

**ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

---

**Определение бычьего**

**ОФС.1.7.2.0020.15**

**сывороточного альбумина в**

**иммунобиологических лекарственных**

**препаратах методом ракетного**

**иммуноэлектрофореза**

**Вводится впервые**

---

Настоящая общая фармакопейная статья предназначена для определения бычьего сывороточного альбумина в иммунобиологических лекарственных препаратах (ИЛП). Определение содержания бычьего сывороточного альбумина (БСА) проводят методом ракетного иммуноэлектрофореза.

Метод основан на способности антигена мигрировать в электрическом поле в гель, содержащий антисыворотку; в результате реакции взаимодействия антигена с антисывороткой образуются линии преципитации в виде пиков (ракет), высота которых пропорциональна концентрации внесенного антигена.

**Метод ракетного иммуноэлектрофореза (РИЭФ)**

В химическую пробирку с 16 мл 1 % геля агарозы, расплавленного и охлажденного до температуры 56 °С прибавляют 16мкл сыворотки против БСА с титром 1:1000 или 32 мкл той же сыворотки с титром 1:500 или 80 мкл кроличьей диагностической сыворотки, преципитирующей белки сыворотки крови рогатого скота (анти-СРС), предназначенной для судебно-медицинских целей (титр антител 1:10000), и перемешивают, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации. Содержимое пробирки выливают на стеклянную пластинку размером 120×90

мм, помещенную на ровную горизонтальную поверхность; толщина слоя агарозного геля должна составлять  $(1,0 \pm 0,1)$  мм. После застывания геля агарозы пластинку накладывают на трафарет (рис. 1) и пробивают лунки стерильным пробойником диаметром 4 мм. Гель из лунок удаляют с помощью вакуумного насоса или стерильной иглы. После этого подготовленную пластинку помещают в прибор для горизонтального электрофореза.

В камеры прибора наливают 1,5 л электродного буферного раствора. Соединяют поверхность агарозного геля с буферным раствором с помощью 4-слойной фильтровальной бумаги размером 120×60 мм. Расстояние от края фильтровальной бумаги до лунок должно быть не менее 15 мм.

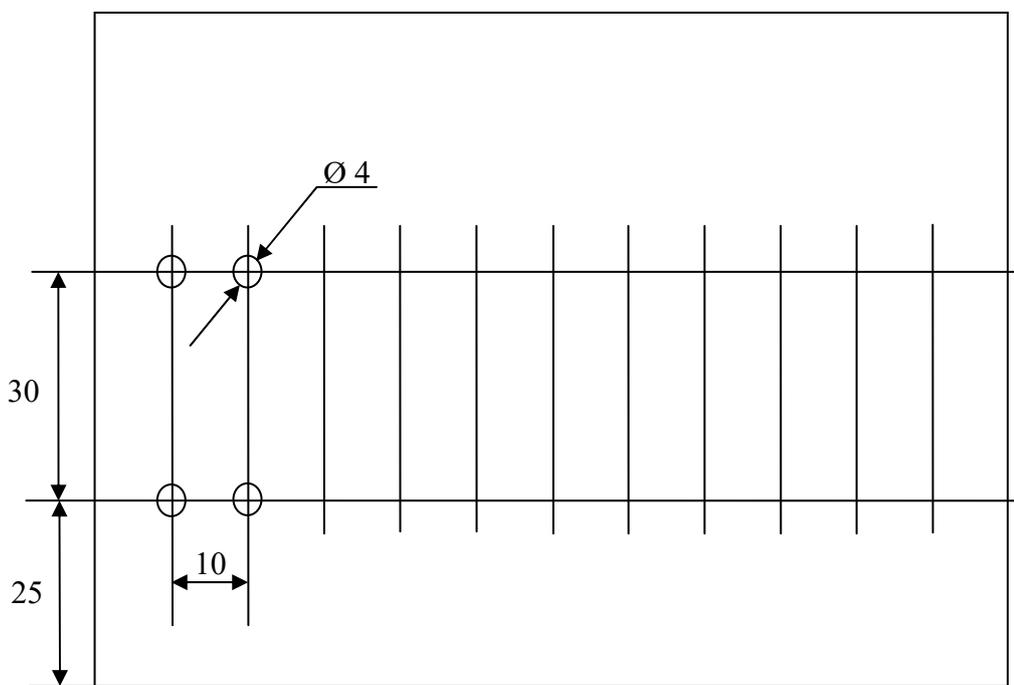


Рисунок 1—Трафарет для ракетного иммуноэлектрофореза  
(размеры указаны в мм)

