

2.8. МЕТОДИ ФАРМАКОГНОЗІЇ

2.8.25. ВИСОКОЕФЕКТИВНА ТОНКОШАРОВА ХРОМАТОГРАФІЯ ЛІКАРСЬКОЇ РОСЛИННОЇ СИРОВИНИ І ЛІКАРСЬКИХ РОСЛИННИХ ПРЕПАРАТІВ

Високоєфективна тонкошарова хроматографія (ВЕТШХ) використовується для якісного аналізу лікарської рослинної сировини й лікарських рослинних препаратів. ▽ Для цього варіанта методу тонкошарової хроматографії (2.2.27) зазвичай▲ використовують скляну пластинку, яка вкрита однорідним пористим шаром (середній розмір пор — 6 нм) зазвичай товщиною 200 мкм; тонкий шар складається із силікагелю, розмір частинок якого варіює від 2 мкм до 10 мкм і в середньому становить 5 мкм, полімерної зв'язувальної речовини й флуоресцентного індикатора (F_{254}). Результати випробування перевіряють, використовуючи ▽ тест на придатність хроматографічної системи▲.

ОБЛАДНАННЯ

Обладнання для якісної високоєфективної тонкошарової хроматографії зазвичай включає:

- скляні пластинки, як зазначено вище, зазвичай розміром 20 см × 10 см;
- підходящий пристрій для нанесення зазначених об'ємів розчинів у вигляді смуг, який дозволяє контролювати розміри й положення зони нанесення;
- підходящий пристрій для кондиціонування нерухомої фази за зазначеної відносної вологості;
- підходящу хроматографічну камеру (наприклад, камеру з двома жолобами);
- підходящий пристрій, який забезпечує відтворюване висушування пластинки після елюювання;
- підходящий пристрій для нанесення реактивів і нагрівання пластинки для проведення процедури дериватизації;
- підходящу систему для електронного документування хроматограм в УФ-світлі за довжин хвиль 254 нм і 366 нм або в білому світлі.

ПРИМІТКА: допускається застосування звичайних варіантів методу тонкошарової хроматографії з використанням скляних пластинок або листів, що вкриті частинками з розміром від 5 мкм до 40 мкм, або ВЕТШХ-листів з алюмінієвою основою за умови, що одержані результати задовольняють такі загальні вимоги тесту на придатність системи: смуги елюються перпендикулярно до нижнього краю пластинки, фронт рухомої фази є паралельним до верхнього краю пластинки, — а також за умови виконання вимог ▽ тесту на придатність хроматогра-

фічної системи▲, зазначених в окремій монографії.

МЕТОДИКА

Приготування випробовуваного розчину. ▽ Випробовуваний розчин описаний в окремій монографії і зазвичай його готують, як наведено нижче▲.

Для сухої лікарської рослинної сировини й сухих рослинних екстрактів: змішують 0.5 г здрібненої на порошок лікарської рослинної сировини або 0.1 г сухого рослинного екстракту з 5.0 мл *метанолу Р* й обробляють ультразвуком протягом 15 хв; фільтрують або центрифугують і використовують фільтрат або надосадову рідину як випробовуваний розчин.

Для ефірних олій: розчиняють 50 мкл ефірної олії в 1.0 мл *толуолу Р* і використовують цей розчин як випробовуваний.

Приготування розчинів порівняння. ▽ Розчини порівняння описані в окремій монографії і зазвичай їх готують, як наведено нижче▲. Готують розчин 1 мг/мл ▽ (позначений як «R» на хроматограмах, наведених у монографії)▲ відповідного реактиву(ів) або стандартного зразку(ів) у *метанолі Р* або (для ефірних олій) у *толуолі Р*. Готують другий розчин порівняння (розведений розчин порівняння ▽ позначений як «R 1/4» на хроматограмах, наведених у монографії)▲ змішуванням 1 об'єму одержаного розчину й 3 об'ємів того самого розчинника ▽ (у деяких випадках замість цього розчину може бути описаний інший розведений розчин порівняння, наприклад «R 1/20»)▲. Обидва розчини використовують як еталони інтенсивності.

Маркер інтенсивності. Використовують одну або більше речовин у розчині порівняння та розведеному розчині порівняння як маркер(и) інтенсивності для оцінювання хроматограми.

Приготування ▽ розчину для оцінювання придатності хроматографічної системи▲. Розчин готують, як зазначено в окремій монографії.

