

12.25 SẮC KÝ LỚP MỎNG HIỆU NĂNG CAO (HPTLC) DÙNG TRONG ĐỊNH TÍNH DƯỢC LIỆU, CAO DƯỢC LIỆU VÀ TINH DẦU

HPTLC được sử dụng cho phân tích định tính dược liệu, cao dược liệu và tinh dầu là kỹ thuật sắc ký lớp mỏng (Phụ lục 5.4) sử dụng pha tĩnh được trải thành lớp mỏng đồng nhất, dày 200 μm , cố định trên các phiến kính hoặc nhôm. Pha tĩnh là các hạt silica gel bề mặt xốp (kích thước lỗ xốp trung bình 6 nm), kích thước hạt từ 2 μm đến 10 μm và trung bình phải đạt 5 μm , có chứa chất bám dính polymer và chỉ thị huỳnh quang có cường độ cực đại ở 254 nm (F_{254}).

Kết quả phân tích được chấp nhận khi phép thử đạt yêu cầu tính phù hợp của hệ thống.

Ghi chú:

- Phương pháp HPTLC có thể áp dụng cho định lượng các thành phần hóa học trong dược liệu, cao dược liệu trong sản phẩm khi có kết hợp thêm với các thiết bị thích hợp.
- Bản mỏng được phủ pha tĩnh có kích thước hạt từ 5 μm đến 40 μm cũng có thể được sử dụng trong phương pháp này khi đạt được yêu cầu về tính phù hợp của hệ thống.

Thiết bị

Thiết bị chính bao gồm:

- Bản mỏng như mô tả ở trên có kích thước 20 \times 10 cm nếu không có quy định trong chuyên luận riêng.
- Dụng cụ chấm sắc ký phù hợp để đưa được thể tích dung dịch theo quy định lên bản mỏng và kiểm soát được kích thước và vị trí vạch chấm.
- Bình tạo độ ẩm tương đối đáp ứng yêu cầu chỉ ra đối với pha tĩnh; dung dịch bão hòa *magnesi clorid* (TT) được sử dụng để tạo độ ẩm tương đối khoảng 33 %. Các dung dịch bão hòa của *kali thiocyanat* (TT) và *natri clorid* (TT) có thể được sử dụng để đạt độ ẩm tương đối lần lượt là 47 % và 75 % ở 25 $^{\circ}\text{C}$.
- Bình triển khai sắc ký phù hợp (ví dụ: bình 02 rãnh).
- Thiết bị sấy khô bản mỏng sau khi khai triển.
- Thiết bị phun thuốc thử và thiết bị sấy bản mỏng.
- Thiết bị giúp quan sát bản mỏng dưới ánh sáng trắng (ánh sáng thường, ánh sáng ban ngày), ánh sáng tử ngoại bước sóng 254 nm, 366 nm.
- Thiết bị chụp ảnh sắc ký đồ trong điều kiện quan sát nêu trên (nếu cần).

Tiến hành

Chuẩn bị dung dịch thử

Nếu không có quy định trong chuyên luận riêng, chuẩn bị dung dịch thử như sau:

Lấy 0,5 g dược liệu khô hoặc 0,05 g cao dược liệu khô, thêm 5,0 ml *methanol* (TT) và siêu âm trong 15 min; lọc hoặc ly tâm và sử dụng dịch lọc hoặc dịch trong làm dung dịch thử.

Đối với tinh dầu, hòa tan 50 μl tinh dầu trong 1,0 ml *toluen* (TT) được dung dịch thử.

Chuẩn bị dung dịch đối chiếu

Nếu không có quy định trong chuyên luận riêng, chuẩn bị dung dịch đối chiếu (dung dịch R) như sau:

Dung dịch chất đối chiếu: Hòa tan chất đánh dấu (chất điểm chỉ) hoặc chất đối chiếu trong *methanol* (TT), để được dung dịch có nồng độ 1 mg/ml.

Dung dịch tinh dầu đối chiếu: Hòa tan 50 μl tinh dầu trong 1,0 ml *toluen* (TT) được dung dịch chấm sắc ký.

