

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035314**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.05.27

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

(21) Номер заявки
201700530

(22) Дата подачи заявки
2017.10.30

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

(43) **2019.04.30**

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

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

(56) **ШОРМАНОВ В.К. и др.**
Определение бенсултапа в биологическом материале растительного происхождения. *Курский научно-практический вестник "Человек и его здоровье"*, 2014, № 3, с. 94-101
GRIGOR'EV A.M. et al.: Detection of bensultap (bancol) derivatives and metabolites by chromatographic methods. *Sud Med Expert*, 2009, 52(5): pp. 30-35 (реферат) [онлайн] [найдено 18.06.2018], Найдено из PubMed, PMID: 20058848
INOUE Mitsuji et al.: An Analytical Method of Bensultap Residues in Crops and Soils. *J. Pesticide Sci.*, 1986, 11, pp: 547-555

(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. Лекарственное растительное сырьё измельчают, обрабатывают четырёхкратным по массе количеством смеси ацетонитрил-дихлорэтан-этилацетат 6:2:2 по объёму, извлечение обезвоживают, испаряют, остаток растворяют в ацетоне, хроматографируют в макроколонке размерами 490×10 мм, заполненной 10 г силикагеля "Merk" 40/63 μ , вначале пропуская через неё 20 мл гексана, а затем элюируя смесью растворителей диэтиловый эфир-гексан в соотношении 8:2 по объёму, элюат собирают фракциями по 2 мл, фракции элюата с 18 по 24 объединяют, элюент 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, её выдерживают 3 мин, повышают со скоростью 20°C в минуту 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.

035314 B1

035314 B1

Изобретение относится к биологии, экологии, токсикологической и санитарной химии, а именно к способам определения бенсультапа (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 бенсультапа 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 бенсультапа (2-диметиламино-1,3-бис-(фенилсульфонилтио)пропана) в растительном биологическом материале, заключающийся в том, что растительный биологический объект измельчают, содержащийся в нём бенсультап переводят в нерейстоксин 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 нерейстоксин 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 бенсультапа по площади хроматографического пика нерейстоксина (Inoue M., Yamamoto A. An Analytical Method of Bensultap Residues in Crops and Soils//Journal of Pesticide Science. - 1986, vol. 11, N 4. -P. 547-555).

Способ характеризуется недостаточно высокими чувствительностью и точностью определения.

Наиболее близким является способ количественного определения бенсультапа в лекарственном растительном сырье, который заключается в том, что лекарственное растительное сырьё 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 лекарственного растительного сырья, полученные органические извлечения объединяют, обезвоживают безводным сульфатом натрия, растворитель из объединённого извлечения испаряют, остаток растворяют в хлороформе, хроматографируют в макроколонке размерами 490×10 мм, заполненной 10 г силикагеля L 40/100 µ, вначале пропускают через неё 20 мл гексана, а затем элюируют смесью растворителей гексан - диоксан - пропанол-2 в соотношении 8:3:0,6 по объёму, элюат собирают фракциями по 2 мл, фракции элюата с 11 по 14 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 объёму и УФ-детектора (Шорманов В.К., Баранов Ю.Н., Терских А.П., Неврова А.Ю., Щербакова М.Н. Определение бенсультапа в биологическом материале растительного происхождения // Курский научно-практический вестник "Человек и его здоровье", - 2014, - № 3, - с. 94-101).

Способ характеризуется недостаточно высокой чувствительностью определения.

Техническим результатом настоящего изобретения является повышение чувствительности определения.

Технический результат достигается тем, что лекарственное растительное сырьё измельчают, двукратно по 30 мин 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 лекарственного растительного сырья, полученные органические извлечения объединяют, обезвоживают безводным сульфатом натрия, растворитель из объединённого извлечения испаряют, остаток растворяют в ацетоне, хроматографируют в макроколонке размерами 490×10 мм, заполненной 10 г силикагеля "Merk" 40/63 µ, вначале пропускают через неё 20 мл гексана, а затем элюируют смесью растворителей диэтиловый эфир-гексан в соотношении 8:2 по объёму, элюат собирают фракциями по 2 мл, фракции элюата с 18 по 24 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 мин, в дальнейшем температура повышается от 70 до 290°C со скоростью 20°C в минуту, конечная температура колонки выдерживается в течение 16 мин, температура инжектора составляет 250°C, температура квадрупольного поля 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 бенсултапа по площади хроматографического пика.

