

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

**Хроматография
на бумаге**

**ОФС.1.2.1.2.0002.15
Взамен ст. ГФ XI, вып.1**

Хроматографический процесс, протекающий на листе фильтровальной бумаги при перемещении по ее капиллярам и поверхности подвижной фазы, называется хроматографией на бумаге.

Неподвижной фазой является либо сама бумага, либо вещества, предварительно нанесенные на ее волокна. Механизм хроматографии на бумаге может быть распределительным или адсорбционным. Перемещение подвижной фазы происходит либо только под действием капиллярных сил (восходящая хроматография), либо под действием капиллярных сил и силы тяжести (нисходящая хроматография).

При хроматографировании анализируемые вещества образуют на бумаге зоны адсорбции в виде круглых или овальных пятен или полос в зависимости от способа нанесения (в точку или полосой). Совокупность зон адсорбции, полученных при хроматографировании данного анализируемого образца, называется хроматограммой.

Подвижность вещества при хроматографировании характеризуется фактором удерживания R_f , (см. ОФС «Хроматография»).

Область применения

Бумажная хроматография может использоваться для установления подлинности, чистоты и количественного определения анализируемого вещества.

Подлинность подтверждается при одновременном хроматографировании на одном листе бумаги анализируемого и

стандартного вещества. Если образцы идентичны, то соответствующие им зоны адсорбции на хроматограммах имеют одинаковый вид и равные значения R_f . Для идентификации иногда целесообразно хроматографировать смесь равных количеств анализируемого и стандартного вещества. На хроматограмме должно наблюдаться одно пятно, характеризующее зону адсорбции. Условия хроматографирования следует подбирать так, чтобы значения R_f были отличны от 0 и не превышали 1. Кроме того, для подтверждения подлинности анализируемого вещества могут быть использованы конкретные условия его детекции, указанные в фармакопейной статье.

При испытаниях на чистоту примеси и основное вещество должны иметь разные значения R_f . О степени чистоты анализируемого вещества можно судить по величине и интенсивности окраски (или поглощения) обнаруживаемых на хроматограмме зон адсорбции примесей. Содержание примесей может быть определено полуколичественно. Для этого на одном листе бумаги одновременно хроматографируют определенное количество анализируемого вещества и несколько образцов определяемой примеси (свидетеля) с различными, точно известными концентрациями. Содержание примеси в анализируемом образце оценивают, сравнивая ее зону адсорбции на хроматограмме по совокупности площади зоны адсорбции и интенсивности окраски (или поглощения) с зонами адсорбции свидетеля.

Для количественного анализа применяют специальные приборы, позволяющие проводить измерения в ультрафиолетовой и видимой областях спектра. Для обработки хроматограмм в видимой области спектра целесообразно использовать планшетные сканеры и соответствующее программное обеспечение.

Можно также проводить количественное определение веществ после их экстракции с хроматограммы. Для этого зоны адсорбции вырезают и экстрагируют определяемое вещество подходящим растворителем.

Содержание анализируемого вещества в извлечении или сухом остатке после отгонки растворителя находят любым методом, пригодным для определения малых концентраций и учитывающим строение анализируемого вещества.

Проба испытуемой смеси может наноситься либо точно на линию старта, либо в виде равномерной полосы вдоль всей линии старта, при этом первичная зона адсорбции будет иметь вид пятна, а во втором случае – полосы, параллельной линии старта.

Оборудование

Для проведения хроматографии на бумаге используют герметизированные камеры, изготовленные из инертного материала и позволяющие наблюдать за ходом процесса разделения при закрытой крышке камеры. Часто в качестве камер используют стеклянные стаканы или цилиндры с шлифованной крышкой и дополнительно герметизированные. На крышке могут быть входные отверстия (шлюзы) для добавления растворителя или снятия избыточного давления в камере.

