

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Определение белка

ОФС.1.2.3.0012.15

Взамен ст. ГФ XII, ч.1, ОФС 42-0053-07

Определение содержания белка проводят в лекарственных средствах, выделенных из природных источников или полученных биотехнологическими методами.

Для таких лекарственных средств могут использоваться модифицированные методики определения белка, указанные в фармакопейных статьях, в которых могут быть изменены рекомендуемые области концентраций белка и/или объемы испытуемого раствора и реактивов и некоторые другие условия в соответствии с индивидуальными свойствами определяемого компонента.

Колориметрические и некоторые спектрофотометрические методы требуют использования стандартного образца. В качестве стандартного образца белка используют: стандартный образец присутствующего в препарате белка, или бычий сывороточный альбумин, или сывороточный альбумин человека, высушенные перед испытанием до постоянной массы (стандартный образец и условия высушивания указывают в фармакопейной статье).

Для количественного определения белка используют спектрофотометрические, колориметрические и спектрофлуориметрические методы.

Метод 1 (Спектрофотометрический)

Метод основан на способности ароматических аминокислот (тирозина, триптофана и, в меньшей степени, фенилаланина), входящих в последовательность молекулы белка, поглощать ультрафиолетовый свет при длине волны около 280 нм.

Для растворения молекул белка используют различные растворители: воду, натрия хлорид раствор 0,9 %, различные буферные растворы и др.

При использовании буферного раствора для растворения молекул белка, имеющего высокое значение оптической плотности по отношению к воде, свидетельствует о присутствии в белковой молекуле интерферирующего вещества. Для устранения влияния интерферирующего вещества на результаты анализа следует использовать в качестве раствора сравнения вместо воды буферный раствор. Если интерферирующие вещества имеют высокую оптическую плотность, результаты анализа могут быть подвергнуты сомнению.

При низких концентрациях белок адсорбируется на стенках кюветы, что может приводить к заниженным результатам содержания белка в растворе. В этом случае испытуемый раствор препарата предварительно концентрируют или используют при приготовлении испытуемого раствора неионные детергенты.

Испытуемый раствор. Готовят раствор испытуемого вещества в буферном растворе, указанном в фармакопейной статье, с концентрацией белка от 0,2 мг/мл до 2,0 мг/мл.

Стандартный раствор. Готовят раствор соответствующего стандартного образца в том же буферном растворе и с той же концентрацией белка, что и в испытуемом растворе.

Методика. Испытуемый раствор, стандартный раствор и раствор сравнения выдерживают при одинаковой температуре. Температуру и время инкубации указывают в фармакопейной статье. Определяют оптические плотности испытуемого и стандартного растворов в кварцевых кюветах при

длине волны 280 нм, используя тот же буферный раствор в качестве раствора сравнения.

Для получения достоверных и точных результатов значения оптической плотности растворов должны удовлетворять требованиям линейности в интервале определяемых концентраций белка.

Для высокоочищенных белков концентрацию белка в растворе вычисляют с использованием удельного показателя поглощения.

Рассеяние света. Точность определения содержания белка в ультрафиолетовой области снижается, если белки в растворе существуют в виде частиц, сравнимых по размеру с длиной волны измеряемого света (250 – 300 нм). Рассеяние светового потока приводит к увеличению оптической плотности испытуемого раствора. При расчете оптической плотности испытуемого раствора при длине волны 280 нм, обусловленной рассеянием света, определение проводят при длинах волн 320 нм, 325 нм, 330 нм, 335 нм, 340 нм и 350 нм. Строят график зависимости десятичного логарифма (\lg) оптической плотности от \lg соответствующей длины волны. Экстраполируют кривую методом линейной регрессии для определения логарифма оптической плотности при длине волны 280 нм. Антилогарифм этого значения соответствует оптической плотности за счет рассеяния света. Для расчета истинного содержания белка в испытуемом растворе оптическую плотность раствора, полученную при 280 нм, корректируют, вычитая оптическую плотность, относящуюся к рассеянному свету.

Снизить эффект рассеянного света в опалесцирующих растворах можно фильтрованием через фильтр с размером пор 0,2 мкм, не адсорбирующим белок, или центрифугированием. Условия фильтрования и центрифугирования указывают в фармакопейной статье.

Расчеты. Концентрацию белка в испытуемом растворе (С) в мг/мл вычисляют по формуле:

$$C = C_0 \cdot A/A_0, \quad \text{где}$$

C_0 – концентрация белка в растворе стандартного образца, в мг/мл;

A и A_0 – скорректированные значения оптической плотности испытуемого раствора и раствора стандартного образца соответственно.

