

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Тонкослойная

ОФС.1.2.1.2.0003.15

хроматография

Взамен ст. ГФ XI, вып.1

Хроматографический процесс, протекающий при движении подвижной фазы в тонком слое сорбента, нанесенном на инертную твердую подложку (пластинку) из соответствующего материала – стекла, металла или полимера, называется тонкослойной хроматографией или хроматографией в тонком слое сорбента.

Тонкослойная хроматография (ТСХ) может использоваться для анализа как однокомпонентных, так и многокомпонентных лекарственных средств. В последнем случае подбираются условия хроматографирования, обеспечивающие разделение компонентов смеси.

Разделение может осуществляться по различным механизмам: адсорбционному, распределительному, ионообменному или какой-либо их комбинации.

Хроматографическое разделение осуществляется в результате движения анализируемых веществ в тонком слое (неподвижной фазе), растворенных в растворителе или соответствующей смеси растворителей (подвижная фаза, элюент). При разделении вещества образуют на поверхности сорбента зоны адсорбции в виде пятен (круглых или эллипсовидных) или полос.

Подвижность вещества при его хроматографировании характеризуется величинами R_f и R_{st} (см. ОФС «Хроматография»).

Параметры R_f и R_{st} используются для идентификации веществ и для оценки разделительной способности системы.

Область применения

ТСХ используется при испытаниях лекарственных средств на подлинность (идентификация анализируемых веществ), посторонние примеси (испытание на чистоту) полуколичественным и количественным методами.

Основные приборы и материалы

- пластинки с закрепленным слоем сорбента (неподвижной фазы) различных модификаций;
- хроматографические камеры;
- калиброванные капилляры и микрошприцы;
- устройства для нанесения на хроматограммы обнаруживающих реагентов (пульверизаторы для опрыскивания, камеры для погружения хроматограмм в раствор и др.);
- стандартные образцы, растворители, реагенты для обнаружения хроматографических зон;
- ультрамикроскопы с УФ-лампами на 254 и 365 нм;
- системы обработки и хранения данных.

Используемая лампа должна удовлетворять следующим требованиям теста.

Проверка работы лампы. На пластинку силикагель G наносят 5 мкл 0,04 % раствора натрия салицилата в спирте 96 % для ламп с максимумом излучения при 254 нм или 5 мкл 0,2 % раствора натрия салицилата в спирте 96 % для ламп с максимумом излучения при 365 нм в виде пятна диаметром около 5 мм; пятно должно светиться. Проверка работы ламп проводится не реже одного раза в три месяца, а также при возникновении сомнений в правильности работы лампы с учетом срока её эксплуатации.

При проведении анализов расстояние между лампой и хроматографической пластинкой не должно превышать расстояния, используемого при проверке работы лампы.

Примечание. Используемый спирт должен быть свободен от флуоресцирующих веществ.

Хроматографические пластинки

Пластинка для ТСХ представляет собой твердую подложку (стеклянную, металлическую или полимерную) с нанесенным слоем сорбента. Толщина слоя сорбента от 0,10 до 0,25 мм для аналитического варианта и от 0,5 до 2,0 мм для препаративного.

В качестве сорбента в пластинках для ТСХ чаще всего используются: алюминия оксид, модифицированный и немодифицированный силикагель, модифицированная и немодифицированная целлюлоза.

Готовые хроматографические пластинки могут содержать флуоресцентный индикатор для детектирования веществ, поглощающих в ультрафиолетовой области спектра при 254 и 365 нм.

Размер частиц сорбента для классического аналитического варианта ТСХ составляет 10 – 20 мкм. Наряду с такими пластинками можно использовать пластинки для высокоэффективной тонкослойной хроматографии, содержащие сорбент с частицами размером 5 – 7 мкм. Такие пластинки позволяют увеличить эффективность разделения и уменьшить предел обнаружения.

Выпускаются также пластинки с монолитными сорбентами и пластинки с концентрирующей зоной (двухфазовые пластинки). Последние используются в фармацевтическом анализе для разделения сложных и гетерогенных смесей (экстракты из лекарственного растительного сырья, растворы таблеток со вспомогательными компонентами, мягкие лекарственные формы, смеси, содержащие пигменты, суспензии и др.).

Предварительная подготовка пластинок. В некоторых случаях перед хроматографированием предусмотрена предварительная обработка

пластинок. Это может быть предварительное хроматографирование чистых пластинок в соответствующем растворителе, импрегнирование пластинок при помощи опрыскивания, погружения или элюирования. При необходимости перед использованием пластинки активируют нагреванием в сушильном шкафу в течение 1 ч при температуре 100 – 105 °С. Описание предварительной обработки пластинок должно быть приведено в фармакопейной статье.

