

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Определение однородности

ОФС.1.8.2.0009.15

лекарственных препаратов

из сыворотки крови человека

и животных методом

электрофореза на плёнках

из ацетата целлюлозы

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы, который предназначен для определения однородности (идентичности) иммунобиологических лекарственных препаратов (иммуноглобулинов). Метод основан на различной скорости перемещения белков в электрическом поле в зависимости от соотношения основных и кислотных групп белка, рН, ионной силы буферного раствора, величины заряда и молекулярной массы частиц.

Белки движутся в электрическом поле со скоростью, пропорциональной их суммарному заряду. Белки, имеющие суммарный отрицательный заряд, движутся к аноду (+), а положительно заряженные – к катоду (-). По скорости движения в электрическом поле белки делятся на 5 основных фракций: альбумины, α_1 -глобулины, α_2 -глобулины, β -глобулины и γ -глобулины. Наименьшей скоростью продвижения обладают γ -глобулины (молекулярная масса 150-160 тыс. кДа); они практически остаются на линии старта, т.к. их заряд близок к нейтральному. Альбумины обладают выраженным отрицательным зарядом и меньшей молекулярной массой (67-70 тыс. кДа), поэтому в электрическом поле они движутся с наибольшей скоростью и в результате обнаруживаются дальше других

белковых фракций от линии старта. С меньшей скоростью, чем альбумины, в электрическом поле перемещаются α_1 -, α_2 - и β -глобулины.

Электрофорез на пленках из ацетата целлюлозы

На увлажнённую плёнку из ацетата целлюлозы размером 90x90 мм, заправленную в специальную рамку, наносят 2-4 мкл исследуемых образцов (5 образцов в 2-х параллельных определениях) и для идентификации контрольный образец – сыворотка для контроля качества электрофоретического разделения белковых фракций. Определение проводят в 2-х параллельных определениях. Предварительно в электродные секции камеры (аппарат для электрофореза на плёнках из ацетата целлюлозы) наливают барбиталовый буферный раствор (рН 8,4). Вместо барбиталового буферного раствора можно использовать любой подходящий коммерческий буферный раствор с указанным значением рН.

Рамку с пленкой из ацетата целлюлозы помещают в разделительную камеру, закрывают крышкой, включают источник питания (сила тока 8-10 мА, напряжение 100-129 В). Разделение проводят в течение 30-40 мин. После проведения электрофореза снимают крышку разделительной камеры, не допуская попадания конденсационной воды на пленку. Рамку с плёнкой извлекают из камеры, избегая контакта с участками, где происходил электрофорез испытуемых образцов. Пленку достают из рамки пинцетом и дают подсохнуть на воздухе. Затем плёнку обрезают с обоих концов (около 2,5 мм), помещают в кювету с 50 мл раствора красителя и выдерживают в течение не более 5 мин (контакт с красителем в течение более длительного времени может деформировать плёнку). Плёнку вынимают из кюветы и после стекания избыточной жидкости помещают на 5 мин поочередно в 3 кюветы, со 100 мл отмывочной жидкости (для ускорения процесса отмывки кювету покачивают). После отмывки фон плёнки должен приобрести бледно-голубое окрашивание или стать почти прозрачным. Далее плёнку тщательно промывают водой, помещают между листами фильтровальной бумаги и слегка промокают.

Идентификацию белковых фракций проводят путём сравнения электрофореграммы испытуемых образцов с электрофореграммой контрольной сыворотки для контроля качества электрофоретического разделения белковых фракций. Сыворотка должна разделиться не менее, чем на 5 фракций: альбумин, α 1- и α 2-глобулины, β -глобулин и γ -глобулин. После проведения электрофореза проводят количественное определение фракций иммуноглобулина путём извлечения краски из плёнки элюирующим раствором с последующим колориметрированием или путём денситометрии электрофореграмм.

