



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2020 00754**

(22) Data de depozit: **19/11/2020**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/03/2023** BOPI nr. **3/2023**

(41) Data publicării cererii:
30/06/2021 BOPI nr. **6/2021**

(73) Titular:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE
DEZVOLTARE PENTRU PROTECȚIA
MEDIULUI, SPLAIUL INDEPENDENȚEI
NR. 294, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **ILIE MIHAELA, STR.CETATEA DE BALTĂ,
NR.11-39, BL.31, SC.2, ET.4, AP.37,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **DEAK GYORGY, STR.FLORILOR, BL.43,
SC.2, AP.5, BĂLAN, HR, RO;**
• **GHIȚĂ GINA, SPLAIUL INDEPENDENȚEI,
NR.292A, ET.2, AP.18, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **MARINESCU FLORICA, STR.BURDUJENI,
NR.3A, BL.GC5, SC.A, ET.4, AP.18,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **TOCIU CARMEN, STR.FLOARE ROȘIE
NR.7, BL.51, SC.2, AP.65, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **MATEI MONICA SILVIA, ALEEA CÂLNĂU
10-16, ET.1, AP.14, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **HOLBAN ELENA, STR.TOAMNEI, NR.6C,
SAT DUDU, COMUNA CHIAJNA, IF, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**D. ALVAREZ-MUNOZ ȘI COL.,
"MULTI-RESIDUE METHOD FOR THE
ANALYSIS OF PHARMACEUTICALS AND
SOME OF THEIR METABOLITES IN
BIVALVES", TALANTA, VOL. 136,
PP. 174-182, 2015; M. ILIE ȘI COL.,
"ASSESSMENT OF ANTIBIOTICS FROM
NATURAL WATER RESOURCES AND THE
POTENTIAL ECOLOGICAL RISK
ASSOCIATED WITH THEIR PRESENCE IN
AQUATIC ECOSYSTEMS FOR
DEVELOPING ADVANCED
TECHNOLOGIES FOR REMOVAL OF
ANTIBIOTIC", AIP CONFERENCE
PROCEEDINGS, 2020; M. ZHU ȘI COL.,
"DETERMINATION OF 21 ANTIBIOTICS IN
SEA CUCUMBER USING ACCELERATED
SOLVENT EXTRACTION WITH IN CELL
CLEAN-UP COUPLED TO
ULTRA-PERFORMANCE LIQUID
CHROMATOGRAPHY - TANDEM MASS
SPECTROMETRY", FOOD CHEMISTRY,
VOL. 258, PP. 87-94, 2018;
CN 110702805 A**

(54) **METODĂ DE EXTRAȚIE RAPIDĂ PENTRU DETERMINAREA
ANTIBIOTICELOR DIN BIOTĂ (PEȘTI) PRIN
CROMATOGRAFIE DE LICHIDE DE ULTRA-ÎNALTĂ
PERFORMANȚĂ CUPLATĂ CU SPECTROMETRIE DE MASĂ
ÎN TANDEM (UHPLC-MS/MS)**



RO 135088 B1

1 Invenția se referă la o metodă de extracție rapidă pentru determinarea reziduurilor
de antibiotice din probe de biotă (pește).

3 Principalele îngrijorări ca urmare a prezenței micropoluantilor farmaceutici emergenți
în apele de suprafață sunt potențialul acestora de bioacumulare și bioconcentrare în
5 organismele acvatic. În vederea efectuării acestor cercetări sunt necesare tehnici analitice
cât mai sensibile pentru detecția și cuantificarea micropoluantilor farmaceutici, implicit
7 metode rapide pentru extracția acestora din biotă. Peștii sunt indicatori reprezentativi ai
poluării mediului acvatic datorită capacității lor de a prelua și concentra în țesuturi
9 micropoluantii conținuți în apă.

