

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202293353** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.01.12

(51) Int. Cl. *C07H 1/08* (2006.01)
C07H 13/10 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.03.24

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ГРАНАТИНА А ВЫСОКОЙ ЧИСТОТЫ

(31) 202010415738.X

(32) 2020.05.16

(33) CN

(86) PCT/CN2021/082510

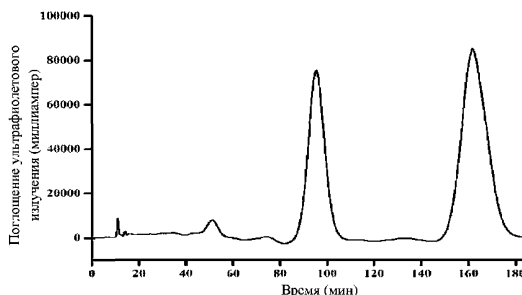
(87) WO 2021/232932 2021.11.25

(71) Заявитель:
**СИНЬЦЗЯН ТЕХНИКАЛ
ИНСТИТУТ ОФ ФИЗИКС ЭНД
КЕМИСТРИ, ЧАЙНИЗ ЭКЭДЕМИ
ОФ САЙЕНСИЗ (CN)**

(72) Изобретатель:
**Айса Хацзи Акбер, Сунь Гуанин,
Адили Гуликир, Абудуайни Мунир,
Чжао Юнсинь (CN)**

(74) Представитель:
Кузнецова С.А. (RU)

(57) Область применения: изобретение относится к способу получения гранатина А высокой чистоты. Задача изобретения: задача изобретения заключается в обеспечении способа получения гранатина А высокой чистоты, при этом в способе посредством сочетания низкотемпературной жидкостной хроматографии и очистки путем изомеризационного превращения и с применением экстракта кожуры граната в качестве сырья из экстракта высушенной кожуры граната можно получить эталонное вещество гранатина А со степенью чистоты, которая выше 98%.



A1

202293353

202293353

A1

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ГРАНАТИНА А ВЫСОКОЙ ЧИСТОТЫ

[0001]

Перекрестная ссылка на родственные заявки

[0002]

Данная заявка испрашивает приоритет на патентную заявку Китая № 202010415738.X, поданную 16.05.2020, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Область техники

[0003]

Настоящее изобретение относится к способу получения гранатина А высокой чистоты.

Уровень техники

[0004]

В современном обществе хроматография как способ разделения широко используется в таких областях, как фармацевтическая, химическая промышленность и т. п. На основании различий в таких аспектах, как адсорбционная способность, коэффициент распределения, растворимость и т. д., целевые соединения на хроматографической колонке могут быть непрерывно распределены с получением разделяемых цветных полос (бесцветные вещества в специальных устройствах обнаружения будут демонстрировать отличающиеся пики поглощения). Технология хроматографии характеризуется весьма широкой областью применения, и при разных потребностях требования к технологии хроматографии совершенно разные. В отношении особых образцов необходимо целенаправленно разрабатывать соответствующие технологии разделения, чтобы получить оптимальное разделение.

[0005]

Плоды гранатника, также называемого гранатовым деревом, являются фруктами, широко выращиваемыми в Китае, в частности в районе Синьцзян (древнее название «Западный край»). Высушенная кожура и цветы граната могут применяться в качестве лекарств, и обладают действием, останавливающим диарею, кровотечение из носа, кровавую рвоту, кровотечение из ран и т. п., и ими также можно лечить лейкорею. При наружном применении можно лечить средний отит. В высушенной кожуре и цветах граната в большом количестве содержатся растительные полифенольные соединения, и они обладают разнообразным антибактериальным и противовоспалительным действием. При этом гранатин А представляет собой основной активный компонент в высушенной кожуре/цветах граната. Стабильность гранатина А очень плохая, и в процессе разделения очень легко возникают примеси, при этом в мире пока еще нет способов очистки гранатина А высокой чистоты. С учетом таких особенностей разработаны технологии низкотемпературного разделения для получения эталонного вещества гранатина А высокой чистоты, в отношении которого можно подавать заявку на получение свидетельства на товар государственного стандарта, чтобы оно вносило вклад в контроль качества высушенной кожуры/цветов граната или другого лекарственного материала, в котором гранатин А является активным ингредиентом.

[0006]

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007]

Цель настоящего изобретения заключается в обеспечении способа получения гранатина А высокой чистоты, при этом в способе посредством сочетания низкотемпературной жидкостной хроматографии и очистки путем изомеризационного превращения и с применением экстракта кожуры граната в качестве сырья из экстракта высушенной кожуры граната можно получить эталонное вещество гранатина А со степенью чистоты, которая выше 98%.

Благодаря этому способу впервые получают эталонное вещество гранатина А высокой чистоты, которое удовлетворяет требованиям при подаче заявки на получение свидетельства на товар государственного стандарта в отношении гранатина А и которое может вносить вклад в контроль качества высушенной кожуры/цветов граната или другого лекарственного материала, в котором гранатин А является активным ингредиентом. Огромное значение имеют исследования критериев качества лекарственного материала, содержащего гранатин А. Гранатин А, полученный способом согласно настоящему изобретению, характеризуется высокой степенью чистоты, большим выходом и высоким процентом извлечения, при этом он удовлетворяет требованиям при подаче заявки на получение свидетельства на товар государственного стандарта в отношении гранатина А; и соответствующая технология очистки по сравнению с традиционной технологией очистки гранатина А является более простой в осуществлении, при этом степень чистоты высокая, оригинальность технологии заметная, и она обладает определенной промышленной ценностью.

[0008]

В способе получения гранатина А высокой чистоты согласно настоящему изобретению соответственно применяют смесь метанола и водного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы, смесь метанола, ацетонитрила и водного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы или смесь из ацетонитрила и водного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы, при этом конкретные операции выполняют согласно последовательности следующих этапов, на которых:

[0009]

при применении смеси метанола и водного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы:

[0010]

а) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным

детектором ультрафиолетового излучения; длину волны высокоэффективного жидкостного хроматографа устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; температуру колонки поддерживают на уровне 30°C; скорость потока поддерживают на уровне 180 мл/мин; метанол и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством вспомогательного насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола составляет 20%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; взвешивают 3 г экстракта высушенной кожуры граната, растворяют в 20 мл воды, центрифугируют с удалением осадка, вводят в виде пробы в высокоэффективный жидкостный хроматограф с осуществлением разделения; собирают компонент, содержащий гранатин А; концентрируют до 5 мл с использованием роторного испарителя при температуре 40°C; посредством сублимационной вакуумной сушки получают 230 мг желтого твердого порошкообразного вещества;

[0011]

б) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения; длину волны высокоэффективного жидкостного хроматографа устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; температуру колонки поддерживают на уровне от 7 до -30°C; скорость потока поддерживают на уровне 0,3-2,4 мл/мин; метанол и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,05-1,0%, смешивают посредством вспомогательного насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола поддерживают на уровне 15-50%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; взвешивают 5-40 мг полученной на этапе а части, богатой гранатином А, растворяют в 1 мл подвижной фазы, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения, получают соответственно первый пик и второй пик гранатина А; собирают компонент, содержащий

гранатин А; концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 30-50°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0012]

с) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения; длину волны высокоэффективного жидкостного хроматографа устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; температуру колонки поддерживают на уровне от 7°C до -30°C; скорость потока поддерживают на уровне 0,3-2,4 мл/мин; метанол и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,05-1,0%, смешивают посредством вспомогательного насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола поддерживают на уровне от 15% до 50%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий первый пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением второго пика гранатина А; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий второй пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением первого пика гранатина А; используемые в этих двух пробах компоненты объединяют; концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 30-50°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0013]

d) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения; длину волны высокоэффективного жидкостного хроматографа устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; температуру колонки поддерживают на уровне от 7°C до -2°C; скорость потока

поддерживают на уровне 0,3-4,7/мин; ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,05-1,0%, смешивают посредством вспомогательного насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание ацетонитрила поддерживают на уровне 10-30%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе с компонент вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением компонента, содержащего гранатин А; концентрируют до 1 мл с использованием роторного испарителя при температуре 30-50°C; осуществляют сублимационную вакуумную сушку с получением светло-желтого порошка гранатина А высокой чистоты; посредством высокоэффективного жидкостного хроматографа определяют его степень чистоты;

[0014]