При проведении нисходящей хроматографии в верхней части камеры помещают сосуд для подвижной фазы (лодочку). Лодочка должна вмещать объем подвижной фазы, достаточный для проведения, по крайней мере, однократного хроматографирования. Длина лодочки должна превышать ширину листа хроматографической бумаги. Камера должна быть снабжена устройствами для закрепления листа хроматографической бумаги в рабочем положении и для ввода в лодочку подвижной фазы.

При проведении восходящей хроматографии подвижную фазу помещают либо в лодочку, установленную в нижней части камеры, либо наливают на дно камеры.

Внутренние стенки камеры обкладывают фильтровальной бумагой, что способствует более быстрому и полному ее насыщению парами растворителей, входящих в состав подвижной фазы.

Подготовку оборудования, хроматографической бумаги и подвижной

фазы приводят в фармакопейных статьях.

Методики хроматографического разделения

Бумажная хроматография может быть одномерной и двумерной.

Одномерная бумажная хроматография предполагает точечное нанесение или нанесение в виде полосы пробы исследуемой смеси на линию старта и последующее хроматографирование в одном направлении (рис. 1).

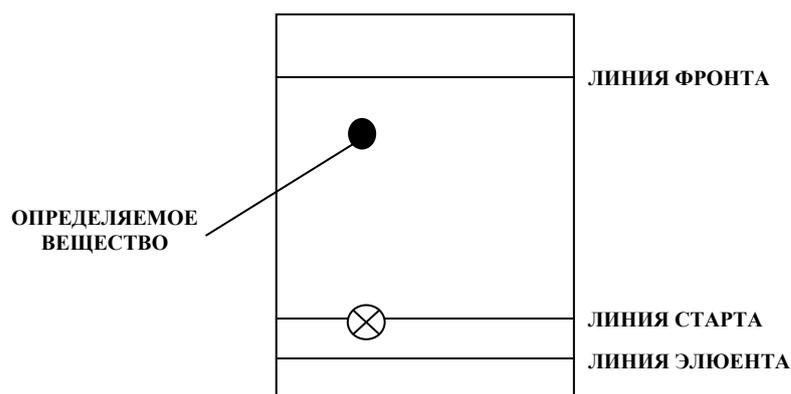


Рисунок 1 – Примерная схема одномерной бумажной хроматографии

Двумерная хроматография предполагает последовательное прохождение подвижной фазы в двух перпендикулярных направлениях, что позволяет обеспечить более четкое разделение смеси анализируемых веществ (рис. 2).

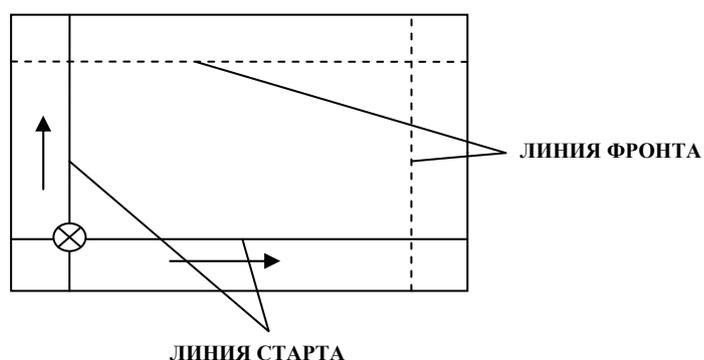


Рисунок 2 – Примерная схема двумерной бумажной хроматографии

Нисходящая хроматография

На дно хроматографической камеры помещают неподвижную или подвижную фазу в количестве, достаточном для образования слоя глубиной 2,5 см. Камеру закрывают и оставляют для насыщения на 24 ч при постоянной температуре. В отдельных случаях, при использовании достаточно летучих растворителей, это время может быть сокращено.