11 Dintre tehnicile de extracție a diferiților compuși organici din probe de biotă utilizate
în străinătate menționăm: (1) extracția probei de țesut de pește cu acid tricloracetic (TCA
5%) urmată de vortexare (timp de 30 s), omogenizare prin agitare și centrifugare urmată de
13 analiza prin cromatografie lichidă rapidă cu ionizare electrospray-spectrometrie de masă
tandem (LC-ESI-MS/MS) pentru screeningul a șase clase de antibiotice (aminoglicozide,
15 beta-lactami, macrolide, chinolone, sulfonamide și tetraciline); (2) tehnica utilizând ultra-
sunete dezvoltată de Schultz (vezi **M.M. Schultz, E.T. Furlong, D.W.Kolpin, S.L.Werner,
17 H.L. Schoenfuss, LB. Barber, V.S. Blazer, D.O. Norris, A.M. Vajda, *Antidepressant
pharmaceuticals in two U.S. effluent-impacted streams: occurrence and fate in water
19 and sediment, and selective uptake in fish neural tissue*, Environ. Sci. Technol. **44**
(2010) 1918), folosind ca solvent de extracție un amestec de acid acetic/etanol (1:1).
21 Extracția s-a realizat în 3 cicluri (15 min fiecare) și supernatantul colectat după fiecare ciclu
a fost centrifugat la 3500 rpm timp de 5 min; (3) metoda QuEChERS (Quick, easy, cheap,
23 effective, rugged and safe), dezvoltată de Anastassiades și colaboratori (vezi
**Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D, Schenck FJ (2003), *Fast and easy
25 multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive
solid phase extraction" for the determination of pesticides residues in produce. J
27 AOAC Int 86:412-431*) ce implică extracția și purificarea la micro-scară a extractului folosind
extracție dispersivă în fază solidă (d-SPE) și aplicată pentru determinarea pesticidelor din
29 țesut de pește (vezi **M. V. Bărbieri, C. Postigo, N. Guillem-Argiles, L. S. Monllor-Alcaraz,
J. I. Simionato, E. Stella, D. Barcelo, M. Lopez de Aida. *Analysis of 52 pesticides in
31 fresh fish muscle by QuEChERS extraction followed by LC-MS/MS determination.
Science of the Total Environment, Vol. 653, 2019, 958-967*); (4) metoda de extracție
33 lichidă la presiune PLE (pressurized liquid extraction) pentru determinarea din țesut de pește
a compușilor bifenil policlorurați (PCB-uri), hidrocarburi policiclice aromatice (PAH-uri) și
35 pesticide organo-clorurate (OCP-uri) aplicată de Helaleh (vezi **M. I. H. Helaleh, A. Al-
Rashdan., *Automated pressurized liquid extraction (PLE) and automated power-prep™
37 clean-up for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons, organo-chlorinated
pesticides and polychlorinated biphenyls in marine samples. Analytical Methods, vol.
39 6, 2013*).********

41 Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în elaborarea unei metode de
extracție rapidă pentru determinarea reziduurilor de antibiotice din probe de biotă (pești) prin
43 extracție cu solvenți organici (acetonitril și metanol) la temperatură și presiune, urmată de
purificarea extractului prin extracție online pe fază solidă (Solid Phase Extraction -
45 SPEonline) în flux de acetonitril și detecția simultană a antibioticelor doxiciclină și metronida-
zol prin cromatografie de lichide de ultra-înaltă performanță cuplată cu spectrometrie de
47 masă în tandem (UHPLC-MS/MS). Comparativ cu alte metode de extracție raportate în
literatura de specialitate, metoda prezintă un timp de extracție redus, o selectivitate mare și

RO 135088 B1

limite de detecție a antibioticelor doxiciclină și metronidazol la nivel de ng/g. Întregul proces de extracție este complet automatizat și efectuat în câteva minute pentru o extracție rapidă cu consum redus de solvent fiind o alternativă foarte bună la metodele tradiționale pentru extracția poluanților din biotă. Din informațiile noastre, această metodă de extracție pentru detecția antibioticelor din biotă (pești) nu se utilizează sau nu se aplică în condițiile prezentate.

Metoda de extracție pentru determinarea simultană a reziduurilor de antibiotice doxiciclină și metronidazol dintr-o probă de pește prin cromatografie de lichide de ultra-înaltă performanță cuplată cu spectrometrie de masă în tandem (UHPLC-MS/MS), conform invenției, constă în aceea că proba se supune unei extracții accelerate cu solvent (ASE) prin introducerea a 50 g de probă într-o celulă de extracție a unui echipament specific pentru extracția accelerată cu solvent, în prezență de solvent organic acetonitril : metanol în raport volumetric de 1:1, la o temperatură de 80°C, presiune de 1500 PSI, timp static de 15 min și 1 ciclu static, volum de spălare de 60% și timp de purjare cu azot de 250 sec, extractul obținut fiind apoi purificat prin extracție online pe fază solidă (SPEonline) în flux de acetonitril, urmat de detecția simultană a doxiciclinei și metronidazolului prin UHPLC-MS/MS.

