

Общие фармакопейные статьи, включенные в первый том Государственной фармакопеи Республики Беларусь (второе издание) «Общие методы контроля качества лекарственных средств». Методы анализа (2.1–2.7)

УТВЕРЖДЕНО

Приказ
Министерства здравоохранения
Республики Беларусь
25.04.2012 № 453

Общие фармакопейные статьи, включенные в первый том Государственной фармакопеи Республики Беларусь (второе издание) «Общие методы контроля качества лекарственных средств»

2. МЕТОДЫ АНАЛИЗА

2.1. ОБОРУДОВАНИЕ

01/2013:20101

2.1.1. КАПЛЕМЕР

Термин «капли» обозначает стандартные капли, вытекающие из стандартного каплемера, как описано ниже.

Стандартные каплемеры (рисунок 2.1.1.-1) изготавливают из бесцветного стекла. Нижний конец имеет круглое отверстие, расположенное в плоскости, перпендикулярной оси.

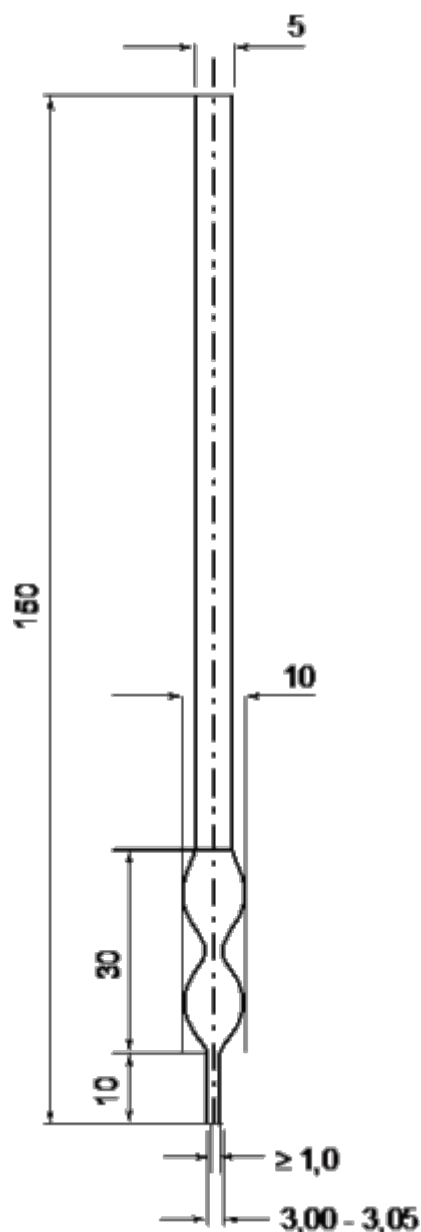


Рисунок 2.1.1.-1. Стандартный каплемер
(размеры указаны в миллиметрах)

Другие каплемеры [#](пипетки)[#] могут быть использованы, если они отвечают требованиям следующего теста.

20 капля *воды Р* при температуре $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$, свободно вытекающих из каплемера [#](пипетки)[#], удерживаемого в вертикальном положении, со скоростью одна капля в секунду, должны иметь массу (1000 ± 50) мг.

Каплемер [#](пипетки)[#] перед использованием должен быть тщательно вымыт. Проводят три определения для каждого каплемера [#](пипетки)[#]. Ни один из результатов не должен отклоняться более чем на 5 % от среднего значения трех определений.

01/2013:20102

2.1.2. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ТАБЛИЦА ПОРИСТОСТИ СТЕКЛЯННЫХ ФИЛЬТРОВ

Таблица 2.1.2.-1

Пористость фильтра (Ph. Eur.) ⁽¹⁾	Максимальный диаметр пор, мкм	Германия	Франция	Великобритания	#
1.6	менее 1,6	5f	—	—	ПОР 1,6
—	1–2,5	5		5	

–	1,6–3	–	–	–	ПОР 3,0
4	1,6–4	–	–	–	
–	4–6	–	5	–	
–	3–10	–	–	–	ПОР 10
10	4–10	4f	–	4	
16	10–16	4	4	–	ПОР 16
40	16–40	3	3	3	ПОР 40
–	40–50	–	–	2	
100	40–100	2	2	–	ПОР 100
–	100–120	–	–	1	
160	100–160	1	1	–	ПОР 160
–	150–200	0	0	–	
250	160–250	–	–	–	ПОР 250
–	200–500	–	00	–	
–	250–500	–	–	–	ПОР 500

⁽¹⁾ Европейская Фармакопея приняла систему, предложенную Международной организацией по стандартизации (ISO).

Возможно следующее применение фильтров (диаметр в микрометрах), пределы которых являются приблизительными:

- #< 1,6 – фильтрование коллоидных растворов;[#]
- #1,6–16 – фильтрование аморфных осадков;[#]
- < 2,5 – бактериологическое фильтрование;
- 4–10 – ультратонкое фильтрование, отделение микроорганизмов большого диаметра;
- 10–40 – аналитическое фильтрование, очень тонкое фильтрование ртути, очень тонкое диспергирование газов;
- #16–40 – фильтрование мелкокристаллических осадков;[#]
- 40–100 – тонкое фильтрование, фильтрование ртути, тонкое диспергирование газов;
- 100–160 – грубое фильтрование, диспергирование и промывка газов, использование в качестве подложки для других фильтрующих материалов;[#] фильтрование грубозернистых и студнеобразных осадков[#];
- 160–500 – очень грубое фильтрование частиц, диспергирование и промывка газов.

01/2013:20103

2.1.3. ЛАМПЫ С УЛЬТРАФИОЛЕТОВЫМ ИЗЛУЧЕНИЕМ ДЛЯ АНАЛИТИЧЕСКИХ ЦЕЛЕЙ

В качестве источника ультрафиолетового излучения используются пары ртути в кварцевых лампах. Для устранения испускаемой лампой видимой части спектра может использоваться подходящий фильтр. Если Фармакопея предписывает использование в испытании ультрафиолетовой лампы с длиной волны 254 нм или 365 нм, используют прибор, состоящий из лампы, содержащей пары ртути, и фильтра, дающего спектр излучения с максимальной интенсивностью около 254 нм или 365 нм. Используемая лампа должна позволять без затруднений обнаруживать стандартное пятно натрия салицилата диаметром около 5 мм на пластинке со слоем *силикагеля G P*, причем пятно должно исследоваться в положении, перпендикулярном к излучению лампы.

Для этой цели используют 5 мкл раствора 0,4 г/л *натрия салицилата P* в 96 % *спирте P* (спирт не должен флуоресцировать) для ламп с максимальным излучением 254 нм и 5 мкл раствора 2 г/л в 96 % *спирте P* для ламп с максимальным излучением 365 нм. Расстояние между лампой и хроматографической пластинкой, при проведении испытаний, указанных в общих и частных статьях, не должно превышать расстояния при проведении вышеуказанного испытания.

01/2013:20104

2.1.4. СИТА

Сита с квадратными отверстиями изготавливают из соответствующих материалов. Для неаналитических процедур могут быть использованы сита с круглыми отверстиями, диаметр которых в 1,25 раза превышает размер стороны квадратного отверстия сита соответствующего номера. Не должно быть взаимодействия между материалом, из которого изготовлено сито, и веществом, которое просеивают. Степень измельчения в частной статье указывают, используя номер сита, соответствующий номинальному размеру стороны отверстия в микрометрах, который приводится в скобках после названия вещества (таблица 2.1.4.-1).

Таблица 2.1.4.-1

Номер сита (номинальный размер отверстия, мкм)	Допуск для отверстия, мкм			Диаметр проволоки, мкм		
	Максимальный допуск для отверстия	Допуск для среднего значения размера отверстия	Промежуточный допуск	Рекомендованный номинальный диаметр	Допустимый предел	
	+X	±Y	+Z	d	d _{max}	d _{min}
11 200	770	350	560	2500	2900	2100
8000	600	250	430	2000	2300	1700
5600	470	180	320	1600	1900	1300
4000	370	130	250	1400	1700	1200
2800	290	90	190	1120	1300	950
2000	230	70	150	900	1040	770
1400	180	50	110	710	820	600
1000	140	30	90	560	640	480
710	112	25	69	450	520	380
500	89	18	54	315	360	270
355	72	13	43	224	260	190
250	58	9,9	34	160	190	130
180	47	7,6	27	125	150	106
125	38	5,8	22	90	104	77
90	32	4,6	18	63	72	54
63	26	3,7	15	45	52	38
45	22	3,1	13	32	37	27
38	–	–	–	30	35	24

Максимальный допуск (см. Международный Стандарт *ISO 3310/1(1975)*) для размера отверстия (+X): не должно быть отверстий, размер которых превышает номинальный размер более чем на величину X:

$$X = \frac{2(\omega^{0,75})}{3} + 4(\omega^{0,25}),$$

где:

ω – номинальный размер отверстия.

Допуск для среднего значения размера отверстия (±Y): средний размер отверстия не должен отклоняться от номинального размера более чем на величину ±Y:

$$Y = \frac{\omega^{0,98}}{27} + 1,6.$$

Промежуточный допуск (+Z): не более 6 % общего числа отверстий могут иметь размеры между «номинальный +X» и «номинальный +Z»:

$$Z = \frac{X+Y}{2}.$$

Диаметр проволоки d : диаметр проволоки, применяемой для плетения металлической проволочной ткани, вставленной в рамку, представлен в таблице 2.1.4.-1. Номинальный диаметр проволоки может отличаться от значения d внутри пределов $d_{\max}$ и $d_{\min}$. Пределы установлены в допустимом диапазоне $\pm 15\%$ от рекомендуемых номинальных размеров. Диаметр проволоки по всему ситу должен быть одинаковым.

01/2013:20105

2.1.5. ПРОБИРКИ ДЛЯ СРАВНИТЕЛЬНЫХ ИСПЫТАНИЙ

Пробирки, используемые для сравнительных испытаний, — это специально подобранные пробирки из бесцветного стекла с одинаковым внутренним диаметром и прозрачным плоским дном.

Слой жидкости исследуется сверху вниз по вертикальной оси пробирки на белом или, при необходимости, на черном фоне. Испытание проводят при рассеянном свете.

Обычно используются пробирки с внутренним диаметром 16 мм. Пробирки с большим внутренним диаметром могут быть использованы вместо вышеупомянутых при условии увеличения объема испытуемой жидкости на столько, чтобы высота жидкости в пробирках была не ниже, чем при аналогичном испытании с использованием жидкости в пробирках с внутренним диаметром 16 мм.

01/2013:20106

2.1.6. ИНДИКАТОРНЫЕ ТРУБКИ

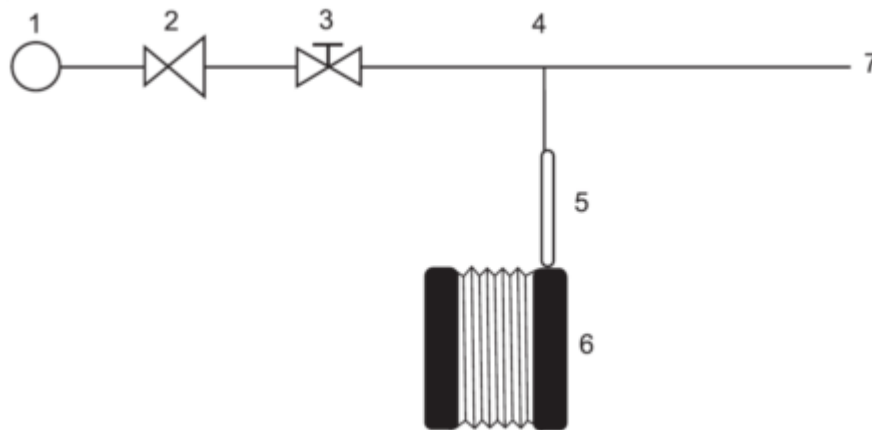
Индикаторные трубки — это герметизированные цилиндрические трубки, состоящие из инертного прозрачного материала и сконструированные с учетом возможности пропускания через них газа. Они содержат реагент, подходящий для визуализации обнаруживаемого вещества, адсорбированный на инертном носителе, и, при необходимости, очищающие слои и/или адсорбирующие фильтры для удаления веществ, которые могут взаимодействовать с обнаруживаемым веществом. Слой индикатора содержит либо один реагент, позволяющий обнаружить определенное вещество, либо несколько реагентов для обнаружения нескольких веществ (однослойные и многослойные трубки).

Испытания проводят путем пропускания требуемого объема газа через индикаторную трубку. Длина окрашенного слоя или интенсивность изменения цвета на градуировочной шкале является функцией и мерой массовой концентрации определяемого компонента.

Проверка индикаторных трубок проводится в соответствии с инструкциями изготовителя.

Подготовка к измерению. Проводится согласно инструкциям изготовителя или следующим образом. Устройство для подачи газа подсоединяют к регулятору давления с игольчатым клапаном. Соединяют гибкий шланг трубки с Y-частью клапана и продувают систему (рисунок 2.1.6.-1). Присоединяют открытый конец индикаторной трубки к короткому концу шланга и регулируют насосом объем анализируемого газа, проходящего через трубку. Записывают значения, соответствующие длине окрашенного слоя или интенсивности цвета на градуировочной шкале. При отрицательном результате анализа индикаторная трубка должна быть откалибрована газом, содержащим соответствующую примесь.

Ввиду использования в воздухозаборном устройстве масла необходимо проверить реакцию трубки на используемое масло. Информация о реакционной способности для различных масел приводится в сопроводительном листке, прилагаемом к трубке. Если используемое масло не указано в сопроводительном листке, изготовитель трубки должен проверить реакционную способность и при необходимости обеспечить прибор специальной трубкой для данного масла.



- 1 – подача газа; 2 – регулятор давления; 3 – игольчатый клапан;
 4 – «Y» конец; 5 – индикаторная трубка;
 6 – насос для индикаторной трубки;
 7 – открытый конец для выхода газа в атмосферу.

Рисунок 2.1.6.-1. Прибор для индикаторных трубок

Индикаторная трубка для диоксида углерода. Герметизированная стеклянная трубка, содержащая адсорбирующие фильтры и подходящие носители для индикаторов: гидразина и кристаллического фиолетового. Минимальная определяемая концентрация – 100 ppm с относительным стандартным отклонением $\pm 15\%$.

Индикаторная трубка для диоксида серы. Герметизированная стеклянная трубка, содержащая адсорбирующие фильтры и подходящие носители для индикаторов: йода и крахмала. Минимальная определяемая концентрация – 0,5 ppm с относительным стандартным отклонением $\pm 15\%$.

Индикаторная трубка для масел. Герметизированная стеклянная трубка, содержащая адсорбирующие фильтры и подходящие носители для индикатора – кислоты серной. Минимальная определяемая концентрация – $0,1 \text{ мг/м}^3$ с относительным стандартным отклонением $\pm 30\%$.

Индикаторная трубка для монооксида азота и диоксида азота. Герметизированная стеклянная трубка, содержащая адсорбирующие фильтры и подходящие носители для окисляющего слоя (соль Cr (VI)) и индикатора – дифенилбензидина. Минимальная определяемая концентрация – 0,5 ppm с относительным стандартным отклонением $\pm 15\%$.

Индикаторная трубка для монооксида углерода. Герметизированная стеклянная трубка, содержащая адсорбирующие фильтры и подходящие носители для индикаторов: йода (V) оксида, селена диоксида и кислоты серной дымящей. Минимальная определяемая концентрация – 5 ppm или менее с относительным стандартным отклонением $\pm 15\%$.

Индикаторная трубка для сероводорода. Герметизированная стеклянная трубка, содержащая адсорбирующие фильтры и подходящие носители для индикатора – соли свинца. Минимальная определяемая концентрация – 1 ppm или менее с относительным стандартным отклонением $\pm 10\%$.

Индикаторная трубка для паров воды. Герметизированная стеклянная трубка, содержащая адсорбирующие фильтры и подходящие носители для индикатора – перхлората магния. Минимальная определяемая концентрация – 67 ppm или менее с относительным стандартным отклонением $\pm 20\%$.

2.2. ФИЗИЧЕСКИЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

01/2013:20201

2.2.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЗРАЧНОСТИ И СТЕПЕНИ МУТНОСТИ ЖИДКОСТЕЙ

ВИЗУАЛЬНЫЙ МЕТОД

Для определения прозрачности и степени мутности жидкостей используют одинаковые пробирки из бесцветного, прозрачного и нейтрального стекла с плоским дном, которые имеют внутренний диаметр от 15 мм до 25 мм. Слой испытуемой жидкости толщиной 40 мм сравнивают с 40-миллиметровым слоем свежеприготовленного, как описано ниже, эталона. Сравнение растворов проводят при рассеянном дневном освещении через 5 минут после приготовления эталона, просматривая объекты вдоль вертикальной оси пробирок на черном фоне. Рассеянный свет должен быть таким, чтобы эталон I легко отличался от воды, а эталон II легко отличался от эталона I.

Прозрачными считаются жидкости, которые по прозрачности не отличаются от *воды Р* или раствора, который используют при приготовлении жидкости в описанных выше условиях, или которые не превышают по интенсивности мутность эталонной суспензии I.

Раствор гидразина сульфата. 1,0 г *гидразина сульфата Р* растворяют в *воде Р* и доводят *водой Р* до объема 100,0 мл. Раствор выдерживают в течение 4–6 ч.

Раствор гексаметилентетрамина. 2,5 г *гексаметилентетрамина Р* растворяют в 25,0 мл *воды Р* в колбе вместимостью 100 мл со стеклянной притертой пробкой.

Исходная опалесцирующая суспензия (суспензия формазина). 25,0 мл раствора гидразина сульфата прибавляют к приготовленному раствору гексаметилентетрамина, перемешивают и выдерживают в течение 24 ч. Суспензия стабильна в течение 2 месяцев при хранении в стеклянной посуде, которая не имеет дефектов поверхности. Суспензия не должна прилипать к стеклу и перед применением должна быть тщательно перемешана.

Основная опалесцирующая суспензия. 15,0 мл исходной опалесцирующей суспензии доводят *водой Р* до объема 1000,0 мл. Срок годности основной опалесцирующей суспензии 24 часа.

Эталоны. Приготовление эталонов проводят в соответствии с таблицей 2.2.1.-1. Основную опалесцирующую суспензию и *воду Р* смешивают и встряхивают перед применением.

Таблица 2.2.1.-1

	I	II	III	IV
Основная опалесцирующая суспензия, мл	5,0	10,0	30,0	50,0
<i>Вода Р</i> , мл	95,0	90,0	70,0	50,0

Эталон мутности. Суспензия формазина, приготовленная смешиванием равных объемов раствора гидразина сульфата и раствора гексаметилентетрамина, является исходной суспензией с 4000 *NTU* (*Nephelometric Turbidity Units* – нефелометрические единицы мутности). Эталоны I, II, III и IV имеют значения 3 *NTU*, 6 *NTU*, 18 *NTU* и 30 *NTU* соответственно. Стабилизированные суспензии формазина, пригодные для приготовления стабильных разведенных эталонов мутности, являются коммерчески доступными и могут быть использованы в случае, если выдерживают сравнение с эталонами, приготовленными, как указано выше.

Формазин обладает характеристиками, делающими его превосходным эталоном мутности. Он может быть воспроизводимо приготовлен из реактивов. Физические характеристики делают его желательным эталоном для градуировки светорассеяния. Полимер формазин состоит из цепей различной длины, которые принимают случайные конфигурации, что приводит к получению частиц с широким спектром форм и размеров, аналитически соответствующих частицам с различными размерами и формами, находящимся в испытуемых образцах. Благодаря трассируемости и воспроизводимости светорассеивающих свойств формазина инструментальные калибровочные алгоритмы и критерии выполнения по большей части основаны на этом стандарте.

ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ

ВВЕДЕНИЕ

Степень мутности раствора может быть определена с помощью инструментального измерения поглощения или рассеяния света за счет субмикроскопических неоднородностей оптической плотности опалесцирующих растворов и суспензий. На практике используются

2 метода: нефелометрия и турбидиметрия. Для измерения мутности окрашенных испытуемых образцов используют методы относительной турбидиметрии и нефелометрии с выбором отношения.

Эффект рассеяния света суспендированными частицами может быть измерен с помощью либо проходящего света (турбидиметрия), либо рассеянного света (нефелометрия). Относительная турбидиметрия сочетает принципы и нефелометрии, и турбидиметрии. Турбидиметрия и нефелометрия могут использоваться в случае со слегка опалесцирующими суспензиями. Условия приготовления эталона должны быть четко оговорены. Для количественных определений существенным является построение калибровочного графика, так как зависимость между оптическими свойствами суспензий и концентрации диспергированной фазы является в лучшем случае полуэмпирической.

Определение опалесценции окрашенных жидкостей проводят методом относительной турбидиметрии или нефелометрии с выбором отношения, так как окрашивание оказывает негативное воздействие, ослабляя как падающий, так и рассеянный свет, и уменьшает значение мутности. Эффект настолько велик, что даже в случае умеренно окрашенных образцов обычные нефелометры не могут быть использованы. Инструментальная оценка прозрачности и опалесценции является более селективным методом, который не зависит от остроты зрения аналитика. Числовые результаты более наглядны для мониторинга качества и контроля процесса, особенно в проверке стабильности при хранении. Например, предварительные числовые данные по стабильности могут быть использованы для определения возможности того, что данная партия лекарственного средства или активного фармацевтического ингредиента превысит предельное значение для срока годности до окончания срока хранения.

НЕФЕЛОМЕТРИЯ

При просматривании суспензии под определенным углом к направлению падающего света система кажется мутной вследствие отражения света от частичек суспензии (эффект Тиндаля). Определенная часть светового луча, попадающего в мутную жидкость, проходит через нее, другая часть поглощается, а оставшаяся часть рассеивается суспендированными частицами. Если измерение проводят под углом 90° к падающему лучу света, рассеянный суспендированными частицами свет может быть использован для определения их концентрации, обусловленной количеством и размерами частиц, влияющих на константу остаточного рассеяния. Эталон должен иметь постоянную степень мутности, а испытуемый образец и эталон должны быть приготовлены в идентичных условиях. Эффект Тиндаля зависит и от числа частиц, и от их размеров. Нефелометрические данные более достоверны при низкой мутности суспензий, когда наблюдается линейная зависимость между значением нефелометрической единицы мутности (*NTU*) и относительным сигналом детектора. При возрастании степени мутности падающий свет попадает не на все частицы, а рассеянное излучение других частиц поглощается на пути к детектору. Максимальное нефелометрическое значение, при котором может быть проведено достоверное измерение, находится в диапазоне 1750–2000 *NTU*. Для подтверждения линейности необходимо построение градуировочного графика как минимум по 4-м концентрациям.

ТУРБИДИМЕТРИЯ

Мутность – это оптическое свойство, возникающее при взаимодействии между светом и суспендированными в жидкости частицами. Это определение оптического свойства, обуславливающего то, что падающий свет в большей степени рассеивается или поглощается, чем проходит через испытуемый образец по прямой. Количество твердых частиц в суспензии может быть определено с помощью измерения интенсивности прошедшего света. Линейная зависимость между мутностью и концентрацией наблюдается в случае однородности и гомогенности размера частиц в суспензии. Это справедливо только для очень разведенных суспензий, содержащих маленькие частицы. Для подтверждения линейности необходимо построение градуировочного графика как минимум по 4-м концентрациям.

ОТНОСИТЕЛЬНАЯ ТУРБИДИМЕТРИЯ

В относительной турбидиметрии находится отношение интенсивности прошедшего света к интенсивности рассеянного света под углом 90° . Проведение такого испытания компенсирует влияние окрашивания испытуемого образца. Этого эффекта можно добиться также за счет использования инфракрасного светоиспускающего диода при длине волны 860 нм. Фотодиодные детекторы прибора получают и измеряют интенсивность рассеянного света под углом 90° , а также интенсивность рассеяния в прямом направлении (отраженный свет) перед испытуемым образцом и интенсивность света, прошедшего через испытуемый образец. Измеренные результаты в единицах *NTU* (отношение) рассчитываются делением интенсивности рассеянного света под углом 90° на сумму интенсивности рассеяния в прямом направлении и интенсивности прошедшего света. В относительной турбидиметрии влияние постороннего света становится незначительным. Нефелометры используют для измерения степени мутности бесцветных жидкостей.

Определение степени мутности эталонов I–IV с помощью относительной турбидиметрии показало, что зависимость между концентрациями и измеренными значениями *NTU* (таблица 2.2.1.-2) является линейной. Эталоны I–IV (ГФ РБ) могут быть использованы для градуировки прибора.

Таблица 2.2.1.-2

Суспензия формазина	Значение опалесценции (<i>NTU</i>)
Эталон I	3
Эталон II	6
Эталон III	18
Эталон IV	30
Основная опалесцирующая суспензия	60
Исходная опалесцирующая суспензия	4000

ИНСТРУМЕНТАЛЬНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПАЛЕСЦЕНЦИИ

Требования, приведенные в частных фармакопейных статьях, указаны в терминах для визуального определения степени мутности в сравнении с конкретным эталоном. Может быть использован также и инструментальный метод определения степени мутности при условии, что прибор соответствует требованиям, указанным ниже, и если проведена градуировка с использованием эталонов I–IV и *воды Р* или используемого растворителя.

Прибор. В качестве используемых источников света в приборах для относительной турбидиметрии или нефелометрах с выбором отношения используют вольфрамовую лампу со спектральной чувствительностью около 550 нм, работающую при температуре 2700 К, или инфракрасный светоиспускающий диод, имеющий максимум испускания при 860 нм со спектральной полосой пропускания 60 нм. Могут использоваться и другие подходящие источники света. В качестве детекторов, записывающих изменения в рассеянии или пропускании света испытуемым образцом, обычно используют кремниевые фотодиоды и фотоумножители. Рассеянный свет под углом $(90 \pm 2,5)^\circ$ регистрируется первичным детектором. Остальные детекторы регистрируют интенсивность рассеяния в прямом и в обратном направлениях. Используемые приборы градуируют с использованием эталонов с известной степенью мутности; кроме этого, приборы должны быть способны к автоматическому определению степени мутности. Результаты испытания, выраженные в *NTU*, считываются непосредственно с дисплея прибора и сравниваются со спецификацией, приведенной в частной фармакопейной статье.

Прибор считают пригодным, если он соответствует следующим техническим условиям.

– *Единицы измерения:* *NTU*. *NTU* основана на мутности первичного стандартного образца формазина. Также могут использоваться *FTU* (*Formazin Turbidity Units* – единицы мутности по формазину) или *FNU* (*Formazin Nephelometry Units* – формазинотические единицы), которые эквивалентны *NTU* при низких значениях (до 40 *NTU*). Эти единицы используются во всех трех инструментальных методах (нефелометрия, турбидиметрия и относительная турбидиметрия).

– *Диапазон измерений:* от 0,01 *NTU* до 1100 *NTU*.

– *Разрешение*: 0,01 NTU в диапазоне 0–10 NTU; 0,1 NTU в диапазоне 10–100 NTU; 1 NTU в диапазоне более 100 NTU. Прибор градуируют и контролируют с использованием эталонов формазина.

– *Точность*: в диапазоне 0–10 NTU: $\pm(2\% \text{ от показания прибора} + 0,01) \text{ NTU}$; в диапазоне 10–1000 NTU: $\pm 5\%$.

– *Повторяемость*: в диапазоне 1–10 NTU:

$\pm 0,01 \text{ NTU}$; в диапазоне 10–1000 NTU: $\pm 2\%$ от измеренного значения.

Градуировка: используют 4 эталона формазина в интересующем диапазоне. Могут быть использованы стандартные образцы, описанные выше, или подходящие стандартные образцы, откалиброванные по исходным суспензиям опалесценции.

– *Посторонний свет*: посторонний свет является существенным источником ошибок при низких значениях турбидиметрических измерений; посторонний свет попадает на оптическую систему детектора, но приходит не от испытуемого образца; менее 0,15 NTU в диапазоне 0–10 NTU, менее 0,5 NTU в диапазоне 10–1000 NTU.

Приборы, отвечающие требованиям, указанным выше, и поверенные с использованием эталонов, описанных в разделе «Визуальный метод», могут быть использованы для подтверждения соответствия требованиям частной фармакопейной статьи вместо визуального определения.

Могут быть использованы приборы с характеристиками (диапазоном измерения, разрешением, точностью, повторяемостью), отличными от указанных выше, при условии, что они полностью валидированы и подходят для предполагаемого использования. Для отдельных испытуемых фармацевтических субстанций/лекарственных средств для подтверждения возможности использования также должна быть валидирована методика испытания. Прибор и методология не должны противоречить свойствам испытуемого образца.

01/2013:20202

2.2.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕПЕНИ ОКРАШИВАНИЯ ЖИДКОСТЕЙ

Определение степени окрашивания жидкостей в ряду коричневый-желтый-красный проводят визуально путем сравнения с соответствующими эталонами (растворами сравнения) одним из двух описанных ниже методов настоящей статьи.

Раствор считается бесцветным, если он выдерживает сравнение с *водой P* или растворителем, или окрашен не более интенсивно, чем эталон В(К)₉.

[#]Степень окрашивания испытуемого раствора не должна превышать степени окрашивания соответствующего эталона, а цвет испытуемого раствора должен быть максимально приближен к цвету соответствующего эталона.[#]

МЕТОД I

2,0 мл испытуемой жидкости сравнивают с 2,0 мл *воды P*, растворителя или эталона (см. таблицы эталонов), описанного в настоящей статье, используя одинаковые пробирки из бесцветного, прозрачного, нейтрального стекла с внешним диаметром 12 мм. Сравнение окраски проводят при рассеянном дневном освещении, просматривая объекты горизонтально (перпендикулярно оси пробирок) на белом матовом фоне.

[#]По методу I обычно проводят сравнение окрашивания жидкостей с эталонами [В(К), ВУ(КЖ), Y(Ж), GY(ЗЖ), R(Kp)]₁₋₃[#]

МЕТОД II

40-миллиметровый слой испытуемой жидкости сравнивают с 40-миллиметровым слоем *воды P*, растворителя или эталона (см. таблицы эталонов), указанного в частной статье, используя одинаковые пробирки из бесцветного, прозрачного, нейтрального стекла с плоским дном, которые имеют внутренний диаметр от 15 мм до 25 мм. Сравнение окраски проводят при рассеянном дневном освещении, просматривая объекты вдоль вертикальной оси пробирок на белом фоне.

[#]По методу II обычно проводят сравнение окрашивания жидкостей с эталонами [В(К), ВУ(КЖ), У(Ж), ГУ(ЗЖ), R(Кр)]₄₋₉[#]

ЭТАЛОНЫ (РАСТВОРЫ СРАВНЕНИЯ)

Исходные растворы

Желтый раствор. 46 г железа (III) хлорида *P* растворяют в 900 мл смеси кислота хлористоводородная *P* – вода *P* (25:975, об/об) и доводят до объема 1000,0 мл этим же растворителем. Определяют концентрацию полученного раствора и разводят раствор этим же растворителем таким образом, чтобы содержание $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ в 1 мл равнялось 45,0 мг.

Раствор хранят в защищенном от света месте. Определение концентрации. 10,0 мл полученного раствора помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл с притертой пробкой, прибавляют 15 мл воды *P*, 5 мл кислоты хлористоводородной *P* и 4 г калия йодида *P*, колбу закрывают и выдерживают в течение 15 мин в темном месте. Прибавляют 100 мл воды *P* и выделившийся йод титруют 0,1 *M* раствором натрия тиосульфата, прибавляя в конце титрования в качестве индикатора 0,5 мл раствора крахмала *P*.

1 мл 0,1 *M* раствора натрия тиосульфата соответствует 27,03 мг $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Красный раствор. 60 г кобальта хлорида *P* растворяют в 900 мл смеси кислота хлористоводородная *P* – вода *P* (25:975, об/об) и доводят до объема 1000,0 мл этим же растворителем. Определяют концентрацию полученного раствора и разводят раствор этим же растворителем таким образом, чтобы содержание $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ в 1 мл равнялось 59,5 мг.

Определение концентрации. 5,0 мл полученного раствора помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл с притертой пробкой, прибавляют 5 мл раствора водорода пероксида разведенного *P* и 10 мл раствора 300 г/л натрия гидроксида *P*, осторожно кипятят в течение 10 минут, охлаждают и прибавляют 60 мл кислоты серной разведенной *P* и 2 г калия йодида *P*. Колбу закрывают и осторожно встряхивают до полного растворения осадка. Выделившийся йод титруют 0,1 *M* раствором натрия тиосульфата, прибавляя в конце титрования в качестве индикатора 0,5 мл раствора крахмала *P*, и титруют до появления бледно-розового окрашивания.

1 мл 0,1 *M* раствора натрия тиосульфата соответствует 23,79 мг $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Синий раствор. 63 г меди сульфата *P* растворяют в 900 мл смеси кислота хлористоводородная *P* – вода *P* (25:975, об/об) и доводят до объема 1000,0 мл этим же растворителем. Определяют концентрацию полученного раствора и разводят раствор этим же растворителем таким образом, чтобы содержание $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 1 мл равнялось 62,4 мг.

Определение концентрации. 10,0 мл полученного раствора помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл с притертой пробкой, прибавляют 50 мл воды *P*, 12 мл кислоты уксусной разведенной *P* и 3 г калия йодида *P*. Выделившийся йод титруют 0,1 *M* раствором натрия тиосульфата, прибавляя в конце титрования в качестве индикатора 0,5 мл раствора крахмала *P*, и титруют до появления бледно-коричневого окрашивания.

1 мл 0,1 *M* раствора натрия тиосульфата соответствует 24,97 мг $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

Основные растворы

Пять основных растворов приготавливают с использованием трех исходных, как указано в таблице 2.2.2.-1.

Таблица 2.2.2.-1

Основные растворы

Основной раствор	Объем, мл			
	Желтый раствор	Красный раствор	Синий раствор	Раствор кислоты хлористоводородной (10 г/л HCl)
В (brown) К (коричневый)	3,0	3,0	2,4	1,6
ВУ (brownish-yellow) КЖ (коричневато-желтый)	2,4	1,0	0,4	6,2
У (yellow) Ж (желтый)	2,4	0,6	0,0	7,0
ГУ (greenish-yellow) ЗЖ (зеленовато-желтый)	9,6	0,2	0,2	0,0

R (red) Кр (красный)	1,0	2,0	0,0	7,0

Эталонны для методов I и II.

Эталонны приготавливают с использованием пяти основных растворов, как указано в таблицах 2.2.2.-2–2.2.2.-6.

Таблица 2.2.2.-2

Эталонны шкалы В(К)

Эталон	Объем, мл	
	Основной раствор В(К)	Раствор кислоты хлористоводородной (10 г/л HCl)
В(К) ₁	75,0	25,0
В(К) ₂	50,0	50,0
В(К) ₃	37,5	62,5
В(К) ₄	25,0	75,0
В(К) ₅	12,5	87,5
В(К) ₆	5,0	95,0
В(К) ₇	2,5	97,5
В(К) ₈	1,5	98,5
В(К) ₉	1,0	99,0

Таблица 2.2.2.-3

Эталонны шкалы ВУ(КЖ)

Эталон	Объем, мл	
	Основной раствор ВУ(КЖ)	Раствор кислоты хлористоводородной (10 г/л HCl)
ВУ(КЖ) ₁	100,0	0,0
ВУ(КЖ) ₂	75,0	25,0
ВУ(КЖ) ₃	50,0	50,0
ВУ(КЖ) ₄	25,0	75,0
ВУ(КЖ) ₅	12,5	87,5
ВУ(КЖ) ₆	5,0	95,0
ВУ(КЖ) ₇	2,5	97,5

Таблица 2.2.2.-4

Эталонны шкалы У(Ж)

Эталон	Объем, мл	
	Основной раствор У(Ж)	Раствор кислоты хлористоводородной (10 г/л HCl)
У(Ж) ₁	100,0	0,0
У(Ж) ₂	75,0	25,0
У(Ж) ₃	50,0	50,0
У(Ж) ₄	25,0	75,0
У(Ж) ₅	12,5	87,5
У(Ж) ₆	5,0	95,0
У(Ж) ₇	2,5	97,5

Таблица 2.2.2.-5

Эталонны шкалы ГУ(ЗЖ)

Эталон	Объем, мл

	Основной раствор GY(ЗЖ)	Раствор кислоты хлористоводородной (10 г/л HCl)
GY(ЗЖ) ₁	25,0	75,0
GY(ЗЖ) ₂	15,0	85,0
GY(ЗЖ) ₃	8,5	91,5
GY(ЗЖ) ₄	5,0	95,0
GY(ЗЖ) ₅	3,0	97,0
GY(ЗЖ) ₆	1,5	98,5
GY(ЗЖ) ₇	0,75	99,25

Таблица 2.2.2.-6

Эталонные шкалы R(Kp)

Эталон	Объем, мл	
	Основной раствор R(Kp)	Раствор кислоты хлористоводородной (10 г/л HCl)
R(Kp) ₁	100,0	0,0
R(Kp) ₂	75,0	25,0
R(Kp) ₃	50,0	50,0
R(Kp) ₄	37,5	62,5
R(Kp) ₅	25,0	75,0
R(Kp) ₆	12,5	87,5
R(Kp) ₇	5,0	95,0

Хранение

Эталонные для определения степени окрашивания жидкостей по методу I хранят в защищенном от света месте в запаянных пробирках из бесцветного, прозрачного, нейтрального стекла с внешним диаметром 12 мм. [#]Для приготовления эталонов для определения степени окрашивания жидкостей по методу I используют основные растворы, приготовленные непосредственно перед применением. [#]

Эталонные для определения степени окрашивания жидкостей по методу II приготавливают из основных растворов непосредственно перед применением.

[#]Срок годности первичных и основных растворов при хранении в защищенном от света месте в штанглазах с притертой пробкой – 1 год. [#]

01/2013:20203

2.2.3. ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ pH

Водородный показатель (pH) – число, характеризующее концентрацию (активность) ионов водорода в водных растворах. На практике pH определяют экспериментально. Значение pH испытуемого раствора связано со значением pH стандартного раствора (pH_s) следующим уравнением:

$$pH = pH_s - \frac{E - E_s}{k},$$

где:

E – потенциал электрода в испытуемом растворе, В;

E_s – потенциал того же электрода в растворе с известным значением pH (pH_s), В;

k – температурный коэффициент (изменение потенциала при изменении значения pH на единицу, рассчитанное по уравнению Нернста) (таблица 2.2.3.-1), В.

Таблица 2.2.3.-1

Значения k при различных температурах

Температура, °С	k , В
15	0,0572
20	0,0582
25	0,0592
30	0,0601
35	0,0611

Потенциометрическое определение рН проводят путем измерения разности потенциалов между двумя электродами, погруженными в испытуемый раствор: один из электродов чувствителен к ионам водорода (обычно это стеклянный электрод), другой – электрод сравнения (например, насыщенный каломельный электрод).

Прибор. Измерительным прибором служит вольтметр с входным сопротивлением, как минимум в 100 раз превышающим сопротивление используемых электродов. Прибор обычно градуирован в единицах рН и должен иметь такую чувствительность, чтобы можно было провести измерение с точностью не менее 0,05 единиц рН или не менее 0,003 В.

Методика. Если иного не указано в частной статье, все измерения проводят при одной и той же температуре в интервале температур от 20 °С до 25 °С. В таблице 2.2.3.-2 приведена зависимость значения рН от температуры для различных стандартных буферных растворов, используемых для калибровки. При необходимости используют температурные поправки в соответствии с инструкцией предприятия-производителя. Прибор калибруют с помощью буферного раствора калия гидрофталата (первичный стандарт) и одного из буферных растворов с другим значением рН (предпочтительно одного из указанных в таблице 2.2.3.-2). Показания прибора для третьего буферного раствора с промежуточным значением рН не должны отличаться более чем на 0,05 единиц рН от табличного значения рН, соответствующего этому раствору. Электроды погружают в исследуемый раствор и измеряют рН при тех же условиях, что и для буферных растворов.

Если прибор используется ежедневно, его градуировку проводят регулярно. В противном случае градуировку прибора проводят перед каждым измерением.

Все испытуемые растворы и стандартные буферные растворы должны быть приготовлены с использованием *воды, свободной от углерода диоксида, Р*.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ СТАНДАРТНЫХ БУФЕРНЫХ РАСТВОРОВ

0,05 М раствор калия тетраоксалата. 12,61 г $C_4H_3KO_8 \cdot 2H_2O$ растворяют в *воде, свободной от углерода диоксида, Р* и доводят до объема 1000,0 мл этим же растворителем.

Насыщенный при 25 °С раствор калия гидротартрата. Избыток $C_4H_5KO_6$ смешивают при энергичном встряхивании с *водой, свободной от углерода диоксида, Р* при температуре 25 °С в течение 30 мин. Фильтруют или сливают надосадочную жидкость. Раствор готовят непосредственно перед использованием.

0,05 М раствор калия дигидроцитрата. 11,41 г $C_6H_7KO_7$ растворяют в *воде, свободной от углерода диоксида, Р* и доводят до объема 1000,0 мл этим же растворителем. Раствор готовят непосредственно перед использованием.

0,05 М раствор калия гидрофталата. 10,13 г $C_8H_5KO_4$, предварительно высушенного при температуре (110 ± 2) °С в течение 1 ч, растворяют в *воде, свободной от углерода диоксида, Р* и доводят до объема 1000,0 мл этим же растворителем.

0,025 М раствор калия дигидрофосфата и 0,025 М раствор динатрия гидрофосфата. 3,39 г KH_2PO_4 и 3,53 г Na_2HPO_4 , предварительно высушенных при температуре (120 ± 2) °С в течение 2 ч, растворяют в *воде, свободной от углерода диоксида, Р* и доводят до объема 1000,0 мл этим же растворителем.

0,0087 М раствор калия дигидрофосфата и 0,0303 М раствор динатрия гидрофосфата. 1,18 г KH_2PO_4 и 4,30 г Na_2HPO_4 , предварительно высушенных при температуре (120 ± 2) °С в течение 2 часов, растворяют в *воде, свободной от углерода диоксида, Р* и доводят до объема 1000,0 мл этим же растворителем.

0,01 М раствор натрия тетрабората. 3,80 г $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ растворяют в *воде, свободной от углерода диоксида, Р* и доводят до объема 1000,0 мл этим же растворителем. Хранят в защищенном от атмосферного углерода диоксида месте.

0,025 М раствор натрия карбоната и 0,025 М раствор натрия гидрокарбоната. 2,64 г Na_2CO_3 и 2,09 г $NaHCO_3$ растворяют в *воде, свободной от углерода диоксида, Р* и

доводят до объема 1000,0 мл этим же растворителем. Хранят в защищенном от атмосферного углерода диоксида месте.

Насыщенный при 25 °С раствор кальция гидроксида. Избыток кальция гидроксида *P* встряхивают с водой, свободной от углерода диоксида, *P* и сливают надосадочную жидкость при температуре 25 °С. Хранят в защищенном от атмосферного углерода диоксида месте.

ХРАНЕНИЕ

Буферные растворы хранят в химически стойких плотноуккупориваемых контейнерах, таких как контейнеры из стекла класса I или пластмассовые контейнеры для водных растворов.

Таблица 2.2.3.-2

Значение pH стандартных буферных растворов при разных температурах

Температура, °С	0,05 М раствор калия тетраоксалата	Насыщенный при 25 °С раствор калия гидротартрата	0,05 М раствор калия дигидроцитрата	0,05 М раствор калия гидрофталата	0,025 М раствор калия дигидрофосфата и 0,025 М раствор динатрия гидрофосфата	0,0087 М раствор калия дигидрофосфата и 0,0303 М раствор динатрия гидрофосфата	0,01 М раствор натрия тетрабората	0,025 М раствор натрия карбоната и 0,025 М раствор натрия гидрокарбоната	Насыщенный при 25 °С раствор кальция гидроксида
	$C_4H_3KO_8 \cdot 2H_2O$	$C_4H_5KO_6$	$C_6H_7KO_7$	$C_8H_5KO_4$	$KH_2PO_4 + Na_2HPO_4$	$KH_2PO_4 + Na_2HPO_4$	$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$	$Na_2CO_3 + NaHCO_3$	$Ca(OH)_2$
15	1,67		3,80	4,00	6,90	7,45	9,28	10,12	12,81
20	1,68		3,79	4,00	6,88	7,43	9,23	10,06	12,63
25	1,68	3,56	3,78	4,01	6,87	7,41	9,18	10,01	12,45
30	1,68	3,55	3,77	4,02	6,85	7,40	9,14	9,97	12,29
35	1,69	3,55	3,77	4,02	6,84	7,39	9,10	9,93	12,13
$\frac{\Delta pH}{\Delta t}^{(1)}$	+0,001	-0,0014	-0,0022	+0,0012	-0,0028	-0,0028	-0,0082	-0,0096	-0,034

⁽¹⁾ ΔрН – изменение рН на градус по Цельсию.

01/2013:20204

2.2.4. ЗАВИСИМОСТЬ МЕЖДУ РЕАКЦИЕЙ РАСТВОРА, ПРИБЛИЗИТЕЛЬНЫМ ЗНАЧЕНИЕМ рН И ЦВЕТОМ ИНДИКАТОРОВ

К 10 мл испытуемого раствора прибавляют 0,1 мл раствора индикатора, если иного не указано в таблице 2.2.4.-1.

Таблица 2.2.4.-1

Реакция раствора	рН	Индикатор	Окраска
Щелочная	> 8	Лакмусовая бумага красная <i>P</i>	Синяя
		Раствор тимолового синего <i>P</i> (0,05 мл)	Серая или фиолетово-серая
Слабощелочная	8,0–10,0	Раствор фенолфталеина <i>P</i> (0,05 мл)	Бесцветная или розовая
		Раствор тимолового синего <i>P</i> (0,05 мл)	Серая
Сильнощелочная	> 10	Фенолфталеиновая бумага <i>P</i>	Красная
Нейтральная	6,0–8,0	Раствор метилового красного <i>P</i>	Желтая
		Раствор фенолового красного <i>P</i> (0,05 мл)	
Нейтральная по метиловому красному	4,5–6,0	Раствор метилового красного <i>P</i>	Оранжево-красная

Нейтральная по фенолфталеину	< 8,0	Раствор фенолфталеина <i>P</i> (0,05 мл)	Бесцветная; розовая или красная после прибавления 0,05 мл 0,1 М раствора основания
Кислая	< 6	Раствор метилового красного <i>P</i>	Оранжевая или красная
		Раствор бромтимолового синего <i>PI</i>	Желтая
Слабокислая	4,0–6,0	Раствор метилового красного <i>P</i>	Оранжевая
		Раствор бромкрезолового зеленого <i>P</i>	Зеленая или синяя
Сильнокислая	< 4	Бумага конго красного <i>P</i>	Зеленая или синяя

[#]Зависимость между интервалом рН и переходом окраски индикаторов представлена в таблице #2.2.4.-2.[#]

Таблица #2.2.4.-2

Интервалы рН и переход окраски индикаторов

Индикаторный раствор	Интервал рН перехода окраски	Переход окраски
Метилового фиолетового раствор <i>PI</i>	0,1–1,5	От желтой до зеленой
Малахитового зеленого раствор <i>P</i>	0,1–2,0	От желтой до зеленовато-голубой
Крезолового красного раствор <i>P</i>	0,2–1,8	От красной до желтой
Метанилового желтого раствор <i>P</i>	1,2–2,3	От красной до оранжево-желтой
м-Крезолового пурпурового раствор <i>P</i>	1,2–2,8	От красной до желтой
Тимолового синего раствор <i>P</i>	1,2–2,8	От красной до желтой
Тропеолина 00 раствор <i>P</i>	1,4–3,2	От красной до желтой
Хинальдинового красного раствор <i>P</i>	1,4–3,2	От бесцветной до красной
Метилового фиолетового раствор <i>PI</i>	1,5–3,2	От зеленой до фиолетовой
Бромфенолового синего раствор <i>P</i>	2,8–4,4	От желтой до синевато-фиолетовой
Диметилового желтого раствор <i>P</i>	3,0–4,0	От красной до желтой
Метилового оранжевого раствор <i>P</i>	3,0–4,4	От красной до желтой
Метилового оранжевого смешанный раствор <i>P</i>	3,0–4,4	От оранжевой до желтовато-зеленой
Конго красного раствор <i>P</i>	3,0–5,0	От синей до розовой
Бромкрезолового зеленого раствор <i>P</i>	3,6–5,2	От желтой до синей
Ализарина <i>S</i> раствор <i>P</i>	3,7–5,2	От желтой до фиолетовой
Метилового красного раствор <i>P</i>	4,4–6,0	От красной до желтой
Лакмус <i>P</i>	5,0–8,0	От красной до синей
Метилового красного смешанный раствор <i>P</i>	5,2–5,6	От красно-фиолетовой до зеленой
Бромкрезолового пурпурового раствор <i>P</i>	5,2–6,8	От желтой до синевато-фиолетовой
Бромтимолового синего раствор <i>PI</i>	5,8–7,4	От желтой до синей
Нейтрального красного раствор <i>P</i>	6,8–8,0	От красной до желтой
Фенолового красного раствор <i>P</i>	6,8–8,4	От желтой до красновато-фиолетовой
Крезолового красного раствор <i>P</i>	7,0–8,6	От желтой до красной
α-Нафтолфталеина раствор <i>P</i>	7,4–8,6	От желтовато-розовой до зеленовато-синей
м-Крезолового пурпурного раствор <i>P</i>	7,4–9,0	От желтой до красно-фиолетовой
Тимолового синего раствор <i>P</i>	8,0–9,6	От оливково-зеленой до синей
Фенолфталеина раствор <i>P</i>	8,2–10,0	От бесцветной до ярко-розовой
Нильского синего <i>A</i> раствор <i>P</i>	9,0–13,0	От синей до красной
Тимолфталеина раствор <i>P</i>	9,3–10,5	От бесцветной до синей
Протравного желтого <i>3R</i> раствор <i>P</i>	10,2–12,0	От желтой до красной
Малахитового зеленого раствор <i>P</i>	11,4–13,0	От зеленовато-голубой до бесцветной
Индигокармина индикаторный раствор <i>P</i>	11,6–14,0	От синей до желтой

01/2013:20205

2.2.5. ОТНОСИТЕЛЬНАЯ ПЛОТНОСТЬ

Относительная плотность $d_{t_2}^h$ представляет собой отношение массы определенного объема вещества при температуре t_1 к массе равного ему объема воды при температуре t_2 . Если в частной статье не указано иного, используют относительную плотность d_{20}^{20} . Часто используется также относительная плотность d_4^{20} . Может использоваться плотность ρ_{20} , определяемая как масса единицы объема при температуре 20 °С и выражаемая в килограммах на кубический метр или в граммах на кубический сантиметр ($1 \text{ кг/м}^3 = 0,001 \text{ г/см}^3$). Эти величины связаны между собой следующими уравнениями, в которых плотность выражена в граммах на кубический сантиметр:

$$\begin{aligned}\rho_{20} &= 0,998203 \cdot d_{20}^{20} \text{ или } d_{20}^{20} = 1,00180 \cdot \rho_{20}, \\ \rho_{20} &= 0,999972 \cdot d_4^{20} \text{ или } d_4^{20} = 1,00003 \cdot \rho_{20}, \\ d_4^{20} &= 0,998230 \cdot d_{20}^{20}.\end{aligned}$$

Относительную плотность или плотность определяют с точностью до десятичных знаков, обозначенных в частной статье, с помощью пикнометра (твердые вещества и жидкости), гидростатических весов (твердые вещества), ареометра (жидкости) или цифрового плотномера с осциллирующим датчиком (жидкости и газы). Атмосферное давление в определениях с использованием взвешивания не учитывают, так как связанная с ним ошибка не превышает единицы в третьем десятичном знаке. Давление воздуха не оказывает влияние на определения с использованием плотномера.

Плотномер с осциллирующим датчиком. Прибор состоит из следующих основных составляющих:

- U-образная трубка, обычно из боросиликатного стекла, в которую помещают испытуемую жидкость;

- генератор магнитоэлектрического или пьезоэлектрического возбуждения, заставляющий колебаться U-образную трубку с характеристической частотой, зависящей от плотности испытуемой жидкости;

- измерительный аппарат, определяющий период колебаний (T), который может быть преобразован прибором непосредственно в плотность либо использован для расчета плотности с использованием постоянных A и B , как указано ниже.

Резонансная частота (f) является функцией динамической жесткости (c) и массы (m) системы:

$$f^2 = \frac{1}{T^2} = \frac{c}{m} \cdot \frac{1}{4\pi^2}.$$

Отсюда:

$$T^2 = \left(\frac{M}{c} + \frac{\rho \cdot V}{c} \right) \cdot 4\pi^2,$$

где:

M – масса трубки;

V – внутренний объем трубки.

Введение двух постоянных $A = c / (4\pi^2 \cdot V)$ и $B = M / V$ приводит уравнение к классическому виду для осциллирующего датчика:

$$\rho = A \cdot T^2 - B.$$

Постоянные A и B определяют для конкретного прибора, заполняя U-образную трубку двумя различными образцами с известными плотностями, например, дегазированной *водой* P и воздухом. Проверку получаемых данных проводят ежедневно с использованием дегазированной *воды* P . Результаты, полученные при проверке с использованием дегазированной *воды* P , не должны отличаться от стандартных значений ($\rho = 0,998203$ г/см³, $d_{20}^{20} = 1,000000$) более чем на специфицированную ошибку. Например, прибор, специфицированный до $\pm 0,0001$ г/см³, считается пригодным для дальнейших измерений, если выдает значение $(0,9982 \pm 0,0001)$ г/см³. В противном случае необходима повторная настройка. Регулярно должна проводиться градуировка с использованием сертифицированных стандартных образцов. Измерения должны проводиться при тех же условиях, что и градуировка. Перед помещением в трубку испытуемую жидкость при необходимости термостатируют при 20 °С для предотвращения образования пузырьков газа и для уменьшения времени, необходимого для измерения.

Факторы, влияющие на точность:

- неоднородность температуры во всем объеме трубки;
- отсутствие линейности в диапазоне измеряемого значения плотности;
- мешающие резонансные эффекты;
- вязкость, вследствие чего растворы с вязкостью, большей, чем у раствора, по которому проводилась градуировка, показывают плотность заметно более высокую, чем истинная.

Проблемы, связанные с эффектами отсутствия линейности и вязкости, могут быть решены при использовании для градуировки веществ со значениями плотности и вязкости, близкими к таковым для испытуемой жидкости (± 5 % для плотности и ± 50 % для вязкости). Плотномер может иметь функцию для автоматической коррекции вязкости и для коррекции ошибок, связанных с отсутствием линейности и с изменениями температуры.

Прецизионность является функцией воспроизводимости и стабильности частоты осциллирующего датчика, которая зависит от стабильности объема, массы и динамической жесткости ячейки.

Плотномеры способны проводить измерения с точностью от $1 \cdot 10^{-3}$ г/см³ до $1 \cdot 10^{-5}$ г/см³ и повторяемостью от $1 \cdot 10^{-4}$ г/см³ до $1 \cdot 10^{-6}$ г/см³.

#Определение плотности при помощи пикнометра проводят, как указано в методах 1 и 2, при помощи ареометра – как указано в методе 3, если нет других указаний в частной статье.#

#Метод 1. Применяют в случае определения плотности жидкостей с точностью до 0,001 г/см³.

Чистый сухой пикнометр взвешивают с точностью до 0,0002 г, заполняют при помощи сухой воронки *водой* P чуть выше метки, закрывают пробкой и термостатируют в течение 20 мин при температуре $(20 \pm 0,1)$ °С. При этой температуре уровень воды в пикнометре доводят до метки, быстро отбирая избыток воды при помощи пипетки или завернутой в трубку полоски фильтровальной бумаги. Пикнометр снова закрывают пробкой и термостатируют еще 10 мин, проверяя положение мениска по отношению к метке. Затем пикнометр вынимают из термостата, фильтровальной бумагой вытирают внутреннюю поверхность шейки пикнометра, а также весь пикнометр снаружи, выдерживают под стеклом весов в течение 10 мин и взвешивают с точностью, указанной выше.

Пикнометр освобождают от воды, высушивают, ополаскивая последовательно 96 % спиртом P и эфиром P (сушить пикнометр путем нагревания не допускается), удаляют остаток эфира продуванием воздуха, заполняют пикнометр испытуемой жидкостью и затем проводят те же операции, что и с *водой* P .

Плотность ρ_{20} (г/см³) рассчитывают по формуле:

$$\frac{(m_2 - m) \cdot 0,99703}{m_1 - m} + 0,0012,$$

где:

m – масса пустого пикнометра, г;
 m_1 – масса пикнометра с *водой P*, г;
 m_2 – масса пикнометра с испытуемой жидкостью, г;
 0,99703 – значение плотности воды при 20 °С, г/см³ (с учетом плотности воздуха);
 0,0012 – значение плотности воздуха при 20 °С, г/см³ и барометрическом давлении 101,3 кПа (760 мм рт. ст.).

#Метод 2. Применяют для определения плотности твердых жиров и воска.

Взвешивают пустой пикнометр, затем взвешивают тот же пикнометр, заполненный *водой P*. После этого воду удаляют и пикнометр высушивают. Все операции проводят, соблюдая условия, указанные в методе 1.

В пикнометр вливают при помощи пипетки или небольшой воронки с тонкооттянутым концом расплавленный жир или воск в таком количестве, чтобы он занимал от 1/3 до 1/2 объема пикнометра. Пикнометр выдерживают в течение 1 ч без пробки в горячей воде, затем охлаждают до температуры 20 °С, взвешивают, доводят до метки *водой P* при температуре 20 °С, вытирают насухо и снова взвешивают. В обеих фазах и на поверхности их раздела не должно быть пузырьков воздуха.

Плотность ρ_{20} (г/см³) рассчитывают по формуле:

$$\frac{(m_2 - m) \cdot 0,99703}{(m_1 + m_2) - (m + m_3)} + 0,0012,$$

где:

m – масса пустого пикнометра, г;
 m_1 – масса пикнометра с *водой P*, г;
 m_2 – масса пикнометра с испытуемым образцом, г;
 m_3 – масса пикнометра с испытуемым образцом и *водой P*, г.

#Метод 3. Применяют в случае определения плотности жидкостей с точностью до 0,01 г/см³.

Испытуемую жидкость помещают в цилиндр, и при температуре жидкости 20 °С осторожно опускают в нее чистый сухой ареометр, шкала которого позволяет определить ожидаемую величину плотности. Ареометр не выпускают из рук, пока не станет очевидным, что он плавает; при этом необходимо следить, чтобы ареометр не касался стенок и дна цилиндра. Отсчет плотности проводят через 3–4 мин после погружения ареометра по делению на шкале, соответствующему нижнему мениску жидкости (в случае определения темноокрашенных жидкостей отсчет производят по верхнему мениску). При отсчете глаз должен быть на уровне мениска. Определение плотности сильнолетучих веществ ареометром не допускается.

01/2013:20206

2.2.6. ПОКАЗАТЕЛЬ ПРЕЛОМЛЕНИЯ (ИНДЕКС РЕФРАКЦИИ)

Показатель преломления среды относительно воздуха равняется отношению синуса угла падения луча света в воздухе к синусу угла преломления луча света в данной среде.

#Абсолютным показателем преломления называют отношение скорости распространения света в вакууме к скорости распространения света в испытуемом веществе. **Относительный** показатель преломления – это отношение скорости распространения света в воздухе к скорости распространения света в испытуемом веществе.[#]

Если в частной статье нет других указаний, определение показателя преломления проводят при температуре (20±0,5) °С при длине волны линии D спектра натрия ($\lambda = 589,3$ нм); показатель преломления, определенный в таких условиях, обозначают

символом n_D^{20} .

[#]Показатель преломления зависит от температуры и длины волны света, при которой проводят определение. В растворах показатель преломления зависит также от концентрации вещества и природы растворителя.

Определение показателя преломления применяется для установления подлинности и чистоты вещества. Метод применяют также для определения концентрации вещества в растворе, которую находят по графику зависимости показателя преломления от концентрации. В таком случае точность измерения показателя преломления должна быть не ниже $\pm 2 \cdot 10^{-4}$. На графике выбирают интервал концентраций, в котором соблюдается линейная зависимость между коэффициентом преломления и концентрацией. В этом интервале концентрацию вещества в растворе в процентах рассчитывают по формуле:

$$\frac{n - n_0}{F},$$

где:

n – показатель преломления раствора;

n_0 – показатель преломления растворителя при той же температуре;

F – фактор, равный величине прироста показателя преломления при увеличении концентрации на 1 % (устанавливается экспериментально).[#]

Рефрактометры обычно определяют критический угол. В таком приборе главной частью является призма с известным показателем преломления, которая контактирует с анализируемой жидкостью.

Для калибровки прибора используют сертифицированные эталонные вещества.

[#]Градуйровка прибора проводится по эталонным жидкостям, прилагаемым к прибору, или по воде P , полученной методом дистилляции, для которой $n_D^{20} = 1,3330$ ($\Delta n / \Delta t = -0,000085$).[#]

При использовании белого света рефрактометры должны быть оборудованы компенсационной системой. Прибор должен давать показания с точностью как минимум до третьего десятичного знака и обеспечивать возможность проведения операций при заданной температуре. Цена деления термометра не должна превышать 0,5 °C.

01/2013:20207

2.2.7. ОПТИЧЕСКОЕ ВРАЩЕНИЕ

Оптическое вращение – это свойство вещества вращать плоскость поляризации поляризованного света.

Оптическое вращение считается положительным (+) для правовращающих веществ (то есть тех, которые вращают плоскость поляризации по часовой стрелке) и отрицательным (–) для левовращающих веществ.

Удельное оптическое вращение $[\alpha_m]_\lambda$, выраженное в радианах (рад), представляет собой вращение, вызванное слоем жидкости или раствора толщиной 1 м, содержащим 1 кг/м³ оптически активного вещества при прохождении через него поляризованного света с длиной волны λ при температуре t . Для практических целей удельное оптическое вращение обычно выражают в миллирадиан-метрах квадратных на килограмм (мрад·м²·кг⁻¹).

В Фармакопее используются следующие общепринятые определения.

Угол оптического вращения жидких веществ представляет собой угол вращения α плоскости поляризации, выраженный в градусах (°), при длине волны линии D спектра натрия ($\lambda = 589,3$ нм), измеренный при температуре 20 °C в толщине слоя 1 дм. Для растворов способ приготовления указывают в частной статье.

Удельное оптическое вращение $[\alpha]_D^{20}$ жидкости представляет собой угол вращения α плоскости поляризации, выраженный в градусах (°), при длине волны линии d спектра

натрия ($\lambda = 589,3$ нм), измеренный при температуре $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, рассчитанный для толщины слоя 1 дм испытуемого вещества и деленный на плотность, выраженную в граммах на кубический сантиметр.

Удельное оптическое вращение $[\alpha]_D^{20}$ вещества в растворе представляет собой угол вращения α плоскости поляризации, выраженный в градусах ($^{\circ}$), при длине волны линии D спектра натрия ($\lambda = 589,3$ нм), измеренный при температуре $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ в растворе испытуемого вещества и рассчитанный для слоя 1 дм в пересчете на содержание вещества 1 г/мл в растворе. Для удельного вращения вещества в растворе всегда указывают используемый растворитель и концентрацию раствора.

В Фармакопее удельное оптическое вращение выражают без размерности; реальная размерность выражается в градус-миллилитрах на дециметр-грамм $[(^{\circ}) \cdot \text{мл} \cdot \text{дм}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}]$.

Пересчет удельного вращения в единицах по Международной Системе в единицы, используемые Фармакопеей, проводят по формуле:

$$[\alpha_m]_d' = [\alpha]_d' \cdot 0,1745.$$

В отдельных случаях, указанных в частной статье, угол вращения может быть измерен при температурах, отличных от $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, и при других длинах волн.

Используемый поляриметр должен обеспечивать измерения с точностью до $0,01\text{ }^{\circ}$. Шкалу обычно проверяют при помощи сертифицированных кварцевых пластинок. Линейность шкалы может быть проверена при помощи растворов сахарозы.

Методика. Определяют ноль поляриметра и угол вращения плоскости поляризации при длине волны линии D спектра натрия ($\lambda = 589,3$ нм) при температуре $(20 \pm 0,5)\text{ }^{\circ}\text{C}$. Измерения оптического вращения могут проводиться при других температурах только в тех случаях, если в частной статье указан способ учета температуры. Определяют ноль прибора с закрытой трубкой; для жидкостей – с пустой трубкой; для растворов твердых веществ – с трубкой, заполненной соответствующим растворителем.

[#]Проводят не менее 5 измерений и рассчитывают среднее значение.[#]

Удельное оптическое вращение рассчитывают по следующим формулам.

Для жидкостей:

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha}{l \cdot \rho_{20}}.$$

Для веществ в растворе:

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{1000 \cdot \alpha}{l \cdot c},$$

где:

c – концентрация вещества в растворе, г/л.

Содержание c (г/л) или c' (% (м/м)) растворенного вещества рассчитывают по формулам:

$$c = \frac{1000 \cdot \alpha}{l \cdot [\alpha]_D^{20}} \quad c' = \frac{100 \cdot \alpha}{l \cdot [\alpha]_D^{20} \cdot \rho_{20}},$$

где:

α – угол вращения, измеренный при температуре $(20 \pm 0,5)\text{ }^{\circ}\text{C}$, в градусах;

l – длина поляризметрической трубки, в дециметрах;

ρ_{20} – плотность при температуре $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, в граммах на кубический сантиметр. В фармакопейном анализе плотность заменяют относительной плотностью (2.2.5).

[#]Если нет других указаний в частной статье, оптическое вращение растворов должно быть измерено в течение 30 мин после их приготовления. Если известно, что вещества подвержены рацемизации или мутаротации, необходимо установить время (интервал) между добавлениями вещества в растворитель и введением приготовленного раствора в трубку поляриметра.[#]

01/2013:20208

2.2.8. ВЯЗКОСТЬ

[#]*Вязкость* (внутреннее трение) – свойство текучих тел оказывать сопротивление передвижению одной их части относительно другой.

Ньютоновскими жидкостями называют системы, вязкость которых не зависит от напряжения сдвига и является постоянной величиной в соответствии с законом Ньютона. Неньютоновские жидкости не попадают под действие закона Ньютона, так как их вязкость зависит от напряжения сдвига.

Для ньютоновских жидкостей различают динамическую, кинематическую, относительную, удельную, приведенную и характеристическую вязкости. Для неньютоновских жидкостей характерна, главным образом, структурная вязкость.[#]

Динамическая вязкость, или *коэффициент вязкости* η – это тангенциальная сила, приходящаяся на единицу поверхности, которая также называется *напряжением сдвига* τ , выраженная в паскалях (Па), которую необходимо приложить для того, чтобы переместить слой жидкости площадью 1 м² со скоростью (v) 1 метр в секунду (м · с⁻¹) на расстояние (x) 1 м относительно другого слоя, параллельно площади скольжения.

Величина dv/dx представляет собой градиент скорости и обуславливает *скорость сдвига* D , выраженную в обратных секундах (с⁻¹). Таким образом, $\eta = \tau / D$.

Единицей динамической вязкости является паскаль-секунда (Па·с). Чаще всего используется дольная единица – миллипаскальсекунда (мПа·с).

Кинематическая вязкость ν , выраженная в метрах квадратных в секунду (м²·с⁻¹), рассматривается как отношение величины динамической вязкости η к плотности жидкости ρ , выраженной в килограммах на метр кубический (кг·м⁻³), измеренной при этой же температуре: $\nu = \eta / \rho$. Кинематическую вязкость обычно выражают в миллиметрах квадратных в секунду (мм²·с⁻¹).

[#]*Структурная* (эффективная, или кажущаяся) *вязкость* – вязкость при данном напряжении сдвига. В ряде случаев необходимо определить вязкость одной жидкости относительно другой – *относительную вязкость* $\eta_{отн}$.

Часто используют *удельную вязкость* $\eta_{уд}$, показывающую, какой вклад в вязкость раствора вносит присутствие в нем растворенного вещества:

$$\eta_{уд} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} = \frac{\eta}{\eta_0} - 1 = \eta_{отн} - 1,$$

где:

η – вязкость раствора;

$\eta_{отн}$ – вязкость растворителя.

Удельную вязкость, отнесенную к единице концентрации раствора, называют *приведенной вязкостью* $\eta_{прив}$:

$$\eta_{прив} = \frac{\eta_{уд}}{c},$$

где c – концентрация раствора.

Для растворов полимеров вязкость является функцией молекулярных масс, формы, размеров и гибкости макромолекул. Чтобы определить структурные характеристики полимеров, приведенную вязкость экстраполируют к нулевой концентрации. В таком случае вводится понятие *характеристической вязкости* $[\eta]$:

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \eta_{\text{прив}} = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{\text{уд}}}{c}$$

Характеристическая вязкость выражается в единицах, обратных единицам концентрации.[#]

Для определения вязкости ньютоновских жидкостей можно использовать капиллярный вискозиметр; для определения вязкости как ньютоновских, так и неньютоновских жидкостей можно использовать ротационный вискозиметр. Допускается использование и других вискозиметров с учетом, что точность и правильность измерений будут не худшими, чем на примере использования вискозиметров, описанных ниже.

01/2013:20209

2.2.9. МЕТОД КАПИЛЛЯРНОЙ ВИСКОЗИМЕТРИИ

Определение вязкости проводят, используя подходящий капиллярный вискозиметр, при температуре $(20 \pm 0,1)^\circ\text{C}$, если в частной статье не указана другая температура. Время вытекания от одной отметки вискозиметра до другой измеряется секундомером с точностью до одной пятой секунды. Полученные данные считаются достоверными при условии, что результаты двух последовательных измерений отличаются не более чем на 1 %.

Время вытекания испытуемой жидкости определяют как среднее не менее трех измерений.

Динамическую вязкость η (2.2.8), выраженную в миллипаскаль-секундах (мПа·с), рассчитывают по формуле:

$$\eta = k \rho t,$$

где:

k – постоянная вискозиметра, в миллиметрах квадратных на секунду в квадрате ($\text{мм}^2 \cdot \text{с}^{-2}$);

ρ – плотность испытуемой жидкости, в миллиграммах на миллиметр кубический ($\text{мг} \cdot \text{мм}^{-3}$), полученная умножением относительной плотности (d_{20}^{20}) на 0,9982;

t – время вытекания испытуемой жидкости, в секундах (с).

Постоянную k определяют с использованием соответствующей жидкости для калибровки вискозиметров.

Кинематическую вязкость, выраженную в миллиметрах квадратных на секунду ($\text{мм}^2 \cdot \text{с}^{-1}$), рассчитывают по формуле:

$$\nu = kt.$$

Определение вязкости может проводиться при помощи прибора (предложен Международной организацией по стандартизации), характеристики которого представлены на рисунке 2.2.9.-1 и в таблице 2.2.9.-1.

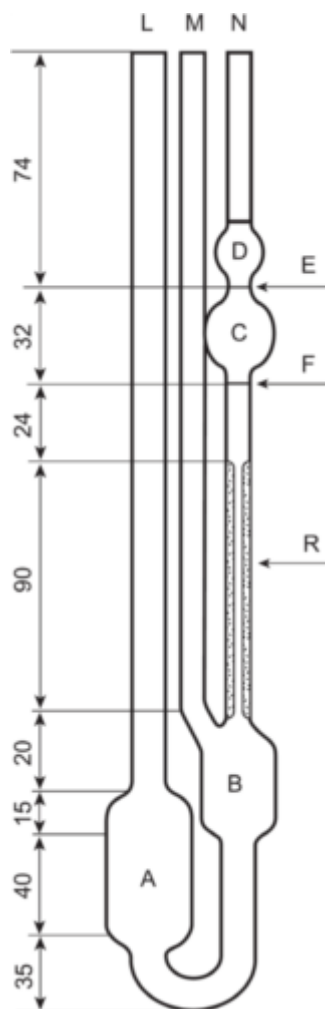


Рисунок 2.2.9.-1. Вискозиметр с висющим уровнем
(Размер представлен в миллиметрах)

Таблица 2.2.9.-1

Размер	Номинальная постоянная вискозиметра $\text{мм}^2 \cdot \text{с}^{-2}$	Диапазон кинематической вязкости $\text{мм}^2 \cdot \text{с}^{-1}$	Внутренний диаметр трубки R мм ($\pm 2\%$)	Объем расширения C мл ($\pm 5\%$)	Внутренний диаметр трубки N мм
1	0,01	От 3,5 до 10	0,64	5,6	От 2,8 до 3,2
1A	0,03	От 6 до 30	0,84	5,6	От 2,8 до 3,2
2	0,1	От 20 до 100	1,15	5,6	От 2,8 до 3,2
2A	0,3	От 60 до 300	1,51	5,6	От 2,8 до 3,2
3	1,0	От 200 до 1000	2,06	5,6	От 3,7 до 4,3
3A	3,0	От 600 до 3000	2,74	5,6	От 4,6 до 5,4
4	10	От 2000 до 10 000	3,70	5,6	От 4,6 до 5,4
4A	30	От 6000 до 30 000	4,07	5,6	От 5,6 до 6,4
5	100	От 20 000 до 100 000	6,76	5,6	От 6,8 до 7,5

Минимальное время вытекания должно быть 350 с для размера 1 и 200 с – для остальных размеров

Методика. Испытуемую жидкость, имеющую температуру 20 °С, если в частной статье не указана иная, заливают в вискозиметр через трубку (L) в таком количестве, чтобы заполнить расширение (A), но при этом уровень жидкости в расширении (B) должен остаться ниже выхода к вентиляционной трубке (M). Вискозиметр в вертикальном положении погружают в водяную баню при температуре (20±0,1) °С, если в частной статье не указана иная температура, удерживая его в этом положении не менее 30 минут для установления температурного равновесия. Трубку (M) закрывают и повышают уровень жидкости в трубке (N) таким образом, чтобы она находилась примерно на 8 мм выше метки (E). Удерживают жидкость на этом уровне, закрыв трубку (N) и открыв трубку (M). Затем

открывают трубку (N) и измеряют время, за которое уровень жидкости снизится от метки (E) до метки (F), секундомером с точностью до одной пятой секунды.

#Работа с прибором, описанным выше, допускает использование вискозиметров капиллярных стеклянных с висязим уровнем (например, вискозиметры капиллярные стеклянные типа ВПЖ-1), параметры которых аналогичны приведенному на рисунке 2.2.9.-1. Вязкость измеряют в соответствии с инструкцией по применению вискозиметра.

Для определения *относительной вязкости* жидкости измеряют время t_{0cp} вытекания между верхней и нижней отметкой вискозиметра той жидкости, относительно которой проводят измерение $\eta_{отн}$. Затем в том же чистом и сухом вискозиметре при тех же условиях определяют время вытекания t_{cp} испытуемой жидкости.

Одновременно измеряют плотность жидкостей, которые изучаются, пикнометром (ρ_0 и ρ) при той же температуре, при которой определяют вязкость, и рассчитывают относительную вязкость по формуле:

$$\eta_{отн} = \frac{t_{cp} \cdot \rho}{t_{0cp} \cdot \rho_0}.$$

Для определения характеристической вязкости готовят не менее пяти испытуемых растворов разной концентрации. При этом должно выполняться условие возможности линейной экстраполяции приведенной вязкости к нулевой концентрации, то есть нужно выбирать минимальные концентрации раствора в пределах чувствительности и точности метода измерения. Для каждой концентрации раствора определяют t_{cp} и рассчитывают приведенную вязкость. Затем строят зависимость $\eta_{прив}$ от концентрации c и графически или линейным методом наименьших квадратов экстраполируют приведенную вязкость к нулевой концентрации, то есть находят характеристическую вязкость.[#]

01/2013:20210

2.2.10. МЕТОД РОТАЦИОННОЙ ВИСКОЗИМЕТРИИ

Принцип метода заключается в измерении силы, действующей на ротор (вращающий момент) во время его вращения с постоянной угловой скоростью (скорость вращения) в жидкости. Ротационные вискозиметры используются для измерения вязкости ньютоновских жидкостей (вязкость не зависит от напряжения сдвига) и неньютоновских жидкостей (вязкость зависит от напряжения сдвига, кажущаяся вязкость). Ротационные вискозиметры могут быть разделены на две группы, а именно: абсолютные вискозиметры и относительные вискозиметры. В абсолютных вискозиметрах время вытекания в используемой геометрии хорошо известно. Результаты измерений представляются в единицах абсолютной вязкости, которые могут сравниваться с любыми другими абсолютными значениями. В относительных вискозиметрах время вытекания в используемой геометрии не определено. Результаты измерений представляются в единицах относительной вязкости, которые не могут быть соотнесены с абсолютными значениями вязкости или со значениями относительной вязкости, полученными не на том же самом приборе.

Для данных диапазонов вязкости и для различных скоростей вращения доступны различные измерительные системы.

ПРИБОР

Наиболее обычными являются следующие типы инструментов.

КОНЦЕНТРИЧЕСКИЕ ЦИЛИНДРИЧЕСКИЕ ВИСКОЗИМЕТРЫ (АБСОЛЮТНЫЕ ВИСКОЗИМЕТРЫ)

В концентрических цилиндрических вискозиметрах (коаксиальный двойной цилиндрический вискозиметр или просто коаксиальный вискозиметр) вязкость определяют, помещая испытуемую жидкость в зазор между внутренним и внешним цилиндрами. При проведении измерений вращают либо внутренний цилиндр (вискозиметр

типа Сирла (*Searle*)), либо внешний цилиндр (вискозиметр типа Куэтта (*Couette*)), как показано на рисунках 2.2.10.-1 и 2.2.10.-2 соответственно. Для ламинарного потока вязкость (или кажущуюся вязкость) η , выраженную в паскаль-секундах (Па·с), рассчитывают по формуле:

$$\eta = \frac{1}{\omega} \left(\frac{M}{4\pi h} \right) \left(\frac{1}{R_i^2} - \frac{1}{R_0^2} \right) = k \frac{M}{\omega},$$

где:

M – вращающий момент, действующий на цилиндрическую поверхность, в ньютон-метрах;

ω – угловая скорость, в радианах в секунду;

h – глубина погружения внутреннего цилиндра в жидкую среду, в метрах;

R_i – радиус внутреннего цилиндра, в метрах;

R_0 – радиус внешнего цилиндра, в метрах;

k – постоянная прибора, в радианах на метр кубический.

Для неньютоновских жидкостей необходимо указывать напряжение при сдвиге (τ) или скорость сдвига (γ), при которых измеряется вязкость. В узком интервале условий (подходящих для абсолютных вискозиметров) наблюдается пропорциональная зависимость между M и τ , а также между ω и γ :

$$\tau = AM \quad \gamma = B\omega,$$

где A и B – постоянные прибора, которые рассчитывают по следующим формулам:

– для концентрической поверхности:

$$A = \frac{1R_i^2 + R_0^2}{4\pi h R_i^2 R_0^2} \quad B = \frac{R_i^2 + R_0^2}{R_0^2 - R_i^2},$$

– для устройства конус-плита:

$$A = \frac{3}{2\pi R^3} \quad B = \frac{1}{\alpha},$$

где:

M – вращающий момент, действующий на коническую или цилиндрическую поверхность, в ньютон-метрах;

ω – угловая скорость, в радианах в секунду;

R_i – радиус внутреннего цилиндра, в метрах;

R_0 – радиус внешнего цилиндра, в метрах;

R – радиус конуса, в метрах;

h – глубина погружения внутреннего цилиндра в жидкую среду, в метрах;

α – угол между плоским диском и конусом, в радианах;

τ – напряжение при сдвиге, в паскалях (Па);

γ – скорость сдвига, в обратных секундах (s^{-1}).

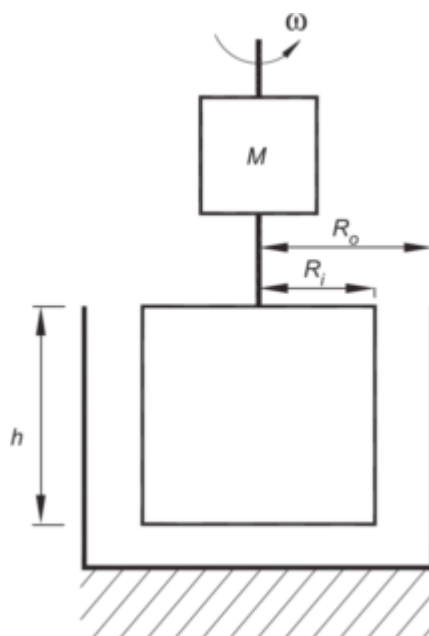


Рисунок 2.2.10.-1

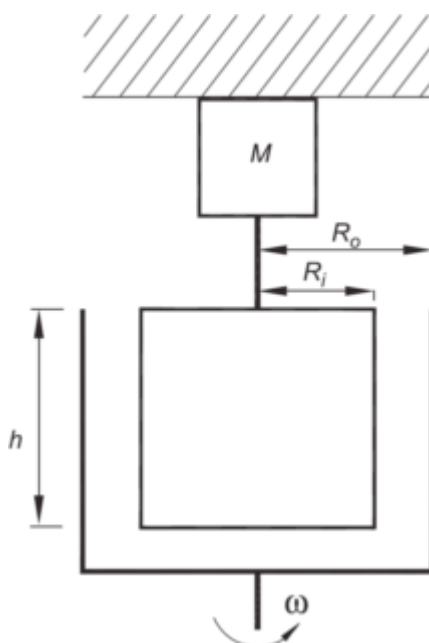


Рисунок 2.2.10.-2

ВИСКОЗИМЕТРЫ КОНУС-ПЛИТА (АБСОЛЮТНЫЕ ВИСКОЗИМЕТРЫ)

В вискозиметрах типа конус-плита жидкость помещают в промежуток между плоским диском и конусом с определенным углом. Определение вязкости проводят, вращая конус или плоский диск, как показано на рисунках 2.2.10.-3 и 2.2.10.-4 соответственно. Вязкость (или кажущуюся вязкость) η , выраженную в паскаль-секундах (Па·с), для ламинарного потока рассчитывают по формуле:

$$\eta = \left(\frac{M}{\omega} \right) \left(\frac{3\alpha}{2\pi R^3} \right) = k \frac{M}{\omega},$$

где:

M – вращающий момент, действующий на коническую поверхность или поверхность плоского диска, в ньютон-метрах;

ω – угловая скорость, в радианах в секунду;

α – угол между плоским диском и конусом, в радианах;

R – радиус конуса, в метрах;

k – постоянная прибора, в радианах на метр кубический.

Постоянные A и B прибора определяют аналогично, как для концентрических цилиндрических вискозиметров.

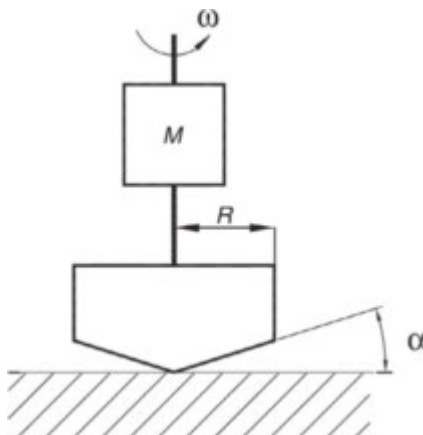


Рисунок 2.2.10.-3

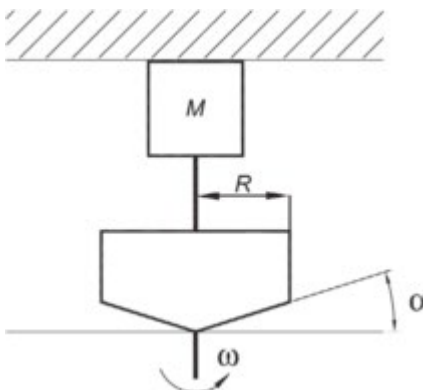


Рисунок 2.2.10.-4

ШПИНДЕЛЬНЫЕ ВИСКОЗИМЕТРЫ (ОТНОСИТЕЛЬНЫЕ ВИСКОЗИМЕТРЫ)

В шпиндельном вискозиметре вязкость определяют с помощью вращающегося шпинделя (например, цилиндрического или дискообразного, как показано на рисунках 2.2.10.-5 и 2.2.10.-6 соответственно), помещенного в жидкость. Относительные значения вязкости (или кажущейся вязкости) могут быть рассчитаны непосредственно с использованием коэффициентов пересчета исходя из показаний прибора при данной скорости вращения.

В общем случае постоянная k прибора может быть определена для разных скоростей вращения с использованием жидкости, сертифицированной для калибровки вискозиметра. После этого вязкость η рассчитывают по формуле:

$$\eta = k \frac{M}{\omega}.$$

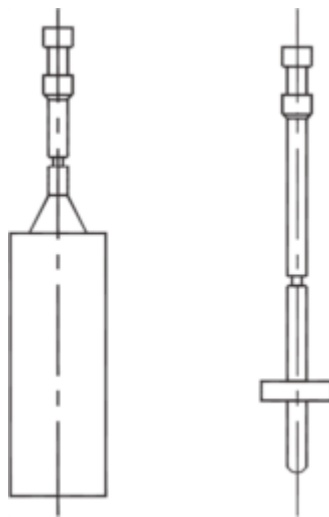


Рисунок 2.2.10.-5

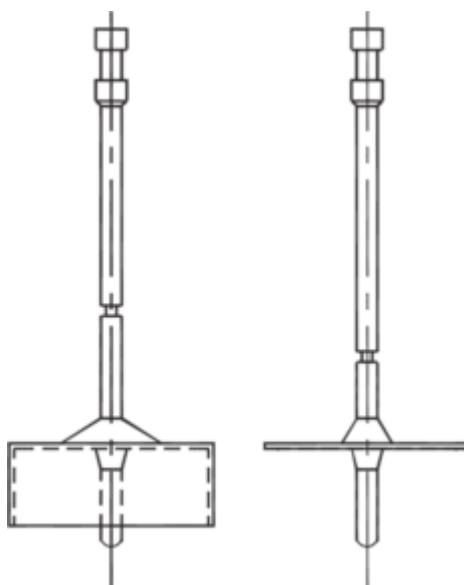


Рисунок 2.2.10.-6

МЕТОДИКА

Измеряют вязкость (или кажущуюся вязкость) в соответствии с инструкциями производителя ротационного вискозиметра. Температуру, при которой измеряют вязкость, указывают в частных статьях. Для неньютоновских систем в частных статьях указывают тип используемого вискозиметра и, если используются абсолютные вискозиметры, угловую скорость или скорость сдвига, при которых производится измерение. В случае, если точно получить необходимую скорость сдвига невозможно, используют значения скорости сдвига выше и ниже необходимого и интерполируют.

В случае относительных вискозиметров скорость сдвига не является постоянной по всему объему образца, и, таким образом, она не может быть определена. В этих условиях вязкость неньютоновских жидкостей, определенная по вышеприведенной формуле, имеет относительный характер, который зависит от типа шпинделя, угловой скорости, а также от размеров контейнера для образцов ($\varnothing$ = не менее 80 мм) и глубины погружения шпинделя. Получаемые результаты сопоставимы только при соблюдении строго одинаковых условий эксперимента.

01/2013:20211

2.2.11. ТЕМПЕРАТУРНЫЕ ПРЕДЕЛЫ ПЕРЕГОНКИ

Температурные пределы перегонки представляют собой интервал температур, приведенных к давлению 101,3 кПа (760 мм рт. ст.), в пределах которого перегоняется жидкость или некоторая ее фракция в следующих условиях.

Прибор. Прибор (рисунок 2.2.11.-1) состоит из перегонной колбы (А), прямого холодильника (В), присоединенного к отводной трубке перегонной колбы, и вставной трубки (алонж) (С), присоединенной к концу холодильника. В качестве альтернативы нижний конец холодильника может быть изогнут для того, чтобы исключить алонж. В горловину колбы помещают термометр таким образом, чтобы верхний конец ртутного резервуара находился на 5 мм ниже нижнего края отводной трубки перегонной колбы. Используют термометр с диапазоном шкалы, близким к 50 °С, с ценой деления 0,2 °С. Во время определения колбу, включая и горловину, предохраняют от охлаждения подходящим экраном.

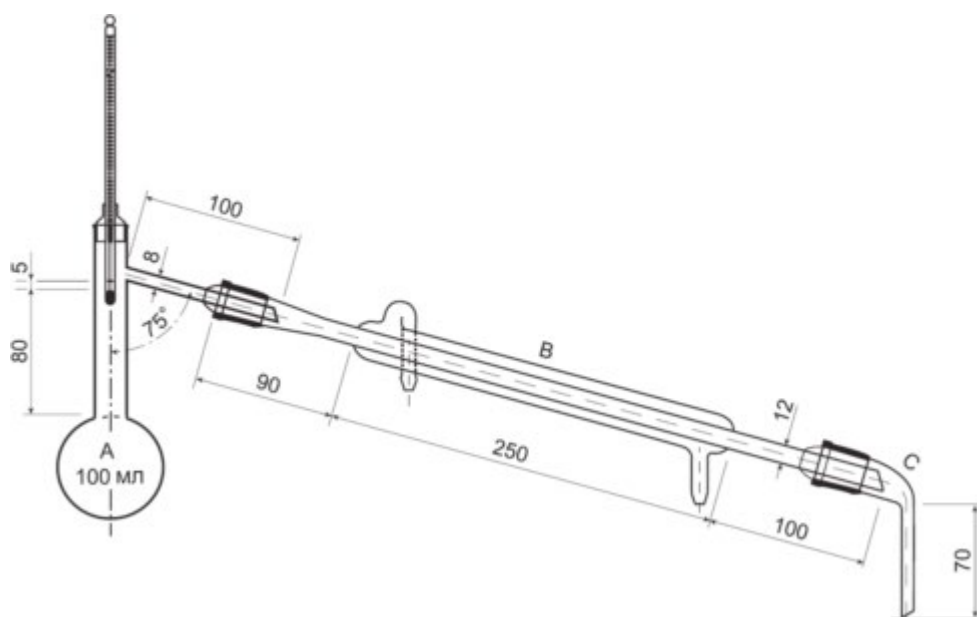


Рисунок 2.2.11.-1. Прибор для определения температурных пределов перегонки (размеры указаны в миллиметрах)

Методика. 50,0 мл испытуемой жидкости и несколько кусочков пористого материала помещают в колбу (А). Для сбора отгона используют цилиндр вместимостью 50 мл с ценой деления 1 мл. Для жидкостей, кипящих при температуре ниже 150 °С, применяют охлаждение циркулирующей водой. Колбу нагревают таким образом, чтобы быстро достичь кипения, и отмечают температуру, при которой в цилиндр поступает первая капля отгона. Устанавливают нагревание, которое обеспечивает перегонку от 2 до 3 мл в минуту, и отмечают температуру, при которой вся жидкость или некоторая ее фракция, объем которой измеряют при температуре 20 °С, отогнаны.

Вносят поправку в наблюдаемую температуру для приведения к нормальному давлению по формуле:

$$t_1 = t_2 + k(101,3 - b),$$

где:

t_1 – исправленная температура;

t_2 – наблюдаемая температура при барометрическом давлении b ;

k – поправочный коэффициент в соответствии с таблицей 2.2.11.-1, если не указано иного;

b – барометрическое давление во время перегонки, в килопаскалях.

Таблица 2.2.11. –1

Коэффициент поправки для приведения к нормальному давлению

Температура перегонки	Поправочный коэффициент k
До 100 °С	0,30
Свыше 100 °С до 140 °С	0,34
Свыше 140 °С до 190 °С	0,38
Свыше 190 °С до 240 °С	0,41
Свыше 240 °С	0,45

01/2013:20212

2.2.12. ТЕМПЕРАТУРА КИПЕНИЯ

Точкой кипения называется скорректированная температура, при которой давление паров жидкости равно 101,3 кПа.

Прибор. В данном случае используется тот же прибор, что и для определения пределов перегонки (2.2.11), за исключением того, что термометр вводится в горло колбы таким образом, чтобы нижний конец ртутного резервуара был на уровне нижнего конца горла перегонной колбы и чтобы сама колба располагалась на пластине из изолирующего материала со сквозным отверстием диаметром 35 мм.

Методика. 20 мл испытуемой жидкости и несколько кусочков пористого материала помещают в колбу (А). Колбу нагревают таким образом, чтобы быстро достичь кипения, и отмечают температуру, при которой жидкость начинает вытекать из отводной трубки в холодильник.

Вносят поправку в наблюдаемую температуру для приведения к нормальному давлению по формуле:

$$t_1 = t_2 + k(101,3 - b),$$

где:

t_1 – исправленная температура;

t_2 – наблюдаемая температура при барометрическом давлении b ;

k – поправочный коэффициент в соответствии с таблицей 2.2.11.-1;

b – барометрическое давление во время перегонки, в килопаскалях.

01/2013:20213

2.2.13. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОДЫ МЕТОДОМ ОТГОНКИ

Прибор (рисунок 2.2.13.-1) состоит из стеклянной круглодонной колбы (А), соединенной трубкой (D) с цилиндрической трубкой (В), снабженной градуированным приемником (Е) и обратным холодильником (С). Цена деления приемника (Е) 0,1 мл. Для соответствующего нагревания целесообразно использовать электрический нагреватель с реостатом или масляную [#](или песчаную)[#] баню. Верхняя часть колбы и соединительная трубка могут быть покрыты теплоизоляцией.

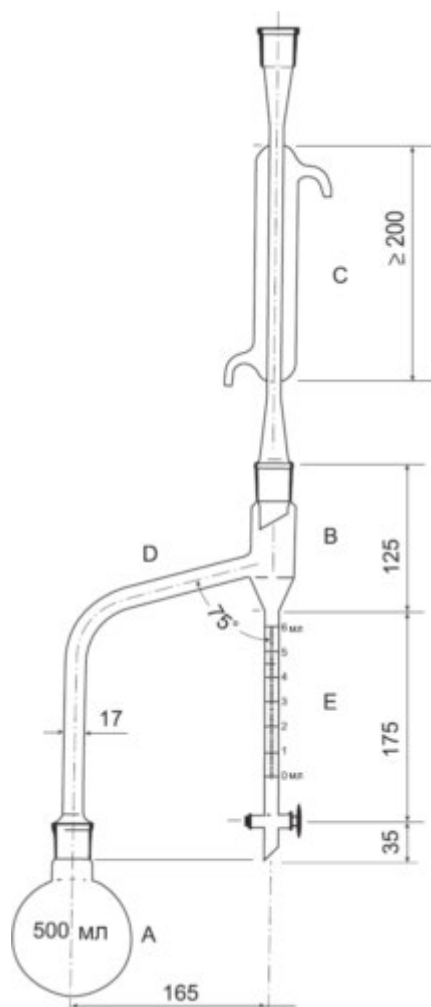


Рисунок 2.2.13.-1. Прибор для определения воды методом отгонки
(размеры указаны в миллиметрах)

Методика. Приемник и холодильник прибора очищают, промывают водой и высушивают.

200 мл *толуола* *P* и около 2 мл *воды* *P* помещают в сухую колбу и перегоняют в течение 2 ч. Колбу охлаждают в течение 30 мин и записывают объем воды с точностью до 0,05 мл. В колбу помещают количество вещества, отвешенного с точностью до 1 %, которое содержит приблизительно от 2 до 3 мл воды. Если вещество имеет пастообразную консистенцию, его взвешивают на кусочке металлической фольги. В колбу вносят несколько кусочков пористого материала и осторожно нагревают в течение 15 мин. Когда толуол начнет кипеть, отгоняют со скоростью около двух капель в секунду, пока большая часть воды не отгонится, а затем увеличивают скорость отгонки до четырех капель в секунду. #Кипячение прекращают, когда объем воды в приемнике перестанет увеличиваться и верхний слой растворителя в приемнике станет прозрачным. #

Когда вода отгонится полностью, внутреннюю трубку холодильника промывают *толуолом* *P*. Нагревание продолжают еще 5 мин, затем нагреватель убирают, дают приемнику охладиться до комнатной температуры и стряхивают все капли воды, которые находятся на стенках приемника. После полного разделения воды и толуола записывают объем воды и определяют ее содержание в миллилитрах на килограмм по формуле:

$$\frac{1000(n_2 - n_1)}{m},$$

где:

n_1 – объем воды, определенный при первом отгоне, в миллилитрах;

n_2 – общий объем отогнанной воды, определенный в обоих отгонах, в миллилитрах;

m – масса испытуемого образца, в граммах.

2.2.14. ТЕМПЕРАТУРА ПЛАВЛЕНИЯ – КАПИЛЛЯРНЫЙ МЕТОД

Температура плавления, определенная капиллярным методом, представляет собой температуру, при которой последняя твердая частичка уплотненного столбика вещества в капиллярной трубке переходит в жидкую фазу.

[#]Весь процесс плавления протекает в течение определенного промежутка времени и определенного интервала температур: начало плавления – появление первой капли жидкости – и конец плавления (температура плавления) – полный переход вещества в жидкое состояние. Этот интервал температур не должен превышать 2 °C, если в частной статье нет других указаний.

Целый ряд органических соединений при плавлении разлагается (происходит резкое изменение внешнего вида вещества, например, вспенивание). Такую температуру называют температурой разложения. Она в значительной мере зависит от скорости нагрева, поэтому при определении температуры разложения в частных статьях указывают скорость нагрева.

Капиллярный метод применяют для определения температуры плавления твердых веществ, легко превращаемых в порошок.[#]

Если есть указание в частной статье, тот же прибор и методику применяют для определения других показателей, таких, как образование мениска или диапазона плавления, характеризующих поведение вещества при плавлении.

Прибор. Составными частями прибора являются:

- подходящий стеклянный сосуд, содержащий жидкость (например, воду, вазелиновое или силиконовое масло), используемый в качестве бани и оснащенный подходящим устройством для нагрева;

- устройство для перемешивания, обеспечивающее однородную температуру внутри бани;

- термометр с меткой погружения и ценой деления не более 0,5 °C. Разность между верхним и нижним делениями термометра в области измеряемой температуры – не более 100 °C;

- запаянные с одного конца капиллярные трубки из бесщелочного прочного стекла диаметром от 0,9 мм до 1,1 мм и толщиной стенок от 0,10 мм до 0,15 мм.

[#]Во время определения температуры плавления ни колба, ни пробирка не должны быть закрыты герметически.[#]

Методика. Если в частной статье нет других указаний, тонкоизмельченное вещество сушат в вакууме над *силикагелем безводным Р* в течение 24 ч. Достаточное количество вещества помещают в капиллярную трубку до получения уплотненного столбика высотой от 4 мм до 6 мм. [#]Необходимое уплотнение вещества при заполнении капиллярной трубки можно получить, если ее несколько раз бросить запаянным концом вниз в стеклянную трубку длиной не менее 1 м, поставленную вертикально на твердую поверхность.[#]

Повышают температуру бани до температуры приблизительно на 10 °C ниже предполагаемой температуры плавления и затем продолжают нагревание со скоростью около 1 °C/мин. Когда температура достигнет значения на 5 °C ниже предполагаемой температуры плавления, помещают капиллярную трубку с веществом в прибор. Для описанного выше прибора капиллярную трубку помещают таким образом, чтобы ее запаянный конец располагался около центра шарика термометра, метка погружения которого находится на уровне поверхности жидкости. Отмечают температуру, при которой последняя твердая частичка переходит в жидкую фазу.

[#]Если в частной статье нет других указаний, нагревание регулируют так, чтобы к моменту плавления была достигнута необходимая скорость подъема температуры:

- от 0,5 до 1 °C/мин – при определении температуры плавления ниже 100 °C;
- от 1 до 1,5 °C/мин – при определении температуры плавления от 100 °C до 150 °C;
- от 1,5 до 2 °C/мин – при определении температуры плавления выше 150 °C;
- от 2,5 до 3,5 °C/мин – для веществ, неустойчивых при нагревании.

Проводят не менее двух определений. За температуру плавления принимают среднее значение. Расхождение между определениями не должно превышать 1 °С.[#]

Градуировка прибора. Для градуировки прибора используют подходящие вещества, пригодные для этих целей.

[#]Допускается применение других приборов, использующих капиллярный метод, если показано, что точность и правильность измерений будут не хуже, чем в случае применения прибора, описанного выше.[#]

01/2013:20215

2.2.15. ТЕМПЕРАТУРА ПЛАВЛЕНИЯ – ОТКРЫТЫЙ КАПИЛЛЯРНЫЙ МЕТОД

Данный метод используют для определения температуры плавления (также известной как температура сдвига или подъема, либо температура разжижения) некоторых веществ.

[#]Открытый капиллярный метод применяют для веществ, имеющих аморфную структуру, не растирающихся в порошок и плавящихся ниже температуры кипения воды, таких как жиры, воск, парафин, вазелин, смолы.[#]

Используют стеклянную капиллярную трубку, открытую с обоих концов, длиной около 80 мм, наружным диаметром от 1,4 мм до 1,5 мм и внутренним диаметром от 1,0 мм до 1,2 мм.

Вещество, предварительно обработанное, как указано в частной статье, помещают в каждую из пяти капиллярных трубок [#](капиллярную трубку, открытую с обоих сторон, погружают в вещество так, чтобы оно заполнило нижнюю часть трубки)[#] в количестве, достаточном для формирования в каждой трубке столбика высотой около 10 мм. Трубки выдерживают определенное время при температуре, указанной в частной статье.

Если не указано иного, вещества с воскообразной консистенцией осторожно полностью расплавляют на водяной бане перед заполнением капиллярных трубок. Трубки выдерживают в течение 2 ч при температуре от 2 °С до 8 °С.

Прикрепляют одну из капиллярных трубок к термометру с ценой деления 0,5 °С таким образом, чтобы вещество находилось в непосредственной близости к шарiku термометра. Термометр с прикрепленной капиллярной трубкой помещают в стакан так, чтобы расстояние между дном стакана и нижней частью шарика термометра составляло 1 см. Стакан наполняют водой таким образом, чтобы высота слоя составляла 5 см. Повышают температуру воды со скоростью 1 °С/мин.

За температуру плавления принимают температуру, при которой вещество начинает подниматься по капиллярной трубке. [#]В тех случаях, когда столбик вещества в капилляре не поднимается, за температуру плавления принимают температуру, при которой столбик вещества в капилляре становится прозрачным.[#]

Повторяют эту операцию с четырьмя другими капиллярными трубками и рассчитывают результат как среднее из пяти показаний.

01/2013:20216

2.2.16. ТЕМПЕРАТУРА ПЛАВЛЕНИЯ – МЕТОД МГНОВЕННОГО ПЛАВЛЕНИЯ

Температуру плавления по методу мгновенного плавления рассчитывают по формуле:

$$\frac{t_1 + t_2}{2},$$

где:

t_1 – первая температура, определяемая в условиях, приведенных ниже;

t_2 – вторая температура, определяемая в условиях, приведенных ниже.

Прибор. Прибор состоит из металлического блока, изготовленного из материала, обладающего высокой теплопроводностью и не взаимодействующего с испытуемым веществом, например, из латуни. Верхняя поверхность блока должна быть плоской и тщательно отполированной. Блок равномерно нагревают по всей массе газовой горелкой с микрорегулировкой или электрическим нагревателем с тонкой регулировкой. Блок имеет достаточно широкую цилиндрическую полость для размещения термометра, столбик ртути которого должен находиться в одном и том же положении как при калибровке, так и при определении температуры плавления испытуемого вещества. Цилиндрическая полость размещена параллельно отполированной верхней поверхности блока и на расстоянии около 3 мм от нее. Прибор градуируют, используя подходящие вещества с известной температурой плавления. *Методика.* Блок быстро нагревают до температуры на 10 °C ниже предполагаемой температуры плавления и затем устанавливают скорость нагревания около 1 °C/мин. Несколько частиц тонко измельченного вещества, высушенного в вакууме над силикагелем безводным P в течение 24 ч, бросают через равные промежутки времени на поверхность блока в непосредственной близости от шарика термометра, очищая поверхность после каждого испытания. Записывают температуру t_1 , при которой вещество плавится мгновенно при соприкосновении с металлом. Останавливают нагревание. Во время охлаждения через равные временные промежутки бросают несколько частичек вещества на поверхность блока, очищая ее после каждого испытания. Записывают температуру t_2 , при которой вещество прекращает мгновенно плавиться при соприкосновении с металлом.

Градуировка прибора. Для градуировки прибора используют подходящие вещества, пригодные для этих целей.

01/2013:20217

2.2.17. ТЕМПЕРАТУРА КАПЛЕПАДЕНИЯ

Температура каплепадения представляет собой температуру, при которой в условиях, приведенных ниже, первая капля расплавленного испытуемого вещества падает из чашечки.

[#]Определение температуры каплепадения проводят для веществ, не растапливающихся в порошок и плавящихся ниже температуры кипения воды, таких как жиры, воск, парафин, вазелин, смолы.[#]

Если в частной статье нет других указаний, определение проводят по методу А. Замена метода А методом В должна быть валидирована.

МЕТОД А

Прибор. Прибор (рисунок 2.2.17.-1) состоит из двух металлических гильз (А) и (В), соединенных одна с другой посредством резьбы. Гильза (А) прикреплена к ртутному термометру. В нижней части гильзы (В) с помощью двух уплотнителей (Е) свободно закреплена металлическая чашечка (F). Точное положение чашечки определяется фиксаторами (D) длиной 2 мм, которые используются также для центровки термометра. Отверстие (C) в стенке гильзы (В) предназначено для выравнивания давления. Отводящая поверхность чашечки должна быть плоской, а края выходного отверстия – под прямым углом к поверхности. Нижняя часть ртутного термометра имеет форму и размер, как показано на рисунке; рабочий диапазон термометра от 0 °C до 110 °C и расстояние на шкале в 1 мм соответствует разности температур в 1 °C. Ртутный шарик термометра имеет диаметр $(3,5 \pm 0,2)$ мм и высоту $(6,0 \pm 0,3)$ мм. Прибор устанавливают по оси пробирки длиной около 200 мм и наружным диаметром около 40 мм.

Прибор прикрепляют к пробирке с помощью пробки, в которую вставлен термометр и которая имеет боковую прорезь. Отверстие чашечки должно находиться на расстоянии около 15 мм от дна пробирки. Все устройство погружают в стакан вместимостью около 1 л, заполненный водой. Дно пробирки должно находиться на расстоянии около 25 мм от дна стакана. Уровень воды должен достигать верхней части гильзы (А). Для равномерного распределения температуры в стакане используют мешалку.

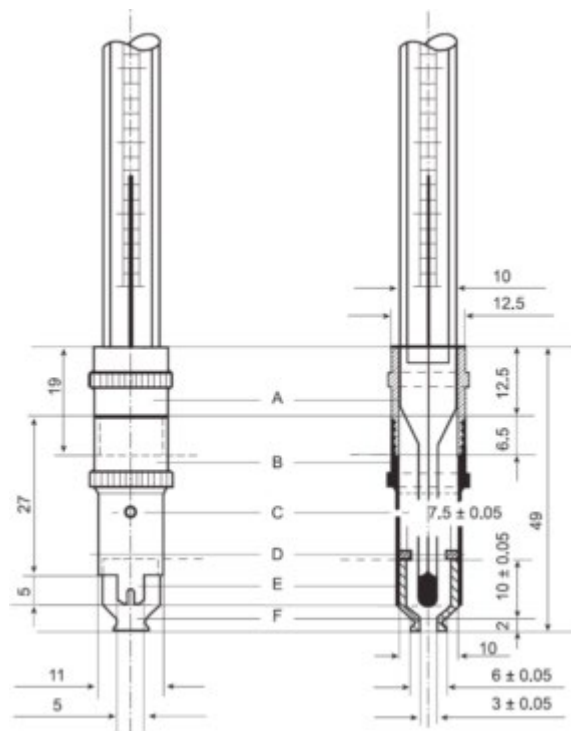
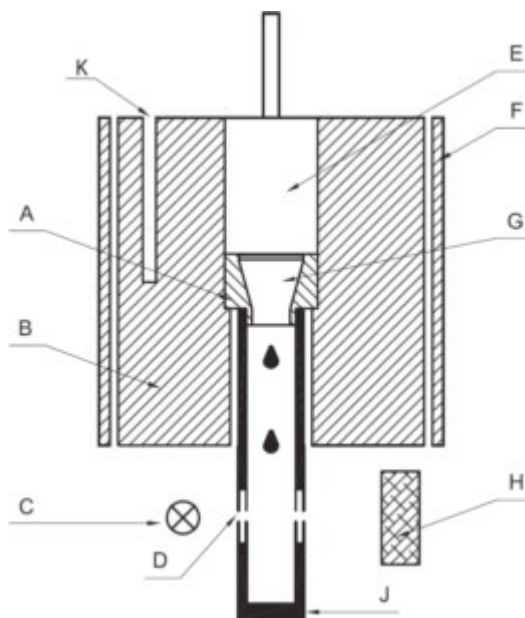


Рисунок 2.2.17.-1. Прибор для определения температуры каплепадения
(размеры указаны в миллиметрах)

Методика. Испытуемое вещество подготавливают, как указано в частной статье. Заполняют чашечку до краев испытуемым веществом. Избыток вещества удаляют с обеих сторон шпателем. После того, как гильзы (A) и (B) соединены, проталкивают чашечку внутрь на ее место в гильзе (B) до упора. Удаляют шпателем вещество, выдавленное термометром. Прибор помещают в водяную баню, как описано выше. Водяную баню нагревают до температуры примерно на 10 °C ниже предполагаемой температуры каплепадения и устанавливают скорость нагрева около 1 °C/мин. Отмечают температуру падения первой капли. Проводят не менее трех определений, каждый раз с новым образцом вещества. Разность между показаниями не должна превышать 3 °C. Среднее из полученных значений представляет собой температуру каплепадения.

МЕТОД В – АВТОМАТИЧЕСКИЙ МЕТОД

Прибор. Прибор (рисунок 2.2.17.-2) состоит из сборного картриджа, включающего держатель чашечки, в котором свободно фиксируется чашечка с испытуемым образцом, и приемного стаканчика с горизонтальной щелью для света, фиксирующегося ниже чашечки. Этот узел помещают в нагревательный блок. Блок – это металлический цилиндр с цилиндрическим отверстием, расположенным вдоль вертикальной оси, в который помещается сборный картридж. Кроме того, присутствует второе более узкое вертикальное отверстие, в которое помещается температурный датчик, располагающийся на одном уровне с чашечкой с испытуемым образцом. Снаружи нагревательного блока располагается электрический нагревательный элемент. Ниже нагревательного блока находится лампа, расположенная таким образом, что луч света проходит сквозь горизонтальную щель приемного рукава и падает на фотоэлектрический датчик, расположенный напротив. Нагревательный блок с помощью нагревательного элемента может быть точно выведен на заданную температуру и, после начального изотермического периода, способен медленно и с постоянной скоростью нагреваться.



А – держатель чашечки; В – нагревательный блок; С – источник света;
 D – щель; E – сборный картридж; F – нагревательный элемент;
 G – чашечка с испытуемым образцом; H – фотоэлектрический датчик;
 J – приемный стаканчик; K – температурный датчик.

Рисунок 2.2.17.-2. Пример прибора автоматического определения температуры каплепадения

Методика. Испытуемый образец расплавляют, помещают в чашечку согласно указаниям частной статьи и проводят испытание, как указано ниже или в соответствии с инструкциями производителя. Избыток вещества удаляют с обеих сторон шпателем. Перед проведением испытания испытуемый образец выдерживают при температуре и в течение времени, указанных в частной статье. Чашечку проталкивают в держатель и наталкивают приемный рукав на чашечку. Собранный картридж помещают в нагревательный блок. Устанавливают начальную температуру и скорость последующего нагревания, как указано в частной статье, и начинают проведение испытания. Автоматически регистрируется температура, при которой первая капля расплавленного испытуемого образца капает из отверстия в дне чашечки, прерывая луч света, падающий на фотоэлектрический датчик.

Градуировка прибора. Прибор используют в соответствии с инструкциями производителя и регулярно проводят предписанные градуировки и проверки пригодности системы в зависимости от использования прибора и испытуемых образцов. В качестве сертифицированных стандартных веществ обычно используют бензойную кислоту и бензофенон. Могут быть использованы и другие вещества при условии, что они не обладают полиморфизмом. Градуировку проводят в соответствии с инструкциями производителя или следующим образом. Подготавливают по три чашечки каждым из двух сертифицированных веществ. Помещают чашечки на чистую поверхность. В каждую чашечку помещают небольшое количество испытуемого образца и прижимают ко дну с помощью стержня (диаметр около 4,5 мм). Необходимо убедиться, что отверстие полностью заполнено. Далее наполняют чашечку примерно до половины, уплотняют испытуемый образец стержнем (диаметр около 9 мм) и, уплотняя, заполняют чашечку до краев.

Температурная программа для бензойной кислоты: начальная температура – 118,0 °C; скорость нагрева – 0,2 °C/мин; конечная температура – 126,0 °C. После установки чашечки при температуре 118 °C выдерживают в течение 30 с и продолжают нагревание.

Температурная программа для бензофенона: начальная температура – 44,0 °C; скорость нагрева – 0,2 °C/мин; конечная температура – 56,0 °C. После установки чашечки при температуре 44 °C выдерживают в течение 30 с и продолжают нагревание.

Пригодность системы: 3 единичных результата испытания не должны отличаться более чем на 0,3 °C от среднего значения.

Рассчитывают скорректированную среднюю температуру (T_2):

$$T_1 - F,$$

где:

T_1 – средняя температура каплепадения, рассчитанная по трем испытаниям, °С;

F – компенсирование различия между температурой испытуемого образца и температурой в месте измерения температуры; это значение сильно зависит от конструкции прибора автоматического определения температуры каплепадения и представляется производителем.

Принимая во внимание температуру каплепадения (T_0) сертифицированного вещества, точность температурной шкалы считается приемлемой, если $|T_2 - T_0|$ не более 0,3 °С.

01/2013:20218

2.2.18. ТЕМПЕРАТУРА ЗАТВЕРДЕВАНИЯ

Температура затвердевания представляет собой максимальную температуру, при которой происходит затвердевание переохлажденной жидкости.

Прибор. Прибор (рисунок 2.2.18.-1) состоит из пробирки для проведения определения диаметром около 25 мм и длиной около 150 мм, помещенной вовнутрь другой пробирки диаметром около 40 мм и длиной около 160 мм. Внутренняя пробирка закрыта пробкой, снабженной термометром длиной около 175 мм с ценой деления 0,2 °С, который закреплен таким образом, чтобы ртутный шарик находился на уровне около 15 мм от дна пробирки. В пробке имеется отверстие, через которое проходит вал мешалки, изготовленный из стеклянного стержня или другого подходящего материала, загнутый на конце под прямым углом в виде петли, внешний диаметр которой около 18 мм. Внутреннюю пробирку вместе с внешней пробиркой размещают в центре сосуда вместимостью 1 л, в который помещают подходящую охлаждающую жидкость, уровень которой находится в пределах 20 мм от верхнего края сосуда. Охлаждающая баня также должна быть снабжена термометром.

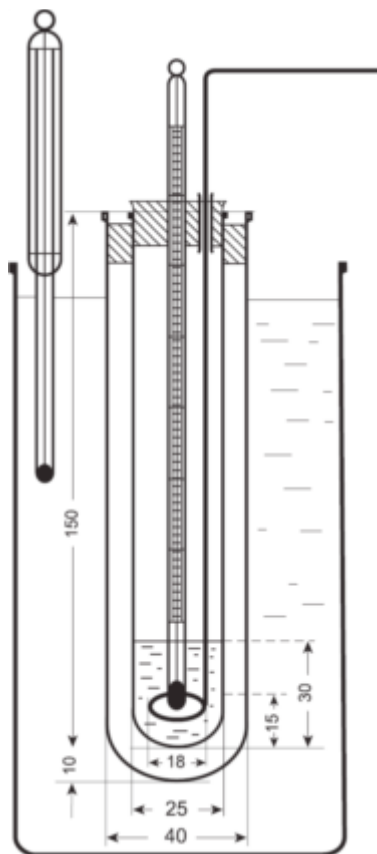


Рисунок 2.2.18.-1. Прибор для определения температуры затвердевания

Методика. Во внутреннюю пробирку помещают достаточное количество жидкости или предварительно расплавленного вещества, чтобы покрыть ртутный шарик термометра (ртутный шарик термометра должен находиться посередине слоя испытуемого вещества), и при быстром охлаждении определяют приблизительную температуру затвердевания. Внутреннюю пробирку помещают в водяную баню с температурой на 5 °С выше приблизительно определенной температуры до полного расплавления кристаллов. Затем заполняют сосуд водой или насыщенным раствором натрия хлорида с температурой на 5 °С ниже ожидаемой температуры затвердевания. Внутреннюю пробирку вместе с внешней помещают в сосуд, убеждаются в наличии зародышей кристаллов и тщательно перемешивают испытуемый образец в течение затвердевания. Отмечают наиболее высокую температуру, наблюдаемую во время затвердевания.

[#]Вначале происходит постепенное понижение температуры, затем, при появлении твердой фазы, она остается некоторое время постоянной или повышается перед тем, как стать постоянной (в этот момент прекращают перемешивание), а затем снова падает. Если вещество остается жидким при ожидаемой температуре затвердевания, его затвердевание вызывают потиранием о стенки внутренней пробирки термометром или внесением кристаллика испытуемого вещества.[#]

01/2013:20219

2.2.19. АМПЕРОМЕТРИЧЕСКОЕ ТИТРОВАНИЕ

При амперометрическом титровании конечную точку титрования определяют по изменению тока между погруженными в испытуемый раствор электродами (один из них поляризующийся индикаторный, а другой неполяризующийся электрод сравнения, либо два поляризующихся индикаторных электрода) как функции от количества прибавленного титранта при постоянной и контролируемой разности потенциалов.

Потенциал индикаторного электрода должен обеспечивать предельный диффузионный ток для электрохимически активного соединения.

Прибор. Прибор состоит из источника постоянного тока с регулируемым напряжением и чувствительного микроамперметра. Детектирующая система обычно состоит из индикаторного электрода (например, платинового, ртутного капельного, вращающегося дискового или графитового электрода) и электрода сравнения (например, каломельного или хлоридсеребряного электрода).

Иногда используют трехэлектродную систему, состоящую из индикаторного электрода, электрода сравнения и поляризованного вспомогательного электрода.

Методика. Электроды помещают в испытуемый раствор, устанавливают постоянный потенциал, указанный в частной статье, и прибавляют титрант порциями. По значениям силы начального тока и значениям, полученным в процессе титрования, строят график зависимости силы тока от количества прибавляемого титранта. Титрант прибавляют последовательно, не менее чем тремя порциями, составляющими в сумме около 80 % от теоретического объема, соответствующего предполагаемой точке эквивалентности. Три полученных значения силы тока должны укладываться на прямую. Продолжают последовательно прибавлять титрант после предполагаемой точки эквивалентности не менее трех раз. Полученные значения должны укладываться на прямую. Точка пересечения этих двух прямых представляет конечную точку титрования.

[#]При амперометрическом титровании с двумя индикаторными электродами (без электрода сравнения) оба электрода изготовлены из одного и того же материала и имеют одинаковую относительно небольшую поверхность. В этом случае регистрируют всю кривую титрования и определяют конечную точку титрования по минимальному значению силы тока. Наибольшая точность амперометрического титрования достигается при потенциале на индикаторном электроде, соответствующем предельному диффузионному току.

При амперометрическом титровании, как правило, концентрация титранта в 10–20 раз превышает концентрацию определяемого вещества.

В фармакопейном анализе амперометрическое титрование целесообразно применять в нитритометрии при определении воды полумикрометодом (по К. Фишеру) и в йодометрии.

В частных статьях необходимо указывать параметры, необходимые для корректного выполнения методики: типы электродов, задаваемый потенциал, массу навески вещества, концентрацию титранта, температуру и т.д.[#]

01/2013:20221

2.2.21. ФЛУОРИМЕТРИЯ

Флуориметрия – метод анализа, основанный на измерении интенсивности флуоресценции, излучаемой испытуемым образцом, относительно флуоресценции, излучаемой стандартным образцом.

Методика. Испытуемый образец растворяют в растворителе или смеси растворителей, указанных в частной статье. Полученный раствор помещают в кювету или камеру флуориметра и облучают возбуждающим светом, имеющим как можно большую монохроматичность, при длине волны, указанной в частной статье.

Измеряют интенсивность испускаемого света под углом 90 ° относительно возбуждающего света после прохождения сквозь фильтр, пропускающий избирательно свет с длиной волны максимальной флуоресценции. Могут быть использованы и другие типы приборов при условии получения аналогичных результатов.

При проведении количественных определений в прибор помещают растворитель или смесь растворителей, используемых для растворения испытуемого образца, и устанавливают регистрирующее устройство прибора на нулевое значение. Затем помещают раствор стандартного образца и устанавливают чувствительность прибора таким образом, чтобы отклик показаний был больше 50 %. Если было проведено вторичное регулирование с изменением ширины щели, повторно устанавливают регистрирующее устройство прибора на нулевое значение и снова измеряют интенсивность флуоресценции раствора стандартного образца. Затем в прибор помещают испытуемый раствор с неизвестной концентрацией и регистрируют показания прибора. Концентрацию (c_x) испытуемого образца в растворе рассчитывают по формуле:

$$c_x = \frac{I_x c_s}{I_s},$$

где:

c_x – концентрация испытуемого образца в растворе;

c_s – концентрация стандартного образца в растворе;

I_x – интенсивность флуоресценции раствора испытуемого образца;

I_s – интенсивность флуоресценции раствора стандартного образца.

Если значения интенсивности флуоресценции не строго пропорциональны значениям концентрации растворов, измерения могут проводиться с использованием градуировочного графика.

В некоторых случаях измерения могут проводиться с использованием фиксированного стандарта (например, флуоресцирующего стекла или раствора флуоресцирующей жидкости). В таких случаях концентрация испытуемого вещества может определяться с использованием градуировочного графика, построенного в тех же условиях.

01/2013:20222

2.2.22. АТОМНО-ЭМИССИОННАЯ СПЕКТРОМЕТРИЯ

ОСНОВНОЙ ПРИНЦИП

Атомная эмиссия – это процесс испускания электромагнитного излучения возбужденными атомами или ионами. В атомно-эмиссионной спектроскопии испытуемый образец подвергается воздействию достаточно высоких температур, вызывающих как диссоциацию на атомы, так и значительное количество соударений, приводящих к возбуждению и ионизации атомов испытуемого образца. Атомы и ионы, будучи в возбужденном состоянии, способны возвращаться в основное энергетическое состояние с передачей тепловой или излучающей энергии и испусканием (эмиссией) электромагнитного излучения. Эмиссионный спектр элемента содержит несколько больше линий, чем соответствующий абсорбционный спектр.

Атомно-эмиссионная спектроскопия – это метод определения содержания химического элемента в испытуемом образце посредством измерения интенсивности одной из эмиссионных линий атомного пара элемента. Определение проводят при длине волны, соответствующей выбранной эмиссионной линии.

В данной статье описан только метод атомизации с использованием пламени. Метод атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой (АЭС-ИСП) описан в другой общей статье.

ПРИБОР

Главными составляющими частями прибора являются:

- система введения и распыления образца;
- пламенный генератор атомного пара;
- монохроматор;
- детектор;
- блок сбора данных.

Для получения пламени могут быть использованы водород, ацетилен, пропан или бутан в сочетании с кислородом или воздухом. Выбор генератора атомного пара является критическим моментом, так как он должен обеспечивать достаточную энергию для возбуждения и распыления атомов. Атомные спектры, полученные с использованием пламенного генератора атомного пара, имеют преимущества, будучи более простыми, по сравнению со спектрами, полученными с использованием генераторов атомного пара других типов, однако основным лимитирующим фактором в его использовании является недостаточная мощность для возбуждения атомов многих элементов. Предпочтительным растворителем для приготовления испытуемых растворов и растворов сравнения является подкисленная вода, но могут быть использованы и органические растворители, если доказано, что они не влияют на стабильность пламени.

ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ

Спектральную интерференцию уменьшают или исключают путем выбора для измерения подходящей линии спектра либо подбора ширины щели. Физическую интерференцию корректируют разведением раствора испытуемого образца, подбором матрицы или использованием метода стандартных добавок. Химическую интерференцию уменьшают использованием химических модификаторов или ионизационных буферов.

ЭФФЕКТ ПАМЯТИ

Эффект памяти, вызванный остатками аналита в приборе, может быть лимитирован тщательным промыванием прибора между испытаниями, разведением, если это возможно, измеряемых растворов, уменьшая таким образом содержание соли, и как можно быстрее впрыскиванием растворов.

МЕТОД

По возможности рекомендуется использовать пластмассовую лабораторную посуду.

Атомно-эмиссионный спектрометр выводят на режим в соответствии с инструкцией завода-производителя и устанавливают необходимую длину волны. Устанавливают параметры эксперимента (температура пламени, настройка горелки, использование ионного буфера, концентрация растворов), необходимые для определения анализируемого элемента, учитывая матрицу образца. В генератор атомного пара вводят холостой раствор

и настраивают регистрирующее устройство на нулевое значение или на значение холостого опыта. Вводят раствор сравнения определяемого элемента с наибольшей концентрацией и настраивают прибор так, чтобы получить регистрируемый сигнал в оптимальном диапазоне измерений.

Предпочтительно, чтобы концентрации растворов находились в линейной части градуировочного графика. Если это невозможно, могут быть использованы криволинейные градуировочные графики с применением подходящего программного обеспечения.

Определения проводят путем сравнения со стандартными растворами с известными концентрациями определяемого элемента методом градуировочного графика (метод I) или методом стандартных добавок (метод II).

МЕТОД I – МЕТОД ГРАДУИРОВОЧНОГО ГРАФИКА

Обычно для измерений готовят и используют три раствора сравнения определяемого элемента и холостой раствор.

Раствор испытуемого образца (испытуемый раствор) готовят, как указано в частной статье. Не менее трех растворов сравнения определяемого элемента готовят так, чтобы диапазон концентраций этих растворов включал ожидаемое значение концентраций определяемого элемента в испытуемом растворе. Для количественного анализа оптимальные значения калибровки должны находиться в диапазоне от 0,7 до 1,3 от ожидаемого содержания определяемого элемента или от предела, указанного в частной статье. Для анализа на содержание примесей оптимальные значения калибровки должны находиться в диапазоне от предела обнаружения до 1,2 от предельного значения для определяемого элемента. Любые реактивы, используемые при приготовлении испытуемого раствора, прибавляют в холостой раствор и растворы сравнения в таких же количествах, как и в испытуемый раствор.

Вводят растворы, используя одинаковое количество повторов, для получения устойчивых результатов.

Расчет. Строят градуировочный график зависимости средних значений эмиссий растворов сравнения от концентрации, по которому определяют концентрацию элемента в испытуемом растворе.

МЕТОД II – МЕТОД СТАНДАРТНЫХ ДОБАВОК

Раствор испытуемого образца (испытуемый раствор) готовят, как указано в частной статье. Равные объемы испытуемого раствора помещают не менее, чем в три мерные колбы одинакового объема. Во все мерные колбы кроме одной прибавляют пропорционально увеличивающиеся объемы раствора сравнения с известной концентрацией определяемого элемента, получая серию растворов, содержащих устойчиво возрастающие концентрации элемента, значения эмиссии которого, если это возможно, находятся в линейной области градуировочного графика. Доводят содержимое каждой колбы растворителем до метки.

Вводят растворы, используя одинаковое количество повторов, для получения устойчивых результатов.

Расчет. Методом наименьших квадратов рассчитывают линейное уравнение графика и по нему – концентрацию определяемого элемента в испытуемом растворе.

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДА

Через определенные временные интервалы верифицируют удовлетворительное исполнение метода, описанного в частной статье.

ЛИНЕЙНОСТЬ

Готовят и анализируют не менее четырех растворов сравнения, концентрация которых находится в пределах диапазона градуировки, и холостой раствор. Проводят не менее пяти повторов.

Используя все полученные данные, рассчитывают линейное уравнение графика методом наименьших квадратов. Строят кривую регрессии, отмечая средние значения, измеренные значения и доверительный интервал градуировочного графика. Метод является пригодным при условии соблюдения следующих требований:

- коэффициент корреляции должен быть не менее 0,99;
- на градуировочном графике погрешности каждого калибровочного уровня должны быть распределены случайным образом.

Рассчитывают среднее значение и относительное стандартное отклонение для наименьшего и наибольшего калибровочного уровня.

В случае если отношение рассчитанного стандартного отклонения наименьшего и наибольшего калибровочного уровня менее 0,5 или более 2,0, то более точная оценка градуировочного графика может быть получена с использованием взвешенной линейной регрессии. Линейная и квадратичная весовая функции применяются к полученным данным для нахождения наиболее подходящей для использования весовой функции. Если средние значения при сравнении с градуировочным графиком проявляют отклонение от линейности, используют двухмерную линейную регрессию.

ПРАВИЛЬНОСТЬ

Предпочтительно верифицировать правильность с использованием сертифицированных стандартных образцов. Если это невозможно, проверяют открываемость.

Открываемость. В случае методик количественного определения открываемость должна быть от 90 % до 110 %. Для других определений, например для определения следовых количеств элемента, открываемость должна быть от 80 % до 120 % от теоретического значения. Открываемость может быть определена с использованием подходящего раствора сравнения (матричного раствора), содержащего известное количество аналита (средняя концентрация градуировочного графика).

СХОДИМОСТЬ

Сходимость должна быть не более 3 % для количественного определения и не более 5 % для испытания на содержание примесей.

ПРЕДЕЛ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Удостоверяются, что предел количественного определения (например, определенный с использованием приближения 10σ) ниже измеряемого значения.

01/2013:20223

2.2.23. АТОМНО-АБСОРБЦИОННАЯ СПЕКТРОМЕТРИЯ

ОСНОВНОЙ ПРИНЦИП

Атомная абсорбция – это процесс поглощения электромагнитного излучения специфической длины волны атомом в основном состоянии с переходом в возбужденное состояние. Атомы в основном состоянии поглощают энергию с резонансной частотой, и вследствие такого резонансного поглощения электромагнитное излучение ослабляется. Поглощенная энергия фактически прямо пропорциональна количеству присутствующих атомов.

Данная глава приводит общую информацию и определяет порядок действия при определении элементов атомно-абсорбционной спектроскопией либо с помощью атомизации с использованием пламени, электротермического испарения в графитовой печи, получения гидридов либо методом холодного пара для определения ртути.

Атомно-абсорбционная спектроскопия – это метод определения концентрации элемента в испытуемом образце путем измерения поглощения электромагнитного излучения атомным паром элемента испытуемого образца. Испытание проводят при длине волны одной из линий поглощения (резонансных линий) определяемого элемента. Количество поглощенного излучения, в соответствии с законом Бугера-Ламберта-Бера, пропорционально концентрации элемента.

ПРИБОР

Основными составляющими частями прибора являются:

- источник излучения;
- система введения и распыления образца;
- атолизатор;
- монохроматор или полихроматор;
- детектор;
- блок сбора данных.

Прибор обычно оснащается системой коррекции фона. В качестве источника излучения используют лампы с полым катодом (ЛПК, *HCL – hollow-cathode lamp*) и безэлектродные газоразрядные лампы (БЭГЛ, *EDL – electrodeless discharge lamp*). Излучение таких ламп состоит из спектра, представляющего собой очень узкие линии с полушириной около 0,002 нм.

Существует три типа атомизаторов:

– *Пламенный метод*

Пламенный атомизатор состоит из системы распыления с пневматическим приспособлением для получения аэрозоля, регулятора газа и горелки. Для получения температуры от 2000 К до 3000 К используют различные смеси горючего газа (пропан, водород и ацетилен) и окислителя (воздух и оксид азота). Конфигурацию горелки адаптируют под используемые газы, скорость подачи газа регулируется. Образцы распыляют, используя подкисленную воду как предпочтительный растворитель для приготовления испытуемых растворов и растворов сравнения. Могут быть использованы и органические растворители, если гарантировано, что они не влияют на стабильность пламени.

– *Метод электротермической атомизации*

Основными составляющими электротермического атомизатора являются графитовая трубчатая печь и источник электроэнергии. При использовании графитовой трубчатой печи происходит полная атомизация образца и атомный пар удерживается на пути излучения в течение длительного времени, что улучшает предел определения. Образцы (жидкости и твердые вещества) вводят непосредственно в графитовую трубчатую печь, которая нагревается постепенно по заданной программе, сначала высушивая образец, затем удаляя основные компоненты матрикса путем пиролиза, после чего атомизируя весь анализ. Очищают печь, нагревая ее до температуры более высокой, чем температура атомизации. Продувание графитовой печи инертным газом во время пиролиза приводит к более качественному процессу атомизации.

– *Метод холодного пара и гидридный метод*

Атомный пар может быть получен и вне спектрометра. Такой способ получения атомного пара используют в методе холодного пара при определении ртути или для определения таких элементов, образующих гидриды, как мышьяк, сурьма, висмут, селен и олово. В случае определения ртути, атомы генерируют химическим восстановлением с помощью хлорида олова или боргидрида натрия, после чего атомный пар быстро переносят с помощью инертного газа в холодную кварцевую кювету, расположенную на пути излучения, испускаемого лампой. Гидриды, генерированные таким образом, переносятся с помощью инертного газа в горячую кювету, где они диссоциируют на атомы.

ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ

При измерениях атомной абсорбции могут иметь место химическая, физическая, ионизационная и спектральная интерференции. Химическую интерференцию компенсируют использованием модификаторов матрикса или высвобождающих агентов либо использованием высоких температур пламени оксид азота – ацетилен. Ионизационную интерференцию компенсируют использованием специальных ионизационных буферов (например, лантановых или цезиевых). Физическую интерференцию, обусловленную высоким содержанием соли или вязкостью, компенсируют, используя разведение образца, посредством метода стандартных добавок или подбором матрикса. Спектральная интерференция происходит при перекрывании резонансных линий, и для ее исключения используют другую резонансную линию. Использование коррекции фона Зеемана также компенсирует спектральную интерференцию и помехи, связанные с поглощением излучения молекулами, особенно при

использовании метода электротермической атомизации. Также к спектральной интерференции может приводить использование многоэлементных ламп с полым катодом. Специфическое или неспецифическое поглощение измеряют в спектральном диапазоне, определяемом выбранной шириной щели монохроматора (0,2–2 нм).

