

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.

Количественное определение.

Используют метод высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Условия хроматографирования:

Прибор – жидкостной хроматограф жидкостной Agilent 1290 Infinity LC с УФ-детектором;

Колонка – из нержавеющей стали «Luna C 18» 250 x 4,6 мм, 5 мкм или аналогичная;

Подвижная фаза:

- раствор трифторуксусной кислоты 0,05% (А);
- ацетонитрил (Б);

Режим элюирования – градиентный:

Время, мин	А, %	Б, %
0	100	0
2	100	0
25	30	70
26	100	0
30	100	0

Детектирование – УФ-детектор с рабочей длиной волны 360 нм;

Скорость потока – 1 мл/мин;

Время записи хроматограммы – 30 минут.

Пики соответствующие флавоноидным компонентам регистрируют, начиная со времени выхода рутина до времени выхода кверцетина (включительно).

Проведение анализа:

По 20 мкл испытуемого раствора и стандартного раствора хроматографируют в условиях, указанных выше, получая не менее 5 хроматограмм в каждом случае.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин (X) в процентах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{a_0 * S_1 * P * 100}{S_0 * 100 * 100 * a} * 100\% = \frac{a_0 * S_1 * P}{S_0 * a}$$

где S_0 – площадь пика рутина на хроматограмме стандартного раствора;

S_1 – сумма площадей пиков рутина и пиков флавоноидов, элюируемых после рутина на хроматограмме испытуемого раствора;

a_0 – навеска СО рутина (USP RS), в граммах;

a – навеска препарата, взятая для анализа;

P – содержание рутина в СО рутина (USP RS), в процентах.

Примечания:

Приготовление стандартного раствора:

Около 0,01 г (точная навеска) СО рутина (USP RS), около 0,01 г (точная навеска) СО кверцетина (USP RS) и около 0,01 г (точная навеска) СО гиперозида (USP RS) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 50 мл спирта метилового, доводят объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивают.

Приготовление испытуемого раствора:

Около 1 г (точная навеска) препарата кипятят в круглодонной колбе вместимостью 100 мл с 30 мл 90% этилового спирта, содержащего 0,5% концентрированной серной кислоты, на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 30 минут. Надосадочную жидкость сливают в коническую колбу с притертой пробкой и экстракцию повторяют еще раз. Объединенную смесь охлаждают, фильтруют через вату, промывают небольшим количеством 90% этилового спирта и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, фильтруя через фильтр «синяя лента», объем доводят до 100 мл 90% этиловым спиртом и перемешивают.

Приготовление 0,05% раствора трифторуксусной кислоты.

0,5 г трифторуксусной кислоты концентрированной помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, доводят объем колбы водой до метки и перемешивают.

Раствор хранят в стеклянной посуде с притертой пробкой при температуре 5°C в течение 30 дней.

Приготовление 90% этилового спирта:

Смешивают 96% этиловый спирт с очищенной водой в соотношении (100:7).

Приготовление 90% этилового спирта, содержащего 0,5% концентрированной серной кислоты :

0,5 г концентрированной серной кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и осторожно доводят до метки 90% этиловым спиртом и перемешивают.

Тестирование хроматографической системы.

Регистрируют, как указано в тексте данного раздела, не менее 5 хроматограмм стандартного раствора.

Относительные стандартные отклонения результатов отдельных измерений времен удерживания и площадей пиков каждого компонента не должны превышать 2%.

Эффективность колонки, рассчитанная по пикам каждого из компонентов, не должна быть менее 2000 теоретических тарелок.

Критерий разделения соседних пиков должен быть не менее 0,9.

Показатели симметрии пиков определяемых веществ не должны превышать значение 2,0.

Руководитель
испытательной лаборатории



Сладкова Т.В.

