**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Тонкослойная хроматография** |  | **ОФС.1.2.1.2.0003** |
|  |  | **Взамен ОФС.1.2.1.2.0003.15** |

|  |
| --- |
|  |

Тонкослойная хроматография (ТСХ, TLC) – вид хроматографии, основанный на различии в скорости перемещения компонентов смеси в плоском тонком слое сорбента при их движении в потоке подвижной фазы. Разделение происходит по адсорбционному, распределительному или ионообменному механизму, или какой-либо их комбинации.

**Область применения**

ТСХ используется для исследования как однокомпонентных, так и многокомпонентных лекарственных средств при испытаниях на подлинность (идентификация анализируемых веществ), родственные примеси (испытание на чистоту) полуколичественным и количественным методами, а также, иногда, для количественного определения анализируемых веществ.

**Метод**

ТСХ включает следующие этапы: подготовка образца, подготовка хроматографических пластин, подготовка хроматографической камеры, нанесение образца, элюирование анализируемых веществ, удаление элюата (подвижной фазы) с пластины, детектирование и идентификация компонентов, исследование на родственные примеси и количественное содержание.

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 круглых или эллипсовидных пятен, или полос.

Адсорбционная ТСХ основана на сорбции растворенного вещества поверхностью сорбента.

В распределительной ТСХ пористый носитель, закрепленный на пластинке, пропитывается неподвижным растворителем, который удерживает распределяемые вещества.

В ионообменной ТСХ разделение основано на различной способности ионов смеси обмениваться на одноименно заряженные ионы твёрдого сорбента – ионита.

***Нанесение проб***

Осуществляют двумя способами: в виде пятен диаметром 2–5 мм и в виде горизонтальных полос длиной 10–20 мм и шириной 1–2 мм с промежутком между пятнами или полосами не менее 10 мм. При большем размере пятна, происходит изменение его формы, и границы разделяемых компонентов могут перекрываться. В процессе нанесения проб недопустимо повреждение слоя сорбента на линии старта.

Расстояние до линии старта от нижнего края пластинки должно составлять не менее 10–20 мм. Расстояния на стартовой линии от боковых краёв пластинки до мест нанесения первой и последней проб должны составлять не менее 10 мм.

В некоторых случаях для нанесения используют шаблоны или трафареты, которые предназначены для предварительной разметки пластин или для нанесения проб на пластины вручную через специальные отверстия.

Для исключения так называемого «краевого эффекта» боковые края пластинок на стеклянной подложке очищают от сорбента на расстояние около 0,5 см, а нижние углы пластинок на алюминиевой или пластиковой подложке срезают.

Для исключения ошибок и получения воспроизводимых результатов следует наносить на одной пластинке равные объёмы веществ (мкл). В методике испытания должны быть указаны количества нанесенных веществ в мкл и мкг.

Подсушивание проб осуществляют в токе холодного или тёплого воздуха, либо на специальном столе с электроподогревом.

В случае использования в методике наряду с обычными пластинками высокоэффективных пластинок, условия нанесения проб должны быть указаны в квадратных скобках.

В зависимости от направления движения подвижной фазы и от положения пластинки с сорбентом в хроматографической камере используют следующие способы элюирования: восходящее (двукратная, многократная, двумерная хроматография), горизонтальное, радиальное.

***Восходящая хроматография***

Этот вид хроматографии наиболее распространен в фармацевтическом анализе и основан на том, что фронт подвижной фазы поднимается по пластинке снизу вверх под действием капиллярных сил.

