**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
| [Ячейка: 1 интервал, ширина линии 16,5 см. Строка ниже: точно 2] |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Стерины в маслах жирных растительных и жирах** |  | **ОФС.1.5.3.0018** |
|  |  | **Вводится впервые** |

|  |
| --- |
| [ |

Метод определения стеринов в маслах жирных растительных и жирах основаны на использовании газовой хроматографии (ОФС «Газовая хроматография»), после получения неомыляемых веществ.

**Методика 1**

Получают неомыляемые вещества масла жирного растительного или твёрдого жира и отделяют стериновую фракцию методом тонкослойной хроматографии (ОФС «Тонкослойная хроматография»), используя пластинки, покрытые слоем силикагеля толщиной от 0,2 мм до 0,5 мм.

*Испытуемый раствор А*. В колбу вместимостью 150 мл, помещают раствор 0,2 % бетулина в метиленхлориде в таком объёме, чтобы количество бетулина соответствовало 10 % содержания стеринов в испытуемом образце, (например, оливы европейской плодов свежих масла жирного прибавляют 500 мкл, в случае других масел жирных растительных 1500 мкл раствора бетулина). Выпаривают в токе азота до сухого остатка.

Если в фармакопейной статье определяется только содержание индивидуальных стеринов в процентах к стериновой фракции, раствор бетулина можно не прибавлять.

В колбу помещают 5 г (точная навеска) испытуемого образца, прибавляют 50 мл калия гидроксида раствора спиртового 2 М и кипятят с обратным холодильником на водяной бане в течение 1 ч, при частомперемешивании*.* Охлаждают до температуры ниже 25 °С и количественно переносят в делительную воронку с помощью 100 мл воды. В делительную воронку прибавляют 100 мл эфира и осторожно встряхивают. Эфирные извлечения сливают и операцию повторяют ещё 2 раза порциями по 100 мл. Объединённые эфирные извлечения переносят в делительную воронку, прибавляют 40 мл воды, осторожно встряхивают в течение 3-5 минут, оставляют до полного расслоения и отбрасывают водный слой. Эфирный слой встряхивают с несколькими порциями воды, по 40 мл каждая, до тех пор, пока водный слой не перестанет давать щелочную реакцию по фенолфталеину. Эфирный слой количественно переносят в доведённую до постоянной массы колбу.

Эфир отгоняют досуха, к сухому остатку прибавляют 6 мл ацетона. В токе азота аккуратно удаляют ацетон. Остаток в колбе сушат до постоянной массы при температуре 100 – 105 °С, охлаждают в эксикаторе и взвешивают. Сухой остаток растворяют в минимальном объёме метиленхлорида. Упаривают содержимое в токе азота до объёма 1 мл. В зависимости от неомыляемого содержимого испытуемого образца, обеспечивают конечную концентрацию раствора 2,5–5 %.

*Испытуемый раствор Б.* В колбу вместимостью 150 мл помещают 5 г (точная навеска) рапса семян масла жирного и далее поступают так, как указано в методике приготовления испытуемого раствора А, начиная со слов «…прибавляют 50 мл калия гидроксида раствора спиртового 2 М….».

*Испытуемый раствор В.* В колбу вместимостью 150 мл помещают 5 г (точная навеска) подсолнечника однолетнего семян масла жирного и далее поступают так, как указано в методике приготовления испытуемого раствора А, начиная со слов «…прибавляют 50 мл калия гидроксида раствора спиртового 2 М….».

*Раствор сравнения.* Растворяют 25 мг холестерина и 10 мг бетулина в 1,0 мл метиленхлорида.

На пластинки (для каждого испытуемого раствора используют отдельную пластинку): в виде полосы длиной 10 мм – наносят 10 мкл раствора сравнения, в виде полосы длиной 150 мм – 0,5 мл испытуемого раствора А, Б или В, соответственно. Пластинки с нанесёнными пробами сушат при комнатной температуре, помещают в камеру со смесью растворителей гексан – эфир (65:35) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдёт около 80 - 90 % длины пластинки от линии старта, её вынимают из камеры, сушат в токе азота, обрабатывают дихлорфлуоресцеина раствором 0,2 % в этаноле и просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм.

*Пригодность хроматографической системы.* На хроматограмме раствора сравнения должны обнаруживаться две зоны адсорбции: зона адсорбции холестерина и под ней зона адсорбции бетулина.

*Результат.* На хроматограммах испытуемых растворов А, Б, В должны обнаруживаться зоны адсорбции с близкими значениями Rf зон адсорбции соответствующим стеринам.

С хроматограммы каждого испытуемого раствора снимают силикагель зоны адсорбции стеринов, а также дополнительно зоны на 2 – 3 мм выше и ниже видимых зон адсорбции на хроматограмме раствора сравнения и помещают раздельно в три колбы вместимостью 50 мл каждая.