Хроматографический отчет

Прибор: Agilent 1290 01 DAD

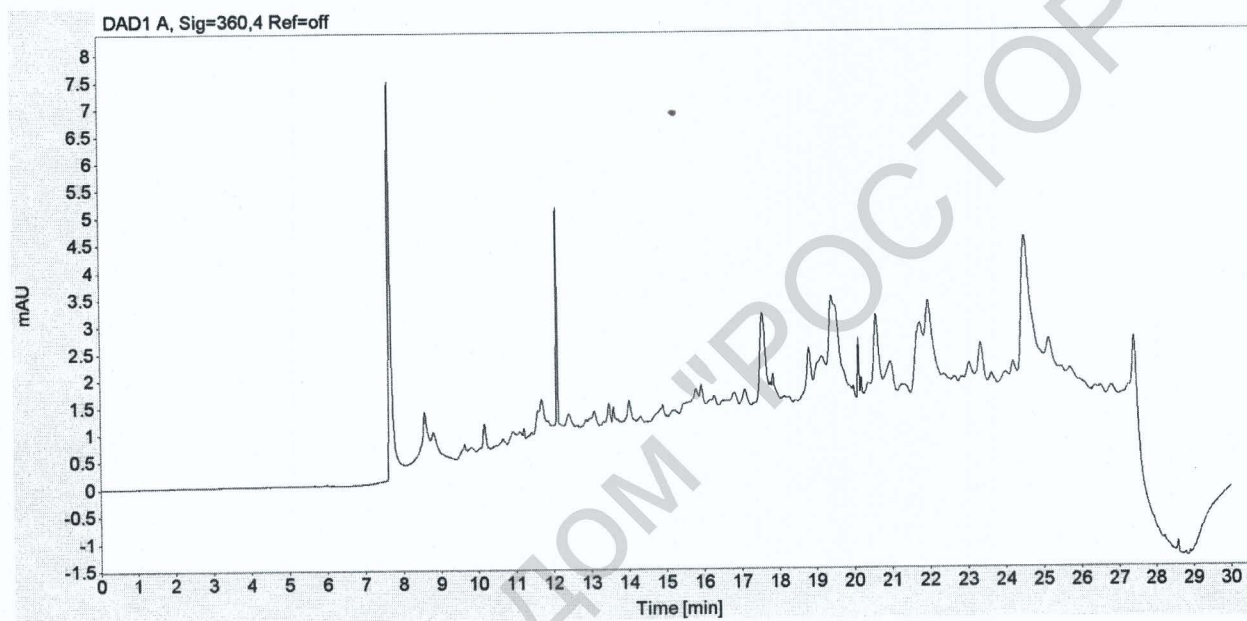
Оператор: SYSTEM

Образец: Градиент

Дата: 10/20/2014 10:24:30 AM

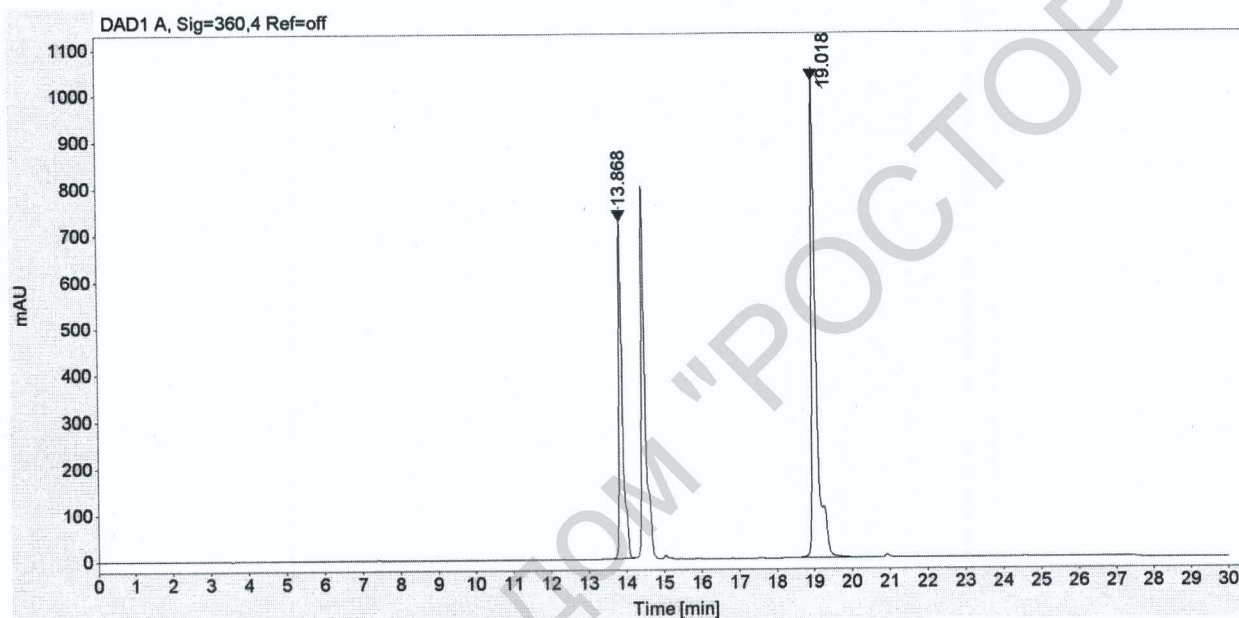
Позиция:

