

## ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

---

Определение белка

ОФС.1.7.2.0023.15

колориметрическим методом

(метод Лоури) в

иммунобиологических

лекарственных препаратах

Вводится впервые

---

Настоящая фармакопейная статья предназначена для определения белка колориметрическим методом (метод Лоури) в иммунобиологических лекарственных препаратах с использованием стандартного образца. Общие принципы метода, требования к стандартному, контрольному и испытываемому образцам изложены в ОФС «Определение белка».

Для определения белка в иммунобиологических лекарственных препаратах применяют следующие модификации метода Лоури:

- метод без предварительного осаждения белка (Метод I) для определения содержания белка от 0,04 до 0,16 мг/мл;
- метод с предварительным осаждением белка (Метод II) для определения содержания белка от 0,1 до 0,13 мг/мл;
- метод для сорбированных препаратов (Метод III) для определения содержания белка от 0,02 до 0,16 мг/мл;
- метод для сорбированных препаратов (Метод IV) для определения содержания белка от 0,01 до 0,02 мг/мл.

### **Метод I (без предварительного осаждения белка)**

Метод рекомендован для определения белка в химических вакцинах и иммунобиологических лекарственных препаратах (ИЛП), в составе которых отсутствуют компоненты, влияющие на результаты анализа.

Определение белка без предварительного осаждения проводят в соответствии с методикой, указанной в ОФС «Определение белка» (метод Лоури, метод А). В качестве контрольного раствора используют 1 мл воды очищенной или буферного раствора, указанного в фармакопейной статье или нормативной документации.

Содержание белка в препарате рассчитывают по калибровочному графику.

*Построение калибровочного графика.* К 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 мл стандартного раствора, добавляют воду очищенную до 1 мл (концентрация белка: 0,04; 0,08; 0,12; 0,16 мг/мл соответственно), перемешивают и далее проводят определение по методу А (без предварительного осаждения белка) в соответствии с ОФС «Определение белка» (Метод Лоури, метод А).

Строят калибровочный график, откладывая по оси абсцисс количество белка в мг, а по оси ординат – среднее значение оптической плотности. Калибровочный график воспроизводят при каждом анализе.

Примечания.

1. Испытуемый раствор. 1 мл испытуемого раствора, содержащий от 0,04 до 0,16 мг/мл белка.

2. Стандартный раствор\*. Стандартный образец (СО) с аттестованным значением содержания белка разводят до концентрации 0,2 мг/мл в соответствии с инструкцией по применению.

\*В случае отсутствия СО, стандартный раствор может быть приготовлен, как указано в ОФС «Определение белка».

### **Метод II (с предварительным осаждением белка)**

Метод рекомендован для ИЛП, содержащих компоненты, влияющие на результаты анализа (тиомерсал, ароматические аминокислоты, сахара и т.п.)

К 1 мл испытуемого раствора прибавляют 1 мл 20 % раствора трихлоруксусной кислоты и перемешивают на вихревой мешалке. Пробу выдерживают при температуре от 2 до 8 °С в течение 18 - 20 ч. Осадок отделяют центрифугированием при температуре 4 - 8 °С при 2000 об/мин в течение 30 мин, промывают 1 мл 10 % раствора трихлоруксусной кислоты и

центрифугируют в аналогичных условиях. Надосадочную жидкость удаляют, осадок растворяют в 0,2 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида, доводят объем раствора водой до 1 мл и перемешивают. К 0,5 мл полученного раствора прибавляют 0,5 мл воды очищенной, перемешивают на вихревой мешалке, прибавляют 5 мл реактива В, вновь перемешивают на вихревой мешалке и выдерживают при комнатной температуре в течение 10 мин. Далее анализ проводят по методу В в соответствии с ОФС «Определение белка» (метод Лоури, метод В).

#### Примечания.

1. Испытуемый раствор. 1 мл испытуемого раствора, содержащий от 0,1 до 0,13 мг/мл белка.
2. Приготовление реактива В указано в ОФС «Определение белка» (Метод Лоури, метод А).
3. Приготовление 10 % и 20 % растворов трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Растворы готовят соответствующим разведением 80 % раствора ТХУ.
4. Приготовление 80 % раствора (ТХУ). Растворяют 150 г ТХУ в 100 мл воды очищенной. Титруют 1 мл полученного раствора 1 М раствором натрия гидроксида, (индикатор фенолфталеин).

Концентрацию ТХУ (Х), выраженную в процентах, рассчитывают по формуле:

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

где: а - объем 1М раствора натрия гидроксида, пошедший на титрование испытуемого раствора, мл;

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

Раствор ТХУ разводят в соответствии с полученными данными до концентрации 80 %. Титр раствора проверяют не реже 1 раза в мес. При изменении установленной концентрации раствор готовят заново.