В каждую колбу прибавляют по 15 мл метиленхлорида и нагревают с обратным холодильником в течение 15 мин, постоянно перемешивая. Растворы фильтруют через стеклянный фильтр или соответствующую фильтровальную бумагу и промывают фильтры тремя порциями метиленхлорида по 15 мл каждая. Каждый из трёх объединённых фильтратов со смывами помещают в колбу, упаривают в токе азота до объёма 5 - 10 мл. Растворы переносят в небольшие пробирки и выпаривают в токе азота досуха.

*Испытуемый раствор.* К сухому остатку, полученному из испытуемого образца методом тонкослойной хроматографии, прибавляют свежеприготовленную смесь из 0,04 мл хлортриметилсилана, 0,1 мл гексаметилдисилазана и 0,5 мл пиридина безводного. Смесь отстаивают в течение 5 мин и используют жидкую фазу.

*Раствор сравнения А.* К 9 частям стеринов, выделенных из рапса семян масла жирного методом тонкослойной хроматографии, прибавляют 1 часть холестерина. К полученной смеси прибавляют свежеприготовленную смесь из 0,04 мл хлортриметилсилана, 0,1 мл гексаметилдисалазана и 0,5 мл пиридина безводного, отстаивают в течение 5 мин и используют надосадочную жидкость.

*Раствор сравнения Б.* К стеринам, выделенным из подсолнечника однолетнего семян масла жирного методом тонкослойной хроматографии, прибавляют свежеприготовленную смесь из 0,04 мл хлортриметилсилана, 0,1 мл гексаметилдисалазана и 0,5 мл пиридина безводного. Смесь отстаивают в течение 5 мин и используют надосадочную жидкость.

Все растворы используются свежеприготовленные.

*Условия хроматографирования*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | Кварцевая капиллярная 20-30 м × 0,25 - 0,32 мм, поли[метил(95)фенил(5)]силоксан или поли(цианопропил)(7)(фенил)(7)метил(8)силоксан, 0,25 мкм  |
| Детектор |  пламенно-ионизационный |
| Газ-носитель | Гелий, водород для хроматографии |
| Деление потока | 1:50 или 1:100 |
| Скорость потока, см/с | 30 - 50 см/с (водород) или 20 – 35 см/с (гелий) |
| Объём пробы, мкл | 1 |
| Температура | Колонка | 260 °С |
| Инжектор | 280 °С |
| Детектор | 290 °С |

*Идентификация примесей.* Для идентификации пиков примесей холестерина, брассикастерина, кампестерина и β-ситостерина используют хроматограмму раствора сравнения А. Для идентификации пиков примесей

кампестерина, стигмастерина, β-ситостерина и ∆7-сигмастенола (∆7-стигмастерина) используют хроматограмму раствора сравнения Б.

Относительные времена удерживания стеринов (по отношению к β-ситостерину) приведены в табл. 1.

Таблица 1 – Относительные времена удерживания стеринов (по отношению к β-ситостерину) для двух различных колонок

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Смесь веществ** | **Поли(цианопропил)(7) (фенил)(7)(метил)(86) силоксан** | **Поли [метил(95)-фенил(5)] силоксан** |
| Холестерин | 0,64 | 0,63 |
| Брассикастерин | 0,70 | 0,71 |
| 24-метиленхолестерин | 0,79 | 0,80 |
| Кампестерин | 0,82 | 0,81 |
| Кампестанол | 0,83 | 0,82 |
| Стигмастерин | 0,87 | 0,87 |
| ∆7-Кампестерин | 0,93 | 0,92 |
| ∆5,23-Стигмастадиенол | 0,95 | 0,95 |
| Клеростерин | 0,96 | 0,96 |
| β-Ситостерин | 1 | 1 |
| Ситостанол | 1,01 | 1,02 |
| ∆5-Авенастерин | 1,03 | 1,03 |
| ∆5,24-Стигмастадиенол | 1,09 | 1,08 |
| ∆7-Стигмастенол(∆7-стигмастерин) | 1,13 | 1,12 |
| ∆7-Авенастерин | 1,18 | 1,16 |
| \*Бетулин | 1,4 | 1,4 |

\*Пик внутреннего стандарта (бетулин) должен быть чётко отделён от пиков определяемых стеринов; площадь пика внутреннего стандарта при расчётах не учитывают.

