

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047325**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.07.03

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

(21) Номер заявки
202293353

(22) Дата подачи заявки
2021.03.24

(54) **СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ГРАНАТИНА А ВЫСОКОЙ ЧИСТОТЫ**

(31) **202010415738.X**

(32) **2020.05.16**

(33) **CN**

(43) **2023.01.12**

(86) **PCT/CN2021/082510**

(87) **WO 2021/232932 2021.11.25**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**СИНЬЦЗЯН ТЕКНИКАЛ
ИНСТИТЮТ 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)

(56) **CN-A-111533768**

SUN, Guangying et al. "Two-Dimensional" Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction Coupled with Crystallization and High Performance Liquid Chromatography for Fast Semi-Preparative Purification of Tannins from Pomegranate Husk Extract" Journal of Chromatography A, Vol. 1505, 15 May 2017 (2017-05-15), ISSN: 0021-9673, page 37 right-hand column paragraph 1, table 4, figure S9 EP-A2-0297547

(57) Изобретение относится к способу получения гранатина А высокой чистоты. 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%.

B1

047325

047325

B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

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

Изобретение относится к способу получения гранатина А высокой чистоты.

Уровень техники

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.

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 лейкорейю. 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.

Сущность изобретения

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.

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:

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 от 15% до 50%; хроматографическую колонку уравнивают до исходного уровня; полученный на этапе б компонент, демонстрирующий первый пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением второго пика гранатина А; полученный на этапе б 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;

д) 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 -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 высокоэффективного жидкостного хроматографа определяют его степень чистоты;

при применении смеси метанола, ацетонитрила 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) длину волны детектора DAD устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; скорость потока поддер-

живают 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%; 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 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 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 -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;

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

a) 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;

b) 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;

д) 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 -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.

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%.

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;

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 с 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.

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

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

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

Подробное описание

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

Вариант осуществления 1

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

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;

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;

в) 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 б компонент, демонстрирующий первый пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением второго пика гранатина А; полученный на этапе б 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;

г) 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 в 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%.

Вариант осуществления 2

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

а) выполняют согласно варианту осуществления 1;

б) хроматографическую колонку С18 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;

с) хроматографическую колонку С18 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 б компонент, демонстрирующий первый пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением второго пика гранатина А; полученный на этапе б 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;

д) хроматографическую колонку С18 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%.

Вариант осуществления 3

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

а) выполняют согласно варианту осуществления 1;

б) хроматографическую колонку С18 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;

с) хроматографическую колонку С18 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 б компонент, демонстрирующий первый пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением второго пика гранатина А; полученный на этапе в 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;

д) хроматографическую колонку С18 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%.

Вариант осуществления 4

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

а) выполняют согласно варианту осуществления 1;

б) хроматографическую колонку С18 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;

с) хроматографическую колонку С18 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 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;

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%.

Вариант осуществления 5

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

a) выполняют согласно варианту осуществления 1;

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; 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 a 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;

c) 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;

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%.

Вариант осуществления 6

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

а) выполняют согласно варианту осуществления 1;

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;

в) 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 б компонент, демонстрирующий первый пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением второго пика гранатина А; полученный на этапе в 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;

г) 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%.

Вариант осуществления 7

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

а) выполняют согласно варианту осуществления 1;

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;

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 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;

д) 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 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 4,5 мг светло-желтого порошка гранатина А высокой чистоты, при этом степень чистоты составляет 95,2%, и степень извлечения составляет 14,1%.

Вариант осуществления 8

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

а) выполняют согласно варианту осуществления 1;

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;

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;

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 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 12,2 мг светло-желтого порошка гранатина А высокой чистоты, при этом степень чистоты составляет 98,9%, и степень извлечения составляет 38,1%.

Вариант осуществления 9

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

a) выполняют согласно варианту осуществления 1;

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 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 a 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;

c) 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;

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 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 11,5 мг светло-желтого порошка гранатина А высокой чистоты, при этом степень чистоты составляет 98,5%, и степень извлечения составляет 35,9%.

