

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201700530** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2019.04.30

(51) Int. Cl. **G01N 21/00** (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2017.10.30

(54) **СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕНСУЛТАПА В ЛЕКАРСТВЕННОМ РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ**

(96) **2017000111 (RU) 2017.10.30**

(71) Заявитель:
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ "КУРСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ"
МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (RU)**

(72) Изобретатель:
**Шорманов Владимир Камбулатович,
Баранов Юрий Николаевич,
Коваленко Евгений Анатольевич,
Сухомлинов Юрий Анатольевич (RU)**

(74) Представитель:
Куприянова З.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к биологии, экологии, токсикологической и санитарной химии и может быть применено для контроля содержания бенсултапа в лекарственном растительном сырье. Растительный объект измельчают, обрабатывают четырехкратным по массе количеством смеси ацетонитрил-дихлорэтан-этилацетат 6:2:2 по объему, извлечение обезвоживают, испаряют, остаток растворяют в ацетоне, хроматографируют в макроколонке с силикагелем "Merk" 40/63 м, элюируя последовательно гексаном и смесью диэтиловый эфир-гексан 8:2 по объему, фракции элюата, содержащие анализируемое вещество, испаряют, остаток растворяют в дихлорметане и проводят определение методом хромато-масс-спектрометрии в капиллярной колонке с 5%-фенил-95%-метилполисилоксаном, используя газ-носитель гелий, подаваемый со скоростью 0,6 мл/мин, и масс-селективный детектор электронного удара, начальная температура колонки 70°C, ее выдерживают 3 мин, повышают со скоростью 20°C/мин до 290°C и выдерживают 16 мин, температура инжектора 250°C, квадруполя 150°C, интерфейса детектора 300°C, регистрируют масс-спектр по полному ионному току и вычисляют количество бенсултапа по площади хроматографического пика. Способ обеспечивает повышение чувствительности.

A1

201700530

201700530

A1

СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕНСУЛТАПА В ЛЕКАРСТВЕННОМ РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ

Изобретение относится к биологии, экологии, токсикологической и санитарной химии, а именно к способам определения бенсултапа (2-диметиламино-1,3-бис-(фенилсульфонилтио)пропана) в лекарственном растительном сырье, и может быть использовано в практике центров по контролю качества лекарственных средств, санэпидстанций, химико-токсикологических и экологических лабораторий. Способ относится к числу массовых.

Известен способ определения бенсултапа в растительном биологическом материале (клубнях картофеля) путём измельчения биологического объекта, трёхкратной обработки в режиме встряхивания с порциями гексана, масса каждой из которых в два раза превышает массу биоматериала, отделения извлечений, их объединения, обезвоживания безводным сульфатом натрия, упаривания до незначительного объёма, определения методом ТСХ в тонком слое широкопористого силикагеля на пластинах «Силуфол» с использованием подвижной фазы гексан-ацетон (3:2) (Методы определения микроколичеств пестицидов в продуктах питания, кормах и внешней среде. Т. 1 / М.А. Клисенко, А.А. Калинина, К.Ф. Новикова, Г.А. Хохолькова. – М.: Колос, 1992.-С. 190-192).

Способ отличается относительно низкой чувствительностью и недостаточно высокой точностью определения.

Известен способ определения бенсултапа (2-диметиламино-1,3-бис-(фенилсульфонилтио)пропана) в растительном биологическом материале, заключающийся в том, что растительный биологический объект измельчают, содержащийся в нём бенсултап переводят в нереистоксин путём последовательной обработки измельчённого объекта кислотным раствором цистеина, раствором хлорида никеля и концентрированным раствором аммиака, центрифугирования реакционной смеси и промывания остатка щелочным раствором цистеина, образующийся нереистоксин экстрагируют

