

"УТВЕРЖДАЮ"

Заместитель Главного Государственного
санитарного врача СССР

А.И. Зайченко

" 12 " апреля 1987 г.

№ 3247-85

ВРЕМЕННЫЕ

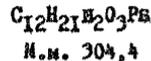
МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ БАЗУДИНА
В ЛЕКАРСТВЕННОМ РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ ЭНЗИМИНО-
ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

(Дополнение к методическим указаниям по определению
базудина в воде, почве и растительном материале
тонкослойной и газожидкостной хроматографией №1916-78)

I. Краткая характеристика препарата

Базудин (0,0-диэтил-0-(2-изопропил-4-метил-6-пиримидил)-тио-
фосфат - динатрия

Структурная формула



2. Методика определения базудина

Метод основан на экстракции препарата из исследуемой пробы органическим растворителем, очистке экстракта и определении методом хроматографии в тонком слое с энзимным проявлением после активации препарата на пластинке в парах брома. Базудин, действующий и угнетающий каллиностеразы печени крупного рогатого скота, проявляется в виде пятен белого цвета на голубом фоне.

Количественное определение производят путем сравнения пятав проб и стандарта.

2.1.1. Метрологическая характеристика метода

Минимально детектируемое количество 1-5 нг или 0,001-0,005 мкг

Нижний предел определения 0,05 мг/кг

Среднее значение определения, % Стандартное отклонение, %

для астрагала веретисто-

цветкового	93	2,5
алтея лекарственного	84	7,8
мака масляного	91	3,3
рвения тангутского	80	11,3
ноготков лекарственных	90	2,6
плодов шиповника	89	3,1

Относительное стандартное отклонение, % Доверительный интервал
среднего при $n=5$ и $p=0,95$

для астрагала веретисто-

цветкового	1,1	3,0
алтея лекарственного	3,4	8,0
мака масляного	1,5	4,1
рвения тангутского	5,1	14,1
ноготков лекарственных	1,3	3,6
плодов шиповника	1,4	3,8

2.2. Реактивы и растворы

Бензол н.д.в., ГОСТ 5955-75.

Этиловый спирт, ректификат, ТУ 6-09-17-10-77.

Бром, ч., ГОСТ 4109-79.

Борная кислота, х.ч., ГОСТ 9656-75.

Имидоацетат, ч.д.в., ТУ 6-09-07-1156-78.

Уксусная кислота, х.ч., ГОСТ 6552-80.

Ортофосфорная кислота, х.ч., ГОСТ 6552-80.

Гексан, х.ч., ТУ 6-09-3375-78

Диметилформамид, х.ч., ГОСТ 20258-74

Калий железосинеродистый, х.ч., ГОСТ 4206-75 - 1,6 % водный раствор

Калий железистосинеродистый, х.ч., ГОСТ 4207-65 - 2%-ный водный раствор

Активированный уголь марки ОУ-А

Буферный раствор pH 8,69 - готовят смесь ортофосфорной (2,1 мл), уксусной (2,3 мл) и борной (2,47 г) кислот и доводят дистиллированной водой до 1 л. Для получения буфера с pH 8,69 к 100 мл указанной смеси прибавляют 65 мл 0,2 н раствора едкого натра, который готовят растворением 0,87 г NaOH в дистиллированной воде в мерной колбе емкостью 100 мл.

Ферментный препарат получают из печени крупного рогатого скота (свежую, однократно замороженную и сохраняемую в дальнейшем в холодильнике печень можно использовать в течение 6 месяцев). Для приготовления ферментного раствора 1 г печени растирают в ступке с 9 мл буферного раствора, фильтруют через вату. К 1 мл полученной сыворотки прибавляют 4 мл буферного раствора и используют этот раствор для опрыскивания пластинок. Применяют свежеприготовленный раствор.

Основной стандартный раствор базудина "А" - 100 мкг/мл, рабочий стандартный раствор "Б" - 1 мкг/мл - готовят разбавлением основного раствора "А" (1 мл раствора "А" доводят в мерной колбе до 100 мл ацетоном).

2.2.1. Проявляющий реагент: 10 мг индоксилацетата растворяют в 6 мл этанола, прибавляют 6 мл дистиллированной воды, 2 мл раствора жедзосинеродистого калия и 2 мл железистосинеродистого калия и хорошо перемешивают. Раствор готовят перед опрыскиванием.

