МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Эксклюзионная хроматография** |  | **ОФС.1.2.1.2.0007** |
|  |  | **Взамен ОФС.1.2.1.2.0007.18** |

|  |
| --- |
|  |

Эксклюзионная хроматография (гель-хроматография) – это метод хроматографии, позволяющий разделять молекулы в растворе в соответствии с их размерами в диапазоне молекулярных масс от 102 до 108.

**Область применения**

Эксклюзионную хроматографию применяют для разделения смесей, компоненты которых различают по молекулярной массе, например, в лекарственных средствах белковой природы, а также может быть использована для определения молекулярной массы веществ и её распределения путём сравнения с соответствующими стандартными веществами для калибровки.

**Метод**

В эксклюзионной хроматографии неподвижная фаза (НП) остаётся инертной и с разделяемыми веществами не взаимодействует, в отличие от адсорбционной хроматографии. В зависимости от природы подвижной фазы эксклюзионную хроматографию подразделяют на две разновидности. При использовании органической подвижной фазы метод называют гель-проникающей хроматографией, при использовании водной подвижной фазы – гель-фильтрационной хроматографией.

Образец вносится в колонку, заполненную гелем или пористыми частицами НП, и проходит её вместе с подвижной фазой. Разделение происходит благодаря многократному обмену молекул компонентов образца между подвижной фазой, протекающей в пространстве между частицами НП (в межгранульном объёме) и подвижной фазой, находящейся в порах частиц.

Диапазон размеров разделяемых молекул определяется диапазоном размеров пор НП. Высокомолекулярные вещества, размер которых превышает максимальный размер пор, мигрируют только между частицами НП, не задерживаясь, и элюируются объёмом подвижной фазы, равным межгранульному объёму колонки (мёртвый объём, V0). Молекулы с наименьшей молекулярной массой свободно проходят в поры частиц НП вместе с молекулами растворителя, и, задерживаясь в порах, элюируются последними. Их объём удерживания равен общему свободному объёму колонки (Vt, или общий объём подвижной фазы, соответствующий объёму удерживания компонентов, размер молекул которых меньше, чем наименьшие поры сорбента и которым доступен весь объём пор сорбента). Элюирование разделяемых молекул происходит в диапазоне объёмов подвижной фазы между межгранульным (мёртвым) объёмом (V0) и общим свободным объёмом колонки (Vt). Этот диапазон объёмов представляет собой рабочий диапазон колонки – диапазон эксклюзии, где V0 соответствует верхнему пределу эксклюзии, а Vt – нижнему пределу эксклюзии. Наиболее селективное разделение происходит в первых двух третях этого диапазона.

***Определение относительного компонентного состава смесей.*** Разделение проводят по методике испытаний. Регистрируют хроматограмму и измеряют площадь или высоту соответствующих пиков. Содержание каждого компонента рассчитывают в соответствии с ОФС «Хроматография». Наиболее часто используют метод нормирования.

***Определение молекулярных масс соединений и молекулярно-массового распределения полимеров***

По стандартным образцам с известными значениями молекулярной массы, соответствующей максимуму хроматографического пика (Mмакс., MP), строят калибровочную кривую зависимости объёма или времени удерживания (х) от логарифма Mмакс. (y). Если диапазон молекулярных масс стандартных образцов входит в рабочий диапазон колонки, калибровочная кривая для данной колонки обычно аппроксимируется функцией первой степени (если калибровочный диапазон молекулярных масс узок) или полиномом третьей степени (для широкого калибровочного диапазона молекулярных масс). Используя калибровочную функцию с помощью специализированного программного обеспечения рассчитывают молекулярную массу испытуемого образца (Mмакс.), а также характеристики молекулярно-массового распределения (среднемассовую молекулярную массу (MW), среднечисловую молекулярную массу (Mn), «z-среднюю» молекулярную массу (MZ) и коэффициент полидисперсности Kd).

Следует учитывать, что значения времени или объёма удерживания анализируемых полимеров не характеризуются прямой связью с молекулярной массой исследуемого вещества и зависят от условий разделения (типа полимера, колонки и подвижной фазы). Фактически разделение обеспечивается за счёт разного гидродинамического объёма молекул образца, то есть разного размера молекул, имеющего определенную связь с молекулярной массой. Поэтому для корректного определения молекулярной массы и оценки молекулярно-массового распределения необходима точная калибровка хроматографической системы, выполненная в условиях анализа исследуемого образца. При этом природа стандартных образцов по возможности должна быть аналогична природе испытуемого вещества.

**Оборудование**

Оборудование для эксклюзионной хроматографии как варианта высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) принципиально не отличается от используемого в других видах ВЭЖХ (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»). Основное отличие заключается в применении хроматографических колонок, заполненных специализированными неподвижными фазами.

Из всех видов жидкостной хроматографии в эксклюзионной хроматографии наиболее жёсткие требования предъявляются к стабильности потока подвижной фазы. Поэтому при эксклюзионной хроматографии необходимо использовать насосные системы с точностью подачи подвижной фазы не хуже 0,3–0,5 %. Разделение в эксклюзионной хроматографии всегда изократическое.

Точность результатов в эксклюзионной хроматографии значительно зависит от температуры, поэтому, как правило, требуется термостатирование разделительной системы.

***Неподвижные фазы***

Неподвижные фазы для эксклюзионной хроматографии представляют собой полужёсткие или жёсткие гели или пористые частицы на основе поперечно-сшитой агарозы, декстрана, полимеров, таких как полиметакрилаты или полистирол-дивинилбензол, а также гидроксилированного силикагеля. [Главной характеристикой](http://chem21.info/info/830890) таких сорбентов являются размеры пор, определяющие [диапазон молекулярных масс](http://chem21.info/info/445171), которые [можно разделить](http://chem21.info/info/1520412) на данном сорбенте. Если анализируемая смесь содержит вещества, отличающиеся по молекулярной массе не более чем на 2–2,5 порядка, её обычно удаётся разделить на хроматографической колонке с одним номинальным размером пор неподвижной фазы. При более широком диапазоне молекулярных масс следует использовать единовременно несколько последовательно соединённых колонок, номинальные размеры пор, которых, различны. Кроме того, существуют колонки, неподвижная фаза которых состоит из смеси частиц одного размера, но с разными номинальными размерами пор, что обеспечивает линейную калибровочную зависимость в широком диапазоне молекулярных масс.

***Детекторы***

В эксклюзионной хроматографии используются следующие основные детекторы: рефрактометрический, спектрофотометрический и флуориметрический. Специально для анализа полимеров разработаны вискозиметрический детектор и детектор многоуглового лазерного светорассеяния, используемые в комбинации с рефрактометром или другим концентрационным детектором.

***Подвижная фаза***

Подвижную фазу выбирают исходя из свойств испытуемого образца, типа сорбента и условий детектирования.

Подвижные фазы для анализа водорастворимых соединений обычно представляют собой растворы неорганических солей таких как хлорид, нитрат или сульфат натрия иногда с добавкой антимикробного агента (например, азида натрия). Наличие соли в подвижной фазе необходимо для предотвращения нежелательных сорбционных эффектов.

***Оценка пригодности хроматографической системы***

Критерии оценки пригодности хроматографической системы, корректировки условий хроматографирования для достижения заявленных требований указаны в ОФС «Хроматография». В методике должны быть указаны дополнительные критерии связанные с оценкой пригодности калибровочной кривой, если это необходимо при определении молекулярной массы и молекулярно-массового распределения полимеров.

Разметка и интегрирование хроматограмм проводится в соответствии с ОФС «Хроматография».