Вариант осуществления 10

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

a) выполняют согласно варианту осуществления 1;

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 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;

c) 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 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;

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%.

Вариант осуществления 11

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

а) выполняют согласно варианту осуществления 1;

б) хроматографическую колонку С18 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;

с) хроматографическую колонку С18 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 б компонент, демонстрирующий первый пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением второго пика гранатина А; полученный на этапе б 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;

д) хроматографическую колонку С18 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%.

Вариант осуществления 12

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

а) выполняют согласно варианту осуществления 1;

б) хроматографическую колонку С18 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

ем 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;

с) хроматографическую колонку С18 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 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;

д) хроматографическую колонку С18 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 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 14,0 мг светло-желтого порошка гранатина А высокой чистоты, при этом степень чистоты составляет 86,3%, и степень извлечения составляет 37,8%.

Вариант осуществления 13

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

а) выполняют согласно варианту осуществления 1;

б) хроматографическую колонку С18 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;

с) хроматографическую колонку С18 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;

d) хроматографическую колонку С18 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 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 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%.

Вариант осуществления 14

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

a) выполняют согласно варианту осуществления 1;

b) хроматографическую колонку С18 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 a 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;

c) хроматографическую колонку С18 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;

d) хроматографическую колонку С18 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

мым 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 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 13,4 мг светло-желтого порошка гранатина А высокой чистоты, при этом степень чистоты составляет 98,3%, и степень извлечения составляет 41,9%.

Вариант осуществления 15

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

а) выполняют согласно варианту осуществления 1;

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;

в) 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 б компонент, демонстрирующий первый пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением второго пика гранатина А; полученный на этапе в 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;

г) 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%.

Вариант осуществления 16

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

а) выполняют согласно варианту осуществления 1;

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;

в) 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 б компонент, демонстрирующий первый пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением второго пика гранатина А; полученный на этапе в 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;

г) 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 в 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%.

Вариант осуществления 17

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

а) выполняют согласно варианту осуществления 1;

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

с) хроматографическую колонку С18 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 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;

d) хроматографическую колонку С18 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 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 10,7 мг светло-желтого порошка гранатина А высокой чистоты, при этом степень чистоты составляет 96,4%, и степень извлечения составляет 32,1%.

Вариант осуществления 18

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

a) выполняют согласно варианту осуществления 1;

b) хроматографическую колонку С18 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 фиг. 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;

с) хроматографическую колонку С18 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;

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 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 13,5 мг светло-желтого порошка гранатина А высокой чистоты, как показано на фиг. 2, при этом степень чистоты составляет 99,1%, и степень извлечения составляет 42,2%.

Вариант осуществления 19

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

a) выполняют согласно варианту осуществления 1;

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 a части, богатой гранатином А, растворяют в 1 мл подвижной фазы, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения, как показано на фиг. 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;

c) 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 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;

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 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 12,4 мг светло-желтого порошка гранатина А высокой чистоты, как показано на фиг. 2, при этом степень чистоты составляет 97,6%, и степень извлечения составляет 38,8%.

Вариант осуществления 20

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

- a) выполняют согласно варианту осуществления 1;
- 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 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;
- c) 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 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;
- 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 сушилку 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%.

Вариант осуществления 21

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

а) выполняют согласно варианту осуществления 1;

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;

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 б компонент, демонстрирующий первый пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением второго пика гранатина А; полученный на этапе б 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;

д) 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 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 сушилку 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%.

Вариант осуществления 22

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

а) выполняют согласно варианту осуществления 1;

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 ис-

пользованием 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;

с) хроматографическую колонку С18 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 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;

d) хроматографическую колонку С18 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%.

Вариант осуществления 23

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

a) выполняют согласно варианту осуществления 1;

b) хроматографическую колонку С18 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;

с) хроматографическую колонку С18 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; ацето-

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

d) хроматографическую колонку С18 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 c 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%.

