

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **048180**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2024.10.31**

(21) Номер заявки  
**202390097**

(22) Дата подачи заявки  
**2022.12.16**

(51) Int. Cl. **G01N 30/02** (2006.01)  
**G01N 33/52** (2006.01)  
**B01D 15/08** (2006.01)

**(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИМИДАКЛОПРИДА В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ**

(43) **2024.06.28**

(96) **2022000130 (RU) 2022.12.16**

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

(56) **RU-C1-2484458  
RU-C1-2467323**

Определение остаточных количеств имидаклоприда в ягодах красной и черной смородины, семенах и масле рапса методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Методические указания, МУК 4.1.2286-07. Москва, 2009

Определение остаточных количеств пестицидов в пищевых продуктах, сельскохозяйственном сырье и объектах окружающей среды. Сборник методических указаний. Выпуск 3, часть 1, МУК 4.1.1387-4.1.1390-03. Москва, Минздрав России, 2004

**CN-A-110455937**

(72) Изобретатель:  
**Королев Владимир Анатольевич,  
Медведева Ольга Анатольевна,  
Бабкина Людмила Александровна,  
Ворсина Екатерина Сергеевна,  
Милова Анастасия Ивановна,  
Королев Егор Владимирович,  
Тарасова Ольга Валерьевна (RU)**

(74) Представитель:  
**Григорьян А.Ю. (RU)**

(57) Изобретение относится к экологии, биологии и токсикологической химии, а именно к способам количественного определения имидаклоприда в биологическом материале. Способ определения имидаклоприда в биологическом материале заключается в том, что биологический объект измельчают, дважды по 30 мин обрабатывают порциями органического изолирующего агента, которым является смесь ацетон-ацетонитрил в соотношении 3:7 по объему, при условии, что масса каждой порции изолирующего агента равна массе биологического объекта, полученные органические извлечения объединяют, обезвоживают безводным сульфатом натрия, аликвоту объединенного извлечения высушивают, остаток растворяют в ацетоне, к раствору прибавляют гексан до достижения объемного соотношения между ацетоном и гексаном 3:4, полученный раствор вносят в колонку нормальнофазового сорбента "Merck", процесс хроматографирования осуществляют, используя двухкомпонентную подвижную фазу ацетон-гексан в соотношении 3:4 по объему, фракции элюата, содержащие анализируемое вещество, объединяют, высушивают, остаток растворяют в этаноле и проводят определение методом спектрофотометрии.

**B1****048180****048180****B1**

Изобретение относится к экологии, биологии и токсикологической химии, а именно к способам количественного определения имидаклоприда в биологическом материале, и может быть использовано в практике химико-токсикологических, клинических, ветеринарных и экологических лабораторий.

Известен способ определения имидаклоприда в биологических объектах (органы и ткани животных, продукты животного происхождения) путем измельчения биологического объекта, трехкратной экстракции по 30 мин порциями ацетона в количестве, превышающем массу объекта исследования в 20 раз, фильтрации объединенного экстракта через бумажный фильтр, обезвоживания безводным сульфатом натрия, упаривания на ротационном испарителе до 1 мл, а затем досуха в токе азота или сухого воздуха, растворения сухого остатка в ацетоне, нанесения полученного раствора на пластину для тонкослойной хроматографии "Сорбфил", помещения пластины в камеру, насыщенную парами гексан-ацетон в соотношении 4:3 по объему, высушивания пластины после подъема фронта растворителя на 10 см, обработки свежеприготовленным раствором ортотолидина и определения количества имидаклоприда по степени свечения стандарта и анализируемой пробы под ультрафиолетовой лампой (Патент 2467323 Российская Федерация, МПК G01N 30/90 (2006.01) / Способ определения имидаклоприда в биологических объектах с использованием тонкослойной хроматографии / Бойко Т.В., Герунова Л.К.; патентообладатель ФГОУ ВПО "Омский государственный аграрный университет" (RU) - № 2011125427/28; Заяв. 20.06.2011; Оpub. 20.11.2012 // Описание изобретения к патенту. - 2012).

Недостатками данного способа являются недостаточно высокий процент обнаружения имидаклоприда и недостаточно высокая точность.