КОРРЕКЦИЯ ФОНА

Рассеивание и фон увеличивают значение измеряемого поглощения при атомизации пламенем или при электротермической атомизации. Поглощение фоном охватывает широкий диапазон длин волн, в то время как атомы поглощают в очень узких диапазонах порядка 0,005–0,02 нм. Поглощение фоном может быть скорректировано использованием контрольного раствора, имеющего точно такой же состав, что и раствор образца, за исключением определяемого элемента, что, однако, часто является неосуществимым. При электротермической атомизации температура пиролиза должна быть подобрана так, чтобы исключить продукты разложения матрикса, вызывающие фоновое поглощение. Коррекция фона может быть проведена также с использованием двух различных источников энергии: лампы с полым катодом, с помощью которой измеряют общее поглощение (элемент + фон), и дейтериевой лампы с непрерывной эмиссией, с помощью которой измеряют фоновое поглощение. Для коррекции фона сигнал, полученный от дейтериевой лампы, вычитают из сигнала, полученного от лампы с полым катодом. Этот способ лимитирован спектральным диапазоном дейтериевой лампы (от 190 нм до 400 нм). Фоновое поглощение также может быть найдено путем измерения поглощения при двух длинах волн: резонансной линии и длине волны, близкой к резонансной, но при которой не наблюдается поглощения образцом, и последующим вычитанием из поглощения резонансной линии поглощения второй длины волны.

Еще один способ коррекции фона – эффект Зеемана (основан на расщеплении Зеемана линии поглощения в магнитном поле). Данный способ особенно полезен в случае, если фон имеет тонкую структуру, а также позволяет значительно скорректировать фон в диапазоне от 185 нм до 900 нм.

ВЫБОР УСЛОВИЙ ПРОВЕДЕНИЯ ИСПЫТАНИЯ

После подбора подходящей длины волны и ширины щели для определяемого элемента рассматривают следующие моменты:

- коррекцию неспецифического фонового поглощения;
- необходимость прибавления химических модификаторов или ионизационных буферов к образцу, а также к контрольному раствору и растворам сравнения;
- разведение образца (например, для минимизации физической интерференции);
- детали температурной программы, предварительный нагрев, высушивание, пиролиз, атомизацию, постатомизацию со временем линейного нарастания и временем удерживания;
- расход инертного газа;
- модификаторы матрикса для электротермической атомизации (печь);
- химические восстанавливающие реагенты для определения ртути или других гидридобразующих элементов вместе с температурой кюветы с холодным паром или температурой нагреваемой кюветы;
- технические требования по исполнению печи (камера, платформа Львова и другие).

МЕТОД

По возможности рекомендуется использовать пластмассовую лабораторную посуду. Приготовление образцов может включать растворение, варку (преимущественно с использованием микроволнового излучения), стадию прокаливания или их сочетание для того, чтобы очистить матрикс образца и/или удалить углеродсодержащие вещества. Если процесс происходит в открытой системе, если в частной статье не указано иного, температура прокаливания не должна превышать 600 °С по причине летучести некоторых металлов. Атомно-абсорбционный спектрометр выводят на режим в соответствии с инструкцией завода-производителя и устанавливают необходимую длину волны. В генератор атомного пара вводят холостой раствор и настраивают регистрирующее

устройство на максимум пропускания. Значение холостого опыта может быть найдено при использовании растворителя для вывода прибора на нулевое значение. Вводят раствор сравнения определяемого элемента с наибольшей концентрацией и настраивают прибор так, чтобы получить максимальный регистрируемый сигнал. Во избежание загрязнения и эффекта памяти тщательно промывают прибор. После завершения анализа прибор промывают *водой Р* или подкисленной водой.

В случае использования техники ввода твердых проб, все условия проведения испытания описывают в частной статье.

Предпочтительно, чтобы концентрации растворов находились в линейной части градуировочного графика. Если это невозможно, могут быть использованы криволинейные градуировочные графики с применением подходящего программного обеспечения.

Определения проводят путем сравнения со стандартными растворами с известными содержаниями определяемого элемента или методом градуировочного графика (метод I), или методом стандартных добавок (метод II).

МЕТОД I – МЕТОД ГРАДУИРОВОЧНОГО ГРАФИКА

Обычно для измерений готовят и используют три раствора сравнения определяемого элемента и холостой раствор.

Испытуемый раствор готовят, как указано в частной статье. Не менее трех растворов сравнения определяемого элемента готовят так, чтобы диапазон концентраций этих растворов включал ожидаемое значение концентрации определяемого элемента в испытуемом растворе. Для количественного анализа оптимальные значения калибровки должны находиться в диапазоне от 0,7 до 1,3 от ожидаемого содержания определяемого элемента или от предела, указанного в частной статье. Для анализа на содержание примесей оптимальные значения калибровки должны находиться в диапазоне от предела обнаружения до 1,2 от предельного значения для определяемого элемента. Любые реактивы, используемые при приготовлении испытуемого раствора, прибавляют в холостой раствор и растворы сравнения в таких же количествах, как и в испытуемый раствор.

Вводят растворы, используя одинаковое количество повторов, для получения устойчивых результатов.

Расчет. Строят градуировочный график зависимости средних значений поглощений растворов сравнения от концентрации, по которому определяют концентрацию элемента в испытуемом растворе.

МЕТОД II – МЕТОД СТАНДАРТНЫХ ДОБАВОК

Испытуемый раствор готовят, как указано в частной статье. Равные объемы испытуемого раствора помещают не менее, чем в три мерные колбы одинакового объема. Во все мерные колбы кроме одной прибавляют пропорционально увеличивающиеся объемы раствора сравнения с известной концентрацией определяемого элемента, получая серию растворов, содержащих устойчиво возрастающие концентрации определяемого элемента, получая, если это возможно, значения в линейной области кривой. Доводят содержимое каждой колбы растворителем до метки.

Вводят растворы, используя одинаковое количество повторов, для получения устойчивых результатов.

Расчет. Методом наименьших квадратов находят линейное уравнение графика и по нему рассчитывают концентрацию определяемого элемента в испытуемом растворе.

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДА

Через определенные временные интервалы верифицируют удовлетворительное исполнение метода, описанного в частной статье.

ЛИНЕЙНОСТЬ

Готовят и анализируют не менее четырех растворов сравнения, концентрация которых находится в пределах диапазона градуировки, и холостой раствор. Проводят не менее пяти повторов.

Используя все полученные данные, рассчитывают линейное уравнение графика методом наименьших квадратов. Строят кривую регрессии, отмечая средние значения, измеренные значения и доверительный интервал градуировочного графика. Метод является пригодным при условии соблюдения следующих требований:

- коэффициент корреляции должен быть не менее 0,99;
- на градуировочном графике погрешности каждого калибровочного уровня должны быть распределены случайным образом.

Рассчитывают среднее значение и относительное стандартное отклонение для наименьшего и наибольшего калибровочного уровня.

В случае если отношение рассчитанного стандартного отклонения наименьшего и наибольшего калибровочного уровня менее 0,5 или более 2,0, может быть получена более точная оценка градуировочного графика с использованием взвешенной линейной регрессии. И линейная, и квадратичная весовая функции применяются к полученным данным для нахождения наиболее подходящей для использования весовой функции. Если средние значения при сравнении с градуировочным графиком проявляют отклонение от линейности, используют двухмерную линейную регрессию.

ПРАВИЛЬНОСТЬ

Предпочтительно верифицировать правильность с использованием сертифицированных стандартных образцов. Если это невозможно, проверяют открываемость.

Открываемость. В случае методик количественного определения открываемость должна быть от 90 % до 110 %. Для других определений, например для определения следовых количеств элемента, открываемость должна быть от 80 % до 120 % от теоретического значения. Открываемость может быть определена с использованием подходящего раствора сравнения (матричного раствора), содержащего известное количество аналита (средняя концентрация градуировочного графика).

СХОДИМОСТЬ

Сходимость должна быть не более 3 % для количественного определения и не более 5 % для испытания на содержание примесей.

ПРЕДЕЛ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Удостоверяются, что предел количественного определения (например, определенный с использованием приближения 10σ) ниже измеряемого значения.

01/2013:20224

2.2.24. АБСОРБЦИОННАЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ В ИНФРАКРАСНОЙ ОБЛАСТИ

[#]Спектрофотометрию в инфракрасной области спектра обычно используют для исследования строения молекул, идентификации, количественного определения, а также для контроля примесей в субстанциях.[#]

Инфракрасные спектрофотометры применяют для записи спектров в области от 4000 см^{-1} до 650 см^{-1} (от 2,5 мкм до 15,4 мкм), а в некоторых случаях до 200 см^{-1} (до 50 мкм).

ПРИБОР

Спектрофотометры для снятия спектров состоят из подходящего источника излучения, монохроматора или интерферометра и детектора.

В спектрофотометрах с Фурье-преобразованием используется полихроматическое излучение и рассчитывается спектр в заданной области частот путем Фурье-преобразования исходных данных. Также могут быть использованы спектрофотометры, снабженные оптической системой, способной выделять монохроматическое излучение в измеряемой области. Обычно спектр представляется как функция пропускания, т.е. отношение

интенсивности прошедшего к интенсивности падающего на образец излучения. Но также может быть представлен как функция поглощения.

Оптическую плотность (A) определяют как десятичный логарифм величины, обратной пропусканию (T):

$$A = \log_{10} \left(\frac{1}{T} \right) = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right),$$

где:

$$T = \frac{I}{I_0};$$

I_0 – интенсивность излучения, падающего на вещество;

I – интенсивность излучения, прошедшего через вещество.

[#]Каждый инфракрасный спектр характеризуется серией полос поглощения, максимумы которых определяются волновым числом ν или длиной волны λ и интенсивностью максимумов поглощения. Волновое число ν , выраженное в обратных сантиметрах (см^{-1}), определяется из соотношения:

$$\nu = \frac{10^4}{\lambda},$$

где:

λ – длина волны, мкм.[#]

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ СПЕКТРОВ ПРОПУСКАНИЯ ИЛИ ПОГЛОЩЕНИЯ

Жидкости. Жидкости исследуют в форме пленки, находящейся между двумя пластинками, прозрачными для инфракрасного излучения, или в кювете с соответствующей толщиной слоя, также прозрачной для инфракрасного излучения.

Жидкости или твердые вещества в растворе. Готовят раствор испытуемого образца в подходящем растворителе. Выбирают концентрацию вещества и толщину слоя кюветы, позволяющие получить удовлетворительный спектр. Обычно хорошие результаты получают при концентрациях от 10 г/л до 100 г/л при толщине слоя от 0,5 мм до 0,1 мм. Поглощение растворителя компенсируют путем помещения в канал сравнения аналогичной кюветы, содержащей выбранный растворитель. При использовании прибора с Фурье-преобразованием записывают поочередно спектр растворителя и спектр образца и вычитают поглощение растворителя с учетом коэффициента компенсации.

Твердые вещества. Твердые вещества исследуют диспергированными в подходящей жидкости в виде суспензии или в твердом состоянии (диски из галогенидов щелочных металлов). Если указано в частной статье, формируют пленку из расплавленной массы между двумя пластинами, прозрачными для инфракрасного излучения.

а) *Суспензия.* Небольшое количество испытуемого образца растирают с минимальным количеством *вазелинового масла Р* или другой подходящей жидкости; обычно от 5 мг до 10 мг испытуемого образца достаточно для получения подходящей суспензии с использованием одной капли *вазелинового масла Р*. Полученную суспензию сжимают между двумя пластинками, прозрачными для инфракрасного излучения.

б) *Диски.* От 1 мг до 2 мг испытуемого образца растирают с 300–400 мг, если нет других указаний, тщательно измельченного *калия бромида Р* или *калия хлорида Р*. Обычно этих количеств достаточно для получения диска диаметром 10–15 мм и спектра соответствующей интенсивности. Смесь тщательно растирают, помещают равномерно в пуансон и прессуют при давлении около 800 МПа ($8 \text{ т} \cdot \text{см}^{-2}$). Диски из нестабильных при обычных атмосферных условиях или гигроскопичных веществ прессуют в вакууме. Причиной образования некачественных дисков могут быть такие факторы, как недостаточное или чрезмерное растирание, влажность или иные примеси в дисперсионной

среде и недостаточное измельчение частиц. Диск непригоден для испытания, если он при визуальном осмотре неоднороден по прозрачности или если пропускание 2000 см^{-1} (5 мкм) составляет менее 60 % без компенсации при отсутствии специфической полосы поглощения вещества.

Газы. Газы исследуют в кювете, прозрачной для инфракрасного излучения, с длиной оптического пути около 100 мм. Кювету откачивают и заполняют через кран или при помощи игольчатого клапана через подходящую газовую линию между кюветой и контейнером с субстанцией, предназначенной для испытания.

Если необходимо, доводят давление в кювете до атмосферного, используя газ, прозрачный для инфракрасного излучения (например, *азот Р* или *аргон Р*). Мешающее влияние поглощения воды, углерода диоксида или других атмосферных газов исключают путем помещения в канал сравнения идентичной кюветы, которая либо вакуумирована, либо заполнена газом, прозрачным для инфракрасного излучения.

ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ СПЕКТРОВ ДИФФУЗНОГО ОТРАЖЕНИЯ

Твердые вещества. Растирают в порошок смесь из испытуемого образца и мелко измельченного и высушенного *калия бромида Р* или *калия хлорида Р*. Если иного не указано в частной статье, готовят смесь, содержащую около 5 % испытуемого образца. Смесь растирают, помещают в чашку для образца и записывают спектр отражения.

После обработки записанного спектра по функции Кубелка-Мунка (*Kubelka-Munk*) может быть получен спектр поглощения испытуемого образца.

ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ СПЕКТРОВ НАРУШЕННОГО ПОЛНОГО ВНУТРЕННЕГО ОТРАЖЕНИЯ

Нарушенное полное отражение (включая многократное отражение) касается света, обычно многократно внутренне отраженного пропускающей средой. Существуют приборы, где происходит только одно отражение. Испытуемый образец помещают на внутренний отражающий элемент (ВОЭ, *IRE*), например, из алмаза, германия, цинка селенида, таллия бромида – таллия йодида (*KRS-5*) или из другого подходящего вещества с высоким коэффициентом преломления, и добиваются плотного и однородного контакта со всей поверхностью кристалла внутреннего отражающего элемента с помощью давления или растворяя испытуемый образец в подходящем растворителе и высушивая полученный раствор на внутреннем отражающем элементе. Просматривают спектр нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО, *ATR*).

ИДЕНТИФИКАЦИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СТАНДАРТНЫХ ОБРАЗЦОВ

Образцы испытуемого вещества и стандартного вещества готовят по одной и той же методике и записывают спектры в области от 4000 см^{-1} до 650 см^{-1} (от 2,5 мкм до 15,4 мкм) в одних и тех же условиях. Минимумы пропускания (максимумы поглощения) в спектрах испытуемой субстанции должны соответствовать по положению и относительной величине таковым в спектре стандартного образца.

Если спектры, полученные в твердом состоянии, отличаются по положению минимумов пропускания (максимумов поглощения), то испытуемый образец и стандартный образец обрабатывают одним и тем же способом так, чтобы они кристаллизовались или получались в одной и той же форме, или обрабатывают способом, указанным в частной статье, а затем снимают спектры.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭТАЛОННЫХ СПЕКТРОВ

Контроль разрешающей способности. В случае приборов с монохроматором записывают спектр пленки полистирола толщиной около 35 мкм. Разность x (см. рисунок 2.2.24.-1) между процентом пропускания в максимуме пропускания А при 2870 см^{-1} (3,48 мкм) и минимуме пропускания В при $2849,5\text{ см}^{-1}$ (3,51 мкм) должна быть более 18. Разность y между процентом пропускания в максимуме пропускания С при 1589 см^{-1} (6,29 мкм) и минимуме пропускания D при 1583 см^{-1} (6,32 мкм) должна быть более 10.

В случае приборов с Фурье-преобразованием устанавливают подходящее разрешение с подходящей аподизацией, рекомендуемое производителем. Для контроля разрешающей

способности используют подходящие методы, например, записывают спектр пленки полистирола толщиной около 35 мкм. Разность между поглощением в минимуме поглощения при 2870 см^{-1} и максимуме поглощения при $2849,5\text{ см}^{-1}$ должна быть более 0,33. Разность между поглощением в минимуме поглощения при 1589 см^{-1} и максимуме поглощения при 1583 см^{-1} должна быть более 0,08.

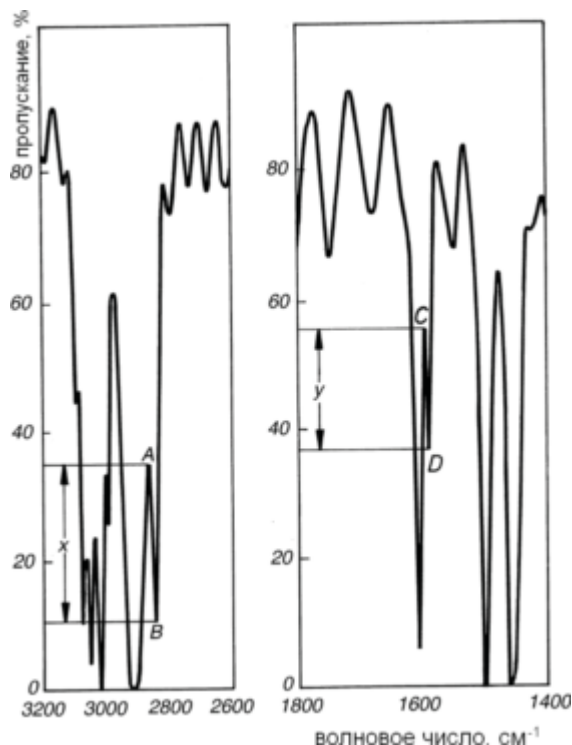


Рисунок 2.2.24.-1. Типичный спектр полистирола, используемого для проверки разрешающей способности

Проверка шкалы волновых чисел. Шкала волновых чисел может быть проверена с использованием пленки полистирола, которая имеет минимум пропускания (максимум поглощения) при волновых числах (см^{-1}), приведенных в таблице 2.2.24.-1.

Таблица 2.2.24.-1

Максимумы пропускания и допустимые пределы пленки полистирола

Минимум пропускания (см^{-1})	Допустимые пределы (см^{-1})	
	Прибор с монохроматором	Прибор с Фурье-преобразованием
3060,0	$\pm 1,5$	$\pm 1,0$
2849,5	$\pm 2,0$	$\pm 1,0$
1942,9	$\pm 1,5$	$\pm 1,0$
1601,2	$\pm 1,0$	$\pm 1,0$
1583,0	$\pm 1,0$	$\pm 1,0$
1154,5	$\pm 1,0$	$\pm 1,0$
1028,3	$\pm 1,0$	$\pm 1,0$

[#]Для проверки шкалы волновых чисел могут использоваться методики, приведенные в инструкции к прибору.[#]

Методика. Испытуемый образец готовят к испытанию согласно инструкции, приложенной к эталонному спектру/стандартному образцу. Используя условия, при которых записывали эталонный спектр, обычно совпадающие с условиями для проверки разрешающей способности, записывают спектр испытуемого образца.

Положения и относительные величины полос на спектре испытуемого образца и на эталонном спектре должны согласовываться между собой.

Компенсация влияния паров воды и атмосферного углерода диоксида. В случае приборов с Фурье-преобразованием спектральная интерференция, вызываемая парами

воды и диоксидом углерода, компенсируется с использованием подходящих алгоритмов в соответствии с инструкциями производителя. Кроме того, спектры могут быть получены либо с использованием продутых приборов, либо при абсолютно одинаковых условиях записи однолучевого спектра фона и спектра образца.

ПРИМЕСИ В ГАЗАХ

Для анализа примесей используют кювету, прозрачную для инфракрасного излучения и имеющую соответствующую длину оптического пути (например, от 1 м до 20 м). Кювету заполняют так, как указано в разделе «Газы». Для определения и количественной оценки примесей используют методики, указанные в частных статьях.

01/2013:20225

2.2.25. АБСОРБЦИОННАЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ В УЛЬТРАФИОЛЕТОВОЙ И ВИДИМОЙ ОБЛАСТЯХ В

Определение оптической плотности. Оптическая плотность (A) раствора представляет собой десятичный логарифм обратной величины пропускания (T) для монохроматического излучения и выражается соотношением:

$$A = \log_{10} \left(\frac{1}{T} \right) = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right),$$

где:

$$T = I/I_0,$$

I_0 – интенсивность падающего монохроматического излучения;

I – интенсивность прошедшего монохроматического излучения.

В отсутствие других физико-химических факторов измеренная оптическая плотность (A) пропорциональна длине пути (b), через который проходит излучение, и концентрации (c) вещества в растворе в соответствии с уравнением:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot b,$$

где:

ϵ – молярный коэффициент поглощения;

b – длина оптического пути, в сантиметрах;

c – концентрация вещества в растворе, в моль на литр.

Величина $A_{1\text{см}}^{1\%}$ представляет собой удельный показатель поглощения, то есть оптическую плотность раствора вещества с концентрацией 10 г/л в кювете с толщиной слоя 1 см:

$$A_{1\text{см}}^{1\%} = \frac{10 \cdot \epsilon}{M.M.}$$

Если нет других указаний в частной статье, измерение оптической плотности проводят при указанной длине волны с использованием кюветы 1 см. Если нет других указаний в частной статье, измерение проводят по сравнению с тем же растворителем или той же смесью растворителей, в которой растворено вещество. Оптическая плотность растворителя, измеренная против воздуха при указанной длине волны, не должна превышать 0,4 и желательно, чтобы она была менее 0,2. Спектр поглощения представляют таким образом, чтобы оптическая плотность или ее некоторая функция были приведены по оси ординат, а длина волны или некоторая функция от длины волны – по оси абсцисс.

Если в частной статье приводят только одно значение для положения максимума поглощения, то это означает, что полученное значение максимума не должно отличаться от указанного более чем на ± 2 нм.

Прибор. Спектрофотометры, предназначенные для измерений в ультрафиолетовой и видимой областях спектра, состоят из оптической системы, выделяющей монохроматическое излучение в области от 200 нм до 800 нм, и устройства для измерения оптической плотности.

Проверка шкалы длин волн. Для проверки шкалы длин волн используют линии водородной или дейтериевой разрядной лампы или линии паров ртути, а также максимумы поглощения *раствора гольмия перхлората Р*, которые представлены в таблице 2.2.25.-1. Допустимое отклонение составляет ± 1 нм для ультрафиолетового и ± 3 нм для видимого диапазонов.

Таблица 2.2.25.-1

Максимумы поглощения (или испускания) для проверки шкалы длин волн

241,15 нм (H α)	404,66 нм (Hg)
253,7 нм (Hg)	435,83 нм (Hg)
287,15 нм (H α)	486,0 нм (d β)
302,25 нм (Hg)	486,1 нм (H β)
313,16 нм (Hg)	536,3 нм (H α)
334,15 нм (Hg)	546,07 нм (Hg)
361,5 нм (H α)	576,96 нм (Hg)
365,48 нм (Hg)	579,07 нм (Hg)

Проверка шкалы оптической плотности. Проверяют значения оптических плотностей, используя подходящие фильтры или раствор *калия дихромата Р* при длинах волн, указанных в таблице 2.2.25.-2. В таблице 2.2.25.-2 приведены точные значения удельного показателя поглощения и его допустимые пределы для каждой длины волны. Данные таблицы основаны на допустимой погрешности при измерении поглощения $\pm 0,01$.

Для проверки шкалы оптических плотностей используют растворы *калия дихромата Р*, который предварительно сушат при температуре 130 °С до постоянной массы.

Для проверки шкалы оптических плотностей при длинах волн 235 нм, 257 нм, 313 нм и 350 нм растворяют 57,0–63,0 мг *калия дихромата Р* в 0,005 М растворе кислоты серной и доводят до объема 1000,0 мл этим же растворителем. Для проверки шкалы оптических плотностей при длине волны 430 нм растворяют 57,0–63,0 мг *калия дихромата Р* в 0,005 М растворе кислоты серной и доводят до объема 100,0 мл этим же растворителем. Также могут быть использованы и другие сертифицированные стандартные вещества.

Таблица 2.2.25.-2

Длина волны, нм	Удельный показатель поглощения $A_{1\text{см}}^{1\%}$	Допустимые пределы $A_{1\text{см}}^{1\%}$
235	124,5	от 122,9 до 126,2
257	144,5	от 142,8 до 146,2
313	48,6	от 47,0 до 50,3
350	107,3	от 105,6 до 109,0
430	15,9	от 15,7 до 16,1

Предельный уровень рассеянного света. Рассеянный свет может быть определен при данной длине волны с использованием соответствующих фильтров или растворов. Например, оптическая плотность раствора 12 г/л *калия хлорида Р* в кювете с толщиной слоя 1 см резко возрастает между 220 нм и 200 нм и имеет значение более 2,0 при 198 нм при использовании воды в качестве компенсационного раствора. Также могут быть использованы и другие сертифицированные стандартные вещества.

Разрешающая способность (для качественного анализа). Если указано в частных статьях, то определяют разрешающую способность спектрофотометра следующим

образом. Записывают спектр 0,02 % (об/об) раствора *толуола Р* в *гексане Р*. Минимально допустимое значение отношения оптической плотности в максимуме поглощения при 269 нм к оптической плотности в минимуме поглощения при 266 нм указывают в частной статье. Также могут быть использованы и другие сертифицированные стандартные вещества.

Ширина спектральной щели (для количественного анализа). В случае использования спектрофотометра с изменяемой шириной спектральной щели при выбранной длине волны возможны погрешности, связанные с шириной этой щели. Для их исключения ширина спектральной щели должна быть малой по сравнению с полушириной полосы поглощения и в то же время должна быть максимально велика для получения высокого уровня I_0 . Таким образом, ширина щели должна быть такой, чтобы дальнейшее ее уменьшение не изменяло величину измеряемой оптической плотности.

Кюветы. Допустимые вариации в толщине слоя используемых кювет должны быть не более $\pm 0,005$ см. Кюветы, предназначенные для испытуемого и компенсационного растворов, должны иметь одинаковое пропускание (или оптическую плотность) при заполнении одним и тем же растворителем. В противном случае это различие следует учитывать.

Чистка и обращение с кюветами должны быть аккуратными.

ПРОИЗВОДНАЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ

В производной спектрофотометрии используется преобразование исходного спектра поглощения (нулевой порядок) в производные спектры первого, второго и более высоких порядков.

Производный спектр первого порядка представляет собой график зависимости градиента кривой поглощения (скорость изменения оптической плотности с длиной волны, $dA/d\lambda$) от длины волны.

Производный спектр второго порядка представляет собой график зависимости кривизны спектра поглощения от длины волны ($d^2A/d\lambda^2$). Вторая производная при любой длине волны λ связана с концентрацией следующим соотношением:

$$\frac{d^2 A}{d\lambda^2} = \frac{d^2 A_{\text{леу}}^{1\%}}{d\lambda^2} \cdot \frac{c' b}{10} = \frac{d^2 A \epsilon}{d\lambda^2} \cdot \frac{c b}{10},$$

где:

c' – концентрация поглощающего раствора, в граммах на литр.

Прибор. Используют спектрофотометр, отвечающий указанным выше требованиям и оснащенный аналоговым резистентно-емкостным дифференцирующим модулем, цифровым дифференциатором или другими средствами получения производных спектров. Некоторые методы получения производных спектров второго порядка сдвигают их относительно спектра нулевого порядка, что следует учитывать там, где это необходимо.

Разрешающая способность. Если указано в частных статьях, записывают производный спектр второго порядка для раствора 0,2 г/л *толуола Р* в *метаноле Р*, используя *метанол Р* в качестве компенсационного раствора. На спектре должен присутствовать небольшой отрицательный экстремум, расположенный между двумя большими отрицательными экстремумами при 261 нм и 268 нм соответственно, как показано на рисунке 2.2.25.-1. Если нет других указаний в частных статьях, отношение А/В (см. рисунок 2.2.25.-1) должно быть не менее 0,2.

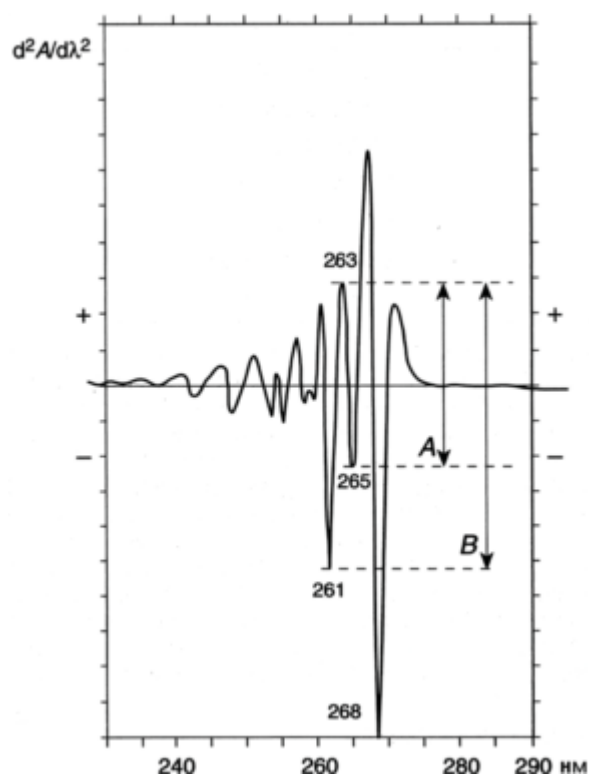


Рисунок 2.2.25.-1

Методика. Готовят раствор испытуемого вещества, устанавливают различные инструментальные характеристики в соответствии с инструкцией к прибору и рассчитывают количество определяемого вещества, как указано в частной статье.

#ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Абсорбционную спектрофотометрию в ультрафиолетовой и видимой областях спектра обычно применяют для идентификации лекарственного средства в следующих вариантах.

1. Сравнение спектров поглощения испытуемого раствора и раствора сравнения; в указанной области спектра должно наблюдаться совпадение положений максимумов, минимумов, плеч и точек перегиба.

2. В указанной области спектра при указанных длинах волн должны наблюдаться максимумы, минимумы, плечи и точки перегиба; возможно указание только некоторых из этих характеристик. Расхождение между наблюдаемыми и указанными длинами волн не должно обычно превышать ± 2 нм.

3. В дополнение к варианту 2 приводят еще и удельные показатели поглощения при указанных длинах волн.

4. В дополнение к варианту 2 приводят отношения оптических плотностей при указанных длинах волн.

Возможны и другие варианты применения, оговоренные в частных статьях.

#КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Рекомендуется такая схема проведения спектрофотометрических измерений: «В измерительную кювету помещают испытуемый раствор и определяют его оптическую плотность по сравнению с компенсационным раствором. Затем кювету вынимают, удаляют ее содержимое, снова помещают испытуемый раствор и снова определяют оптическую плотность. Операцию повторяют, получая не менее трех значений оптической плотности для испытуемого раствора. Таким же образом получают не менее трех значений оптической плотности для раствора сравнения. Следует избегать попадания исследуемого раствора на внешнюю стенку кюветы. Для расчетов используют среднее значение полученных оптических плотностей испытуемого раствора и раствора сравнения».

Однокомпонентный одноволновой анализ. Однокомпонентный одноволновой анализ (или «обычная спектрофотометрия») – это количественное определение одного из компонентов лекарственного средства посредством измерения оптической плотности раствора испытуемого образца при одной аналитической длине волны (АДВ).

Такой анализ может проводиться методом показателя поглощения (МПП) и методом стандарта (МС).

При использовании МПП количественное определение проводят посредством измерения оптической плотности (A) раствора испытуемого образца при АДВ и расчете концентрации (c) анализируемого компонента по формуле:

$$c = \frac{A}{A_{1\%}^{1\text{см}}}, \quad (1)$$

где:

$A_{1\%}^{1\text{см}}$ – удельный показатель поглощения анализируемого компонента при АДВ;
 c – концентрация анализируемого вещества, % (м/об).

При использовании МС количественное определение проводят посредством измерения при АДВ оптических плотностей раствора испытуемого образца (A) и раствора сравнения (A_0) с концентрацией c_0 и расчета концентрации (c) анализируемого компонента, исходя из формулы:

$$\frac{c}{c_0} = \frac{A}{A_0}. \quad (2)$$

Измерение оптических плотностей испытуемого раствора и раствора сравнения следует проводить в одних и тех же условиях с минимальным интервалом времени.

В общем случае более надежным является МС. Возможность применения МПП необходимо в каждом конкретном случае обосновывать, исходя из допусков количественного содержания анализируемого компонента, метрологических характеристик методики и требований к спектрофотометру. Обычно МПП применим при допусках содержания анализируемого компонента не менее ± 10 % от номинального содержания.

Во всех случаях применения одноволнового однокомпонентного анализа необходимо, чтобы остальные компоненты препарата не оказывали существенного влияния на результаты. Обычно доля их суммарного поглощения в оптическом поглощении образца при АДВ не должна превышать десятой части допусков содержания анализируемого компонента.

Многокомпонентный спектрофотометрический анализ. Многокомпонентный спектрофотометрический анализ применяют для одновременного количественного определения компонентов лекарственных средств.

В обычной спектрофотометрии погрешность собственно спектрофотометрических измерений («спектрофотометрическая погрешность») мало зависит от типа анализируемого вещества и выбора аналитической длины волны, а определяется классом спектрофотометра и не превышает обычно 0,5 %. С учетом погрешностей приготовления растворов это приводит к суммарной погрешности анализа, не превышающей обычно 1 %.

В отличие от обычной спектрофотометрии, спектрофотометрическая погрешность многокомпонентного анализа определяется не только классом прибора, но и сильно зависит от состава анализируемого лекарственного средства и особенно выбора аналитических длин волн. Эта погрешность может быть охарактеризована коэффициентом усиления K , который показывает, во сколько раз спектрофотометрическая погрешность определения данного вещества в анализируемой смеси с помощью многокомпонентной спектрофотометрии превышает спектрофотометрическую погрешность определения этого же вещества в чистом растворе (без других компонентов) методом обычной спектрофотометрии. Способы расчета коэффициентов усиления для каждого компонента при использовании различных методов представлены ниже.

Обычными являются величины K в диапазоне 5–10, но возможны и значения K равные 100 и более, что может приводить к общей погрешности анализа, составляющей десятки и даже сотни процентов.

Для получения надежных результатов при количественном определении лекарственных средств коэффициенты усиления K не должны обычно превышать 5.

Поэтому прогноз погрешности определения и сравнение ее с допусками содержания анализируемого компонента является обязательным условием при обосновании применимости методик многокомпонентной спектрофотометрии. Если нет соответствующего обоснования, то должно выдерживаться следующее соотношение между полной относительной погрешностью количественного определения k_i компонента анализируемого образца ($\Delta_{k,r} \%$) и допусками ($\pm B$) содержания этого компонента в образце:

$$\Delta_{k,r} \leq 0,32 \cdot B, \quad (3)$$

$$\Delta_{k,r} = 2 \cdot S_{ck,r}, \quad (4)$$

где:

$S_{ck,r}$ – относительное генеральное стандартное отклонение полной погрешности количественного определения k_i компонента анализируемого образца.

Количественное определение в многокомпонентном спектрофотометрическом анализе основывается обычно на использовании уравнения:

$$A_i = \sum_{j=1}^m E_{ij} \cdot c_j, \quad j = 1 \dots n, \quad (5)$$

где:

A_i – оптическая плотность испытуемого раствора при i -ой длине волны;

E_{ij} – показатели поглощения (зависящие от способа выражения концентрации) j -ого компонента образца при i -ой аналитической длине волны;

c_j – концентрация j -ого компонента образца.

Для решения данного уравнения могут применяться различные подходы, среди которых можно выделить три основных: метод наименьших квадратов (МНК), модифицированный метод наименьших квадратов (ММНК) и метод отношения рассчитанных концентраций (МОРК).

Метод наименьших квадратов. Метод наименьших квадратов (МНК) является обобщением метода показателя поглощения одноволнового однокомпонентного анализа. В рамках МНК решение уравнения (3) имеет вид:

$$c_k = \sum_{i=1}^n a_{ki} \cdot A_i, \quad k = 1 \dots n. \quad (6)$$

Расчетные коэффициенты $a^{МНК}$ находят в соответствии с матричным соотношением:

$$a^{МНК} = (E^T \cdot E)^{-1} E^T, \quad (7)$$

где:

$a^{МНК}$ – матрица расчетных коэффициентов;

E – матрица показателей поглощения;

T – символ транспонирования.

Выбор аналитических длин волн (АДВ). Выбор АДВ описан в разделе «Модифицированный метод наименьших квадратов».

Прогноз погрешности определения. Полная погрешность количественного определения компонента с помощью МНК определяется из соотношения:

$$S_{ck,r}^2 = (K_k^{MHK})^2 \cdot (S_{A,r}^2 + S_{E,r}^2) + S_{V,r}^2, \quad (8)$$

$$(K_k^{MHK})^2 = \sum_{i=1}^n \left(\frac{a_{ki} \cdot A_i^{st}}{C_k^{st}} \right)^2, \quad (9)$$

где:

$S_{ck,r}$ – относительное стандартное отклонение полной погрешности количественного определения k -ого компонента образца;

A_i^{st} – оптическая плотность раствора модельной смеси образца, содержащей номинальные концентрации всех компонентов;

C_k^{st} – номинальная концентрация k -ого компонента образца в модельной смеси;

$S_{A,r}$ – относительное стандартное отклонение сходимости оптической плотности на спектрофотометре (включая кюветную погрешность);

$S_{E,r}$ – относительное стандартное отклонение правильности оптической плотности на спектрофотометре;

$S_{V,r}$ – относительное стандартное отклонение погрешности приготовления растворов.

Величины $S_{A,r}$ и $S_{E,r}$ известны из паспортных данных спектрофотометра, а $S_{V,r}$ оценивают, исходя из погрешностей взятия навесок и разбавлений.

При этом должны выполняться соотношения (3–4).

Преимуществом МНК является то, что его применение не требует использования стандартных образцов. Однако из-за значительной погрешности правильности оптической плотности (из таблицы 2.2.25.-2 видно, что величины $S_{V,r}$ могут достигать нескольких процентов) и ее неконтролируемости полная погрешность анализа посредством МНК может достигать десяти и более процентов, что делает МНК ненадежным методом. Его применение предъявляет очень высокие требования к спектрофотометрам и уровню работы аналитического персонала, поэтому он применим обычно только в научных исследованиях на стадии разработки лекарственных средств при больших колебаниях в концентрации анализируемых компонентов.

Модифицированный метод наименьших квадратов. Модифицированный метод наименьших квадратов является одним из вариантов обобщения метода стандарта на случай многокомпонентной спектрофотометрии и основан на уравнениях:

$$d_i = \frac{A_i}{A_i^{st}} = \sum_{j=1}^m r_{ij} \cdot \frac{c_j}{c_j^{st}} = \sum_{j=1}^m r_{ij} \cdot X_j, \quad (10)$$

$$r_{ij} = \frac{E_{ij} \cdot c_j^{st}}{\sum_{k=1}^m E_{ik} \cdot c_k^{st}}, \quad (11)$$

где переменные имеют тот же смысл, что и в уравнениях (5) и (9), величины r_{ij} представляют собой информационные коэффициенты, а $X_j \cdot 100$ представляет собой концентрацию j -ого компонента препарата в процентах к его номинальному содержанию.

Решение уравнения (10) имеет вид:

$$X_i = \sum_{j=1}^n a_{ji}^{ММНК} \cdot d_j, \quad i = 1 \dots n, \quad (12)$$

где расчетные коэффициенты $a^{ММНК}$ находят по матричному уравнению

$$a^{ММНК} = (r^T \cdot r)^{-1} r^T. \quad (13)$$

Выбор аналитических длин волн (АДВ). АДВ находят исходя из критерия минимума коэффициента усиления $K^{ММНК}$, получаемого из соотношения:

$$(K^{ММНК})^2 = \sum_{j=1}^m K_j^2 = \sum_{j=1}^m \sum_{i=1}^n (a_{ij}^{ММНК})^2, \quad (14)$$

где:

K_j – коэффициент усиления для j -ого компонента образца.

В случае анализа двух соединений по двум длинам волн АДВ можно находить из условия максимума информационных коэффициентов каждого компонента при одной из двух длин волн.

Схема проведения анализа. Готовят модельную смесь, содержащую все компоненты препарата точно в номинальных концентрациях (раствор сравнения). Проводят необходимые разбавления, измеряют попеременно оптические плотности испытуемого раствора и раствора сравнения при АДВ и проводят расчет по уравнениям (10–11).

Прогноз погрешности определения. Полную погрешность количественного определения компонента с помощью ММНК определяют из соотношения:

$$S_{ch,r}^2 = 2 \cdot [(K_k^{ММНК})^2 \cdot S_{A,r}^2 + S_{r,r}^2]. \quad (15)$$

Должно выполняться соотношение (3). Недостатком ММНК является необходимость приготовления точной номинальной смеси образца, однако он является самым надежным и точным из всех многоволновых методов количественного определения лекарственных средств.

Частный случай – количественное определение одного компонента смеси по одной длине волны. Если информационный коэффициент (r_{ik}) k компонента при i -ой длине волны значительно превосходит все остальные, то количественное определение этого компонента можно проводить по упрощенной формуле:

$$X_k = d_i. \quad (16)$$

Максимальная погрешность такого приближения не превосходит $2B(1-r_{ik})$. Данное приближение является обоснованным при $r_{ik} \geq 0,95$.

Метод отношения рассчитанных концентраций. Метод отношения рассчитанных концентраций (МОРК) является одним из вариантов обобщения метода стандарта на случай многокомпонентной спектрофотометрии и основан на допущении, что отношение концентраций, рассчитанных для испытуемого раствора и раствора сравнения, является более точным, чем сами рассчитанные концентрации, то есть:

$$X_k = \frac{c_k}{c_k^{st}} = \frac{\sum_{i=1}^n a_{ki} \cdot A_i}{\sum_{i=1}^n a_{ki} \cdot A_i^{st}}, \quad (17)$$

где:

a_{ki} – коэффициенты расчетной матрицы, полученные с помощью МНК (уравнение (7)) или другими методами цифровой фильтрации, например, методом производной спектрофотометрии. В отсутствии фона поглощения самым точным является применение МНК.

Выбор аналитических длин волн (АДВ). Смотрите выбор АДВ и ММНК.

Процедура проведения анализа. Такая же, как для ММНК, но для изготовления модельной смеси можно использовать концентрации компонентов, близкие (а не точно равные) к номинальным. Расчет концентраций проводят по уравнению (17).

Прогноз погрешности определения (в случае использования МНК) проводят по соотношению:

$$X_k = \frac{c_k}{c_k^{st}} = \frac{\sum_{i=1}^n a_{ki} \cdot A_i}{\sum_{i=1}^n a_{ki} \cdot A_i^{st}}, \quad (17)$$

Должно выполняться соотношение (3).

МОРК менее точен, чем ММНК, но он не требует приготовления точно номинальной смеси и поэтому проще в применении.

#ПРОИЗВОДНАЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ

Производную спектрофотометрию используют для количественного определения обычно в тех случаях, когда имеется фоновое поглощение, вызванное присутствием веществ, содержание которых не регламентируется. Она может применяться в двух вариантах.

В первом случае получение производной проводит сам аналитик с помощью производных полиномов, которые представляются в уравнении (17) вместо величин a_{ki} . Прогноз погрешности концентрации должен учитывать в этом случае погрешность неполного обращения в нуль поглощения других компонентов смеси.

Во втором случае непосредственно используют значения производных, получаемых на спектрофотометре. Процедура анализа при этом аналогична применению метода стандарта в обычной спектрофотометрии, но вместо оптических плотностей используют производные.

01/2013:20226

2.2.26. БУМАЖНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

#Хроматография на бумаге представляет собой хроматографический метод разделения, при котором подвижная жидкая фаза перемещается по капиллярам и поверхности хроматографической бумаги либо веществ, предварительно нанесенных на ее волокна. В бумажной хроматографии используют хроматографическую бумагу нужной плотности квалификации «Для хроматографии».[#]

ВОСХОДЯЩАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ НА БУМАГЕ

Оборудование. Оборудование представляет собой стеклянную камеру с тщательно шлифованной крышкой, соответствующую по размерам используемой хроматографической бумаге. Камера в верхней части должна быть снабжена приспособлением для закрепления хроматографической бумаги, с помощью которого ее можно опускать, не открывая камеры. На дне камеры помещена емкость (лодочка) для подвижной фазы, в которую должен быть погружен нижний край бумаги. Хроматографическая бумага представляет собой соответствующую фильтровальную бумагу, разрезанную на полоски достаточной длины и шириной не менее 2,5 см; бумага должна быть разрезана так, чтобы подвижная фаза двигалась вдоль направления волокна бумаги.

[#]В некоторых случаях допускается использование хроматографических камер других типов с описанием их в частной статье.[#]

Методика. Обозначенную в частной статье подвижную фазу помещают в лодочку в количестве, достаточном для образования слоя 2,5 см. Если указано в частных статьях, между стенками камеры и лодочки помещают хроматографическую бумагу. Для насыщения камеру закрывают крышкой и выдерживают в течение 24 ч при температуре от 20 °С до 25 °С. Поддерживают заданную температуру камеры на протяжении всего испытания.

На расстоянии 3 см от одного края по всей ширине полосы бумаги карандашом наносят тонкую горизонтальную линию. Обозначенный в частной статье объем раствора наносят на полученную линию при помощи микропипетки. Если весь обозначенный раствор образует пятно диаметром более 10 мм, раствор наносят небольшими порциями, давая каждой из них высохнуть перед нанесением следующей. Если на одной полоске бумаги должно быть получено больше одной хроматограммы, растворы наносят вдоль линии так, чтобы расстояние между точками нанесения отдельных проб было не менее 3 см.

[#]Если условия насыщения хроматографической камеры, нанесения пятен или хроматографирования отличаются от условий, описанных выше, они должны быть описаны в частной статье.[#]

Бумагу помещают в камеру, закрывают камеру крышкой и выдерживают в течение 1,5 ч. Бумагу опускают в подвижную фазу и проводят элюирование в соответствии с указанным временем или на указанное расстояние, которое должна пройти подвижная фаза. На протяжении всего процесса элюирования бумагу защищают от воздействия яркого света. Полоску бумаги вынимают из камеры и сушат на воздухе.

[#]После прохождения подвижной фазой необходимого расстояния, обозначенного в частной статье, бумагу вынимают, отмечают карандашом конец положения фронта подвижной фазы, сушат и проявляют пятна обозначенным в частной статье способом.

Визуальную оценку и количественные измерения проводят в соответствии со статьей 2.2.27. *Тонкослойная хроматография.*[#]

НИСХОДЯЩАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ НА БУМАГЕ

Оборудование. Оборудование представляет собой стеклянную камеру с тщательно шлифованной крышкой, соответствующую по размерам используемой хроматографической бумаге. В центре крышки должно быть отверстие с диаметром около 1,5 см, закрытое тяжелой стеклянной пластиной или пробкой. В верхней части камеры располагается лодочка для подвижной фазы, снабженная приспособлением для закрепления хроматографической бумаги. От каждой стороны лодочки параллельно ей и немного выше верхнего ее края размещены два прямых стеклянных стержня, которые поддерживают бумагу в таком положении, чтобы она не соприкасалась со стенками камеры. Хроматографическая бумага представляет собой соответствующую фильтровальную бумагу, разрезанную на полосы достаточной длины шириной не менее 2,5 см и не более длины лодочки; бумага должна быть разрезана таким образом, чтобы подвижная фаза двигалась вдоль направления волокна бумаги.

[#]В необходимых случаях допускается использование хроматографических камер других типов с описанием их в частной статье.[#]

Методика. Обозначенную в частной статье подвижную фазу помещают на дно хроматографической камеры в количестве, достаточном для образования слоя 2,5 см. Для насыщения камеру закрывают крышкой и выдерживают в течение 24 ч при температуре от 20 °С до 25 °С. Поддерживают заданную температуру камеры на протяжении всего испытания.

По всей ширине полосы бумаги карандашом наносят тонкую горизонтальную линию от закрепленного в лодочке края на таком расстоянии, чтобы линия была размещена параллельно направляющему стержню и несколькими сантиметрами ниже его. Обозначенный в частной статье объем раствора наносят на полученную линию при помощи микропипетки. Если весь обозначенный раствор образует пятно диаметром более 10 мм, раствор наносят небольшими порциями, давая каждой из них высохнуть перед нанесением следующей. Если на одной полоске бумаги должно быть получено больше одной

хроматограммы, растворы наносят вдоль линии так, чтобы расстояние между точками нанесения отдельных проб было не менее 3 см.

[#]Если условия насыщения хроматографической камеры, нанесения пятен или хроматографирования отличаются от условий, описанных выше, они должны быть описаны в частной статье.[#]

Бумагу помещают в камеру, закрывают камеру крышкой и выдерживают в течение 1,5 ч. Через отверстие в крышке в лодочку помещают достаточное количество подвижной фазы и проводят элюирование в соответствии с указанным временем или на указанное расстояние, которое должна пройти подвижная фаза. На протяжении всего процесса элюирования бумагу защищают от воздействия яркого света.

[#]После прохождения подвижной фазой необходимого расстояния, обозначенного в частной статье, бумагу вынимают, отмечают карандашом конец положения фронта подвижной фазы, сушат и проявляют пятна обозначенным в частной статье способом.

Визуальную оценку и количественные измерения проводят в соответствии со статьей 2.2.27. *Тонкослойная хроматография.*[#]

01/2013:20227

2.2.27. ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Тонкослойная хроматография (ТСХ) представляет собой метод разделения, в котором используется неподвижная фаза, состоящая из подходящего материала, нанесенного в виде тонкого слоя и зафиксированного на подложке (пластинке) из стекла, металла или пластмассы. Перед хроматографированием растворы анализируемых веществ наносят на пластинку. Разделение основано на процессах адсорбции, распределения, ионного обмена или на их комбинации и осуществляется посредством перемещения в тонком слое (неподвижной фазе) исследуемых веществ, растворенных в растворителе или в соответствующей смеси растворителей (подвижной фазе).

ОБОРУДОВАНИЕ

Пластинки. Хроматографирование проводят с использованием пластинок, полученных, как указано в статье 4.1.1. *Реактивы.*

[#]Допускается использование пластинок, приготовленных в промышленных условиях, если они отвечают требованиям статьи 4.1.1. *Реактивы*, а также выдерживают испытание «Проверка пригодности хроматографической системы», описанное в частной статье. Рекомендуются каждую партию получаемых пластинок, приготовленных в промышленных условиях, проверять на близость величин R_F .[#]

[#]*Близость величин R_F .* Испытания проводят не менее чем на трех пластинках испытываемой партии. Для этого используют методику проверки хроматографической разделяющей способности, указанной в статье 4.1.1. *Реактивы (ТСХ пластинка со слоем силикагеля P)*. На линию старта каждой пластинки наносят по 5 пятен *раствора для проверки пригодности ТСХ пластинок P*, хроматографируют и рассчитывают величины R_F красителей для каждого нанесения. В пределах каждой пластинки наибольшая разница величин R_F среди разных нанесений для каждого красителя не должна превышать 0,02. В противном случае такие пластинки не рекомендуются использовать для фармакопейного анализа.

Предварительная подготовка пластинок. В некоторых случаях может понадобиться промывка пластинок перед хроматографированием, которая может быть выполнена посредством предварительного элюирования чистых пластинок подходящим растворителем. Пластины могут быть также импрегнированы (пропитаны) посредством таких процедур, как элюирование, погружение или опрыскивание. Перед использованием пластинки активируют, если необходимо, посредством нагревания в термостате при температуре от 100 °C до 105 °C в течение 1 ч.

[#]Допускаются другие условия активации пластинок, описанные в частных статьях.[#]

Хроматографическая камера представляет собой емкость с плотно подогнанной крышкой и с плоским дном или дном с двумя желобами из инертного прозрачного

материала, соответствующими по размеру используемым пластинкам. Для горизонтального элюирования хроматографическая камера имеет желоб для подвижной фазы и дополнительно содержит устройство для подачи подвижной фазы к неподвижной фазе.

[#]Допускается использование хроматографических камер других типов с описанием их в частных статьях.[#]

Микропипетки, микрошприцы, калиброванные капилляры или другие устройства, пригодные для нанесения растворов.

Устройство для обнаружения флуоресценции для обнаружения непосредственной флуоресценции или для обнаружения тушения флуоресценции.

Проявляющие устройства и реактивы. Для проявления разделенных веществ используют подходящие устройства, пригодные для нанесения реактивов на пластинку (посредством опрыскивания, погружения или обработки парами) и, если это необходимо, для нагревания.

Документирование. Для обеспечения документирования проявленных хроматограмм могут быть использованы различные приемы, например фотографирование или создание компьютерного файла.

МЕТОДИКА

[#]Если в частной статье нет других указаний, хроматографическое разделение выполняют восходящим способом.

Предпочтительнее использовать такие подвижные фазы, которые обеспечивают величины R_F испытуемых соединений в пределах от 0,3 до 0,7.

Слой жидкости в хроматографической камере должен быть таким, чтобы после помещения в него пластинки пятна или полосы находились над уровнем жидкости.[#]

Нанесение. Указанные объемы растворов наносят на подходящем расстоянии от нижнего края и от боковых краев пластинки на линию, параллельную нижнему краю пластинки; расстояние между центрами круглых пятен должно составлять не менее 10 мм (5 мм для пластинок для высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ)), расстояние между краями полос – не менее 5 мм (2 мм для пластинок для ВЭТСХ). Растворы наносят минимальными порциями для получения пятен диаметром 2–5 мм (1–2 мм для пластинок для ВЭТСХ) или полос длиной 10–20 мм (5–10 мм для пластинок для ВЭТСХ) и шириной 1–2 мм.

Если частная статья предусматривает использование наряду с обычными пластинками и пластинок для ВЭТСХ, рабочие условия для высокоэффективной тонкослойной хроматографии указываются в скобках [] после указания условий для обычных пластинок.

Вертикальное элюирование. Стенки хроматографической камеры выстилают фильтровальной бумагой. Подвижную фазу наливают в камеру в количестве, достаточном для того, чтобы после смачивания фильтровальной бумаги покрыть дно камеры слоем жидкости, необходимым для хроматографирования. Для насыщения хроматографическую камеру с подвижной фазой закрывают крышкой и выдерживают в течение 1 ч при температуре от 20 °С до 25 °С. Если в частной статье нет других указаний, хроматографирование проводят в насыщенной камере. Наносят указанные объемы растворов, как описано выше. После испарения растворителей из нанесенных проб пластинку помещают в хроматографическую камеру как можно более вертикально, следя за тем, чтобы пятна или полосы находились выше поверхности подвижной фазы. Камеру закрывают, оставляют ее при температуре от 20 °С до 25 °С в защищенном от попадания прямых солнечных лучей месте. После того, как подвижная фаза пройдет расстояние, указанное в частной статье, пластинку вынимают, сушат и обнаруживают пятна способом, указанным в частной статье.

В случае двухмерной хроматографии после первого хроматографирования пластинку сушат и выполняют второе хроматографирование в направлении, перпендикулярном первому.

Горизонтальное элюирование. Наносят указанные объемы растворов, как описано выше. После испарения растворителей из нанесенных проб в желоб хроматографической камеры вводят с помощью шприца или пипетки достаточное количество подвижной фазы, помещают пластинку, убеждаясь, что она расположена горизонтально и подсоединена к

устройству для подачи подвижной фазы, в соответствии с инструкциями производителя. Если указано в частной статье, пластинку элюируют, начиная одновременно с двух концов. Камеру закрывают и проводят хроматографирование при температуре от 20 °С до 25 °С. После того, как подвижная фаза пройдет расстояние, указанное в частной статье, пластинку вынимают, сушат и обнаруживают пятна указанным способом.

В случае двухмерной хроматографии после первого хроматографирования пластинку сушат и выполняют второе хроматографирование в направлении, перпендикулярном первому.

ВИЗУАЛЬНАЯ ОЦЕНКА

Идентификация. Основное пятно на хроматограмме испытуемого раствора сравнивают с соответствующим пятном на хроматограмме раствора сравнения, сравнивая цвет, размер и фактор подвижности (R_F)[#] (или фактор удерживания (R_f)[#] обоих пятен.

Фактор подвижности (R_F) определяют как отношение расстояния от точки нанесения пятна до центра пятна после хроматографирования к расстоянию, пройденному фронтом растворителя от точки нанесения.

Проверка разделяющей способности неподвижной фазы для идентификации. Обычно для оценки пригодности достаточно испытания на пригодность неподвижной фазы, описанного в статье 4.1.1. *Реактивы*. В особых случаях дополнительные требования указывают в частных статьях.

Сопутствующие примеси. Дополнительное пятно (пятна) на хроматограмме испытуемого раствора сравнивают визуально с соответствующим пятном (пятнами) на хроматограмме раствора сравнения. В качестве стандартного образца для приготовления раствора сравнения используют как саму примесь (примеси), так и различные разведения испытуемого раствора.

Проверка разделяющей способности. Требования для проверки разделяющей способности приводят в соответствующих частных статьях.

Проверка чувствительности. Чувствительность считается удовлетворительной, если на хроматограмме наиболее разведенного раствора сравнения четко обнаруживается пятно или полоса.

#Способы оценки содержания примесей методом ТСХ. При контроле примесей нежелательно включение в частную статью требования отсутствия пятна контролируемой примеси на хроматограмме испытуемого раствора. Методом ТСХ могут контролироваться как конкретно указываемые (специфицированные) примеси, так и сумма примесей.

Контроль специфицированных примесей. Контроль специфицированных примесей применяют в тех случаях, когда содержание каких-то конкретных примесей, возникающих в процессе производства лекарственного средства или его хранения, должно быть ограничено ввиду их токсичности или по другим соображениям. При контроле специфицированных примесей обычно используют сравнение пятен регламентированных примесей на хроматограммах испытуемого раствора и раствора сравнения.

Контроль общего содержания примесей. В тех случаях, когда нет оснований считать какие-то примеси особо токсичными, часто не так важно знать их истинное содержание. Важно знать, что это содержание не превосходит определенного уровня. В таких случаях используют метод внутренней нормализации: в качестве растворов сравнения обычно используют растворы самой испытуемой субстанции различной концентрации, а содержание примесей находят в пересчете на эту субстанцию. В зависимости от количества различных растворов субстанции, наносимых на хроматограмму в виде растворов сравнения, контроль общего содержания примесей может быть одноуровневым, двухуровневым и трехуровневым. В двух и трехуровневых вариантах возможна регламентация и общей суммы примесей.

КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ИЗМЕРЕНИЯ

Требования к разрешению и разделению приводят в частных статьях.

В том случае, когда вещества, разделяемые методом тонкослойной хроматографии, поглощают или флуоресцируют в ультрафиолетовом или видимом свете, их можно

количественно определить непосредственно на пластинке, используя подходящее оборудование. Для этого измеряют отражение или пропускание падающего света, передвигая пластинку или измеряющее устройство. Аналогичным образом, используя подходящее оптическое оборудование, можно измерять флуоресценцию. Вещества, содержащие радионуклиды, могут быть количественно определены тремя способами:

- непосредственно на пластинке – передвижением пластинки вдоль подходящего счетчика радиоактивности или счетчика радиоактивности вдоль пластины (см. статью *Радиофармацевтические препараты*);

- разрезанием пластинки на полосы и измерением радиоактивности на каждой полосе, с использованием подходящего счетчика радиоактивности;

- соскребанием неподвижной фазы, растворением ее в подходящем сцинтилляционном коктейле и измерением радиоактивности с использованием жидкостного сцинтилляционного счетчика.

Оборудование. Оборудование для измерений непосредственно на пластинке включает в себя:

- устройство для точного нанесения в определенном месте пластинки необходимого количества вещества;

- механическое устройство для передвижения пластинки или измерительного устройства вдоль осей *X* или *Y*;

- регистрирующее устройство и интегратор или компьютер;

- для веществ, поглощающих или флуоресцирующих в ультрафиолетовом или видимом свете: для измерения отражения или пропускания используются фотометр с источником света, оптическое устройство, генерирующее монохроматический свет, и фотозаэлемент соответствующей чувствительности; в том случае, когда измеряется флуоресценция, требуется дополнительно монохроматический фильтр для выбора соответствующей спектральной области излучаемого света;

- для веществ, содержащих радионуклиды: подходящий счетчик радиоактивности; для него необходимо проверить линейность диапазона.

Методика. Готовят раствор испытуемого образца (испытуемый раствор), как указано в частной статье, и, при необходимости, растворы стандартных образцов анализируемых веществ (растворы сравнения), используя тот же растворитель, что и для приготовления испытуемого раствора. Одинаковые объемы каждого из растворов наносят на пластинку и хроматографируют.

Вещества, поглощающие или флуоресцирующие в ультрафиолетовом или видимом свете. Готовят и наносят не менее трех растворов сравнения, концентрации которых охватывают ожидаемое значение концентрации в испытуемом растворе (около 80 %, 100 % и 120 % от этой концентрации). Опрыскивают, если необходимо, указанным реактивом и регистрируют отражение, пропускание или флуоресценцию на хроматограммах испытуемого раствора и растворов сравнения. По полученным данным рассчитывают количество вещества в испытуемом растворе.

Вещества, содержащие радионуклиды. Готовят и наносят испытуемый раствор, содержащий около 100 % ожидаемого значения концентрации. Измеряют радиоактивность как функцию длины пути и записывают радиоактивность каждого полученного пика в процентах от суммарной радиоактивности.

Критерии пригодности системы описаны в статье 2.2.46. *Хроматографические методы разделения.* Допустимые величины изменений, которые можно вносить с хроматографическую систему для удовлетворения критериям пригодности системы, также указаны в данном разделе.

01/2013:20228

2.2.28. ГАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Газовая хроматография (ГХ) представляет собой метод разделения, основанный на различном распределении образца между двумя несмешивающимися фазами, в котором подвижной фазой является газ (газ-носитель), а неподвижной фазой, помещенной в

колонку, – твердое вещество или жидкость, нанесенные на твердый инертный носитель или равномерно покрывающие внутренние стенки колонки.

Газовая хроматография основана на механизмах адсорбции, распределения или эксклюзии.

ПРИБОР

Прибор состоит из блока ввода проб (инжектора), хроматографической колонки, помещенной в термостат, детектора и регистрирующего устройства (интегрирующее устройство или самописец). Газ-носитель проходит с заданной скоростью или давлением через колонку, а затем через детектор.

Определение проводят при постоянной температуре колонки или в соответствии с заданной температурной программой.

БЛОК ВВОДА ПРОБ (ИНЖЕКТОР)

Прямой ввод растворов является обычным способом ввода проб, если в частной статье нет других указаний. Ввод пробы может осуществляться либо непосредственно в начало колонки с использованием шприца или инжекторного клапана, либо в испаритель, который может оснащаться делителем потока.

Ввод паровой фазы может осуществляться с использованием статической или динамической парофазной системы ввода.

Динамическая парофазная (продувка и уловитель) система ввода включает барботажную установку, при помощи которой летучие вещества в растворе продуваются в абсорбирующую колонку при невысокой температуре. Задержанные на колонке вещества затем десорбируются в подвижную фазу при быстром нагревании абсорбирующей колонки.

Статическая парофазная система ввода включает термостатируемую нагревающую камеру для образцов, в которую помещены закрытые виалы с твердыми или жидкими образцами на фиксированный период времени, позволяющий летучим компонентам образца достичь равновесия между негазовой и паровой фазами. После достижения равновесия заданное количество паровой фазы из виал вводится в газовый хроматограф.

НЕПОДВИЖНАЯ ФАЗА

Колонки с помещенной в них неподвижной фазой могут быть описаны следующим образом:

- капиллярные кварцевые колонки с покрытыми неподвижной фазой внутренними стенками;
- колонки, заполненные инертными частицами, импрегнированными неподвижной фазой;
- колонки, заполненные твердой неподвижной фазой.

Капиллярные колонки имеют внутренний диаметр (ϕ) от 0,1 мм до 0,53 мм и длину от 5 м до 60 м. Жидкость или неподвижная фаза, которая может быть химически связана с внутренней поверхностью, представляет собой пленку с толщиной слоя от 0,1 мкм до 5,0 мкм.

Набивные колонки, изготовленные из стекла или металла, имеют длину обычно от 1 м до 3 м и внутренний диаметр (ϕ) от 2 мм до 4 мм. Неподвижная фаза обычно состоит из пористых полимеров или твердых носителей, импрегнированных жидкой фазой.

Носители для анализа полярных соединений на колонках, набитых малоемкой малополярной неподвижной фазой, должны быть инертными для предотвращения образования пиков с размытым тылом. Реакционная способность носителей может быть снижена путем силанизации, предшествующей нанесению жидкой фазы. Обычно используют обработанный кислотой и прокаленный диатомит. Размер частиц может быть разным, но наиболее часто используются частицы размером от 150 мкм до 180 мкм и от 125 мкм до 150 мкм.

ПОДВИЖНАЯ ФАЗА

Время удерживания и характеристики пика зависят от скорости потока газа-носителя; время удерживания прямо пропорционально длине колонки, а разрешение

пропорционально квадратному корню из длины колонки. Для набивных колонок скорость потока газа-носителя обычно выражают в миллилитрах в минуту при атмосферном давлении и комнатной температуре. Скорость потока измеряется при рабочей температуре колонки на выходе из детектора как градуированным механическим устройством, так и с помощью пенного измерителя. Линейная скорость газа-носителя через набивную колонку обратно пропорциональна квадратному корню из внутреннего диаметра колонки для данного объема потока. Скорости потока 60 мл/мин при внутреннем диаметре колонки 4 мм и 15 мл/мин при внутреннем диаметре 2 мм дают одинаковые линейные скорости и близкие времена удерживания.

В качестве газа-носителя для набивных колонок обычно используют гелий или азот, для капиллярных – азот, гелий и водород.

ДЕТЕКТОРЫ

Обычно используется пламенно-ионизационные детекторы; кроме этого, в зависимости от цели анализа могут применяться следующие типы детекторов: электронного захвата, азотно-фосфорный, масс-спектрометрический, термокондуктометрический, ИК-спектрофотометрический с преобразованием Фурье и другие.

МЕТОДИКА

Колонку, устройство ввода пробы и детектор термостатируют при указанной в частной статье температуре и скорости газа-носителя до получения стабильной базовой линии. Готовят испытуемый раствор(ы) и раствор(ы) сравнения, как указано в частной статье. Растворы не должны содержать твердых частиц.

Критерии для проверки пригодности хроматографической системы описаны в статье 2.2.46. *Хроматографические методы разделения*, где кроме этого приводятся интервалы, в пределах которых могут изменяться различные параметры хроматографических испытаний без принципиального изменения методики, для того, чтобы удовлетворять критериям пригодности хроматографической системы.

Парофазная газовая хроматография

Парофазная газовая хроматография является методом, наиболее подходящим для разделения и определения летучих соединений, которые присутствуют в твердых или жидких образцах. Метод основан на анализе газовой фазы, находящейся в равновесии с твердой или жидкой фазой.

ПРИБОР

Прибор состоит из газового хроматографа, снабженного устройством для ввода испытуемого образца, которое может быть связано с модулем автоматического контроля давления и температуры. При необходимости используют устройство для удаления растворителей.

Испытуемый образец вводят в контейнер, снабженный подходящей пробкой и клапанной системой, которая регулирует прохождение газа-носителя. Контейнер помещают в термостатируемую камеру с температурой, устанавливаемой в соответствии со свойствами испытуемого образца.

Пробу выдерживают при заданной температуре в течение времени, достаточного для установления равновесия между твердой или жидкой фазой и газовой фазой.

В контейнер вводят газ-носитель и по истечении указанного времени открывают клапан, чтобы газ поступал в хроматографическую колонку, перенося с собой перешедшие в газовую фазу компоненты.

Вместо специально оснащенного устройства для ввода образцов хроматографа возможно использование газовых шприцов и обычного хроматографа. Уравновешивание в таком случае проводится в отдельной камере, а паровая фаза вводится в колонку с соблюдением необходимых мер предосторожности для предотвращения любых изменений в равновесной системе.

МЕТОДИКА

Настраивают прибор для получения необходимого сигнала, используя подготовленные образцы сравнения.

МЕТОД ПРЯМОЙ ГРАДУИРОВКИ

В одинаковые флаконы отдельно помещают испытуемый образец и каждый из образцов сравнения, приготовленные, как указано в частной статье, избегая контакта между устройством для ввода проб и образцами.

Флаконы герметично закрывают и помещают в термостатируемую камеру с температурой и давлением, указанными в частной статье. После установления равновесия паровую фазу хроматографируют в указанных условиях.

МЕТОД СТАНДАРТНЫХ ДОБАВОК

Равные объемы испытуемого образца помещают в одинаковые указанные в частной статье контейнеры. Во все контейнеры, кроме одного, прибавляют указанные количества раствора сравнения, содержащего известную концентрацию анализируемого вещества, для получения ряда образцов с равномерно увеличивающимися концентрациями этого вещества.

Контейнеры герметично закрывают и помещают в термостатируемую камеру с температурой и давлением, указанными в частной статье. После установления равновесия хроматографируют газовую фазу в указанных условиях.

Уравнение линейной зависимости рассчитывают методом наименьших квадратов. По полученному уравнению определяют концентрацию анализируемого вещества в испытуемом образце.

Допускается определение концентрации с использованием графического метода. Для этого по оси ординат откладывают средние значения полученных результатов, а по оси абсцисс – концентрации стандартных добавок анализируемого вещества. Экстраполируют линию, проходящую через полученные точки, до пересечения с осью абсцисс. Расстояние между этой точкой и началом координат представляет собой концентрацию анализируемого вещества в испытуемом растворе.

МЕТОД ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНЫХ ОТБОРОВ (МНОГОКРАТНАЯ ПАРОФАЗНАЯ ЭКСТРАКЦИЯ)

Применение данного метода описано в частной статье.

01/2013:20230

2.2.30. ЭКСКЛЮЗИОННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Эксклюзионная хроматография представляет собой хроматографический метод, в котором процесс разделения молекул в растворе происходит в соответствии с их размерами. В случае использования органической подвижной фазы метод называют *гель-проникающей хроматографией*, а в случае использования водной подвижной фазы – *гель-фильтрационной хроматографией*. Проба вводится в колонку, заполненную гелем или пористыми частичками наполнителя, и переносится подвижной фазой через колонку. Разделение в соответствии с размерами происходит в процессе движения и многоразовых обменов молекул растворенного вещества между молекулами растворителя подвижной фазы и тем же самым растворителем, находящимся в порах материала, которым заполнена колонка (неподвижная фаза). Диапазон размеров распределенных молекул определяется диапазоном размеров пор наполнителя.

Достаточно маленькие молекулы, способные проникать во все поры материала, элюируются в *полном проникающем объеме* колонки (V , #объем пор[#]). Молекулы с размерами, превышающими размер всех пор материала колонки, мигрируют лишь сквозь пространство между частицами наполнителя, не препятствуя им, и элюируются в свободном объеме колонки или *объеме эксклюзии* (V_0 , объем пустот). Разделение молекул в соответствии с размерами происходит между объемом эксклюзии и полным

проникающим объемом колонки; наиболее эффективное разделение происходит в первые две трети данного диапазона.

Прибор. Специфичной частью оборудования является хроматографическая колонка с различными длиной и внутренним диаметром (Φ), заполненная материалом, который обеспечивает разделение молекул соответствующих размеров в необходимом диапазоне. При необходимости колонку термостатируют. Через колонку с постоянной скоростью пропускают элюент. К одному концу колонки обычно присоединяют приспособление для введения пробы, например, инжектор с прерывателем потока, шприцевой инжектор с мембраной или инжектор с клапаном. К этому же концу колонки также может быть присоединен соответствующий насос для подачи элюента с контролируемой скоростью. Проба может также наноситься непосредственно на сухую поверхность материала колонки или, если вязкость пробы превышает вязкость элюента, может наслаиваться на поверхность материала колонки под элюент. Другой конец колонки обычно присоединяют к соответствующему детектору с приспособлением, регистрирующим и обеспечивающим контроль соответствующих концентраций распределенных компонентов пробы. Обычно используют следующие детекторы: фотометрический, рефрактометрический или люминесцентный. При необходимости может быть присоединен автоматический коллектор фракций.

В качестве наполнителя может использоваться или мягкий носитель, такой как набухший гель, или твердый – пористое стекло, силикагель или подходящий для данного растворителя поперечносшитый органический полимер. При использовании твердых носителей обычно применяют принудительную подачу подвижной фазы под давлением, что ускоряет разделение. Подвижную фазу выбирают исходя из природы пробы, наполнителя и метода детектирования. Указания по обработке материала для заполнения колонки перед выполнением разделения и наполнения колонки представлены в соответствующей частной статье или инструкции изготовителя.

Критерии для проверки пригодности хроматографической системы описаны в статье 2.2.46. *Хроматографические методы разделения*, где также приводятся интервалы, в пределах которых могут изменяться различные параметры хроматографических испытаний без принципиального изменения методики для того, чтобы удовлетворять критериям пригодности хроматографической системы.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНОГО КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА СМЕСЕЙ

Разделение проводят, как описано в частной статье. По возможности постоянно контролируют элюирование компонентов и измеряют площади соответствующих пиков. Если контроль пробы проводится по физико-химическим свойствам, по которым все интересующие компоненты обладают одинаковыми откликами (например, они имеют одинаковое удельное оптическое поглощение), относительное содержание каждого компонента рассчитывают как отношение площади пика соответствующего компонента к сумме площадей пиков всех компонентов. Если отклики компонентов по детектируемому свойству отличаются, содержание каждого компонента рассчитывают с помощью градуировочных графиков, полученных с использованием соответствующих стандартных образцов для градуировки, как указано в частной статье.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАСС

Эксклюзионная хроматография может быть использована для определения молекулярных масс веществ путем сравнения с соответствующими стандартными образцами для градуировки, указанными в частной статье. Для молекулярных масс стандартных образцов строят график зависимости объема удерживания от логарифма молекулярных масс. График, выстроенный в пределах, ограниченных значениями объема эксклюзии и полного проникающего объема, обычно для данной колонки в данных экспериментальных условиях приближается к прямой линии. На основании этого графика могут быть рассчитаны молекулярные массы. Использование молекулярно-массовой градуировки позволяет получать достоверные результаты лишь для частных случаев систем высокомолекулярное вещество/растворитель в описанных экспериментальных условиях.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-МАССОВОГО РАЗДЕЛЕНИЯ ПОЛИМЕРОВ

Эксклюзионная хроматография может быть использована для определения молекулярно-массового распределения полимеров. Однако сравнить между собой результаты можно лишь в одинаковых экспериментальных условиях. Стандартные образцы, используемые для градуировки, и методики анализа описывают в соответствующих частных статьях.

01/2013:20231

2.2.31. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

ОБЩИЙ ПРИНЦИП

Под действием электрического поля заряженные частицы, растворенные или диспергированные в растворе электролита, передвигаются в направлении электрода противоположной полярности. В гель-электрофорезе движение частиц замедляется взаимодействием с окружающей матрицей геля, который действует как молекулярное сито. Встречные взаимодействия электрической силы и молекулярного сита приводят к дифференциации скорости передвижения частиц в зависимости от их размеров, форм и зарядов. В ходе электрофореза из-за различия физико-химических свойств разные макромолекулы смеси передвигаются с разной скоростью и, таким образом, разделяются на дискретные фракции. [#]Скорость передвижения прямо пропорциональна суммарному заряду частицы и обратно пропорциональна ее размеру либо молекулярной массе. [#]

[#]Электрофоретическая подвижность является величиной, характерной для данного вещества. Различают абсолютную и относительную электрофоретическую подвижность. Абсолютная электрофоретическая подвижность под влиянием градиента потенциала 1 В на 1 см измеряется в сантиметрах в секунду. Относительная электрофоретическая подвижность – это отношение подвижности испытуемого вещества к подвижности другого вещества, принятого за стандарт. [#]

Электрофоретическое разделение может быть проведено в системах без неподвижных фаз (например, свободное разделение раствора в капиллярном электрофорезе) и в стабилизированных средах, таких как тонкослойные пластинки, пленки или гели.

[#]Существует два различных метода электрофореза: фронтальный и зональный. Фронтальный электрофорез проводят в свободной незакрепленной среде, и он является единственным способом определения абсолютной электрофоретической подвижности. Зональный электрофорез проводят в закрепленной среде, цель которой состоит в стабилизации электрофоретических зон. [#]

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ СО СВОБОДНОЙ ИЛИ ПОДВИЖНОЙ ГРАНИЦЕЙ

Этот метод обычно используется для определения электрофоретической подвижности, экспериментальной характеристики веществ, непосредственно измеренной и воспроизведенной. Этот метод обычно применяется для веществ с высокой относительной молекулярной массой, которые имеют малую способность к диффузии. Перед началом определения определяют месторасположение границ физическими методами, например, рефрактометрией или кондуктометрией. После наложения определенного электрического поля в течение точно измеренного времени определяют новые границы и их относительное положение. Условия испытания подбирают так, чтобы можно было определять столько границ, сколько веществ присутствует в испытуемом образце.

ЗОНАЛЬНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФАЗЫ НОСИТЕЛЯ

Для проведения этого испытания требуется лишь небольшое количество испытуемого образца.

Природа носителя (бумаги, геля агара, ацетата целлюлозы, крахмала, агарозы, полиакриламида, смешанного геля) служит причиной ряда дополнительных факторов, влияющих на подвижность:

а) вследствие наличия каналов в фазе носителя кажущееся пройденное расстояние меньше реального пройденного расстояния;

б) некоторые фазы носителя не являются электрически нейтральными. Поскольку носители являются неподвижной фазой, это иногда может приводить к значительно большему электроэндоосмотическому потоку;

в) любое нагревание в результате эффекта Джоуля может вызвать некоторое испарение жидкости с фазы носителя, что вследствие капиллярности приводит к движению раствора в направлении от краев к центру. Ионная сила в этом случае возрастает.

Следовательно, скорость передвижения зависит от четырех главных факторов: подвижности заряженной частицы, скорости потока электроэндоосмоса, испарения жидкости с фазы носителя, напряженности поля. Поэтому необходимо проводить испытание в строго определенных экспериментальных условиях и, по возможности, использовать стандартные вещества.

Основными составляющими прибора для электрофореза являются следующие.

– *Источник постоянного тока*, напряжение которого можно контролировать и, желательно, стабилизировать.

– *Электрофоретическая камера*. Обычно это камера из стекла или твердой пластмассы, состоящая из двух отдельных резервуаров – анодного и катодного, содержащих раствор электролита. В каждый резервуар камеры погружается электрод, например, платиновый или графитовый. Они присоединяются изолированной схемой к соответствующему выходу источника питания и образуют анод и катод. Во избежание сифонирования уровень жидкости в обоих резервуарах камеры поддерживается одинаковым.

Электрофоретическая камера снабжена воздухонепроницаемой крышкой, которая поддерживает атмосферу насыщенную влажностью на протяжении испытания и уменьшает испарение растворителя. При снятии крышки ток отключается предохранителем. Если электродвижущая сила измерена в интервале, превышающим 10 В, желательно охладить носитель.

– *Приспособление установки носителя. Электрофорез на полосках*. Полоски с носителем, предварительно смоченные одним и тем же электродным раствором, погружают в электродный резервуар, закрепляют и фиксируют соответствующим держателем для предупреждения диффузии электролита. Такими держателями могут быть горизонтальная рамка, перевернуто-V-образный штатив или однородная поверхность с точками контакта через определенные интервалы.

Гель-электрофорез. Основной частью приспособления является стеклянная пластинка (например, предметное стекло), на поверхность которой нанесен слой хорошо закрепленного геля одинаковой толщины. Соединение геля с электродным раствором осуществляется разными способами в зависимости от типа используемого прибора. Необходимо принять меры для предупреждения конденсации воды или высыхания твердого слоя.

– *Измерительное устройство или детектор*.

Методика. Раствор электролита помещают в электродный резервуар. Соответствующим образом импрегнированный носитель с электролитным раствором помещают в камеру в соответствии с инструкцией для используемого прибора. Устанавливают линию старта и наносят образец. Подают электрический ток в течение определенного времени. После отключения тока носитель вынимают из камеры, высушивают и проявляют.

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА КОЛОНКАХ С ПОЛИАКРИЛАМИДНЫМ ГЕЛЕМ

При электрофорезе на колонках с полиакриламидным гелем стационарной фазой является гель, приготовленный из смеси акриламида и N,N' -метиленабисакриламида. Колонку с гелем готовят с использованием трубок длиной 7,5 см и внутренним диаметром 0,5 см; во всех трубках должен быть использован один и тот же раствор.

Прибор. Прибор состоит из двух вставленных вертикально один над другим резервуаров для буферного раствора, изготовленных из подходящего материала, например, поли(метилметакрилата). Каждый резервуар снабжен платиновым электродом. Электроды присоединены к источнику тока, что позволяет проводить испытание или при

постоянном токе, или при постоянном напряжении. В основании верхнего резервуара имеется ряд держателей, равноудаленных от электрода.

Методика. Обычно растворы дегазируют до начала полимеризации и гели используют сразу после приготовления. Готовят предписанную смесь компонентов, заливают в соответствующие закрытые снизу стеклянные колонки до одинакового уровня около 1 см от верхнего края, избегая попадания пузырьков воздуха в колонки. На смесь геля наслаивают слой *воды Р*, чтобы исключить попадание воздуха, и оставляют для полимеризации. Гелеобразование обычно занимает около 30 минут и завершается, когда образуется четкое разделение поверхности геля и водного слоя. Водный слой удаляют. Нижний резервуар наполняют указанным буферным раствором. Колонки открывают и вставляют в держатели верхнего резервуара так, чтобы дно колонок было погружено в буферный раствор нижнего резервуара. Колонки осторожно наполняют указанным буферным раствором. Готовят испытуемые образцы и образцы сравнения, содержащие индикаторный краситель, и уплотняют путем растворения в них, например, *сахарозы Р*. Приготовленные образцы наслаивают на поверхность геля, используя для каждого образца отдельную колонку. Верхний резервуар наполняют тем же буферным раствором. Электроды подключают к источнику тока и проводят процесс электрофореза при указанных условиях: температуре и постоянном напряжении или токе. Источник тока отключают, когда индикаторный краситель почти переходит в нижний резервуар. Каждую колонку сразу вынимают из прибора и извлекают гель. Определяют местоположение полос на электрофореграмме.

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ С НАТРИЯ ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТОМ В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ (ДСН-ПАГ, *SDS-PAGE*)

Область применения. Электрофорез в полиакриламидном геле применяется для качественной идентификации белков в биологических препаратах, контроля их чистоты и количественных определений.

Цель. Аналитический гель-электрофорез – метод, позволяющий идентифицировать и оценить гомогенность белков в лекарственных средствах. Метод обычно используется для определения молекулярных масс белковых субъединиц и субъединичного состава очищенных белков.

Имеется разнообразный ассортимент коммерчески доступных готовых к использованию гелей и реактивов, которые могут быть использованы вместо описанных в общей статье, если получаются эквивалентные результаты и выполняются условия раздела «Валидация испытания», приведенного ниже.

СВОЙСТВА ПОЛИАКРИЛАМИДНЫХ ГЕЛЕЙ

Ситовые свойства полиакриламидных гелей обусловлены трехмерной сеткой геля, образованной поперечными сшивками соседних акриламидных цепей бифункциональным бисакриламидом. Процесс полимеризации катализируется системой генерирующей свободные радикалы состоящей из аммония персульфата и тетраметилэтилендиамина.

При увеличении концентрации акриламида в геле уменьшается эффективный размер пор. Практически эффективный размер пор геля определяется его ситовыми свойствами, то есть сопротивлением миграции макромолекул. Из этого следует, что акриламид может использоваться только в определенных концентрациях. При высоких концентрациях акриламида гели чаще ломаются и являются сложными в обработке. Поскольку размер пор геля уменьшается, уменьшается скорость миграции белка через гель. Регулируя размер пор геля, изменяя концентрацию акриламида, можно оптимизировать условия разделения испытуемого белкового продукта. Следовательно, данный конкретный гель характеризуется содержанием акриламида и бисакриламида.

Кроме состава геля, важным компонентом электрофоретической подвижности является структура белка. В случае определения белков электрофоретическая подвижность зависит от значения pK заряженных групп и размера молекулы. На это влияют тип, концентрация и pH буфера, температура и сила электрического поля, а также природа материала носителя.

ДЕНАТУРИРУЮЩИЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ

Данный метод является примером анализа мономерных полипептидов с молекулярной массой от 14 000 дальтон до 100 000 дальтон. Возможно расширение границ молекулярных масс (например, путем использования градиентных гелей, особенностей буферной системы), но такие методики анализа не обсуждаются в данной статье.

Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле с использованием натрия додецилсульфата (ДСН-ПАГ; *SDS-PAGE*) является наиболее общепринятым методом электрофореза, который используется для оценки качества белковых лекарственных средств и описан ниже в качестве примера указанного метода. Обычно аналитический электрофорез белков проводят в полиакриламидных гелях в условиях, обеспечивающих диссоциацию белков на отдельные полипептидные субъединицы и минимизирующих их агрегацию. Чаще всего перед нанесением на гель белки подвергают диссоциации, нагревая их с сильным анионным детергентом – натрия додецилсульфатом (ДСН). Денатурированные полипептиды связываются с ДСН, превращаясь в отрицательно заряженные частички с постоянным отношением массы к заряду независимо от типа белка. Поскольку количество связанного ДСН почти всегда пропорционально молекулярной массе полипептида и не зависит от его последовательности, ДСН-полипептидные комплексы мигрируют в полиакриламидном геле со скоростью, зависящей от размера полипептида. Электрофоретическая подвижность полученных детергент-полипептидных комплексов находится в функциональной взаимосвязи с их молекулярными массами. Миграция ДСН-комплексов происходит в направлении к аноду предсказуемым образом: комплексы с низкими молекулярными массами движутся быстрее, чем комплексы с большими молекулярными массами. Следовательно, молекулярная масса белка может быть определена калибровкой ДСН-ПАГ, и наличие единичной полосы в геле является критерием чистоты белка.

Однако модификации полипептидной цепи, например, *N*- или *O*-гликозилирование, приводят к значительному влиянию на кажущуюся среднюю молекулярную массу белка, так как ДСН не связывается с углеводным компонентом так, как с полипептидным. В этом случае постоянное отношение заряда к молекулярной массе не сохраняется. Средняя молекулярная масса белков, подвергнутых посттрансляционной модификации, не является истинным отображением массы полипептидной цепи.

Восстанавливающие условия. Полипептидные субъединицы и трехмерная структура белков часто поддерживаются благодаря присутствию дисульфидных связей. Целью ДСН-ПАГ испытаний в восстановленных условиях является разрушение структуры белка восстановлением дисульфидных связей. Полная денатурация и диссоциация белков обработкой 2-меркаптоэтанолом или дитиотреитолом (ДТТ) приводит к разворачиванию полипептидной цепи и дальнейшему комплексообразованию с ДСН. В этих условиях молекулярную массу полипептидных субъединиц можно рассчитать по линейной зависимости в присутствии соответствующих стандартов молекулярных масс.

Невосстанавливающие условия. Для ряда испытаний полная диссоциация белка на субъединичные пептиды невозможна. Из-за отсутствия восстанавливающих агентов, таких как 2-меркаптоэтанол или ДТТ, дисульфидные ковалентные связи становятся недоступными, сохраняя олигомерную форму белка. Олигомерные ДСН-белковые комплексы мигрируют медленнее, чем их ДСН-полипептидные субъединицы. Кроме того, невосстановленные белки не могут быть целиком насыщены ДСН и, соответственно, поэтому не могут связывать детергент с постоянным соотношением масс. Это делает молекулярно-массовое определение этих молекул с помощью ДСН-ПАГ неадекватным в сравнении с анализом полностью денатурированных полипептидов, так как необходимо наличие стандартов, которые имеют идентичную с испытуемым неизвестным белком конфигурацию для адекватного сравнения. Однако проявление одной полосы в таком геле является критерием чистоты белка.

СВОЙСТВА ЭЛЕКТРОФОРЕЗА В ГЕЛЕ С ПЕРЫВИСТОЙ БУФЕРНОЙ СИСТЕМОЙ

Наиболее широко используемый электрофоретический метод исследования сложных белковых смесей включает использование перывистой буферной системы, которая

состоит из двух гелей: разрешающего или разделяющего (нижнего) геля и концентрирующего (верхнего) геля. Два геля отличаются пористостью, pH и ионной силой. Кроме того, используются разные по подвижности ионы в геле и электродных буферах. Благодаря буферной прерывистости происходит концентрация больших объемов образца, приводя к лучшему разрешению. После подключения источника тока перепад напряжения приводит к тому, что белки проникают в концентрирующий гель. Глицинат-ионы из электродного буфера двигаются вслед за белками в концентрирующий гель. Быстро образуется область подвижной границы с высокоподвижными хлорид-ионами на переднем краю и относительно медленными глицинат-ионами на заднем краю. Образуется локализованный высоковольтный градиент между фронтами лидирующих и отстающих ионов, заставляя ДСН-белковые комплексы формировать тонкие зоны (полосы) и мигрировать между фазами хлорида и глицината. В широких границах, независимо от высоты нанесенного образца, все ДСН-белки концентрируются в очень узкую область и двигаются к разделяющему гелю в виде четко определенной тонкой зоны с высокой плотностью белка. Крупнопористый концентрирующий гель не задерживает миграцию большинства белков и, в основном, служит антиконвективной средой.

На границе раздела концентрирующего и разделяющего гелей происходит резкое возрастание эффекта задерживания белков вследствие ограниченного размера пор разделяющего геля. Одновременно движение белков в разделяющем геле продолжает замедляться вследствие ситовых свойств матрицы. Глицинат-ионы догоняют белки, которые далее передвигаются в пространстве с постоянным pH, образованным трис(гидроксиметил)аминометаном и глицином. Молекулярно-ситовые свойства фазы приводят к разделу ДСН-полипептидных комплексов в соответствии с их молекулярными массами.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ВЕРТИКАЛЬНЫХ ПРЕРЫВИСТО-БУФЕРНЫХ ДСН-ПОЛИАКРИЛАМИДНЫХ ГЕЛЕЙ

Сборка кассет, формирующих гель. Две стеклянные пластинки (например, размером 10 см × 8 см), политетрафторэтиленовую гребенку, две прокладки и силиконовые трубки (например, диаметром 0,6 мм и длиной 35 см) моют с мягким моющим средством и ополаскивают водой. Все предметы сушат бумажным полотенцем или тканью. Прокладки и трубки смазывают несиликоновым маслом. Прокладки укладывают вдоль двух коротких сторон стеклянных пластин на расстоянии 2 мм от их краев и 2 мм от длинной стороны, являющейся дном геля. Используя одну прокладку в качестве основы, начинают укладывать трубку. Осторожно просовывают трубку к низу прокладки и протягивают вдоль длинной стороны стеклянной пластинки. Придерживая трубку вдоль длинной стороны пластинки, укладывают трубку по короткой стороне стеклянной пластинки, используя прокладку в качестве направляющей. Накрывают другой стеклянной пластинкой, плотно прижимая кассету руками. Устанавливают по два зажима на две короткие стороны кассеты. Осторожно устанавливают четыре зажима на длинную сторону кассеты геля, формируя дно кассеты. Необходимо удостовериться, что трубка проходит вдоль края стеклянной пластинки и нигде не выдавливается при размещении зажимов. Кассета готова для заливания гелем.

Приготовление геля. В случае прерывистого буферного ДСН-полиакриламидного геля рекомендуется залить разделительный гель, дождаться его полимеризации и затем залить концентрирующий гель, поскольку гели отличаются содержанием акриламида-бисакриламида, буфером и pH.

Приготовление разделительного геля. В конической колбе готовят соответствующий объем раствора с необходимой концентрацией акриламида для формирования геля, используя указания, приведенные в таблице 2.2.31.-1. Компоненты смешивают в указанной последовательности. Если необходимо, перед прибавлением раствора аммония персульфата и тетраметилэтилендиамина (ТЕМЭД) раствор фильтруют под вакуумом сквозь ацетатцеллюлозную мембрану (диаметр пор 0,45 мкм); раствор выдерживают под вакуумом, взбалтывая фильтрационное приспособление до окончания образования в растворе пузырьков. Прибавляют соответствующее количество раствора аммония персульфата и ТЕМЭД, как указано в таблице 2.2.31.-1, взбалтывают и сразу заливают в

пространство между двумя пластинками кассеты. Оставляют необходимое место для концентрирующего геля (к длине зубца гребенки прибавляют 1 см). Используя заостренную стеклянную пипетку, осторожно наслаивают насыщенный водой раствор изобутанола. Гель выдерживают в вертикальном положении при комнатной температуре для полимеризации.

Таблица 2.2.31.-1

Приготовление разделительного геля

Компоненты раствора	Объем компонента (мл) на 1 кассету геля вместимостью							
	5 мл	10 мл	15 мл	20 мл	25 мл	30 мл	40 мл	50 мл
6 % акриламид								
Вода Р	2,6	5,3	7,9	10,6	13,2	15,9	21,2	26,5
Раствор акриламида ⁽¹⁾	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	8,0	10,0
1,5 М Трис (рН 8,8) ⁽²⁾	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
Раствор 100 г/л ДСН ⁽³⁾	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
Раствор 100 г/л АПС ⁽⁴⁾	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
ТЕМЭД ⁽⁵⁾	0,004	0,008	0,012	0,016	0,02	0,024	0,032	0,04
8 % акриламид								
Вода Р	2,3	4,6	6,9	9,3	11,5	13,9	18,5	23,2
Раствор акриламида ⁽¹⁾	1,3	2,7	4,0	5,3	6,7	8,0	10,7	13,3
1,5 М Трис (рН 8,8) ⁽²⁾	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
Раствор 100 г/л ДСН ⁽³⁾	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
Раствор 100 г/л АПС ⁽⁴⁾	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
ТЕМЭД ⁽⁵⁾	0,003	0,006	0,009	0,012	0,015	0,018	0,024	0,03
10 % акриламид								
Вода Р	1,9	4,0	5,9	7,9	9,9	11,9	15,9	19,8
Раствор акриламида ⁽¹⁾	1,7	3,3	5,0	6,7	8,3	10,0	13,3	16,7
1,5 М Трис (рН 8,8) ⁽²⁾	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
Раствор 100 г/л ДСН ⁽³⁾	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
Раствор 100 г/л АПС ⁽⁴⁾	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
ТЕМЭД ⁽⁵⁾	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02
12 % акриламид								
Вода Р	1,6	3,3	4,9	6,6	8,2	9,9	13,2	16,5
Раствор акриламида ⁽¹⁾	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0	12,0	16,0	20,0
1,5 М Трис (рН 8,8) ⁽²⁾	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
Раствор 100 г/л ДСН ⁽³⁾	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
Раствор 100 г/л АПС ⁽⁴⁾	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
ТЕМЭД ⁽⁵⁾	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02
14 % акриламид								
Вода Р	1,4	2,7	3,9	5,3	6,6	8,0	10,6	13,8
Раствор акриламида ⁽¹⁾	2,3	4,6	7,0	9,3	11,6	13,9	18,6	23,2
1,5 М Трис (рН 8,8) ⁽²⁾	1,2	2,5	3,6	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
Раствор 100 г/л ДСН ⁽³⁾	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
Раствор 100 г/л АПС ⁽⁴⁾	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
ТЕМЭД ⁽⁵⁾	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02
15 % акриламид								
Вода Р	1,1	2,3	3,4	4,6	5,7	6,9	9,2	11,5
Раствор акриламида ⁽¹⁾	2,5	5,0	7,5	10,0	12,5	15,0	20,0	25,0
1,5 М Трис (рН 8,8) ⁽²⁾	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
Раствор 100 г/л ДСН ⁽³⁾	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
Раствор 100 г/л АПС ⁽⁴⁾	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
ТЕМЭД ⁽⁵⁾	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02

⁽¹⁾ Раствор акриламида: 30 % раствор акриламид-бисакриламида (29:1) Р.

⁽²⁾ 1,5 М Трис (рН 8,8): 1,5 М буферный раствор трис-гидрохлорида рН 8,8 Р.

⁽³⁾ Раствор 100 г/л ДСН: раствор 100 г/л натрия додецилсульфата Р.

⁽⁴⁾ Раствор 100 г/л АПС: раствор 100 г/л аммония персульфата Р. Благодаря аммония персульфату появляются свободные радикалы, ускоряющие полимеризацию акриламида и бисакриламида. Поскольку раствор аммония персульфата медленно разлагается, свежие растворы следует готовить еженедельно.

⁽⁵⁾ ТЕМЭД: тетраметилэтилендиамин Р.

Приготовление концентрирующего геля. После завершения полимеризации (около 30 мин) сливают изобутанол и промывают верхнюю поверхность геля несколько раз водой для удаления нанесенного изобутанола и любых неполимеризованных излишков акриламида. Удаляют как можно больше жидкости с поверхности геля при помощи кончика бумажной салфетки.

В конической колбе готовят соответствующий объем раствора с необходимой концентрацией акриламида для формирования геля, используя указания, приведенные в таблице 2.2.31.-2. Компоненты смешивают в указанной последовательности. Если необходимо, перед прибавлением раствора аммония персульфата и ТЕМЭД раствор фильтруют под вакуумом сквозь ацетатцеллюлозную мембрану (диаметр пор 0,45 мкм); раствор выдерживают под вакуумом, встряхивая фильтрационное приспособление до окончания образования в растворе пузырьков. Прибавляют соответствующее количество раствора аммония персульфата и ТЕМЭД, как указано в таблице 2.2.31.-2, взбалтывают и сразу заливают в пространство между двумя пластинками кассеты прямо на поверхность полимеризованного разделительного геля. В раствор концентрирующего геля сразу вкладывают чистую политетрафторэтиленовую гребенку во избежание появления воздушных пузырьков. Прибавляют еще раствор концентрирующего геля до полного заполнения пространства гребня. Гель выдерживают в вертикальном положении при комнатной температуре для полимеризации.

Таблица 2.2.31.-2

Приготовление концентрирующего геля

Компоненты раствора	Объем компонента (мл) на 1 кассету геля вместимостью							
	1 мл	2 мл	3 мл	4 мл	5 мл	6 мл	8 мл	10 мл
<i>Вода Р</i>	0,68	1,4	2,1	2,7	3,4	4,1	5,5	6,8
Раствор акриламида ⁽¹⁾	0,17	0,33	0,5	0,67	0,83	1,0	1,3	1,7
1,0 М Трис (рН 6,8) ⁽²⁾	0,13	0,25	0,38	0,5	0,63	0,75	1,0	1,25
Раствор 100 г/л ДСН ⁽³⁾	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,08	0,1
Раствор 100 г/л АПС ⁽⁴⁾	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,08	0,1
ТЕМЭД ⁽⁵⁾	0,001	0,002	0,003	0,004	0,005	0,006	0,008	0,01

⁽¹⁾ Раствор акриламида: 30 % раствор акриламид/бисакриламида (29:1) Р.

⁽²⁾ 1,0 М Трис (рН 6,8): 1 М буферный раствор трис-гидрохлорида рН 6,8 Р.

⁽³⁾ Раствор 100 г/л ДСН: раствор 100 г/л натрия додецилсульфата Р.

⁽⁴⁾ Раствор 100 г/л АПС: раствор 100 г/л аммония персульфата Р. Благодаря аммония персульфату появляются свободные радикалы, ускоряющие полимеризацию акриламида и бисакриламида. Поскольку раствор аммония персульфата медленно разлагается, свежие растворы следует готовить еженедельно.

⁽⁵⁾ ТЕМЭД: тетраметилэтилендиамин Р.

Сборка электрофоретического прибора и проведение электрофоретического разделения. После завершения полимеризации (около 30 мин) осторожно удаляют политетрафторэтиленовую гребенку. Сразу ополаскивают стенки водой или *буферным рабочим раствором для электрофореза в системе натрия додецилсульфат – полиакриламидный гель (SDS-PAGE) Р* для удаления излишков неполимеризованного акриламида. При необходимости поправляют зубцы концентрирующего геля тупой гиподермичной иглой, надетой на шприц. Снимают зажимы с одной короткой стороны, осторожно вытягивают трубку и возвращают зажимы на место. Повторяют эти операции с другой короткой стороны. Затем удаляют трубку со дна геля. Помещают гель в прибор для электрофореза. Верхний и нижний резервуары наполняют буфером для электрофореза. Удаляют все пузырьки, образующиеся на дне геля между двумя стеклянными пластинками. Для этих целей лучше всего использовать изогнутую иглу, надетую на шприц. Не следует проводить первоначальный электрофорез до нанесения образцов, так как это приведет к нарушению прерывистости буферной системы. Перед нанесением образцов осторожно ополаскивают лунки *буферным рабочим раствором для электрофореза в системе натрия додецилсульфат – полиакриламидный гель (SDS-PAGE) Р*. Готовят испытуемые растворы и растворы сравнения в рекомендованном буфере для образцов и обрабатывают, как указано в частной статье. Наносят необходимое количество каждого раствора в лунки

концентрирующего геля. Начинают электрофорез в условиях, указанных в инструкции к прибору. Изготовители ДСН-ПАГ приборов могут поставлять гели разных размеров и толщины. Для получения оптимального разделения необходимо подбирать время проведения электрофореза, а также силу тока/напряжения в соответствии с указанием изготовителя приборов.

Необходимо удостовериться, что окрашенный фронт доходит до разделительного геля. Когда краситель доходит до нижнего края геля, электрофорез заканчивают. Кассету геля вынимают из прибора и отделяют стеклянные пластинки. Вытаскивают прокладки, отрезают и отделяют концентрирующий гель и немедленно окрашивают полученный гель.

ОБНАРУЖЕНИЕ БЕЛКОВ В ГЕЛЯХ

Наиболее широко применяется метод окрашивания белков красителем Кумасси, позволяющий определить от 1 мкг до 10 мкг белков в одной полосе. Окрашивание серебром – наиболее чувствительный метод для окрашивания белков в гелях, при этом определяются полосы, содержащие от 10 нг до 100 нг белка.

Все стадии окрашивания геля проводят при комнатной температуре, осторожно встряхивая (например, на платформе встряхивателя с круговыми движениями) в подходящей посуде. При окрашивании гелей необходимо надевать перчатки, так как на геле остаются отпечатки пальцев.

Окрашивание Кумасси. Гель погружают в большой объем *красящего раствора Кумасси R*, выдерживают в течение не менее 1 ч. Затем сливают раствор для окрашивания.

Гель обесцвечивают большим объемом *обесцвечивающего раствора R*. Обесцвечивающий раствор меняют несколько раз до четкого проявления белковых полос на прозрачном фоне. Чем тщательнее обесцвечивают гель, тем меньшее количество белков можно найти этим методом. Обесцвечивание можно ускорить использованием нескольких граммов анионообменной смолы или маленьким кусочком пористого материала, смоченным *обесцвечивающим раствором R*.

ПРИМЕЧАНИЕ. Кислотно-спиртовые растворы, используемые в указанной методике, не полностью фиксируют белки в геле. Это может привести к потерям некоторых низкомолекулярных белков в процессе окрашивания и обесцвечивания тонких гелей. Стойкая фиксация обеспечивается выдерживанием геля в смеси трихлоруксусная кислота *R* – метанол *R* – вода *R* (1:4:5, об/об/об) в течение 1 ч перед погружением геля в красящий раствор Кумасси *R*.

Окрашивание серебром. Гель погружают в большой объем *фиксирующего раствора R* и выдерживают в течение 1 ч. Фиксирующий раствор сливают, гель заливают свежим фиксирующим раствором, выдерживают в течение не менее 1 ч или, если возможно, в течение ночи. Фиксирующий раствор сливают и гель промывают большим объемом *воды R* в течение 1 ч. Затем гель выдерживают в растворе 1 % (об/об) *глутарового альдегида R* в течение 15 мин, дважды промывают большим объемом *воды R*, каждый раз в течение 15 мин, помещают в свежеприготовленный *реактив серебра нитрата R* и выдерживают в течение 15 мин в темном месте. Затем трижды промывают большим объемом *воды R*, каждый раз в течение 5 мин. Гель выдерживают в *растворе проявителя R* в течение около 1 мин до достаточного окрашивания. Проявление останавливают, помещая гель в *блокирующий раствор R* на 15 мин. Ополаскивают гель *водой R*.

ВЫСУШИВАНИЕ ОКРАШЕННЫХ ДСН-ПОЛИАКРИЛАМИДНЫХ ГЕЛЕЙ

Гели высушивают в зависимости от использованного метода окрашивания. Кумасси-окрашенные гели после стадии обесцвечивания выдерживают в растворе 100 г/л *глицерина R* в течение 2 ч (возможно инкубирование в течение ночи). При окрашивании серебром на конечной стадии ополаскивания выдерживают гель в растворе 20 г/л *глицерина R* в течение 5 мин.

Два листа пористой целлюлозной пленки погружают в *воду R* и выдерживают в течение 5–10 мин. Один из листов помещают на рамку высушивания, осторожно наносят на него гель, удаляют воздушные пузырьки и наносят несколько миллилитров *воды R* по краям геля, накрывают другим листом, удаляют воздушные пузырьки и завершают сборку

рамки высушивания. Рамку помещают в сушилку и оставляют при комнатной температуре до высыхания геля.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ

Молекулярные массы белков определяют, сравнивая их подвижность с подвижностью маркерных белков с известной молекулярной массой. Для градуирования гелей используют доступные готовые смеси равномерно окрашиваемых маркерных белков с точно известными молекулярными массами. Такие смеси доступны для различных диапазонов молекулярных масс. Концентрированные растворы белков с известной молекулярной массой разводят соответствующим буферным раствором для образцов и наносят на тот же гель, что и испытуемый образец.

Сразу после проведения электрофореза фиксируют электрофоретический фронт красителя бромфенолового синего. Это можно сделать нанесением насечки на край геля или введением иглы, смоченной индигокармином, в гель на линии фронта красителя. После окрашивания измеряют пройденное расстояние каждой белковой полосы (известной и неизвестной) от верха разделительного геля. Расстояние, пройденное каждым белком, делят на расстояние, пройденное красителем. Полученные результаты называются относительной подвижностью белков (относительно фронта красителя) и условно обозначаются R_f . Строят график зависимости логарифма относительных молекулярных масс ($M_{\text{м.}}$) маркерных белков от условно полученных значений R_f . Обычно график имеет слегка сигмовидную форму. Неизвестные молекулярные массы определяют с помощью линейной зависимости или интерполяцией графика зависимости $\lg M_{\text{м.}}$ от R_f , если значения, полученные для неизвестных образцов, располагаются на линейной части графика.

ВАЛИДАЦИЯ ИСПЫТАНИЯ

Результаты испытания признаются достоверными, если белки, которые являются маркерами молекулярных масс, расположены вдоль 80 % длины геля и по всей области разделения (то есть области, включающей образец и его димеры или образец и сопутствующие примеси), разделение соответствующих белковых полос проявляет линейную зависимость логарифма молекулярной массы от R_f . Дополнительные требования к валидации по отношению к испытуемым растворам указываются в частной статье.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРИМЕСЕЙ

Если в частной статье указывают предел содержания примесей, в испытании необходимо использовать раствор сравнения соответствующего разведения. Например, если предел содержания примесей составляет 5 %, необходимо использовать раствор сравнения, разведенный по отношению к испытуемому раствору в соотношении 1:20. На электрофореграмме испытуемого раствора ни одна примесь (ни одна полоса, кроме основной) не должна быть интенсивнее основной полосы на электрофореграмме раствора сравнения.

Для валидированной методики содержание примесей может определяться методом внутренней нормализации по отношению к основной полосе с использованием интегрирующего денситометра. При валидации методики необходимо подтвердить линейность сигнала.

01/2013:20233

2.2.33. СПЕКТРОМЕТРИЯ ЯДЕРНОГО МАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА

ВВЕДЕНИЕ

Спектрометрия ядерного магнитного резонанса (ЯМР) – это аналитический метод, позволяющий выяснить химическую структуру органических молекул по интерпретации их ЯМР спектров по магнитным моментам ^1H или изотопов ^{13}C , ^{19}F , ^{15}N , ^{31}P . ЯМР спектры могут использоваться для качественного и количественного определения.

В соответствующих экспериментальных условиях интегрированная интенсивность ЯМР сигналов прямо пропорциональна числу спинов ядер молекулярной группы,

ответственной за сигнал. Эти интегралы могут использоваться для количественного анализа.

ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ

При помещении группировки ядер с угловым моментом и магнитным моментом в статическое магнитное поле (B_0) ядра занимают по отношению к оси магнитного поля определенные ориентации, разрешенные в квантовой механике. Эти уровни энергетически различны. Колебательное высокочастотное магнитное поле (B_1), перпендикулярное B_0 вызывает переходы между этими уровнями с поглощением энергии. Согласно условию резонанса $\omega_0 = \gamma B_0$ (γ – гиромагнитное отношение, ω_0 – частота Лармора), для получения спектра могут варьироваться магнитное поле B_0 или частота поля B_1 (метод непрерывной волны (НВ; *CW, continuous wave*)). В настоящее время излучение B_1 получают при помощи радиочастотного импульса (метод Фурье преобразования (ФП; *FT, Fourier transform*)). Когерентное излучение, испускаемое при возвращении в первоначальное состояние, регистрируют в виде затухающей кривой, называемой спадом свободной индукции (ССИ; *FID, free induction decay*). Последующее Фурье-преобразование дает спектр в области частоты, предоставляя информацию о молекулярной структуре. Дополнительные радиочастотные области применяются во время регистрации сигнала ССИ для того, чтобы подавить скалярные взаимодействия (прямая связь) между ядрами (называется «распаривание»). Для качественного и количественного анализа жидких или твердых образцов можно применить одно- и многомерные методы.

Важную информацию о структуре вещества получают из следующих спектроскопических параметров:

резонансная частота	определяется вид ядер
число резонансных сигналов (синглеты, мультиплеты)	количество отдельных химических групп ядер
химический сдвиг δ (ppm)	определяется химическая природа и окружение структурных групп
интенсивность резонансных сигналов	относительное число резонансных ядер в отдельной химической группе
мультиплетность сопряженной структуры	количество ядер, которые скалярно связаны с наблюдаемым ядром
константа спин-спинового взаимодействия nJ (Гц)	количество взаимодействующих ядер и геометрия связей

Корреляции различных спектральных параметров (например, химический сдвиг и константа спин-спинового взаимодействия, или химические сдвиги различных ядер в пределах одной молекулярной системы) могут быть получены гомо- и гетероядерными двумерными и более многомерными методами. Информацию о времени релаксации T_1 и T_2 , о ядерных эффектах Оверхаузера (ЯЭО, *NOE*) и кинетике процессов, зависящих от времени, также можно получить с помощью соответствующих экспериментов.

ПРИБОР

ЯМР-спектрометр с высокой разрешающей способностью состоит из следующих частей:

- магнит для создания постоянного магнитного поля B_0 ;
 - термостатируемый датчик с держателем образца, предназначенный для подачи высокочастотного импульса и определения излучения, испускаемого образцом;
 - электронное устройство для создания мощных высокочастотных импульсов, регистрации и преобразования сигнала ССИ в цифровую форму; это устройство также поддерживает стабильность электроники прибора;
 - устройства сбора и обработки данных (компьютер);
- и может также включать:
- проточную кювету для проведения жидкостной ЯМР-хроматографии или проточно-инъекционного анализа;
 - систему для создания импульсного градиента магнитного поля ЯМР.

Сильное магнитное поле генерируется катушкой сверхпроводимости в сосуде Дьюара, заполненного жидким гелием. Датчик, как правило, содержит образец в пробирке с внешним диаметром 5 мм или в проточной кювете и соединен радиочастотными кабелями с электронным блоком, настроенным на частоту ^1H -ядер и изотопов X-ядер. Необходимыми являются дополнительные устройства для настройки и регулировки электронных контуров; кроме того, часто используют термостатирование образцов.

Следует проверять надлежащее функционирование ЯМР-спектрометра. Для проверки используют соответствующие испытания, включающие, как правило, измерение ширины спектральной линии на полувысоте определенных пиков при определенных условиях, отношение сигнал/шум (S/N) для стандартных смесей, интенсивность импульса (измеренная как 90° ширины импульса) и воспроизводимость импульса. Все изготовители приборов предоставляют спецификации и протоколы измерения указанных параметров для определенных комбинаций прибор/датчик, и необходимо проводить проверку соответствия этим спецификациями.

ЯМР С ФУРЬЕ ПРЕОБРАЗОВАНИЕМ (ЯМР-ФП)

Как правило, в современных спектрометрах используется принцип Фурье-преобразования (ФП): после возбуждения образца высокочастотным импульсом соответствующей частоты (ν), амплитуды (B_1) и продолжительности (τ_p) и последующей короткой паузы (t_d) (время восстановления чувствительности приемника), усиленный аналоговый сигнал ССИ регистрируют в течение определенного времени (t_{ac}) и переводят в цифровую форму аналогово-цифровым преобразователем (АЦП), результаты сохраняют в памяти спектрометра. Выходной сигнал перед оцифровкой усиливается, чтобы максимально повысить чувствительность, не перегружая АЦП. В случае наблюдения за X-ядрами стандартный эксперимент включает, в случае необходимости, широкополосное ^1H распаривание, то есть возбуждение всех протонов во время эксперимента. Чтобы увеличить отношение сигнал/шум, многократные сигналы ССИ могут быть когерентно накоплены и суммированы. При Фурье-преобразовании данных этого временного интервала получают спектр области частот.

ПАРАМЕТРЫ

Следующие параметры влияют на результат эксперимента ФП и должны контролироваться.

Ширина импульса (τ_p). Импульс возбуждения направлен вдоль оси x, так называемой рамки вращения, ее продолжительность (или «ширина», τ_p) определяет угол переворота (θ) и, таким образом, интенсивность (I) резонансного сигнала:

$$\theta = \gamma' \cdot B_1 \cdot \tau_p, \quad (1)$$

$$M_y = M_0 \cdot \sin \theta, \quad (2)$$

Наблюдаемая намагниченность M_y максимальна при $\theta = 90^\circ$. Продолжительность импульса должна быть короткой, чтобы гарантировать, что все сигналы возбуждения в спектральной ширине (SW , *spectral width*) имеют одинаковую интенсивность. Намагниченность затухает вследствие процессов релаксации.

Длительность паузы (t_d). Пауза – время между окончанием подачи импульса и началом сбора данных, необходимое по техническим причинам, поскольку ее длительность может влиять на интенсивность сигнала и фазу пика. Быстро затухающие сигналы (дающие начало широким спектральным линиям) уменьшаются в интенсивности больше, чем медленно затухающие сигналы (которые дают начало узким спектральным линиям).

Время сбора данных (t_{ac}). Время сбора данных (t_{ac}) связано со спектральной шириной (то есть всей наблюдаемой областью) и количеством точек цифрового разрешения (DP), собранных во время обнаружения сигнала.

$$t_{ac} = \frac{DP}{2SW}. \quad (3)$$

Максимальная интенсивность сигнала и отношение сигнала к шуму будут достигнуты, если $t_{ac} \approx 1,2 / (\pi v_{1/2})$, где $v_{1/2}$ – полная ширина на полувысоте, но для минимизации искажения сигнала эта величина должна быть больше чем $5 / (\pi v_{1/2})$.

Время повторения (t_r). Спин-решеточная релаксация (T_1) влияет на время, требуемое для спиновой системы, чтобы прийти в равновесие после импульса. Релаксация может быть уменьшена при помощи специальных реактивов. В количественном анализе используемое время повторения должно устанавливаться относительно T_1 и θ для того, чтобы избежать эффектов насыщения.

Усиление приемника. Аналоговый сигнал, детектируемый датчиком, усиливают до оцифровки и хранения. Амплификация сигнала должна быть отрегулирована автоматически или вручную так, чтобы сигнал не перегрузил АЦП, что может привести к искажению сигнала, и позволит случайному шуму, произведенному при исследовании, быть переведенным в цифровую форму (то есть быть отличным от нуля).

ОПТИМИЗАЦИЯ ПАРАМЕТРОВ СБОРА И ОБРАБОТКИ ДАННЫХ ПРИ КОЛИЧЕСТВЕННОМ АНАЛИЗЕ

Помимо параметров сбора данных, интенсивность сигнала зависит еще от нескольких параметров. После сбора достаточного количества циклов сканирования сводный сигнал ССИ преобразовывается с помощью Фурье-преобразования. Для надежных количественных определений должны быть оптимизированы следующие параметры.

Цифровое разрешение. Цифровое разрешение – разнесение по частоте между измеренными точками. У обработанного сигнала должно быть не меньше 5 измеренных точек выше полувысоты интегрируемых сигналов. Чтобы улучшить цифровое разрешение, перед преобразованием к концу экспериментальной ССИ могут быть прибавлены дополнительные точки нулевой интенсивности («нулевое заполнение»).

Отношение сигнал/шум. Это отношение между интенсивностью (высотой пика) определенного сигнала в ЯМР-спектре и интенсивностью случайных колебаний, которые обычно измеряются в области спектра, который не содержит сигналов от анализируемого вещества. Недостаточное отношение сигнал/шум ограничивает точность интегрирования пика и количественных определений. При отношении сигнал/шум равным или более 150:1 стандартное относительное отклонение при интегрировании пика может быть менее 1 %. В программном обеспечении современных спектрометров имеются алгоритмы по определению отношения сигнал/шум соответствующих пиков. При анализе разбавленных растворов получить достаточно высокое отношение сигнал/шум довольно трудно, особенно при детектировании ядер, кроме ^1H . Способы увеличения отношения сигнал/шум включают в себя:

- увеличение числа суммируемых измерений (n), поскольку отношение сигнал/шум увеличивается с увеличением $\sqrt{n}$;
- использование экспоненциального умножения сигнала ССИ перед Фурье-преобразованием: экспоненциальный коэффициент умножения должен быть в зоне полной пиковой ширины на полувысоте;
- использование спектрометров с более высоким магнитным полем B_0 , так как отношение сигнал/шум пропорционально $B_0^{3/2}$;
- использование цифрового фильтра для уменьшения шума;
- использование датчиков, которые максимизируют фактор заполнения;
- использование криодатчиков, которые уменьшают тепловые помехи.

Область интегрирования. Интенсивность ЯМР-сигналов получают интегрированием квази-аналогового сигнала или с помощью ступенчатого графика, или более точным интегрированием отдельных линий и цифровым представлением данных. При исследовании жидких образцов получают ЯМР-сигналы в виде линий лоренцевой формы. Если в частной статье не определено иначе или когда происходит перекрывание

пика, для испытуемого пика и пика сравнения должен использоваться одинаковый диапазон интегрирования, выраженный в виде кратного числа полной ширине на полувысоте пика.

Динамический диапазон. Динамический диапазон аналогово-цифрового преобразователя (АЦП) определяет минимальную линию интенсивности, которую можно наблюдать или количественно определить при интегрировании двух сигналов с той же самой шириной спектральной линии. 16-битовый АЦП позволяет идентифицировать сигнал интенсивностью 0,003 % относительно сильного сигнала, полностью заполняющего динамический диапазон АЦП.

ЯМР СПЕКТРОСКОПИЯ ОБРАЗЦОВ В РАСТВОРАХ

Большинство ЯМР исследований проводят на разведенных растворах (приблизительно 1 %) испытуемого вещества в соответствующем растворителе, к которому может быть прибавлен в известной концентрации подходящий стандарт для калибровки химического сдвига.

Растворители. Растворитель должен растворять испытуемое вещество без дальнейшего взаимодействия, если не обозначено иначе. Для минимизации интенсивных сигналов растворителей следует использовать полностью дейтерированные растворители (*дейтерия оксид P*, *дейтерированный хлороформ P*, *дейтерированный диметилсульфоксид P*, *дейтерированный ацетон P*, *дейтерированный метанол P* и т.д.). Атомы растворителя дают сигналы, которые легко идентифицируются по их химическому сдвигу и могут использоваться для калибровки оси химического сдвига (вторичный стандарт).

Ядра	Вода ¹	Ξ	Другие растворители	Ξ
¹ H	DSS ²	1,00000000	TMC	1,00000000
¹³ C	DSS ²	0,25144953	TMC	0,25145020
¹⁵ N	NH ₃	0,10132912	CH ₃ NO ₂	0,10136767
¹⁹ F	CF ₃ COOH	не указан	CCl ₃ F	0,94094011
³¹ P	H ₃ PO ₄ (85 %)	0,40480742	(CH ₃ O) ₃ PO	0,40480864

¹ Химический сдвиг зависит от значения pH,

² DSS – натрия 2,2-диметил-силапентан-5-сульфонат.

Сравнение. Спектральная характеристика, наиболее зависящая от химического окружения атома в молекуле, называется химическим сдвигом, обозначается буквой δ и измеряется в миллионных долях. Химический сдвиг между резонансом для ЯМР активного ядра $X(\delta_{X,образец})$ измеряется в миллионных долях (ppm) как разность между частотой резонанса этого ядра ($\nu_{X,образец}$) и внутреннего сдвига ядра стандартного образца ($\nu_{X,сравнение}$) выраженная в герцах, деленная на основную рабочую частоту ЯМР спектрометра ($\nu_{X,сравнение}$), в мегагерцах, при данном B_0 :

$$\delta_{X,образец} = \frac{(\nu_{X,образец} - \nu_{X,сравнение})}{\nu_{X,сравнение}} \quad (4)$$

Принято, что стандарт точного химического сдвига устанавливается по ¹H резонансу *тетраметилсилана P* (TMC) и обозначается как $\delta_{TMC} = 0$ ppm. Формально, установив шкалу сдвигов ¹H относительно TMC, можно вычислить точную частоту любого другого X резонанса и откалибровать масштаб его химического сдвига. Частота (вторичного) стандартного образца при $\delta_X = 0$ ppm ($\nu_{X,сравнение}$) рассчитывается по ¹H частоте TMC ($\nu_{H,TMC}$) табличному значению отношения ($\Xi_{X,сравнение}$) определенной для изотопа частоты относительно ¹H в TMC:

$$\nu_{X,сравнение} = \nu_{H,TMC} \cdot \Xi_{X,сравнение} \quad (5)$$

Стандартные образцы при $\delta_X = 0$ ppm и соответствующие значения $\Xi_{X,сравнение}$ приведены в таблице.

На практике химические сдвиги X сравнивают, непосредственно используя соответствующий стандарт. В ¹H и ¹³C ЯМР главным образом используется внутренний

стандарт, который при исследовании непосредственно прибавляют к испытываемому образцу. В ^{15}N , ^{19}F и ^{31}P ЯМР часто используется внешний стандарт, когда образец и стандарт находятся в отдельных коаксиальных цилиндрических пробирках.

Стабилизация. Чтобы предотвратить дрейф спектра во времени, выполняется стабилизационная процедура, названная дейтериевой стабилизацией (дейтериевый лок). Для этого используется сигнал ^2H (дейтерия), вызываемый дейтерированными растворителями, если в частной статье не указано иначе.

КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

Качественные ЯМР спектры используются как испытания на подлинность, при которых ^1H или ^{13}C спектр испытываемого образца сравнивают со спектром стандартного образца или, реже, с опубликованным стандартным спектром. Спектры стандартных и испытываемых образцов должны быть получены с использованием тех же самых методик и условий. Пики в этих 2 спектрах или характеристичных областях спектров должны совпадать по положению, интенсивности и мультиплетности. В соответствующих случаях может быть проведено математическое сопоставление, например, вычисление коэффициента корреляции. При отсутствии стандартного образца может использоваться рабочий стандартный образец, идентичность которого была подтверждена альтернативными методами или путем подтверждения того, что ЯМР спектр полностью совпадает с заявленной структурой материала.

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

Интенсивность сигнала в основном испытании ЯМР представляет собой интегрированную площадь под кривой измеренного сигнала. Высота сигнала может быть мерой интенсивности только при одинаковом значении полной ширины на полувысоте и одинаковой мультиплетности двух сигналов. В условиях практически полной релаксации между регистрируемыми сигналами интенсивность сигнала (I_A) является истинной мерой количества ядер (N_A), ответственных за соответствующий сигнал:

$$I_A = K_S \cdot N_A. \quad (6)$$

Константа K_S включает фундаментальные постоянные, свойства образца и параметры приемника и может не учитываться в случаях, когда интенсивности сигналов сопоставимы и можно получить прямую зависимость между количеством ядер в двух сравниваемых структурных группах А и В:

$$\frac{I_A}{I_B} = \frac{N_A}{N_B}. \quad (7)$$

Количества (N_i) ядер, принадлежащих различным структурным группам одной молекулы, представляют собой небольшие целые числа. Измеренные значения округляют до целых чисел. Однако правильное функционирование блока сбора и обработки данных легко проверяется путем сравнения точной интенсивности в пределах спектра любого подходящего органического соединения известной структуры.

Помимо того, что интенсивность сигналов, полученных от каждого компонента в смеси, связана друг с другом небольшими целыми числами, относительные молярные количества этих компонентов могут быть измерены сравнением нормализованных интенсивностей резонансов различных компонентов. Молярное отношение двух компонентов смеси вычисляют с помощью следующего уравнения:

$$\frac{n_A}{n_B} = \frac{I_A}{I_B} \cdot \frac{N_B}{N_A}. \quad (8)$$

Результаты определения являются достоверными только в случаях, когда структуры молекул, для которых определены I_A и I_B , известны (или, по крайней мере, известны

значения N для проверенных групп). Определения проводят, используя метод внутреннего стандарта или метод нормализации пиков.

Метод внутреннего стандарта. Масса (m_A) аналита (A) может быть определена, если к раствору в качестве стандарта интенсивности прибавлена известная масса (m_B) вещества (B) с известным процентным содержанием (P_B). Уравнение (8) может быть преобразовано в уравнение (9):

$$m_A = \frac{I_A}{I_B} \cdot \frac{N_B}{N_A} \cdot \frac{M_A}{M_B} \cdot m_B \cdot \frac{P_B}{100}, \quad (9)$$

где M_i – молекулярные массы.

Необходимо тщательно выбирать стандарт интенсивности; он должен быть полностью растворим в растворителе, используемом для испытуемого вещества, должен производить лишь небольшое количество сигналов, и у «мониторной группы» должен быть сигнал в пустой спектральной области. Для этих целей рекомендуется выбирать соединение с высокой чистотой и с относительно высокой молекулярной массой.

Метод внутренней нормализации. Относительное содержание компонентов в смеси, степень замещения в структурно-измененном полимере или количество примеси можно определить с помощью сравнения относительных интенсивностей полученных резонансов.

Методика должна быть валидирована в отношении отсутствия наложения соответствующих сигналов. Когда в образце присутствуют вещества с плохо определенной структурой или молекулярной массой (например, эмульгатор), прибавление известного количества этого материала в пробирку для ЯМР позволяет построить калибровочную кривую.

МЕТОД

Подготовка испытуемого образца. Испытуемый образец растворяют в растворителе, к которому может быть прибавлен соответствующий стандартный образец для калибровки химического сдвига, как указано в частной статье. Для количественного анализа растворы не должны содержать нерастворенных частиц. При некоторых количественных определениях может потребоваться прибавление внутреннего стандарта для сравнения интегрированных резонансов испытуемого и стандартного образцов. Соответствующие стандартные образцы и их концентрации указаны в частных статьях. В других количественных исследованиях результат получают путем сравнения относительной интенсивности двух или всех резонансов, полученных при исследовании образца. После помещения образца в пробирку и укупорки, образец вводят в магнит ЯМР установки и устанавливают параметры испытания и проводят измерения. Основные параметры испытания приводятся в частных статьях.

Процедура измерения. Уравновешивают образец в датчике и регулируют прибор для получения наиболее оптимальных условий резонанса и максимального отношения сигнал/шум путем подбора настройки датчика для данного объема образца для обеспечения максимальной однородности магнитного поля во всем объеме испытуемого образца (процедура называется «шиммирование»). Параметры настройки записывают или сохраняют в компьютере. Условия испытания могут включать выполнение многократных последовательностей циклов «импульс – сбор данных – пауза», и отдельные ССИ сигналы суммируются в памяти компьютера, с усреднением уровня шума. Когда соответствующий уровень отношения сигнал/шум достигнут, ССИ сохраняют и спектр области частот получают путем Фурье-преобразования суммированных ССИ сигналов.

ЯМР СПЕКТРОМЕТРИЯ ОБРАЗЦОВ В ТВЕРДОМ СОСТОЯНИИ

Анализ образцов в твердом состоянии может быть выполнен с помощью специально оборудованных ЯМР спектрометров. Определенные технические операции обеспечивают выделение отдельных линий для определенных положений атомов, а также позволяют использовать ЯМР для оценки неорганических материалов.

Одна из таких операций – быстрое вращение (4 – 30 кГц) порошкообразного образца в роторе (внешний диаметр около 4 мм) находящегося под углом $54,7^\circ$ («магический угол») к оси магнитного поля B_0 . Этот способ называется вращением под магическим углом. Второй эффективный способ – силовое распаривание, и третий способ – перенос поляризации от легковозбудимых ядер к менее поляризуемым ядрам, то есть кросс-поляризация. Комбинация этих методов позволяет получить спектры с высоким разрешением, содержащие большое количество информации о химических и структурных характеристиках твердых стекловидных тел, веществ в аморфном состоянии, кристаллов керамической, полимерной или минеральной природы.

Если ЯМР используют для оценки образца в твердом состоянии, полное описание процедуры приводят в частной статье.

01/2013:20234

2.2.34. ТЕРМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Термический анализ объединяет группу методов, при помощи которых определяется зависимость различных физических свойств веществ от температуры. Обычно в большинстве используемых методов определяют изменение энергии или массы испытуемого образца.

[#]Характерной особенностью термических методов анализа является их универсальность. Инструментальные методы термического анализа дают информацию о кристаллической структуре, температуре кипения, способности к сублимации, дегидратации, твердофазном взаимодействии. Эта информация может быть использована для идентификации, определения чистоты, влажности и стабильности веществ, количественного определения термостойких веществ, выявления присутствия полиморфных форм, для характеристики совместимости субстанций и вспомогательных веществ в лекарственных средствах, выбора упаковки и контроля качества.

Различают термогравиметрию, термометрическое титрование, дифференциальный термический анализ (ДТА), дифференциальную сканирующую калориметрию (ДСК), дериватографию, термомикроскопию.

Термические методы анализа, как правило, не требуют больших количеств веществ, непродолжительны по времени выполнения. В частности, определение потери в массе при высушивании методом *термогравиметрии* включают в частные статьи на дорогие субстанции. В частных статьях следует указывать параметры, необходимые для корректного выполнения методики, например, скорость и температуру нагревания, инертный газ и скорость его потока.[#]

ТЕРМОГРАВИМЕТРИЯ

Термогравиметрия представляет собой метод, при помощи которого регистрируют изменение массы испытуемого образца в зависимости от программированного изменения температуры.

Прибор. Основными составляющими частями прибора являются: приспособление для нагревания или охлаждения вещества в соответствии с заданной температурной программой, камера для образца с контролируемой атмосферой, электронные весы и регистрирующее устройство. К прибору может быть присоединено приспособление для анализа летучих веществ.

Проверка температурной шкалы. Проверку температурной шкалы проводят в соответствии с инструкцией изготовителя.

Градуировка электронных весов. Подходящее количество подходящего сертифицированного стандартного образца (например, *ФСО кальция оксалата моногидрата*) помещают в держатель и регистрируют его массу. Начинают нагревание образца по запрограммированному изменению температуры соответствии инструкции изготовителя. Термогравиметрическую кривую регистрируют в виде графика: показания температуры или времени откладываются по оси абсцисс по возрастанию значений слева направо; показания массы откладываются по оси ординат по возрастанию значений снизу

вверх. При температуре около 230 °С повышение температуры останавливают. На графике измеряют расстояние между начальным и конечным плато масса-температура или плато масса-время, что соответствует изменению массы образца. Полученную величину потери в массе сертифицированного испытуемого образца сопоставляют с величиной, указанной на маркировке.

Методика. Изменение массы испытуемого образца определяют в условиях, указанных в частной статье. Потерю в массе испытуемого образца определяют, измеряя расстояние между начальным и конечным плато на гравиметрической кривой, и выражают в процентах ($\Delta m/m$).

При регулярном использовании прибора периодически проводят градуировку и проверку температурной шкалы. В противном случае эти операции проводят перед каждым использованием.

Так как характеристики атмосферы при проведении испытания очень важны, для каждого измерения отмечают следующие параметры: давление или скорость потока, состав газа.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ СКАНИРУЮЩАЯ КАЛОРИМЕТРИЯ

Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК, DSC) является методом, который используется для демонстрации энергетических явлений, происходящих при нагревании (или охлаждении) вещества (или смеси веществ), и для определения изменений в энтальпии и удельной теплоемкости, а так же *температур*, при которых эти изменения происходят.

Этот метод используется для нахождения различий в количестве теплоты, выделенной или поглощенной испытуемым образцом, по сравнению с ячейкой сравнения в зависимости от температуры. Существует два типа приборов для ДСК: приборы, использующие компенсацию энергии для удерживания нулевой разницы температуры между испытуемым образцом и образцом сравнения; приборы, поддерживающие постоянную скорость нагрева и определяющие температурный дифференциал как разность в тепловом потоке между испытуемым образцом и образцом сравнения.

Прибор. Прибор для ДСК с компенсацией энергии состоит из печи, имеющей держатель образцов с испытуемой ячейкой и ячейкой сравнения. Прибор для ДСК с тепловым потоком имеет единственную ячейку с держателем образца для испытуемого тигля и тигля сравнения.

К прибору присоединяют устройство для программирования температуры, температурный детектор (детекторы) и регистрирующую систему, которая может быть подсоединена к компьютеру. Измерения проводятся в контролируемой атмосфере.

Калибровка прибора. Прибор калибруется на изменения температуры и энтальпии с использованием индия высокой чистоты или любого другого сертифицированного стандартного образца в соответствии с инструкцией изготовителя. Использование двух металлов, например, индия и цинка, может применяться для проверки линейности.

Проведение испытания. В подходящий тигель взвешивают подходящее количество испытуемого образца и помещают в держатель для образца. Устанавливают температуру начала и конца испытания и скорость нагрева, указанные в частной статье.

Начинают испытание и регистрируют кривую дифференциального термического анализа, откладывая значения температуры или времени по оси абсцисс (по возрастанию значений слева направо) и изменения энергии по оси ординат (уточняют, процесс эндотермичный или экзотермичный).

Температура, при которой происходит явление (начальная температура), соответствует точке пересечения (*A*) продолжения базовой линии и касательной к точке самого большого наклона (точке перегиба) кривой (см. рисунок 2.2.34.-1). Конечная температура теплового явления соответствует пику на кривой.