из водно-щелочного раствора диэтиловым эфиром, эфирный экстракт отделяют, обезвоживают безводным сульфатом натрия, упаривают, экстрагируют кисло-водным раствором, кисло-водное извлечение отделяют, подщелачивают раствором аммиака, водно-щелочной раствор экстрагируют дихлорметаном, дихлорметановый экстракт отделяют, обезвоживают безводным сульфатом натрия, испаряют до сухого остатка, остаток растворяют в метаноле и проводят определение физико-химическим методом, которым является ГЖХ, в набивной колонке длиной 1,5 м и внутренним диаметром 3 мм, заполненной газохромом Q (60/80 меш) с 5% полиэтиленгликоля ПЭГ-20, используя газ-носитель азот, подаваемый со скоростью 30 мл/мин, и пламенно-фотометрический детектор, при температуре термостата колонки 165°C, детектора – 200°C, инжектора – 200°C, вычисляя количество бенсултапа по площади хроматографического пика нереистоксина.

Способ характеризуется недостаточно высокими чувствительностью и точностью определения.

Наиболее близким является способ определения бенсултапа в лекарственном растительном сырье, который заключается в том, что растительный биологический объект измельчают, двукратно по 30 минут обрабатывают порциями органического изолирующего агента, которым является ацетонитрил, при условии, что масса каждой порции изолирующего агента в 4 раза превышает массу биологического объекта, полученные органические извлечения объединяют, обезвоживают безводным сульфатом натрия, растворитель из объединённого извлечения испаряют, остаток растворяют в хлороформе, хроматографируют в макроколонке с силикагелем L 40/100 м, вначале пропускают через неё гексан, а затем элюируют смесью растворителей гексан – диоксан – пропанол-2 в соотношении 8:3:0,6 по объёму, фракции элюата, содержащие анализируемое вещество, объединяют, элюент испаряют, остаток растворяют в смеси растворителей гексан – диоксан – пропанол-2 в соотношении 15:5:1 по объёму и проводят

определение физико-химическим методом, которым является ВЭЖХ, в колонке размерами 64×2 мм, заполненной неподвижной фазой «Силасорб 600», с применением подвижной фазы гексан - диоксан - пропанол-2 в соотношении 15:5:1 по объему и УФ-детектора.

Способ характеризуется недостаточно высокой чувствительностью определения.

Техническим результатом настоящего изобретения является повышение чувствительности определения.

Технический результат достигается тем, что растительный биологический объект измельчают, двукратно по 30 минут обрабатывают порциями органического изолирующего агента, которым является смесь ацетонитрил-дихлорэтан-этилацетат в соотношении 6:2:2 по объёму, при условии, что масса каждой порции изолирующего агента в 4 раза превышает массу биологического объекта, полученные органические извлечения объединяют, обезвоживают безводным сульфатом натрия, растворитель из объединённого извлечения испаряют, остаток растворяют в ацетоне, хроматографируют в макроколонке с силикагелем «Merk» 40/63 μ , вначале пропуская через неё гексан, а затем элюируя смесью растворителей диэтиловый эфир-гексан в соотношении 8:2 по объёму, фракции элюата, содержащие анализируемое вещество, объединяют, элюент испаряют, остаток растворяют в дихлорметане и проводят определение физико-химическим методом, которым является хромато-масс-спектрометрия, в капиллярной колонке DB-5 MS EVIDEX длиной 25 м и внутренним диаметром 0,2 мм с неподвижной фазой, представляющей собой 5%-фенил-95%-метилполисилоксан, при толщине плёнки неподвижной фазы 0,33 мкм, используя газ-носитель гелий, подаваемый со скоростью 0,6 мл/мин, и масс-селективный детектор, работающий в режиме электронного удара, начальная температура термостата колонки составляет 70°C, данная температура выдерживается в течение 3 минут, в дальнейшем температура повышается от 70°C до 290°C со скоростью 20°C в минуту, конечная температура колонки

выдерживается в течение 16 минут, температура инжектора составляет 250°C, температура квадруполя 150°C, температура интерфейса детектора 300°C, регистрируют интенсивность сигнала, обусловленного заряженными частицами, образующимися при бомбардировке анализируемого вещества, вышедшего из капиллярной колонки и попавшего в источник ионов, ионизирующим пучком электронов с энергией 70 эВ, регистрируют масс-спектр по полному ионному току и вычисляют количество бенсультапа по площади хроматографического пика.