Metoda constă din următoarele etape: (1) proba de biotă (pește) se introduce într-o celulă de extracție și se realizează extracția cu un amestec de solvenți acetonitril și metanol la temperatură de 80°C și presiune de 1500 PSI, utilizând echipamentul ASE (Accelerated Solvent Extraction); (2) extractul obținut se purifică prin extracție online pe fază solidă (Solid Phase Extraction - SPEonline) în flux de acetonitril; (3) determinarea simultană a două antibiotice, respectiv doxiciclină și metronidazol, prin cromatografie de lichide de ultra-înaltă performanță cuplată cu spectrometrie de masă în tandem (UHPLC-MS/MS).

O celulă de extracție din inox de 100 ml a fost umplută cu o cantitate de țesut de pește, uscat prin congelare și mărunțit în vederea omogenizării și pământ diatomitic (agent de uscare). La cele două extremități ale celulei au fost introduse filtre din celuloză. Extracția a fost efectuată în următoarele condiții optime experimentale: solvenți de extracție a antibioticelor acetonitrikmetanol (1:1, v/v), temperatura de 80°C, presiunea de 1500 PSI, o cantitate de probă de biotă (pește) de 50 g, un timp static de 15 min și 1 ciclu static, un volum de spălare de 60% și un timp de purjare cu azot de 250 s. Extracția s-a realizat cu echipamentul Dionex ASE 350 (Accelerated Solvent Extraction).

Extractul obținut se utilizează pentru identificarea și cuantificarea antibioticelor prin metoda SPEonline-UHPLC-MS/MS. Metoda cel mai frecvent utilizată pentru detecția micropoluanților farmaceutici din diferite matrici de mediu este extracția pe fază solidă (SPEoffline) urmată de cromatografie de lichide cuplată cu spectrometrie de masă în tandem (HPLC-MS/MS). Comparativ cu această tehnică, deși se obțin rezultate comparabile ca selectivitate și sensibilitate, metoda utilizată pentru detecția de antibiotice prin tehnica SPEonline prezintă avantajul separării compușilor de interes mult mai rapid, cu consum redus de solvenți față de tehnica SPEoffline și extracția lichid-lichid (LLE) folosită în mod tradițional, urmată de detecția cu ajutorul unui spectrometru de masă triplu cuadrupol.

În continuare se prezintă un exemplu pentru aplicarea metodei conform invenției. Pentru a demonstra aplicabilitatea metodei inovative de extracție, aceasta a fost aplicată pentru determinarea antibioticelor doxiciclină și metronidazol, la nivel de ng/g într-o probă de biotă (pește) din Fluviul Dunărea - zona Braț Epurașu. Extracția s-a realizat într-o celulă de extracție din inox de 100 ml în care s-a introdus o cantitate de țesut de pește de 50 g, uscat prin congelare și mărunțit în vederea omogenizării și pământ diatomitic (agent de uscare). La cele două extremități ale celulei au fost introduse filtre din celuloză. Extracția a fost efectuată în următoarele condiții optime experimentale: solvenți de extracție a

RO 135088 B1

antibioticelor acetonitril:metanol (1:1, v/v), temperatura de 80°C, presiunea de 1500 PSI, o cantitate de probă de biotă (pește) de 50 g, un timp static de 15 min și 1 ciclu static, un volum de spălare de 60% și un timp de purjare cu azot de 250 s. Extracția s-a realizat cu echipamentul Dionex ASE 350 (Accelerated Solvent Extraction).

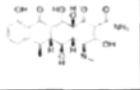

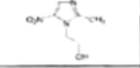

Compușii țintă, respectiv antibioticele doxiciclină și metronidazol, au fost identificate și cuantificate într-o singură injecție, cu un timp de rulare cromatografică de numai 14 min. Detecția și cuantificarea antibioticelor doxiciclină și metronidazol din extractul obținut prin metoda descrisă anterior s-a realizat cu echipamentul SPE-online-UHPLC-MS/MS Thermo Fisher Scientific™ EQuan MAX Plus™ UltiMate 3000 sistem cuplat cu spectrometru de masă triplu cuadrupol TSQ Quantiva. Sistemul oferă performanțe cantitative excepționale cu un nivel de sensibilitate de atograme, (10^{-18} g). Tehnica utilizată este cea mai sensibilă și selectivă în comparație cu alte tehnici analitice utilizate frecvent, permițând detecția și cuantificarea poluanților emergenți din categoria produselor farmaceutice la nivel de ng/g.