Метод 2 (Метод Лоури, колориметрический)

Метод основан на реакции белков с солями меди (II) в щелочном растворе и восстановлении фосфорномолибдено-вольфрамового реактива (реактив Фолина) с образованием окрашенных продуктов, интенсивность окраски которых определяют по оптической плотности при длине волны 750 нм. Реактив Фолина взаимодействует с остатками ароматических аминокислот белка, главным образом тирозина, а также триптофана и фенилаланина и, в меньшей степени, цистеина. Развитие окраски достигает максимума через 20 – 30 мин при комнатной температуре, в дальнейшем идет уменьшение ее интенсивности. Степень окрашивания зависит от природы белка. Поскольку различные виды белков могут давать цветные реакции различной интенсивности, испытуемый белок должен соответствовать стандартному образцу.

Определению мешают некоторые соли, тиоловые соединения, углеводы, липиды, неионные детергенты, органические растворители, комплексоны и некоторые другие соединения. Большинство мешающих веществ дает слабое окрашивание, однако применение некоторых детергентов приводит к значительному увеличению окраски. Высокая концентрация соли может являться причиной образования осадка. Для уменьшения влияния веществ, мешающих определению, проводят дополнительное разведение раствора, обеспечивающее концентрацию испытуемого белка на уровне, достаточном для проведения точных измерений, или осаждение белков растворами натрия дезоксихолата и трихлоруксусной кислоты.

Стандартные растворы. Растворяют соответствующий стандартный образец белка в буферном растворе, указанном в фармакопейной статье. Части полученного раствора разводят в том же буферном растворе для

получения не менее чем пяти стандартных растворов, имеющих концентрации белка, равномерно распределенные в интервале между 5 мкг/мл и 100 мкг/мл.

Испытуемый раствор. Готовят раствор испытуемого лекарственного средства в буферном растворе, указанном в фармакопейной статье, с концентрацией белка, находящейся в пределах интервала концентраций калибровочного графика.

Контрольный раствор. Используют буферный раствор, применяемый для приготовления стандартных и испытуемого растворов.

Метод А (без предварительного осаждения белка). К 1,0 мл каждого из стандартных растворов, испытуемого раствора и к 1,0 мл контрольного раствора, прибавляют по 5,0 мл реактива В. Содержимое пробирок перемешивают и оставляют на 10 – 30 мин при комнатной температуре. Затем в каждую пробирку прибавляют 0,5 мл реактива Фолина, разбавленного перед употреблением водой в 2 раза, быстро и тщательно перемешивают и оставляют на 30 мин при комнатной температуре. Измеряют оптическую плотность испытуемого и стандартных растворов на спектрофотометре при длине волны 750 нм (или указанной в фармакопейной статье), используя контрольный раствор в качестве раствора сравнения. Окраска остается стабильной в течение 2 часов. Допускается использование коммерческого реактива Фолина-Чокалтеу.

Зависимость оптической плотности от концентрации белка носит нелинейный характер, тем не менее, если интервал концентраций, используемых для построения калибровочного графика, небольшой, то она приближается к линейной. Строят зависимости оптических плотностей стандартных растворов от концентраций белка и используют линейную регрессию для построения калибровочной кривой. На основании калибровочной кривой и оптической плотности испытуемого раствора определяют концентрацию белка в испытуемом растворе.

Калибровочный график строят каждый раз при приготовлении новых реактивов или использовании другого спектрофотометра, но не реже 1 раза в 3 мес.

Примечания:

1. *Приготовление реактива А.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 2 г натрия карбоната, растворяют в 0,1 М растворе натрия гидроксида и доводят объем до метки этим же раствором, перемешивают.

Срок годности раствора 1 мес.

2. *Приготовление реактива Б.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,5 г меди сульфата, 1 г калия-натрия тартрата, растворяют в воде и доводят до метки.

Срок годности раствора: 2 мес.

3. *Приготовление реактива В.* Перед анализом смешивают 50,0 мл реактива А и 1,0 мл реактива Б.

Метод Б (с натрия додецилсульфатом). Определение проводят, как описано в методе А, но вместо 5 мл реактива В к растворам прибавляют по 1 мл щелочного реактива меди и по 0,5 мл разведенного реактива Фолина.

