

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Определение белкового азота

ОФС.1.7.2.0026.15

с реактивом Несслера

с предварительным осаждением

белкового материала в

иммунобиологических

лекарственных препаратах

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья предназначена для определения белкового азота в иммунобиологических лекарственных препаратах (ИЛП). Метод основан на свойстве реактива Несслера давать цветную реакцию с ионами аммония, образующимися после минерализации белковых продуктов.

Для количественного определения содержания белкового азота используются колориметрические методы:

- метод с предварительным осаждением белковых компонентов с использованием трихлоруксусной кислоты (ТХУ), рекомендуемый для определения белкового азота в вирусных вакцинах, анатоксинах и инфекционных аллергенах (методы А и В).

- метод с предварительным осаждением белковых компонентов с использованием фосфорновольфрамовой кислоты, рекомендуемый для определения белкового азота в неинфекционных аллергенах.

Метод с использованием трихлоруксусной кислоты для определения содержания белкового азота от 0,01 до 0,4 мг/мл (метод А)

В центрифужную пробирку вместимостью 10 мл вносят необходимое

количество испытуемого образца (А), прибавляют раствор ТХУ до конечной концентрации 10 % и перемешивают (табл.).

Таблица – Соотношение содержания белкового азота, объема анализируемого образца, реагента и минерализата для колориметрирования

Содержание белкового азота в анализируемом образце, мг/мл	Объем анализируемого образца (А), мл	Трихлоруксусная кислота		Объем минерализата (В), мл
		объем, мл	исходная концентрация, %	
0,010-0,016	5	0,72	80	2,0
0,016-0,030	3	0,43	80	2,0
0,030-0,050	3	0,43	80	1,0
0,050-0,080	2	2,00	20	1,0
0,080-0,200	1	1,00	20	1,0
0,200-0,400	1	1,00	20	0,5

Пробу оставляют на 18–20 ч при температуре 4–8 °С. Образовавшийся осадок отделяют от надосадочной жидкости центрифугированием при 2000 об/мин при температуре 4–6 °С в течение 30 мин. Далее осадок промывают 1 мл 10 % раствора ТХУ и вновь центрифугируют в аналогичных условиях. К осадку прибавляют 0,1 мл серной кислоты концентрированной. Пробирку закрывают стеклянным колпачком и минерализуют на песочной бане при температуре 190–210 °С. Одновременно в аналогичных условиях минерализуют контрольную пробу, содержащую 0,1 мл серной кислоты концентрированной. Для ускорения минерализации используют водорода пероксид, который периодически добавляют по 1 – 2 капли в предварительно охлажденную пробирку. Минерализацию продолжают не менее 10 ч до обесцвечивания содержимого пробирки. К полученному минерализату добавляют 9,9 мл воды очищенной и перемешивают.

В химическую пробирку вносят необходимое количество минерализата (В) (табл.), содержащего 8–20 мкг азота, доводят объем раствора до 9,5 мл водой очищенной, перемешивают, прибавляют 0,5 мл реактива Несслера и вновь перемешивают.

Измеряют оптическую плотность испытуемого и калибровочных растворов при 400 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм по сравнению с контрольным раствором, приготовленным аналогичным образом из контрольной пробы.

Одновременно с испытуемым образцом для подтверждения правильности методики проводят анализ стандартного образца (СО) «Содержание белкового азота». Анализ проводят при каждом определении.

Построение калибровочного графика. В химические пробирки вносят 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 мл стандартного раствора № 2 (0,05 мг/мл аммония сульфата), доводят объем растворов водой очищенной до 9,5 мл, перемешивают (содержание азота 5; 10; 15; 20; 25 мкг соответственно), прибавляют по 0,5 мл реактива Несслера и вновь перемешивают. Измеряют оптическую плотность, как указано выше. В качестве контрольного раствора используют 9,5 мл воды очищенной и 0,5 мл реактива Несслера. Строят калибровочный график, откладывая по оси абсцисс количество белкового азота (мкг), а по оси ординат - среднее значение оптической плотности.

Калибровочный график воспроизводят при каждом анализе.

Содержание белкового азота (X , мг/мл) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{a \cdot 10}{A \cdot B \cdot 1000} = \frac{a}{A \cdot B \cdot 100}$$

где: a – количество азота, рассчитанное по калибровочному графику, мкг;

A – объем анализируемого образца, мл;

B – объем минерализата, мл;

1000 – перевод мкг в мг;

10 – разведение минерализата.

Содержание белка по белковому азоту (Y , мг/мл) вычисляют по формуле:

$$Y = X \cdot 6,25,$$

где: X – содержание белкового азота, мг/мл;

6,25 – коэффициент пересчета белкового азота на белок.

Содержание белкового азота, полученное по методу А, должно составлять от 0,01 до 0,4 мг/мл.

Примечания.

1. Испытуемый раствор. 1, 2, 3 или 5 мл раствора испытуемого образца (согласно Таблице 1) (содержание белкового азота в анализируемой пробе должно быть 0,08 – 0,4 мг).

