**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Аффинная хроматография** |  | **ОФС.1.2.1.2.0009** |
| **[** |  | **Взамен ОФС.1.2.1.2.0009.18** |

|  |
| --- |
|  |

[Свободная строка, 1 интервал]

Аффинная хроматография является методом очистки и разделения биомолекул из смесей, основанным на высокоспецифичном взаимодействии между биомолекулой и другим веществом (лигандом), ковалентно связанным с инертным носителем. При этом используются следующие типы связывающего взаимодействия:

- антиген-антитело;

- фермент-субстрат;

- фермент-ингибитор;

- фермент-кофактор;

- гормон-рецептор;

- белок-белок;

- белок-полисахарид;

- белок-металл;

- нуклеотид-нуклеотид.

Аффинная хроматография отличается от других хроматографических методов высокой селективностью и разрешающей способностью разделения определяемой молекулы и посторонних примесей, хотя родственные примеси этим методом обычно отделить нельзя.

**Область применения**

Данный метод предназначен для разделения, определения и очистки белков, пептидов, нуклеотидов и полисахаридов.

**Основы метода**

В основе аффинной хроматографии лежит взаимодействие определяемого вещества из смеси с лигандом или рецептором, связанным с инертным носителем, образующими неподвижную фазу. Главной особенностью аффинной хроматографии является высокая специфичность лиганда, иммобилизованного на носителе, к определяемому веществу, или так называемая аффинность.

Существует несколько разновидностей метода аффинной хроматографии таких, например, как колоночная аффинная хроматография, мембранная аффинная хроматография и тонкослойная аффинная хроматография.

***Колоночная аффинная хроматография.*** Обычно идёт в 3 этапа:

1) сорбция определяемого вещества или группы веществ на носителе путём их реакции с иммобилизованным на носителе лигандом;

2) промежуточная промывка сорбента для удаления неспецифически связанных компонентов;

3) десорбция исследуемого компонента смеси с носителя.

Для первого этапа подбирают такие условия (состав буферного раствора, pH, ионная сила буферного раствора, температура), которые являются наиболее благоприятными для взаимодействия аффинной пары. После освобождения носителя от неспецифически связанных компонентов проводят десорбцию определяемого вещества. Это обычно достигается с помощью повышения ионной силы буферного раствора, повышением или понижением его pH, добавлением различных органических растворителей или введением в буферный раствор различных хаотропных агентов. Также можно проводить десорбцию раствором конкурирующего лиганда или хелатирующего агента. Иногда для более эффективного разделения соединений со схожими физико-химическими свойствами используют линейный градиент pH, ионной силы или содержания органического растворителя.

***Мембранная аффинная хроматография.*** Состоит из тех же этапов, что и колоночная аффинная хроматография, при этом основным преимуществом мембранной хроматографии является большая динамическая ёмкость. В мембранной аффинной хроматографии вместо колонки с сорбентом используют фильтрационный элемент с иммобилизованным на нём специфическим лигандом. Кроме того, в мембранном варианте резко возрастает скорость очистки при близкой к колоночной хроматографии эффективности.

***Тонкослойная аффинная хроматография.*** Представляет собой вариант тонкослойной хроматографии, при котором на пластинку иммобилизован специфический лиганд.

**Оборудование**

В колоночной аффинной хроматографии используют стандартное оборудование для колоночной хроматографии. Набор необходимых узлов системы обычно включает в себя хроматографическую колонку, насос, систему ввода пробы, систему детектирования, систему сбора и обработки данных. Возможно использование коллектора фракций и градиентного смесителя.

***Неподвижная фаза.*** Неподвижная фаза аффинной хроматографии представляет собой специально синтезированный сорбент, состоящий из инертного носителя, соединённого со специфическим лигандом (возможно использование «спейсера» для сшивки). В качестве инертного носителя используют модифицированную агарозу или другие носители. Ёмкость носителя можно выразить содержанием лиганда на единицу массы носителя, которое обычно составляет 1–15 мкмоль/г. Лиганд и его связь с матрицей должны быть достаточно стабильны в установленных хроматографических условиях (температура, pH, ионная сила).

***Подвижная фаза.*** Подвижная фаза (элюент) аффинной хроматографии представляет собой жидкость, инертную по отношению к неподвижной фазе и определяемому веществу. Подвижная фаза должна обладать низкой вязкостью и быть совместимой с используемыми методами детектирования. В качестве подвижной фазы обычно используют буферные растворы с различными значениями pH, состав элюента подбирается в зависимости от условий хроматографирования. Чаще всего, из-за сильного удерживания компонентов смеси сорбентом, необходимо использовать ступенчатый или линейный градиент элюирования.

**Методика**

Методика проведения колоночной аффинной хроматографии аналогична методике любой колоночной хроматографии. Прежде всего, подготавливают хроматографическую колонку. Для этого осуществляют заполнение колонки сорбентом суспензионным методом. После этого колонку обязательно уравновешивают. Затем в колонку под давлением подают элюент. Проба может вводиться как фронтальным методом, так и через специальный дозирующий кран с известным объёмом петли. После сорбции аналита на колонке инициируется стадия элюирования, во время которой на выходе из колонки раствор элюента с разделёнными определяемыми компонентами проходит через детектор. В качестве детектора возможно использование любой детектирующей системы для колоночной жидкостной хроматографии, позволяющей детектировать определяемую молекулу и примеси (ОФС «Хроматография», ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»). Возможно проведение постколоночной дериватизации для увеличения чувствительности детектирования. Результаты хроматографирования регистрируются с помощью компьютерной системы сбора и обработки данных или самописца. Для сбора проб возможно использование коллектора фракций, подключённого к хроматографической системе.

Вновь заполненная колонка, особенно аналитическая, должна быть протестирована на эффективность разделения и допустимую асимметрию пиков.

Перечень условий хроматографирования, подлежащих указанию

В фармакопейной статье должны быть приведены:

- состав подвижной фазы и способ её приготовления;

- приготовление стандартных и испытуемых растворов.

- параметры колонки (длина и внутренний диаметр), мембраны (площадь, рабочий объём мембранного сорбента, максимальное рабочее давление, материал носителя) или пластинки;

- тип сорбента с указанием иммобилизованного лиганда;

- температура колонки,

- скорость подачи подвижной фазы,

- объём вводимой пробы (объём петли);

- тип детектора и условия детектирования (при необходимости параметры используемой ячейки детектора);

- время хроматографирования,

- условия элюирования, при необходимости, в градиентном режиме, включая стадию переуравновешивания к исходным условиям.