Примечания:

1. *Приготовление сульфатного реактива меди.* В мерной колбе вместимостью 100 мл растворяют в воде 0,2 г меди сульфата и 0,4 г натрия тартрата, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. В мерной колбе вместимостью 100 мл растворяют в воде 10 г натрия карбоната, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Медленно приливают раствор натрия карбоната к раствору меди сульфата при перемешивании. Раствор используют в течение 24 часов.

2. *Приготовление щелочного реактива меди.* 1 объем полученного раствора сульфатного реактива меди смешивают с 2 объемами 5 % раствора натрия додецилсульфата (50 г/л) и 1 объемом 3,2 % раствора натрия гидроксида (32 г/л).

Срок годности раствора: 2 недели при комнатной температуре.

3. *Приготовление разведенного реактива Фолина.* Смешивают 5 мл реактива Фолина с 55 мл воды.

Раствор хранят в банках темного стекла при комнатной температуре.

Метод В (с предварительным осаждением белка).

Методика. К 1,0 мл испытуемого раствора прибавляют 0,1 мл раствора натрия дезоксихолата. Раствор перемешивают на вихревой мешалке и

выдерживают при комнатной температуре в течение 10 мин. Прибавляют 0,1 мл 72 % раствора трихлоруксусной кислоты и перемешивают на вихревой мешалке. Осадок отделяют центрифугированием в течение 30 мин при 3000 g. Осторожно удаляют надосадочную жидкость, оставшийся осадок растворяют в 1 мл щелочного реактива меди. Далее поступают, как описано выше в методе Б.

При построении калибровочного графика стандартные растворы белка следует обрабатывать аналогичным способом.

В качестве раствора сравнения используют пробу, содержащую 0,1 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида, 0,9 мл воды, 5,0 мл реактива В и 0,5 мл разбавленного в 2 раза реактива Фолина.

Примечания:

1. Приготовление 0,15 % раствора натрия дезоксихолата. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,15 г натрия дезоксихолата и растворяют в воде. Объем раствора доводят до метки водой и тщательно перемешивают.

2. Приготовление 72 % раствора трихлоруксусной кислоты. В мерную колбу вместимостью 500 мл помещают 360 г трихлоруксусной кислоты и растворяют в воде. Объем раствора доводят до метки водой и тщательно перемешивают.

Срок годности 72 % раствора трихлоруксусной кислоты 1 мес.

Метод 3 (Метод Бредфорд, колориметрический)

Данный метод основан на смещении максимума поглощения оптической плотности красителя кислотного синего 90 (Кумасси бриллиантовый синий R-250) от 470 нм до 595 нм, наблюдаемой вследствие связывания белка с красителем. Краситель наиболее активно связывается с остатками аргинина и лизина белка, что может приводить к погрешности при количественном определении различных видов белков. Белок, используемый в качестве стандартного образца, должен быть таким же, как испытуемый белок.

Существует относительно небольшое влияние интерферирующих веществ, которого можно избежать, не используя детергенты и амфолиты в

испытуемом образце. Сильнощелочные образцы могут взаимодействовать с кислотным реактивом.

Стандартные растворы. Растворяют соответствующий стандартный образец белка в буферном растворе, указанном в фармакопейной статье. Части полученного раствора разводят в том же буферном растворе для получения не менее чем пяти стандартных растворов, имеющих концентрации белка, равномерно распределенные в интервале между 0,1 мг/мл и 1 мг/мл.

Испытуемый раствор. Готовят раствор испытуемого лекарственного средства в буферном растворе, указанном в фармакопейной статье, с концентрацией белка, находящейся в пределах интервала концентраций калибровочного графика.

Контрольный раствор. Используют буферный раствор, применяемый для приготовления стандартных и испытуемого растворов.

Методика. Прибавляют 5 мл реактива Бредфорд к 0,1 мл каждого стандартного раствора, испытуемого раствора и контрольного раствора. Тщательно перемешивают, переворачивая. Избегают образование пены, приводящей к плохой воспроизводимости. Выдерживают при комнатной температуре в течение 10 мин и измеряют оптические плотности стандартных растворов и испытуемого раствором на спектрофотометре при длине волны 595 нм, используя контрольный раствор в качестве раствора сравнения, содержащего растворитель и реактив Бредфорд. При определении не следует использовать кварцевые спектрофотометрические кюветы, поскольку краситель связывается с этими материалами. Окраска остается стабильной в течение 1 ч.