при применении смеси метанола, ацетонитрила и водного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы:

[0015]

а) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения; длину волны высокоэффективного жидкостного хроматографа устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; температуру колонки поддерживают на уровне 30°C; скорость потока поддерживают на уровне 180 мл/мин; метанол и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством вспомогательного насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола составляет 20%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; взвешивают 3 г экстракта высушенной кожуры граната, растворяют в 20 мл воды, центрифугируют с удалением осадка, вводят в виде пробы в высокоэффективный жидкостный хроматограф с

осуществлением разделения; собирают компонент, содержащий гранатин А; концентрируют до 5 мл с использованием роторного испарителя при температуре 40°C; посредством сублимационной вакуумной сушки получают 230 мг желтого твердого порошкообразного вещества;

[0016]

b) длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 0,3-2,4 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне от 7°C до -30°C; метанол, ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,05-1,0%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола поддерживают на уровне 15-40%, содержание ацетонитрила поддерживают на уровне 5-15%, содержание водного раствора муравьиной кислоты поддерживают на уровне 55-80%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; взвешивают 5-40 мг полученной на этапе а части, богатой гранатином А, растворяют в 1 мл подвижной фазы, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения, получают соответственно первый пик и второй пик гранатина А; собирают компонент, содержащий гранатин А, концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 30-50°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0017]

c) длину волны высокоэффективного жидкостного хроматографа устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают в диапазоне 0,3-2,4 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне от 7°C до -30°C; метанол, ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,05-1,0%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола поддерживают на уровне от 15% до 40%, содержание ацетонитрила поддерживают на уровне от 5% до 15%,

содержание водного раствора муравьиной кислоты поддерживают на уровне от 55% до 80%; уравнивают хроматографическую колонку в течение 10-40 мин; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий первый пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением второго пика гранатина A; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий второй пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением первого пика гранатина A; используемые в двух пробах компоненты объединяют; концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 30-50°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0018]

d) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения; длину волны высокоэффективного жидкостного хроматографа устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; температуру колонки поддерживают на уровне от 7°C до -2°C; скорость потока поддерживают на уровне 0,3-4,7/мин; ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,05-1,0%, смешивают посредством вспомогательного насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание ацетонитрила поддерживают на уровне 10-30%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе c компонент вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением компонента, содержащего гранатин A; концентрируют до 1 мл с использованием роторного испарителя при температуре 30-50°C; осуществляют сублимационную вакуумную сушку с получением светло-желтого порошка гранатина A высокой чистоты; посредством высокоэффективного жидкостного хроматографа определяют его степень чистоты;

[0019]

при применении смеси ацетонитрила и водного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы:

[0020]

а) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения; длину волны высокоэффективного жидкостного хроматографа устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; температуру колонки поддерживают на уровне 30°C; скорость потока поддерживают на уровне 180 мл/мин; метанол и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством вспомогательного насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола составляет 20%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; взвешивают 3 г экстракта высушенной кожуры граната, растворяют в 20 мл воды, центрифугируют с удалением осадка, вводят в виде пробы в высокоэффективный жидкостный хроматограф с осуществлением разделения; собирают компонент, содержащий гранатин А; концентрируют до 5 мл с использованием роторного испарителя при температуре 40°C; посредством сублимационной вакуумной сушки получают 230 мг желтого твердого порошкообразного вещества;

[0021]

б) длину волны высокоэффективного жидкостного хроматографа устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 0,3-2,4 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне от 7°C до -2°C; ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,05-1,0%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание ацетонитрила поддерживают на уровне

10-30%, содержание водного раствора муравьиной кислоты поддерживают на уровне 70-90%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; взвешивают 5-40 мг полученной на этапе а части, богатой гранатином А, растворяют в 1 мл подвижной фазы, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения, получают соответственно первый пик и второй пик гранатина А; собирают компонент, содержащий гранатин А, концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 30-50°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0022]

с) длину волны высокоэффективного жидкостного хроматографа устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 0,3-2,4 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне от 7°C до -2°C; ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,05-1,0%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание ацетонитрила поддерживают на уровне от 10% до 30%, содержание водного раствора муравьиной кислоты поддерживают на уровне от 70% до 90%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий первый пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением второго пика гранатина А; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий второй пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением первого пика гранатина А; используемые в двух пробах компоненты объединяют; концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 30-50°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0023]

d) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения; длину волны высокоэффективного жидкостного хроматографа устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; температуру колонки поддерживают на уровне от 7°C до -2°C; скорость потока поддерживают на уровне 0,3-4,7/мин; ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,05-1,0%, смешивают посредством вспомогательного насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание ацетонитрила поддерживают на уровне 10-30%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе с компонент вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением компонента, содержащего гранатин А; концентрируют до 1 мл с использованием роторного испарителя при температуре 30-50°C; осуществляют сублимационную вакуумную сушку с получением светло-желтого порошка гранатина А высокой чистоты; посредством метода высокоэффективной жидкостной хроматографии определяют его степень чистоты.

[0024]

Содержание муравьиной кислоты в водном растворе муравьиной кислоты в смеси метанола и водного раствора муравьиной кислоты, используемой в качестве подвижной фазы на этапе b, этапе с и этапе d, поддерживают на уровне 0,1-0,3%.

[0025]

Температуру концентрирования при использовании смеси метанола и водного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы, использовании смеси метанола, ацетонитрила и водного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы или использовании смеси ацетонитрила и водного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы на этапе b, этапе с и этапе d поддерживают на уровне 30-37°C;

[0026]

При использовании смеси метанола и водного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы или использовании смеси метанола, ацетонитрила и водного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы на этапе b и на этапе c в процессе разделения температуру колонки поддерживают на уровне от -15°C до -25°C, а на этапе d температуру колонки поддерживают на уровне от 2°C до -2°C или при использовании смеси ацетонитрила и водного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы на этапе b и этапе c в процессе разделения температуру колонки поддерживают на уровне от 2°C до -2°C, а на этапе d температуру колонки поддерживают на уровне от 2°C до -2°C.

[0027]

Способ получения гранатина А высокой чистоты согласно настоящему изобретению, при этом в способе на основе сочетания принципов низкотемпературной хроматографии и нелинейной хроматографии и благодаря исследованиям механизма возникновения примеси из экстракта высушенной кожуры граната получают эталонное вещество гранатина А высокой чистоты. У полученного этим способом гранатина А степень чистоты выше 98%, и он удовлетворяет требованиям при подаче заявки на получение свидетельства на товар государственного стандарта в отношении гранатина А и может вносить вклад в контроль качества высушенной кожуры/цветов граната или другого лекарственного материала, в котором гранатин А является активным ингредиентом. Огромное значение имеют исследования критериев качества лекарственного материала, содержащего гранатин А.

Описание графических материалов

[0028]

На фиг. 1 представлено схематическое изображение хроматограммы разделения экстракта высушенной кожуры граната на этапе b согласно настоящему изобретению.

[0029]

На фиг. 2 представлено изображение измерения степени чистоты гранатина А, полученного на этапе d согласно настоящему изобретению, полученное с помощью жидкостной хроматографии.

Подробное описание

[0030]

Далее настоящее изобретение описано более подробно с помощью конкретных вариантов осуществления.

[0031]

Вариант осуществления 1

[0032]

При применении смеси метанола и водного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы:

[0033]

а) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 80 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; температуру колонки поддерживают на уровне 30°C; скорость потока поддерживают на уровне 180 мл/мин; метанол и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством вспомогательного насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола составляет 20%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; взвешивают 3 г экстракта высушенной

кожуры граната, растворяют в 20 мл воды, центрифугируют с удалением осадка, вводят в виде пробы в высокоэффективный жидкостный хроматограф с осуществлением разделения; собирают компонент, содержащий гранатин А, концентрируют до 5 мл с использованием роторного испарителя при температуре 40°C, посредством сублимационной вакуумной сушки получают 230 мг желтого твердого порошкообразного вещества;

[0034]

б) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; температуру колонки поддерживают на уровне -20°C; скорость потока поддерживают на уровне 1,2 мл/мин; метанол и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством вспомогательного насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола поддерживают на уровне 15%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; взвешивают 5 мг полученной на этапе а части, богатой гранатином А, растворяют в 1 мл подвижной фазы, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения, получают соответственно первый пик и второй пик гранатина А; собирают компонент, содержащий гранатин А, концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 30°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0035]

с) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также

называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; температуру колонки поддерживают на уровне -20°C; скорость потока поддерживают на уровне 1,2 мл/мин; метанол и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством вспомогательного насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола поддерживают на уровне 15%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий первый пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением второго пика гранатина A; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий второй пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением первого пика гранатина A; используемые в этих двух пробах компоненты объединяют, концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 30°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0036]

d) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; температуру колонки поддерживают на уровне -2°C; скорость потока поддерживают на уровне 1,2 мл/мин; ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание ацетонитрила составляет 10%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 90%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе c компонент вводят в

виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением компонента, содержащего гранатин А; концентрируют до 1 мл с использованием роторного испарителя при температуре 30°C, осуществляют сублимационную вакуумную сушку с получением 0,3 мг светло-желтого порошка гранатина А высокой чистоты, при этом степень чистоты составляет 98,9%, и степень извлечения составляет 7,5%.

