201080032-XXXX

2.1.8.32. ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ, РАСТИТЕЛЬНЫХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЙ И ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ

В общей фармакопейной статье описан метод высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ), используемый для качественного анализа лекарственного растительного сырья, растительных фармацевтических субстанций и лекарственных растительных препаратов.

ОБОРУДОВАНИЕ

При испытании методом ВЭТСХ как правило используется следующее оборудование:

– пластинки со стеклянной подложкой шириной 20 см и высотой 10 см (могут быть использованы пластинки другого размера, при условии, что приняты меры для получения воспроизводимых результатов, например, может потребоваться иная хроматографическая камера), покрытые однородным пористым (средний размер пор – 6 нм) слоем силикагеля толщиной как правило 200 мкм, состоящим из частиц неправильной формы с размером от 2 мкм до 10 мкм (средний размер – 5 мкм) с полимерным связующим веществом и флуоресцентным индикатором (F_{254}) (при условии выполнения требований к пригодности хроматографической системы могут быть использованы пластинки с иными характеристиками, например, пластинки для ВЭТСХ на алюминиевой подложке, а также пластинки с размером частиц от 5 мкм до 40 мкм);

– приспособления для нанесения необходимых объемов растворов в виде полос, позволяющие контролировать размеры и положение мест нанесения (например, могут быть использованы шприцы или капилляры для нанесения контактным способом, или пробы могут быть нанесены путем распыления);

– приспособление, подходящее для кондиционирования неподвижной фазы при необходимой относительной влажности;

– подходящая хроматографическая камера (например, камера с двумя желобами; размеры камеры должны подбираться с учетом размера пластинки для получения воспроизводимого состава паровой фазы);

– приспособление, подходящее для воспроизводимого высушивания пластинки после хроматографирования (необходимо учитывать возможность улетучивания легколетучих компонентов испытуемого образца или образца сравнения; неравномерное высушивание может приводить к различным интенсивностям пятен (зон адсорбции) при равном количестве вещества);

– приспособления, подходящие для нанесения реактивов на пластинку и для ее нагрева при проявлении;

– система, подходящая для электронного сохранения изображений хроматограмм в коротковолновом (номинальная длина волны 254 нм) и длинноволновом (номинальная длина волны обозначается как 365 нм или 366 нм) ультрафиолетовом свете, а также при дневном свете.

МЕТОД

Приготовление испытуемого раствора. При отсутствии других указаний в частной фармакопейной статье, испытуемый раствор готовят как описано ниже.

Лекарственное растительное сырье сухое или экстракты сухие: смешивают 0,5 г измельченного в порошок лекарственного растительного сырья или 0,1 г экстракта сухого с 5,0 мл *метанола Р*, обрабатывают ультразвуком в течение 15 мин и фильтруют или центрифугируют; используют полученный прозрачный фильтрат или прозрачную надосадочную жидкость.

Масло эфирное: готовят раствор масла эфирного с концентрацией 50 мкл/мл в *толуоле Р*.

Приготовление растворов сравнения. Растворы сравнения и разбавленные растворы сравнения готовят как указано в частной фармакопейной статье. Для этого, как правило, растворяют необходимое количество подходящего реактива (реактивов) или стандартного образца (стандартных образцов) в *метаноле Р* (для лекарственного растительного сырья или сухих экстрактов) или в *толуоле Р* (для масла эфирного). Разбавленные растворы сравнения готовят, смешивая, как правило, 1 объем раствора сравнения и 3 объема растворителя, который использовался для его приготовления (могут применяться и другие разведения).

Растворы сравнения, используемые для проверки пригодности хроматографической системы, готовят как указано в частной фармакопейной статье.

Маркеры интенсивности. В качестве маркера (маркеров) интенсивности для оценки хроматограммы используют одно или более веществ раствора сравнения и разбавленного раствора сравнения.

Нанесение проб на хроматографическую пластинку. При отсутствии других указаний в частной фармакопейной статье, растворы наносят в виде узких полос длиной 8 мм на расстоянии 8 мм от нижнего края пластинки.

