

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390097** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.06.28

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

(22) Дата подачи заявки
2022.12.16

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

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

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

(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:
Куприянова З.Н. (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.

A1

202390097

202390097

A1

Способ определения имидаклоприда в биологическом материале

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 минут 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 минут, 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. Барabanовой, Н.В. Кожока, Е.И. Максаковой. – 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 минут 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 минут 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 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 минут. При этом биологический объект заливают 10 г смеси ацетона и ацетонитрила, взятых в соотношении 3:7 по объему, и оставляют на 30 минут 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 ± 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.

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 ± 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 линеен 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 таблице 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 минут. При этом биологический объект заливают 10 г смеси ацетона и ацетонитрила, взятых в соотношении 3:7 по объему, и оставляют на 30 минут 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 ± 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 таблице 2.

Сравнительные характеристики предлагаемого и известного способов представлены в таблице 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	$S_{\delta} = 0,1479$
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	$S_{\delta} = 0,1403$
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
$S_{\delta}, \%$	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 объект измельчают, неоднократно обрабатывают изолирующим агентом по 30 минут, 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 объект 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 объекта, 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 ± 2 нм, соответствующей максимуму поглощения имидаклоприда в этаноле, и толщине поглощающего слоя 1 см.

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

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

Номер евразийской заявки:

202390097**А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:***G01N 30/02 (2006.01)**G01N 33/52 (2006.01)**B01D 15/08 (2006.01)*

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)

G01N 30/00, 30/02, 33/48, 33/50, 33/52, B01D 15/08, 15/42

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если возможно, используемые поисковые термины)
Espacenet, ЕАПАТИС, EPOQUE Net, Reaxys, Google**В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ**

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	RU 2484458 C1 (ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ "ОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ П.А. СТОЛЫПИНА") 10.06.2013, формула	1
A	RU 2467323 C1 (ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ "ОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ) 20.11.2012	1
A	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	1
A	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	1
A	CN 110455937 A (YANGTZE RIVER FISHERIES RESEARCH INSTITUTE et al.) 15.11.2019	1

 последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

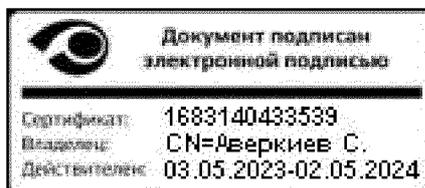
«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 04 июля 2023 (04.07.2023)

Уполномоченное лицо:

Начальник Управления экспертизы



С.Е. Аверкиев