

ООО «ОЛФАРМ»
ИСПЫТАТЕЛЬНАЯ ЛАБОРАТОРИЯ

117105, г. Москва, ул. Нагатинская, д. 3А; тел./факс: +7 (499) 611-40-36
Аккредитована Федеральной службой по аккредитации
для проведения работ по испытаниям в соответствии с областью аккредитации
Аттестат аккредитации № РОСС RU.0001.21ФЛ10 от 08 октября 2014 г.
Лицензия на выполнение работ с микроорганизмами 3-4 группы патогенности
№ 77.01.13.001.Л.000142.04.09 от 30 апреля 2009 г.

**Методика газохроматографического определения жирных кислот в препаратах
«Фитомет» и «Фитолиз».**

Реагенты и реактивы:

Гексан х.ч.

Стандарт метилмиристата, чистота не менее 99 %

Стандарты жирных кислот, чистота не менее 99 %

2 % метанольный раствор едкого натра

14 % метанольный раствор трифторида бора. Merck

Раствор серной кислоты 1М

Натрия хлорид

Приготовление раствора внутреннего стандарта:

В качестве внутреннего стандарта применяют метиловые эфиры кислот, отсутствующие в анализируемой смеси.

В мерную колбу вместимостью 50 мл взвешивают около 100 мг (точная навеска) стандарта метилмиристата (внутренний стандарт). Растворяют навеску в гексане, доводят объем до метки и перемешивают. Раствор внутреннего стандарта 1.

5 мл раствора внутреннего стандарта 1 вносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем до метки гексаном и перемешивают. Раствор внутреннего стандарта 2.

Приготовление испытуемого раствора:

В коническую колбу емкостью 25 мл взвешивают около 0,1 г (точная навеска) препарата, прибавляют 4 мл 2 % метанольного раствора едкого натра. На колбу устанавливают обратный холодильник и кипятят смесь 30 минут при умеренном нагреве. Через обратный холодильник к кипящему раствору прибавляют 4 мл 14 % метанольного раствора трифторида бора и продолжают кипячение ещё 30 мин. Пробе дают хорошо остыть, снимают холодильник и прибавляют в колбу 5 мл раствора внутреннего стандарта 2. Устанавливают холодильник и кипятят смесь 5 мин. Смесь охлаждают до комнатной температуры, удаляют холодильник и прибавляют к пробе 0,5 мл 1М серной кислоты, воды чтобы верхний уровень пробы поднялся в узкую часть колбы почти под пробку и 0,5 г хлористого натрия. Смесь осторожно встряхивают и после полного разделения фракций из верхнего слоя отбирают пипеткой 2 мл пробы и переносят в пробирку со шлифом, содержащую 1 г безводного сульфата натрия.

Приготовление стандартного раствора:

В коническую колбу емкостью 25 мл взвешивают около 10 мг (точная навеска) стандартов пальмитиновой, пальмитолеиновой, стеариновой, олеиновой, линолевой, линоленовой, арахидиновой кислот, прибавляют 4 мл 2 % метанольного раствора едкого натра. На колбу

устанавливают обратный холодильник и кипятят смесь 30 минут при умеренном нагреве. Через обратный холодильник к кипящему раствору прибавляют 4 мл 14 % метанольного раствора трифторида бора и продолжают кипячение ещё 30 мин. Пробе дают хорошо остыть, снимают холодильник и прибавляют в колбу 5 мл раствора внутреннего стандарта 1. Устанавливают холодильник и кипятят смесь 5 мин. Смесь охлаждают до комнатной температуры, удаляют холодильник и прибавляют к пробе 0,5 мл 1М серной кислоты, воды чтобы верхний уровень пробы поднялся в узкую часть колбы почти под пробку и 0,5 г хлористого натрия. Смесь осторожно встряхивают и после полного разделения фракций из верхнего слоя отбирают пипеткой 2 мл пробы и переносят в пробирку со шлифом, содержащую 1 г безводного сульфата натрия. Из пробирки отбирают пипеткой 1 мл пробы, переносят в мерную колбу вместимостью 10 мл и гексаном доводят до метки.

Условия хроматографического определения:

Прибор:

Agilent 7820A или другой, пригодный для работы с капиллярными колонками, снабженный пламенно-ионизационным детектором и делителем потока.

Колонка:

DB-WAX 30м x0,32мм (Carbowax 20M)

Температура термостата

210°C

Температура инжектора:

250°C

Температура детектора:

250°C

Скорость газа носителя (азот):

2 мл\мин

Расход вспомогательного газа (азот):

28 мл\мин

Расход водорода:

30 мл\мин

Расход воздуха:

300мл\мин

Объем вводимой пробы:

1мкл

Деление потока:

1:10

Процедура анализа:

В инжектор хроматографа последовательно вводят по 1мкл: гексана, раствор внутреннего стандарта 2, испытуемого раствора и стандартный раствор. На полученных хроматограммах определяют площади пиков идентифицированных жирных кислот. Порядок выхода жирных кислот и относительные времена удерживания (относительно метилмиристата) следующий:

метилмиристан	1,63
метилпальмитат	1,60
метилпальмитоолеат	1,76
метилстеарат	2,39
метилолеат	2,55
метиллинолеат	2,90
метиллиноленоат	3,45
метиларахиноат	4,40

Расчет содержания жирных кислот в препарате как массовой доли в процентах осуществляется по следующим формулам:

Определение поправочного коэффициента

$$K = \frac{C_i \cdot S_{\text{вн.ст}}}{C_{\text{вн.ст}} \cdot S_i} ; \text{ где} \quad \text{или} \quad \frac{m_i \cdot 1 \cdot 50 \cdot 10}{5 \cdot 10 \cdot m \cdot 1}$$

C_i - концентрация стандарта i жирной кислоты в стандартном растворе, мг\мл
 $C_{\text{вн.ст}}$ - концентрация метилмиристата (внутреннего стандарта) в стандартном растворе, мг\мл
 S_i - площадь пика i жирной кислоты на хроматограмме стандартного раствора, мг\мл
 $S_{\text{вн.ст}}$ - площадь пика метилмиристата (внутреннего стандарта на хроматограмме стандартного раствора, мг\мл

Расчет содержания каждой из жирных кислот в (%) в пробе проводят по следующей формуле:

$$X = \frac{C_{\text{вн.ст}} \cdot S_i \cdot K \cdot V}{S_{\text{вн.ст}} \cdot a} \cdot 100 ; \text{ где}$$

$C_{\text{вн.ст}}$ - концентрация метилмиристата (внутреннего стандарта) в испытуемом растворе, мг\мл
 S_i - площадь пика i жирной кислоты на хроматограмме испытуемого раствора, мг\мл
 $S_{\text{вн.ст}}$ - площадь пика метилмиристата (внутреннего стандарта на хроматограмме испытуемого раствора, мг\мл
 a - навеска образца, г
 V - объём раствора внутреннего стандарта, взятого для экстракции, мл

Общее содержание жирных кислот (%) в препарате рассчитывается по следующей формуле:

$$A = \Sigma (X_1 + \dots + X_{n-1})$$

Руководитель
испытательной лаборатории



Сладкова Т.В.