Количественное определение фракций иммуноглобулина

Колориметрическое определение. Извлечение краски каждой фракции проводят в 3 мл элюирующего раствора с 2-х параллельных электрофореграмм. Элюцию проводят в течение 40 мин при многократном встряхивании. Оптическую плотность полученного элюата измеряют на спектрофотометре при длине волны 620 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм по отношению к элюату неокрашенного участка электрофореграммы. Сумму оптических плотностей всех белковых фракций принимают за 100 % и рассчитывают процентное содержание каждой фракции препарата иммуноглобулина.

Денситометрическое определение. Электрофореграммы исследуемых образцов высушивают между листами фильтровальной бумаги в полиэтиленовом пакете (такие условия высушивания исключают деформацию плёнки). Высушенные плёнки просветляют вазелиновым маслом, пропитывая их таким образом, чтобы в плёнке не остались пузырьки воздуха. Для этого плёнку следует держать горизонтально и нижней поверхностью осторожно касаться масла. Избыток вазелинового масла удаляют, промокая плёнку между листами фильтровальной бумаги.

Фракции иммуноглобулина записываются денситометром в виде пиков. Величина площади каждого пика пропорциональна количеству

краски, соединившейся с белком. С помощью автоматического интегратора площадь каждого пика вычисляют по формуле площади прямоугольника ($h \cdot d$, где h – максимальная высота пика, d – ширина пика). Сумма площадей всех пиков фракций иммуноглобулина принимается за 100 % и вычисляется процентное содержание каждой фракции в испытуемом препарате иммуноглобулина.

Примечания.

1. Подготовка плёнки из ацетата целлюлозы. Плёнку смачивают в барбиталовом буферном растворе и гладкой стороной помещают в кювету на поверхность буферного раствора на 2 мин, а затем пинцетом погружают на дно кюветы и выдерживают 5 мин. После этого плёнку вынимают пинцетом, избыток влаги удаляют между листами фильтровальной бумаги и заправляют в рамку, избегая неравномерного натяжения и провисания.

2. Подготовка испытуемых образцов. Испытуемые образцы предварительно обрабатывают 0,05% раствором красителя – бромфенолового синего, используемого для отслеживания продвижения и распределения белковых фракций препарата иммуноглобулина в процессе электрофореза. В пробирку типа Эппендорф помещают 100 мкл испытуемого образца и 10 мкл 0,05% раствора бромфенолового синего и перемешивают. Окрашенные испытуемые образцы в объеме 2-4 мкл помещают в каждую лунку лотка.

3. Приготовление барбиталового буферного раствора (рН 8,4)*. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 8,5 г натрия барбитала, растворяют в 600-700 мл воды очищенной, прибавляют 11 мл 1М раствора хлористоводородной кислоты, доводят объём раствора водой до метки и перемешивают.

*Вместо барбиталового буферного раствора можно использовать любой другой коммерческий буферный раствор с известным значением рН.

4. Приготовление 1 М раствора хлористоводородной кислоты. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 85 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, доводят объём раствора до метки и перемешивают.

5. Приготовление красителя. К 0,5 г амидочёрного 10 Б прибавляют 10 мл уксусной кислоты ледяной, 3 г трихлоруксусной кислоты и 90 мл этилового спирта и перемешивают. Для полного растворения краситель оставляют на 24 ч. Перед использованием раствор красителя перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр.

6. Приготовление раствора для отмывки электрофореграмм. В мерный цилиндр вместимостью 1000 мл помещают 40 мл уксусной кислоты ледяной, прибавляют 700 мл воды очищенной и перемешивают. Затем объем раствора доводят водой очищенной до метки и вновь перемешивают.

7. Приготовление элюирующего раствора. Смешивают 10 мл 1 М раствора натрия гидроксида с 1 мл 1 М раствора натрия эдетата (трилон Б).

Если условия проведения анализа и реагенты отличаются от приведенных в данной статье, они должны быть указаны в соответствующей фармакопейной статье или нормативной документации с изложением иной валидированной методики анализа.