Объем: -1.000



Хроматографический отчет

Прибор: Agilent 1290 01 DAD
 Оператор: SYSTEM
 Образец: Смесь стандартов
 Дата: 10/20/2014 10:55:55 AM
 Позиция: Vial 1
 Объем: 5.000

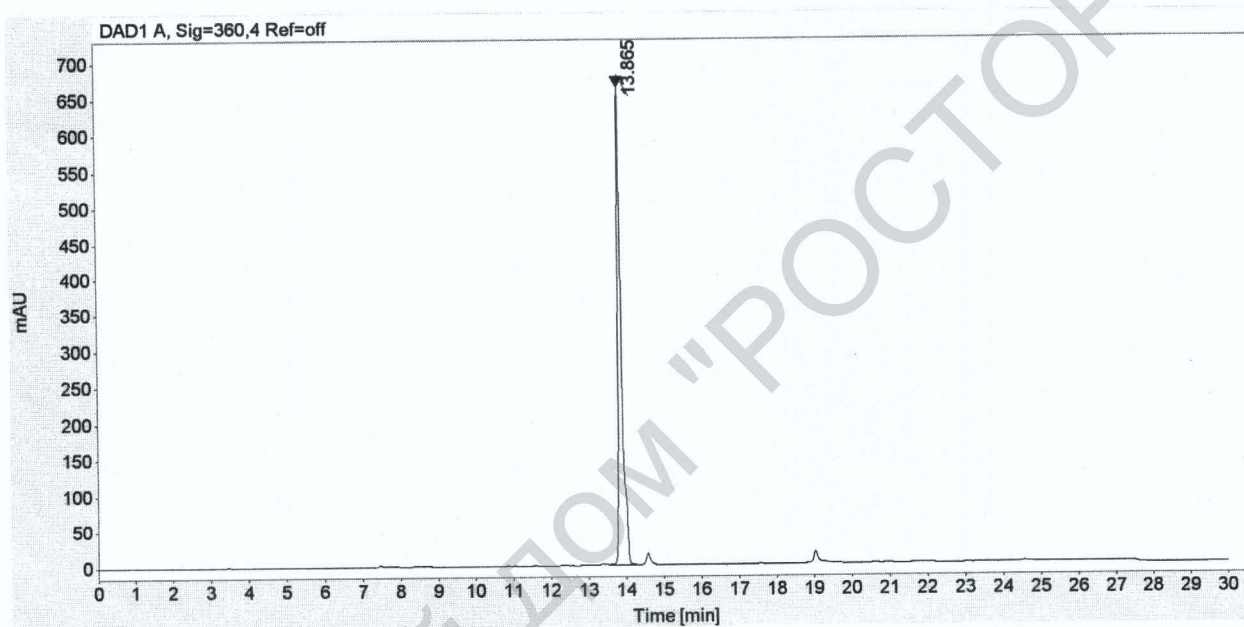


Signal: DAD1 A, Sig=360,4 Ref=off

Время	Высота	Площадь	Площадь, %	Симметрия	Разрешение	Теор. тарелки	Compound_Name
13.868	724.5145	4792.7979	34.9760	0.67124		135448.01542	
19.018	1030.2335	8910.3164	65.0240	0.62156	30.82204	173000.67172	
	Sum	13703.1143					