Хроматографические камеры

Используют хроматографические камеры для вертикального или горизонтального элюирования с герметичными крышками. Камеры для горизонтального элюирования снабжены также устройствами для подачи подвижной фазы на пластинку. Использование камеры для горизонтального элюирования позволяет осуществлять одновременное элюирование с противоположных сторон пластинки, что увеличивает производительность анализа в два раза по сравнению с использованием камеры для вертикального элюирования. При этом также уменьшается расход подвижной фазы приблизительно в 10 раз. В горизонтальной камере движение подвижной фазы по пластинке происходит только за счет капиллярных сил, вклад гравитации при этом отсутствует, что повышает эффективность разделения по сравнению с камерами для вертикального элюирования.

Подвижные фазы

Подвижные фазы (элюенты) должны быть предпочтительно малотоксичными, содержать минимум компонентов, не вступать в химические реакции ни с сорбентом (неподвижной фазой), ни с компонентами разделяемой смеси. Подвижные фазы должны также достаточно быстро испаряться с поверхности хроматограмм после элюирования.

Для подавления диссоциации полярных молекул компонентов разделяемой смеси к подвижной фазе добавляют вещества кислого или

основного характера (модификаторы).

Нанесение проб

Нанесение проб осуществляют:

- калиброванными капиллярами с тупым концом;
- поршневыми микрошприцами с тупым концом иглы;
- полуавтоматическими или автоматическими приборами для нанесения образцов.

Нанесение осуществляют двумя способами: в виде пятен 2 – 5 мм диаметром (1 – 2 мм на высокоэффективных пластинках) с промежутками между пятнами не менее 10 мм и в виде полос длиной 10 – 20 мм (5 – 10 мм на высокоэффективных пластинках) с промежутком между ними не менее 10 мм. Расстояние до линии старта от нижнего края пластинки должно составлять не менее 10 мм. Если в методике фармакопейной статьи предусмотрено использование как обычных, так и высокоэффективных пластинок, условия для высокоэффективных пластинок должны быть указаны в квадратных скобках. Расстояния на стартовой линии от боковых краев пластинки до мест нанесения первой и последней проб должны составлять не менее 10 мм. В процессе нанесения проб недопустимо повреждение сорбента на линии старта. Подсушивание нанесенных проб осуществляют в токе холодного или теплого воздуха, либо на специальном столе с электроподогревом.

Способы элюирования

Используют следующие способы элюирования: восходящее элюирование (одно- и многоступенчатое, одномерное и двумерное – с поворотом пластинки на 90° или 180°) и горизонтальное.

Восходящая хроматография

Если не указано иначе в фармакопейной статье, пластинку с нанесенными пробами помещают вертикально в камеру. При необходимости камеру предварительно насыщают парами подвижной фазы (в этом случае в

фармакопейной статье должно быть указано время насыщения). Для этого перед проведением анализа обычно внутренние стенки камеры обкладывают фильтровальной бумагой, смоченной подвижной фазой. Уровень подвижной фазы должен быть расположен ниже линии старта. Камеру закрывают и проводят процесс при 20 – 25 °С в защищенном от света месте. После прохождения фронтом подвижной фазы расстояния, указанного в нормативном документе, пластинку вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, проявляют и детектируют зоны адсорбции указанным способом.

При проведении двумерной хроматографии пластинку сушат после хроматографирования в первом направлении и хроматографируют в направлении, перпендикулярном первому.

Горизонтальная хроматография

Пластинку с нанесенными пробами помещают в камеру и направляют поток подвижной фазы из лотка в камеру согласно инструкции к прибору для горизонтального элюирования. Процесс проводят при 20 – 25 °С (если это указано в фармакопейной статье, одновременно с противоположных сторон пластинки). Когда подвижная фаза пройдет расстояние, указанное в нормативном документе, пластинку вынимают, сушат до удаления следов растворителей, проявляют и детектируют зоны адсорбции указанным способом.

Двухмерную хроматографию выполняют, как указано в разделе «Восходящая хроматография».

ВИЗУАЛЬНАЯ ОЦЕНКА

Обнаружение (детектирование) зон адсорбции после проведения качественной и полуколичественной ТСХ осуществляют следующими способами:

- в видимом и ультрафиолетовом свете (при определенной длине волны);
- опрыскиванием растворами обнаруживающих реагентов;
- выдерживанием в парах обнаруживающего реагента;

- погружением в растворы обнаруживающих реагентов с использованием для этих целей специальных камер.

