**ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
| ОФС.0.0.0000 |
| **Тонкослойная хроматография** |

Тонкослойная хроматография (ТСХ) представляет собой метод разделения, основанный на процессах адсорбции, распределения, ионного обмена или на их комбинации и осуществляется посредством перемещения в тонком слое (неподвижной фазе) определяемых веществ (аналитов), растворённых в растворителе или в подходящей смеси растворителей (подвижной фазе). Неподвижная фаза состоит из подходящего материала, нанесённого в виде тонкого слоя и зафиксированного на подложке (пластинке) из стекла, металла или полимера.

Перед хроматографированием растворы определяемых веществ (аналитов) наносят на пластинку.

ОБОРУДОВАНИЕ

**Пластинки**. Хроматографирование проводят с использованием пластинок, описанных в соответствии с указаниями *ОФС «Реактивы. Индикаторы».* В фармакопейных статьях, в которых используются как обычные, так и высокоэффективные пластинки (ВЭТСХ), размер частиц силикагеля указывается в скобках (…мкм) после его названия.

*Предварительная подготовка пластинок.* При необходимости перед использованием пластинки могут быть пропитаны путём миграции соответствующим растворителем, а также путём элюирования, погружения или опрыскивания. Во время использования, при необходимости, пластинки активируют, нагреванием в сушильном шкафу при температуре 120 °C в течение 20 мин.

**Хроматографическая камера** для вертикального элюирования представляет собой ёмкость с плотно подогнанной крышкой и плоским дном или дном с двумя желобами из инертного прозрачного материала, соответствующими по размеру используемым пластинкам.

Для горизонтального элюирования хроматографическая камера имеет жёлоб для подвижной фазы и дополнительно содержит устройство для подачи подвижной фазы к неподвижной фазе.

**Микропипетки, микрошприцы, калиброванные капилляры** или другие устройства, пригодные для нанесения растворов.

**Устройство для обнаружения флуоресценции.** Для измерения непосредственной флуоресценции или гашения флуоресценции.

**Проявляющие устройства и реактивы**. Для проявления разделённых определяемых веществ (аналитов) используют подходящие устройства, пригодные для нанесения реактивов на пластинку (посредством опрыскивания, погружения или обработки парами) и, в случае применимости, нагревания.

**Документирование**. Допускается использование устройств, обеспечивающих документирование визуализированных хроматограмм, например, фотографирование или создание компьютерного файла.

МЕТОД

**Нанесение**. На линию, параллельную нижнему краю пластинки, на соответствующем расстоянии от её нижнего края и сторон наносят указанные объёмы растворов; расстояние между центрами круглых пятен должно составлять не менее 10 мм (5 мм для пластинок для ВЭТСХ), расстояние между краями полос – не менее 5 мм (2 мм для пластинок для ВЭТСХ). Растворы наносят минимальными порциями для получения пятен диаметром 2–5 мм (1–2 мм для пластинок для ВЭТСХ) или полос
длиной 10–20 мм (5–10 мм для пластинок для ВЭТСХ) и шириной 1–2 мм.

Если в фармакопейной статье предусмотрено использование наряду с обычными пластинками пластинок для ВЭТСХ, условия хроматографирования для ВЭТСХ указывают в квадратных скобках […] после указания условий для обычных пластинок.

**Вертикальное хроматографирование**. Стенки хроматографической камеры выстилают фильтровальной бумагой. Подвижную фазу наливают в камеру в количестве, достаточном для того, чтобы после смачивания фильтровальной бумаги покрыть дно камеры слоем жидкости, необходимым для хроматографирования. При отсутствии других указаний в фармакопейной статье хроматографирование проводят в насыщенной камере. Для насыщения хроматографическую камеру с подвижной фазой закрывают крышкой и выдерживают при температуре от 20 °С до 25 °С, как правило, в течение 1 ч. Наносят указанные объёмы растворов как описано выше. После испарения растворителей из нанесённых проб пластинку помещают в хроматографическую камеру как можно более вертикально, следя за тем, чтобы пятна или полосы находились выше поверхности подвижной фазы. Камеру закрывают, оставляют её при температуре от 20 °С до 25 °С в защищённом от попадания прямых солнечных лучей месте. После того, как подвижная фаза пройдёт расстояние, указанное в фармакопейной статье, пластинку вынимают, сушат и обнаруживают зоны адсорбции способом, указанным в фармакопейной статье.

В случае двумерной хроматографии после первого хроматографирования пластинку сушат и выполняют второе хроматографирование в направлении, перпендикулярном первому.

**Горизонтальное хроматографирование**. Наносят указанные объёмы растворов как описано выше. После испарения растворителей из нанесённых проб в жёлоб хроматографической камеры вводят с помощью шприца или пипетки достаточное количество подвижной фазы, помещают пластинку, убеждаясь, что она расположена горизонтально и подсоединена к устройству для подачи подвижной фазы в соответствии с инструкциями производителя. Если указано в фармакопейной статье, пластинку элюируют, начиная одновременно с двух концов. Камеру закрывают и проводят хроматографирование при температуре от 20 °C до 25 °C. После того, как подвижная фаза пройдёт расстояние, указанное в фармакопейной статье, пластинку вынимают, сушат и обнаруживают зоны адсорбции указанным способом.