Хроматографический отчет

Прибор: Agilent 1290 01 DAD
Оператор: SYSTEM
Образец: Стандарт рутина
 свежий
Дата: 10/20/2014 11:30:08 AM
Позиция: Vial 2
Объем: 5.000

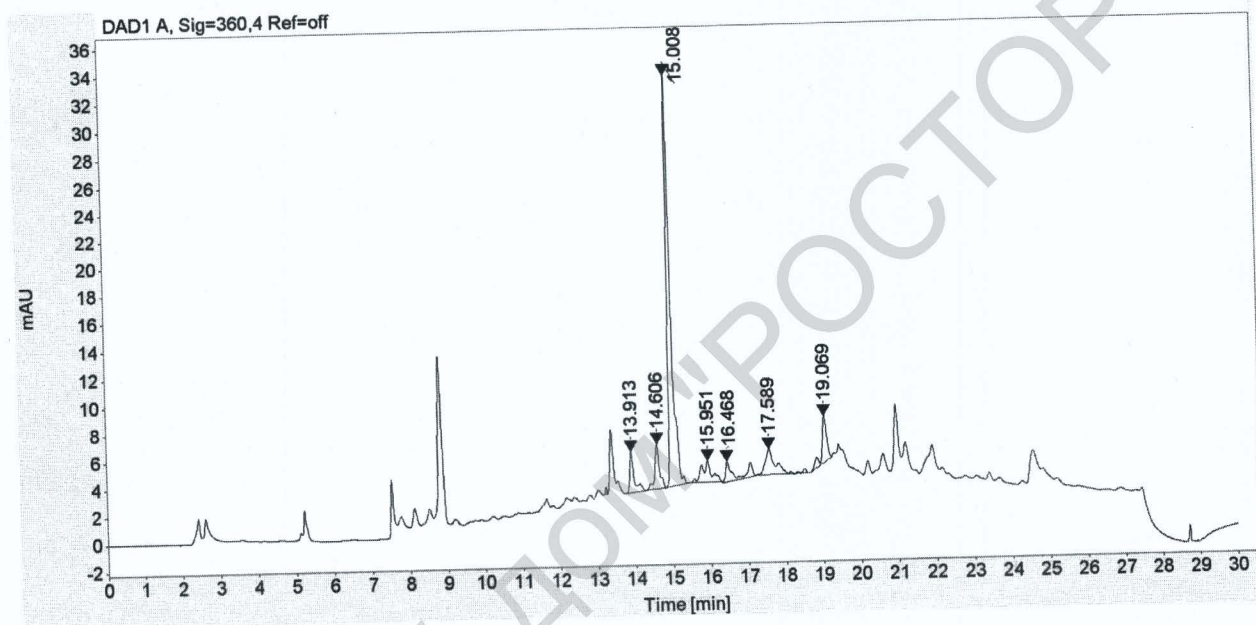


Signal: DAD1 A, Sig=360,4 Ref=off

Время	Высота	Площадь	Площадь, %	Симметрия	Разрешение	Теор. тарелки	Compound Name
13.865	666.8175	4462.2905	100.0000	0.67185		131889.62489	
	Sum	4462.2905					

Хроматографический отчет

Прибор: Agilent 1290 01 DAD
 Оператор: SYSTEM
 Образец: Фитомет
 Дата: 10/20/2014 1:17:43 PM
 Позиция: Vial 3
 Объем: 5.000