Способ осуществляется следующим образом: растительный биологический объект, содержащий бенсультап, измельчают, двукратно по 30 минут обрабатывают порциями органического изолирующего агента, которым является смесь ацетонитрил-дихлорэтан-этилацетат в соотношении 6:2:2 по объёму, при условии, что масса каждой порции изолирующего агента в 4 раза превышает массу биологического объекта, полученные органические извлечения объединяют, обезвоживают безводным сульфатом натрия, растворитель из объединённого извлечения испаряют, остаток растворяют в ацетоне, хроматографируют в макроколонке с силикагелем «Merk» 40/63 μ , вначале пропускают через неё гексан, а затем элюируют смесью растворителей диэтиловый эфир-гексан в соотношении 8:2 по объёму, фракции элюата, содержащие анализируемое вещество, объединяют, элюент испаряют, остаток растворяют в дихлорметане и проводят определение физико-химическим методом, которым является хромато-масс-спектрометрия, в капиллярной колонке DB-5 MS EVIDEX длиной 25 м и внутренним диаметром 0,2 мм с неподвижной фазой, представляющей собой 5%-фенил-95%-метилполисилоксан, при толщине плёнки неподвижной фазы 0,33 мкм, используя газ-носитель гелий, подаваемый со скоростью 0,6 мл/мин, и масс-селективный детектор, работающий в режиме электронного удара, начальная температура термостата колонки составляет 70°C, данная температура выдерживается в течение 3 минут, в дальнейшем температура повышается от 70°C до 290°C со скоростью 20°C в минуту, конечная

температура колонки выдерживается в течение 16 минут, температура инжектора составляет 250°C, температура квадруполя 150°C, температура интерфейса детектора 300°C, регистрируют интенсивность сигнала, обусловленного заряженными частицами, образующимися при бомбардировке анализируемого вещества, вышедшего из капиллярной колонки и попавшего в источник ионов, ионизирующим пучком электронов с энергией 70 эВ, регистрируют масс-спектр по полному ионному току и вычисляют количество бенсультапа по площади хроматографического пика.

Способ иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1

Определение бенсультапа в корнях одуванчика лекарственного

К 10 г мелкоизмельченной ткани корней одуванчика прибавляют 10 мг бенсультапа (2-диметиламино-1,3-бис-(фенилсульфонилтио)пропана), тщательно перемешивают биологическую ткань с веществом и оставляют на полтора часа при температуре 18-20°C. По истечении указанного времени растительный биологический объект, содержащий анализируемое вещество, двукратно обрабатывают порциями органического изолирующего агента, которым является смесь ацетонитрил-дихлорэтан-этилацетат в соотношении 6:2:2 по объёму, при условии, что масса каждой порции изолирующего агента в 4 раза превышает массу биологического объекта. При этом биологический объект заливают 40 г смеси ацетонитрил-дихлорэтан-этилацетат в соотношении 6:2:2 по объёму и выдерживают 30 минут при периодическом перемешивании. Извлечение отделяют от твердых частиц биоматериала, операцию настаивания повторяют в указанных условиях. Полученные органические извлечения объединяют, обезвоживают безводным сульфатом натрия путём фильтрования через стеклянный фильтр диаметром 4 см со слоем безводного сульфата натрия высотой 1-1,5 см. Фильтр дополнительно промывают 20 г смеси ацетонитрил-дихлорэтан-этилацетат в соотношении 6:2:2 по объёму. Фильтрат и промывную жидкость

объединяют, растворитель из объединённого извлечения испаряют в токе воздуха при комнатной температуре. Остаток растворяют в 4 мл ацетона, 2 мл полученного раствора смешивают с 1 г силикагеля «Merk» 40/63 μ и испаряют остатки ацетона из сорбента в токе воздуха.