Вариант осуществления 24

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

a) выполняют согласно варианту осуществления 1;

b) хроматографическую колонку С18 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 a 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;

c) хроматографическую колонку С18 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 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;

d) хроматографическую колонку С18 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 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 14,1 мг светло-желтого порошка гранатина А высокой чистоты, при этом степень чистоты составляет 85,4%, и степень извлечения составляет 37,6%.

Вариант осуществления 25

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

а) выполняют согласно варианту осуществления 1;

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;

в) 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 б компонент, демонстрирующий первый пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением второго пика гранатина А; полученный на этапе б 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;

г) 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%.

Вариант осуществления 26

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.

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°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; 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;

в) 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 б компонент, демонстрирующий первый пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением второго пика гранатина А; полученный на этапе б 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;

д) 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 -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:

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) 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 б компонент, демонстрирующий первый пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением второго пика гранатина А; полученный на этапе в 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;

д) 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; тем-

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 ацетонитрила 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) 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;

в) 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 б компонент, демонстрирующий первый пик, вводят в виде пробы в хроматографическую колонку с осуществлением низкотемпературного разделения с получением второго пика гранатина А; полученный на этапе б 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;

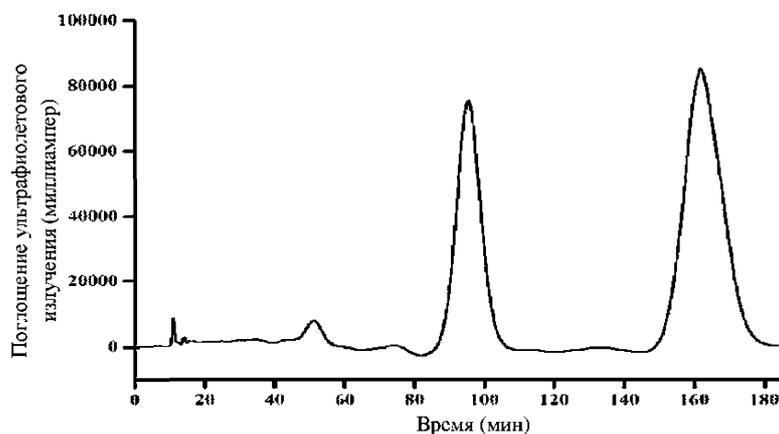
г) хроматографическую колонку С18 с обращенной фазой соединяют с высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным двухканальным детектором ультрафиолетового излучения; длину волны высокоэффективного жидкостного хроматографа устанавливают на уровне 254 нм и 366 нм; температуру колонки поддерживают на уровне от 7°C до -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.

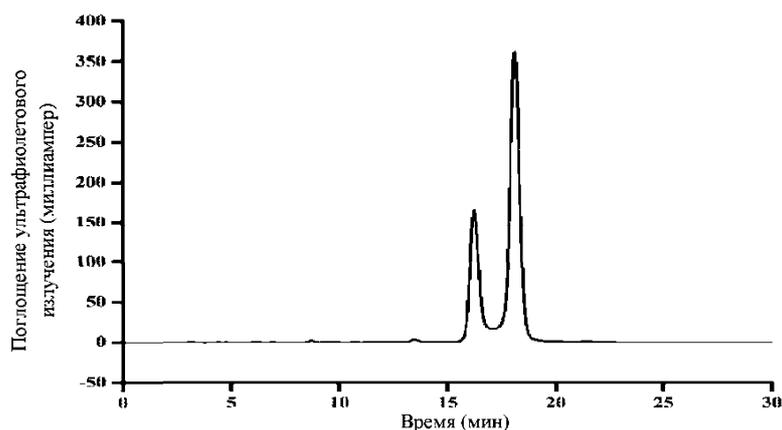
2. Способ получения гранатина А высокой чистоты по п.1, отличающийся тем, что содержание муравьиной кислоты в водном растворе муравьиной кислоты в смеси метанола и водного раствора муравьиной кислоты, используемой в качестве подвижной фазы на этапе b, этапе с и этапе d, поддерживают на уровне 0,1-0,3%.

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 с 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