[0037]

Вариант осуществления 2

[0038]

При применении смеси метанола и водного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы:

[0039]

а) выполняют согласно варианту осуществления 1;

[0040]

б) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; температуру колонки поддерживают на уровне -20°C; скорость потока поддерживают на уровне 0,3 мл/мин; метанол и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством вспомогательного насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола поддерживают на уровне 15%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; взвешивают 40 мг полученной на этапе а части, богатой гранатином А, растворяют в 1 мл подвижной фазы, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением

низкотемпературного разделения, получают соответственно первый пик и второй пик гранатина А; собирают компонент, содержащий гранатин А, концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 30°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0041]

с) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; температуру колонки поддерживают на уровне -20°C; скорость потока поддерживают на уровне 0,3 мл/мин; метанол и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством вспомогательного насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола поддерживают на уровне 15%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий первый пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением второго пика гранатина А; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий второй пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением первого пика гранатина А; используемые в двух пробах компоненты объединяют, концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 30°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0042]

d) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом,

оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; температуру колонки поддерживают на уровне -2°C ; скорость потока поддерживают на уровне 0,3 мл/мин; ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание ацетонитрила составляет 10%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 90%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе с компонент вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением компонента, содержащего гранатин А; концентрируют до 1 мл с использованием роторного испарителя при температуре 30°C , осуществляют сублимационную вакуумную сушку с получением 9,8 мг светло-желтого порошка гранатина А высокой чистоты, при этом степень чистоты составляет 98,9%, и степень извлечения составляет 30,6%.

[0043]

Вариант осуществления 3

[0044]

При применении смеси метанола и водного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы:

[0045]

а) выполняют согласно варианту осуществления 1;

[0046]

б) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также

называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; температуру колонки поддерживают на уровне 7°C; скорость потока поддерживают на уровне 1,8 мл/мин; метанол и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством вспомогательного насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола поддерживают на уровне 15%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; взвешивают 20 мг полученной на этапе а части, богатой гранатином А, растворяют в 1 мл подвижной фазы, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения, получают соответственно первый пик и второй пик гранатина А; собирают компонент, содержащий гранатин А, концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 30°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0047]

с) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; температуру колонки поддерживают на уровне 7°C; скорость потока поддерживают на уровне 1,8 мл/мин; метанол и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством вспомогательного насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола поддерживают на уровне 15%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий первый пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением второго пика гранатина А; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий второй пик, вводят в виде пробы в

хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением первого пика гранатина А; используемые в этих двух пробах компоненты объединяют, концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 30°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0048]

d) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; температуру колонки поддерживают на уровне 7°C; скорость потока поддерживают на уровне 2,5 мл/мин; ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание ацетонитрила составляет 10%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 90%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе с компонент вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением компонента, содержащего гранатин А; концентрируют до 1 мл с использованием роторного испарителя при температуре 30°C, осуществляют сублимационную вакуумную сушку с получением 6,0 мг светло-желтого порошка гранатина А высокой чистоты, при этом степень чистоты составляет 89,8%, и степень извлечения составляет 33,7%.

[0049]

Вариант осуществления 4

[0050]

При применении смеси метанола и водного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы:

[0051]

а) выполняют согласно варианту осуществления 1;

[0052]

б) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; температуру колонки поддерживают на уровне -30°C; скорость потока поддерживают на уровне 1,2 мл/мин; метанол и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством вспомогательного насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола поддерживают на уровне 15%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; взвешивают 40 мг полученной на этапе а части, богатой гранатином А, растворяют в 1 мл подвижной фазы, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения, получают соответственно первый пик и второй пик гранатина А; собирают компонент, содержащий гранатин А, концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 30°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0053]

с) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на

уровне 254 нм и 366 нм; температуру колонки поддерживают на уровне -30°C ; скорость потока поддерживают на уровне 1,2 мл/мин; метанол и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством вспомогательного насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола поддерживают на уровне 15%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий первый пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением второго пика гранатина A; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий второй пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением первого пика гранатина A; используемые в двух пробах компоненты объединяют, концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 30°C , добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0054]

d) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; температуру колонки поддерживают на уровне 5°C ; скорость потока поддерживают на уровне 3,0 мл/мин; ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание ацетонитрила составляет 10%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 90%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе c компонент вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением

низкотемпературного разделения с получением компонента, содержащего гранатин А; концентрируют до 1 мл с использованием роторного испарителя при температуре 30°C, осуществляют сублимационную вакуумную сушку с получением 9,2 мг светло-желтого порошка гранатина А высокой чистоты, при этом степень чистоты составляет 99,1%, и степень извлечения составляет 28,8%.

[0055]

Вариант осуществления 5

[0056]

При применении смеси метанола и водного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы:

[0057]

а) выполняют согласно варианту осуществления 1;

[0058]

б) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; температуру колонки поддерживают на уровне -15°C; скорость потока поддерживают на уровне 1,2 мл/мин; метанол и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством вспомогательного насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола поддерживают на уровне 30%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; взвешивают 40 мг полученной на этапе а части, богатой гранатином А, растворяют в 1 мл подвижной фазы, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения, получают соответственно первый пик и второй

пик гранатина А; собирают компонент, содержащий гранатин А, концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 30°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0059]

с) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; температуру колонки поддерживают на уровне -15°C; скорость потока поддерживают на уровне 1,2 мл/мин; метанол и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством вспомогательного насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола поддерживают на уровне 30%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий первый пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением второго пика гранатина А; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий второй пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением первого пика гранатина А; используемые в двух пробах компоненты объединяют, концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 30°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0060]

d) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также

называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; температуру колонки поддерживают на уровне -1°C; скорость потока поддерживают на уровне 1,2 мл/мин; ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание ацетонитрила составляет 10%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 90%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе с компонент вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением компонента, содержащего гранатин А. Концентрируют до 1 мл с использованием роторного испарителя при температуре 30°C, осуществляют сублимационную вакуумную сушку с получением 10,6 мг светло-желтого порошка гранатина А высокой чистоты, при этом степень чистоты составляет 96,5%, и степень извлечения составляет 33,1%.

[0061]

Вариант осуществления 6

[0062]

При применении смеси метанола и водного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы:

[0063]

а) выполняют согласно варианту осуществления 1;

[0064]

б) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на

уровне 254 нм и 366 нм; температуру колонки поддерживают на уровне -25°C; скорость потока поддерживают на уровне 2,0 мл/мин; метанол и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством вспомогательного насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола поддерживают на уровне 15%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; взвешивают 40 мг полученной на этапе а части, богатой гранатином А, растворяют в 1 мл подвижной фазы, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения, получают соответственно первый пик и второй пик гранатина А; собирают компонент, содержащий гранатин А, концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 30°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0065]

с) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; температуру колонки поддерживают на уровне -25°C; скорость потока поддерживают на уровне 2,0 мл/мин; метанол и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством вспомогательного насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола поддерживают на уровне 15%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий первый пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением второго пика гранатина А; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий второй пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного

разделения с получением первого пика гранатина А; используемые в двух пробах компоненты объединяют, концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 30°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0066]

d) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; температуру колонки поддерживают на уровне 2°C; скорость потока поддерживают на уровне 4,7 мл/мин; ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание ацетонитрила составляет 10%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 90%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня. Полученный на этапе с компонент вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением компонента, содержащего гранатин А; концентрируют до 1 мл с использованием роторного испарителя при температуре 30°C, осуществляют сублимационную вакуумную сушку с получением 9,5 мг светло-желтого порошка гранатина А высокой чистоты, при этом степень чистоты составляет 99,1%, и степень извлечения составляет 29,7%.

