

2.2.39. МОЛЕКУЛЯРНО-МАСОВИЙ РОЗПОДІЛ ДЕКСТРАНІВ

Визначення проводять методом ексклюзійної хроматографії (2.2.30).

Випробовуваний розчин. 0,200 г субстанції розчиняють у рухомій фазі і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

Маркерний розчин. 5 мг глюкози *P* і 2 мг ФСЗ декстрану V_0 розчиняють в 1 мл рухомої фази.

Калібрувальні розчини. Наважку кожного із зазначених стандартних зразків: 15 мг ФСЗ декстрану 4 для калібрування, 15 мг ФСЗ декстрану 10 для калібрування, 20 мг ФСЗ декстрану 40 для калібрування, 20 мг ФСЗ декстрану 70 для калібрування і 20 мг ФСЗ декстрану 250 для калібрування окремо розчиняють в 1 мл рухомої фази.

Розчин для перевірки придатності хроматографічної системи. 20 мг ФСЗ декстрану 40 для перевірки придатності хроматографічної системи (для аналізу декстрану 40) або 20 мг ФСЗ декстрану 60/70 для перевірки придатності хроматографічної системи (для аналізу декстрану 60 і декстрану 70) розчиняють в 1 мл рухомої фази.

Хроматографування може бути проведене на хроматографі з диференціальним рефрактометричним детектором за таких умов:

- колонка \blacktriangleright розміром 0,3 м \times 10 мм \blacktriangleleft , заповнена агарозою для хроматографії поперечношитою *P*, або серія колонок розміром 0,3 м \times \blacktriangleright 7,5 \blacktriangleleft мм кожна, заповнені \blacktriangleright поліметакрилату гелем гідроксильованим *P* \blacktriangleleft ;
- рухома фаза: розчин 7 г натрію сульфату безводного *P* і 1 г хлорбутанолу *P* в \blacktriangleright 1000 мл води для хроматографії *P* \blacktriangleleft ;
- швидкість рухомої фази від 0,5 мл/хв до 1 мл/хв, підтримувана сталою з точністю ± 1 % за год;
- петльовий інжектор з об'ємом петлі від 100 мкл до 200 мкл;
- температура системи підтримується сталою з точністю $\pm 0,1$ °С.

КАЛІБРУВАННЯ ХРОМАТОГРАФІЧНОЇ СИСТЕМИ

Хроматографують кілька разів обраний об'єм маркерного розчину. На хроматограмі мають бути присутніми два піки: перший пік відповідає ФСЗ декстрану V_0 , другий пік відповідає глюкозі *P*. Виходячи з об'єму елюювання декстрану V_0 розраховують об'єм ексклюзії V_0 ; повний об'єм V_t розраховують за піком, відповідним глюкозі.

Хроматографують вибраний об'єм кожного з калібрувальних розчинів. Для кожної з одержаних хроматограм проводять базову лінію, звертаючи увагу на правильність визначення початку і кінця піка. Кожну хроматограму поділяють вертикальни-

ми рівновіддаленими лініями на *p* секцій (кількість не менше 60), що відповідають рівним об'ємам елюювання. Для кожної секції *i*, відповідної об'єму елюювання V_i , вимірюють висоту (y_i) від базової лінії до лінії хроматограми й обчислюють коефіцієнти розподілу (K_i) за формулою :

$$K_i = \frac{(V_i - V_0)}{(V_i - V_0)}, \quad (1)$$

де V_0 — об'єм ексклюзії, визначений за піком, відповідним ФСЗ декстрану V_0 на хроматограмі маркерного розчину;

V_t — повний об'єм колонки, визначений за піком, відповідним глюкозі на хроматограмі маркерного розчину;

V_i — об'єм елюювання для секції *i*, одержаний для хроматограм кожного з калібрувальних розчинів.

Калібрування проводять, використовуючи будь-який з таких методів.

Калібрування за калібрувальною прямою. За рівнянням (1) для кожного з декстранів для калібрування розраховують коефіцієнт розподілу K_{\max} , відповідний максимальній висоті лінії хроматограми. На напівлогарифмічному папері будують залежність значень K_{\max} (вісь абсцис) від молекулярної маси, зазначеної для максимальної висоти лінії хроматограми (M_{\max}) кожного з декстранів для калібрування і глюкози (вісь ординат). Через усі одержані точки проводять першу калібрувальну пряму, екстраполюючи її з точки K_{\max} , одержаної для ФСЗ декстрану 250 для калібрування, до більш низьких значень K , одержаних для цих стандартних зразків (див. Рис. 2.2.39.-1). Використовуючи одержану першу калібрувальну пряму, знаходять для всіх значень K_i для всіх хроматограм відповідні значення молекулярних мас M_i , одержуючи в такий спосіб калібрувальну залежність для розрахунку молекулярно-масового розподілу. Для всіх декстранів для калібрування розраховують середню молекулярну масу M_w за рівнянням (3), наведеним нижче. Калібрувальна пряма може бути використана для розрахунків, якщо обчислені значення M_w для кожного з декстранів для калібрування не відрізняються від зазначених у паспорті значень більше як на 5 % і усереднене відхилення для всіх декстранів не перевищує 3 %. Якщо дані вимоги не виконуються, калібрувальну пряму змішують уздовж осі ординат і повторюють вищеописані операції, поки розраховані та зазначені в паспорті значення M_w будуть відрізнятися не більше як на 5 %.