В лунки агарозного геля вносят по 15 мкл испытуемого образца и стандартного образца «Содержания бычьего сывороточного альбумина для построения калибровочного графика». Испытуемый образец вносят в 2 лунки. При использовании анти-СРС сыворотки для выявления преципитата БСА из испытуемого образца готовят 2 пробы: одна содержит воду очищенную, а вторая – БСА в конечной концентрации 2 мкг/мл.

Время от начала внесения образцов до включения прибора не должно превышать 10 мин.

Условия проведения электрофореза: напряжение— 6 - 8 В на 1 см длины геля, сила тока—6 мА, время – 18–20 ч. По окончании электрофореза пластинку помещают в кювету с 0,9 % раствором натрия хлорида и дважды промывают в течение 3 ч. После этого пластинку вынимают, накрывают фильтровальной бумагой, предварительно смоченной водой, прокалывают иглой отверстия над лунками (для предотвращения растрескивания геля) и сушат при температуре 18–20 °С. После высушивания с пластинки удаляют фильтровальную бумагу путем смачивания водой и переносят в кювету с красителем на 15–20 мин. Затем окрашенную пластинку помещают в кювету с раствором для обесцвечивания окрашенных гелей и выдерживают до достижения необходимой контрастности между преципитатом и фоном. Далее пластинку промывают водой и сушат при температуре 18–20 °С. С помощью металлической линейки измеряют высоту пика (h), длина шкалы до  $(300 \pm 0,1)$  мм. Измерения делают от края лунки до максимума внешней высоты пика («ракеты») (рис. 2).

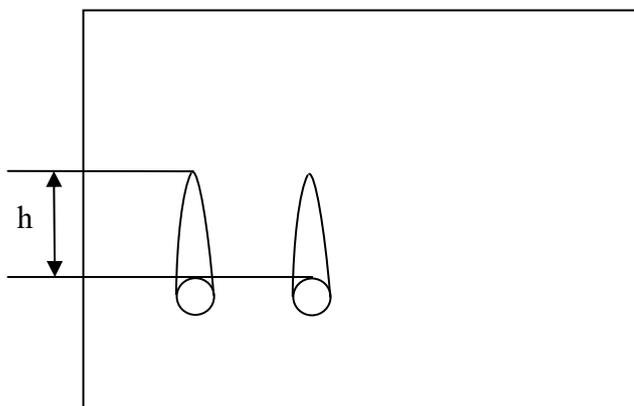


Рисунок 2. Измерение высоты пика «ракеты»

Содержание БСА в испытуемой пробе определяют по калибровочному графику. Оно должно находиться в диапазоне от 0,5 до 2,0 мкг/мл.

*Построение калибровочного графика.* СО «Содержания бычьего сывороточного альбумина для построения калибровочного графика» разводят в соответствии с инструкцией по применению до концентрации 2,0

мкг/мл. К 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 мл разведенного стандартного образца прибавляют воду до 0,4 мл (концентрация БСА – 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 мкг/мл соответственно). Строят калибровочный график, откладывая по оси абсцисс количество БСА в СО, в мкг/мл, а по оси ординат – высоту пика в мм. Калибровочный график должен проходить через начало координат.

Калибровочный график воспроизводят при каждом анализе.

Примечания.

1. Испытуемый образец – 15 мкл испытуемого образца.
2. Получение сыворотки против БСА. Кроликов породы Шиншилла массой 2,5–3,5 кг иммунизируют 0,15 % раствором БСА. Используют БСА с содержанием белка не менее 95 %.

Приготовление 0,15 % раствора БСА. 0,15 г БСА помещают в градуированный цилиндр вместимостью 100 мл, растворяют в 50 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

*I цикл иммунизации* состоит из 2 инъекций 0,15 % раствора БСА с интервалом 7 сут в дозе 1,0 мл в смеси с 1,0 мл адьюванта Фрейнда в область подколенных лимфатических узлов (последовательно в правую и левую лапу).