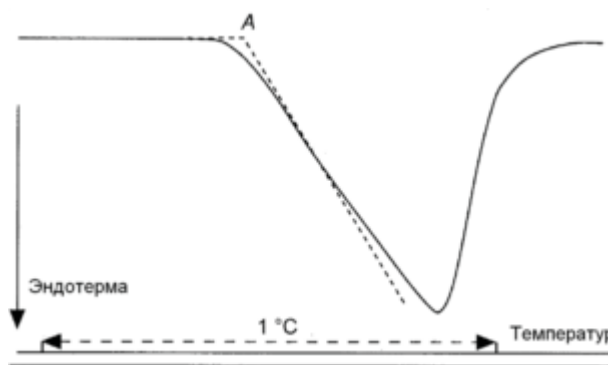


Рисунок 2.2.34.-1. Термограмма

Значение энтальпии явления пропорционально значению площади под кривой, ограниченной базовой линией; коэффициент пропорциональности находят путем измерения теплоты плавления известного вещества (например, индия) при тех же условиях проведения испытания.

Каждая термограмма может сопровождаться следующими данными: условия испытания, запись последней калибровки, размер и идентификация (включая термическую историю) образца, контейнер, атмосфера (состав, скорость потока, давление), направление и скорость температурных измерений, чувствительность прибора и регистрирующего устройства.

Область применения

Фазовые превращения. Определение температуры, изменения теплоемкости и энтальпии при фазовых превращениях, происходящих с веществом, как функции температуры.

переход твердое вещество – твердое вещество:	аллотропия-полиморфизм прозрачность стекла десольватация аморфность-кристалличность
переход твердое вещество – жидкость:	плавление
переход твердое вещество – газ:	сублимация
переход жидкость – твердое вещество:	замерзание перекристаллизация
переход жидкость – газ:	испарение

Изменения химического состава. Измеряя теплоту и температуру реакции при данных условиях, можно определить, например, кинетику разложения или десольватации.

Использование для фазовых диаграмм. Создание фазовых диаграмм для твердых смесей. Создание фазовой диаграммы может быть важным шагом при предварительной постановке и оптимизации процесса лиофилизации.

Определение чистоты. Измерение теплоты плавления и температуры плавления с помощью ДСК делает возможным определение содержания примесей в веществе по одной диаграмме с использованием нескольких миллиграмм образца и без необходимости проведения повторных точных измерений истинной температуры.

Теоретически плавление полностью чистого кристаллического вещества при постоянном давлении характеризуется теплотой плавления ΔH_f с бесконечно узким диапазоном, соответствующим температуре плавления T_0 . Расширение этого диапазона является чувствительным индикатором присутствия примесей. Таким образом, при испытании образцов одного и того же вещества с содержанием примесей, отличающимся на несколько десятых процента, получают визуально отличающиеся друг от друга термические диаграммы (см. рисунок 2.2.34.-2).

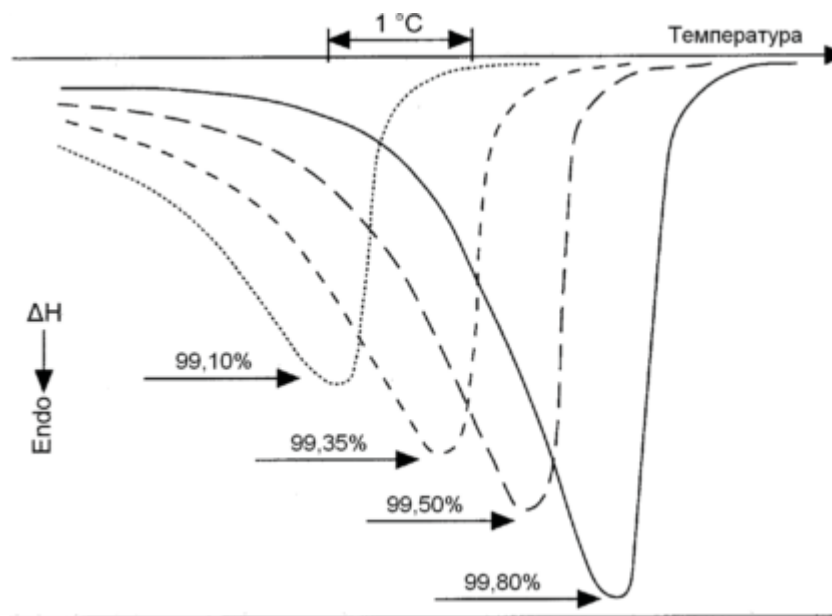


Рисунок 2.2.34.-2. Термические диаграммы вещества в зависимости от чистоты

Определение молярной чистоты с помощью ДСК основано на использовании математического приближения интегральной формы уравнения Вант-Гоффа применительно к концентрациям (не к активностям) в бинарной системе [$\ln(1-x_2) = -x_2$ и $T \cdot T_0 = T_0^2$]

$$T = T_0 - \frac{RT_0^2}{\Delta H_f} \cdot x_2, \quad (1)$$

где:

x_2 – молярная доля примеси, то есть число молекул примеси, разделенное на общее число молекул в жидкой фазе (или в расплавленной фазе) при температуре T (выраженной в Кельвинах);

T_0 – температура плавления химически чистого вещества, в кельвинах;

R – универсальная газовая постоянная для идеальных газов, в джоуль·кельвин⁻¹·моль⁻¹;

ΔH_f – молярная теплота плавления вещества, в джоулях.

Таким образом, определение чистоты с помощью ДСК ограничено обнаружением примесей, образующих эвтектические смеси с основным веществом и присутствующих в испытуемом образце с молярной долей менее 2 %.

Данный метод не применяют для:

- аморфных веществ;
- сольватов или полиморфных соединений, которые нестабильны в пределах используемых при испытании температур;
- примесей, образующих твердые растворы с основным веществом;
- примесей, которые нерастворимы в жидкой фазе или в расплаве основного вещества.

Во время нагревания испытуемого вещества примеси полностью плавятся при температуре эвтектической смеси. Выше этой температуры твердая фаза содержит только чистое вещество. Так как температура постепенно увеличивается от температуры эвтектической смеси до температуры плавления чистого вещества, молярная доля примеси в жидкой фазе постоянно падает, так как количество расплавленного чистого вещества постоянно увеличивается. Для всех температур выше эвтектической точки:

$$x_2 = \frac{1}{F} \cdot x_2^* \quad (2)$$

где:

F – расплавленная доля анализируемого образца;

x_2^* – молярная доля примеси в анализируемом образце.

Если образец расплавлен полностью, то $F = 1$ и $x_2 = x_2^*$

При объединении уравнений (1) и (2) получается следующее выражение:

$$T = T_0 - \frac{x_2^* R T_0^2}{\Delta H_f} \cdot \frac{1}{F}.$$

Значение теплоты плавления получают путем интегрирования пика плавления.

Температура плавления T_0 чистого вещества экстраполируется из графика зависимости $1/F$ от температуры, выраженной в кельвинах.

Наклон (α) графика, при необходимости полученного после линеаризации,

соответствующий $\frac{R T_0^2}{\Delta H_f} x_2^*$ позволяет определить значение x_2^* .

Доля x_2^* , умноженная на 100, дает молярную долю всех эвтектических примесей в процентах.

ТЕРМОМИКРОСКОПИЯ

Фазовые изменения могут быть визуализированы с помощью термомикроскопии – метода, который позволяет исследовать образец, который подвергается температурному воздействию по заданной программе, под микроскопом в поляризованном свете.

Наблюдения, сделанные с помощью термомикроскопии, позволяют точно идентифицировать природу явления, обнаруженного с использованием термогравиметрии и дифференциальной сканирующей калориметрии.

Прибор. Прибор состоит из микроскопа, снабженного поляризатором света, нагревательной пластинки, программного регулятора температуры и скорости нагрева и/или остывания и регистрирующего устройства для температур фазовых переходов. Могут дополнительно использоваться видеокамера и видеоманитофон.

01/2013:20235

2.2.35. ОСМОЛЯЛЬНОСТЬ

Осмоляльность – это показатель, позволяющий оценить суммарный вклад различных растворенных веществ в осмотическое давление раствора.

Приближенный расчет осмоляльности ξ_m водного раствора проводят по формуле:

$$\xi_m = v m \Phi,$$

где:

v – суммарное число ионов, образующихся из одной молекулы растворенного вещества в результате диссоциации; в случае если растворенное вещество не диссоциирует на ионы, $v = 1$;

m – моляльность раствора, т.е. число моль растворенного вещества на килограмм растворителя;

Φ – моляльный осмотический коэффициент, учитывающий взаимодействие между ионами противоположного знака в растворе и зависящий от величины m . По мере усложнения состава раствора усложняется и определение величины Φ .

Единицей осмоляльности является осмоль на килограмм (осмоль/кг), но на практике обычно используется единица миллиосмоль на килограмм (мосмоль/кг).

Если нет других указаний в частной статье, осмоляльность определяют по понижению температуры замерзания раствора. Зависимость между осмоляльностью и понижением температуры замерзания ΔT выражают соотношением:

$$\xi_m = \frac{\Delta T}{1,86} \cdot 1000 \quad \text{мосмоль/кг.}$$

Прибор. Составными частями прибора (осмометра) являются:

- приспособление для охлаждения сосуда с измерительной кюветой;
- система для измерения температуры, состоящая из чувствительного к температуре сопротивления (термистора) с соответствующим устройством для измерения тока или разности потенциалов; измерительное устройство может быть градуировано в градусах понижения температуры или непосредственно в единицах осмоляльности;
- как правило, приспособление для перемешивания образца.

Методика. Готовят стандартные растворы в соответствии с таблицей 2.2.35.-1. Устанавливают нулевое значение на шкале прибора, используя воду P . Проводят градуировку прибора, используя стандартные растворы: помещают от 50 мкл до 250 мкл стандартного раствора в измерительную кювету и начинают охлаждение системы. Чтобы предотвратить переохлаждение, измерительное устройство, как правило, программируют на работу при температурах более низких, чем ожидаемое криоскопическое понижение температуры. Подходящее устройство указывает на достижение равновесия. Перед каждым измерением ячейку ополаскивают соответствующим стандартным раствором.

Таблица 2.2.35.-1

Стандартные растворы для градуировки осмометра

Масса натрия хлорида P , в граммах на килограмм воды P	Фактическая осмоляльность (мосмоль/кг)	Теоретическая осмоляльность идеального раствора (мосмоль/кг)	Моляльный осмотический коэффициент	Криоскопическое понижение температуры
3,087	100	105,67	0,9463	0,186
6,260	200	214,20	0,9337	0,372
9,463	300	323,83	0,9264	0,558
12,684	400	434,07	0,9264	0,558
15,916	500	544,66	0,9180	0,930
19,147	600	655,24	0,9157	1,116
22,380	700	765,86	0,9140	1,302

Те же операции проводят с испытуемым раствором. При этом перед каждым измерением кювету ополаскивают испытуемым раствором. Результаты либо непосредственно определяют по шкале прибора, либо рассчитывают по измеренному понижению температуры замерзания. Результаты считают достоверными, если полученное значение осмоляльности испытуемого раствора не выходит за пределы значений осмоляльности двух стандартных растворов, использованных для градуировки.

[#]Наряду с понятием «осмоляльность» в практике используется понятие «осмолярность». Данные показатели близки и отличаются друг от друга только различным способом выражения концентрации растворов – моляльной и молярной:

- *осмоляльность* – количество осмолей на 1 килограмм раствора;

– *осмолярность* – количество осмолей на 1 литр раствора. Единицей осмолярности является осмоль на литр (осмоль/л), но на практике обычно используется единица миллиосмоль на литр (мосмоль/л).

Для идеальных растворов масса осмоля в граммах представляет собой отношение грамм-молекулярной массы вещества к числу частиц или ионов, образующихся при его растворении.

Для разбавленных растворов, близких к идеальным, осмоляльность и осмолярность могут быть рассчитаны теоретически.

Осмолярность идеальных растворов может быть рассчитана по формуле:

$$\text{Осмолярность} = \frac{\text{концентрация вещества} \cdot \text{количество частиц}}{\text{молекулярная масса}},$$

где:

концентрация вещества – количество растворенного вещества на литр раствора, в граммах;

количество частиц – число частиц или ионов, образующихся при растворении одной молекулы вещества.

При повышении концентрации раствора взаимодействие между частицами вещества возрастает, и фактическая осмолярность понижается по сравнению с осмолярностью идеального раствора. Теоретический расчет осмолярности растворов веществ с большой молекулярной массой (например, белковых гидролизатов) и высококонцентрированных растворов невозможен. В таких случаях определяют осмоляльность экспериментальным путем по понижению температуры замерзания раствора или по понижению давления пара над раствором. Понижение температуры замерзания на 1,86 °С и понижение давления пара на 0,3 мм рт. ст. при температуре 25 °С соответствует 1 осмолю на килограмм воды.

Растворы, равные по осмоляльности (осмолярности) 0,9 % раствору натрия хлорида, называют изотоничными.

Наряду с прибором, описанным выше, для определения осмоляльности могут использоваться также осмометры, основанные на измерении давления пара над раствором. Они требуют малого объема вводимой пробы (около 5 мкл), при этом точность и правильность определения сравнима с величинами, получаемыми на приборах, основанных на измерении температуры замерзания.

В осмометрах, основанных на измерении понижения температуры замерзания, объем вводимой пробы образца можно варьировать.

Значение осмоляльности (осмолярности) необходимо указывать на этикетках растворов для инфузий.[#]

01/2013:20236

2.2.36. ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ИОНОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИОНОСЕЛЕКТИВНЫХ ЭЛЕКТРОДОВ

Теоретически потенциал E ионоселективного электрода изменяется линейно от логарифма активности a_i данного иона, что выражается уравнением Нернста:

$$E = E_0 + 2,303 \frac{RT}{z_i F} \log a_i,$$

где:

E_0 – стандартный электродный потенциал используемого электрода;

R – универсальная газовая постоянная;

T – абсолютная температура;

F – число Фарадея;

z_i – величина заряда иона с обозначением его знака.

При постоянной ионной силе выполняется уравнение:

$$E = E_0 + \frac{k}{z_i} \log fC_i,$$

где:

C_i – молярная концентрация иона;

f – коэффициент активности ($a_i = f \cdot C_i$);

$$k = \frac{RT}{F}.$$

Если: $E_0 + \frac{k}{z_i} \log f = E'_0$ и $E_0 + \frac{k}{z_i} \log f = E'_0$, где S – наклон градуировочной кривой электрода (наклон электродной функции), в таком случае выполняется уравнение:

$$E = E'_0 + S \log C_i \text{ и для } -\log C_i = pC_i: E = E'_0 - SpC_i.$$

Потенциометрическое определение концентрации иона проводят путем измерения разницы потенциалов между двумя подходящими электродами, погруженными в испытуемый раствор; индикаторный электрод является селективным по отношению к анализируемому иону, другой является электродом сравнения.

Прибор. Используют вольтметр, позволяющий выполнять измерения с точностью 0,1 милливольт, с входным сопротивлением, в 100 раз превышающим сопротивление используемых электродов.

Ионоселективные электроды – преимущественно электроды с кристаллической или некристаллической мембраной или с твердой основой (например, стеклянные электроды); или электроды с заряженными (положительно или отрицательно) или с незаряженными подвижными носителями; или сенсibilизированные электроды (ферментные электроды, газ-индикаторные электроды). Электродом сравнения обычно является хлорсеребряный или каломельный электрод с подходящими соединяющими жидкостями, исключаящими их перемешивание.

Методика. Измерения проводят при постоянной температуре с точностью $\pm 0,5$ °С, учитывая изменение наклона электродной функции электрода в зависимости от температуры (см. таблицу 2.2.36.-1).

Таблица 2.2.36.-1

Значения k при различных температурах

Температура, °С	k
20	0,0582
25	0,0592
30	0,0602

Регулируют ионную силу и, если необходимо, рН испытуемого раствора, используя буферные растворы, указанные в частной статье, и уравнивают электрод, погружая его в перемешиваемый с постоянной скоростью испытуемый раствор, до получения постоянного значения потенциала.

Если электродная система используется часто, то регулярно проверяют воспроизводимость и стабильность сигнала, линейность градуировочной кривой или расчетного алгоритма в пределах концентраций испытуемого раствора; если нет, то проводят проверку перед каждой серией измерений.

Показания электрода можно считать линейными, если наклон S градуировочной кривой приблизительно равен k/z_i на единицу pC_i .

МЕТОД I (МЕТОД ПРЯМОЙ ГРАДУИРОВКИ)

Измеряют последовательно не менее трех раз потенциалы не менее трех растворов сравнения предположительно близких к испытываемому раствору концентраций. Рассчитывают уравнение градуировочного графика или строят градуировочный график в координатах среднее значение потенциала E – соответствующее ему значение концентрации анализируемого иона, выраженное как $-\log C_i$ или pC_i .

Готовят испытываемый раствор, как указано в частной статье. Измеряют потенциал три раза и по среднему значению потенциала рассчитывают концентрацию анализируемого иона, используя градуировочный график.

МЕТОД II (МЕТОД МНОГОРАЗОВЫХ СТАНДАРТНЫХ ДОБАВОК)

Готовят испытываемый раствор, как указано в частной статье. Измеряют равновесный потенциал E_T в объеме V_T этого раствора с неизвестной концентрацией C_T анализируемого иона. Не менее трех раз последовательно к объему V_T испытываемого раствора прибавляют объем V_S раствора сравнения, незначительный в сравнении с V_T ($V_S \leq 0,01 V_T$), с концентрацией C_S , значения которой находятся в пределах линейной части градуировочного графика. После каждого прибавления измеряют потенциал и рассчитывают разницу потенциалов ΔE между измеряемым потенциалом и E_T . ΔE связано с концентрацией анализируемого иона уравнением:

$$\Delta E = S \log \left(1 + \frac{C_S V_S}{C_T V_T} \right)$$

Или

$$\Delta E = S \log \left(1 + \frac{C_S V_S}{C_T V_T} \right),$$

где:

V_T – объем испытываемого раствора;

C_T – концентрация анализируемого иона в испытываемом растворе;

V_S – объем прибавляемого раствора сравнения;

C_S – концентрация анализируемого иона в растворе сравнения;

S – наклон электродной функции, установленный экспериментально при постоянной температуре путем измерения разницы между потенциалами двух растворов сравнения, концентрации которых отличаются в 10 раз и рассчитаны в пределах линейной области градуировочного графика.

Строят график зависимости $10^{\frac{\Delta E}{S}}$ (ось y) относительно V_S (ось x) и экстраполируют полученную линию до пересечения с осью x . В точке пересечения концентрацию C_T анализируемого иона в испытываемом растворе рассчитывают по формуле:

$$C_T = \frac{C_S V_S}{V_T}.$$

МЕТОД III (МЕТОД ОДНОЙ СТАНДАРТНОЙ ДОБАВКИ)

К объему V_T испытываемого раствора, приготовленного, как указано в частной статье, прибавляют объем V_S раствора сравнения, вмещающего такое количество анализируемого иона, чтобы сигнал находился в линейной части градуировочного графика. Параллельно в тех же условиях готовят контрольный раствор. Потенциалы испытываемого раствора и контрольного раствора измеряют не менее трех раз перед прибавлением и после прибавления раствора сравнения. Рассчитывают концентрацию C_T анализируемого иона, используя уравнение и учитывая контрольный раствор:

$$C_T = \frac{C_S V_S}{10^{\frac{\Delta E}{S}} (V_T + V_S) - V_T},$$

где:

C_T – концентрация анализируемого иона в испытуемом растворе;

C_S – концентрация анализируемого иона в растворе сравнения;

V_S – объем прибавляемого раствора сравнения;

ΔE – среднее значение разницы потенциалов, измеренных до и после прибавления объема V_S ;

S – наклон электродной функции, установленный экспериментально при постоянной температуре путем измерения разницы между потенциалами двух растворов сравнения, концентрации которых отличаются в 10 раз и рассчитаны в пределах линейной области градуировочного графика;

V – объем испытуемого раствора или контрольного раствора.

01/2013:20237

2.2.37. РЕНТГЕНОФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ СПЕКТРОМЕТРИЯ

Рентгенофлуоресцентная спектрометрия с волновой дисперсией – это метод анализа, в котором измеряют интенсивность флуоресцентного излучения, испускаемого элементом, имеющим атомный номер от 11 до 92, возбуждаемого непрерывным первичным рентгеновским излучением. Интенсивность флуоресценции элемента зависит от его концентрации в образце, а также от поглощения матрицей возбуждающего и испускаемого излучения. При следовых количествах определяемого вещества в области линейности градуировочного графика измеренная при определенной длине волны интенсивность флуоресценции элемента, находящегося в матрице определенного состава, прямо пропорциональна концентрации данного элемента и обратно пропорциональна массовому коэффициенту ослабления (поглощения) матрицы при этой длине волны.

Методика. Настройку и использование прибора проводят в соответствии с инструкциями производителя. Жидкие образцы помещают непосредственно в прибор; твердые образцы предварительно прессуют в таблетки (гранулы), иногда после смешивания с подходящим связывающим материалом.

Для определения концентрации элемента в образце измеряют скорость сетевого импульса, создаваемого одним или несколькими стандартными образцами, содержащими известные количества данного элемента в матрицах определенного состава, и рассчитывают или измеряют массовый коэффициент ослабления матрицы анализируемого образца.

Градуировка. С помощью градуировочного раствора или серии растворов, содержащих разные концентрации определяемого элемента в различных матрицах, определяют угловой коэффициент градуировочного графика b_0 по формуле:

$$b_0 \frac{1}{\mu_M} = \frac{I_C^N}{C},$$

где:

μ_M – рассчитанный или измеренный массовый коэффициент ослабления матрицы M ;

I_C^N – скорость сетевого импульса;

C – концентрация определяемого элемента в стандартном образце.

Массовый коэффициент ослабления матрицы образца. Если эмпирическая формула анализируемого образца известна, его массовый коэффициент ослабления рассчитывают исходя из справочных значений массовых коэффициентов ослабления составляющих

элементов. Если элементный состав образца неизвестен, измеряют интенсивность рассеянного рентгеновского излучения I_U (Комптоновское рассеяние) и рассчитывают величину массового коэффициента ослабления матрицы образца по формуле:

$$\frac{1}{\mu_{MP}} = a + bI_U,$$

где:

μ_{MP} – массовый коэффициент ослабления образца;

I_U – рассеянное рентгеновское излучение.

Определение скорости сетевого импульса для определяемого элемента в образце.

Рассчитывают скорость сетевого импульса I_{EP}^N для определяемого элемента по измеренным интенсивностям флуоресцентной линии и фоновой линии (линий), принимая во внимание все загрязняющие вещества пробирки.

Расчет содержания следов. Если концентрация элемента входит в область линейности градуировочного графика, ее можно рассчитать по формуле:

$$C = \frac{I_{EP}^N}{b_0 \frac{1}{\mu_{MP}}} \cdot f,$$

где:

f – фактор разведения.

01/2013:20238

2.2.38. ЭЛЕКТРОПРОВОДНОСТЬ

Сила тока I (в амперах) в проводнике прямопропорциональна приложенной электродвижущей силе E (в вольтах) и обратнопропорциональна сопротивлению R (в омах) проводника:

$$I = \frac{E}{R}.$$

Электропроводность (ранее – удельная электропроводность) раствора (κ) – величина, обратная удельному сопротивлению (ρ). Удельное сопротивление определяют как отношение напряженности электрического поля к плотности тока. Сопротивление R (Ом) проводника, имеющего площадь сечения S (см²) и длину l (см), рассчитывают по формуле:

$$R = \rho \frac{L}{S}.$$

Таким образом: $R = \frac{1}{\kappa} \cdot \frac{L}{S}$ или $\kappa = \frac{1}{R} \cdot \frac{L}{S},$

где L/S соответствует постоянной идеальной камеры.

Единица электропроводности в системе СИ – сименс на метр (См·м⁻¹). На практике электропроводность растворов выражают в сименсах на сантиметр (См·см⁻¹) или в микросименсах на сантиметр (мкСм·см⁻¹). Единица удельного сопротивления в системе СИ – ом-метр (Ом·м). На практике сопротивление раствора обычно выражают единицах

ом-сантиметр (Ом·см). Если нет других указаний в частной статье, значения электропроводности или удельного сопротивления обозначают для температуры 25 °С.

Описание прибора и порядок проведения испытания, приведенные ниже, пригодны для лабораторного измерения электропроводности большей, чем 10 мкСм·см⁻¹. Определение электропроводности воды проводят, как указано в соответствующих частных статьях.

ПРИБОР

Принцип работы используемого прибора (кондуктометра или омметра) основан на измерении удельного сопротивления столба жидкости между электродами иммерсионного измерительного приспособления (электропроводной камеры). Во избежание поляризации электродов используют переменный ток. Прибор снабжают температурным компенсатором или прецизионным термометром.

Измерительная камера вмещает два платиновых электрода, каждый с площадью поверхности S , располагающихся параллельно один к другому на расстоянии L и покрытых платиновой чернью. Обычно оба электрода защищены стеклянной трубкой. Могут использоваться и другие типы измерительных камер.

ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ ИСПЫТАНИЯ

Определение постоянной камеры

Выбирают измерительную камеру, соответствующую свойствам и электропроводности испытуемого раствора. Чем выше ожидаемая электропроводность, тем большей должна быть постоянная камеры (ниже ρ). Обычно используемые измерительные камеры имеют постоянную порядка 0,1 см⁻¹, 1 см⁻¹ и 10 см⁻¹. Используют сертифицированный стандартный образец, например, раствор калия хлорида, который пригоден для измерения. Значение электропроводности сертифицированного стандартного образца должно быть близким к ожидаемому значению электропроводности испытуемого раствора. Могут быть использованы другие сертифицированные стандартные образцы, особенно для камер с постоянной порядка 0,1 см⁻¹. Камеру ополаскивают несколько раз *водой дистиллированной* P и как минимум дважды используемым для определения постоянной измерительной камеры сертифицированным стандартным образцом. Измеряют сопротивление измерительной камеры, используя сертифицированный стандартный образец при температуре (25±1) °С. Постоянную K (см⁻¹) измерительной камеры рассчитывают по формуле:

$$K = R_{CCO} \cdot \kappa_{CCO},$$

где:

R_{CCO} – измеренное сопротивление, МОм;

κ_{CCO} – электропроводность используемого сертифицированного стандартного образца, мкСм·см⁻¹.

Измеренное значение постоянной K камеры не должно отличаться от указанного более чем на 5 %.

Если определение постоянной камеры проводится при температуре, отличающейся от указанной для сертифицированного стандартного образца, значение проводимости рассчитывают по формуле:

$$\kappa_T = \kappa_{TCCO} \cdot [1 + \alpha(T - T_{CCO})],$$

где:

κ_T – значение электропроводности при отличающейся температуре;

κ_{TCCO} – значение электропроводности сертифицированного стандартного образца;

T – температура при проведении градуировки;

T_{CCO} – температура, указанная для сертифицированного стандартного образца;

α – температурный коэффициент для значения электропроводности сертифицированного стандартного образца; для калия хлорида $\alpha = 0,021$.

Определение удельной электропроводности испытуемого раствора

После того, как прибор отградуирован с использованием одного из стандартных растворов, измерительную камеру промывают несколько раз *водой дистиллированной Р* и как минимум дважды испытуемым водным раствором. Измерения проводят так, как указано в частной статье.

01/2013:20239

2.2.39. МОЛЕКУЛЯРНО-МАССОВОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ДЕКСТРАНОВ

Определение проводят методом эксклюзионной хроматографии (2.2.30).

Испытуемый раствор. 0,200 г испытуемого образца растворяют в подвижной фазе и доводят до объема 10 мл этим же растворителем.

Маркерный раствор. 5 мг глюкозы *Р* и 2 мг ФСО декстрана V_0 растворяют в 1 мл подвижной фазы.

Градуировочные растворы. Навеску каждого из указанных стандартных образцов: 15 мг ФСО декстрана 4 для градуировки, 15 мг ФСО декстрана 10 для градуировки, 20 мг ФСО декстрана 40 для градуировки, 20 мг ФСО декстрана 70 для градуировки и 20 мг ФСО декстрана 250 для градуировки по отдельности растворяют в 1 мл подвижной фазы.

#Допускается использование стандартных образцов декстранов для градуировки с другими паспортными данными, в этом случае для градуировки хроматографической системы рекомендуется использовать дополнительно еще не менее двух стандартных образцов декстранов.#

Раствор для проверки пригодности хроматографической системы. 20 мг ФСО декстрана 40 для проверки пригодности хроматографической системы (для анализа субстанции декстрана 40) или 20 мг ФСО декстрана 60/70 для проверки пригодности хроматографической системы (для анализа субстанций декстрана 60 и декстрана 70) растворяют в 1 мл подвижной фазы.

Если нет других указаний в частной статье, можно использовать следующие условия хроматографирования:

- колонка длиной 0,3 м и внутренним диаметром 10 мм, заполненная *агарозой поперечно-сшитой для хроматографии Р*, или серия колонок длиной 0,3 м и внутренним диаметром 10 мм каждая, заполненных *полиэфирным гидроксильным гелем для хроматографии Р*;

- подвижная фаза: раствор 7 г натрия сульфата безводного *Р* и 1 г хлорбутанола *Р* в 1 л воды *Р*;

- скорость подвижной фазы: от 0,5 мл/мин до 1 мл/мин, поддерживаемая постоянно с точностью $\pm 1\%$ в час;

- детектор: дифференциальный рефрактометрический;

- петлевой дозатор: объем от 100 мкл до 200 мкл;

- температура системы: поддерживают постоянной с точностью $\pm 0,1^\circ\text{C}$.

ГРАДУИРОВКА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

Хроматографируют несколько раз выбранный объем маркерного раствора. На хроматограмме должны присутствовать два пика: первый пик соответствует ФСО декстрана V_0 , второй пик соответствует глюкозе *Р*. Исходя из объема элюирования декстрана V_0 , рассчитывают объем эксклюзии V_0 ; полный объем V_i рассчитывают по пику, соответствующему глюкозе.

Хроматографируют определенный объем каждого из градуировочных растворов. Для каждой полученной хроматограммы проводят базовую линию. Каждую хроматограмму делят вертикальными равноудаленными линиями на *p* секций (количеством не менее 60), что соответствует равным объемам элюирования. Для каждой секции *i*, соответствующей

объему элюирования V_i , измеряют высоту (y_i) от базовой линии до линии хроматограммы и рассчитывают коэффициент распределения (K_i) по формуле:

$$\frac{(V_i - V_0)}{(V_t - V_0)}, \quad (1)$$

где:

V_0 – объем эксклюзии, определенный по пику, соответствующему ФСО декстрана V_0 на хроматограмме маркерного раствора;

V_t – полный объем колонки, определенный по пику, соответствующему глюкозе на хроматограмме маркерного раствора;

V_i – объем элюирования для секции i , полученный для хроматограммы каждого из градуировочных растворов.

Градуировку проводят, используя один из следующих методов.

Градуировка путем построения градуировочного графика. По уравнению (1) для каждого из декстранов для градуировки рассчитывают коэффициент распределения $K_{\max}$, соответствующий максимальной высоте линии хроматограммы. На полулогарифмической бумаге строят зависимость значений $K_{\max}$ (ось абсцисс) от молекулярной массы для максимальной высоты линии хроматограммы ($M_{\max}$) каждого из декстранов для градуировки и глюкозы (ось ординат). Через все полученные точки проводят первую градуировочную линию, экстраполируя ее из точки $K_{\max}$, полученной для ФСО декстрана 250 для градуировки, до более низких значений K , полученных для тех же стандартных растворов (см. рисунок 2.2.39.-1).

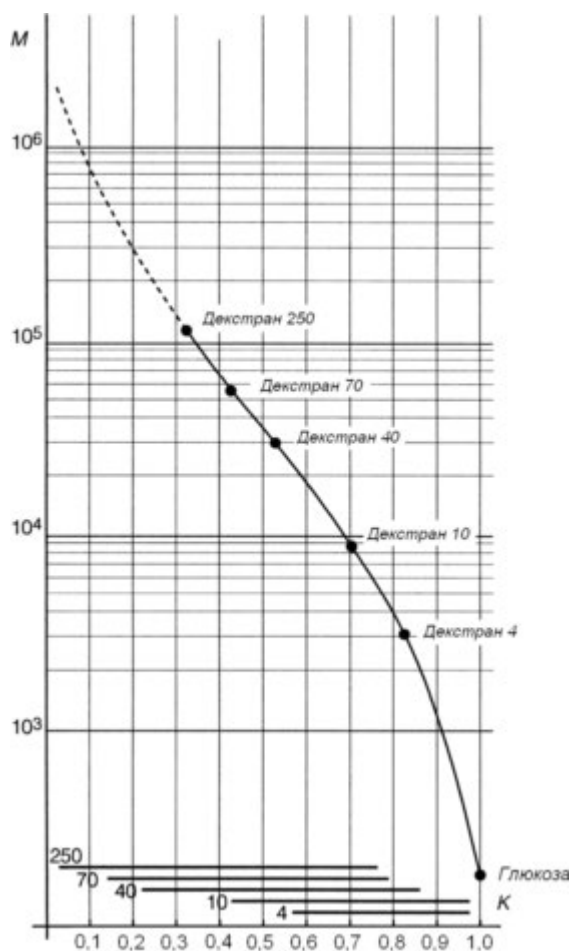


Рисунок 2.2.39.-1. Пример градуировочного графика

Пунктиром обозначена часть градуировочного графика, полученная экстраполированием.
Горизонтальными линиями в нижней части рисунка указаны ширина и положения хроматографических линий, полученных для каждого декстрана для градуировки

Используя полученный первый градуировочный график, находят для всех значений K_i для всех хроматограмм соответствующие значения молекулярных масс M_i , получая таким образом графическую зависимость для расчета молекулярно-массового распределения. Для всех декстранов для градуировки рассчитывают среднюю молекулярную массу по уравнению (3), приведенному ниже. Градуировочный график может быть использован для расчетов, если рассчитанные значения для каждого из декстранов для градуировки не отличаются от указанных в паспорте значений больше чем на 5 % и среднее отклонение для всех декстранов не превышает ± 3 %. Если данные условия не выполняются, градуировочный график смещают вдоль оси ординат и повторяют вышеописанные операции, пока рассчитанные и указанные в паспорте значения будут отличаться не более чем на 5 %.

Градуировка при помощи расчетного метода. При помощи уравнений (2) и (3), приведенных ниже, и подходящего метода (возможно использование итеративного метода, такого как модифицированного Хартли метода Гаусса-Ньютона; также возможно построение кривой при помощи компьютерных программ, которые используют принцип нелинейного регрессивного анализа) рассчитывают значения коэффициентов b_1, b_2, b_3, b_4 и b_5 , которые могут отличаться не более чем на 5 % от соответствующих паспортных значений для каждого декстрана для градуировки и 180 ± 2 для глюкозы.

[#]При расчетах глюкозы в уравнении (2) допускают $K = 1$.[#]

$$M_i = b_5 + e^{(b_1 + b_2 K_i + b_3 K_i^2 + b_4 K_i^3)}, \quad (2)$$

$$\bar{M}_w = \frac{\sum_{i=1}^p (y_i M_i)}{\sum_{i=1}^p y_i}, \quad (3)$$

где:

p – число секций, на которые поделена хроматограмма;

y_i – высота хроматографической линии над базовой линией в i -той секции;

M_i – молекулярная масса для секции i .

ПРИГОДНОСТЬ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

Хроматографируют подходящий объем соответствующего раствора для проверки пригодности хроматографической системы.

Средняя молекулярная масса ФСО декстрана для проверки пригодности хроматографической системы. Рассчитывают значение M_w , как указано в разделе «Градуировка хроматографической системы», используя градуировочный график или значения коэффициентов b_1, b_2, b_3, b_4 и b_5 . Результаты анализа считаются достоверными, если полученное значение находится в пределах:

– от 41 000 до 47 000 (для ФСО декстрана 40 для проверки пригодности хроматографической системы);

– от 67 000 до 75 000 (для ФСО декстрана 60/70 для проверки пригодности хроматографической системы).

Средняя молекулярная масса 10 % высокомолекулярной фракции декстрана. Значение M_w для 10 % высокомолекулярной фракции декстрана, которая элюируется в секциях от 1 до n включительно, рассчитывают по формуле:

$$M_w = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i M_i)}{\sum_{i=1}^n y_i}, \quad (4)$$

где n определяется неравенствами:

$$\sum_{i=1}^n y_i \leq 0,1 \left(\sum_{i=1}^p y_i \right), \quad (5)$$

$$\sum_{i=1}^{n+1} y_i > 0,1 \left(\sum_{i=1}^p y_i \right), \quad (6)$$

где:

p – количество секций, на которые разделена хроматограмма;

y_i – высота хроматографической линии над базовой линией для секции i ;

M_i – молекулярная масса для секции i .

Результаты анализа считаются достоверными, если полученное значение для 10 % высокомолекулярной фракции декстрана находится в пределах:

– от 110 000 до 130 000 (для ФСО декстрана 40 для проверки пригодности хроматографической системы);

– от 190 000 до 230 000 (для ФСО декстрана 60/70 для проверки пригодности хроматографической системы).

Средняя молекулярная масса 10 % низкомолекулярной фракции декстрана. Значение для 10 % низкомолекулярной фракции декстрана, которая элюируется в секции и после секции хроматограмм m , рассчитывают по формуле:

$$M_{\omega} = \frac{\sum_{i=m}^p (y_i M_i)}{\sum_{i=m}^p y_i}, \quad (7)$$

где m определяется неравенствами:

$$\sum_{i=m}^p y_i \leq 0,1 \left(\sum_{i=1}^p y_i \right), \quad (8)$$

$$\sum_{i=m-1}^p y_i > 0,1 \left(\sum_{i=1}^p y_i \right), \quad (9)$$

где:

p – количество секций, на которые разделена хроматограмма;

y_i – высота хроматографической линии над базовой линией для секции i ;

M_i – молекулярная масса для секции i .

Результаты анализа считаются достоверными, если полученное значение для 10 % низкомолекулярной фракции декстрана находится в пределах:

– от 6000 до 8500 (для ФСО декстрана 40 для проверки пригодности хроматографической системы);

– от 7000 до 11 000 (для ФСО декстрана 60/70 для проверки пригодности хроматографической системы).

МОЛЕКУЛЯРНО-МАССОВОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ИСПЫТУЕМОГО ДЕКСТРАНА

Хроматографируют выбранный объем испытуемого раствора и рассчитывают: значение M_{ω} для молекулярно-массового распределения декстрана, значение M_{ω} для 10 % высокомолекулярной фракции декстрана и значение M_{ω} для 10 % низкомолекулярной

2.2.40. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ БЛИЖНЕГО ИНФРАКРАСНОГО ДИАПАЗОНА

Спектрофотометрия ближнего инфракрасного (БИК) диапазона – метод с широкими и разнообразными способами применения в фармацевтическом анализе. Ближний инфракрасный спектральный диапазон охватывает область от около 780 нм до около 2500 нм (от около 12 800 см⁻¹ до около 4000 см⁻¹). В некоторых случаях наиболее полезная информация находится в спектральном диапазоне от около 1700 нм до около 2500 нм (от около 6000 см⁻¹ до около 4000 см⁻¹). В спектрах БИК-диапазона представлены главным образом обертона колебаний C–H, N–H, O–H и S–H и комбинации основных типов колебаний; они являются очень информативными при условии, если информация обрабатывается с помощью соответствующих хемометрических алгоритмов. Полосы в БИК-области значительно более слабые, чем полосы основных колебаний в средней ИК-области, от которых они происходят. Так как значения молярного поглощения в БИК-области малы, излучение обычно проникает в материал (включая твердые вещества) на несколько миллиметров. Кроме того, многие вещества, такие как стекло, являются прозрачными в этом диапазоне длин волн.

Измерения могут быть проведены как на образцах *in situ*, так и с использованием стандартного отбора образцов и методов испытаний. Из БИК-спектра доступна как физическая информация, так и химическая, а также качественная и количественная информация. Однако непосредственное сравнение полученного спектра со спектром химического стандартного образца, как это происходит в абсорбционной спектрофотометрии в среднем ИК-диапазоне, в данном случае не приемлемо. Требуется проведение соответствующей валидированной математической обработки полученных данных.

БИК-спектрофотометрия широко используется как для химического анализа, так и для физического.

Химический анализ:

- идентификация активных субстанций, вспомогательных веществ, готовых лекарственных форм, промежуточных продуктов производства, химического сырья и упаковочных материалов;

- количественное определение содержания активных субстанций и вспомогательных веществ, определение химических чисел, таких как гидроксильное число, йодное число, кислотное число, определение содержания воды, определение степени гидроксирования, контроль содержания растворителей;

- контроль процесса производства.

Физический анализ:

- кристаллическая форма и кристалличность, полиморфизм, псевдополиморфизм, размер частиц;

- процесс растворения, схема распада, твердость;

- исследование свойств пленок;

- контроль процесса производства, например, контроль смешивания и грануляции.

На измерения в БИК-диапазоне влияют многие химические и физические факторы, описанные ниже; воспроизводимость и релевантность результатов зависят от контроля этих факторов; измерения справедливы обычно только для конкретной модели градуировки.

ПРИБОР

БИК-спектрофотометры используются для получения спектров в области от около 780 нм до около 2500 нм (от около 12 800 см⁻¹ до около 4000 см⁻¹). Все измерения в БИК-диапазоне основаны на прохождении луча света через образец или в него и измерении ослабления выходящего (прошедшего, рассеянного или отраженного) излучения.

Спектрофотометры для измерений в БИК-диапазоне включают подходящий источник света и монохроматор или интерферометр. Обычно монохроматорами являются акустико-оптические перестраиваемые фильтры (*AOTF*), дифракционные решетки или призмы. Обычно используются источники света высокой интенсивности, такие как кварцевые или вольфрамовые лампы или аналогичные. Вольфрамовые лампы в качестве источника излучения могут быть высоко стабилизированы. Поэтому многие БИК-спектрофотометры имеют однолучевую конструкцию. В качестве материала детектора обычно используются кремния диоксид, свинца сульфид, индия арсенид, индия галлия арсенид, ртути кадмия теллурид (*MCT*) и дейтерированный триглицинсульфат. Стандартными приспособлениями для образцов являются обычные кюветные держатели, оптико-волоконные зонды, трансмиссионная кювета для погружения, вращающиеся или траверсные держатели образцов. Выбор производят исходя из предполагаемого применения, уделяя особое внимание пригодности приспособления отбора проб для типа анализируемых образцов. Подходящие блоки по обработке данных и их оценке обычно являются частью системы.

МЕТОДЫ ИЗМЕРЕНИЙ

Режим пропускания. Пропускание (T) является мерой ослабления интенсивности излучения при данной длине волны при прохождении излучения сквозь образец. Образец помещают в оптический пучок между источником и детектором. Расположение аналогично таковому во многих традиционных спектрофотометрах. Результат может быть представлен непосредственно в единицах пропускания (T) и/или поглощения (A).

$$T = \frac{I}{I_0},$$

где:

I – интенсивность падающего излучения;

I_0 – интенсивность прошедшего излучения.

$$A = -\log_{10} T = \log_{10} \left(\frac{1}{T} \right) = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right).$$

Режим диффузного отражения. Режим диффузного отражения основан на измерении отражения (R) – отношения интенсивности света, отраженного от образца (I) к интенсивности света, отраженного от фона или стандартной отражающей поверхности (I_r). БИК-излучение может проникать в образец на существенную глубину, где может быть поглощено колебательными комбинациями и обертонами аналитов, присутствующих в образце. Непоглощенное излучение отражается от образца на детектор. БИК-спектр отражения обычно получают расчетом и построением зависимости $\lg(1/R)$ от длины волны или волнового числа.

$$R = \frac{I}{I_r},$$

где:

I – интенсивность излучения, диффузноотраженного от образца;

I_0 – интенсивность излучения, диффузно отраженного от фона или отраженного от поверхности сравнения.

Режим пропускания-отражения. Этот режим является комбинацией пропускания и отражения. При измерении пропускания-отражения (T^*) используется зеркало или диффузная отражающая поверхность для отражения излучения, прошедшего сквозь образец второй раз, удваивая, таким образом, оптический путь. Непоглощенное излучение отражается от образца на детектор.

$$T^* = \frac{I}{I_T},$$

где:

I_T – интенсивность прошедшего и отраженного излучения без образца;

I – интенсивность прошедшего и отраженного излучения, измеренная с образцом.

$$A^* = \log_{10} \left(\frac{1}{T^*} \right).$$

ПРИГОТОВЛЕНИЕ/ПОДАЧА ОБРАЗЦА

Режим пропускания. Измерение и расчет пропускания (T) зависят от фонового спектра пропускания. В качестве фона могут выступать воздух, пустая кювета, используемый растворитель или, в специальных случаях, стандартный образец. Метод в основном применяется для исследования разведенных и неразведенных жидкостей, дисперсионных систем, растворов и твердых веществ. Для измерения пропускания твердых веществ необходимо использовать подходящие приспособления для образцов. Образцы исследуются либо в кюветах подходящей длины (обычно от 0,5 мм до 4 мм), прозрачных в БИК-диапазоне, либо путем погружения оптического волоконного зонда подходящей конфигурации, позволяющего получать спектр, находящийся в зоне, отвечающей требованиям спецификации прибора и подходящей для намеченных целей.

Режим диффузного отражения. Данный метод обычно применяется для исследования твердых веществ. Образец исследуется в подходящем приспособлении. Должны быть приняты меры по соблюдению как можно более воспроизводимых условий измерений от образца к образцу. При использовании оптического волоконного зонда внимание должно быть уделено позиционированию зонда, чтобы убедиться, что он остается неподвижным во время получения спектра и что условия испытания воспроизводимы от образца к образцу. Излучение, отраженное от стандартной отражающей поверхности (фона), сканируется для получения базовой линии, и затем измеряется отражение одного или более аналитического образца. Распространенными стандартными отражающими веществами являются керамическая плитка, перфторированные полимеры и золото. Могут быть использованы и другие подходящие вещества. Непосредственное сравнение возможно только лишь между спектрами, полученными при использовании фона с одинаковыми оптическими свойствами. Должны учитываться влияния размера частиц, гидратационной воды и степени сольватации.

Режим пропускания-отражения. Отражатель размещается позади образца таким образом, чтобы удваивать оптический путь. Такая конфигурация может быть предназначена для разделения одной и той же геометрии прибора на систему с отражателем и систему с оптическим волоконным зондом, когда источник излучения и детектор располагаются по одну сторону образца. Образец исследуется в кювете с зеркалом или подходящим диффузным отражателем, сделанным либо из металла, либо из инертного вещества (например, титана оксида), которое не поглощает в БИК-диапазоне.

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА СПЕКТРАЛЬНЫЙ ОТКЛИК

Температура образца. Данный параметр важен при исследовании водных растворов и многих жидкостей, когда различие на несколько градусов может приводить к значительным отличиям спектров. Кроме того, температура играет важную роль при исследовании твердых веществ и порошков, содержащих воду.

Влага и остаточные растворители. Влага и остаточные растворители, присутствующие в образце, будут приводить к значительным полосам поглощения в БИК-диапазоне.

Толщина образца. Толщина образца является известным источником спектральной вариабельности и должна учитываться и/или контролироваться. Например, при измерении отражения образцы должны быть «бесконечно» толстыми, а более тонкие образцы

постоянной толщины должны иметь стабильный диффузионно-отражающий материал подложки с постоянной и, желательно, высокой отражающей способностью.

Оптические свойства образца. Для твердых веществ должны учитываться как поверхностные свойства, так и объемные свойства образца. Для записи спектров физически, химически или оптически неоднородных образцов может понадобиться усреднение путем увеличения пучка излучения или путем проведения большого числа измерений или путем вращения зонда. Определенные факторы, такие как различия в степени уплотнения или в размерах частиц порошков, а также в качестве поверхности, могут вызывать значительные спектральные изменения.

Полиморфизм. Вариации в кристаллической структуре (полиморфизм) влияют на спектры. По этой причине различные кристаллические формы, так же как и аморфные формы, твердых веществ могут быть отличены друг от друга на основании БИК-спектров. В случае присутствия многочисленных кристаллических форм необходимо обращать особое внимание на то, чтобы градуировочные стандартные образцы имели распределение кристаллических форм, подходящее для решения поставленной задачи.

Возраст образца. С течением времени в образце могут происходить изменения физических, химических или оптических свойств. Необходимо убедиться, что образцы, предназначенные для БИК-спектрофотометрии, являются однотипными с образцами, взятыми для градуировки. В случае анализа образцов различного возраста необходимо принимать в расчет потенциальные отличия в их свойствах.

КОНТРОЛЬ ПАРАМЕТРОВ ПРИБОРА

Прибор используют в соответствии с инструкциями производителя. Регулярно проводят необходимые проверки в соответствии с использованием прибора и испытуемыми веществами.

Проверка шкалы длин волн (за исключением прибора с фильтром). Проверяют используемую шкалу длин волн обычно в диапазоне от около 780 нм до около 2500 нм (от около $12\,800\text{ см}^{-1}$ до около 4000 см^{-1}) или в планируемом для анализа диапазоне, используя один или несколько более подходящих стандартных образцов для проверки длин волн, имеющих характеристические максимумы или минимумы в данном диапазоне. Подходящими стандартными образцами являются, например, метиленхлорид или смесь оксидов редкоземельных металлов. Записывают спектр с таким же спектральным разрешением, как и при получении сертифицированного значения, и определяют расположение не менее трех пиков, расположенных в используемом диапазоне. Допустимыми отклонениями являются $\pm 1\text{ нм}$ при 1200 нм, $\pm 1\text{ нм}$ при 1600 нм и $\pm 1,5\text{ нм}$ при 2000 нм ($\pm 8\text{ см}^{-1}$ при 8300 см^{-1} , $\pm 4\text{ см}^{-1}$ при 6250 см^{-1} и $\pm 4\text{ см}^{-1}$ при 5000 см^{-1}). В зависимости от используемого стандартного образца проверку допустимого отклонения для каждого используемого пика осуществляют, применяя требования для ближайшей длины волны (волнового числа) из описанных выше. Для приборов с преобразованием Фурье градуировка шкалы длин волн может быть проведена с использованием узкой линии паров воды при $7299,86\text{ см}^{-1}$ или узкой линии сертифицированного образца. Из оксидов редкоземельных металлов наиболее подходящим стандартным образцом является NIST 1920 (a).

Измерения в режиме пропускания. Может быть использован метиленхлорид *P* с длиной оптического пути 1,0 мм. Метиленхлорид имеет характеристические резкие полосы при 1155 нм, 1366 нм, 1417 нм, 1690 нм, 1838 нм, 1894 нм, 2068 нм и 2245 нм. Полосы при 1155 нм, 1417 нм, 1690 нм и 2245 нм используются для градуировки. Могут быть использованы и другие подходящие стандартные образцы.

Измерения в режиме диффузного отражения. Может быть использована смесь оксидов диспрозия, гольмия и эрбия (1+1+1 по массе) или другой подходящий стандартный образец. Указанный стандартный образец имеет характеристические пики при 1261 нм, 1681 нм и 1935 нм. Если использование внешних твердых стандартных образцов является невозможным и если измерения диффузного рассеивания проводят в кюветах или с использованием оптоволоконного зонда, то непосредственно в кювету или зонд помещают тщательно перемешанную суспензию из 1,2 г титана диоксида *P* в около 4 мл метиленхлорида *P*. Спектр записывают через 2 мин. Титана оксид не обладает

поглощением в БИК-диапазоне. Спектры записывают с максимальной номинальной инструментальной шириной щели 10 нм при 2500 нм (16 см^{-1} при 4000 см^{-1}). Измерения осуществляют на не менее трех пиках, расположенных в используемом диапазоне. Допустимые отклонения такие же, как указаны выше (при проверке шкалы длин волн). В зависимости от используемого стандартного образца, проверку допустимого отклонения для каждого используемого пика осуществляют, применяя требования для ближайшей длины волны (волнового числа) из описанных выше.

Проверка сходимости длин волн (за исключением прибора с фильтром). Проверяют сходимость длин волн с использованием подходящих стандартных образцов. Стандартное отклонение длины волны должно соответствовать спецификации производителя прибора.

Проверка фотометрической линейности и стабильности отклика. Проверку фотометрической линейности проводят с использованием стандартных образцов пропускания или отражения и известными значениями пропускания и отражения, выраженными в процентах. При измерениях отражения используют углеродсодержащие стандартные образцы. В диапазоне 10–90 % используют не менее 4 стандартных образцов: 10 %, 20 %, 40 % и 80 % со значениями оптического поглощения 1,0, 0,7, 0,4 и 0,1 соответственно. Если система используется для анализов с оптической плотностью более 1,0, дополнительно используют 2 % и/или 5 % стандартные образцы. Строят график зависимости наблюдаемой оптической плотности стандартных образцов от их стандартных оптических плотностей и рассчитывают линейную регрессию. Допустимые отклонения: для угла наклона – $(1,00 \pm 0,05)$; для точки пересечения с осью абсцисс – $(0,00 \pm 0,05)$.

Спектры, полученные с использованием стандартных образцов отражения, проявляют вариабельность по причине отличий условий испытаний, при которых они калибровались в заводских условиях, от условий испытаний, при которых они далее используются. По этой причине процентные значения отражения стандартных образцов, используемых для градуировки, могут быть не достаточны для «абсолютной» градуировки данного прибора. Однако, до тех пор, пока стандартные образцы не изменяются химически или физически, и до тех пор, пока используется та же стандартная отражающая поверхность (фон), что использовалась и при получении сертифицированного значения, последующие измерения тех же стандартных образцов при идентичных условиях, включая точное расположение образца, дают информацию о долгосрочной стабильности фотометрического отклика. Для долгосрочной стабильности допустимыми отклонениями являются $\pm 2\%$; это необходимо в случае, только если спектры записывают без предварительной обработки образца.

Проверка фотометрического шума. Находят фотометрический шум при помощи подходящего стандартного отражающего образца, например, белых керамических плиток или отражающих термопластических смол (например, ПТФЭ). Сканируют отражение стандартного образца в необходимом диапазоне длин волн или волновых чисел с соблюдением рекомендаций производителя прибора и рассчитывают фотометрический шум как пик/пик шум. Фотометрический шум должен соответствовать спецификации спектрофотометра.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И СПЕКТРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ (КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ)

Создание библиотеки спектров сравнения. Записывают спектры подходящего количества серий субстанции, которые были проверены на соответствие требованиям спецификации и которые проявляют типичную для данной субстанции вариабельность (обусловленные, например, различными производителями, физической формой, размером частиц). Набор спектров представляет информацию для идентификации и характеристики, которая определяет границы сходства для данной субстанции; этот набор вносят в библиотеку, используемую для идентификации данной субстанции. Количество веществ в библиотеке зависит от специфики ее использования, но слишком большие библиотеки способны вызывать некоторые сложности в выявлении отличий между различными веществами и при валидации. Все спектры используемой библиотеки должны иметь одинаковые:

– спектральный диапазон и количество точек получения данных;

- методику измерения;
- предварительную обработку данных.

Если создаются подгруппы (библиотеки), то указанные выше параметры применяются независимо для каждой группы. Коллекция спектров библиотеки может быть представлена различными способами в соответствии с математическими методами, используемыми для идентификации. Коллекции могут включать:

- все индивидуальные спектры субстанции;
- средний спектр каждой серии субстанции;
- при необходимости, описание вариабельности спектра субстанции.

Электронные рабочие данные, использованные для создания библиотеки, должны быть сохранены.

Предварительная обработка данных. Во многих случаях, особенно для спектров, снятых в режиме диффузного отражения, могут применяться различные виды предварительной математической обработки спектров перед разработкой классификации или проведением градуировки. Целью этого может быть, например, уменьшение вариаций базовой линии, уменьшение влияния известных изменений, мешающих дальнейшему использованию математических моделей, или сжатие данных перед использованием. Типичными методами являются коррекция мультипликативного рассеивания (*MSC*), преобразование Кубелка-Мунка, способы сжатия спектральных данных, которые могут включать использование весовой функции и подавление шумов, а также числовой расчет производных спектра первого или второго порядка. Производные более высокого порядка не рекомендуются. В некоторых случаях спектры также могут быть нормализованы, например, по максимуму поглощения, среднему поглощению или интегрированной площади под спектром поглощения.

При проведении любых математических преобразований должна соблюдаться осторожность во избежание появления помех или возможной потери важной информации (важных для квалификации методик). Необходимо понимание алгоритма обработки, и во всех случаях логическое обоснование использования преобразования должно документироваться.

Оценка данных. Спектры, полученные в испытании, сравнивают напрямую с отдельными или усредненными спектрами сравнения всех субстанций, находящихся в базе данных, на основании их математической корреляции или других подходящих алгоритмов. Набор известных усредненных спектров сравнения и отклонений от них может быть использован в соответствии с алгоритмом классификации. Различные алгоритмы, основанные на анализе основных компонентов в комбинации с кластерным анализом, *SIMCA* (*soft independent modeling by class analogy* – программное независимое моделирование на основе сходства классов), *COMPARE* функциях, использующих фильтры, *UNEQ* (*unequal dispersed class* – неравномерно рассеянный класс) и другие, используются в программном обеспечении приборов для БИК-спектрофотометрии, а также в стороннем программном обеспечении. Достоверность выбранного алгоритма должна валидироваться для конкретного использования. Например, коэффициент корреляции, сумма квадратов разниц или расстояний при кластерном анализе, должны соответствовать критериям приемлемости, определенным в процессе валидации.

Валидация базы данных

Специфичность. В процессе валидации должна быть установлена селективность классификации, использующей базу данных спектра для положительной идентификации данного вещества и достоверного отличия от спектров других веществ. Должны быть установлены пределы приемлемости. Строгие критерии приемлемости обладают большей способностью к различению спектров, но могут вызывать некоторые ошибки, связанные с присущей данному веществу вариабельностью. Мягкие критерии приемлемости решают эти проблемы, но могут приводить к появлению неоднозначных результатов. Исследование веществ, близких по внешним признакам, химической структуре или наименованию к веществам, входящим в базу данных спектров, должно дать отрицательные результаты при идентификации. Образцы веществ, входящих в базу данных, но не использованных для ее создания (т.е. другие серии, смеси) при идентификации должны давать положительные результаты.

Робастность. Робастность качественного анализа должна быть оценена для установления влияния незначительных изменений стандартных условий на проведение испытаний. Не допускаются изменения параметров предварительной обработки и алгоритма градуировки. Факторами, влияющими на робастность, являются:

- эффект различных условий окружающей среды (например, температуры и влажности в лаборатории);
- эффект температуры образца, размещения образца в оптическом окне, глубины зонда и уплотнения/наполнения вещества;
- замена частей прибора или устройств подачи образца.

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

Создание библиотеки стандартных спектров для градуировки. Градуировка – это процесс получения математической модели соотношения отклика, полученного от прибора, и свойств испытуемого образца. Используют любой алгоритм градуировки, который может описываться точной математической формулой и давать удовлетворительные результаты. Записывают спектры необходимого количества образцов с известными значениями определяемой величины во всем диапазоне градуировки (например, содержание воды). При градуировке проверяют правильности выбора длин волн для испытуемого образца путем сравнения полос испытуемого образца и матрицы. Создают модель градуировки с использованием около 2/3 измеренных образцов. Оставшуюся 1/3 часть измеренных образцов сравнивают с полученной базой данных. Все образцы должны иметь значения количественного содержания в точно установленных пределах в соответствии с поставленной задачей. Корректность количественного определения должна быть продемонстрирована изменениями матрицы в пределах заданного интервала. Обычно используют множественную линейную регрессию (*MLR, multiple linear regression*), метод частных наименьших квадратов (*PLS, partial least squares*) и регрессию основного компонента (*PCR, principle component regression*). В случае градуировок *PLS* и *PCR* на график наносят коэффициенты или нагрузки, и области высоких коэффициентов сравниваются со спектрами анализируемого образца. Рабочие данные, использованные для градуировки, должны быть сохранены без предварительной обработки.

Предварительная обработка данных. Предварительная обработка данных может быть представлена как математическое превращение БИК-спектральных данных для улучшения качества спектров и/или для удаления или уменьшения нежелательных источников отклонений перед проведением градуировки. Существует много подходящих алгоритмов для предварительной обработки данных и калибровки. Выбор алгоритма основывается на пригодности для решения поставленной задачи. Выбор длины волны может повысить эффективность моделей градуировки, таких как *MLR* (например, для определения размера частиц). В некоторых случаях весьма полезным является удаление части шкалы длин волн, например, в случае определения гидратной воды. Кроме этого используют прием компрессии шкалы длин волн.

Параметры валидации. При валидации методик в БИК-области спектра используются такие же аналитические характеристики, как и для других аналитических методик. Специфические критерии приемлемости для каждого параметра валидации должны учитывать предполагаемое использование метода.

Специфичность. Относительная различительная способность и селективность для количественного анализа должны быть аналогичны таковым для «Качественного анализа». Объем испытаний на специфичность определяется предполагаемым использованием метода и контролируруемыми рисками. Отличия концентраций матрицы в пределах рабочего диапазона не должны значительно влиять на количественное измерение.

Линейность. Валидация по показателю линейность включает в себя корреляцию БИК-результатов, рассчитанных из БИК-откликов, полученных по используемым алгоритмам, от результатов, полученных стандартным методом и распределенным в пределах определенного диапазона модели градуировки. Также могут валидироваться БИК-отклики, находящиеся в нелинейном диапазоне.

Диапазон применения. Диапазон стандартных значений испытуемого образца определяет диапазон БИК-методики и ее пределов количественного определения.

Необходимо контролировать, чтобы результаты определения не выходили за пределы валидированного диапазона.

Правильность. Правильность может быть определена путем сравнения результатов анализа с результатами, полученными по валидированной методике, или с результатами анализа известных образцов (холостые образцы и образцы, к которым добавлено известное количество испытуемой субстанции). Правильность может быть выражена как стандартная ошибка прогнозирования (*SEP, standard error of prediction*) БИК-методики, которая должна согласовываться с данными валидированной методики. Стандартная ошибка прогнозирования представляет собой стандартное отклонение разниц, полученных при сравнении данных, полученных по используемой БИК-методике, с аналитическими данными метода сравнения. Путем сравнения стандартной ошибки прогнозирования с методом сравнения, использованным для валидации, демонстрируется корреляция результатов БИК-методики и аналитических данных метода сравнения. Для сравнения результатов БИК-методики со стандартными результатами могут применяться альтернативные статистические методы (двухсторонний *t*-тест, оценка систематической погрешности).

Точность (прецизионность). Точность выражает степень близости результатов для серии измерений при заданных условиях. Она устанавливается на не менее 6 измерениях, выполненных в соответствии с разработанной аналитической методикой. Точность рассматривается на двух уровнях: сходимости (повторяемость), которая определяется повторными измерениями одного и того же образца с изменениями его положения или без них, и внутрилабораторная точность (проведение измерений различными аналитиками, выполнение измерений в различные дни).

Робастность. Робастность включает влияние изменений температур, влажности, обработки образца, а также инструментальных изменений.

Выбросы (outliers). Выбросы данных БИК-измерений образца за пределы диапазона градуировки указывают на необходимость дальнейших испытаний. Если дальнейшие испытания образца соответствующей аналитической методикой дают значения, укладывающиеся в нормы спецификации, полученный результат рассматривается как соответствующий спецификации. Таким образом, выбросы данных БИК-измерений образца могут рассматриваться как соответствующие спецификации для испытуемого образца.

ОЦЕНКА ДЕЙСТВУЮЩЕЙ МОДЕЛИ

Валидированные для использования БИК-модели подвергаются непрерывной оценке производительности и контролю за валидационными параметрами. При обнаружении несоответствий необходимо применять корректирующие действия. Степень необходимой ревалидации зависит от природы изменений. Ревалидация модели качественного анализа необходима в случае внесения нового вещества в библиотеку стандартов и может быть необходима, если наблюдаются изменения физических свойств вещества и если изменяется поставщик материалов. Ревалидация модели количественного анализа необходима при изменении состава готового продукта, производственного процесса и поставщиков/квалификации сырья.

ПЕРЕНОС БАЗЫ ДАННЫХ

При переносе базы данных на другой прибор должны быть учтены спектральный диапазон, количество экспериментальных точек, спектральное разрешение и другие параметры. Для демонстрации того, что модель остается пригодной для новой базы данных или нового прибора, должны быть проведены последующие валидационные процедуры и установлены соответствующие критерии.

ХРАНЕНИЕ ДАННЫХ

Электронные версии БИК-спектров, библиотеки и данные сохраняют в соответствии с действующими правилами.

БИК-спектры сохраняют с предварительной обработкой данных для конкретного использования (например, для идентификации, анализа размера частиц, определения содержания воды и др.) в соответствии с действующими спецификациями.

01/2013:20241

2.2.41. КРУГОВОЙ ДИХРОИЗМ

Круговым дихроизмом называют разность оптических плотностей в пределах полосы поглощения для света с левой и правой круговой поляризацией, присущую оптически активным веществам.

Прямое измерение дает величину:

$$\Delta A = A_L - A_R,$$

где:

ΔA – оптическая плотность кругового дихроизма;

A_L – оптическая плотность для света с левой круговой поляризацией;

A_R – оптическая плотность для света с правой круговой поляризацией.

Круговой дихроизм рассчитывают по формуле:

$$\Delta \epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R = \frac{\Delta A}{c \cdot l},$$

где:

$\Delta \epsilon$ – молярный круговой дихроизм или молярный дифференциальный дихроичный коэффициент поглощения, выраженный л·моль⁻¹·см⁻¹;

ϵ_L – молярный коэффициент поглощения (2.2.25) для света с левой круговой поляризацией;

ϵ_R – молярный коэффициент поглощения для света с правой круговой поляризацией;

c – концентрация вещества в испытуемом растворе, моль·л⁻¹;

l – длина оптического пути, см.

Для характеристики кругового дихроизма могут быть также использованы следующие единицы:

Фактор диссимметрии:

$$g = \frac{\Delta \epsilon}{\epsilon},$$

где:

ϵ – молярный коэффициент поглощения (2.2.25).

Молярная эллиптичность:

Некоторые типы приборов непосредственно показывают величину эллиптичности Θ , выраженную в градусах. При использовании таких приборов молярная эллиптичность $[\Theta]$ может быть рассчитана по формуле:

$$[\Theta] = \frac{\Theta \cdot M}{c \cdot l \cdot 10},$$

где:

$[\Theta]$ – молярная эллиптичность, градус·см²·дмоль⁻¹;

Θ – величина эллиптичности, показываемая прибором;

M – относительная молекулярная масса испытуемого вещества;
 c – концентрация испытуемого вещества в растворе, г/мл;
 l – длина оптического пути, см.

Молярная эллиптичность также связана с молярным круговым дихроизмом следующим уравнением:

$$\Theta = 2,303 \Delta \epsilon \frac{4500}{\pi} \approx 3300 \Delta \epsilon,$$

Молярная эллиптичность часто используется при анализе белков и нуклеиновых кислот. В этом случае молярная концентрация, выраженная в единицах мономерных остатков, рассчитывается, исходя из выражения:

$$\frac{\text{молекулярная масса}}{\text{число аминокислот}},$$

Для белков среднее значение относительной молекулярной массы мономерного остатка составляет от 100 до 120 (в среднем 115), для нуклеиновых кислот (в виде натриевой соли) – около 330.

Прибор. Источником света (S) является ксеноновая лампа (рисунок 2.2.41.-1); свет проходит через двойной монохроматор (M), снабженный кварцевыми призмами (P1, P2).

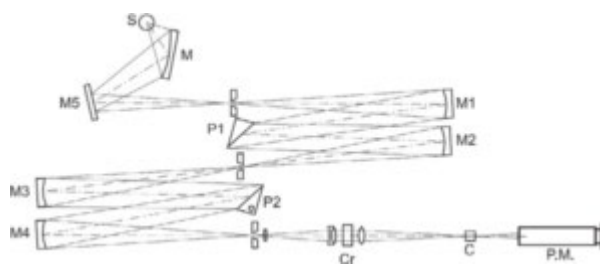


Рисунок 2.2.41.-1. Оптическая схема дихрографа

Линейный луч из первого монохроматора расщепляется на два компонента, поляризуемые под правым углом вторым монохроматором. Дополнительный луч устраняется выходной щелью монохроматора.

Поляризованный и монохроматический свет проходит через двоякопреломляющий модулятор (Cr); в результате образуется свет с круговой поляризацией.

Затем луч проходит через исследуемый образец (C) и попадает на фотоумножитель (P.M.), за которым следует усилитель, производящий два электрических сигнала: один постоянного тока V_c , а другой переменного тока с частотой модуляции V_{ac} , характерной для исследуемого образца. Фаза является показателем кругового дихроизма. Отношение V_{ac}/V_c пропорционально дифференциальной оптической плотности ΔA , которая создается сигналом. Дихрограф обычно позволяет проводить измерения в диапазоне длин волн от 170 нм до 800 нм.

Градуировка прибора

Точность шкалы оптической плотности. 10,0 мг изоандростерона P растворяют в диоксане P и доводят до объема 10,0 мл этим же растворителем. Снимают спектр кругового дихроизма раствора в диапазоне от 280 нм до 360 нм. Величина $\Delta \epsilon$, измеренная в максимуме при 304 нм, равна +3,3.

Также может быть использован раствор $(1S)$ -(+)-10-камфорсульфоновой кислоты P .

Линейность модуляции. 10,0 мг $1(S)$ -(+)-10-камфорсульфоновой кислоты P растворяют в воде P и доводят до объема 10,0 мл этим же растворителем. Определяют точную концентрацию камфорсульфоновой кислоты в растворе методом спектрофотометрии в ультрафиолетовой области (2.2.25), используя величину удельного показателя поглощения при 285 нм, равную 1,49. Снимают спектр кругового дихроизма

раствора в диапазоне от 185 нм до 340 нм. Величина $\Delta\epsilon$, измеренная в максимуме при 290,5 нм, составляет от +2,2 до +2,5, а измеренная в максимуме при 192,5 нм – от –4,3 до –5.

Может быть использован (1S)-(+)- или его оптический изомер (1R)-(+)-10-камфорсульфонат аммония Р.

01/2013:20242

2.2.42. ПЛОТНОСТЬ ТВЕРДЫХ ТЕЛ

Плотность твердых тел соответствует их средней массе единицы объема и обычно выражается в граммах на сантиметр кубический (г/см^3), хотя международной единицей является килограмм на метр кубический ($1 \text{ г/см}^3 = 1000 \text{ кг/м}^3$).

В отличие от газов и жидкостей, плотность которых определяются только температурой и давлением, плотность твердых тел зависит также от их структуры и поэтому изменяется в зависимости от кристаллической структуры и степени кристалличности.

В том случае, когда твердые частицы являются аморфными или частично аморфными, их плотность зависит от способа получения, обработки и хранения.

Поэтому, в отличие от жидкостей, плотности двух химически эквивалентных твердых веществ могут быть различными, и это отличие отражает соответствующие различия в строении твердых тел. Плотность частиц – важная физическая характеристика лекарственных средств в форме порошка.

Плотность твердой частицы может принимать различные значения в зависимости от метода, используемого для измерения ее объема. Следует различать три уровня выражения плотности:

- *истинная плотность*, которая используется только для твердой фракции материала; истинную плотность также называют *кристаллической плотностью*;
- *плотность частиц*, которая характеризует также объем пор внутри твердых частиц;
- *объемная плотность*, которая включает объемы пустот между частицами, образованные в слое порошка; [#]объемную плотность называют также *кажущейся плотностью* или *насыпной массой*[#].

ИСТИННАЯ ПЛОТНОСТЬ

Истинная плотность вещества представляет собой отношение массы к объему элементарной ячейки кристалла за исключением объема пор, которые не являются неотъемлемой частью кристаллической решетки вещества. Истинная плотность является свойством, присущим индивидуальной кристаллической структуре вещества, и поэтому ее величина не должна зависеть от способа определения. Истинная плотность определяется расчетным путем.

Истинную плотность рассчитывают на основании кристаллографических данных (размер и состав элементарной ячейки кристалла), например, из данных дифракции рентгеновского излучения монокристалла или путем уточнения кристаллической структуры на основании данных дифракции рентгеновского излучения на порошке.

ПЛОТНОСТЬ ЧАСТИЦ

Плотность частиц вещества учитывает как истинную плотность, так и пористость самой частицы вещества (закрытые и/или недоступные в условиях эксперимента открытые поры). Таким образом, плотность частиц зависит от величины установленного объема, который, в свою очередь, зависит от метода измерения. Плотность частицы вещества может быть установлена одним из двух следующих методов.

Пикнометрическая плотность определяется путем измерения объема, занимаемого известной массой порошкообразного вещества, который эквивалентен объему газа, вытесненного веществом, используя пикнометр газового вытеснения (2.9.23). Объем вещества, установленный таким способом, не включает объем, занимаемый открытыми порами, однако он включает объем закрытых пор или пор, недоступных для газа. Благодаря высокой диффузионной активности гелия, который является наиболее предпочтительным

для определения газом, большинство открытых пор доступны для газа. Поэтому пикнометрическая плотность тонко измельченного порошка, в общем, не сильно отличается от значений истинной плотности. Таким образом, с помощью пикнометрической плотности можно оценить истинную плотность аморфных или частично кристаллических образцов, и поэтому данный способ широко применим для образцов лекарственных средств в форме порошков.

Плотность, устанавливаемая ртутным порозиметром, также называемая *гранулярной плотностью*. Объем, определяемый этим методом, включает объем, занимаемый закрытыми порами или порами, недоступными для ртути, однако объем открытых пор включается только в случае, если их размер меньше некоторого предела. Этот предел размера пор или минимально доступный диаметр зависит от давления, под которым подается ртуть во время измерения; при обычных условиях измерения ртуть не проникает в мельчайшие поры, доступные для гелия. Для одного образца могут быть получены различные значения гранулярной плотности, так как возможно определение плотности для каждого используемого рабочего давления, что соответствует различным значениям предельных размеров пор при различных давлениях.

ОБЪЕМНАЯ ПЛОТНОСТЬ И ПЛОТНОСТЬ ПОСЛЕ УСАДКИ

Плотность при свободной засыпке порошка учитывает вклад свободного объема между частицами порошка. Следовательно, плотность при свободной засыпке зависит как от плотности частиц порошка, так и от их пространственного расположения в слое порошка.

Плотность при свободной засыпке зачастую очень сложно измерить с хорошей воспроизводимостью, так как самые незначительные нарушения в слое могут приводить к новому значению плотности. Таким образом, важным требованием при сообщении значений насыпной плотности является указание метода ее определения.

Объемную плотность и плотность после усадки определяют, как указано в статье 2.9.34. *Объемная плотность и плотность после усадки*.

01/2013:20243

2.2.43. МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ

Масс-спектрометрия основана на прямом измерении отношения массы к числу элементарных положительных или отрицательных зарядов ионов (m/z), полученных из анализируемого вещества и находящихся в газовой фазе. Данное отношение выражается в атомных единицах массы (1 а.е.м. равна одной двенадцатой массы нуклида ^{12}C) или в дальтонах (1 Да равен массе атома водорода).

Ионы, образовавшиеся в *ионизаторе* прибора, ускоряются и перед попаданием в *детектор* разделяются с помощью *масс-анализатора*. Все эти действия происходят в камере, в которой насосная система поддерживает вакуум от 10^{-3} Па до 10^{-6} Па.

Результирующий масс-спектр является графиком зависимости относительного количества различных ионов от отношения m/z . Сигнал, отвечающий иону, представлен несколькими пиками, соответствующими статистическому распределению различных изотопов этого иона. Такая диаграмма называется *изотопным профилем*, а пик (по крайней мере, для небольших молекул), представляющий наиболее распространенные изотопы для каждого атома, – *моноизотопным пиком*.

Масс-спектрометрический анализ дает важную качественную (определение молекулярных масс; информация, касающаяся структуры определяемых фрагментов) и количественную (с использованием внешнего или внутреннего стандартов) информацию с пределом обнаружения от пикомоля до фемтомоля.

ВВОД ОБРАЗЦА

Первой стадией анализа является ввод образца в прибор без значительного нарушения вакуума. В широко распространенном методе, называемом *прямым вводом жидкости*, образец помещается на конце цилиндрического штока (в кварцевом тигле, на проволоке или на металлической поверхности). Этот шток через вакуумный шлюз, в котором

поддерживается первичный промежуточный вакуум между атмосферным давлением и вторичным вакуумом прибора, вводится в спектрометр.

Другие системы ввода позволяют проанализировать компоненты смеси, которые разделяются с помощью соответствующего прибора, соединенного с масс-спектрометром.

Газовая хроматография/масс-спектрометрия. При использовании подходящих колонок (капиллярных или полукапиллярных) возможно непосредственное введение конца колонки в ионизатор прибора без применения сепаратора.

Жидкостная хроматография/масс-спектрометрия. Такая комбинация особенно полезна для анализа полярных соединений, которые являются недостаточно летучими либо слишком термолабильными для того, чтобы их можно было проанализировать методом газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией. Данный метод осложняется трудностью получения ионов в газовой фазе из жидкой фазы, что требует применения специальных интерфейсов, таких как:

– *прямой ввод жидкости*: подвижная фаза распыляется, и растворитель испаряется перед ионизатором прибора;

– *интерфейс с пучком частиц*: подвижная фаза, скорость которой может достигать 0,6 мл/мин, распыляется в десольватационной камере, в результате в ионизатор прибора попадают лишь анализируемые вещества в нейтральной форме; данный способ может быть использован для соединений с относительно низкой полярностью и молекулярными массами меньше 1000 Да;

– *интерфейс с движущейся лентой*: подвижная фаза, скорость которой может достигать 1 мл/мин, наносится на поверхность движущейся ленты; после выпаривания растворителя анализируемые вещества переносятся к ионизатору прибора, где подвергаются ионизации; данный способ мало продуктивен для очень полярных или термолабильных соединений.

Другие виды интерфейсов (электрораспыление, термораспыление, химическая ионизация при атмосферном давлении) могут рассматриваться как самостоятельные методы ионизации и описаны в разделе, посвященном способам ионизации.

Сверхкритическая флюидная хроматография/масс-спектрометрия. Подвижная фаза, обычно состоящая из находящегося в сверхкритическом состоянии диоксида углерода, переходит в газообразное состояние после прохождения через нагретую заслонку, находящуюся между колонкой и ионизатором.

Капиллярный электрофорез/масс-спектрометрия. Элюент вводится в ионизатор, в некоторых случаях после добавления дополнительного растворителя для того, чтобы достичь скорости потока порядка нескольких миллилитров в минуту. Ограничениями данного метода являются малые количества вводимого образца и необходимость использования летучих буферных растворов.

СПОСОБЫ ИОНИЗАЦИИ

Электронный удар. Образец, находящийся в газообразном состоянии, ионизируется потоком электронов, энергия которых (обычно 70 эВ) больше энергии ионизации образца. При этом кроме молекулярного иона M^+ образуются осколочные ионы, характерные для данной молекулярной структуры. Главным ограничением данного способа является необходимость испарения образца, что делает невозможным его применение для полярных, термолабильных или высокомолекулярных соединений. Ионизация электронным ударом может быть использована в газовой хроматографии, соединенной с масс-спектрометрией, а в некоторых случаях и в жидкостной хроматографии.

Химическая ионизация. Этот тип ионизации предполагает использование реагентного газа, такого как метан, аммиак, монооксид азота, диоксид азота или кислород. Спектр характеризуется ионами $(M + H)^+$ или $(M - H)^-$ типов или ионами-аддуктами, образованными из аналита и используемого газа. Осколочные ионы образуются реже, чем при ионизации электронным ударом. Для термолабильных веществ используется разновидность данного метода ионизации, при которой образец, находящийся на проволоке, очень быстро испаряется вследствие эффекта Джоуля-Томсона (десорбционная химическая ионизация).

Бомбардировка быстрыми атомами (FAB) или ионизация бомбардировкой быстрыми ионами (жидкостная масс-спектрометрия вторичных ионов – LSIMS). Образец, растворенный в вязкой матрице (например, в глицерине), наносится на металлическую поверхность и ионизируется потоком нейтральных атомов, например, аргона, ксенона или обладающими большой кинетической энергией ионами цезия. Образуются ионы $(M + H)^+$ или $(M - H)^-$ типов либо ионы-аддукты, сформированные матрицей или образцом. Данный тип ионизации хорошо подходит для полярных, термолабильных соединений, имеющих молекулярную массу до 10 000 Да. При прибавлении к подвижной фазе 1–2 % глицерина он может быть использован для жидкостной хроматографии, однако скорость подвижной фазы должна быть очень низкой (несколько микролитров в минуту). При нанесении тонкого слоя матрицы на поверхность хроматографических пластинок такой способ ионизации может быть использован и в тонкослойной хроматографии.

Полевая десорбция или полевая ионизация. Образец испаряется около вольфрамовой проволоки, покрытой микроиглами (*полевая ионизация*) или помещается на эту проволоку (*полевая десорбция*). Сильное электрическое поле (напряжение около 10 кВ), возникающее между проволокой и противоэлектродом, ионизирует образец. При данных способах ионизации образуются преимущественно молекулярные ионы M^+ и $(M + H)^+$ ионы. Эти способы используются для малополярных и/или термолабильных соединений.

Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (MALDI). Образец, смешанный с подходящей матрицей и помещенный на металлическую подложку, ионизируется импульсным лазерным излучением с длиной волны от УФ- до ИК-диапазона (продолжительность импульсов может составлять от пикосекунды до нескольких наносекунд). Данный способ ионизации играет важную роль при анализе соединений с очень большой молекулярной массой (более 100 000 Да), но ограничен использованием времяпролетного анализатора (см. ниже).

Электрораспылительная ионизация. Данный способ ионизации проводится при атмосферном давлении. Образец, находящийся в растворе, вводится в источник через капилляр, конец которого имеет потенциал порядка 5 кВ. Для облегчения распыления может использоваться газ. Испарение молекул растворителя из образующихся микрокапель приводит к образованию в газовой фазе однозарядных или многозарядных ионов. Скорости подвижной фазы при данном виде ионизации могут изменяться от нескольких микролитров в минуту до 1 мл/мин. Такая ионизация подходит для полярных соединений, а также для исследования биомолекул с молекулярными массами до 100 000 Да. Она может сочетаться с жидкостной хроматографией или капиллярным электрофорезом.

Химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI). Ионизация проводится при атмосферном давлении под действием электрода, имеющего потенциал несколько киловольт и помещенного на пути подвижной фазы, которая распыляется как вследствие тепловых эффектов, так и благодаря использованию потока азота. Образующиеся ионы являются однозарядными и относятся к $(M + H)^+$ типу в случае положительного заряда и к $(M - H)^-$ типу в случае отрицательного. Возможность использования высоких скоростей подвижной фазы (до 2 мл/мин) делает этот способ ионизации идеальным для сочетания с жидкостной хроматографией.

Термораспылительная ионизация. Образец, находящийся в подвижной фазе, состоящей из воды и органических модификаторов и содержащей летучий электролит (обычно ацетат аммония), вводится в распыленной форме после прохождения через металлический капилляр, температура которого контролируется. Допускаются скорости подвижной фазы порядка 1 мл/мин – 2 мл/мин. Ионы электролита ионизируют анализируемое соединение. Такой процесс ионизации может быть заменен или усилен электрическим разрядом величиной около 800 вольт, особенно при использовании только органического растворителя. Данный способ ионизации может быть использован в методе жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией.

АНАЛИЗАТОРЫ

Различия в работе анализаторов зависят, главным образом, от двух параметров:

– диапазона, в котором могут быть измерены отношения m/z (*массовый диапазон*);

– *разрешающей способности*, характеризующейся возможностью разделить два иона одинаковой интенсивности с отношениями m/z , отличающимися на ΔM и перекрывающиеся при определенном процентном превышении базовой линии; например, разрешающая способность ($M/\Delta M$), равная 1000 с 10 % превышением базовой линии, позволяет провести разделение отношений m/z 1000 и 1001 с интенсивностями, на 10 % превышающими базовую линию. В некоторых случаях (времяпролетные анализаторы, квадрупольные анализаторы, ионные ловушки) разрешающая способность может быть определена как отношение молекулярной массы к ширине пика на половине высоты (50 % превышение базовой линии).

Магнитные и электростатические анализаторы. Ионы, образовавшиеся в ионизаторе, ускоряются потенциалом V и сосредотачиваются, в зависимости от устройства прибора, между магнитным (магнитное поле B) или электростатическим анализаторами (электростатическое поле E). В соответствии с законом Лапласа они перемещаются по траектории с радиусом r :

$$\frac{m}{z} = \frac{B^2 r^2}{2V}.$$

Для накопления и измерения различных ионов, образовавшихся в ионизаторе, могут быть использованы два типа сканирования: изменение B при постоянной величине V или изменение V при постоянной величине B . За магнитным анализатором обычно следует электрический сектор, который действует как фильтр кинетической энергии и позволяет заметно увеличить разрешающую способность прибора. Максимальная разрешающая способность такого прибора (двойной сектор) изменяется от 10 000 до 150 000 и в большинстве случаев позволяет достаточно точно оценить величину отношений m/z для определения элементного состава соответствующих ионов. Для однозарядных ионов массовый диапазон составляет от 2000 Да до 15 000 Да. Некоторые ионы могут разрушаться спонтанно (метастабильные переходы) или при столкновении с газом (диссоциация, активированная столкновением (*CAD*)) в областях между ионизатором и детектором, где отсутствует поле. Исследование этих процессов разрушения очень полезно для определения структуры и характеристики определенного соединения, входящего в состав смеси, и делает возможным использование тандемной масс-спектрометрии. В зависимости от места, в котором протекают процессы разрушения, известно много методик его проведения:

– *режим дочернего иона* (определение состава ионов, образовавшихся при разрушении определенного родительского иона): $B/E = \text{константа}$, *MIKES* (*Mass-analysed Ion Kinetic Energy Spectroscopy*);

– *режим родительского иона* (определение всех ионов, образовавшихся при разрушении иона с определенным отношением m/z): $B^2/E = \text{константа}$;

– *режим нейтральных частиц* (определение всех ионов, которые теряют идентичные фрагменты): $B/E(1 - E/E_0)^{1/2} = \text{константа}$, где E_0 – базовый потенциал электрического сектора.

Квадрупольные анализаторы. Анализатор состоит из четырех параллельных металлических стержней, имеющих цилиндрическое или гиперболическое поперечное сечение. Они расположены симметрично по отношению к траектории движения ионов; пары противоположных стержней присоединены к электрическому источнику. Потенциалы двух пар стержней противоположны. Они состоят из постоянного и изменяющегося компонентов. Ионы, образовавшиеся в ионизаторе, пропускаются и разделяются вследствие изменения потенциалов, приложенных к стержням, причем отношение постоянного потенциала к переменному должно оставаться неизменным. Квадрупольные анализаторы обычно имеют массовый диапазон от 1 а.е.м. до 2000 а.е.м., хотя в некоторых случаях он может достигать 4000 а.е.м. Несмотря на то, что такие анализаторы имеют меньшее разрешение, чем магнитные, они позволяют получать моноизотопный профиль однозарядных ионов во всем массовом диапазоне. Для получения спектров можно использовать три квадрупольных анализатора, соединенных друг с другом, Q_1 , Q_2 , Q_3 (Q_2 служит

ионизационной камерой и в действительности не является анализатором; чаще всего в качестве ионизирующего газа применяют аргон).

Наиболее часто используемыми режимами сканирования являются:

– *режим дочернего иона*: Q_1 выбирает m/z ион, фрагменты которого, полученные при ионизации в квадруполе Q_2 , анализируются квадруполем Q_3 ;

– *режим родительского иона*: Q_3 пропускает ионы только с определенным соотношением m/z , в то время как Q_1 сканирует определенный массовый диапазон. Детектируются только ионы, при разрушении которых образуется ион, отбираемый квадруполем Q_3 ;

– *режим нейтральных частиц*: Q_1 и Q_3 сканируют определенный массовый диапазон, но в интервале, соответствующем фрагментам, которые теряет определенное вещество или группа веществ.

Для получения спектров возможно сочетание квадрупольных анализаторов с магнитными или электростатическими. Такие приборы называют *гибридными масс-спектрометрами*.

Ионные ловушки. Данные анализаторы имеют такой же принцип работы, что и квадрупольные, но в них используются трехмерные электрические поля. Анализаторы такого типа позволяют получать спектры ионов нескольких генераций (MS^n).

Циклотронно-резонансные масс-анализаторы. Ионы, образовавшиеся в ячейке и подвергнутые действию интенсивного магнитного поля, движутся по круговым траекториям с частотами, которые могут быть непосредственно связаны с величинами отношений m/z для этих ионов при помощи преобразования Фурье. Данное явление называется ионно-циклотронным резонансом. Анализаторы такого типа состоят из сверхпроводящих магнитов и обладают очень высокой разрешающей способностью (до 1000 000 и выше), а также позволяют получать MS^n спектры. Их недостатком является необходимость использования очень глубокого вакуума (порядка 10–7 Па).

Времяпролетные анализаторы. Ионы, образовавшиеся в ионизаторе, ускоряются потенциалом величиной от 10 кВ до 20 кВ. Они проходят через анализатор, состоящий из бесполевого трубы длиной от 25 см до 1,5 м, обычно называемой *пролетной трубой*. Время (t), за которое ион достигает детектора, пропорционально квадратному корню из отношения m/z . Теоретически массовый диапазон для такого анализатора бесконечен. Практически он определяется методом ионизации или десорбции. Времяпролетные анализаторы используются, главным образом, для высокомолекулярных соединений (вплоть до нескольких сотен тысяч дальтон). Данный анализатор обладает очень высокой чувствительностью (достаточно несколько пикомолей вещества). Точность измерений и разрешающая способность таких приборов могут быть значительно улучшены при использовании электростатического зеркала (рефлектрона).

ПОЛУЧЕНИЕ СИГНАЛА

Существует три возможных режима получения сигнала.

Режим полного спектра. Записывается полный сигнал, полученный для выбранного массового диапазона. Спектр представляет собой зависимость относительной интенсивности различных ионов от величины m/z . Получаемые результаты являются главным образом качественными. Для более быстрой идентификации возможно использование библиотек спектров сравнения.

Фрагментометрический режим (селективное сканирование ионов). Получаемый сигнал ограничен одним (сканирование одного иона, *single-ion monitoring (SIM)*) или несколькими (множественное ионное сканирование, *multiple-ion monitoring (MIM)*) ионами, характерными для анализируемого вещества. В этом режиме предел обнаружения значительно ниже. При использовании внутреннего или внешнего стандартов (например, дейтерированные стандарты) могут быть проведены количественные или полуколичественные измерения. При использовании времяпролетных анализаторов такие измерения невозможны.

Двойной фрагментометрический массспектрометрический режим (множественный мониторинг реакций, *multiple reaction monitoring (MRM)*). Включает специфическую мономолекулярную или бимолекулярную реакцию разрушения

выбранного иона-предшественника, характерного для анализируемого вещества. Селективность и высокая специфичность данного режима получения сигнала обеспечивают превосходную чувствительность и делают его наиболее подходящим для количественных определений с использованием подходящих внутренних стандартов (например, дейтерированных). Данный вид анализа может быть проведен только при использовании приборов, снабженных тремя соединенными квадрупольями, ионными ловушками или циклотронно-резонансными анализаторами.

ГРАДУИРОВКА

Градуировка позволяет установить соответствие между величиной m/z и детектируемым сигналом. Как правило, она проводится с использованием вещества сравнения. Градуировка может быть внешней (данные находятся в отдельном файле) или внутренней (вещество (вещества) сравнения смешивается с исследуемым веществом и результаты вносятся в файл с данными анализа). Число ионов или точек, необходимое для надежной градуировки, зависит от типа анализатора и требуемой точности измерений, например, в случае магнитного анализатора, где отношение m/z экспоненциально изменяется при изменении величины магнитного поля, необходимо брать настолько много точек, насколько это возможно.

ОБНАРУЖЕНИЕ СИГНАЛА И ОБРАБОТКА ДАННЫХ

Ионы, разделенные анализатором, преобразуются в электрические сигналы такими детектирующими системами, как фотоумножитель или электронный умножитель. Затем данные сигналы усиливаются и превращаются в цифровые сигналы, которые используются при обработке данных и позволяют проводить различные операции: градуировку, получение спектров, автоматические количественные расчеты, архивирование данных, создание или использование библиотек масс-спектров. Различные физические параметры, требуемые для работы прибора, в целом контролируются компьютером.

01/2013:20244

2.2.44. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ОБЩЕГО ОРГАНИЧЕСКОГО УГЛЕРОДА В ВОДЕ ДЛЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Определение содержания общего органического углерода (ООУ, *TOC*, *total organic carbon*) является непрямым методом определения содержания органических веществ в воде для фармацевтического применения. Определение содержания ООУ может также использоваться при контроле выполнения различных операций в производстве лекарственных средств.

Поскольку для определения содержания ООУ могут применяться различные методики, в данной статье приведены не описания методик, а их квалификация и интерпретация результатов в предельных испытаниях. Испытания раствора сравнения проводят через определенные интервалы времени в зависимости от частоты измерений; раствор готовят с использованием легкоокисляющейся субстанции (например, сахарозы) с такой концентрацией, чтобы отклик прибора соответствовал измеряемому пределу содержания ООУ. Пригодность системы проверяют с использованием трудноокисляющейся субстанции (например, 1,4-бензохинона).

Разные типы приборов для определения ООУ в воде для фармацевтического применения, как правило, предназначены для полного окисления органических молекул в образце воды до углерода диоксида с последующим измерением его количества, используемого затем для расчета концентрации углерода в воде.

Используемый прибор в процессе работы может определять органический и неорганический углерод (неорганический углерод присутствует в виде карбонатов). Это может обеспечиваться путем определения количества неорганического углерода и вычитанием его из количества общего углерода или удалением неорганического углерода из образца при помощи продувания перед окислением. В процессе продувания из

испытуемого образца могут удаляться и органические молекулы, но часть связанного с ними углерода в воде для фармацевтического применения незначительна.

Прибор. Используют отградуированный прибор, установленный в режим «on-line» или «автономно». Пригодность системы проверяют, как описано ниже, через определенный промежуток времени. Прибор должен иметь предел определения углерода 0,05 мг/л или менее, в соответствии с паспортом изготовителя прибора.

Вода для определения содержания ООУ. Используют воду высокоочищенную, соответствующую следующим требованиям:

- электропроводность: не более $1,0 \text{ мкСм} \cdot \text{см}^{-1}$ при температуре $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$;
- содержание общего органического углерода: не более 0,1 мг/л.

В зависимости от типа используемого прибора критическим параметром может быть также содержание в воде тяжелых металлов или меди, что должно быть указано в инструкции изготовителя прибора.

Подготовка посуды. Используют посуду, тщательно вымытую с помощью метода, позволяющего удалить органические вещества. Для последнего промывания используют воду для определения содержания ООУ.

Раствор сравнения. Сахарозу P , предварительно высушенную при температуре $105 \text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 3 ч, растворяют в воде для определения содержания ООУ, получая раствор, содержащий 1,19 мг/л сахарозы (0,50 мг/л углерода). **Испытуемый раствор.** Испытуемую воду собирают, исключая минимальное воздушное пространство, в воздухонепроницаемый контейнер, используя все возможные меры для предотвращения загрязнения. Испытание проводят с минимальной задержкой по времени с целью уменьшения возможного загрязнения воды от контейнера и его укупорочного материала.

Раствор для проверки пригодности системы. Готовят раствор 0,75 мг/л 1,4-бензохинона P в воде для определения содержания ООУ (0,50 мг/л углерода).

Контрольная вода для определения содержания ООУ. Используют воду для определения содержания ООУ, полученную одновременно с водой для приготовления раствора сравнения и раствора для проверки пригодности системы.

Контрольные растворы. Кроме контрольной воды для определения содержания ООУ готовят подходящие холостые растворы или другие растворы, необходимые для восстановления базовой линии или корректирования градуировки в соответствии с инструкцией изготовителя прибора; используя контрольные растворы, устанавливают ноль прибора.

Проверка пригодности системы. Проводят испытания указанных растворов и записывают отклики прибора: вода для определения содержания ООУ (r_w), раствор сравнения (r_s), раствор для проверки пригодности системы (r_{ss}). Эффективность откликов, в процентах, рассчитывают по формуле:

$$\frac{r_{ss} - r_w}{r_s - r_w} \cdot 100.$$

Система считается пригодной, если эффективность отклика прибора составляет не менее 85 % и не более 115 % от теоретического отклика.

Методика. Записывают отклик (r_u) для испытуемого раствора. Испытуемый раствор выдерживает испытание, если значение r_u не превышает значение $r_s - r_w$.

Данная методика может быть выполнена в режиме «on-line» на приборе, который соответствующим образом отградуирован и соответствует требованиям пригодности системы. Прибор должен быть установлен таким образом, чтобы обеспечить показания откликов, соответствующих испытуемой воде.

01/2013:20245

2.2.45. СВЕРХКРИТИЧЕСКАЯ ФЛЮИДНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Сверхкритическая флюидная хроматография (СФХ, SFC) – это метод хроматографического разделения, в котором подвижная фаза является флюидом,

находящимся в сверхкритическом или субкритическом состоянии. Неподвижная фаза, содержащаяся в колонке, состоит либо из тонко измельченных твердых частиц, таких как силикагель или пористый графит; химически модифицированная неподвижная фаза такая же, как и в жидкостной хроматографии, или, в случае капиллярных колонок, пленка жидкости, равномерно нанесенная на стенки колонки.

СФХ основана на механизмах адсорбции или распределения.

ПРИБОР

Прибор обычно состоит из охлаждаемой насосной системы, инжектора, хроматографической колонки, находящейся в термостате, детектора, регулятора давления и регистрирующего устройства (интегратор или самописец).

Насосная система

Насосная система необходима для поддержания постоянной скорости подвижной фазы. Колебания давления должны быть сведены к минимуму, например, путем пропускания сжатого растворителя через устройство, подавляющее пульсацию. Насосно-компрессорная система и соединительные линии должны быть устойчивы к давлению, создаваемому насосом.

Точная доставка подвижной фазы при постоянных либо изменяющихся по определенной программе условиях осуществляется системами, контролируемые микропроцессором. В случае градиентного элюирования могут быть использованы насосные системы, доставляющие растворитель (растворители) из нескольких резервуаров; смешивание растворителей может быть проведено как со стороны насоса (насосов) низкого давления, так и со стороны высокого давления.

Инжекторы

Ввод пробы может быть осуществлен непосредственно в колонку с помощью клапана.

Неподвижные фазы

Неподвижные фазы находятся в колонках, которые описаны в статьях 2.2.29. *Жидкостная хроматография* (набивные колонки) и 2.2.28. *Газовая хроматография* (капиллярные колонки). Максимальный внутренний диаметр ($\varnothing$) капиллярной колонки – 100 мкм.

Подвижные фазы

Обычно подвижной фазой является диоксид углерода, который может содержать полярный модификатор, такой как метанол, 2-пропанол или ацетонитрил. Состав, давление (плотность), температура и скорость используемой подвижной фазы могут быть как постоянными в течение всего хроматографического процесса (изократическое, изотермическое элюирование, элюирование при постоянной плотности), так и изменяться по определенной программе (градиентное элюирование модификатора, давления (плотности), температуры или скорости потока).

Детекторы

Наиболее часто используемыми детекторами являются спектрофотометры, работающие в ультрафиолетовой и видимой областях (*UV/Vis*) и пламенно-ионизационные детекторы. Кроме того, могут применяться детекторы, работа которых основана на измерении рассеяния света, ИК-спектрофотометры, катарометры или другие специальные детекторы.

МЕТОДИКА

Испытуемый раствор (растворы) и раствор (растворы) сравнения готовят так, как описано выше. Растворы не должны содержать твердых частиц.

Критерии для оценки пригодности системы были описаны в статье 2.2.46. *Хроматографические методы разделения*. В данной главе были также приведены уровни, до которых можно регулировать параметры хроматографической системы для того, чтобы она оставалась пригодной.

01/2013:20246

2.2.46. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ РАЗДЕЛЕНИЯ

Хроматографическими называют многостадийные методы разделения, в которых компоненты образца распределяются между двумя фазами – неподвижной и подвижной. Неподвижная фаза может быть твердым веществом, жидкостью, нанесенной на твердый носитель, либо гелем; она помещается в колонку, распределяется в виде тонкого слоя, пленки и т.д. Подвижная фаза может быть газом, жидкостью или сверхкритическим газом (флюидом). Разделение основано на адсорбции, распределении, ионном обмене и т.д. либо на различиях в физико-химических свойствах молекул, таких как размер, масса, объем и т.д.

Данная глава содержит определения и расчеты общих параметров и применимых ко всем хроматографическим методам требований для пригодности системы. Принципы разделения, аппаратура и методики приводятся в следующих общих статьях:

- Бумажная хроматография (2.2.26);
- Тонкослойная хроматография (2.2.27);
- Газовая хроматография (2.2.28);
- Жидкостная хроматография (2.2.29);
- Эксклюзионная хроматография (2.2.30);
- Сверхкритическая флюидная хроматография (2.2.45).

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Для установления пригодности хроматографической системы и расчета пределов в частных статьях использованы приведенные ниже определения. Ряд параметров (например, отношение сигнал/шум и разрешение) может быть рассчитан с помощью программного обеспечения, поставляемого производителем используемого оборудования. На пользователе лежит ответственность за соответствие способов расчета, используемых в программном обеспечении, требованиям Фармакопеи. В противном случае должны быть сделаны соответствующие корректировки.

Хроматограмма

Хроматограмма представляет собой графическое или иное представление отклика детектора на концентрацию веществ в элюате или другой количественной величины, используемой для измерения концентрации веществ в элюате, относительно времени или объема. Идеализированные хроматограммы представлены сочетанием гауссовских пиков и базовой линии.

Пик

Участок хроматограммы с записанным откликом детектора при элюировании из колонки одного компонента (или двух и более неразделенных компонентов).

Пик может быть охарактеризован площадью пика, или высотой пика (h) и шириной пика на половине высоты (w_h), или высотой пика (h) и шириной пика между точками перегиба (w_i). Для гауссовских пиков (рисунок 2.2.46.-1) справедливо соотношение:

$$w_h = 1,18w_i.$$

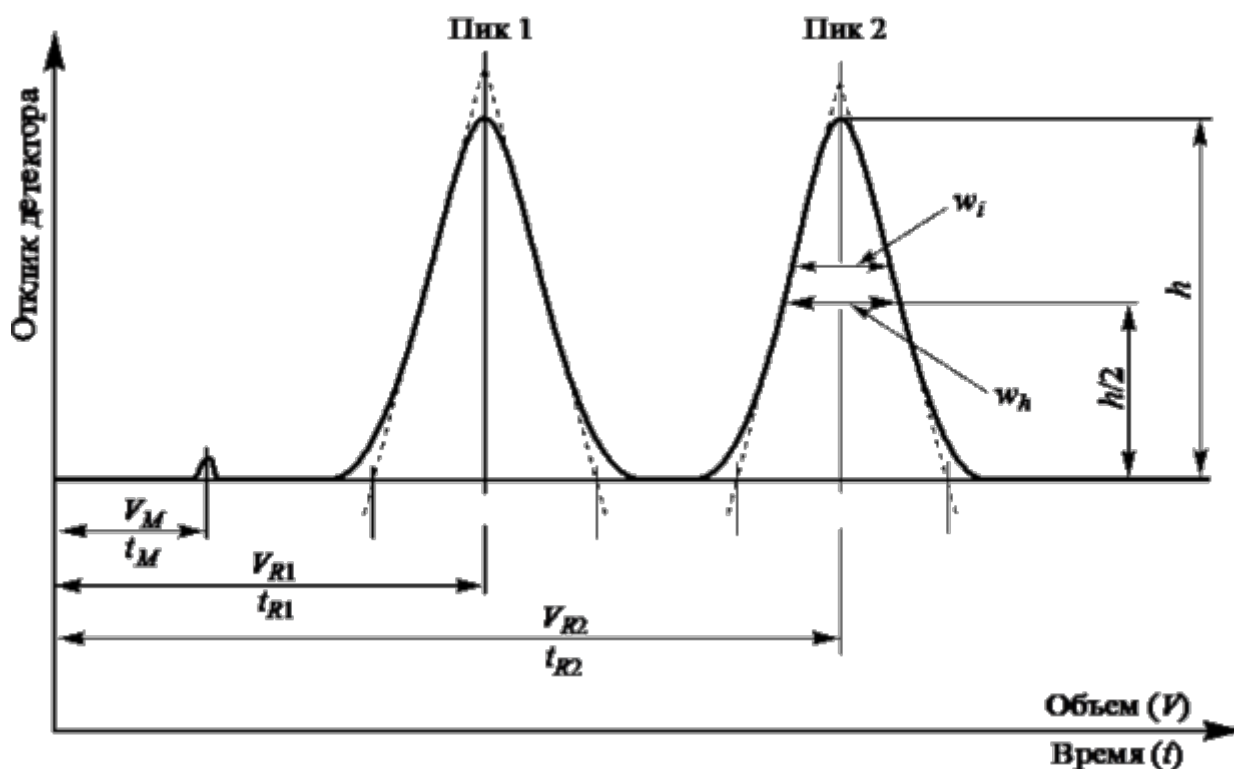


Рисунок 2.2.46.-1

Время удерживания (t_R)

Время, необходимое для элюирования компонента (рисунок 2.2.46.-1, где базовая линия – время).

Объем удерживания (V_R)

Объем подвижной фазы, необходимый для элюирования компонента. Он может быть рассчитан из времени удерживания (в минутах) и скорости подвижной фазы (F) (в миллилитрах в минуту) по формуле:

$$V_R = t_R \cdot F.$$

Мертвое время (t_M)

Время, необходимое для элюирования неудерживаемого компонента (рисунок 2.2.46.-1, где базовая линия – время). В эксклюзионной хроматографии используют символ t_0 (см. ниже).

Мертвый объем (V_M)

Объем подвижной фазы, необходимый для элюирования неудерживаемого компонента. Он может быть рассчитан из «мертвого» времени (в минутах) и скорости подвижной фазы (F) (в миллилитрах в минуту) по формуле:

$$V_M = t_M \cdot F.$$

В эксклюзионной хроматографии используют символ V_0 (см. ниже).

Фактор удерживания (k)

Фактор удерживания (также известный как концентрационный коэффициент распределения (D_m) или коэффициент емкости (k')) представляет собой соотношение:

$$k = \frac{\text{количество вещества в неподвижной фазе}}{\text{количество вещества в подвижной фазе}} = K_C \frac{V_s}{V_M},$$

где:

K_C – коэффициент распределения;

V_s – объем неподвижной фазы;

V_M – объем подвижной фазы.

Значение фактора удерживания компонента может быть определено из хроматограммы по формуле:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}.$$

Общее время подвижной фазы (t_t)

В эксклюзионной хроматографии – время удерживания компонента, молекулы которого меньше, чем размер мельчайшей поры геля (рисунок 2.2.46.-2).

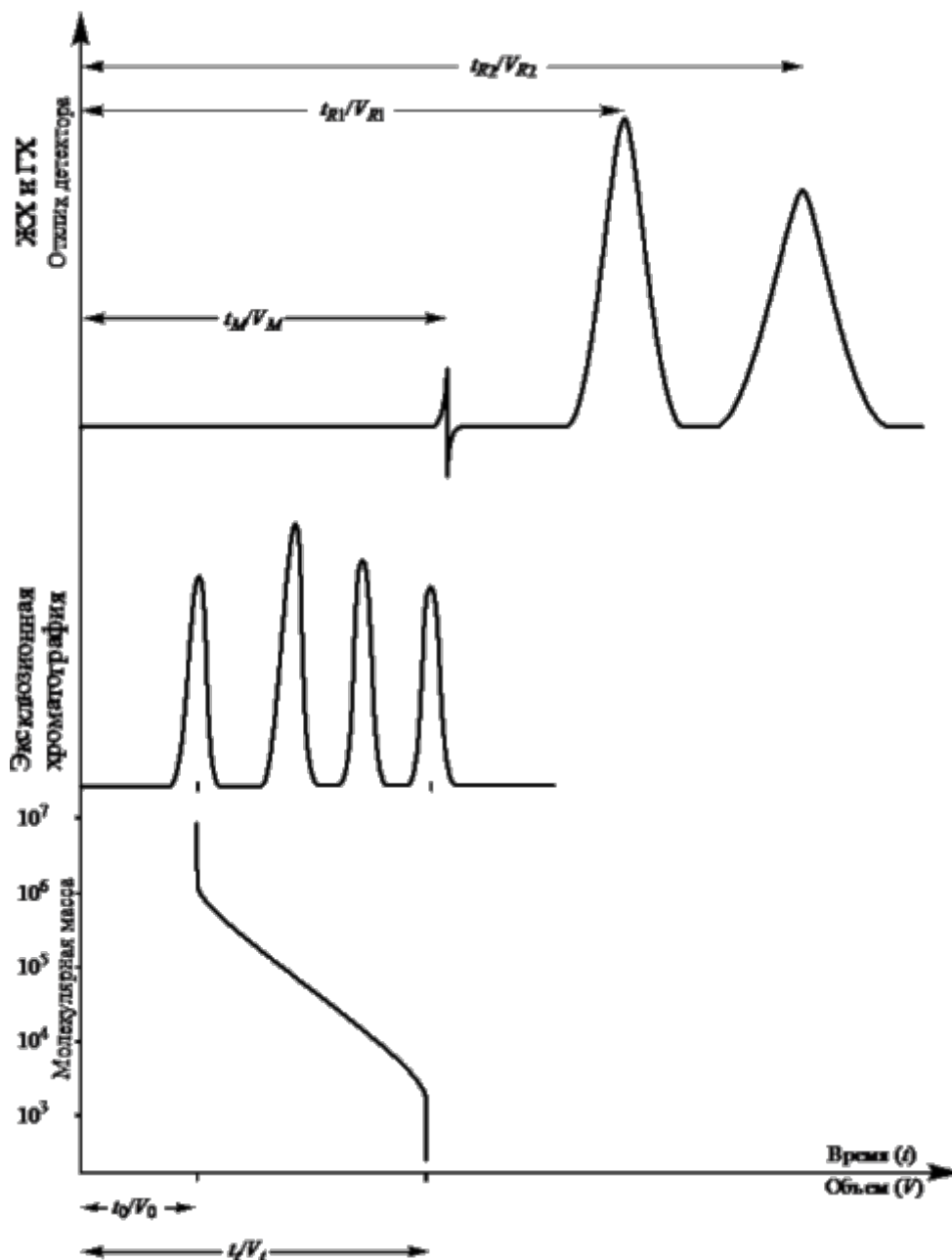


Рисунок 2.2.46.-2

Общий объем подвижной фазы (V_t)

В эксклюзионной хроматографии – объем удерживания компонента, молекулы которого меньше, чем размер мельчайшей поры геля. Он может быть рассчитан из общего времени подвижной фазы (в минутах) и скорости подвижной фазы (F) (в миллилитрах в минуту) по формуле:

$$V_t = t_t \cdot F.$$

Время удерживания неудерживаемого компонента (t_0)

В эксклюзионной хроматографии – время удерживания компонента, молекулы которого больше, чем размер наибольшей поры геля (рисунок 2.2.46.-2).

Объем удерживания неудерживаемого компонента (V_0)

В эксклюзионной хроматографии – объем удерживания компонента, молекулы которого больше, чем размер наибольшей поры геля. Он может быть рассчитан из времени удерживания неудерживаемого компонента (в минутах) и скорости подвижной фазы (F) (в миллилитрах в минуту) по формуле:

$$V_0 = t_0 \cdot F.$$

Коэффициент распределения (K_0)

В эксклюзионной хроматографии элюентные свойства компонента в определенной колонке могут быть представлены коэффициентом распределения, который рассчитывают по формуле:

$$K_0 = \frac{t_R - t_0}{t_i - t_0}.$$

Фактор подвижности (R_F)

Фактор подвижности (также известный как относительная скорость или фактор удерживания (R_f)), используемый в плоскостной хроматографии, представляет собой отношение расстояния от точки нанесения пробы до центра пятна к расстоянию, пройденному фронтом растворителя от точки нанесения пробы (рисунок 2.2.46.-3).

$$R_F = \frac{b}{a},$$

где:

b – расстояние, пройденное компонентом;

a – расстояние, пройденное фронтом растворителя.

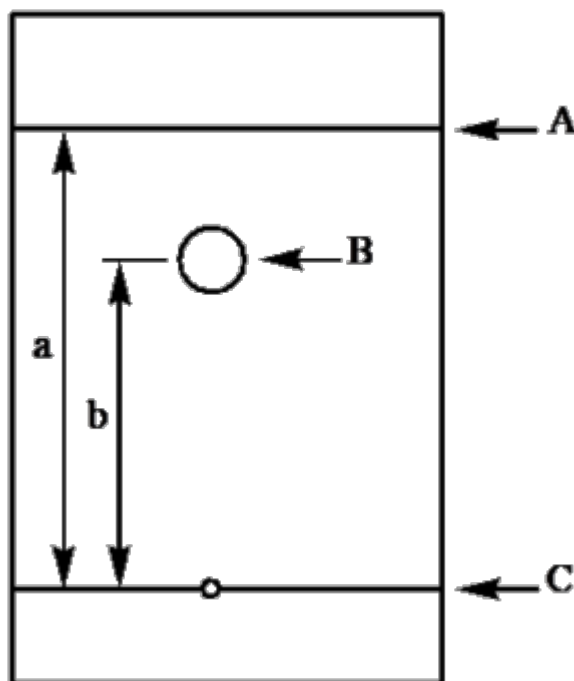


Рисунок 2.2.46.-3

А – фронт подвижной фазы; В – пятно;

C – линия нанесения пробы ([#]линия старта[#]).

Число тарелок (*N*)

Эффективность колонки в зависимости от метода может быть рассчитана как число тарелок (также известное как число теоретических тарелок) из данных, полученных в зависимости от методики как при изотермическом либо изократическом режиме, так и при режиме постоянной плотности, по формуле, в которой величины t_R и w_h должны быть выражены в одинаковых единицах:

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2,$$

где:

t_R – время удерживания пика, соответствующего компоненту;

w_h – ширина пика на половине высоты.

Число теоретических тарелок зависит как от компонента, так и от используемой колонки и ее температуры, а также от подвижной фазы и времени удерживания.

Объем градиентной задержки (*D*)

Объем градиентной задержки [#](объем формирования градиента в хроматографической системе)[#] – это объем между точками, при которых элюенты достигнут конца колонки. Он может быть определен с использованием следующей методики.

Условия хроматографирования:

– колонка: хроматографическую колонку заменяют подходящей капиллярной трубкой (например, длиной 1 м и внутренним диаметром 0,12 мм);

– подвижная фаза:

подвижная фаза А: вода *P*;

подвижная фаза В: 0,1 % (об/об) раствор ацетона *P*;

Время (мин)	Подвижная фаза А (%, об/об)	Подвижная фаза В (%, об/об)
0–20	100 → 0	0 → 100
20–30	0	100

– скорость подвижной фазы: устанавливают до получения достаточного давления (например, 2 мл/мин);

– детектор: спектрофотометрический, длина волны 265 нм.

Определяют время ($t_{0,5}$) (в минутах), при котором оптическая плотность увеличится на 50 % (рисунок 2.2.46.-4).

$$D = t_D \cdot F,$$

где:

t_D – представляет собой разницу $t_{0,5} - 0,5t_G$ (в минутах);

t_G – время градиента (20 мин);

F – скорость подвижной фазы.

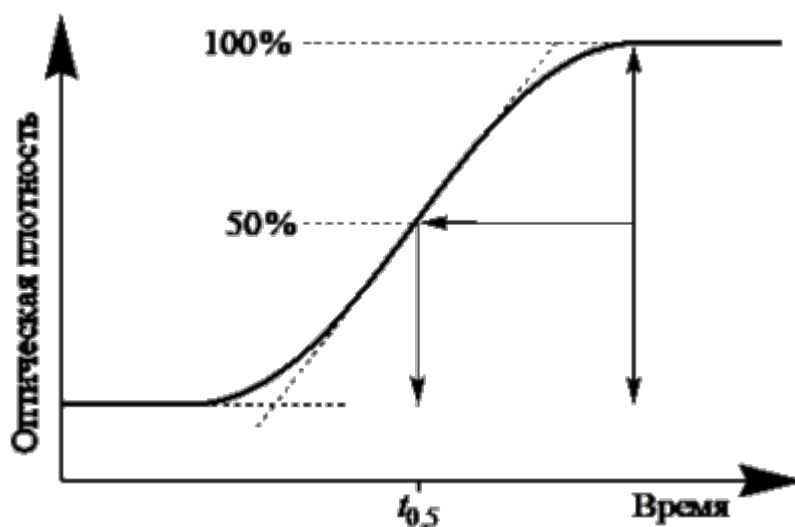


Рисунок 2.2.46.-4

Фактор асимметрии (A_s)

Фактор асимметрии пика (также известный как коэффициент или фактор симметрии) (рисунок 2.2.46.-5) рассчитывают по формуле:

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d},$$

где:

$w_{0,05}$ – ширина пика на одной двадцатой его высоты;

d – расстояние между перпендикуляром, опущенным из максимума пика, и передним краем пика на одной двадцатой высоты.

Если фактор асимметрии равен 1,0, это означает полную (идеальную) симметрию.

Если $A_s > 1,0$, это означает, что пик с размытым тылом; если $A_s < 1,0$ – пик с размытым фронтом.

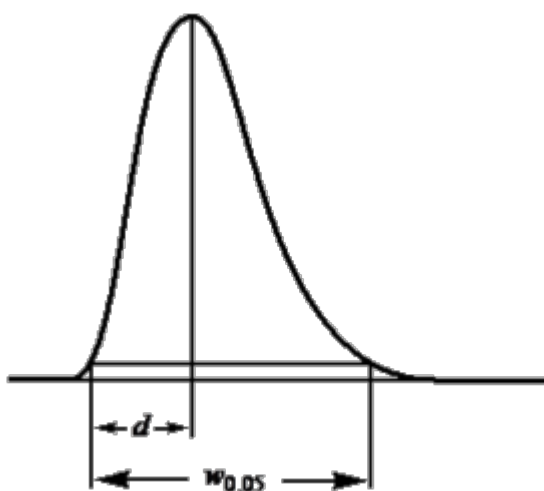


Рисунок 2.2.46.-5

Разрешение (R_s)

Разрешение между пиками двух компонентов (рисунок 2.2.46.-1) рассчитывают по формуле:

$$R_s = \frac{1,18(t_{R2} - t_{R1})}{w_{01} + w_{02}},$$

где:

$t_{R2} > t_{R1}$;

t_{R1} и t_{R2} – времена удерживания пиков;

w_{h1} и w_{h2} – ширины пиков на половине высоты.

В количественной плоскостной хроматографии с использованием денситометрии вместо времен удерживания используются пройденные расстояния, и разрешение между пиками двух компонентов рассчитывают по формуле:

$$R_s = \frac{1,18a(R_{F2} - R_{F1})}{w_{h1} + w_{h2}},$$

где:

R_{F1} и R_{F2} – факторы подвижности пиков;

w_{h1} и w_{h2} – ширина пиков на половине высоты;

a – расстояние, пройденное фронтом растворителя.

Коэффициент разделения пиков (p/v)

Коэффициент разделения не полностью разделенных пиков (или p/v -параметр) может быть использован в качестве критерия пригодности хроматографической системы при выполнении испытания на сопутствующие примеси в случае неполного разделения (не до базовой линии) двух пиков (рисунок 2.2.46.-6).

$$p/v = \frac{H_p}{H_v},$$

где:

H_p – высота меньшего пика относительно экстраполированной базовой линии;

H_v – расстояние между экстраполированной базовой линией и нижней точкой кривой, разделяющей меньший и больший пики.

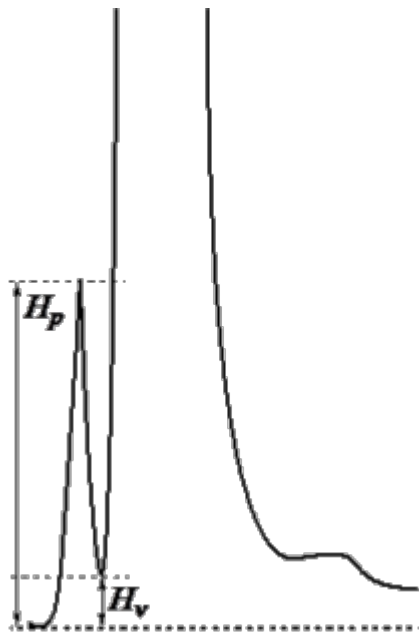


Рисунок 2.2.46.-6

Относительное удерживание (r)

Относительное удерживание (r) рассчитывают по формуле:

$$r = \frac{t_{Ri} - t_M}{t_{Rst} - t_M},$$

где:

t_{Ri} – время удерживания интересующего пика;

t_{Rst} – время удерживания пика сравнения (обычно пик, соответствующий испытуемому веществу);

t_M – мертвое время.

Неоткорректированное относительное удерживание (r_G) рассчитывают по формуле:

$$r_G = \frac{t_{Ri}}{t_{Rst}}.$$

Относительное удерживание, указанное в частных статьях, соответствует неоткорректированному относительному удерживанию, если нет других указаний.

В плоскостной хроматографии вместо t_{Rst} и t_{Ri} используются факторы подвижности R_{Fst} и R_{Fi} .

Отношение сигнал/шум (S/N)

Отношение сигнал/шум влияет на точность (прецизионность) количественного определения и рассчитывается по формуле:

$$S / N = \frac{2H}{h},$$

где:

H – высота пика (рисунок 2.2.46.-7), соответствующая рассматриваемому компоненту, на хроматограмме, полученной при использовании рекомендованного раствора сравнения, измеренная от максимума пика до экстраполированной базовой линии для сигнала, величина которого эквивалентна пятикратному превышению величины ширины пика на половине высоты;

h – размах для фонового шума (уровень шума) на хроматограмме, полученной при введении или нанесении холостой пробы, величина которого эквивалентна пятикратному превышению ширины пика на половине высоты для пика на хроматограмме, полученной при использовании рекомендованного раствора сравнения и, если возможно, расположенного на одном и том же расстоянии от места возможного обнаружения пика.

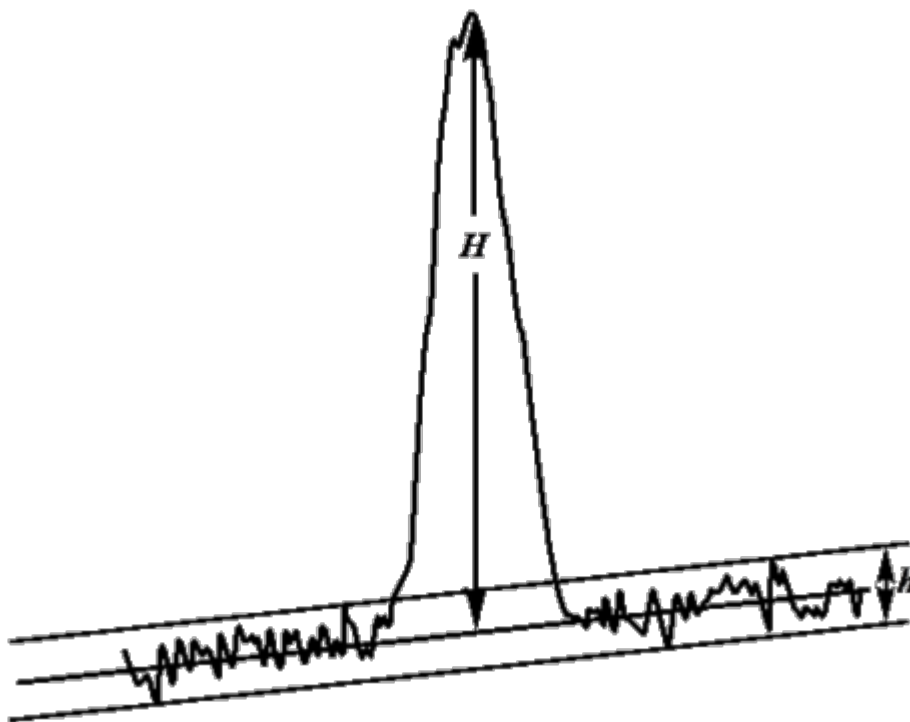


Рисунок 2.2.46.-7

Сходимость (повторяемость)

Сходимость (повторяемость) отклика выражается в виде рассчитанного процентного относительного стандартного отклонения ($s_r(\%)$) последовательных серий измерений не менее чем 3 введений или нанесений раствора сравнения и рассчитывается по формуле:

$$s_r(\%) = \frac{100}{\bar{y}} \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n-1}},$$

где:

y_i – индивидуальные значения площади пика, высоты пика или отношения площадей в методе внутреннего стандарта;

$\bar{y}$ – среднее индивидуальных значений;

n – число индивидуальных значений.

ПРИГОДНОСТЬ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

Используемое оборудование (в том числе отдельные компоненты) должно быть пригодным и способным выдерживать требования к пригодности системы, необходимые для проведения испытания или количественного определения.

Испытания на определение пригодности системы являются неотъемлемой частью методики и используются для того, чтобы удостовериться в адекватном функционировании хроматографической системы. Для оценки работы колонки обычно используются следующие параметры: эффективность, фактор удерживания (концентрационный коэффициент распределения), разрешение, относительное удерживание и фактор асимметрии.

На хроматографическое поведение могут влиять следующие факторы:

- состав, ионная сила, температура и pH подвижной фазы;
- скорость потока, размеры колонки, температура колонки и давление;
- характеристика неподвижной фазы: тип хроматографической основы (может представлять собой частицы либо быть монолитной), размер частиц или макропор, пористость, удельная площадь поверхности;
- химическая модификация поверхности неподвижной фазы (обращенно-фазовая и другие модификации), степень химической модификации (блокирование концевых групп (эндкепирование), число атомов углерода и т.д.).

При отсутствии других указаний должны быть соблюдены следующие требования и любые другие дополнительные требования, описанные в частной статье.

– В испытании на сопутствующие примеси и при количественном определении величина фактора асимметрии пика, полученного на хроматограмме раствора сравнения, используемого для количественных расчетов, должна находиться в пределах от 0,8 до 1,5, если в частной статье нет иных указаний.

– При количественном определении фармацевтической субстанции, при количественном содержании 100 % для чистой субстанции, максимально допустимое относительное стандартное отклонение ($s_r(\%)$) для установленных пределов рассчитывают из серии введений раствора сравнения по формуле:

$$s_r(\%)_{\max} = \frac{KB\sqrt{n}}{t_{90\%,n-1}},$$

где:

$$s_r(\%)_{\max} = \frac{KB\sqrt{n}}{t_{90\%,n-1}}, \text{ в котором } \frac{0,6}{\sqrt{2}} -$$

K – константа (0,349), полученная из уравнения требуемое значение относительного стандартного отклонения (в процентах) при 6 повторных вводах пробы для $B = 1,0$;

B – верхний предел количественного содержания, приведенный в определении частной статьи минус 100 %;

n – число повторных вводов пробы для раствора сравнения ($3 \leq n \leq 6$);

$t_{90\%,n-1}$ – коэффициент Стьюдента t для 90 %-ной доверительной вероятности (двусторонняя критическая область) с числом степеней свободы $n - 1$.

Если иного не указано в частной статье, максимально допустимое относительное стандартное отклонение не должно превышать величин, приведенных в таблице 2.2.46.-1. Данное требование не распространяется на испытания на сопутствующие примеси.

– в испытании на сопутствующие примеси предел определения пика (соответствующий отношению сигнал/шум равному 10) равен или меньше, чем неучитываемый предел.

Таблица 2.2.46.-1.

Требования к сходимости (повторяемости)

	Число отдельных вводов пробы			
	3	4	5	6
B (%)	Максимально допустимое относительное стандартное отклонение			
2,0	0,41	0,59	0,73	0,85
2,5	0,52	0,74	0,92	1,06
3,0	0,62	0,89	1,10	1,27

Соответствие критериям пригодности системы является необходимым в течение всего процесса хроматографирования. В зависимости от различных факторов, таких как частота использования методики, опыта и знания хроматографической системы, аналитик подбирает подходящую схему верификации для их контроля.

РЕГУЛИРОВАНИЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ УСЛОВИЙ

Ниже приведены интервалы, в пределах которых могут изменяться различные параметры хроматографических испытаний без принципиального изменения методики, для того, чтобы удовлетворять критериям пригодности хроматографической системы. Регулирование условий хроматографирования при градиентном элюировании более критичны, чем при изократическом элюировании, и могут привести к смещению пиков на различных уровнях градиента, что в свою очередь приведет к неверному установлению

пиков, маскированию пиков или к такому смещению, при котором элюирование будет происходить вне предписанного времени элюирования. Другие, не описанные ниже изменения, требуют ревалидации методики. Описанные хроматографические условия были валидированы в процессе подготовки этой статьи.

Проверка пригодности хроматографической системы включена для того, чтобы гарантировать требуемое разделение для удовлетворительного проведения испытания или количественного определения. Неподвижные фазы описаны только в общем виде, так как существует огромное количество их доступных коммерческих разновидностей, отличающихся по хроматографическому поведению, и для того, чтобы достигнуть предписанных требований пригодности системы, в ряде случаев приходится вносить некоторые изменения в хроматографические условия. В частности, в методиках обращенно-фазовой хроматографии регулирование условий хроматографирования не всегда приводит к удовлетворительному разделению. В этом случае может возникнуть необходимость заменить одну колонку другой однотипной колонкой (например, силикагель октадецилсилильный), обеспечивающей желаемое хроматографическое поведение. Информацию о хроматографических колонках, использованных для разработки частных статей, описанных в Европейской Фармакопее, можно найти на сайте *EDQM* (www.edqm.eu) в разделе «*Knowledge database*».

Регулирование критических параметров для гарантии пригодности системы четко указывается в частной статье.

Тонкослойная и бумажная хроматография

Состав подвижной фазы: количество растворителя, содержание которого в смеси минимально, может изменяться в пределах $\pm 30\%$ (относительное содержание) или $\pm 2\%$ (абсолютное содержание), в зависимости от того, что больше. Например, для растворителя, содержание которого в смеси минимально и составляет 10% , относительное изменение в 30% допускает предельные значения $7\text{--}13\%$, а абсолютное изменение в 2% допускает предельные значения $8\text{--}12\%$, т.е. изменение количества растворителя по относительному содержанию больше; для растворителя, содержание которого в смеси минимально и составляет 5% , относительное изменение в 30% допускает предельные значения $3,5\text{--}6,5\%$, а абсолютное изменение в 2% допускает предельные значения $3\text{--}7\%$, т.е. изменение количества растворителя по абсолютному содержанию больше. Абсолютное содержание других компонентов не может быть изменено более чем на 10% .

pH водного компонента подвижной фазы: $\pm 0,2$ pH при отсутствии других указаний в частной статье, или $\pm 1,0$ pH в случае исследования неионизированных веществ.

Концентрация солей в буферном компоненте подвижной фазы: $\pm 10\%$.

Наносимый объем пробы: $10\text{--}20\%$ от требуемого объема при использовании пластинок с мелким размером частиц ($2\text{--}10$ мкм).

Жидкостная хроматография: изократическое элюирование

Состав подвижной фазы: количество растворителя, содержание которого в смеси минимально, может изменяться в пределах $\pm 30\%$ (относительное содержание) или $\pm 2\%$ (абсолютное содержание), в зависимости от того, что больше (см. пример выше). Абсолютное содержание других компонентов не может быть изменено более чем на 10% .

pH водного компонента подвижной фазы: $\pm 0,2$ pH при отсутствии других указаний в частной статье, или $\pm 1,0$ pH в случае исследования неионизированных веществ.

Концентрация солей в буферном компоненте подвижной фазы: $\pm 10\%$.

Скорость подвижной фазы: $\pm 50\%$; большие отклонения допустимы в случае изменения размеров колонки (см. формулу ниже).

Характеристики колонки:

Неподвижная фаза:

– не допускаются изменения в названии химического модификатора неподвижной фазы (т.е. не допускается замена C_{18} на C_8);

– *размер частиц:* допускается уменьшение размера на 50% , увеличение не допускается.

Размер колонки:

– *длина:* $\pm 70\%$;

– *внутренний диаметр:* $\pm 25\%$.

Если изменяется размер колонки, то требуемая скорость подвижной фазы может быть определена по формуле:

$$F_2 = F_1 \frac{l_2 d_2^2}{l_1 d_1^2},$$

где:

F_1 – скорость подвижной фазы, указанная в частной статье, в миллилитрах в минуту;

F_2 – измененная скорость, в миллилитрах в минуту;

l_1 – длина колонки, указанная в частной статье, в миллиметрах;

l_2 – длина используемой колонки, в миллиметрах;

d_1 – внутренний диаметр колонки, указанный в частной статье, в миллиметрах;

d_2 – внутренний диаметр используемой колонки, в миллиметрах.

Температура: ± 10 °C при отсутствии других указаний в частной статье.

Длина волны детектора: изменения не допускаются.

Объем вводимой пробы: может быть уменьшен при условии, что используемое детектирование и сходимость пика (пиков) остаются удовлетворительными; увеличение не допускается.

Жидкостная хроматография: градиентное элюирование

Регулирование хроматографических условий при градиентном элюировании требует большей осторожности, чем при изократическом элюировании.

Состав подвижной фазы/градиентного элюирования: минимальные изменения состава подвижной фазы и градиента допустимы при выполнении следующих условий:

- соответствие требованиям пригодности хроматографической системы;
- отклонение от указанного в частной статье времени удерживания основного пика (или пиков) не должно превышать ± 15 %;
- элюирующая сила конечного состава подвижной фазы должна быть не ниже, чем у предписанного состава.

В случае, если не удастся достичь критериев пригодности хроматографической системы, зачастую рассчитывают объем задержки или меняют хроматографическую колонку.