В колонку размером 490×10 мм вносят вначале 9 г силикагеля «Merk» 40/63 μ , а затем, поверх образующегося слоя, – 1 г силикагеля «Merk» 40/63 μ , содержащего анализируемое вещество, предварительно введённое в виде ацетонового раствора. Хроматографируют в колонке силикагеля «Merk» 40/63 μ , вначале пропуская через колонку гексан. После истечения из колонки 20 мл элюата растворитель, находящийся над поверхностью столба сорбента, удаляют и начинают элюировать смесью растворителей диэтиловый эфир-гексан в соотношении 8:2 по объёму. С момента начала подачи системы растворителей диэтиловый эфир-гексан в соотношении 8:2 по объёму выходящий из колонки элюат собирают отдельными фракциями по 2 мл каждая. Фракции элюата с 18 по 24 включительно, содержащие анализируемое вещество, объединяют в выпарительной чашке, элюент испаряют в токе воздуха при комнатной температуре. Остаток растворяют в 10 мл дихлорметана (раствор А). 2,5 мл раствора А вносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят дихлорметаном до метки (раствор Б) и проводят определение физико-химическим методом, которым является хромато-масс-спектрометрия.

В процессе определения 4 мкл раствора Б вводят в хромато-масс-спектрометр.

Определение проводят, используя газовый хроматограф фирмы Agilent Technologies (США) модели 6850 Network GC System с квадрупольным масс-селективным детектором модели 5973 Network этой же фирмы.

Хроматографирование осуществляют в кварцевой капиллярной колонке DB-5 MS EVIDEX длиной 25 м и внутренним диаметром 0,2 мм с неподвижной фазой, представляющей собой 5%-фенил-95%-метилполисилоксан, при толщине плёнки неподвижной фазы 0,33 мкм.

В качестве газа-носителя используется гелий. Подача газа-носителя производится со скоростью 0,6 мл/мин. Режим без деления потока. Масс-селективный детектор работает в режиме электронного удара (70 эВ). Регистрация масс-спектра проводится по полному ионному току с задержкой 3,5 минуты. Диапазон сканирования соответствует интервалу 40-500 m/z.

Начальная температура термостата колонки составляет 70°C, данная температура выдерживается в течение 3 минут, в дальнейшем температура повышается от 70°C до 290°C со скоростью 20°C в минуту, конечная температура колонки выдерживается в течение 16 минут, температура инжектора составляет 250°C, температура квадруполя 150°C, температура интерфейса детектора 300°C, регистрируют интенсивность сигнала, обусловленного заряженными частицами, образующимися при бомбардировке анализируемого вещества, вышедшего из капиллярной колонки и попавшего в источник ионов, ионизирующим пучком электронов с энергией 70 эВ, регистрируют масс-спектр по полному ионному току и вычисляют количество анализируемого вещества, которым является бенсултап, по площади хроматографического пика с временем удерживания $9,24 \pm 0,011$, используя уравнение градуировочного графика, и пересчитывают на навеску вещества, внесенную в ткань корней одуванчика.

Построение градуировочного графика

В ряд мерных колб вместимостью 25 мл вносят 0,1, 0,25, 0,5, 1,0, 2,5, 4,0, 5,0, 6,0 и 7,5 мл 0,1% раствора бенсултапа в дихлорметане и доводят объём содержимого каждой колбы до метки дихлорметаном.

4 мкл каждого из полученных растворов вводят в хромато-масс-спектрометр.

Определение проводят, используя газовый хроматограф фирмы Agilent Technologies (США) модели 6850 Network GC System с квадрупольным масс-селективным детектором модели 5973 Network этой же фирмы.

Хроматографирование осуществляют в кварцевой капиллярной колонке DB-5 MS EVIDEX длиной 25 м и внутренним диаметром 0,2 мм с

неподвижной фазой, представляющей собой 5%-фенил-95%-метилполисилоксан, при толщине плёнки неподвижной фазы 0,33 мкм.

В качестве газа-носителя используется гелий. Подача газа-носителя производится со скоростью 0,6 мл/мин. Режим без деления потока. Масс-селективный детектор работает в режиме электронного удара (70 эВ). Регистрация масс-спектра проводится по полному ионному току с задержкой 3,5 минуты. Диапазон сканирования соответствует интервалу 40-500 m/z.