*II цикл иммунизации* проводят через 30 сут после I цикла: делают 5 внутрибрюшинных инъекций БСА с интервалом 2 сут в возрастающих дозах: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 мл (за 1 ч до первой инъекции проводится десенсибилизация – 0,1 мл 0,15% раствора БСА подкожно).

*III цикл иммунизации* проводят через 30 сут после цикла II иммунизации, и он состоит из 3 внутривенных инъекций с интервалом 2 сут в возрастающих объемах: 0,5; 1,0; 1,5 мл 0,15 % раствора БСА (за 1 ч до первой инъекции проводится десенсибилизация – 0,1 мл раствора БСА подкожно).

Через 7 сут после последнего введения БСА у кроликов берут 2–3 мл крови и в сыворотке определяют титр антител против БСА методом ракетного иммуноэлектрофореза (отмечают разведение сыворотки, дающее пик высотой 1 мм с раствором БСА в концентрации 0,5 мкг/кг). Сыворотка, имеющая титр не ниже 1:500, годна к дальнейшему использованию в этом случае кроликов обескровливают тотально.

Если титр сыворотки ниже 1:500, через 30 сут проводят *IV цикл иммунизации* (аналогичный третьему циклу), через 7 сут кроликов обескровливают тотально и устанавливают титр антител против БСА. Сыворотка, имеющая титр ниже 1:500, подлежит уничтожению.

При обескровливании кроликов кровь от каждого из них собирают в отдельный флакон. Флаконы с кровью ставят в термостат при температуре  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  на 60–65 мин, затем обводят образовавшийся сгусток пипеткой и оставляют при температуре 4 – 8  $^\circ\text{C}$  на 18–20 ч. После этого сыворотку

отбирают в стерильную посуду, прибавляют борную кислоту из расчета 20 – 25 мг на 100 мл сыворотки и разливают по 0,5 мл в ампулы из стекла НС-1. Ампулы запаивают и хранят при температуре минус 19–21 °С в течение 2 лет.

3. Приготовление концентрированного трис-боратного буферного раствора с натрия эдетатом (трилон Б) (рН 8,6 – 8,8). В мерном цилиндре вместимостью 1000 мл последовательно растворяют в воде очищенной 6,5 г трис(гидроксиметил)аминометана, 6,0 г натрия эдетата (трилон Б) и 19,0 г борной кислоты, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. При необходимости полученный раствор фильтруют через бумажный фильтр. Раствор хранят при температуре 2 – 8°С не более 3 мес.

4. Приготовление электродного буферного раствора (рН 8,6 – 8,8). К 300 мл концентрированного трис-боратного буферного раствора с натрия эдетатом (трилон Б) (рН 8,6 – 8,8) прибавляют 1200 мл воды очищенной и перемешивают. Раствор хранят при температуре 2 – 8 °С не более 1 мес при 4-кратном использовании.

5. Приготовление 1 % геля агарозы. В колбу вместимостью 100 мл помещают 1 г агарозы, прибавляют 80 мл воды очищенной и растворяют при нагревании на кипящей водяной бане, прибавляют 20 мл концентрированного трис-боратного буферного раствора с натрия эдетатом (трилон Б) и вновь нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Гель агарозы разливают по 16 мл в химические пробирки вместимостью 20 мл и хранят при температуре 4 – 8 °С не более 2 мес.

6. Приготовление красителя. 0,5 г кислотного синего 92 растворяют в растворе, состоящем из 10 мл уксусной кислоты ледяной, 45 мл 96 % раствора спирта этилового и 45 мл воды очищенной. Раствор перемешивают, фильтруют и хранят при комнатной температуре в течение 3 мес.

7. Приготовление раствора для обесцвечивания. К 200 мл уксусной кислоты ледяной прибавляют 500 мл 96 % раствора спирта этилового, 300 мл воды очищенной и перемешивают. Раствор хранят при комнатной температуре в течение 3 мес.

8. Подготовка стеклянных пластинок. На стеклянные пластинки размером 120 × 90 мм, обработанные хромовой смесью, наносят 1 мл 1 % расплавленного геля, растирают по поверхности пластинки с помощью стеклянной палочки и подсушивают. Подготовку стеклянных пластинок проводят непосредственно перед использованием.