Метод восходящей тонкослойной хроматографии имеет ряд своих недостатков. Например, скорость поднятия фронта по пластинке происходит неравномерно, т.е. в нижней части она самая высокая, а по мере поднятия фронта уменьшается. Это связано с тем, что в верхней части камеры насыщенность парами растворителя меньше, поэтому растворитель с хроматографической пластинки испаряется интенсивнее, следовательно уменьшается его концентрация и скорость движения замедляется. Для устранения этого недостатка по стенкам хроматографической камеры прикрепляют полоски фильтровальной бумаги, либо выкладывают стенки камеры фильтровальной бумагой с трёх сторон, по которой поднимающаяся хроматографическая система насыщает парами камеру по всему объёму. Недостатком также можно считать необходимость следить за фронтом растворителя, так как возможно «убегание» линии фронта растворителя до верхнего края. В таком случае определить действительное значение Rf уже не представляется возможным.

Если не указано иначе в методике испытания, пластинку с нанесёнными пробами помещают вертикально в камеру. При необходимости камеру предварительно насыщают парами подвижной фазы (в этом случае в методике испытания должно быть указано время насыщения). Для этого перед проведением испытания обычно внутренние стенки камеры выкладывают фильтровальной бумагой, смоченной подвижной фазой. Уровень подвижной фазы должен быть расположен ниже линии старта. Камеру закрывают и проводят процесс при 20–25 °С в защищённом от света месте. После прохождения фронтом подвижной фазы расстояния, указанного в методике испытания, пластинку вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, проявляют и детектируют зоны адсорбции указанным способом.

***Двумерная хроматография***. После хроматографирования в одном направлении пластинку сушат и затем хроматографируют в направлении с поворотом пластинки на 90° или на 180°.

***Нисходящая хроматография***

Этот метод хроматографии основан на опускании фронта хроматографической системы по пластинке, в основном под действием сил тяжести, т.е. фронт подвижной фазы движется сверху вниз.

В верхней части хроматографической камеры крепится кювета с хроматографической системой, из которой с помощью фитиля на хроматографическую пластинку поступает растворитель, который стекает и происходит хроматографирование исследуемого образца.

К недостаткам метода можно отнести усложнение оборудования. Метод используется в основном в бумажной хроматографии.

***Горизонтальная хроматография***

Применяется для разделения веществ с близкими значениями Rf. Пластинку с нанесёнными 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 одновременно с противоположных сторон пластинки, в том случае, если в методике испытания нет иных указаний. Когда подвижная фаза пройдёт расстояние, указанное в методике испытания, пластинку вынимают, сушат до удаления следов растворителей, проявляют и детектируют зоны адсорбции.

К достоинствам метода можно отнести то, что в горизонтальной кювете насыщение парами системы происходит гораздо быстрее, скорость движения фронта постоянная.

***Радиальная хроматография***

Заключается в нанесении исследуемого вещества в центр пластинки и туда же подаётся система, которая движется от центра к краю пластинки.

***Визуальная обнаружение (детектирование) зон адсорбции***

Осуществляют следующими способами:

- в видимом и ультрафиолетовом свете (при определённой длине волны);

- опрыскиванием растворами обнаруживающих реагентов;

- выдерживанием в парах обнаруживающего реагента;

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

Для просмотра хроматографических пластинок используют ультрафиолетовое освещение двух типов:

- длинноволновое, с длиной волны 365 нм, под которым разделённые вещества на пластинах флуоресцируют на тёмном фоне яркими пятнами, часто разного цвета;

- коротковолновое, с длиной волны 254 нм, под которым вещества, поглощающие свет, становятся видимыми как тёмные пятна на ярком зелёном или синем фоне пластины, содержащей УФ-индикатор.

Для просмотра хроматограмм используются ультрахемископы с УФ лампами с длинами волн 254 нм и 365 нм.

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.

**Оборудование**

1. Хроматографические пластинки с закреплённым слоем сорбента (неподвижной фазы) различных модификаций.

2. Хроматографические камеры.

3. Оборудование для нанесения веществ на хроматографическую пластинку: калиброванные капилляры и микрошприцы, шаблоны, трафареты, полуавтоматическое или автоматическое устройство для точного и воспроизводимого нанесения необходимого количества вещества в определённом месте пластинки.