Зависимость оптической плотности от концентрации белка носит нелинейный характер, тем не менее, если интервал концентраций, используемых для построения калибровочного графика, небольшой, то она приближается к линейной. Строят зависимости оптических плотностей стандартных растворов от концентраций белка и используют линейную

регрессию для построения калибровочной кривой. На основании калибровочной кривой и оптической плотности испытуемого раствора определяют концентрацию белка в испытуемом растворе.

В нормативных документах допускается изменение объемов испытуемого раствора и реактива Бредфорд при соблюдении линейной зависимости оптической плотности от концентрации белка при построении калибровочного графика.

Калибровочный график строят каждый раз при приготовлении новых реактивов или использовании другого спектрофотометра, но не реже 1 раза в 3 мес.

Примечание:

Приготовление реактива Бредфорд. В мерную колбу вместимостью 500 мл помещают 0,05 г кислотного синего 90 (Кумасси бриллиантовый синий R-250), растворяют в 25 мл спирта 96%, прибавляют 50 мл фосфорной кислоты концентрированной, доводят объем раствора водой до метки и тщательно перемешивают. Фильтруют и хранят в банках темного стекла при комнатной температуре. Если при хранении выпадает осадок красителя, перед использованием реактив необходимо профильтровать.

Срок годности 2 недели.

Метод 4 (Метод с бицинхониновой кислотой, колориметрический)

Метод основан на восстановлении ионов меди Cu^{2+} до ионов меди Cu^{1+} при взаимодействии с остатками цистеина, цистина, триптофана, тирозина, пептидной связью белка и образовании окрашенного комплекса Cu^{+} с бицинхониновой кислотой (2,2'-бихинолин-4,4'-дикарбоновая кислота). Определению мешают восстанавливающие вещества: сахара, аскорбиновая кислота, тиоловые соединения, этилендиаминтетраацетат. Влияние мешающих веществ может быть минимизировано путем разведения, обеспечивающего концентрацию белка на уровне, достаточном для проведения точных измерений. В качестве альтернативы можно использовать методику осаждения белка, описанную в определении белка по методу Лоури. Поскольку интенсивность окраски образующегося комплекса зависит

от природы белка, белок стандартного образца должен быть тот же, что и в испытуемом образце.

Стандартные растворы. Соответствующий стандартный образец белка растворяют в буферном растворе, указанном в фармакопейной статье. Части полученного раствора разводят в том же буферном растворе для получения не менее чем пяти стандартных растворов, имеющих концентрации белка, равномерно распределенные в интервале между 10 мкг/мл и 1200 мкг/мл.

Испытуемый раствор. Готовят раствор испытуемого лекарственного средства в буферном растворе, указанном в фармакопейной статье, с концентрацией белка, находящейся в пределах интервала концентраций калибровочного графика.

Контрольный раствор. Используют буферный раствор, применяемый для приготовления стандартных и испытуемого растворов.

Методика. Прибавляют к 0,1 мл каждого стандартного раствора, испытуемого раствора и контрольного раствора 2,0 мл реактива медно-бицинониновой кислоты. Растворы выдерживают при температуре 37 °С в течение 30 мин, засекают время и охлаждают смесь до комнатной температуры. Через 60 мин после окончания инкубации при 37 °С измеряют оптические плотности стандартных растворов и испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 562 нм в кварцевых кюветах, используя контрольный раствор в качестве раствора сравнения.

Зависимость оптической плотности от концентрации белка носит нелинейный характер, тем не менее, если интервал концентраций, используемых для построения калибровочного графика, небольшой, то она приближается к линейной. Строят зависимости оптических плотностей стандартных растворов от концентраций белка и используют линейную регрессию для построения калибровочной кривой. На основании калибровочной кривой и оптической плотности испытуемого раствора определяют концентрацию белка в испытуемом растворе.

Примечания:

1. *Приготовление реактива бицинхониновой кислоты.* В мерную колбу вместимостью 1 л помещают 10 г динатриевой соли бицинхониновой кислоты, 20 г натрия карбоната моногидрата, 1,6 г натрия тартрата, 4 г натрия гидроксида, 9,5 г натрия гидрокарбоната, растворяют в воде. При необходимости значение рН полученного раствора доводят до 11,25 раствором натрия гидроксида 10 % или натрия гидрокарбоната 5 %. Доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

2. *Приготовление реактива медно-бицинхониновой кислоты.* Смешивают 1,0 мл 4 % раствора меди сульфата (40 г/л) и 50,0 мл реактива бицинхониновой кислоты.