Нанесення зразків і розмітка пластинки. ▽ Зразки зазвичай▲ наносять у вигляді вузьких смуг довжиною 8 мм на відстані 8 мм від нижнього краю пластинки. Центр першого треку, який використовують для ▽ розчину для оцінювання придатності хроматографічної системи▲, має бути на відстані 20 мм від лівого краю пластинки. Мінімальна відстань між треками (від центру до центру) має бути 11 мм. На стандартну пластинку наносять не більше 15 треків. Якщо не використовується електронний пристрій для детектування фронту рухомої фази, відстань, що має пройти рухома фаза, позначають олівцем біля лівого або правого краю пластинки.

Кондиціонування пластинки. Після нанесення зразків і якщо в окремій монографії не зазначено інше, пластинку витримують на повітрі за підхожої відносної вологості, яку забезпечують, використовуючи насичений розчин *магнію хлориду Р* (наприклад, пластинку витримують протягом 1 год у закритій камері, яка містить такий розчин, або використовують попередньо кондиційоване повітря).

Підготовка камери й елювання пластинки. Якщо в окремій монографії не зазначено інше, хроматографічне розділення проводять у насиченій камері. У разі використання камери з двома жолобами, фільтрувальний папір поміщають у дальній жолоб. Заповнюють камеру достатньою кількістю рухомої фази, так щоб фільтрувальний папір повністю просочився та рівень рідини в обох жолобах становив 5 мм. Камеру закривають кришкою та витримують протягом 20 хв для насичення. Пластинку поміщають у передній жолоб камери вертикально, тонкий шар за такої умови має бути розвернутий до фільтрувального паперу. Коли рухома фаза пройде \blacktriangleright зазначену дистанцію (зазвичай це 70 мм від нижнього краю пластинки) \blacktriangleleft , пластинку виймають із камери й сушать у вертикальному положенні в потоці повітря за кімнатної температури. Інші форми камери й відстань проходження рухомої фази можуть бути зазначені в окремій монографії.

ПРИМІТКА: інші камери можуть бути застосовані за умови, що одержані результати відповідають усім вимогам придатності хроматографічної системи.

Візуалізація. Хроматограми на пластинці візуалізують, як зазначено в окремій монографії \blacktriangleright в умовах виявлення \blacktriangleleft . У разі використання дериватизаційних реактивів пластинку розміром 20 см \times 10 см рівномірно обприскують зазвичай 3.5 мл розчину реактиву або занурюють пластинку в розчин реактиву, зазвичай зі швидкістю 5 мм/с і часом затримки 1 с. Спостереження може бути проведено в УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм або 366 нм або в білому світлі до й/або після дериватизації. У разі цифрового запису хроматограм час експозиції слід регулювати, базуючись на трек розчину для \blacktriangleright оцінювання придатності хроматографічної системи \blacktriangleleft .

\blacktriangleright Тест на придатність хроматографічної системи \blacktriangleleft . Цей тест оснований на розділенні двох речовин, які мають близькі коефіцієнти затримки (R_f) і ледь розділюються за зазначених хроматографічних умов (наприклад, хлорогенова кислота й гіперозид у хроматографічній системі, використовуваний для флавоноїдів). Результати, одержані для випробовуваного розчину й розчину порівняння, є придатними, якщо результати хроматографування розчину для \blacktriangleright оцінювання придатності хроматографічної системи \blacktriangleleft задовольняють вимоги до розділення, зазначені в окремій монографії.

Візуальне оцінювання. Хроматограми випробовуваного розчину й розчинів порівняння порівнюють із описом, наданим у розділі «Результати» окремої монографії, оцінюють положення зон, їх колір, а також — на хроматограмі випробовуваного розчину — їх інтенсивність. На хроматограмі випробовуваного розчину зони, для яких у таблиці результатів \blacktriangleright надано опис «еквівалентні» або для яких не надано опису інтенсивності, мають інтенсивність, близьку до інтенсивності зони маркера на хроматограмі розчину порівняння (R) \blacktriangleleft . Зони, описані як «інтенсивні», візуально більш інтенсивні, ніж зона маркера інтенсивності на хроматограмі розчину порівняння; зони, описані як «слабі», візуально менш інтенсивні, ніж зона маркера інтенсивності на хроматограмі розчину порівняння, і рівні за інтенсивністю або більш інтенсивні, ніж зона маркера інтенсивності на хроматограмі розведеного розчину порівняння \blacktriangleright (R 1/4, R 1/20 тощо) \blacktriangleleft ; зони, описані як «дуже слабкі», візуально менш інтенсивні, ніж зона маркера інтенсивності на хроматограмі розведеного розчину порівняння.