4. Оборудование для сушки пластинок: фен, сушильный шкаф, плитка или специальный столик для сушки пластинок.

5. Оборудование для проявления хроматограм:

- ультрахемископы с УФ-лампами с длиной волны 254 и 365 нм;

- пульверизаторы:с резиновой грушей или электропневматический (с использованием сжатого воздуха);

- спрей-камера для орошения (опрыскивания) хроматограмм различными детектирующими реагентами;

- фотометр (денситометр) для количественных измерений непосредственно на хроматографической пластинке.

6. Системы обработки и хранения данных.

***Хроматографические пластинки***

Пластинка для ТСХ представляет собой твёрдую подложку (стеклянную, металлическую или полимерную) с нанесённым 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. Готовые хроматографические пластинки могут содержать флуоресцентный индикатор (зелёного или синего цвета) для детектирования веществ, поглощающих в ультрафиолетовой области спектра при 254 нм и 365 нм.

Выбор сорбента ТСХ зависит от вида хроматографии. В адсорбционной ТСХ в качестве сорбентов применяют модифицированный и немодифицированный силикагели, оксид алюминия, целлюлозу. В распредилительной ТСХ неподвижная фаза может быть гидрофильная - силикагель, целлюлоза, или гидрофобная – тефлон, полиэтилен, поливинилхлоид. В ионообменных хроматографических пластинках в качестве адсорбента используют ионообменные смолы, содержащие четвертичный аммоний или активные сульфогруппы, специальные сорта ионообменной целлюлозы, а также иониты на основе сефадексов - сшитых декстранов, участвующие в ионном обмене.

Вышеперечисленные сорбенты являются наиболее распространенными, но помимо этих существуют множество веществ, используемых как сорбенты – тальк, сульфат кальция, крахмал и т.д., которые также могут быть модифицированы для придания им новых сорбционных свойств (пропитка сорбентов реактивами, например AgNO3, создание пластин с обращённой фазой). Для закрепления сорбента применяют гипс, крахмал, силиказоль и др., которые удерживают зерна сорбента на подложке. Толщина слоя может быть различна (0,1 мм и более), но самый важный критерий – слой должен быть равномерный по толщине в любом месте хроматографической пластинки.

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), разделение на которые основано на различных свойствах двух сорбентов: инертного концентрирующего силикагеля с большими порами в зоне нанесения пробы и селективно разделяющего силикагеля. Такие пластинки применяются в фармацевтическом испытании 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.

*Очистка* пластинок от сорбированных примесей – обычно проводится погружением в какой-либо органический растворитель (метанол, диэтиловый эфир), либо элюированием пластинки в этих растворителях (в последнем случае эффективность отмывки выше).

*Импрегнирование* пластинок органическими или неорганическими растворителями для изменения сорбционных свойств слоя сорбента проводится погружением, опрыскиванием или предварительным элюированием импрегнирующим раствором.

*Активирование* пластинок предназначено для удаления связанной воды из слоя сорбента, как правило, проводится путём нагревания пластинок в сушильном шкафу в течение 1 ч при температуре 100–105 °C.

Чрезмерное нагревание может привести к удалению химически связанной воды и необратимому изменению свойств сорбента. Активированные пластинки по сравнению с неактивированными пластинками, обладают бо́льшими удерживающими свойствами, подвижность веществ на них замедляется.

***Хроматографические камеры***

Используют хроматографические камеры для вертикального или горизонтального элюирования с герметичными крышками.

*Камера для вертикального элюирования с плоским дном* позволяет проводить процедуру хроматографирования в условиях частичного или полного насыщения атмосферы камеры парами подвижной фазы. Размер камер предназначен для пластин разных стандартных размеров: 10 × 10 см, 15 × 15 см и 20 × 20 см.