Объем задержки. Конфигурация используемого оборудования может значительно изменить разрешение, время удерживания или относительные удерживания, описанные в методике. К таким эффектам может привести избыточный объем задержки. В частных статьях обычно указывается изократическая стадия, предшествующая началу градиентного элюирования, поэтому различие в объеме задержки для системы, используемой при разработке частной статьи, и для фактически используемой системы можно откорректировать изменением временных точек программы градиента. Таким образом, должна проводиться адаптация продолжительности изократической стадии в зависимости от используемого аналитического оборудования. Если в частной статье приведен объем задержки, установленный при ее разработке, то временные точки (t , мин), указанные в таблице градиента, могут быть заменены на адаптированные временные точки (t_c , мин), рассчитанные по формуле:

$$t_c = t - \frac{(D - D_0)}{F},$$

где:

D – объем задержки, в миллилитрах;

D_0 – объем задержки, использованный при разработке частной статьи, в миллилитрах;

F – скорость подвижной фазы, в миллилитрах в минуту.

Изократическая стадия, введенная для этих целей, может быть удалена при наличии данных по валидации методики без указанной стадии.

pH водного компонента подвижной фазы: изменения не допускаются.

Концентрация солей в буферном компоненте подвижной фазы: изменения не допускаются.

Скорость подвижной фазы: отклонения допустимы в случае изменения размеров колонки (см. формулу ниже).

Характеристики колонки:

Неподвижная фаза:

– не допускаются изменения в названии химического модификатора неподвижной фазы (т.е. не допускается замена C18 на C8);

– *размер частиц:* изменения не допускаются.

Размер колонки:

– *длина:* $\pm 70\%$;

– *внутренний диаметр:* $\pm 25\%$.

Если изменяется размер колонки, то требуемая скорость подвижной фазы может быть определена по формуле:

$$F_2 = F_1 \frac{l_2 d_2^2}{l_1 d_1^2},$$

где:

F_1 – скорость подвижной фазы, указанная в частной статье, в миллилитрах в минуту;

F_2 – измененная скорость, в миллилитрах в минуту;

l_1 – длина колонки, указанная в частной статье, в миллиметрах;

l_2 – длина используемой колонки, в миллиметрах;

d_1 – внутренний диаметр колонки, указанный в частной статье, в миллиметрах;

d_2 – внутренний диаметр используемой колонки, в миллиметрах.

Температура: $\pm 5^\circ\text{C}$ при отсутствии других указаний в частной статье.

Длина волны детектора: изменения не допускаются.

Объем вводимой пробы: может быть уменьшен при условии, что используемое детектирование и сходимость пика (пиков) остаются удовлетворительными; увеличение не допускается.

Газовая хроматография

Характеристики колонки:

Неподвижная фаза:

– *размер частиц:* допускается уменьшение размера на 50 %, увеличение не допускается (набивные колонки);

– *толщина слоя:* от -50% до $+100\%$ (капиллярные колонки).

Размер колонки:

– *длина:* $\pm 70\%$;

– *внутренний диаметр:* $\pm 50\%$.

Скорость потока: $\pm 50\%$.

Температура: $\pm 10\%$.

Вводимый объем пробы: может быть изменен при условии, что используемое детектирование и повторяемость остаются удовлетворительными.

Сверхкритическая флюидная хроматография

Состав подвижной фазы: для набивных колонок количество растворителя, содержание которого в смеси минимально, может изменяться в пределах $\pm 30\%$ (относительное содержание) или $\pm 2\%$ (абсолютное содержание), в зависимости от того, что больше. Для капиллярных колонок изменения не допускаются.

Длина волны детектора: изменения не допускаются.

Характеристики колонки:

Неподвижная фаза:

– *размер частиц:* допускается уменьшение размера на 50 %, увеличение не допускается (набивные колонки);

Размер колонки:

– *длина:* $\pm 70\%$;

– *внутренний диаметр*:
 ± 25 % (набивные колонки);
 ± 50 % (капиллярные колонки).
Скорость потока: ± 50 %.
Температура: ± 5 °C.

Объем вводимый пробы: может быть уменьшен при условии, что используемое детектирование и повторяемость остаются удовлетворительными; увеличение не допускается.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

При количественном определении не учитывают пики растворителей и реактивов, а также пики подвижной фазы и матрикса испытуемого образца.

– *Чувствительность детектора*. Чувствительность детектора определяется его выходным сигналом на концентрацию или единицу массы вещества, попадающего на детектор. Относительный фактор отклика детектора, или *коэффициент отклика*, выражает чувствительность детектора к данному веществу относительно стандартного вещества. *Поправочный коэффициент* обратно пропорционален коэффициенту отклика.

– *Метод внешнего стандарта*. Концентрацию анализируемого компонента (компонентов) определяют путем сравнения отклика (откликов) детектора (пика (пиков)), полученного для испытуемого раствора, и отклика (откликов) детектора (пика (пиков)), полученного для раствора сравнения.

– *Метод внутреннего стандарта*. В испытуемый раствор и раствор сравнения вводят одинаковые количества компонента (внутреннего стандарта), который разделяется с исследуемым веществом. Внутренний стандарт не должен взаимодействовать с исследуемым веществом, должен быть стабильным и не содержать примесей со временем удерживания, соответствующим исследуемому веществу. Концентрацию исследуемого вещества определяют путем сравнения отношения площадей или высот пиков, соответствующих исследуемому веществу и внутреннему стандарту для испытуемого раствора и отношения площадей или высот пиков, соответствующих исследуемому веществу и внутреннему стандарту для раствора сравнения.

– *Методика нормализации*. Процентное содержание компонента исследуемого вещества рассчитывают путем определения площади соответствующего пика в процентах от общей площади всех пиков, исключая пики, соответствующие растворителям, реактивам, пикам подвижной фазы и матрикса испытуемого образца, а также пики, содержание которых равно или ниже неучитываемого предела.

– *Методика градуировки*. Определяют связь между измеренным или рассчитанным сигналом (y) и количеством (концентрацией, массой и т.д.) исследуемого вещества (x) и рассчитывают уравнение градуировочной функции. Аналитические результаты рассчитывают из измеренного или рассчитанного сигнала с помощью обратной функции.

В испытаниях на сопутствующие примеси с применением, как метода внешнего стандарта с использованием разведенного испытуемого раствора, так и методики нормализации, используют поправочные коэффициенты, приведенные в частной статье (т.е. когда коэффициент отклика выходит за рамки 0,8–1,2).

Когда в испытании на сопутствующие примеси указывается сумма примесей или проводится количественное определение отдельной примеси, очень важно выбрать соответствующие настройки для предела определения и подходящие условия для интегрирования площадей пиков. В таких испытаниях *неучитываемый предел*, т.е. предел, при котором и ниже которого пики не учитываются, обычно составляет 0,05 %. Таким образом, предел определения в системе обработки данных должен соответствовать не менее чем половине значения неучитываемого предела.

Интегрирование площади пика любой примеси, которая не полностью разделяется с основным пиком, лучше всего проводить экстраполяцией по нижним точкам пика (по касательной).

2.2.47. КАПИЛЛЯРНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ

Капиллярный электрофорез – это физический метод анализа, основанный на миграции внутри капилляра заряженных аналитов, растворенных в растворе электролита, под влиянием постоянного электрического поля.

Скорость миграции аналита под влиянием электрического поля с напряженностью E определяется электрофоретической подвижностью аналита и электроосмотической подвижностью буферного раствора внутри капилляра. Электрофоретическая подвижность вещества (μ_{ep}) зависит от его свойств (электрический заряд, размер и форма молекул) и от свойств буферного раствора, в котором происходит процесс миграции (тип и ионная сила электролита, значение pH, вязкость и наличие добавок). Электрофоретическая скорость (v_{ep}) вещества, частицы которого принимаются за сферические, описывается уравнением:

$$v_{ep} = \mu_{ep} \cdot E = \left(\frac{q}{6\pi r \eta} \right) \cdot \left(\frac{V}{L} \right),$$

где:

q – эффективный заряд вещества;

r – Стоксовский радиус частиц вещества;

η – вязкость раствора электролита;

V – приложенное напряжение;

L – общая длина капилляра.

При помещении капилляра, заполненного буферным раствором, в электрическое поле внутри капилляра начинается перемещение растворителя, называемое электроосмотическим потоком. Скорость электроосмотического потока зависит от электроосмотической подвижности (μ_{eo}), которая, в свою очередь, зависит от плотности заряда на внутренней стенке капилляра и свойств буферного раствора. Электроосмотическая скорость (v_{eo}) описывается уравнением:

$$v_{eo} = \mu_{eo} \cdot E = \left(\frac{\epsilon \zeta}{\eta} \right) \cdot \left(\frac{V}{L} \right),$$

где:

ϵ – диэлектрическая постоянная буферного раствора;

ζ – дзета-потенциал поверхности капилляра.

Скорость вещества (v) определяется как:

$$v = v_{ep} + v_{eo}.$$

В зависимости от заряда вещества электрофоретическая подвижность аналита и электроосмотическая подвижность могут быть направлены одинаково или противоположно. В условиях нормального капиллярного электрофореза анионы перемещаются в направлении, противоположном направлению электроосмотического потока, а их скорости меньше электроосмотической скорости. Катионы мигрируют в направлении, совпадающем с направлением электроосмотического потока, а их скорости превышают электроосмотическую скорость. В условиях, когда электроосмотическая скорость превышает электрофоретическую, катионы и анионы могут быть разделены в течение одного анализа.

Время (t), необходимое веществу для миграции на расстояние (l) от конца капилляра, в который вводится вещество, до точки детекции (эффективная длина капилляра), определяется уравнением:

$$t = \frac{l}{v_{ep} + v_{eo}} = \frac{l \cdot L}{(\mu_{ep} + \mu_{eo}) \cdot V}.$$

В общем, при значении pH более 3 капилляры с немодифицированной поверхностью, изготовленные из плавленого кварца, имеют отрицательный заряд, обусловленный ионизацией силанольных групп, расположенных на внутренней стенке капилляра. Соответственно, электроосмотический поток направлен от анода к катоду. Если необходимо получить хорошую воспроизводимость скорости миграции веществ, электроосмотический поток должен оставаться постоянным. В некоторых случаях требуется уменьшить или устранить электроосмотический поток путем модификации внутренней стенки капилляра или изменения концентрации, состава и/или pH буферного раствора.

После введения испытуемого образца в капилляр каждый ион аналита, входящего в состав пробы, мигрирует в среде фонового электролита согласно своей электрофоретической подвижности как независимая зона. Дисперсия зоны, представляющая собой расширение полосы каждого вещества, является следствием различных явлений. При идеальных условиях вклад в процесс расширения зоны вещества вносит только молекулярная диффузия вещества вдоль капилляра (продольная диффузия). В этом идеальном случае эффективность зоны, выражаемая как число теоретических тарелок (N), определяется как:

$$N = \frac{(\mu_{ep} + \mu_{eo}) \cdot V \cdot l}{2 \cdot D \cdot L},$$

где:

D – коэффициент молекулярной диффузии вещества в буферном растворе.

На практике значительный вклад в дисперсию полосы вносят процессы тепловой конвекции, адсорбции образца на стенках капилляра, а также неодинаковая проводимость между образцом и буферным раствором, длина устройства для ввода пробы, размер ячейки детектора и расположение емкостей с буферными растворами на разных уровнях.

Разделение двух полос (выражаемое как разрешение, R_s) может быть достигнуто при изменении электрофоретической подвижности аналитов либо электроосмотической подвижности, а также при увеличении эффективности полосы для каждого аналита, согласно уравнению:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}(\mu_{epb} - \mu_{epa})}{4(\bar{\mu}_{ep} + \mu_{eo})},$$

где:

μ_{epa} и μ_{epb} – электрофоретические подвижности двух разделяемых аналитов;

$\bar{\mu}_{ep}$ – средняя электрофоретическая подвижность двух аналитов $\bar{\mu}_{ep} = \frac{1}{2}(\mu_{epb} + \mu_{epa})$.

ПРИБОР

Прибор для капиллярного электрофореза состоит из:

- управляемого высоковольтного источника постоянного тока;
- двух резервуаров с буферными растворами, расположенных на одном и том же уровне и содержащих предписанные анодный и катодный растворы;
- двух электродов (катода и анода), погруженных в резервуары с буферными растворами и соединенных с источником тока;

- капилляра, в котором проводится разделение (обычно изготовленного из плавленого кварца); при использовании некоторых типов детекторов капилляр имеет оптическое окошко, расположенное на уровне детектора; концы капилляра помещены в резервуары с буферными растворами; капилляр заполнен раствором, указанным в частной статье;
- подходящей системы ввода пробы;
- детектора, способного контролировать количество определяемых веществ, проходящих через разделяющий сегмент капилляра в течение определенного времени; детектирование обычно основано на абсорбционной спектрофотометрии (в ультрафиолетовой и видимой областях) или флуориметрии, в ряде случаев может быть использовано также кондуктометрическое, амперометрическое или масс-спектрометрическое детектирование; альтернативным способом детектирования веществ, которые не поглощают УФ-излучение и не флуоресцируют, является не прямое детектирование;
- для получения хорошо воспроизводимых результатов разделения рекомендуется использовать термостат, способный поддерживать постоянную температуру внутри капилляра;
- устройства записи и подходящего интегратора или компьютера.

Описание процесса ввода пробы и его автоматизация являются критическими факторами для точного количественного анализа. Ввод пробы может быть основан на использовании силы тяжести, давления, вакуума и электрокинетических сил. Количество каждого компонента образца, введенного электрокинетически, зависит от его электрокинетической подвижности, что приводит к возможным неравным условиям для разных веществ при использовании данного режима ввода пробы.

Используют капилляр, буферные растворы, способ пробоподготовки и создания условий анализа, раствор пробы и условия миграции, указанные в частной статье для испытуемого образца. Применяемый раствор электролита фильтруют для удаления твердых частиц и дегазируют для предотвращения образования пузырьков, мешающих работе детектора и созданию электрического контакта в капилляре во время процесса разделения. Для обеспечения воспроизводимых значений времени миграции веществ для каждой аналитической методики должна быть разработана методика тщательной промывки системы.

КАПИЛЛЯРНЫЙ ЗОННЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

ПРИНЦИП

В капиллярном зонном электрофореze аналиты разделяются в капилляре, содержащем только буферный раствор без антиконвективной среды. В данном методе разделение происходит вследствие того, что различные компоненты образца мигрируют с различной скоростью в виде отдельных полос. Скорость перемещения каждой полосы зависит от электрофоретической подвижности вещества и электроосмотического потока в капилляре (см. Общие принципы). Для улучшения разделения веществ, адсорбирующихся на кварцевой поверхности, могут быть использованы капилляры с модифицированной поверхностью.

При использовании данной разновидности капиллярного электрофореza может быть осуществлен анализ как малых ($M_r < 2000$), так и больших молекул ($2000 < M_r < 100\,000$). Благодаря высокой эффективности зонного капиллярного электрофореza в свободном растворе может быть проведено разделение молекул, имеющих очень незначительные различия в величинах отношений заряда к массе. При добавлении к разделяющему буферному раствору хиральных селекторов можно разделять хиральные соединения.

ОПТИМИЗАЦИЯ

Оптимизация разделения является комплексным процессом, в котором основную роль могут играть несколько параметров разделения. Основными факторами, которые следует принимать во внимание при разработке методик разделения, являются инструментальные параметры, а также параметры раствора электролита.

Инструментальные параметры

Напряжение. При оптимизации прикладываемого напряжения и температуры капилляра важно учитывать нагрев, возникающий при воздействии электрического тока. Время разделения обратно пропорционально приложенному напряжению. Однако увеличение напряжения может вызвать избыточное выделение тепла, повышение температуры и, как результат, образование градиентов вязкости в буферном растворе, находящемся в капилляре. Данный эффект приводит к расширению полосы и уменьшению разрешения.

Полярность. Полярность электродов может быть нормальной (анод на входе и катод на выходе), электроосмотический поток при этом перемещается по направлению к катоду. В случае обращенной полярности электродов электроосмотический поток направлен от выхода из капилляра, и только заряженные аналиты с электрофоретическими подвижностями, превышающими величину электрофоретического потока, попадают к выходу.

Температура. Температура влияет, главным образом, на вязкость и электрическую проводимость и, как следствие, на скорость миграции. В некоторых случаях увеличение температуры капилляра может вызвать конформационные изменения в молекулах белков, что изменяет их времена миграции и эффективность разделения.

Капилляр. Размеры капилляра (длина и внутренний диаметр) влияют на время анализа, эффективность разделения и загрузочную емкость. Увеличение как эффективной, так и общей длины капилляра может ослабить электрическое поле (в случае работы при постоянном напряжении), что приводит к увеличению времени миграции. Для определенного буферного раствора и электрического поля тепловая конвекция и, следовательно, расширение полос образца зависит от величины внутреннего диаметра капилляра. Кроме этого, величина внутреннего диаметра капилляра влияет на предел обнаружения, зависящий от объема введенной пробы и используемого детектора.

Поскольку адсорбция компонентов образца на стенке капилляра влияет на эффективность, при разработке методики разделения должны быть предложены способы предотвращения таких взаимодействий. В некоторых случаях, касающихся белков, были предложены способы, позволяющие избежать адсорбции на стенке капилляра. Некоторые из таких способов (использование экстремальных значений pH и адсорбция положительно заряженных буферных добавок) для предотвращения адсорбции белков требуют лишь изменения состава буферной смеси. В других способах внутренняя стенка капилляра покрывается полимером, ковалентно связанным с поверхностью, что предотвращает взаимодействия между белками и отрицательно заряженной поверхностью кварца. Для этих целей выпускаются готовые к использованию капилляры с покрытиями, состоящими из нейтральных гидрофильных, катионных или анионных полимеров.

Параметры раствора электролита

Тип и концентрация буферного раствора. Буферные растворы, подходящие для капиллярного электрофореза, имеют соответствующую буферную емкость в выбранном диапазоне pH и низкую подвижность для уменьшения образования тока.

Подбор соответствующей подвижности буферного иона по отношению к подвижности испытуемого вещества важен для уменьшения возможного изменения полосы. Тип растворителя, использованного для растворения определяемого вещества, также важен для достижения фокусирования вещества на колонке, что увеличивает эффективность разделения и улучшает детектирование.

Увеличение концентрации буферного раствора (для данного значения pH) уменьшает электроосмотический поток и скорость вещества.

Значение pH буферного раствора. Значение pH буферного раствора может влиять на разделение вследствие изменения заряда аналита или добавок, а также электроосмотического потока. При разделении белков и пептидов изменение pH буферного раствора от значения, превышающего изоэлектрическую точку (pI), до значения, которое меньше ее, изменяет суммарный отрицательный заряд вещества на положительный. Увеличение pH буферного раствора обычно увеличивает электроосмотический поток.

Органические растворители. К водным буферным растворам для увеличения растворимости веществ, а также (или) для изменения степени ионизации компонентов образца могут быть добавлены органические модификаторы (метанол, ацетонитрил и

другие). Добавление таких органических модификаторов к буферному раствору обычно вызывает уменьшение электроосмотического потока.

Добавки для хиральных разделений. Для разделения оптических изомеров к разделяющему буферному раствору добавляют хиральный селектор. Наиболее часто используемыми хиральными селекторами являются циклодекстрины, но кроме этого могут быть использованы краун-эфиры, полисахариды и белки. Поскольку хиральное распознавание управляется различными взаимодействиями между хиральным селектором и каждым из энантиомеров, разрешение, достигаемое для хиральных соединений, зависит, главным образом, от типа использованного хирального селектора. В этом отношении при разработке методик определенных разделений может оказаться полезным использование циклодекстринов с различным размером полостей (α -, β - или γ -циклодекстринов) либо модифицированных циклодекстринов с нейтральными (метил-, этил-, гидроксипропил- и другие) или способными к ионизации (аминометил-, карбоксиметил-, сульфобутиловые эфиры и другие) группами. При использовании модифицированных циклодекстринов следует принимать во внимание различия в степени замещения между разными партиями данных веществ, поскольку это может оказывать влияние на селективность. Другими факторами, контролирующими разрешение при хиральных separations, являются концентрация хирального селектора, состав и значение pH буферного раствора, а также температура. Достигнутую величину разрешения также может изменять использование органических добавок, таких как метанол или мочевины.

КАПИЛЛЯРНЫЙ ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

ПРИНЦИП

В капиллярном гель-электрофорезе разделение происходит внутри капилляра, заполненного гелем, который действует как молекулярное сито. Поскольку более малые молекулы легче проникают в структуру геля и мигрируют быстрее, чем большие, разделение молекул с близкими величинами отношения заряда к массе происходит в соответствии с их размерами. Таким образом, методом капиллярного гель-электрофореза согласно величинам молекулярных масс могут быть разделены различные биологические макромолекулы (например, белки и фрагменты ДНК), часто имеющие близкие величины отношения заряда к массе.

ХАРАКТЕРИСТИКИ ГЕЛЕЙ

В капиллярном электрофорезе используют гели двух типов: химически модифицированные и динамически модифицированные. Химически модифицированные гели, такие как поперечно-сшитый полиакриламид, получают полимеризацией мономеров внутри капилляра. Они обычно химически связаны с поверхностью плавленого кварца и не могут быть удалены без разрушения капилляра. Если гели используются для анализа белков, разделяющий буфер обычно содержит натрия додецилсульфат и пробы перед вводом денатурируют нагреванием в смеси натрия додецилсульфата и 2-меркаптоэтанола или дитиотреитола. При использовании не восстанавливающих условий (в случае анализа интактного антигена) 2-меркаптоэтанол и дитиотреитол не применяют. Разделение с помощью поперечно-сшитых гелей может быть улучшено при изменении буферного раствора, используемого при разделении (как указано в разделе, посвященном капиллярному зонному электрофорезу), и контроле пористости геля во время его получения. Для поперечно-сшитых полиакриламидных гелей пористость может быть модифицирована путем изменения концентрации акриламида и/или пропорции сшивающего реагента. Как правило, уменьшение пористости геля приводит к уменьшению подвижности разделяемых веществ. Вследствие жесткости подобных гелей может быть использован только электрокинетический ввод проб.

Динамически модифицированные гели представляют собой гидрофильные полимеры, такие как линейный полиакриламид, производные целлюлозы, декстран и другие, которые могут растворяться в водных буферных растворах, используемых при разделении, образуя разделяющую среду, которая также действует как молекулярное сито. Такие разделяющие среды получить легче, чем поперечно-сшитые полимеры. Они могут быть приготовлены в

пробирке и помещены под давлением в капилляр с модифицированной поверхностью (без электроосмотического потока). Удаление геля после каждого ввода пробы обычно улучшает воспроизводимость разделения. Пористость гелей может быть увеличена при использовании полимеров с большей молекулярной массой (при определенной концентрации полимера) или путем уменьшения концентрации полимера (при определенной молекулярной массе полимера). Уменьшение пористости геля приводит к уменьшению подвижности вещества для того же самого буферного раствора. Поскольку растворение таких полимеров в буферном растворе дает растворы с низкой вязкостью, может быть использован как гидродинамический, так и электрокинетический ввод пробы.

КАПИЛЛЯРНОЕ ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЕ ФОКУСИРОВАНИЕ

ПРИНЦИП

При изоэлектрическом фокусировании молекулы мигрируют под влиянием электрического поля до тех пор, пока они остаются заряженными в градиенте рН, создаваемом амфолитами, имеющими широкий диапазон значений рІ (полиаминокарбоновые кислоты), растворенными в буферном растворе.

Тремя основными стадиями изоэлектрического фокусирования являются загрузка, фокусирование и мобилизация.

Стадия загрузки. Могут быть использованы два способа:

- одноступенчатая загрузка: проба смешивается с амфолитами и вводится в капилляр под давлением или с помощью вакуума;

- последовательная загрузка: в капилляр вводят вначале ведущий буферный раствор, затем амфолиты, затем пробу, смешанную с амфолитами, после чего снова амфолиты и в конце замыкающий буферный раствор. Объем пробы должен быть таким, чтобы не повлиять на величину градиента рН.

Стадия фокусирования. При наложении напряжения амфолиты, в зависимости от своего заряда, мигрируют по направлению к катоду или аноду, тем самым создавая градиент от анода (более низкие рН) к катоду (более высокие рН). Во время данной стадии разделяемые компоненты мигрируют до тех пор, пока не достигнут значения рН, соответствующего своей изоэлектрической точке и ток не упадет до очень низких значений.

Стадия мобилизации. Если для детектирования необходима мобилизация, используют один из следующих способов:

- в первом способе мобилизация проводится в течение стадии фокусирования вследствие действия электроосмотического потока; электроосмотический поток должен быть достаточно малым, чтобы позволить провести фокусирование компонентов;

- во втором способе мобилизация проводится после стадии фокусирования путем использования положительного давления;

- в третьем способе мобилизация проводится после стадии фокусирования путем добавления солей в катодный или анодный резервуар (в зависимости от направления, выбранного для мобилизации) для изменения рН в капилляре при наложении напряжения. Поскольку рН изменяется, белки и электролиты перемещаются по направлению к резервуару, который содержит добавленные соли, и проходят через детектор.

Достижимое разделение, выраженное как ΔpI , зависит от градиента рН (dpH/dx), числа амфолитов, имеющих различные величины рІ, коэффициента молекулярной диффузии (D), напряженности электрического поля (E) и того, как изменяется электрофоретическая подвижность аналита при изменении рН ($-d\mu/dpH$):

$$\Delta pI = 3 \cdot \sqrt{\frac{D(dpH/dx)}{E(-d\mu/dpH)}}$$

ОПТИМИЗАЦИЯ

Основными параметрами, которые следует учитывать при разработке методик разделения, являются следующие.

Напряжение. В капиллярном изoeлектрическом фокусировании на стадии фокусирования используются электрические поля с очень высокой напряженностью – от 300 В/см до 1000 В/см.

Капилляр. В зависимости от способа мобилизации (см. выше) электроосмотический поток должен быть уменьшен или подавлен. Капилляры с модифицированной поверхностью склонны уменьшать электроосмотический поток.

Растворы. Резервуар с анодным буферным раствором заполняют раствором, значение рН которого меньше, чем значение pI большинства кислотных амфолитов, а катодный резервуар – раствором, значение рН которого больше, чем значение pI большинства основных амфолитов. Для анода часто используют фосфорную кислоту, а для катода – натрия гидроксид.

Добавление полимера, такого как метилцеллюлоза, в раствор амфолита приводит к подавлению конвективных сил (если такие имеются) и электроосмотического потока, что обусловлено увеличением вязкости. Имеющиеся в продаже амфолиты покрывают множество диапазонов рН, а при необходимости получить более широкий диапазон рН их можно смешивать. Широкие диапазоны рН используются для оценки величины изoeлектрической точки, в то время как более узкие применяются для улучшения точности анализа. Для градуировки можно использовать зависимость между временем миграции и изoeлектрической точкой для серии белковых маркеров.

Если необходимо, осаждение белков в изoeлектрической точке во время стадии фокусирования может быть предотвращено с помощью добавления к буферному раствору глицерина, поверхностно-активных веществ, мочевины или цвиттер-ионных буферных растворов. Следует иметь в виду, что мочевина в зависимости от концентрации денатурирует белки.

МИЦЕЛЛЯРНАЯ ЭЛЕКТРОКИНЕТИЧЕСКАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

ПРИНЦИП

В мицеллярной электрокинетической хроматографии (МЭКХ, МЕКС) разделение происходит в растворе электролита, который содержит поверхностно-активное вещество в концентрации, превышающей критическую концентрацию мицеллообразования ($ккм$). Молекулы растворенного вещества распределяются между водным буферным раствором и псевдонеподвижной фазой, образованной мицеллами, в соответствии со своим коэффициентом распределения. Таким образом, данный метод можно рассматривать как гибрид электрофореза и хроматографии. Он может быть использован для разделения как заряженных, так и нейтральных веществ и сохраняет эффективность, скорость и оборудование, присущие капиллярному электрофорезу. Одним из поверхностно-активных веществ, широко используемым в МЭКХ, является анионное поверхностно-активное вещество натрия додецилсульфат. Применяются также и другие поверхностно-активные вещества, например, катионные поверхностно-активные вещества, такие как соли цетилтриметиламмония. Механизм разделения заключается в следующем. В нейтральной или щелочной среде возникает сильный электроосмотический поток, который перемещает ионы буферного раствора, используемого при разделении, по направлению к катоду. Если в качестве поверхностно-активного вещества используется натрия додецилсульфат, электрофоретическая миграция анионных мицелл происходит в противоположном направлении, т.е. к аноду. В результате общая скорость миграции мицелл уменьшается по сравнению со скоростью потока раствора электролита. В случае нейтральных разделяемых веществ скорость миграции аналита будет зависеть только от величины его коэффициента распределения между мицеллой и водным буферным раствором, поскольку аналит способен распределяться между мицеллой и водным буферным раствором и не имеет электрофоретической подвижности. На электрофореграмме пики, соответствующие каждому из разделяемых незаряженных веществ, всегда находятся между пиком маркера электроосмотического потока и пиком мицеллы (время между этими двумя пиками называется окном разделения). Для заряженных разделяемых веществ скорость миграции зависит как от коэффициента распределения вещества между мицеллой и водным

буферным раствором, так и от электрофоретической подвижности вещества в отсутствии мицеллы.

Поскольку механизм разделения в МЭХХ для нейтральных и слабоионизированных веществ главным образом хроматографический, миграция вещества и разрешение могут быть охарактеризованы с помощью фактора удерживания вещества (k), также известного как концентрационный коэффициент распределения (D_m), который представляет собой отношение количества разделяемого вещества, находящегося в мицелле, к количеству данного вещества в подвижной фазе.

Для нейтральных соединений k определяется как:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0 \cdot \left(1 - \frac{t_R}{t_{mc}}\right)} = K \cdot \frac{V_S}{V_M},$$

где:

t_R – время миграции вещества;

t_0 – время анализа неудерживаемого вещества (определяемое с помощью маркера электроосмотического тока, не входящего в мицеллу, например, метанола);

t_{mc} – время миграции мицеллы (измеряется с помощью маркера мицеллы, такого как Судан III, который мигрирует, полностью находясь в мицеллах);

K – коэффициент распределения вещества;

V_S – объем мицеллярной фазы;

V_M – объем подвижной фазы.

Аналогично, разрешение пиков двух близко мигрирующих веществ (R_s) определяется как:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k_b}{k_b + 1} \cdot \frac{1 - \left(\frac{t_0}{t_{mc}}\right)}{1 + k_a \cdot \left(\frac{t_0}{t_{mc}}\right)},$$

где:

N – число теоретических тарелок для одного из веществ;

α – селективность;

k_a и k_b – факторы удерживания для обоих веществ соответственно ($k_b > k_a$).

Подобные, но не идентичные уравнения для значений k и R_s используются и в случае разделения заряженных веществ.

ОПТИМИЗАЦИЯ

Основными параметрами, которые следует принимать во внимание при разработке методик разделения в МЭХХ, являются инструментальные, а также параметры раствора электролита.

Инструментальные параметры

Напряжение. Время разделения обратно пропорционально приложенному напряжению. Однако увеличение напряжения может вызвать избыточное выделение тепла, повышение температуры и, как результат, образование градиентов температуры и вязкости в буферном растворе, находящемся в капилляре. Данный эффект особенно характерен для буферных растворов с высокой электропроводностью и содержащих мицеллы. Неудовлетворительная тепловая конвекция приводит к расширению полосы и уменьшает разрешение.

Температура. Изменения температуры капилляра влияют на коэффициент распределения вещества между буферным раствором и мицеллой, на критическую концентрацию мицеллообразования и вязкость буферного раствора. Данные параметры

вносят вклад в величину времени удерживания вещества. Использование хорошей охлаждающей системы улучшает воспроизводимость времен миграции веществ.

Капилляр. Как и в случае капиллярного электрофореза со свободным раствором, размеры капилляра (длина и внутренний диаметр) влияют на время анализа и эффективность разделения. Увеличение как эффективной, так и общей длины капилляра может ослабить электрическое поле (в случае работы при постоянном напряжении), увеличить время миграции и улучшить эффективность разделения. Внутренний диаметр контролирует тепловую конвекцию (для определенного буферного раствора и электрического поля) и, соответственно, расширение полосы вещества.

Параметры раствора электролита

Тип и концентрация поверхностно-активного вещества. Тип поверхностно-активного вещества таким же образом, как и неподвижная фаза в хроматографии, влияет на разрешение, поскольку изменяет селективность разделения. Величина I_{gk} нейтрального соединения линейно увеличивается при увеличении концентрации поверхностно-активного вещества в подвижной фазе. Поскольку разрешение в МЭКХ достигает максимума при приближении величины k к $\sqrt{t_{mc}/t_0}$, изменение концентрации поверхностно-активного вещества в подвижной фазе изменяет величину разрешения.

Значение рН буферного раствора. Несмотря на то, что значение рН не изменяет коэффициент распределения неионизированных веществ, оно может изменять электроосмотический поток в капиллярах с немодифицированной поверхностью. Уменьшение значения рН буферного раствора уменьшает электроосмотический поток и тем самым увеличивает разрешение нейтральных веществ в МЭКХ вследствие увеличения времени анализа.

Органические растворители. Для улучшения МЭКХ-разделения гидрофобных соединений к раствору электролита могут быть добавлены органические модификаторы (метанол, пропанол, ацетонитрил и другие). Добавление этих модификаторов обычно уменьшает время миграции и селективность разделения. Поскольку добавление органических модификаторов влияет на величину критической концентрации мицеллообразования, определенная концентрация поверхностно-активного вещества может быть использована только в пределах некоторого процентного содержания органического модификатора до прекращения мицеллообразования или отрицательного влияния на этот процесс, приводящего к исчезновению мицелл и прекращению разделения. Диссоциация мицелл в присутствии большого количества органического растворителя не всегда означает невозможность дальнейшего разделения; в некоторых случаях гидрофобное взаимодействие между мономером ионного поверхностно-активного вещества и нейтральным разделяемым веществом приводит к образованию сольвофобных комплексов, которые могут быть разделены электрофоретически.

Добавки для хиральных разделений. Для разделения энантиомеров с использованием МЭКХ хиральный селектор включается в мицеллярную систему, либо ковалентно связывается с поверхностно-активным веществом либо добавляется к раствору электролита, в котором происходит разделение мицелл. Мицеллы, способные к хиральным разделениям, обычно включают в себя соли *N*-додеканоил-L-аминокислот, соли желчных кислот и т.д. Хиральное разделение может быть также проведено с помощью циклодекстринов, добавленных к растворам электролитов, содержащих мицеллы ахиральных поверхностно-активных веществ.

Другие добавки. Существует ряд подходов, предполагающих добавление различных реагентов к буферному раствору для изменения селективности. Добавление некоторых типов циклодекстринов к буферному раствору также может быть использовано для уменьшения взаимодействия гидрофобных веществ с мицеллой, тем самым увеличивая селективность разделения для такого типа соединений.

Добавление веществ, которые способны изменять взаимодействие между разделяемым веществом и мицеллой вследствие адсорбции на последней, используется для улучшения селективности разделения в МЭКХ. Данные добавки могут представлять собой второе поверхностно-активное вещество (ионное или неионное), которое увеличивает количество смешанных мицелл или катионов металлов, которые растворяются в мицелле и образуют координационные комплексы с разделяемыми веществами.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Пики должны быть разделены соответствующими временами миграции, чтобы в итоге получить исправленную площадь, позволяющую компенсировать:

- смещения времен удерживания от анализа к анализу и тем самым уменьшить различия в величине отклика;
- различные отклики компонентов пробы с различными временами миграции.

При использовании внутреннего стандарта следует убедиться в том, что пик испытуемого вещества не перекрывается пиком внутреннего стандарта.

РАСЧЕТЫ

По полученным данным рассчитывают содержание испытуемого компонента или компонентов. Если требуется, рассчитывают процентное содержание одного или нескольких компонентов образца путем определения исправленной площади пика или пиков как процентной части исправленных площадей всех пиков, исключая пики, соответствующие растворителям или любым добавленным реагентам (метод нормализации). Рекомендуется использование автоматической системы интегрирования (интегратора или системы получения и обработки данных).

ПРИГОДНОСТЬ СИСТЕМЫ

Параметры пригодности системы используются для проверки поведения системы капиллярного электрофореза. Выбор этих параметров зависит от используемой разновидности капиллярного электрофореза. К ним относятся: фактор удерживания (k) (только для мицеллярной электрокинетической хроматографии), число теоретических тарелок (N), фактор симметрии (A_s) и разрешение (R_s). В предыдущих разделах были описаны уравнения для расчетов N и R_s , ниже приведены уравнения, позволяющие рассчитать эти параметры из электрофореграмм.

ЧИСЛО ТЕОРЕТИЧЕСКИХ ТАРЕЛОК

Число теоретических тарелок (N) может быть рассчитано по формуле:

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2,$$

где:

t_R – время миграции или расстояние по базовой линии от точки ввода пробы до перпендикуляра, опущенного из максимума пика, соответствующего компоненту;

w_h – ширина пика на половине высоты.

РАЗРЕШЕНИЕ

Разрешение (R_s) близких по высоте пиков двух компонентов может быть рассчитано по формуле:

$$R_s = \frac{1,18 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}},$$
$$t_{R2} > t_{R1},$$

где:

t_{R1} и t_{R2} – времена миграции или расстояния по базовой линии от точки ввода пробы до перпендикуляров, опущенных из максимумов двух соседних пиков;

w_{h1} и w_{h2} – ширины пиков на половине высоты.

При необходимости может быть измерена высота седловины (H_v) между двумя частично разделенными пиками в стандартном образце, а

также высота меньшего пика (H_p) и рассчитана величина коэффициента разделения не полностью разделенных пиков:

$$p/v = \frac{H_p}{H_v}.$$

ФАКТОР АСИММЕТРИИ

Фактор асимметрии пика (A_s) рассчитывают по формуле:

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d},$$

где:

$w_{0,05}$ – ширина пика на одной двадцатой высоты;

d – расстояние между перпендикуляром, опущенным из максимума пика, и передним краем пика на одной двадцатой высоты.

Испытания на повторяемость площадей (стандартное отклонение площадей или отношений площадь/время миграции) и времен миграции (стандартное отклонение времени миграции) используются в качестве параметров пригодности. Повторяемость времени миграции обеспечивает испытание по определению пригодности методики промывки капилляра. Альтернативным способом предупреждения ухудшения повторяемости времени миграции является использование времени миграции относительно времени миграция внутреннего стандарта.

Для определения родственных соединений может быть полезно испытание на подтверждение отношения сигнал/шум для стандартного образца (или определение предела количественного определения).

ОТНОШЕНИЕ СИГНАЛ/ШУМ

Пределы обнаружения и количественного определения отвечают отношению сигнал/шум 3 и 10 соответственно. Отношение сигнал/шум (S/N) рассчитывают по формуле:

$$S/N = \frac{2H}{h},$$

где:

H – высота пика, соответствующего его рассматриваемому компоненту, на электрофореграмме, полученной при использовании рекомендованного раствора сравнения, и измеренная от максимума пика до экстраполированной базовой линии для сигнала, величина которого эквивалентна двадцатикратному превышению ширины пика на половине высоты;

h – размах для фонового шума (уровень шума) на электрофореграмме, полученной при введении контрольной пробы. Величина эквивалентна двадцатикратному превышению ширины пика на половине высоты для пика на электрофореграмме, полученной при использовании рекомендованного раствора сравнения и, если возможно, расположенного на одном и том же расстоянии от места возможного обнаружения пика.

01/2013:20248

2.2.48. РАМАНОВСКАЯ СПЕКТРОМЕТРИЯ

Рамановская спектроскопия (неупругое рассеяние света) [#](или спектроскопия комбинационного рассеяния) [#] – это процесс рассеяния света, при котором испытуемый образец в условиях испытаний облучается интенсивным монохроматическим светом

(обычно излучение лазера), и для света, рассеиваемого образцом, определяется сдвиг частоты.

Рамановская спектроскопия является дополнительным методом по отношению к ИК-спектроскопии в том смысле, что оба этих метода основаны на молекулярных колебаниях частиц испытуемого вещества. Однако рамановская и ИК-спектроскопия отличаются по относительной чувствительности для различных функциональных групп. Рамановская спектроскопия особенно чувствительна к неполярным связям (например, одинарные или кратные связи C–C), тогда как вода, для которой характерно сильное поглощение в ИК-области, обладает слабым рамановским рассеянием и поэтому хорошо подходит на роль растворителя в рамановской спектроскопии.

Прибор. Спектрометры для получения рамановских спектров обычно состоят из следующих компонентов:

- источник монохроматического света, чаще всего лазер с длиной волны в ультрафиолетовой, видимой или ближней инфракрасной области;
 - подходящая оптика (линзы, зеркала, оптико-волоконные устройства), которые направляют возбуждающее излучение на образец и собирают свет, рассеиваемый образцом;
 - оптическое устройство (монокроматор или фильтр), которое пропускает сдвинутое по частоте рамановское рассеяние и препятствует попаданию на детектор интенсивного света, частота которого равна частоте возбуждающего света (рэлеевское рассеяние);
 - диспергирующее устройство (дифракционная решетка или призма), соединенное со щелью, регулирующей длину волны, и детектором (обычно фотоумножитель);
- или:
- диспергирующее устройство (дифракционная решетка или призма), соединенное с многоканальным детектором (обычно прибор с зарядовой связью (ПЗС, *CCD*));
- или:
- интерферометр, регистрирующий интенсивность рассеянного света во времени, и устройство обработки данных, которое с помощью Фурье-преобразования переводит данные в диапазон частот или волновых чисел.

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

Рамановские спектры могут быть получены для твердых веществ, жидкостей и газов, причем как помещенных в стеклянные контейнеры или трубки, как правило, без предварительной подготовки образца или растворения, так и напрямую.

Основным ограничением рамановской спектроскопии является флуоресценция примесей, которая мешает детектору улавливать значительно более слабый рамановский сигнал. Флуоресценции можно избежать при использовании в качестве возбуждающего света лазерного излучения с большой длиной волны, например, находящейся в ближней инфракрасной области. Интенсивность некоторых рамановских линий может быть усилена несколькими способами, например, путем использования резонансной рамановской спектроскопии (*RR*) или усиленной поверхностью рамановской спектроскопии (*SERS*).

Из-за узости светового потока падающего лазерного излучения для получения спектра необходимо всего лишь несколько микролитров образца. Тем не менее следует учитывать неоднородность образца, если только его объем не увеличен, например, путем вращения.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СТАНДАРТНЫХ ОБРАЗЦОВ

Испытуемый образец и стандартный образец подвергают одинаковой обработке и затем при одинаковых условиях получают их спектры. Максимумы в спектре испытуемого образца должны совпадать по расположению и интенсивности с соответствующими максимумами в спектре стандартного образца (*FCO*).

Если спектры, полученные для твердых веществ, имеют различия в положениях максимумов, испытуемый образец и стандартный образец подвергают одинаковой обработке для того, чтобы они выкристаллизовались или образовались в одинаковой форме, либо поступают так, как описано в частной статье, и затем снимают спектры.

Поскольку закон Бера-Ламберта для рамановской спектроскопии не выполняется, интенсивность рамановского излучения прямо пропорциональна концентрации

рассеивающих частиц. Как и в случае других спектроскопических методов, количественное определение может быть проведено с использованием известных количеств или концентраций стандартных образцов. Вследствие небольшого пространственного разрешения метода следует обращать внимание на качество испытуемых образцов и стандартных образцов, например, необходимо быть уверенным в том, что они находятся в одном и том же физическом состоянии либо использовать внутренний стандарт для жидких образцов.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СПЕКТРАЛЬНЫХ БИБЛИОТЕК И СТАТИСТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ КЛАССИФИКАЦИИ И ГРАДУИРОВКИ

Контроль за работой прибора. При использовании прибора следуют инструкциям производителя; регулярно, в зависимости от применения прибора и испытуемых образцов, проводят предписанные градуировки и испытания работы системы. При использовании рамановской спектроскопии для количественных определений либо при создании спектральных библиотек сравнения для (хемометрической) классификации или градуировки необходимо обращать особое внимание на то, чтобы были сделаны все поправки к измерениям либо предприняты меры для контроля за изменчивостью величин волновых чисел и интенсивности сигнала прибора.

Проверка шкалы волновых чисел. Шкалу волновых чисел рамановских сдвигов (обычно выражаемую в обратных сантиметрах) проверяют с помощью подходящих стандартов, которые имеют характерные максимумы при исследуемых величинах волновых чисел (например, органическое вещество, неоновая лампа или линии Ar^+ плазмы аргон-ионного лазера).

Градуировка прибора должна соответствовать типу образца, т.е. для твердых испытуемых образцов следует использовать твердые образцы сравнения, а для жидких – жидкие. Выбирают подходящее вещество (например, инден, циклогексан или нафталин), для которого установлены точные значения сдвигов волновых чисел. Образец индена для предотвращения его разрушения помещают в пробирку для ЯМР, вакуумируют и затем хранят в атмосфере инертного газа в прохладном и темном месте.

Таблица 2.2.48.-1

Сдвиги волновых чисел (и допустимые отклонения) для циклогексана, индена и нафталина

Циклогексан ^A	Инден ^B	Нафталин ^A
		3056,4 (±1,5)
2938,3 (±1,5)		
2923,8 (±1,5)		
2852,9 (±1,5)		
	1609,7 (±1,0)	1576,6 (±1,0)
1444,4 (±1,0)	1552,6 (±1,0)	1464,5 (±1,0)
1266,4 (±1,0)	1205,2 (±1,0)	1382,2 (±1,0)
1157,6 (±1,0)		1147,2 (±1,0)
1028,3 (±1,0)	1018,6 (±1,0)	1021,6 (±1,0)
801,3 (±1,0)	730,5 (±1,0)	763,8 (±1,0)
	533,9 (±1,0)	513,8 (±1,0)

^A Standard guide for Raman shift standards for spectrometer calibration (American Society for Testing and Materials ASTM E 1840).

^B D. A. Carter, W. R. Thompson, C. E. Taylor and J. E. Pemberton, *Applied Spectroscopy*, 1995, 49 (11), 1561–1576.

Проверка шкалы интенсивностей. На абсолютную и относительную интенсивность рамановских полос могут оказывать влияние следующие факторы:

- состояние поляризации падающего света;
- состояние поляризации собирающей оптики;
- интенсивность падающего света;
- различия в отклике прибора;

- различия в фокусе и геометрии образца;
- различия в насыпной плотности для твердых образцов.

Подходящие критерии приемлемости могут изменяться в зависимости от применения, но в большинстве случаев допустимы колебания (*day-to-day variations*) в относительных интенсивностях полос $\pm 10\%$.

Создание спектральных библиотек сравнения. Снимают спектры подходящего числа полностью исследованных (например, так, как описано в частной статье) веществ, имеющих отличия в производителе, серии, кристаллической модификации, размерах частиц и т.д., типичные для анализируемого материала. Набор спектров дает информацию, определяющую границы подобию или количественного определения, которые могут быть использованы для того, чтобы, например, идентифицировать вещество или проконтролировать его количество, образовавшееся в процессе производства. Количество веществ в базе данных зависит от особенностей ее применения. Коллекция спектров в базе данных может быть представлена различными способами, определяемыми математической методикой, используемой для классификации или количественного определения.

Селективность базы данных, которая позволяет положительно идентифицировать данный материал либо достоверно отличить его от других материалов базы данных, должна быть установлена во время процедуры валидации. Для уверенности в пригодности базы данных эта селективность должна регулярно проверяться; в особенности это необходимо делать после любых значительных изменений, произошедших с веществом (например, изменения поставщика или производственного процесса), либо при настройке прибора для рамановской спектроскопии (например, при проверке шкалы волновых чисел или повторяемости отклика спектрометра). База данных пригодна только для исходного прибора либо для подобного прибора при условии, что перенесенная на прибор база данных остается пригодной.

Методика. Подготовку и исследование образца проводят таким же образом, как и при создании базы данных. Для облегчения сравнения спектров и количественных расчетов могут быть использованы подходящие математические преобразования рамановских спектров.

Сравнение или преобразования спектров, количественный прогноз свойств веществ, находящихся в испытуемом материале, могут проводиться с использованием подходящих методов хемометрики, статистической классификации и градуировки.

01/2013:20249

2.2.49. ИЗМЕРЕНИЕ ВЯЗКОСТИ НА ВИСКОЗИМЕТРЕ С ПАДАЮЩИМ ШАРИКОМ

Определение динамической вязкости ньютоновских жидкостей проводят, используя подходящий вискозиметр с падающим шариком, при температуре $(20 \pm 0,1)^\circ\text{C}$, если в частной статье не указана другая температура. Измерение вязкости основано на определении времени падения шарика в жидкости от одной отметки вискозиметра до другой. Если для используемого оборудования не установлены точные пределы, то полученные результаты считаются приемлемыми при условии, что результаты двух последовательных измерений отличаются не более, чем на $1,5\%$.

Оборудование. Вискозиметр с падающим шариком состоит из стеклянной трубки, заключенной в кожух, позволяющий контролировать температуру; шести шариков различной плотности и диаметра, изготовленных из стекла, железно-никелевого сплава или стали. Трубку фиксируют таким образом, чтобы отклонение от вертикальной оси составляло $(10 \pm 1)^\circ$. На трубке имеются две отметки, которые определяют расстояние падения шарика. К промышленным вискозиметрам прилагаются таблицы со значениями постоянных, плотности шариков и данные по пригодности определенного шарика для использования в предполагаемом диапазоне вязкости.

Методика. Чистую, сухую трубку вискозиметра, предварительно выдержанную при температуре $(20 \pm 0,1)^\circ\text{C}$, заполняют испытуемой жидкостью, избегая образования пузырьков. Помещают подходящий для предполагаемого диапазона вязкости шарик, чтобы

получить время падения не менее 30 с. Закрывают трубку и термостатируют раствор при $(20 \pm 0,1)^\circ\text{C}$ не менее 15 мин. Пропускают шарик между двумя метками безизмерения времени падения. Шарик ставят в исходное положение, включают секундомер, когда нижняя часть шарика коснется верхней метки, и останавливают, когда шарик достигнет нижней метки. Время движения шарика измеряют не менее 3 раз с точностью до 1/5 секунды.

Рассчитывают динамическую вязкость (η , мПа·с) по формуле:

$$\eta = k(\rho_1 - \rho_2) \cdot t,$$

где:

k – постоянная вискозиметра, в $\text{мм}^2/\text{с}^2$;

ρ_1 – плотность шарика, в $\text{г}/\text{см}^3$;

ρ_2 – плотность испытуемой жидкости, в $\text{г}/\text{см}^3$, полученная умножением относительной плотности (d_{20}^{20}) на 0,9982;

t – среднее время падения шарика между крайними метками, в секундах.

01/2013:20254

2.2.54. ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЕ ФОКУСИРОВАНИЕ

ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ

Изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ, *IEF*) – это вариант электрофореза, в котором разделение белков происходит в соответствии с их изоэлектрическими точками. Разделение проводится на пластине из полиакриламидного или агарозного геля, содержащего смесь амфотерных электролитов (амфолитов). При действии электрического поля амфолиты мигрируют в геле, создавая градиент pH. В некоторых случаях используют гели, имеющие фиксированный градиент pH, полученные путем включения слабых кислот или оснований в определенные места геля во время его приготовления. Когда нанесенные белки достигают фракции геля, которая имеет такое же значение pH, что и их изоэлектрическая точка (pI), заряд данных белков нейтрализуется и миграция прекращается. Градиенты могут быть созданы в различных диапазонах pH в зависимости от выбранной смеси амфолитов.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

В изоэлектрической точке молекула белка не заряжена и не может передвигаться в матрице геля под действием электрического поля. Ее перемещение, однако, может происходить в результате диффузии. Градиент pH вынуждает белок оставаться в изоэлектрическом состоянии, концентрируя данное вещество. Такое концентрирование называется «фокусированием». Увеличение приложенного напряжения или уменьшение количества нанесенного вещества улучшает разделение полос. Величина приложенного напряжения ограничена выделяющейся теплотой, которая должна быть рассеяна. Использование тонких слоев геля, а также пластин с эффективным охлаждением, контролируемых термостатирующим устройством, предотвращает возгорание геля и в тоже время обеспечивает точное фокусирование. Разделение оценивают по минимальной разности pI (ΔpI), которая необходима для разделения двух соседних полос:

$$\Delta pI = 3 \cdot \sqrt{\frac{D(dpH/dx)}{E(-d\mu/dpH)}},$$

где:

D – коэффициент диффузии белка;

$\frac{dpH}{dx}$ – градиент pH;

E – напряженность электрического поля, в вольтах на сантиметр;

$-\frac{d\mu}{dpH}$ – изменение подвижности вещества при изменении рН в диапазоне, близком к рI.

Поскольку D и $-\frac{d\mu}{dpH}$ для определенного белка не могут быть изменены, улучшить разделение можно при использовании более узкого диапазона рН либо при увеличении напряженности электрического поля.

Разрешение между полосами белков в случае использования ИЭФ-геля, содержащего ведущие амфолиты, достаточно хорошее. Улучшить разрешение можно при использовании фиксированных градиентов рН, для создания которых применяются буферные вещества, аналогичные ведущим электролитам, сополимеризованные с матрицей геля. При использовании геля, содержащего ведущие электролиты, могут быть разделены белки, значения рI которых отличаются на 0,02 единицы рН, в то время как фиксированные градиенты рН позволяют разделить белки, изоэлектрические точки которых различаются приблизительно на 0,001 рН.

ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

Следует уделять особое внимание характеристикам и/или подготовке образца. Наличие солей в образце может вызвать ряд проблем, поэтому лучше всего при его приготовлении использовать деионизированную воду или 2 % раствор амфолитов, используя при необходимости диализ или гель-фильтрацию.

Время, необходимое для завершения фокусирования в тонком слое полиакриламидных гелей, определяют путем нанесения окрашенного белка (например, гемоглобина) в различные области поверхности геля и применения электрического поля: стабильное состояние достигается тогда, когда все нанесения дают идентичный образец полос. В некоторых протоколах о завершении фокусирования судят по времени, прошедшему после нанесения образца.

ИЭФ может быть использовано в качестве испытания на подлинность. В этом случае испытуемый образец, мигрирующий на геле, сравнивается с подходящим стандартным образцом и ИЭФ-градуировочными белками. ИЭФ может быть использовано в качестве испытания на предельное содержание. При этом плотность полосы на ИЭФ сравнивается, соответственно, с полосой на ИЭФ, появляющейся при использовании стандартного образца, если измерение производится с помощью денситометра или аналогичного устройства, позволяющего определить относительную концентрацию белка в полосе. ИЭФ может быть также использовано при испытании на количественное содержание белков.

Прибор. Прибор для ИЭФ состоит из:

- управляемого генератора для создания постоянного потенциала, тока и мощности; используются потенциалы величиной 2500 В: они считаются оптимальными для используемых условий работы; рекомендуется источник тока, имеющий постоянную мощность до 30 Вт;

- жесткой пластиковой ИЭФ камеры, в которой находится охлаждаемая пластинка или подходящий материал, служащий основой для нанесения геля;

- пластиковой крышки с платиновыми электродами, которые соединены с гелем с помощью бумажных фитилей подходящей ширины, длины и толщины, пропитанных растворами анодных и катодных электролитов.

ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЕ ФОКУСИРОВАНИЕ В ПОЛИАКРИЛАМИДНЫХ ГЕЛЯХ: ПОДРОБНАЯ МЕТОДИКА

Следующая методика представляет собой подробное описание процедуры ИЭФ в пластинах полиакриламидного геля, используемой, если в частной статье не указано иного.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ГЕЛЕЙ

Матрица формования. Матрица формования (см. рисунок 2.2.54.-1) состоит из стеклянной пластинки (А) на которую для облегчения работы с гелем помещена

полиэфирная пленка (В), одной или нескольких распорных деталей (с), второй стеклянной пластинки (d) и зажимов, скрепляющих всю конструкцию.

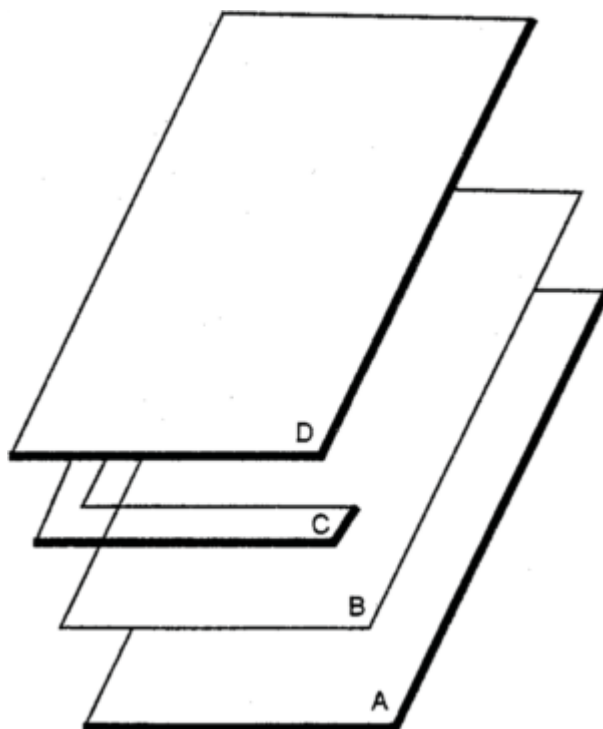


Рисунок 2.2.54.-1. Матрица формования

7,5 %-ный полиакриламидный гель. 29,1 г акриламида *P* и 0,9 г метиленбисакриламида *P* растворяют в 100 мл воды *P*. К 2,5 объемам полученного раствора прибавляют смесь амфолитов, указанных в частной статье, и доводят водой *P* до объема 10 мл. Раствор аккуратно перемешивают и дегазируют.

Приготовление формы. Полиэфирную пленку помещают на нижнюю стеклянную пластинку, вставляют распорную деталь, помещают вторую стеклянную пластинку и скрепляют конструкцию зажимами. Перед использованием раствор помещают на магнитную мешалку и прибавляют к нему 0,25 объема 100 г/л раствора аммония персульфата *P* и 0,25 объема тетраметилэтилендиамина *P*. Немедленно заполняют раствором пространство между стеклянными пластинками формы.

МЕТОДИКА

Форму разбирают на составные части и, используя полиэфирную пленку, переносят гель на охлажденную подложку, увлажненную несколькими миллилитрами подходящей жидкости, избегая образования воздушных пузырьков. Готовят испытуемые растворы и растворы сравнения, как указано в частной статье. Для нанесения образца помещают полоски бумаги размером приблизительно 10 мм × 5 мм на поверхность геля и пропитывают каждую предписанным количеством испытуемого раствора и раствора сравнения. Также наносят предписанное количество раствора белков с известными величинами изоэлектрических точек, служащих в качестве маркеров рН для градуировки геля. В некоторых протоколах вместо импрегнированных бумажных полосок используют гель, который имеет желобки, предназначенные для помещения раствора образца. Отрезают 2 полоски бумаги длиной, соответствующей длине геля, и пропитывают их растворами электролитов: кислотой для анода и щелочью для катода (составы анодного и катодного растворов приводятся в частных статьях). Эти бумажные фитильки помещают на каждую сторону геля на расстоянии нескольких миллиметров от его границы. Устанавливают крышку так, чтобы электроды контактировали с полосками бумаги (соответственно, анодным и катодным полями). Выполняют изоэлектрическое фокусирование при использовании электрических параметров, описанных в частной статье. Когда миграция смеси стандартных белков стабилизируется, электрический ток выключают. С помощью пинцета удаляют полоски, предназначенные для нанесения

образца, и 2 электродных фитилька. Погружают гель в *фиксирующий раствор* для *изоэлектрического фокусирования в полиакриламидном геле Р*. Выдерживают при аккуратном встряхивании при комнатной температуре в течение 30 мин. Удаляют раствор высушиванием и прибавляют 200 мл *обесцвечивающего раствора Р*. Выдерживают при перемешивании в течение 1 часа. Высушивают гель, прибавляют *кумасси красящий раствор Р*. Выдерживают в течение 30 мин. Обесцвечивают гель путем пассивной диффузии *обесцвечивающего раствора Р* до тех пор, пока на чистом фоне не станут хорошо видны полосы. Отмечают положение и интенсивность полос на электрофореграмме, как указано в частной статье.

ИЗМЕНЕНИЯ ПОДРОБНОЙ МЕТОДИКИ (ПРЕДМЕТ ВАЛИДАЦИИ)

Там, где делается ссылка на общую методику *изоэлектрического фокусирования*, изменения в методологии или методике *изоэлектрического фокусирования* могут быть предметом валидации. Они включают в себя:

- использование имеющихся в продаже гелей заводского производства, а также окрашивающих и обесцвечивающих наборов;
- использование фиксированных градиентов pH;
- использование стержневых гелей;
- использование кассет геля различных размеров, включая ультратонкие (0,2 мм) гели;
- изменения в методике нанесения образца, включающие различные объемы образца или использование шаблонов или фитильков, изготовленных не из бумаги;
- использование альтернативных условий перемещения, включающих изменения электрического поля в зависимости от размеров геля и оборудования, а также использование фиксированных времен миграции вместо субъективной интерпретации стабильности полосы;
- включение стадии предварительного фокусирования;
- использование автоматизированного оборудования;
- использование гелей агарозы.

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИК ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ФОКУСИРОВАНИЯ

Если используются альтернативные способы по отношению к описанной методике, они должны быть валидированы. Для валидации разделения могут быть использованы следующие критерии:

- образование устойчивого градиента pH с желаемыми характеристиками, оцениваемого, например, с помощью окрашенных маркеров pH с известными величинами *изоэлектрических точек*;
- сравнение электрофореграммы, прилагаемой к стандартному образцу, с электрофореграммой, полученной при проведении испытания;
- любые другие критерии валидации, указанные в частной статье.

СПЕЦИФИЦИРОВАННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ОБЩЕЙ МЕТОДИКИ

Изменения общей методики, необходимые при анализе конкретных субстанций, могут быть подробно описаны в частных статьях. Они включают:

- добавление в гель мочевины (обычно 3 М концентрация достаточна для поддержания белка в растворенном состоянии, но может быть использована концентрация до 8 М): некоторые белки в *изоэлектрической точке* выпадают в осадок, в этом случае для того, чтобы белок оставался в растворе, в гель вводится мочевина; при использовании мочевины следует применять только ее свежие растворы, чтобы не допустить карбамоилирования белка;
- использование альтернативных способов окрашивания;
- использование добавок для геля, таких как неионные детергенты (например, октилглюкозид) или цвиттер-ионные детергенты (например, *CHAPS* или *CHAPSO*), и добавление амфолита к образцу для предотвращения процессов агрегации и преципитации белков.

ПОЛОЖЕНИЯ, КОТОРЫЕ СЛЕДУЕТ ПРИНИМАТЬ ВО ВНИМАНИЕ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ДАННОГО МЕТОДА

Образцы могут наноситься на любой участок поверхности геля, но для того, чтобы защитить белки от экстремальных значений pH, образцы не должны наноситься в непосредственной близости от электродов. В ходе выполнения анализа аналитик может нанести белок на гель в трех местах (посередине и на оба конца). Образцы белка, наносимые на противоположные концы геля, могут быть различными.

Известно явление, называемое катодным дрейфом, при котором градиент pH с течением времени разрушается. Это может происходить, если фокусирование в геле происходит слишком долго. Причины данного явления не совсем ясны, но факторами, вызывающими катодный дрейф, могут быть электроэндоосмос и абсорбция диоксида углерода. Для исследования этой проблемы могут быть использованы фиксированные градиенты pH.

В течение фокусирования важно проводить эффективное охлаждение (до около 4 °C) емкости, в которую помещен гель. Высокие напряженности электрического поля, используемые во время изоэлектрического фокусирования, могут приводить к перегреванию и влиять на качество фокусируемого геля.

01/2013:20255

2.2.55. ПЕПТИДНОЕ КАРТИРОВАНИЕ

Пептидное картирование (или составление пептидных карт) является методом идентификации белков, в особенности получаемых методом рекомбинантных ДНК. Метод включает в себя этапы химического или ферментатического расщепления белков до образования пептидных фрагментов с последующим разделением и идентификацией этих фрагментов в воспроизводимых условиях. Это надежный метод испытания, позволяющий произвести идентификацию изменения практически каждой отдельной аминокислоты, произошедшего в результате таких явлений, как ошибка в считывании последовательности комплементарной ДНК (кДНК), либо являющегося результатом мутации. Составление пептидных карт является сравнительным испытанием, поскольку получаемая информация сравнивается со стандартным образцом, подвергающимся аналогичному воздействию. Данное испытание позволяет подтвердить первичную структуру белка, определить возможные изменения первичной структуры в случае наличия таковых, подтвердить соответствие процесса и генетическую стабильность. Для каждого из белков характерна совокупность уникальных характеристик, которые должны быть описаны. Научные и аналитические методики позволяют осуществлять развитие метода пептидного картирования, который, в свою очередь, характеризуется достаточной специфичностью.

Данная статья содержит детальное описание аспектов использования и валидации метода пептидного картирования с целью получения характеристики анализируемого белка, оценки стабильности клеточных систем экспрессии, используемых для получения продуктов рекомбинантных ДНК и оценки согласованности процесса в целом – в отношении как оценки стабильности продукта, так и обеспечения идентичности белка, либо определения содержания протеинов с изменениями в структуре.

Пептидное картирование не является общим методом, а заключается в составлении индивидуальных карт для каждого отдельного белка. Хотя технологии продолжают стремительно развиваться, существует ряд методов, которые являются общепризнанными. При наличии определенных расхождений с данными методами они будут описываться в соответствующих частных статьях.

Составление пептидных карт может рассматриваться как метод получения «отпечатков пальцев» белка и представляет собой получаемую в результате ряда химических процессов полную расшифровку анализируемого белка. Метод включает четыре принципиальные стадии: выделение и очистка белка – в случае, если белок входит в состав какой-либо смеси; избирательное расщепление пептидных связей; хроматографическое разделение образующихся пептидных фрагментов; анализ и идентификация пептидов. Анализируемый образец подвергается расщеплению и анализу

параллельно со стандартным образцом. Полное расщепление пептидных связей более вероятно, когда вместо химических гидролизующих реагентов используются такие ферменты, как эндопептидазы (например, трипсин). Для того, чтобы карта была информативной, она должна содержать достаточное количество пептидов. С другой стороны, в случае, если пептидных фрагментов будет слишком много, карта может утратить свою специфичность, поскольку у многих белков может оказаться аналогичный профиль.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА

Выделение и очистка являются обязательным этапом при проведении анализа нерасфасованных или дозированных форм лекарственных средств, содержащих мешающие анализу вспомогательные вещества или белковые носители и, если это требуется, указываются в частной статье. Количественное извлечение пептида из дозированной формы должно быть валидировано.

ИЗБИРАТЕЛЬНОЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ ПЕПТИДНЫХ СВЯЗЕЙ

Выбор метода расщепления пептидных связей зависит от анализируемого белка. Процедура выбора включает определение требуемого типа расщепления (химического или ферментативного), а также типа протеолитического реагента в рамках выбранной категории. В таблице 2.2.55.-1 приводится ряд протеолитических ферментов и параметры их специфичности. Данный список не является исчерпывающим и будет дополняться по мере определения других реагентов, способных расщеплять пептидные связи.

Таблица 2.2.55.-1

Примеры реагентов для расщепления пептидных связей

Тип	Реагент	Специфичность
Ферментативные	Трипсин (EC 3.4.21.4)	C-концевые аргинин и лизин
	Химотрипсин (EC 3.4.21.1)	C-концевые гидрофильные остатки (например, лейцин, метионин, аланин, ароматические аминокислоты)
	Пепсин (EC 3.4.23.1 и 2)	Неспецифический реагент
	Лизил эндопептидаза (Lys-C эндопептидаза) (EC 3.4.21.50)	C-концевой лизин
	Глутамил эндопептидаза (из <i>S. aureus</i> штамм V8) (EC 3.4.21.19)	C-концевые глутамин и аспарагин
	Пептидил-Asp металло-эндопептидаза (эндопротеаза Asp-N)	N-концевой аспарагин
Химические	Клострипаин (EC 3.4.22.8)	C-концевой аргинин
	Цианобромид	C-концевой метионин
	2-Нитро-5-тио-цианобензойная кислота	N-концевой цистеин
	O-Йодозобензойная кислота	C-концевые триптофан и тирозин
	Разведенная кислота	Аспарагин и пролин
	BNPS-скатол	Триптофан

Подготовка образца. В зависимости от размера или конфигурации белка используются различные подходы к подготовке образца. В случае если используется трипсин для расщепления пептидных связей белка с молекулярной массой более 100 000 Да, лизиновые остатки должны быть защищены путем получения производных с лимонной или малеиновой кислотой, так как в противном случае может образоваться слишком много пептидных фрагментов.

Подготовка реагента для расщепления пептидных связей. Подготовка реагента для расщепления пептидных связей, в особенности ферментов, может быть необходимым этапом для обеспечения требуемой чистоты и воспроизводимости карты. Например, трипсин, используемый в качестве реагента для расщепления пептидных связей, следует обработать тозил-L-фенилаланинхлорметилкетон с целью инактивации химотрипсина. Хорошо зарекомендовали себя, в особенности при ограниченном количестве имеющегося

белка, другие методы очистки, такие как высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) при очистке трипсина или иммобилизация фермента на гелевом носителе.

Подготовка белка. При определенных условиях может быть необходимо концентрирование образца либо отделение белка от используемых в готовой лекарственной форме сопутствующих веществ и стабилизаторов, которые могут искажать результаты картирования. Физические методы подготовки могут включать ультрафильтрацию, колоночную хроматографию и лиофилизацию. С целью проведения денатурации белка до процедуры пептидного картирования возможно использование других методов подготовки, таких как добавление хаотропных агентов (например, мочевины). Для обеспечения полного доступа фермента к местам разрыва связей и частичной денатурации белка во многих случаях до этапа протеолитического расщепления необходимым представляется сокращение числа дисульфидных связей путем их восстановления и алкилирования. Расщепление пептидных связей с использованием трипсина может сопровождаться появлением в пептидной карте ряда неточностей ввиду протекающих параллельно с реакцией протеолитического расщепления побочных реакций, таких как неспецифическое расщепление, дезаминирование, дисульфидная изомеризация, окисление остатков метионина, образование пироглутаминовых групп при дезаминировании глутамина и *N*-концевых участков пептида. Более того, при автогидролизе трипсина также могут появляться дополнительные пики. Интенсивность их образования зависит от соотношения содержания трипсина к белку. Для предотвращения гидролиза растворы протеаз могут быть приготовлены при pH, отличном от оптимального (например, при pH 5 для трипсина), благодаря чему фермент не перейдет в активное состояние до момента разведения с буферным раствором при проведении расщепления.

Установление оптимальных условий для расщепления пептидных связей. Факторы, которые влияют на полноту и эффективность расщепления протеинов, являются факторами, оказывающими влияние на химические и ферментативные реакции.

pH реакционной среды. Значение pH смеси, в которой осуществляется расщепление пептида, определяется эмпирически и направлено на оптимизацию состояния расщепляющего реагента. Например, при использовании цианобромида в качестве расщепляющего реагента необходимым является создание сильноокислой среды (например, pH 2, муравьиная кислота); однако при использовании трипсина в качестве расщепляющего агента оптимальной является слабощелочная среда (pH 8). В целом значение pH реакционной среды не должно изменять химическую структуру белка в ходе реакции расщепления и не должно изменяться в ходе проведения реакции фрагментации.

Температура. Для большинства реакций расщепления наиболее подходящей является температура в интервале от 25 °C до 37 °C. Создаваемая температура должна способствовать минимизации побочных химических реакций. Тип тестируемого протеина определяет выбор температуры реакционной среды, поскольку некоторые белки с повышением температуры склонны к денатурации. Например, расщепление рекомбинантного бычьего соматотропина проводится при температуре 4 °C, поскольку при более высокой температуре он осаждается в ходе проведения реакции расщепления.

Время. В случае если имеется достаточное количество тестируемого образца, следует провести испытание по определению времени, являющегося оптимальным для получения воспроизводимой карты и достаточным для проведения полного расщепления. Время расщепления варьируется от 2 ч до 30 ч. Реакция прекращается либо прибавлением кислоты, которая не оказывает влияния на полученную пептидную карту, либо замораживанием.

Количество используемого расщепляющего реагента. Для обеспечения достаточного быстрого расщепления (от 6 ч до 20 ч) используется избыточное количество расщепляющего реагента; тем не менее, его количество должно быть минимизировано, чтобы предотвратить вклад реагента в структуру пептидной карты. Обычно анализируемый протеин и реагент берут в соотношении 20:1 или 200:1. Для оптимизации процедуры расщепления рекомендуется добавлять расщепляющий агент в два или более этапов. При этом конечный объем реагирующей смеси должен оставаться достаточно небольшим для обеспечения следующего этапа пептидного картирования – разделения. Для того, чтобы исключить возможное влияние искажающих продуктов расщепления (артефактов) на

результаты последующего анализа, проводится контрольное определение со всеми реагентами за исключением анализируемого белка.

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ

Для разделения пептидных фрагментов используются различные методы. Выбор метода зависит от белка, для которого составляется пептидная карта. В таблице 2.2.55.-2 перечислены методы, которые на данном этапе успешно используются для разделения пептидных фрагментов при составлении пептидных карт. В данном разделе описывается один из методов хроматографического разделения – наиболее часто используемый метод обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Критическими факторами при ВЭЖХ разделении являются чистота растворителей и подвижной фазы. Для проведения обращенно-фазовой ВЭЖХ рекомендуется использование растворителей и воды степени чистоты «для ВЭЖХ». Растворенные газы являются проблемой для градиентных систем в тех случаях, когда растворимость газа в растворителе может быть меньше в смеси, чем в самом растворителе. В качестве эффективного способа дегазации может быть использована вакуумная дегазация и воздействие ультразвуком. В случае если твердые частицы в растворителе попадут в хроматографическую систему, они могут нарушить герметичность клапанов насоса или засорить верхнюю часть хроматографической колонки. В связи с этим рекомендуется проведение фильтрации до и после насоса.

Таблица 2.2.55.-2

Методы, используемые для разделения пептидных фрагментов

Обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография
Ионообменная хроматография
Хроматография гидрофобного взаимодействия
Полиакриламидный гель-электрофорез, неденатурирующий
Гель-электрофорез в полиакриламидных слоях с использованием мицеллярных систем (натрия додецилсульфат)
Капиллярный электрофорез
Бумажная электро-хроматография
Электрофорез на бумаге при высокой разности потенциалов

Хроматографическая колонка. Для каждого белка выбор колонки осуществляется эмпирически. Колонки с размером пор от 10 нм до 30 нм, заполненные сорбентом на основе силикагеля, могут обеспечить оптимальное разделение. Для более мелких пептидных фрагментов *силикагель октилсилильный для хроматографии P* (3–10 мкм) и *силикагель октадецилсилильный для хроматографии P* (3–10 мкм) в качестве наполнителей колонки являются более эффективными, чем *силикагель бутилсилильный для хроматографии P* (5–10 мкм).

Растворитель. Наиболее часто в качестве растворителя используется вода и ацетонитрил в качестве органического модификатора с добавлением не более 0,1 % кислоты трифторуксусной. При необходимости для повышения растворимости компонентов смеси прибавляют пропанол или 2-пропанол. Прибавление спиртов не должно приводить к чрезмерному повышению вязкости компонентов.

Подвижная фаза. Подвижная фаза, содержащая фосфатный буфер, используется для обеспечения возможности выбора pH, поскольку изменение pH в интервале от 3,0 до 5,0 улучшает разделение пептидов, содержащих кислотные остатки (например, глутаминовая и аспарагиновая кислоты). Натрия или калия фосфаты, ацетат аммония, фосфорная кислота при значении pH между 2 и 7 (или выше при использовании полимерного наполнителя) используются с ацетонитрильным градиентом. Достаточно часто используется ацетонитрил с трифторуксусной кислотой.

Градиент. Градиент может быть линейным, нелинейным или включать ступенчатое изменение состава. Для разделения сложных смесей рекомендуется низкая скорость изменения состава. Градиент оптимизируют, добиваясь четкого разрешения с одним или двумя пиками, которые становятся «маркерными» пиками для теста.

Изократическое элюирование. Изократическая ВЭЖХ с подвижной фазой постоянного состава используется ввиду ее удобства и улучшенного отклика детектора. В ряде случаев сложно подобрать оптимальный состав подвижной фазы, позволяющий добиться хорошего разрешения для каждого пика. Для проведения изократической ВЭЖХ не должны использоваться подвижные фазы, для которых незначительное изменение в соотношении компонентов или в значении pH существенно влияет на время удерживания пиков на пептидной карте.

Другие параметры. Для достижения хорошей воспроизводимости, как правило, требуется контроль температуры колонки. Скорость подвижной фазы варьируется от 0,1 мл/мин до 2,0 мл/мин, детектирование пептидов осуществляется спектрофотометрически детектором при длине волны от 200 нм до 230 нм. Используются и другие методы детектирования (например, постколоночная дериватизация), но они не столь надежны и универсальны, как детектирование в ультрафиолетовой области.

Валидация. В данном разделе приводятся экспериментальные средства для оценки общих характеристик используемого метода. Критерии оценки пригодности системы зависят от определения критических параметров испытания, влияющих на интерпретацию данных и их приемлемость. Критические параметры являются также критериями, по которым производится контроль расщепления и анализа пептидов. Для контроля полноты требуемого расщепления используется сравнение со стандартным образцом, который был подвергнут такому же воздействию, как и испытуемый белок. Использование стандартного образца параллельно с испытуемым белком является необходимым для разработки и установления значений критериев оценки пригодности системы. Кроме этого, с целью дополнительного сравнения включается образец хроматограммы стандартного образца. Другие показатели могут включать визуальный контроль растворимости белка или пептидов, отсутствие интактного белка, измерение откликов труднорасщепляемых пептидов. Критические параметры оценки пригодности системы для пептидного анализа будут зависеть от конкретного используемого метода разделения и детектирования, а также требований к получаемым в результате анализа данным.

В случае, когда пептидное картирование используется в качестве испытания по идентификации, требования к пригодности системы для идентифицируемых пептидов включают избирательность и воспроизводимость. В этом случае, как и в случае идентификации отличающихся по составу белков, определение первичной структуры пептидных фрагментов при картировании обеспечивает как верификацию известной первичной структуры, так и идентификацию структуры отличающихся белков путем сравнения с пептидной картой стандартного образца для белка установленной структуры. Использование подвергнутого расщеплению стандартного образца при определении разделения пептидов и аминокислот является референтным методом. Для анализа отличающихся по составу белков может быть использована охарактеризованная по составу смесь отличающегося белка и стандартного образца, в особенности если отличные по составу белки находятся в зоне худшего разрешения на пептидной карте. Критерием выбора системы определения структуры белка может являться число основных определяемых пептидов. Критерии выбора системы для определения структуры белка лучшим образом определяются разрешением пиков пептидов. Хроматографические параметры, такие как разрешение между пиками, ширина пика у основания, площадь пика, степень размывания заднего фронта пика и эффективность колонки, могут быть использованы для определения разрешения пептидов. В зависимости от испытуемого белка и используемого метода разделения могут устанавливаться требования к разрешению одного или нескольких пептидов.

Повторный анализ продуктов расщепления стандартного образца для испытуемого белка позволяет установить количественные характеристики прецизионности и открываемости. Открываемость определяемых пептидов в целом устанавливается при помощи внутренних и внешних пептидных стандартов. Прецизионность выражается как относительное стандартное отклонение. Следует ожидать различий в извлечении и воспроизводимости идентифицируемого протеина; следовательно, критерии допуска для оценки пригодности системы должны быть установлены как для извлечения, так и для

воспроизводимости идентифицируемых пептидов. Установленные критерии допуска являются специфическими для данного протеина и указываются в частных статьях.

Визуальное сравнение относительных времен удерживания, параметров пиков (площади пика или высоты пика), числа пиков и в целом метода элюирования производится изначально. Оно дополняется и подтверждается математическим анализом соотношений анализируемых параметров пиков и хроматографического профиля смеси 1:1 (об/об) продуктов расщепления испытуемого образца и образца сравнения. Идентичность анализируемого образца подтверждается, если все пики продуктов расщепления анализируемого белка и стандартного образца имеют аналогичные времена удерживания и соотношения оцениваемых параметров пиков.

Если пики, которые изначально характеризовались значительно различающимися временами удерживания, затем в смеси 1:1 обнаруживались единым пиком, изначально выявленное различие является показателем нестабильности системы. Однако если в смеси 1:1 наблюдаются разделенные пики, это является доказательством наличия различных пептидов в каждом из пиков. Если пик в смеси 1:1 существенно шире, чем соответствующий пик в анализируемом белке и стандартном образце, это может означать наличие различных пептидов. Было предложено использование компьютерной программы распознавания для анализа данных пептидного картирования, однако аспекты валидации компьютерной программы исключают ее использование в качестве справочного теста в ближайшем будущем. Использовались также иные автоматизированные подходы с использованием математических формул, моделей и систем распознавания. Одним из таких подходов, например, является автоматическое определение соединений методом ИК-спектроскопии и применение диодно-матричного УФ-спектрального анализа для идентификации пептидов. Данные методы имеют ограничения, обусловленные недостаточным разрешением, одновременным элюированием фрагментов, различиями в абсолютных значениях параметров пиков между продуктами расщепления анализируемого и стандартных образцов.

Можно произвести множественное сравнение времен удерживания и площадей или высоты пиков для выбранной группы соответствующих пиков, которые правильно идентифицируются на пептидной карте. Площади пиков могут быть рассчитаны с использованием одного пика, демонстрирующего относительно небольшую вариабельность в качестве внутреннего стандарта, с учетом того, что интегрирование площади пика является чувствительным к базовой вариабельности и может служить причиной ошибки анализа. Как альтернативный вариант для испытуемого образца может быть рассчитан процент высоты пика каждого пептида относительно суммы высоты всех пиков. Затем полученный процент сравнивается со значением аналогичного параметра соответствующего пика стандартного образца. Возможность автогидролиза трипсина контролируется при помощи создания пептидной карты-плацебо, получаемой при обработке трипсином раствора без определяемого белка.

Минимальным требованием для оценки качества пептидного картирования является принятая процедура тестирования, которая включает пригодность системы в качестве контроля. В целом на начальном этапе регуляторного процесса качественный анализ пептидной карты анализируемого белка является достаточным. С усовершенствованием процесса регуляторного одобрения белков дополнительные испытания по оценке качества могут включать частичную валидацию аналитической процедуры для обеспечения гарантии того, что метод будет произведен в соответствии с запланированным при разработке пептидной карты определяемого белка.

АНАЛИЗ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПЕПТИДОВ

В данном разделе приводится руководство по использованию метода составления пептидных карт при разработке частных фармакопейных статей и нормативных документов по контролю качества (НД) при регистрации лекарственных средств.

Использование метода составления пептидных карт в качестве метода качественного определения не требует подробной характеристики индивидуальных пептидных пиков. Однако валидация метода составления пептидных карт при разработке частных фармакопейных статей и НД требует исчерпывающей характеристики каждого из

индивидуальных пиков пептидной карты. Для характеристики индивидуальных пиков могут быть использованы как метод *N*-концевого секвенирования с последующим анализом аминокислот, так и метод с использованием масс-спектропии. В случаях, когда для составления характеристики используется метод *N*-концевого секвенирования с последующим анализом аминокислот, аналитическое разделение масштабируют для целей препаративного разделения. Необходимо убедиться на основании эмпирических данных, что ухудшения разрешения между пиками вследствие проведения масштабирования не происходит. Элюаты, соответствующие специфическим пептидным пикам, собирают, концентрируют в вакууме и, при необходимости, повторно хроматографируют. Аминокислотный анализ фрагментов может быть ограничен размером пептидов. В случае если *N*-концевая аминокислота заблокирована, может потребоваться ее высвобождение до секвенирования. С целью получения характеристики может также использоваться *C*-концевое секвенирование белков в комбинации с карбоксипептидазой и методом матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации с времяпролетным масс-анализатором (*MALDI-TOF*).

Использование масс-спектропии для характеристики пептидных фрагментов производится либо путем непосредственного введения выделенных пептидов, либо с использованием *on-line* системы ВЭЖХ с масс-спектрометром для структурного анализа. В целом он включает электрораспыление и *MALDI-TOF* масс-спектрометрию, а также бомбардировку быстрыми атомами. Тандемная масс-спектропия также используется для определения последовательности модифицированных белков и для определения типа произошедшей аминокислотной модификации. Определение расположения дисульфидных связей в различных сульфгидрил-содержащих пептидах может быть произведено методом сравнения масс-спектров продукта расщепления до и после восстановления. Если некоторые части первичной структуры не могут быть достаточно четко отражены пептидной картой, может потребоваться составление вторичной пептидной карты. Целью валидированного метода характеристики протеина методом пептидного картирования является определение как минимум 95 % теоретического состава структуры белка.

01/2013:20256

2.2.56. АНАЛИЗ АМИНОКИСЛОТ

Анализ аминокислот – это комплекс методов, используемых для определения аминокислотного состава или количественного содержания аминокислот в белках, пептидах и лекарственных средствах. Белки и пептиды являются макромолекулами, состоящими из ковалентно связанных остатков аминокислот, которые образуют линейные полимеры. Последовательность аминокислот в белках или пептидах определяет свойства молекулы. Белки представляют собой крупные молекулы, которые обычно существуют в виде трехмерных структур со специфической конформацией, в то время как пептиды имеют меньший размер и могут состоять только из нескольких аминокислот. Анализ аминокислот может быть использован для количественного определения белков и пептидов, определения подлинности белков или пептидов на основе их аминокислотного состава, структурного анализа белков и пептидов, для оценки стратегий расщепления для пептидных остатков и для обнаружения атипичных аминокислот, которые могут присутствовать в белках или пептидах. Перед анализом аминокислот необходимо гидролизовать белки/пептиды до получения отдельных аминокислотных составляющих. После гидролиза белков/пептидов процесс анализа аминокислот может быть таким же, как и для свободных аминокислот в других лекарственных средствах. Аминокислотные составляющие испытуемого образца обычно подвергаются химической модификации (или дериватизации) для анализа.

ОБОРУДОВАНИЕ

Методы, используемые для анализа аминокислот, обычно основаны на хроматографическом разделении аминокислот, присутствующих в испытуемом образце. Современные методики анализа основаны на использовании автоматизированных хроматографических приборов для решения аналитических задач. В качестве прибора для

анализа аминокислот обычно используют жидкостный хроматограф низкого или высокого давления, способный создавать градиентное элюирование подвижной фазой, что обеспечивает разделение анализируемых аминокислот на хроматографической колонке. Если анализ образца не осуществляется с использованием предколоночной дериватизации, прибор должен иметь устройство для постколоночной дериватизации. В качестве детектора обычно используется спектрофотометрический детектор в ультрафиолетовой/видимой области или флуоресцентный детектор в зависимости от используемого метода дериватизации. Регистрирующее устройство (например, интегратор) используется для преобразования аналогового сигнала из детектора и для проведения количественных вычислений. Предпочтительно, чтобы прибор использовался исключительно для анализа аминокислот.

ОСНОВНЫЕ МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

При выполнении анализа аминокислот аналитик всегда должен учитывать возможность фоновое загрязнение. Необходима высокая степень чистоты реактивов (например, низкая чистота кислоты хлористоводородной может способствовать загрязнению глицина). Аналитические реактивы должны меняться регулярно каждые несколько недель, при этом должны использоваться только растворители класса «для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)». Возможное загрязнение микроорганизмами и посторонними частицами, которые могут присутствовать в растворителях, устраняется путем фильтрования этих растворителей перед применением, хранением растворителей в закрытых емкостях и проведением анализа с защитой от прямого солнечного света.

Качество анализа аминокислот определяется лабораторной практикой. Приборы размещают в местах наименьшего передвижения персонала. Лабораторию содержат в чистоте. Очищают и калибруют пипетки согласно графику. Наконечники пипеток хранят в закрытой коробке; аналитикам не позволяется трогать их руками. Аналитик должен использовать неприпудренные латексные или аналогичные перчатки. Ограничивают число открытий и закрытий виалы с испытуемым образцом, так как пыль может приводить к завышению результатов по содержанию глицина, серина и аланина.

Для получения удовлетворительных результатов анализа аминокислот прибор необходимо обслуживать надлежащим образом. Если прибор используется по стандартной программе, он должен ежедневно проверяться на отсутствие течи, на стабильную работу детектора и ламп и на способность колонки поддерживать необходимую степень разделения индивидуальных аминокислот. Согласно графику проводят очистку или замену всех фильтров прибора и другое техническое обслуживание.

СТАНДАРТНЫЕ ОБРАЗЦЫ

Необходимые стандартные образцы аминокислот для проведения анализа аминокислот коммерчески доступны и обычно представляют собой водный раствор смеси аминокислот. При определении аминокислотного состава наряду с испытуемым образцом анализируются стандартные образцы белков или пептидов, которые используются в качестве контроля для подтверждения полноты всего процесса. Для этой цели в качестве стандартного образца белка используют высокоочищенный бычий сывороточный альбумин.

ГРАДУИРОВКА ОБОРУДОВАНИЯ

Градуировка оборудования для анализа аминокислот обычно включает анализ стандартного образца аминокислот, который состоит из смеси аминокислот, при разных концентрациях для определения величины отклика и рабочего диапазона концентраций для каждой аминокислоты. Концентрация каждой аминокислоты в стандартном образце известна. В процессе градуировки при выполнении анализа аминокислот стандартный образец разводят до различных концентраций анализируемого вещества в пределах ожидаемой области линейности согласно используемой аналитической методике. Затем анализируют растворы с различными концентрациями анализируемого вещества. По оси ординат наносят площади пиков каждой аминокислоты, а по оси абсцисс –

соответствующие известные концентрации каждой аминокислоты с учетом разведений. Эти результаты позволяют определить область концентраций аминокислот, в которой зависимость площади пика данной аминокислоты от ее концентрации является линейной функцией. Важно, чтобы образцы для анализа аминокислот были приготовлены таким образом, чтобы концентрации аминокислот в этих образцах находились в пределах аналитических границ (т.е. в рабочей линейной области) используемой методики с целью получения точных и воспроизводимых результатов.

Для определения коэффициента отклика каждой аминокислоты анализируют от 4 до 6 концентраций стандартного образца. Коэффициент отклика рассчитывается как средняя площадь или высота пика в расчете на наномоль (10^{-9} моль) аминокислоты, представленной в стандартном образце. Коэффициенты отклика каждой аминокислоты используют для расчета концентрации каждой аминокислоты, представленной в испытуемом образце. Количество вещества (наномоль) анализируемой аминокислоты рассчитывают путем деления площади пика, соответствующего данной аминокислоте, на коэффициент отклика этой аминокислоты. Для рутинного анализа может быть достаточно градуировки по одной точке; при этом градуировка по коэффициентам отклика каждой аминокислоты должна часто обновляться и проверяться для контроля достоверности.

ПОВТОРЯЕМОСТЬ

Полный анализ аминокислот требует от аналитической лаборатории контроля повторяемости результатов количественного определения. Во время хроматографического разделения аминокислот или их производных на хроматограмме наблюдается множество пиков, относящихся к аминокислотам. Большое количество пиков делает необходимым наличие программного обеспечения, способного неоднократно идентифицировать пики, основываясь на времени удерживания, и интегрировать площади пиков для количественных расчетов. Типичная оценка повторяемости включает приготовление стандартного раствора аминокислот и анализ многократных повторных вводов пробы (например, 6 или более повторных вводов) одного и того же стандартного раствора. Относительное стандартное отклонение (*RSD*) определяют для времени удерживания и интегрированной площади пика каждой аминокислоты. Оценку повторяемости дополняют включением многократных количественных определений, проводимых в течение нескольких дней разными аналитиками. Многократные количественные определения включают приготовление стандартных разведений из исходных материалов для определения различий результатов, возникающих из-за манипуляций с образцом. При оценке повторяемости часто проводят анализ аминокислотного состава стандартного образца белка (например, бычий сывороточный альбумин). На основе оценки относительных стандартных отклонений (*RSD*) лаборатория рассчитывает аналитические пределы для подтверждения того, что анализы в данной лаборатории проведены надлежащим образом. Для гарантирования наилучших результатов желательно установить наименьшие практические пределы отклонений. Факторы, на которые следует обратить внимание для уменьшения отклонений в результатах анализа аминокислот, включают приготовление образца, высокие фоновые спектральные помехи из-за качества реактивов и/или из-за лабораторных манипуляций, работу и обслуживание приборов, анализ и интерпретацию данных, профессиональные качества аналитика и его состояние. Все параметры, о которых идет речь, должны всесторонне исследоваться в рамках проведения валидации.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦА

Точные результаты анализа аминокислот требуют использования очищенных образцов белков и пептидов. Компоненты буфера (например, соли, мочевины, детергенты) могут повлиять на анализ аминокислот и должны удаляться из образца перед анализом. Методики, которые используют постколоночную дериватизацию аминокислот, обычно зависят от влияния компонентов буфера в меньшей степени, чем методики с предколоночной дериватизацией. Для уменьшения потенциально возможного фонового загрязнения, улучшения открываемости анализируемого вещества и уменьшения трудоемкости число операций с образцом желательно ограничить. Общие технические

приемы, которые используются для удаления компонентов буфера из образцов белка, включают следующие методы: (1) введение образца белка в обращенно-фазовую систему ВЭЖХ, удаление белка с помощью летучего растворителя, содержащего достаточное количество органического компонента, и высушивание образца в вакуумной центрифуге; (2) диализ с летучим буферным раствором или водой; (3) ультрафильтрационное центрифугирование для замены буфера летучим буферным раствором или водой; (4) осаждение белка из буферного раствора с использованием органического растворителя (например, ацетона); (5) гель-фильтрация.

ВНУТРЕННИЕ СТАНДАРТЫ

В ходе аминокислотного анализа рекомендуется использовать внутренний стандарт для контроля физических и химических потерь и колебаний результатов. Перед гидролизом к раствору белка может быть прибавлено точно известное количество внутреннего стандарта. Открываемость внутреннего стандарта указывает на общую открываемость аминокислот белкового раствора. Однако свободные аминокислоты ведут себя иначе, чем аминокислоты белка во время гидролиза, скорость высвобождения которых всегда разная. Поэтому использование внутреннего стандарта для введения поправки на потери в ходе гидролиза может давать ненадежные результаты, что необходимо учитывать при их интерпретации. Внутренние стандарты также могут быть добавлены к смеси аминокислот после гидролиза для введения поправки на различия во введениях пробы образца, на изменяющуюся стабильность реактивов и на отклонения скорости подвижной фазы. В идеальном случае в качестве внутреннего стандарта используют коммерчески доступную аминокислоту, которая отличается от природных аминокислот. Кроме того, внутренний стандарт должен быть стабильным в ходе гидролиза, его коэффициент отклика должен иметь линейную зависимость от концентрации и выходить из хроматографической колонки со свойственным только этому стандарту временем удерживания без перекрывания пиков других аминокислот. Наиболее часто используемые стандартные образцы аминокислот включают норлейцин, нитротирозин и α -аминомасляную кислоту.

ГИДРОЛИЗ БЕЛКОВ

Для анализа аминокислот белков и пептидов необходимо проводить гидролиз. Лабораторная посуда, используемая для проведения гидролиза, должна быть очень чистой. Опудривающий порошок перчаток, а также отпечатки пальцев на посуде, в которой проводится гидролиз, могут привести к загрязнению. Для очистки стеклянных пробирок для проведения гидролиза используют кипячение в течение 1 ч в 1 М растворе кислоты хлористоводородной или замачивание в концентрированной азотной кислоте или в смеси из равных объемов концентрированных хлористоводородной и азотной кислот. Чистые пробирки, используемые для гидролиза, промывают водой высокоочищенной, затем ополаскивают метанолом для хроматографии, высушивают в течение ночи в сушильном шкафу и хранят в закрытом состоянии вплоть до использования. Для удаления загрязнения из пробирок, которые используются для гидролиза, также можно использовать прокалывание чистой стеклянной посуды при температуре 500 °C в течение 4 ч. Допускается использование соответствующих одноразовых лабораторных принадлежностей.

Кислотный гидролиз является наиболее часто используемым методом для расщепления белка в образце перед анализом аминокислот. Метод кислотного гидролиза может повлиять на отклонение результатов анализа из-за полного или частичного разрушения некоторых аминокислот: триптофан разрушается, серин и треонин частично разрушаются, метионин может подвергаться окислению, а цистеин обычно определяется как цистин (но открываемость цистина обычно низкая вследствие частичного разрушения или восстановления до цистеина). Применение соответствующего вакуума (менее 200 мкм ртутного столба, или 26,7 Па) или введение инертного газа (аргона) в пространство реакционного сосуда может уменьшить степень окислительной деструкции. Пептидные связи изолейцин-изолейцин, валин-валин, изолейцинвалин и валин-изолейцин расщепляются частично; аспарагин и глутамин дезамидируются с образованием соответственно аспарагиновой и глутаминовой кислот. Потеря триптофана, аспарагина и

глутамин в ходе кислотного гидролиза ограничивает количественное определение до 17 аминокислот. Некоторые из описанных ниже методов кислотного гидролиза используются для решения этих задач. Некоторые методы гидролиза (например, методы 4–11) могут приводить к превращениям в другие аминокислоты. Поэтому преимущества использования конкретной методики оцениваются относительно задач, решаемых с ее помощью, и всесторонне изучаются перед выбором методики, отличающейся от обычного кислотного гидролиза.

Для определения исходной концентрации аминокислот, которые частично разрушаются или медленно отщепляются, часто используют исследование гидролиза во времени (анализ аминокислот при кислотном гидролизе в течение 24 ч, 48 ч и 72 ч). Путем построения графика зависимости найденной концентрации частично разрушающихся (лабильных) аминокислот (например, серина и треонина) от времени гидролиза и экстраполяции полученной кривой к началу координат определяют исходную концентрацию этих аминокислот. Концентрацию остатков аминокислот, которые медленно отщепляются (например, изолейцин и валин), принимают равной высоте плато на полученном графике зависимости концентрации остатков от времени гидролиза. Если гидролиз будет протекать слишком долго, концентрация аминокислот в образце начнет уменьшаться, что укажет на их разрушение при данных условиях гидролиза.

Приемлемая альтернатива исследованию гидролиза во времени – подвергнуть стандарт аминокислот с известными концентрациями таким же условиям гидролиза, как и в случае с испытуемым образцом. Однако аминокислоты в свободном состоянии могут не в полной мере отражать превращения, происходящие в ходе гидролиза: степень разрушения лабильных аминокислот, находящихся в составе пептидов или белков, и, в особенности, степень расщепления медленно расщепляемых связей (например, связи изолейцин-валин). Эта методика позволяет аналитику учесть лишь некоторую часть разрушающихся аминокислот. Возможно применение кислотного гидролиза с использованием микроволнового излучения, который отличается быстротой, но требует специального оборудования, а также специальных мер предосторожности. Оптимальные условия гидролиза с использованием микроволнового излучения должны быть установлены для каждого отдельного белкового/протеинового образца. Микроволновый гидролиз обычно протекает в течение нескольких минут, но отклонение даже в одну минуту может привести к неудовлетворительным результатам (например, неполный гидролиз или разрушение лабильных аминокислот). Полный протеолиз с применением смеси протеаз может быть слишком сложным, он требует надлежащего контроля и обычно более подходит для пептидов, чем для белков.

Для определения оптимальных условий в ходе первоначального анализа белка неизвестного состава проводятся эксперименты с различными временами гидролиза и при разных температурных режимах.

МЕТОД 1

Для гидролиза используется кислота хлористоводородная, содержащая фенол, – это наиболее общая процедура, используемая для гидролиза белка/пептида при анализе аминокислот. Добавление фенола предупреждает реакцию галогенирования тирозина.

Гидролизный раствор. 6 М кислота хлористоводородная, содержащая от 0,1 % до 1,0 % фенола.

Методика.

Жидкофазный гидролиз. Образец белка или пептида помещают в гидролизную ампулу и высушивают (образец высушивают для того, чтобы вода в образце не разводила кислоту, используемую для гидролиза). Прибавляют гидролизный раствор из расчета 200 мкл на 500 мкг лиофилизированного белка. Образец в ампуле замораживают в бане с сухим льдом и ацетоном и запаивают в вакууме при помощи пламени. Образцы обычно гидролизуют при температуре 110 °С в течение 24 ч в вакууме или в атмосфере инертного газа для предотвращения окисления. Если есть подозрения, что испытуемый белок полностью не гидролизует, рассматривают возможность проведения гидролиза в течение более длительного времени (например, 48 ч и 72 ч).

Парофазный гидролиз. Это один из наиболее общих методов кислотного гидролиза. Он предпочтителен для микроанализа, когда доступны лишь небольшие количества образца. При использовании парофазного гидролиза контаминация образца кислотными реактивами минимальна. Контейнеры с сухими образцами помещают в сосуд, содержащий подходящее количество гидролизного раствора. Гидролизный раствор не должен контактировать с испытуемым образцом. В свободном пространстве сосуда используют атмосферу инертного газа или вакуум (менее 200 мкм ртутного столба, или 26,7 Па) и для проведения гидролиза нагревают при температуре около 110 °С в течение 24 ч. Пары кислоты гидролизуют сухой образец. Возможность конденсации кислоты в контейнере с образцом должна быть сведена к минимуму. После гидролиза испытуемый образец высушивают в вакууме до удаления остатков кислоты.

МЕТОД 2

Использование меркаптоэтансульфоновой кислоты в качестве восстанавливающей кислоты уменьшает окисление триптофана в процессе гидролиза.

Гидролизный раствор. 2,5 М раствор меркаптоэтансульфоновой кислоты.

Парофазный гидролиз. От 1 мкг до 100 мкг испытуемого белка/пептида высушивают в гидролизной ампуле. Гидролизную ампулу помещают в большую ампулу, содержащую около 200 мкл гидролизного раствора. Герметично запаивают большую ампулу в вакууме (около 50 мкм ртутного столба, или 6,7 Па). Нагревают гидролизную ампулу до температуры от 170 °С до 185 °С в течение 12,5 мин. После гидролиза гидролизную ампулу высушивают в вакууме в течение 15 мин до удаления остатков кислоты.

МЕТОД 3

Использование тиогликолевой кислоты (ТГК) в качестве восстанавливающей кислоты предотвращает окисление триптофана при гидролизе.

Гидролизный раствор. 7 М раствор кислоты хлористоводородной, содержащий 1 % фенола, 10 % кислоты трифторуксусной и 20 % кислоты тиогликолевой.

Парофазный гидролиз. От 10 мкг до 50 мкг испытуемого белка/пептида высушивают в гидролизной ампуле. Гидролизную ампулу помещают в большую ампулу, содержащую около 200 мкл гидролизного раствора. Герметично запаивают большую ампулу в вакууме (около 50 мкм ртутного столба, или 6,7 Па). Нагревают гидролизную ампулу до температуры 166 °С в течение 15–30 мин. После гидролиза гидролизную ампулу высушивают в вакууме в течение 5 мин до удаления остатков кислоты. Окрываемость триптофана в этом методе зависит от количества испытуемого образца.

МЕТОД 4

Перед гидролизом белка проводят окисление цистеина/цистина и метионина кислотой надмуравьиной.

Окисляющий раствор. Смешивают 1 объем раствора пероксида водорода (30 %) и 9 объемов кислоты муравьиной безводной и выдерживают при комнатной температуре в течение 1 ч. Полученную кислоту надмуравьиную используют свежеприготовленной.

Методика. Образец белка/пептида растворяют в 20 мкл кислоты муравьиной безводной, нагревают при температуре 50 °С в течение 5 мин и прибавляют 100 мкл окисляющего раствора. Процесс окисления проводят в течение 10–30 мин. В этой реакции цистеин превращается в цистеиновую кислоту, а метионин – в метионин-сульфон. Избыток реактива удаляют из образца при помощи вакуумного центрифугирования. Окисленный белок может быть затем гидролизован по методу 1 или методу 2. При наличии галогенидов эта методика может приводить к модификации остатков тирозина.

МЕТОД 5

Окисление цистеина/цистина происходит во время жидкофазного гидролиза с натрия азидом.

Гидролизный раствор. К 6 М раствору кислоты хлористоводородной, содержащей 0,2 % фенола, прибавляют натрия азид до получения конечной концентрации 2 г/л. Прибавление фенола предотвращает галогенирование тирозина.

Жидкофазный гидролиз. Гидролиз белка/ пептида проводят при температуре около 110 °С в течение 24 ч. Во время гидролиза присутствующий в образце цистеин/цистин превращается в кислоту цистеиновую под воздействием натрия азиды, содержащегося в гидролизном растворе. Эта методика приводит к лучшей открываемости тирозина, чем метод 4, но она не подходит для количественного определения метионина. Метионин превращается в смесь из метионина и двух продуктов его окисления – метионинсульфоксида и метионинсульфона.

МЕТОД 6

Окисление цистеина/цистина происходит под воздействием диметилсульфоксида (ДМСО).

Гидролизный раствор. К раствору 6 М кислоты хлористоводородной, содержащей от 0,1 % до 1,0 % фенола, прибавляют ДМСО до получения раствора с конечной концентрацией 2 % (об/об).

Парофазный гидролиз. Гидролиз белка/пептида проводят при температуре около 110 °С в течение 24 ч. Во время гидролиза присутствующий в образце цистеин/цистин превращается в кислоту цистеиновую под воздействием ДМСО, содержащегося в гидролизном растворе. С целью ограничения разброса данных и компенсации частичного разрушения рекомендуется оценивать открываемость цистеиновой кислоты при окислительном гидролизе стандартного образца белка, содержащего 1–8 остатков цистеина. Коэффициент отклика гидролизата белка/пептида обычно на 30 % ниже, чем для негидролизованного стандартного образца цистеиновой кислоты. Так как гистидин, метионин, тирозин и триптофан также модифицируются, полный анализ состава при использовании этой методики невозможен.

МЕТОД 7

Восстановление и алкилирование цистеина/цистина происходит при пиридилэтилировании в паровой фазе.

Восстанавливающий раствор. 83,3 мкл пиридина, 16,7 мкл 4-винилпиридина, 16,7 мкл трибутилфосфина и 83,3 мкл воды помещают в подходящий контейнер и перемешивают.

Методика. Гидролизную ампулу с образцом белка/пептида (от 1 мкг до 100 мкг) помещают в большую ампулу. Переносят восстанавливающий раствор в большую ампулу, герметично запаивают в вакууме (около 50 мкм ртутного столба, или 6,7 Па) и нагревают при температуре около 100 °С в течение 5 мин. Затем внутреннюю гидролизную ампулу помещают в вакуумный эксикатор и высушивают в течение 15 мин для удаления остатков реактивов. Пиридилэтилированный образец затем гидролизуют согласно описанной ранее методике. Для оценки открываемости пиридилэтилцистеина параллельно проводят реакцию пиридилэтилирования стандартного образца белка, содержащего 1–8 остатков цистеина. Длительное время инкубации при реакции пиридилэтилирования может быть причиной модификации конечных α-аминогрупп и ε-аминогрупп лизина в белке.

МЕТОД 8

Восстановление и алкилирование цистеина/цистина происходит при пиридилэтилировании в жидкой фазе.

Исходные растворы. Готовят и фильтруют 3 раствора: 1 М раствор трис-гидрохлорида с рН 8,5, содержащий 0,004 М динатрия эдетата (исходный раствор А); 8 М раствор гуанидина гидрохлорида (исходный раствор В); и 10 % раствор 2-меркаптоэтанола (исходный раствор С).

Восстанавливающий раствор. Для получения буферного раствора 6 М раствора гуанидина гидрохлорида в 0,25 М растворе трис-гидрохлорида смешивают 1 объем исходного раствора А и 3 объема исходного раствора В.

Методика. Около 10 мкг испытуемого образца растворяют в 50 мкл восстанавливающего раствора и прибавляют около 2,5 мкл исходного раствора С. Выдерживают при комнатной температуре в защищенном от света месте в атмосфере азота или аргона в течение 2 ч. Для проведения реакции пиридинэтилирования к раствору белка прибавляют около 2 мкл 4-винилпиридина и выдерживают дополнительно 2 ч при комнатной температуре в защищенном от света месте. Обессоливают белок/пептид методом обращенно-фазовой ВЭЖХ, собирая белковую/пептидную фракцию. Перед кислотным гидролизом собранный образец может быть высушен при помощи вакуумного центрифугирования.

МЕТОД 9

Восстановление и алкилирование цистеина/цистина происходит при карбоксиметилировании в жидкой фазе.

Исходные растворы. Готовят, как указано в методе 8.

Карбоксиметилирующий раствор. Готовят раствор 100 г/л йодацетамида в 96 % спирте.

Буферный раствор. Используют восстанавливающий раствор, приготовленный, как указано в Методе 8.

Методика. Испытуемый образец растворяют в 50 мкл буферного раствора и прибавляют около 2,5 мкл исходного раствора С. Выдерживают при комнатной температуре в защищенном от света месте в атмосфере азота или аргона в течение 2 ч. Прибавляют карбоксиметилирующий раствор в 1,5-кратном количестве от общего теоретического содержания тиолов и выдерживают дополнительно в течение 30 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте. Если содержание тиолов в белке неизвестно, прибавляют 5 мкл 0,1 М раствора йодацетамида на каждые 20 наномоль испытуемого образца белка. Для прекращения реакции прибавляют избыток 2-меркаптоэтанола. Обессоливают белок/ пептид методом обращенно-фазовой ВЭЖХ, собирая белковую/пептидную фракцию. Перед кислотным гидролизом собранный образец может быть высушен при помощи вакуумного центрифугирования. В процессе кислотного гидролиза полученный S-карбоксамидометилцистеин будет превращаться в S-карбоксиметилцистеин.

МЕТОД 10

Цистеин/цистин, прореагировавший с дитиогликолевой кислотой или дитиодипропионовой кислотой, образует смешанный дисульфид. Выбор дитиогликолевой кислоты или дитиодипропионовой кислоты зависит от требуемого разделения при анализе аминокислот.

Восстанавливающий раствор. Раствор 10 г/л дитиогликолевой кислоты (или дитиодипропионовой кислоты) в 0,2 М растворе натрия гидроксида.

Методика. Около 20 мкг испытуемого образца помещают в гидролизную ампулу и прибавляют 5 мкл восстанавливающего раствора. Прибавляют 10 мкл изопропилового спирта и удаляют всю жидкость из образца при помощи вакуумного центрифугирования. Образец гидролизуют, используя метод 1. Преимущество данного метода заключается в том, что другие остатки аминокислот не участвуют в побочных реакциях, а образец не нуждается в обессоливании перед гидролизом.

МЕТОД 11

Аспарагин и глутамин в процессе кислотного гидролиза превращаются в аспарагиновую кислоту и глутаминовую кислоту соответственно. Остатки аспарагина и аспарагиновой кислоты обозначают как *Asx*, а остатки глутамина и глутаминовой кислоты обозначают как *Glx*. Белки/пептиды могут реагировать с бис(1,1-трифторацетокси)йодбензолом (*BTI*), превращая при гидролизе остатки аспарагина и глутамина в остатки диаминопропионовой кислоты и диаминамасляной кислоты соответственно. Эти превращения позволяют определять в белке/пептиде содержание аспарагина и глутамина в присутствии остатков аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты.

Восстанавливающие растворы. Готовят и фильтруют 3 раствора: 0,01 М раствор трифторуксусной кислоты (раствор А); 5 М раствор гуанидина гидрохлорида, содержащий 0,01 М трифторуксусной кислоты (раствор В); свежеприготовленный раствор диметилформамида, содержащий 36 мг/мл *BTI* (раствор С).

Методика. Около 200 мкг испытуемого образца помещают в чистую гидролизную ампулу и прибавляют 2 мл раствора А или раствора В и 2 мл раствора С. Герметично запаивают гидролизную ампулу в вакууме. Испытуемый образец нагревают при температуре 60 °С в течение 4 ч в защищенном от света месте. Затем образец диализируют водой для удаления избытка реактивов. Диализированный образец трижды экстрагируют равными объемами бутилацетата и лиофилизируют. Белок может быть затем гидролизован согласно описанной ранее методике. Остатки α,β -диаминопропионовой кислоты и α,γ -диаминомасляной кислоты обычно не отделяются от остатков лизина ионообменной хроматографией, используемой при анализе аминокислот. Таким образом, при использовании ионного обмена в качестве метода разделения при анализе аминокислот содержание аспарагина и глутамина представляет собой разницу между количественным содержанием аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты, полученным при кислотном гидролизе без дериватизации и полученным при кислотном гидролизе с *BTI*-дериватизацией. Количественное содержание треонина, метионина, цистеина, тирозина и гистидина может быть изменено при *BTI*-дериватизации; при необходимости определения этих аминокислотных остатков белка/пептида следует проводить гидролиз без *BTI*-дериватизации.

МЕТОДОЛОГИЯ АНАЛИЗА АМИНОКИСЛОТ: ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ

Существует множество способов анализа аминокислот. Выбор конкретного способа зачастую определяется требуемой чувствительностью количественного определения. В целом около половины применяемых способов анализа аминокислот основаны на разделении свободных аминокислот посредством ионообменной хроматографии с последующей постколоночной дериватизацией (например, с нингидрином или *o*-фталевым альдегидом). Метод постколоночной дериватизации может быть использован для образцов, содержащих небольшое количество буферных компонентов (таких как соли и мочевины), и обычно требует от 5 мкг до 10 мкг испытуемого образца белка для проведения одного анализа. Остальные способы анализа аминокислот обычно включают предколоночную дериватизацию свободных аминокислот (например, с фенилизотиоцианатом; с 6-аминохинолил-*N*-гидроксисукцинимидилкарбаматом или *o*-фталевым альдегидом; с (диметиламино)азобензолсульфонилхлоридом; с 9-фторенилметилхлорформиатом; с 7-фтор-4-нитробензо-2-окса-1,3-диазолом) с последующим обращенно-фазовым ВЭЖХ анализом. Метод предколоночной дериватизации отличается высокой чувствительностью (обычно требуется от 0,5 мкг до 1,0 мкг испытуемого образца белка для проведения одного анализа), однако на него могут оказывать влияние компоненты солевого буфера, содержащиеся в испытуемом образце. В результате предколоночной дериватизации могут образовываться множественные производные одной аминокислоты, что приводит к усложнению интерпретации результатов.

Для количественного анализа аминокислот могут быть использованы приведенные ниже методы. Приборы и реактивы для проведения этих испытаний коммерчески доступны. Кроме того, многие из этих методов имеют модификации с различным приготовлением реактивов, проведением химических реакций, различными хроматографическими системами и так далее. Специфические параметры могут отличаться в зависимости от конкретного оборудования и методики выполнения анализа. Многие лаборатории используют более одной методики анализа аминокислот, так как каждая из них имеет свои преимущества. В каждой из этих методик аналоговый сигнал обнаруживается с помощью детектора, а площади пиков используются для количественного определения.

МЕТОД 1. ПОСТКОЛОНОЧНАЯ ДЕРИВАТИЗАЦИЯ С НИНГИДРИНОМ

Ионообменная хроматография с постколоночной дериватизацией с нингидрином является одним из наиболее распространенных методов, предназначенных для количественного анализа аминокислот. Как правило, для анализа большинства сложных

физиологических образцов пригодной является катионообменная система на основе ионов лития, а катионообменная система на основе ионов натрия используется для более простых смесей аминокислот, полученных при гидролизе белков (обычно 17 аминокислот). Разделение аминокислот на ионообменной колонке достигается подбором pH и ионной силы. Для улучшения разделения часто используют температурный градиент.

При взаимодействии аминокислоты с нингидрином образуется продукт с характерным фиолетовым или желтым цветом. Аминокислоты, за исключением иминокислот, образуют продукт фиолетового цвета, имеющий максимум поглощения при 570 нм. Иминокислоты, такие как пролин, образуют продукт желтого цвета, имеющий максимум поглощения при 440 нм.

Продукты постколоночной реакции между нингидрином и элюируемыми из колонки аминокислотами детектируются при длинах волн 440 нм и 570 нм, а полученная хроматограмма используется для определения аминокислотного состава.

Предел обнаружения для большинства производных аминокислот обычно составляет 10 пикомоль, а для производных пролина – 50 пикомоль. Линейность отклика наблюдается в области 20–500 пикомоль с коэффициентом корреляции более 0,999. Для получения удовлетворительных данных рекомендуется перед гидролизом использовать образцы массой более 1 мкг.

МЕТОД 2. ПОСТКОЛОНОЧНАЯ ДЕРИВАТИЗАЦИЯ С О-ФТАЛЕВЫМ АЛЬДЕГИДОМ

о-Фталевый альдегид (ОФА) реагирует с первичными аминами в присутствии тиольных соединений, образуя производные изоиндола с сильной флуоресценцией. Эта реакция используется для постколоночной дериватизации при анализе аминокислот методом ионообменной хроматографии. Условия разделения такие же, как указано в методе 1.

Для образования флуоресцирующих производных с ОФА вторичные амины (иминокислоты, такие как пролин) предварительно окисляют натрием гипохлоритом или хлорамином Т. В методике используются сильноокислотные катионообменные колонки для разделения свободных аминокислот с последующим постколоночным окислением натрия гипохлоритом или хлорамином Т и постколоночной дериватизацией с использованием ОФА и тиольных соединений, таких как N-ацетил-L-цистеин или 2-меркаптоэтанол. Длительное воздействие натрия гипохлорита или хлорамина Т не оказывает заметного влияния на дериватизацию первичных аминокислот.

Разделение аминокислот на ионообменной колонке достигается подбором pH и ионной силы. После постколоночной дериватизации элюируемых аминокислот с ОФА продукты реакции проходят через флуориметрический детектор. Интенсивность флуоресценции ОФА-производных аминокислот измеряется при длине волны возбуждающего света 348 нм и длине волны излучаемого света 450 нм.

Предел обнаружения для большинства ОФА-производных аминокислот обычно составляет несколько десятков пикомоль. Линейность отклика наблюдается в области от нескольких пикомоль до нескольких десятков наномоль. Для получения удовлетворительных данных рекомендуется перед гидролизом использовать образцы массой более 500 нг.

МЕТОД 3. ПРЕДКОЛОНОЧНАЯ ДЕРИВАТИЗАЦИЯ С ФЕНИЛИЗОТИОЦИАНАТОМ

Фенилизотиоцианат (ФИТЦ) реагирует с аминокислотами с образованием фенилтиокарбамильных производных (ФТК-производных), которые могут быть обнаружены с высокой чувствительностью при длине волны 254 нм. Предколоночная дериватизация аминокислот с ФИТЦ проводится перед разделением смеси аминокислот методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с УФ-спектрофотометрическим детектированием.

После удаления реактива под вакуумом сухие замороженные производные аминокислот могут храниться без заметной деструкции в течение нескольких недель. Раствор пробы для введения может храниться в холодном месте в течение 3 дней без заметных изменений хроматографического отклика.

Разделение ФТК-производных аминокислот методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонках, заполненных октадецилсилилсиликагелем (С18) достигается путем подбора концентрации ацетонитрила и ионной силы буферного раствора. Элюируемые из колонки ФТК-производные аминокислот определяют при длине волны 254 нм.

Предел обнаружения для большинства ФТК-производных аминокислот обычно составляет 1 пикомоль. Линейность отклика наблюдается в области 20–500 пикомоль с коэффициентом корреляции более 0,999. Для получения удовлетворительных данных рекомендуется перед гидролизом использовать образцы массой более 500 нг.

МЕТОД 4. ПРЕДКОЛОНОЧНАЯ ДЕРИВАТИЗАЦИЯ С 6-АМИНОХИНОЛИЛ-N-ГИДРОКСИСУКЦИНИМИДИЛКАРБАМАТОМ

Предколоночная дериватизация аминокислот с 6-аминохинолил-N-гидроксисукцинимидилкарбаматом (АХК) проводится перед разделением смеси аминокислот методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. АХК реагирует с аминокислотами с образованием стабильных флуоресцирующих несимметричных производных мочевины (АХК-аминокислот), которые легко поддаются анализу методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием.

Разделение АХК-производных аминокислот методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке С18 достигается подбором концентрации ацетонитрила и ионной силы буферного раствора. Селективное флуоресцентное детектирование производных при длине волны возбуждающего света 250 нм и при длине волны излучаемого света 395 нм допускает прямой ввод реакционной смеси без каких-либо существенных поправок на основной флуоресцирующий побочный продукт – 6-аминохинолин. Избыток реактива быстро гидролизует ($t_{1/2} < 15$ с) с образованием 6-аминохинолина, N-гидроксисукцинимидидила и диоксида углерода, а через 1 мин дальнейшее образование производных не происходит.

Раствор пробы АХК-аминокислот для введения может храниться при комнатной температуре в течение одной недели без заметных изменений хроматографического отклика. Следовательно, АХК-аминокислоты обладают более чем достаточной стабильностью для проведения круглосуточного автоматического хроматографического анализа. Предел обнаружения для каждой аминокислоты, кроме цистеина, находится в области от 40 фемтомоль до 320 фемтомоль.

Предел обнаружения для цистеина составляет около 800 фемтомоль. Линейность отклика наблюдается в области 2,5–500 микромоль с коэффициентом корреляции более 0,999. Для получения удовлетворительных данных рекомендуется перед гидролизом использовать образцы массой более 30 нг.

МЕТОД 5. ПРЕДКОЛОНОЧНАЯ ДЕРИВАТИЗАЦИЯ С О-ФТАЛЕВЫМ АЛЬДЕГИДОМ

Предколоночная дериватизация аминокислот с о-фталевым альдегидом (ОФА) проводится перед разделением смеси аминокислот методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием. Метод не позволяет определять аминокислоты, являющиеся вторичными аминами (например, пролин).

ОФА в присутствии тиольных соединений реагирует с первичной аминогруппой, образуя производные изоиндола с сильной флуоресценцией. В качестве тиольных соединений могут быть использованы 2-меркаптоэтанол и 3-меркаптопропионовая кислота. ОФА не обладает флуоресценцией и, следовательно, не образует мешающих пиков. Кроме того, его растворимость и стабильность в водном растворе, наряду с высокой скоростью реакции, позволяют проводить автоматическую дериватизацию с использованием автодозатора для смешивания испытуемого образца и реагента. Основным недостатком ОФА является отсутствие у него способности реагировать со вторичными аминокислотами (например, пролином). Компенсировать данный недостаток можно сочетанием с методиками, описанными в методах 7 или 8.

Предколоночная дериватизация аминокислот с ОФА используется для пробоподготовки перед обращенно-фазовой ВЭЖХ. Так как ОФА-производные аминокислот неустойчивы, анализ и разделение методом ВЭЖХ проводят немедленно после дериватизации. Хроматограф для жидкостной хроматографии должен быть

оборудован флуориметрическим детектором для обнаружения производных аминокислот. Интенсивность флуоресценции ОФА-производных аминокислот измеряют при длине волны возбуждающего света 348 нм и длине волны излучаемого света 450 нм.

Заявленный предел обнаружения при флуориметрическом детектировании не ниже 50 фемтомоль, однако на практике предел обнаружения составляет 1 пикомоль.

МЕТОД 6. ПРЕДКОЛОНОЧНАЯ ДЕРИВАТИЗАЦИЯ С (ДИМЕТИЛАМИНО)АЗОБЕНЗОЛСУЛЬФОНИЛХЛОРИДОМ

Предколоночная дериватизация аминокислот с (диметиламино)азобензолсульфонилхлоридом (ДАБС) проводится перед разделением смеси аминокислот методом обращенно-фазовой ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием в видимой области спектра.

ДАБС является хромофорным реактивом и используется для маркировки аминокислот. Аминокислоты, маркированные ДАБС (ДАБС-аминокислоты), обладают высокой стабильностью и проявляют максимум поглощения при 436 нм.

ДАБС-аминокислоты всех встречающихся в природе производных аминокислот могут быть разделены на колонке C18 методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с использованием градиентного элюирования и подвижной фазы, состоящей из ацетонитрила и водной буферной смеси. Элюируемые из колонки ДАБС-аминокислоты определяют при длине волны 436 нм.

Метод позволяет проводить с одинаковой чувствительностью анализ как аминокислот, так и иминокислот (таких как пролин). Метод дериватизации с ДАБС позволяет количественно определять остатки триптофана, полученные при гидролизе белка/пептида с сульфоновыми кислотами (такими как кислота меркаптоэтансульфоновая, кислота п-толуолсульфоновая или кислота метансульфоновая), как указано в методе 2, описанном в разделе «Гидролиз белков». Другие лабильные остатки аминокислот, такие как аспарагин и глутамин, можно анализировать, как и предыдущие, после превращения их в кислоту диаминопропионовую и кислоту диаминамасляную соответственно, как указано в методе 11, описанном в разделе «Гидролиз белков».

В качестве внутреннего стандарта для этого метода не может быть использован норлейцин, так как он элюируется в области хроматограммы со скоплением пиков первичных аминокислот. В качестве внутреннего стандарта может быть использован нитротирозин, который элюируется в свободной от пиков области хроматограммы.

Предел обнаружения ДАБС-аминокислот обычно составляет 1 пикомоль. Предел определения ДАБС-аминокислот – 2–5 пикомоль. Для получения удовлетворительных данных рекомендуется для одного анализа использовать 10–30 нг ДАБС-производных белкового гидролизата.

МЕТОД 7. ПРЕДКОЛОНОЧНАЯ ДЕРИВАТИЗАЦИЯ С 9-ФТОРЕНИЛМЕТИЛХЛОРФОРМИАТОМ

Предколоночная дериватизация аминокислот с 9-фторенилметилхлорформиатом (ФМФ) проводится перед разделением смеси аминокислот методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием.

ФМФ взаимодействует с первичными и вторичными аминокислотами с образованием производных с сильной флуоресценцией. Реакция проходит при мягких условиях в водном растворе в течение 30 с. Полученные производные стабильны, за исключением подверженных деструкции производных гистидина. Избыток флуоресцирующего ФМФ и флуоресцирующие побочные продукты могут быть удалены без потерь ФМФ-аминокислот.

ФМФ-аминокислоты могут быть разделены на колонке C18 методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. Разделение проводят с использованием градиентного элюирования с использованием линейно изменяющегося состава подвижной фазы со смеси из 10 объемов ацетонитрила, 40 объемов метанола и 50 объемов ацетатного буфера до смеси из 50 объемов ацетонитрила и 50 объемов ацетатного буфера. В результате такого элюирования 20 производных аминокислот разделяются в течение 20 мин. Элюируемые из колонки производные аминокислот определяют при длине волны возбуждающего света 260 нм и длине волны излучаемого света 313 нм.

Предел обнаружения находится в нижнем фемтомолярном диапазоне. Линейность отклика для большинства аминокислот наблюдается в области 0,1–50 пикомоль.

МЕТОД 8. ПРЕДКОЛОНОЧНАЯ ДЕРИВАТИЗАЦИЯ С 7-ФТОР-4-НИТРОБЕНЗО-2-ОКСА-1,3-ДИАЗОЛОМ

Предколоночная дериватизация аминокислот с 7-фтор-4-нитробензо-2-окса-1,3-диазолом (НБД) проводится перед разделением смеси аминокислот методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием.

НБД взаимодействует с первичными и вторичными аминокислотами с образованием производных с сильной флуоресценцией. Аминокислоты дериватируются с НБД при нагревании до 60 °С в течение 5 мин.

НБД-производные аминокислот могут быть разделены на колонке C18 методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с использованием градиентного элюирования и подвижной фазы, состоящей из ацетонитрила и водной буферной смеси. В результате такого элюирования 17 производных аминокислот разделяются в течение 35 мин. В качестве внутреннего стандарта может быть использована ϵ -аминокапроновая кислота, которая элюируется в свободной от пиков области хроматограммы. Элюируемые из колонки производные аминокислот определяют при длине волны возбуждающего света 480 нм и длине волны излучаемого света 530 нм.

Чувствительность этого метода почти такая же, как в предколоночной дериватизации с ОФА (метод 5), за исключением пролина, который не реагирует с ОФА (преимущественное отличие метода с НБД). Предел обнаружения для каждой аминокислоты составляет около 10 фемтомоляр. Для получения удовлетворительных данных рекомендуется для одного анализа использовать 10–30 нг ДАБС-производных белкового гидролизата. Анализ проводят с использованием 1,5 мг белкового гидролизата в предколоночной реакционной смеси.

РАСЧЕТ И АНАЛИЗ ПОЛУЧЕННЫХ ДАННЫХ

При определении содержания аминокислот в белковом/пептидном гидролизате следует учитывать, что при кислотном гидролизе разрушаются триптофан и цистеин, серин и треонин разрушаются частично, в то время как связи по остаткам изолейцина и валина расщепляются не полностью. Метионин во время кислотного гидролиза может подвергаться окислению, в результате чего появляются свободные аминокислоты (например, глицин и серин), загрязняющие образец. Использование вакуума (менее 200 мкм ртутного столба, или 26,7 Па) или введение инертного газа (аргон) в пространство реакционного сосуда может уменьшить степень окислительной деструкции. Поэтому количественные результаты, полученные для цистеина, триптофана, треонина, изолейцина, валина, метионина, глицина и серина из белкового/ пептидного гидролизата, могут быть непостоянными и служить основанием для дальнейшего исследования и анализа.

Мольный процент аминокислот – это количество конкретных аминокислотных остатков на 100 остатков белка. Эта величина может быть полезной при оценке данных, полученных при анализе аминокислот, если молекулярная масса исследуемого белка неизвестна. Информация также может быть использована для подтверждения подлинности белка/пептида или для других целей. Мольный процент каждой аминокислоты в испытуемом образце рассчитывают по формуле:

$$\frac{100 \cdot r_U}{r}$$

где:

r_U – отклик пика аминокислоты в испытуемом образце, проинтегрированный в наномоль;

r – сумма откликов пиков всех аминокислот в испытуемом образце, проинтегрированных в наномоль.

Сравнение полученного в испытании мольного процента аминокислот с данными известных белков может помочь установить или подтвердить подлинность испытуемого образца белка.

Образцы неизвестного белка. Этот метод расчета может быть использован для оценки концентрации белка в образце неизвестного белка с использованием данных, полученных при анализе аминокислот. Массу каждой высвобождаемой аминокислоты рассчитывают в микрограммах по формуле:

$$\frac{m \cdot M_r}{1000},$$

где:

m – количество аминокислоты, определенное в испытании, в наномоль;

M_r – средняя молекулярная масса данной аминокислоты, скорректированная с учетом массы молекулы воды, удаленной при образовании пептидной связи.

Суммируя массы высвобожденных аминокислот, получают общую массу анализируемого белка после соответствующей корректировки с учетом частично или полностью разрушенных аминокислот. Если известна молекулярная масса неизвестного белка (например, определенная методом гель-электрофореза в полиакриламидном геле с использованием натрия додецилсульфата или методом масс-спектрометрии), можно установить аминокислотный состав неизвестного белка. Число остатков каждой аминокислоты рассчитывают по формуле:

$$\frac{m}{\left(\frac{1000 \cdot M}{M_n} \right)},$$

где:

m – количество аминокислоты, определенное в испытании, в наномоль;

M – общая масса белка, в микрограммах;

M_n – молекулярная масса неизвестного белка.

Образцы известного белка. Этот метод расчета может быть использован для установления аминокислотного состава и концентрации белка в образце белка с известной молекулярной массой и аминокислотным составом с использованием данных, полученных при анализе аминокислот. При анализе состава известного белка учитывают, что некоторые аминокислоты высвобождаются хорошо, в то время как открываемость других аминокислот может быть затруднена вследствие полного или частичного разрушения (например, триптофан, цистеин, треонин, серин, метионин), неполного расщепления связей (например, изолейцин и валин), контаминации свободными аминокислотами (например, глицин и серин).

Для определения количественного содержания белка используют аминокислоты, открываемость которых наилучшая. Хорошо открываемыми аминокислотами обычно являются: аспартат-аспарагин, глутамат-глутамин, аланин, лейцин, фенилаланин, лизин и аргинин. Этот перечень может быть модифицирован на основании наработанного опыта по проведению анализа аминокислот. Для определения количественного содержания белка по каждой хорошо открываемой аминокислоте количество каждой хорошо открываемой аминокислоты, в наномоль, делят на ожидаемое число остатков этой аминокислоты в белке. Рассчитывают среднее содержание белка. Содержание белка, установленное по каждой хорошо открываемой аминокислоте, должно быть равномерно распределено около средней величины. Значения содержания белка, определенные по этим аминокислотам, имеющие неприемлемые отклонения (обычно более 5 %) от средней величины, отбрасывают. С учетом оставшихся значений пересчитывают среднее содержание белка в испытуемом образце. Для определения аминокислотного состава испытуемого образца содержание

каждой аминокислоты делят на рассчитанное среднее содержание белка. Относительную ошибку определения аминокислотного состава рассчитывают в процентах по формуле:

$$\frac{100 \cdot m}{m_s},$$

где:

m – экспериментально установленное количество аминокислот, в наномоль на аминокислотный остаток;

m_s – известное значение остатков для этой аминокислоты.

Средняя величина относительной ошибки определения аминокислотного состава является средним значением абсолютных величин относительных ошибок определения каждой аминокислоты, обычно кроме триптофана и цистеина. Средняя величина относительной ошибки определения аминокислотного состава может дать важную информацию об устойчивости анализа во времени. Соответствие найденного аминокислотного состава образца белка и известного состава может служить подтверждением подлинности и чистоты белка в испытуемом образце.

01/2013:20257

2.2.57. АТОМНО-ЭМИССИОННАЯ СПЕКТРОМЕТРИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИНДУКТИВНО СВЯЗАННОЙ ПЛАЗМЫ

ОБЩИЙ ПРИНЦИП

Атомно-эмиссионная спектроскопия с использованием индуктивно связанной плазмы (ИСП-АЭС, *ICP-AES – inductively coupled plasma – atomic emission spectrometry*) представляет собой метод атомно-эмиссионной спектроскопии, в котором в качестве источника возбуждения атомов используется индуктивно связанная плазма (ИСП).

Индуктивно связанная плазма представляет собой ионизированный инертный газ (обычно аргон) с одинаковым числом электронов и ионов, поддерживаемых радиочастотным (РЧ) полем. Высокая температура плазмы последовательно десольватирует, испаряет, возбуждает (детектирование методом атомно-эмиссионной спектроскопии (АЭС)) и ионизирует (детектирование методом масс-спектрометрии (МС)) атомы испытуемого образца. Пределы обнаружения обычно находятся в диапазоне от менее нанограмма (ИСП-МС) до менее микрограмма (ИСП-АЭС) на литр.