[0067]

Вариант осуществления 7

[0068]

При применении смеси метанола и водного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы:

[0069]

а) выполняют согласно варианту осуществления 1;

[0070]

б) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; температуру колонки поддерживают на уровне -25°C; скорость потока поддерживают на уровне 2,24 мл/мин; метанол и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством вспомогательного насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола поддерживают на уровне 50%; уравнивают хроматографическую колонку 20 мин; взвешивают 40 мг полученной на этапе а части, богатой гранатином А, растворяют в 1 мл подвижной фазы, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения, получают соответственно первый пик и второй пик гранатина А; собирают компонент, содержащий гранатин А, концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 30°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0071]

с) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; температуру колонки поддерживают на уровне -25°C; скорость потока поддерживают на уровне 2,4 мл/мин; метанол и водный раствор

муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством вспомогательного насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола поддерживают на уровне 50%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий первый пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением второго пика гранатина A; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий второй пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением первого пика гранатина A; используемые в двух пробах компоненты объединяют, концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 30°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0072]

d) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; температуру колонки поддерживают на уровне 6°C; скорость потока поддерживают на уровне 1,2 мл/мин; ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание ацетонитрила составляет 10%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 90%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе c компонент вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением компонента, содержащего гранатин A; концентрируют до 1 мл с использованием роторного испарителя при

температуре 30°C, осуществляют сублимационную вакуумную сушку с получением 4,5 мг светло-желтого порошка гранатина А высокой чистоты, при этом степень чистоты составляет 95,2%, и степень извлечения составляет 14,1%.

[0073]

Вариант осуществления 8

[0074]

При применении смеси метанола, ацетонитрила и водного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы:

[0075]

а) выполняют согласно варианту осуществления 1;

[0076]

б) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 0,3 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне -20°C; метанол, ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола поддерживают на уровне 15%, содержание ацетонитрила составляет 5%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 80%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; взвешивают 40 мг полученной на этапе а части, богатой гранатином А, растворяют в 1 мл подвижной фазы, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения, получают соответственно первый пик и второй пик гранатина А; собирают компонент,

содержащий гранатин А, концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 30°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0077]

с) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 0,3 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне -20°C; метанол, ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола поддерживают на уровне 15%, содержание ацетонитрила составляет 5%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 80%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий первый пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением второго пика гранатина А; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий второй пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением первого пика гранатина А; используемые в двух пробах компоненты объединяют, концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 30°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0078]

d) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом,

оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 1,2 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне -2°C; ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание ацетонитрила составляет 10%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 90%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе с компонент вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением компонента, содержащего гранатин А; концентрируют до 1 мл с использованием роторного испарителя при температуре 30°C, осуществляют сублимационную вакуумную сушку с получением 12,2 мг светло-желтого порошка гранатина А высокой чистоты, при этом степень чистоты составляет 98,9%, и степень извлечения составляет 38,1%.

[0079]

Вариант осуществления 9

[0080]

При применении смеси метанола, ацетонитрила и водного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы:

[0081]

а) выполняют согласно варианту осуществления 1;

[0082]

б) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также

называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 1,2 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне -30°C; метанол, ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола поддерживают на уровне 40%, содержание ацетонитрила составляет 5%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 55%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; взвешивают 40 мг полученной на этапе а части, богатой гранатином А, растворяют в 1 мл подвижной фазы, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения, получают соответственно первый пик и второй пик гранатина А; собирают компонент, содержащий гранатин А, концентрируют и высушивают с использованием ротационного испарителя при температуре 30°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0083]

с) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 1,2 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне -30°C; метанол, ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола поддерживают на уровне 40%, содержание ацетонитрила составляет 5%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 55%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий первый пик, вводят

в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением второго пика гранатина А; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий второй пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением первого пика гранатина А; используемые в двух пробах компоненты объединяют, концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 30°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0084]

d) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 0,3 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне 7°C; ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание ацетонитрила составляет 10%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 90%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе c компонент вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением компонента, содержащего гранатин А; концентрируют до 1 мл с использованием роторного испарителя при температуре 30°C, осуществляют сублимационную вакуумную сушку с получением 11,5 мг светло-желтого порошка гранатина А высокой чистоты, при этом степень чистоты составляет 98,5%, и степень извлечения составляет 35,9%.

[0085]

Вариант осуществления 10

[0086]

При применении смеси метанола, ацетонитрила и водного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы:

[0087]

а) выполняют согласно варианту осуществления 1;

[0088]

б) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 2,4 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне 7°C; метанол, ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола поддерживают на уровне 20%, содержание ацетонитрила составляет 15%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 65%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; взвешивают 40 мг полученной на этапе а части, богатой гранатином А, растворяют в 1 мл подвижной фазы, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения, получают соответственно первый пик и второй пик гранатина А; собирают компонент, содержащий гранатин А, концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 30°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0089]

с) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 2,4 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне 7°C; метанол, ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола поддерживают на уровне 20%, содержание ацетонитрила составляет 15%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 65%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий первый пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением второго пика гранатина A; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий второй пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением первого пика гранатина A; используемые в двух пробах компоненты объединяют, концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 30°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0090]

d) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 2,4 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне -30°C; ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты

составляет 0,1%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание ацетонитрила составляет 10%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 90%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе с компонент вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением компонента, содержащего гранатин А; концентрируют до 1 мл с использованием роторного испарителя при температуре 30°C, осуществляют сублимационную вакуумную сушку с получением 13,2 мг светло-желтого порошка гранатина А высокой чистоты, при этом степень чистоты составляет 98,1%, и степень извлечения составляет 41,2%.

[0091]

Вариант осуществления 11

[0092]

При применении смеси ацетонитрила и водного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы:

[0093]

а) выполняют согласно варианту осуществления 1;

[0094]

б) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 80 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 1,2 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне -2°C; ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном

жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание ацетонитрила составляет 5%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 95%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; взвешивают 40 мг полученной на этапе а части, богатой гранатином А, растворяют в 1 мл подвижной фазы, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения, получают соответственно первый пик и второй пик гранатина А; собирают компонент, содержащий гранатин А, концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 30°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0095]

с) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 80 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 1,2 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне -2°C; ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание ацетонитрила составляет 5%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 95%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий первый пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением второго пика гранатина А; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий второй пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением первого пика гранатина А; используемые в двух пробах компоненты объединяют, концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при

температуре 30°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0096]

d) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 1,2 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне -2°C; ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание ацетонитрила составляет 5%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 90%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня. Полученный на этапе с компонент вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением компонента, содержащего гранатин А; концентрируют до 1 мл с использованием роторного испарителя при температуре 30°C, осуществляют сублимационную вакуумную сушку с получением 11,2 мг светло-желтого порошка гранатина А высокой чистоты, при этом степень чистоты составляет 90,1%, и степень извлечения составляет 31,5%.

[0097]

Вариант осуществления 12

[0098]

При применении смеси ацетонитрила и водного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы:

[0099]

а) выполняют согласно варианту осуществления 1;

[0100]

б) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 80 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 0,3 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне 7°C; ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание ацетонитрила составляет 15%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 95%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; взвешивают 40 мг полученной на этапе а части, богатой гранатином А, растворяют в 1 мл подвижной фазы, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения, получают соответственно первый пик и второй пик гранатина А; собирают компонент, содержащий гранатин А, концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 30°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0101]

с) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 80 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 0,3 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне 7°C; ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты

составляет 0,1%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание ацетонитрила составляет 15%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 95%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий первый пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением второго пика гранатина A; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий второй пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением первого пика гранатина A; используемые в двух пробах компоненты объединяют, концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 30°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0102]

d) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 1,2 мл/мин. Поддерживают температуру колонки на уровне -2°C; ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание ацетонитрила составляет 15%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 90%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе c компонент вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением компонента, содержащего гранатин A; концентрируют до 1 мл с использованием роторного испарителя при

температуре 30°C, осуществляют сублимационную вакуумную сушку с получением 14,0 мг светло-желтого порошка гранатина А высокой чистоты, при этом степень чистоты составляет 86,3%, и степень извлечения составляет 37,8%.