2.2.2. Лекарственное растительное сырье

Трава астрагала жестистоцветкового, ФС 42-533-72
 Корень алтея неочищенный, ФС 42-812-73
 Мак масличный, промышленное сырье, ГОСТ 6517-76
 Корень ревеня ФС 42-1910-82
 Цветки ноготков лекарственных, ФС 42-1391-80
 Плоды яблонника, ГОСТ 1994-76, продлен до 01.07.87 г.
 Трава алтея лекарственного

2.3. Приборы и посуда

Компрессорная установка УК-40/260, ТУ 64-I-2749-73 (для равномерного мелкодисперстного опрыскивания пластинок)
 Термостат СШ-36
 Аппарат для встряхивания марки АВУ-1, ТУ 64-I-24-51-72
 Эконкатор, ГОСТ 6372-73
 Ступка керамическая $d = 10$ см, ГОСТ 9147-74
 Камера для хроматографирования, ГОСТ 10565-63
 Стеклоянные пластинки 9x12 см или хроматографические пластинки "Силуфол"
 Пульверизатор стеклянный, ГОСТ 19391-81
 Колбы конические плоскодонные на 250-500 мл, ГОСТ 10394-72
 Колбы круглодонные на 250 мл со шлифом, ГОСТ 10394-72
 Воронки делительные на 250-500 мл, ГОСТ 8613-76
 Холодильник бытовой
 Колбы мерные на 100 мл, ГОСТ 1770-74
 Пробирки мерные на шлифах на 5-10 мл, ГОСТ 1770-74
 Пипетки на 1 мл, 2 мл, 5 мл, 10 мл, ГОСТ 1770-74
 Микрошприц на 10 мкл, МШ-10, ТУ 5В-2.833.024

2.4. Подготовка к определению

2.4.1. Пластинки хроматографические

Стандартные хроматографические пластинки "Силуфол".
 Хроматографические пластинки с тонким слоем силикагеля КМ, серце-

ленным гипсом.[†]

2.4.2. Отбор проб

Лекарственное растительное сырье измельчают и отбирают методом квартования среднюю пробу по 10,0 г.

2.5. Проведение определения

Из лекарственного растительного сырья, представленного травой и цветками, базудии экстрагируют 150 мл 50%-ного водного ацетона, из корней алтея и семян мака масличного - 100 мл ацетона, из корней ревеня и плодов шиповника - 100 мл гексана.

Из всех проб экстракции проводят дважды на аппарате для встряхивания в течение одного часа.

Трава астрагала шерстистоцветкового и алтея лекарственного. Водно-ацетоновые экстракты объединяют, отфильтровывают в делительные воронки и подвергают очистке. С этой целью проводят реэкстракцию базудина гексаном по 50 мл трижды. Объединенные гексановые фракции сушат безводным сернистым натрием, добавляют 2-3 г активированного угля марки ОУ-А, перемешивают и через 30 минут отфильтровывают в круглодонные колбы. Концентрируют экстракты под вакуумом при температуре 40°C до объема 0,5 мл, а затем на воздухе досуха. Остаток в колбе растворяют в ацетоне и количественно переносят в мерную пробирку в притертой пробкой. Общий объем экстракта в пробирке доводят до 10,0 мл. Закрывают пробкой и хорошо перемешивают.

Ноготки лекарственные(цветки). Для проб ноготков проводят дополнительную очистку. Для этого сухой остаток после удаления гексана растворяют в 5 мл этилового спирта, добавляют равное количество

[†] Приготовление хроматографических пластинок производят в соответствии с инструкцией, изложенной в кн. М.А.Клисенко, Т.А.Лебедева, Э.Ф.Иркова, "Химический анализ микроколичеств ядохимикатов", М., изд. "Медицина", 1972, с.293.

3%-ого раствора хлористого аммония и помещают в морозильную камеру на 1 час. Одновременно ставят для охлаждения смесь этилового спирта с 3%-ным раствором хлористого аммония в соотношении 1:1. Раствор отфильтровывают в делительную воронку, промывают охлажденной смесью 2 раза по 10 мл и извлекают базудин из водно-спиртовой смеси 3 раза по 40 мл гексана. Гексановый экстракт сушат б/в сульфатом натрия, концентрируют и далее поступают как описано выше.