Плазма образуется при прохождении тангенциального потока газа-носителя через «горелку», т.е. систему, состоящую из трех концентрических кварцевых трубок. Металлическая катушка (индуктор электронагревателя) окружает верхний конец горелки и подсоединена к радиочастотному (РЧ) генератору. На катушку подается мощность (обычно 700–1500 Вт), в результате чего образуется осциллирующее магнитное поле с частотой, соответствующей частоте генератора (в большинстве случаев 27 МГц, 40 МГц). Плазма образуется, когда газ-носитель становится проводящим под воздействием электрического разряда, который вносит затравочные электроны и ионы. В индуцированном магнитном поле заряженные частицы (ионы и электроны) движутся по замкнутой кольцевой траектории. Из-за наличия сопротивления движению происходит разогревание, в результате которого появляется дальнейшая ионизация. Процесс происходит почти мгновенно, и плазма развивается до своих полных размеров и мощности. Радиочастотная осцилляция мощности, подающаяся на катушку, вызывает образование около верха горелки радиочастотных электрического и магнитного полей. Когда искра (продуцируемая либо трубкой Тесла, либо иным приспособлением) воздействует на газ-носитель, протекающий через горелку, из газа-носителя выбиваются некоторые электроны. Эти электроны подхватываются магнитным полем и ускоряются. Придание энергии электронам с помощью катушки называется индуктивным связыванием. Эти высокоэнергетические электроны сталкиваются с другими атомами газа-носителя, выбивая все больше электронов. Ионизация газа-носителя при столкновениях, происходящая в режиме цепной

реакции, приводит к превращению газа в физическую плазму, состоящую из атомов газа-носителя, электронов и ионов газа-носителя. Плазма затем поддерживается между горелкой и катушкой постоянной подачей энергии с помощью процесса индуктивного связывания.

ИСП представляет собой интенсивную, очень яркую перовидную плазму. Основание плазмы тороидальное и оно является местом индукции, то есть местом, в котором индуктивная энергия передается от индуктора электронагревателя плазме. Образец вводится через место индукции в центр плазмы.

ПРИБОР

Главными составляющими частями прибора являются:

- система ввода образца, состоящая из перистальтического насоса, подающего раствор с постоянной скоростью в распылитель;
- радиочастотный (РЧ) генератор;
- плазменная горелка;
- оптика, фокусирующая изображение плазмы на входной щели спектрометра; радиальное наблюдение больше подходит для сложных матриц (щелочи, органические вещества), в то время как аксиальное наблюдение дает большую интенсивность и лучший предел определения в случае с простыми матрицами;
- приспособление для разложения света на спектр, включающее в себя дифракционные решетки, призмы, фильтры или интерферометры;
- детектор, превращающий энергию излучения в электрическую энергию;
- блок сбора данных.

ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ

Интерференцией называется явление, вызывающее несоответствие аналитического сигнала аналита в образце сигналу аналита в градуировочном растворе такой же концентрации. Хорошо известная химическая интерференция, которая встречается в пламенной атомно-абсорбционной спектрометрии, обычно слабо проявляется в ИСП-АЭС. В редких случаях, когда имеет место интерференция, может помочь увеличение мощности радиочастот или уменьшение потока внутреннего газа-носителя. Интерференция в ИСП-АЭС может быть спектрального происхождения или может быть результатом высоких концентраций определенных элементов или компонентов матрицы. Физическая интерференция (возникающая из-за различий в вязкости и поверхностном натяжении раствора образца и градуировочного раствора) может быть уменьшена путем разведения, подбора матрицы, использования внутренних стандартов или использованием метода стандартных добавок.

Другим типом интерференции, иногда встречающимся в ИСП-АЭС, является так называемый «эффект легко ионизируемых элементов». Легко ионизируемыми элементами называются элементы, которые ионизируются значительно легче, например, щелочные и щелочноземельные металлы. В образцах, которые содержат высокие концентрации таких элементов (более 0,1 %) может происходить подавление либо увеличение эмиссии.

Спектральная интерференция. Она может происходить из-за присутствия других линий или сдвигов в интенсивности базовой линии. Эти линии могут соответствовать аргону (наблюдаются после 300 нм); ОН линии, появляющиеся из-за разложения воды (около 300 нм); NO линии, появляющиеся из-за взаимодействия азота из окружающей среды с плазмой (между 200 нм и 300 нм); могут присутствовать линии других элементов, особенно тех, которые находятся в высокой концентрации в образце. Интерференция распадается на четыре различные категории: простой сдвиг базовой линии, наклонный сдвиг базовой линии, прямое спектральное наложение, сложный сдвиг базовой линии.

Абсорбционная интерференция. Данный вид интерференции возникает тогда, когда часть сигнала аналита поглощается до достижения детектора. В частности, этот эффект обнаруживается, когда концентрация элемента с сильной эмиссией настолько высока, что атомы или ионы этого элемента с более низкой энергией абсорбируют значительное количество излучения, испускаемого соответствующими возбужденными атомами или ионами. Этот эффект, называемый самопоглощением, предопределяет верхнюю границу линейного участка рабочего диапазона для данной длины волны эмиссии.

Многокомпонентный спектральный подбор. Во избежание проблем со спектральной интерференцией обычно проводят определение с использованием нескольких эмиссионных линий. Для более точной коррекции спектральной интерференции получают информацию с использованием усовершенствованной системы детекторов при помощи многокомпонентного спектрального подбора. Этот способ учитывает не только интерференцию, но также фоновый вклад матрицы, создавая, таким образом, формулу поправки. Многокомпонентный спектральный подбор использует модель множественных линейных квадратов, основанную на анализе чистого аналита, матрицы и холостого раствора, создавая математическую модель с учетом интерференции. Это позволяет определять эмиссию аналита в сложной матрице с более низкими пределами детектирования и более высокой точностью.

МЕТОД

ПРОБОПОДГОТОВКА И ВВОД ОБРАЗЦА

Основной целью пробоподготовки является гарантирование попадания концентрации аналита после использования разведения или концентрирования в рабочий диапазон прибора и получения раствора испытуемого образца, способного воспроизводимо распыляться.

Некоторые распылительные системы устойчивы к действию высоких концентраций кислот, но использование серной и фосфорной кислот может вносить вклад в базовую линию ИСП-спектров. Более предпочтительным является использование азотной и хлористоводородной кислот. Фтористоводородную кислоту можно использовать при наличии устойчивых к ней систем ввода образца (например, из перфторалкоксиполимера) и горелок. При выборе метода ввода образца учитывают требования по чувствительности, стабильности, скорости, размеру образца, устойчивости к коррозии и устойчивости к закупорке. В большинстве случаев подходит использование распылителя с поперечным потоком вместе с распылительной камерой и горелкой. Перистальтический насос, использующийся в ИСП-АЭС, подает испытуемый раствор и раствор сравнения со скоростью 1 мл/мин или менее. В случае использования органических растворителей необходимо обеспечить разделение кислорода и органических слоев.

ВЫБОР УСЛОВИЙ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

При выборе условий проведения анализа следуют рекомендациям производителя прибора. Анализ водных растворов и органических растворителей обычно происходит при различных условиях. Надлежащим образом должны быть выбраны следующие аналитические параметры:

- длины волн;
- скорости потоков газа-носителя (внешняя, промежуточная и внутренняя трубки горелки);
- мощность радиочастотного излучения;
- положение для наблюдения (радиальное или аксиальное);
- скорость насоса;
- условия для детектора (усиление/напряжение – для детектора с фотоумножающей трубкой, другие – для матричного детектора);
- время интегрирования (установленное время для измерения интенсивности эмиссии на каждой длине волны).

КОНТРОЛЬ РАБОТОСПОСОБНОСТИ ПРИБОРА

Пригодность системы

Для подтверждения надлежащей работы ИСП-АЭС прибора с использованием многоэлементного раствора могут быть проведены следующие испытания:

- передача энергии (генератор, горелка, плазма); может быть использовано соотношение Mg II (280,270 нм)/Mg I (285,213 нм);
- подача образца, путем проверки эффективности и стабильности распылителя;

– разрешение (оптическая система), путем измерения ширины пика на половине высоты, например, для As (189,042 нм), Mn (257,610 нм), Cu (324,745 нм) или Ba (455,403 нм);

– аналитические характеристики, путем расчета пределов обнаружения выбранных элементов в данном диапазоне длин волн.

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДА

Через определенные временные интервалы верифицируют удовлетворительное исполнение метода, описанного в частной статье.

ЛИНЕЙНОСТЬ

Готовят и анализируют не менее четырех растворов сравнения, концентрация которых находится в пределах диапазона градуировки, и холостой раствор. Проводят не менее пяти повторов.

Используя все полученные данные, рассчитывают линейное уравнение графика методом наименьших квадратов. Строят кривую регрессии, отмечая средние значения, измеренные значения и доверительный интервал градуировочного графика. Метод является пригодным при условии соблюдения следующих требований:

– коэффициент корреляции должен быть не менее 0,99;
– на градуировочном графике погрешности каждого калибровочного уровня должны быть распределены случайным образом.

Рассчитывают среднее значение и относительное стандартное отклонение для наименьшего и наибольшего калибровочного уровня.

В случае если отношение рассчитанного стандартного отклонения наименьшего и наибольшего калибровочного уровня менее 0,5 или более 2,0, то более точная оценка градуировочного графика может быть получена с использованием взвешенной линейной регрессии. Линейная и квадратичная весовая функции применяются к полученным данным для нахождения наиболее подходящей для использования весовой функции. Если средние значения при сравнении с градуировочным графиком проявляют отклонение от линейности, используют двухмерную линейную регрессию.

ПРАВИЛЬНОСТЬ

Предпочтительно верифицировать правильность с использованием сертифицированных стандартных образцов. Если это невозможно, проверяют открываемость.

Открываемость. В случае методик количественного определения открываемость должна быть от 90 % до 110 %. Для других определений, например, для определения следовых количеств элемента, открываемость должна быть от 80 % до 120 % от теоретического значения. Открываемость может быть определена с использованием подходящего раствора сравнения (матричного раствора), содержащего известное количество аналита (средняя концентрация градуировочного графика).

СХОДИМОСТЬ

Сходимость должна быть не более 3 % для количественного определения и не более 5 % для испытания на содержание примесей.

ПРЕДЕЛ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Удостоверяются, что предел количественного определения (например, определенный с использованием приближения 10σ) ниже измеряемого значения.

01/2013:20258

2.2.58. МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИНДУКТИВНО СВЯЗАННОЙ ПЛАЗМЫ

Масс-спектрометрия с использованием индуктивно связанной плазмы (ИСП-МС, *ICP-MS – inductively coupled plasma – mass spectrometry*) представляет собой метод, использующий индуктивно связанную плазму в качестве ионизирующего источника. Основные принципы ИСП описаны в статье 2.2.57. *Атомно-эмиссионная спектрометрия с использованием индуктивно связанной плазмы* (ИСП-АЭС).

В ИСП-МС используется способность ИСП генерировать заряженные ионы элементов, входящих в состав образца. Полученные ионы направляют в масс-спектрометр, который разделяет их в соответствии с отношением масса/заряд (m/z). Большинство масс-спектрометров имеют квадрупольные или магнитные анализаторы. Ионы переносятся из плазмы в ионную оптику через два сопла (сопло ввода пробы и сепараторное сопло, образующие область интерфейса). Ионная оптика состоит из электростатических линз, которые переносят ионы из пространства с атмосферным давлением к масс-фильтру с давлением 10^{-8} Па или менее, поддерживаемым с помощью турбомолекулярного насоса. После фильтрации ионы с выбранным соотношением масса/заряд направляются на детектор (канальный электроумножитель, чашка Фарадея, диоды), где поток ионов конвертируется в электрические сигналы. Количественно определяют число появляющихся и генерирующих электрические импульсы ионов в единицу времени.

Система ввода образца и способы обработки данных аналогичны используемым в ИСП-АЭС.

ПРИБОР

Главными составляющими частями прибора являются:

- система ввода образца, состоящая из перистальтического насоса, подающего раствор с постоянной скоростью в распылитель;
- радиочастотный (РЧ) генератор;
- плазменная горелка;
- область интерфейса, включающая в себя сопла для переноса ионов в ионную оптику;
- масс-спектрометр;
- детектор;
- блок сбора данных.

ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ

Наибольшей проблемой является массовая интерференция. Например, изобарические виды значительно перекрывают массовый сигнал искомым ионов, особенно в центральной части диапазона масс (например, 40–80 а.е.м.). Комбинация атомных ионов приводит к полиатомной или молекулярной интерференциям (то есть $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$ с ^{56}Fe или $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}$ с ^{80}Se). Матрица, в случае с некоторыми аналитами, также может вызывать интерференцию. Некоторые образцы оказывают влияние на образование капель или на температуру ионизации. Эти явления могут приводить к подавлению аналитического сигнала. Обойти физическую интерференцию можно, используя метод внутреннего стандарта или метод стандартных добавок. Выбор элемента, используемого в качестве внутреннего стандарта, зависит от исследуемого элемента: например, в качестве внутренних стандартов могут быть использованы ^{59}Co и ^{115}In .

Основной характеристикой приборов ИСП-МС является разрешение, то есть способность к разделению двух близких масс. С этой точки зрения приборы с квадрупольными анализаторами проигрывают приборам с магнитными анализаторами.

МЕТОД

ПРОБОПОДГОТОВКА И ВВОД ОБРАЗЦА

Пробоподготовка обычно включает в себя стадию разложения матрицы с помощью подходящего метода, например, в микроволновой печи. Кроме того, важно попадание концентрации аналита после использования разведения или концентрирования в рабочий диапазон прибора и получение раствора испытуемого образца, способного воспроизводимо распыляться.

Некоторые распылительные системы устойчивы к действию высоких концентраций кислот, но использование серной и фосфорной кислот может вносить вклад в базовую линию ИСП-спектров. Более предпочтительным является использование азотной и хлористоводородной кислот. Фтористоводородную кислоту можно использовать при наличии устойчивых к ней (например, из перфторалкоксиполимера) систем ввода образца и горелок. При выборе метода ввода образца учитывают требования по чувствительности, стабильности, скорости, размеру образца, устойчивости к коррозии и устойчивости к закупорке. В большинстве случаев подходит использование распылителя с поперечным потоком вместе с распылительной камерой и горелкой. Перистальтический насос подает испытуемый раствор и раствор сравнения со скоростью 20–1000 мкл/мин.

В случае использования органических растворителей необходимо обеспечить разделение кислорода и органических слоев.

ВЫБОР УСЛОВИЙ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

При выборе условий проведения анализа следуют рекомендациям производителя прибора. Анализ водных растворов и органических растворителей обычно происходит при различных условиях. Надлежащим образом должны быть выбраны следующие аналитические параметры:

- сопла (материал сопла ввода проб и сепараторного сопла);
- скорости потоков газа-носителя (внешняя, промежуточная и внутренняя трубки горелки);
- мощность радиочастотного излучения;
- скорость насоса;
- должен быть осуществлен выбор одного или более изотопов измеряемого элемента (масса).

ВЫБОР ИЗОТОПОВ

Выбор изотопов осуществляют по нескольким критериям. Для получения максимальной чувствительности выбирают наиболее распространенный изотоп данного элемента. Кроме того, следует выбирать изотоп с минимальной интерференцией, вызываемой другими видами изотопов, присутствующими в матрице и в газе-носителе. В программном обеспечении производителей приборов ИСП-МС обычно присутствует информация об изобарической интерференции и интерференции, вызываемой полиатомными ионами, например, гидридными, оксидными, хлоридными и т.д.

КОНТРОЛЬ РАБОТОСПОСОБНОСТИ ПРИБОРА

Пригодность системы

Настройка прибора позволяет отследить и настроить измерение перед введением образца. Точность определения масс прибором ИСП-МС проверяют с помощью раствора для настройки, содержащего несколько изотопов, охватывающих весь диапазон, например, ^9Be , ^{59}Co , ^{89}Y , ^{115}In , ^{140}Ce и ^{209}Bi .

– Записывают чувствительность и кратковременную и долговременную стабильность. Параметры прибора (условия плазмы, параметры ионных линз и квадруполей) настраивают на получение максимально возможного числа обнаружений ионов.

– Для подтверждения наблюдения приемлемого отклика в широком диапазоне масс разрешение и ось масс настраивают с использованием раствора, содержащего Li, Y и Tl.

– Должна проводиться проверка эффективности разложения плазмой оксидов. Хорошими индикаторами являются отношения Ce/CeO и/или Ba/BaO , требуемый уровень при этом должен составлять менее 3 %.

– Подавление образования двухзарядных ионов осуществляют с использованием Ba и Ce. Отношение сигнала двухзарядных ионов к искомому элементу должно составлять менее 2 %.

– Долговременную стабильность проверяют, измеряя стандарт в начале и в конце испытания образца, при этом проверяется влияние отложения солей в соплах на уменьшение сигнала во время испытания.

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДА

Через определенные временные интервалы верифицируют удовлетворительное исполнение метода, описанного в частной статье.

ЛИНЕЙНОСТЬ

Готовят и анализируют не менее четырех растворов сравнения, концентрация которых находится в пределах диапазона градуировки, и холостой раствор. Проводят не менее пяти повторов.

Используя все полученные данные, рассчитывают линейное уравнение графика методом наименьших квадратов. Строят кривую регрессии, отмечая средние значения, измеренные значения и доверительный интервал градуировочного графика. Метод является пригодным при условии соблюдения следующих требований:

- коэффициент корреляции должен быть не менее 0,99;
- на градуировочном графике погрешности каждого калибровочного уровня должны быть распределены случайным образом.

Рассчитывают среднее значение и относительное стандартное отклонение для наименьшего и наибольшего калибровочного уровня.

В случае если отношение рассчитанного стандартного отклонения наименьшего и наибольшего калибровочного уровня менее 0,5 или более 2,0, то более точная оценка градуировочного графика может быть получена с использованием взвешенной линейной регрессии. Линейная и квадратичная весовая функции применяются к полученным данным для нахождения наиболее подходящей для использования весовой функции. Если средние значения при сравнении с градуировочным графиком проявляют отклонение от линейности, используют двухмерную линейную регрессию.

ПРАВИЛЬНОСТЬ

Предпочтительно верифицировать правильность с использованием сертифицированных стандартных образцов. Если это невозможно, проверяют открываемость.

Открываемость. В случае методик количественного определения открываемость должна быть от 90 % до 110 %. Для других определений, например для определения следовых количеств элемента, открываемость должна быть от 80 % до 120 % от теоретического значения. Открываемость может быть определена с использованием подходящего раствора сравнения (матриксного раствора), содержащего известное количество аналита (средняя концентрация градуировочного графика).

СХОДИМОСТЬ

Сходимость должна быть не более 3 % для количественного определения и не более 5 % для испытания на содержание примесей.

ПРЕДЕЛ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Удостоверяются, что предел количественного определения (например, определенный с использованием приближения 10σ) ниже измеряемого значения.

01/2013:20259

2.2.59. АНАЛИЗ ГЛИКАНОВ В ГЛИКОПРОТЕИНАХ

1. ВВЕДЕНИЕ

Анализ гликанов – это испытание, используемое для исследования гликановых фрагментов гликопротеинов. Он может включать в себя:

- анализ целого гликопротеина;
- разделение и обнаружение гликоформ белка;
- анализ гликопептидов, полученных при ферментативной обработке гликопротеина;
- анализ высвобожденных гликанов, полученных при химической или ферментативной обработке гликопротеина.

Анализ моносахаридов может служить дополнением к информации, полученной при анализе гликанов.

Гликозилирование может играть важную роль в проявлении лекарственным средством биологического происхождения его функциональных, фармакокинетических, фармакодинамических и иммуногенных свойств, а также его устойчивости. Гликозилирование, в отличие от транскрипции, является ферментативным модифицирующим процессом, не имеющим матричного управления, результатом чего является гетерогенность гликанов. На гетерогенность также влияет процесс производства. Поэтому анализ гликанов гликопротеинов является важным испытанием для идентификации изменений в схеме гликозилирования гликопротеинов и/или для наблюдения за стабильностью схемы гликозилирования при производстве.

Анализ гликанов может быть сравнительным методом, потому что полученная информация, при сравнении с аналогично анализируемым стандартным образцом, подтверждает соответствие испытуемого образца.

В приведенном разделе представлены подходы для анализа гликанов гликопротеинов и требования к использованию и валидации методов.

Анализ гликанов не является единым общим методом, а включает в себя применение определенных процедур и получение специфических карт гликанов для каждого гликопротеина. Особые процедуры указаны в соответствующих частных статьях.

1-1. ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ

Существует 3 вида ферментативного гликозилирования белков:

- *N*-гликозилирование, под которым понимают присоединение олигосахаридов к азоту в терминальной амидной группе аспарагина;
- *O*-гликозилирование, под которым понимают присоединение олигосахаридов к гидроксильным группам серина, треонина и/или гидроксипролина;
- *C*-гликозилирование, под которым понимают присоединение α -маннопиранозы к С2-углероду индольного цикла триптофана.

При инкубировании белков с восстанавливающими сахарами может происходить неферментативное присоединение, известное как гликирование.

Приведенный раздел описывает аналитические методики для *N*- и *O*-связанных гликозилирований, обнаруживающихся в основном в гликопротеиновых лекарственных средствах.

1-2. ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ

При производстве гликопротеинов может проявляться различная степень гетерогенности гликанов. Эта гетерогенность может быть следствием следующих изменений:

- степени заполненности (полная, частичная, свободная);
- типа гликозилирования (*N*- или *O*-связанная);
- олигосахаридных структур (удлинение, разветвление и присоединение).

Результатом такой гетерогенности гликозилирования является набор гликоформ для одного определенного гликопротеина. Такие изменения появляются по причине того, что, несмотря на транскрипцию и трансляцию, гликозилирование является посттрансляционным модификационным процессом, не имеющим матричного управления. Схема гликозилирования в определенном положении зависит от многих факторов, включая специфичное для клетки и/или размер-зависимое наличие гликотрансфераз и экzogликозидаз, обнаруженных в комплексе Гольджи и эндоплазматическом ретикулуме. На гликозилирование также влияют структура белка, процесс производства, хозяин-векторная ДНК система экспрессии и условия клеточных культур.

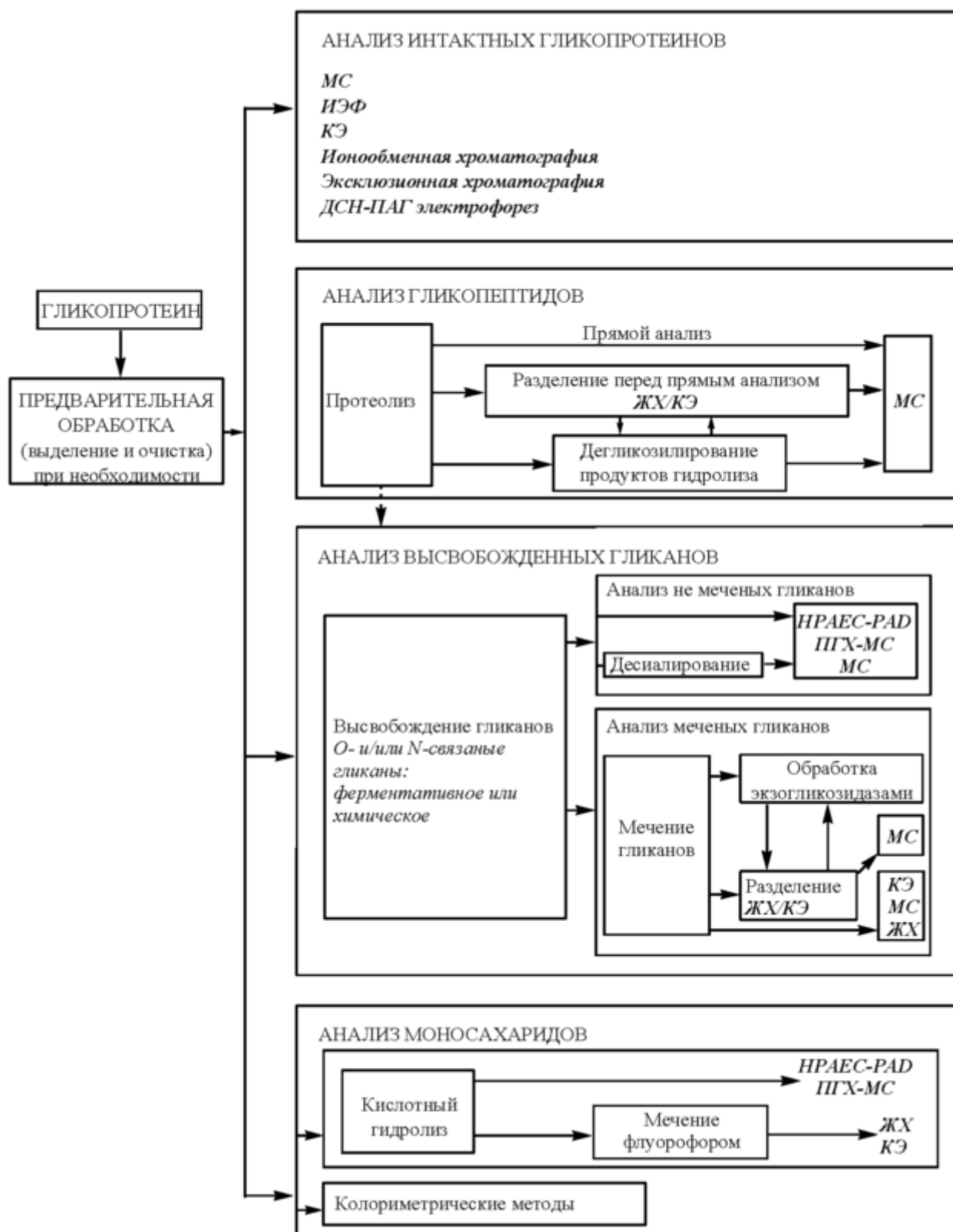


Рисунок 2.2.59.-1. Общая схема методик анализа гликанов

Легенда:
 КЭ – капиллярный электрофорез;
 НРАЕС-PAD – анионно-обменная хроматография при высоких значениях pH с импульсным амперометрическим детектированием;
 ИЭФ – изоэлектрическое фокусирование;
 ЖХ – жидкостная хроматография;
 МС – масс-спектрометрия;
 ПГХ – пористо-графитная хроматография;
 ДСН-ПАГ электрофорез – электрофорез с натрия додецилсульфатом в полиакриламидном геле.

2. МЕТОДИКИ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА ГЛИКАНОВ

Гетерогенность в гликозилировании может быть оценена четырьмя отдельными и взаимодополняющими методами:

- анализ интактного гликопротеина;
- анализ гликопептидов;
- анализ высвобожденных гликанов;
- анализ моносахаридов.

В настоящей статье представлены методы и общие требования, применяемые для анализа гликанов в гликопротеинах, содержащих *N*- и *O*-связанные гликаны.

Анализ гликанов обычно представляет собой многоступенчатый процесс. Существует большое количество методик анализа гликанов, обусловленное разнообразием и сложностью гликановых структур, числом доступных методик и систем детектирования, а также широким выбором подходов, в зависимости от уровня необходимой информации.

На рисунке 2.2.59.-1 представлена схема аналитических методик анализа гликанов, которая может быть использована для выбранного подхода (подходов). Вследствие разнообразия и сложности структуры и происхождения гликанов, доступны различные вариации одних и тех же методик и условий.

Выделение и очистка. Выделение и очистка могут быть необходимы для анализа фармацевтических субстанций или для анализа дозированных лекарственных форм, содержащих мешающие вспомогательные вещества, и описываются в частных статьях.

2-1. АНАЛИЗ ИНТАКТНЫХ ГЛИКОПРОТЕИНОВ

Анализ интактного гликопротеина предоставляет информацию о гликозилировании гликопротеина в целом.

В том случае, если молекула крупная и содержит много положений гликозилирования, этот подход дает ограниченное количество информации.

Могут использоваться такие методы, как капиллярный электрофорез (КЭ, *CE*) (2.2.47) и масс-спектрометрия (МС, *MS*) (2.2.43). Размер-зависимые методы, такие как эксклюзионная хроматография (2.2.30) и электрофорез с натрия додецилсульфатом в полиакриламидном геле (ДСН-ПАГ электрофорез, *SDS-PAGE*) (2.2.31), могут предоставлять информацию о состоянии гликозилирования белка. Если степень сialiрирования значительно влияет на биологическую активность гликопротеина, то для ее мониторинга могут быть использованы ионообменная хроматография (2.2.46), изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ, *IEF*) (2.2.54) или КЭ (2.2.47). Должна быть выбрана методика, обеспечивающая достоверную корреляцию между степенью сialiрирования и биологической активностью продукта.

2-2. АНАЛИЗ ГЛИКОПЕПТИДОВ

Анализ гликопептидов предоставляет информацию о свойствах гликозилирования в зависимости от местоположения, о степени заполненности и об олигосахаридных структурах. Он включает протеолитическое расщепление гликопротеинов. Подходы к расщеплению белкового остова в зависимости от местоположения представлены в общей статье 2.2.55. *Пептидное картирование.*

После протеолиза гликопротеина могут быть выбраны следующие подходы.

Прямой анализ методом МС (2.2.43). Необходимо тщательно следить, чтобы сигнал гликопептида не подавлялся присутствием других пептидов, так как гликопептиды составляют малую долю в общей смеси пептидов и интенсивность сигнала у них меньше, чем у негликозилированных пептидов.

Разделение, предшествующее анализу МС. Эта дополнительная стадия помогает преодолеть проблемы, упомянутые выше. Приемы насыщения или фракционирования могут быть использованы как параллельно с прямым анализом, так и после него. Такие методы разделения как жидкостная хроматография (ЖХ, *LC*) (2.2.29) и КЭ (2.2.47) также пригодны. Эти методы могут быть совмещены с МС, позволяя получать результаты МС в режиме реального времени (*on-line*).

Дегликозилирование гликопептидов. При сравнении пептидных карт, полученных при протеолитическом расщеплении интактного гликопротеина и дегликозилированного перед протеолитическим расщеплением или после протеолитического расщепления, возможно определение различных положений гликозилирования гликопротеина. Пептидная масса предоставляет информацию о гликозилированных участках, и с помощью подсчета разницы масс между интактным и дегликозилированным гликопептидом можно получить информацию о составе и гетерогенности присоединенных гликанов. Способы дегликозилирования белкового остова представлены в разделе 2-3-1. Стадия разделения может быть проведена до или после дегликозилирования.

2-3. АНАЛИЗ ВЫСВОБОЖДЕННЫХ ГЛИКАНОВ

Анализ высвобожденных гликанов является удобным способом получения информации о различных видах гликанов, представленных в белке (профилирование по характеру ветвления: двойное, тройное или более высокого порядка). На этой стадии определяют также степень сialiрования. В зависимости от выбранного метода, для детектирования гликанов может быть необходима предварительная дериватизация/мечение.

Анализ высвобожденных гликанов обычно включает в себя высвобождение и очистку гликанов из реакционной смеси, сопровождающиеся при необходимости мечением/дериватизацией гликанов; полученные гликановые фрагменты затем профилируют (фракционирование или разделение).

2-3-1. Высвобождение гликанов

Выбор метода, который используется для высвобождения гликанов, зависит от испытуемого гликопротеина. Применяемый агент расщепления выбирается в зависимости от типа требуемого расщепления и уровня необходимой информации. Может быть использовано ферментативное или химическое расщепление. В таблице 2.2.59.-1 представлен неполный список агентов ферментативного расщепления и их особенности.

Таблица 2.2.59.-1

Примеры агентов ферментативного расщепления

Агенты	Специфичность
Высвобождение N-связанных гликанов	
Пептид-N⁴-(N-ацетил-β-глюкозаминил)аспарагинамидаза (3.5.1.52)	Гидролиз N⁴-(ацетил-β-D-глюкозаминил)аспарагиновых остатков, в которых остаток глюкозамина может быть далее гликозилирован, с получением (замещенного) N-ацетил-β-D-глюкозаминиламина и пептида, содержащего остаток аспартата
– Пептид-N-гликозидаза F (PNGase F)	Высвобождение N-гликановой цепи, кроме N-гликановой цепи, содержащей (α1-3)-связанное ядро фукозы
– Пептид-N-гликозидаза A (PNGase A)	Высвобождение N-гликановой цепи, содержащей (α1-3)-связанное ядро фукозы
Маннозил-гликопротеинэндо-β-N-ацетилглюкозаминидаза (3.2.1.96)	Эндогидролиз N,N'-диацетилхитобиозидовых единиц в гликопептидах/гликопротеинах с высоким содержанием маннозы, содержащих структуру – [Man(GlcNAc)₂]Asn
– Эндо-β-N-ацетилглюкозаминидаза F (эндо F)	Высвобождение гибридных и комплексных олигосахаридов с высоким содержанием маннозы
– Эндо-β-N-ацетилглюкозаминидаза H (эндо H)	Высвобождение гибридных олигосахаридов с высоким содержанием маннозы
Высвобождение O-связанных гликанов	
Гликопептид α-N-ацетилгалактозаминидаза (3.2.1.97)*	Гидролиз терминальных D-галактозил-N-ацетил-α-D-галактозаминидиновых остатков

Обычно эффективность расщепления зависит от доступности гликанов в гликопротеине. Следовательно, для увеличения доступности мест гликозилирования белок

может быть денатурирован, за исключением случаев, когда необходимо различить поверхностные и погруженные гликаны.

Также могут быть использованы агенты химического расщепления, например, гидразин или боргидриды щелочных металлов для β -элиминирования.

2-3-2. Анализ гликанов

Высвобожденные гликаны могут быть проанализированы или профилированы хроматографическими, электрофоретическими и масс-спектрометрическими методами, а также сочетанием этих всех методов. Выбор метода производят в зависимости от природы гликанов и уровня необходимой информации.

Анализ гликанов предоставляет информацию о различных видах гликанов, присутствующих в белке (с высоким содержанием маннозы, комплексных, гибридных). Информация об относительных количествах разветвленных структур может быть получена с помощью анализа десиалированных гликанов.

Может потребоваться стадия разделения. Она подразумевает использование ЖХ (2.2.29) и КЭ (2.2.47) в качестве промежуточных методов. ЖХ (2.2.29) может применяться как препаративная, со сбором индивидуальных фракций (обычно требуется мечение), так может быть и совмещена непосредственно с МС (2.2.43).

2-3-2-1. Анализ немеченых гликанов

Нативные гликаны могут быть проанализированы с помощью анионообменной хроматографии при высоких значениях pH с импульсным амперометрическим детектированием (HPLC-PAD), пористо-графитной хроматографией (ПГХ, PGC) и МС (2.2.43).

Метод HPLC-PAD обладает высокой чувствительностью и способностью к разделению некоторых изомеров. Коэффициенты откликов разных сигналов не одинаковы из-за различий олигосахаридных структур. Полный количественный анализ гликанов невозможен, кроме случаев, когда доступна информация о стандартах олигосахаридов. Количественное определение может быть проведено путем сравнения испытуемого образца с соответствующим хорошо изученным стандартным образцом или путем соотношения площади пика каждого гликана с общей площадью пиков всех гликанов на карте. Для разделения природных гликанов также может применяться ПГХ, обладающая более высокой селективностью по сравнению с общепринятой хроматографией на неполярных колонках. Для прямого анализа гликанов может применяться ПГХ-МС с электрораспылительной ионизацией.

2-3-2-2. Анализ маркированных гликанов

Маркирование гликанов

Тип производимого химического изменения (derivatизации) зависит от метода, используемого для детектирования гликанов: УФ или флуоресцентный.

Дериватизация с флуоресцентными метками – наиболее используемый метод для маркирования гликанов на восстанавливающем остатке путем восстановительного аминирования. Один маркер может прикрепляться к каждому моно- и олигосахариду, позволяя определить молярное количество. В таблице 2.2.59.-2 приведен неполный список обычно используемых флуоресцентных маркеров и подходящих аналитических методов.

Для детектирования с использованием только МС (2.2.43) также может использоваться предельное метилирование гликанов. Оно основано на метилировании олигосахаридов.

Таблица 2.2.59.-2

Примеры флуоресцентных меток и подходящих аналитических методов

Название	Аббревиатура	Аналитические методы
2-Аминобензойная кислота	2-AA	ЖХ (2.2.29), МС (2.2.43)
2-Аминобензамид	2-AB	ЖХ (2.2.29), МС (2.2.43)
2-Аминопиридин	2-AP	ЖХ (2.2.29), МС (2.2.43)
2-Амино-9(10H)-акридинон	AMAC	Гель-электрофорез (2.2.31)
Тринатрия 8-аминопирин-1,3,6-трисульфат	APTS	КЭ (2.2.47)

Анализ маркированных гликанов

Маркированные гликаны могут быть проанализированы с помощью таких аналитических методов, как ЖХ (2.2.29), КЭ (2.2.47) и МС (2.2.43).

В соответствии со свойствами разделяющихся гликанов, они могут быть профилированы и определены количественно с использованием подходящего маркера с помощью нескольких систем ЖХ (2.2.29): обращенно-фазной (разделение по гидрофобности), нормально-фазной (разделение по размеру), и анионообменной (разделение по заряду) ЖХ.

2-4. АНАЛИЗ МОНОСАХАРИДОВ

Анализ моносахаридов дает информацию о моносахаридной структуре гликопротеина. Анализ может быть выполнен как колориметрическими, так и разделительными методами.

2-4-1. Колориметрические методы

Колориметрические методы, основанные на химическом окрашивании, дают информацию о количестве специфических классов сахаров, таких как сиаловые кислоты, нейтральные сахара и гексозамины.

2-4-2. Методы разделения

Разделительные методы предоставляют информацию о полном моносахаридном составе. Перед использованием методов требуется предварительный кислотный гидролиз олигосахаридных цепей интактных гликопротеинов или высвобожденных гликанов. Для высвобождения сиаловых кислот применяется умеренный кислотный гидролиз или ферментативная обработка. Стадия гидролиза – это значимый источник вариативности, и она требует продукт-специфичной валидации.

Методы для разделения и количественного определения моносахаридов включают:

- использование *HPAEC-PAD* и ПГХ-МС, которые позволяют определить молярные количества нативных моносахаридов (сиаловые кислоты, нейтральные сахара и альдиты);
- флуорофорное мечение моносахаридов с последующим использованием методов разделения, таких как обращенно-фазная или ионообменная хроматография или капиллярный электрофорез.

3. ОЦЕНКА И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследование и оценка результатов, полученных в ходе анализа гликанов, производится с 3 различными целями:

- подтверждение подлинности индивидуальных структур или групп структур;
- подтверждение соответствия испытуемого образца при качественном анализе;
- подтверждение соответствия испытуемого образца при количественном анализе.

Особые соображения касательно стандартных образцов и методов проведения каждой стадии анализа приведены в разделах 4 и 5 соответственно.

3-1. ПОДТВЕРЖДЕНИЕ ПОДЛИННОСТИ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ СТРУКТУР ИЛИ ГРУПП СТРУКТУР

Аналитической мишенью метода анализа гликанов может быть отдельный моносахарид (например, сиаловая кислота, фукоза), определенная олигосахаридная структура (например, тетра-сиалиловый, тетра-антеннальный гликан) или группа структур, имеющая общую аналитическую особенность (например, тетра-сиалиловые гликаны, три-антеннальные гликаны, гликопротеиновые изоформы с одинаковым зарядом). Подтверждение подлинности аналитической мишени – это важнейший шаг при анализе и оценке результатов, который может быть достигнут абсолютно (путем подтверждения молекулярной структуры) или сравнительно (путем сравнения с соответствующим стандартным образцом).

3-1-1. Абсолютное подтверждение подлинности

Абсолютное подтверждение подлинности гликановых структур выполняется обычно во время разработки лекарственного средства, и оно не обязательно является целью рутинного анализа. Подлинность аналитической мишени устанавливают с помощью

известного молекулярного свойства молекулы. Такая абсолютная идентификация индивидуальных структур требует многоступенчатых подходов, включающих в себя ферментативные и химические реакции, разделительные методики и *on-line* или *off-line* методы детектирования, и обычно использует в качестве основополагающего принципа для подтверждения структуры отношение заряда к массе молекулярного иона, которое определяется подходящим масс-спектрометрическим методом.

3-1-2. Сравнительное определение подлинности

При рутинном применении аналитического метода подлинность аналитической мишени может быть подтверждена путем сравнения со стандартными образцами процесса или пригодности системы. Они могут быть получены из известных хорошо изученных гликопротеинов, которые могут принадлежать тому же классу, что и испытуемый образец (например, фетуин для *N*-связанных гликопротеинов), или могут быть произведены из хорошо изученной серии испытуемого продукта, которая была определена как стандартный образец. Следующие утверждения применяются к сравнительному определению структурной подлинности:

- в случае подтвержденной высокой воспроизводимости времени удерживания, для корректной интерпретации может быть использовано абсолютное время удерживания;
- в качестве альтернативы, в начале и в конце испытания может быть введен гликановый маркер для проверки любых отклонений времени удерживания; на основе этих эталонных хроматограмм могут быть интерпретированы гликаны испытуемых образцов;
- в случаях, когда стандарт для определения всех пиков гликанов в испытуемом образце отсутствует, для контролирования и мечения неизвестных пиков гликанов может использоваться абсолютное или нормализованное время удерживания.

3-2. ПОДТВЕРЖДЕНИЕ СООТВЕТСТВИЯ ИСПЫТУЕМОГО ОБРАЗЦА ТРЕБОВАНИЯМ КАЧЕСТВА

На этом этапе определения аналитические результаты, полученные для испытуемого образца, оцениваются на предмет соответствия спецификации. Обычно это достигается путем сравнения с данными, полученными при параллельном испытании соответствующего стандартного образца. При оценке данных необходимо:

- для проверки пригодности системы установить, что аналитический результат, полученный при использовании стандартного образца, соизмерим с ожидаемым результатом; например, при картировании гликанов это будет достигнуто путем сравнения карты для стандартного образца с представленной картой образца, полученной при создании этого стандартного образца, и с помощью подтверждения пригодности всех критериев системы;
- продемонстрировать сходство карт стандартного образца и испытуемого образца, используя любые специфические критерии пригодности, указанные в частной статье.

3-3. ПОДТВЕРЖДЕНИЕ СООТВЕТСТВИЯ ИСПЫТУЕМОГО ОБРАЗЦА ТРЕБОВАНИЯМ КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА

3-3-1. Количественное определение содержания анализируемого вещества и представление результатов

В некоторых случаях, например, при определении сиаловой кислоты или других моносахаридов, данные предоставляют в виде молярного соотношения сиаловой кислоты к гликопротеину. Данные рассчитывают с учетом стандартного образца сиаловой кислоты и валидированного метода определения белка. Может быть использован как метод внутреннего стандарта, так и метод внешнего стандарта (2.2.46. *Хроматографические методы разделения*).

3-3-2. Количественное выражение профиля разделения

Профили или структуры распределения могут быть представлены в цифровом виде несколькими путями, включая процесс нормализации; процент содержания каждой аналитической мишени, например, части гликана, рассчитывают путем определения отклика части гликана как процентную составляющую общего отклика всех частей, не учитывая отклики растворителей, других добавленных реактивов и сигналов ниже

неучитываемого предела. Кроме того, могут использоваться такие численные выражения, как Z число, которые специфичны методу и продукту и описаны в частных статьях.

4. СТАНДАРТНЫЕ ОБРАЗЦЫ

Стандартные образцы для анализа гликанов выполняют две функции: проверка пригодности системы и подтверждение соответствия испытываемого образца специфицированным требованиям.

Стандартными образцами, используемыми для проверки пригодности системы, могут быть:

- стандартный образец испытываемого вещества;
- гликановая часть, высвобожденная из полностью изученного стандартного образца испытываемого вещества;
- хорошо изученные гликановые части, высвобожденные из гликопротеинов (например, фетуин, IgG);

– маркеры гликановых частей, изученные по показателям идентификации и чистоты.

Стандартный образец, используемый для получения заключения о соответствии испытываемого гликопротеина, является препаратом испытываемого вещества. Ранее отмечено, что методики анализа гликанов, описанные в частных статьях, предписывают использование стандартных образцов для испытываемого вещества и валидированной методики анализа гликанов.

5. ПУНКТЫ, КОТОРЫЕ УЧИТЫВАЮТСЯ ПРИ РАЗРАБОТКЕ МЕТОДА

Этот раздел представляет способы оценки исполнения в целом метода при его разработке. Степень проработки метода и аналитическая валидация выбираются на основе их пригодности для определенного продукта. В зависимости от выбранного метода, для анализа гликанов необходимы определенные действия, например, как:

- выделение и очистка (или деминерализация) гликопротеина;
- ферментативная (или химическая) обработка гликопротеина для селективного высвобождения как N -, так и O -связанных гликанов от белкового остова;
- выделение и очистка высвобожденных гликанов;
- контроль высвобожденной сиаловой кислоты и моносахаридных остатков;
- хромофорное мечение высвобожденных гликанов;
- разделение гликанов, нативных или флуоресцентно-меченных;
- идентификация и количественное определение гликанов (например, вычисление Z числа);
- определение положений связывания на основании относительных количеств гликозилированных и негликозилированных пептидов.

Выделение и очистка белков. Для удаления мешающих веществ (например, вспомогательные вещества, соли) могут понадобиться выделение и очистка гликопротеинов из матрицы, что при необходимости описывают в частной статье. Эти процедуры необходимо проводить воспроизводимо для гарантии количественной открываемости белка.

Высвобождение и выделение олигосахаридов. Подход, выбранный для высвобождения гликанов, зависит от анализируемых белков и основан на типе гликозилирования, т.е. N - или O -связанное гликозилирование. Не описанные в Фармакопее подходы, применяемые для высвобождения гликанов, должны быть оптимизированы для подтверждения количественного профилирования гликановых составляющих. Факторы, влияющие на эффективность расщепления, такие как соотношение концентраций фермент-белок, температура, время протекания реакции и предварительная денатурация белка, должны быть оптимизированы.

Следует отметить, что ферментативная/ химическая реакция не должна изменять строение гликана, например, не должна разрушать остатки сиаловой кислоты. Там, где присутствует более одного положения гликозилирования, при ферментативной обработке должны пропорционально высвобождаться все фрагменты олигосахаридов, присоединенные к белку, независимо от их структуры и своего конкретного места в белке.

Должна быть подтверждена воспроизводимость открываемости всех гликановых составляющих из реакционной смеси.

Дериватизация высвобожденных гликанов. Дериватизацию обычно выполняют в соответствии с методиками, неописанными в фармакопее. По этой причине повторная дериватизация всех гликановых групп должна верифицироваться, что может быть достигнуто при оптимизации условий реакций, таких как количество агентов дериватизации, температура и время реакции. Реакция дериватизации не должна изменять строение гликана, например, не должна разрушать остаток сиаловой кислоты.

Разделение, идентификация и проверка пригодности системы. Методы, используемые для анализа гликанов, должны позволять обнаружение и разделение разных фрагментов гликанов для достоверности идентификации и количественного анализа.

Критерии приемлемости для проверки пригодности системы, а также расщепления, открываемости и анализа гликанов, зависят от критических параметров испытания, которые влияют на конечный результат.

Сравнение гликановых карт испытуемого образца и стандартного образца, полученных в одинаковых условиях, является параметром для оценки правильности выполнения аналитической процедуры. Для дальнейшего подтверждения полученных результатов анализа могут быть повторно проведены с помощью независимого метода. Использование стандартного образца (например, стандартный образец испытуемого вещества, маркер гликана для проверки пригодности системы) является необходимым для установления параметров пригодности системы и валидации аналитической процедуры.

Воспроизводимость результатов количественного определения (например, расчет Z числа) гликана должна быть подтверждена.

Определение положений связывания на основании относительных количеств гликозилированных и негликозилированных пептидов. При установлении положений связывания путем сравнения гликозилированных и негликозилированных пептидов с ферментативно расщепленными гликопротеинами должна быть продемонстрирована воспроизводимость расщепления обеих форм пептидов.

6. СХЕМА ПРИНЯТИЯ РЕШЕНИЙ ПРИ АНАЛИЗЕ ГЛИКАНОВ

Эта система принятия решений приводится для информации и не является обязательной частью Фармакопеи.

Выбор метода для анализа гликанов производят в зависимости от уровня информации, необходимой для подтверждения качества гликопротеина, и устанавливают при разработке продукта.

Руководство по выбору методики для проведения гликанового анализа, при необходимости, представлено на рисунке 2.2.59.-2.

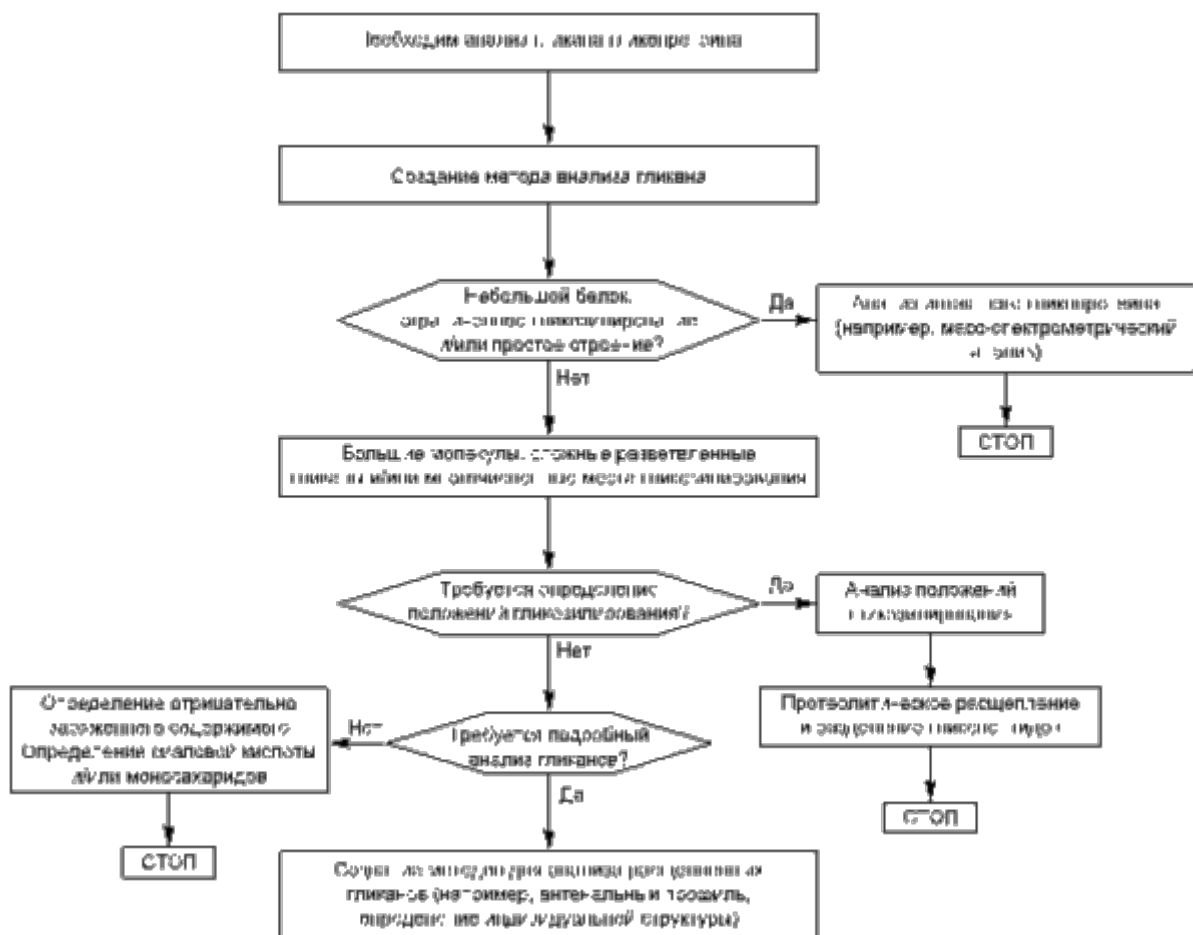


Рисунок 2.2.59.-2. Руководство по выбору методики для проведения анализа гликанов

01/2013:20260

2.2.60. ТЕМПЕРАТУРА ПЛАВЛЕНИЯ – ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЙ МЕТОД

В разделе описано измерение температуры плавления капиллярным методом с использованием инструментального метода определения.

ПРИБОР

Существуют 2 варианта автоматической регистрации:

- вариант А: по пропусканию света через капилляр с испытуемым образцом;
- вариант В: по свету, отраженному образцом в капилляре.

В обоих вариантах капиллярную трубку помещают в отверстие электронагреваемого металлического блока, снабженного температурным датчиком, размещенным в другом отверстии блока. Нагревательный блок должен при нагревании выдерживать заданную температуру с точностью до $\pm 0,1$ °C, а также обеспечивать медленную и устойчивую скорость нагрева 1 °C/мин после начальной изотермической стадии.

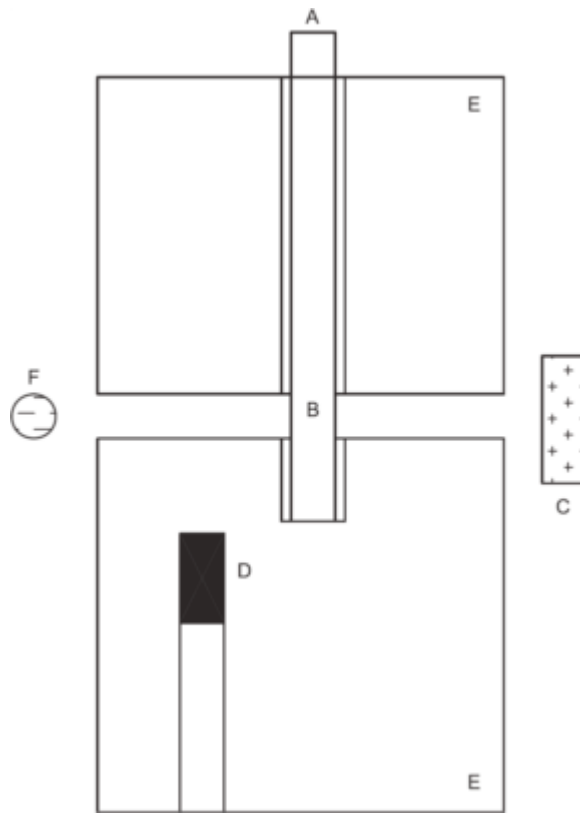


Рисунок 2.2.60.-1. Вариант А – пропускание

А – стеклянная капиллярная трубка; В – испытуемый образец;

С – фотодатчик; D – температурный датчик;

Е – нагревательный блок; F – источник излучения.

В варианте А луч света проходит через горизонтальное отверстие и вертикально установленную капиллярную трубку и попадает на фотодатчик.

В варианте В луч света освещает капиллярную трубку снаружи, а датчик записывает изображение.

Некоторые модели приборов позволяют проводить визуальное определение точки плавления.

Температура, при которой сигнал датчика изменит начальное показание, называется началом плавления, а температура, при которой сигнал достигнет окончательного значения – концом плавления, или *температурой плавления*.

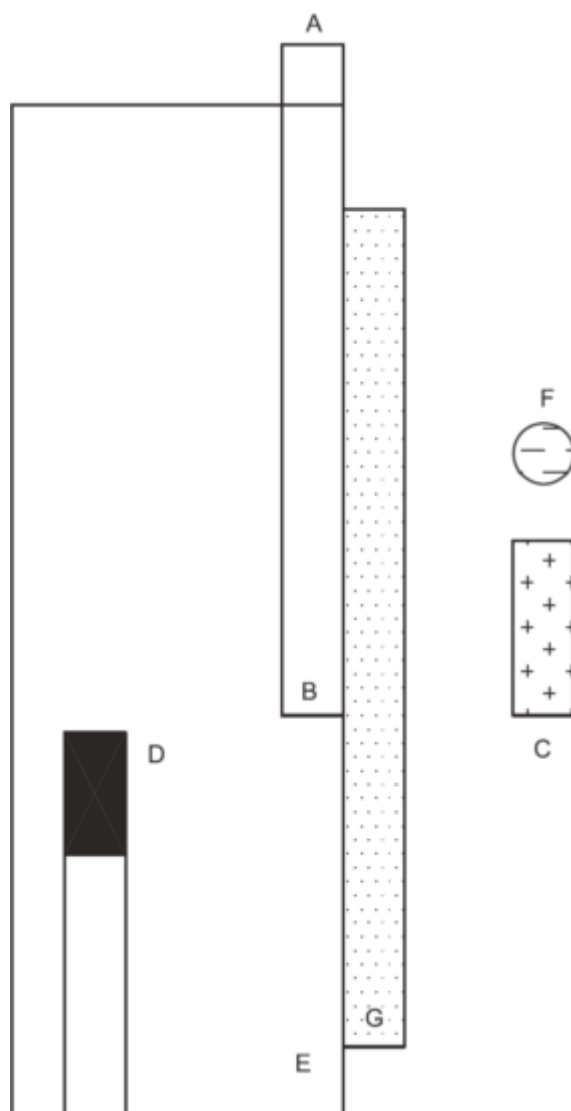


Рисунок 2.2.60.-2. Вариант В – отражение

A – стеклянная капиллярная трубка; B – испытуемый образец;
C – датчик; D – температурный датчик; E – нагревательный блок;
F – источник излучения; G – прозрачная пластинка.

Используют стеклянные капиллярные трубки с запаянным концом длиной 100 мм, наружным диаметром 1,3–1,5 мм и внутренним диаметром 0,8–1,3 мм. Толщина стенки капиллярной трубки – 0,1–0,3 мм.

Некоторые модели приборов позволяют определять температуру плавления более чем на одной капиллярной трубке.

МЕТОДИКА

Испытуемый образец, предварительно обработанный, как указано в частной статье, помещают в капиллярную трубку в количестве, достаточном для формирования в трубке столбика высотой около 4 мм. Трубку выдерживают в течение определенного времени при температуре, указанной в частной статье.

Далее поступают, как указано в инструкции изготовителя по эксплуатации прибора или следующим образом. Нагревают нагревательный блок до температуры на 5 °C ниже ожидаемой температуры плавления. Помещают капиллярную трубку в нагревательный блок запаянным концом вниз. Включают температурную программу. Когда субстанция начнет плавиться, изменится ее внешний вид, в результате чего после изменения сигнала фотодатчика, обусловленного пропусканием света (рисунок 2.2.60.-1) или изменением изображения (2.2.60.-2), автоматически будет записана температура нагревательного блока.

Повторяют испытание еще на 2-х образцах и рассчитывают среднее значение из 3-х результатов.

КАЛИБРОВКА

Температурная шкала прибора периодически должна проверяться путем измерения температуры плавления сертифицированных веществ сравнения. При этом используют капиллярные трубки такого же размера, что и при обычном измерении температуры плавления (см. «Прибор»).

Готовят по 3 капиллярные трубки на каждое сертифицированное вещество сравнения (не менее 2-х). Проводят испытание и рассчитывают среднее значение из 3-х результатов для каждого вещества.

ПРИГОДНОСТЬ СИСТЕМЫ

В дополнение к калибровке перед проведением испытания осуществляют верификацию с использованием подходящего сертифицированного вещества сравнения с температурой плавления, близкой к таковой для испытуемого образца.

Готовят по 3 капиллярные трубки. Проводят испытание и рассчитывают среднее значение из 3-х результатов.

Среднее значение должно укладываться в пределы, установленные в сертификате, прилагаемом к сертифицированному веществу сравнения.

2.3. ПОДЛИННОСТЬ (ИДЕНТИФИКАЦИЯ)

01/2013:20302

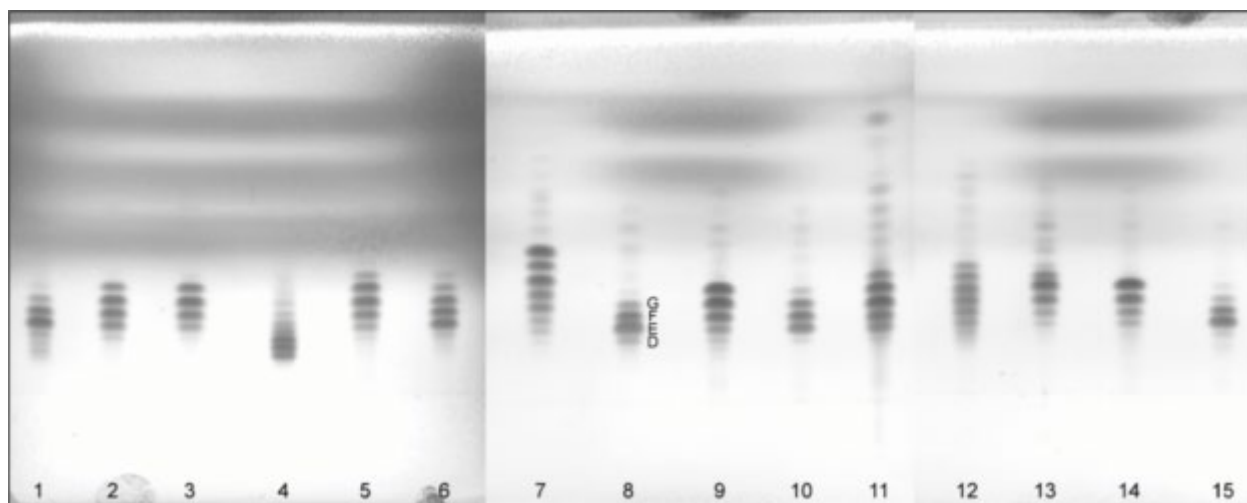
2.3.2. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЖИРНЫХ МАСЕЛ МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Определение проводят методом тонкослойной хроматографии (2.2.27), используя в качестве тонкого слоя силикагель октадецилсилильный для высокоэффективной тонкослойной хроматографии.

Испытуемый раствор. Если нет других указаний в частной статье, около 20 мг (1 каплю) жирного масла растворяют в 3 мл метиленхлорида *P*. *Раствор сравнения.* Около 20 мг (1 каплю) масла кукурузного *P* растворяют в 3 мл метиленхлорида *P*.

На линию старта хроматографической пластинки отдельно наносят по 1 мкл испытуемого раствора и раствора сравнения. Пластинку дважды хроматографируют на расстояние 0,5 см, используя в качестве подвижной фазы эфир *P*, и дважды хроматографируют на расстояние 8 см, используя в качестве подвижной фазы смесь растворителей: метиленхлорид *P* – кислота уксусная ледяная *P* – ацетон *P* (20:40:50, об/об/об). Пластинку сушат на воздухе, опрыскивают раствором 100 г/л кислоты фосфорномолибденовой *P* в 96 % спирте *P*, нагревают при температуре 120 °C в течение 3 мин и просматривают при дневном свете.

Типичная хроматограмма для идентификации жирных масел приведена на рисунке 2.3.2.-1.



- 1 – арахисовое масло; 2 – кунжутное масло; 3 – кукурузное масло;
4 – рапсовое масло; 5 – соевое масло;
6 – рапсовое масло (не содержащее эруковой кислоты); 7 – льняное масло;
8 – оливковое масло; 9 – подсолнечное масло;
10 – миндальное масло; 11 – масло зародышей пшеницы;
12 – масло бурачника лекарственного; 13 – энотеровое масло;
14 – сафлоровое масло (тип I); 15 – сафлоровое масло (тип II).

01/2013:20303

2.3.3. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ФЕНОТИАЗИНОВ МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Определение проводят методом тонкослойной хроматографии (2.2.27), используя в качестве тонкого слоя *кизельгур G P*. Пластинку помещают в закрытую камеру с необходимым количеством пропитывающей смеси, содержащей 10 % (об/об) *феноксиэтанола P* в растворе 50 г/л *макрогола 300 P* в *ацетоне P*, таким образом, чтобы она была погружена в пропитывающую смесь примерно на 5 мм. Когда фронт растворителей пройдет 17 см от нижнего края пластинки, ее вынимают из камеры и тотчас используют для хроматографирования. Хроматографирование проводят в том же направлении, что и пропитывание.

Испытуемый раствор. 20 мг испытуемого образца растворяют в *хлороформе P* и доводят до объема 10 мл этим же растворителем.

Раствор сравнения. 20 мг соответствующего ФСО растворяют в *хлороформе P* и доводят до объема 10 мл этим же растворителем.

На линию старта хроматографической пластинки отдельно наносят по 2 мкл испытуемого раствора и раствора сравнения. Пластинку помещают в камеру со смесью *петролейный эфир P – диэтиламин P* (50:1, об/об), насыщенной *феноксиэтанолом P* (т.е. от 3 мл до 4 мл *феноксиэтанола P* прибавляют к вышеуказанной смеси растворителей, взбалтывают до образования устойчивой мутности, декантируют и используют верхний слой, который может быть мутным). Хроматографирование проводят в темном месте. Когда фронт растворителей пройдет 15 см от линии старта, пластинку вынимают из камеры, помещают в ультрафиолетовый свет с длиной волны 365 нм и через несколько минут проводят оценку хроматограммы.

На хроматограмме испытуемого раствора обнаруживается пятно, соответствующее по расположению, флуоресценции и размеру пятну на хроматограмме раствора сравнения. Затем пластинку опрыскивают 10 % (об/об) *раствором кислоты серной P* в 96 % *спирте P*. На хроматограмме испытуемого раствора обнаруживается пятно, соответствующее по цвету, а также стабильности окраски в течение не менее 20 мин, пятну на хроматограмме раствора сравнения.

01/2013:20304

2.3.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗАПАХА

От 0,5 г до 2,0 г испытуемого образца распределяют тонким слоем на часовом стекле диаметром от 6 см до 8 см. Через 15 мин определяют запах или делают вывод о его отсутствии.

2.4. ИСПЫТАНИЯ НА ПРЕДЕЛЬНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ПРИМЕСЕЙ

01/2013:20401

2.4.1. АММОНИЯ СОЛИ

Если нет других указаний в частной статье, используют метод А.

МЕТОД А

Количество испытуемого образца, указанное в частной статье, помещают в пробирку, растворяют в 14 мл *воды Р*, при необходимости подщелачивают *раствором натрия гидроксида разведенным Р* и доводят *водой Р* до объема 15 мл. Прибавляют 0,3 мл *раствора калия тетраiodмеркурата щелочного Р*. Пробирку закрывают.

В качестве эталона используют раствор, полученный прибавлением к 10 мл *эталонного раствора аммония (1 ррт NH_4) Р* 5 мл *воды Р* и 0,3 мл *раствора калия тетраiodмеркурата щелочного Р*. Пробирку закрывают.

Через 5 мин желтая окраска испытуемого раствора должна быть не интенсивнее окраски эталона.

МЕТОД В

Количество мелкоизмельченного испытуемого образца, указанное в частной статье, помещают в сосуд вместимостью 25 мл, снабженный полиэтиленовой пробкой, и растворяют или суспендируют в 1 мл *воды Р*. Прибавляют 0,30 г *магния оксида тяжелого Р*, помещают в сосуд под пробку полоску *серебряно-марганцевой бумаги Р*, смоченную несколькими каплями *воды Р*, таким образом, чтобы отрезок бумаги размером 5 × 5 мм находился ниже нижнего края пробки, после чего сосуд немедленно закрывают пробкой. Перемешивают содержимое сосуда круговыми движениями, не допуская попадания брызг на бумагу, и выдерживают при температуре 40 °С в течение 30 мин.

Параллельно с теми же количествами реактивов и в этих же условиях готовят эталон. К указанному в частной статье количеству *эталонного раствора аммония (1 ррт NH_4) Р* прибавляют 1 мл *воды Р*, 0,30 г *магния оксида тяжелого Р* и далее поступают, как с испытуемым раствором.

Серая окраска *серебряно-марганцевой бумаги Р*, полученная в опыте с испытуемым раствором, должна быть не интенсивнее окраски *серебряно-марганцевой бумаги Р*, полученной в опыте с эталоном.

#МЕТОД С

Применяют для образцов, содержащих щелочноземельные и тяжелые металлы.

Количество испытуемого образца, указанное в частной статье, помещают в пробирку, растворяют в минимальном объеме *воды Р*, прибавляют при охлаждении 2 мл *раствора натрия гидроксида разведенного Р* и 2 мл *раствора натрия карбоната Р*. Раствор разводят *водой Р* до указанной в частной статье концентрации, встряхивают и фильтруют. 10 мл полученного фильтрата помещают в пробирку, доводят *водой Р* до объема 15 мл и прибавляют 0,3 мл *раствора калия тетраiodмеркурата щелочного Р*.

В качестве эталона используют смесь 10 мл *эталонного раствора аммония (1 ррт NH_4) Р*, 5 мл *воды Р* и 0,3 мл *раствора калия тетраiodмеркурата щелочного Р*. Пробирки закрывают.

Через 5 мин желтая окраска испытуемого раствора должна быть не интенсивнее окраски эталона.

#МЕТОД D

Применяют для образцов, содержащих более 300 ррт примеси железа.

Количество испытуемого образца, указанное в частной статье, помещают в пробирку, растворяют в 10 мл *воды Р*, прибавляют 2 капли *раствора натрия гидроксида разведенного Р* и 3 мл *раствора 200 г/л калия-натрия тартрата Р*. Тщательно перемешивают, доводят *водой Р* до объема 15 мл и прибавляют 0,3 мл *раствора калия тетраiodмеркурата щелочного Р*. Пробирку закрывают.

Параллельно с теми же количествами реактивов и в тех же условиях готовят эталон, используя вместо 10 мл испытуемого раствора 10 мл *эталонного раствора аммония (1 ррт NH_4) Р*.

Через 5 мин желтая окраска испытуемого раствора должна быть не интенсивнее окраски эталона.

2.4.2. МЫШЬЯК

МЕТОД А

Прибор (см. рисунок 2.4.2.-1) состоит из конической колбы вместимостью 100 мл, закрытой стеклянной притертой пробкой, через которую проходит стеклянная трубка длиной около 200 мм с внутренним диаметром 5 мм. Нижняя часть трубки вытянута до внутреннего диаметра 1,0 мм; на расстоянии 15 мм от кончика трубки расположено боковое отверстие диаметром от 2 мм до 3 мм. Трубка помещена таким образом, чтобы боковое отверстие находилось минимум на 3 мм ниже нижней поверхности пробки. Верхний конец трубки должен иметь совершенно плоскую притертую поверхность, расположенную под прямым углом к оси трубки. Другая стеклянная трубка длиной 30 мм с таким же внутренним диаметром и такой же плоской притертой поверхностью помещается наверху первой и плотно прикрепляется к ней двумя пружинами.

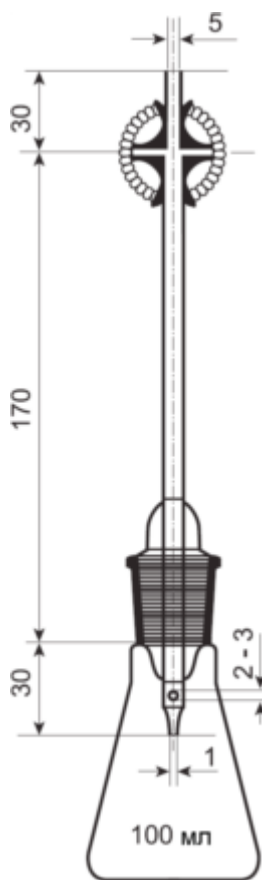


Рисунок 2.4.2.-1. Прибор для испытания на мышьяк (метод А)
(размеры указаны в миллиметрах)

Нижнюю трубку неплотно заполняют 50–60 мг *свинцово-ацетатной ваты Р* или помещают небольшой ватный тампон и скрученную в трубочку полоску *свинцово-ацетатной бумаги Р* массой 50–60 мг. Между плоскими поверхностями трубок помещают кусочек *ртутно-бромидной бумаги Р* такого размера, чтобы закрыть отверстие трубки (15 × 15 мм).

Указанное количество испытуемого образца помещают в коническую колбу и растворяют в 25 мл *воды Р* или указанный объем испытуемого раствора помещают в коническую колбу, доводят *водой Р* до объема 25 мл. Прибавляют 15 мл *кислоты хлористоводородной Р*, 0,1 мл *раствора олова (II) хлорида Р*, 5 мл *раствора калия йодида Р*, выдерживают в течение 15 мин и затем прибавляют 5 г *цинка активированного Р*. Немедленно соединяют две части прибора, колбу помещают в водяную баню, температура которой поддерживается так, чтобы обеспечить равномерное выделение газа [#](температура водяной бани не должна превышать 40 °С) [#].

Параллельно с теми же количествами реактивов и в тех же условиях проводят опыт с эталоном, состоящим из 1 мл *эталонного раствора мышьяка (1 ppm As) P* и 24 мл *воды P*.

По истечении не менее 2 ч окраска ртутно-бромидной бумаги, полученная в опыте с испытуемым раствором, должна быть не интенсивнее окраски ртутно-бромидной бумаги, полученной в опыте с эталоном.

МЕТОД В

Количество испытуемого образца, указанное в частной статье, помещают в пробирку, содержащую 4 мл *кислоты хлористоводородной P* и около 5 мг *калия йодида P*, и прибавляют 3 мл *реактива гипофосфита P*. Смесь нагревают на водяной бане в течение 15 мин, время от времени встряхивая.

Параллельно с теми же количествами реактивов и в тех же условиях готовят эталон, используя вместо испытуемого образца 0,5 мл *эталонного раствора мышьяка (10 ppm As) P*.

После нагревания на водяной бане окраска испытуемого раствора должна быть не интенсивнее окраски эталона.

[#]Метод В применяют в случае определения наряду с мышьяком селена и теллура, а также при определении мышьяка в образцах, содержащих сурьму, висмут, ртуть и серебро, а также сульфиды и сульфиты, и в других случаях, указанных в частных статьях.[#]

01/2013:20403

2.4.3. КАЛЬЦИЙ

При приготовлении всех растворов, применяемых в данном испытании, должна использоваться вода дистиллированная P.

К 0,2 мл *эталонного раствора кальция спиртового (100 ppm Ca) P* прибавляют 1 мл *раствора аммония оксалата P*. Через 1 мин прибавляют смесь из 1 мл *кислоты уксусной разведенной P* и 15 мл раствора, содержащего указанное в частной статье количество испытуемого образца, и встряхивают.

Параллельно с теми же количествами реактивов и в тех же условиях готовят эталон, используя смесь из 1 мл *кислоты уксусной разведенной P*, 10 мл *эталонного раствора кальция водного (10 ppm Ca) P* и 5 мл *воды дистиллированной P*.

Через 15 мин опалесценция испытуемого раствора не должна превышать опалесценцию эталона.

01/2013:20404

2.4.4. ХЛОРИДЫ

К 15 мл раствора, указанного в частной статье, прибавляют 1 мл *кислоты азотной разведенной P* и выливают смесь в один прием в пробирку, содержащую 1 мл *раствора серебра нитрата P2*.

Параллельно с теми же количествами реактивов и в тех же условиях готовят эталон, используя вместо 15 мл испытуемого раствора 10 мл *эталонного раствора хлорида (5 ppm Cl) P* и 5 мл *воды P*. Пробирки помещают в защищенное от света место.

Через 5 мин пробирки просматривают на черном фоне горизонтально (перпендикулярно оси пробирок). Опалесценция испытуемого раствора не должна превышать опалесценцию эталона.

01/2013:20405

2.4.5. ФТОРИДЫ

Количество испытуемого образца, указанное в частной статье, 0,1 г *песка P*, промытого кислотой, и 20 мл смеси из равных объемов *кислоты серной P* и *воды P*

помещают во внутреннюю пробирку прибора, изображенного на рисунке 2.4.5.-1. Рубашку, заполненную *тетрахлорэтаном Р*, нагревают до температуры кипения тетрахлорэтана (146 °С). Подсоединяют генератор водяного пара и отгоняют содержимое пробирки с перегретым водяным паром, собирая отгон в мерную колбу вместимостью 100 мл, содержащую 0,3 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида и 0,1 мл раствора фенолфталеина *Р*. Объем раствора в пробирке во время отгонки должен быть постоянным (20 мл). Поддерживают щелочную реакцию содержимого мерной колбы, при необходимости прибавляя по каплям 0,1 М раствор натрия гидроксида. Доводят объем дистиллята водой *Р* до 100 мл и перемешивают (испытываемый раствор).

Параллельно с теми же количествами реактивов и в тех же условиях готовят эталон, используя вместо испытуемого образца 5 мл эталонного раствора фторида (10 ppm F) *Р*.

В цилиндр со стеклянной притертой пробкой помещают 20 мл испытуемого раствора, в другой такой же цилиндр – 20 мл эталона, затем в каждый цилиндр прибавляют по 5 мл реактива аминотетракарбиоксиновой кислоты *Р*. Через 20 мин синяя окраска испытуемого раствора, появившаяся вместо первоначальной красной, должна быть не интенсивнее окраски эталона.

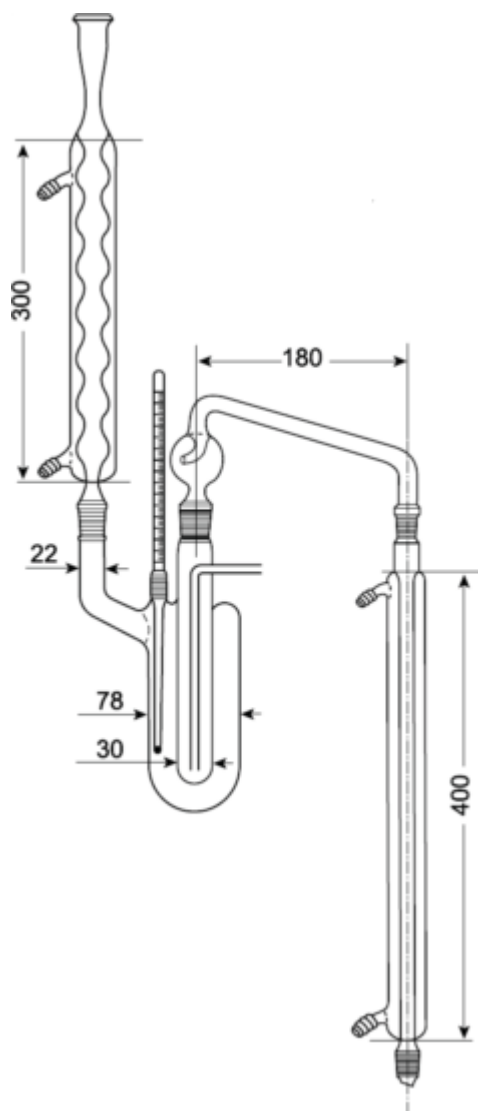


Рисунок 2.4.5.-1. Прибор для испытания на фториды
(размеры указаны в миллиметрах)

01/2013:20406

2.4.6. МАГНИЙ

К 10 мл раствора испытуемого образца, приготовленного, как указано в частной статье, прибавляют 0,1 г динатрия тетрабората *Р*. Определяют значение pH раствора и

при необходимости доводят до pH 8,8–9,2, используя кислоту хлористоводородную разведенную *P* или раствор натрия гидроксида разведенный *P*. Раствор помещают в делительную воронку, встряхивают в течение 1 мин с двумя порциями, по 5 мл каждая, раствора 1 г/л гидроксихинолина *P* в хлороформе *P*, оставляют до расслоения и отбрасывают органический слой. К водному слою прибавляют 0,4 мл бутиламина *P* и 0,1 мл триэтанолamina *P*. Определяют значение pH раствора и при необходимости доводят до pH 10,5–11,5. Прибавляют 4 мл раствора 1 г/л гидроксихинолина *P* в хлороформе *P*, встряхивают в течение 1 мин и оставляют до расслоения. Для испытания используют нижний слой.

Параллельно с теми же количествами реактивов и в тех же условиях готовят эталон, используя вместо 10 мл раствора испытуемого вещества смесь из 1 мл эталонного раствора магния (10 ppm Mg) *P* и 9 мл воды *P*.

Окраска испытуемого раствора должна быть не интенсивнее окраски эталона.

01/2013:20407

2.4.7. МАГНИЙ И ЩЕЛОЧНОЗЕМЕЛЬНЫЕ МЕТАЛЛЫ

К 200 мл воды *P* прибавляют 0,1 г гидроксилamina гидрохлорида *P*, 10 мл аммиачного буферного раствора pH 10,0 *P*, 1 мл 0,1 М раствора цинка сульфата и около 15 мг индикаторной смеси протравного черного II *P*. Нагревают до температуры около 40 °С. Полученный раствор титруют 0,01 М раствором натрия эдетата до перехода окраски раствора от фиолетовой к синей. К полученному раствору прибавляют указанное в частной статье количество испытуемого образца, растворенное в 100 мл воды *P*, или используют указанный в частной статье раствор. Если окраска раствора становится фиолетовой, снова титруют до перехода окраски раствора к синей.

Объем 0,01 М раствора натрия эдетата, израсходованный на второе титрование, не должен превышать объем титранта, указанный в частной статье.

01/2013:20408

2.4.8. ТЯЖЕЛЫЕ МЕТАЛЛЫ

Все описанные ниже методы требуют использования тиаоацетамидного реактива *P*. Допускается использование раствора натрия сульфида *P1* (0,1 мл) вместо тиаоацетамидного реактива *P*. Если предписанная в частной статье методика испытания разработана с использованием тиаоацетамидного реактива *P*, но вместо него используется раствор натрия сульфида *P1*, то для методов А, В и Н необходимо введение проверочного раствора, приготовленного из такого же количества испытуемого образца, что используется при приготовлении испытуемого раствора, к которому прибавляют такой же объем эталонного раствора свинца, что и при приготовлении раствора сравнения. Испытание считают недействительным, если окраска проверочного раствора менее интенсивная, чем окраска раствора сравнения.

МЕТОД А

Испытуемый раствор. 12 мл указанного в частной статье водного раствора испытуемого образца.

Раствор сравнения (эталон). Смесь из 10 мл эталонного раствора свинца (1 ppm Pb) *P* или эталонного раствора свинца (2 ppm Pb) *P*, указанного в частной статье, и 2 мл указанного в частной статье водного раствора испытуемого образца.

Контрольный раствор. Смесь из 10 мл воды *P* и 2 мл указанного в частной статье водного раствора испытуемого образца.

К каждому раствору прибавляют по 2 мл буферного раствора pH 3,5 *P* и перемешивают. Полученные растворы прибавляют к порциям по 1,2 мл тиаоацетамидного реактива *P* и немедленно перемешивают. Сравнение растворов проводят через 2 мин.

Пригодность системы: раствор сравнения имеет светло-коричневую окраску по сравнению с контрольным раствором.

Результат: окраска испытуемого раствора должна быть не интенсивнее окраски раствора сравнения.

Если невозможно дать однозначную оценку результату испытания, растворы фильтруют через подходящий мембранный фильтр (номинальный размер пор 0,45 мкм). Давление поршня шприца должно быть умеренным и постоянным для обеспечения медленного и равномерного фильтрования. Сравнивают окраски мембранных фильтров, полученные в опытах с разными растворами.

МЕТОД В

Испытуемый раствор. 12 мл указанного в частной статье раствора, приготовленного с использованием органического растворителя, содержащего минимальное количество воды (например, диоксан или ацетон, содержащие по 15 % воды).

Раствор сравнения (эталон). Смесь из 10 мл эталонного раствора свинца (1 ppm или 2 ppm Pb), указанного в частной статье, и 2 мл указанного в частной статье раствора испытуемого образца в органическом растворителе. Эталонный раствор свинца (1 ppm или 2 ppm Pb) готовят путем разведения *эталонного раствора свинца (100 ppm Pb)* органическим растворителем, применяемым для растворения испытуемого образца.

Контрольный раствор. Смесь из 10 мл растворителя, применяемого для растворения испытуемого образца, и 2 мл указанного в частной статье раствора испытуемого образца в органическом растворителе.

К каждому раствору прибавляют по 2 мл *буферного раствора pH 3,5 Р* и перемешивают. Полученные растворы прибавляют к порциям по 1,2 мл *тиоацетамидного реактива Р* и немедленно перемешивают. Сравнение растворов проводят через 2 мин.

Пригодность системы: раствор сравнения имеет светло-коричневую окраску по сравнению с контрольным раствором.

Результат: окраска испытуемого раствора должна быть не интенсивнее окраски раствора сравнения.

Если невозможно дать однозначную оценку результату испытания, растворы фильтруют через подходящий мембранный фильтр (номинальный размер пор 0,45 мкм). Давление поршня шприца должно быть умеренным и постоянным для обеспечения медленного и равномерного фильтрования. Сравнивают окраски мембранных фильтров, полученные в опытах с разными растворами.

МЕТОД С

Испытуемый раствор. В кварцевый тигель помещают 4 мл раствора 250 г/л *магния сульфата Р* в *кислоте серной разведенной Р* и прибавляют количество испытуемого образца, указанное в частной статье (не более 2 г). Перемешивают тонкой стеклянной палочкой и осторожно нагревают. Если смесь жидкая, осторожно выпаривают на водяной бане до сухого остатка. Затем постепенно нагревают до обугливания и продолжают нагревание до получения почти белого или, в крайнем случае, сероватого остатка. Сжигание проводят при температуре не более 800 °С. Оставляют до охлаждения, затем остаток в тигле смачивают несколькими каплями *кислоты серной разведенной Р*. Выпаривают до сухого остатка, вновь сжигают и оставляют до охлаждения. Общее время сжигания не должно превышать 2 ч. Остаток из тигля количественно переносят в пробирку двумя порциями *кислоты хлористоводородной разведенной Р* по 5 мл каждая. Прибавляют 0,1 мл *раствора фенолфталеина Р*, затем нейтрализуют *раствором аммиака концентрированным Р* до появления розовой окраски. Охлаждают, прибавляют *кислоту уксусную ледяную Р* до обесцвечивания раствора и прибавляют еще 0,5 мл *кислоты уксусной ледяной Р*. При необходимости фильтруют и промывают фильтр *водой Р*. Доводят объем раствора *водой Р* до 20 мл и перемешивают.

Раствор сравнения (эталон). Готовят аналогично испытуемому раствору, используя указанное в частной статье количество *эталонного раствора свинца (10 ppm Pb) Р* вместо испытуемого образца. К 10 мл полученного раствора прибавляют 2 мл испытуемого раствора.

Проверочный раствор. Готовят аналогично испытуемому раствору, прибавляя к испытуемому образцу указанный в частной статье объем *эталонного раствора свинца (10 ppm Pb) P* для приготовления раствора сравнения. К 10 мл полученного раствора прибавляют 2 мл испытуемого раствора.

Контрольный раствор. Смесь из 10 мл *воды P* и 2 мл испытуемого раствора.

К 12 мл каждого раствора прибавляют по 2 мл *буферного раствора pH 3,5 P* и перемешивают. Полученные растворы прибавляют к порциям по 1,2 мл *тиоацетамидного реактива P* и немедленно перемешивают. Сравнение растворов проводят через 2 мин.

Пригодность системы:

– раствор сравнения имеет светло-коричневую окраску по сравнению с контрольным раствором;

– окраска проверочного раствора не менее интенсивная, чем окраска раствора сравнения.

Результат: окраска испытуемого раствора должна быть не интенсивнее окраски раствора сравнения.

Если невозможно дать однозначную оценку результату испытания, растворы фильтруют через подходящий мембранный фильтр (номинальный размер пор 0,45 мкм). Давление поршня шприца должно быть умеренным и постоянным для обеспечения медленного и равномерного фильтрования. Сравнивают окраски мембранных фильтров, полученные в опытах с разными растворами.

МЕТОД D

Испытуемый раствор. Количество испытуемого образца, указанное в частной статье, помещают в кварцевый тигель и тщательно смешивают с 0,5 г *магния оксида P1*. Сжигают при слабом красном калении [#](около 600 °C) [#] до образования однородного остатка белого или серовато-белого цвета. Если после 30 мин сжигания смесь остается окрашенной, тигель оставляют до охлаждения, содержимое перемешивают тонкой стеклянной палочкой и повторяют сжигание. При необходимости операцию повторяют. Нагревают при температуре 800 °C около 1 ч. Остаток из тигля количественно переносят в пробирку двумя порциями по 5 мл смеси из равных объемов раствора кислоты хлористоводородной P1 и *воды P*. Прибавляют 0,1 мл *раствора фенолфталеина P*, затем подщелачивают *раствором аммиака концентрированным P* до появления розовой окраски. Охлаждают, подкисляют *кислотой уксусной ледяной P* до обесцвечивания раствора и прибавляют еще 0,5 мл *кислоты уксусной ледяной P*. При необходимости фильтруют и промывают фильтр *водой P*. Доводят объем раствора *водой P* до 20 мл и перемешивают.

Раствор сравнения (эталон). Готовят аналогично испытуемому раствору, используя указанное в частной статье количество *эталонного раствора свинца (10 ppm Pb) P* вместо испытуемого образца и нагревая при температуре от 100 °C до 105 °C. К 10 мл полученного раствора прибавляют 2 мл испытуемого раствора.

Проверочный раствор. Готовят аналогично испытуемому раствору, прибавляя к испытуемому образцу указанный в частной статье объем *эталонного раствора свинца (10 ppm Pb) P* для приготовления раствора сравнения и нагревая при температуре от 100 °C до 105 °C. К 10 мл полученного раствора прибавляют 2 мл испытуемого раствора.

Контрольный раствор. Смесь из 10 мл *воды P* и 2 мл испытуемого раствора.

К 12 мл каждого раствора прибавляют по 2 мл *буферного раствора pH 3,5 P* и перемешивают. Полученные растворы прибавляют к порциям по 1,2 мл *тиоацетамидного реактива P* и немедленно перемешивают. Сравнение растворов проводят через 2 мин.

Пригодность системы:

– раствор сравнения имеет светло-коричневую окраску по сравнению с контрольным раствором;

– окраска проверочного раствора не менее интенсивная, чем окраска раствора сравнения.

Результат: окраска испытуемого раствора должна быть не интенсивнее окраски раствора сравнения.

Если невозможно дать однозначную оценку результату испытания, растворы фильтруют через подходящий мембранный фильтр (номинальный размер пор 0,45 мкм).

Давление поршня шприца должно быть умеренным и постоянным для обеспечения медленного и равномерного фильтрования. Сравнивают окраски мембранных фильтров, полученные в опытах с разными растворами.

МЕТОД Е

Испытуемый раствор. Количество испытуемого образца, указанное в частной статье, растворяют в 30 мл или в указанном объеме воды *P*. *Раствор сравнения (эталон).* Количество эталонного раствора свинца (1 ppm Pb) *P*, указанное в частной статье, разводят водой *P* до объема испытуемого раствора.

В держатель устройства для фильтрования, на подложку которого помещен мембранный фильтр (номинальный размер пор 3 мкм), а над ним – предфильтр (рисунок 2.4.8.-1), устанавливают шприц вместимостью 50 мл без поршня.

Испытуемый раствор помещают в шприц и вводят поршень, создавая такое давление, чтобы профильтровался весь раствор. Открывают держатель, вынимают предфильтр и проверяют отсутствие примесей на мембранном фильтре. В случае обнаружения примесей его заменяют другим мембранным фильтром и операцию повторяют в тех же условиях.

К фильтрату или к указанному в частной статье объему фильтрата прибавляют 2 мл *буферного раствора pH 3,5 P* и перемешивают. Полученные растворы прибавляют к порциям по 1,2 мл *реагента тиаоацетамида P* и перемешивают, оставляют на 10 мин и вновь фильтруют, как описано выше, но расположение фильтров изменяют таким образом, чтобы жидкость проходила вначале через мембранный фильтр, а затем – через предфильтр (рисунок 2.4.8.-1). Давление поршня шприца должно быть умеренным и постоянным для обеспечения медленного и равномерного фильтрования. После окончания фильтрования держатель открывают, мембранный фильтр вынимают и высушивают при помощи фильтровальной бумаги.

Параллельно проводят аналогичное испытание с раствором сравнения.

Результат: окраска мембранного фильтра, полученная в опыте с испытуемым раствором, должна быть не интенсивнее окраски мембранного фильтра, полученной в опыте с раствором сравнения.

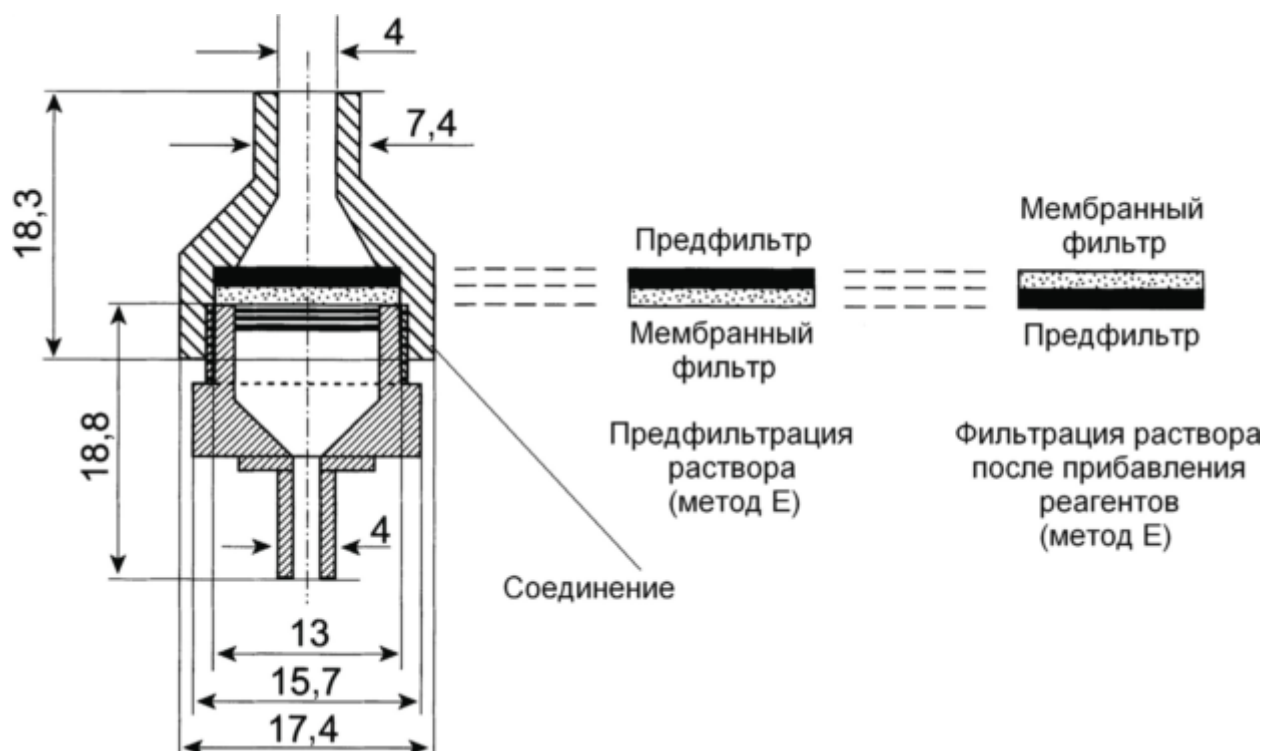


Рисунок 2.4.8.-1. Прибор для испытания на соли тяжелых металлов (размеры указаны в миллиметрах)

МЕТОД F

Испытуемый раствор. Количество испытуемого образца, указанное в частной статье, помещают в чистую сухую колбу Кьельдаля вместимостью 100 мл (в случае интенсивного

пенообразования следует использовать колбу вместимостью 300 мл). Колбу закрепляют под углом 45° и, если испытуемый образец представляет собой твердое вещество, прибавляют смесь из 8 мл *кислоты серной Р* и 10 мл *кислоты азотной Р* в количестве, достаточном для полного смачивания испытуемого образца; если испытуемый образец представляет собой жидкость, прибавляют несколько миллилитров смеси из 8 мл *кислоты серной Р* и 10 мл *кислоты азотной Р*. Осторожно нагревают до начала реакции. После прекращения реакции прибавляют дополнительные порции этой же смеси кислот, нагревая после каждого прибавления. Операцию повторяют до тех пор, пока объем прибавленной смеси кислот не достигнет 18 мл. Увеличивают температуру нагревания и осторожно кипятят до потемнения раствора. Охлаждают, прибавляют 2 мл *кислоты азотной Р* и вновь нагревают до потемнения раствора. Продолжают прибавление *кислоты азотной Р* с последующим нагреванием до тех пор, пока раствор не перестанет темнеть, затем сильно нагревают до появления плотных белых паров. Охлаждают, осторожно прибавляют 5 мл *воды Р*, кипятят с предосторожностями до появления плотных белых паров и продолжают нагревание до получения остатка объемом от 2 мл до 3 мл. Охлаждают, осторожно прибавляют 5 мл *воды Р* и определяют окраску раствора. Если раствор имеет желтую окраску, прибавляют по каплям 1 мл *раствора водорода пероксида концентрированного Р*, вновь нагревают до появления плотных белых паров и продолжают нагревание до получения остатка объемом от 2 мл до 3 мл. Если окраска раствора все еще остается желтой, повторно прибавляют 5 мл *воды Р* и 1 мл *раствора водорода пероксида концентрированного Р* до обесцвечивания раствора. Охлаждают и осторожно разводят *водой Р*. Ополаскивая колбу *водой Р*, полученный раствор переносят в пробирку вместимостью 50 мл и доводят до объема 25 мл этим же растворителем.

Доводят рН раствора до 3,0–4,0 *раствором аммиака концентрированным Р1* (при приближении к указанному значению рН можно применять *раствор аммиака разведенный Р1*), используя в качестве внешнего индикатора индикаторную бумагу, действующую в узком интервале рН, затем доводят объем раствора *водой Р* до 40 мл и перемешивают. Прибавляют 2 мл *буферного раствора рН 3,5 Р* и перемешивают. Полученный раствор прибавляют к 1,2 мл *тиоацетамидного реактива Р* и немедленно перемешивают. Доводят *водой Р* до объема 50 мл и перемешивают.

Раствор сравнения (эталон). Готовят параллельно с теми же количествами реактивов и в тех же условиях, используя вместо испытуемого образца указанный в частной статье объем *эталонного раствора свинца (10 ppm Pb) Р*.

Проверочный раствор. Готовят аналогично испытуемому раствору, прибавляя к испытуемому образцу указанный в частной статье объем *эталонного раствора свинца (10 ppm Pb) Р* для приготовления раствора сравнения.

Контрольный раствор. Готовят аналогично испытуемому раствору, но без прибавления испытуемого образца.

Просматривают растворы через 2 мин после приготовления вертикально напротив белого фона.

Пригодность системы:

- раствор сравнения имеет коричневую окраску по сравнению с контрольным раствором;

- окраска проверочного раствора не менее интенсивная, чем окраска раствора сравнения.

Результат: коричневая окраска испытуемого раствора должна быть не интенсивнее окраски раствора сравнения.

Если невозможно дать однозначную оценку результату испытания, растворы фильтруют через подходящий мембранный фильтр (номинальный размер пор 0,45 мкм). Давление поршня шприца должно быть умеренным и постоянным для обеспечения медленного и равномерного фильтрования. Сравнивают окраски мембранных фильтров, полученные в опытах с разными растворами.

МЕТОД G

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ: при использовании сосудов для сжигания при высоком давлении необходимо соблюдать требования по технике безопасности, указанные

производителем оборудования. Циклы сжигания должны соответствовать типу используемой микроволновой печи (например, микроволновые печи с контролем мощности, печи с контролем температуры или печи с контролем давления). Кроме того, циклы сжигания должны соответствовать инструкции по эксплуатации используемого оборудования. Циклы сжигания применяют в случае образования прозрачных растворов.

Испытуемый раствор. Количество испытуемого образца, указанное в частной статье (не более 0,5 г), помещают в подходящий чистый лабораторный стакан с магнитной мешалкой, прибавляют последовательно 2,7 мл кислоты серной Р, 3,3 мл кислоты азотной Р и 2,0 мл раствора водорода пероксида концентрированного Р, прибавляя каждый реактив после завершения реакции между испытуемым образцом и предыдущим реактивом. Полученную смесь количественно переносят в сухой, устойчивый к высокому давлению сосуд для сжигания (фторсодержащий полимер или кварцевое стекло).

Раствор сравнения. Готовят аналогично испытуемому раствору, используя вместо испытуемого образца указанный в частной статье объем эталонного раствора свинца (10 ppm Pb) Р.

Проверочный раствор. Готовят аналогично испытуемому раствору, прибавляя к испытуемому образцу указанный в частной статье объем эталонного раствора свинца (10 ppm Pb) Р для приготовления раствора сравнения.

Контрольный раствор. Готовят аналогично испытуемому раствору, но без прибавления испытуемого образца.

Сосуды укупоривают и помещают в лабораторную микроволновую печь. Процедуру сжигания проводят, последовательно используя две подходящие программы. В зависимости от типа используемой микроволновой печи (следят за давлением, температурой или мощностью) разрабатывают многоступенчатые программы сжигания для адекватного контроля над протеканием реакции. После завершения первой программы оставляют сосуды до охлаждения перед их вскрытием. Затем в каждый сосуд прибавляют по 2,0 мл раствора водорода пероксида концентрированного Р и сжигают, используя вторую программу. После завершения второй программы оставляют сосуды до охлаждения перед их вскрытием. При необходимости для получения прозрачного раствора повторно прибавляют раствор водорода пероксида концентрированного Р и проводят вторую программу сжигания. Охлаждают и осторожно разводят водой Р. Ополаскивая сосуд водой Р, полученный раствор переносят в колбу и доводят до объема 25 мл этим же растворителем.

Доводят рН растворов до 3,0–4,0 раствором аммиака концентрированным Р1 (при приближении к указанному значению рН можно применять раствор аммиака разведенный Р1), используя в качестве внешнего индикатора индикаторную бумагу, действующую в узком интервале рН. Для предотвращения нагревания растворов используют ледяную баню и магнитную мешалку. Доводят объем растворов до 40 мл водой Р и перемешивают. Прибавляют 2 мл буферного раствора рН 3,5 Р и перемешивают. Полученные растворы прибавляют к порциям по 1,2 мл тиацетамидного реактива Р и немедленно перемешивают. Доводят объем растворов водой Р до 50 мл, перемешивают и выдерживают в течение 2 мин.

Растворы фильтруют через подходящий мембранный фильтр (номинальный размер пор 0,45 мкм). Давление поршня шприца должно быть умеренным и постоянным для обеспечения медленного и равномерного фильтрования. Сравнивают окраски мембранных фильтров, полученные в опытах с разными растворами.

Пригодность системы:

– окраска мембранного фильтра, полученная в опыте с раствором сравнения, должна быть коричневая по сравнению с окраской мембранного фильтра, полученной в опыте с контрольным раствором;

– окраска мембранного фильтра, полученная в опыте с проверочным раствором, не менее интенсивна, чем окраска мембранного фильтра, полученная в опыте с раствором сравнения.

Результат: коричневая окраска мембранного фильтра, полученная в опыте с испытуемым раствором, должна быть не интенсивнее окраски мембранного фильтра, полученной в опыте с раствором сравнения.

МЕТОД Н

Испытуемый раствор. Количество испытуемого образца, указанное в частной статье, растворяют в 20 мл указанного в частной статье растворителя или смеси растворителей.

Раствор сравнения. Указанный в частной статье объем *эталонного раствора свинца (10 ppm Pb) Р* разводят указанным в частной статье растворителем или смесью растворителей.

Контрольный раствор. 20 мл указанного в частной статье растворителя или смеси растворителей.

К каждому раствору прибавляют по 2 мл *буферного раствора pH 3,5 Р* и перемешивают. (*В некоторых случаях образуется осадок, поэтому в частной статье необходимо описать повторное растворение в определенном количестве данного растворителя*). Полученные растворы прибавляют к порциям по 1,2 мл *тиоацетамидного реактива Р*, немедленно перемешивают и выдерживают в течение 2 мин. Полученные растворы фильтруют через подходящие мембранные фильтры (номинальный размер пор 0,45 мкм). Сравнивают окраски мембранных фильтров, полученные в опытах с разными растворами.

Пригодность системы: окраска мембранного фильтра, полученная в опыте с раствором сравнения, должна быть коричневатой-черной по сравнению с окраской мембранного фильтра, полученной в опыте с контрольным раствором.

Результат: коричневатая-черная окраска мембранного фильтра, полученная в опыте с испытуемым раствором, должна быть не интенсивнее окраски мембранного фильтра, полученной в опыте с раствором сравнения.

01/2013:20409

2.4.9. ЖЕЛЕЗО

Количество испытуемого образца, указанное в частной статье, растворяют в *воде Р*, доводят до объема 10 мл этим же растворителем и перемешивают; или используют 10 мл раствора, указанного в частной статье. Прибавляют 2 мл раствора 200 г/л *кислоты лимонной Р* и 0,1 мл *кислоты тиогликолевой Р*. Перемешивают, подщелачивают *раствором аммиака Р* и доводят *водой Р* до объема 20 мл.

Параллельно с теми же количествами реактивов и в тех же условиях готовят эталон, используя 10 мл *эталонного раствора железа (III) (1 ppm Fe) Р*.

Через 5 мин розовая окраска испытуемого раствора должна быть не интенсивнее окраски эталона.

01/2013:20410

2.4.10. СВИНЕЦ В САХАРАХ

Определение свинца проводят методом атомно-абсорбционной спектроскопии (2.2.23, метод II).

Испытуемый раствор. 20,0 г испытуемого образца растворяют в смеси из равных объемов *кислоты уксусной разведенной Р* и *воды Р*, доводят до объема 100 мл этой же смесью растворителей и перемешивают. Прибавляют 2,0 мл прозрачного насыщенного (около 10 г/л) раствора *аммония пирролидиндитиокарбамата Р* и 10,0 мл *метилизобутилкетона Р* и встряхивают в течение 30 с в защищенном от яркого света месте. Оставляют до расслоения. Для испытания используют слой метилизобутилкетона.

Растворы сравнения. Готовят три раствора сравнения аналогично испытуемому раствору, но с добавлением к 20,0 г испытуемого образца соответственно 0,5 мл, 1,0 мл и 1,5 мл *эталонного раствора свинца (10 ppm Pb) Р*.

Устанавливают нулевую точку на приборе, используя *метилизобутилкетон Р*, обработанный аналогично испытуемому раствору, но без добавления испытуемого образца.

Измеряют поглощение при длине волны 283,3 нм, используя в качестве источника излучения лампу с полым свинцовым катодом и воздушно-ацетиленовое пламя.

Испытуемый образец должен содержать не более 0,5 ppm свинца, если нет других указаний в частной статье.

01/2013:20411

2.4.11. ФОСФАТЫ

К 100 мл приготовленного и при необходимости нейтрализованного, как указано в частной статье, раствора прибавляют 4 мл *сульфмолибденового реактива P3*. Встряхивают и прибавляют 0,1 мл *раствора олова (II) хлорида P1*. Параллельно с теми же количествами реактивов и в тех же условиях готовят эталон, используя вместо 100 мл раствора испытуемого образца смесь из 2 мл *эталонного раствора фосфата (5 ppm PO₄) P* и 98 мл *воды P*.

Через 10 мин сравнивают окраску 20 мл каждого раствора. Окраска испытуемого раствора должна быть не интенсивнее окраски эталона.

01/2013:20412

2.4.12. КАЛИЙ

К 10 мл раствора, приготовленного, как указано в частной статье, прибавляют 2 мл свежеприготовленного раствора 10 г/л *натрия тетрафенилбората P*.

Параллельно с теми же количествами реактивов и в тех же условиях готовят эталон, используя вместо 10 мл раствора испытуемого образца смесь из 5 мл *эталонного раствора калия (20 ppm K) P* и 5 мл *воды P*.

Через 5 мин опалесценция испытуемого раствора не должна превышать опалесценцию эталона.

01/2013:20413

2.4.13. СУЛЬФАТЫ

При приготовлении всех растворов, применяемых в данном испытании, должна использоваться вода дистиллированная P.

К 4,5 мл *эталонного раствора сульфата (10 ppm SO₄) P1* прибавляют 3 мл раствора 250 г/л *бария хлорида P*. Встряхивают и выдерживают в течение 1 мин. К 2,5 мл полученного раствора прибавляют 15 мл испытуемого раствора, приготовленного, как указано в частной статье, и 0,5 мл *кислоты уксусной P*.

Параллельно с теми же количествами реактивов и в тех же условиях готовят эталон, используя вместо испытуемого раствора 15 мл *эталонного раствора сульфата (10 ppm SO₄) P*.

Через 5 мин опалесценция испытуемого раствора не должна превышать опалесценцию эталона.

01/2013:20414

2.4.14. СУЛЬФАТНАЯ ЗОЛА

Подходящий тигель (платиновый, фарфоровый или кварцевый) прокаливают при температуре (600±50) °C, выдерживают до остывания в эксикаторе над силикагелем или другим подходящим влагопоглотителем и взвешивают. В тигель помещают указанное в частной статье количество испытуемого образца и взвешивают. Испытуемый образец увлажняют небольшим количеством *кислоты серной P* (обычно 1 мл) и осторожно нагревают при насколько возможно невысокой температуре до полного обугливания

образца. После охлаждения остаток увлажняют небольшим количеством *кислоты серной Р* (обычно 1 мл), осторожно нагревают до прекращения выделения белых паров и прокаливают при температуре $(600 \pm 50)^\circ\text{C}$ до полного озоления остатка. Во время проведения анализа в тигле не должно появляться пламя.

Тигель с остатком выдерживают до остывания в эксикаторе над силикагелем или другим подходящим влагопоглотителем, взвешивают и рассчитывают процентное содержание остатка.

Если количество полученного остатка превышает предписанный предел, его повторно увлажняют *кислотой серной Р* и сжигают, как указано выше, в течение 30 мин. Сжигание повторяют до тех пор, пока разница между двумя последующими взвешиваниями будет отличаться не более чем на 0,5 мг, или пока полученное количество не уложится в предписанный предел. Количество испытуемого образца, используемое для анализа (обычно 1–2 г), выбирают таким образом, чтобы при данном предписанном пределе масса остатка (обычно около 1 мг) могла быть измерена с достаточной точностью.

01/2013:20415

2.4.15. НИКЕЛЬ В ПОЛИОЛАХ

Определение никеля проводят методом атомно-абсорбционной спектроскопии (2.2.23, метод II).

Испытуемый раствор. 20,0 г испытуемого образца растворяют в смеси из равных объемов кислоты *уксусной разведенной Р* и *воды Р*, доводят до объема 100 мл этой же смесью растворителей и перемешивают. Прибавляют 2,0 мл насыщенного (около 10 г/л) раствора *аммония пирролидиндитиокарбамата Р* и 10,0 мл *метилизобутилкетона Р* и встряхивают в течение 30 с в защищенном от яркого света месте. Оставляют до расслоения. Для испытания используют слой метилизобутилкетона.

Растворы сравнения. Готовят три раствора сравнения аналогично испытуемому раствору, но с добавлением к 20,0 г испытуемого образца соответственно 0,5 мл, 1,0 мл и 1,5 мл *эталонного раствора никеля (10 ppm Ni) Р*.

Устанавливают нулевую точку на приборе, используя *метилизобутилкетон Р*, обработанный аналогично испытуемому раствору, но без добавления испытуемого образца. Измеряют поглощение при длине волны 232,0 нм, используя в качестве источника излучения лампу с полым никелевым катодом и воздушно-ацетиленовое пламя.

Испытуемый образец должен содержать не более 1,0 ppm никеля, если в частной статье нет других указаний.

01/2013:20416

2.4.16. ОБЩАЯ ЗОЛА

Кварцевый или платиновый тигель нагревают при красном калении (около 500°C) в течение 30 мин, выдерживают до остывания в эксикаторе и взвешивают. Если нет других указаний в частной статье, 1,00 г испытуемого образца или измельченного в порошок лекарственного растительного сырья помещают в тигель и равномерно распределяют по дну тигля. Высушивают при температуре от 100°C до 105°C в течение 1 ч и затем сжигают до постоянной массы в муфельной печи при температуре $(600 \pm 25)^\circ\text{C}$, выдерживая тигель до остывания в эксикаторе после каждого сжигания. Во время проведения анализа в тигле не должно появляться пламя. Если после длительного сжигания зола все еще содержит темные частицы, содержимое тигля количественно переносят горячей водой на беззольный фильтр и сжигают остаток на фильтре вместе с фильтровальной бумагой. Фильтрат объединяют с золой, осторожно выпаривают до сухого остатка и сжигают до постоянной массы.

01/2013:20417

2.4.17. АЛЮМИНИЙ

Раствор испытуемого образца, приготовленный, как указано в частной статье, помещают в делительную воронку, встряхивают с двумя порциями, по 20 мл каждая, 10 мл раствора 5 г/л *гидроксихинолина Р* в *хлороформе Р*, затем с 10 мл этого же раствора. Хлороформные слои объединяют и доводят *хлороформом Р* до объема 50,0 мл (испытуемый раствор).

Эталон готовят аналогично, используя указанный в частной статье раствор сравнения.

Контрольный раствор готовят аналогично, используя указанный в частной статье контрольный раствор.

Измеряют интенсивность флуоресценции (2.2.21) испытуемого раствора (I_1), эталона (I_2) и холостого раствора (I_3), используя возбуждающее излучение при длине волны 392 нм и вторичный фильтр с полосой пропускания, имеющей максимум при длине волны 518 нм, или монохроматор, установленный на пропускание этой длины волны.

Флуоресценция ($I_1 - I_3$) испытуемого раствора не должна превышать флуоресценцию ($I_2 - I_3$) эталона.

01/2013:20418

2.4.18. СВОБОДНЫЙ ФОРМАЛЬДЕГИД

Если в частной статье нет других указаний, используют метод А. Метод В является подходящим для вакцин, в которых для нейтрализации избыточного формальдегида использован натрия метабисульфит.

МЕТОД А

Вакцины, используемые в медицине, разводят в 10 раз.

1 мл испытуемой вакцины, разведенной, как указано выше, помещают в пробирку и прибавляют 4 мл *воды Р* и 5 мл *реагента ацетилацетона Р1*. Пробирку помещают в водяную баню с температурой 40 °С на 40 мин.

Параллельно в этих же условиях готовят эталон, используя вместо разведенной вакцины 1 мл *раствора формальдегида Р*, разведенного до содержания формальдегида (CH_2O) 20 мкг/мл. Пробирки просматривают вдоль их вертикальных осей. Окраска испытуемого раствора должна быть не интенсивнее окраски эталона.

МЕТОД В

Испытуемый раствор. Испытуемую вакцину разводят 1:200 *водой Р*. Если вакцина представляет собой эмульсию, такое разведение проводят с водной фазой, отделенной подходящим способом (см. ниже). Если для отделения используют один из перечисленных ниже способов, то в дальнейшем водную фазу используют в разведении 1:20.

Раствор сравнения. Готовят растворы 0,25 г/л, 0,50 г/л, 1,00 г/л и 2,00 г/л CH_2O путем разведения *раствора формальдегида Р* в *воде Р*. Полученные растворы разводят 1:200 *водой Р*.

В пробирки помещают по 0,5 мл испытуемого раствора и каждого из растворов сравнения. В каждую пробирку прибавляют по 5,0 мл раствора 0,5 г/л *метилбензотиазолонгидразона гидрохлорида Р*. Пробирки закрывают, встряхивают и выдерживают в течение 60 мин. Затем прибавляют по 1 мл *реагента железа (III) хлорида* и *сульфаминовой кислоты Р* и выдерживают в течение 15 мин.

Измеряют оптическую плотность (2.2.25) полученных растворов при длине волны 628 нм.

Содержание формальдегида в испытуемой вакцине рассчитывают по градуировочному графику, построенному с использованием растворов сравнения. Испытание считается недействительным, если коэффициент корреляции (r) градуировочного графика менее 0,97.

Эмульсии. Если испытуемая вакцина представляет собой эмульсию, водную фазу отделяют подходящим способом и используют для приготовления испытуемого раствора. Перечисленные ниже способы являются подходящими для отделения водной фазы.

(а) К 1,0 мл *изопропилмиристата Р* прибавляют 1,0 мл испытуемой вакцины и перемешивают. Прибавляют 1,3 мл 1 М раствора кислоты хлористоводородной, 2,0 мл *хлороформа Р* и 2,7 мл раствора 9 г/л *натрия хлорида Р*. Тщательно перемешивают и центрифугируют с ускорением 15 000 g в течение 60 мин. Водный слой помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводят *водой Р* до метки. Если описанная процедура не позволяет достичь разделения слоев, к раствору *натрия хлорида Р* прибавляют раствор 100 г/л *полисорбата 20 Р* и повторяют процедуру, центрифугируя с ускорением 22 500 g.

(б) К 1,0 мл раствора 100 г/л *натрия хлорида Р* прибавляют 1,0 мл испытуемой вакцины, перемешивают и центрифугируют с ускорением 1000 g в течение 15 мин. Водный слой помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводят *водой Р* до метки.

(с) К 2,0 мл раствора 100 г/л *натрия хлорида Р* и 3,0 мл *хлороформа Р* прибавляют 1,0 мл испытуемой вакцины, перемешивают и центрифугируют с ускорением 1000 g в течение 5 мин. Водный слой помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводят *водой Р* до метки.

01/2013:20419

2.4.19. ЩЕЛОЧНЫЕ ПРИМЕСИ В ЖИРНЫХ МАСЛАХ

В пробирку помещают 10 мл свежеперегнанного *ацетона Р* и 0,3 мл *воды Р*, прибавляют 0,05 мл раствора 0,4 г/л *бромфенолового синего Р* в 96 % *спирте Р*. При необходимости раствор нейтрализуют 0,01 М раствором кислоты хлористоводородной или 0,01 М раствором *натрия гидроксида*. Затем прибавляют 10 мл испытуемого масла, встряхивают и оставляют до разделения слоев.

Для изменения окраски верхнего слоя на желтую должно быть израсходовано не более 0,1 мл 0,01 М раствора кислоты хлористоводородной.

01/2013:20421

2.4.21. ПОСТОРОННЫЕ МАСЛА В ЖИРНЫХ МАСЛАХ МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Испытание проводят методом тонкослойной хроматографии (2.2.27) с использованием в качестве тонкого слоя *кизельгура G Р*. Пластинку пропитывают, поместив в камеру, содержащую смесь *вазелинового масла Р* – *петролейный эфир Р* (10:90, об/об) в таком количестве, чтобы нижний край пластинки погрузился на 5 мм ниже поверхности жидкости. Когда смесь для пропитывания поднимется не менее чем на 12 см от нижнего края пластинки, ее вынимают из камеры и дают растворителю испариться в течение 5 мин. Последующее хроматографирование проводят в том же направлении, что и пропитывание.

Приготовление смеси жирных кислот. К 2 г масла прибавляют 30 мл 0,5 М раствора *калия гидроксида спиртового* и нагревают с обратным холодильником в течение 45 мин. Прибавляют 50 мл *воды Р*, выдерживают до охлаждения, переносят в делительную воронку и встряхивают с тремя порциями *эфира Р*, по 50 мл каждая. Эфирные слои отделяют, водный слой подкисляют кислотой хлористоводородной *Р* и вновь встряхивают с тремя порциями *эфира Р*, по 50 мл каждая. Все эфирные слои объединяют и встряхивают с тремя порциями *воды Р*, по 10 мл каждая, отбрасывая промывные воды. Объединенные эфирные слои высушивают с помощью *натрия сульфата безводного Р* и фильтруют. Затем эфир выпаривают на водяной бане, а из остатка готовят испытуемый раствор. Жирные кислоты также можно извлечь из раствора, полученного при определении неомыляемых веществ.

Испытуемый раствор. 40 мг смеси жирных кислот, полученной из испытуемого образца, растворяют в 4 мл *хлороформа Р*.

Раствор сравнения. 40 мг смеси жирных кислот, полученной из смеси 19 объемов кукурузного масла *P* и 1 объема рапсового масла *P*, растворяют в 4 мл хлороформа *P*.

На линию старта хроматографической пластинки наносят по 3 мкл каждого раствора. Помещают пластинку в камеру со смесью растворителей: вода *P* – кислота уксусная ледяная *P* (10:90, об/об). Когда фронт растворителей пройдет 8 см от линии старта, пластинку вынимают из камеры, высушивают при температуре 110 °С в течение 10 мин и оставляют до охлаждения. Затем, если нет других указаний в частной статье, пластинку помещают в закрытую плотно подогнанной крышкой хроматографическую камеру, предварительно насыщенную парами йода (на дно камеры в выпарительной чашке помещен йод *P*). Через некоторое время проявляются коричневые или желтовато-коричневые пятна. Пластинку вынимают из камеры и оставляют на несколько минут. Когда коричневый фон исчезнет, пластинку опрыскивают *раствором крахмала P*. Появляющиеся синие пятна могут приобретать коричневую окраску при высушивании и вновь становятся синими после опрыскивания *водой P*.

На хроматограмме испытуемого раствора всегда должны обнаруживаться пятно с R_F около 0,5 (олеиновая кислота) и пятно с R_F около 0,65 (линолевая кислота), соответствующие пятнам на хроматограмме раствора сравнения. На хроматограммах некоторых масел может обнаруживаться пятно с R_F около 0,75 (линоленовая кислота). Путем сравнения пятен на хроматограмме испытуемого раствора с пятнами на хроматограмме раствора сравнения убеждаются в отсутствии на хроматограмме испытуемого раствора пятен с R_F около 0,25 (эруковая кислота).

01/2013:20422

2.4.22. ПОСТОРОННЫЕ ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ В МАСЛАХ МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Испытание на посторонние жирные кислоты проводят путем перевода жирных кислот, содержащихся в испытуемом масле, в метиловые эфиры, которые определяют методом газовой хроматографии (2.2.28).

МЕТОД А

Этот метод неприменим для масел, содержащих глицериды жирных кислот с эпокси-, гидроэпокси-, гидроперокси-, циклопропиловыми или циклопропениловыми группами, а также для масел, в составе которых большая часть жирных кислот имеет длину цепи менее восьми атомов углерода, и для масел с кислотным числом более 2,0.

Испытуемый раствор. Испытуемое масло высушивают перед метилированием, если это указано в частной статье. 1,0 г масла помещают в круглодонную колбу вместимостью 25 мл со шлифом, снабженную обратным холодильником и газоотводной трубкой. В колбу прибавляют 10 мл *метанола безводного P*, 0,2 мл раствора 60 г/л калия гидроксида *P* в *метаноле P*, присоединяют обратный холодильник и, пропуская через смесь *азот P* со скоростью около 50 мл/мин, встряхивают и нагревают до кипения. Когда раствор станет прозрачным (обычно через 10 мин), продолжают нагревание в течение последующих 5 мин. Затем колбу охлаждают под проточной водой и содержимое переносят в делительную воронку. Колбу промывают 5 мл *гептана P*, переносят промывные воды в ту же делительную воронку и встряхивают. Прибавляют 10 мл раствора 200 г/л *натрия хлорида P* и энергично встряхивают. Оставляют до расслоения, затем переносят органический слой в сосуд, содержащий *натрия сульфат безводный P*, и через некоторое время фильтруют.

Раствор сравнения (а). Готовят 0,50 г смеси веществ, применяемых для градуировки (градуировочной смеси), состава, приведенного в одной из таблиц 2.4.22, как указано в частной статье (если в частной статье не указан определенный раствор, готовят смесь, состав которой приведен в таблице 2.4.22.-1). Смесь растворяют в *гептане P* и доводят до объема 50,0 мл этим же растворителем.

Раствор сравнения (b). 1,0 мл раствора сравнения (а) доводят *гептаном P* до объема 10,0 мл.

Раствор сравнения (с). Готовят 0,50 г смеси метиловых эфиров жирных кислот, соответствующих составу смеси жирных кислот, указанной в частной статье для данного

испытуемого образца. Смесь растворяют в *гептане Р* и доводят до объема 50,0 мл этим же растворителем. Допускается использование готовых смесей метиловых эфиров жирных кислот.

Таблица 2.4.22.-1

Градуировочная смесь (для газовой хроматографии с применением капиллярной колонки и делением потока рекомендуется прибавлять к градуировочной смеси компоненты испытуемой смеси с большей длиной цепи, когда качественный анализ проведен с использованием градуировочного графика)

Смесь следующих веществ	Состав (% , м/м)
Метиллаурат <i>Р</i>	5
Метилмиристат <i>Р</i>	5
Метилпальмитат <i>Р</i>	10
Метилстеарат <i>Р</i>	20
Метиларахидат <i>Р</i>	40
Метилолеат <i>Р</i>	20

Таблица 2.4.22.-2

Градуировочная смесь (для газовой хроматографии с применением капиллярной колонки и делением потока рекомендуется прибавлять к градуировочной смеси компоненты испытуемой смеси с большей длиной цепи, когда качественный анализ проведен с использованием градуировочного графика)

Смесь следующих веществ	Состав (% , м/м)
Метилкапроат <i>Р</i>	10
Метилкаприлат <i>Р</i>	10
Метилкаприат <i>Р</i>	20
Метиллаурат <i>Р</i>	20
Метилмиристат <i>Р</i>	40

Таблица 2.4.22.-3

Градуировочная смесь (для газовой хроматографии с применением капиллярной колонки и делением потока рекомендуется прибавлять к градуировочной смеси компоненты испытуемой смеси с большей длиной цепи, когда качественный анализ проведен с использованием градуировочного графика)

Смесь следующих веществ	Состав (% , м/м)
Метилмиристат <i>Р</i>	5
Метилпальмитат <i>Р</i>	10
Метилстеарат <i>Р</i>	15
Метиларахидат <i>Р</i>	20
Метилолеат <i>Р</i>	20
Метилэйкозеноат <i>Р</i>	10
Метилбегенат <i>Р</i>	10
Метиллигноцерат <i>Р</i>	10

Условия хроматографирования:

- колонка: капиллярная кварцевая или стеклянная длиной от 1 м до 10 м и внутренним диаметром от 0,2 мм до 0,8 мм, покрытая слоем *макрогола 20 000 Р* (толщина слоя 0,1 – 0,5 мкм) или другой подходящей неподвижной фазой;
- газ-носитель: *гелий для хроматографии Р* или *водород для хроматографии Р*;
- скорость газа-носителя: 1,3 мл/мин (для колонки с внутренним диаметром 0,32 мкм);
- деление потока: 1:100 или меньше, в зависимости от внутреннего диаметра колонки (для колонки с внутренним диаметром 0,32 мкм – 1:50);

– температура:

– колонка: при изотермических условиях – 160–200 °С в зависимости от длины и типа колонки (200 °С для колонки длиной 30 м, покрытой слоем *макрогела 20 000 Р*); при необходимости использования программы линейного градиента температуры, например, повышают температуру от 170 °С до 230 °С со скоростью 3 °С/мин;

– блок ввода проб: 250 °С;

– детектор: 250 °С;

– детектор: пламенно-ионизационный;

– объем вводимой пробы: 1 мкл.

Пригодность хроматографической системы при использовании градуировочной смеси в соответствии с таблицей 2.4.22.-1 или таблицей 2.4.22.-3:

– разрешение: не менее 1,8 между пиками метилолеата и метилстеарата на хроматограмме раствора сравнения (а);

– отношение сигнал/шум: не менее 5 для пика метилмиристата на хроматограмме раствора сравнения (b);

– число теоретических тарелок: чуть более 30 000, рассчитанных по пику метилстеарата на хроматограмме раствора сравнения (а). Пригодность хроматографической системы при использовании градуировочной смеси в соответствии с таблицей 2.4.22.-2:

– разрешение: не менее 4,0 между пиками метилкаприлата и метилкапрата на хроматограмме раствора сравнения (а);

– отношение сигнал/шум: не менее 5 для пика метилкапроата на хроматограмме раствора сравнения (b);

– число теоретических тарелок: не менее 15 000, рассчитанных по пику метилкапрата на хроматограмме раствора сравнения (а).

ОЦЕНКА ХРОМАТОГРАММ

Следует избегать условий хроматографирования, которые могут дать неразделенные пики (наличие компонентов с небольшим различием между временами удерживания, например, линоленовая и арахидоновая кислоты).

Качественный анализ. Идентифицируют пики, полученные при хроматографировании раствора сравнения (с) (изотермические условия или условия линейного градиента температуры).

При использовании изотермических условий, пики могут быть идентифицированы при построении градуировочных графиков, используя хроматограмму раствора сравнения (а) и данные таблиц 2.4.22.-1, 2.4.22.-2, 2.4.22.-3.

Измеряют приведенное время удерживания (t'_R) для каждого пика на хроматограмме раствора сравнения (а). Приведенное время удерживания представляет собой время удерживания, измеренное от времени выхода пика растворителя, а не от времени ввода пробы. Строят градуировочный график, который представляет собой прямую линию:

$$\lg(t'_R) = f(\text{эквивалент длины цепи}).$$

Логарифмы приведенных времен удерживания ненасыщенных кислот расположены на этой линии как точки, соответствующие нецелым значениям «эквивалента длины цепи»; эквивалент длины цепи – это длина теоретически насыщенной цепи, которая будет иметь такое же приведенное время удерживания, как идентифицируемая жирная кислота. Например, линолевая кислота имеет такое же приведенное время удерживания, как и теоретически насыщенная жирная кислота, содержащая 18,8 атомов углерода.

Пики на хроматограмме испытуемого раствора идентифицируют по градуировочному графику и приведенным временам удерживания. Эквиваленты длины цепи приведены в таблице 2.4.22.-4.

Эквиваленты длины цепи (эти значения, рассчитанные по градуировочному графику, даны в качестве примера для колонки, покрытой слоем макрогела 20 000 Р)

Жирная кислота	Эквивалент длины цепи
Капроевая кислота	6,0
Каприловая кислота	8,0
Капровая кислота	10,0
Лауриновая кислота	12,0
Миристиновая кислота	14,0
Пальмитиновая кислота	16,0
Пальмитолеиновая кислота	16,3
Маргариновая кислота	17,0
Стеариновая кислота	18,0
Олеиновая кислота	18,3
Линолевая кислота	18,8
Гамма-линоленовая кислота	19,0
Альфа-линоленовая кислота	19,2
Арахидиновая кислота	20,0
Эйкозеновая кислота	20,2
Арахидоновая кислота	21,2
Бегеновая кислота	22,0
Эруковая кислота	22,2
12-Оксостеариновая кислота	22,7
Рицинолеиновая кислота	23,9
12-Гидроксистеариновая кислота	23,9
Лигноцериновая кислота	24,0
Нервоновая кислота	24,2

Количественный анализ. Обычно используют метод внутренней нормализации; при этом сумму площадей всех пиков на хроматограмме, кроме пиков, относящихся к растворителю, принимают за 100 %. Содержание каждого компонента рассчитывают как отношение площади соответствующего пика к сумме площадей всех пиков. Пики, площадь которых составляет менее 0,05 % от суммы площадей всех пиков, не учитывают.

В определенных случаях, т.е. при наличии жирных кислот с 12 или менее атомами углерода, в частной статье должен быть указан поправочный коэффициент для преобразования площадей пиков в проценты (м/м).

МЕТОД В

Этот метод неприменим для масел, содержащих глицериды жирных кислот с эпокси-, гидроэпокси-, гидроперокси-, циклопропиловыми и циклопропениловыми группами и для масел с кислотным числом более 2,0.

Испытуемый раствор. 0,100 г испытуемого образца помещают в центрифужную пробирку с завинчивающейся крышкой, растворяют в 1 мл *гептана Р* и 1 мл *диметилкарбоната Р* и энергично перемешивают при умеренном нагревании (от 50 °С до 60 °С). К еще теплomu раствору прибавляют 1 мл раствора 12 г/л *натрия Р* в *метаноле безводном Р*, приготовленного с необходимыми предосторожностями, и энергично перемешивают в течение 5 мин. Прибавляют 3 мл *воды дистиллированной Р* и энергично перемешивают в течение 30 с. Центрифугируют в течение 15 мин с ускорением 1500 g. Хроматографируют 1 мкл органического слоя.

Растворы сравнения и оценка хроматограмм. Если в частной статье нет других указаний, поступают, как указано в методе А.

Условия хроматографирования:

– *колонка:* капиллярная кварцевая длиной 30 м и внутренним диаметром 0,25 мм, покрытая слоем *макрогела 20 000 Р* (толщина слоя 0,1–0,5 мкм) или другой подходящей неподвижной фазой;

– *газ-носитель:* гелий для хроматографии *Р*;

– *скорость газа-носителя:* 0,9 мл/мин;

– *деление потока:* 1:100;

– *температура:*

	Время (мин)	Температура (°C)
Колонка	0–15	100
	15–36	100 → 225
	36–61	225
Блок ввода проб		250
Детектор		250

- *детектор*: пламенно-ионизационный;
- *объем вводимой пробы*: 1 мкл.

МЕТОД С

Этот метод неприменим для масел, содержащих глицериды жирных кислот с эпокси-, гидроэпокси-, гидроперокси-, альдегидными, кетоновыми, циклопропиловыми и циклопропениловыми группами и сопряженными полиненасыщенными и ацетиленовыми компонентами из-за частичного или полного разрушения этих групп.

Испытуемый раствор. 0,10 г испытуемого образца помещают в коническую колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 2 мл раствора 20 г/л *натрия гидроксида Р* в метаноле *Р* и кипятят с обратным холодильником в течение 30 мин. Затем через холодильник прибавляют 2,0 мл *раствора бора фторида в метаноле Р* и кипятят еще 30 мин, после чего прибавляют через холодильник 4,0 мл *гептана Р* и кипятят 5 мин. Охлаждают, прибавляют 10,0 мл раствора *натрия хлорида насыщенного Р*, встряхивают в течение 15 с и прибавляют такой объем *раствора натрия хлорида насыщенного Р*, чтобы верхний слой поднялся к горлу колбы. Отбирают 2,0 мл верхнего слоя, помещают в делительную воронку, промывают тремя порциями *воды Р*, по 2 мл каждая, и высушивают над *натрия сульфатом безводным Р*.

Растворы сравнения, хроматографическая методика и оценка хроматограмм. Если в частной статье нет других указаний, поступают, как указано в методе А.

01/2013:20423

2.4.23. СТЕРИНЫ В ЖИРНЫХ МАСЛАХ

ОТДЕЛЕНИЕ СТЕРИНОВОЙ ФРАКЦИИ

Получают неомыляемые вещества жирного масла и затем отделяют стериновую фракцию методом тонкослойной хроматографии (2.2.27), используя *ТСХ пластинки со слоем силикагеля Р* толщиной от 0,2 мм до 0,5 мм.