[0103]

Вариант осуществления 13

[0104]

При применении смеси метанола, ацетонитрила и водного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы:

[0105]

а) выполняют согласно варианту осуществления 1;

[0106]

б) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 1,2 мл/мин. Поддерживают температуру колонки на уровне -20°C; метанол, ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола поддерживают на уровне 20%, содержание ацетонитрила составляет 15%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 65%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; взвешивают 40 мг полученной на этапе а части, богатой гранатином А, растворяют в 1 мл подвижной фазы, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения, получают соответственно первый пик и второй пик гранатина А; собирают компонент,

содержащий гранатин А, концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 30°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0107]

с) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 1,2 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне -20°C; метанол, ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола поддерживают на уровне 20%, содержание ацетонитрила составляет 15%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 65%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий первый пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением второго пика гранатина А; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий второй пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением первого пика гранатина А; используемые в двух пробах компоненты объединяют, концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 50°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0108]

d) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом,

оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 0,3 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне -2°C; ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание ацетонитрила составляет 10%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 90%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе с компонент вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением компонента, содержащего гранатин А; концентрируют до 1 мл с использованием роторного испарителя при температуре 50°C, осуществляют сублимационную вакуумную сушку с получением 12,8 мг светло-желтого порошка гранатина А высокой чистоты, при этом степень чистоты составляет 96,5%, и степень извлечения составляет 40,0%.

[0109]

Вариант осуществления 14

[0110]

При применении смеси метанола, ацетонитрила и водного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы:

[0111]

а) выполняют согласно варианту осуществления 1;

[0112]

б) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также

называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 2,0 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне -10°C; метанол, ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола поддерживают на уровне 20%, содержание ацетонитрила составляет 15%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 65%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; взвешивают 40 мг полученной на этапе а части, богатой гранатином А, растворяют в 1 мл подвижной фазы, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения, получают соответственно первый пик и второй пик гранатина А; собирают компонент, содержащий гранатин А, концентрируют и высушивают с использованием ротационного испарителя при температуре 30°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0113]

с) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 2,0 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне -10°C; метанол, ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола поддерживают на уровне 20%, содержание ацетонитрила составляет 15%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 65%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий первый пик, вводят

в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением второго пика гранатина А; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий второй пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением первого пика гранатина А; используемые в двух пробах компоненты объединяют, концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 37°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0114]

d) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 2,5 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне -1°C; ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание ацетонитрила составляет 30%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 90%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе c компонент вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением компонента, содержащего гранатин А; концентрируют до 1 мл с использованием роторного испарителя при температуре 37°C, осуществляют сублимационную вакуумную сушку с получением 13,4 мг светло-желтого порошка гранатина А высокой чистоты, при этом степень чистоты составляет 98,3%, и степень извлечения составляет 41,9%.

[0115]

Вариант осуществления 15

[0116]

При применении смеси метанола, ацетонитрила и водного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы:

[0117]

а) выполняют согласно варианту осуществления 1;

[0118]

б) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 2,4 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне 7°C; метанол, ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,05%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола поддерживают на уровне 20%, содержание ацетонитрила составляет 15%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 65%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; взвешивают 40 мг полученной на этапе а части, богатой гранатином А, растворяют в 1 мл подвижной фазы, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения, получают соответственно первый пик и второй пик гранатина А; собирают компонент, содержащий гранатин А, концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 30°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0119]

с) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 2,4 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне 7°C; метанол, ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,05%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола поддерживают на уровне 20%, содержание ацетонитрила составляет 15%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 65%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий первый пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением второго пика гранатина A; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий второй пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением первого пика гранатина A; используемые в двух пробах компоненты объединяют, концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 37°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0120]

d) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 4,7 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне 7°C; ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты

составляет 0,05%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание ацетонитрила составляет 20%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 90%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе с компонент вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением компонента, содержащего гранатин А; концентрируют до 1 мл с использованием роторного испарителя при температуре 37°C, осуществляют сублимационную вакуумную сушку с получением 15 мг светло-желтого порошка гранатина А высокой чистоты, при этом степень чистоты составляет 90,8%, и степень извлечения составляет 42,6%.

[0121]

Вариант осуществления 16

[0122]

При применении смеси метанола, ацетонитрила и водного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы:

[0123]

а) выполняют согласно варианту осуществления 1;

[0124]

б) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 1,5 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне -15°C; метанол, ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,3%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном

жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола поддерживают на уровне 20%, содержание ацетонитрила составляет 15%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 65%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; взвешивают 40 мг полученной на этапе а части, богатой гранатином А, растворяют в 1 мл подвижной фазы, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения, получают соответственно первый пик и второй пик гранатина А; собирают компонент, содержащий гранатин А, концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 30°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0125]

с) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 1,5 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне -15°C; метанол, ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,3%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола поддерживают на уровне 20%, содержание ацетонитрила составляет 15%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 65%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий первый пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением второго пика гранатина А; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий второй пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением первого пика гранатина А; используемые в этих двух

пробах компоненты объединяют, концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 37°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0126]

d) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 3,5 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне 5°C; ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,3%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание ацетонитрила составляет 10%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 90%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе с компонент вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением компонента, содержащего гранатин А; концентрируют до 1 мл с использованием роторного испарителя при температуре 37°C, осуществляют сублимационную вакуумную сушку с получением 12,1 мг светло-желтого порошка гранатина А высокой чистоты, при этом степень чистоты составляет 98,0%, и степень извлечения составляет 37,0%.

[0127]

Вариант осуществления 17

[0128]

При применении смеси метанола, ацетонитрила и водного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы:

[0129]

а) выполняют согласно варианту осуществления 1;

[0130]

б) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 1,5 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне -30°C; метанол, ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 1,0%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола поддерживают на уровне 20%, содержание ацетонитрила составляет 15%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 65%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; взвешивают 40 мг полученной на этапе а части, богатой гранатином А, растворяют в 1 мл подвижной фазы, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения, получают соответственно первый пик и второй пик гранатина А; собирают компонент, содержащий гранатин А, концентрируют и высушивают с использованием ротационного испарителя при температуре 30°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0131]

с) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на

уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 1,5 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне -30°C; метанол, ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 1,0%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола поддерживают на уровне 20%, содержание ацетонитрила составляет 15%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 65%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий первый пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением второго пика гранатина A; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий второй пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением первого пика гранатина A; используемые в этих двух пробах компоненты объединяют, концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 37°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0132]

d) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 4,0 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне 1°C; ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 1,0%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание ацетонитрила составляет 10%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 90%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе c компонент вводят в

виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением компонента, содержащего гранатин А; концентрируют до 1 мл с использованием роторного испарителя при температуре 37°C, осуществляют сублимационную вакуумную сушку с получением 10,7 мг светло-желтого порошка гранатина А высокой чистоты, при этом степень чистоты составляет 96,4%, и степень извлечения составляет 32,1%.

[0133]

Вариант осуществления 18

[0134]

При применении смеси метанола, ацетонитрила и водного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы:

[0135]

а) выполняют согласно варианту осуществления 1;

[0136]

б) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 0,8 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне 1°C; метанол, ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,2%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола поддерживают на уровне 30%, содержание ацетонитрила составляет 5%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 65%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; взвешивают 40 мг полученной на этапе а части, богатой гранатином А,

растворяют в 1 мл подвижной фазы, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения, как показано на фигуре 1, получают соответственно первый пик и второй пик гранатина А; собирают компонент, содержащий гранатин А, концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 30°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0137]

с) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 0,8 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне 1°C; метанол, ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,2%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола поддерживают на уровне 30%, содержание ацетонитрила составляет 5%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 65%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий первый пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением второго пика гранатина А; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий второй пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением первого пика гранатина А; используемые в этих двух пробах компоненты объединяют, концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 37°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0138]

d) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 0,8 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне 2°C; ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,2%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание ацетонитрила составляет 15%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 85%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе с компонент вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением компонента, содержащего гранатин А; концентрируют до 1 мл с использованием роторного испарителя при температуре 37°C, осуществляют сублимационную вакуумную сушку с получением 13,5 мг светло-желтого порошка гранатина А высокой чистоты, как показано на фигуре 2, при этом степень чистоты составляет 99,1%, и степень извлечения составляет 42,2%.