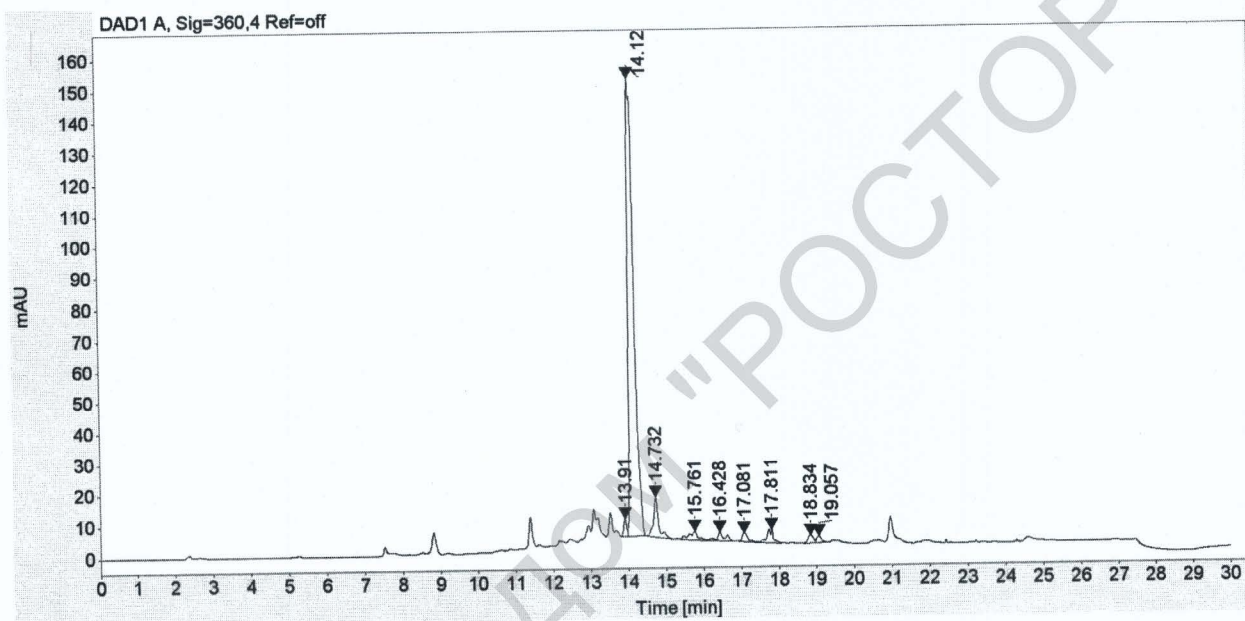


Signal: DAD1 A, Sig=360,4 Ref=off

Время	Высота	Площадь	Площадь, %	Симметрия	Разрешение	Теор. тарелки	Compound Name
13.913	3.0291	24.2704	6.5153	0.50860		118815.44771	
14.606	3.3047	29.1990	7.8384	1.00027	4.01654	101742.87283	
15.008	29.9789	198.2040	53.2074	0.60632	2.42707	166083.24255	
15.951	1.5804	28.5176	7.6555	1.34497	5.27498	92684.33380	
16.468	1.4841	24.8395	6.6681	0.22112	2.30872	76633.93455	
17.589	1.8871	35.2143	9.4532	0.58902	3.83810	41471.30708	
19.069	3.4146	32.2669	8.6620	1.16989	5.32276	132484.19559	
	Sum	372.5117					

Хроматографический отчет

Прибор: Agilent 1290 01 DAD
 Оператор: SYSTEM
 Образец: Фитолиз
 Дата: 10/20/2014 2:22:47 PM
 Позиция: Vial 4
 Объем: 5.000



Signal: DAD1 A, Sig=360,4 Ref=off

Время	Высота	Площадь	Площадь, %	Симметрия	Разрешение	Теор. тарелки	Compound Name
13.910	5.8490	32.3719	1.6223	0.94790		134346.84887	
14.120	147.4220	1643.1228	82.3464	0.42049	0.94884	37714.37150	
14.732	12.8133	119.7561	6.0017	0.87629	2.57442	102441.64515	
15.761	2.7599	45.9730	2.3040	1.90638	3.49395	24331.89087	
16.428	2.7743	33.8758	1.6977	0.63342	2.32956	153645.77815	
17.081	2.7676	26.1737	1.3117	0.68947	3.28163	88658.86758	
17.811	4.2636	50.2524	2.5184	0.66706	2.93188	69969.15005	
18.834	2.6498	27.0616	1.3562	0.00000	3.79569	77819.82174	
19.057	2.1283	16.7918	0.8415	0.70485	0.89757	115096.15706	
	Sum	1995.3790					