Наиболее близкой является методика определения остаточных количеств имидаклоприда в огурцах, томатах, сахарной свекле, картофеле, перце и баклажанах путем измельчения биологического объекта, извлечения анализируемого вещества пятикратным количеством смеси ацетон-вода в соотношении 3:1 по объему, гомогенизации при 10000 об./мин в течение 3 мин, фильтрации через бумажный фильтр, упаривания аликвоты полученного экстракта в 5-7 раз на ротационном испарителе, двукратного промывания остатка с отбрасыванием органического слоя смесью гексан-вода в соотношении 1:4 по объему, трехкратной обработки водной фазы дихлорметаном, промывания объединенного дихлорметанового экстракта 0,05 М раствором калия карбоната, обезвоживания натрия сульфатом, упаривания досуха на ротационном испарителе, хроматографирования остатка в колонке с силикагелем с использованием в качестве элюента смеси гексан-этилацетат в соотношении 2:8 по объему, объединения фракций, содержащих анализируемое вещество, упаривания досуха на ротационном испарителе, растворения остатка в смеси ацетонитрил-вода в соотношении 1:3 по объему и определения имидаклоприда в полученном растворе методом обращенно-фазовой высоко-эффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектором (Определение остаточных количеств пестицидов в пищевых продуктах, сельскохозяйственном сырье и объектах окружающей среды: Сборник методических указаний / Под ред. Н.Е. Акоповой, Т.Л. Барабановой, Н.В. Кожока, Е.И. Макасовой. - М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. - Вып.3. -Ч.1.-С. 34-43).

Недостатками данного способа являются трудоемкость, длительность и недостаточно высокая точность.

Техническим результатом настоящего изобретения является повышение процента обнаружения и точности определения имидаклоприда в биологическом материале за счет подбора подходящего изолирующего агента и метода очистки.

Технический результат достигается тем, что биологический объект измельчают, дважды по 30 мин обрабатывают порциями органического изолирующего агента, которым является смесь ацетон-ацетонитрил в соотношении 3:7 по объему, при условии, что масса каждой порции изолирующего агента равна массе биологического объекта, полученные органические извлечения объединяют, обезвоживают безводным сульфатом натрия, аликвоту объединенного извлечения высушивают, остаток растворяют в ацетоне, к раствору прибавляют гексан до достижения объемного соотношения между ацетоном и гексаном 3:4, полученный раствор вносят в колонку нормальнофазового сорбента "Merck", процесс хроматографирования осуществляют, используя двухкомпонентную подвижную фазу ацетон-гексан в соотношении 3:4 по объему, фракции элюата, содержащие анализируемое вещество, объединяют, высушивают, остаток растворяют в этаноле и проводят определение методом спектрофотометрии при длине волны 270 ± 2 нм, соответствующей максимуму поглощения имидаклоприда в этаноле, и толщине поглощающего слоя 1 см.

Способ осуществляется следующим образом: биологический объект, содержащий имидаклоприд, измельчают, дважды по 30 мин обрабатывают порциями органического изолирующего агента, которым является смесь ацетон-ацетонитрил в соотношении 3:7 по объему, при условии, что масса каждой порции изолирующего агента равна массе биологического объекта, полученные органические извлечения объединяют, обезвоживают безводным сульфатом натрия, аликвоту объединенного извлечения высушивают, остаток растворяют в ацетоне, к раствору прибавляют гексан до достижения объемного соотношения между ацетоном и гексаном 3:4, полученный раствор вносят в колонку нормальнофазового сорбента "Merck", процесс хроматографирования осуществляют, используя двухкомпонентную подвижную фазу ацетон-гексан в соотношении 3:4 по объему, фракции элюата, содержащие анализируемое вещество,

объединяют, высушивают, остаток растворяют в этаноле и проводят определение методом спектрофотометрии при длине волны  $270 \pm 2$  нм, соответствующей максимуму поглощения имидаклоприда в этаноле, и толщине поглощающего слоя 1 см. Способ иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1.

Определение имидаклоприда в ткани печени.

К 10,0 г мелкоизмельченной ткани печени прибавляют 5 мг имидаклоприда, тщательно перемешивают биологическую ткань с веществом и оставляют на полтора часа при температуре 18-20°C. По истечении указанного времени биологический объект, содержащий анализируемое вещество, неоднократно (дважды) обрабатывают смесью ацетона и ацетонитрила, взятых в соотношении 3:7 по объему, каждый раз в течение 30 мин. При этом биологический объект заливают 10 г смеси ацетона и ацетонитрила, взятых в соотношении 3:7 по объему, и оставляют на 30 мин при перемешивании. Извлечение отделяют, операцию настаивания повторяют в вышеописанных условиях еще раз. Полученные извлечения объединяют, обезвоживают безводным сульфатом натрия путем фильтрования через стеклянный фильтр диаметром 4 см со слоем безводного сульфата натрия высотой 1-1,5 см. Фильтр дополнительно промывают 10 г смеси ацетон-ацетонитрил в соотношении 3:7 по объему, фильтрат и промывную жидкость объединяют, доводят до объема 50 мл смесью ацетон-ацетонитрил в соотношении 3:7. Из полученного экстракта берут аликвоту в объеме 0,5 мл, помещают в выпарительную чашку и высушивают на воздухе до полного удаления экстрагента.