*Камера для горизонтального элюирования* снабжена устройствами для подачи подвижной фазы на пластинку. Использование камеры для горизонтального элюирования, за счёт нанесение треков с двух сторон, позволяет осуществлять одновременное элюирование с противоположных сторон пластинки, что увеличивает производительность испытания в два раза, а расход подвижной фазы меньше приблизительно в 10 раз, по сравнению с использованием камеры для вертикального элюирования. В горизонтальной камере движение подвижной фазы по пластинке происходит только за счёт капиллярных сил, вклад гравитации при этом отсутствует, что повышает эффективность разделения по сравнению с камерами для вертикального элюирования.

*Двужелобковая камера* позволяет не только уменьшить расход подвижной фазы, но и использовать дополнительный желоб, в случае необходимости, для насыщения камеры другим растворителем (аммиаком, ацетоном и др.).

*Камера для окрашивания пластин и камера для проявления в парах йода* – плоские стеклянные камеры, предназначенные для окрашивания хроматографических пластинок растворами реагентов в легколетучих растворителях методом погружения. Камеры позволяют равномерно по площади окрасить поверхность пластины, потребляют малое количество детектирующего реагента. Размер камер предназначен для пластин размером 10 × 10 и 15 × 15 см.

***Оборудование для проявлений хроматограмм***

*Пульверизатор для агрессивных жидкостей*предназначен для работы с агрессивными жидкостями (например, концентрированные кислоты и щелочи). Пульверизатор может работать как с использованием резиновой груши (маловязкие жидкости), так и с использованием сжатого воздуха, что позволяет распылять вязкие жидкости.

*Пульверизатор для маловязких жидкостей* работает с использованием резиновой груши; используют для распыления маловязких и неагрессивных жидкостей, т.е. водных и спиртовых растворов.

*Спрей-камера* предназначена для окрашивания хроматограмм методом орошения (опрыскивания) различными детектирующими реагентами; устойчива к агрессивным средам, что гарантирует безопасность процесса распыления вредных веществ для организма человека. Камера, по желанию, может быть укомплектована гибкой трубой для соединения с вытяжной вентиляцией.

*Сушка пластин после хроматографирования.* После процесса разделения исследуемых веществ, пластинки сушат. Если в состав подвижной фазы входят только легкокипящие компоненты, то достаточно естественной сушки в течение 3–5 мин. Если же в состав подвижной фазы входят высококипящие жидкости (спирты, вода, органические кислоты и т.д.), сушку пластин нужно проводить не менее 10 мин (до удаления запаха растворителей), возможно использование фена (теплый воздух) или специальной плитки (столика) для сушки пласстин, или сушильного шкафа.

**Растворители для наносимых веществ**

При выборе растворителей в ТСХ пользуются любым известным элюотропным рядом, в котором растворители расположены в соответствии с увеличивающейся элюирующей силой, т.е.в порядке возрастания полярности. Использование полярных растворителей препятствует чрезмерному концентрированию вещества в точке за счёт размывания вещества в стартовом пятне.

Требования к растворителям:

- полная растворимость испытуемых веществ в растворителе или полная нерастворимость в случаях, когда необходимо, чтобы растворились отдельные компоненты испытуемого образца;

- хорошая смачиваемость слоя сорбента;

- химическая чистота;

- относительная летучесть, необходимая для быстрого удаления с пластины.

**Подвижные фазы**

Подвижные фазы (ПФ) должны быть предпочтительно малотоксичными, содержать минимум компонентов, не вступать в химические реакции ни с сорбентом (неподвижной фазой), ни с компонентами разделяемой смеси (за исключением специальных добавок для улучшения детектирования веществ). ПФ также должны 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).

Для получения воспроизводимых результатов ПФ для каждого эксперимента следует готовить вновь, поскольку растворители испаряются. В этом случае можно приготовить рассчитанный больший объём ПФ (с небольшим запасом) и для каждого эксперимента отбирать от него необходимую порцию.

**Проверка пригодности хроматографической системы**

Для получения воспроизводимых результатов при определении подлинности, родственных примесей, количественного содержания методом ТСХ устанавливают пригодность хроматографической системы.