Начальная температура термостата колонки составляет 70°C, данная температура выдерживается в течение 3 минут, в дальнейшем температура повышается от 70°C до 290°C со скоростью 20°C в минуту, конечная температура колонки выдерживается в течение 16 минут, температура инжектора составляет 250°C, температура квадруполя 150°C, температура интерфейса детектора 300°C, регистрируют интенсивность сигнала, обусловленного заряженными частицами, образующимися при бомбардировке анализируемого вещества, вышедшего из капиллярной колонки и попавшего в источник ионов, ионизирующим пучком электронов с энергией 70 эВ, регистрируют масс-спектр по полному ионному току и вычисляют количество анализируемого вещества, которым является бенсултап, по площади хроматографического пика с временем удерживания $9,24 \pm 0,011$.

По результатам измерений на хромато-масс-спектрометре строят график зависимости площади пика от концентрации определяемого вещества. График линеен в интервале концентраций $1,6 \cdot 10^{-8} - 1,2 \cdot 10^{-6}$ г.

Методом наименьших квадратов рассчитывают уравнение градуировочного графика, которое в данном случае имеет вид:

$$S = 5460 \cdot C - 5677,$$

где S – площадь хроматографического пика; C – концентрация определяемого вещества в хроматографируемой пробе, нг.

Результаты количественного определения бенсултапа в ткани корней одуванчика представлены в таблице 1.

Пример 2

Определение бенсультапа в траве пастушьей сумки

К 10 г мелкоизмельченной ткани травы пастушьей сумки прибавляют 10 мг бенсультапа (2-диметиламино-1,3-бис-(фенилсульфонилтио)пропана), тщательно перемешивают биологическую ткань с веществом и оставляют на полтора часа при температуре 18-20°C. По истечении указанного времени растительный биологический объект, содержащий анализируемое вещество, двукратно обрабатывают порциями органического изолирующего агента, которым является смесь ацетонитрил-дихлорэтан-этилацетат в соотношении 6:2:2 по объёму, при условии, что масса каждой порции изолирующего агента в 4 раза превышает массу биологического объекта. При этом биологический объект заливают 40 г смеси ацетонитрил-дихлорэтан-этилацетат в соотношении 6:2:2 по объёму и выдерживают 30 минут при периодическом перемешивании. Извлечение отделяют от твердых частиц биоматериала, операцию настаивания повторяют в указанных условиях. Полученные органические извлечения объединяют, обезвоживают безводным сульфатом натрия путём фильтрования через стеклянный фильтр диаметром 4 см со слоем безводного сульфата натрия высотой 1-1,5 см. Фильтр дополнительно промывают 20 г смеси ацетонитрил-дихлорэтан-этилацетат в соотношении 6:2:2 по объёму. Фильтрат и промывную жидкость объединяют, растворитель из объединённого извлечения испаряют в токе воздуха при комнатной температуре. Остаток растворяют в 4 мл ацетона, 2 мл полученного раствора смешивают с 1 г силикагеля «Merk» 40/63 μ и испаряют остатки ацетона из сорбента в токе воздуха.

В колонку размером 490×10 мм вносят вначале 9 г силикагеля «Merk» 40/63 μ , а затем, поверх образующегося слоя, – 1 г силикагеля «Merk» 40/63 μ , содержащего анализируемое вещество, предварительно введённое в виде ацетонового раствора. Хроматографируют в колонке силикагеля «Merk» 40/63 μ , вначале пропуская через колонку гексан. После истечения из колонки 20 мл элюата растворитель, находящийся над поверхностью столба

сорбента, удаляют и начинают элюировать смесью растворителей диэтиловый эфир-гексан в соотношении 8:2 по объёму. С момента начала подачи системы растворителей диэтиловый эфир-гексан в соотношении 8:2 по объёму выходящий из колонки элюат собирают отдельными фракциями по 2 мл каждая. Фракции элюата с 18 по 24 включительно, содержащие анализируемое вещество, объединяют в выпарительной чашке, элюент испаряют в токе воздуха при комнатной температуре. Остаток растворяют в 10 мл дихлорметана (раствор А). 2,5 мл раствора А вносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят дихлорметаном до метки (раствор Б) и проводят определение физико-химическим методом, которым является хромато-масс-спектрометрия.