Сухой остаток растворяют в 0,3 мл ацетона, к раствору добавляют 0,4 мл гексана до достижения объемного соотношения между ацетоном и гексаном 3:4, полученный раствор вносят в полупрепаративную хроматографическую колонку размерами 150×10 мм, заполненную нормальнофазовым сорбентом "Merck" с размером частиц 60 мкм, предварительно промытую смесью растворителей ацетон-гексан в соотношении 3:4 по объему. Процесс хроматографирования осуществляют, используя двухкомпонентную подвижную фазу, которой является смесь растворителей ацетон-гексан в соотношении 3:4 по объему. Элюат собирают отдельными фракциями по 2 мл каждая. Фракции элюата с 12 по 15 включительно, содержащие имидаклоприд, объединяют и высушивают до полного удаления растворителя. Остаток помещают в мерную колбу вместимостью 5 мл, растворяют в 2 мл этанола, доводят этанолом до метки (испытуемый раствор) и проводят определение физико-химическим методом, которым является спектрофотометрия.

Определение проводят, используя спектрофотометр BioRad SmartSpecPlus (США). Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на фоне этанола при длине волны  $270 \pm 2$  нм, соответствующей максимуму поглощения имидаклоприда в этаноле, и толщине поглощающего слоя 1 см. Количественное содержание имидаклоприда рассчитывают по оптической плотности, используя градуировочного графика, с учетом навески анализируемого вещества, внесенной в биологический материал, и разведения.

Построение градуировочного графика.

В ряд мерных колб вместимостью 10 мл вносят 10; 20; 40; 80; 160; 200; 320; 400 мкл 0,05% раствора имидаклоприда в этаноле и доводят объем содержимого каждой колбы до метки этанолом. Полученные растворы измеряют на спектрофотометре BioRad SmartSpecPlus (США) на фоне этанола при длине волны  $270 \pm 2$  нм, соответствующей максимуму поглощения имидаклоприда в этаноле, и толщине поглощающего слоя 1 см.

По результатам измерений на спектрофотометре строят график зависимости оптической плотности от концентрации определяемого вещества. График линейен в интервале концентраций  $5 \cdot 10^{-7}$ - $2 \cdot 10^{-5}$  г/мл.

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

$$A=0,0917X + 0,000378,$$

где А - оптическая плотность; X - концентрация определяемого вещества в спектрофотометрируемой пробе, мкг/мл.

Результаты количественного определения имидаклоприда в ткани печени представлены в табл. 1.

Пример 2.

Определение имидаклоприда в ткани клубней картофеля.

К 10,0 г мелкоизмельченной ткани клубней картофеля прибавляют 5 мг имидаклоприда, тщательно перемешивают биологическую ткань с веществом и оставляют на полтора часа при температуре 18-20°C. По истечении указанного времени биологический объект, содержащий анализируемое вещество, неоднократно (дважды) обрабатывают смесью ацетона и ацетонитрила, взятых в соотношении 3:7 по объему, каждый раз в течение 30 мин. При этом биологический объект заливают 10 г смеси ацетона и ацетонитрила, взятых в соотношении 3:7 по объему, и оставляют на 30 мин при перемешивании. Извлечение отделяют, операцию настаивания повторяют в вышеописанных условиях еще раз. Полученные извлечения объединяют, обезвоживают безводным сульфатом натрия путем фильтрования через стеклянный фильтр диаметром 4 см со слоем безводного сульфата натрия высотой 1-1,5 см. Фильтр дополнительно промывают 10 г смеси ацетон-ацетонитрил в соотношении 3:7 по объему, фильтрат и промывную жидкость

объединяют, доводят до объема 50 мл смесью ацетон-ацетонитрил в соотношении 3:7. Из полученного экстракта берут аликвоту в объеме 0,5 мл, помещают в выпарительную чашку и высушивают на воздухе до полного удаления экстрагента.