Метод 5 (Колориметрический метод с биуретовым реактивом)

Метод основан на взаимодействии ионов двухвалентной меди с пептидными связями молекулы белка в щелочной среде с образованием окрашенного комплекса, оптическая плотность которого измеряется при длине волны 540 нм. Этот метод показывает минимальные различия между равными количествами иммуноглобулиновых и альбуминовых белков.

Метод не рекомендован для проведения реакции в растворах, содержащих соли аммония, а также для мутных или образующих осадок растворов. Для устранения влияния мешающих веществ проводят осаждение белка из раствора испытуемого образца следующим образом: к 1 объему раствора испытуемого образца прибавляют 0,1 объем 50 % раствора трихлоруксусной кислоты, перемешивают на вихревой мешалке и выдерживают при комнатной температуре в течение 10 мин, центрифугируют при 3000 g в течение 30 мин. Удаляют надосадочную жидкость и растворяют осадок в небольшом объеме 0,5 М раствора натрия гидроксида. Полученный раствор используют для приготовления испытуемого раствора.

При построении калибровочного графика стандартные растворы белка следует обрабатывать аналогичным способом.

Стандартные растворы. Если иное не указано в фармакопейной статье, растворяют соответствующий стандартный образец белка в 0,9 %

растворе натрия хлорида. Части полученного раствора разводят 0,9 % раствором натрия хлорида для получения не менее трех стандартных растворов с концентрациями в интервале от 2 мг/мл до 10 мг/мл.

Испытуемый раствор. Готовят раствор испытуемого лекарственного средства в 0,9 % растворе натрия хлорида с концентрацией белка, находящейся в пределах интервала концентраций стандартных растворов.

Контрольный раствор. Используют 0,9 % раствор натрия хлорида.

Методика. К 1,0 мл испытуемого раствора, каждого из стандартных растворов и контрольного раствора прибавляют 4,0 мл биуретового реактива, перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 30 мин. Измеряют оптическую плотность испытуемого и стандартных растворов при длине волны 540 нм, используя контрольный раствор в качестве раствора сравнения (или указанной в фармакопейной статье, в пределах 540 – 650 нм).

Зависимость оптической плотности от концентрации белка носит нелинейный характер. Однако в небольшом интервале концентраций, используемых для построения калибровочного графика, она приближается к линейной. Строят график зависимости оптических плотностей стандартных растворов от концентраций белка и используют линейную регрессию для построения калибровочной кривой. На основании калибровочной кривой и оптической плотности испытуемого раствора определяют концентрацию белка в испытуемом растворе.

Калибровочный график строят каждый раз при приготовлении новых реактивов или использовании другого спектрофотометра, но не реже 1 раза в 3 мес.

Примечание:

Приготовление 50 % раствора трихлоруксусной кислоты. В мерную колбу вместимостью 500 мл помещают 250 г трихлоруксусной кислоты и растворяют в воде. Объем раствора доводят до метки водой и тщательно перемешивают.

Срок годности 50 % раствора трихлоруксусной кислоты 1 мес.

Метод 6 (Флуорометрический метод с о-фталальдегидом)

Метод основан на дериватизации белка о-фталальдегидом, который реагирует с первичными аминогруппами белка (N-концевая аминокислота и ε-аминогруппа остатков лизина) с последующим измерением флуоресценции полученного комплекса. Чувствительность количественного определения может быть увеличена гидролизом белка перед добавлением о-фталальдегида. Гидролиз делает α-аминогруппу, входящую в структуру аминокислот, доступной для взаимодействия с фталальдегидным реактивом. Метод является высокочувствительным и требует небольшого количества белка.

Определению мешают буферные растворы, содержащие первичные амины, такие как трис(гидроксиметил)аминометан, и аминокислоты, которые взаимодействуют с о-фталальдегидом. Аммиак в больших концентрациях также взаимодействует с о-фталальдегидом. Флуоресценция, полученная при взаимодействии аминов с о-фталальдегидом, может быть нестабильной. Использование автоматизированных методик для стандартизации данного метода позволяет повысить точность и воспроизводимость определения.

Стандартные растворы. Растворяют соответствующий стандартный образец белка в 0,9 % растворе натрия хлорида. Части полученного раствора разводят 0,9 % раствором натрия хлорида для получения не менее пяти стандартных растворов с концентрациями в интервале от 10 мкг/мл до 200 мкг/мл. Доводят значение рН раствора до 8,0 - 10,5 перед добавлением фталальдегидного реактива.