Способ осуществляется следующим образом: лекарственное растительное сырьё, содержащее бенсултап, измельчают, двукратно по 30 мин 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 лекарственного растительного сырья, полученные органические извлечения объединяют, обезвоживают безводным сульфатом натрия, растворитель из объединённого извлечения испаряют, остаток растворяют в ацетоне, хроматографируют в макроколонке размерами 490×10 мм, заполненной 10 г силикагеля "Merk" 40/63 μ , вначале пропуская через неё 20 мл гексана, а затем элюируя смесью растворителей диэтиловый эфир-гексан в соотношении 8:2 по объёму, элюат собирают фракциями по 2 мл, фракции элюата с 18 по 24 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 мин, в дальнейшем температура повышается от 70 до 290°C со скоростью 20°C в минуту, конечная температура колонки выдерживается в течение 16 мин, температура инжектора составляет 250°C, температура квадрупольного поля 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 бенсултапа по площади хроматографического пика.

Способ иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1. Определение бенсултапа в корнях одуванчика лекарственного

К 10 г мелкоизмельченной ткани корней одуванчика прибавляют 10 мг бенсултапа (2-диметиламино-1,3-бис-(фенилсульфонилтио)пропана), тщательно перемешивают лекарственное растительное сырьё с веществом и оставляют на полтора часа при температуре 18-20°C. По истечении указанного времени лекарственное растительное сырьё, содержащее 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 лекарственного растительного сырья. При этом биологический объект заливают 40 г смеси ацетонитрил-дихлорэтан-этилацетат в соотношении 6:2:2 по объёму и выдерживают 30 мин 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 гексана 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 объединяют в выпарительной чаш-

ке, 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 мин, в дальнейшем температура повышается от 70 до 290°C со скоростью 20°C в минуту, конечная температура колонки выдерживается в течение 16 мин, температура инжектора составляет 250°C, температура квадрупольной 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 мин. 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 до 290°C со скоростью 20°C в минуту, конечная температура колонки выдерживается в течение 16 мин, температура инжектора составляет 250°C, температура квадрупольной 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 $1,6 \times 10^{-8}$ - $1,2 \times 10^{-6}$ г.

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

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

где S - площадь хроматографического пика;

C - концентрация определяемого вещества в хроматографируемой пробе, нг.

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

Пример 2. Определение бенсултапа в траве пастушьей сумки

К 10 г мелкоизмельченной ткани травы пастушьей сумки прибавляют 10 мг бенсултапа (2-диметиламино-1,3-бис-(фенилсульфонилтио)пропана), тщательно перемешивают лекарственное расти-

тельное сырьё с веществом и оставляют на полтора часа при температуре 18-20°C. По истечении указанного времени лекарственное растительное сырьё, содержащее 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 лекарственного растительного сырья. При этом биологический объект заливают 40 г смеси ацетонитрил-дихлорэтан-этилацетат в соотношении 6:2:2 по объёму и выдерживают 30 мин 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 гексана 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 мин. Диапазон сканирования соответствует интервалу 40-500 m/z.

Начальная температура термостата колонки составляет 70°C, данная температура выдерживается в течение 3 мин, в дальнейшем температура повышается от 70 до 290°C со скоростью 20°C в минуту, конечная температура колонки выдерживается в течение 16 мин, температура инжектора составляет 250°C, температура квадрупольного детектора 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 табл. 2.

Пример 3. Определение бенсултапа в корнях лабазника вязолистного

К 10 г мелкоизмельченной ткани корней лабазника вязолистного прибавляют 10 мг бенсултапа (2-диметиламино-1,3-бис-(фенилсульфонилтио)пропана), тщательно перемешивают лекарственное растительное сырьё с веществом и оставляют на полтора часа при температуре 18-20°C. По истечении указанного времени лекарственное растительное сырьё, содержащее 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 лекарственного растительного сырья. При этом биологический объект заливают 40 г смеси ацетонитрил-дихлорэтан-этилацетат в соотношении 6:2:2 по объёму и выдерживают 30 мин 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.

териала, 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 гексана 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 мин. Диапазон сканирования соответствует интервалу 40-500 м/z.

Начальная температура термостата колонки составляет 70°C, данная температура выдерживается в течение 3 мин, в дальнейшем температура повышается от 70 до 290°C со скоростью 20°C в минуту, конечная температура колонки выдерживается в течение 16 мин, температура инжектора составляет 250°C, температура квадрупольного детектора 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 табл. 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 табл. 4.