[0139]

Вариант осуществления 19

[0140]

При применении смеси метанола, ацетонитрила и водного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы:

[0141]

a) выполняют согласно варианту осуществления 1;

[0142]

b) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 0,3 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне -20°C; метанол, ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 1,0%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола поддерживают на уровне 30%, содержание ацетонитрила составляет 5%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 65%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; взвешивают 40 мг полученной на этапе а части, богатой гранатином А, растворяют в 1 мл подвижной фазы, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения, как показано на фигуре 1, получают соответственно первый пик и второй пик гранатина А; собирают компонент, содержащий гранатин А, концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 30°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0143]

с) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 0,3 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне -20°C; метанол, ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при

этом содержание метанола поддерживают на уровне 30%, содержание ацетонитрила составляет 5%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 65%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий первый пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением второго пика гранатина A; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий второй пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением первого пика гранатина A; используемые в двух пробах компоненты объединяют, концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 37°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0144]

d) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 0,3 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне -2°C; ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание ацетонитрила составляет 15%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 85%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе c компонент вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением компонента, содержащего гранатин A; концентрируют до 1 мл с использованием роторного испарителя при температуре 37°C, осуществляют сублимационную вакуумную сушку с получением 12,4 мг светло-желтого порошка гранатина A высокой чистоты, как

показано на фигуре 2, при этом степень чистоты составляет 97,6%, и степень извлечения составляет 38,8%.

[0145]

Вариант осуществления 20

[0146]

При применении смеси метанола, ацетонитрила и водного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы:

[0147]

а) выполняют согласно варианту осуществления 1;

[0148]

б) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 2,4 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне -30°C; метанол, ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола поддерживают на уровне 30%, содержание ацетонитрила составляет 12%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 58%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; взвешивают 40 мг полученной на этапе а части, богатой гранатином А, растворяют в 1 мл подвижной фазы, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения, получают соответственно первый пик и второй пик гранатина А; собирают компонент, содержащий гранатин А, концентрируют и высушивают с использованием

роторного испарителя при температуре 30°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0149]

с) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 2,4 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне -30°C; метанол, ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 1,0%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола поддерживают на уровне 30%, содержание ацетонитрила составляет 12%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 58%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий первый пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением второго пика гранатина A; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий второй пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением первого пика гранатина A; используемые в этих двух пробах компоненты объединяют, концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 37°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0150]

d) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также

называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 4,7 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне -2°C; ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание ацетонитрила составляет 15%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 85%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе с компонент вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением компонента, содержащего гранатин А; концентрируют до 1 мл с использованием роторного испарителя при температуре 37°C, осуществляют сублимационную вакуумную сушку с получением 11,1 мг светло-желтого порошка гранатина А высокой чистоты, при этом степень чистоты составляет 94,9%, и степень извлечения составляет 32,9%.

[0151]

Вариант осуществления 21

[0152]

При применении смеси метанола, ацетонитрила и водного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы:

[0153]

а) выполняют согласно варианту осуществления 1;

[0154]

б) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на

уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 0,3 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне 5°C; метанол, ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола поддерживают на уровне 15%, содержание ацетонитрила 15%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 70%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; взвешивают 40 мг полученной на этапе а части, богатой гранатином А, растворяют в 1 мл подвижной фазы, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения, получают соответственно первый пик и второй пик гранатина А; собирают компонент, содержащий гранатин А, концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 30°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0155]

с) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 0,3 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне 5°C; метанол, ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола поддерживают на уровне 15%, содержание ацетонитрила составляет 15%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 70%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий первый пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением

низкотемпературного разделения с получением второго пика гранатина А; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий второй пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением первого пика гранатина А; используемые в двух пробах компоненты объединяют, концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 37°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0156]

d) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 0,3 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне 7°C; ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 1,0%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание ацетонитрила составляет 15%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 85%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе c компонент вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением компонента, содержащего гранатин А; концентрируют до 1 мл с использованием роторного испарителя при температуре 37°C, осуществляют сублимационную вакуумную сушку с получением 10,1 мг светло-желтого порошка гранатина А высокой чистоты, при этом степень чистоты составляет 94,1%, и степень извлечения составляет 29,7%.

[0157]

Вариант осуществления 22

[0158]

При применении смеси метанола, ацетонитрила и водного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы:

[0159]

а) выполняют согласно варианту осуществления 1;

[0160]

б) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 2,4 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне 7°C; метанол, ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола поддерживают на уровне 40%, содержание ацетонитрила составляет 5%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 55%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; взвешивают 40 мг полученной на этапе а части, богатой гранатином А, растворяют в 1 мл подвижной фазы, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения, получают соответственно первый пик и второй пик гранатина А; собирают компонент, содержащий гранатин А, концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 30°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0161]

с) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 2,4 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне 7°C; метанол, ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола поддерживают на уровне 40%, содержание ацетонитрила составляет 5%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 55%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий первый пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением второго пика гранатина A; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий второй пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением первого пика гранатина A; используемые в двух пробах компоненты объединяют, концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 37°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0162]

d) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 2,4 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне -2°C; ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты

составляет 1,0%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание ацетонитрила составляет 15%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 85%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе с компонент вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением компонента, содержащего гранатин А; концентрируют до 1 мл с использованием роторного испарителя при температуре 37°C, осуществляют сублимационную вакуумную сушку с получением 12,8 мг светло-желтого порошка гранатина А высокой чистоты, при этом степень чистоты составляет 96,8%, и степень извлечения составляет 38,7%.

[0163]

Вариант осуществления 23

[0164]

При применении смеси ацетонитрила и водного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы:

[0165]

а) выполняют согласно варианту осуществления 1;

[0166]

б) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 2,4 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне -2°C; ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном

жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание ацетонитрила поддерживают на уровне 10%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 90%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; взвешивают 40 мг полученной на этапе а части, богатой гранатином А, растворяют в 1 мл подвижной фазы, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения, получают соответственно первый пик и второй пик гранатина А; собирают компонент, содержащий гранатин А, концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 30°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0167]

с) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 2,4 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне -2°C; ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание ацетонитрила поддерживают на уровне 10%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 90%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий первый пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением второго пика гранатина А; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий второй пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением первого пика гранатина А; используемые в двух пробах компоненты объединяют, концентрируют и высушивают с использованием

ротаторного испарителя при температуре 35°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0168]

d) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 4,7 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне -2°C; ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 1,0%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание ацетонитрила составляет 10%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 90%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе с компонент вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением компонента, содержащего гранатин А; посредством устройства ротационного выпаривания при температуре 35°C концентрируют до 1 мл, осуществляют сублимационную вакуумную сушку с получением 14,3 мг светло-желтого порошка гранатина А высокой чистоты, при этом степень чистоты составляет 87,1%, и степень извлечения составляет 38,9%.

[0169]

Вариант осуществления 24

[0170]

При применении смеси ацетонитрила и водного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы:

[0171]

а) выполняют согласно варианту осуществления 1;

[0172]

б) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 1,0 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне 7°C; ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание ацетонитрила поддерживают на уровне 30%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 70%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; взвешивают 40 мг полученной на этапе а части, богатой гранатином А, растворяют в 1 мл подвижной фазы, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения, получают соответственно первый пик и второй пик гранатина А; собирают компонент, содержащий гранатин А, концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 30°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0173]

с) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 1,0 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне 7°C; ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты

составляет 0,1%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание ацетонитрила поддерживают на уровне 20%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 80%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий первый пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением второго пика гранатина A; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий второй пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением первого пика гранатина A; используемые в двух пробах компоненты объединяют, концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 37°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0174]

d) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 4,7 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне 2°C; ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 1,0%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание ацетонитрила составляет 30%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 70%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе c компонент вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением компонента, содержащего гранатин A; концентрируют до 1 мл с использованием роторного испарителя при

температуре 37°C, осуществляют сублимационную вакуумную сушку с получением 14,1 мг светло-желтого порошка гранатина А высокой чистоты, при этом степень чистоты составляет 85,4%, и степень извлечения составляет 37,6%.