Испытуемый раствор (а). В колбу вместимостью 150 мл, снабженную обратным холодильником, помещают раствор 2 г/л *бетулина Р* в *метиленхлориде Р* в таком объеме, чтобы количество бетулина соответствовало около 10 % от содержания стеринов в образце, взятом для определения (т.е. в случае оливкового масла прибавляют 500 мкл, в случае других растительных масел – 1500 мкл раствора бетулина). Если в частной статье определяется содержание индивидуальных стеринов в процентах к стериновой фракции, раствор бетулина можно не прибавлять. Выпаривают до сухого остатка в токе *азота Р*. В колбу помещают 5,00 г (*m*) испытуемого образца. Прибавляют 50 мл 2 М *раствора калия гидроксида спиртового Р* и нагревают на водяной бане в течение 1 ч, часто перемешивая содержимое колбы круговыми движениями. Охлаждают до температуры ниже 25 °C и количественно переносят содержимое колбы в делительную воронку, содержащую 100 мл *воды Р*. Осторожно встряхивают с тремя порциями *эфира, свободного от пероксидов Р*, по 100 мл каждая. Эфирные слои собирают в другую делительную воронку, содержащую 40 мл *воды Р*, осторожно встряхивают в течение нескольких минут, оставляют до расслоения и отбрасывают водный слой. Эфирный слой встряхивают с несколькими порциями *воды Р*, по 40 мл каждая, до тех пор, пока водный слой не перестанет давать щелочную реакцию по фенолфталеину. Эфирный слой количественно переносят в колбу, высушенную до постоянной массы, промывая делительную воронку *эфиром, свободным от пероксидов Р*. Эфир отгоняют с необходимыми предосторожностями, к остатку прибавляют 6 мл *ацетона Р*. Осторожно удаляют растворитель в токе *азота Р*.

Высушивают до постоянной массы при температуре от 100 °С до 105 °С, охлаждают в эксикаторе и взвешивают. Остаток переносят с помощью *метиленхлорида Р* в маленькую пробирку и упаривают в токе *азота Р* до объема 1 мл. В зависимости от содержания неомыляемых веществ в масле, доводят конечную концентрацию раствора до 25–50 мг/мл.

Испытуемый раствор (b). В колбу вместимостью 150 мл, снабженную обратным холодильником, помещают 5,00 г *рапсового масла Р* и далее поступают, как указано в приготовлении испытуемого раствора (а), начиная со слов «Прибавляют 50 мл 2 М раствора калия гидроксида спиртового Р».

Испытуемый раствор (с). В колбу вместимостью 150 мл, снабженную обратным холодильником, помещают 5,00 г *подсолнечного масла Р* и далее поступают, как указано в приготовлении испытуемого раствора (а), начиная со слов «Прибавляют 50 мл 2 М раствора калия гидроксида спиртового Р».

Раствор сравнения. 25 мг *холестерина Р* и 10 мг *бетулина Р* растворяют в 1 мл *метиленхлорида Р*.

Для каждого испытуемого раствора используют отдельную пластинку. Наносят в виде полосы длиной 10 мм (на расстоянии 20 мм от нижнего края пластинки и 10 мм от левого края пластинки) 10 мкл раствора сравнения и в виде полос длиной 150 мм (на расстоянии 20 мм от нижнего края пластинки) по 0,5 мл испытуемых растворов (а), (b) или (с). Пластинки помещают в камеру со смесью растворителей *эфир Р – гексан Р* (35:65, об/об). Когда фронт растворителей пройдет 17 см от линии старта, пластинки вынимают из камеры, высушивают в токе *азота Р*, опрыскивают раствором 2 г/л *дихлорфлуоресцеина Р* в *этаноле Р* и просматривают в ультрафиолетовом свете при длине волны 254 нм. На хроматограмме раствора сравнения обнаруживаются полосы, соответствующие холестерину и бетулину. На хроматограммах испытуемых растворов обнаруживаются полосы с близкими значениями R_F , соответствующие стеринам. С хроматограммы каждого испытуемого раствора снимают область покрытия, на которой расположены полосы стерина, а также дополнительно зоны на 2–3 мм выше и ниже видимых зон раствора сравнения, и помещают раздельно в три колбы вместимостью 50 мл каждая. В каждую колбу прибавляют по 15 мл *метиленхлорида Р* и нагревают с обратным холодильником в течение 15 мин при перемешивании. Каждый раствор фильтруют через стеклянный фильтр (ПОР 40) (2.1.2) или подходящую фильтровальную бумагу и промывают каждый фильтр тремя порциями *метиленхлорида Р*, по 15 мл каждая. Объединенные фильтраты и смывы помещают в три колбы, упаривают до объема 5–10 мл в токе *азота Р*, переносят в маленькие пробирки и выпаривают досуха в токе *азота Р*.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕРИНОВ

Газовая хроматография (2.2.28). *Испытание проводят с защитой от попадания влаги, и растворы готовят непосредственно перед использованием.*

Испытуемый раствор. К выделенным из испытуемого образца методом тонкослойной хроматографии стеринам прибавляют свежеприготовленную смесь из 0,04 мл *хлортриметилсилана Р*, 0,1 мл *гексаметилдисилазана Р* и 0,5 мл *пиридина безводного Р*. Выдерживают в течение не менее 5 мин и используют надосадочную жидкость.

Раствор сравнения (а). К 9 частям стерина, выделенных из *рапсового масла Р* методом тонкослойной хроматографии, прибавляют 1 часть *холестерина Р*. К полученной смеси прибавляют свежеприготовленную смесь из 0,04 мл *хлортриметилсилана Р*, 0,1 мл *гексаметилдисилазана Р* и 0,5 мл *пиридина безводного Р*. Выдерживают в течение не менее 5 мин и используют надосадочную жидкость.

Раствор сравнения (b). К стеринам, выделенным из *подсолнечного масла Р* методом тонкослойной хроматографии, прибавляют свежеприготовленную смесь из 0,04 мл *хлортриметилсилана Р*, 0,1 мл *гексаметилдисилазана Р* и 0,5 мл *пиридина безводного Р*. Выдерживают в течение не менее 5 мин и используют надосадочную жидкость.

Условия хроматографирования:

– колонка: кварцевая, длиной от 20 м до 30 м и внутренним диаметром от 0,25 мм до 0,32 мм, покрытая поли[метил(95)фенил(5)силоксаном Р] или поли(цианопропил)(7)(фенил)(7)(метил)(86) силоксаном Р с толщиной слоя 0,25 мкм;

- газ-носитель: водород для хроматографии *P* или гелий для хроматографии *P*;
- линейная скорость: 30–50 см/с (водород) или 20–35 см/с (гелий);
- деление потока: 1:50 или 1:100;
- температура: колонка – 260 °С, блок ввода проб – 280 °С, детектор – 290 °С;
- детектор: пламенно-ионизационный;
- объем вводимой пробы: 1 мкл.

Результаты: на хроматограмме раствора сравнения (а) обнаруживаются 4 основных пика, соответствующих холестерину, брассикастерину, кампестерину и β -ситостерину; на хроматограмме раствора сравнения (б) обнаруживаются 4 основных пика, соответствующих кампестерину, стигмастерину, β -ситостерину и Δ^7 -стигмастеролу. Времена удерживания стерина относительно β -ситостерина представлены в таблице 2.4.23.-1.

Пик внутреннего стандарта (бетулин) должен быть четко отделен от пиков определяемых стерина.

Идентифицируют пики, обнаруженные на хроматограмме испытуемого раствора, и рассчитывают процентное содержание каждого стерина в стериновой фракции испытуемого вещества по формуле:

$$\frac{A}{S} \cdot 100,$$

где:

A – площадь пика, соответствующего определяемому стерину;

S – сумма площадей всех пиков, соответствующих компонентам, указанным в таблице 2.4.23.-1.

Если это указано в частной статье, рассчитывают количество каждого стерина в миллиграммах, содержащееся в 100 г испытуемого образца, по формуле:

$$\frac{A \cdot m' \cdot 100}{A' \cdot m},$$

где:

A – площадь пика, соответствующего определяемому компоненту;

A' – площадь пика, соответствующего бетулину;

m – масса навески испытуемого образца, г;

m' – масса навески бетулина *P*, мг.

Таблица 2.4.23.-1

Времена удерживания стерина по отношению ко времени удерживания β -ситостерина для двух различных колонок

	Поли(цианопропил)(7)(фенил)(7)(метил)(86)силоксан	Поли[метил(95)-фенил(5)]силоксан
Холестерин	0,64	0,63
Брассикастерин	0,70	0,71
24-Метиленхолестерин	0,79	0,80
Кампестерин	0,82	0,81
Кампестанол	0,83	0,82
Стигмастерин	0,87	0,87
Δ^7 -Кампестерин	0,93	0,92
$\Delta^5,23$ -Стигмастадиенол	0,95	0,95
Клеростерин	0,96	0,96
β -Ситостерин	1	1
Ситостанол	1,01	1,02
Δ^5 -Аванастерин	1,03	1,03

Δ5,24-Стигмастадиенол	1,09	1,08
Δ7-Стигмастенол ¹	1,13	1,12
Δ7-Авенастерин	1,18	1,16
Бетулин	1,4	1,4

¹ Δ7-Стигмастенол в литературе может упоминаться как Δ7-стигмастерин.

01/2013:20424

2.4.24. ИДЕНТИФИКАЦИЯ И КОНТРОЛЬ СОДЕРЖАНИЯ ОСТАТОЧНЫХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

Методики испытаний, приведенные в этой общей статье, могут быть использованы:

1) для идентификации большинства остаточных растворителей классов 1 и 2 в фармацевтических субстанциях, вспомогательных веществах и готовых лекарственных средствах, если остаточные растворители неизвестны;

2) для определения предельного содержания растворителей классов 1 и 2, если они присутствуют в фармацевтических субстанциях, вспомогательных веществах и готовых лекарственных средствах;

3) для количественного определения растворителей класса 2, если их предельное содержание превышает 1000 ppm (0,1 %), или, если необходимо, для количественного определения растворителей класса 3.

Остаточные растворители классов 1, 2 и 3 перечислены в статье 5.4. *Остаточные количества органических растворителей.*

Для приготовления испытуемых растворов ниже предложены три растворителя, а также условия введения газовых проб при парофазной газовой хроматографии. Хотя описаны две хроматографические системы, предпочтительнее использовать систему А; система В обычно используется для идентификации. Выбор методики приготовления испытуемых растворов зависит от растворимости испытуемого образца и, в некоторых случаях, от контролируемых остаточных растворителей.

Формамид, 2-этоксиэтанол, 2-метоксиэтанол, этиленгликоль, *N*-метилпирролидон и сульфолан плохо определяются с помощью парофазной газовой хроматографии, и поэтому их следует определять другими валидированными методиками.

Если приведенную ниже методику испытаний применяют для количественного определения остаточных растворителей в конкретном веществе, она должна быть валидирована.

МЕТОДИКА

Испытания проводят методом парофазной газовой хроматографии (2.2.28).

Пробоподготовка 1. Применяют при определении остаточных растворителей в веществах, растворимых в воде.

Исходный раствор испытуемого образца (1). 0,200 г испытуемого образца растворяют в воде Р и доводят до объема 20,0 мл этим же растворителем.

Пробоподготовка 2. Применяют при определении остаточных растворителей в веществах, нерастворимых в воде.

Исходный раствор испытуемого образца (2). 0,200 г испытуемого образца растворяют в *N,N*-диметилформамиде Р (ДМФ) и доводят до объема 20,0 мл этим же растворителем.

Пробоподготовка 3. Применяют при контроле *N,N*-диметилацетамида и/или *N,N*-диметилформамида, если известно или допускается, что один или оба растворителя присутствуют в испытуемом образце.

Исходный раствор испытуемого образца (3). 0,200 г испытуемого образца растворяют в 1,3-диметил-2-имидазолидиноне Р (ДМИ) и доводят до объема 20,0 мл этим же растворителем.

Если ни одна из вышеприведенных методик пробоподготовки не подходит, возможно использование другого растворителя и других подходящих условий парофазного анализа.

Раствор остаточного растворителя (а). К 1,0 мл ФСО раствора остаточного растворителя класса 1 прибавляют 9 мл диметилсульфоксида Р и доводят водой Р до

объема 100,0 мл. 1,0 мл полученного раствора доводят *водой Р* до объема 100 мл. 1,0 мл полученного раствора доводят *водой Р* до объема 10,0 мл.

Растворы сравнения должны выдерживать следующие пределы:

- бензол: 2 ppm (0,0002 %);
- четыреххлористый углерод: 4 ppm (0,0004 %);
- 1,2-дихлорэтан: 5 ppm (0,0005 %);
- 1,1-дихлорэтен: 8 ppm (0,0008 %);
- 1,1,1-трихлорэтан: 10 ppm (0,001 %).

Раствор остаточных растворителей (b). Соответствующие количества остаточных растворителей класса 2 растворяют в *диметилсульфоксиде Р* и доводят *водой Р* до объема 100,0 мл. Полученный раствор разводят *водой Р* до концентрации, соответствующей 1/20 значений пределов концентраций, указанных в таблице 2 статьи 5.4. *Остаточные количества органических растворителей.*

Раствор остаточных растворителей (c). 1,00 г растворителя или растворителей, присутствующих в испытуемом образце, растворяют в *диметилсульфоксиде Р* или в *воде Р* и разводят *водой Р* до концентрации, соответствующей 1/20 значений пределов концентраций, указанных в таблице 1 или таблице 2 статьи 5.4. *Остаточные количества органических растворителей.*

Холостой раствор (контроль). Готовят аналогично раствору остаточных растворителей (c), но без добавления остаточных растворителей (используют для проверки отсутствия мешающих пиков).

Испытуемый раствор. 5,0 мл исходного раствора испытуемого образца и 1,0 мл холостого раствора помещают во флакон.

Раствор сравнения (a) (класс 1). 1,0 мл раствора остаточного растворителя (a) и 5,0 мл подходящего растворителя [#](используемого для растворения испытуемого образца)[#] помещают во флакон.

Раствор сравнения (a₁) (класс 1). 5,0 мл исходного раствора испытуемого образца и 1,0 мл раствора остаточного растворителя (a) помещают во флакон.

Раствор сравнения (b) (класс 2). 1,0 мл раствора остаточного растворителя (b) и 5,0 мл подходящего растворителя помещают во флакон.

Раствор сравнения (c). 5,0 мл исходного раствора испытуемого образца и 1,0 мл раствора остаточного растворителя (c) помещают во флакон.

Раствор сравнения (d). 1,0 мл холостого раствора и 5,0 мл подходящего растворителя [#](используемого для растворения испытуемого образца)[#] помещают во флакон.

Флаконы плотно закрывают резиновыми пробками, покрытыми политетрафторэтиленом, и обжимают алюминиевыми колпачками. Встряхивают до получения однородного раствора.

Для проведения парофазного анализа могут быть использованы следующие условия:

Параметры хроматографической системы	Методика пробоподготовки		
	1	2	3
Равновесная температура (°C)	80	105	80
Время достижения равновесия (мин)	60	45	45
Температура линии подачи газовой пробы (°C)	85	110	105
Газ-носитель: азот для хроматографии <i>Р</i> или гелий для хроматографии <i>Р</i> под соответствующим давлением			
Время нахождения под давлением (с)	30	30	30
Объем вводимой пробы (мл)	1	1	1

Для проведения хроматографического анализа могут быть использованы следующие системы.

СИСТЕМА А

– колонка кварцевая капиллярная длиной

30 м и внутренним диаметром 0,32 мм или 0,53 мм, покрытая слоем поперечносшитого полимера с 6 % полицианопротилфенилсилоксана и 94 % полидиметилсилоксана толщиной 1,8 мкм или 3 мкм;

– газ-носитель: азот для хроматографии *P* или гелий для хроматографии *P* с делением потока 1:5 и линейной скоростью около 35 см/с;
– пламенно-ионизационный детектор (для хлорсодержащих остаточных растворителей класса 1 может быть также использован масс-спектрометрический детектор или детектор электронного захвата);
– температура колонки: изотермический режим при 40 °С в течение 20 мин с последующим программированным повышением температуры со скоростью 10 °С/мин до 240 °С, затем изотермический режим при температуре 240 °С в течение 20 мин;
– температура блока ввода проб: 140 °С;
– температура детектора: 250 °С.
Если возможно мешающее влияние матрицы, используют систему В.

СИСТЕМА В

– колонка кварцевая капиллярная длиной 30 м и внутренним диаметром 0,32 мм или 0,53 мм, покрытая слоем макрогеля 20 000 *P* толщиной 0,25 мкм;
– газ-носитель: азот для хроматографии *P* или гелий для хроматографии *P* с делением потока 1:5 и линейной скоростью около 35 см/с;
– пламенно-ионизационный детектор (для хлорсодержащих остаточных растворителей класса 1 может быть также использован масс-спектрометрический детектор или детектор электронного захвата);
– температура колонки: изотермический режим при 50 °С в течение 20 мин с последующим программированным повышением температуры со скоростью 6 °С/мин до 165 °С, затем изотермический режим при температуре 165 °С в течение 20 мин;
– температура блока ввода проб: 140 °С;
– температура детектора: 250 °С.

Испытания в системе А

Вводят 1 мл равновесной газовой фазы раствора сравнения (а) и записывают хроматограмму в таких условиях, чтобы можно было измерить отношение сигнал/шум для 1,1,1-трихлорэтана; отношение сигнал/шум должно быть не менее 5. Типичная хроматограмма представлена на рисунке 2.4.24.-1.

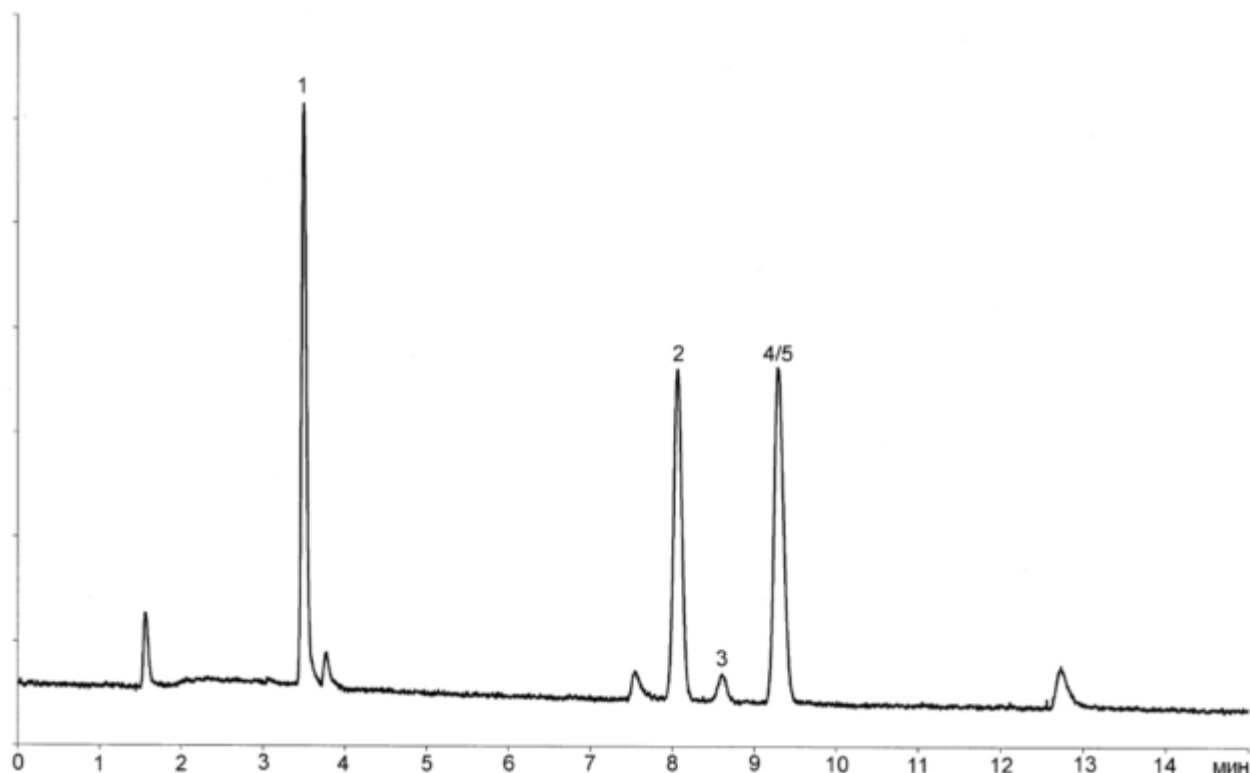


Рисунок 2.4.24.-1. Типичная хроматограмма остаточных растворителей класса 1 в условиях, описанных для системы А и пробоподготовки 1. Пламенно-ионизационный детектор

1 – 1,1-дихлорэтен; 2 – 1,1,1-трихлорэтан; 3 – четыреххлористый углерод; 4 – бензол; 5 – 1,2-дихлорэтан.

Вводят 1 мл равновесной газовой фазы раствора сравнения (а₁). Пики, соответствующие остаточным растворителям класса 1, должны обнаруживаться.

Вводят 1 мл равновесной газовой фазы раствора сравнения (b) и записывают хроматограмму в таких условиях, чтобы можно было определить разрешение между пиками ацетонитрила и метиленхлорида. Хроматографическая система считается пригодной, если полученная хроматограмма имеет вид хроматограммы, представленной на рисунке 2.4.24.-2, а разрешение между пиками ацетонитрила и метиленхлорида не менее 1,0.

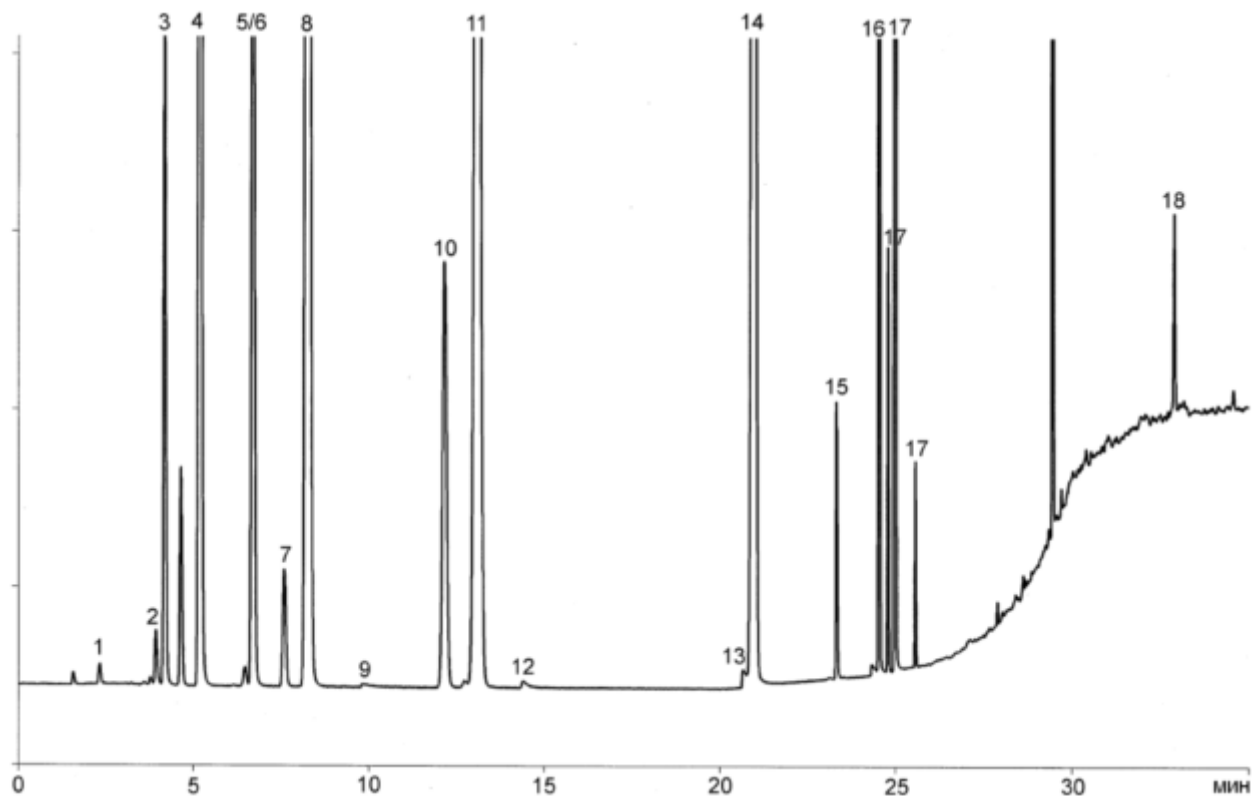


Рисунок 2.4.24.-2. Типичная хроматограмма остаточных растворителей класса 2 в условиях, описанных для системы А и пробоподготовки 1. Пламенно-ионизационный детектор

- 1 – метанол; 2 – ацетонитрил; 3 – дихлорметан; 4 – гексан; 5 – *цис*-1,2-дихлорэтен;
 6 – нитрометан; 7 – хлороформ; 8 – циклогексан; 9 – 1,2-диметоксиметан;
 10 – 1,1,2-трихлорэтен; 11 – метилциклогексан; 12 – 1,4-диоксан;
 13 – пиридин; 14 – толуол; 15 – 2-гексанон; 16 – хлорбензол;
 17 – *орто*-, *мета*- и *пара*-ксилол; 18 – тетралин.

Вводят 1 мл равновесной газовой фазы испытуемого раствора. Если на полученной хроматограмме не обнаруживаются пики, соответствующие пикам остаточных растворителей на хроматограммах, полученных для растворов сравнения (а) или (b), то испытуемый образец выдерживает испытания. Если какой-либо пик на полученной для испытуемого раствора хроматограмме соответствует одному из пиков остаточных растворителей на хроматограммах, полученных для растворов сравнения (а) или (b), то должна быть использована система В.

Испытания в системе В

Вводят 1 мл равновесной газовой фазы раствора сравнения (а) и записывают хроматограмму в таких условиях, чтобы можно было измерить отношение сигнал/шум для бензола; отношение сигнал/шум должно быть не менее 5. Типичная хроматограмма представлена на рисунке 2.4.24.-3.

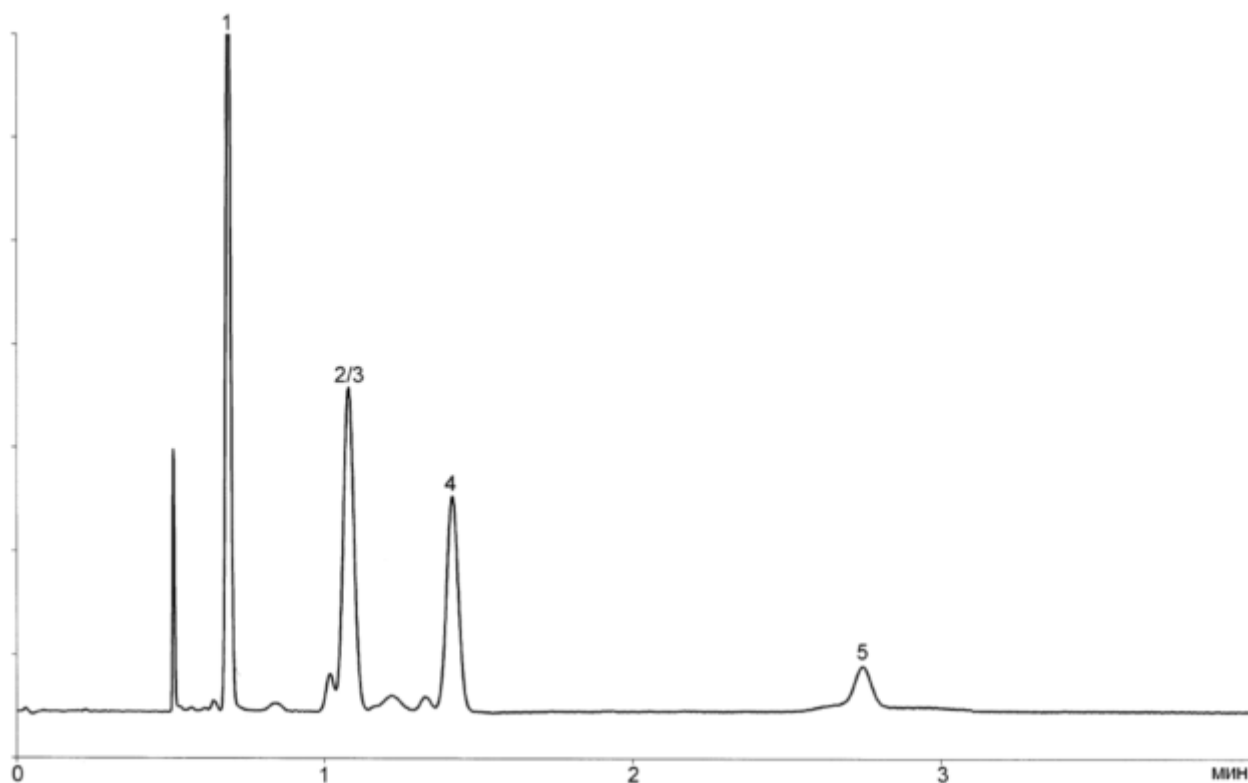


Рисунок 2.4.24.-3. Типичная хроматограмма остаточных растворителей класса 1 в условиях, описанных для системы В и пробоподготовки 1. Пламенно-ионизационный детектор

1 – 1,1-дихлорэтен; 2 – 1,1,1-трихлорэтан; 3 – четыреххлористый углерод; 4 – бензол; 5 – 1,2-дихлорэтан.

Вводят 1 мл равновесной газовой фазы раствора сравнения (а₁); пики, соответствующие остаточным растворителям класса 1, должны обнаруживаться.

Вводят 1 мл равновесной газовой фазы раствора сравнения (b) и записывают хроматограмму в таких условиях, чтобы можно было определить разрешение между пиками ацетонитрила и трихлорэтена. Хроматографическая система считается пригодной, если полученная хроматограмма имеет вид хроматограммы, представленной на рисунке 2.4.24.-4, а разрешение между пиками ацетонитрила и трихлорэтена не менее 1,0.

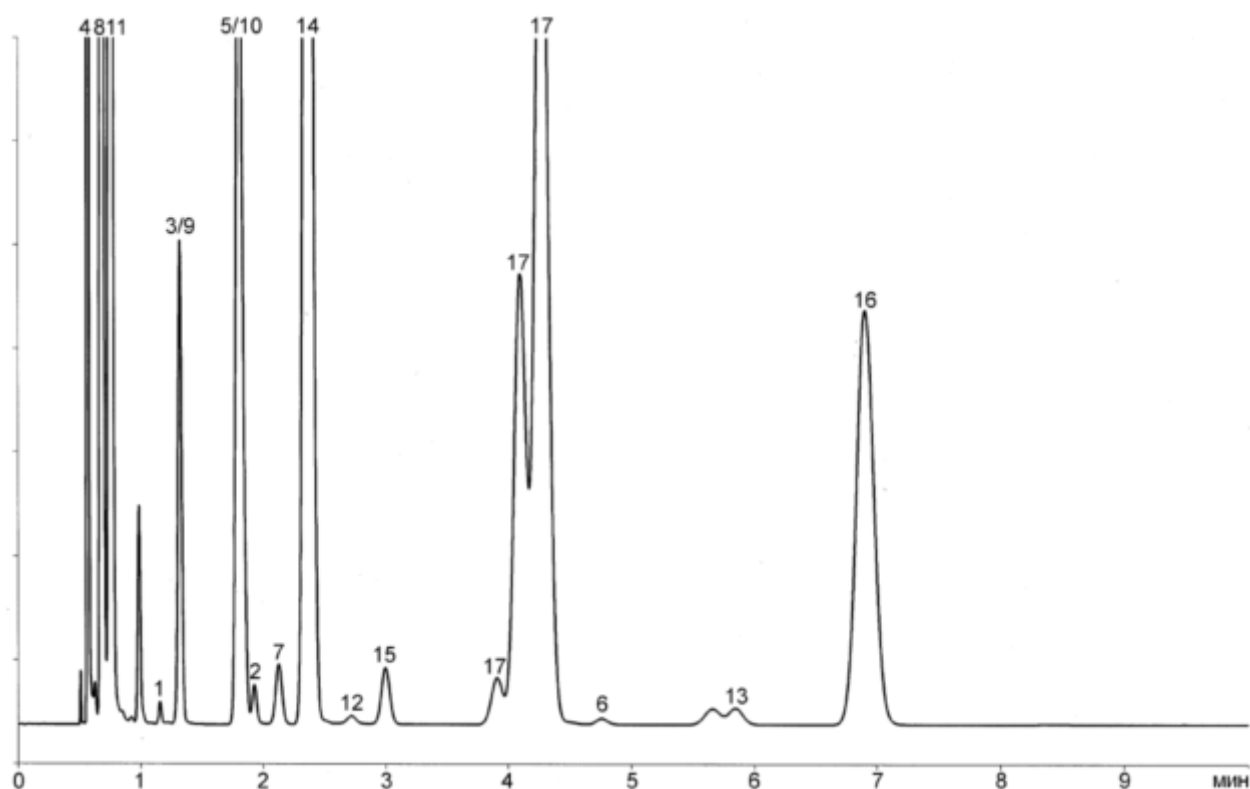


Рисунок 2.4.24.-4. Типичная хроматограмма остаточных растворителей класса 1 в условиях, описанных для системы В и пробоподготовки 1. Пламенно-ионизационный детектор

- 1 – метанол; 2 – ацетонитрил; 3 – дихлорметан; 4 – гексан; 5 – *цис*-1,2-дихлорэтен;
6 – нитрометан; 7 – хлороформ; 8 – циклогексан; 9 – 1,2-диметоксиэтан;
10 – 1,1,2-трихлорэтен; 11 – метилциклогексан; 12 – 1,4-диоксан;
13 – пиридин; 14 – толуол; 15 – 2-гексанон; 16 – хлорбензол;
17 – *орто*-, *мета*- и *пара*-ксилол; 18 – тетралин ($t_R = 28$ мин).

Вводят 1 мл равновесной газовой фазы испытуемого раствора. Если на полученной хроматограмме не обнаруживаются пики, соответствующие пикам остаточных растворителей на хроматограммах, полученных для растворов сравнения (а) или (b), то испытуемый образец выдерживает испытания. Если какой-либо пик на полученной для испытуемого раствора хроматограмме соответствует одному из пиков остаточных растворителей на хроматограммах, полученных для растворов сравнения (а) или (b), и подтверждает соответствие, полученное при использовании системы А, то далее поступают следующим образом.

Вводят 1 мл равновесной газовой фазы раствора сравнения (с) в условиях, указанных для системы А или системы В. При необходимости регулируют чувствительность системы таким образом, чтобы высота пика, соответствующего устанавливаемому остаточному растворителю, составляла не менее 50 % шкалы регистрирующего устройства.

Вводят 1 мл равновесной газовой фазы раствора сравнения (d). Не должно наблюдаться никаких мешающих пиков.

Вводят 1 мл равновесной газовой фазы испытуемого раствора и 1 мл газовой фазы раствора сравнения (с). Повторяют введение еще дважды.

Средняя площадь пика остаточного растворителя/растворителей на хроматограмме, полученной для испытуемого раствора, не должна превышать половину площади пика остаточного растворителя/растворителей на хроматограмме, полученной для раствора сравнения (с). Хроматографическая система считается пригодной, если относительное стандартное отклонение разностей площадей пиков анализируемого вещества, полученное из трех повторных парных введений равновесной газовой фазы раствора сравнения (а) и испытуемого раствора, не превышает 15 %.

Схема проведения испытаний представлена на рисунке 2.4.24.-5.

Если уровень содержания остаточного растворителя (классов 2 или 3) составляет 0,1 % и более, для его количественного определения может быть использован метод стандартных добавок.

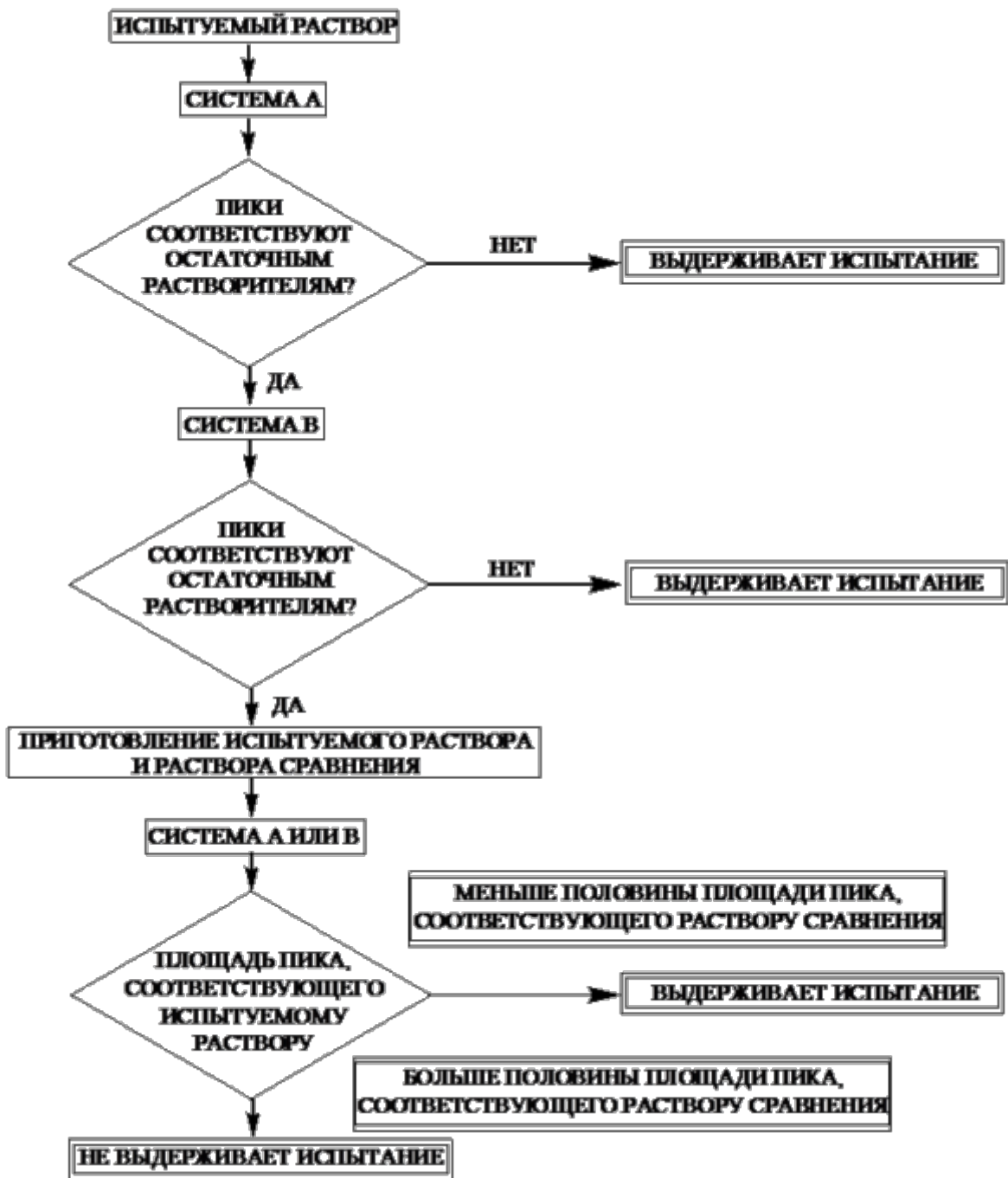


Рисунок 2.4.24.-5. Ход испытаний при идентификации и определении пределов

01/2013:20425

2.4.25. ОСТАТОЧНЫЕ КОЛИЧЕСТВА ЭТИЛЕНОКСИДА И ДИОКСАНА

Испытание предназначено для определения содержания остаточных количеств этиленоксида и диоксана в веществах, растворимых в воде или диметилацетамиде. Для веществ, нерастворимых или недостаточно растворимых в этих растворителях, приготовление раствора испытуемого образца и условия определения методом парофазной газовой хроматографии указывают в частной статье.

Испытание проводят методом парофазной газовой хроматографии (2.2.28).

А. Для веществ, растворимых или смешивающихся с водой, применяют следующую методику.

Испытуемый раствор. 1,00 г (M_T) испытуемого образца помещают во флакон вместимостью 10 мл (в зависимости от условий проведения испытания могут применяться флаконы другого объема) и прибавляют 1 мл воды Р. Флакон закрывают, содержимое перемешивают до получения однородного раствора и выдерживают в течение 45 мин при температуре 70 °С.

Раствор сравнения (а). 1,00 г (M_R) испытуемого образца помещают в такой же флакон вместимостью 10 мл, прибавляют 0,50 мл *раствора этиленоксида P3* и 0,50 мл *раствора диоксана P1*. Флакон закрывают, содержимое перемешивают до получения однородного раствора и выдерживают в течение 45 мин при температуре 70 °С.

Раствор сравнения (b). 0,50 мл *раствора этиленоксида P3* помещают во флакон вместимостью 10 мл, прибавляют 0,1 мл свежеприготовленного раствора 10 мг/л *ацетальдегида P* и 0,1 мл *раствора диоксана P1*. Флакон закрывают, содержимое перемешивают до получения однородного раствора и выдерживают в течение 45 мин при температуре 70 °С.

В. Для веществ, растворимых или смешивающихся с диметилацетамидом, применяют следующую методику.

Испытуемый раствор. 1,00 г (M_T) испытуемого образца помещают во флакон вместимостью 10 мл (в зависимости от условий проведения испытания могут применяться флаконы другого объема), прибавляют 1,0 мл *диметилацетамида P* и 0,20 мл *воды P*. Флакон закрывают, содержимое перемешивают до получения однородного раствора и выдерживают в течение 45 мин при температуре 90 °С.

Раствор сравнения (а). 1,00 г (M_R) испытуемого образца помещают во флакон вместимостью 10 мл и прибавляют 1,0 мл *диметилацетамида P*, 0,10 мл *раствора диоксана P* и 0,10 мл *раствора этиленоксида P2*. Флакон закрывают, содержимое перемешивают до получения однородного раствора и выдерживают в течение 45 мин при температуре 90 °С.

Раствор сравнения (b). 0,10 мл *раствора этиленоксида P2* помещают во флакон вместимостью 10 мл, прибавляют 0,1 мл свежеприготовленного раствора 10 мг/л *ацетальдегида P* и 0,1 мл *раствора диоксана P*. Флакон закрывают, содержимое перемешивают до получения однородного раствора и выдерживают в течение 45 мин при температуре 90 °С.

Могут быть использованы следующие условия подготовки и ввода равновесной паровой фазы:

- температура уравнивания: 70 °С (90 °С для растворов в диметилацетамиде);
- время уравнивания: 45 мин;
- температура линии подачи пробы: 75 °С (150 °С для растворов в диметилацетамиде);
- газ-носитель: *гелий для хроматографии P*;
- время подачи газа-носителя в контейнер с анализируемой пробой: 1 мин;
- время ввода газовой пробы: 12 с.

Условия хроматографирования:

- *колонка* капиллярная стеклянная или кварцевая длиной 30 м и внутренним диаметром 0,32 мм, внутренняя поверхность которой покрыта слоем *полидиметилсилоксана P* толщиной 1,0 мкм;
- *газ-носитель*: *гелий для хроматографии P* или *азот для хроматографии P*;
- *линейная скорость газа-носителя*: около 20 см/с;
- *деление потока*: 1:20;
- *детектор*: пламенно-ионизационный;
- *температура*: колонка – 50 °С в течение 5 мин, затем повышают до 180 °С со скоростью 5 °С/мин, затем до температуры 230 °С со скоростью 30 °С/мин и поддерживают такую температуру в течение 5 мин; блок ввода проб – 150 °С; детектор – 250 °С.

Хроматографируют подходящий объем (например, 1,0 мл) пробы газовой фазы раствора сравнения (b). Регулируют чувствительность системы таким образом, чтобы высоты пиков этиленоксида и ацетальдегида на полученной хроматограмме составляли не менее 15 % шкалы регистрирующего устройства. Хроматографическая система считается пригодной, если разрешение для пиков ацетальдегида и этиленоксида не менее 2,0, а отношение сигнал/шум для пика диоксана не менее 5.

Хроматографируют поочередно подходящие объемы, например, по 1,0 мл (или такой же объем, как для раствора сравнения (b)) проб газовых фаз испытуемого раствора и раствора сравнения (а). Повторяют введение еще дважды.

ПРОВЕРКА ТОЧНОСТИ

Для каждой пары введений вычисляют разность площадей пиков этиленоксида и диоксана на хроматограмме раствора сравнения (а) и хроматограмме испытуемого раствора. Хроматографическая система считается пригодной, если относительное стандартное отклонение, рассчитанное для трех значений разности площадей пиков этиленоксида, составляет не более 15 %, а относительное стандартное отклонение, рассчитанное для трех значений разности площадей пиков диоксана, составляет не более 10 %.

Если навески испытуемого образца, взятые для приготовления испытуемого раствора и раствора сравнения (а), отличались от 1,00 г более чем на 0,5 %, необходимо внести соответствующие поправки.

Содержание этиленоксида в миллионных частях (ppm) рассчитывают по формуле:

$$\frac{A_T \cdot C}{(A_R \cdot M_T) - (A_T \cdot M_R)},$$

где:

A_T – площадь пика этиленоксида на хроматограмме испытуемого раствора;

A_R – площадь пика этиленоксида на хроматограмме раствора сравнения (а);

M_T – масса навески испытуемого образца, взятая для приготовления испытуемого раствора, г;

M_R – масса навески испытуемого образца, взятая для приготовления раствора сравнения, г;

C – количество этиленоксида, прибавленного к раствору сравнения (а), мкг.

Содержание диоксана в миллионных частях (ppm) рассчитывают по формуле:

$$\frac{D_T \cdot C}{(D_R \cdot M_T) - (D_T \cdot M_R)},$$

где:

D_T – площадь пика диоксана на хроматограмме испытуемого раствора;

D_R – площадь пика диоксана на хроматограмме раствора сравнения (а);

C – количество диоксана, прибавленного к раствору сравнения (а), мкг.

01/2013:20426

2.4.26. N,N-ДИМЕТИЛАНИЛИН

МЕТОД А

Испытание проводят методом газовой хроматографии (2.2.28), используя в качестве внутреннего стандарта *N,N*-диэтиланилин Р.

Раствор внутреннего стандарта. 50 мг *N,N*-диэтиланилина Р растворяют в 4 мл 0,1 М раствора кислоты хлористоводородной и доводят водой Р до объема 50 мл. 1 мл полученного раствора разводят водой Р до объема 100 мл.

Испытуемый раствор. В колбу с притертой стеклянной пробкой помещают 0,50 г испытуемого образца и растворяют в 30,0 мл воды Р, затем прибавляют 1,0 мл раствора внутреннего стандарта и термостатируют раствор при температуре от 26 °С до 28 °С. Прибавляют 1,0 мл раствора натрия гидроксида концентрированного Р и перемешивают до полного растворения. Прибавляют 2,0 мл триметилпентана Р, встряхивают в течение 2 мин и оставляют до расслоения. Используют верхний слой.

Раствор сравнения. 50,0 мг *N,N*-диметиланилина Р растворяют в 4,0 мл 0,1 М раствора кислоты хлористоводородной и доводят водой Р до объема 50,0 мл. 1,0 мл полученного раствора разводят водой Р до объема 100,0 мл. 1,0 мл полученного раствора разводят водой Р до объема 30,0 мл. Прибавляют 1,0 мл раствора внутреннего стандарта и

1,0 мл раствора натрия гидроксида концентрированного *P*. Прибавляют 2,0 мл триметилпентана *P*, встряхивают в течение 2 мин и оставляют до расслоения. Используют верхний слой.

Испытание может быть проведено при использовании следующих условий хроматографирования:

- колонка кварцевая капиллярная длиной 25 м и внутренним диаметром 0,32 мм, покрытая слоем поперечносшитого полиметилфенилсилоксана *P* толщиной 0,52 мкм;

- газ-носитель: гелий для хроматографии *P* с делением потока 1:20, давлением на входе в колонку 50 кПа и объемной скоростью сбрасываемого газа-носителя 20 мл/мин;

- детектор: пламенно-ионизационный;

- кварцевая вставка-испаритель длиной 1 см, заполненная слоем диатомита для газовой хроматографии *P* с нанесенным поли(диметил)силоксаном *P* в количестве 10 % (м/м);

- температура: колонка – 150 °С в течение 5 мин, затем повышают до 275 °С со скоростью 20 °С/мин и поддерживают такую температуру в течение 3 мин; блок ввода проб – 220 °С; детектор – 300 °С.

Времена удерживания: *N,N*-диметиланилин – около 3,6 мин, *N,N*-диэтиланилин – около 5,0 мин.

Хроматографируют 1 мкл испытуемого раствора и 1 мкл раствора сравнения.

МЕТОД В

Испытание проводят методом газовой хроматографии (2.2.28), используя в качестве внутреннего стандарта нафталин *P*.

Раствор внутреннего стандарта. 50 мг нафталена *P* растворяют в циклогексане *P* и доводят до объема 50 мл этим же растворителем. 5 мл полученного раствора разводят циклогексаном *P* до объема 100 мл.

Испытуемый раствор. В пробирку с притертой стеклянной пробкой помещают 1,00 г испытуемого вещества, прибавляют 5 мл 1 *M* раствора натрия гидроксида и 1,0 мл раствора внутреннего стандарта. Пробирку закрывают и энергично встряхивают в течение 1 мин. При необходимости центрифугируют и используют верхний слой.

Раствор сравнения. К 50,0 мг *N,N*-диметиланилина *P* прибавляют 2 мл кислоты хлористоводородной *P* и 20 мл воды *P*. Встряхивают до растворения и доводят объем раствора водой *P* до объема 50,0 мл. 5,0 мл полученного раствора разводят водой *P* до объема 250,0 мл. 1,0 мл полученного раствора помещают в пробирку с притертой стеклянной пробкой, прибавляют 5 мл 1 *M* раствора натрия гидроксида и 1,0 мл раствора внутреннего стандарта. Пробирку закрывают и энергично встряхивают в течение 1 мин. При необходимости центрифугируют и используют верхний слой.

Испытание может быть проведено при использовании следующих условий хроматографирования:

- колонка стеклянная длиной 2 м и внутренним диаметром 2 мм, заполненная диатомитом силанизированным для газовой хроматографии *P*, импрегнированным 3 % (м/м) полиметилфенилсилоксана *P*;

- газ-носитель: азот для хроматографии *P*;

- скорость газа-носителя: 30 мл/мин;

- детектор: пламенно-ионизационный;

- температура: колонка – 120 °С; блок ввода проб – 150 °С; детектор – 150 °С.

Хроматографируют 1 мкл испытуемого раствора и 1 мкл раствора сравнения.

01/2013:20428

2.4.28. 2-ЭТИЛГЕКСАНОВАЯ КИСЛОТА

Испытание проводят методом газовой хроматографии (2.2.28), используя в качестве внутреннего стандарта кислоту 3-циклогексилпропионовую *P*.

Раствор внутреннего стандарта. 100 мг кислоты 3-циклогексилпропионовой *P* растворяют в циклогексане *P* и доводят до объема 100 мл этим же растворителем.

Испытуемый раствор. 0,300 г испытуемого образца растворяют в 4,0 мл 33 % (об/об) раствора кислоты хлористоводородной Р. Энергично встряхивают в течение 1 мин с 1,0 мл раствора внутреннего стандарта. Выдерживают до расслоения, при необходимости центрифугируют. Для испытания используют верхний слой.

Раствор сравнения. 75,0 мг кислоты 2-этилгексановой Р растворяют в растворе внутреннего стандарта и доводят до объема 50,0 мл этим же растворителем. К 1,0 мл полученного раствора прибавляют 4,0 мл 33 % (об/об) раствора кислоты хлористоводородной Р и энергично встряхивают в течение 1 мин. Выдерживают до расслоения, при необходимости центрифугируют. Для испытания используют верхний слой.

Хроматографируют по 1 мкл испытуемого раствора и раствора сравнения в следующих условиях:

- колонка капиллярная кварцевая длиной 10 м и внутренним диаметром 0,53 мм, покрытая слоем макрогола 20 000 2-нитротерефталата Р толщиной 1,0 мкм;
- газ-носитель: гелий для хроматографии Р;
- скорость газа-носителя: 10 мл/мин;
- детектор: пламенно-ионизационный;
- температура колонки и скорость подъема температуры: в соответствии со следующей программой:

	Время (мин)	Температура (°С)	Скорость подъема температуры (°С/мин)	Примечание
Колонка	0–2	40	–	Изотермический режим Линейный градиент температуры Изотермический режим
	2–7,3	40 → 200	30	
	7,3–10,3	200	–	
Блок ввода проб		200		
Детектор		300		

Хроматографическая система считается пригодной, если разрешение между пиком 2-этилгексановой кислоты (первый пик) и пиком внутреннего стандарта составляет не менее 2,0.

Содержание 2-этилгексановой кислоты в процентах вычисляют по формуле:

$$\frac{A_T \cdot I_R \cdot m_R \cdot 2}{A_R \cdot I_T \cdot m_T},$$

где:

A_T – площадь пика 2-этилгексановой кислоты на хроматограмме испытуемого раствора;

A_R – площадь пика 2-этилгексановой кислоты на хроматограмме раствора сравнения;

I_T – площадь пика внутреннего стандарта на хроматограмме испытуемого раствора;

I_R – площадь пика внутреннего стандарта на хроматограмме раствора сравнения;

m_T – масса навески испытуемого образца, взятая для приготовления испытуемого раствора, г;

m_R – масса навески 2-этилгексановой кислоты, взятая для приготовления раствора сравнения, г.

01/2013:20429

2.4.29. СОСТАВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В МАСЛАХ, ОБОГАЩЕННЫХ ОМЕГА-3 КИСЛОТАМИ

Испытание применяется для количественного определения содержания эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК) и докозагексаеновой кислоты (ДГК), содержащихся в рыбьем жире, обогащенном омега-3 кислотами в разных концентрациях. Метод

применяется для триглицеридов или сложных этиловых эфиров, и результаты выражаются как триглицериды или сложные этиловые эфиры соответственно.

ЭПК И ДГК

Газовая хроматография (2.2.28). Испытание выполняют по возможности быстро, избегая воздействия актиничного света, окисляющих агентов, окислительных катализаторов (например, медь и железо) и воздуха.

Метод применяется для определения метиловых и этиловых сложных эфиров (*all-Z*)-эйкоза-5,8,11,14,17-пентаеновой кислоты (ЭПК (ЕРА); 20:5 n-3) и (*all-Z*)-докоза-4,7,10,13,16,19-гексаеновой кислоты (ДГК (DHA); 22:6 n-3) в испытуемом образце.

Внутренний стандарт. Метилтрикозаноат Р.

Испытуемый раствор (а)

А. Количество испытуемого образца в соответствии с таблицей 2.4.29.-1 и около 70,0 мг внутреннего стандарта растворяют в растворе 50 мг/л *бутилгидрокситолуола Р* в *триметилпентане Р* и доводят до объема 10,0 мл этим же растворителем. При необходимости, осторожно нагревают (до температуры 60 °С) до полного растворения внутреннего стандарта.

Таблица 2.4.29.-1

Приблизительная сумма ЭПК и ДГК (%)	Количество испытуемого образца (г)
30–50	0,4–0,5
50–70	0,3
70–90	0,25

Сложные этиловые эфиры подготовлены к анализу. Стадия В необходима для подготовки к анализу триглицеридов.

В. 2,0 мл раствора, полученного на стадии А, помещают в кварцевую пробирку и выпаривают растворитель в слабом токе азота Р. Прибавляют 1,5 мл раствора 20 г/л натрия гидроксида Р в метаноле Р, плотно укупоривают пробкой, покрытой политетрафторэтиленом, в атмосфере азота Р, перемешивают и нагревают на водяной бане в течение 7 мин. Охлаждают. Прибавляют 2 мл раствора бора хлорида в метаноле Р, плотно укупоривают в атмосфере азота Р, перемешивают и нагревают на водяной бане в течение 30 мин. Охлаждают до температуры (40–50) °С, прибавляют 1 мл *триметилпентана Р*, укупоривают и интенсивно встряхивают не менее 30 с. Немедленно прибавляют 5 мл насыщенного раствора натрия хлорида Р, плотно укупоривают в атмосфере азота Р и тщательно встряхивают не менее 15 с. Переносят верхний слой в отдельную пробирку. Встряхивают еще раз метанольный слой с 1 мл *триметилпентана Р*. Объединенные триметилпентановые извлечения дважды промывают водой Р порциями по 1 мл и высушивают с помощью натрия сульфата безводного Р. Готовят по 3 раствора для каждого образца.

Испытуемый раствор (b). 0,300 г испытуемого образца растворяют в растворе 50 мг/л *бутилгидрокситолуола Р* в *триметилпентане Р* и доводят до объема 10,0 мл этим же растворителем. Далее поступают, как указано для испытуемого раствора (а).

Раствор сравнения (а₁). 70,0 мг внутреннего стандарта и 90,0 мг *ФСО этилового эфира эйкозапентаеновой кислоты* растворяют в растворе 50 мг/л *бутилгидрокситолуола Р* в *триметилпентане Р* и доводят до объема 10,0 мл этим же растворителем. При необходимости, осторожно нагревают (до температуры 60 °С) до полного растворения внутреннего стандарта.

Раствор сравнения (а₂). 70,0 мг внутреннего стандарта и 60,0 мг *ФСО этилового эфира докозагексаеновой кислоты* растворяют в растворе 50 мг/л *бутилгидрокситолуола Р* в *триметилпентане Р* и доводят до объема 10,0 мл этим же растворителем. При необходимости, осторожно нагревают (до температуры 60 °С) до полного растворения внутреннего стандарта.

При анализе этиловых эфиров раствор сравнения (а₁) и раствор сравнения (а₂) обрабатывают аналогично испытуемому раствору (а), стадия А. Для анализа триглицеридов

поступают, как указано в стадии В для испытуемого раствора (а), и готовят по 3 раствора для каждого образца.

Раствор сравнения (b). 0,3 г метиларахидата *P*, 0,3 г метилбегената *P*, 0,3 г метилпальмитата *P* и 0,3 г метилстеарата *P* помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл и растворяют в растворе 50 мг/л бутилгидрокситолуола *P* в триметилпентане *P* и доводят до объема 10,0 мл этим же растворителем. *Раствор сравнения (c).* Образец, содержащий около 55,0 мг метилового эфира докозагексаеновой кислоты *P* и около 5,0 мг метилового эфира тетракоз-15-еновой кислоты *P*, помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяют в растворе 50 мг/л бутилгидрокситолуола *P* в триметилпентане *P* и доводят до объема 10,0 мл этим же растворителем.

Условия хроматографирования:

- колонка: кварцевая капиллярная длиной не менее 25 м и внутренним диаметром 0,25 мм, покрытая слоем макрогеля 20 000 *P* (толщина слоя 0,2 мкм);
- газ-носитель: водород для хроматографии *P* или гелий для хроматографии *P*;
- скорость газа-носителя: 1 мл/мин;
- деление потока: 1:200; в качестве альтернативы – без деления потока с температурным контролем (перед введением растворы образца должны быть разведены 1/200 раствором 50 мг/л бутилгидрокситолуола *P* в триметилпентане *P*);
- температура:

	Время (мин)	Температура (°C)
Колонка	0–2	170
	2–25,7	170 → 240
	25,7–28	240
Блок ввода проб		250
Детектор		270

- детектор: пламенно-ионизационный;
- объем вводимой пробы: 1 мкл, дважды.

Пригодность хроматографической системы:

– на хроматограмме раствора сравнения (b) процент площади пиков компонентов возрастает в следующем порядке: метилпальмитат, метилстеарат, метиларахидат, метилбегенат; разница между площадями пиков метилпальмитата и метилбегената (в %) должна быть менее 2,0 %;

– разрешение: не менее 1,2 между пиками метилового эфира докозагексаеновой кислоты и метилового эфира тетракоз-15-еновой кислоты на хроматограмме сравнения (c);

– на хроматограмме испытуемого раствора (а) пики, соответствующие метилтрикозаноату и метиловому или этиловому эфирам генэйкозапентаноеновой кислоты (C21:5), обнаруживаемые при сравнении с хроматограммой испытуемого раствора (b), должны быть полностью разделены (если нет, используют поправочный коэффициент).

Принимая во внимание указанную чистоту стандартных образцов, процентное содержание ЭПК и ДГК рассчитывают по формуле:

$$A_x \cdot \frac{A_{x,3}}{m_{x,3}} \cdot \frac{m_1}{A_1} \cdot \frac{m_{x,r}}{A_{x,r}} \cdot \frac{1}{m_2} \cdot C \cdot 100,$$

где:

m_1 – масса навески внутреннего стандарта, взятая для приготовления испытуемого раствора (а), мг;

m_2 – масса навески испытуемого образца, взятая для приготовления испытуемого раствора (а), мг;

$m_{x,3}$ – масса навески внутреннего стандарта, взятая для приготовления раствора сравнения (а₁) (определение ЭПК) или раствора сравнения (а₂) (определение ДГК), мг;

$m_{x,r}$ – масса навески ФСО этилового эфира эйкозапентаноеновой кислоты, взятая для приготовления раствора сравнения (а₁) или масса ФСО этилового эфира докозагексаеновой кислоты, взятая для приготовления раствора сравнения (а₂), мг;

A_x – площадь пика эфира эйкозапентаеновой кислоты или докозагексаеновой кислоты на хроматограмме испытуемого раствора (а);

$A_{x,r}$ – площадь пика эфира эйкозапентаеновой кислоты на хроматограмме раствора сравнения (а₁) или эфира докозагексаеновой кислоты на хроматограмме раствора сравнения (а₂);

A_1 – площадь пика внутреннего стандарта на хроматограмме испытуемого раствора (а);

$A_{x,3}$ – площадь пика внутреннего стандарта на хроматограмме раствора сравнения (а₁) (определение ЭПК) или на хроматограмме раствора сравнения (а₂) (определение ДГК);

C – коэффициент пересчета между этиловым эфиром и триглицеридами:

$C = 1,00$ для этиловых эфиров,

$C = 0,954$ для ЭПК,

$C = 0,957$ для ДГК.

СУММА ОМЕГА-3 КИСЛОТ

Процентное содержание суммы омега-3 кислот рассчитывают по формуле, идентифицируя соответствующие пики на хроматограммах:

$$\text{ЭПК} + \text{ДГК} + \frac{A_{n-3}(\text{ЭПК} + \text{ДГК})}{A_{\text{ЭПК}} + A_{\text{ДГК}}},$$

где:

ЭПК – процентное содержание ЭПК;

ДГК – процентное содержание ДГК;

A_{n-3} – сумма площадей пиков, соответствующих эфирам C18:3 n–3, C18:4 n–3, C20:4 n–3, C21:5 n–3 и C22:5 n–3, на хроматограмме испытуемого раствора (b);

$A_{\text{ЭПК}}$ – площадь пика эфира ЭПК на хроматограмме испытуемого раствора (b);

$A_{\text{ДГК}}$ – площадь пика сложного эфира ДГК на хроматограмме испытуемого раствора (b).

01/2013:20430

2.4.30. ЭТИЛЕНГЛИКОЛЬ И ДИЭТИЛЕНГЛИКОЛЬ В ЭТОКСИЛИРОВАННЫХ СУБСТАНЦИЯХ

Этоксилированные субстанции могут содержать различные количества этиленгликоля и диэтиленгликоля, образующихся при производственном процессе. Метод, описанный ниже, может использоваться для количественного определения этих веществ, в частности в случае следующих поверхностно-активных веществ: рицинолеата макроглицерина, гидроксистеарата макроглицерина, гидроксистеарата макрогола 15, цетостеарилового эфира наноксинола 9 и макрогола.

ГАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ (2.2.28).

Раствор внутреннего стандарта. 30,0 мг 1,2-пентандиола P растворяют в ацетоне P и доводят до объема 30,0 мл этим же растворителем. 1,0 мл полученного раствора доводят ацетоном P до объема 20,0 мл.

Испытуемый раствор. 0,500 г испытуемого образца растворяют в растворе внутреннего стандарта и доводят до объема 10,0 мл этим же растворителем.

Раствор сравнения (а). 30,0 мг этиленгликоля P растворяют в ацетоне P и доводят до объема 100,0 мл этим же растворителем. 1,0 мл полученного раствора доводят раствором внутреннего стандарта до объема 10,0 мл.

Раствор сравнения (b). Готовят раствор диэтиленгликоля P с концентрацией, соответствующей заданному пределу, используя те же растворители, что и для приготовления раствора сравнения (а).

Условия хроматографирования:

- колонка: кварцевая капиллярная длиной 30 м и внутренним диаметром 0,53 мм, покрытая слоем *макрогола 20 000 R* (толщина слоя 1 мкм);
- газ-носитель: *гелий для хроматографии R*;
- скорость газа-носителя: 10 мл/мин;
- деление потока: 1:3;
- температура:

	Время (мин)	Температура (°C)
Колонка	0–40	80→200
	40–45	200→230
	45–65	230
Блок ввода проб		250
Детектор		250

- детектор: пламенно-ионизационный;
- объем вводимой пробы: 2 мкл. Относительное удерживание (по отношению к 1,2-пентандиолу; время удерживания – около 19 мин): этиленгликоль – около 0,7; диэтиленгликоль – около 1,3.

01/2013:20431

2.4.31. НИКЕЛЬ В ГИДРОГЕНИЗИРОВАННЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ МАСЛАХ

Атомно-абсорбционная спектрометрия (2.2.23, метод I).

ВНИМАНИЕ: при использовании сосудов для разложения под высоким давлением и микроволновых лабораторных печей тщательно ознакомьтесь с инструкциями производителя по безопасности и применению.

Реактивы *магния нитрата R* и *аммония дигидрофосфата R* перед использованием должны быть проверены на содержание никеля. При расчете содержания никеля в испытуемом образце учитывают фактическое содержание никеля.

Испытуемый раствор. 0,250 г (*m*) испытуемого образца помещают в сосуд для разложения под высоким давлением (из фторированных полимеров или кварцевого стекла), прибавляют 6,0 мл азотной кислоты, свободной от никеля, *R* и 2,0 мл концентрированного раствора водорода пероксида *R*. Аналогично готовят контрольный раствор. Закрытые сосуды помещают в лабораторную микроволновую печь и обрабатывают по подходящей программе, например, при 1000 Вт в течение 40 мин. Перед открытием сосуды охлаждают. Прибавляют 2,0 мл концентрированного раствора водорода пероксида *R* и повторяют процедуру разложения. Перед открытием сосуды охлаждают. Содержимое сосуда количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 0,5 мл раствора 10 г/л *магния нитрата R* и 0,5 мл раствора 100 г/л *аммония дигидрофосфата R*, доводят водой для хроматографии *R* до объема 25,0 мл и перемешивают.

Раствор сравнения. По 25 мкл, 50 мкл, 75 мкл и 100 мкл *эталонного раствора никеля (5 ppm Ni) R* помещают в 4 мерные колбы вместимостью 25 мл. В каждую колбу прибавляют 0,5 мл раствора 10 г/л *магния нитрата R*, 0,5 мл раствора 100 г/л *аммония дигидрофосфата R* и 6,0 мл азотной кислоты, свободной от никеля, *R*, доводят водой для хроматографии *R* до объема 25,0 мл и перемешивают. Полученные растворы содержат соответственно 5 нг/мл, 10 нг/мл, 15 нг/мл и 20 нг/мл (*ppb*) никеля.

Нулевой раствор. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 1,0 мл раствора 10 г/л *магния нитрата R*, 1,0 мл раствора 100 г/л *аммония дигидрофосфата R*, 12,0 мл азотной кислоты, свободной от никеля, *R*, доводят водой для хроматографии *R* до объема 50,0 мл и перемешивают.

Методика. Измеряют поглощение каждого раствора при 232,0 нм, используя подходящий атомно-абсорбционный спектрометр с графитовой печью, оборудованный системой коррекции фона, пиролитически покрытой кюветой и никелевой лампой с полым катодом. Высушивание образца проводят при температуре 120 °C в течение 35 с после подъема температуры в течение 5 с; озоление проводят при температуре 1100 °C в течение 10 с после подъема температуры в течение 30 с; охлаждение проводят при температуре

800 °С в течение 5 с после уменьшения температуры в течение 5 с; атомизацию проводят при температуре 2600 °С в течение 7 с. Нулевой раствор используют для настройки прибора на ноль. Используя наклон полученных кривых, определяют концентрации в испытуемом и контрольном растворах. При необходимости разводят нулевым раствором для получения показаний в калиброванном диапазоне поглощения.

Содержание никеля в микрограммах на грамм (ppm) рассчитывают по формуле:

$$\frac{c \cdot f}{m \cdot 40},$$

где:

c – измеренная концентрация никеля, нг/мл;

f – коэффициент разведения испытуемого раствора;

m – масса навески испытуемого образца, г.

01/2013:20432

2.4.32. ОБЩИЙ ХОЛЕСТЕРИН В МАСЛАХ, ОБОГАЩЕННЫХ ОМЕГА-3 КИСЛОТАМИ

Данный метод может быть использован для количественного определения суммы свободного и этерифицированного холестерина в рыбьем жире, обогащенном омега-3 кислотами (в виде сложных этиловых эфиров или триглицеридов).

Газовая хроматография (2.2.28).

Исходный раствор внутреннего стандарта. 0,15 г (5 α)-холестана P растворяют в гептане P и доводят до объема 50,0 мл этим же растворителем.

Рабочий раствор внутреннего стандарта. Готовят непосредственно перед использованием. 1,0 мл исходного раствора внутреннего стандарта доводят гептаном P до объема 10,0 мл.

Исходный раствор холестерина. 30,0 мг холестерина P растворяют в гептане P и доводят до объема 10,0 мл этим же растворителем. Полученный раствор помещают в сосуды для газовой хроматографии, он может храниться в замороженном состоянии до 6 месяцев.

Таблица 2.4.32.-1

Приготовление испытуемых растворов и растворов сравнения

	Испытуемый раствор		Раствор сравнения (а)		Раствор сравнения (b)
	менее 3 мг/г	более либо равно 3 мг/г	менее 3 мг/г	более либо равно 3 мг/г	
Исходный раствор внутреннего стандарта	–	+	–	+	+
Рабочий раствор внутреннего стандарта	+	–	+	–	–
Исходный раствор холестерина	–	–	–	+	+
Рабочий раствор холестерина	–	–	+	–	–
Раствор α -токоферола	–	–	–	–	+

Рабочий раствор холестерина. Готовят непосредственно перед использованием. 1,0 мл исходного раствора холестерина доводят гептаном P до объема 10,0 мл.

Раствор α -токоферола. 15,0 мг ФСО α -токоферола доводят гептаном P до объема 10,0 мл.

Испытуемый раствор. 0,100 г испытуемого образца помещают в кварцевую пробирку вместимостью 15 мл и прибавляют 1,0 мл исходного/рабочего раствора внутреннего

стандарта в зависимости от ожидаемого содержания холестерина в масле (таблица 2.4.32.-1).

Полученный раствор выпаривают досуха при температуре 50 °С в слабом токе азота при перемешивании. Прибавляют 0,5 мл раствора 50 % *калия гидроксида Р* и 3,0 мл 96 % *спирта Р*. Пробирку укупоривают в атмосфере *азота Р* и нагревают при температуре 100 °С в течение 1 ч при перемешивании. Охлаждают около 10 мин и прибавляют 6 мл *воды дистиллированной Р*. Экстрагируют 4 раза *эфиром Р* порциями по 2,5 мл, перемешивая каждый раз в течение 1 мин с использованием вихревой мешалки. Объединенные эфирные слои помещают в большую центрифужную пробирку или делительную воронку и промывают 5 мл *воды дистиллированной Р*, аккуратно перемешивая определенное количество раз, например, 60 раз. Водную фазу отбрасывают, к эфирной фазе прибавляют 5 мл 3 % раствора *калия гидроксида Р* и аккуратно перемешивают 20 раз. Водную фазу отбрасывают, к эфирной фазе прибавляют 5 мл *воды дистиллированной Р* и аккуратно перемешивают 20 раз. Эфирную фазу переносят в маленькую центрифужную пробирку, избегая попадания воды. В случае образования эмульсии прибавляют небольшое количество *натрия хлорида Р* для разделения фаз.

Полученный раствор выпаривают в слабом токе азота при аккуратном подогреве. Остаток растворяют в 600 мкл *этилацетата Р*.

В зависимости от ожидаемого содержания холестерина в масле, далее растворы готовят, как указано ниже:

– содержание менее 3 мг/г: 200 мкл полученного раствора доводят *этилацетатом Р* до объема 2,0 мл;

– содержание более либо равно 3 мг/г: 20 мкл полученного раствора доводят *этилацетатом Р* до объема 2,0 мл.

Раствор сравнения (а). 1,0 мл исходного/рабочего раствора внутреннего стандарта и 1,0 мл исходного/рабочего раствора холестерина, в зависимости от ожидаемого содержания холестерина в масле (таблица 2.4.32.-1), помещают в кварцевую пробирку вместимостью 15 мл и обрабатывают аналогично испытываемому раствору, начиная со слов «Выпаривают досуха при температуре...».

Раствор сравнения (b). Смешивают 1,0 мл исходного раствора внутреннего стандарта, 1,0 мл исходного раствора холестерина и 2,0 мл раствора α -токоферола. Выпаривают досуха в слабом токе азота при аккуратном подогреве. Полученный остаток растворяют в *этилацетате Р* и доводят до объема 50,0 мл этим же растворителем. 1,0 мл полученного раствора доводят *этилацетатом Р* до объема 10,0 мл. Полученный раствор в замороженном состоянии может храниться до 6 месяцев.

Условия хроматографирования:

– колонка кварцевая капиллярная длиной 30 м и внутренним диаметром 0,25 мм, покрытая слоем *поли(диметил)(дифенил)силоксана Р* (толщина слоя 0,25 мкм);

– газ-носитель: *гелий для хроматографии Р*;

– скорость газа-носителя: 1,3 мл/мин;

– температура:

	Время (мин)	Температура (°С)
Колонка	0–1	170
	1–38	170 → 320
	38–40	320
Блок ввода проб		320
Детектор		300

– детектор: пламенно-ионизационный;

– объем вводимой пробы: 1 мкл.

Пригодность хроматографической системы: раствор сравнения (b):

– разрешение: не менее 1,2 между пиками холестерина и α -токоферола.

Содержание общего холестерина, выраженное в миллиграммах холестерина на грамм масла, рассчитывают по формуле:

$$\frac{A_1 \cdot m_2 \cdot F}{A_2 \cdot m_1 \cdot R},$$

где:

A_1 – площадь пика холестерина на хроматограмме испытуемого раствора;

A_2 – площадь пика (5 α)-холестана на хроматограмме испытуемого раствора;

m_1 – масса навески испытуемого образца, г;

m_2 – масса навески (5 α)-холестана, взятого для приготовления исходного раствора внутреннего стандарта, г;

F – коэффициент разведения: 20 – для масел с ожидаемым количеством холестерина более либо равным 3 мг/г, 2 – для масел с ожидаемым содержанием холестерина менее 3 мг/г;

R – коэффициент отклика.

Коэффициент отклика рассчитывают по формуле:

$$\frac{A_3 \cdot m_2}{A_4 \cdot m_3 \cdot 5},$$

где:

A_3 – площадь пика холестерина на хроматограмме раствора сравнения (а);

A_4 – площадь пика (5 α)-холестана на хроматограмме раствора сравнения (а);

m_3 – масса навески холестерина, взятого для приготовления исходного раствора холестерина.

2.5. МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ

01/2013:20502

2.5.2. ЭФИРНОЕ ЧИСЛО

Эфирным числом I_E называют массу (мг) калия гидроксида, необходимую для омыления эфиров, содержащихся в 1 г испытуемого образца. Эфирное число рассчитывают исходя из значений числа омыления I_S и кислотного числа I_A :

$$I_E = I_S - I_A.$$

01/2013:20503

2.5.3. ГИДРОКСИЛЬНОЕ ЧИСЛО

Гидроксильным числом I_{OH} называют массу (мг) калия гидроксида, эквивалентную массе кислоты, связывающейся при ацилировании 1 г испытуемого образца.

МЕТОД А

Навеску испытуемого образца в соответствии с таблицей 2.5.3.-1 (m , г), если иное количество не указано в частной статье, помещают в круглодонную колбу со шлифом вместимостью 150 мл. Прибавляют объем *раствора уксусного ангидрида* Pl , указанный в таблице 2.5.3.-1.

Таблица 2.5.3.-1

Предполагаемое значение I_{OH}	Навеска испытуемого образца, г	Объем <i>раствора уксусного ангидрида</i> Pl , мл
10–100	2,0	5,0
100–150	1,5	5,0

150–200	1,0	5,0
200–250	0,75	5,0
250–300	0,60 или 1,20	5,0 или 10,0
300–350	1,0	10,0
350–700	0,75	15,0
700–950	0,5	15,0

К колбе присоединяют воздушный холодильник, помещают в водяную баню, поддерживая уровень воды в бане на 2,5 см выше уровня жидкости в колбе, и нагревают в течение 1 ч. Колбу извлекают из водяной бани, охлаждают и через верхний конец воздушного холодильника прибавляют 5 мл *воды Р*. При помутнении к раствору прибавляют *пиридин Р* до полного исчезновения мути, отмечая израсходованный объем. Колбу встряхивают, возвращают в водяную баню и нагревают в течение 10 мин. Затем колбу извлекают из водяной бани и охлаждают. Воздушный холодильник и стенки колбы промывают 5 мл *спирта Р*, предварительно нейтрализованного по *раствору фенолфталеина Р1*. Полученный раствор титруют 0,5 М *раствором калия гидроксида спиртовым*, используя в качестве индикатора 0,2 мл *раствора фенолфталеина Р1* (n_1 мл 0,5 М *раствора калия гидроксида спиртового*).

Параллельно проводят контрольный опыт (n_2 мл 0,5 М *раствора калия гидроксида спиртового*).

$$I_{\text{ОН}} = \frac{28,05 \cdot (n_2 - n_1)}{m} + I_{\text{А}}.$$

МЕТОД В

Указанную навеску испытуемого образца (m , г) помещают в хорошо высушенную коническую колбу вместимостью 5 мл с притертой пробкой или подходящей пластмассовой пробкой и прибавляют 2,0 мл *реактива пропионового ангидрида Р*. Колбу закрывают, осторожно встряхивают до растворения вещества и выдерживают в течение 2 ч, если нет других указаний в частной статье. Вынимают пробку и колбу вместе с содержимым помещают в коническую колбу вместимостью 500 мл с широким горлом, содержащую 25,0 мл *раствора 9 г/л анилина Р* в *циклогексане Р* и 30 мл *кислоты уксусной ледяной Р*. Содержимое колбы взбалтывают и выдерживают в течение 5 мин, прибавляют 0,05 мл *раствора кристаллического фиолетового Р* и титруют 0,1 М *раствором хлорной кислоты* до появления изумрудно-зеленого окрашивания (n_1 мл 0,1 М *раствора хлорной кислоты*).

Параллельно проводят контрольный опыт (n_2 мл 0,1 М *раствора хлорной кислоты*).

$$I_{\text{ОН}} = \frac{5,610 \cdot (n_1 - n_2)}{m}.$$

Количество воды (y , %), содержащейся в испытуемом образце, определяют полумикрометодом (2.5.12).

Пересчет гидроксильного числа $I_{\text{ОН}}$ осуществляют по формуле:

$$I_{\text{ОН}} = (\text{полученное значение гидроксильного числа}) - 31,1y.$$

01/2013:20504

2.5.4. ЙОДНОЕ ЧИСЛО

Йодным числом называют массу (г) галогена в пересчете на йод, которая может связаться со 100 г испытуемого образца в описанных условиях.

Если в частной статье нет других указаний, используют метод А. Замена метода А методом В требует проведения валидации.

МЕТОД А

Если в частной статье нет других указаний, навеску испытуемого образца в соответствии с таблицей 2.5.4.-1 (m , г), помещают в предварительно высушенную или промытую *кислотой уксусной ледяной Р* колбу вместимостью 250 мл с притертой пробкой и растворяют в 15 мл *хлороформа Р*. К полученному раствору очень медленно прибавляют 25,0 мл *раствора йода бромиды Р*. Колбу закрывают пробкой и выдерживают в темном месте при частом перемешивании в течение 30 мин, если нет других указаний в частной статье. Прибавляют 10 мл раствора 100 г/л калия йодида *Р*, 100 мл *воды Р* и титруют 0,1 М *раствором натрия тиосульфата* при интенсивном перемешивании до светло-желтого окрашивания, затем прибавляют 5 мл *раствора крахмала Р* и титруют 0,1 М *раствором натрия тиосульфата* по каплям до обесцвечивания (n_1 мл 0,1 М *раствора натрия тиосульфата*).

Параллельно проводят контрольный опыт (n_2 мл 0,1 М *раствора натрия тиосульфата*).

$$I_1 = \frac{1,269 \cdot (n_2 - n_1)}{m}$$

Таблица 2.5.4.-1

Предполагаемое значение I_1	Масса навески испытуемого образца, г
менее 20	1,0
20–60	0,5–0,25
60–100	0,25–0,15
более 100	0,15–0,10

МЕТОД В

Масса испытуемого образца должна быть такая, чтобы избыток добавленного *раствора йода хлорида Р* составлял 50–60 % от общего количества, т.е. 100–150 % от связанного количества.

Если в частной статье нет других указаний, навеску испытуемого образца в соответствии с таблицей 2.5.4.-2 (m , г) помещают в предварительно высушенную или промытую *кислотой уксусной ледяной Р* колбу вместимостью 250 мл с притертой пробкой и растворяют в 15 мл смеси из равных объемов *циклогексана Р* и *кислоты уксусной ледяной Р*. Если необходимо, образец расплавляют перед растворением (температура плавления более 50 °С). Очень медленно прибавляют указанный в таблице 2.5.4.-2 объем *раствора йода хлорида Р*. Колбу закрывают пробкой и выдерживают в темном месте при частом перемешивании в течение 30 мин, если в частной статье нет других указаний. Прибавляют 10 мл раствора 100 г/л калия йодида *Р*, 100 мл *воды Р* и титруют 0,1 М *раствором натрия тиосульфата* при постоянном интенсивном перемешивании до светло-желтого окрашивания. Прибавляют 5 мл *раствора крахмала Р* и продолжают титрование, прибавляя по каплям 0,1 М *раствор натрия тиосульфата* до полного обесцвечивания (n_1 мл 0,1 М *раствора натрия тиосульфата*).

Параллельно проводят контрольный опыт (n_2 мл 0,1 М *раствора натрия тиосульфата*).

Таблица 2.5.4.-2

Предполагаемое значение I_1	Масса (г) навески испытуемого образца (соответствует избытку 150 % ICl)	Масса (г) навески испытуемого образца (соответствует избытку 100 % ICl)	Раствор йода хлорида (мл)
<3	10	10	25
3	8,4613	10,5760	25
5	5,0770	6,3460	25
10	2,5384	3,1730	20
20	0,8461	1,5865	20
40	0,6346	0,7935	20

60	0,4321	0,5288	20
80	0,3173	0,3966	20
100	0,2538	0,3173	20
120	0,2115	0,2644	20
140	0,1813	0,2266	20
160	0,1587	0,1983	20
180	0,1410	0,1762	20
200	0,1269	0,1586	20

01/2013:20505

2.5.5. ПЕРЕКИСНОЕ (ПЕРОКСИДНОЕ) ЧИСЛО

Перекисным (пероксидным) числом I_p называют количество миллиэквивалентов активного кислорода, соответствующее количеству пероксидов, содержащемуся в 1000 г испытуемого образца и определяемому методами, приведенными ниже.

Если в частной статье нет других указаний, используют метод А. Замена метода А методом В требует проведения валидации.

МЕТОД А

5,00 г испытуемого образца (m , г) помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл с притертой стеклянной пробкой, прибавляют 30 мл смеси *хлороформ Р – кислота уксусная ледяная Р* (2:3, об/об). Колбу встряхивают до растворения испытуемого образца, прибавляют 0,5 мл *насыщенного раствора калия йодида Р*, встряхивают в течение ровно 1 мин и прибавляют 30 мл *воды Р*. Полученный раствор титруют 0,01 М *раствором натрия тиосульфата*, медленно добавляя титрованный раствор при непрерывном перемешивании почти до полного исчезновения желтого окрашивания. Затем прибавляют 5 мл *раствора крахмала Р* и продолжают титровать при интенсивном перемешивании до обесцвечивания раствора (n_1 мл 0,01 М *раствора натрия тиосульфата*).

Параллельно проводят контрольный опыт (n_2 мл 0,01 М *раствора натрия тиосульфата*). Объем 0,01 М *раствора натрия тиосульфата Р*, израсходованный на титрование в контрольном опыте, не должен превышать 0,1 мл.

$$I_p = \frac{10 \cdot (n_1 - n_2)}{m}.$$

МЕТОД В

Испытания проводят с защитой от света, способного вызывать фотохимические превращения.

Навеску испытуемого образца (m , г) в соответствии с таблицей 2.5.5.-1 помещают в коническую колбу с притертой стеклянной пробкой, прибавляют 50 мл смеси *триметилпентан Р – кислота уксусная ледяная Р* (2:3, об/об). Колбу закрывают пробкой и взбалтывают до растворения испытуемого образца. К полученному раствору подходящей мерной пипеткой прибавляют 0,5 мл *насыщенного раствора калия йодида Р*. Колбу закрывают пробкой, выдерживают в течение 60 ± 1 с при постоянном тщательном встряхивании и прибавляют 30 мл *воды Р*. Титруют 0,01 М *раствором натрия тиосульфата* (V_1 , мл), прибавляя титрованный раствор постепенно при постоянном и интенсивном перемешивании почти до полного исчезновения желтого окрашивания йода. Затем прибавляют около 0,5 мл *раствора крахмала Р1* и продолжают титрование при постоянном интенсивном перемешивании, особенно вблизи точки эквивалентности, с целью полного высвобождения йода из слоя органического растворителя. Раствор натрия тиосульфата прибавляют по каплям до исчезновения синего окрашивания.

При необходимости, вместо 0,01 М *раствора натрия тиосульфата* может быть использован 0,1 М *раствор натрия тиосульфата*.

Таблица 2.5.5.-1

Предполагаемое значение I_p	Масса навески испытуемого образца, г
0–12	2,00–5,00
12–20	1,20–2,00
20–30	0,80–1,20
30–50	0,500–0,800
50–90	0,300–0,500

ПРИМЕЧАНИЕ: для перекисных чисел 70 и более наблюдается задержка от 15 с до 30 с в обесцвечивании крахмального индикатора, что обусловлено свойством триметилпентана всплывать на поверхность водной фазы. Поэтому необходимо время для перемешивания растворителя с титрованным раствором для полного высвобождения йода. Для перекисных чисел более 150 рекомендуется использовать *0,1 М раствор натрия тиосульфата*. С целью предотвращения расслоения фаз и быстрого высвобождения йода к реакционной смеси допускается прибавление небольшого количества (от 0,5 % до 1,0 % (м/м)) эмульгатора с высоким гидрофильно-липофильным балансом (ГЛБ) (например, полисорбат 60).

Параллельно проводят контрольный опыт (V_0 , мл). Если объем титрованного раствора, израсходованный на титрование в контрольном опыте, превышает 0,1 мл, испытание повторяют со свежеприготовленными реактивами.

Пероксидное число рассчитывают по формуле:

$$I_p = \frac{1000 \cdot (V_1 - V_0) \cdot c}{m},$$

где:

c – концентрация раствора натрия тиосульфата, моль/л.

01/2013:20506

2.5.6. ЧИСЛО ОМЫЛЕНИЯ

Числом омыления I_s называют массу (мг) калия гидроксида, необходимую для нейтрализации свободных кислот и омыления сложных эфиров, содержащихся в 1 г испытуемого образца.

Если в частной статье нет других указаний, навеску испытуемого образца (m , г) в соответствии с таблицей 2.5.6.-1 помещают в колбу из боросиликатного стекла вместимостью 250 мл, снабженную обратным холодильником.

[#]Если испытуемый образец в целях консервации был насыщен углерода диоксидом, перед взвешиванием его выдерживают в выпарительной чашке в течение 24 ч в вакуум-эксикаторе.[#]

Прибавляют 25,0 мл *0,5 М раствора калия гидроксида спиртового* и несколько стеклянных шариков, присоединяют холодильник и нагревают в течение 30 мин, если иного не указано в частной статье. Прибавляют 1 мл *раствора фенолфталеина Р1* и немедленно титруют (пока раствор горячий) *0,5 М раствором хлористоводородной кислоты* (n_1 мл *0,5 М раствора хлористоводородной кислоты*).

Параллельно проводят контрольный опыт (n_2 мл *0,5 М раствора хлористоводородной кислоты*).

$$I_s = \frac{28,05 \cdot (n_2 - n_1)}{m}.$$

Таблица 2.5.6.-1

Предполагаемое значение I_s	Масса навески испытуемого образца, г
< 3	20
3–10	12–15
10–40	8–12

40–60	5–8
60–100	3–5
100–200	2,5–3
200–300	1–2
300–400	0,5–1

01/2013:20507

2.5.7. НЕОМЫЛЯЕМЫЕ ВЕЩЕСТВА

Термин «неомыляемые вещества» применяется к веществам, нелетучим при температуре от 100 °С до 105 °С, которые экстрагируются органическим растворителем из испытуемого образца после его омыления. Содержание неомыляемых веществ рассчитывают в процентах (м/м).

Следует использовать стеклянную посуду со шлифами без смазки.

Навеску испытуемого образца (*m*, г), указанную в частной статье, помещают в колбу вместимостью 250 мл, снабженную обратным холодильником. Прибавляют 50 мл 2 М раствора калия гидроксида спиртового *P* и нагревают на водяной бане в течение 1 ч, часто перемешивая круговыми движениями. Затем охлаждают до температуры ниже 25 °С и количественно переносят содержимое колбы в делительную воронку с помощью 100 мл воды *P*. Полученный раствор осторожно встряхивают с тремя порциями эфира, свободного от пероксидов, *P* по 100 мл каждая. Все эфирные извлечения собирают в отдельную делительную воронку, в которую предварительно помещают 40 мл воды *P*, осторожно встряхивают в течение нескольких минут, выдерживают до полного расслоения, после чего отбрасывают водный слой. Эфирный слой дважды промывают водой *P* порциями по 40 мл каждая. Затем тщательно промывают поочередно 40 мл раствора 30 г/л калия гидроксида *P* и 40 мл воды *P*; повторяют данную процедуру три раза. Затем эфирный слой несколько раз промывают 40 мл воды *P* до отсутствия щелочной реакции по фенолфталеину в водном слое. Эфирный слой количественно переносят в предварительно взвешенную колбу с помощью эфира, свободного от пероксидов, *P*.

Эфир отгоняют с соответствующими предосторожностями и к остатку прибавляют 6 мл ацетона *P*. Затем аккуратно удаляют растворитель в потоке воздуха. Остаток в колбе сушат до постоянной массы при температуре от 100 °С до 105 °С, охлаждают в эксикаторе и взвешивают (*a*, г).

$$\text{Неомыляемые вещества} = \frac{100 \cdot a}{m} \%.$$

Остаток растворяют в 20 мл 96 % спирта *P*, предварительно нейтрализованного по раствору фенолфталеина *P*, и титруют 0,1 М раствором натрия гидроксида спиртовым. Если объем 0,1 М раствора натрия гидроксида спиртового, пошедшего на титрование, более 0,2 мл, разделение слоев прошло не полностью; при этом взвешенный остаток не может рассматриваться как «неомыляемые вещества». В этом случае испытания необходимо повторить.

01/2013:20508

2.5.8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИННОГО АЗОТА В СОЕДИНЕНИЯХ, КОТОРЫЕ СОДЕРЖАТ ПЕРВИЧНУЮ АРОМАТИЧЕСКУЮ АМИНОГРУППУ

Указанное количество испытуемого образца растворяют в 50 мл кислоты хлористоводородной разведенной *P* или в другом указанном растворителе и прибавляют 3 г калия бромида *P*. Охлаждают в воде со льдом и затем медленно титруют, при постоянном перемешивании, 0,1 М раствором натрия нитрита, поддерживая температуру раствора около 15 °С, если нет других указаний в частной статье.

Конечную точку титрования определяют электрометрическими методами или с помощью индикатора, указанного в частной статье.

[#]Рекомендуемая скорость прибавления титранта в начале титрования – около 2 мл/мин, в конце титрования – около 0,05 мл/мин.

При потенциометрическом титровании в качестве индикаторного электрода применяют платиновый электрод, электродом сравнения служит хлоридсеребряный или насыщенный каломельный электрод.

В качестве внешнего индикатора используют *йодкрахмальную бумагу Р*. Титрование проводят, пока через 1 мин, если нет других указаний в частной статье, после прибавления *0,1 М раствора натрия нитрита* капля титруемого раствора, взятая с помощью стеклянной палочки, не будет вызывать синее окрашивание бумаги. Параллельно проводят контрольный опыт.

В качестве внутренних индикаторов используют тропеолин 00 (0,2 мл *раствора тропеолина 00 Р*), тропеолин в смеси с метиленовым синим (0,2 мл *раствора тропеолина 00 Р* и 0,1 мл *раствора метиленового синего Р*) или раствор нейтрального красного 5 г/л (0,1 мл раствора в начале титрования и 0,1 мл в конце титрования). Титрование с тропеолином 00 проводят до перехода окраски от красной к желтой, со смесью тропеолина 00 с метиленовым синим – от красно-фиолетовой к голубой, с нейтральным красным – от красно-фиолетовой к синей. Выдержку в конце титрования с нейтральным красным увеличивают до 2 мин.

Нитритометрическое титрование применяют для количественного определения соединений, содержащих первичную ароматическую аминогруппу, для определения гидразидов, а также ароматических нитросоединений после предварительного восстановления нитрогруппы до аминогруппы.[#]

01/2013:20509

2.5.9. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АЗОТА ПОСЛЕ МИНЕРАЛИЗАЦИИ СЕРНОЙ КИСЛОТОЙ

ПОЛУМИКРОМЕТОД

Указанную массу испытуемого образца (*m*, г), содержащего около 2 мг азота, помещают в колбу для сжигания, прибавляют 4 г измельченной смеси, состоящей из 100 г *калия сульфата Р*, 5 г *меди сульфата Р* и 2,5 г *селена Р*, и три стеклянных шарика. Смывают прилипшие к горлу колбы частицы 5 мл *кислоты серной Р* таким образом, чтобы кислота стекала по стенкам колбы. Содержимое колбы перемешивают круговыми движениями. Во избежание чрезмерных потерь серной кислоты горло колбы неплотно закрывают пробкой (например, подходящей грушевидной пробкой с коротким отростком). Колбу нагревают, постепенно доводя до кипения с конденсацией серной кислоты в горле колбы; при этом необходимо следить за тем, чтобы верхняя часть колбы не перегревалась. Нагревание продолжают в течение 30 мин, если нет других указаний в частной статье. Охлаждают, растворяют твердый остаток, осторожно прибавляя к смеси 25 мл *воды Р*, снова охлаждают и подсоединяют к прибору для перегонки с водяным паром. Прибавляют 30 мл *раствора натрия гидроксида концентрированного Р* и немедленно перегоняют, пропуская пар через смесь. Собирают около 40 мл отгона в приемник, содержащий 20,0 мл *0,01 М раствора кислоты хлористоводородной* и достаточное количества *воды Р* для того, чтобы конец холодильника был погружен в жидкость. В конце перегонки приемник опускают таким образом, чтобы конец холодильника находился над поверхностью жидкости. Необходимо исключить попадание жидкости на внешнюю поверхность холодильника из содержимого приемника.

[#]По окончании отгонки конец холодильника промывают снаружи небольшим количеством *воды Р*, собирая промывную воду в тот же приемник.[#]

Отгон титруют *0,01 М раствором натрия гидроксида*, используя в качестве индикатора *смешанный раствор метилового красного Р* до перехода окраски из красно-фиолетовой в зеленую (*n*₁ мл *0,01 М раствора натрия гидроксида*).

Испытания повторяют, используя вместо испытуемого образца около 50 мг *глюкозы Р* (*n*₂ мл *0,01 М раствора натрия гидроксида*).

$$\text{Содержание азота} = \frac{0,01401 \cdot (n_2 - n_1)}{m}.$$

01/2013:20510

2.5.10. МЕТОД СЖИГАНИЯ В КОЛБЕ С КИСЛОРОДОМ

Если нет других указаний, колба для сжигания – это коническая колба вместимостью не менее 500 мл из боросиликатного стекла с притертой пробкой, снабженной держателем для образца, который может быть, например, платиновым или платино-иридиевым.

Указанное в частной статье количество мелкоизмельченного испытуемого образца помещают в центр фильтровальной бумаги размером 30 мм на 40 мм с небольшой полосой шириной 10 мм и длиной 30 мм.

[#]Фильтровальную бумагу заворачивают в виде пакетика, оставляя узкую полоску. В случае испытания жидкостей их помещают в капилляр, запаянный парафином, или в капсулу из полиэтилена, нитропленки или метилцеллюлозы. Для труднолетучих жидкостей возможно применение двойного бумажного пакетика. При испытании мазеподобных образцов применяют капсулу из нитропленки или пакет из воценой бумаги. Капсулы и капилляры заворачивают в пакетик из фильтровальной бумаги, оставляя узкую полоску. При анализе твердых и мазеподобных образцов, сгорающих со вспышкой, к навеске прибавляют 3–5 мг парафина. Приготовленную пробу помещают в держатель.[#]

Если в частной статье указана бумага, пропитанная лития карбонатом, перед использованием центр бумаги увлажняют насыщенным раствором *лития карбоната Р* и сушат в сушильном шкафу. Испытуемый образец заворачивают в бумагу и помещают в держатель образца. Помещают в колбу *воду Р* или указанный раствор, предназначенный для поглощения продуктов горения. С помощью трубки, конец которой находится выше уровня жидкости, вытесняют воздух из колбы, пропуская поток кислорода. Смачивают горловину колбы *водой Р*, поджигают узкий конец фильтровальной бумаги с соблюдением мер предосторожности и закрывают колбу пробкой.

[#]Для соблюдения мер предосторожности необходимо: надеть защитные очки, колбу поместить в предохранительный чехол, установить защитный экран.[#]

Во время сжигания необходимо придерживать пробку колбы рукой. После сжигания колбу энергично встряхивают до полного растворения продуктов горения. Колбу охлаждают в течение 5 мин, если нет других указаний, и осторожно открывают. Обмывают дно, стенки колбы и держатель образца *водой Р*. Объединяют продукты горения и жидкость после промывки. Проводят определение методом, указанным в частной статье.

01/2013:20511

2.5.11. КОМПЛЕКСОМЕТРИЧЕСКОЕ ТИТРОВАНИЕ

[#]Комплексометрическое титрование – это группа методов титрования, основанных на реакциях образования растворимых в воде комплексных соединений.

Комплексонометрическое титрование как частный случай комплексометрического титрования основано на реакции комплексообразования катионов металлов с комплексонами – аминополикарбоновыми кислотами и их солями. Образующиеся комплексные соединения называют комплексонатами.

Для комплексонометрического титрования в качестве титранта обычно применяют динатриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты, известную под названиями: натрия эдетат, трилон Б, комплексон III, хелатон III и др.

Натрия эдетат образует с катионами многовалентных металлов устойчивые и хорошо растворимые в воде комплексонаты в стехиометрическом отношении 1:1 и используется для количественного определения алюминия, висмута, кальция, свинца, магния и цинка в лекарственных средствах и фармацевтических субстанциях.

Индикаторы, применяемые для визуального обнаружения конечной точки титрования, называются металлоиндикаторами. Большинство из них (металлохромные

индикаторы) являются органическими красителями и обладают свойством изменять окраску при образовании комплексных соединений с катионами металлов. Металлоиндикаторы для комплексонометрии подбирают таким образом, чтобы их взаимодействие с катионами определяемых металлов было обратимым и устойчивость их комплексов была значительно меньше устойчивости комплексонатов, образующихся в процессе титрования.

Прямое титрование растворами натрия эдетата проводят следующим образом: к испытуемому раствору, при необходимости нейтрализованному, прибавляют буферный раствор для создания требуемого значения pH, затем прибавляют металлоиндикатор. В процессе титрования раствором натрия эдетата в конечной точке титрования окраска раствора изменяется от окраски комплекса металлоиндикатора с титруемым катионом металла до окраски свободного металлоиндикатора.

При обратном титровании к испытуемому раствору прибавляют натрия эдетат и его избыток оттитровывают при определенном значении pH в присутствии соответствующего металлоиндикатора растворами солей цинка, магния, свинца и др.

Допускается использование в качестве титранта *0,05 М раствор натрия эдетата*, что должно быть указано в частной статье.[#]

АЛЮМИНИЙ

20,0 мл раствора, указанного в частной статье, помещают в коническую колбу вместимостью 500 мл, прибавляют 25,0 мл *0,1 М раствора натрия эдетата* и 10 мл смеси из равных объемов раствора 155 г/л *аммония ацетата Р* и *кислоты уксусной разведенной Р*, кипятят в течение 2 мин и охлаждают. Прибавляют 50 мл *этанола Р* и 3 мл свежеприготовленного раствора 0,25 г/л *дитизона Р* в *этаноле Р*. Титруют избыток натрия эдетата *0,1 М раствором цинка сульфата* до перехода зеленовато-синего окрашивания раствора в красно-фиолетовое.

1 мл *0,1 М раствора натрия эдетата* соответствует 2,698 мг Al.

[#]Допускается проводить определение алюминия по следующей методике.

Навеску испытуемого образца, эквивалентную 0,02–0,03 г алюминия, растворяют в 2 мл *1 М раствора кислоты хлористоводородной* и 50 мл *воды Р*. Прибавляют 50 мл *0,05 М раствора натрия эдетата* и нейтрализуют *1 М раствором натрия гидроксида*, используя в качестве индикатора *метиловый красный Р*. Раствор нагревают до кипения и выдерживают на кипящей водяной бане в течение 10 мин, охлаждают, прибавляют 50 мг *индикаторной смеси ксиленолового оранжевого Р*, 5 г *гексаметилентетрамина Р* и титруют избыток натрия эдетата *0,05 М раствором свинца нитрата* до появления розовато-фиолетового окрашивания.

1 мл *0,05 М раствора натрия эдетата* соответствует 1,349 мг Al.[#]

ВИСМУТ

Раствор, указанный в частной статье, помещают в коническую колбу вместимостью 500 мл, доводят *водой Р* до объема 250 мл и, если нет других указаний в частной статье, прибавляют по каплям при перемешивании *раствор аммиака концентрированный Р* до помутнения смеси. Затем прибавляют 0,5 мл *кислоты азотной Р*, нагревают при температуре около 70 °С до полного исчезновения помутнения. Прибавляют около 50 мг *индикаторной смеси ксиленолового оранжевого Р* и титруют *0,1 М раствором натрия эдетата* до перехода розовато-фиолетового окрашивания в желтое.

1 мл *0,1 М раствора натрия эдетата* соответствует 20,90 мг Bi.

КАЛЬЦИЙ

Раствор, указанный в частной статье, помещают в коническую колбу вместимостью 500 мл и доводят *водой Р* до объема 300 мл. Прибавляют 6,0 мл *раствора натрия гидроксида концентрированного Р* и около 15 мг *индикаторной смеси кальконкарбоновой кислоты Р*. Титруют *0,1 М раствором натрия эдетата* до перехода фиолетового окрашивания в насыщенно-синее.

1 мл *0,1 М раствора натрия эдетата* соответствует 4,008 мг Ca.

[#]Допускается проводить определение кальция по следующей методике.

Навеску испытуемого образца, эквивалентную 0,04–0,05 г кальция, растворяют, как указано в частной статье, в воде *P* или кислоте хлористоводородной разведенной *P*, доводят водой *P* до объема 50 мл, прибавляют 10 мл аммиачного буферного раствора *pH* 10,0 *P*, 0,1 г индикаторной смеси хромового темно-синего *P* или 7 капель раствора хромового темно-синего *P* и титруют 0,05 *M* раствором натрия эдетата до появления сине-фиолетового окрашивания.

1 мл 0,05 *M* раствора натрия эдетата соответствует 2,004 мг Ca.[#]

МАГНИЙ

Раствор, указанный в частной статье, помещают в коническую колбу вместимостью 500 мл и доводят водой *P* до объема 300 мл. Прибавляют 10 мл аммиачного буферного раствора *pH* 10,0 *P* и около 50 мг индикаторной смеси протравного черного 11 *P* (эриохром черный Т). Раствор нагревают до температуры около 40 °С и титруют при этой температуре 0,1 *M* раствором натрия эдетата до перехода фиолетового окрашивания в синее.

1 мл 0,1 *M* раствора натрия эдетата соответствует 2,431 мг Mg.

[#]Допускается проводить определение магния по следующей методике:

Навеску испытуемого образца, эквивалентную 0,02–0,03 г магния, растворяют, как указано в частной статье. Прибавляют 50 мл воды *P*, 10 мл аммиачного буферного раствора *pH* 10,0 *P*; 0,1 г индикаторной смеси протравного черного 11 *P* (эриохром черный Т) или 7 капель раствора протравного черного 11 *P* (эриохром черный Т) и титруют 0,05 *M* раствором натрия эдетата до появления синего окрашивания.

1 мл 0,05 *M* раствора натрия эдетата соответствует 1,215 мг Mg.[#]

СВИНЕЦ

Раствор, указанный в частной статье, помещают в коническую колбу вместимостью 500 мл и доводят водой *P* до объема 200 мл. Прибавляют около 50 мг индикаторной смеси ксиленолового оранжевого *P*, а затем гексаметилентетрамина *P* до появления фиолетово-розового окрашивания. Титруют 0,1 *M* раствором натрия эдетата до перехода фиолетово-розового окрашивания в желтое.

1 мл 0,1 *M* раствора натрия эдетата соответствует 20,72 мг Pb.

ЦИНК

Раствор, указанный в частной статье, помещают в коническую колбу вместимостью 500 мл и доводят водой *P* до объема 200 мл. Прибавляют около 50 мг индикаторной смеси ксиленолового оранжевого *P*, а затем гексаметилентетрамина *P* до появления фиолетово-розового окрашивания раствора. После этого дополнительно прибавляют 2 г гексаметилентетрамина *P* и титруют 0,1 *M* раствором натрия эдетата до перехода фиолетово-розового окрашивания в желтое.

1 мл 0,1 *M* раствора натрия эдетата соответствует 6,54 мг Zn.

01/2013:20513

2.5.13. АЛЮМИНИЙ В АДсорбированных ВАКЦИНАХ

Испытуемый образец гомогенизируют и количество с предполагаемым содержанием алюминия от 5 мг до 6 мг переносят в колбу для сжигания вместимостью 50 мл. Прибавляют 1 мл серной кислоты *P*, 0,1 мл азотной кислоты *P* и несколько стеклянных шариков. Полученный раствор нагревают до выделения плотного белого дыма. Если на данной стадии наблюдается обугливание, прибавляют несколько капель азотной кислоты *P* и продолжают кипячение до исчезновения окраски. Смесь охлаждают несколько минут, с осторожностью прибавляют 10 мл воды *P* и кипятят до получения прозрачного раствора. Охлаждают, прибавляют 0,05 мл раствора метилового оранжевого *P* и нейтрализуют раствором натрия гидроксида концентрированным *P* (от 6,5 мл до 7 мл). Если образуется осадок, его растворяют, прибавляя по каплям достаточный объем серной кислоты разведенной *P*. Переносят раствор в коническую колбу вместимостью 250 мл, промывая колбу для сжигания 25 мл воды *P*. Прибавляют 25,0 мл 0,02 *M* раствора натрия эдетата,

10 мл *ацетатного буферного раствора pH 4,4 Р*, несколько стеклянных шариков и осторожно кипятят в течение 3 мин, прибавляют 0,1 мл *раствора пиридилазонафтола Р* и титруют горячий раствор 0,02 М *раствором меди сульфата* до изменения цвета раствора на пурпурно-коричневый.

Проводят контрольный опыт без использования вакцины.

1 мл 0,02 М *раствора натрия эдета* соответствует 0,5396 мг Al.

01/2013:20514

2.5.14. КАЛЬЦИЙ В АДсорбированных ВАКЦИНАХ

Все растворы, используемые для данного исследования, должны готовиться с использованием воды Р.

Кальций определяют методом атомно-эмиссионной спектрометрии (2.2.22, метод I).

Испытуемый образец гомогенизируют. К 1,0 мл прибавляют 0,2 мл *кислоты хлористоводородной разведенной Р* и разводят до 3,0 мл *водой Р*. Измеряют интенсивность излучения при длине волны 620 нм.

01/2013:20515

2.5.15. ФЕНОЛ В ИММУНОСЫВОРОТКАХ И ВАКЦИНАХ

Испытуемый образец гомогенизируют и разводят до необходимого объема *водой Р*, чтобы получить раствор с предполагаемым содержанием фенола 15 мкг/мл. Готовят ряд растворов сравнения с *фенолом Р*, содержащих 5 мкг/мл, 10 мкг/мл, 15 мкг/мл, 20 мкг/мл и 30 мкг/мл фенола соответственно. К 5 мл испытуемого раствора и к 5 мл каждого из растворов сравнения прибавляют 5 мл *буферного раствора pH 9,0 Р*, 5 мл раствора 1 г/л *аминопиперазона Р* и 5 мл *раствора калия феррицианида Р*. Выдерживают в течение 10 мин и измеряют интенсивность окрашивания при длине волны 546 нм.

Строят градуировочный график и рассчитывают содержание фенола в испытуемом образце.

01/2013:20516

2.5.16. БЕЛОК В ПОЛИСАХАРИДНЫХ ВАКЦИНАХ

Испытуемый раствор. Используют мерную колбу необходимого объема для приготовления раствора, содержащего около 5 мг/мл сухого полисахарида. Количественно переносят содержимое контейнера в мерную колбу и доводят *водой Р* до метки. 1 мл раствора помещают в стеклянную пробирку, прибавляют 0,15 мл раствора 400 г/л *кислоты трихлоруксусной Р*, встряхивают, выдерживают в течение 15 мин, центрифугируют в течение 10 мин при скорости вращения 5000 об/мин и отбрасывают надосадочную жидкость. К полученному осадку прибавляют 0,4 мл 0,1 М *раствора натрия гидроксида*.

Растворы сравнения. 0,100 г альбумина *бычьего Р* растворяют в 100 мл 0,1 М *натрия гидроксида* (основной раствор, содержащий 1 г/л белка). 1 мл основного раствора доводят 0,1 М *раствором натрия гидроксида* до объема 20 мл (рабочий раствор 1 с концентрацией белка 50 мг/л). 1 мл основного раствора доводят 0,1 М *раствором натрия гидроксида* до объема 4 мл (рабочий раствор 2 с концентрацией протеина 250 мг/л). В 6 стеклянных пробирок помещают 0,10 мл, 0,20 мл и 0,40 мл рабочего раствора 1 и 0,15 мл, 0,20 мл и 0,25 мл рабочего раствора 2. Доводят объем в каждой пробирке до 0,40 мл, используя 0,1 М *раствор натрия гидроксида*.

Готовят контрольный раствор, используя 0,40 мл 0,1 М *раствора натрия гидроксида*.

В каждую пробирку прибавляют 2 мл *раствора медно-тартратного Р3*, встряхивают и выдерживают в течение 10 мин. В каждую пробирку прибавляют по 0,2 мл смеси из равных объемов *фосфомолибденовольфрамового реактива Р* и *воды Р*, приготовленной непосредственно перед использованием. Закрывают пробирки, перемешивают,

переворачивая их, и дают отстояться в темном месте в течение 30 мин. Голубой цвет остается стабильным в течение 60 мин. При необходимости центрифугируют для получения прозрачных растворов.

Измеряют оптическую плотность (2.2.25) каждого раствора при длине волны 760 нм, используя контрольный раствор в качестве компенсационного раствора. Строят градуировочный график на основе оптической плотности 6 растворов сравнения и соответствующей концентрации белка и с его помощью находят содержание белка в испытуемом растворе.

01/2013:20517

2.5.17. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ В ПОЛИСАХАРИДНЫХ ВАКЦИНАХ

Испытуемый раствор. Используют мерную колбу необходимого объема для приготовления раствора, содержащего около 5 мг/мл сухого полисахарида. Количественно переносят содержимое контейнера в мерную колбу и доводят *водой Р* до метки.

При необходимости разводят испытуемый раствор до достижения оптической плотности, подходящей для используемого прибора. Измеряют оптическую плотность (2.2.25) при длине волны 260 нм, используя *воду Р* в качестве компенсационного раствора.

Оптическая плотность раствора 1 г/л нуклеиновой кислоты при длине волны 260 нм равна 20.

01/2013:20518

2.5.18. ФОСФОР В ПОЛИСАХАРИДНЫХ ВАКЦИНАХ

Испытуемый раствор. Используют мерную колбу необходимого объема для приготовления раствора, содержащего около 5 мг/мл сухого полисахарида. Количественно переносят содержимое контейнера в мерную колбу и доводят *водой Р* до метки. Разводят раствор так, чтобы объем, используемый в опыте (1 мл), содержал около 6 мкг фосфора. Переносят 1,0 мл раствора в пробирку из термостойкого стекла вместимостью 10 мл.

Растворы сравнения. 0,2194 г калия дигидрофосфата *Р* растворяют в 500 мл *воды Р* для получения раствора с содержанием фосфора 0,1 мг/мл. 5,0 мл полученного раствора доводят *водой Р* до объема 100,0 мл. Переносят 0,5 мл, 1,0 мл и 2,0 мл разведенного раствора в три пробирки из термостойкого стекла.

Готовят контрольный раствор, используя 2,0 мл *воды Р* в пробирке из термостойкого стекла.

Во все пробирки прибавляют по 0,2 мл *кислоты серной Р* и подогревают на масляной бане при температуре 120 °С в течение 1 ч, а затем при температуре 160 °С до появления белого дыма (около 1 ч). Прибавляют 0,1 мл *кислоты хлорной Р* и нагревают при температуре 160 °С до обесцвечивания раствора (около 90 мин). Охлаждают и прибавляют в каждую пробирку 4 мл *воды Р* и 4 мл *реагента аммония молибдата Р*. Нагревают на водяной бане при температуре 37 °С в течение 90 мин, охлаждают и доводят *водой Р* до объема 10,0 мл. Голубой цвет остается стабильным в течение нескольких часов.

Измеряют оптическую плотность (2.2.25) каждого раствора при длине волны 820 нм, используя контрольный раствор в качестве компенсационного раствора. Строят градуировочный график на основе оптической плотности 6 растворов сравнения и соответствующей концентрации фосфора и с его помощью находят содержание фосфора в испытуемом растворе.

01/2013:20519

2.5.19. О-АЦЕТИЛ В ПОЛИСАХАРИДНЫХ ВАКЦИНАХ

Испытуемый раствор. Используют мерную колбу необходимого объема для приготовления раствора, содержащего около 5 мг/мл сухого полисахарида. Количественно

переносят содержимое контейнера в мерную колбу и доводят *водой Р* до метки. Разводят раствор так, чтобы объемы, используемые в опыте, содержали от 30 мкг до 600 мкг ацетилхолина хлорида (*О*-ацетил). Помещают по 0,3 мл, 0,5 мл и 1,0 мл полученного раствора в двух повторностях в 6 пробирок (3 реагирующих раствора и 3 корректирующих раствора).

Растворы сравнения. 0,150 г ацетилхолина хлорида *Р* растворяют в 10 мл *воды Р* (основной раствор, содержащий 15 г/л ацетилхолина хлорида). Непосредственно перед использованием 1 мл основного раствора доводят *водой Р* до объема 50 мл (рабочая концентрация 1:300 мкг/мл ацетилхолина хлорида). Непосредственно перед использованием 1 мл основного раствора доводят *водой Р* до объема 25 мл (рабочая концентрация 2:600 мкг/мл ацетилхолина хлорида). Помещают по 0,1 мл и 0,4 мл рабочей концентрации 1 в двух повторностях (реагирующий и корректирующий растворы) в 4 пробирки и по 0,6 мл и 1,0 мл рабочей концентрации 2 в двух повторностях (реагирующий и корректирующий растворы) в другие 4 пробирки.

Готовят контрольный раствор, используя 1 мл *воды Р*.

Объем в каждой пробирке доводят *водой Р* до 1 мл. Прибавляют 1,0 мл 4 *М* раствора кислоты хлористоводородной в каждую из корректирующих пробирок и в контрольный раствор. Прибавляют 2,0 мл раствора гидроксилamina щелочного *Р* в каждую пробирку. Выдерживают в течение ровно 2 мин для протекания реакции и прибавляют в каждую из пробирок с реагирующим раствором 1,0 мл 4 *М* раствора кислоты хлористоводородной. В каждую пробирку прибавляют 1,0 мл раствора 100 г/л железа хлорида *Р* в 0,1 *М* растворе кислоты хлористоводородной, закрывают пробирки пробками и сильно встряхивают для удаления пузырьков.

Измеряют оптическую плотность (2.2.25) каждого раствора при длине волны 540 нм, используя в качестве компенсационного раствора контрольный раствор. Для каждого реагирующего раствора вычитают оптическую плотность соответствующего корректирующего раствора.

Строят градуировочный график на основании скорректированных оптических плотностей для 4 растворов сравнения и соответствующего содержания ацетилхолин хлорида и с его помощью определяют содержание ацетилхолина хлорида в испытуемом растворе для каждого исследуемого объема. Рассчитывают среднее по трем значениям.

1 моль ацетилхолина хлорида (181,7 г) соответствует 1 моль *О*-ацетила (43,05 г).

01/2013:20520

2.5.20. ГЕКСОЗАМИНЫ В ПОЛИСАХАРИДНЫХ ВАКЦИНАХ

Испытуемый раствор. Используют мерную колбу необходимого объема для приготовления раствора, содержащего около 5 мг/мл сухого полисахарида. Количественно переносят содержимое контейнера в мерную колбу и доводят *водой Р* до метки. Разводят раствор так, чтобы объемы, используемые в опыте, содержали от 125 мкг до 500 мкг глюкозамина (гексозамина). Помещают 1,0 мл полученного раствора в градуированную пробирку.

Растворы сравнения. 60 мг глюкозамина гидрохлорида *Р* растворяют в 100 мл *воды Р* (основной раствор, содержащий 0,500 г/л глюкозамина). Помещают по 0,25 мл, 0,50 мл, 0,75 мл, и 1,0 мл рабочей концентрации в 4 градуированные пробирки.

Готовят контрольный раствор, используя 1 мл *воды Р*.

Объем в каждой пробирке доводят *водой Р* до 1 мл. В каждую пробирку прибавляют 1 мл раствора (292 г/л) кислоты хлористоводородной *Р*. Закрывают пробирки пробками, выдерживают в водяной бане в течение 1 ч и охлаждают до комнатной температуры. В каждую пробирку прибавляют 0,05 мл раствора 5 г/л тимолфталеина *Р* в спирте *Р*. Прибавляют раствор 200 г/л натрия гидроксида *Р* до появления голубого окрашивания, а затем раствор 1 *М* кислоты хлористоводородной до обесцвечивания раствора. Объем в каждой пробирке доводят *водой Р* до 10 мл (нейтрализованные гидролизаты).

Во вторую серию градуированных пробирок объемом 10 мл помещают по 1 мл каждого нейтрализованного гидролизата. В каждую пробирку прибавляют по 1 мл

ацетилацетонового реактива (приготовленная непосредственно перед использованием смесь из 1 объема *ацетилацетона Р* и 50 объемов раствора 53 г/л *натрия карбоната безводного Р*). Закрывают пробирки пробками и выдерживают в водяной бане при температуре 90 °С в течение 45 мин. Охлаждают до комнатной температуры. В каждую пробирку прибавляют по 2,5 мл *спирта Р* и по 1,0 мл раствора диметиламинобензальдегида (непосредственно перед использованием растворяют 0,8 г *диметиламинобензальдегида Р* в 15 мл *спирта Р* и прибавляют 15 мл *кислоты хлористоводородной Р*) и доводят объем в каждой пробирке *спиртом Р* до 10 мл. Пробирки закрывают, содержимое перемешивают, переворачивая пробирки, и выдерживают в темном месте в течение 90 мин. Измеряют оптическую плотность (2.2.25) каждого раствора при длине волны 530 нм, используя контрольный раствор в качестве компенсационного раствора.

Строят градуировочный график на основании оптических плотностей для 4 растворов сравнения и соответствующего содержания гексозамина и с его помощью определяют содержание гексозамина в испытуемом растворе.

01/2013:20521

2.5.21. МЕТИЛПЕНТОЗЫ В ПОЛИСАХАРИДНЫХ ВАКЦИНАХ

Испытуемый раствор. Используют мерную колбу необходимого объема для приготовления раствора, содержащего около 5 мг/мл сухого полисахарида. Количественно переносят содержимое контейнера в мерную колбу и доводят *водой Р* до метки. Разводят раствор так, чтобы объемы, используемые в опыте, содержали от 2 мкг до 20 мкг рамнозы (метилпентозы). Помещают по 0,25 мл, 0,50 мл и 1,0 мл полученного раствора в 3 пробирки.

Растворы сравнения. 0,100 г *рамнозы Р* растворяют в 100 мл *воды Р* (основной раствор, содержащий 1 г/л метилпентозы). Непосредственно перед использованием 1 мл основного раствора доводят *водой Р* до объема 50 мл (рабочая концентрация: 20 мг/л метилпентозы). В 5 пробирок помещают по 0,10 мл, 0,25 мл, 0,50 мл, 0,75 мл и 1,0 мл рабочей концентрации.

Готовят контрольный раствор с использованием 1 мл *воды Р*.

Объем в каждой пробирке доводят *водой Р* до 1 мл. Пробирки помещают в ледяную воду, прибавляют по каплям при постоянном помешивании по 4,5 мл охлажденной смеси, состоящей из 1 объема *воды Р* и 6 объемов *кислоты серной Р*. Пробирки нагревают до комнатной температуры и выдерживают на водяной бане в течение нескольких минут. Охлаждают до комнатной температуры. В каждую пробирку прибавляют по 0,10 мл приготовленного непосредственно перед применением раствора 30 г/л *цистеина гидрохлорида Р*. Встряхивают и выдерживают в течение 2 ч.

Измеряют оптическую плотность (2.2.25) каждого раствора при длинах волн 396 нм и 430 нм, используя контрольный раствор в качестве компенсационного раствора. Для каждого раствора рассчитывают разницу между оптической плотностью, измеренной при длине волны 396 нм, и оптической плотностью, измеренной при длине волны 430 нм.

Строят градуировочный график на основании разницы оптических плотностей для 5 стандартных растворов и соответствующей концентрации метилпентозы и с его помощью определяют содержание метилпентозы в испытуемом растворе для каждого исследуемого объема. Рассчитывают среднее по трем значениям.

01/2013:20522

2.5.22. УРОНОВЫЕ КИСЛОТЫ В ПОЛИСАХАРИДНЫХ ВАКЦИНАХ

Испытуемый раствор. Используют мерную колбу необходимого объема для приготовления раствора, содержащего около 5 мг/мл сухого полисахарида. Количественно переносят содержимое контейнера в мерную колбу и доводят *водой Р* до метки. Разводят раствор так, чтобы объемы, используемые в опыте, содержали от 4 мкг до 40 мкг глюкоуроновой кислоты (уроновых кислот). Помещают по 0,25 мл, 0,50 мл и 1,0 мл полученного раствора в 3 пробирки.

Растворы сравнения. 50 мг натрия глюкуроната *P* растворяют в 100 мл воды *P* (основной раствор: содержит 0,4 г/л глюкуроновой кислоты). Непосредственно перед использованием 5 мл основного раствора разводят водой *P* до объема 50 мл (рабочая концентрация: 40 мг/л глюкуроновой кислоты). В 5 пробирок помещают по 0,10 мл, 0,25 мл, 0,50 мл, 0,75 мл, и 1,0 мл рабочей концентрации.

Готовят контрольный раствор с использованием 1 мл воды *P*.

Доводят водой *P* объем в каждой пробирке до 1 мл. Помещают пробирки в ледяную воду и при постоянном перемешивании по каплям прибавляют в каждую пробирку по 5,0 мл боратного раствора *P*. Закрывают пробирки пробками и выдерживают в водяной бане в течение 15 мин. Охлаждают до комнатной температуры. В каждую пробирку добавляют по 0,20 мл раствора 1,25 г/л карбазола *P* в этаноле *P*. Закрывают пробирки пробками и выдерживают в водяной бане в течение 15 мин. Охлаждают до комнатной температуры. Измеряют оптическую плотность (2.2.25) каждого раствора при длине волны 530 нм, используя контрольный раствор в качестве компенсационного раствора.

Строят градуировочный график оптических плотностей для 5 стандартных растворов и соответствующих концентраций глюкуроновой кислоты и определяют содержание глюкуроновой кислоты в испытуемом растворе для каждого исследуемого объема. Рассчитывают среднее по трем значениям.

01/2013:20523

2.5.23. СИАЛОВАЯ КИСЛОТА В ПОЛИСАХАРИДНЫХ ВАКЦИНАХ

Испытуемый раствор. Используют мерную колбу необходимого объема для приготовления раствора, содержащего около 250 мкг/мл сухого полисахарида. Количественно переносят содержимое одного или нескольких контейнеров в мерную колбу и доводят водой *P* до метки. 4,0 мл полученного раствора переносят с помощью шприца в ультрафильтрационную кювету вместимостью 10 мл, пропускающую молекулы с относительной молекулярной массой менее 50 000. Дважды промывают шприц водой *P* и промывную жидкость тоже переносят в ультрафильтрационную кювету. Проводят ультрафильтрацию при постоянном перемешивании в присутствии азота *P* под давлением около 150 кПа. Наполняют кювету водой *P* каждый раз, когда объем жидкости в ней уменьшается до 1 мл, до тех пор, пока не профильтруется 200 мл, а оставшийся в кювете объем не будет составлять около 2 мл. Используя шприц, переносят оставшуюся жидкость в мерную колбу вместимостью 10 мл. Кювету трижды промывают водой *P* порциями по 2 мл. Смывную жидкость переносят в ту же мерную колбу и доводят водой *P* до объема 10,0 мл (испытуемый раствор). В две пробирки помещают по 2,0 мл испытуемого раствора.

Растворы сравнения. Используют растворы сравнения, указанные в частной статье.

Готовят две серии из 3 пробирок. В пробирки каждой серии помещают 0,5 мл, 1,0 мл и 1,5 мл раствора сравнения, соответствующего типу вакцины, предназначенной для исследования, и объем в каждой пробирке доводят водой *P* до 2 мл. Готовят контрольный раствор с использованием воды *P* по 2,0 мл в двух пробирках.

В каждую пробирку прибавляют по 5,0 мл резорцина реактива *P*. Нагревают при температуре 105 °С в течение 15 мин, охлаждают в холодной воде и помещают в баню с ледяной водой. Во все пробирки прибавляют 5 мл спирта изоамилового *P*, тщательно перемешивают и выдерживают в ледяной воде в течение 15 мин. Центрифугируют пробирки и держат их в ледяной воде до проведения исследования методом абсорбционной спектрофотометрии. Измеряют оптическую плотность (2.2.25) надосадочной жидкости при 580 нм и 450 нм, используя спирт изоамиловый *P* в качестве компенсационного раствора. Для каждой длины волны рассчитывают оптическую плотность как среднее значений, полученных в двух идентичных растворах. Вычитают среднее значение для контрольного раствора из средних значений, полученных для других растворов.

Строят график зависимости разницы между оптическими плотностями при 580 нм и 450 нм стандартных растворов от содержания *N*-ацетилнейраминовой кислоты и с его помощью определяют содержание *N*-ацетилнейраминовой кислоты (сиаловой кислоты) в испытуемом растворе.

2.5.24. УГЛЕРОДА ДИОКСИД В ГАЗАХ

Газы поглощают свет при единственных характерных длинах волн. Это широко используемое свойство газов позволяет проводить высокоселективное измерение их концентрации.

Описание и принцип измерения. Концентрация углерода диоксида в других газах определяется с помощью инфракрасного анализатора.

Инфракрасный анализатор главным образом состоит из источника широкополосного инфракрасного излучения, оптического устройства, ячейки для испытуемого образца и детектора. Оптическое устройство, размещаемое либо перед ячейкой для испытуемого образца, либо за ней, состоит из одного или нескольких оптических фильтров, через которые проходит широкополосное инфракрасное излучение. В данном случае используют оптическое устройство для определения углерода диоксида. Измеряемый световой пучок проходит через ячейку с испытуемым образцом и ячейку сравнения, если анализатор таковой оборудован (в некоторых приборах вместо ячейки сравнения используется электронная система).

Если в ячейке с испытуемым образцом присутствует углерода диоксид, происходит поглощение энергии измеряемого светового пучка в соответствии с законом Бугера-Ламберта-Бера, что приводит к изменению сигнала детектора. Измеренный сигнал сравнивается с сигналом сравнения и на выходе образуется сигнал, отражающий содержание углерода диоксида. Выходной сигнал линеаризируется таким образом, чтобы получить концентрацию углерода диоксида. Для предотвращения попадания на датчики твердых частиц, приводящих к явлению светорассеяния, прибор снабжается подходящим фильтром.

Требования к техническим характеристикам. Для определения предельных содержаний инфракрасный анализатор должен выдерживать следующие требования:

– *предел обнаружения*: (обычно определяемый по отношению сигнал/шум более 2) не более 20 % от максимально допустимой концентрации;

– *повторяемость*: относительное стандартное отклонение для максимально допустимой концентрации не более 10 %, определенное на шести повторных определениях;

– *линейность*: не более 10 % от максимально допустимой концентрации.

Требования к техническим характеристикам должны выдерживаться и в присутствии примесей других газов в испытуемом образце.

01/2013:20525

2.5.25. УГЛЕРОДА МОНООКСИД В ГАЗАХ

МЕТОД I

Прибор. Прибор (рисунок 2.5.25.-1) состоит из следующих частей, соединенных последовательно:

– U-образная трубка (U_1), содержащая *безводный силикагель Р*, пропитанный *хрома (VI) оксидом Р*;

– промывочная емкость (F_1), содержащая 100 мл раствора 400 г/л *калия гидроксида Р*;

– U-образная трубка (U_2), содержащая шарики *калия гидроксида Р*;

– U-образная трубка (U_3), содержащая *фосфора (V) оксид Р*, распределенный на предварительно гранулированную плавленную пемзу;

– U-образная трубка (U_4), содержащая 30 г *йода (V) оксида перекристаллизованного Р* в гранулах, предварительно высушенного при температуре 200 °С и поддерживаемого при температуре 120 °С (T) во время испытания. Йода (V) оксид упакован в трубке в односантиметровые столбики, разделенные односантиметровыми столбиками стекловаты для достижения эффективной длины 5 см;

– реакционная трубка (F_2), содержащая 2,0 мл *раствора калия йодида Р* и 0,15 мл *раствора крахмала Р*.

Методика. 5,0 л *аргона Р* пропускают через аппарат и при необходимости обесцвечивают голубой цвет йодного раствора, прибавляя минимально необходимое количество свежеприготовленного 0,002 М раствора натрия тиосульфата. Газ продолжают пропускать до тех пор, пока после прохождения 5,0 л *аргона Р* для обесцвечивания йодного раствора будет требоваться не более 0,045 мл 0,002 М раствора натрия тиосульфата. Испытуемый газ пропускают из цилиндра через аппарат, учитывая указанные в частной статье объем и скорость потока. Остатки выделившегося йода в реакционной пробирке извлекают, пропустив через аппарат 1,0 л *аргона Р*. Выделившийся йод титруют 0,002 М раствором натрия тиосульфата. Проводят контрольный опыт, используя одинаковый объем *аргона Р*. Разница между объемами 0,002 М раствора натрия тиосульфата, использованного при титрованиях, не должна превышать указанное в частной статье значение.

МЕТОД II

Газы поглощают свет при единственных характерных длинах волн. Это широко используемое свойство газов позволяет проводить высокоселективное измерение их концентрации.

Описание и принцип измерения. Концентрация углерода монооксида в других газах определяется с помощью инфракрасного анализатора.

Инфракрасный анализатор главным образом состоит из источника широкополосного инфракрасного излучения, оптического устройства, ячейки для испытуемого образца и детектора. Оптическое устройство, размещаемое либо перед ячейкой для испытуемого образца, либо за ней, состоит из одного или нескольких оптических фильтров, через которые проходит широкополосное инфракрасное излучение. В данном случае используют оптическое устройство для определения углерода монооксида. Измеряемый световой пучок проходит через ячейку с испытуемым образцом и ячейку сравнения, если анализатор таковой оборудован (в некоторых приборах вместо ячейки сравнения используется электронная система).

Если в ячейке с испытуемым образцом присутствует углерода монооксид, происходит поглощение энергии измеряемого светового пучка в соответствии с законом Бугера-Ламберта-Бера, что приводит к изменению сигнала детектора. Измеренный сигнал сравнивается с сигналом сравнения и на выходе образуется сигнал, отражающий содержание углерода монооксида. Выходной сигнал линеаризируется таким образом, чтобы получить концентрацию углерода монооксида. Для предотвращения попадания на датчики твердых частиц, приводящих к явлению светорассеяния, прибор снабжается подходящим фильтром.

Требования к техническим характеристикам. Для определения предельных содержаний инфракрасный анализатор должен выдерживать следующие требования:

- *предел обнаружения*: (обычно определяемый по отношению сигнал/шум более 2) не более 20 % от максимально допустимой концентрации;

- *повторяемость*: относительное стандартное отклонение для максимально допустимой концентрации не более 10 %, определенное на шести повторных определениях;

- *линейность*: не более 10 % от максимально допустимой концентрации.

Требования к техническим характеристикам должны выдерживаться и в присутствии примесей других газов в испытуемом образце.