Аллея лекарственная (корни). К объединенным ацетоновым экстрактам добавляют равное количество дистиллированной воды, перемешивают и проводят рекстракцию базудина гексаном как указано выше для травяных аллей.

Мак масличный (немолодые семена). Ацетоновые вытяжки из молодых семян мака масличного как правило очистки не требуют. Их концентрируют и доводят объем общего экстракта в мерной пробирке с притертой пробкой до 10,0 мл.

Ревень тангутский (корни), шиповник (плоды). Гексановые экстракты концентрируют до объема 10,0 мл переносят в делительную воронку, приливают 50 мл диметилформамида, насыщенного гексаном и взбалтывают 2 мин. Гексановый слой отбрасывают. В большую делительную воронку переносят диметилформамидный экстракт, приливают 250 мл воды, 15 мл насыщенного раствора хлористого натрия, перемешивают и извлекают базудин и гексаном три раза по 50 мл. Объединенные гексановые экстракты сушат б/в серноокислым натрием, отгоняют растворитель и далее поступают как описано выше.

2.5.2. Хроматографирование в тонком слое с энзимным проявлением

С целью уменьшения краевого эффекта хроматографические пластинки с силикагелем КСК или "Силуфол" предварительно разделяют на вертикальные полосы. Аликвотную часть экстракта пробы (10 мкл) и стандартного раствора базудина (2-5 нг) наносят при помощи микрошприца на пласт-

тинки.

Развитие хроматограммы производят в смеси н-гексана с ацетоном в объемном соотношении 4:1 для проб астрагала, ноготков, алтея и мака масличного, 9:1 - для шиповника. Для хроматографирования экстрактов ревеня предложены следующие системы подвижных растворителей: I - бензол, II - ацетон-гексан (1:4). Когда фронт растворителя поднимется на 10 см, пластинку вынимают из камеры и дают растворителю испариться. Для активации базудина в парах брома пластинку помещают на 1 минуту в эксикатор, насыщенный парами брома. Силуфольные пластинки активируют в течение 10 сек.

После удаления избытка брома с пластинки (60 мин) ее обрабатывают свежеприготовленным ферментным раствором и инкубируют в течение 60 мин в насыщенном водными парами термостате при температуре 38°C (для увлажнения ставят чашку Петри с водой).

После инкубации пластинки опрыскивают проявляющим реагентом и помещают в термостат при температуре 38°C. Базудин проявляется в течение 10 мин в виде белых пятен на голубом фоне.

R_f базудина на пластинках с силикагелем КСК и "Силуфол" в системе ацетон-гексан (1:4) составляет соответственно 0,50 и 0,60, в системе ацетон-гексан (1:9) - 0,43 и 0,55 и в системе I - бензол, II - ацетон-гексан (1:4) - 0,50 и 0,70.

2.5.3. Обработка результатов анализа

Содержание базудина определяют путем сравнения площади пятен пробы и стандарта. Пропорциональная зависимость площади пятна от концентрации соблюдается в пределах 5 - 50 $\frac{\mu\text{г}}{\text{кг}}$

Расчет содержания препарата в анализируемом объекте производят по формуле

$$X = \frac{A \cdot S_2 \cdot V \cdot 1000}{S_1 \cdot V_1 \cdot P} ; \text{ где ;}$$

- A - содержание препарата в стандарте, мкг
 S_1 - площадь пятна стандарта, мм²
 S_2 - площадь пятна пробы, мм²
 V_1 - объем экстракта, нанесенного на пластинку, мл
V - общий объем экстракта, мл
P - масса пробы, взятой на анализ, г

3. Требования безопасности

Соблюдаются требования безопасности обычно рекомендуемые для работы с химическими реактивами.

4. Настоящие методические указания разработаны:

Г.И.Крамаренко, С.С.Горлачевой (г.Лубны Полтавской обл., Украинская зональная опытная станция лекарственных растений БИЛР),
М.В.Пиошменная (г.Киев, ВНИИГНТОКС)

5. Апробированы:

В Украинском НИИ защиты растений (г.Киев), ВНИИ лекарственных растений (г.Москва)