Центры полос, расположенных по краям, должны находиться не менее чем в 20 мм от боковых краев пластинки, расстояние между центрами полос должно составлять не менее 11 мм. На крайнюю полосу (как правило, слева) наносят раствор сравнения, используемый для проверки пригодности хроматографической системы.

Если для определения фронта растворителя не используются электронные приспособления, необходимые для хроматографирования, расстояние отмечают карандашом около левого или правого края пластинки.

Кондиционирование пластинки. При отсутствии других указаний в частной фармакопейной статье, пластинку с нанесенными пробами выдерживают на воздухе с подходящей относительной влажностью, полученном в контакте с насыщенным раствором *магния хлорида Р* (относительная влажность воздуха – около 33 %), например, обрабатывая указанным воздухом с помощью подходящего оборудования или выдерживая в течение 1 ч в закрытой камере, содержащей указанный раствор.

Подготовка камеры и хроматографическое разделение. При отсутствии других указаний в частной фармакопейной статье, хроматографическое разделение проводят в насыщенной камере. Например, в случае использования камеры с двумя желобами, в один из желобов помещают фильтровальную бумагу подходящего размера, в камеру наливают подвижную фазу в количестве, достаточном для полного смачивания фильтровальной бумаги и получения в обоих желобах уровня подвижной фазы 5 мм, закрывают крышкой и оставляют на 20 мин для насыщения. Пластинку помещают вертикально во второй желоб слоем сорбента в сторону фильтровальной бумаги. После прохождения подвижной фазой указанного расстояния (как правило, 70 мм от нижнего края пластинки) пластинку вынимают из камеры и сушат в вертикальном положении в потоке воздуха.

Другие хроматографические камеры могут использоваться при условии выполнения критериев пригодности хроматографической системы.

Детектирование. Детектирование осуществляют как указано в частной фармакопейной статье. Если пластинку требуется обработать реактивами, это осуществляют путем погружения пластинки в раствор реактива с определенной скоростью на определенное время (например, со скоростью около 50 мм/с на 1 с) или путем

распыления раствора реактива на пластинку (обычно расходуя 2 – 3,5 мл раствора на пластинку шириной 20 см и высотой 10 см). Просматривают хроматограмму в коротковолновом (номинальная длина волны 254 нм) и длинноволновом (номинальная длина волны обозначается как 365 нм или 366 нм) ультрафиолетовом свете или при дневном свете до и (или) после дериватизации. При цифровом сохранении хроматограмм настройка времени экспозиции должна проводиться с использованием хроматограммы раствора для проверки пригодности хроматографической системы.

Проверка пригодности хроматографической системы. Общим требованием к пригодности хроматографической системы является параллельность фронта подвижной фазы и разделяемых пятен (зон адсорбции) горизонтальным сторонам пластинки. Специфические требования указываются в частных фармакопейных статьях. Как правило, она основана на разделении двух веществ с очень близкими коэффициентами замедления (значениями R_F), но при этом пятна, соответствующие этим веществам, должны делиться (например, хлорогеновая кислота и гиперозид в условиях хроматографирования, используемых для определения флавоноидов). Проверку пригодности хроматографической системы проводят каждый раз при анализе, нанося соответствующий раствор сравнения на каждую хроматографическую пластинку.

Визуальная оценка. Полученные хроматограммы испытуемого раствора и растворов сравнения сопоставляют с описанием, приведенным в частной фармакопейной статье, при этом оцениваются расположение и цвет пятен, а для испытуемого раствора, кроме того, оценивается интенсивность.

Для описания интенсивности пятен используют следующие определения:

– «интенсивная» – для пятен, интенсивность которых визуально больше интенсивности пятна маркера интенсивности на хроматограмме раствора сравнения;

– «равная» или без указаний интенсивности – для пятен, интенсивность которых визуально близка к интенсивности пятна маркера интенсивности на хроматограмме раствора сравнения;

– «слабая» – для пятен, интенсивность которых визуально менее интенсивности пятна маркера интенсивности на хроматограмме раствора сравнения, но равна или более интенсивности пятна маркера интенсивности на хроматограмме разбавленного раствора сравнения;

– «очень слабая» – для пятен, интенсивность которых визуально менее интенсивности пятна маркера интенсивности на хроматограмме разбавленного раствора сравнения.