В случае двумерной хроматографии после первого хроматографирования пластинку сушат и выполняют второе хроматографирование в направлении, перпендикулярном первому.

Критерии оценки пригодности системы, а также пределы, в которых могут корректироваться параметры хроматографической системы для соответствия критериям её пригодности приведены в *ОФС «Хроматография»*.

ВИЗУАЛЬНАЯ ОЦЕНКА

**Идентификация**. Визуально сравнивают цвет, размер и фактор замедления *(Rf)* основной зоны адсорбции на хроматограмме испытуемого раствора с соответствующей зоной адсорбции на хроматограмме раствора сравнения.

Фактор замедления *(Rf)* определяют как отношение расстояния от точки нанесения пробы до центра зоны адсорбции и расстояния, пройденного фронтом растворителя от точки нанесения *(ОФС «Хроматография»).*

*Проверка разделяющей способности неподвижной фазы для идентификации.* Обычно для оценки пригодности достаточно испытания на пригодность неподвижной фазы, описанного в *ОФС «Реактивы. Индикаторы».* Дополнительные требования к оценке пригодности указывают в фармакопейной статье.

**Испытание на родственные примеси**. Дополнительная(ые) зона(ы) адсорбции на хроматограмме испытуемого раствора сравнивают визуально с соответствующей(ими) зоной(ами) адсорбции на хроматограмме раствора сравнения, содержащего примесь(и), или раствора сравнения, приготовленного путём разведения испытуемого раствора.

*Проверка разделяющей способности.* Требования для проверки разделяющей способности приводят в соответствующих фармакопейных статьях.

*Проверка чувствительности.* Чувствительность считается удовлетворительной, если на хроматограмме наиболее разведённого раствора сравнения чётко обнаруживается пятно или полоса (зона адсорбции).

КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ИЗМЕРЕНИЯ

Требования к разрешению и разделению приводят в соответствующих фармакопейных статьях.

Вещества, разделяемые методом тонкослойной хроматографии, поглощающие или флуоресцирующие в ультрафиолетовом или видимом свете, могут быть определены непосредственно на пластинке, используя подходящее оборудование. Для этого измеряют отражение или пропускание падающего света, передвигая пластинку или измеряющее устройство. Аналогичным образом, используя подходящее оптическое оборудование, можно измерять флуоресценцию. Вещества, содержащие радионуклиды, могут быть количественно определены (*ОФС «Радиофармацевтические препараты»* и *ОФС «Обнаружение и измерение радиоактивности»*) тремя способами:

- непосредственно на пластинке – передвигая пластинки вдоль подходящего счётчика радиоактивности или счётчика радиоактивности вдоль пластины;

- разрезанием пластинки на полосы и измерением радиоактивности на каждой полосе, используя подходящий счётчик радиоактивности;

- соскабливание неподвижной фазы, растворением её в подходящем сцинтилляционном коктейле и измерением радиоактивности с использованием жидкостного сцинтилляционного счётчика.

**Оборудование**. Оборудование для измерений непосредственно на пластинке включает в себя:

- устройство для точного нанесения в определённом месте пластинки необходимого количества вещества;

- механическое устройство для передвижения пластинки или измерительного устройства вдоль осей *X* или *Y;*

- регистрирующее устройство и интегратор или компьютер;

- *для веществ, поглощающих или флуоресцирующих в ультрафиолетовом или видимом свете:* для измерения отражения или пропускания используются фотометр с источником света, оптическое устройство, генерирующее монохроматический свет, и фотоэлемент соответствующей чувствительности; для измерения флуоресценции требуется дополнительно монохроматический фильтр для выбора соответствующей спектральной области излучаемого света;

- *для веществ, содержащих радионуклиды:* подходящий счётчик радиоактивности. Необходимо проверить линейность диапазона счётчика радиоактивности.

**Методика**. Готовят раствор испытуемого образца (испытуемый раствор) в соответствии с указаниями в фармакопейной статье и, при необходимости, растворы стандартных образцов анализируемых веществ (растворы сравнения), используя тот же растворитель, что и для приготовления испытуемого раствора. На пластинку наносят одинаковые объёмы каждого из растворов и хроматографируют.

*Вещества, поглощающие или флуоресцирующие в ультрафиолетовом или видимом свете.* Готовят и наносят не менее 3 растворов сравнения, концентрации которых охватывают предполагаемое значение концентрации испытуемого раствора (около 80 %, 100 % и 120 % от этой концентрации). Обрабатывают, при необходимости, указанным реактивом и регистрируют отражение, пропускание или флуоресценцию на хроматограммах испытуемого раствора и растворов сравнения. По полученным данным рассчитывают количество вещества в испытуемом растворе.

*Вещества, содержащие радионуклиды.* Готовят и наносят испытуемый раствор, содержащий около 100 % предполагаемого значения концентрации. Измеряют радиоактивность как функцию длины пути и записывают значение радиоактивности каждого полученного пика в процентах от суммарной радиоактивности.