

## ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

---

**Определение молекулярных параметров иммуноглобулинов методом ВЭЖХ**

ОФС.1.8.2.0006.15  
Вводится взамен метода, изложенного в ФС 42-3874-99

---

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), предназначенный для определения молекулярных параметров иммуноглобулинов. Механизм процесса эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии заключается в хроматографическом распределении молекул иммуноглобулинов в соответствии с их размером и молекулярными массами. Основные положения эксклюзионной ВЭЖХ указаны в ОФС «ВЭЖХ».

Метод эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии вводится взамен метода гель-фильтрации.

**Метод эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии**

Процесс эксклюзионной ВЭЖХ происходит в водной среде и называется гель-фильтрационным, в результате чего происходит распределение молекул иммуноглобулинов по их размеру в широком диапазоне молекулярных масс от 10 до 600 тыс.кДа. Особенностью метода эксклюзионной жидкостной ВЭЖХ является использование высокого

давления (до 400 бар) и мелкозернистых сорбентов (размером 3-5 мкм). Это позволяет быстро и полно разделять сложные смеси веществ.

Принципиальные основы метода заключаются в объеме эксклюзионной колонки, который можно выразить суммой трех слагаемых:

$$V_c = V_o + V_i + V_d,$$

где:  $V_o$  – свободный объем подвижной фазы;

$V_i$  – объем пор, заполненный подвижной фазой (объем неподвижной фазы);

$V_d$  – объем матрицы сорбента без учета пор.

Полный объем подвижной фазы колонки ( $V_t$ ) представляет собой сумму свободного объема подвижной фазы ( $V_o$ ) и объема неподвижной фазы  $V_i$ .

Удерживание молекул в эксклюзионной колонке определяется вероятностью их диффузии в поры и зависит в основном от соотношения размеров молекул и пор. Коэффициент распределения  $K_d$  представляет собой отношение концентраций вещества в неподвижной ( $C_1$ ) и подвижной фазах ( $C_o$ ):  $K_d = C_1/C_o$ . Время удерживания молекул иммуноглобулинов зависит от силы взаимодействия вещества с подвижной и неподвижной фазами.

Анализ иммуноглобулинов проводят в соответствии с методиками, изложенными в фармакопейных статьях или нормативной документации, с указанием следующих необходимых параметров: пробоподготовки исследуемого образца; приготовления стандартных образцов; приготовления подвижной фазы. При описании требуемых хроматографических условий необходимо указать:

- характеристику хроматографической колонки (ее марку (тип), размеры);
- диапазон разделения молекулярных масс;
- состав и название подвижной фазы;
- наименование носителя (сорбента);
- характеристику детектора;
- длину волны;

- объем вводимой пробы;
- температуру колонки;
- скорость потока подвижной фазы;
- последовательность (порядок) ввода проб;
- время хроматографирования.

В процессе разделения фракций иммуноглобулинов на хроматографической колонке белковые молекулы иммуноглобулина с молекулярной массой более 40 тыс кДа свободно проходят между гранулами носителя (сорбента), не попадая и не задерживаясь в пористых гранулах. Более мелкие молекулы частично попадают и задерживаются в гранулах и медленнее вымываются из них подвижной фазой. Очень мелкие молекулы с молекулярной массой менее 50 тыс кДа попадают в гранулы носителя и медленно вымываются подвижной фазой. Распределение по времени удерживания/выхода компонентов (фракций) иммуноглобулинов, о чем указывается в фармакопейных статьях или нормативной документации, происходит в порядке уменьшения их молекулярных масс: полимеры (агрегаты), димеры, мономеры Ig G (основная фракция сывороточного иммуноглобулина) и фрагменты Ig G.

Количественный анализ иммуноглобулинов состоит из следующих стадий: 1) хроматографическое разделение; 2) измерение площади и/или высоты пиков; 3) расчет количественного состава фракций иммуноглобулинов на основании хроматографических данных; 4) интерпретация полученных результатов (статистическая обработка данных).

Содержание компонентов (фракций) иммуноглобулинов вычисляется автоматически с помощью программного обеспечения счетно-аналитического прибора по площадям пиков и указывается в процентах. Процентное содержание определяемых компонентов иммуноглобулинов должно соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации.

Пригодность хроматографической системы оценивается по стандартным образцам. Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются условия, описанные в фармакопейной статье или нормативной документации: фактор разрешения (R) между пиками, эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику с указанием числа теоретических тарелок, относительное стандартное отклонение площадей пиков.

### ***Примечания***

1. Испытуемый раствор. Образцы иммуноглобулина перед анализом разводят, как указано в фармакопейной статье или нормативной документации.

2. Подвижная фаза. Подвижную фазу готовят в соответствии с методикой, изложенной в фармакопейной статье или нормативной документации.

3. Стандартные образцы:

- раствор для проверки пригодности хроматографической системы;
- маркеры для эксклюзионной ВЭЖХ с молекулярной массой в диапазоне от 10000 до 600000 Да. Приготовление маркеров осуществляют в соответствии с инструкцией по применению или как описано в методике, изложенной в фармакопейной статье или нормативной документации.