Для этой цели определяют:

- *чувствительность хроматографической системы*, которая считается удовлетворительной, если зона адсорбции чётко обнаруживается на хроматограмме стандартного раствора основного вещества/примеси или раствора сравнения наименьшей концентрации, соответсвующей чувствительности системы (пределу количественного определения) наиболее разбавленного раствора основного вещества/примеси или раствора сравнения;

- *разделительная способность* – зоны адсорбции примесей должны быть чётко отделены от зоны адсорбции основного вещества и друг от друга.

Положение каждой зоны адсорбции характеризуется величиной *Rf*, которая является индивидуальной характеристикой соединения, хроматографируемого в условиях опыта, и изменяется от 0 до 1. Оптимальным для практической ТСХ является интервал изменения *Rf* от 0,2 до 0,8. Наиболее точной величиной для оценки разделительной способности хроматографической системы является величина Rst – отношение величины *Rf* одного вещества к величине *Rf* другого (ОФС «Хроматография»).

Требования к оценке пригодности хроматографической системы системы должны быть приведены в методике испытания.

Критерии оценки пригодности системы, а также допустимые пределы изменения параметров хроматографической системы для выполнения условий пригодности описаны в ОФС «Хроматография».

***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) по положению на пластинке (значению фактора *R*f), размеру, нтенсивности окраски, поглощения или флуоресценции в УФ свете.

***Испытание на родственные примеси***

При испытаниях на чистоту основное вещество и примеси в условиях хроматографирования должны иметь разные значения *R*f. При этом о степени чистоты испытуемого вещества можно судить по величине и интенсивности зон адсорбции обнаруживаемых на хроматограмме примесей. Их содержание может быть определено полуколичественно. Для этого на пластинку наносят определенное количество испытуемого вещества – свидетеля или стандартного образца.

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 путём разведения испытуемого раствора или раствора стандартного образца.

В некоторых случаях при отсутствии стандартных образцов примесей используют метод разложения основного вещества при определенных условиях, либо другой метод получения примеси при одновременно протекающей реакции ее образования «*in situ*» (условия должны быть указаны в методике испытания).

Наличие или отсутствие примесей в анализируемом лекарственном средстве может быть оценено:

- при сравнии зон адсорбции примесей 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;

- при сравнении зон адсорбции с определенным (рассчитанным) количеством основного вещества, взятого в качестве свидетеля (наносят шкалу из растворов основного вещества разной концентрации; используют, когда чувствительности обнаружения испытуемого вещества и стандартного образца примеси близки);

- по отсутствию посторонних пятен на хроматограмме испытуемого вещества при нанесении его в соответствующем количестве (менее объективный способ).

***Количественное определение веществ в ТСХ***

Осуществляют двумя способами:

- основано на том, что площадь и интенсивность окраски зон адсорбции пропорциональны количеству вещества. При этом испытуемое вещество (пятно) вымывают из слоя сорбента после механического вырезания зоны и полученный раствор анализируют каким-либо методом, например, спектрофотометрическим (полуколичественное определение);

- непосредственно на хроматограмме, используя инструментальные методы, такие как фотоденситометрия, флуориметрия. Фотоденситометрия основана на количественном сканировании окрашенных зон лучём монохроматического света и измерении доли поглощённого или отражённого веществом света. Электрический сигнал регистрируется в виде кривых. Количество вещества находят по величине площади пика.

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

**Высокоэффективная тонкослойная хроматография**

По сравнению с классической ТСХ использование высокоэффективных пластинок позволяет:

- увеличить число испытуемых проб за счёт 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 испытуемых веществ в 10–100 раз.

Эффективность разделения увеличивается как вследствие увеличения площади раздела подвижной и неподвижной фазы за счёт 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 обращённо-фазовом (неполярная неподвижная фаза) вариантах, содержащие сорбент с частицами размером 5–7 мкм.

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