5. Приготовление фосфорномолибденово-вольфрамового реактива. Перед использованием 2 N фосфорномолибденово-вольфрамовый реактив (2 N коммерческий реактив Фолина) разводят в 2 раза водой очищенной или готовят реактив в соответствии с ОФС «Реактивы. Индикаторы».

#### **Метод III (для сорбированных препаратов с содержанием белка 0,02 - 0,16 мг/мл)**

В центрифужную пробирку отбирают 1 или 2 мл испытуемого раствора, тщательно перемешанного на вихревой мешалке, центрифугируют

при температуре 4-5 °С при 3500 об/мин в течение 30 мин. Надосадочную жидкость удаляют, осадок промывают 2 мл воды очищенной и вновь центрифугируют в тех же условиях, после чего надосадочную жидкость вновь сливают.

К осадку прибавляют 1 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида, перемешивают, выдерживают 30 мин при комнатной температуре, затем прибавляют 5 мл реактива В и снова перемешивают. Через 10 мин прибавляют 0,5 мл фосфорномолибденово-вольфрамового реактива. Смесь перемешивают и центрифугируют при температуре 4 - 5 °С при 3500 об/мин в течение 20 мин. Надосадочную жидкость сливают в пробирку и через 10 мин измеряют оптическую плотность по методике, указанной в ОФС «Определение белка» (метод Лоури, метод А).

В качестве контрольного раствора используют 1 или 2 мл воды очищенной или буферного раствора, указанного в фармакопейной статье или нормативной документации, прибавляют 1 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида, 5 мл реактива В и 0,5 мл фосфорномолибденово-вольфрамового реактива.

Содержания белка рассчитывают по калибровочному графику, как указано в методе I. Калибровочный график воспроизводят при каждом определении.

#### Примечания.

1. Испытуемый раствор. 1 мл испытуемого раствора, содержащего от 0,04 до 0,16 мг/мл белка или 2 мл испытуемого раствора, содержащего от 0,02 мг/мл до 0,04 мг/мл белка.
2. Приготовление стандартного раствора – указано в методе I.

#### **Метод IV (для сорбированных препаратов с содержанием белка 0,01 - 0,02 мг/мл)**

2 мл испытуемого раствора центрифугируют при 3500 об/мин при температуре 4 – 5 °С в течение 30 мин. Надосадочную жидкость удаляют,

осадок промывают 2 мл воды очищенной и центрифугируют в тех же условиях. Затем надосадочную жидкость вновь удаляют.

К осадку прибавляют 0,4 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида, перемешивают, выдерживают при комнатной температуре в течение 30 мин, затем прибавляют 2 мл реактива В и вновь перемешивают. Через 10 мин прибавляют 0,2 мл фосфорномолибденово-вольфрамового реактива. Смесь перемешивают и центрифугируют при температуре 4 – 5 °С при 3500 об/мин в течение 20 мин. Надосадочную жидкость сливают в пробирку и через 10 мин измеряют оптическую плотность по методике, указанной в ОФС «Определение белка» (метод Лоури, метод А).

В качестве контрольного раствора используют 2 мл воды очищенной или буферного раствора, указанного в фармакопейной статье или нормативной документации, прибавляют 0,4 мл 0,1М раствора натрия гидроксида, 2 мл реактива В и 0,2 мл фосфорномолибденово-вольфрамового реактива.

Содержание белка рассчитывают по калибровочному графику, как указано в методе I.

*Построение калибровочного графика.* К 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 мл, (концентрация белка: 0,02; 0,04; 0,06; 0,08 мг/мл соответственно) добавляют воду очищенную до объема 0,4 мл перемешивают, добавляют 2,0 мл фосфорномолибденово-вольфрамового реактива и вновь перемешивают. Далее определение проводят по методике, указанной в ОФС «Определение белка» (Метод Лоури, Метод А).

#### Примечания.

1. Испытуемый раствор. 2 мл испытуемого раствора с содержанием белка от 0,01 до 0,02 мг/мл.

2. Приготовление стандартного раствора указано в методе I. При определении белка в сорбированных препаратах в фармакопейной статье или в нормативной документации может быть указан коэффициент, учитывающий не полную десорбцию белка.

В случае, если в исходном препарате содержание белка выше, чем указано в методах I, II и III, его предварительно разводят до необходимой

концентрации. Способ разведения и растворитель указывают в нормативной документации. При вычислении конечного результата учитывают степень разведения.