Dung dịch dược liệu đối chiếu: Lấy 0,5 g dược liệu (mẫu chuẩn), thêm 5,0 ml *methanol* (TT) và siêu âm trong 15 min; lọc hoặc ly tâm và sử dụng dịch lọc hoặc dịch trong làm dung dịch đối chiếu.

Dung dịch cao dược liệu đối chiếu: Lấy 0,05 g cao dược liệu khô (mẫu chuẩn), thêm 5,0 ml *methanol* (TT) và siêu âm trong 15 min; lọc hoặc ly tâm và sử dụng dịch lọc hoặc dịch trong làm dung dịch đối chiếu.

Dung dịch đối chiếu pha loãng: Pha loãng các dung dịch đối chiếu để được dung dịch đối chiếu thứ hai bằng cách trộn đều 1 thể tích dung dịch đối chiếu (gọi tắt là R) với 3 thể tích dung môi để được dung dịch R1/4 (trong 1 số trường hợp có thể pha loãng hơn, ví dụ pha loãng 20 lần được dung dịch R1/20). Dung dịch R và R1/4 (hoặc R1/20) được sử dụng để đánh giá độ đậm của vết sắc ký.

Độ đậm của vết sắc ký

Sử dụng dung dịch đối chiếu (dung dịch R) và dung dịch đối chiếu pha loãng (R1/4, R1/20,...) để đánh giá mức độ đậm của vết sắc ký (xem phần đánh giá kết quả)

Dung dịch kiểm tra tính phù hợp của hệ thống

Cách chuẩn bị dung dịch kiểm tra tính phù hợp của hệ thống được chỉ ra trong chuyên luận riêng.

Đưa chất phân tích lên bản mỏng

Các dung dịch đối chiếu và dung dịch thử được chấm riêng biệt lên bản mỏng thành các vạch hẹp dài 8 mm, cách mép dưới của bản mỏng 8 mm. Điểm giữa (trung tâm) của vạch đầu tiên (vạch của dung dịch kiểm tra tính phù hợp hệ thống) cách mép bên trái của bản mỏng 20 mm. Khoảng cách tối thiểu giữa các vạch (tính từ các điểm giữa) là 11 mm. Tối đa là 15 vạch được chấm trên một bản mỏng (kích thước 20 \times 10 cm). Thể tích dung dịch đưa lên bản mỏng thường từ 2 - 10 μl . Nếu không có thiết bị để phát hiện đường dung môi khai triển thì khoảng triển khai sắc ký được đánh dấu bằng bút chì sát với mép phía bên phải hoặc bên trái bản mỏng.

Ổn định bản mỏng

Sau khi chấm các vạch lên bản mỏng, nếu không có quy định trong chuyên luận riêng, để bản mỏng trong môi trường có độ ẩm tương đối thích hợp (33 %) bằng cách sử dụng các dung dịch bão hòa phù hợp và bình tạo độ ẩm {ví dụ: để bản mỏng trong trong bình tạo độ ẩm đậy kín có chứa *dung dịch bão hòa magnesi clorid* (TT) trong 1 h} hoặc sử dụng thiết bị điều hòa không khí.

Chuẩn bị bình khai triển và triển khai sắc ký

Nếu không có quy định trong chuyên luận riêng, triển khai sắc ký trong bình bão hòa dung môi. Khi sử dụng bình hai rãnh, đặt một tấm giấy lọc vừa khít vào rãnh sau. Đưa vào bình khai triển đủ lượng pha động để làm ướt hoàn toàn tấm giấy lọc và đạt được mức dung môi cao khoảng 5 mm ở cả hai rãnh. Đậy kín nắp bình khai triển, để yên trong 20 min để đạt được sự bão hòa dung môi. Đặt bản mỏng thẳng đứng vào rãnh phía trước sao cho lớp pha tĩnh đối diện với tấm giấy lọc. Khi pha động di chuyển được khoảng cách yêu cầu (thường là 70 mm tính từ vạch xuất phát), lấy bản mỏng ra và làm khô ở vị trí thẳng đứng dưới dòng không khí ở nhiệt độ phòng.

Ghi chú: Các bình khai triển khác và khoảng khai triển sắc ký có thể được chỉ ra trong chuyên luận riêng.