Sistemul a fost echipat cu o coloană de separare SPEonline de tip Thermo Scientific Hypersil GOLD C18. Fazele mobile au fost compuse din apă cu 0,1% soluție de acid formic ca fază mobilă A și acetonitril cu 0,1% soluție de acid formic ca fază mobilă B. Debitul a fost de $0,3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

Spectrometru de masă triplu cuadrupol TSQ QUANTIVA (ThermoFisher, SUA), echipat cu o interfață de ionizare prin pulverizare electronică (ESI), selectat în modul ion pozitiv, a fost utilizat pentru detecția celor două antibiotice doxiciclină și metronidazol. Condițiile optime de monitorizare selectivă a reacțiilor (SRM) au fost efectuate la următorii parametri: tensiunea de pulverizare ionică, 3500 V; temperatura tubului de transfer de ioni, 350°C; temperatura sursei de ioni, 300°C. Valorile energiei de coliziune și tranzițiile pentru modul SRM, sunt prezentate în tabelul 1:

Parametrii de funcționare în modul SRM pentru detecția antibioticelor doxiciclină și metronidazol

Tabelul 1

Compus	Timp de retenție (min)	Polaritate	Precursor ion (m/z)	Prođuși (m/z)	Energie de coliziune (V)	Formulă chimică
Doxiciclină	4.8	Positiv	445.2	154 428	27 18	 <p>Formulă moleculară: $C_{22}H_{33}N_5O_6$</p> <p>Masă moleculară: 444,43 g/mol</p>
						
Metronidazol	4.2	Positiv	172	82 128	23.9 14	 <p>Formulă moleculară: $C_6H_9N_3O_3$</p> <p>Masă moleculară: 171,064 g/mol</p>
						

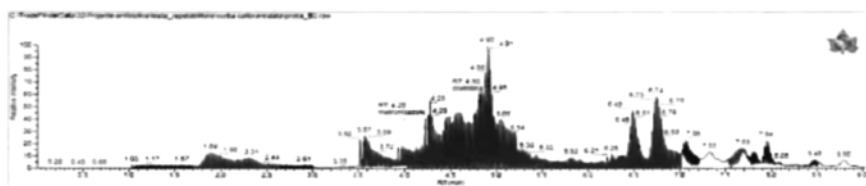


Fig. 1

RO 135088 B1

Dezvoltarea metodei pentru detecția antibioticelor doxiciclină și metronidazol a fost realizată în conformitate cu criteriile de confirmare cantitativă descrise în Decizia 2002/657/CE de stabilire a normelor de aplicare a Directivei 96/23/CE a Consiliului privind funcționarea metodelor de analiză și interpretarea rezultatelor.	1 3
Antibioticele doxiciclină și metronidazol au fost detectate în proba de biotă la nivelul de 6,35 ng/g și respectiv 0,16 ng/g. Caracteristicile de performanță ale metodei au fost evaluate în ceea ce privește liniaritatea, precizia și limitele de detecție. Precizia metodei, calculată ca abatere standard relativă (RSD), a fost de 2,8% pentru metronidazol și 3,0% pentru doxiciclină. Limita de detecție pentru compușii țintă a fost de 0,04 ng/g.	5 7 9

RO 135088 B1

1

Revendicare

3

Metodă de extracție pentru determinarea simultană a reziduurilor de antibiotice doxiciclină și metronidazol dintr-o probă de pește prin cromatografie de lichide de ultra-înaltă performanță cuplată cu spectrometrie de masă în tandem (UHPLC-MS/MS) **caracterizată**

5

prin aceea că proba se supune unei extracții accelerate cu solvent (ASE) prin introducerea

7

a 50 g de probă într-o celulă de extracție a unui echipament specific pentru extracția accelerată cu solvent, în prezență de solvent organic acetonitril:metanol în raport volumetric

9

de 1:1, la o temperatură de 80°C, presiune de 1500 PSI, timp static de 15 min și 1 ciclu static, volum de spălare de 60% și timp de purjare cu azot de 250 s, extractul obținut fiind

11

apoi purificat prin extracție online pe fază solidă (SPE online) în flux de acetonitril, urmat de detecția simultană a doxiciclinei și metronidazolului prin UHPLC-MS/MS.



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 127/2023