Испытуемый раствор. Готовят раствор испытуемого лекарственного средства в 0,9 % растворе натрия хлорида с концентрацией белка, находящейся в пределах интервала концентраций стандартных растворов. Доводят значение рН раствора до 8,0-10,5 перед добавлением фталальдегидного реактива.

Контрольный раствор. Используют 0,9 % раствор натрия хлорида.

Методика. Смешивают 10 мкл испытуемого раствора, каждого из стандартных растворов и контрольного раствора с 0,1 мл фталальдегидного реактива и выдерживают при комнатной температуре в течении 15 мин. Прибавляют 3 мл 0,5 М раствора натрия гидроксида и перемешивают. Определяют интенсивность флуоресценции испытуемого раствора и каждого из стандартных растворов при длине волны возбуждения 340 нм и длине волны испускания между 440 нм и 455 нм, используя контрольный раствор в качестве раствора сравнения. Измеряют интенсивность флуоресценции указанных растворов только один раз, поскольку излучение снижает интенсивность флуоресценции.

Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации белка носит линейный характер. Строят график зависимости интенсивностей флуоресценции стандартных растворов от концентраций белка и используют линейную регрессию для построения калибровочной кривой. На основании калибровочной кривой и интенсивности флуоресценции испытуемого раствора определяют концентрацию белка в испытуемом растворе.

Калибровочный график строят каждый раз при приготовлении новых реактивов или использовании другого спектрофлуориметра, но не реже 1 раза в 3 мес.

Примечания:

Приготовление боратного буферного раствора. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 61,83 г борной кислоты и растворяют в воде и доводят рН до значения 10,4 при помощи раствора калия гидроксида. Объем раствора доводят до метки водой и тщательно перемешивают.

Приготовление исходного раствора фталальдегида. 1,20 г фталальдегида растворяют в 1,5 мл метанола, прибавляют 100 мл боратного буферного раствора и перемешивают. Прибавляют 0,6 мл 30 % раствора макрогол 23 лаурилового эфира (300 г/л) и перемешивают.

Хранят при комнатной температуре и используют в течение 3 недель.

Приготовление фталальдегидного реактива. К 5 мл исходного раствора фталальдегида прибавляют 15 мкл 2-меркаптоэтанола. Раствор следует готовить не менее чем за 30 мин перед использованием.

Используют в течение 24 часов.

Метод 7 (Определение белка по содержанию азота)

Определение белка по содержанию азота основано на том, что содержание азота в большинстве белков практически одинаково и может быть принято равным 16 %. По количеству найденного азота во взятой пробе рассчитывают содержание белка в лекарственном средстве, используя коэффициент пересчета азота на белок, равный 6,25.

На результаты определения будут оказывать влияние другие азотсодержащие вещества, присутствующие в испытуемом образце.

Методика определения белка по содержанию азота основана на разложении испытуемого образца в ходе проведения анализа, но не лимитирована содержанием белка в водной среде. При нагревании азотсодержащего органического соединения с серной кислотой концентрированной, азот превращается в аммония сульфат, который можно определить количественно.

Метод А (Метод Кьельдаля)

Определение проводят в соответствии с требованиями, указанными в ОФС «Определение азота в органических соединениях» (метод 2 – микрометод Кьельдаля) из точной навески препарата, содержащей 10 – 20 мг белка. После минерализации азотсодержащего органического соединения с серной кислотой концентрированной азот превращается в аммония сульфат, который можно определить количественно.

Метод Б

Большинство приборов для определения азота используют пиролиз, то есть сжигание образца в кислороде при температуре приблизительно 1000 °С, в ходе которого выделяется азота монооксид (NO) и другие оксиды азота (NO_x), из азота присутствующего в испытуемом веществе. Некоторые приборы преобразуют оксиды азота в азот, который количественно определяется с помощью детектора по теплопроводности. В других приборах азота монооксид (NO) смешивается с озоном (O₃) для получения азота диоксида (NO₂^{*}) в возбужденном состоянии, испускающего свет при распаде,

который может быть количественно определен с помощью хемилюминесцентного детектора. Для оптимизации навески и параметров пиролиза и обеспечения стабильности показателей при проведении анализа используется стандартный образец соответствующей чистоты и подходящий по составу с исследуемому белку.

Расчеты. Концентрацию белка рассчитывают путем деления содержания азота в испытуемом образце на известное содержание азота в исследуемом белке. Известное содержание азота в белке можно определить исходя из химического состава белка или путем сравнения с подходящим стандартным образцом.