Quan sát sắc ký đồ

Sắc ký đồ được quan sát sau khi triển khai sắc ký và bản mỏng được làm khô như trên hoặc sau quá trình dẫn xuất hóa (nếu có) như mô tả trong chuyên luận riêng.

Quá trình dẫn xuất hóa: Khi các thuốc thử hiện màu được sử dụng, thể tích thuốc thử thường dùng khoảng 3,5 ml, được phun đều lên bản mỏng kích thước 20 × 10 cm, hoặc bản mỏng được nhúng trong dung dịch thuốc thử với tốc độ 5 mm/s để đạt được thời gian lưu trú 1 s (ví dụ: thiết bị đưa bản mỏng vào rãnh chứa dung dịch thuốc thử theo phương thẳng đứng, từ cao xuống thấp với tốc độ 5 mm/s). Sau đó, bản mỏng được làm khô theo chỉ dẫn (nhiệt độ, thời gian sấy) như trong chuyên luận riêng.

Quan sát sắc ký đồ: Quan sát các vết xuất hiện dưới ánh sáng trắng (ánh sáng thường, ánh sáng ban ngày), ánh sáng có bước sóng 254 nm hoặc 366 nm trước và/hoặc sau khi phun thuốc thử hiện màu. Khi hình ảnh sắc ký đồ đã được ghi lại bằng kỹ thuật số thích hợp (chụp ảnh, quét phổ,...), thời gian quan sát sẽ được điều chỉnh dựa trên các vết thu được từ dung dịch kiểm tra tính phù hợp hệ thống.

Kiểm tra tính phù hợp hệ thống

Yêu cầu chung về tính phù hợp của hệ thống là đường dung môi và các vết trên sắc ký đồ sau khi khai triển phải song song với mép trên nằm ngang của tấm sắc ký. Hơn nữa, để kiểm tra tính phù hợp hệ thống đối với độ phân giải, màu sắc, vị trí các vết trên sắc ký đồ thì hai hay nhiều chất đánh dấu (chất điểm chỉ) sẽ được chọn sao cho các chất này có bản chất tương tự nhau nhưng có hệ số di chuyển - giá trị R_f khác nhau (có thể tách biệt) trong điều kiện sắc ký quy định. Ví dụ: acid chlorogenic (màu xanh dương) và hyperosid (màu vàng cam) thường được dùng trong hệ sắc ký tách các flavonoid. Tính phù hợp hệ thống phải thực hiện trong mỗi lần phân tích.

Kết quả sắc ký đối với dung dịch thử và dung dịch đối chiếu chỉ có giá trị khi phép thử tính phù hợp hệ thống đáp ứng yêu cầu chỉ ra trong chuyên luận riêng.

Đánh giá kết quả

So sánh vị trí, màu sắc, độ đậm của vết trên sắc ký đồ thu được từ dung dịch thử và dung dịch đối chiếu theo yêu cầu trong chuyên luận riêng. Mức độ đánh giá về độ đậm của các vết như sau:

- Nếu không có yêu cầu đánh giá cụ thể về mức độ đậm của vết sắc ký thì các vết trên sắc ký đồ thu được từ dung dịch thử được cho là “tương đương” khi có độ đậm tương tự vết trên sắc ký đồ thu được từ dung dịch đối chiếu (R).
- Các vết trên sắc ký đồ thu được từ dung dịch thử được cho là “đậm” khi có độ đậm lớn hơn độ đậm của vết trên sắc ký đồ thu được từ dung dịch đối chiếu (R).
- Các vết trên sắc ký đồ thu được từ dung dịch thử được cho là “nhạt” khi có độ đậm kém hơn độ đậm của vết trên sắc ký đồ thu được từ dung dịch đối chiếu (R) nhưng tương đương hoặc đậm hơn với độ đậm của vết trên sắc ký đồ thu được từ dung dịch đối chiếu đã pha loãng (R1/4; R1/20,...).
- Các vết trên sắc ký đồ thu được từ dung dịch thử được cho là “rất nhạt” khi có độ đậm kém hơn độ đậm của vết trên sắc ký đồ thu được từ dung dịch đối chiếu đã pha loãng (R1/4; R1/20,...).