Идентификация. Испытание на подлинность (идентификация) анализируемых веществ проводится при одновременном хроматографировании одинакового количества анализируемого вещества и стандартного образца на одной и той же хроматографической пластинке. Основную зону адсорбции (пятно или полосу) на хроматограмме испытуемого раствора сравнивают с основной зоной адсорбции (пятном или полосой) на хроматограмме стандартного раствора (раствора сравнения), сравнивая окраску (цвет флуоресценции), размер и величину фактора R_f соответствующих зон адсорбции (ОФС «Хроматография»).

Испытание на посторонние примеси. При испытаниях на чистоту основное вещество и примеси в условиях хроматографирования должны иметь разные значения R_f . При этом о степени чистоты анализируемого вещества можно судить по величине и интенсивности зон адсорбции обнаруживаемых на хроматограмме примесей. Их содержание может быть определено полуколичественно. Для этого на пластинку наносят определенные количества анализируемого вещества и свидетелей. Для определения идентифицированных примесей в качестве свидетелей используют стандартные образцы идентифицированных примесей в количествах, соответствующих их предельно допустимому содержанию. Для определения неидентифицированных примесей чаще всего используют растворы сравнения, приготовленные путем разведения испытуемого раствора. Содержание примеси в анализируемом лекарственном средстве оценивают, сравнивая зону адсорбции примеси по совокупности величины и интенсивности поглощения или окраски с соответствующими зонами адсорбции на хроматограмме свидетелей. Дополнительное пятно (пятна) на хроматограмме испытуемого раствора сравнивают визуально с дополнительным пятном (пятнами) на хроматограмме стандартного раствора,

содержащего примесь (примеси), или с пятном на хроматограмме раствора сравнения, приготовленного из разбавленного испытуемого раствора.

Проверка разделительной способности хроматографической системы.

Требования к проверке разделительной способности приводят в фармакопейной статье.

Проверка определения предела обнаружения определяемых примесей.

Чувствительность считается удовлетворительной, если зона адсорбции четко обнаруживается на хроматограмме наиболее разбавленного стандартного раствора примеси или раствора сравнения.

КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ИЗМЕРЕНИЯ

Если вещества, разделяемые методом ТСХ реагируют на излучение в ультрафиолетовой или видимой области спектра, их можно количественно определить непосредственно на пластинке, используя соответствующее оборудование. Для этого измеряют интенсивность отраженного света, передвигая пластинку или регистрирующее устройство вдоль оси хроматограммы. Аналогичным образом можно измерять флуоресценцию.

Вещества, содержащие радионуклиды, могут быть количественно определены непосредственно на пластинке с использованием соответствующего счетчика радиоактивных веществ, а также удалением неподвижной фазы в районе зон адсорбции и измерением радиоактивности с использованием жидкостного сцинтиляционного счетчика.

Оборудование. Для проведения количественных измерений непосредственно на хроматографической пластинке оборудование содержит:

- полуавтоматическое или автоматическое устройство для точного и воспроизводимого нанесения необходимого количества вещества в определенном месте пластинки;
- фотометр (денситометр), способный перемещать пластику или измерительное устройство вдоль осей «х» и «у», с источником монохроматического излучения для измерения отражения или

пропускания; в том случае, когда измеряется флуоресценция, требуется дополнительный монохроматический фильтр для выбора соответствующей спектральной области излучаемого света; полученные в результате денситограммы обрабатывают в соответствии с методом обработки хроматограмм, описанным в ОФС «Хроматография».

Критерии оценки пригодности системы описаны в ОФС «Хроматография». В этой же ОФС приводятся пределы изменения параметров хроматографической системы, которые допустимы для выполнения условий пригодности.

Высокоэффективная тонкослойная хроматография

Эффективность разделения увеличивается как вследствие увеличения площади раздела подвижной и неподвижной фазы за счет уменьшения диаметра частиц сорбента, так и благодаря большей однородности размеров этих частиц. Применяют пластинки для высокоэффективной тонкослойной хроматографии, выполненные как в нормально-фазовом (полярная неподвижная фаза), так и в обращенно-фазовом (неполярная неподвижная фаза) вариантах.

По сравнению с классической ТСХ использование высокоэффективных пластинок позволяет:

- увеличить число анализируемых проб за счет уменьшения размеров зон адсорбции первичной хроматограммы: диаметра пятен (до 1 – 2 мм) или длины полос (до 5 – 10 мм);
- значительно увеличить разделительную способность системы;
- снизить пределы обнаружения и количественного определения анализируемых веществ в 10 – 100 раз.

Применение высокоэффективной тонкослойной хроматографии обеспечивает получение более компактных зон адсорбции разделяемых соединений, что улучшает метрологические характеристики количественного определения с помощью сканирующей хроматоденситометрии.