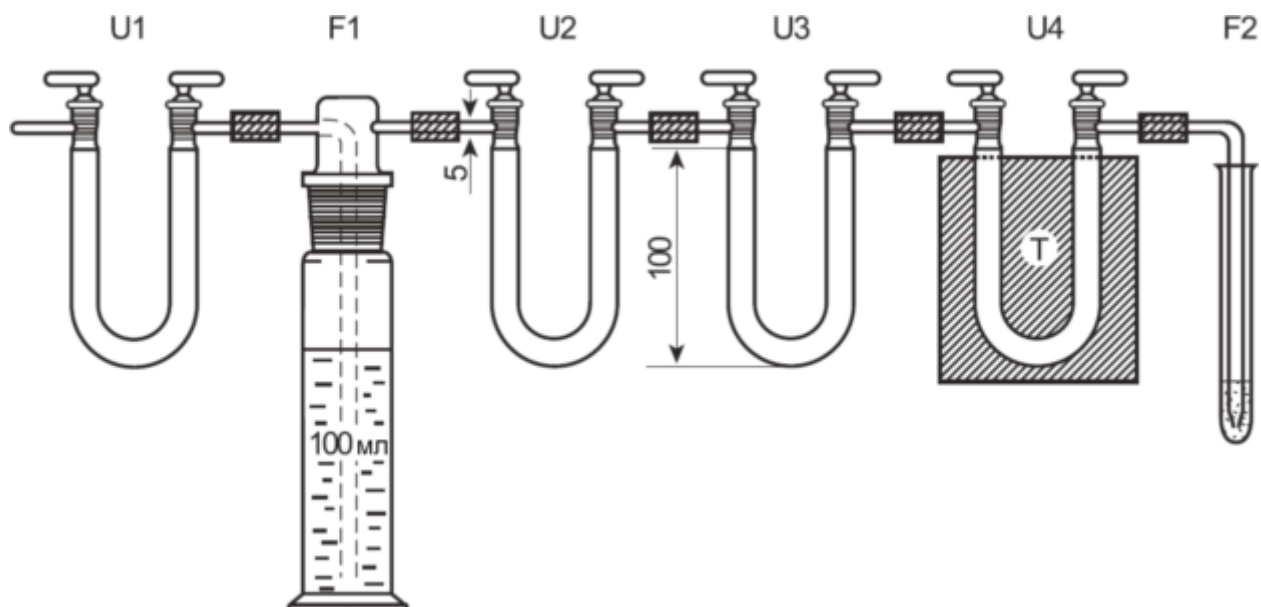


Рисунок 2.5.25.-1. Прибор для определения углерода монооксида (размеры указаны в миллиметрах)

01/2013:20526

2.5.26. АЗОТА МОНООКСИД И АЗОТА ДИОКСИД В ГАЗАХ

Азота монооксид и азота диоксид в газах определяется хемилюминесцентным анализатором (рисунок 2.5.26.-1).

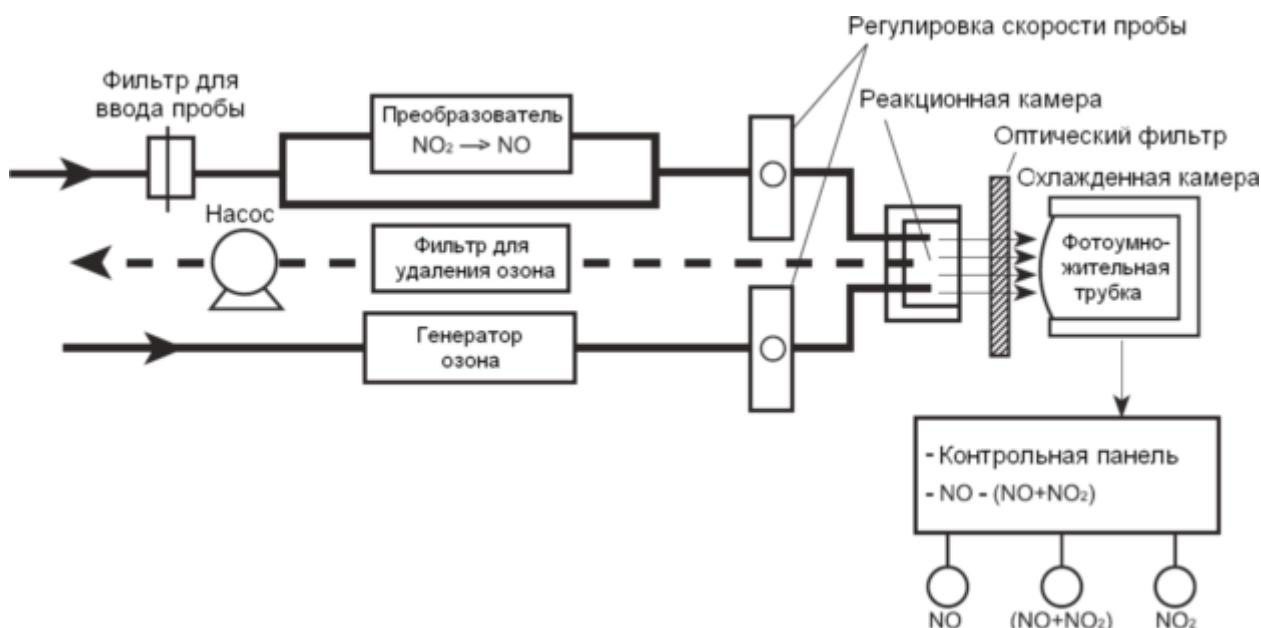


Рисунок 2.5.26.-1. Хемилюминесцентный анализатор

Конструкция аппарата включает в себя:

- устройство для фильтрования, проверки и контроля скорости потока испытуемого газа;
- преобразователь, восстанавливающий азота диоксид в азота монооксид для определения суммарного содержания азота монооксида и азота диоксида; перед использованием необходимо проверить эффективность преобразователя;
- генератор озона с контролем скорости потока; озон производится высоковольтными электрическими разрядами между двумя электродами; в генератор озона подается чистый кислород или безводный воздух окружающей среды, а концентрация озона должна намного превышать максимальное содержание всех определяемых оксидов азота;

- камеру, в которой взаимодействуют азота монооксид с озоном;
- систему определения слабого излучения при длине волны 1,2 мкм, состоящую из селективного оптического фильтра и фотоумножительной трубки.

01/2013:20527

2.5.27. КИСЛОРОД В ГАЗАХ

Кислород в газах определяется с помощью парамагнитного анализатора.

Принцип метода основан на высокой парамагнитной чувствительности молекулы кислорода. Кислород проявляет сильное взаимодействие с магнитными полями. Это взаимодействие измеряется количеством электричества, зависящим от величины содержания кислорода. Измерения концентрации кислорода зависят от давления и температуры, и, если анализатор автоматически не реагирует на изменения температуры и давления, необходимо произвести градуировку прибора непосредственно перед самым использованием. Поскольку парамагнитный эффект кислорода имеет линейный характер, прибор должен позволять проводить измерения в подходящем диапазоне с возможностью считывания показаний до 0,1 % и ниже.

Градуировка прибора. Градуировка производится следующим образом:

- устанавливают нулевой уровень, пропуская через прибор *азот P1* до получения постоянных показателей;

- устанавливают шкалу на 100 % пропуская через прибор *кислород P* со скоростью потока, аналогичной используемой для *азота P1*, до получения постоянных показателей.

Количественное определение. Пропускают испытуемый газ через прибор с постоянной скоростью потока до получения стабильных показателей. Записывают концентрацию кислорода в испытуемом газе.

01/2013:20528

2.5.28. ВОДА В ГАЗАХ

Вода в газах определяется с помощью электролитического гигрометра, описанного ниже.

Измерительная камера состоит из тонкой пленки фосфора (V) оксида, расположенной между 2 платиновыми проводами в качестве электродов. Водный пар в испытуемом газе поглощается фосфора (V) оксидом, который преобразуется в фосфорную кислоту, являющуюся электрическим проводником. Постоянное напряжение вокруг электродов вызывает электролиз воды и регенерацию фосфора (V) оксида. Затем измеряется возникающий электрический ток, который пропорционален содержанию воды в испытуемом газе. Данная система является самокалибрующей, поскольку она соответствует закону Фарадея.

Берут образец испытуемого газа и оставляют его для уравнивания при комнатной температуре. Постоянно пропускают газ через камеру, пока не получают стабильные показатели. Измеряют содержание воды в испытуемом газе. Необходимо следить, чтобы в течение всего периода работы прибора температура была постоянной.

01/2013:20529

2.5.29. СЕРЫ ДИОКСИД

В колбу (A) вливают 150 мл *воды P* (рисунок 2.5.29.-1) и через всю систему пропускают *углерода диоксид P* в течение 15 мин со скоростью 100 мл/мин. К 10 мл *раствора водорода пероксида разведенного P* прибавляют 0,15 мл раствора 1 г/л *бромфенолового синего P* в *спирте P* (20 %, об/об). Затем прибавляют 0,1 М *раствор натрия гидроксида P* до появления фиолетово-синего оттенка. Раствор помещают в пробирку (D). Не прерывая поток диоксида углерода, снимают воронку (B) и через

образовавшееся отверстие вводят в колбу (А) 25,0 г испытуемого образца при помощи 100 мл *воды Р*. Через воронку прибавляют 80 мл *кислоты хлористоводородной разведенной Р* и кипятят в течение 1 ч. Открывают пробку воронки и останавливают поток диоксида углерода, а также нагревание и охлаждение воды. Переносят содержимое пробирки с небольшим количеством *воды Р* в коническую колбу вместимостью 200 мл с широким горлом. Колбу нагревают на водяной бане в течение 15 мин и выдерживают до охлаждения. Прибавляют 0,1 мл раствора 1 г/л *бромфенолового синего Р* в *спирте Р* (20 %, об/об) и титруют 0,1 М *раствором натрия гидроксида* до изменения цвета с желтого на фиолетово-синий (V_1 , мл).

Параллельно проводят контрольный опыт (V_2 , мл).

Содержание серы диоксида в частях на миллион рассчитывают по формуле:

$$32\,030 \cdot (V_1 - V_2) \cdot \frac{n}{m},$$

где:

n – молярность раствора натрия гидроксида, использованного в качестве титранта.

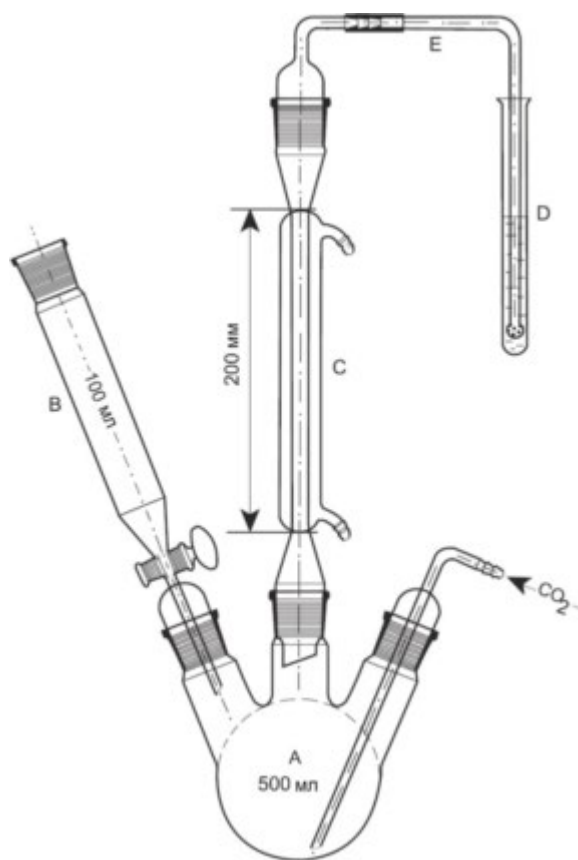


Рисунок 2.5.29.-1. Прибор для определения серы диоксида

01/2013:20530

2.5.30. ОКИСЛЯЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА

В коническую колбу с притертой пробкой вместимостью 125 мл вносят 4,0 г испытуемого образца и прибавляют 50,0 мл *воды Р*. Закрывают пробкой и взбалтывают в течение 5 мин. Переносят содержимое в центрифужную пробирку вместимостью 50 мл с притертой пробкой и центрифугируют. 30 мл прозрачной надосадочной жидкости переносят в коническую колбу вместимостью 125 мл с притертой пробкой, прибавляют 1 мл *кислоты уксусной ледяной Р* и от 0,5 г до 1,0 г *калия йодида Р*. Закрывают пробкой, взбалтывают и выдерживают в течение 25–30 мин в темном месте. Прибавляют 1 мл

раствора крахмала *P* и титруют 0,002 *M* раствором натрия тиосульфата до исчезновения окраски.

Параллельно проводят контрольный опыт. На титрование расходуется не более 1,4 мл 0,002 *M* раствора натрия тиосульфата (0,002 % в пересчете на H₂O₂).

1 мл 0,002 *M* раствора натрия тиосульфата соответствует 34 мкг окисляющих веществ в пересчете на водорода пероксид.

01/2013:20531

2.5.31. РИБОЗА В ПОЛИСАХАРИДНЫХ ВАКЦИНАХ

Испытуемый раствор. Для приготовления раствора, содержащего около 5 мг/мл сухого полисахарида, используют мерную колбу необходимого объема. Количественно переносят содержимое контейнера в мерную колбу и доводят водой *P* до метки. Разводят раствор так, чтобы объемы, используемые в опыте, содержали от 2,5 мкг до 25 мкг рибозы. Помещают по 0,20 мл и по 0,40 мл полученного раствора в пробирки в трех повторностях.

Растворы сравнения. 25 мг рибозы *P* растворяют в воде *P* и доводят до объема 100,0 мл этим же растворителем (основной раствор: 0,25 г/л рибозы). Непосредственно перед использованием 1 мл основного раствора доводят водой *P* до объема 10,0 мл (рабочая концентрация: 25 мг/л рибозы). Помещают 0,10 мл, 0,20 мл, 0,40 мл, 0,60 мл, 0,80 мл и 1,0 мл рабочей концентрации в шесть пробирок.

Готовят контрольный раствор с использованием 2 мл воды *P*.

Доводят объем в каждой пробирке водой *P* до 2 мл. Встряхивают. Прибавляют в каждую пробирку 2 мл раствора 0,5 г/л железа хлорида *P* в кислоте хлористоводородной *P* и встряхивают. Прибавляют 0,2 мл раствора 100 г/л орцина *P* в этаноле *P*. Пробирки выдерживают в водяной бане в течение 20 мин. Охлаждают в ледяной воде. Измеряют оптическую плотность (2.2.25) каждого раствора при длине волны 670 нм, используя контрольный раствор в качестве компенсационного раствора. На основании показателей 6 растворов сравнения и соответствующего содержания рибозы строят градуировочный график и с его помощью определяют содержание рибозы в испытуемом растворе для каждого объема. Рассчитывают среднее по трем значениям.

01/2013:20532

2.5.32. ВОДА: МИКРООПРЕДЕЛЕНИЕ

ПРИНЦИП

Кулонометрическое титрование воды основано на количественной реакции воды с сернистым газом и йодом в безводной среде в присутствии основания с большой буферной емкостью. В отличие от объемного метода (2.5.12), йод получается электрохимическим способом в реакторной камере. Йод, получаемый на аноде, сразу взаимодействует с водой и диоксидом серы, содержащимися в реакторной камере. Количество воды в веществе прямо пропорционально количеству электричества, выделенного до конечного результата титрования. Конечная точка титрования определяется по появлению избытка йода после того, как расходуется вся вода, присутствующая в реакторной камере. Один моль йода соответствует одному моль воды, а количество электричества 10,71 Кл соответствует 1 мг воды.

Вода удаляется из системы предварительным электролизом. Индивидуальные определения могут выполняться последовательно в том же растворе реагента при выполнении следующих условий:

- каждый компонент испытуемой смеси совместим с другими компонентами;
- других реакций не происходит;
- объем и емкость воды электролитического реагента достаточны.

Кулонометрическое титрование ограничено количественным определением малых объемов воды (рекомендуется от 10 мкг до 10 мг).

Точность метода предопределяется степенью, до которой атмосферная влажность исключается из системы. Система должна контролироваться измерением количества базового отклонения.

ПРИБОР

Прибор состоит из реакторной камеры, электродов и магнитной мешалки. Реакторная камера состоит из большого анодного отдела и меньшего катодного отдела. В зависимости от конструкции электрода оба отделения могут быть разделены диафрагмой. Каждое отделение содержит платиновый электрод. Жидкость или растворенные образцы вводятся через септу при помощи шприца. В качестве альтернативы может использоваться техника выпаривания, при которой проба нагревается в трубке (печке) и вода выпаривается и переносится в реакторную камеру потоком сухого инертного газа. Следует избегать попадания в камеру твердых образцов. Однако, если существует такая необходимость, используют герметично закрывающееся отверстие; при этом для предотвращения попадания атмосферной влаги должны быть приняты меры предосторожности, такие как, например, работа в защитной камере с перчатками в атмосфере сухого инертного газа. Процесс анализа должен контролироваться с помощью электронного приспособления, которое также показывает и результаты.

МЕТОД

Отделение реакторной камеры заполняют *электролитическим реактивом для микроопределения воды Р* в соответствии с инструкциями производителя и выполняют кулонометрическое титрование до получения стабильного результата. В реакторную камеру вносят соответствующее количество испытуемого образца, перемешивают в течение 30 с, если в частной статье не указано иное, и снова титруют до получения стабильного результата. В случае использования печи необходимое количество образца вносят в трубку и нагревают. После выпаривания воды из образца в титрующую камеру проводят титрование. Записывают показания прибора и, при необходимости, рассчитывают процентный состав или количество воды, присутствующее в образце. При необходимости, когда этого требует тип образца или его пробоподготовка, проводят контрольный опыт.

ПОДТВЕРЖДЕНИЕ ТОЧНОСТИ

Между двумя последовательными титрованиями образца вносят тщательно взвешенное количество *воды Р* или *стандартного раствора для микроопределения воды Р* того же порядка, что и в образце, и производят кулонометрическое титрование. Степень открываемости должна быть в диапазоне от 97,5 % до 102,5 % для навески 1000 мкг H_2O и в диапазоне от 90,0 % до 110,0 % для навески 100 мкг H_2O .

01/2013:20533

2.5.33. ОБЩИЙ БЕЛОК

Многие из методов анализа, которые описаны в данном разделе, могут выполняться с использованием коммерчески доступных наборов.

МЕТОД 1

Белок в растворе поглощает ультрафиолетовый свет при длине волны 280 нм благодаря присутствию в его структуре ароматических аминокислот, главным образом тирозина и триптофана. Это свойство белков может использоваться в целях их количественного определения. Если буферный раствор, используемый для разведения белка, имеет большую оптическую плотность относительно плотности воды, в нем присутствует мешающее вещество. Этот мешающий эффект можно устранить, используя буферный раствор в качестве компенсационного раствора, однако, если мешающее вещество имеет высокую оптическую плотность, результаты могут быть подвергнуты сомнению. При низких концентрациях белок может сорбироваться на кювете, что приводит

к существенному занижению концентрации его в растворе. Этого можно избежать, готовя образцы с высокой концентрацией или используя детергенты неионного характера.

Испытуемый раствор. Необходимое количество испытуемого образца растворяют в указанном в частной статье буферном растворе для получения раствора с концентрацией белка в диапазоне от 0,2 мг/мл до 2 мг/мл.

Раствор сравнения. Готовят раствор стандартного образца, предназначенного для определения белка, в том же буферном растворе и той же концентрации, что и у испытуемого раствора.

Методика. Во время выполнения данного исследования испытуемый раствор, раствор сравнения и компенсационный раствор хранят при одинаковой температуре. Определяют оптические плотности (2.2.25) испытуемого раствора и раствора сравнения в кварцевой кювете при длине волны 280 нм, используя указанный буферный раствор в качестве компенсационного раствора. Отклик должен быть линейным в диапазоне концентраций определяемого белка.

Рассеяние света. Точность определения белка может быть снижена из-за светорассеяния раствором испытуемого образца. Если белок в растворе присутствует в виде частиц, сопоставимых по размерам с длиной волны используемого света (от 250 нм до 300 нм), рассеяние светового потока приводит к значительному увеличению оптической плотности испытуемого образца. Чтобы рассчитать оптическую плотность при длине волны 280 нм с учетом светорассеяния, определяют оптическую плотность испытуемого раствора при 320 нм, 325 нм, 330 нм, 335 нм, 340 нм, 345 нм и 350 нм. Строят график зависимости логарифма оптической плотности от логарифма длины волны и с помощью линейной регрессии находят кривую, наилучшим образом совпадающую с нанесенными точками. Для определения логарифма оптической плотности при 280 нм экстраполируют полученную кривую. Антилогарифмом данного значения является оптическая плотность, характеризующая светорассеяние. Для получения оптической плотности белка в растворе вычитают оптическую плотность, характеризующую светорассеяние, из общей оптической плотности, измеренной при длине волны 280 нм. Для снижения эффекта светорассеяния могут применяться фильтрование с использованием не поглощающего белок фильтра с размером пор 0,2 мкм или осветление центрифугированием, особенно в случае явной мутности раствора.

Расчеты. Для расчетов используют откорректированные значения оптической плотности. Рассчитывают концентрацию белка в испытуемом растворе (C_U) по уравнению:

$$C_U = C_S(A_U / A_S),$$

где:

C_S – концентрация белка в растворе сравнения;

A_U и A_S – откорректированные значения оптических плотностей испытуемого раствора и раствора сравнения соответственно.

МЕТОД 2

Данный метод (обычно называемый методом Лоури) основан на восстановлении белком хромогена (смешанной кислоты фосфорномолибденово-вольфрамовой) в фосфорномолибденово-вольфрамовом реактиве, что приводит к появлению максимума оптической плотности при длине волны 750 нм. Фосфорномолибденово-вольфрамовый реактив реагирует преимущественно с остатками тирозина. Развитие окраски достигает своего максимума через 20–30 мин при комнатной температуре, после чего происходит постепенное обесцвечивание. Поскольку данный метод является чувствительным к мешающим веществам, можно использовать процедуру для осаждения белка из испытуемого образца. Большинство мешающих веществ вызывают ослабление окрашивания, хотя применение некоторых детергентов может вызывать усиление цвета. Высокая концентрация солей может приводить к образованию осадка. Поскольку различные белки могут давать цветные реакции различной интенсивности, стандартный образец и испытуемый белок должны быть одинаковыми. В тех случаях, когда необходимо отделение мешающих веществ от белка в испытуемом образце, перед тем как приготовить

испытуемый раствор используют процедуру удаления мешающих веществ, описанную ниже. Эффект мешающих веществ может быть минимизирован с помощью разведения, обеспечивающего концентрацию испытуемого белка на уровне, достаточном для проведения точных измерений.

Для приготовления всех реактивов и буферных растворов, применяемых в данном методе, используют *воду дистиллированную Р*.

Испытуемый раствор. Достаточное количество испытуемого образца растворяют в указанном в частной статье буферном растворе для получения раствора с концентрацией в пределах интервала стандартного графика. При использовании указанного буферного раствора приготовленный раствор имеет рН от 10,0 до 10,5.

Растворы сравнения. Стандартный образец, предназначенный для определения белка, растворяют в указанном в частной статье буферном растворе. Полученный раствор разводят тем же буферным раствором, чтобы получить не менее пяти растворов сравнения с концентрациями белка, равномерно распределенными в необходимом диапазоне в интервале от 5 мкг/мл до 100 мкг/мл.

Контрольный раствор. Используют буферный раствор, используемый для приготовления испытуемого раствора и растворов сравнения.

Реактив меди сульфата. 100 мг *меди (II) сульфата Р* и 0,2 г *натрия тартрата Р* растворяют в *воде дистиллированной Р* и доводят до объема 50 мл этим же растворителем. 10 г *натрия карбоната безводного Р* растворяют в *воде дистиллированной Р* и доводят до объема 50 мл этим же растворителем. Медленно при перемешивании вливают раствор натрия карбоната в раствор меди сульфата. Раствор используют в течение 24 ч.

Реактив щелочной меди. Смешивают 1 объем реактива меди сульфата, 2 объема раствора 50 г/л *натрия додецилсульфата Р* и 1 объем раствора 32 г/л *натрия гидроксида Р*. Хранят при комнатной температуре и используют в течение 2-х недель.

Разведенный фосформолибденово-вольфрамовый реактив. Смешивают 5 мл *фосформолибденово-вольфрамового реактива Р* и 55 мл *воды дистиллированной Р*. Хранят в контейнере из темного стекла при комнатной температуре.

Методика. К 1,0 мл каждого раствора сравнения, испытуемого раствора и контрольного раствора прибавляют по 1,0 мл реактива щелочной меди и перемешивают. Выдерживают в течение 10 мин. Прибавляют 0,5 мл разведенного фосформолибденово-вольфрамового реактива, перемешивают и выдерживают при комнатной температуре в течение 30 мин. Измеряют оптические плотности (2.2.25) растворов при длине волны 750 нм, используя контрольный раствор в качестве компенсационного раствора.

Расчеты. Зависимость оптической плотности от концентрации белка не является линейной; тем не менее, если диапазон концентраций, используемый для построения стандартного графика, невелик, он близок к линейности. Строят графическую зависимость оптических плотностей растворов сравнения от концентраций белка и используют линейную регрессию для построения стандартного графика. На основании стандартного графика и оптической плотности определяют концентрацию белка в испытуемом растворе.

Мешающие вещества. В представленной методике перед началом определения для удаления мешающих веществ с помощью осаждения белков к испытуемому образцу прибавляют дезоксихолево-трихлоруксусную кислоту. Данная методика также может быть применена для концентрирования белков из разведенного раствора.

0,1 мл раствора 1,5 г/л *натрия дезоксихолата Р* прибавляют к 1 мл раствора испытуемого образца. Используя вихревой встряхиватель (вортекс) перемешивают полученный раствор и выдерживают при комнатной температуре в течение 10 мин. Прибавляют 0,1 мл раствора 720 г/л *трихлоруксусной кислоты Р* и перемешивают, используя вихревой встряхиватель. Центрифугируют при ускорении 3000 g в течение 30 мин, декантируют и удаляют оставшуюся жидкость пипеткой. Повторно разводят полученный осадок в 1 мл реактива щелочной меди.

МЕТОД 3

Данный метод (известный как метод Бредфорда) основан на абсорбционном сдвиге с длины волны 470 нм до 595 нм, наблюдаемом при связывании белков с красителем кислотным синим 90. Краситель кислотный синий 90 наиболее активно связывает в белке

остатки аргинина и лизина, что может приводить к погрешности при исследовании различных белков. Белок, используемый в качестве стандартного образца, должен быть такими же, как и белок, взятый для испытания. Мешающих веществ относительно немного, однако следует избегать присутствия в испытуемом образце детергентов и амфолитов. Высокощелочные образцы могут взаимодействовать с кислотным реагентом.

Для приготовления всех реактивов и буферных растворов, применяемых в данном методе, используют *воду дистиллированную Р*.

Испытуемый раствор. Для получения раствора с концентрацией в пределах интервала стандартного графика растворяют достаточное количество испытуемого образца в указанном в частной статье буферном растворе.

Растворы сравнения. Стандартный образец, предназначенный для определения белка, растворяют в указанном в частной статье буферном растворе. Полученный раствор разводят тем же буферным раствором, чтобы получить не менее пяти растворов сравнения с концентрациями белка, равномерно распределенными в необходимом диапазоне в интервале от 0,1 мг/мл до 1 мг/мл.

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

Реактив кислотного синего 90. 0,10 г *кислотного синего 90 Р* растворяют в 50 мл 96 % *спирта Р*. Прибавляют 100 мл *кислоты фосфорной Р*, доводят *дистиллированной водой Р* до объема 1000 мл и перемешивают. Фильтруют раствор и хранят в контейнере из темного стекла при комнатной температуре. При хранении выпадает осадок красителя, поэтому перед использованием реактив необходимо фильтровать.

Методика. По 5 мл реактива кислотного синего 90 прибавляют к 0,100 мл каждого раствора сравнения, испытуемого раствора и контрольного раствора. Смешивают, при этом избегают образования пены, приводящей к ухудшению воспроизводимости. Измеряют оптические плотности (2.2.25) растворов сравнения и испытуемого раствора при длине волны 595 нм, используя контрольный раствор в качестве компенсационного раствора. Не следует использовать кварцевые (кремниевые) спектрофотометрические кюветы, поскольку с этим материалом связывается краситель.

Расчеты. Зависимость оптической плотности от концентрации белка не является линейной; тем не менее, если диапазон концентраций, используемый для построения стандартного графика, невелик, он близок к линейности. Строят графическую зависимость оптических плотностей растворов сравнения от концентраций белка и используют линейную регрессию для построения стандартного графика. На основании стандартного графика и оптической плотности определяют концентрацию белка в испытуемом растворе.

МЕТОД 4

Данный метод (известный как метод бицинхонинической кислоты или БХК, *BCA*) основан на восстановлении белком иона двухвалентной меди (Cu^{2+}) до иона одновалентной меди (Cu^{1+}). Реагент бицинхонинической кислоты применяется для определения иона одновалентной меди. Реакции мешают некоторые вещества. Их влияние может быть минимизировано с помощью разведения, обеспечивающего концентрацию исследуемого белка на уровне, достаточном для проведения точных измерений. Для удаления мешающих веществ также может быть использовано осаждение белка, описанное в методе 2. Поскольку различные белки могут давать цветные реакции различной интенсивности, стандартный образец и испытуемый белок должны быть одинаковыми.

Для приготовления всех реактивов и буферных растворов, применяемых в данном методе, используют *воду дистиллированную Р*.

Испытуемый раствор. Для получения раствора с концентрацией в пределах интервала стандартного графика растворяют достаточное количество испытуемого образца в указанном в частной статье буферном растворе.

Растворы сравнения. Стандартный образец, предназначенный для определения белка, растворяют в указанном в частной статье буферном растворе. Полученный раствор разводят тем же буферным раствором, чтобы получить не менее пяти растворов сравнения с концентрациями белка, равномерно распределенными в необходимом диапазоне в интервале от 10 мкг/мл до 1200 мкг/мл.

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

БХК реактив. 10 г *динатрия бицинхонината Р*, 20 г *натрия карбоната моногидрата Р*, 1,6 г *натрия тартрата Р*, 4 г *натрия гидроксида Р*, и 9,5 г *натрия гидрокарбоната Р* растворяют в *воде дистиллированной Р*. При необходимости доводят значение рН раствора до 11,25 раствором *натрия гидроксида Р* или раствором *натрия гидрокарбоната Р*, доводят *водой дистиллированной Р* до объема 1000 мл и перемешивают.

Медно-бицинхонинатовый реактив. Смешивают 1 мл раствора 40 г/л *меди сульфата Р* и 50 мл БХК реактива.

Методика. 0,1 мл каждого раствора сравнения, испытуемого раствора и контрольного раствора смешивают с 2 мл медно-бицинхонинатового реактива и перемешивают. Инкубируют полученные растворы при температуре 37 °С в течение 30 мин, отмечают время и выдерживают до охлаждения до комнатной температуры. В течение 60 мин после окончания инкубации в кварцевых кюветах измеряют оптическую плотность (2.2.25) растворов сравнения и испытуемого раствора при длине волны 562 нм, используя контрольный раствор в качестве компенсационного раствора. Необходимо учитывать, что после остывания растворов до комнатной температуры, интенсивность цвета постепенно возрастает.

Расчеты. Зависимость оптической плотности от концентрации белка не является линейной; тем не менее, если диапазон концентраций, используемый для построения стандартного графика, невелик, он близок к линейности. Строят графическую зависимость оптических плотностей растворов сравнения от концентраций белка и используют линейную регрессию для построения стандартного графика. На основании стандартного графика и оптической плотности определяют концентрацию белка в испытуемом растворе.

МЕТОД 5

Данный метод (известный как биуретовый метод) основан на взаимодействии двухвалентного иона меди (Cu^{2+}) с белком в щелочной среде и появлении окрашивания раствора, оптическая плотность которого измеряется при длине волны 545 нм. Метод проявляет минимальное различие между равными количествами иммуноглобулиновых и альбуминовых образцов. Прибавление натрия гидроксида и биуретового реактива в качестве комбинированного реагента, недостаточное перемешивание после прибавления натрия гидроксида или продолжительный период времени между прибавлением натрия гидроксида и прибавлением биуретового реактива завышают значения для иммуноглобулиновых образцов по сравнению с альбуминовыми образцами. Метод трихлоруксусной кислоты, используемый для минимизации влияния мешающих веществ, также может использоваться для определения содержания белка в испытуемых образцах при концентрациях ниже 500 мкг/мл.

Для приготовления всех реактивов и буферных растворов, применяемых в данном методе, используют *воду дистиллированную Р*.

Испытуемый раствор. Для получения раствора с концентрацией в пределах интервала стандартного графика растворяют достаточное количество испытуемого образца в растворе 9 г/л *натрия хлорида Р*.

Растворы сравнения. Стандартный образец, предназначенный для определения белка, растворяют в растворе 9 г/л *натрия хлорида Р*. Полученный раствор разводят раствором 9 г/л *натрия хлорида Р*, чтобы получить не менее трех растворов сравнения с концентрациями белка, равномерно распределенными в необходимом диапазоне в интервале от 0,5 мг/мл до 10 мг/мл.

Контрольный раствор. Используют раствор 9 г/л *натрия хлорида Р*.

Биуретовый реактив. 3,46 г *меди (II) сульфата Р* растворяют в 10 мл горячей *воды дистиллированной Р* и охлаждают (раствор А). 34,6 г *натрия цитрата Р* и 20,0 г *натрия карбоната безводного Р* растворяют в 80 мл горячей *воды дистиллированной Р* и охлаждают (раствор В). Смешивают растворы А и В и доводят *водой дистиллированной Р* до объема 200 мл. Используют полученный раствор в течение 6 месяцев. В случае помутнения или выпадения осадка реактив не подлежит использованию.

Методика. К одному объему испытуемого раствора прибавляют равный объем раствора 60 г/л *натрия гидроксида Р* и перемешивают. Немедленно прибавляют биуретовый реактив в количестве, равном 0,4 объема испытуемого раствора, и быстро перемешивают. Выдерживают при температуре от 15 °С до 25 °С в течение не менее 15 мин. В течение 90 мин после прибавления биуретового реактива измеряют оптическую плотность (2.2.25) растворов сравнения и испытуемого раствора при длине волны 545 нм, используя контрольный раствор в качестве компенсационного раствора. Мутные растворы или растворы с осадком непригодны для определения концентрации белка.

Расчеты. Зависимость оптической плотности от концентрации белка имеет почти линейный характер в рамках указанного интервала концентрации белка для растворов сравнения. Строят графическую зависимость оптических плотностей растворов сравнения от концентраций белка и используют линейную регрессию для построения стандартного графика. Рассчитывают коэффициент корреляции для стандартного графика. Система считается пригодной, если линейная зависимость имеет коэффициент корреляции не менее 0,99. На основании стандартного графика и оптической плотности определяют концентрацию белка в испытуемом растворе.

Мешающие вещества. Для минимизации эффекта мешающих веществ белок может быть осажден из испытуемого образца следующим образом: прибавляют 0,1 объема раствора 500 г/л *кислоты трихлоруксусной Р* к 1 объему раствора испытуемого образца, удаляют надосадочную жидкость и осадок растворяют в небольшом объеме 0,5 М раствора *натрия гидроксида*. Полученный раствор используют для приготовления испытуемого раствора.

МЕТОД 6

Данный флуориметрический метод основан на дериватизации белка *о*-фталевым альдегидом, который взаимодействует с первичными аминами белка (*N*-концевая аминокислота и ϵ -аминогруппа остатков лизина). Чувствительность анализа может быть повышена гидролизом белка перед прибавлением *о*-фталевого альдегида. Гидролиз делает α -аминогруппы аминокислот, входящих в структуру белка, доступными для реакции с реактивом фталевого альдегида. Данный метод требует очень малых количеств белка. Первичные амины, например, трис(гидроксиметил)аминометан и аминокислотные буферные растворы, взаимодействуют с фталевым альдегидом, вследствие чего их следует избегать или удалять. Аммиак при высоких концентрациях взаимодействует с фталевым альдегидом. Флуоресценция, полученная при взаимодействии амина с фталевым альдегидом, может быть нестабильной. Использование автоматизированных процедур для стандартизации данного метода может повысить его качество и точность.

Для приготовления всех реактивов и буферных растворов, применяемых в данном методе, используют воду дистиллированную *Р*.

Испытуемый раствор. Растворяют достаточное количество испытуемого образца в растворе 9 г/л *натрия хлорида Р* для получения раствора с концентрацией в пределах концентраций растворов сравнения. Перед прибавлением реактива фталевого альдегида устанавливают рН раствора от 8 до 10,5.

Растворы сравнения. Стандартный образец, предназначенный для определения белка, растворяют в растворе 9 г/л *натрия хлорида Р*. Полученный раствор разводят раствором 9 г/л *натрия хлорида Р*, чтобы получить не менее пяти растворов сравнения с концентрациями белка, равномерно распределенными в необходимом диапазоне в интервале от 10 мкг/мл до 200 мкг/мл. Перед прибавлением реактива фталевого альдегида устанавливают значение рН растворов от 8 до 10,5.

Контрольный раствор. Используют раствор 9 г/л *натрия хлорида Р*.

Боратный буферный раствор. 61,83 г *кислоты борной Р* растворяют в воде дистиллированной *Р*, доводят раствором калия гидроксида *Р* до рН 10,4, разводят водой дистиллированной *Р* до объема 1000 мл и перемешивают.

Основной раствор фталевого альдегида. 1,20 г *фталевого альдегида Р* растворяют в 1,5 мл *метанола Р*, прибавляют 100 мл боратного буферного раствора и перемешивают. Прибавляют 0,6 мл раствора 300 г/л *макрогол 23 лаурилового эфира Р* и перемешивают. Хранят при комнатной температуре и используют в течение 3-х недель.

Реактив фталевого альдегида. К 5 мл основного раствора фталевого альдегида прибавляют 15 мкл 2-меркаптоэтанола *P*. Раствор готовят не менее чем за 30 мин до начала использования. Используют в течение 24 ч.

Методика. К 10 мкл испытуемого раствора и каждого из растворов сравнения прибавляют по 0,1 мл реактива фталевого альдегида, перемешивают и выдерживают при комнатной температуре в течение 15 мин. Прибавляют 3 мл 0,5 М раствора натрия гидроксида и перемешивают. Определяют флуоресценцию (2.2.21) растворов сравнения и испытуемого раствора при длине волны возбуждающего света 340 нм и длине волны испускаемого света от 440 нм до 455 нм. Измеряют флуоресценцию полученных растворов только один раз, поскольку облучение снижает интенсивность флуоресценции.

Расчеты. Зависимость флуоресценции от концентрации белка является линейной. Строят графическую зависимость флуоресценции растворов сравнения от концентраций белка и используют линейную регрессию для построения стандартного графика. На основании стандартного графика и интенсивности флуоресценции определяют концентрацию белка в испытуемом растворе.

МЕТОД 7

Данный метод основан на определении содержания азота как способе определения белка. Присутствие других азотсодержащих веществ в испытуемом образце может оказывать мешающее влияние на определение белка при помощи данного метода. Техника азотного анализа основана на разрушении испытуемого образца, но не зависит от содержания белка в водной среде.

Методика А. Выполняется в соответствии с методом определения азота после минерализации серной кислотой (2.5.9) или при помощи коммерчески доступного прибора для определения азота по Кьельдалю.

Методика В. Анализ может выполняться при помощи коммерчески доступных приборов. Большинство приборов, применяемых для азотного анализа, используют пиролиз (т.е. сжигание образца в присутствии кислорода при температуре, достигающей 1000 °С). При этом из азота, присутствующего в испытуемых образцах, образуется оксид азота (NO) и другие оксиды азота (NO_x). В некоторых приборах оксиды азота преобразуются в азот, который обнаруживается теплопроводным детектором. В других приборах оксид азота (NO) смешивается с озоном (O₃), образуя при этом активированный диоксид азота (NO₂^{*}), который испускает свет при распаде и может быть определен с помощью хемилюминесцентного детектора. Стандартный образец белка, который относительно чист и схож по своему составу с исследуемыми белками, используется для оптимизации параметров пиролиза и оценки стабильности анализа.

Расчеты. Содержание белка рассчитывают путем деления содержания азота в испытуемом образце на известное содержание азота в белке. Известное содержание азота в белке можно определить на основе химического состава белка или сравнивая с подходящим стандартным образцом.

01/2013:20534

2.5.34. УКСУСНАЯ КИСЛОТА В СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДАХ

Жидкостная хроматография (2.2.29).

Испытуемый раствор. Готовят испытуемый раствор, как указано в частной статье. Концентрация пептида в растворе может быть адаптирована в зависимости от ожидаемого содержания уксусной кислоты в образце.

Раствор сравнения. Готовят раствор 0,10 г/л кислоты уксусной ледяной *P* в смеси из 5 объемов подвижной фазы В и 95 объемов подвижной фазы А.

Условия хроматографирования:

– колонка из нержавеющей стали длиной 0,25 м и внутренним диаметром 4,6 мм, заполненная силикагелем октадецилсилильным для хроматографии *P* с размером частиц 5 мкм;

– скорость подвижной фазы: 1,2 мл/мин;

– подвижная фаза:

– подвижная фаза А: 0,7 мл кислоты фосфорной Р разводят водой Р до объема 1000 мл и доводят раствором натрия гидроксида концентрированным Р до рН 3,0;

– подвижная фаза В: метанол Р2;

Время (мин)	Подвижная фаза А (% об/об)	Подвижная фаза В (% об/об)
0–5	95	5
5–10	95 → 50	5 → 50
10–20	50	50
20–22	50 → 95	50 → 5
22–30	95	5

– спектрофотометрический детектор, длина волны 210 нм;

– объем вводимой пробы: 10 мкл.

На полученных хроматограммах пик, соответствующий уксусной кислоте, имеет время удерживания 3–4 мин. После начала градиента базовая линия круто поднимается, что соответствует элюированию из колонки пептида.

Определяют содержание уксусной кислоты в пептиде.

01/2013:20535

2.5.35. АЗОТА ЗАКИСЬ В ГАЗАХ

Азота закись (N_2O) в газах определяют с использованием инфракрасного анализатора (рисунок 2.5.35.-1).

Инфракрасный анализатор включает в себя 2 генератора идентичных инфракрасных лучей, которые оснащены зеркалами и катушками, электрически нагреваемыми до слабого красного каления. Один луч проходит через испытуемую ячейку, в которую поступает струя испытуемого газа, другой – через ячейку сравнения, содержащую азот Р1. Две камеры детектора, заполненные азота закисью Р автоматически селективно регистрируют излучение. Проходя через испытуемый газ, излучение поглощается закисью азота и по-разному нагревает газ в камерах детектора, приводя к различию в расширении. Различие в давлении между камерами детектора приводит к растяжению металлической диафрагмы, которая их разделяет. Диафрагма является частью конденсатора, чья емкость варьирует в зависимости от разности давления, которое в свою очередь зависит от содержания закиси азота в испытуемом газе. Так как инфракрасные лучи периодически прерываются вращающимися лопастями, электрический сигнал является частотно-модулированным.



Рисунок 2.5.35.-1. Инфракрасный анализатор

01/2013:20536

2.5.36. АНИЗИДИНОВОЕ ЧИСЛО

Анизидиновое число представляет собой 100-кратную измеренную в кювете с толщиной слоя 1 см оптическую плотность раствора, содержащего 1 г испытуемого образца в 100 мл смеси из растворителей и реактивов.

Все приготовления и измерения необходимо проводить настолько это возможно быстро, избегая воздействия света, способного вызывать фотохимические превращения.

Испытуемый раствор (а). 0,500 г испытуемого образца растворяют в триметилпентане *P* и доводят до объема 25,0 мл этим же растворителем.

Испытуемый раствор (b). К 5,0 мл испытуемого раствора (а) прибавляют 1,0 мл раствора 2,5 г/л *n*-анизидина *P* в кислоте уксусной ледяной *P*, встряхивают и хранят в защищенном от света месте.

Раствор сравнения. К 5,0 мл триметилпентана *P* прибавляют 1,0 мл раствора 2,5 г/л *n*-анизидина *P* в кислоте уксусной ледяной *P*, встряхивают и хранят в защищенном от света месте.

Измеряют оптическую плотность (2.2.25) испытуемого раствора (а) при 350 нм, используя триметилпентан *P* в качестве компенсационного раствора. Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора (b) при 350 нм ровно через 10 мин после его приготовления, используя раствор сравнения в качестве компенсационного раствора.

Анизидиновое число рассчитывают по формуле:

$$\frac{25 \cdot (1,2 A_1 - A_2)}{m},$$

где:

A_1 – оптическая плотность испытуемого раствора (b) при 350 нм;

A_2 – оптическая плотность испытуемого раствора (а) при 350 нм;

m – масса навески испытуемого образца, г.

01/2013:20537

2.5.37. МЕТИЛ-, ЭТИЛ- И ИЗОПРОПИЛМЕТАНСУЛЬФОНАТ В МЕТАНСУЛЬФОНОВОЙ КИСЛОТЕ

Следующий метод был валидирован для определения метиловых, этиловых и изопропиловых эфиров метансульфоновой кислоты в диапазоне концентраций от 0,5 ppm до 100 ppm.

Если данный метод предполагается использовать для определения концентраций эфиров метансульфоновой кислоты, выходящих за границы валидированного диапазона концентраций, например, на ранних стадиях синтеза до их удаления, концентрация испытуемого раствора должна быть соответствующим образом скорректирована.

МЕТОДИКА

Газовая хроматография (2.2.28) спаренная с масс-спектрометрией (2.2.43).

Раствор внутреннего стандарта. 7 мкл ФСО бутилметансульфоната (БМС) доводят метиленхлоридом *P* до объема 10,0 мл. 10 мкл полученного раствора доводят метиленхлоридом *P* до объема 100,0 мл.

Испытуемый раствор. К 0,74 г испытуемого образца прибавляют 10,0 мл воды *P* и проводят экстракцию с использованием 10,0 мл раствора внутреннего стандарта. Выдерживают до расслоения фаз, переносят органический слой во флакон, содержащий натрия сульфат безводный *P*. Встряхивают и фильтруют.

Раствор сравнения (а). По 50 мг метилметансульфоната *P* (ММС), этилметансульфоната *P* (ЭМС) и изопропилметансульфоната *P* (ИМС) растворяют в растворе внутреннего стандарта и доводят до объема 50,0 мл этим же раствором. 74 мкл полученного раствора доводят раствором внутреннего стандарта до объема 10,0 мл. 100 мкл полученного раствора доводят раствором внутреннего стандарта до объема 10,0 мл.

Раствор сравнения (b). 3,0 мл раствора сравнения (а) доводят раствором внутреннего стандарта до объема 10,0 мл.

Условия хроматографирования:

- колонка: кварцевая капиллярная, длиной 15 м и внутренним диаметром 0,25 мм, заполненная полидиметилсилоксаном *P* (толщина слоя 1 мкм);
- газ-носитель: гелий для хроматографии *P*;
- скорость потока: 1 мл/мин;
- импульсный ввод без деления потока: 250 кПа, 0,25 мин;
- температура:

		Время (мин)	Температура (°C)
Колонка		0–1	55
		1–9	55 → 135
Блок ввода проб			240
Детектор:	автоматическая линия		280
	источник		230
	анализатор		150

– детектор: масс-спектрометр, описанный ниже; корректируют настройку детектора для соответствия критериям пригодности системы:

– квадрупольный масс-спектрометр, снабженный системой ионизации электронным ударом (70 эВ);

– для режима фрагментометрии (одноионный мониторинг (*SIM*)) параметры масс-спектрометра устанавливают следующим образом:

Вещество	<i>m/z</i>	Длительность мониторинга
Бутилметансульфонат (БМС)	56	<i>t_R</i> между 7,0 мин и 9,0 мин
Метилметансульфонат (ММС)	80	<i>t_R</i> между 2,0 мин и 3,5 мин
Этилметансульфонат (ЭМС)	79	<i>t_R</i> между 4,0 мин и 4,7 мин
Изопропилметансульфонат (ИМС)	123	<i>t_R</i> между 4,7 мин и 5,5 мин

– объем вводимой пробы: 2 мкл.

Относительное удерживание (по отношению к внутреннему стандарту (БМС) (время удерживания – около 7,6 мин)): ММС – около 0,3; ЭМС – около 0,5; ИМС – около 0,6.

Пригодность хроматографической системы:

– разрешение: не менее 3,0 между пиками ЭМС и ИМС на хроматограмме раствора сравнения (а);

– отношение сигнал/шум: не менее 10 для пиков ММС, ЭМС и ИМС на хроматограмме раствора сравнения (б).

Содержание ММС, ЭМС или ИМС (в частях на миллион, ppm) рассчитывают по формуле:

$$\frac{A_2 \cdot I_1 \cdot W_1 \cdot C \cdot 0,148}{A_1 \cdot I_2 \cdot W_2},$$

где:

*A*₁ – площадь пика ММС, ЭМС или ИМС на хроматограмме раствора сравнения (а);

*A*₂ – площадь пика ММС, ЭМС или ИМС на хроматограмме испытуемого раствора;

C – концентрация ММС, ЭМС или ИМС, в процентах;

*I*₁ – площадь пика внутреннего стандарта на хроматограмме раствора сравнения (а);

*I*₂ – площадь пика внутреннего стандарта на хроматограмме испытуемого раствора;

*W*₁ – масса навески ММС, ЭМС или ИМС, взятой для приготовления раствора сравнения (а), в миллиграммах;

*W*₂ – масса навески испытуемого образца, взятой для приготовления испытуемого раствора, в миллиграммах;

0,148 – коэффициент разведения.

2.5.38. МЕТИЛ-, ЭТИЛ- И ИЗОПРОПИЛМЕТАНСУЛЬФОНАТ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЯХ

Следующий метод был валидирован для определения метиловых, этиловых и изопропиловых эфиров метансульфоновой кислоты (в диапазоне концентраций от 0,2 ppm до 5 ppm) в бетагистина мезилате.

Если данный метод предполагается использовать для определения эфиров метансульфоновой кислоты в других фармацевтических субстанциях, содержащих отличающиеся концентрации эфиров метансульфоновой кислоты, концентрация испытуемого раствора и раствора сравнения должна быть соответствующим образом скорректирована и проведена подходящая валидация.

МЕТОДИКА

Парофазная газовая хроматография (2.2.28), спаренная с масс-спектрометрией (2.2.43). *Испытуемый раствор и раствор сравнения готовят непосредственно перед использованием.*

Смесь растворителей. Вода Р – ацетонитрил Р (20:80, об/об).

Раствор А. 30 мг натрия тиосульфата безводного Р и 60,0 г натрия йодида Р растворяют в воде Р и доводят до объема 50,0 мл этим же растворителем.

Раствор внутреннего стандарта. 10 мкл ФСО бутилметансульфоната (БМС) доводят смесью растворителей до объема 10,0 мл. 20 мкл полученного раствора доводят смесью растворителей до объема 10,0 мл. 10,0 мл полученного раствора доводят смесью растворителей до объема 100,0 мл.

Испытуемый раствор. 25,0 мг испытуемого образца помещают во флакон для парофазного пробоотборника вместимостью 20 мл, прибавляют 0,50 мл раствора А и 0,50 мл раствора внутреннего стандарта, немедленно закрывают флакон силиконовой мембраной с политетрафторэтиленовым покрытием и обкатывают алюминиевым колпачком. В ходе реакции дериватизации может образоваться осадок, который не влияет на достоверность количественного определения.

Раствор сравнения (а). По 25,0 мг метилметансульфоната Р (ММС), этилметансульфоната Р (ЭМС) и изопропилметансульфоната Р (ИМС) растворяют в толуоле Р и доводят до объема 5,0 мл этим же растворителем. 50 мкл полученного раствора доводят раствором внутреннего стандарта до объема 25,0 мл.

Раствор сравнения (b). 20 мкл раствора сравнения (а) доводят раствором внутреннего стандарта до объема 20,0 мл. 0,50 мл полученного раствора и 0,50 мл раствора А помещают во флакон для парофазного пробоотборника вместимостью 20 мл, немедленно закрывают флакон силиконовой мембраной с политетрафторэтиленовым покрытием и обкатывают алюминиевым колпачком.

Раствор сравнения (с). 500 мкл раствора сравнения (а) доводят раствором внутреннего стандарта до объема 20,0 мл. 0,50 мл полученного раствора и 0,50 мл раствора А помещают во флакон для парофазного пробоотборника вместимостью 20 мл, немедленно закрывают флакон силиконовой мембраной с политетрафторэтиленовым покрытием и обкатывают алюминиевым колпачком.

Условия хроматографирования:

– колонка: кварцевая капиллярная, длиной 30 м и внутренним диаметром 0,25 мм, заполненная полярно деактивированным полиэтиленгликолем Р (толщина слоя 1 мкм);

– газ-носитель: гелий для хроматографии Р;

– скорость потока: 0,5 мл/мин;

– деление потока: 1:20;

– условия для парофазного пробоотборника:

– температура уравнивания: 60 °С;

– время уравнивания: 30 мин;

– температура автоматической линии: 120 °С;

– температура:

	Время (мин)	Температура (°С)
Колонка*	0–1	40

		1–10	40 → 130
Блок ввода проб			220
Детектор:	автоматическая линия		280
	источник		250
	анализатор		200

* В конце анализа поднимают температуру колонки до 240 °С и поддерживают ее в течение 7 мин.

– *детектор*: масс-спектрометр, описанный ниже; корректируют настройку детектора для соответствия критериям пригодности системы; альтернативно может быть использован подходящий детектор с электронной ловушкой:

– квадрупольный масс-спектрометр, снабженный системой ионизации электронным ударом (70 эВ);

– для режима фрагментометрии (одноионный мониторинг (*SIM*)) параметры массспектрометра устанавливают следующим образом:

Вещество	Ион для количественного определения (<i>m/z</i>)	Ион для квалификации (<i>m/z</i>)
Бутильодид (<i>BuI</i>)**	184	127
Метильодид (<i>MeI</i>)**	142	127
Этильодид (<i>EtI</i>)**	156	127
Изопропилийодид (<i>iPrI</i>)**	170	127

** Получены из БМС, ММС, ЭМС и ИМС в результате реакции дериватизации.

– *объем вводимой пробы*: по 1 мл равновесной газовой фазы испытуемого раствора, раствора сравнения (b) и раствора сравнения (c).

Относительное удерживание (по отношению к внутреннему стандарту (бутильодид) (время удерживания – около 8,5 мин)): метильодид – около 0,51; этильодид – около 0,63; изопропилийодид – около 0,68.

Пригодность хроматографической системы:

– *разрешение*: не менее 1,5 между пиками этильодида и изопропилийодида на хроматограмме раствора сравнения (c);

– *отношение сигнал/шум*: не менее 10 для пиков каждого алкильодида на хроматограмме раствора сравнения (b).

Содержание каждого алкилметансульфоната (в частях на миллион, ppm) рассчитывают по формуле:

$$\frac{A_2 \cdot I_1 \cdot W_1 \cdot C \cdot 0,05}{A_1 \cdot I_2 \cdot W_2},$$

где:

A_1 – площадь пика каждого алкильодида на хроматограмме раствора сравнения (c);

A_2 – площадь пика каждого алкильодида на хроматограмме испытуемого раствора;

C – концентрация каждого эфира, в процентах;

I_1 – площадь пика внутреннего стандарта на хроматограмме раствора сравнения (c);

I_2 – площадь пика внутреннего стандарта на хроматограмме испытуемого раствора;

W_1 – масса навески каждого эфира, взятой для приготовления раствора сравнения (a), в миллиграммах;

W_2 – масса навески испытуемого образца, взятой для приготовления испытуемого раствора, в миллиграммах;

0,05 – коэффициент разведения.

01/2013:20539

2.5.39. МЕТАНСУЛЬФОНИЛХЛОРИД В МЕТАНСУЛЬФОНОВОЙ КИСЛОТЕ

Следующий метод был валидирован для определения метансульфонилхлорида в метансульфоновой кислоте в диапазоне концентраций от 0,05 ppm до 50 ppm.

МЕТОДИКА

Газовая хроматография (2.2.28), спаренная с масс-спектрометрией (2.2.43).

Раствор внутреннего стандарта. 68 мкл ФСО бутилметансульфоната (БМС) доводят метиленхлоридом *P* до объема 10,0 мл. 0,5 мл полученного раствора доводят метиленхлоридом *P* до объема 50,0 мл.

Испытуемый раствор. К 5 мл воды *P* добавляют 7,4 г испытуемого образца и медленно перемешивают. После охлаждения прибавляют 5,0 мл метиленхлорида *P*, 100 мкл раствора внутреннего стандарта и встряхивают. Выдерживают до расслоения фаз, переносят органический слой во флакон, содержащий 1 г натрия сульфата безводного *P*. Экстракцию повторяют дважды, каждый раз используя 5,0 мл метиленхлорида *P*. Органические слои смешивают и фильтруют.

Раствор сравнения (а). 50 мг метансульфонилхлорида *P* растворяют в метиленхлориде *P* и доводят до объема 10,0 мл этим же растворителем. 1,0 мл полученного раствора доводят метиленхлоридом *P* до объема 10,0 мл. 300 мкл полученного раствора доводят метиленхлоридом *P* до объема 10,0 мл.

Раствор сравнения (b). 500 мкл раствора сравнения (а) и 100 мкл раствора внутреннего стандарта доводят метиленхлоридом *P* до объема 15,0 мл.

Раствор сравнения (с). 25 мкл раствора сравнения (а) и 100 мкл раствора внутреннего стандарта доводят метиленхлоридом *P* до объема 15,0 мл.

Условия хроматографирования:

- колонка: кварцевая капиллярная, длиной 15 м и внутренним диаметром 0,25 мм, заполненная полидиметилсилоксаном *P* (толщина слоя 1 мкм);
- газ-носитель: гелий для хроматографии *P*;
- скорость потока: 1 мл/мин;
- импульсный ввод без деления потока: 60 кПа, 0,1 мин;
- температура:

		Время (мин)	Температура (°C)
Колонка*		0–4	40
		4–8	40 → 200
Блок ввода проб			240
Детектор:	автоматическая линия		280
	источник		230
	анализатор		150

* В конце анализа поднимают температуру колонки до 270 °C и поддерживают ее в течение 8 мин.

– детектор: масс-спектрометр, описанный ниже; корректируют настройку детектора для соответствия критериям пригодности системы:

– квадрупольный масс-спектрометр, снабженный системой ионизации электронным ударом (70 эВ);

– для режима фрагментометрии (одноионный мониторинг (*SIM*)) параметры масс-спектрометра устанавливают следующим образом:

Вещество	<i>m/z</i>	Длительность мониторинга
Метансульфонилхлорид	79	<i>t_R</i> между 3,3 мин и 6,0 мин
Бутилметансульфонат (БМС)	56	<i>t_R</i> между 6,0 мин и 8,0 мин

– объем вводимой пробы: по 5 мкл испытуемого раствора, раствора сравнения (b), раствора сравнения (с), раствора внутреннего стандарта и метиленхлорида *P*.

Относительное удерживание (по отношению к внутреннему стандарту (БМС) (время удерживания – около 7,2 мин)): метансульфонилхлорид – около 0,68.

Пригодность хроматографической системы:

– на хроматограмме раствора внутреннего стандарта не должно обнаруживаться пика со временем удерживания, идентичным метансульфонилхлориду;

– разрешение: не менее 5,0 между пиками метансульфонилхлорида и БМС на хроматограмме раствора сравнения (b);

– отношение сигнал/шум: не менее 10 для пика метансульфонилхлорида на хроматограмме раствора сравнения (с).

Содержание метансульфонилхлорида (в частях на миллион, ppm) рассчитывают по формуле:

$$\frac{A_2 \cdot I_1 \cdot W_1 \cdot C \cdot 1,5}{A_1 \cdot I_2 \cdot W_2},$$

где:

A_1 – площадь пика метансульфонилхлорида на хроматограмме раствора сравнения (b);

A_2 – площадь пика метансульфонилхлорида на хроматограмме испытуемого раствора;

C – концентрация метансульфонилхлорида, в процентах;

I_1 – площадь пика внутреннего стандарта (БМС) на хроматограмме раствора сравнения (b);

I_2 – площадь пика внутреннего стандарта (БМС) на хроматограмме испытуемого раствора;

W_1 – масса навески метансульфонилхлорида, взятой для приготовления раствора сравнения (a), в миллиграммах;

W_2 – масса навески испытуемого образца, взятой для приготовления испытуемого раствора, в миллиграммах;

1,5 – коэффициент разведения.

01/2013:РБ20550

#2.5.50. ТИТРОВАНИЕ В НЕВОДНЫХ РАСТВОРИТЕЛЯХ

Метод кислотно-основного титрования в неводных растворителях применяется для количественного определения веществ, представляющих собой кислоты, основания или соли, титрование которых в воде затруднено или невозможно из-за слабых кислотно-основных свойств или малой растворимости.

В неводных растворителях резко изменяются кислотно-основные свойства различных веществ. В зависимости от растворителя одно и то же вещество может быть кислотой, основанием или вообще не проявлять кислотно-основных свойств. Применение различных растворителей позволяет управлять кислотно-основными свойствами веществ.

Выбор растворителя осуществляется на основании величин констант титрования K_T или их отрицательных логарифмов pK_T . Величина pK_T является критерием возможности и точности титрования. Чем больше эта величина, тем лучше условия титрования. Константа титрования определяется двумя основными величинами: константой кислотности титруемой кислоты (K_a) или константой кислотности кислоты, сопряженной с титруемым основанием (K_{BH^+}), и константой автопротолиза растворителя (K_{SH}).

При титровании кислот:

$$K_T = \frac{K_{SH}}{K_a} \text{ или } pK_T = pK_{SH} - pK_a.$$

При титровании оснований:

$$K_T = K_{BH^+} \text{ или } pK_T = pK_{BH^+}.$$

При титровании смеси двух кислот:

$$K_T = \frac{K_{a(2)}}{K_{a(1)}} \text{ или } pK_T = pK_{a(2)} - pK_{a(1)}.$$

При титровании смеси двух оснований:

$$K_T = \frac{K_{\text{BH}^+(1)}}{K_{\text{BH}^+(2)}} \text{ или } pK_T = pK_{\text{BH}^+(1)} + pK_{\text{BH}^+(2)}.$$

Индекс 1 относится к более сильной кислоте (основанию), а индекс 2 – к более слабой кислоте (основанию).

Значения величин pK_{SH} для ряда растворителей и pK_{a} кислот и pK_{BH^+} оснований в воде и различных неводных растворителях приведены в таблицах #2.5.50.-2, #2.5.50.-3, #2.5.50.-4. Эти таблицы позволяют быстро определять pK_T . Задачу выбора растворителя помогает решить также линейная зависимость pK_T кислот и оснований, принадлежащих к одной группе химических соединений, в воде и неводных растворителях. Это позволяет определять pK_T кислот и оснований в неводных растворителях, если известны их pK_T в воде.

Как кислоты можно титровать: карбоновые кислоты, фенолы, барбитураты, сульфамиды, аминокислоты и другие.

Как основания можно титровать: амины, азотсодержащие гетероциклические соединения, амиды, четвертичные аммониевые основания и другие.

Оптимальные условия титрования для слабых кислот достигаются в основных неводных растворителях, таких как пиридин, диметилформамид; для слабых оснований – в кислотных неводных растворителях, таких как уксусная кислота и уксусный ангидрид.

Соли некоторых органических и минеральных кислот могут быть оттитрованы как основания в кислотных растворителях.

В случае титрования солей галогеноводородных кислот перед титрованием прибавляют обычно раствор ртути (II) ацетата для связывания галогенид-ионов в малодиссоциирующие соединения. При использовании уксусного ангидрида в качестве растворителя возможно титрование солей галогеноводородных кислот, преимущественно хлоридов, без прибавления ртути (II) ацетата.

Для раздельного титрования смесей кислот или смесей оснований используют дифференцирующие растворители, т.е. растворители с величиной pK_{SH} , обычно превышающей 15, не обладающие выраженными кислотно-основными свойствами, такие как кетоны, нитрилы, нитрометан.

В ряде случаев для титрования применяют смеси неводных растворителей, один из которых является апротонным (бензол, хлороформ и др.). Присутствие апротонного растворителя уменьшает константу автопротолиза среды (K_i), что может способствовать улучшению условий титрования.

Метод неводного титрования применяют также для количественного определения веществ, содержащих карбонильную группу, обладающих слабовыраженными кислотно-основными свойствами и не поддающихся прямому титрованию в неводных растворителях. В этом случае проводят реакцию оксимирования в неводных растворителях и осуществляют количественное определение карбонилсодержащих веществ путем титрования избытка реагента. Метод применяют для количественного определения различных классов органических соединений: альдегидов, кетонов, хромонов, стероидных гормонов, гликозидов и др. Титрование в неводных средах может быть проведено как с индикаторами, так и потенциометрически с использованием в качестве индикаторного стеклянного или других обратимых к протону электродов. В качестве электрода сравнения обычно используют хлоридсеребряный электрод.

При проведении потенциометрического титрования в неводных средах электролитический мост или электрод сравнения заполняют растворами калия хлорида или лития хлорида в соответствующих неводных растворителях.

При титровании в основных растворителях следует принимать меры для защиты испытуемого раствора и титрованного раствора от углерода диоксида, содержащегося в воздухе. Титрование лучше проводить в атмосфере инертного газа (азота, гелия).

В таблице #2.5.50.-1 приведены наиболее часто применяемые неводные растворители, индикаторы и титранты.

Растворители, индикаторы и титранты, наиболее часто применяемые в неводном титровании

Растворители	Индикаторы	Титранты
Кислотные Уксусная и муравьиная кислоты, уксусный ангидрид и их смеси с другими растворителями	Кристаллический фиолетовый, судан III, тропеолин 00, метиловый фиолетовый, нейтральный красный, малахитовый зеленый, диметиламиноазобензол	Раствор хлорной кислоты в уксусной кислоте или нитрометане
Основные Диметилформамид, пиридин, этилендиамин	Тимоловый синий, бромтимоловый синий, β -нафтолбензеин, <i>o</i> -нитроанилин	Растворы натрия гидроксида, калия гидроксида, натрия метилата, лития метилата, тетраэтиламмония в метаноле или смеси метанола и бензола
Дифференцирующие Ацетон, диоксан, нитрометан, метилэтилкетон, метанол, изопропанол, третбутанол, диметилсульфоксид	Метиловый оранжевый, тимоловый синий, нейтральный красный, метиловый красный, бромтимоловый синий	Растворы хлористоводородной кислоты в метаноле или гликолевых смесях; растворы хлорной кислоты в нитрометане, в метаноле или в гликолевых смесях; растворы, применяемые при титровании в основных растворителях

Таблица #2.5.50.-2

Величины pK_{SH} различных растворителей ($pK_{SH} = -\lg K_{SH}$) при температуре от 20 °C до 25 °C

Растворитель	pK_i
1. Серная кислота	3,62
2. Муравьиная кислота	6,10
3. Уксусная кислота	14,4
4. Уксусный ангидрид	14,5
5. Этилендиамин	15,3
6. Этиленгликоль	15,6
7. Формамид	16,7
8. Метанол	16,7
9. Пропиленгликоль	16,8
10. Диэтиленгликоль	17,5
11. Этанол	19,1
12. Масляная кислота	19,2
13. н-Бутанол	20,1
14. Метилцеллозольв	20,7
15. Изопропанол	22,0
16. Диметилацетамид	23,9
17. Нитрометан	24,0
18. N-Метилпирролидон	24,2
19. Пиридин	24,2
20. Диметилсульфоксид 97 % (*)	24,5
21. Диметилформамид	25,3
22. Метилбутилкетон	25,3

23. Сульфолан	25,5
24. Метилэтилкетон	25,7
25. Ацетон	25,9
26. Ацетон 90 % (*)	20,3
27. трет-Бутанол	26,8
28. Пропиленкарбонат	29,2
29. Аммиак жидкий	29,8
30. Ацетонитрил	32,2
31. Диметилсульфоксид	33,3

(*) Другой компонент – вода.

Величина pK_a кислот в разных растворителях ($pK_a = -\lg K_a$)

Кислота	Растворитель																											
	Во- да	Мета- нол	Эта- нол 95 %	Бута- нол	Изопро- панол	трет- Бута- нол	Этилен- гликоль	Пропилен- гликоль	Метилцел- лозольв	Аце- тон	Аце- тон 90 %	Метил- изобутил- кетон	Метил- этил- кетон	Фор- мамид	Диметил- фор- мамид	Диметил- сульф- оксид	Диметил- сульф- оксид 97 %	Диметил- ацетамид	Пропилен- карбонат	Ацето- нитрил	Нитро- метан	N- метил- пирро- лидон	Пири- дин	Ам- миак жид- кий	Уксус- ная кис- лота	Мура- вьиная кислота	Мас- ляная кис- лота	Уксус- ный ангид- рид
Хлорная						3,94				2,90			2,20						5,34	1,90	2,23		3,23	2,27	2,70	0,28	12,1	0,90
Серная		1,44		3,42									5,48		3,10					4,60	5,10				4,25	0,58		4,90
Азотная	0,2	3,17	3,75										4,66								8,80		4,30	2,37	5,10		14,2	8,20
Хлористоводородная	0,8	1,05	1,95		3,10	5,50				8,90	2,47		8,30						7,77	6,20	8,10	4,08	5,40	2,89	5,30	0,89	13,3	8,30
Бромистоводородная	0,2				2,0	5,0									1,80					5,51			4,36					4,90
n-Толуолсульфоновая						3,82									1,55					5,30			2,68				0,34	12,90
Уксусная	4,75	9,70	10,41	10,35	11,35	14,27	8,32	9,10	11,10	12,55	10,27		16,6	6,91	13,50	12,60		12,60	18,81	22,30	20,50	13,30	11,44	4,11				
Монохлоруксусная	2,86	7,80	8,51	8,50	9,23	12,24	6,05		9,10	11,20	7,60		15,4	4,50	10,10	8,90		8,75	16,55	18,80	17,0	10,90						
Дихлоруксусная	1,31	6,30	7,14	7,30	7,80	10,27	4,50			10,20			10,26							15,80	14,10	8,30						
Трихлоруксусная	0,70	4,90	5,70	6,30					5,90	8,20			8,86	1,46	10,60				11,30									
Фенилуксусная	4,31						8,06	8,78						6,57	12,90	11,60					20,10							
Муравьиная	3,75		9,15			8,82			9,70				16,70	5,74	11,55				17,09			12,0	8,84					
Бензойная	4,20	9,52	10,13	10,24		15,10	8,16	8,83	10,70	11,95	9,70		16,6	6,36	12,20	11,10		11,0	19,67	20,70	19,60	12,30	9,80					
n-Нитробензойная	3,40	8,40	8,87	9,10	9,60	12,04				10,59	8,09			5,88	10,60	9,0				18,70	17,60	10,50	7,94					
m-Нитробензойная	3,46	8,30	9,0	9,15		9,20				10,66	8,03			5,40	10,82	9,20				19,29	17,60	10,70	8,16					
n-Аминобензойная	4,92																10,20											
3,5-Динитробензойная	2,80				8,31	10,60				9,63		18,80	9,78		8,95	7,40				16,90								
Салициловая	2,89	7,90	8,60	7,73		9,53			8,90	9,53	7,22		13,0	4,73	8,30	6,80	8,34	6,90	15,23	16,70								
Ацетилсалициловая	3,50												16,30		11,30													
Никотиновая	4,73									16,60			15,0		10,80	9,60	9,60											
Барбитуровая	4,01																12,32						6,67					
Винная	3,03	7,40													8,90													
Лимонная	3,10												10,1		10,60													
Фенол	9,89	14,2				19,08							22,3		18,0	16,40	15,62			26,60	25,70	17,60	16,20					
Резорцин	9,20																14,73											
o-Нитрофенол	7,17									13,82	10,75				12,14	11,0				22,0	21,40	12,60	10,03					
n-Нитрофенол	17,15	11,0	11,0		11,19	14,48				13,52	10,93			8,53	11,83	11,0				19,71	20,80	20,10	12,50	9,60				
m-Нитрофенол	8,30				12,6															21,24								
2,4-Динитрофенол	4,02	7,85	8,21	8,36		10,68				8,76	6,45		9,31	4,52	6,36	5,20				14,87	16,0	15,90	6,80	4,38				
2,5-Динитрофенол	5,22	8,98									8,10			5,94	8,78					16,45	17,50	17,9		5,76				
2,6-Динитрофенол	3,71	7,63									6,77	17,60		4,17	6,18	4,90					16,8	16,0						
3,5-Динитрофенол	6,70				10,83	13,40									11,42	10,60					20,50	19,40						

Пикриновая	0,80	4,80	3,93	4,50	3,70	3,65				3,17	2,18	11,0	3,70	1,33	3,65	1,0			9,90	11,0	10,50		3,65						
Барбитал	7,43	12,69				16,8							19,0			13,0	11,15			23,4									
Фенобарбитал	7,21								19,20				13,30		13,40	10,98	10,9												
Сульфадимезин	7,51								19,60				18,70		13,0		11,0												
Сульфадиметоксин	5,90																7,47												
Сульфамеразин	7,10																7,43												
Норсульфазол	6,80																11,22												
Сульгин	13,00																18,05												
Метилурацил	9,70														15,30	13,0													
Фторурацил	7,98														12,40	10,1													
Тиоурацил	7,82														12,20	10,8													
Цинхофен	6,22																11,28												
Рутин	8,96	10,34							13,15						11,12	12,1													
Кверцетин	8,21	9,18							14,41						11,22	11,63													
Ликуразид	9,46	12,30							14,34						13,15	13,28													
Изосалипурпозид	7,67	11,66							12,90						11,83	12,20													
Неодикумарин	4,37	5,71							7,37						5,75	6,23													
Зоокумарин	4,70	9,63							7,81						8,45	9,90													

Таблица #2.5.50.-4

Величина K_{BH}^* оснований в разных растворителях ($pK_{\text{BH}}^* = pK_{SH} - pK_B = pK_T$)

Основание	Растворитель																		
	Вода	Метанол	Этанол 95 %	Этиленгликоль	Пропилен-гликоль	Метил-целлозольв	N-метилпирролидон	Муравьиная кислота	Уксусная кислота	Уксусный ангидрид	Ацетон	Метил-этилкетон	Метил-изобутилкетон	Формамид	Диметил-формамид	Диметил-сульфоксид	Пропилен-карбонат	Нитро-метан	Ацетонитрил
Тетраметилгуанидин	13,60												20,30		13,65	13,20			23,3
Гуанозин	12,40					15,0													
Пиперидин	11,20	11,0	12,51	12,52	11,71		10,40		10,1		12,24	13,48		11,08	10,40		18,53	18,22	18,92
Диэтиламин	10,90					12,20	9,20	5,19	10,10			13,44			10,10	10,50	18,69	17,95	18,70
Бензиламин	9,62					11,30													
Цитидин	9,80					13,20													
Аденин	9,90					13,70													
Трибутиламин	9,85								10,10									17,77	18,10
Триэтиламин	10,70			11,15	10,87		8,70		10,20	11,50	11,62	12,40		9,99	9,25	9,0	17,91	18,35	18,46
Диметиламин	10,60								10,0						10,40			19,96	18,73
n-Бутиламин	10,60														10,50	11,10		16,86	18,26
Аденозин	10,55					14,90													
Дифенилгуанидин	10,10	13,60	15,26				8,90		10,0				15,90		8,90		17,00	17,20	17,90
Аммиак	9,30					11,70			10,10						9,45	10,50	15,90	15,70	16,46
Анилин	4,58	6,10	5,70	6,12	6,12			5,49	8,60		5,92		9,63	4,10	4,36	3,60	10,56	9,07	10,56
Диметиланилин	5,10	4,50	4,40						9,93		4,91	6,20				2,51	11,15	11,04	
Диэтиланилин	6,52								10,20	10,60	6,26	7,20					12,08		

<i>n</i> -Хлоранилин	4,00		4,66					9,27		5,34			3,26				7,99	
<i>m</i> -Хлоранилин	3,52		4,35					9,25		4,85		8,40	2,75				7,74	
<i>o</i> -Нитроанилин	0,29							6,95										
<i>m</i> -Нитроанилин	2,50		4,25					6,70		3,97		7,40					6,62	
<i>n</i> -Нитроанилин	1,02	1,29	1,01							3,52							5,18	
Пиридин	5,15	5,54	4,30	5,92	5,69		5,50	10,0	9,90	5,77	6,94		4,43	3,30	3,40	11,92	12,16	19,33
<i>n</i> -Толуидин	5,07	6,60	6,30							6,57	6,81		5,81			10,90	9,80	11,25
<i>m</i> -Толуидин	4,71	3,20	5,90							6,15							9,70	
α -Пиколин	5,95	6,24	5,54	6,38	6,09					6,64								
α -Нафтиламин	3,92	5,66	5,10				5,05	9,60		5,42	6,38					9,71		
Дифениламин	0,90	3,18						7,45		3,87							5,24	
Ацетамид	0,48							6,75	8,60					9,50				
Ацетоксим	1,81							8,42										
Тиомочевина	0,96							7,75										
Эфедрин	9,70			11,29					8,90									
Атропин	9,60								11,30									
Цитозин	9,40				12,50													
Новокаин	8,80								11,30				8,60					
Промедол	8,40								11,30		14,40		8,20					
Морфолин	8,70			10,14	9,19					16,61			15,18	16,61		15,80		
Тебаин	8,30										11,01							
Димедрол	8,20												7,70					
Платифилин	8,10								11,50									
Кодеин	8,00	8,60	11,40	9,38			5,11		10,80	9,62	11,81		8,30					
Морфин	7,80	8,60		9,51			5,08			9,57			8,30					
Гидразин	8,11				11,10													
Хинин	8,00			5,23					11,50				8,75					
Бруцин	7,96											12,90						
Этилморфин	7,90								11,10									
Спазмолитин	7,70								11,60		13,60		7,00					
Пилокарпин	6,80								10,90									
Резерпин	6,60								9,54									
Наркотин	6,20	7,20								8,10	8,30							
Гидроксиламин	5,97				9,00													
Папаверин	5,90	6,92		7,25					10,80	8,03			6,60					
Тифен	6,30								11,30		13,40							
Уротропин	4,90							9,70	7,00		9,80							
Хинолин	4,80		4,58	5,39	5,27			9,86		5,41						11,40		
Амидопирин	4,80								9,13		6,20							
Дибазол	4,20								9,00				6,40					
Акридин	4,11																	
Теофилин	2,60								6,60									
Фенацетин	2,20								6,00		3,20							

2.6.1. СТЕРИЛЬНОСТЬ

Испытание применяется для субстанций, лекарственных средств или изделий, которые, в соответствии с Фармакопеей, должны быть стерильны. Однако удовлетворительный результат показывает лишь то, что в условиях испытания в испытуемом образце не обнаружено микроорганизмов.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРОТИВ МИКРОБНОЙ КОНТАМИНАЦИИ

Испытание на стерильность выполняют в асептических условиях. Для достижения таких условий обстановка, в которой выполняется испытание, должна быть адаптирована к способу его проведения. Меры предосторожности, принимаемые против контаминации, не должны влиять ни на один из микроорганизмов, обнаруживаемых в ходе испытания. Рабочие условия, в которых выполняется испытание, регулярно контролируются путем отбора проб воздуха и поверхностей рабочей зоны, а также проведением соответствующих контрольных испытаний.

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ И ТЕМПЕРАТУРЫ ИНКУБАЦИИ

Среды для проведения испытаний могут быть приготовлены в соответствии с приведенными ниже указаниями; также могут использоваться эквивалентные коммерчески доступные среды при условии, что они выдерживают испытания на питательные свойства.

Показано, что следующие питательные среды являются подходящими для испытания на стерильность. Жидкая тиогликолевая среда предназначена в первую очередь для культивирования анаэробных бактерий, но также пригодна для обнаружения и аэробных бактерий. Среда на основе гидролизатов соевых бобов и казеина [#](и среда Сабуро)[#] подходит для культивирования как грибов, так и аэробных бактерий. Могут быть использованы также и другие среды при условии их соответствия требованиям испытаний на пригодность.

ЖИДКАЯ ТИОГЛИКОЛЕВАЯ СРЕДА

L-Цистин	0,5 г
Агар	0,75 г
Натрия хлорид	2,5 г
Глюкоза моногидрат/глюкоза безводная	5,5 г / 5,0 г
Дрожжевой экстракт (водорастворимый)	5,0 г
Панкреатический гидролизат казеина	15,0 г
Натрия тиогликолят или тиогликолевая кислота	0,5 г 0,3 мл
Раствор 1 г/л резазурина натрия свежеприготовленный	1,0 мл
Вода Р	1000 мл
рН среды после стерилизации 7,1±0,2	

Смешивают L-цистин, агар, натрия хлорид, глюкозу, водорастворимый дрожжевой экстракт и панкреатический гидролизат казеина с 1000 мл воды Р и нагревают до получения раствора. Натрия тиогликолят или тиогликолевую кислоту растворяют в полученной смеси и, при необходимости, прибавляют 1 М раствор гидроксида натрия так, чтобы после стерилизации значение рН раствора составляло 7,1±0,2. Если необходима фильтрация, раствор снова нагревают, не доводя до кипения, и фильтруют в горячем виде через увлажненную фильтровальную бумагу. Прибавляют раствор резазурина натрия,

перемешивают и помещают среду в подходящие сосуды, которые обеспечивают такое отношение поверхности к глубине среды, чтобы изменению окраски, указывающему на поглощение кислорода в конце периода инкубирования, был подвержен только верхний слой, составляющий не более трети от общего объема среды. Стерилизуют с использованием валидированного процесса. Среду хранят при температуре от 2 °С до 25 °С в стерильном воздухонепроницаемом контейнере. Если верхний слой, составляющий не более трети от общего объема среды, приобретает розовую окраску, среду можно однократно регенерировать путем нагрева контейнеров на водяной бане или в струе пара до исчезновения розовой окраски с последующим быстрым охлаждением; при этом должны быть приняты меры предосторожности против попадания в контейнер нестерильного воздуха. Среду не используют по истечении валидированных сроков хранения.

Жидкую тиогликолевую среду инкубируют при температуре от 30 °С до 35 °С.

Для продуктов, содержащих ртутьсодержащие консерванты, которые не представляется возможным контролировать методом мембранной фильтрации, может использоваться жидкая тиогликолевая среда, инкубированная при температуре от 20 °С до 25 °С, вместо среды на основе гидролизатов соевых бобов и казеина при условии ее пригодности на основании результатов испытаний на ростовые свойства.

В тех случаях, когда это описано или оправдано и обосновано, может быть использована следующая альтернативная тиогликолевая среда. Готовят смесь, имеющую тот же состав что и жидкая тиогликолевая среда, но не включающую агар и раствор резазурина натрия; стерилизуют, как указано выше. Значение рН среды после стерилизации – (7,1±0,2). Нагревают на водяной бане перед использованием и инкубируют при температуре от 30 °С до 35 °С в анаэробных условиях.

Среда на основе гидролизатов соевых бобов и казеина

Панкреатический гидролизат казеина	17,0 г
Папаиновый гидролизат сои	3,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Дикалия гидрофосфат	2,5 г
Глюкоза моногидрат/глюкоза безводная	2,5 г / 2,3 г
<i>Вода Р</i>	1000 мл
рН среды после стерилизации	7,3±0,2

Твердые компоненты растворяют в *воде Р*, слегка нагревая для получения раствора. Раствор охлаждают до комнатной температуры. При необходимости прибавляют *1 М раствор гидроксида натрия* так, чтобы после стерилизации значение рН раствора составляло (7,3±0,2). Раствор фильтруют (при необходимости устранения мутности), разливают по подходящим сосудам и стерилизуют с использованием валидированного процесса. Если среда не подлежит немедленному использованию, ее хранят при температуре от 2 °С до 25 °С в стерильном плотнокупоренном контейнере. Среду не используют по истечении валидированных сроков хранения.

Среду на основе гидролизатов соевых бобов и казеина инкубируют при температуре от 20 °С до 25 °С.

[#]Допускается использование среды Сабуро:

Пептон ферментативный	10,0 г
Глюкоза моногидрат/глюкоза безводная	40,0 г / 36,4 г
<i>Вода Р</i>	до 1000 мл
рН среды после стерилизации	5,6±0,2

Среду Сабуро инкубируют при температуре от 20 °С до 25 °С.[#]

Используемые среды должны выдерживать следующие испытания, проводимые до испытания продукта или параллельно с ним.

Стерильность. Порции среды инкубируют в течение 14 дней. Роста микроорганизмов наблюдаться не должно.

Ростовые свойства сред в отношении аэробов, анаэробов и грибов. Проверке подвергают каждую партию готовой среды и каждую партию среды, приготовленной из обезвоженных составов или ингредиентов. Подходящие штаммы микроорганизмов приведены в таблице 2.6.1.-1.

Порции жидкой тиогликолевой среды инокулируют небольшим количеством (не более 100 КОЕ) микроорганизмов, используя отдельную порцию среды для каждого из следующих штаммов: *Clostridium sporogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*. Порции среды на основе гидролизатов соевых бобов и казеина[#] (или среды Сабуро)[#] засевают небольшим количеством (не более 100 КОЕ) микроорганизмов, используя отдельную порцию среды для каждого из следующих штаммов: *Aspergillus brasiliensis*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*. Инкубируют в течение не более 3 дней[#] (при температуре от 30 °С до 35 °С)[#] в случае бактерий и не более 5 дней[#] (при температуре от 20 °С до 25 °С)[#] в случае грибов.

При получении рабочей культуры, используемой при проведении испытания, число пересевов, произведенных от исходного штамма, не должно превышать пяти.

Среды являются пригодными при условии наличия четкого визуально наблюдаемого роста микроорганизмов.

Таблица 2.6.1.-1

Штаммы тест-микроорганизмов, пригодные для испытаний питательных сред

Аэробные бактерии	
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538, CIP 4.83, NCTC 10788, NCIMB 9518, NBRC 13276, [#] ATCC 6538-P [#]
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633, CIP 52.62, NCIMB 8054, NBRC 3134
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118, NBRC 13275
Анаэробные бактерии	
<i>Clostridium sporogenes</i>	ATCC 19404, CIP 79.3, NCTC 532, ATCC 11437, NBRC 14293, [#] ГИСК 272 [#]
Грибы	
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231, IP 48.72, NCPF 3179, NBRC 1594, [#] ATCC 885-653 [#]
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404, IP 1431.83, IMI 149007, NBRC 9455

ПРОВЕРКА ПРИГОДНОСТИ

Проверку пригодности методики выполняют в соответствии с нижеприведенным описанием испытания на стерильность испытуемого образца с использованием такого же метода, но со следующими модификациями.

Мембранная фильтрация. После переноса содержимого испытуемого контейнера или контейнеров на мембрану заключительную порцию стерильного растворителя, используемого для промывки фильтра, инокулируют небольшим количеством жизнеспособных микроорганизмов (не более 100 КОЕ).

Прямая инокуляция. После внесения в питательную среду содержимого испытуемого контейнера или контейнеров ту же среду инокулируют небольшим количеством жизнеспособных микроорганизмов (не более 100 КОЕ).

В обоих случаях используют штаммы микроорганизмов, приведенные выше в описании испытания ростовых свойств в отношении аэробов, анаэробов и грибов. За положительный контроль принимают результаты испытания ростовых свойств используемых сред. Все контейнеры, содержащие питательную среду, инкубируют не более 5 дней.

Если после периода инкубации отчетливо наблюдается рост микроорганизмов, визуально сравнимый с ростом в контрольном сосуде, не содержащем испытуемого образца, делают вывод, что либо продукт в условиях испытания не обладает антимикробной активностью, либо такая активность была в достаточной степени исключена. В таком случае испытание на стерильность может проводиться без дальнейших модификаций.

Если после периода инкубации не наблюдается роста микроорганизмов, визуально сравнимого с ростом в контрольном сосуде, не содержащем испытуемого образца, делают

вывод, что продукт обладает антимикробной активностью, которая в условиях испытания не была в достаточной степени исключена. Условия подвергают модификациям с целью исключения антимикробной активности и повторяют испытание на пригодность.

Испытание на проверку пригодности следует проводить в следующих случаях:

- а) когда проводится испытание на стерильность новой продукции;
- б) при внесении любых изменений в экспериментальные условия испытания.

Проверка пригодности может выполняться одновременно с контролем стерильности испытуемой продукции.

[#]Частные статьи должны содержать сведения о наличии антимикробного действия продукта и рекомендации по его устранению.[#]

ИСПЫТАНИЕ НА СТЕРИЛЬНОСТЬ ИСПЫТУЕМОГО ОБРАЗЦА

Испытание может быть выполнено с использованием метода мембранной фильтрации или путем прямой инокуляции питательной среды испытуемым образцом. Должны проводиться соответствующие отрицательные контрольные опыты. В тех случаях, когда позволяет природа продукта (фильтруемые водные, спиртовые или масляные образцы, а также образцы, смешиваемые или растворимые в водных или масляных растворителях, не обладающих антимикробным эффектом в условиях испытания), следует предпочесть метод мембранной фильтрации.

Мембранная фильтрация. Используют мембранные фильтры с номинальным размером пор, не превышающим 0,45 мкм, с установленной способностью к удерживанию бактерий. Например, фильтры на основе нитрата целлюлозы используют для водных, масляных и разбавленных спиртовых растворов, а фильтры на основе ацетата целлюлозы – в частности, для растворов с высоким содержанием спирта. Для некоторых видов продукции, например, для антибиотиков, могут потребоваться специально подготовленные фильтры.

В нижеописанном методе предполагается использование мембран диаметром около 50 мм. При использовании фильтров других диаметров объемы разведений и промывок должны быть изменены соответствующим образом. Аппарат для фильтрации и мембрану стерилизуют подходящим способом. Конструкция аппарата должна обеспечивать введение и фильтрацию испытуемого раствора в асептических условиях, извлечение мембраны для ее переноса в питательную среду или проведение инкубации после помещения питательной среды в аппарат.

Водные растворы. Небольшое количество подходящего стерильного растворителя, не подавляющего рост микроорганизмов, например, нейтрального раствора 1 г/л мясного или казеинового пептона (рН (7,1±0,2)), помещают на мембрану аппарата и фильтруют. Растворитель может содержать подходящие нейтрализующие и/или инактивирующие вещества, например, в случае антибиотиков.

Содержимое контейнера или контейнеров, подлежащих испытанию, переносят на мембрану (мембраны), при необходимости после разведения до объема, используемого в испытании на пригодность, выбранным стерильным растворителем; в любом случае, используют количество испытуемого образца не менее указанного в таблице 2.6.1.-2. Немедленно фильтруют. Если испытуемый раствор обладает антимикробным действием, мембрану не менее трех раз промывают путем пропускания через нее каждый раз объема выбранного стерильного растворителя, указанного в испытании на пригодность. Число циклов промывки должно быть не более 5 из расчета по 100 мл на фильтр, даже если при проверке пригодности было показано, что такая промывка не полностью исключает антимикробное действие. Мембрану целиком переносят в питательную среду или в асептических условиях делят ее на две равные части, каждую из которых помещают в две подходящие среды. Используют такие же объемы питательных сред, как и в испытании на пригодность. Кроме того, среда может быть нанесена на мембрану в аппарате. Среда инкубируют в течение не менее 14 дней.

Твердые растворимые вещества. Для каждой среды используют количество продукта, не менее указанного в таблице 2.6.1.-2, растворенного в подходящем растворителе, например, растворителе, прилагаемом к лекарственному средству, изотоническом растворе натрия хлорида или нейтральном растворе 1 г/л мясного или

казеинового пептона, и продолжают испытание по методике, описанной выше, для водных растворов, с использованием мембраны, соответствующей выбранному растворителю.

Масла и масляные растворы. Для каждой среды используют количество продукта не менее указанного в таблице 2.6.1.-2. Масла и масляные растворы, обладающие достаточно низкой вязкостью, могут быть подвергнуты фильтрованию через сухую мембрану без разбавления. Вязкие масла могут быть при необходимости разбавлены подходящим стерильным растворителем, для которого показано отсутствие антимикробной активности в условиях испытания, например, изопропилмиристатиом. Дают маслу проникнуть в мембрану под действием собственной тяжести, затем фильтруют, постепенно увеличивая давление или вакуум. Мембрану промывают путем фильтрования не менее трех порций по 100 мл подходящего стерильного растворителя, например, нейтрального раствора 1 г/л мясного или казеинового пептона, содержащего подходящий эмульгатор в концентрации, приемлемость которой была подтверждена в ходе испытания на пригодность, например, 10 г/л полисорбата 80. Мембрану или мембраны переносят в питательную среду или среды (или наоборот) в соответствии с указаниями, приведенными выше для водных растворов, и инкубируют при таких же температурах в течение тех же промежутков времени.

Мази и кремы. Для каждой среды используют количество продукта не менее указанного в таблице 2.6.1.-2. Мази на жирной основе и водно-масляные эмульсии могут быть разбавлены до содержания 1 % изопропилмиристатиом, как описано выше, при необходимости при нагревании до температуры, не превышающей 40 °С. В исключительных случаях может оказаться необходимым нагрев до температуры, не превышающей 44 °С. Фильтруют насколько возможно быстро и продолжают испытание в соответствии с указаниями, приведенными выше для масел и масляных растворов.

Таблица 2.6.1.-2

Минимальные количества испытуемого продукта, используемые для каждой питательной среды

Количество в контейнере	Минимальное количество, которое следует использовать для посева на каждую среду, если не обосновано и не разрешено использование других количеств
<i>Для жидкостей</i> — менее 1 мл — 1–40 мл — более 40 мл, но не более 100 мл — более 100 мл	Все содержимое каждого контейнера Половина содержимого каждого контейнера, но не менее 1 мл 20 мл 10 % содержимого контейнера, но не менее 20 мл
<i>Для жидкостей, содержащих антибиотики</i>	1 мл
<i>Нерастворимые лекарственные средства, кремы и мази, подлежащие суспендированию или эмульгированию</i>	Все содержимое каждого контейнера, составляющее не менее 200 мг
<i>Для твердых веществ</i> Менее 50 мг 50 мг и более, но не менее 300 мг От 300 мг до 5 г Более 5 г	Все содержимое каждого контейнера Половина содержимого каждого контейнера, но не менее 50 мг 150 мг 500 мг

Прямая инокуляция питательной среды. Количество испытуемого продукта, предписанное в таблице 2.6.1.-2, помещают непосредственно в питательную среду. При этом объем продукта должен составлять не более 10 % объема среды, если нет других указаний.

Если испытуемый продукт обладает антимикробной активностью, испытания выполняют после нейтрализации подходящим нейтрализующим агентом или путем разведения в достаточном количестве питательной среды. При необходимости использования большого объема продукта предпочтительнее использовать концентрированную питательную среду, приготовленную с учетом последующего

разбавления. Если это удобно, концентрированная среда может быть добавлена непосредственно к продукту в контейнере.

Масляные жидкости. Используют среды с добавкой подходящего эмульгатора в концентрации, приемлемость которой была подтверждена в ходе испытания на пригодность, например, 10 г/л полисорбата 80.

Мази и кремы. Готовят разбавлением в соотношении около 1:10 путем эмульгирования с использованием избранного эмульгатора в подходящем стерильном растворителе, например, растворе мясного или казеинового пептона, концентрацией 1 г/л. Разбавленный продукт переносят в среду, не содержащую эмульгатора.

Инокулированную среду инкубируют в течение не менее 14 дней. Состояние культур оценивают несколько раз в течение инкубационного периода. Инокулированные среды, содержащие масляные продукты, ежедневно осторожно встряхивают. Однако при использовании тиогликолевой или другой аналогичной среды для определения анаэробных микроорганизмов встряхивание или перемешивание сводят к минимуму для поддержания анаэробных условий.

НАБЛЮДЕНИЕ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Время от времени в течение периода инкубации, а также по его завершении оценивают наличие макроскопических признаков микробного роста в средах. Если внесение испытуемого материала приводит к помутнению питательной среды, вследствие чего наличие или отсутствие микробного роста не может быть легко определено визуально, следует через 14 дней после начала инкубации перенести порции среды (каждая объемом не менее 1 мл) в другие сосуды, содержащие свежую аналогичную среду, и инкубировать исходные сосуды и сосуды с перенесенными порциями в течение 4 дней.

Если признаков микробного роста не обнаруживается, то продукт признают выдерживающим испытание на стерильность. При наличии признаков микробного роста продукт не выдерживает испытание на стерильность, если не может быть показано путем повторного испытания или другим способом, что результаты испытания не являются достоверными по причинам, не связанным с испытуемым продуктом. Результаты испытания могут быть признаны недостоверными лишь при выполнении не менее одного из перечисленных ниже критериев:

- a) данные микробиологического мониторинга зоны проверки стерильности указывают на произошедшие сбои;
- b) проверка методики, используемой в данном испытании, привела к обнаружению недочетов;
- c) в отрицательном контроле был обнаружен микробный рост;
- d) после установления типа микроорганизмов, выделенных в ходе испытания, рост этого штамма (этих штаммов) может быть однозначно приписан ошибкам, вносимым материалами и/или методиками, используемыми при проведении испытания.

Если результаты испытания признаны недостоверными, испытание повторяют, используя то же количество образцов, что и в первоначальном испытании.

Если признаков микробного роста в ходе повторного испытания не обнаруживается, то продукт признают выдерживающим испытание на стерильность. Если в ходе повторного испытания обнаруживается рост, то продукт не выдерживает испытание на стерильность.

ПРИМЕНЕНИЕ ИСПЫТАНИЯ К ЛЕКАРСТВЕННЫМ СРЕДСТВАМ ДЛЯ ПАРЕНТЕРАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ, ОФТАЛЬМОЛОГИЧЕСКИМ И ДРУГИМ НЕИНЪЕКЦИОННЫМ ЛЕКАРСТВЕННЫМ СРЕДСТВАМ, ДЛЯ КОТОРЫХ ТРЕБУЕТСЯ ВЫПОЛНЕНИЕ ИСПЫТАНИЯ НА СТЕРИЛЬНОСТЬ

При использовании метода мембранной фильтрации используют, где это возможно, все содержимое контейнера, но не менее чем в количестве, указанном в таблице 2.6.1.-2, при необходимости разбавляя приблизительно до 100 мл подходящим стерильным раствором, например, нейтральным раствором 1 г/л мясного или казеинового пептона.

При использовании метода прямой инокуляции питательной среды используют количества, указанные в таблице 2.6.1.-2, если не оправдано и не разрешено применение других количеств. Испытания на стерильность в отношении бактерий и грибов выполняют

на одном и том же образце испытуемого продукта. В случаях, когда объем или количество, содержащиеся в контейнере, являются недостаточными для проведения испытаний, для инокуляции различных сред используют содержимое двух или более контейнеров.

МИНИМАЛЬНОЕ КОЛИЧЕСТВО ЕДИНИЦ ПРОДУКЦИИ ДЛЯ ИСПЫТАНИЯ

Минимальное количество единиц продукции для испытания в зависимости от размера серии указано в таблице 2.6.1.-3.

Руководства по применению испытания на стерильность приведены в главе 5.1.9.

Таблица 2.6.1.-3

Минимальное количество единиц продукции для испытания

Количество единиц в партии*	Минимальное количество единиц продукции для каждой среды, если не обосновано и не разрешено иное**
<i>Лекарственные средства для парентерального применения</i>	
– Не более 100 контейнеров	10 % или 4 контейнера, в зависимости от того, что больше
– Более 100, но не более 500 контейнеров	10 контейнеров
– Более 500 контейнеров	2 % или 20 контейнеров (10 контейнеров для лекарственных средств для парентерального применения большого объема), в зависимости от того, что меньше
<i>Офтальмологические и другие неинъекционные лекарственные средства</i>	
– Не более 200 контейнеров	5 % или 2 контейнера, в зависимости от того, что больше
– Более 200 контейнеров	10 контейнеров
– В случаях, когда продукция представлена в форме однодозовых контейнеров, применяют указанную выше схему для лекарственных средств для парентерального применения	
<i>Твердые продукты «in bulk»</i>	
– До 4 контейнеров	Каждый контейнер
– Более 4 контейнеров, но не более 50 контейнеров	20 % или 4 контейнера, в зависимости от того, что больше
– Более 50 контейнеров	2 % или 10 контейнеров, в зависимости от того, что больше

* Если размер серии неизвестен, используют максимальное количество единиц для испытания.

** Если содержимого одного контейнера достаточно для инокуляции двух сред, то в данной колонке дано количество контейнеров, необходимое для обеих сред.

01/2013:20602

2.6.2. МИКОБАКТЕРИИ

Если испытуемый образец может содержать микроорганизмы, отличные от микобактерий, его обрабатывают подходящим деконтаминирующим раствором, например, раствором ацетилцистеина и гидроксида натрия или раствором натрия лаурилсульфата.

На каждую из двух подходящих твердых питательных сред (например, среда Левенштейна-Йенсена или среда Миддлбрук 7H10) наносят по 0,2 мл образца. Эксперимент выполняют в трех повторностях. В подходящую жидкую питательную среду также в трех повторностях вносят по 0,5 мл образца. Все среды инкубируют при температуре 37 °C в течение 56 дней.

Устанавливают способность среды к обеспечению роста в присутствии испытуемого образца путем инокуляции подходящего штамма семейства *Mycobacterium*, например, BCG, и, при необходимости, используют подходящий нейтрализующий агент.

Если в течение первых восьми дней инкубации наблюдается развитие посторонних микроорганизмов, испытание повторяют с одновременным проведением испытания на бактериологическую стерильность.

Испытуемый образец выдерживает испытание, если в конце инкубационного периода ни в одной из пробирок не наблюдается роста микобактерий.

01/2013:20607

2.6.7. МИКОПЛАЗМЫ

Если испытание на микоплазмы предписано для главного или рабочего банка клеток, для посевной партии вирусов или для контрольных клеток, применяют как метод культивирования, так и метод индикаторной клеточной культуры. Если испытание предписано для вирусного сбора, нефасованной вакцины (*in bulk*) или готовой партии (серии) продукта, применяют метод культивирования. Метод индикаторной клеточной культуры может при необходимости также использоваться для скрининга сред.

При условии надлежащей валидации вместо обоих этих методов могут использоваться методы амплификации нуклеиновых кислот (АНК, *NAT – nucleic acid amplification technique*).

МЕТОД КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

ВЫБОР ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ

Испытание выполняют с использованием достаточного количества как твердых, так и жидких питательных сред для того, чтобы в выбранных условиях инкубации был обеспечен рост небольшого количества микоплазм, которые могут присутствовать в испытуемом образце. Жидкие среды должны содержать феноловый красный. Для ряда сред показано наличие удовлетворительных питательных свойств, по крайней мере для ниже перечисленных организмов. Для каждой новой партии среды должны быть подтверждены питательные свойства в отношении соответствующих организмов из списка. При проведении испытания на содержание микоплазм в испытуемом образце по крайней мере один штамм из перечисленных ниже должен быть включен в качестве положительного контроля:

– *Acholeplasma laidlawii* (вакцины для медицинского и ветеринарного применения, в процессе производства которых используются антибиотики);

– *Mycoplasma gallisepticum* (в случаях, когда для производства вакцин используются материалы, имеющие птичье происхождение, или для вакцин, предназначенных для применения в птицеводстве);

– *Mycoplasma hyorhinis* (ветеринарные вакцины, кроме птичьих);

– *Mycoplasma orale* (вакцины для медицинского и ветеринарного применения);

– *Mycoplasma pneumoniae* (вакцины для медицинского применения) или другие подходящие виды, связанные с ферментацией D-глюкозы, например, *Mycoplasma fermentans*;

– *Mycoplasma synoviae* (в случаях, когда для производства вакцин используются материалы, имеющие птичье происхождение, или для вакцин, предназначенных для применения в птицеводстве).

Тест-штаммы представляют собой изоляты, подвергнутые ограниченному числу пассажей (не более чем 15) и хранящиеся в замороженном или лиофилизированном состоянии. После клонирования принадлежность штамма к требуемому виду определяется подходящим методом путем сравнения с типовыми культурами, например:

<i>A. laidlawii</i>	NCTC 10116	CIP 75.25	ATCC 23206
<i>M. gallisepticum</i>	NCTC 10115	CIP 104967	ATCC 19610
<i>M. fermentans</i>	NCTC 10117	CIP 105680	ATCC 19989
<i>M. hyorhinis</i>	NCTC 10130	CIP 104968	ATCC 17981
<i>M. orale</i>	NCTC 10112	CIP 104969	ATCC 23714
<i>M. pneumoniae</i>	NCTC 10119	CIP 103766	ATCC 15531
<i>M. synoviae</i>	NCTC 10124	CIP 104970	ATCC 25204

БСП Acholeplasma laidlawii, *БСП Micoplasma fermentans*, *БСП Mycoplasma hyorhinis*, *БСП Mycoplasma orale* и *БСП Mycoplasma synoviae* могут быть использованы в качестве стандартных штаммов с малым количеством пассажей.

УСЛОВИЯ ИНКУБАЦИИ

Жидкие питательные среды помещают в плотно закупоренные контейнеры и инкубируют при температуре от 35 °С до 38 °С. Твердые питательные среды инкубируют в микроаэрофильной атмосфере (азот, содержащий от 5 % до 10 % углерода диоксида и с достаточной влажностью, чтобы не высыхала поверхность агара) при температуре от 35 °С до 38 °С.

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СВОЙСТВА

Питательные свойства испытывают для каждой новой партии среды. Выбранные среды засевают соответствующими тест-микроорганизмами. На чашку диаметром 60 мм, содержащую 9 мл твердой среды, или в контейнер вместимостью 100 мл, содержащий жидкую среду, вносят не более 100 колониеобразующих единиц (КОЕ); для каждого вида организмов используют отдельные чашки и контейнеры. Среда инкубируют и через указанные интервалы делают пересев 0,2 мл жидкой среды на твердую среду (см. Испытание анализируемого продукта на микоплазмы). Твердая среда выдерживает испытание, если наблюдается адекватный рост каждого тест-микроорганизма (наблюдаемый рост отличается не более чем в 5 раз по отношению к первичному материалу). Жидкая среда выдерживает испытание, если обнаруживается рост хотя бы одного пересева для каждого испытываемого тест-микроорганизма на чашке с агаром, на которую был совершен пересев из жидкой среды.

ИНГИБИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА

Испытание данного продукта на ингибирующие вещества проводят только один раз и повторяют в случае изменений в способе производства, которые могут повлиять на определение микоплазм.

Для демонстрации отсутствия ингибирующих веществ проводят испытание на питательные свойства в присутствии испытываемого образца и в его отсутствии. Если в отсутствии испытываемого образца рост хотя бы одного пересева тест-микроорганизмов происходит быстрее, чем в присутствии испытываемого образца, или если чашки, на которые напрямую был нанесен испытываемый образец, имеют менее 1/5 количества колоний, которое обнаруживается на чашках без испытываемого образца, это указывает на присутствие ингибирующих веществ, и их влияние должно быть нейтрализовано или учтено каким-либо иным способом, например, посевом на субстраты, не содержащие ингибиторов, или разведением в большем объеме среды перед испытанием. Если используется разведение, могут быть использованы или большие объемы среды, или объем первичного материала может быть разделен между несколькими колбами вместимостью 100 мл. Эффективность нейтрализации или иного способа проверяется повторением испытания на ингибирующие вещества после нейтрализации.

ИСПЫТАНИЕ ИСПЫТУЕМОГО ПРОДУКТА НА МИКОПЛАЗМЫ

В каждую жидкую среду вносят испытываемый образец в количестве 10 мл на 100 мл среды. Если при прибавлении испытываемого образца происходит существенное изменение показателя pH, исходное значение восстанавливают прибавлением раствора кислоты хлористоводородной или натрия гидроксида. На каждую чашку наносят по 0,2 мл испытываемого образца. Жидкие среды инкубируют в течение 20–21 дня. Твердые среды инкубируют в течение не менее 14 дней, за исключением соответствующих 20–21 дневным посевам, которые инкубируют в течение 7 дней. Одновременно инкубируют порции по 100 мл каждой жидкой среды и чашки с агаром без испытываемого образца в качестве отрицательного контроля. На 2–4 день после инокуляции выполняют посев по 0,2 мл каждой из жидких культур по крайней мере на 1 чашку каждой твердой среды. Данную процедуру повторяют на 6–8 день, на 13–15 день и на 19–21 день испытания. Состояние

жидких сред контролируют каждые два или три дня и, в случае изменения окраски, выполняют пересев. Если в жидкой среде обнаруживаются бактериальные или грибковые контаминации, испытание считают недействительным. Испытание считают действительным, если может быть проведена оценка по крайней мере одной чашки с каждой средой и каждым выполненным посевом. В испытание включают положительный контроль, приготовленный инокуляцией не более 100 КОЕ по крайней мере одного тест-микроорганизма на среду с агаром или в бульонную среду. В случае регулярного проведения испытания на микоплазмы рекомендуется по возможности чередовать тест-микроорганизмы. Тест-микроорганизмы перечислены в разделе «Выбор питательной среды».

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

В конце периодов инкубации все инокулированные твердые среды изучают под микроскопом для установления наличия колоний микоплазм. Образец выдерживает испытание, если ни на одной инокулированной среде не обнаружено роста микоплазм. Образец не выдерживает испытание, если на любой из твердых сред обнаруживается рост типичных колоний микоплазм. Испытание является недействительным, если в одном или более положительном контроле не обнаруживается рост микоплазм хотя бы на одной чашке посева. Испытание является недействительным, если в одном или более отрицательном контроле обнаруживается рост микоплазм. При обнаружении подозрительных колоний может быть использован валидированный метод определения их принадлежности к микоплазмам.

Следующий раздел приводится для информации

СРЕДЫ, РЕКОМЕНДУЕМЫЕ ДЛЯ МЕТОДА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Рекомендуются нижеследующие среды. Могут использоваться и другие среды при условии, что на каждой партии в присутствии и отсутствии испытуемого продукта продемонстрирована способность к поддержанию роста микоплазм.

СРЕДЫ ХЕЙФЛИКА (HAYFLICK) (РЕКОМЕНДОВАНЫ ДЛЯ ОБЩЕГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКОПЛАЗМ)

Жидкая среда

Бульон из экстракта говяжьего сердца (1)	90,0 мл
Лошадиная сыворотка (не подвергнутая нагреву)	20,0 мл
Дрожжевой экстракт (250 г/л)	10,0 мл
Феноловый красный (раствор 0,6 г/л)	5,0 мл
Пенициллин (20 000 МЕ/мл)	0,25 мл
Дезоксирибонуклеиновая кислота (раствор 2 г/л)	1,2 мл

Значение pH доводят до 7,8.

Твердая среда

Готовят, как указано выше, заменяя бульон из экстракта говяжьего сердца на агар из экстракта говяжьего сердца, содержащий 15 г/л агара.

СРЕДЫ ФРЕЯ (FREY) (РЕКОМЕНДОВАНЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ M. SYNOVIAE)

Бульон из экстракта говяжьего сердца (1)	90,0 мл
Смесь незаменимых витаминов (2)	0,025 мл
Глюкоза моногидрат (раствор 500 г/л)	2,0 мл
Свиная сыворотка (инактивированная при температуре 56 °C в течение 30 мин)	12,0 мл
β-Никотинамидадениндинуклеотид (раствор 10 г/л)	1,0 мл
Цистеина гидрохлорид (раствор 10 г/л)	1,0 мл
Феноловый красный (раствор 0,6 г/л)	5,0 мл

Пенициллин (20 000 МЕ/мл)

0,25 мл

Смешивают растворы β -никотинамидадениндинуклеотида и цистеина гидрохлорида и через 10 мин прибавляют к остальным компонентам. Значение рН доводят до 7,8.

Твердая среда

Бульон из экстракта говяжьего сердца (1)

90,0 мл

Агар очищенный (3)

1,4 г

Значение рН доводят до 7,8, стерилизуют автоклавированием, после чего прибавляют:

Смесь незаменимых витаминов (2)

0,025 мл

Глюкоза моногидрат (раствор 500 г/л)

2,0 мл

Свиная сыворотка (не подвергнутая нагреву)

12,0 мл

β -Никотинамидадениндинуклеотид (раствор 10 г/л)

1,0 мл

Цистеина гидрохлорид (раствор 10 г/л)

1,0 мл

Феноловый красный (раствор 0,6 г/л)

5,0 мл

Пенициллин (20 000 МЕ/мл)

0,25 мл

СРЕДЫ ФРИИСА (FRIS) (РЕКОМЕНДОВАНЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКОПЛАЗМ, ИМЕЮЩИХ ОТЛИЧНОЕ ОТ ПТИЧЬЕГО ПРОИСХОЖДЕНИЕ)

Жидкая среда

Сбалансированный солевой раствор Хэнкса (модифицированный) (4)

800 мл

Вода дистиллированная

67 мл

Экстракт из сердца и мозгов (5)

135 мл

Бульон *PPLO* (6)

248 мл

Дрожжевой экстракт (170 г/л)

60 мл

Бацитрацин

250 мг

Метициллин

250 мг

Феноловый красный (5 г/л)

4,5 мл

Лошадиная сыворотка

165 мл

Свиная сыворотка

165 мл

Значение рН доводят до 7,40–7,45.

Твердая среда

Сбалансированный солевой раствор Хэнкса (модифицированный) (4)

200 мл

DEAE-декстран [#](диэтиламиноэтилдекстран)[#]

200 мг

Агар очищенный (3)

15,65 г

Хорошо перемешивают и стерилизуют автоклавированием. Охлаждают до температуры 100 °С. Прибавляют к 1740 мл вышеописанной жидкой среды.

(1) Бульон из экстракта говяжьего сердца

Говяжье сердце (для приготовления экстракта)

500 г

Пептон

10 г

Натрия хлорид

5 г

Вода дистиллированная

до 1000 мл

Стерилизуют автоклавированием.
(2) *Смесь незаменимых витаминов*

Биотин	100 мг
Кальция пантотенат	100 мг
Холина хлорид	100 мг
Фолиевая кислота	100 мг
<i>l</i> -Инозит	200 мг
Никотинамид	100 мг
Пиридоксаль гидрохлорид	100 мг
Рибофлавин	10 мг
Тиамин гидрохлорид	100 мг
Вода дистиллированная	до 1000 мл

(3) *Агар очищенный (ионагар)*

Высокочистый агар для использования в микробиологии и иммунологии готовят ионообменным методом с получением продукта исключительной чистоты, прозрачности и прочности образующегося геля. Содержит приблизительно:

Вода	12,2 %
Зола	1,5 %
Зола, нерастворимая в кислоте	0,2 %
Хлор	0
Фосфаты (в пересчете на P_2O_5)	0,3 %
Общий азот	0,3 %
Медь	8 ppm
Железо	170 ppm
Кальций	0,28 %
Магний	0,32 %

(4) *Сбалансированный солевой раствор Хэнкса (модифицированный)*

Натрия хлорид	6,4 г
Калия хлорид	0,32 г
Магния сульфат гептагидрат	0,08 г
Магния хлорид гексагидрат	0,08 г
Кальция хлорид безводный	0,112 г
Натрия гидрофосфат дигидрат	0,0596 г
Калия дигидрофосфат безводный	0,048 г
Вода дистиллированная	до 800 мл

(5) *Экстракт из сердца и мозгов*

Экстракт мозга телят	200 г
Экстракт говяжьего сердца	250 г
Протеозный пептон	10 г
Глюкоза моногидрат	2 г
Натрия хлорид	5 г

Натрия гидрофосфат безводный	2,5 г
Вода дистиллированная	до 1000 мл

(6) Бульон PPLO

Экстракт говяжьего сердца	50 г
Пептон	10 г
Натрия хлорид	5 г
Вода дистиллированная	до 1000 мл

МЕТОД ИНДИКАТОРНОЙ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ

Клеточные культуры окрашиваются флуоресцентным красителем, обладающим способностью связываться с ДНК. Микоплазмы детектируются по их характерной точечной или волокнистой флуоресценции на клеточной поверхности и, при высоком уровне загрязнения, в прилегающем пространстве. Митохондрии в цитоплазме также могут окрашиваться, однако они легко распознаются.

Если в случае вирусных суспензий затруднена интерпретация результатов из-за значительных цитопатических эффектов, вирусы могут быть нейтрализованы с помощью специфичной иммунной сыворотки, которая бы не влияла на микоплазмы, или с помощью субстрата клеточной культуры, препятствующей росту вирусов. Для доказательства отсутствия ингибирующего эффекта сыворотки проводят положительные контроли в присутствии и отсутствии иммунной сыворотки.

ПРОВЕРКА СУБСТРАТА

Для обнаружения микоплазм используют клеточную культуру Веро или иную эквивалентную по эффективности клеточную культуру (например, производственную линию клеток). Проверяют эффективность используемых клеток, используя описанную ниже методику и инокулируя не более 100 КОЕ или КОЕ-подобных микроорганизмов подходящих штаммов сравнения *M. hyorhinae* и *M. orale*. Могут быть использованы следующие штаммы:

<i>M. hyorhinae</i>			ATCC 29052
<i>M. orale</i>	NCTC 10112	CIP 104969	ATCC 23714

Клеточная культура является подходящей, если обнаруживаются оба штамма сравнения.

Индикаторные клетки должны быть пересеяны без антибиотика перед использованием для испытания.

МЕТОД ИСПЫТАНИЯ

1. Среду однородно засевают культурой с подходящей плотностью (например, от $2 \cdot 10^4$ до $2 \cdot 10^5$ клеток в миллилитре; от $4 \cdot 10^3$ до $2,5 \cdot 10^4$ клеток на см^2), которая через 3 дня роста привела бы к слиянию. 1 мл испытуемого образца инокулируют в сосуд с клеточной культурой и инкубируют при температуре от 35 °C до 38 °C.

2. Не менее чем через 3 дня инкубирования, когда клеточный рост привел к слиянию, проводят пересев на покровные стекла в подходящих контейнерах или на другую подходящую поверхность (например, разделенные на камеры предметные стекла), пригодную для методики испытания. Клетки высевают с низкой плотностью так, чтобы через 3–5 дней инкубирования было достигнуто 50 % слияние. Необходимо избегать полного слияния, так как оно ослабляет визуализацию микоплазм после окрашивания.

3. Удаляют среду и ополаскивают индикаторные клетки фосфатным забуференным физиологическим раствором pH 7,4 Р, затем прибавляют подходящий фиксирующий раствор (при использовании бисбензимида Р для окрашивания, может быть использована свежеприготовленная смесь из 1 объема уксусной кислоты ледяной Р и 3 объемов метанола Р).

4. Удаляют фиксирующий раствор и промывают клетки стерильной *водой Р*. Если стекла должны будут окрашиваться более чем через 1 ч, их полностью высушивают (при окрашивании высушенных стекол должны быть приняты особые меры предосторожности во избежание возникновения артефактов).

5. Прибавляют подходящий краситель ДНК и выдерживают в течение необходимого времени (для *рабочего раствора бисбензимида Р* такое время составляет 10 мин).

6. Удаляют краситель и промывают монослой *водой Р*.

7. При необходимости подготавливают покровные стекла для исследования (для подготовки может быть использована смесь из равных объемов *глицерина Р* и *фосфатно-цитратного буферного раствора рН 5,5 Р*). Просматривают с использованием люминесцентного микроскопа (при применении бисбензимида в качестве красителя могут быть использованы фильтр возбуждения 330 нм/380 нм и барьерный фильтр *LP 440 нм*) при увеличении 400× или более.

8. Сравнивают микроскопическую картину тест-культур с микроскопическими картинками отрицательного и положительных контролей, изучая внеядерную флуоресценцию. Микоплазмы проявляют себя в виде точек или волокон, расположенных над цитоплазмой и иногда в межклеточном пространстве. Количество исследуемых микроскопических полей указывается в протоколе испытаний, установленном в процессе валидации.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Испытуемый образец выдерживает испытание, если в тест-культурах, на которые он был нанесен, нет признаков присутствия микоплазм. Результаты испытания недостоверны, если в положительных контролях не обнаруживается присутствие микоплазм. Результаты испытания недостоверны, если в отрицательных контролях обнаруживается присутствие микоплазм.

МЕТОД АМПЛИФИКАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Методы амплификации нуклеиновых кислот (2.6.21) могут быть использованы для обнаружения микоплазм с помощью амплификации нуклеиновых кислот, экстрагированных из испытуемого образца, и с использованием специфических праймеров, которые позволяют выявить присутствие целевых нуклеиновых кислот. Данные методы указывают на присутствие отдельных последовательностей нуклеиновых кислот и не обязательно на присутствие жизнеспособных микоплазм. Для проведения определения доступны несколько различных методик. В данном общем разделе не описываются конкретные методики проведения испытаний. Используемая методика должна быть соответствующим образом валидирована с учетом рекомендаций, приведенных в конце данного раздела. В случае использования коммерчески доступных наборов некоторые элементы валидации могут быть проведены производителем, и данная информация может быть представлена пользователю, однако необходимо помнить, что полная информация относительно праймеров может быть недоступна, а производство наборов может быть изменено или прервано.

Методы амплификации нуклеиновых кислот используются, если это указано в частной фармакопейной статье. Также, после надлежащей валидации, они могут использоваться вместо метода культивирования и метода индикаторной клеточной культуры.

Прямой метод амплификации нуклеиновых кислот может быть использован в присутствии цитотоксического материала и в случае необходимости быстрого проведения испытания.

Обогащение клеточной культуры с последующей амплификацией нуклеиновых кислот: испытуемый образец и подходящий клеточный субстрат (указанный при описании метода индикаторной клеточной культуры) культивируют вместе в течение определенного периода времени; после этого экстрагированные из клеток и плавающие над осадком нуклеиновые кислоты используют для определения с помощью методов амплификации нуклеиновых кислот.

ВАЛИДАЦИЯ

Стандартные образцы необходимы на различных стадиях валидации, а также для контроля при проведении рутинных испытаний. В качестве стандартных образцов могут использоваться микоплазмы или нуклеиновые кислоты.

Для валидации предела обнаружения следующие штаммы представляют собой наилучший выбор благодаря частоте встречаемости в качестве контаминантов и благодаря филогенетическому родству:

- *A. laidlawii*;
- *M. fermentas*;
- *M. hyorhinis* (при обогащении клеточной культуры включают штамм, требовательный к питательным средам, такой как ATCC 29052);
- *M. orale*;
- *M. pneumoniae* или *M. gallisepticum*;
- *M. synoviae* (в случае использования или обработки материалами птичьего происхождения в процессе производства);
- *Mycoplasma arginini*;
- *Spiroplasma citri* (в случае использования или обработки материалами насекомых или растений в процессе производства).

Демонстрация специфичности требует использования подходящего ряда штаммов бактерий, отличных от микоплазм. Наиболее подходящими для валидации являются рода бактерий с близким к микоплазмам филогенетическим родством; в их число входят *Clostridium*, *Lactobacillus* и *Streptococcus*.

Сравнительные исследования для использования методов амплификации нуклеиновых кислот в качестве альтернативного метода. Для каждого штамма испытуемых микоплазм:

- в качестве альтернативы методу культивирования: должна быть показана возможность обнаруживать методами амплификации нуклеиновых кислот 10 КОЕ/мл;
- в качестве альтернативы методу индикаторной клеточной культуры: должна быть показана возможность обнаруживать методами амплификации нуклеиновых кислот 100 КОЕ/мл;

или эквивалентный предел обнаружения, выраженный в единицах числа копий нуклеиновой кислоты микоплазмы в испытуемом образце (с использованием подходящих стандартных образцов нуклеиновой кислоты микоплазм).

КОНТРОЛИ

Внутренний контроль. Внутренние контроли необходимы при рутинных анализах для верификации отсутствия ингибирования. Внутренний контроль может содержать место связывания праймера, или может быть использована другая подходящая последовательность. Внутренний контроль, как правило, добавляется в исследуемый материал перед изолированием нуклеиновой кислоты и вследствие этого действует как общий контроль (экстракция, обратная транскрипция, амплификация и детектирование).

Внешние контроли. Внешний положительный контроль содержит определенное число копий целевых последовательностей или КОЕ из одного или более видов микоплазм, выбранных из числа используемых для валидации условий испытания. Один положительный контроль должен располагаться близко около положительной точки отсечения для подтверждения достижения ожидаемой чувствительности. Отрицательный внешний контроль не содержит целевой последовательности, однако не обязательно воспроизводит тот же матрикс, что и испытуемый образец.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Используемые праймеры могут также амплифицировать немикоплазменные бактериальные нуклеиновые кислоты, приводя к ошибочному положительному результату. При необходимости во время валидации устанавливаются процедуры обращения с положительными результатами.

Следующий раздел приводится для информации

Валидация методов амплификации нуклеиновых кислот для обнаружения микоплазм: руководство

1. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Методы амплификации нуклеиновых кислот являются качественными или количественными методами определения присутствия нуклеиновой кислоты. Для обнаружения загрязнения микоплазмами различных образцов, таких как вакцины и клеточные субстраты, подходят количественные методы, которые должны быть рассмотрены на предмет возможности быть предельным испытанием.

Данное руководство описывает методы валидации количественных аналитических методик амплификации нуклеиновых кислот для оценки зараженности микоплазмами. Эти подходы также могут быть пригодны для методики амплификации нуклеиновых кислот в реальном времени в качестве предельного испытания по контролю за контаминацией.

К наиболее важным характеристикам для валидации аналитической методики относят специфичность и предел обнаружения. Кроме того, должна быть оценена робастность аналитической методики.

В данном документе под аналитической методикой понимают методику целиком, начиная от выделения нуклеиновой кислоты и заканчивая обнаружением амплифицированных продуктов.

В случае использования коммерчески доступных наборов для выполнения методики в целом или ее части, документы по валидации от производителя этих наборов могут заменить валидацию, проводимую пользователем. Однако соответствие набора для предполагаемого анализа должно быть оценено пользователем (например, предел обнаружения, робастность, взаимное обнаружение классов бактерий).

Амплификация нуклеиновых кислот может использоваться:

- в качестве дополнительного испытания (например, для цитотоксичных вирусных суспензий) или в целях контроля процесса;
- в качестве альтернативного метода для замены общепринятой методики (метода индикаторной клеточной культуры или метода культивирования).

Данное руководство, таким образом, будет разделяться на руководство по валидации методики амплификации нуклеиновых кислот и на руководство по изучению сопоставимости метода амплификации нуклеиновых кислот и общепринятых методов.

2. РУКОВОДСТВО ПО ВАЛИДАЦИИ МЕТОДИКИ АМПЛИФИКАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ МИКОПЛАЗМ

Следует оценить три параметра: специфичность, предел обнаружения и робастность.

2-1. Специфичность. Специфичность – это способность методики однозначно определять специфические нуклеиновые кислоты в присутствии других компонентов, которые могут присутствовать в образце.

Специфичность амплификации зависит от выбора праймеров, проб (для анализа готового продукта) и строгости условий испытания (как для стадии амплификации, так и для стадии детектирования).

Возможность метода амплификации нуклеиновых кислот обнаруживать большой список видов микоплазм зависит от выбора праймеров и параметров пробы и метода. Эта возможность должна быть продемонстрирована с использованием охарактеризованных стандартных панелей (например, штаммы сравнения, предлагаемые *EDQM*). Так как методы амплификации нуклеиновых кислот зависят от смеси праймеров, теоретический анализ праймеров и проб, основанный на сравнении с базами данных, не рекомендуется, так как интерпретация результатов может быть довольно сложной и не отражать экспериментальных результатов.

Более того, так как есть вероятность, что праймеры будут обнаруживать другие виды бактерий, должно быть задокументировано и отвалидировано потенциальное перекрестное обнаружение. Наиболее подходящими для данной валидации являются такие виды бактерий, как грамположительные бактерии с близким филогенетическим родством к микоплазмам; это *Clostridium*, *Lactobacillus* и *Streptococcus*. Однако этот перечень не

является исчерпывающим, и выбор видов, необходимых для исследования, зависит от теоретической возможности (основанной на последовательности праймеров/проб) методов амплификации нуклеиновых кислот обнаруживать такие виды.

На основании результатов, полученных при валидации специфичности, при обнаружении проблемных мест в специфичности методики (таких как немикоплазматические бактериальные нуклеиновые кислоты), при изучении валидации должна быть предложена стратегия, позволяющая интерпретировать положительные результаты рутинных испытаний. Например, повторное испытание может выполняться с использованием альтернативного метода без данных проблемных мест в специфичности либо с использованием общепринятого метода.

2-2. Предел обнаружения. Предел обнаружения отдельной аналитической методики – это наименьшее количество специфической нуклеиновой кислоты в образце, которое может быть обнаружено, но необязательно должно быть определено количественно.

Для установления предела обнаружения должна быть определена крайняя положительная точка для аналитической методики амплификации нуклеиновой кислоты. Крайняя положительная точка (как определено в общем разделе 2.6.21) – это минимальное число копий специфической последовательности в объеме образца, которое может быть обнаружено в 95 % случаев проведения испытания. На крайнюю положительную точку влияет распределение микоплазматического генома в отдельно взятых испытуемых образцах и другие факторы (например, эффективность фермента), что может приводить к различным значениям 95 % порогового значения в индивидуальных аналитических испытаниях.

Для определения крайней положительной точки должны быть исследованы серии разведений охарактеризованных и калиброванных (либо в КОЕ, либо в копиях нуклеиновой кислоты) внутренних рабочих штаммов или стандартов *EDQM* в различные дни для определения вариабельности рабочих циклов.

Для валидации предела обнаружения методики рекомендуется использовать следующие виды с учетом распространенности и филогенетических связей:

- *A. laidlawii*;
- *M. fermentas*;
- *M. hyorhinae*;
- *M. orale*;
- *M. pneumoniae* или *M. gallisepticum*;
- *M. synoviae* (в случае использования или обработки материалами птичьего происхождения в процессе производства);
- *M. arginini*;
- *S. citri* (в случае использования или обработки материалами насекомых или растений в процессе производства).

Для статистического анализа полученных результатов следует исследовать не менее 3 независимых 10-кратных разведений каждого штамма с достаточным числом повторов для каждого разведения для того, чтобы получить в конечном итоге 24 результата испытания каждого разведения.

Например, лаборатория может исследовать 3 серии разведений в разные дни с количеством повторов для каждого разведения равным 8, или 4 серии разведений в разные дни с количеством повторов для каждого разведения равным 6, или 6 серий разведений в разные дни с количеством повторов для каждого разведения равным 4. Чтобы удержать количество разведений в приемлемых рамках, следует провести предварительные испытания для получения предварительного значения крайней положительной точки. Диапазон разведений может выбираться в области предварительно определенного порогового значения. Концентрацию микоплазм (в КОЕ или в количестве копиях), которая может быть обнаружена в 95 % случаев проведения испытаний, рассчитывают с помощью подходящего статистического подхода.

Полученные результаты также могут служить для оценки вариабельности аналитической методики.

2-3. Робастность (устойчивость). Робастность (устойчивость) аналитической методики – это мера устойчивости к небольшим намеренным изменениям параметров методики, она дает представление о надежности методики при стандартном использовании.

Оценку робастности следует проводить на стадии разработки. Следует показать надежность аналитической методики по отношению к намеренным изменениям параметров методики. В случае амплификации нуклеиновых кислот небольшие изменения условий эксперимента могут быть критическими. Однако, робастность методики может быть продемонстрирована при ее разработке в случае изучения малых изменений концентраций реактивов (например, $MgCl_2$, праймеров или дезоксирибонуклеотидов). Также могут быть оценены модификации наборов для экстракции или методик экстракции и различные типы термоциклера (амплификатора).

В конечном итоге, робастность методики может быть оценена с помощью межлабораторных испытаний.

3. РУКОВОДСТВО ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ СОПОСТАВИМОСТИ МЕТОДА АМПЛИФИКАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ОБЩЕПРИНЯТЫХ МЕТОДОВ

Метод амплификации нуклеиновых кислот может быть использован вместо общепринятых методов (метода культивирования и метода индикаторной клеточной культуры). В этом случае следует провести изучение сопоставимости методов. В изучение следует включать в основном сравнение соответствующих пределов обнаружения альтернативной и общепринятой методиками. При этом должна оцениваться также специфичность (группа определяемых микоплазм, предполагаемые ложноположительные результаты).

Для предела обнаружения определяют критерии приемлемости, как указано далее:

- если альтернативный метод используется вместо метода культивирования, то должно быть показано, что он способен обнаруживать 10 КОЕ/мл каждого испытуемого вида микоплазм, описанных в разделе 2-2;

- если альтернативный метод используется вместо метода индикаторной клеточной культуры, то должно быть показано, что он способен обнаруживать 100 КОЕ/мл каждого испытуемого вида микоплазм, описанных в разделе 2-2.

В обоих случаях для установления факта достижения критериев приемлемости могут использоваться подходящие стандарты, калиброванные по количеству копий нуклеиновой кислоты или по количеству КОЕ. Зависимость между КОЕ и числом копий нуклеиновой кислоты должна быть предварительно установлена для возможности сравнения характеристик альтернативных методов амплификации нуклеиновых кислот с характеристиками общепринятых методов.

Для проведения сравнительного исследования может быть использована одна из следующих методик:

- альтернативный метод проводят параллельно с общепринятым методом (методами) для одновременного установления предела обнаружения обеих методик с использованием одинаковых образцов калиброванных штаммов;

- сравнивают характеристики методов амплификации нуклеиновых кислот с данными, полученными ранее при валидации общепринятого метода. В этом случае должна быть тщательно задокументирована калибровка используемых стандартов, а также их стабильность.

В отчетах о сравнительных исследованиях (проверке сопоставимости методов) должны быть отмечены все элементы валидации, упомянутые в разделе 2 (специфичность, предел обнаружения, вариабельность и робастность), для того, чтобы оценить все преимущества и/или недостатки альтернативного метода по сравнению с общепринятыми методами.

01/2013:20608

2.6.8. ПИРОГЕННОСТЬ

Испытание состоит в измерении роста температуры тела, вызванного у кроликов внутривенным введением стерильного раствора испытуемого образца.

Выбор животных. Используют здоровых взрослых кроликов обоего пола массой не менее 1,5 кг, получавших полноценное сбалансированное питание, не включающее антибиотиков, масса тела которых не снижалась в течение недели, предшествующей испытанию. Кролика не следует использовать в испытании на пирогенность, если:

а) он использовался в аналогичном испытании, давшем отрицательный результат, в течение предшествующих 3 дней;

б) он использовался в аналогичном испытании, в котором испытуемая субстанция была признана несоответствующей требованиям, в течение предшествующих 3 недель.

Помещение для животных. Кроликов содержат индивидуально в тихом помещении при однородной подходящей температуре. Животных не кормят в течение ночи и до окончания испытания, в течение испытания не дают воду. Испытание проводят в тихом помещении, где отсутствует риск возникновения помех, которые могут возбудить животных, и в котором температура поддерживается на уровне, не более чем на 3 °C отличающемся от температуры, поддерживаемой в месте постоянного содержания кроликов или в помещении, в котором кролики содержались в течение не менее 18 ч до начала испытания.

Материалы. Стеклянная посуда, шприцы и иглы. Тщательно моют всю стеклянную посуду, шприцы и иглы водой для инъекций и нагревают в сухожаровом шкафу при температуре 250 °C в течение 30 мин или при температуре 200 °C в течение 1 ч.

