

#### 2.4.23. СТЕРИНИ У ЖИРНИХ ОЛІЯХ

Якщо в монографії не зазначений конкретний метод, використовують метод А. Будь-які заміни методу А на метод В мають бути валідовані.

#### МЕТОДА

##### Відокремлення стеринової фракції (ТШХ)

Одержують неомілювані речовини жирної олії і потім відокремлюють стеринову фракцію методом тонкошарової хроматографії (2.2.27), використовуючи ТШХ-пластинку із шаром силікагелю Р за товшки від 0.2 мм до 0.5 мм.

*Випробовуваний розчин (а).* У колбу місткістю 150 мл, споряджену зворотним холодильником, поміщають розчин 2 г/л бетуліну Р у метиленхлориді Р у такому об'ємі, щоб кількість бетуліну відповідала приблизно 10 % вмісту стеринів у зразку, взятому для визначення (наприклад, у разі оливкової олії додають 500 мкл, у разі інших рослинних олій — 1500 мкл розчину бетуліну). Якщо в монографії регламентується вміст індивідуальних стеринів у стериновій фракції у відсотках, розчин бетуліну можна не додавати. Випарюють до сухого залишку під потоком азоту Р. У колбу поміщають 5.00 г випробовуваної субстанції. Додають 50 мл калію гідроксиду 2 М розчину спиртового Р і нагрівають на водяній бані протягом 1 год, часто перемішуючи. Охолоджують до температури нижче 25 °С і кількісно переносять вміст колби в ділильну лійку, що містить 100 мл води Р. Обережно струшують із трьома порціями ефіру, вільного від пероксидів, Р по 100 мл кожна. Ефірні шари збирають в іншу ділильну лійку, що містить 40 мл води Р, злегка струшують протягом декількох хвилин, залишають до розшарування і відкидають водний шар. Ефірний шар струшують із кількома порціями води Р по 40 мл кожна доти, доки водний шар не припинить давати лужну реакцію з фенолфталеїном. Ефірний шар кількісно переносять у колбу, висушену до постійної маси, промиваючи ділильну лійку ефіром, вільним від пероксидів, Р. Ефір випарюють з необхідною обережністю, до залишку додають 6 мл ацетону Р. Обережно видаляють розчинник під потоком азоту Р. Висушують до постійної маси за температури від 100 °С до 105 °С, охолоджують в ексікаторі й зважують. Залишок переносять у невелику пробірку і розчиняють у метиленхлориді Р. Випарюють під потоком азоту Р до об'єму приблизно 1 мл. Залежно від вмісту неомілюваних речовин олії встановлюють остаточну концентрацію розчину від 25 мг/мл до 50 мг/мл.

*Випробовуваний розчин (б).* Беруть 5.00 г рапсової олії Р і далі чинять, як зазначено в приготуванні випробовуваного розчину (а), починаючи від слів:

«Додають 50 мл калію гідроксиду 2 М розчину спиртового Р».

*Випробовуваний розчин (с).* Беруть 5.00 г соняшникової олії Р і далі чинять, як зазначено в приготуванні випробовуваного розчину (а), починаючи від слів: «Додають 50 мл калію гідроксиду 2 М розчину спиртового Р».

*Розчин порівняння.* 25 мг холестерину Р і 10 мг бетуліну Р розчиняють у 1 мл метиленхлориду Р.

Для кожного випробовуваного розчину використовують окрему пластинку. На кожну з пластинок наносять смугою 10 мм на відстані 20 мм від нижнього краю та 10 мм від лівого краю по 10 мкл розчину порівняння і смугою 150 мм на відстані 20 мм від нижнього краю 0.5 мл випробовуваного розчину (а), або випробовуваного розчину (б), або випробовуваного розчину (с) відповідно. Пластинки поміщають у камеру із сумішшю розчинників ефір Р — гексан Р (35:65). Коли фронт розчинників пройде 17 см від лінії старту, пластинки виймають із камери, висушують у потоці азоту Р, обприскують розчином 2 г/л дихлорфлуоресцеїну Р в етанолі безводному Р і переглядають в ультрафіолетовому світлі за довжини хвилі 254 нм. На хроматограмі розчину порівняння виявляються смуги, що відповідають холестерину і бетуліну. На хроматограмах випробовуваних розчинів виявляються смуги з близькими значеннями  $R_f$ , що відповідають стеринам. З хроматограми кожного випробовуваного розчину знімають ділянку покриття, на якій розташовані смуги стеринів, а також додатково зони на 2—3 мм вище і нижче видимих зон розчину порівняння, і поміщають нарізно в три колби місткістю по 50 мл кожна. У кожну колбу додають по 15 мл метиленхлориду Р і нагрівають зі зворотним холодильником, перемішуючи, протягом 15 хв. Кожний розчин фільтрують крізь фільтр із пористого скла (40) (2.1.2) або придатний фільтрувальний папір і промивають кожний фільтр трьома порціями метиленхлориду Р по 15 мл кожна. Об'єднані фільтрати і змиви з кожного фільтра поміщають окремо в три колби, випарюють під потоком азоту Р до об'єму 5—10 мл, переносять у невелику пробірку і випарюють до сухого залишку під потоком азоту Р.

##### Визначення стеринів (ГХ)

Визначення проводять методом газової хроматографії (2.2.28). Усі операції проводять, захищаючи розчини і реактиви від вологи, розчини готують безпосередньо перед застосуванням.

*Випробовуваний розчин.* До виділених з випробовуваної субстанції методом ТШХ стеринів додають свіжоприготовану суміш, що складається з 0.04 мл хлортриметилсилану Р, 0.1 мл гексаметилдисилану Р і 0.5 мл піридину безводного Р. Залишають