Таблица 1. Результаты определения бенсултапа в корнях одуванчика лекарственного

№	Внесено бенсултапа, мг в 10 г корней одуванчика лекарст- венного	Найдено				Метроло- гические характе- ристики, %
		площадь пика на хромато- грамме, усл. ед.	мг в хромато- графиру- емой пробе	мг в пересчёте на навеску, внесённую в лекарст- венное рас- тительное сырье	% от внесён- ной в лекар- ствен- ное расти- тельное сырье навески	
1	10,00	2121102	$3,8952 \cdot 10^{-7}$	9,7381	97,38	$\bar{x}=94,53$
2	10,00	2031558	$3,7312 \cdot 10^{-7}$	9,3278	93,28	$S=2,27$
3	10,00	2090308	$3,8388 \cdot 10^{-7}$	9,5965	95,97	$S_{\bar{x}}=1,01$
4	10,00	1993993	$3,6624 \cdot 10^{-7}$	9,1564	91,56	$\Delta\bar{x}=2,82$
5	10,00	2057766	$3,7792 \cdot 10^{-7}$	9,4477	94,48	$\varepsilon=2,98$

Таблица 2. Результаты определения бенсултапа в траве пастушьей сумки

№	Внесено бенсултапа, мг в 10 г травы пастушьей сумки	Найдено				Метроло- гические характе- ристики, %
		площадь пика на хромато- грамме, усл. ед.	мг в хромато- графиру- емой пробе	мг в пересчёте на навеску, внесённую в лекарст- венное рас- тительное сырье	% от внесён- ной в лекар- ствен- ное расти- тельное сырье навески	
1	10,00	2076767	$3,8140 \cdot 10^{-7}$	9,5352	95,35	$\bar{x}=96,87$
2	10,00	2050774	$3,7664 \cdot 10^{-7}$	9,4155	94,16	$S=2,25$
3	10,00	2154081	$3,9556 \cdot 10^{-7}$	9,8890	98,89	$S_{\bar{x}}=1,01$
4	10,00	2102757	$3,8616 \cdot 10^{-7}$	9,6539	96,54	$\Delta\bar{x}=2,80$
5	10,00	2165437	$3,9764 \cdot 10^{-7}$	9,9413	99,41	$\varepsilon=2,89$

Таблица 3. Результаты определения бенсултапа в корнях лабазника вязолистного

№	Внесено бенсултапа, мг в 10 г корней лабазника вязолистно- го	Найдено				Метроло- гические характе- ристики, %
		площадь пика на хромато- грамме, усл. ед.	мг в хромато- графиру- емой пробе	мг в пересчёте на навеску, внесённую в лекарст- венное рас- тительное сырье	% от внесён- ной в лекар- ствен- ное расти- тельное сырье навески	
1	10,00	1992738	$3,6601 \cdot 10^{-7}$	9,1504	91,5	$\bar{x}=93,22$
2	10,00	2030794	$3,7298 \cdot 10^{-7}$	9,3251	93,25	$S=2,39$
3	10,00	1967130	$3,6132 \cdot 10^{-7}$	9,0332	90,33	$S_{\bar{x}}=1,07$
4	10,00	2064318	$3,7912 \cdot 10^{-7}$	9,4776	94,78	$\Delta\bar{x}=2,97$
5	10,00	2096205	$3,8496 \cdot 10^{-7}$	9,6238	96,24	$\varepsilon=3,19$

Таблица 4. Сравнительная характеристика предлагаемого и известного способов
(на примере исследования корней одуванчика лекарственного)

Показатель	Предлагаемый способ	Известный способ
1. Чувствительность (открываемый минимум): а) в хроматографируемой пробе	$8 \cdot 10^{-9}$ г	$2 \cdot 10^{-8}$ г
б) в 100 г лекарственного растительного сырья	$1 \cdot 10^{-4}$ г	$2 \cdot 10^{-4}$ г
2. Степень извлечения (при условии содержания 100 мг определяемого вещества в 100 г лекарственного растительного сырья)	94,53% (изолирование смесью ацетонитрил- дихлорэтан-этилацетат в соотношении 6:2:2 по объёму)	92,75 % (изолирование ацетонитрилом)

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ количественного определения бенсультапа в лекарственном растительном сырье, заключающийся в том, что лекарственное растительное сырьё измельчают, двукратно по 30 мин обрабатывают порциями органического изолирующего агента при условии, что масса каждой порции изолирующего агента в 4 раза превышает массу лекарственного растительного сырья, полученные органические извлечения объединяют, обезвоживают безводным сульфатом натрия, растворитель из объединённого извлечения испаряют, остаток растворяют, хроматографируют в макроколонке размерами 490×10 мм, заполненной 10 г силикагеля, вначале пропуская через неё 20 мл гексана, а затем элюируя смесью растворителей, элюат собирают фракциями по 2 мл, фракции элюата 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 используются силикагель "Merk" 40/63 μ , для элюирования из макроколонки с силикагелем применяют смесь растворителей диэтиловый эфир-гексан в соотношении 8:2 по объёму, объединяют фракции элюата с 18 по 24, 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 мин, в дальнейшем температура повышается от 70 до 290°C со скоростью 20°C в минуту, конечная температура колонки выдерживается в течение 16 мин, 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.