В процессе определения 4 мкл раствора Б вводят в хромато-масс-спектрометр.

Определение проводят, используя газовый хроматограф фирмы Agilent Technologies (США) модели 6850 Network GC System с квадрупольным масс-селективным детектором модели 5973 Network этой же фирмы.

Хроматографирование осуществляют в кварцевой капиллярной колонке DB-5 MS EVIDEX длиной 25 м и внутренним диаметром 0,2 мм с неподвижной фазой, представляющей собой 5%-фенил-95%-метилполисилоксан, при толщине плёнки неподвижной фазы 0,33 мкм.

В качестве газа-носителя используется гелий. Подача газа-носителя производится со скоростью 0,6 мл/мин. Режим без деления потока. Масс-селективный детектор работает в режиме электронного удара (70 эВ). Регистрация масс-спектра проводится по полному ионному току с задержкой 3,5 минуты. Диапазон сканирования соответствует интервалу 40-500 m/z.

Начальная температура термостата колонки составляет 70°C, данная температура выдерживается в течение 3 минут, в дальнейшем температура повышается от 70°C до 290°C со скоростью 20°C в минуту, конечная температура колонки выдерживается в течение 16 минут, температура инжектора составляет 250°C, температура квадруполья 150°C, температура

интерфейса детектора 300°C, регистрируют интенсивность сигнала, обусловленного заряженными частицами, образующимися при бомбардировке анализируемого вещества, вышедшего из капиллярной колонки и попавшего в источник ионов, ионизирующим пучком электронов с энергией 70 эВ, регистрируют масс-спектр по полному ионному току и вычисляют количество анализируемого вещества, которым является бенсултап, по площади хроматографического пика с временем удерживания $9,24 \pm 0,011$, используя уравнение градуировочного графика, и пересчитывают на навеску вещества, внесенную в ткань травы пастушьей сумки.

Построение градуировочного графика и его уравнение приводятся выше в примере 1.

Результаты количественного определения бенсултапа в ткани травы пастушьей сумки представлены в таблице 2.

Пример 3

О п р е д е л е н и е б е н с у л т а п а в к о р н я х л а б а з н и к а в я з о -
л и с т н о г о

К 10 г мелкоизмельченной ткани корней лабазника вязолистного прибавляют 10 мг бенсултапа (2-диметиламино-1,3-бис-(фенилсульфонилтио)пропана), тщательно перемешивают биологическую ткань с веществом и оставляют на полтора часа при температуре 18-20°C. По истечении указанного времени растительный биологический объект, содержащий анализируемое вещество, двукратно обрабатывают порциями органического изолирующего агента, которым является смесь ацетонитрил-дихлорэтан-этилацетат в соотношении 6:2:2 по объёму, при условии, что масса каждой порции изолирующего агента в 4 раза превышает массу биологического объекта. При этом биологический объект заливают 40 г смеси ацетонитрил-дихлорэтан-этилацетат в соотношении 6:2:2 по объёму и выдерживают 30 минут при периодическом перемешивании. Извлечение отделяют от твердых частиц биоматериала, операцию настаивания

повторяют в указанных условиях. Полученные органические извлечения объединяют, обезвоживают безводным сульфатом натрия путём фильтрования через стеклянный фильтр диаметром 4 см со слоем безводного сульфата натрия высотой 1-1,5 см. Фильтр дополнительно промывают 20 г смеси ацетонитрил-дихлорэтан-этилацетат в соотношении 6:2:2 по объёму. Фильтрат и промывную жидкость объединяют, растворитель из объединённого извлечения испаряют в токе воздуха при комнатной температуре. Остаток растворяют в 4 мл ацетона, 2 мл полученного раствора смешивают с 1 г силикагеля «Merk» 40/63 μ и испаряют остатки ацетона из сорбента в токе воздуха.