2. Основной стандартный раствор аммония сульфата 0,1 мг/мл (раствор №1). В мерной колбе вместимостью 500 мл в воде очищенной растворяют 0,2357 г аммония сульфата, доведенного до постоянной массы в эксикаторе над безводным кальция хлоридом, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Основной раствор хранят при температуре 4 – 8°С в колбе с притертой пробкой в течение 1 года.

3. Стандартный раствор аммония сульфата 0,05 мг/мл (раствор №2). В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 50 мл раствора №1, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор хранят при температуре 4-8°С в колбе с притертой пробкой в течение 3 мес.

4. Стандартный образец (СО) «Содержание белкового азота».

5. Приготовление 80 % раствора ТХУ. Растворяют 150 г ТХУ в 100 мл воды очищенной. После этого 1 мл раствора титруют 1М раствором натрия гидроксида (индикатор - фенолфталеин).

Концентрацию ТХУ (X) в % в анализируемом растворе рассчитывают по формуле:

$$X = a \cdot 0,1634 \cdot 100 = a \cdot 16,34,$$

где: а – количество 1М раствора натрия гидроксида, израсходованное на титрование испытуемого образца, мл;

0,1634 – количество ТХУ, соответствующее 1 мл 1М раствора натрия гидроксида, г.

Концентрация ТХУ должна быть 80 – 90 %.

Раствор ТХУ разводят до концентрации 80 % и хранят в емкости из темного стекла в течение 6 мес. (растворы ТХУ меньших концентраций готовят соответствующим разведением 80 % раствора). Перед каждым использованием раствора ТХУ проводят проверочное определение ее процентной концентрации.

Метод с использованием кислоты трихлоруксусной для определения содержания белкового азота от 2,5 до 10 мкг/мл (метод В)

В центрифужную пробирку емкостью 10 мл вносят 5 мл испытуемого образца, прибавляют 0,72 мл 80 % раствора ТХУ и перемешивают. Далее проводят минерализацию испытуемого образца по методу А. Одновременно

в аналогичных условиях минерализуют контрольную пробу, содержащую 0,1 мл серной кислоты концентрированной. Объем минерализата доводят до 5 мл водой очищенной и перемешивают. Отбирают в пробирку 1 мл полученного раствора, доводят объем раствора водой очищенной до 9,5 мл, перемешивают, прибавляют 0,5 мл реактива Несслера и вновь перемешивают. Измеряют оптическую плотность испытуемого и калибровочных растворов при длине волны 400 нм в кюветах с толщиной слоя 20 мм по сравнению с контрольным раствором, приготовленным аналогичным образом из контрольной пробы.

Содержание белкового азота (X) в мг/мл вычисляют по формуле:

$$X = \frac{a \cdot 5^a}{5^b \cdot 1 \cdot 1000} = \frac{a}{1000},$$

где: a – количество азота, рассчитанное по калибровочному графику, мкг;

5^a – разведение минерализата, мл;

5^b – объем испытуемого образца, взятый на минерализацию, мл;

1 – объем минерализата, взятый на колориметрирование, мл;

1000 – перевод в миллиграммы.

Построение калибровочного графика. В химические пробирки вносят 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 мл стандартного раствора №3 (содержание белкового азота 2; 4; 6; 8; 10; 12 мкг соответственно), доводят объем раствора водой очищенной до 9,5 мл, перемешивают, прибавляют по 0,5 мл реактива Несслера и вновь перемешивают. В качестве контрольного раствора используют 9,5 мл воды очищенной и 0,5 мл реактива Несслера. Измеряют оптическую плотность растворов, как указано выше. Строят калибровочный график, откладывая по оси абсцисс количество белкового азота (мкг), а по оси ординат - среднее значение оптической плотности.

Калибровочный график воспроизводят при каждом анализе.

Содержание белкового азота, полученное по методу В, должно составлять от 2,5 до 10 мкг/мл.

Примечания.

1. Основной стандартный раствор аммония сульфата 0,1 мг/мл (раствор №1). Приготовление указано в методе А.

2. Стандартный раствор аммония сульфата 0,02 мг/мл (раствор №3). В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 20 мл раствора №1, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор хранят при температуре 4-8°C в колбе с притертой пробкой в течение 3 мес.

3. Приготовление 80 % растворТХУ. Приготовление указано в методе А.

Метод определения белкового азота с использованием фосфорновольфрамовой кислоты

Определение проводят по ОФС «Определение белка» (метод В) с использованием фосфорновольфрамовой кислоты.

Содержание белкового азота в неинфекционных аллергенах должно быть от 0,01 до 0,4 мг/мл.

Построение калибровочного графика аналогично изложенному в методе А.

Одновременно с испытуемым образцом для подтверждения правильности методики проводят анализ стандартного образца (СО) «Содержание белкового азота в неинфекционных аллергенах». Анализ проводят при каждом определении.

Примечание.

Стандартный образец (СО) «Содержание белкового азота в неинфекционных аллергенах». Определение проводят в соответствии с инструкцией по применению.