Содержание каждого стерина в стериновой фракции испытуемого образца в процентах (Х) вычисляют по формуле:

|  |
| --- |
|  |
| где |  | **–** | площадь пика, соответствующего определяемому стерину; |
|  |  | **–** | сумма площадей всех пиков, соответствующих компонентам, указанным в таблице 1; не учитывают пик бетулина. |

Содержание каждого стерина в мг на 100 г испытуемого образца (Х) вычисляют по формуле:

|  |
| --- |
|  |
| где |  | **–** | площадь пика, соответствующего определяемому стерину; |
|  |  | **–** | площадь пика внутреннего стандарта бетулина; |
|  |  | **–** | навеска внутреннего стандарта бетулина, мг; |
|  |  | **–** | навеска испытуемого образца, мг. |

**Методика 2**

Неомыляемые вещества получают в соответствии с ОФС «Масла жирные растительные». Одновременно, в таких же условиях, получают и неомыляемые вещества из подсолнечника однолетнегосемян масла жирного

и отделяют стериновую фракцию методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Определение проводят методом ВЭЖХ (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

*Испытуемый раствор.* В пробирку вместимостью 15 мл с помощью трех порций (каждое по 4 мл) растворителя, использованного при получении неомыляемых веществ (обычно: эфир или петролейный эфир) переносят неомыляемые вещества. Выпаривают в токе азота досуха. Сухой остаток растворяют в достаточном объёме подвижной фазы для получения раствора с концентрацией около 4 %. Для улучшения растворимости добавляют несколько капель 2-пропанола и фильтруют через мембранный фильтр (размер пор 0,45 мкм).

*Раствор сравнения.* Готовят, как описано для испытуемого раствора с использованием неомыляемых веществ, полученных из подсолнечника однолетнегосемян масла жирного.

*Условия хроматографирования*

|  |  |
| --- | --- |
| Предколонка | 5 мм × 4,6 мм, силикагель для хроматографии , 5 мкм,размер пор 6 нм |
| Колонка | 250 мм × 4,6 мм, силикагель для хроматографии , 5 мкм,размер пор 6 нм |
| Подвижная фаза | гексан - 2-пропанол (1 : 99) |
| Скорость потока, мл/мин | 1 |
| Температура колонки, °С | 25 |
| Детектор | спектрофотометрический |
| Длина волны, нм | 210 |
| Объем пробы, мкл | 50 |

*Идентификация стеринов.* Стериновая фракция элюируется в конце хроматограммы. Устанавливают расположение собираемой фракции по хроматограмме раствора сравнения, на которой наблюдается два основных пика, элюирующихся между 23-й и 32-й минутами. Собирают фракцию на выходе из детектора в пробирку вместимостью 15 мл с завинчивающейся крышкой и выпаривают растворитель в потоке азота.

Определение проводят методом ГХ (ОФС «Газовая хроматография»).

*Испытуемый раствор.* Остаток стериновой фракции, полученный методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, как описано выше для испытуемого раствора, растворяют в 0,2 мл пиридина безводного и 0,2 мл смеси N,О‑бис(Триметилсилил) трифторацетамид – хлортриметилсилан (99:1). Плотно закрывают пробирку и нагревают при 80 °С в течение 20 мин, выдерживают до охлаждения и используют жидкую фазу.

*Раствор сравнения.* Остаток стериновой фракции, полученный методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, как описано выше для раствора сравнения, растворяют в 0,2 мл пиридина безводного и 0,2 мл смеси N,О‑бис(Триметилсилил) трифторацетамид - хлортриметилсилан (99:1). Плотно закрывают пробирку и нагревают при 80 °С в течение 20 мин, выдерживают до охлаждения и используют надосадочную жидкость.

|  |
| --- |
| *Условия хроматографирования* |
| Колонка | Кварцевая капиллярная 30 м × 0,25 мм, поли[метил(95)фенил(5)]силоксан, 0,25 мкм  |
| Детектор |  пламенно-ионизационный |
| Газ-носитель | Гелий для хроматографии |
| Деление потока | 1:25 |
| Скорость потока, мл/мин  | 2,6 |
| Объём пробы, мкл | 1-3 |
| Температура | Колонка | Время (мин) | Температура ºС |
|  | 0–38 | 260 |
| 38–44 | 260 → 290 |
| 44–49 | 290 |
| Инжектор | 290 °С |
| Детектор | 290 °С |

*Идентификация примесей.* Для идентификации пиков примесей кампестерина, стигмастерина, β-ситостерина и ∆7-сигмастенола используют хроматограмму раствора сравнения. Идентифицируют пики стеринов на хроматограмме испытуемого раствора с использованием хроматограммы раствора сравнения и относительных времён удерживания компонентов по отношению к β‑ситостерину (основной пик), приведённых в таблице 1.

*Пригодность хроматографической системы*. На хроматограмме раствора сравнения *разрешение* (*RS*) между пиками кампестерина и стигмастерина должно быть не менее 4,0.

Содержание каждого определяемого стерина в стериновой фракции испытуемого образца в процентах (Х) вычисляют по формуле:

|  |
| --- |
|  |
| где |  | **–** | площадь пика, соответствующего определяемому стерину |
|  |  | **–** | сумма площадей всех пиков (за исключением бетулина), соответствующих компонентам, указанным в таблице 1. |