В колонку размером 490×10 мм вносят вначале 9 г силикагеля «Merk» 40/63 μ , а затем, поверх образующегося слоя, – 1 г силикагеля «Merk» 40/63 μ , содержащего анализируемое вещество, предварительно введённое в виде ацетонового раствора. Хроматографируют в колонке силикагеля «Merk» 40/63 μ , вначале пропуская через колонку гексан. После истечения из колонки 20 мл элюата растворитель, находящийся над поверхностью столба сорбента, удаляют и начинают элюировать смесью растворителей диэтиловый эфир-гексан в соотношении 8:2 по объёму. С момента начала подачи системы растворителей диэтиловый эфир-гексан в соотношении 8:2 по объёму выходящий из колонки элюат собирают отдельными фракциями по 2 мл каждая. Фракции элюата с 18 по 24 включительно, содержащие анализируемое вещество, объединяют в выпарительной чашке, элюент испаряют в токе воздуха при комнатной температуре. Остаток растворяют в 10 мл дихлорметана (раствор А). 2,5 мл раствора А вносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят дихлорметаном до метки (раствор Б) и проводят определение физико-химическим методом, которым является хромато-масс-спектрометрия.

В процессе определения 4 мкл раствора Б вводят в хромато-масс-спектрометр.

Определение проводят, используя газовый хроматограф фирмы Agilent Technologies (США) модели 6850 Network GC System с квадрупольным масс-селективным детектором модели 5973 Network этой же фирмы.

Хроматографирование осуществляют в кварцевой капиллярной колонке DB-5 MS EVIDEX длиной 25 м и внутренним диаметром 0,2 мм с неподвижной фазой, представляющей собой 5%-фенил-95%-метилполисилоксан, при толщине плёнки неподвижной фазы 0,33 мкм.

В качестве газа-носителя используется гелий. Подача газа-носителя производится со скоростью 0,6 мл/мин. Режим без деления потока. Масс-селективный детектор работает в режиме электронного удара (70 эВ). Регистрация масс-спектра проводится по полному ионному току с задержкой 3,5 минуты. Диапазон сканирования соответствует интервалу 40-500 m/z.

Начальная температура термостата колонки составляет 70°C, данная температура выдерживается в течение 3 минут, в дальнейшем температура повышается от 70°C до 290°C со скоростью 20°C в минуту, конечная температура колонки выдерживается в течение 16 минут, температура инжектора составляет 250°C, температура квадрупольного полюса 150°C, температура интерфейса детектора 300°C, регистрируют интенсивность сигнала, обусловленного заряженными частицами, образующимися при бомбардировке анализируемого вещества, вышедшего из капиллярной колонки и попавшего в источник ионов, ионизирующим пучком электронов с энергией 70 эВ, регистрируют масс-спектр по полному ионному току и вычисляют количество анализируемого вещества, которым является бенсултап, по площади хроматографического пика с временем удерживания $9,24 \pm 0,011$, используя уравнение градуировочного графика, и пересчитывают на навеску вещества, внесенную в ткань корней лабазника вязолистного.

Построение градуировочного графика и его уравнение приводятся выше в примере 1.

Результаты количественного определения бенсултапа в ткани корней лабазника вязолистного представлены в таблице 3.