[0175]

Вариант осуществления 25

[0176]

При применении смеси ацетонитрила и водного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы:

[0177]

а) выполняют согласно варианту осуществления 1;

[0178]

б) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 0,3 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне 2°C; ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание ацетонитрила поддерживают на уровне 20%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 80%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; взвешивают 20 мг полученной на этапе а части, богатой гранатином А, растворяют в 1 мл подвижной фазы, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения, получают соответственно первый пик и второй пик гранатина А; собирают компонент, содержащий гранатин А, концентрируют

и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 30°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0179]

с) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 0,3 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне 2°C; ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание ацетонитрила поддерживают на уровне 20%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 80%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий первый пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением второго пика гранатина A; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий второй пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением первого пика гранатина A; используемые в двух пробах компоненты объединяют, концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 37°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

[0180]

d) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой (технические характеристики: длина 250 мм, диаметр 10 мм, размер частиц заполнителя 10 мкм) соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения (также

называемым детектором DAD); длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 4,7 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне 7°C; ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 1,0%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание ацетонитрила составляет 30%, содержание водного раствора муравьиной кислоты составляет 70%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе с компонент вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением компонента, содержащего гранатин А; концентрируют до 1 мл с использованием роторного испарителя при температуре 37°C, осуществляют сублимационную вакуумную сушку с получением 3,8 мг светло-желтого порошка гранатина А высокой чистоты, при этом степень чистоты составляет 95,4%, и степень извлечения составляет 19,4%.

[0181]

Вариант осуществления 26

[0182]

Гранатин А в любом из вариантов осуществления 1-25 может быть использован в качестве эталонного вещества для измерения содержания гранатина А в богатом на гранатин А лекарственном материале, например в таком лекарственном материале, как высушенная кожура граната и цветы граната, при этом гранатин А, у которого степень чистоты выше чем 98%, удовлетворяет требованиям при подаче заявки на получение свидетельства на товар государственного стандарта и может вносить вклад в контроль качества высушенной кожуры/цветов граната или другого лекарственного материала, в котором гранатин А является активным ингредиентом. Огромное значение имеют исследования критериев качества лекарственного материала, содержащего гранатин А.

[0183]

Наконец, следует отметить, что приведенные выше варианты осуществления используются исключительно для иллюстрации технических решений настоящего изобретения, а не для их ограничения. Хотя настоящее изобретение было подробно описано со ссылкой на варианты осуществления, специалистам в данной области техники должно быть понятно, что любая модификация или эквивалентная замена технических решений настоящего изобретения не выходят за рамки сущности и объема технических решений настоящего изобретения и должны быть включены в объем формулы настоящего изобретения.

Формула изобретения

1. Способ получения гранатина А высокой чистоты, отличающийся тем, что соответственно применяют смесь метанола и водного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы, смесь метанола, ацетонитрила и водного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы или смесь ацетонитрила и водного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы, при этом конкретные операции выполняют согласно последовательности следующих этапов, на которых:

при применении смеси метанола и водного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы:

а) хроматографическую колонку С18 с обращенной фазой соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения; длину волны высокоэффективного жидкостного хроматографа устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; температуру колонки поддерживают на уровне 30°C; скорость потока поддерживают на уровне 180 мл/мин; метанол и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством вспомогательного насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола составляет 20%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; взвешивают 3 г экстракта высушенной кожуры граната, растворяют в 20 мл воды, центрифугируют с удалением осадка, вводят в виде пробы в высокоэффективный жидкостный хроматограф с осуществлением разделения; собирают компонент, содержащий гранатин А, концентрируют до 5 мл с использованием роторного испарителя при температуре 40°C, посредством сублимационной вакуумной сушки получают 230 мг желтого твердого порошкообразного вещества;

б) хроматографическую колонку С18 с обращенной фазой соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным

детектором ультрафиолетового излучения; длину волны высокоэффективного жидкостного хроматографа устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; температуру колонки поддерживают на уровне от 7 до -30°C; скорость потока поддерживают на уровне 0,3-2,4 мл/мин; метанол и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,05-1,0%, смешивают посредством вспомогательного насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола поддерживают на уровне 15-50%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; взвешивают 5-40 мг полученной на этапе а части, богатой гранатином А, растворяют в 1 мл подвижной фазы, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения, получают соответственно первый пик и второй пик гранатина А; собирают компонент, содержащий гранатин А, концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 30-50°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

с) хроматографическую колонку С18 с обращенной фазой соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения; длину волны высокоэффективного жидкостного хроматографа устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; температуру колонки поддерживают на уровне от 7°C до -30°C; скорость потока поддерживают на уровне 0,3-2,4 мл/мин; метанол и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,05-1,0%, смешивают посредством вспомогательного насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола поддерживают на уровне 15-50%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий первый пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением второго пика гранатина А; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий второй пик, вводят в виде пробы в

хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением первого пика гранатина А; используемые в этих двух пробах компоненты объединяют, концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 30-50°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

d) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения; длину волны высокоэффективного жидкостного хроматографа устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; температуру колонки поддерживают на уровне от 7°C до -2°C; скорость потока поддерживают на уровне 0,3-4,7 мл/мин; ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,05-1,0%, смешивают посредством вспомогательного насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание ацетонитрила поддерживают на уровне 10-30%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе с компонент вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением компонента, содержащего гранатин А; концентрируют до 1 мл с использованием роторного испарителя при температуре 30-50°C, осуществляют сублимационную вакуумную сушку с получением светло-желтого порошка гранатина А высокой чистоты, посредством высокоэффективной жидкостной хроматографии определяют его степень чистоты;

при применении смеси метанола, ацетонитрила и водного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы:

a) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения; длину волны высокоэффективного жидкостного хроматографа устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; температуру колонки поддерживают на уровне 30°C; скорость потока

поддерживают на уровне 180 мл/мин; метанол и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством вспомогательного насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола составляет 20%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; взвешивают 3 г экстракта высушенной кожуры граната, растворяют в 20 мл воды, центрифугируют с удалением осадка, вводят в виде пробы в высокоэффективный жидкостный хроматограф с осуществлением разделения; собирают компонент, содержащий гранатин А, концентрируют до 5 мл с использованием роторного испарителя при температуре 40°C, посредством сублимационной вакуумной сушки получают 230 мг желтого твердого порошкообразного вещества;

б) длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 0,3-2,4 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне от 7°C до -30°C; метанол, ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,05-1,0%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола поддерживают на уровне 15-40%, содержание ацетонитрила поддерживают на уровне 5-15%, содержание водного раствора муравьиной кислоты поддерживают на уровне 55-80%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; взвешивают 5-40 мг полученной на этапе а части, богатой гранатином А, растворяют в 1 мл подвижной фазы, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения, получают соответственно первый пик и второй пик гранатина А; собирают компонент, содержащий гранатин А, концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 30-50°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

с) длину волны высокоэффективного жидкостного хроматографа устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают в диапазоне 0,3-2,4 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне от 7°C до -30°C; метанол,

ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,05-1,0%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола поддерживают на уровне от 15% до 40%, содержание ацетонитрила поддерживают на уровне от 5% до 15%, содержание водного раствора муравьиной кислоты поддерживают на уровне от 55% до 80%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий первый пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением второго пика гранатина A; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий второй пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением первого пика гранатина A; используемые в двух пробах компоненты объединяют, концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 30-50°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

d) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения; длину волны высокоэффективного жидкостного хроматографа устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; температуру колонки поддерживают на уровне от 7°C до -2°C; скорость потока поддерживают на уровне 0,3-4,7/мин, ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,05-1,0%, смешивают посредством вспомогательного насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание ацетонитрила поддерживают на уровне 10-30%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе c компонент вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением компонента, содержащего гранатин A; концентрируют до 1 мл с использованием роторного испарителя при температуре 30-50°C, осуществляют сублимационную вакуумную

сушку с получением светло-желтого порошка гранатина А высокой чистоты, посредством высокоэффективной жидкостной хроматографии определяют его степень чистоты;

при применении смеси ацетонитрила и водного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы:

а) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения; длину волны высокоэффективного жидкостного хроматографа устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; температуру колонки поддерживают на уровне 30°C; скорость потока поддерживают на уровне 180 мл/мин; метанол и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,1%, смешивают посредством вспомогательного насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание метанола составляет 20%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; взвешивают 3 г экстракта высушенной кожуры граната, растворяют в 20 мл воды, центрифугируют с удалением осадка, вводят в виде пробы в высокоэффективный жидкостный хроматограф с осуществлением разделения; собирают компонент, содержащий гранатин А, концентрируют до 5 мл с использованием роторного испарителя при температуре 40°C, посредством сублимационной вакуумной сушки получают 230 мг желтого твердого порошкообразного вещества;

б) длину волны высокоэффективного жидкостного хроматографа устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 0,3-2,4 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне от 7°C до -2°C; ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,05-1,0%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание ацетонитрила поддерживают на уровне 10-30%, содержание водного раствора муравьиной кислоты поддерживают на

уровне 70-90%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; взвешивают 5-40 мг полученной на этапе а части, богатой гранатином А, растворяют в 1 мл подвижной фазы, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения, получают соответственно первый пик и второй пик гранатина А; собирают компонент, содержащий гранатин А, концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 30-50°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

с) длину волны высокоэффективного жидкостного хроматографа устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддерживают на уровне 0,3-2,4 мл/мин; температуру колонки поддерживают на уровне от 7°C до -2°C; ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,05-1,0%, смешивают посредством насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание ацетонитрила поддерживают на уровне от 10% до 30%, содержание водного раствора муравьиной кислоты поддерживают на уровне от 70% до 90%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий первый пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением второго пика гранатина А; полученный на этапе b компонент, демонстрирующий второй пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением первого пика гранатина А; используемые в двух пробах компоненты объединяют, концентрируют и высушивают с использованием роторного испарителя при температуре 30-50°C, добавляют 1 мл подвижной фазы с растворением, откладывают на время;

d) хроматографическую колонку C18 с обращенной фазой соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения; длину волны высокоэффективного жидкостного хроматографа устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; температуру колонки поддерживают на уровне от 7°C до -2°C; скорость потока

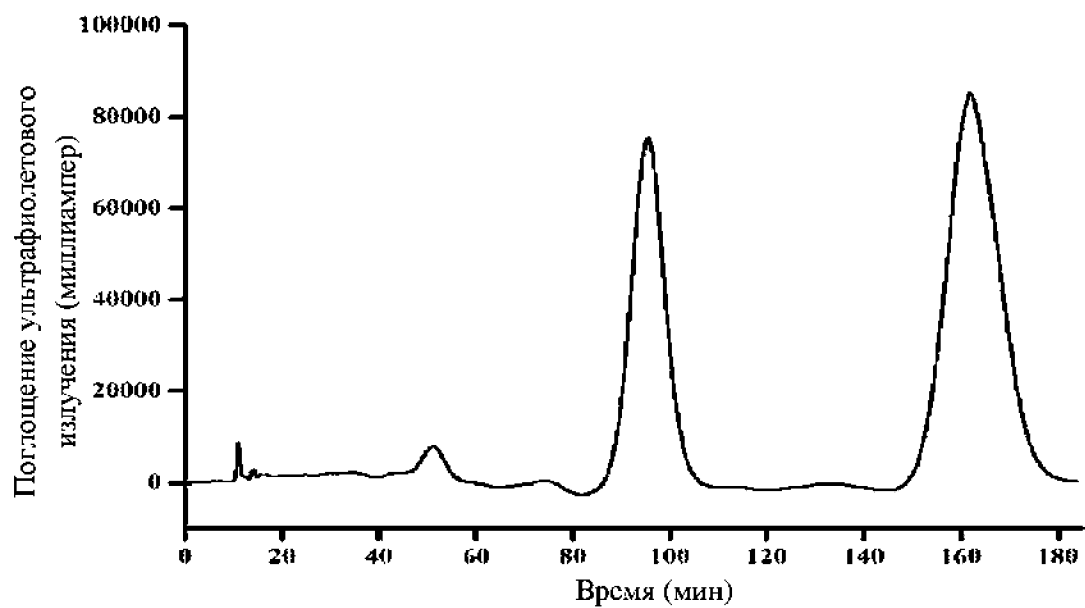
поддерживают на уровне 0,3-4,7/мин; ацетонитрил и водный раствор муравьиной кислоты, в котором содержание муравьиной кислоты составляет 0,05-1,0%, смешивают посредством вспомогательного насоса в высокоэффективном жидкостном хроматографе с использованием в качестве подвижной фазы, при этом содержание ацетонитрила поддерживают на уровне 10-30%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе с компонент вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением компонента, содержащего гранатин А; концентрируют до 1 мл с использованием роторного испарителя при температуре 30-50°C, осуществляют сублимационную вакуумную сушку с получением светло-желтого порошка гранатина А высокой чистоты, посредством высокоэффективной жидкостной хроматографии определяют его степень чистоты.

2. Способ получения гранатина А высокой чистоты по п. 1, отличающийся тем, что содержание муравьиной кислоты в водном растворе муравьиной кислоты в смеси метанола и водного раствора муравьиной кислоты, используемой в качестве подвижной фазы на этапе b, этапе с и этапе d, поддерживают на уровне 0,1-0,3%.

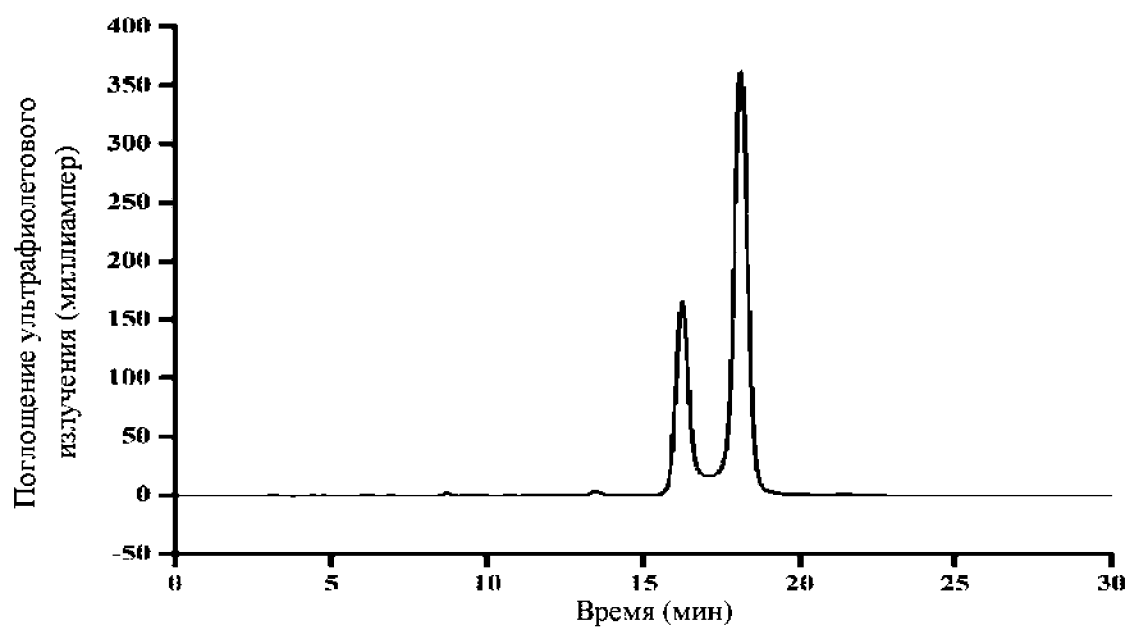
3. Способ получения гранатина А высокой чистоты по п. 1, отличающийся тем, что температуру концентрирования при использовании смеси метанола и водного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы, использовании смеси метанола, ацетонитрила и водного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы или использовании смеси ацетонитрила и водного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы на этапе b, этапе с и этапе d поддерживают на уровне 30-37°C.

4. Способ получения гранатина А высокой чистоты по п. 1, отличающийся тем, что при использовании смеси метанола и водного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы или использовании смеси метанола, ацетонитрила и водного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы на этапе b и на этапе с в процессе разделения температуру колонки поддерживают на уровне от -

15°C до -25°C, а на этапе d температуру колонки поддерживают на уровне от 2°C до -2°C; или при использовании смеси ацетонитрила и водного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы на этапе b и этапе c в процессе разделения температуру колонки поддерживают на уровне от 2°C до -2°C, а на этапе d температуру колонки поддерживают на уровне от 2°C до -2°C.



Фиг. 1



Фиг. 2