Растворы веществ наносят на линию старта микропипеткой или микрошприцем так, чтобы расстояние между точками нанесения отдельных проб было не менее 3 см. Если минимальное, необходимое для проведения хроматографирования количество анализируемого раствора может образовывать на бумаге первичную зону адсорбции в виде пятна, превышающего в диаметре 10 мм, нанесение проводят в несколько приемов, предотвращая путем подсушивания чрезмерную диффузию на линии старта. После нанесения растворов анализируемых веществ и высыхания образовавшейся при этом первичной хроматограммы полосу бумаги закрепляют в рабочем положении в камере и оставляют на 1,5 ч. В рабочем положении полоса хроматографической бумаги должна висеть вертикально так, чтобы между ее верхним концом, погруженным в лодочку, и линией старта был лишь один, по возможности плавный, перегиб. По окончании выдержки начинают хроматографирование, для чего в лодочку вливают подвижную фазу. Хроматографирование обычно заканчивают при приближении фронта подвижной фазы к нижнему концу полосы бумаги. Если в фармакопейной статье нет специальных указаний, полосу вынимают из камеры и сушат на воздухе, отметив графитовым карандашом конечное положение фронта подвижной фазы. Детекцию зон адсорбции осуществляют согласно указаниям фармакопейной статьи.

Восходящая хроматография

Для проведения восходящей хроматографии на бумаге используют камеры, в которых сосуд (лодочка) с подвижной фазой располагается в

нижней части или на дне. Полоса хроматографической бумаги закрепляется в верхней части камеры так, чтобы обеспечить возможность погружения нижнего конца полосы в лодочку с подвижной фазой. В рабочем положении полосы линия старта должна отстоять от поверхности подвижной фазы на 2 – 3 см. В остальном приемы работы при проведении восходящей хроматографии на бумаге не отличаются от описанных выше.

Подготовка фаз и бумаги

При приготовлении несмешивающихся систем растворителей, совместно используемых при хроматографии в качестве подвижной и неподвижной фазы, необходимо обеспечить их взаимное насыщение, например, путем встряхивания в делительной воронке. При этом в фармакопейной статье должно быть указано, какую из фаз используют для хроматографирования.

Фильтровальную бумагу нужной плотности квалификации «для хроматографии» разрезают в направлении, перпендикулярном или параллельном волокнам, на листы (полосы), длина которых приблизительно равна высоте камеры. Ширина этих полос может быть приблизительно определена по формуле: $A = 3(K + 1)$, где A – ширина полосы (см), K – количество хроматограмм на полосе.

На каждой полосе бумаги для обозначения мест нанесения хроматографируемых веществ графитовым карандашом проводят прямую линию, называемую линией старта. Расстояние от конца полосы бумаги до линии старта выбирается так, чтобы при погружении бумаги в лодочку исключалось непосредственное соприкосновение нанесенных на линию старта веществ с жидкостью, находящейся в лодочке.

На приготовленные таким образом листы фильтровальной бумаги, если указано в фармакопейной статье, наносят неподвижную фазу. Для этого соответствующие труднолетучие растворители (формамид, пропиленгликоль и т.п.) смешивают с легколетучими растворителями и в полученную смесь на

1 – 2 с погружают подлежащие обработке листы бумаги. Избыток смеси с поверхности листов снимают, обжимая их между двумя слоями фильтровальной бумаги, после чего летучий компонент смеси удаляют высушиванием на воздухе в течение 15 – 20 мин.

Если в качестве неподвижной фазы рекомендован водный раствор нелетучих веществ, то бумагу обрабатывают этим раствором, сушат, как указано выше, а перед хроматографированием выдерживают в камере, содержащей пары воды. Нанесение на бумагу легколетучих компонентов неподвижных фаз осуществляется путем выдерживания ее в парах фазы в камере непосредственно перед хроматографированием.

Детекция зон адсорбции

По окончании хроматографирования хроматограммы подсушивают до удаления следов растворителей и просматривают в видимом или ультрафиолетовом свете (при определенной длине волны детектора, указанной в фармакопейной статье), отмечая при этом зоны адсорбции. В ряде случаев для обнаружения зон адсорбции хроматограмму подвергают обработке специальными реагентами, образующими с анализируемыми веществами окрашенные продукты реакции, путем опрыскивания или погружения в раствор реагента.

Способ детекции зон адсорбции должен быть обязательно указан в соответствующей фармакопейной статье на лекарственное средство.