Предлагаемый способ по сравнению с прототипом в 2 раза повышает чувствительность определения в биологическом материале и в 2,5 раз в хроматографируемой пробе. Сравнительная характеристика предлагаемого и известного способов представлена в таблице 4.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ определения бенсультапа в лекарственном растительном сырье, заключающийся в том, что растительный биологический объект измельчают, двукратно по 30 минут обрабатывают порциями органического изолирующего агента, полученные органические извлечения объединяют, обезвоживают безводным сульфатом натрия, растворитель из объединённого извлечения испаряют, остаток растворяют, хроматографируют в макроколонке с силикагелем, вначале пропуская через неё гексан, а затем элюируя смесью растворителей, фракции элюата, содержащие анализируемое вещество, объединяют, элюент испаряют, остаток растворяют и проводят определение физико-химическим методом в колонке, заполненной неподвижной фазой, отличающийся тем, что органическим изолирующим агентом является смесь ацетонитрил-дихлорэтан-этилацетат в соотношении 6:2:2 по объёму, остаток, полученный после испарения растворителя из объединённого извлечения, растворяют в ацетоне, в качестве силикагеля для хроматографирования в макроколонке используется силикагель «Merk» 40/63 μ , для элюирования из макроколонки с силикагелем применяют смесь растворителей диэтиловый эфир-гексан в соотношении 8:2 по объёму, остаток, полученный после испарения элюента, растворяют в дихлорметане, в качестве физико-химического метода используется хромато-масс-спектрометрия, определение проводят в капиллярной колонке DB-5 MS EVIDEX длиной 25 м и внутренним диаметром 0,2 мм с неподвижной фазой, представляющей собой 5%-фенил-95%-метилполисилоксан, при толщине плёнки неподвижной фазы 0,33 мкм, используя газ-носитель гелий, подаваемый со скоростью 0,6 мл/мин, и масс-селективный детектор, работающий в режиме электронного удара, начальная температура термостата колонки составляет 70°C, данная температура выдерживается в течение 3 минут, в дальнейшем температура повышается от 70°C до 290°C со скоростью 20°C в минуту, конечная температура колонки выдерживается в

течение 16 минут, температура инжектора составляет 250°C, температура квадруполя 150°C, температура интерфейса детектора 300°C, регистрируют интенсивность сигнала, обусловленного заряженными частицами, образующимися при бомбардировке анализируемого вещества, вышедшего из капиллярной колонки и попавшего в источник ионов, ионизирующим пучком электронов с энергией 70 эВ, регистрируют масс-спектр по полному ионному току и вычисляют количество бенсультапа по площади хроматографического пика.


ЕВРАЗИЙСКОЕ ПАТЕНТНОЕ ВЕДОМСТВО

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42
Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

201700530

Дата подачи: 30 октября 2017 (30.10.2017)		Дата испрашиваемого приоритета:
Название изобретения: Способ определения бенсултапа в лекарственном растительном сырье		
Заявитель: ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ "КУРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ" МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАЩЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ		
<input type="checkbox"/> Некоторые пункты формулы не подлежат поиску (см. раздел I дополнительного листа) <input type="checkbox"/> Единство изобретения не соблюдено (см. раздел II дополнительного листа)		
А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:		G01N 21/00 (2006.01)
Согласно международной патентной классификации (МПК)		
Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:		
Минимум просмотренной документации (система классификации и индексы МПК) A61K 31/10, 36/00, G01N 21/00		
Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в область поиска:		
В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ		
Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	ШОРМАНОВ В.К. и др. Определение бенсултапа в биологическом материале растительного происхождения. Курский научно-практический вестник "Человек и его здоровье", 2014, № 3, сс. 94-101	1
A	GRIGORE'EV A.M. et al. Detection of bensultap (bancol) derivatives and metabolites by chromatographic methods. Sud Med Exspert, 2009, 52(5): pp. 30-35 (реферат) [онлайн] [найдено 18.06.2018] Найдено из PubMed, PMID: 20058848	1
A	INOUE Mitsuji et al. An Analytical Method of Bensultap Residues in Crops and Soils. J. Pesticide Sci., 1986, 11, pp: 547-555	1
<input type="checkbox"/> последующие документы указаны в продолжении графы В		<input type="checkbox"/> данные о патентах-аналогах указаны в приложении
* Особые категории ссылочных документов: "А" документ, определяющий общий уровень техники "Е" более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее "О" документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д. "Р" документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета "D" документ, приведенный в евразийской заявке		"Г" более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения "Х" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности "У" документ, имеющий наиболее близкое от поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории "&" документ, являющийся патентом-аналогом "L" документ, приведенный в других целях
Дата действительного завершения патентного поиска:		19 июня 2018 (19.06.2018)
Наименование и адрес Международного поискового органа: Федеральный институт промышленной собственности РФ, 125993, Москва, Г-59, ГСП-3, Бережковская наб., 30-1. Факс: 243-3337, телетайп: 114818 ПОДАЧА		Уполномоченное лицо :  М. Белугин Телефон № (495) 531-6481