Сухой остаток растворяют в 0,3 мл ацетона, к раствору добавляют 0,4 мл гексана до достижения объемного соотношения между ацетоном и гексаном 3:4, полученный раствор вносят в полупрепаративную хроматографическую колонку размерами 150×10 мм, заполненную нормальнофазовым сорбентом "Merck" с размером частиц 60 мкм, предварительно промытую смесью растворителей ацетон-гексан в соотношении 3:4 по объему. Процесс хроматографирования осуществляют, используя двухкомпонентную подвижную фазу, которой является смесь растворителей ацетон-гексан в соотношении 3:4 по объему. Элюат собирают отдельными фракциями по 2 мл каждая. Фракции элюата с 12 по 15 включительно, содержащие имидаклоприд, объединяют и высушивают до полного удаления растворителя. Остаток помещают в мерную колбу вместимостью 5 мл, растворяют в 2 мл этанола, доводят этанолом до метки (испытываемый раствор) и проводят определение физико-химическим методом, которым является спектрофотометрия.

Определение проводят, используя спектрофотометр BioRad SmartSpecPlus (США). Измеряют оптическую плотность испытываемого раствора на фоне этанола при длине волны  $270 \pm 2$  нм, соответствующей максимуму поглощения имидаклоприда в этаноле, и толщине поглощающего слоя 1 см. Количественное содержание имидаклоприда рассчитывают по оптической плотности, используя уравнение градуировочного графика, с учетом навески анализируемого вещества, внесенной в биологический материал, и разведения.

Построение градуировочного графика.

Построение градуировочного графика и его уравнение приводятся в примере 1.

Результаты количественного определения имидаклоприда в ткани клубней картофеля представлены в табл. 2.

Сравнительные характеристики предлагаемого и известного способов представлены в табл. 3.

Таблица 1

Результаты определения имидаклоприда в ткани печени (n = 5; P = 0,95)					
№	Внесено, мг в 10 г печени	Оптическая плотность	Найдено		Метрологические характеристики
			мг	%	
1.	5,0	0,901	4,9107	98,21	$\bar{X} = 98,15\%$
2.	5,0	0,896	4,8834	97,67	$S = 0,3307$
3.	5,0	0,899	4,8998	98,00	$S_8 = 0,1479$
4.	5,0	0,904	4,9271	98,54	$\Delta\bar{X} = 0,41$
5.	5,0	0,902	4,9162	98,32	$\bar{\varepsilon} = 0,42\%$

Таблица 2

Результаты определения имидаклоприда в ткани клубней картофеля (n = 5; P = 0,95)					
№	Внесено, мг в 10 г картофеля	Оптическая плотность	Найдено		Метрологические характеристики
			мкг	%	
1.	5,0	0,884	4,8180	96,36	$\bar{X} = 96,62\%$
2.	5,0	0,887	4,8344	96,69	$S = 0,3138$
3.	5,0	0,890	4,8507	97,01	$S_8 = 0,1403$
4.	5,0	0,883	4,8126	96,25	$\Delta\bar{X} = 0,39$
5.	5,0	0,888	4,8398	96,80	$\bar{\varepsilon} = 0,40\%$

Таблица 3

Сравнительная характеристика предлагаемого и известного способов (на примере исследования ткани клубней картофеля)		
Показатели	Предлагаемый способ	Известный способ
$\bar{X}$	96,62% (извлечение смесью ацетон-ацетонитрил 3:7)	88,3% (извлечение смесью ацетон-вода 3:1)
S	0,3138	5,4
$S_8, \%$	0,15	2,4
$\Delta\bar{X}$	0,39	5,0

Таким образом, предлагаемый способ по сравнению с прототипом повышает процент обнаружения имидаклоприда на 8,3%, существенно увеличивает точность и улучшает метрологические характеристики получаемых результатов.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ определения имидаклоприда в биологическом материале, заключающийся в том, что биологический материал измельчают, неоднократно обрабатывают изолирующим агентом по 30 мин, полученные извлечения объединяют, обезвоживают безводным сульфатом натрия, из аликвоты испаряют экстрагент, остаток растворяют, раствор вносят в колонку с сорбентом, процесс хроматографирования осуществляют, используя двухкомпонентную подвижную фазу гексан-ацетон в соотношении 4:3 по объему, фракции элюата, содержащие имидаклоприд, объединяют, элюент испаряют, остаток растворяют и проводят определение физико-химическим методом, отличающийся тем, что биологический материал дважды обрабатывают порциями органического изолирующего агента, которым является смесь ацетон-ацетонитрил в соотношении 3:7 по объему, при условии, что масса каждой порции изолирующего агента равна массе биологического материала, после испарения экстрагента остаток растворяют в ацетоне, к раствору прибавляют гексан до достижения объемного соотношения между ацетоном и гексаном 3:4, полученный раствор вносят в колонку нормальнофазового сорбента "Merck", после испарения элюента остаток растворяют в этаноле и проводят определение методом спектрофотометрии при длине волны  $270 \pm 2$  нм, соответствующей максимуму поглощения имидаклоприда в этаноле, и толщине поглощающего слоя 1 см.