Клетки (станки). Клетки для кроликов, температуру которых измеряют с помощью электрического прибора, устроены таким образом, чтобы животные фиксировались лишь с помощью свободно закрепленных на шее хомутов; остальная часть тела остается относительно свободной так, чтобы кролики могли сидеть в обычном положении. Они не удерживаются с помощью ремней или другими подобными методами, которые могут причинить вред животному. Животные помещаются в клетки не менее чем за 1 ч до первого измерения температуры и остаются там в течение всего испытания.

Термометры. Используют термометр или электрическое устройство, показывающее температуру с точностью до 0,1 °C, вводя его в прямую кишку кролика на глубину около 5 см. Глубина введения постоянна для каждого из кроликов в течение каждого из испытаний. Если используется электрическое устройство, оно может оставаться на месте в течение всего испытания.

Предварительное испытание. После отбора животных за 1–3 дня до проведения испытания продукции тем из них, которые не использовались для опытов в течение последних двух недель, вводят внутривенно апиrogenный раствор 9 г/л натрия хлорида *R*, нагретый до температуры около 38,5 °C, в количестве 10 мл на килограмм массы тела. Записывают температуру животных, начиная не менее чем за 90 мин до введения и продолжая в течение 3 ч после введения раствора. Животные, температура которых колеблется в пределах более 0,6 °C, не используются в основном испытании.

Основное испытание. Испытание проводят с использованием группы из трех кроликов.

Подготовка и введение продукта. Испытуемую жидкость перед введением нагревают до температуры около 38,5 °C. Испытуемый продукт может быть растворен или разведен в апиrogenном растворе 9 г/л хлорида натрия *R* или другом растворителе, указанном в частной статье. Раствор медленно вводят в крайнюю вену уха каждого из кроликов в течение не более 4 мин, если в частной статье нет других указаний. Количество вводимого продукта варьируется в зависимости от испытуемого продукта и указывается в частной статье. Вводимый объем должен составлять не менее 0,5 мл и не более 10 мл на 1 кг массы тела.

Определение исходной и максимальной температуры. За «исходную температуру» каждого из кроликов принимают среднее из двух значений температуры, записанных для данного кролика с интервалом 30 мин в течение 40 мин, предшествующих введению испытуемого продукта. «Максимальная температура» каждого из кроликов – самая высокая температура, записанная для данного кролика в течение 3 ч после введения. Температуру каждого из кроликов записывают с интервалами, не превышающими 30 мин, начиная не

менее чем за 90 мин до введения испытуемого продукта и продолжая в течение 3 ч после введения. За результат испытания принимают разность между максимальной и исходной температурами каждого из кроликов. При отрицательной разности результат принимают равным нулю.

При определении исходной температуры кролики, у которых два последовательных значения температуры варьируются в пределах, превышающих 0,2 °С, изымаются из испытания. В каждом из испытаний используют животных, исходная температура которых отличается друг от друга не более чем на 1 °С. Кролики, исходная температура которых выше 39,8 °С или ниже 38,0 °С, изымаются из испытания.

Интерпретация результатов. После проведения испытания на группе из трех кроликов его при необходимости повторяют на других группах из трех кроликов (суммарно до четырех групп, в зависимости от полученных результатов). Если суммированный результат, полученный в первой группе, не превышает значение, данное во второй колонке таблицы 2.6.8.-1, считают, что продукт выдерживает испытание. Если суммированный результат превышает значение, данное во второй колонке таблицы, но не превышает значение, данное в третьей колонке таблицы, испытание повторяют, как указано выше. Если суммированный результат превышает значение, данное в третьей колонке таблицы, считают, что продукт не выдерживает испытание.

Таблица 2.6.8.-1

Количество кроликов	Продукт выдерживает испытание, если суммированный результат, не превышает:	Продукт не выдерживает испытание, если суммированный результат, превышает:
3	1,15 °С	2,65 °С
6	2,80 °С	4,30 °С
9	4,45 °С	5,95 °С
12	6,60 °С	6,60 °С

Кролики, которые использовались в проведении испытаний на пирогенность, в случае если повышение их температуры составило 1,2 °С, исключаются из дальнейших испытаний.

01/2013:20609

2.6.9. АНОМАЛЬНАЯ ТОКСИЧНОСТЬ

ОБЩЕЕ ИСПЫТАНИЕ

Каждой из пяти здоровых мышей массой от 17 г до 24 г вводят внутривенно указанное в частной статье количество испытуемого образца, растворенное в 0,5 мл *воды для инъекций Р* или стерильного раствора 9 г/л *хлорида натрия Р*. Если нет других указаний в частной статье, раствор вводят в течение 15–30 с.

Считается, что испытуемый образец выдерживает испытание, если ни одна из мышей не погибает в течение 24 ч или времени, указанного в частной статье. Если погибает более одного животного, считают, что испытуемый образец не выдерживает испытание. Если погибает одно животное, испытание повторяют. Считается, что испытуемый образец выдерживает испытание, если ни одна из мышей второй группы не погибает в течение указанного промежутка времени.

ИММУННЫЕ СЫВОРОТКИ И ВАКЦИНЫ ДЛЯ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Если в частной статье нет других указаний, каждой из пяти здоровых мышей массой от 17 г до 24 г внутривенно вводят одну человеческую дозу, но не более 1,0 мл. Человеческая доза указана на этикетке или листке-вкладыше испытуемого образца. Животных наблюдают в течение 7 дней.

Испытуемый образец выдерживает испытание, если ни одно из животных не обнаруживает признаков недомогания. Если погибает более одного животного,

испытываемый образец не выдерживает испытание. Если одно из животных погибает или обнаруживает признаки недомогания, испытание повторяют. Испытываемый образец выдерживает испытание, если ни одно из животных второй группы не погибает и не обнаруживает признаков недомогания в течение указанного промежутка времени.

Испытание также должно быть проведено на двух здоровых морских свинках массой от 250 г до 400 г. Внутривенно вводят каждому животному одну человеческую дозу, но не более 5,0 мл. Человеческая доза указана на этикетке или листке-вкладыше испытываемого образца. Животных наблюдают в течение 7 дней.

Испытываемый образец выдерживает испытание, если ни одно из животных не обнаруживает признаков недомогания. Если погибает более одного животного, испытываемый образец не выдерживает испытание. Если одно из животных погибает или обнаруживает признаки недомогания, испытание повторяют. Испытываемый образец выдерживает испытание, если ни одно из животных второй группы не погибает и не обнаруживает признаков недомогания в течение указанного промежутка времени.

01/2013:20610

2.6.10. ГИСТАМИН

Убивают морскую свинку массой от 250 г до 350 г, которая была лишена пищи в течение предшествующих 24 ч. Извлекают участок периферийной тонкой кишки длиной 2 см и опорожняют отделенную часть путем тщательной промывки раствором В, описанным ниже, с помощью шприца. К каждому из концов присоединяют тонкую нить и делают маленький поперечный разрез в центре фрагмента кишки. Помещают ее в ванночку для органов вместимостью от 10 мл до 20 мл, содержащую раствор В, поддерживаемый при постоянной температуре (от 34 °C до 36 °C), и пропускают через раствор смесь из 95 частей кислорода и 5 частей диоксида углерода. Укрепляют одну из нитей рядом с дном ванночки для органов. Другую нить присоединяют к изотоническому миографу и регистрируют сокращения органа с помощью кимографа или другим подходящим способом непрерывной регистрации. Если используется рычаг, его длина должна быть такой, чтобы движение органа усиливалось приблизительно в 20 раз. Натяжение кишки должно составлять около 9,8 мН (1 г) и быть отрегулировано в соответствии с чувствительностью органа. Промывают ванночку для органов раствором В. Выдерживают в течение 10 мин. Промывку раствором В повторяют еще два или три раза. Стимулируют серию сокращений путем добавления измеренных объемов от 0,2 мл до 0,5 мл раствора *гистамина дигидрохлорида Р*, имеющего концентрацию, которая вызывает воспроизводимые субмаксимальные реакции. Эту дозу обозначают как «высокую дозу». Перед каждым добавлением гистамина ванночку для органов трижды промывают (предпочтительно путем переполнения без опорожнения ванночки) раствором В. Последовательные добавления следует выполнять, соблюдая равные интервалы времени, достаточные для полной релаксации между добавлениями (около 2 мин). Добавляют равные объемы более разбавленного раствора *гистамина дигидрохлорида Р*, приводящего к воспроизводимым реакциям, составляющим примерно половину от реакций, вызываемых «высокой дозой». Эту дозу обозначают как «низкую дозу». Продолжают периодическое добавление «высоких» и «низких» доз раствора гистамина, следуя вышеуказанному, и чередуют каждое добавление с равным объемом разведения испытываемого раствора, регулируя степень разбавления таким образом, чтобы сокращение кишки, в случае его наличия, было меньшим, чем сокращение, вызываемое «высокой дозой» гистамина. Определяют, является ли сокращение, в случае его наличия, воспроизводимым и остаются ли реакции на «высокую» и «низкую» дозы гистамина неизменными. Вычисляют активность испытываемого образца, выраженную в ее эквиваленте на микрограмм основания гистамина, основываясь на определенном выше разведении.

Определенное таким образом количество не должно превышать количество, указанное в частной статье.

Если испытываемый раствор не вызывает сокращений, готовят свежий раствор, добавляя количество гистамина, соответствующее максимально допустимому в

соответствии с требованиями частной статьи, и отмечают, соответствуют ли сокращения, вызываемые испытуемым раствором с добавкой гистамина, количеству добавленного гистамина. Если такого соответствия не наблюдается, сокращение, вызываемое испытуемым образцом, невоспроизводимо или последующие реакции на «высокие» и «низкие» дозы гистамина уменьшаются, то результаты испытания считают недостоверными и выполняют испытание на депрессорные вещества (2.6.11).

Раствор А

Натрия хлорид	160,0 г
Калия хлорид	4,0 г
Кальция хлорид, безводный	2,0 г
Магния хлорид, безводный	1,0 г
Натрия гидрофосфат додекагидрат	0,10 г
Вода для инъекций Р	до 1000 мл

Раствор В

Раствор А	50,0 мл
Атропина сульфат	0,5 мг
Натрия гидрокарбонат	1,0 г
Глюкоза моногидрат	0,5 г
Вода для инъекций Р	до 1000 мл

Раствор В должен быть свежеприготовленным, и его используют в течение 24 ч.

01/2013:20611

2.6.11. ДЕПРЕССОРНЫЕ ВЕЩЕСТВА

Испытание проводят на кошке массой не менее 2 кг, анестезированной с использованием хлоралозы или барбитурата, что позволяет поддерживать постоянное кровяное давление. Животное защищают от потери температуры тела и поддерживают ее таким образом, чтобы ректальная температура оставалась в физиологических пределах. В трахею вводят дыхательную трубку. В общую сонную артерию вводят канюлю, наполненную гепаринизированным раствором 9 г/л натрия хлорида, и присоединяют ее к устройству, обеспечивающему постоянную регистрацию кровяного давления. В бедренную вену вводят другую канюлю, наполненную гепаринизированным раствором 9 г/л натрия хлорида, через которую может быть введен раствор гистамина и испытуемого образца. Определяют чувствительность животного к гистамину путем внутривенного введения через равные промежутки времени *раствора гистамина Р* в дозах, соответствующих 0,1 мкг и 0,15 мкг основания гистамина на килограмм массы тела. Введение меньшей дозы повторяют не менее трех раз. Вторую и последующие инъекции вводят не ранее, чем через одну минуту после того, как кровяное давление возвращается к уровню, наблюдавшемуся непосредственно перед предыдущей инъекцией. Животное используют в испытании только в случае, если получено четко регистрируемое снижение кровяного давления, являющееся постоянным для меньшей дозы, а большая доза вызывает более высокую реакцию. Испытуемый образец растворяют в растворе 9 г/л натрия хлорида или в другом растворителе, указанном в частной статье и взятом в количестве, достаточном для получения предписанной концентрации. Вводят внутривенно на килограмм массы тела 1,0 мл *раствора гистамина Р*, затем две последовательные инъекции указанного в частной статье количества испытуемого раствора и, наконец, 1,0 мл *раствора гистамина Р*. Вторую, третью и четвертую инъекции вводят не ранее, чем через одну минуту после того, как кровяное давление возвращается к уровню, наблюдавшемуся непосредственно перед предыдущей инъекцией. Эти серии инъекций повторяют дважды и завершают испытание введением 1,5 мл *раствора гистамина Р* на килограмм массы тела.

Если реакция на 1,5 мл *раствора гистамина Р* на килограмм массы тела не превышает реакцию на 1,0 мл того же раствора, результаты испытания признают недостоверными. Испытуемый образец не выдерживает испытание, если среднее значение реакции на его введение превышает среднее значение реакции на 1,0 мл *раствора гистамина Р* на килограмм массы тела или если любая из доз образца вызвала более высокую депрессорную

реакцию, чем завершающая доза раствора гистамина. Лабораторное животное не следует использовать в другом испытании на депрессорные вещества, если любая из испытанных доз вызывает более выраженную депрессорную реакцию, чем завершающая доза раствора гистамина, или если реакция на высокую дозу гистамина, введенную после испытуемого образца, менее среднего значения реакции на введенные ранее меньшие дозы гистамина.

#Испытание на содержание веществ гистаминаподобного действия может быть проведено также в соответствии с нижеизложенным методом.

Испытание проводят на кошках обоего пола массой не менее 2 кг, анестезированных с использованием хлоралозы, зооксилазина, рометара или барбитурата, что позволяет поддерживать постоянное кровяное давление.

Для регистрации артериального давления в отпрепарированную сонную артерию вставляют канюлю, заполненную раствором, предупреждающим свертывание крови (насыщенный раствор натрия гидрокарбоната, 25 % раствор магния сульфата, раствор гепарина, содержащий 50 ЕД в 1 мл и др.), и соединяют ее с ртутным манометром. Запись давления производят на ленте кимографа.

Испытуемые растворы вводят внутривенно. Вначале проверяют чувствительность животного к гистамину. Для приготовления основного раствора гистамина, содержащего 1 мг гистаминаоснования в 1 мл воды, около 138,1 мг *гистамина фосфата Р* или около 82,8 мг *гистамина дигидрохлорида Р* растворяют в 50 мл *воды дистиллированной Р*.

Раствор хранят не более 1 месяца в склянке из темного стекла с притертой пробкой в защищенном от света месте при температуре от 4 °С до 10 °С.

В качестве основного раствора гистамина можно использовать также 0,1 % раствор гистамина дигидрохлорида в ампулах, в 1 мл которого содержится 0,6038 мг гистаминаоснования.

Из основного раствора гистамина непосредственно перед опытом путем последовательных разведений в воде или в растворе 9 г/л натрия хлорида в зависимости от растворителя для испытуемого образца, указанного в соответствующей статье, готовят стандартные растворы, содержащие 0,5 мкг/мл и 1 мкг/мл гистаминаоснования.

Для проверки реакции животного на гистамин в вену последовательно вводят указанные стандартные растворы с промежутками не менее 5 мин в дозах 0,1 мкг и 0,2 мкг гистаминаоснования в 0,2 мл на 1 кг массы. Скорость введения раствора – 0,1 миллилитр в секунду. Животных, у которых при введении гистамина в дозе 0,2 мкг на 1 кг массы артериальное давление снизится менее чем на 20 мм рт. ст., из опыта исключают.

После проверки чувствительности животного к гистамину уточняют величину гипотензивной реакции посредством повторного введения стандартного раствора гистамина в дозе 0,1 мкг (0,2 мл раствора) на 1 кг массы со скоростью 0,1 миллилитр в секунду. Введение гистамина с интервалом 5 мин повторяют несколько раз, пока при двух последовательных введениях не будет получено одинаковое снижение артериального давления, которое принимается за стандартное в данных условиях опыта.

Затем с интервалом не менее 5 мин животному вводят испытуемый раствор лекарственного средства с той же скоростью, с которой вводили раствор гистамина.

Растворитель и концентрация испытуемого раствора (тест-доза) указаны в соответствующей фармакопейной статье.

Испытуемый образец считают выдержавшим испытание, если снижение артериального давления после введения тест-дозы не превышает реакции на введение 0,1 мкг/кг гистамина в стандартном растворе.

При испытании в одном опыте разных лекарственных средств необходимо проводить дополнительное определение реакции животного на введение стандартного раствора гистамина в дозе 0,1 мкг/кг. Отмеченная при этом величина реакции принимается за стандартную для последующего испытания образца.

В случае значительного уменьшения величины реакции по сравнению с наблюдаемой в начале опыта необходимо вновь проверить чувствительность животного к действию гистамина в дозе 0,2 мкг/кг. Если снижение артериального давления при этом будет не менее 20 мм рт.ст., испытание образцов продолжают в соответствии с указанными выше требованиями.[#]

2.6.12. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ НЕСТЕРИЛЬНОЙ ПРОДУКЦИИ: ОБЩЕЕ КОЛИЧЕСТВО ЖИЗНЕСПОСОБНЫХ АЭРОБОВ

1. ВВЕДЕНИЕ

Испытания, описанные ниже, позволяют осуществлять количественное определение мезофильных бактерий и грибов, способных расти в аэробных условиях.

Испытания предназначены в первую очередь для определения соответствия требованиям спецификации по микробиологической чистоте как субстанций, так и лекарственных средств. В случае использования методик для таких целей следуют инструкциям, приведенным ниже, включая количество образцов, которое следует взять, и интерпретацию результатов, в соответствии с тем, как изложено далее.

Эти методы не применимы к продуктам, содержащим живые микроорганизмы в качестве активных ингредиентов.

Альтернативные микробиологические методики, включая автоматические методы, могут использоваться в том случае, если доказана их эквивалентность фармакопейным методикам.

2. ОБЩИЕ ОПЕРАЦИИ

Выполняют испытания в условиях, позволяющих избежать случайную контаминацию испытуемого продукта. Меры предосторожности, предпринимаемые для предотвращения контаминации, не должны влиять ни на один из микроорганизмов, обнаруживаемых в ходе испытания.

Если испытуемый продукт обладает антимикробным действием, оно должно быть подходящим образом нейтрализовано. Если для этой цели используют инактиваторы, должна быть продемонстрирована их эффективность и нетоксичность в отношении микроорганизмов.

Если для приготовления образца используются поверхностно-активные вещества, должна быть продемонстрирована их нетоксичность и их совместимость с применяемыми инактиваторами.

3. МЕТОДЫ ПОДСЧЕТА

Суммарное количество жизнеспособных аэробов определяют методом мембранной фильтрации или методом чашечного подсчета в соответствии с указаниями частной статьи. Метод наиболее вероятного числа (НВЧ) обычно является наименее точным методом микробиологических подсчетов, однако он может оказаться наиболее подходящим для некоторых групп продуктов с очень низкой бионагрузкой.

Выбор метода основывается на таких факторах, как природа продукта и требуемый предел содержания микроорганизмов. Выбранный метод должен позволять проводить испытания образца подходящего размера для возможности вынесения заключения о соответствии спецификации. Пригодность выбранного метода должна быть доказана.

4. РОСТОВЫЕ СВОЙСТВА СРЕД, ПРИГОДНОСТЬ МЕТОДА ПОДСЧЕТА И ОТРИЦАТЕЛЬНЫЕ КОНТРОЛИ

4-1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Возможность обнаружения микроорганизмов в испытании в присутствии испытуемого продукта должна быть доказана.

При внесении в процедуру испытания или в продукт изменений, способных повлиять на проведение испытания, должна быть подтверждена пригодность.

4-2. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ТЕСТ-ШТАММОВ

Используют стабильные стандартизованные суспензии тест-штаммов или готовят их, как указано ниже. Используется техника сохранения эталонного банка культур микроорганизмов таким образом, чтобы живые микроорганизмы, использованные для

инокуляции, были удалены не более чем на 5 пересевов от оригинального контрольного банка культур микроорганизмов. Выращивают каждый бактериальный или грибковый тест-штамм отдельно, как указано в таблице 2.6.12.-1.

Для приготовления испытуемой суспензии используют забуференный раствор натрия хлорида и пептона pH 7,0 или фосфатный буферный раствор pH 7,2; для суспендирования спор *A. brasiliensis* в буфер может быть прибавлен полисорбат 80 в количестве 0,05 %. Суспензии используют в течение 2 ч или, при условии хранения при температуре от 2 °С до 8 °С, в течение 24 ч. В качестве альтернативы приготовлению и последующему разведению свежей суспензии вегетативных клеток *A. brasiliensis* или *B. subtilis* готовят стабильную суспензию спор и затем необходимый объем приготовленной суспензии используют для инокуляции. Стабильная суспензия спор может храниться при температуре от 2 °С до 8 °С в течение валидированного периода времени.

4-3. ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ

Для проверки условий испытания проводят отрицательный контроль с использованием выбранного разбавителя вместо испытуемого образца. Не должно наблюдаться роста микроорганизмов. Отрицательный контроль проводят также при испытании продуктов, как указано в разделе 5. Неудавшийся отрицательный контроль требует проведения расследования.

4-4. РОСТОВЫЕ СВОЙСТВА СРЕД

Испытания проводят на каждой серии готовой среды и на каждой серии среды, приготовленной из дегидратированной среды или из указанных ингредиентов.

Инокулируют порции/чашки с бульоном на основе гидролизата казеина и соевых бобов и с агаризованной средой на основе гидролизата казеина и соевых бобов небольшим количеством (не более 100 КОЕ) микроорганизмов, указанных в таблице 2.6.12.-1, используя отдельные порции/ чашки среды для каждого вида. Инокулируют чашки с декстрозным агаром Сабуро небольшим количеством (не более 100 КОЕ) микроорганизмов, указанных в таблице 2.6.12.-1, используя отдельные чашки со средой для каждого вида. Инкубируют в условиях, указанных в таблице 2.6.12.-1. Рост, обнаруживаемый на каждой твердой среде, не должен отличаться от значения, найденного для стандартизованного инокулята, более чем в 2 раза. Для свежеприготовленного инокулята рост микроорганизмов сопоставим с ростом, который был ранее получен с использованием ранее испытанной и утвержденной серией среды. Жидкая среда пригодна, если обнаруживается отчетливо заметный рост микроорганизмов в сравнении с ростом, который был ранее получен с использованием ранее испытанной и утвержденной серией среды.

[#]Допускается использование альтернативных питательных сред (2.6.13), например, жидкой среды № 1 (мясо-пептонный бульон) и агаризованной среды № 1 – для приготовления тест-штаммов и определения общего количества аэробов (ОКА); жидкой среды № 2 и агаризованной среды № 2 – для приготовления тест-штаммов и определения общего количества грибов (ОКГ).[#]

Таблица 2.6.12.-1

Приготовление и использование тест-микроорганизмов

Микроорганизм	Приготовление тест-штамма	Активация роста		Пригодность метода подсчета в присутствии продукта	
		Общее количество аэробов	Общее количество грибов и плесени	Общее количество аэробов	Общее количество грибов и плесени
<i>Staphylococcus aureus</i> : ATCC 6538 NCIMB 9518	Агаризованная среда на основе гидролизата казеина и соевых бобов или бульон	Агаризованная среда на основе гидролизата казеина и соевых бобов и бульон	—	Агаризованная среда на основе гидролизата казеина и соевых бобов/НВЧ	—

CIP 4.83 NBRC 13276	на основе гидролизата казеина и соевых бобов 30–35 °C 18–24 ч	на основе гидролизата казеина и соевых бобов ≤ 100 КОЕ 30–35 °C ≤ 3 дней		бульон на основе гидролизата казеина и соевых бобов ≤ 100 КОЕ 30–35 °C ≤ 3 дней	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> : ATCC 9027 NCIMB 8626 CIP 82.118 NBRC 13275	Агаризованная среда на основе гидролизата казеина и соевых бобов или бульон на основе гидролизата казеина и соевых бобов 30–35 °C 18–24 ч	Агаризованная среда на основе гидролизата казеина и соевых бобов и бульон на основе гидролизата казеина и соевых бобов ≤ 100 КОЕ 30–35 °C ≤ 3 дней	–	Агаризованная среда на основе гидролизата казеина и соевых бобов/НВЧ бульон на основе гидролизата казеина и соевых бобов ≤ 100 КОЕ 30–35 °C ≤ 3 дней	–
<i>Bacillus subtilis</i> : ATCC 6633 NCIMB 8054 CIP 52.62 NBRC 3134	Агаризованная среда на основе гидролизата казеина и соевых бобов или бульон на основе гидролизата казеина и соевых бобов 30–35 °C 18–24 ч	Агаризованная среда на основе гидролизата казеина и соевых бобов и бульон на основе гидролизата казеина и соевых бобов ≤ 100 КОЕ 30–35 °C ≤ 3 дней	–	Агаризованная среда на основе гидролизата казеина и соевых бобов/НВЧ бульон на основе гидролизата казеина и соевых бобов ≤ 100 КОЕ 30–35 °C ≤ 3 дней	–
<i>Candida albicans</i> : ATCC 10231 NCIMB 3179 CIP 48.72 NBRC 1594	Декстрозный агар Сабуро или декстрозный бульон Сабуро 20–25 °C 2–3 дня	Агаризованная среда на основе гидролизата казеина и соевых бобов ≤ 100 КОЕ 30–35 °C ≤ 5 дней	Декстрозный агар Сабуро ≤ 100 КОЕ 20–25 °C ≤ 5 дней	Агаризованная среда на основе гидролизата казеина и соевых бобов ≤ 100 КОЕ 30–35 °C ≤ 5 дней НВЧ: не применяется	Декстрозный агар Сабуро ≤ 100 КОЕ 20–25 °C ≤ 5 дней
<i>Aspergillus brasiliensis</i> : ATCC 16404 NCIMB 149 007 CIP 1431.83 NBRC 9455	Декстрозный агар Сабуро или картофельно-декстрозный бульон 20–25 °C 5–7 дней или до получения хорошей споруляции	Агаризованная среда на основе гидролизата казеина и соевых бобов ≤ 100 КОЕ 30–35 °C ≤ 5 дней	Декстрозный агар Сабуро ≤ 100 КОЕ 20–25 °C ≤ 5 дней	Агаризованная среда на основе гидролизата казеина и соевых бобов ≤ 100 КОЕ 30–35 °C ≤ 5 дней НВЧ: не применяется	Декстрозный агар Сабуро ≤ 100 КОЕ 20–25 °C ≤ 5 дней

4-5. ПРИГОДНОСТЬ МЕТОДА ПОДСЧЕТА В ПРИСУТСТВИИ ПРОДУКТА

4-5-1. **Приготовление образца.** Способ приготовления образца зависит от физических свойств испытуемого продукта. В случае если ни один из описанных способов не является удовлетворительным, должен быть разработан альтернативный способ.

Водорастворимые продукты. Растворяют или разводят (обычно в соотношении 1:10) испытуемый продукт в забуференном растворе натрия хлорида и пептона pH 7,0, в фосфатном буферном растворе pH 7,2 или в бульоне на основе гидролизата казеина и соевых бобов. При необходимости доводят до pH 6–8. Дальнейшие разведения, при необходимости, готовят с помощью этого же разбавителя.

Нерастворимые в воде продукты, не относящиеся к жирам. Суспендируют (обычно в соотношении 1:10) испытуемый продукт в забуференном растворе натрия хлорида и пептона pH 7,0, в фосфатном буферном растворе pH 7,2 или в бульоне на основе

гидролизата казеина и соевых бобов. Для получения суспензии плохо смачиваемых веществ может быть добавлено поверхностно-активное вещество, например 1 г/л полисорбата 80. При необходимости доводят до pH 6–8. Дальнейшие разведения, при необходимости, готовят с помощью этого же разбавителя.

Жиры. Испытуемый продукт растворяют в изопропилмиристате, стерилизованном с помощью фильтрации, или смешивают с минимальным необходимым количеством стерильного полисорбата 80 или иного не ингибирующего стерильного поверхностно-активного вещества, нагретого при необходимости до температуры не выше 40 °С или, в исключительных случаях, не выше 45 °С. Аккуратно перемешивают и при необходимости поддерживают температуру в водяной бане. Прибавляют предварительно подогретый до нужной температуры выбранный разбавитель до получения разведения испытуемого продукта 1:10. Аккуратно перемешивают, поддерживая температуру в течение минимального времени, необходимого для образования эмульсии. Дальнейшие серийные десятикратные разведения могут быть приготовлены с использованием выбранного разбавителя, содержащего подходящую концентрацию полисорбата 80 или иного не ингибирующего стерильного поверхностно-активного вещества.

Жидкости или твердые вещества в форме аэрозоля. Испытуемый продукт асептически переносят на мембранный фильтр или помещают в стерильный контейнер для дальнейшего отбора проб. Используют либо полный объем аэрозоля, либо определенное количество доз из каждого испытуемого контейнера.

Трансдермальные пластыри. С трансдермальных пластырей удаляют защитное покрытие и помещают их в стерильные пластмассовые или стеклянные лотки клейкой поверхностью вверх. Клейкую поверхность накрывают стерильным пористым материалом, например, марлей, для предотвращения слипания пластырей, и переносят их в подходящий объем выбранного разбавителя, содержащего инактиваторы, такие как полисорбат 80 и/или лецитин. Энергично встряхивают в течение не менее 30 мин.

4-5-2. Инокуляция и разведение. К приготовленному как описано выше (4-5-1) образцу и к контролю (не содержащему испытуемого продукта) прибавляют достаточный объем микробной суспензии до получения инокулята, содержащего не более 100 КОЕ. Объем суспензии инокулята не должен превышать 1 % объема разведенного продукта.

Для демонстрации приемлемой микробной открываемости испытуемого продукта для испытания должен быть использован минимально возможный фактор разведения. Если это невозможно из-за антимикробного действия или плохой растворимости, должны быть разработаны иные подходящие методики. Если ингибирование роста образцом невозможно предотвратить, аликвота микробной суспензии может прибавляться после нейтрализации, разведения или фильтрации.

4-5-3. Нейтрализация/устранение антимикробного действия. Количество микроорганизмов, обнаруженных в приготовленном образце, разведенном, как указано в 4-5-2, и инкубированном в соответствии с процедурой, описанной в 4-5-4, сравнивают с количеством микроорганизмов, обнаруженных в контроле.

Если рост ингибируется (уменьшение на коэффициент более 2), изменяют процедуру точного подсчета для подтверждения достоверности полученных результатов. Изменения процедуры могут включать, например, (1) увеличение объема разбавителя или питательной среды, (2) включение специфического или общего нейтрализующего агента в разбавитель, (3) мембранную фильтрацию или (4) комбинацию перечисленных способов.

Нейтрализующие агенты. Нейтрализующие агенты могут быть использованы для нейтрализации активности антимикробных агентов (таблица 2.6.12.-2). Они могут прибавляться в выбранный разбавитель или в среду, желательно перед стерилизацией. Если они используются, их эффективность и отсутствие токсичного действия на микроорганизмы должны подтверждаться контрольным испытанием, проводимым с нейтрализующим агентом и без испытуемого продукта.

Таблица 2.6.12.-2

Общие нейтрализующие агенты для мешающих веществ

Мешающее вещество	Возможный метод нейтрализации

Глутаровый альдегид, ртутьсодержащие вещества	Натрия гидросульфит (натрия бисульфит)
Фенольные вещества, спирт, альдегиды, сорбат	Разведение
Альдегиды	Глицин
Четвертичные аммониевые соединения (ЧАС), парагидроксibenзоаты (парабены), бис-бигуаниды	Лецитин
ЧАС, йод, парабены	Полисорбат
Ртутьсодержащие вещества	Тиогликолят
Ртутьсодержащие вещества, галогены, альдегиды	Тиосульфат
ЭДТА (эдетат)	Ионы Mg^{2+} и Ca^{2+}

Если невозможно подобрать подходящий метод нейтрализации, можно сделать заключение, что невозможность изолирования инокулированного микроорганизма обуславливается бактерицидным действием продукта. Такая информация указывает на то, что продукт не может быть контаминирован данным видом микроорганизма. Однако, возможно, что продукт ингибирует только некоторые специфицированные для него микроорганизмы, но не ингибирует иные, не включенные в этот список штаммы или для которых эти штаммы не являются характерными. Поэтому проводят испытание с большим коэффициентом разведения, допускающим микробный рост и специфические критерии приемлемости.

4-5-4. Обнаружение микроорганизмов в присутствии испытуемого продукта. Проводят отдельные испытания для каждого перечисленного микроорганизма. Подсчитывают только микроорганизмы прибавленного тест-штамма.

4-5-4-1. Мембранная фильтрация. Используют мембранные фильтры с номинальным размером пор, не превышающим 0,45 мкм. Тип фильтрующего материала выбирают таким образом, чтобы компоненты испытуемого образца не влияли на эффективность удерживания бактерий. Для каждого перечисленного микроорганизма используют один мембранный фильтр.

Подходящее количество испытуемого образца, приготовленного, как описано в 4-5-1–4-5-3 (желательно, содержащего 1 г испытуемого продукта или менее, если ожидают большое количество КОЕ), переносят на мембранный фильтр, немедленно фильтруют и промывают мембранный фильтр подходящим количеством разбавителя.

Для определения общего количества аэробов (ОКА, *TAMC* – *total aerobic microbial count*) мембранный фильтр переносят на поверхность агаризованной среды на основе гидролизата казеина и соевых бобов. Для определения общего количества грибов (ОКГ, *TYMC* – *total combined yeasts/moulds count*) мембранный фильтр переносят на декстрозный агар Сабуро. Чашки инкубируют, как указано в таблице 2.6.12.-1. Проводят подсчет.

4-5-4-2. Методы чашечного подсчета. Проводят метод чашечного подсчета не менее чем в двух повторностях на каждой среде и используют среднее значение.

4-5-4-2-1. Метод глубинного посева.

На чашку Петри диаметром 9 см прибавляют 1 мл испытуемого образца, приготовленного, как описано в 4-5-1–4-5-3, и 15–20 мл агаризованной среды на основе гидролизата казеина и соевых бобов или декстрозного агара Сабуро с температурой не более 45 °С. Если используются большие чашки Петри, соответственно увеличивают количество агаризованной среды. Для каждого микроорганизма, перечисленного в таблице 2.6.12.-1, используют не менее 2 чашек Петри. Инкубируют чашки, как указано в таблице 2.6.12.-1. Рассчитывают среднее арифметическое значение числа колоний и определяют КОЕ в первоначальном инокуляте.

4-5-4-2-2. Метод поверхностного посева.

На чашку Петри диаметром 9 см прибавляют 15–20 мл агаризованной среды на основе гидролизата казеина и соевых бобов или декстрозного агара Сабуро с температурой около 45 °С и выдерживают до затвердевания. Если используются большие чашки Петри, соответственно увеличивают количество агаризованной среды. Чашки высушивают, например, в ламинаре или в инкубаторе. Для каждого микроорганизма, перечисленного в таблице 2.6.12.-1, используют не менее 2 чашек Петри. Наносят измеренный объем (не менее 0,1 мл) испытуемого образца, приготовленного, как описано в 4-5-1–4-5-3, на поверхность среды. Инкубируют и проводят расчет, как описано в 4-5-4-2-1.

4-5-4-3. *Метод наиболее вероятного числа (НВЧ)*. Точность и правильность метода НВЧ меньше, чем у метода мембранной фильтрации и метода чашечного подсчета. Ненадежные результаты получаются главным образом при подсчете грибов. По этой причине метод НВЧ используют только для расчета общего количества аэробов (ОКА) в случае, если иные методы не доступны. Если данный метод указан, его проводят следующим образом.

Готовят серии из не менее 3 серийных десятикратных разведений испытуемого продукта, как описано в 4-5-1–4-5-3. Из каждого уровня разведений используют 3 аликвоты по 1 г или 1 мл для инокулирования 3 пробирок с 9–10 мл бульона на основе гидролизата казеина и соевых бобов. При необходимости в среду может быть добавлено поверхностно-активное вещество, например, полисорбат 80 или инактиватор антимикробного действия. Таким образом, если приготовлено 3 уровня разведений, инокулируют 9 пробирок.

Пробирки инкубируют при температуре 30–35 °С в течение не более 3 дней. Если получение результатов осложнено или они неточные вследствие природы испытуемого продукта, пересевают в аналогичный бульон или на агаризованную среду на основе гидролизата казеина и соевых бобов, инкубируют при той же температуре в течение 1–2 дней и используют полученные результаты. Определяют наиболее вероятное число микроорганизмов в грамме или миллилитре испытуемого продукта по таблице 2.6.12.-3.

Таблица 2.6.12.-3

Значения наиболее вероятного числа микроорганизмов

Наблюдаемые комбинации количества пробирок, в которых наблюдается рост в каждой серии пробирок			НВЧ в грамме или миллилитре испытуемого продукта	Пределы при уровне значимости 95 %
Количество граммов или миллилитров испытуемого продукта в пробирке				
0,1	0,01	0,001		
0	0	0	< 3	0–9,4
0	0	1	3	0,1–9,5
0	1	0	3	0,1–10
0	1	1	6,1	1,2–17
0	2	0	6,2	1,2–17
0	3	0	9,4	3,5–35
1	0	0	3,6	0,2–17
1	0	1	7,2	1,2–17
1	0	2	11	4–35
1	1	0	7,4	1,3–20
1	1	1	11	4–35
1	2	0	11	4–35
1	2	1	15	5–38
1	3	0	16	5–38
2	0	0	9,2	1,5–35
2	0	1	14	4–35
2	0	2	20	5–38
2	1	0	15	4–38
2	1	1	20	5–38
2	1	2	27	9–94
2	2	0	21	5–40
2	2	1	28	9–94
2	2	2	35	9–94
2	3	0	29	9–94
2	3	1	36	9–94
3	0	0	23	5–94
3	0	1	38	9–104
3	0	2	64	16–181
3	1	0	43	9–181
3	1	1	75	17–199
3	1	2	120	30–360

3	1	3	160	30–380
3	2	0	93	18–360
3	2	1	150	30–380
3	2	2	210	30–400
3	2	3	290	90–990
3	3	0	240	40–990
3	3	1	460	90–1980
3	3	2	1100	200–4000
3	3	3	> 1100	

4-6. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

При проверке пригодности метода мембранной фильтрации или метода чашечного подсчета должно быть получено среднее значение любого из тест-организмов, не отличающееся на коэффициент более чем 2 от значения контроля, описанного в 4-5-2 при отсутствии испытуемого продукта. При проверке пригодности метода НВЧ рассчитанное значение инокулята должно укладываться в пределы при уровне значимости 95 % от результата, полученного в контроле.

Если указанные выше критерии не могут быть достигнуты для одного или нескольких организмов, испытываемых любым из описанных методов, для испытуемого образца применяют метод и условия испытания, наиболее близкие к требуемым критериям.

5. ИСПЫТАНИЕ ПРОДУКТОВ

5-1. КОЛИЧЕСТВА, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ИСПЫТАНИЙ

Если иного не указано в частной статье, используют 10 г или 10 мл испытуемого продукта, отобранного с указанными выше предосторожностями. Для жидкостей или твердых веществ в форме аэрозоля используют 10 контейнеров. Для трансдермальных пластырей используют 10 пластырей.

Количество, необходимое для испытания, может быть уменьшено для фармацевтических субстанций, содержание которых в готовой форме будет составлять: количество в дозированной единице (например, таблетка, капсула, форма для инъекции) менее или равно 1 мг или количество в грамме или миллилитре (для недозированных лекарственных средств) менее 1 мг. В таких случаях количество испытуемого образца должно быть не менее чем количество, содержащееся в 10 дозированных единицах или 10 г или 10 мл продукта.

Для веществ, используемых в качестве фармацевтических субстанций, количество которых ограничено или объем серии очень мал (например, менее 1000 мл или 1000 г), количество, необходимое для испытания, должно составлять 1 % от размера серии, если не подтверждена возможность использования меньшего количества.

Для продуктов, общее количество в серии которых менее 200 единиц (например, образцы, используемые для клинических исследований) размер образца может быть уменьшен до 2 единиц, или 1 единицы, если объем серии менее 100 единиц.

Образец (образцы) отбирают случайным образом из *in bulk* продукта или из доступных контейнеров лекарственного средства. Для получения требуемого количества смешивают содержимое достаточного числа контейнеров для формирования образца для анализа.

5-2. ИСПЫТАНИЕ ПРОДУКТА

5-2-1. Мембранная фильтрация.

Используют аппарат для фильтрования, позволяющий переносить фильтр на среду. Для приготовления образца используют метод, который был установлен пригодным, как указано в разделе 4, переносят подходящее количество на каждый из двух мембранных фильтров и немедленно фильтруют. Допускается промывка фильтра после фильтрования.

Для определения общего количества аэробов (ОКА) один из мембранных фильтров переносят на поверхность агаризованной среды на основе гидролизата казеина и соевых бобов. Для определения общего количества грибов (ОКГ) переносят другой мембранный фильтр на поверхность декстрозного агара Сабуро. Чашки с агаризованной средой на

основе гидролизата казеина и соевых бобов инкубируют при температуре 30–35 °С в течение 3–5 дней, а чашки с декстрозным агаром Сабуро при температуре 20–25 °С в течение 5–7 дней. Рассчитывают содержание КОЕ в грамме или миллилитре испытуемого продукта.

При испытании трансдермальных пластырей 10 % объема раствора, приготовленного как указано в 4-5-1, фильтруют по отдельности через каждый из двух стерильных мембранных фильтров. Для определения общего количества аэробов (ОКА) один из мембранных фильтров переносят на поверхность агаризованной среды на основе гидролизата казеина и соевых бобов. Для определения общего количества грибов (ОКГ) переносят другой мембранный фильтр на поверхность декстрозного агара Сабуро.

5-2-2. Методы чашечного подсчета.

5-2-2-1. Метод глубинного посева.

Для приготовления образца используют метод, который был найден пригодным, как указано в разделе 4. Для каждой среды готовят не менее двух чашек Петри для каждого уровня разведений. Чашки с агаризованной средой на основе гидролизата казеина и соевых бобов инкубируют при температуре 30–35 °С в течение 3–5 дней, а чашки с декстрозным агаром Сабуро при температуре 20–25 °С в течение 5–7 дней. Отбирают чашки, соответствующие данному уровню разведения, с максимальным количеством колоний менее 250 для определения общего количества аэробов (ОКА) и менее 50 для определения общего количества грибов (ОКГ). Рассчитывают среднее арифметическое значение числа колоний и определяют КОЕ в грамме или миллилитре испытуемого продукта.

5-2-2-2. Метод поверхностного посева.

Для приготовления образца используют метод, который был найден пригодным, как указано в разделе 4. Для каждой среды готовят не менее двух чашек Петри для каждого уровня разведений. Инкубацию и расчет числа КОЕ проводят, как указано для метода глубинного посева.

5-2-3. Метод наиболее вероятного числа.

Для приготовления образца используют метод, который был найден пригодным, как указано в разделе 4. Все пробирки инкубируют при температуре 30–35 °С в течение 3–5 дней. При необходимости пересевают, используя подходящий способ. Для каждого уровня разведения записывают число пробирок, в которых обнаруживается микробный рост. Определяют наиболее вероятное число микроорганизмов в грамме или миллилитре испытуемого продукта в соответствии с таблицей 2.6.12.-3.

[#]Частные статьи должны содержать сведения о наличии антимикробного действия продукта и рекомендации по его устранению.[#]

5-3. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Общее количество аэробов (ОКА) считается равным числу КОЕ, найденному с использованием агаризованной среды на основе гидролизата казеина и соевых бобов; если на этой среде обнаруживаются колонии грибов, они рассчитываются как часть общего количества аэробов (ОКА). Общее количество грибов (ОКГ) считается равным числу КОЕ, найденному с использованием декстрозного агара Сабуро; если на этой среде обнаруживаются колонии бактерий, они рассчитываются как часть общего количества грибов (ОКГ). Если из-за микробного роста ожидается превышение предельных значений общего количества грибов (ОКГ), допускается использование декстрозного агара Сабуро, содержащего антибиотика. Если расчеты производят с использованием метода НВЧ, полученное значение рассматривается как общее количество аэробов (ОКА).

Допустимые критерии приемлемости микробиологической чистоты интерпретируют следующим образом:

- 10¹ КОЕ: максимально допустимое число = 20;
- 10² КОЕ: максимально допустимое число = 200;
- 10³ КОЕ: максимально допустимое число = 2000 и так далее.

Рекомендуемые растворы и питательные среды описаны в общей статье 2.6.13.

2.6.13. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ НЕСТЕРИЛЬНОЙ ПРОДУКЦИИ: ИСПЫТАНИЯ НА НАЛИЧИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

1. ВВЕДЕНИЕ

Испытания, описанные далее в статье, позволяют определять отсутствие или предельное содержание специфических микроорганизмов, которые могут быть обнаружены в приведенных условиях.

Испытания предназначены в первую очередь для определения соответствия требованиям спецификации по микробиологической чистоте, как субстанций, так и лекарственных средств. В случае использования методик для таких целей следуют инструкциям, приведенным ниже, включая количество образцов, которое следует взять, и интерпретацию результатов, в соответствии с тем, как изложено далее.

Альтернативные микробиологические методики, включая автоматические методы, могут использоваться в том случае, если доказана их эквивалентность фармакопейным методикам.

2. ОСНОВНЫЕ ОПЕРАЦИИ

Подготовка образцов проводится так, как описано в общей статье 2.6.12.

В случае если продукт обладает антимикробным действием, то его подавляют до такой степени, насколько это возможно, или нейтрализуют, как описано в общей статье 2.6.12.

В случае если поверхностно-активные вещества используются при подготовке образцов, должно быть продемонстрировано, как это указано в общей статье 2.6.12, отсутствие их токсичности для микроорганизмов и их совместимость с используемыми инактиваторами.

3. РОСТОВЫЕ И ИНГИБИРУЮЩИЕ РОСТ СВОЙСТВА СРЕД, ПРИГОДНЫХ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИСПЫТАНИЙ И ОТРИЦАТЕЛЬНОГО КОНТРОЛЯ

Способность методики определять микроорганизмы в присутствии испытуемого образца должна быть установлена предварительно. Пригодность методики должна быть подтверждена, в случае, если в выполнение испытаний или в образец вводятся изменения, которые могут повлиять на результат испытаний.

3-1. ПОЛУЧЕНИЕ ТЕСТ-ШТАММОВ

Используют стабильные стандартизованные суспензии тест-штаммов или готовят их как указано ниже. Используется техника сохранения эталонного банка культур микроорганизмов таким образом, чтобы живые микроорганизмы, использованные для инокуляции, были удалены не более чем на 5 пересевов от оригинального контрольного банка культур микроорганизмов.

3-1-1. Аэробные микроорганизмы. Бактериальные тест-штаммы выращивают отдельно на бульоне или агаре на основе гидролизата казеина и соевых бобов при температуре 30–35 °C в течение 18–24 ч. Тест-штаммы *Candida albicans* выращивают отдельно на декстрозном бульоне Сабуро или декстрозном агаре Сабуро при температуре 20–25 °C в течение 2–3 дней.

- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, NCIMB 9518, CIP 4.83 или NBRC 13276;
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118 или NBRC 13275;
- *Escherichia coli* ATCC 8739, NCIMB 8545, CIP 53.126 или NBRC 3972;
- *Salmonella enterica* подвид *enterica* серовар Typhimurium ATCC 14028 или, как альтернативный, *Salmonella enterica* подвид *enterica* серовар Abony NBRC 100797, NCTC 6017 или CIP 80.39;
- *Candida albicans* ATCC 10231, NCPF 3179, IP 48.72 или NBRC 1594.

Для приготовления суспензий используют забуференный раствор натрия хлорида и пептона pH 7,0 или фосфатный буферный раствор pH 7,2. Используют суспензию в течение 2 ч или 24 ч при хранении при температуре 2–8 °C.

3-1-2. **Клостридии.** Используют штаммы *Clostridium sporogenes* ATCC 11437 (NBRC 14293, NCIMB 12343, CIP 100651) или ATCC 19404 (NCTC 532 или CIP 79.03) или NBRC 14293. Тест-штаммы клостридий выращивают в анаэробных условиях на обогащенной среде для клостридий при температуре 30–35 °С в течение 24–48 ч. В качестве альтернативы приготовлению и последующему разведению свежей суспензии вегетативных клеток *Cl. sporogenes*, для инокуляции используют стабильную суспензию спор. Стабильная суспензия спор может сохраняться при температуре 2–8 °С в течение установленного периода.

3-2. ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ

Для проверки условий испытания проводят отрицательный контроль с использованием выбранного разбавителя вместо испытуемого образца. Не должно наблюдаться роста микроорганизмов. Отрицательный контроль проводят также при испытании продуктов как указано в разделе 4. Неудавшийся отрицательный контроль требует проведения расследования.

3-3. РОСТОВЫЕ И ИНГИБИРУЮЩИЕ РОСТ СВОЙСТВА СРЕД

Испытания проводят на каждой серии готовой среды и на каждой серии среды, приготовленной из дегидратированной среды или из указанных ингредиентов.

Подтверждают приемлемость свойств подходящих сред как это указано в таблице 2.6.13.-1.

Испытания ростовых свойств жидких сред: инокулируют порцию соответствующей среды небольшим количеством подходящих микроорганизмов (не более 100 КОЕ). Инкубируют при определенной температуре в течение периода времени, не большего, чем самый короткий период, указанный в испытании. Наблюдается отчетливый рост микроорганизмов сравнимый с тем, что наблюдался для ранее протестированной и одобренной серии среды.

Испытания ростовых свойств твердых сред: выполняют методом поверхностного посева, инокулируя каждую чашку небольшим количеством (не более 100 КОЕ) подходящих микроорганизмов. Инкубируют при определенной температуре в течение периода времени, не большего, чем самый короткий период, указанный в испытании. Наблюдается отчетливый рост микроорганизмов сравнимый с тем, что наблюдался для ранее протестированной и одобренной серии среды.

Испытания на ингибирующие рост свойства жидких и твердых сред: инокулируют порцию соответствующей среды не менее чем 100 КОЕ подходящих микроорганизмов. Инкубируют при определенной температуре в течение периода времени, не меньшего, чем самый длинный период, указанный в испытании. Не должен наблюдаться рост микроорганизмов.

Испытания на индикаторные свойства: выполняют методом поверхностного посева, инокулируя каждую чашку небольшим количеством (не более 100 КОЕ) подходящих микроорганизмов. Инкубируют при определенной температуре в течение периода времени, находящегося в специфицированных для испытания рамках. Колонии сравнимы по проявлению и индикаторным реакциям с теми, что наблюдались для ранее протестированной и одобренной серии среды.

3-4. ИСПЫТАНИЯ НА ПРИГОДНОСТЬ МЕТОДА

Для каждого испытуемого продукта, выполняют подготовку образцов как описано в соответствующем подразделе раздела 4. Прибавляют тест-штаммы при перемешивании в указанную питательную среду. Инокулируют тест-штаммы по отдельности. Используют количество микроорганизмов не более чем 100 КОЕ при проведении испытания.

Выполняют испытание как описано в соответствующем подразделе раздела 4, используя наименьший период времени из предписанных.

Специфицированные микроорганизмы должны быть определены реакциями индикации, как описано в разделе 4.

Проявление любой антимикробной активности продукта неизбежно влечет за собой модификации методики проведения испытаний (см. 4-5-3 в общей статье 2.6.12).

В случае если для данного продукта антимикробная активность не может быть нейтрализована без влияния на тестируемые микроорганизмы, то предполагается, что ингибированные микроорганизмы не будут присутствовать в продукте.

Таблица 2.6.13.-1

Ростовые, ингибирующие рост и индикаторные свойства питательных сред

	Среда	Свойство	Тест-штамм
Испытания на грамотрицательные бактерии, толерантные к желчи	Обогащительный питательный бульон Мосселя для энтеробактерий	Ростовое	<i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i>
		Ингибирующее	<i>S. aureus</i>
	Агаризованная среда с глюкозой, кристаллическим фиолетовым, нейтральным красным и желчью	Ростовое и индикаторное	<i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i>
Испытания на <i>Escherichia coli</i>	Бульон Макконки	Ростовое	<i>E. coli</i>
		Ингибирующее	<i>S. aureus</i>
	Агар Макконки	Ростовое и индикаторное	<i>E. coli</i>
Испытания на <i>Salmonella</i>	Обогащительный питательный бульон Раппапорта Вассилиадиса для <i>Salmonella</i>	Ростовое	<i>Salmonella enterica</i> подвид <i>enterica</i> серовар Typhimurium или <i>Salmonella enterica</i> подвид <i>enterica</i> серовар Abony
		Ингибирующее	<i>S. aureus</i>
	Агар на основе ксилозы, лизина, дезоксихолата	Ростовое и индикаторное	<i>Salmonella enterica</i> подвид <i>enterica</i> серовар Typhimurium или <i>Salmonella enterica</i> подвид <i>enterica</i> серовар Abony
Испытания на <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Агар на основе цетримида	Ростовое	<i>P. aeruginosa</i>
		Ингибирующее	<i>E. coli</i>
Испытания на <i>Staphylococcus aureus</i>	Агар на основе маннита и соли	Ростовое и индикаторное	<i>S. aureus</i>
		Ингибирующее	<i>E. coli</i>
Испытания на клостридии	Обогащенная среда для клостридий	Ростовое	<i>Cl. sporogenes</i>
	Колумбийский агар	Ростовое	<i>Cl. sporogenes</i>
Испытания на <i>Candida albicans</i>	Декстрозный бульон Сабуро	Ростовое	<i>C. albicans</i>
	Декстрозный агар Сабуро	Ростовое и индикаторное	<i>C. albicans</i>

4. ИСПЫТАНИЕ ПРОДУКТОВ

4-1. ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫЕ БАКТЕРИИ, ТОЛЕРАНТНЫЕ К ЖЕЛЧИ

4-1-1. Приготовление образца и предварительное инкубирование. Готовят образец разведением 1 к 10 не менее чем из 1 г испытуемого продукта как описано в общей статье 2.6.12, но используя бульон на основе гидролизата казеина и соевых бобов в качестве разбавителя, перемешивают и инкубируют при температуре 20–25 °С в течение времени, достаточного для оживления бактерий, но недостаточного для увеличения числа организмов (обычно 2 ч, но не более 5 ч).

4-1-2. Испытание на отсутствие бактерий. Если иное не указано в частной статье, используют объем, соответствующий 1 г продукта приготовленного как указано в пункте 4-1-1, для инокуляции обогащительного питательного бульона Мосселя для энтеробактерий. Инкубируют при температуре 30–35 °С в течение 24–48 ч. Пересевуют на чашку с агаризованной средой с глюкозой, кристаллическим фиолетовым, нейтральным красным и

желчью. Инкубируют при температуре 30–35 °С в течение 18–24 ч. Продукт выдерживает испытание, если рост колоний не наблюдается.

4-1-3. Количественная оценка

4-1-3-1. *Селекция и пересев.* Инокулируют подходящие количества обогатительного питательного бульона Мосселя для энтеробактерий образцом приготовленным, как указано в пункте 4-1-1, и/или его разбавлениями, содержащими, соответственно, 0,1 г, 0,01 г и 0,001 г (или 0,1 мл, 0,01 мл и 0,001 мл) испытуемого продукта. Инкубируют при температуре 30–35 °С в течение 24–48 ч. Каждую из культур пересевают на чашку с агаризованной средой с глюкозой, кристаллическим фиолетовым, нейтральным красным и желчью. Инкубируют при температуре 30–35 °С в течение 18–24 ч.

4-1-3-2. *Интерпретация результатов.* Рост колоний свидетельствует о положительном результате. Отмечают наименьшее количество продукта, которое дает положительный результат и наибольшее количество, которое дает отрицательный результат. Вероятное количество бактерий определяют по таблице 2.6.13.-2.

Таблица 2.6.13.-2

Интерпретация результатов

Результаты для каждого количества продукта			Вероятное количество бактерий в грамме или миллилитре продукта
0,1 г или 0,1 мл	0,01 г или 0,01 мл	0,001 г или 0,001 мл	
+	+	+	Более 10 ³
+	+	–	Менее 10 ³ , но более 10 ²
+	–	–	Менее 10 ² , но более 10
–	–	–	Менее 10

[#]В качестве альтернативного испытания допускается определение бактерий семейства *Enterobacteriaceae* и других микроорганизмов (например, *Aeromonas*, *Pseudomonas*) как указано ниже.

10 мл испытуемого образца, подготовленного, как описано в общей статье 2.6.12, но с использованием среды № 11 вместо буферного раствора с натрия хлоридом и пептоном рН 7,0, инкубируют в течение 2–5 ч при температуре 30–35 °С, вносят в 100 мл питательной среды № 3, перемешивают и инкубируют при температуре 30–35 °С в течение 24–48 ч. При наличии роста делают пересев на среду № 4 в чашке Петри. Посевы инкубируют при температуре 30–35 °С в течение 24–48 ч. Наличие роста малиновых с металлическим блеском или без него; розовых, бесцветных, блестящих, выпуклых колоний грамотрицательных палочек указывает на возможную контаминацию лекарственного средства бактериями сем. *Enterobacteriaceae* и некоторыми другими грамотрицательными бактериями. Выросшие колонии пересевают, каждую отдельно, со среды № 4 на скошенную в пробирках среду № 1 и выращивают при температуре 30–35 °С течение 18–20 ч. Из каждой пробирки с чистой культурой делают пересевы на среду № 6 (в двух повторностях) и среду № 7.

После посева в половину пробирок со средой № 6 вносят по 0,5 мл стерильного вазелинового масла. Все посевы инкубируют при температуре 30–35 °С в течение 18–20 ч. Ферментацию глюкозы устанавливают по изменению цвета среды № 6 из красного в желтый в пробирках с маслом и без него. О наличии нитритов в среде № 7 судят по появлению красного окрашивания при внесении в среду реактива Грисса. Параллельно исследуют чистые культуры на наличие фермента цитохромоксидазы. Если в образце обнаружены грамотрицательные неспорообразующие палочки, которые дают отрицательную оксидазную реакцию, ферментируют глюкозу с образованием кислоты (или кислоты и газа) и восстанавливают нитраты в нитриты, испытуемый продукт контаминирован бактериями семейства *Enterobacteriaceae*.

Тест на цитохромоксидазу. Полоску фильтровальной бумаги смачивают реактивом и наносят стеклянной палочкой суточную чистую культуру исследуемых бактерий со среды № 1. Синее окрашивание, появляющееся через 2–5 мин, свидетельствует о положительной оксидазной реакции.

Количественная оценка. Инокулируют подходящие количества среды № 3 гомогенатом и/или его разбавлениями, содержащими, соответственно, 0,1 г, 0,01 г и 0,001 г (или 0,1 мл, 0,01 мл и 0,001 мл) испытуемого продукта. Инкубируют при температуре 30–35 °С в течение 24–48 ч. При наличии роста делают пересев на плотную среду № 4 (агар Эндо) и инкубируют при той же температуре в течение 18–24 ч. В случае появления характерных для *Enterobacteriaceae* колоний грамотрицательных палочек определяют количество энтеробактерий в 1 г или в 1 мл образца по таблице 2.6.13.-2.[#]

4-2. *ESCHERICHIA COLI*

4-2-1. Приготовление образца и предварительное инкубирование. Готовят образец разведением 1 к 10 не менее чем из 1 г испытуемого продукта как описано в общей статье 2.6.12 и используют 10 мл или количество, соответствующее 1 г или 1 мл, для инокуляции подходящего количества (определенного как указано в пункте 3-4) бульона на основе гидролизата казеина и соевых бобов, перемешивают и инкубируют при температуре 30–35 °С в течение 18–24 ч.

4-2-2. Селекция и пересев. Встряхивают контейнер, переносят 1 мл бульона на основе гидролизата казеина и соевых бобов в 100 мл бульона Макконки и инкубируют при температуре 42–44 °С в течение 24–48 ч. Пересевают на чашки с агаром Макконки и инкубируют при температуре 30–35 °С в течение 18–72 ч.

4-2-3. Интерпретация результатов. Рост колоний свидетельствует о возможном присутствии *E. coli*. Результат подтверждается идентификационными испытаниями.

Продукт выдерживает испытание, если подобные колонии не обнаруживаются или испытания идентификации дают отрицательный результат.

[#]В качестве альтернативного испытания допускается определение *Escherichia coli* как указано ниже.

10 мл образца в питательной среде № 11 или количество, представляющее 1 г или 1 мл продукта, подготовленное и инкубированное как описано для определения бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, помещают в 100 мл питательной среды № 3 и инкубируют при температуре 30–35 °С в течение 18–24 ч. Пересевают на среду № 4 и инкубируют при температуре 30–35 °С в течение 18–24 ч. На среде № 4 *Escherichia coli* образуют, как правило, характерные малиновые колонии с металлическим блеском или без него, диаметром 2–4 мм. Подозрительные на принадлежность к *Escherichia coli* колонии микроскопируют. При обнаружении грамотрицательных палочек отсевают на скошенную в пробирках плотную среду № 1 и инкубируют при температуре 30–35 °С в течение 18–24 ч. Из каждой пробирки с чистой культурой делают пересевы на среды № 14 и № 15, а также используют для теста на цитохромоксидазу. Через 18–24 ч. инкубации при температуре 30–35 °С отмечают бактериальный рост или его отсутствие на средах № 14 и № 15. Утилизацию цитрата устанавливают по изменению цвета среды № 14 из зеленого в синий. Наличие индола определяют по появлению красного кольца на поверхности среды № 15 при добавлении реактива Ковача или Эрлиха.

Если в образце обнаружены грамотрицательные неспорообразующие палочки, не обладающие ферментом цитохромоксидазой, не утилизирующие цитрат натрия и образующие индол, считают, что испытуемый продукт загрязнен *Escherichia coli*.[#]

4-3. *SALMONELLA*

4-3-1. Приготовление образца и предварительное инкубирование. Готовят образец испытуемого продукта как описано в общей статье 2.6.12 и используют количество, соответствующее не менее 10 г или 10 мл для инокуляции подходящего количества (определенного как указано в пункте 3-4) бульона на основе гидролизата казеина и соевых бобов, перемешивают и инкубируют при температуре 30–35 °С в течение 18–24 ч.

4-3-2. Селекция и пересев. Переносят 0,1 мл бульона на основе гидролизата казеина и соевых бобов в 10 мл обогатительного питательного бульона Раппапорта Вассилиадиса для *Salmonella* и инкубируют при температуре 30–35 °С в течение 18–24 ч. Пересевают на чашки с агаром на основе ксилозы, лизина, дезоксихолата. Инкубируют при температуре 30–35 °С в течение 18–48 ч.

4-3-3. Интерпретация результатов. На возможное присутствие *Salmonella* указывает рост хорошо развитых, красных колоний или красных колоний с черным центром. Присутствие *Salmonella* подтверждается в идентификационных испытаниях.

Продукт выдерживает испытание, если колонии, описанного типа не обнаруживаются или испытания идентификации дают отрицательный результат.

[#]В качестве альтернативного испытания допускается определение бактерий семейства *Salmonella* как указано ниже.

1 мл обогащенной культуры на среде № 3 вносят в пробирку с 10 мл среды № 12 и инкубируют при температуре 30–35 °С в течение 16–18 ч. Делают пересев петлей на среду № 5 и инкубируют при температуре 30–35 °С в течение 24–48 ч. На среде № 5 *Salmonella* образует, как правило, типичные черные колонии с характерным металлическим блеском, при этом участок среды под колонией прокрашивается в черный цвет. Подозрительные на принадлежность к *Salmonella* колонии микроскопируют и при обнаружении в мазках грамтрицательных палочек отсевают на среду № 13 (трехсахарный агар с солями железа), нанося небольшое количество культуры петлей сначала на скошенную часть агара, а потом уколом в столбик. Параллельно ставят тест на цитохромоксидазу, используя чистую культуру с плотной среды № 1. Через 18–24 ч. инкубации при 30–35 °С отмечают изменение цвета среды из красного в желтый только в столбике питательной среды. Почернение среды свидетельствует об образовании сероводорода.

Если в образце обнаружены грамтрицательные неспорообразующие палочки, не обладающие ферментом цитохромоксидазы, не ферментирующие сахарозу и лактозу и выделяющие сероводород, считают, что испытуемый продукт загрязнен *Salmonella*.[#]

4-4. *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

4-4-1. Приготовление образца и предварительное инкубирование. Готовят образец разведением 1 к 10 не менее чем из 1 г испытуемого продукта как описано в общей статье 2.6.12 и используют 10 мл или количество соответствующее 1 г или 1 мл для инокуляции подходящего количества (определенного как указано в пункте 3-4) бульона на основе гидролизата казеина и соевых бобов, перемешивают. В случае, если испытанию подвергаются трансдермальные пластыри, фильтруют через стерильный мембранный фильтр объем образца соответствующий 1 пластырю, обработанному как указано в разделе 4-5-1 общей статьи 2.6.12 и переносят фильтр в 100 мл бульона на основе гидролизата казеина и соевых бобов. Инкубируют при температуре 30–35 °С в течение 18–24 ч.

4-4-2. Селекция и пересев. Пересевают на чашки с агаризованной средой на основе цетримида и инкубируют при температуре 30–35 °С в течение 18–72 ч.

4-4-3. Интерпретация результатов. На возможное присутствие *P. aeruginosa* указывает рост колоний. Результат подтверждается идентификационными испытаниями.

Продукт выдерживает испытание, если подобные колонии не обнаруживаются или испытания идентификации дают отрицательный результат.

[#]В качестве альтернативного испытания допускается определение *Pseudomonas aeruginosa* как указано ниже.

Образец в количестве 10 г (мл) вносят в 100 мл питательной среды № 8, перемешивают и инкубируют при температуре 30–35 °С в течение 24–48 ч. Делают пересев на чашку с плотной питательной средой № 9 и инкубируют при температуре 30–35 °С в течение 18–48 ч. Рост зеленоватых, как правило, флуоресцирующих колоний, голубых в ультрафиолетовом свете (что свидетельствует о наличии пигмента пиоцианина) указывает на возможность загрязнения лекарственного средства *Pseudomonas aeruginosa*. В этом случае подозрительные колонии пересевают на скошенную плотную среду № 1, инкубируют при температуре 30–35 °С в течение 18–24 ч. Выросшие колонии микроскопируют и, при выявлении грамтрицательных палочек, проводят тест на наличие фермента цитохромоксидазы. Если в образце обнаружены грамтрицательные неспорообразующие палочки, которые дают положительную оксидазную реакцию и образуют сине-зеленый пигмент, испытуемый продукт загрязнен *Pseudomonas aeruginosa*.[#]

4-5. *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

4-5-1. Приготовление образцов и предварительное инкубирование. Готовят образец, разведением 1 к 10 не менее чем из 1 г испытуемого продукта как описано в общей статье 2.6.12 и используют 10 мл или количество соответствующее 1 г или 1 мл для инокуляции подходящего количества (определенного как указано в пункте 3-4) бульона на основе гидролизата казеина и соевых бобов, перемешивают. В случае, если испытанию подвергаются трансдермальные пластыри, фильтруют через стерильный мембранный фильтр объем образца соответствующий 1 пластырю, обработанному как указано в разделе 4-5-1 общей статьи 2.6.12 и переносят фильтр в 100 мл бульона на основе гидролизата казеина и соевых бобов. Инкубируют при температуре 30–35 °C в течение 18–24 ч.

4-5-2. Селекция и пересев. Пересевают на чашки с агаризованной средой на основе маннита и соли и инкубируют при температуре 30–35 °C в течение 18–72 ч.

4-5-3. Интерпретация результатов. На возможное присутствие *S. aureus* указывает рост желтых/белых колоний, окруженных желтыми зонами. Результат подтверждается идентификационными испытаниями.

Продукт выдерживает испытание, если подобные колонии не обнаруживаются или испытания идентификации дают отрицательный результат.

[#]В качестве альтернативного испытания допускается определение *Staphylococcus aureus* как указано ниже.

Образец в количестве 10 г (мл) вносят в 100 мл питательной среды № 8, перемешивают и инкубируют при температуре 30–35 °C в течение 24–48 ч. Делают пересев на чашку с плотной питательной средой № 10 и инкубируют при температуре 30–35 °C в течение 18–48 ч. Рост золотисто-желтых колоний, окруженных желтыми зонами (что свидетельствует о ферментации маннита), указывает на возможность загрязнения лекарственного средства *Staphylococcus aureus*. В этом случае колонии пересевают на скошенную плотную среду № 1, инкубируют при температуре 30–35 °C в течение 18–24 ч. Выросшие колонии микроскопируют и, при выявлении грамположительных кокков, расположенных гроздьями, проводят тест на наличие фермента плазмокоагулаза.

Тест на наличие плазмокоагулазы (реакция плазмокоагуляции). Используют сухую кроличью цитратную плазму промышленного производства, в соответствии с инструкцией по ее применению.

Если в образце обнаружены грамположительные кокки, которые ферментируют маннит и дают положительную реакцию плазмокоагуляции, испытуемый продукт загрязнен *Staphylococcus aureus*.[#]

4-6. CLOSTRIDIA

4-6-1. Приготовление образцов и тепловая обработка. Готовят образец разведением 1 к 10 (минимальный общий объем 20 мл) не менее чем из 2 г или 2 мл испытуемого продукта, как описано в общей статье 2.6.12. Делят образец на две части, каждая из которых не менее 10 мл. Нагревают одну порцию при температуре 80 °C в течение 10 мин и быстро охлаждают. Вторую порцию не нагревают.

4-6-2. Селекция и пересев. Используют 10 мл или количество соответствующее 1 г или 1 мл испытуемого продукта из обеих порций образца для инокуляции подходящего количества (определенного как указано в 3-4) обогащенной среды для клостридий. Инкубируют в анаэробных условиях при температуре 30–35 °C в течение 48 ч. После инкубации делают пересев из каждого контейнера на колумбийский агар и инкубируют в анаэробных условиях при температуре 30–35 °C в течение 48–72 ч.

4-6-3. Интерпретация результатов. Анаэробный рост палочек (с эндоспорами и без них), дающих отрицательную реакцию на каталазу свидетельствует о присутствии клостридий. Результат подтверждается идентификационными испытаниями.

Продукт выдерживает испытание, если подобные колонии не обнаруживаются или испытания идентификации дают отрицательный результат.

4-7. CANDIDA ALBICANS

4-7-1. Приготовление образцов и предварительное инкубирование. Готовят образец, как описано в общей статье 2.6.12 и используют 10 мл или количество

соответствующее 1 г или 1 мл для инокуляции 100 мл декстрозного бульона Сабуро, перемешивают. Инкубируют при температуре 30–35 °С в течение 3–5 дней.

4-7-2. Селекция и пересев. Пересевают на чашки с декстрозным агаром Сабуро и инкубируют при температуре 30–35 °С в течение 24–48 ч.

4-7-3. Интерпретация результатов. Рост белых колоний может свидетельствовать о присутствии *C. albicans*. Результат подтверждается идентификационными испытаниями.

Продукт выдерживает испытание, если подобные колонии не обнаруживаются или испытания идентификации дают отрицательный результат.

Следующий раздел приводится для информации.

5. РЕКОМЕНДУЕМЫЕ РАСТВОРЫ И ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

Нижеописанные растворы и питательные среды удовлетворяют целям, для которых они предназначены в фармакопейном испытании на микробную контаминацию. Могут быть использованы и другие среды при условии, что их пригодность может быть доказана.

Основной буферный раствор. 34 г калия дигидрофосфата помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в 500 мл воды очищенной, доводят значение pH раствора до $7,2 \pm 0,2$ натрия гидроксидом, доводят водой очищенной до объема 1000,0 мл и перемешивают. Разливают в контейнеры и стерилизуют. Хранят при температуре 2–8 °С.

Фосфатный буферный раствор pH 7,2. Смешивают основной буферный раствор и очищенную воду (1:800, об/об) и стерилизуют.

Забуференный раствор натрия хлорида и пептона pH 7,0

Калия дигидрофосфат	3,6 г
Динатрия гидрофосфат дигидрат	7,2 г, что эквивалентно 0,067 М фосфата
Натрия хлорид	4,3 г
Пептон (мясной или казеиновый)	1,0 г
Вода очищенная	1000 мл

Стерилизуют в автоклаве в соответствии с валидированной процедурой.

Бульон на основе гидролизата казеина и соевых бобов

Панкреатический гидролизат казеина	17,0 г
Папаиновый гидролизат соевых бобов	3,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Дикалия гидрофосфат	2,5 г
Глюкоза моногидрат	2,5 г
Вода очищенная	1000 мл

Значение pH доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло $7,3 \pm 0,2$ при температуре 25 °С. Стерилизуют в автоклаве в соответствии с валидированной процедурой.

Агаризованная среда на основе гидролизата казеина и соевых бобов

Панкреатический гидролизат казеина	15,0 г
Папаиновый гидролизат соевых бобов	5,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Агар	15,0 г
Вода очищенная	1000 мл

Значение pH доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло $7,3 \pm 0,2$ при температуре 25 °С. Стерилизуют в автоклаве в соответствии с валидированной процедурой.

Декстрозный агар Сабуро

Декстроза	40,0 г
Смесь пептического гидролизата животных тканей и панкреатического гидролизата казеина (1:1)	10,0 г
Агар	15,0 г
Вода очищенная	1000 мл

Значение pH доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло $5,6 \pm 0,2$ при температуре 25 °С. Стерилизуют в автоклаве в соответствии с валидированной процедурой.

Агаризованная среда на основе картофельной декстрозы

Вытяжка из картофеля	200 г
Декстроза	20,0 г
Агар	15,0 г
Вода очищенная	1000 мл

Значение pH доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло $5,6 \pm 0,2$ при температуре 25 °С. Стерилизуют в автоклаве в соответствии с валидированной процедурой.

Декстрозный бульон Сабуро

Декстроза	20,0 г
Смесь пептического гидролизата животных тканей и панкреатического гидролизата казеина (1:1)	10,0 г
Вода очищенная	1000 мл

Значение pH доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло $5,6 \pm 0,2$ при температуре 25 °С. Стерилизуют в автоклаве в соответствии с валидированной процедурой.

Обогатительный бульон Мосселя для энтеробактерий

Панкреатический гидролизат желатина	10,0 г
Глюкоза моногидрат	5,0 г
Дегидрированная бычья желчь	20,0 г
Калия дигидрофосфат	2,0 г
Динатрия гидрофосфата дигидрат	8,0 г
Бриллиантовый зеленый	15 мг
Вода очищенная	1000 мл

Значение pH доводят таким образом, чтобы после нагревания оно составляло $7,2 \pm 0,2$ при температуре 25 °С. Нагревают при температуре 100 °С в течение 30 мин и немедленно охлаждают.

Агаризованная среда с глюкозой, кристаллическим фиолетовым, нейтральным красным и желчью

Дрожжевой экстракт	3,0 г
Панкреатический гидролизат желатина	7,0 г
Соли желчных кислот	1,5 г
Натрия хлорид	5,0 г
Глюкоза моногидрат	10,0 г
Агар	15,0 г
Нейтральный красный	30 мг
Кристаллический фиолетовый	2 мг
Вода очищенная	1000 мл

Значение рН доводят таким образом, чтобы после нагревания оно составляло $7,4\pm 0,2$ при температуре 25 °С. Нагревают до кипения. Не автоклавируют.

Бульон Макконки

Панкреатический гидролизат желатина	20,0 г
Лактоза моногидрат	10,0 г
Дегидрированная бычья желчь	5,0 г
Бромкрезоловый пурпурный	10 мг
Вода очищенная	1000 мл

Значение рН доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло $7,3\pm 0,2$ при температуре 25 °С. Стерилизуют в автоклаве в соответствии с валидированной процедурой.

Агаризованная среда Макконки

Панкреатический гидролизат желатина	17,0 г
Пептоны (мясной и казеиновый)	3,0 г
Лактоза моногидрат	10,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Соли желчных кислот	1,5 г
Агар	13,5 г
Нейтральный красный	30,0 мг
Кристаллический фиолетовый	1 мг
Вода очищенная	1000 мл

Значение рН доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло $7,1\pm 0,2$ при температуре 25 °С. Кипятят в течение одной минуты при постоянном встряхивании, затем стерилизуют в автоклаве в соответствии с валидированной процедурой.

Обогащительный питательный бульон Раппапорта Вассилиадиса для *Salmonella*

Соевый пептон	4,5 г
Магния хлорид гексагидрат	29,0 г
Натрия хлорид	8,0 г
Дикалия гидрофосфат	0,4 г
Калия дигидрофосфат	0,6 г

Малахитовый зеленый	0,036 г
Вода очищенная	1000 мл

Растворяют при осторожном нагревании. Стерилизуют в автоклаве в соответствии с валидированной процедурой, при температуре, не превышающей 115 °С. Значение рН доводят таким образом, чтобы после нагревания и автоклавирования оно составляло $5,2 \pm 0,2$ при температуре 25 °С.

Агаризованная среда на основе ксилозы, лизина, дезоксихолата

Ксилоза	3,5 г
L-Лизин	5,0 г
Лактоза моногидрат	7,5 г
Сахароза	7,5 г
Натрия хлорид	5,0 г
Дрожжевой экстракт	3,0 г
Феноловый красный	80 мг
Агар	13,5 г
Натрия дезоксихолат	2,5 г
Натрия тиосульфат	6,8 г
Железа (III) аммония цитрат	0,8 г
Вода очищенная	1000 мл

Значение рН доводят таким образом, чтобы после нагревания оно составляло $7,4 \pm 0,2$ при температуре 25 °С. Нагревают до кипения, охлаждают до температуры 50 °С и разливают по чашкам Петри. Не автоклавируют.

Агаризованная среда на основе цетримид

Панкреатический гидролизат желатина	20,0 г
Магния хлорид	1,4 г
Калия сульфат	10,0 г
Цетримид	0,3 г
Агар	13,6 г
Вода очищенная	1000 мл
Глицерин	10,0 мл

Нагревают до кипения и кипятят в течение 1 мин при встряхивании. Значение рН доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло $7,2 \pm 0,2$ при температуре 25 °С. Стерилизуют в автоклаве в соответствии с валидированной процедурой.

Агаризованная среда на основе маннита и соли

Панкреатический гидролизат казеина	5,0 г
Пептический гидролизат животных тканей	5,0 г
Говяжий экстракт	1,0 г
D-Маннит	10,0 г
Натрия хлорид	75,0 г
Агар	15,0 г
Феноловый красный	0,025 г

Вода очищенная

1000 мл

Нагревают до кипения и кипятят в течение 1 мин при встряхивании. Значение рН доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло $7,4 \pm 0,2$ при температуре 25 °С. Стерилизуют в автоклаве в соответствии с валидированной процедурой.

Обогащенная питательная среда для клостридий

Говяжий экстракт	10,0 г
Пептон	10,0 г
Дрожжевой экстракт	3,0 г
Растворимый крахмал	1,0 г
Глюкоза моногидрат	5,0 г
Цистеина гидрохлорид	0,5 г
Натрия хлорид	5,0 г
Натрия ацетат	3,0 г
Агар	0,5 г
Вода очищенная	1000 мл

Агар замачивают, растворяют при нагревании до кипения при постоянном перемешивании. При необходимости, значение рН доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло $6,8 \pm 0,2$ при температуре 25 °С. Стерилизуют в автоклаве в соответствии с валидированной процедурой.

Колумбийский агар

Панкреатический гидролизат казеина	10,0 г
Пептический гидролизат мяса	5,0 г
Панкреатический гидролизат сердца	3,0 г
Дрожжевой экстракт	5,0 г
Кукурузный крахмал	1,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Агар, в зависимости от гелеобразующей способности	10,0–15,0 г
Вода очищенная	1000 мл

Агар замачивают, растворяют при нагревании до кипения при постоянном перемешивании. При необходимости, значение рН доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло $7,3 \pm 0,2$ при 25 °С. Стерилизуют в автоклаве в соответствии с валидированной процедурой. Охлаждают до температуры 45–50 °С, и, при необходимости, прибавляют гентамицина сульфат в количестве, соответствующем 20 мг основания гентамицина; разливают по чашкам Петри.

#Кроме описанных выше сред в некоторых испытаниях могут использоваться следующие альтернативные питательные среды и реактивы:

Фосфатный буферный раствор с натрия хлоридом и пептоном (1/15 моль)

Калия дигидрофосфат	3,56 г
Динатрия гидрофосфат дигидрат	7,23 г
Натрия хлорид	4,3 г
Пептон ферментативный сухой	1,0 г
Вода очищенная	1000 мл

pH

7,0±0,2

Компоненты растворяют в воде очищенной при нагревании, фильтруют через бумажный фильтр. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин.

Нейтрализующая жидкость

Полисорбат 80	30 г
Лецитин (яичный)	3 г
Гистидина гидрохлорид	1 г
Пептон (мясной или казеиновый)	1 г
Натрия хлорид	4,3 г
Калия дигидрофосфат	3,6 г
Динатрия гидрофосфат дигидрат	7,2 г
Вода очищенная	1000 мл

Раствор стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин.

Если нейтрализующая способность раствора недостаточна, концентрация полисорбата 80 или лецитина может быть увеличена. Кроме того, могут быть добавлены нейтрализаторы, перечисленные в статье 2.6.12 в таблице 2.6.12.-2.

Среда № 1 (для выращивания бактерий)

Пептон ферментативный сухой	10,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Глюкоза моногидрат	1,0 г
Агар	13,0 г
Мясная вода	1000 мл

Все компоненты растворяют в мясной воде при нагревании, вносят глюкозу моногидрат, значение pH доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло 7,3±0,2. Кипятят в течение 1 мин, прибавляют агар, нагревают до полного его расплавления, фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин.

Жидкая среда № 1 (мясо-пептонный бульон)

Пептон ферментативный сухой	10,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Глюкоза моногидрат	1,0 г
Мясная вода	1000 мл

К мясной воде прибавляют пептон и натрия хлорид, растворяют при нагревании, вносят глюкозу моногидрат, значение pH доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло 7,3±0,2. Кипятят в течение 1 мин, фильтруют через бумажный фильтр. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин.

Среда № 2 (для выращивания грибов, Сабуро-агар)

Пептон ферментативный сухой	10,0 г
Глюкоза моногидрат	40,0 г
Агар	13,0 г

Все компоненты растворяют в воде очищенной при нагревании, значение pH доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло $5,6 \pm 0,2$. Прибавляют агар, нагревают до полного его расплавления, фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Для подавления роста бактерий после стерилизации прибавляют 100 мг бензилпенициллина натрия и 100 мг тетрациклина (либо перед стерилизацией – 50 мг хлорамфеникола) на 100 мл среды. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °C в течение 15 мин.

Жидкая среда № 2 (среда Сабуро)

Пептон ферментативный сухой	10,0 г
Глюкоза моногидрат	40,0 г
Вода очищенная	1000 мл

Все компоненты растворяют в воде очищенной при нагревании, значение pH доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло $5,6 \pm 0,2$. Фильтруют через бумажный фильтр. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °C в течение 15 мин.

Среда № 3 (среда обогащения для бактерий семейства *Enterobacteriaceae*)

Пептон ферментативный сухой	10,0 г
Калия дигидрофосфат	2,5 г
Динатрия гидрофосфат дигидрат	7,5 г
Глюкоза моногидрат	10,0 г
Феноловый красный	0,08 г
Малахитовый зеленый	0,015 г
Мясная вода	1000 мл

Пептон и соли растворяют в мясной воде при нагревании, вносят глюкозу моногидрат, прибавляют 8 мл 1 % раствора фенолового красного и 3 мл 0,5 % раствора малахитового зеленого, значение pH доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло $7,3 \pm 0,2$. Кипятят в течение 1 мин, фильтруют через бумажный фильтр. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °C в течение 15 мин.

Среда № 4 (для выделения бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, агар Эндо)

Панкреатический гидролизат рыбной муки	12,0 г
Экстракт пекарных дрожжей	1,0 г
Натрия хлорид	3,4 г
Натрия сульфит безводный	0,8 г
Динатрия гидрофосфат дигидрат	0,5 г
Лактоза моногидрат	10,0 г
Фуксин основной	0,2 г
Агар	15,0 г
Вода очищенная	1000 мл

Все компоненты размешивают в воде очищенной, значение pH доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло $7,4 \pm 0,2$. Нагревают до полного расплавления агара и кипятят в течение 2–3 мин. Фильтруют через ватно-марлевый фильтр, снова нагревают до момента закипания. Охлаждают до температуры от 45 °C до 50 °C и разливают в чашки Петри.

Среда № 5 (для выделения бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, висмутсульфит агар)

Панкреатический гидролизат мяса	10,1 г
Динатрия гидрофосфат дигидрат	3,68 г
Натрия хлорид	2,6 г
Натрия карбонат	0,65 г
Висмута цитрат	2,38 г
Железа (II) аммония сульфат	0,97 г
Глюкоза моногидрат	3,9 г
Бриллиантовый зеленый	0,028 г
Агар	15,0 г
Вода очищенная	1000 мл

Все компоненты размешивают в воде очищенной, значение pH доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло $7,6 \pm 0,2$. Нагревают до полного расплавления агара и кипятят в течение 3–5 мин. Охлаждают до температуры от 45 °С до 50 °С и разливают в чашки Петри.

Среда № 6 (для определения ферментации глюкозы)

Пептон ферментативный сухой	10,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Глюкоза моногидрат	40,0 г
Феноловый красный	0,08 г
Мясная вода	1000 мл

Пептон и натрия хлорид растворяют в мясной воде при нагревании, вносят глюкозу моногидрат, прибавляют 8 мл 1 % раствора фенолового красного, значение pH доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло $7,2 \pm 0,2$. Кипятят в течение 1 мин, фильтруют через бумажный фильтр и разливают в пробирки с поплавками по 4–5 мл. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин. По окончании стерилизации быстро охлаждают.

Среда № 7 (для определения восстановления нитратов в нитриты)

Пептон ферментативный сухой	5,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Калия нитрат	1,5 г
Вода очищенная	1000 мл

Все компоненты растворяют в воде очищенной при нагревании, значение pH доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло $7,2 \pm 0,2$. Кипятят в течение 1 мин, фильтруют через бумажный фильтр, разливают в пробирки по 4–5 мл. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин.

Среда № 8 (среда обогащения для *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*)

Пептон ферментативный сухой	10,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Дикалия гидрофосфат	2,5 г

Глюкоза моногидрат	2,5 г
Вода очищенная	1000 мл

Пептон и соли растворяют в воде при нагревании, вносят глюкозу моногидрат, значение рН доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло $7,3 \pm 0,2$. Кипятят в течение 1 мин, фильтруют через бумажный фильтр. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин.

Среда № 9 (для выявления пигмента пиоцианина)

Пептон ферментативный сухой	20,0 г
Магния хлорид безводный	1,4 г
Калия сульфат безводный	10,0 г
Глицерин	10,0 мл
Агар	15,0 г
Вода очищенная	1000 мл

Пептон и соли растворяют в воде очищенной. Затем вносят глицерин, растворяют при нагревании, значение рН доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло $7,2 \pm 0,2$. Кипятят в течение 1 мин, прибавляют агар, нагревают до полного его расплавления, фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин.

Среда № 10 (для идентификации *Staphylococcus aureus*)

Пептон ферментативный сухой	10,0 г
Натрия хлорид	75,0 г
D-Маннит	10,0 г
Феноловый красный	0,025 г
Агар	15,0 г
Вода очищенная	1000 мл

Все компоненты растворяют в воде очищенной, прибавляют 2,5 мл 1 % раствора фенолового красного, значение рН доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло $7,4 \pm 0,2$. Кипятят в течение 1 мин, прибавляют агар, нагревают до полного его расплавления, фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин.

Среда № 11 (для предварительного обогащения бактерий семейства *Enterobacteriaceae*)

Пептон ферментативный сухой	8,0 г
Лактоза моногидрат	5,0 г
Вода очищенная	1000 мл

Все компоненты растворяют в воде очищенной при нагревании, значение рН доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло $6,9 \pm 0,1$. Фильтруют через бумажный фильтр. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин.

Среда № 12 (для накопления и выделения бактерий рода *Salmonella*, селенитовая среда)

Панкреатический гидролизат казеина	5,26 г

Лактоза моногидрат	4,21 г
Динатрия гидрофосфат дигидрат	6,23 г
Натрия гидроселенит (без теллура)	4,21 г
Вода очищенная	1000 мл

Все компоненты тщательно размешивают в 1000 мл воды очищенной. Колбу закрывают ватной пробкой, быстро доводят до кипения (до образования пузырьков) и сразу прекращают нагрев. Значение рН после стерилизации $7,5 \pm 0,2$.

Среда № 13 (для выявления сероводорода и определения ферментации лактозы, глюкозы и сахарозы; трехсахарный агар с солями железа)

Мясной экстракт	3,0 г
Дрожжевой экстракт	3,0 г
Пептон	20,0 г
Лактоза моногидрат	10,0 г
Сахароза	10,0 г
Глюкоза моногидрат	1,0 г
Железа (II) сульфат	0,2 г
Натрия хлорид	5,0 г
Натрия тиосульфат	0,3 г
Феноловый красный	0,024 г
Агар	15,0 г
Вода очищенная	1000 мл

Все компоненты растворяют в воде очищенной при нагревании, значение рН доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло $7,3 \pm 0,2$. Фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Среду разливают в пробирки по 7 мл. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121°C в течение 15 мин. При охлаждении скашивают, оставляя столбик высотой 2,5–3,0 см.

Среда № 14 (для определения утилизации натрия цитрата, цитратный агар Симмонса)

Натрия хлорид	5,0 г
Магния сульфат	0,2 г
Аммония дигидрофосфат	1,0 г
Дикалия гидрофосфат	1,0 г
Натрия цитрат	3,0 г
Бромтимоловый синий	0,08 г
Агар	20,0 г
Вода очищенная	1000 мл

Соли растворяют в воде очищенной, вносят агар и нагревают до полного его расплавления, значение рН доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло $7,2 \pm 0,1$. Фильтруют через ватно-марлевый фильтр, прибавляют 40 мл 0,2 % водного раствора бромтимолового синего. Среду разливают в пробирку по 5–7 мл. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121°C в течение 15 мин. При охлаждении скашивают, оставляя столбик высотой 2,0–2,5 см.

Среда № 15 (для определения индола, бульон Хоттингера)

Натрия хлорид	5,0 г
Дикалия гидрофосфат	1,0 г
Раствор гидролизата мяса по Хоттингеру с содержанием аминного азота 1200–1400 мг/л	1000 мл

Гидролизат Хоттингера разводят водой до содержания в среде 1200–1400 мг/л аминного азота, прибавляют соли, значение рН доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло $7,5 \pm 0,1$. Кипятят в течение 15 мин, фильтруют через бумажный фильтр. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин.

0,9 % раствор натрия хлорида

9,0 г *натрия хлорида Р* растворяют в 1000,0 мл *воды очищенной Р*. Раствор фильтруют через бумажный фильтр. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин.

Раствор № 1 (для промывания мембраны)

Пептон ферментативный	1,0 г
Вода очищенная	1000 мл
рН после стерилизации	$7,1 \pm 0,2$

Раствор № 2 (для промывания мембраны)

Пептон ферментативный	5,0 г
Полисорбат 80	10,0 г
Вода очищенная	1000 мл
рН после стерилизации	$7,1 \pm 0,2$

Растворы № 1 и № 2 стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин.

1 % раствор фенолового красного

1,0 г *фенолового красного Р* растирают в ступке, прибавляя небольшими порциями 0,1 М раствор *натрия гидроксида Р*. Полученный раствор переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем раствора до метки *водой очищенной Р*. Хранят во флаконе нейтрального стекла при температуре от 4 °С до 10 °С в защищенном от света месте.

0,5 % раствор малахитового зеленого

0,5 г *малахитового зеленого Р* растворяют в горячей стерильной *воде очищенной Р* и доводят до объема 100,0 мл этим же растворителем. Раствор выдерживают в термостате в течение 1 сут, периодически перемешивая.

Реактив Грисса

Раствор № 1: 0,5 г *кислоты сульфаниловой Р* растворяют в 30 мл *кислоты уксусной ледяной Р*, прибавляют 100 мл *воды очищенной Р*, фильтруют.

Раствор № 2: 0,1 г *нафтиламина Р* растворяют в 100 мл кипящей *воды очищенной Р*, охлаждают, прибавляют 30 мл *кислоты уксусной ледяной Р*, фильтруют.

Перед употреблением смешивают равные объемы растворов № 1 и № 2.

Реактив на цитохромоксидазу

Раствор № 1: 1 % раствор α -нафтола *Р* в 96 % *спирте Р*.

Раствор № 2: 1 % раствор *N,N*-диметил-*n*-фенилендиамина дигидрохлорида.

Перед употреблением смешивают раствор № 1 и № 2 в соотношении 2:3.

Реактив Ковача

5,0 г *n*-диметиламинобензальдегида *Р* растворяют в 75,0 г *пентанола Р* или *изоамилового спирта Р* при легком нагревании до 50–55 °С (на водяной бане), охлаждают и медленно прибавляют 20,0 мл *кислоты хлористоводородной Р*.

Раствор должен быть желтого цвета.

Реактив Эрлиха

1,0 г *n*-диметиламинобензальдегида *P* растворяют в 95 мл 96 % спирта *P* и медленно прибавляют 20 мл кислоты хлористоводородной *P*.[#]

01/2013:20614

2.6.14. БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЭНДОТОКСИНЫ

Испытание на бактериальные эндотоксины (ИБЭ) проводят для определения наличия или количества эндотоксинов, источником которых являются грамотрицательные бактерии, с использованием лизата амебоцитов мечехвоста (*Limulus polyphemus* или *Tachypleus tridentatus*). Существует три способа проведения данного испытания: способ гель-тромба, основанный на образовании геля; турбидиметрический способ, основанный на помутнении в результате расщепления эндогенного субстрата; хромогенный способ, основанный на появлении окраски после расщепления синтетического пептидно-хромогенного комплекса.

В настоящем разделе описаны следующие шесть методов.

Метод А. Гель-тромб-метод: предельное испытание.

Метод В. Гель-тромб-метод: количественное испытание.

Метод С. Турбидиметрический кинетический метод.

Метод D. Хромогенный кинетический метод.

Метод E. Хромогенный метод конечной точки.

Метод F. Турбидиметрический метод конечной точки.

Испытание выполняют любым из этих шести методов. В сомнительных и спорных случаях окончательное решение принимают, основываясь на методе А, если иное не предписано в частной статье.

Испытание выполняют в условиях, не допускающих загрязнения посторонними эндотоксинами.

1. ОБОРУДОВАНИЕ

Всю стеклянную посуду и другую термоустойчивую аппаратуру депирогенизируют в сухожаровом шкафу с использованием процесса с подтвержденной эффективностью. Общеприняты минимальные значения времени и температуры обработки, составляющие 30 мин и 250 °С соответственно. При использовании пластиковой аппаратуры, например, микротитрационных планшетов и наконечников для автоматических пипеток, следует продемонстрировать отсутствие на ней поддающихся определению эндотоксинов и мешающих факторов.

Примечание: в данном разделе термин «пробирка» включает в себя все типы сосудов, например, микротитрационные планшеты.

2. РЕАКТИВЫ, ИСПЫТУЕМЫЕ РАСТВОРЫ

(1) Лизат амебоцитов

Лизат амебоцитов – это лиофилизированный продукт, полученный из лизата амебоцитов мечехвоста (*Limulus polyphemus* или *Tachypleus tridentatus*). Данный реактив производят только в соответствии с инструкциями компетентного органа.

Примечание: лизат амебоцитов реагирует, кроме эндотоксинов, с некоторыми β-глюканами. Доступны также препараты лизата амебоцитов, которые не реагируют с глюканами; их готовят, удаляя из лизата амебоцитов фактор G, реагирующий с глюканами, или ингибируя реагирующий комплекс фактора G лизата амебоцитов. Эти препараты могут быть использованы в присутствии глюканов.

(2) Раствор лизата

Растворяют лизат амебоцитов в воде для ИБЭ или в буфере, в зависимости от рекомендаций производителя лизата, при аккуратном перемешивании. Восстановленный раствор хранят, в зависимости от рекомендаций производителя, охлажденным или замороженным.

(3) Вода для ИБЭ (вода для испытания на бактериальные эндотоксины)

Вода для инъекций Р или вода, полученная иным способом и не реагирующая с лизатом, использованным на пределе обнаружения реагента.

3. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ИСХОДНОГО СТАНДАРТНОГО РАСТВОРА ЭНДОТОКСИНА

Исходный стандартный раствор эндотоксина готовят из стандартного образца эндотоксина, калиброванного по отношению к Международному стандартному образцу, например, *БСП стандартного образца эндотоксина*.

Количественное содержание эндотоксина выражают в Международных Единицах (МЕ). Эквивалентность Международного стандартного образца в Международных Единицах устанавливается Всемирной организацией здравоохранения.

Примечание: одна Международная Единица (МЕ) эндотоксина эквивалентна одной Единице Эндотоксина (ЕЭ).

Исходный стандартный раствор эндотоксина готовят и хранят, следуя условиям, приведенным на листке-вкладыше и этикетке.

4. ПРИГОТОВЛЕНИЕ СТАНДАРТНЫХ РАСТВОРОВ ЭНДОТОКСИНА

Необходимые последовательные разведения предварительно интенсивно перемешанного исходного стандартного раствора эндотоксина готовят с использованием воды для ИБЭ. Приготовленные растворы используют по возможности быстро, чтобы избежать потери активности вследствие адсорбции.

5. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ИСПЫТУЕМЫХ РАСТВОРОВ

Испытуемые растворы готовят путем растворения или разбавления фармацевтических субстанций или медицинской продукции с использованием воды для ИБЭ. Для некоторых субстанций и лекарственных средств более подходящим является растворение или разбавление с использованием других водных растворов. При необходимости доводят рН испытуемого раствора (или его разведения) так, чтобы рН его смеси с лизатом находилось в интервале, предписанном производителем лизата, обычно от 6,0 до 8,0. Значение рН может быть доведено с использованием кислоты, основания или подходящего буферного раствора в соответствии с рекомендациями производителя лизата. Кислоты и основания могут быть приготовлены из концентратов или порошков с использованием воды для ИБЭ в контейнерах, не содержащих определяемых количеств эндотоксина. Должно быть подтверждено отсутствие эндотоксинов и мешающих факторов в буферных растворах.

6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАКСИМАЛЬНО ДОПУСТИМОГО РАЗВЕДЕНИЯ

Максимально допустимое разведение (МДР) – это максимальное разведение образца, при котором может быть определено предельное содержание эндотоксина. МДР рассчитывают по формуле:

$$МДР = \frac{\text{предельное содержание эндотоксинов} \cdot \text{концентрация испытуемого раствора}}{\lambda}$$

Предельное содержание эндотоксинов: для фармацевтических субстанций, предназначенных для парентерального введения, равно:

$$\frac{K}{M},$$

где:

K – допустимая пирогенная доза эндотоксина, на килограмм массы тела;

M – максимальная рекомендованная доза продукта, на килограмм массы тела.

Если продукт вводится через малые промежутки времени или если используется в течение продолжительного периода времени, в качестве *M* используют максимальную общую дозу, вводимую в течение одного часа.

Предельное содержание эндотоксинов в фармацевтических субстанциях, предназначенных для парентерального введения, указывается в частных статьях и выражается в таких единицах, как МЕ/мл, МЕ/мг, МЕ/Единица биологической активности и т.д.

Концентрация испытуемого раствора:

– в мг/мл, если предельное содержание эндотоксинов выражено в массовых единицах (МЕ/мг);

– в Ед/мл, если предельное содержание эндотоксинов выражено в пересчете на единицу биологической активности (МЕ/Ед);

– в мл/мл, если предельное содержание эндотоксинов выражено в объемных единицах (МЕ/мл).

λ – чувствительность лизата (МЕ/мл) в гель-тромб-методе, указанная на этикетке, или низшая концентрация на стандартной кривой в турбидиметрических или хромогенных методах.

7. СПОСОБ ГЕЛЬ-ТРОМБА (МЕТОДЫ А И В)

Способ гель-тромба позволяет определять наличие и количество эндотоксинов и основывается на свертывании лизата в присутствии эндотоксинов. Минимальная концентрация эндотоксинов, требующаяся для свертывания лизата в стандартных условиях, представляет собой указанную на этикетке чувствительность лизата. Для обеспечения точности и достоверности испытания указанную чувствительность лизата следует подтвердить, а также провести испытание на мешающие факторы, как описано в подразделе 1. Предварительные испытания.

1. ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ИСПЫТАНИЯ

(I) Подтверждение заявленной чувствительности лизата

Перед использованием лизата в испытаниях указанную на этикетке чувствительность λ , выраженную в МЕ/мл, следует подтвердить в четырех повторностях. Подтверждение чувствительности лизата выполняют при использовании новой партии лизата или при любом изменении экспериментальных условий, способном повлиять на проведение испытания.

Готовят стандартные растворы не менее чем четырех концентраций, эквивалентных 2λ , λ , $0,5\lambda$ и $0,25\lambda$, путем разбавления исходного стандартного раствора эндотоксина водой для ИБЭ. В каждой из пробирок смешивают раствор лизата с равным объемом одного из стандартных растворов (например, по 0,1 мл каждого). Если используются одноразовые флаконы или ампулы с лиофилизированным лизатом, растворы добавляют непосредственно в ампулу или флакон. Реакционную смесь инкубируют в течение определенного периода в соответствии с рекомендациями производителя лизата (обычно при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (60 ± 2) мин), избегая вибрации. Исследуют целостность геля: при использовании пробирок каждую из них по очереди извлекают из инкубатора и переворачивают одним плавным движением приблизительно на 180° . Если образуется прочный гель, остающийся на своем месте после переворачивания, результат записывают как положительный. Результат отрицательный, если неповрежденного геля не образуется.

Результаты испытания считают достоверными, если низшая концентрация стандартных растворов во всех повторностях дает отрицательный результат.

За конечную точку принимают минимальную концентрацию в нисходящем ряду концентраций эндотоксина, приводящую к свертыванию лизата. Находят среднее геометрическое значение концентрации в конечной точке, рассчитывая значение логарифмов концентраций в конечных точках 4 серий разведений; берут антилогарифм этого значения по следующей формуле:

$$\text{Среднее геометрическое концентрации в конечной точке} = \text{anti log } \frac{\sum e}{f},$$

где:

$\sum e$ – сумма логарифмов концентраций в конечных точках в используемом ряду разведений;

f – число повторностей.

Среднее геометрическое концентрации в конечной точке представляет собой измеренную чувствительность раствора лизата (МЕ/мл). Если это значение составляет не менее $0,5\lambda$ и не более 2λ , чувствительность, указанную на этикетке, считают подтвержденной и используют в испытаниях, выполняемых с этим лизатом.

(II) Определение мешающих факторов

Готовят растворы А, В, С и D в соответствии с таблицей 2.6.14.-1 и используют не содержащие определяемых эндотоксинов испытуемые растворы в разведении, меньшем МДР в соответствии с указаниями подраздела 1. Предварительные испытания, (I) Подтверждение заявленной чувствительности лизата.

Средние геометрические концентрации в конечной точке для растворов В и С рассчитывают по формуле, приведенной в подразделе 1. Предварительные испытания, (I) Подтверждение заявленной чувствительности лизата.

Испытание на мешающие факторы повторяют в случае любых изменений экспериментальных условий, которые могут повлиять на результат.

Результаты испытания считают достоверными, если растворы А и D во всех повторностях дают отрицательный результат, а результат, полученный для раствора С, подтверждает чувствительность лизата, указанную на этикетке.

Если чувствительность лизата, определенная для раствора В, не менее $0,5\lambda$ и не более 2λ , считают, что испытуемый раствор в условиях испытания не содержит мешающих факторов. В иных случаях раствор оказывает влияние на результат испытания.

Если испытуемый образец оказывает влияние на результат испытания в разведениях менее МДР, испытание на мешающие факторы повторяют с использованием больших разведений, но не превышающих МДР. Использование более чувствительного лизата позволяет применять большие разведения испытуемого образца, и это может содействовать исключению мешающих факторов.

Мешающие факторы могут быть удалены соответствующей обработкой, например, путем фильтрации, нейтрализации, диализа или теплового воздействия. Для подтверждения, что выбранный метод эффективно исключает мешающие факторы, не удаляя эндотоксины, испытания повторяют с использованием испытуемого образца, к которому был добавлен стандартный образец эндотоксина и проведена выбранная процедура удаления мешающих факторов.

2. ПРЕДЕЛЬНОЕ ИСПЫТАНИЕ (МЕТОД А)

(I) Методика

Готовят растворы А, В, С и D в соответствии с таблицей 2.6.14.-2 и выполняют испытание для этих растворов в соответствии с указаниями подраздела 1. Предварительные испытания, (I) Подтверждение заявленной чувствительности лизата.

Таблица 2.6.14.-1

Раствор	Концентрация эндотоксинов/ Раствор, к которому прибавляют эндотоксины	Разбавитель	Фактор разведения	Концентрация эндотоксинов	Количество повторностей
А	0 / Испытуемый раствор	—	—	—	4
В	2λ / Испытуемый раствор	Испытуемый раствор	1	2λ	4
			2	λ	4
			4	0,5λ	4
			8	0,25λ	4
С	2λ / Вода для ИБЭ	Вода для ИБЭ	1	2λ	2

			2	λ	2
			4	$0,5\lambda$	2
			8	$0,25\lambda$	2
D	0 / Вода для ИБЭ	–	–	–	2

Раствор А – раствор испытуемого образца, не содержащий определяемых эндотоксинов.

Раствор В – тест на мешающие вещества.

Раствор С – контроль чувствительности, указанной на этикетке.

Раствор D – отрицательный контроль (вода для ИБЭ).

Таблица 2.6.14.-2

Раствор	Концентрация эндотоксинов/ Раствор, к которому прибавляют эндотоксины	Количество повторностей
A	0 / Испытуемый раствор	2
B	2λ / Испытуемый раствор	2
C	2λ / Вода для ИБЭ	2
D	0 / Вода для ИБЭ	2

Растворы А и В (положительный контроль с образцом) готовят в разведениях не более МДР и обрабатывают в соответствии с указаниями подраздела 1. Предварительные испытания, (II) Определение мешающих факторов. Растворы В и С (положительные контроли) содержат стандартный образец эндотоксина в концентрации, соответствующей двукратной заявленной чувствительности. Раствор D (отрицательный контроль) представляет собой воду для ИБЭ.

(II) Интерпретация

Результаты испытания считают достоверными, если растворы В и С в обеих повторностях дают положительный результат, а раствор D – отрицательный результат.

Испытуемый образец выдерживает испытание, если для раствора А в обеих повторностях получен отрицательный результат.

Испытуемый образец не выдерживает испытание, если для раствора А в обеих повторностях получен положительный результат.

В случае, если для одной из повторностей раствора А получен положительный результат, а для другой – отрицательный, испытание повторяют. Испытуемый образец выдерживает испытание, если в повторном эксперименте для раствора А в обеих повторностях получен отрицательный результат. Испытуемый образец не выдерживает испытание, если для раствора А в одной или обеих повторностях получен положительный результат.

Однако, если испытуемый образец не выдерживает испытание при разведении, меньшем, чем МДР, то испытание может быть повторено при большем разведении, но не превышающем МДР.

3. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ИСПЫТАНИЕ (МЕТОД В)

(I) Методика

С помощью данного испытания определяют количество бактериальных эндотоксинов путем титрования до конечной точки. Готовят растворы А, В, С и D в соответствии с таблицей 2.6.14.-3 и выполняют испытание для этих растворов в соответствии с указаниями подраздела 1. Предварительные испытания, (I) Подтверждение заявленной чувствительности лизата.

(II) Вычисления и интерпретация

Результаты испытания считают достоверными при выполнении следующих трех условий:

(а) раствор D (отрицательный контроль) в обеих повторностях дает отрицательный результат;

(б) раствор В (положительный контроль с образцом) в обеих повторностях дает положительный результат;

(с) среднее геометрическое концентрации в конечной точке для раствора С находится в пределах от $0,5\lambda$ до 2λ .

Для определения концентрации эндотоксинов в растворе А находят концентрацию в конечной точке для каждой из повторностей путем умножения каждого фактора разведения в конечной точке на λ .

Таблица 2.6.14.-3

Раствор	Концентрация эндотоксинов/ Раствор, к которому прибавляют эндотоксины	Разбавитель	Фактор разведения	Концентрация эндотоксинов	Количество повторностей
А	0 / Испытуемый раствор	Вода для ИБЭ	1	—	2
			2	—	2
			4	—	2
			8	—	2
В	2 λ / Испытуемый раствор	—	1	2 λ	2
С	2 λ / Вода для ИБЭ	Вода для ИБЭ	1	2 λ	2
			2	λ	2
			4	0,5 λ	2
			8	0,25 λ	2
Д	0 / Вода для ИБЭ	—	—	—	2

Раствор А – испытуемый раствор в разведении, не превышающем МДР, с которым проводилось определение мешающих факторов. Последующие разведения испытуемого раствора не должны превышать МДР. Используют воду для ИБЭ для получения двух рядов разведений в отношениях 1, 1/2, 1/4, и 1/8 к разведению, с которым проводилось определение мешающих факторов. При необходимости могут быть выполнены и другие разведения.

Раствор В – раствор А, содержащий стандартный образец эндотоксина в концентрации 2 λ (положительный контроль с образцом).

Раствор С – серия разведений из 4 пробирок воды для ИБЭ, содержащей стандартный образец эндотоксина в концентрациях 2 λ , λ , 0,5 λ , 0,25 λ .

Раствор Д – вода для ИБЭ (отрицательный контроль).

За концентрацию эндотоксина в испытуемом растворе принимают концентрации в конечных точках в повторностях. Если испытание проводят с разбавленным испытуемым раствором, концентрацию эндотоксина в исходном растворе получают путем умножения на фактор разбавления.

Если ни одно из разведений испытуемого раствора в ходе испытания с подтвержденной достоверностью не дает положительного результата, концентрацию эндотоксинов регистрируют как «менее λ » (или, в случае использования разбавленного образца, как «менее $\lambda \times$ наименьший фактор разведения образца»). Если для всех разведений получен положительный результат, то концентрация эндотоксинов регистрируется как «равная или превышающая максимальный фактор разведения, умноженный на λ » (например, в таблице 2.6.14.-3 это значение равно исходному фактору разведения $\times 8 \times \lambda$).

Продукт соответствует требованиям испытания, если концентрация эндотоксина в обеих повторностях менее указанной в частной статье.

8. ФОТОМЕТРИЧЕСКИЕ КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ СПОСОБЫ (МЕТОДЫ С, D, E И F)

1. ТУРБИДИМЕТРИЧЕСКИЙ СПОСОБ (МЕТОДЫ С И F)

Данный способ представляет собой фотометрическое испытание, основанное на измерении увеличения степени мутности. В зависимости от используемого подхода с использованием данного метода могут быть проведены турбидиметрическое испытание методом конечной точки и кинетическое турбидиметрическое испытание.

Турбидиметрический метод конечной точки (метод F) основан на количественном соотношении между концентрацией эндотоксина и степенью мутности (выражающейся в пропускании или поглощении света) реакционной смеси в конце инкубационного периода.

Кинетическое турбидиметрическое испытание (метод С) заключается либо в измерении времени, требующегося для достижения заданного значения поглощения в реакционной смеси, либо в определении скорости увеличения степени мутности.

Испытание проводят при температуре инкубации, рекомендованной производителем лизата (обычно $(37\pm 1)^\circ\text{C}$).

2. ХРОМОГЕННЫЙ СПОСОБ (МЕТОДЫ D И E)

Данный способ основан на измерении количества хромофора, высвобождаемого из соответствующего хромогенного пептида в результате реакции эндотоксинов с лизатом. В зависимости от используемого подхода с использованием данного способа могут быть проведены хромогенное испытание методом конечной точки и кинетическое хромогенное испытание.

Хромогенный метод конечной точки (метод E) основан на количественном соотношении между концентрацией эндотоксина и количеством хромофора, высвобождаемого к концу инкубационного периода.

Кинетическое хромогенное испытание (метод D) заключается либо в измерении времени, требующегося для достижения заданного значения поглощения в реакционной смеси, либо в определении скорости появления окраски.

Испытание проводят при температуре инкубации, рекомендованной производителем лизата (обычно $(37\pm 1)^\circ\text{C}$).

3. ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ИСПЫТАНИЯ

Предварительные испытания проводят для обеспечения точности и достоверности результатов турбидиметрических и хромогенных испытаний. В ходе предварительных испытаний подтверждают выполнение критериев стандартной кривой и отсутствие мешающего влияния испытуемого раствора на результаты испытания.

При внесении любых изменений в экспериментальные условия, которые могут повлиять на результаты, требуется подтверждение пригодности метода испытания.

(I) Подтверждение выполнения критериев стандартной кривой

Данное испытание должно быть проведено для каждой серии реагента лизата.

Для получения стандартной кривой готовят не менее трех концентраций эндотоксина в диапазоне, рекомендованном производителем лизата, с использованием стандартного раствора эндотоксина. Проводят испытание с каждым стандартным раствором эндотоксина не менее чем в трех повторностях в соответствии с рекомендациями производителя лизата (объемные отношения, время инкубации, температура, pH и т.д.).

Если при использовании кинетических методов желаемый интервал в логарифмической шкале превышает 2, в испытание должны быть включены дополнительные стандарты для включения каждого увеличенного логарифмического значения в диапазон стандартной кривой.

В диапазоне концентраций эндотоксина, указанном производителем лизата, абсолютное значение коэффициента корреляции $|r|$ должно превышать или быть равным 0,980.

(II) Определение мешающих факторов

Выбирают концентрацию эндотоксина в центре или недалеко от центра стандартной кривой.

Готовят растворы A, B, C и D в соответствии с таблицей 2.6.14.-4. Проводят испытание с каждым из этих растворов не менее чем в двух повторностях в соответствии с рекомендациями производителя лизата (объем испытуемого раствора и раствора лизата, объемное соотношение испытуемого раствора и раствора лизата, время инкубации и т.д.).

Результаты испытания считают достоверными при выполнении следующих трех условий:

- абсолютное значение коэффициента корреляции стандартной кривой, полученной при помощи раствора C, более или равно 0,980;

- результат, полученный с раствором D, не превышает предельного значения для контроля, указанного в описании используемого реактива лизата, или он меньше, чем предел обнаружения используемого реактива лизата.

Рассчитывают среднее значение открываемости прибавленного эндотоксина вычитанием средней концентрации эндотоксина в растворе (при ее наличии) (раствор A,

таблица 2.6.14.-4) от концентрации в растворе, содержащем прибавленный эндотоксин (раствор В, таблица 2.6.14.-4).

Считают, что испытуемый раствор не содержит мешающих факторов, если в условиях испытания рассчитанная концентрация эндотоксина, прибавленного к испытуемому раствору, находится в пределах 50–200 % от известной концентрации прибавленного эндотоксина после вычитания концентрации эндотоксина, обнаруженной в растворе, не содержащем добавок стандарта.

Если открываемость эндотоксина выходит за специфицированные рамки, считают, что испытуемый раствор обладает мешающими факторами. Повторяют испытание, используя большее разведение, не превышающее МДР. Кроме того, мешающее влияние испытуемого раствора или испытуемого раствора в разведении, не превышающем МДР, может быть исключено подходящим подтвержденным способом, например, фильтрацией, нейтрализацией, диализом или термической обработкой. Для подтверждения, что выбранный способ эффективно удаляет мешающее влияние без потери эндотоксинов, повторяют испытание на мешающие факторы с использованием испытуемого препарата, к которому был прибавлен стандартный раствор эндотоксинов, и который затем обработали выбранным способом.

Таблица 2.6.14.-4

Раствор	Концентрация эндотоксинов	Раствор, к которому прибавляют эндотоксины	Количество повторностей
А	0	Испытуемый раствор	Не менее 2
В	Средняя концентрация стандартной кривой	Испытуемый раствор	Не менее 2
С	Не менее трех концентраций (низшая определяется λ)	Вода для ИБЭ	Каждая концентрация не менее 2
Д	0	Вода для ИБЭ	Не менее 2

Раствор А – испытуемый раствор, который может быть разведен, не превышая МДР.

Раствор В – испытуемый образец в таком же разведении, что и раствор А, содержащий прибавленный эндотоксин в концентрации в центре или недалеко от центра стандартной кривой.

Раствор С – стандартный раствор эндотоксина в концентрациях, использовавшихся при валидации метода в соответствии с указанием подраздела 3. Предварительные испытания, (I) Подтверждение выполнения критериев стандартной кривой (положительные контроли).

Раствор Д – вода для ИБЭ (отрицательный контроль).

4. ИСПЫТАНИЕ

(I) Метод

Следуют указаниям, приведенным в подразделе 3. Предварительные испытания, (II) Определение мешающих факторов.

(II) Вычисления

Для раствора А в каждой повторности определяют концентрацию эндотоксина с использованием стандартной кривой, полученной с помощью раствора положительного контроля С.

Результаты испытания считают достоверными при выполнении следующих трех условий:

(1) результаты, полученные для раствора С, соответствуют требованиям валидации, приведенным в подразделе 1. Предварительные испытания. (I) Подтверждение выполнения критериев стандартной кривой;

(2) открываемость эндотоксина, рассчитанная из концентрации эндотоксина, определенной в растворе В, после вычитания концентрации эндотоксина, определенной в растворе А, находится в пределах 50–200 %.

(3) результат, полученный с раствором Д (отрицательный контроль), не превышает предельного значения для контроля, указанного в описании используемого реагента лизата, или он меньше, чем предел обнаружения используемого реагента лизата.

(III) Интерпретация

Испытуемый образец соответствует требованиям испытания, если средняя концентрация эндотоксинов в повторностях раствора А, с учетом разведений и концентрации, меньше предельного значения эндотоксина для испытуемого образца.

2.6.15. АКТИВАТОР ПРЕКАЛЛИКРЕИНА

Активатор прекалликреина (АПК) активирует прекалликреин, переводя его в калликреин, и может быть определен по его способности к отщеплению хромофора от синтетического пептидного субстрата в условиях, позволяющих определять скорость распада спектрофотометрическим методом; концентрация АПК вычисляется путем сравнения со стандартным образцом, калиброванным в Международных Единицах.

За Международную Единицу принята активность установленного количества Международного стандартного образца, представляющего собой лиофилизированный активатор прекалликреина. Эквивалентность Международного стандартного образца в Международных Единицах устанавливается Всемирной организацией здравоохранения.

РЕАКТИВЫ

БСП активатора прекалликреина в альбумине калибруется в Международных Единицах в сравнении с Международным стандартным образцом.

Буфер А. 6,055 г *трис(гидроксиметил)аминометана Р*, 1,17 г *натрия хлорида Р*, 50 мг *гексадиметрина бромида Р* и 100 мг *натрия азиды Р* растворяют в *воде Р*. Доводят 2 М раствором кислоты хлористоводородной до pH 8,0 и разводят *водой Р* до объема 1000 мл.

Буфер В. 6,055 г *трис(гидроксиметил)аминометана Р*, и 8,17 г *натрия хлорида Р* растворяют в *воде Р*. Доводят 2 М раствором кислоты хлористоводородной до pH 8,0 и разводят *водой Р* до объема 1000 мл.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ СУБСТРАТА ПРЕКАЛЛИКРЕИНА

Для предотвращения активации коагуляции крови или плазма, используемая для приготовления прекалликреина, должна контактировать только с пластиком или стеклянными поверхностями, обработанными силиконом.

9 объемов человеческой крови приливают к 1 объему антикоагулянтного раствора (ACD, CPD или раствора 38 г/л *цитрата натрия Р*), к которому прибавлен *гексадиметрина бромид Р* в количестве 1 мг/мл. Смесь центрифугируют при 3600 g в течение 5 мин. Отделяют плазму и снова центрифугируют при 6000 g в течение 20 мин для осаждения тромбоцитов. Плазму с уменьшенным содержанием тромбоцитов отделяют и подвергают диализу против 10 объемов буфера А в течение 20 ч. Диализованную плазму наносят на хроматографическую колонку, заполненную *агарозой-ДЭАЭ для ионообменной хроматографии Р*, которая взята в количестве, равном двойному объему плазмы, и которая уравновешена с помощью буфера А. Колонку элюируют буфером А со скоростью 20 мл/см²/ч. Собирают фракции элюата, регистрируя оптическую плотность при 280 нм (2.2.25). Фракции, содержащие первый пик белка, объединяют таким образом, чтобы объем объединенных фракций составлял 120 % объема плазмы с пониженным содержанием тромбоцитов.

Проверяют отсутствие калликреиновой активности в объединенном растворе субстрата, смешивая его в соотношении 1:20 с предварительно подогретым раствором хромогенного субстрата, который будет использоваться в определении, и инкубируют при 37 °C в течение 2 мин. Субстрат может быть использован в испытании, если увеличение оптической плотности составляет менее 0,001 единицы в минуту. К собранному раствору прибавляют *натрия хлорид Р* в количестве 7 г/л и фильтруют через мембранный фильтр (пористость 0,45 мкм). Порции фильтрата замораживают и хранят при температуре –25 °C; субстрат перед хранением может быть подвергнут лиофилизации.

Все процедуры от начала хроматографии до заморозки порций выполняют в течение одного рабочего дня.

МЕТОД

Определение может быть выполнено с использованием автоматического анализатора ферментов или подходящей системы с титрационным микропланшетом, позволяющей проводить кинетические измерения, с подходящим программным обеспечением для обсчета результатов. Разведения стандартов, образцов и субстрата прекалликреина могут быть приготовлены с использованием буфера В.

Разбавленные стандартные или испытываемые образцы инкубируют с субстратом прекалликреина в течение 10 мин так, чтобы объем неразбавленного образца не превышал 1/10 общего объема инкубируемой смеси, во избежание ошибок, связанных с изменением ионной силы и показателя рН инкубируемой смеси. Смесь или ее часть инкубируют с не менее чем равным объемом раствора подходящего синтетического хромогенного субстрата с установленной специфичностью к калликреину (например, *N*-бензоил-*L*-пролил-*L*-фенилаланил-*L*-аргинина-4-нитроанилида ацетат Р или *D*-пролил-*L*-фенилаланил-*L*-аргинина-4-нитроанилида дигидрохлорид Р), растворенного в буфере В. Регистрируют скорость изменения оптической плотности в минуту в течение промежутка времени от 2 до 10 минут при длине волны, специфичной для используемого субстрата. Для каждой смеси образца или стандарта готовят контроль, в котором вместо субстрата прекалликреина содержится буфер В.

В зависимости от используемого метода вносят поправки в значение $\Delta A/\text{мин}$, вычитая результат, полученный для соответствующего контроля. Результат может быть рассчитан по градуировочной графику или с использованием иного метода статистической обработки. Строят градуировочный график, используя значения, полученные таким образом для стандартного образца в соответствующих концентрациях; используют полученный график для определения активности АПК в испытываемом образце.

01/2013:20616

2.6.16. ИСПЫТАНИЯ НА ПОСТОРОННИЕ АГЕНТЫ В ВИРУСНЫХ ВАКЦИНАХ ДЛЯ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Если для проведения испытания требуется предварительная нейтрализация вируса, используют специфические антитела, не происходящие от человека или обезьян; если выращивание вируса производилось на тканях птичьего происхождения, то антитела не должны, кроме того, происходить от птиц. Для приготовления антисыворотки используют иммунизирующий антиген, произведенный клеточной культурой, имеющей происхождение, отличное от происхождения вакцины, и не содержащей посторонних агентов. Если предписано использование яиц *SPF* (*specified pathogens free*, не зараженные конкретными патогенами (свободные от специфических патогенов)), яйца отбирают из групп, не содержащих указанные патогены (5.2.2).

ВИРУСНЫЙ ПОСЕВНОЙ МАТЕРИАЛ

Образцы вирусного посевного материала отбирают во время его сбора и, если их не подвергают испытанию немедленно, хранят при температуре ниже $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Половозрелые мыши. Каждой из не менее 10 половозрелых мышей массой от 15 г до 20 г вводят интрацеребрально 0,03 мл и внутрибрюшинно 0,5 мл вирусного посевного материала. Мышей наблюдают в течение не менее 21 дня. Производят вскрытие всех мышей, погибших или имеющих симптомы заболевания по окончании первых 24 ч испытания, и исследуют их на наличие признаков вирусной инфекции как путем прямого макроскопического осмотра, так и перепрививкой подходящих суспензий тканей интрацеребральным и внутрибрюшинным методами дополнительно не менее чем пяти мышам, которых наблюдают в течение 21 дня. Вирусный посевной материал выдерживает испытание, если ни одна мышь не обнаруживает симптомов инфекции, которая может быть вызвана посевным материалом. Результаты испытания считают достоверными, если не менее 80 % привитых мышей выживают в течение периода наблюдения.

Новорожденные мыши. Каждой из не менее 20 мышей возрастом менее 24 ч вводят интрацеребрально 0,01 мл и внутрибрюшинно не менее 0,1 мл вирусного посевного материала. Мышей наблюдают ежедневно в течение не менее 14 дней. Производят

вскрытие всех мышей, погибших или имеющих симптомы заболевания по окончании первых 24 ч испытания, и исследуют их на наличие признаков вирусной инфекции как путем прямого макроскопического осмотра, так и перепрививкой подходящих суспензий тканей интрацеребральным и внутрибрюшинным методами дополнительно не менее чем пяти новорожденным мышам, которых наблюдают ежедневно в течение 14 дней. Вирусный посевной материал выдерживает испытание, если ни одна мышь не обнаруживает симптомов инфекции, которая может быть вызвана посевным материалом. Результаты испытания считают достоверными, если не менее 80 % привитых мышей выживают в течение периода наблюдения.

Морские свинки. Каждой из не менее 5 морских свинок массой от 350 г до 450 г вводят внутрибрюшинно 5,0 мл вирусного посевного материала. Животных наблюдают в течение не менее 42 дней, отмечая наличие симптомов заболевания. Производят вскрытие всех морских свинок, погибших или имеющих симптомы заболевания по окончании первых 24 ч испытания, и исследуют их макроскопически; ткани исследуют как микроскопически, так и культурально, отмечая наличие признаков инфекции. Животных, выживших в течение периода наблюдения, умерщвляют и исследуют аналогичным образом. Вирусный посевной материал выдерживает испытание, если ни одна морская свинка не обнаруживает признаков инфекции, которая может быть вызвана посевным материалом. Результаты испытания считают достоверными, если не менее 80 % морских свинок выживают в течение периода наблюдения.

Спироплазмы. Вирусный посевной материал, получаемый из клеток насекомых, не должен содержать спироплазм, что подтверждается валидированным методом, одобренным компетентным органом.

ВИРУСНЫЙ ПОСЕВНОЙ МАТЕРИАЛ И ВИРУСНЫЕ СБОРЫ

Образцы отбирают во время сбора и, если их не подвергают испытанию немедленно, хранят при температуре ниже -40°C .

Бактериальная и грибковая стерильность. 10 мл испытуемого образца должны выдерживать испытание на стерильность (2.6.1).

Микоплазмы. 10 мл испытуемого образца должны выдерживать испытание на микоплазмы (2.6.7).

Микобактерии (2.6.2). 5 мл испытуемого образца подвергают испытанию на наличие *Mycobacterium* spp. методами культивирования, обладающими известной чувствительностью в отношении определения этих организмов.

Испытание клеточной культуры на другие посторонние агенты. Нейтрализованные образцы, эквивалентные 500 человеческим дозам, но не менее 50 мл, если иные количества не предписаны в частной статье, испытывают на присутствие посторонних агентов путем введения в непрерывные почечные обезьяньи и человеческие клеточные культуры. Если вирус выращен на обезьяньих или человеческих клетках, нейтрализованный вирусный сбор также испытывают на отдельной культуре этих клеток. Если вирус вакцины выращен на системе клеток млекопитающих или птиц, отличающихся от обезьяньих или человеческих клеток, то производят инокуляцию клеток этих видов из отдельной партии (серии). Клетки инкубируют при температуре $(36\pm 1)^{\circ}\text{C}$ и наблюдают в течение 14 дней. Вирусный посевной материал или сбор выдерживает испытание, если ни в одной из клеточных культур не обнаруживаются признаков любых посторонних агентов, не внесенных в результате случайной контаминации. Результаты испытания считают достоверными, если не менее 80 % клеточных культур остаются жизнеспособными.

Птичьи вирусы (требуется только для вирусного посевного материала, выращенного на тканях птичьего происхождения, и вирусного сбора, выращенного на первичных тканях птичьего происхождения). Нейтрализуют образец, эквивалентный 100 человеческим дозам вакцины или 10 мл в зависимости от того, что из них больше. Используя по 0,5 мл на каждое яйцо, инокулируют группу оплодотворенных яиц *SPF* возрастом от 9 дней до 11 дней аллантоисным путем, а другую группу, возрастом от 5 до 7 дней, – в желточный мешок. Инкубируют в течение 7 дней. Вирусный посевной материал или сбор выдерживает испытание, если в аллантоисных жидкостях и жидкостях желточных мешков не обнаруживаются гемагглютинирующие агенты и если ни один из эмбрионов и

хориоаллантоисных мембран не обнаруживает макроскопической патологии. Результаты испытания считают достоверными, если не менее 80 % привитых яиц выживают в течение 7 дней.

Вирусы насекомых (требуется только для вирусов, выращенных на клетках насекомых). Если нет других указаний, нейтрализованные образцы, эквивалентные 500 человеческим дозам вакцины или 50 мл, в зависимости от того, что из них больше, испытывают на наличие посторонних агентов с помощью инокуляции на одну или более клеточную культуру, отличающуюся от использовавшихся при получении и допустимую для вируса насекомых, которая позволяет обнаруживать арбовирусы человека. Выбор клеток должен быть одобрен компетентным органом, учитывается также происхождение производящих клеток и вероятные контаминанты, которые можно обнаружить в этих клетках. Клетки инкубируют при температуре $(27\pm 1)^\circ\text{C}$ и наблюдают в течение 14 сут. Посевной вирусный материал или сбор выдерживает испытание, если ни в одной из клеточных культур не обнаруживается присутствие посторонних агентов. Результаты испытания считаются действительными, если не менее 80 % клеточных культур остаются жизнеспособными.

ПРОИЗВОДСТВЕННАЯ КЛЕТОЧНАЯ КУЛЬТУРА: КОНТРОЛЬНЫЕ КЛЕТКИ

Контрольные клетки изучают под микроскопом на отсутствие любой цитопатической дегенерации вирусного происхождения. Изучение проводят в течение периода инкубации, но не менее чем в течение 14 дней после инокуляции. Результаты испытания считают достоверными, если не менее 80 % контрольных клеточных культур выживают в течение периода наблюдения.

В момент последнего сбора вирусов, но не ранее, чем на 14-й день, выполняют нижеописанные испытания.

Испытание на гемадсорбирующие вирусы. Не менее 25 % контрольных культур испытывают на наличие гемадсорбирующих вирусов путем добавления эритроцитов морских свинок. Если испытание на гемадсорбирующие вирусы невыполнимо, проводят испытание на вирусы гемагглютинации. При необходимости эритроциты морских свинок можно хранить при температуре $(5\pm 3)^\circ\text{C}$ в течение не более 7 дней. Состояние половины культур оценивают после инкубации при температуре $(5\pm 3)^\circ\text{C}$ в течение 30 мин, а состояние другой половины – после инкубации при температуре от 20°C до 25°C в течение 30 мин. Признаков присутствия гемадсорбирующих агентов не должно обнаруживаться.

Испытание клеточных культур на другие посторонние агенты. Собирают супернатанты контрольных клеток и испытывают на присутствие посторонних агентов путем введения в почечные обезьяны и человеческие клеточные культуры. Если вирус вакцины выращен в системе клеток млекопитающих, то производят также инокуляцию клеток данного вида, но из отдельной партии (серии). На каждой клеточной системе испытывают не менее 5 мл. Инокулированные культуры инкубируют при температуре $(36\pm 1)^\circ\text{C}$ и наблюдают в течение 14 дней. Признаков присутствия посторонних агентов не должно обнаруживаться.

Если производственная клеточная культура поддерживается при температуре, отличной от $(36\pm 1)^\circ\text{C}$, выполняют дополнительное испытание на посторонние агенты при этой температуре с использованием клеток того же типа, который используется для выращивания вируса.

Если вирус выращен в клетках насекомых, то накопленную надосадочную жидкость инокулируют на не менее чем одну клеточную культуру, отличающуюся от использовавшихся при получении и допускаемую для вируса насекомых, которая позволяет обнаруживать арбовирусы человека. Клетки инкубируют при температуре $(27\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 14 сут. Признаков присутствия посторонних агентов не должно обнаруживаться.

Вирусы птичьего лейкоза (требуется только для вирусов, выращенных на первичных тканях птичьего происхождения). Проводят испытания на вирусы птичьего лейкоза с использованием 5 мл надосадочной жидкости от контрольных клеток.

КОНТРОЛЬНЫЕ ЯЙЦА

Гемагглютинирующие агенты. По 0,25 мл аллантоисной жидкости каждого из яиц испытывают на гемагглютинирующие агенты путем непосредственного смешивания с куриными красными кровяными тельцами и после засева яиц *SPF*, выполняемого следующим образом: инокулируют объединенный образец амниотических жидкостей общим объемом 5 мл в аллантоисную и амниотическую полости яиц *SPF*. Объемы введения – по 0,5 мл. Контрольные яйца выдерживают испытание, если ни в одном случае не обнаруживаются признаки присутствия гемагглютинирующих агентов.

Вирусы птичьего лейкоза. Используют образец объединенных амниотических жидкостей контрольных яиц общим объемом 10 мл. Проводят усиление путем пяти пассажей на клеточных культурах куриных эмбрионов, не содержащих вирусов лейкоза; испытание на птичий лейкоз выполняют с использованием клеток, полученных в пятом пассаже. Контрольные яйца выдерживают испытание, если не обнаруживается признаков присутствия вирусов лейкоза.

Другие посторонние агенты. Образцы объединенных амниотических жидкостей контрольных яиц по 5 мл прививают на человеческие и обезьяньи клеточные культуры. Клеточные культуры наблюдают в течение 14 дней. Контрольные яйца выдерживают испытание, если не обнаруживается признаков присутствия посторонних агентов. Результаты испытания считают достоверными, если не менее 80 % привитых культур выживают до окончания периода наблюдения.

01/2013:20617

2.6.17. ИСПЫТАНИЕ НА АНТИКОМПЛЕМЕНТАРНУЮ АКТИВНОСТЬ ИММУНОГЛОБУЛИНА

Для определения антикомплемментарной активности (АКА) иммуноглобулина определенное количество испытуемого материала (10 мг иммуноглобулина) подвергают инкубации с определенным количеством комплемента морских свинок (20 CH_{50}), после чего титруют остаток комплемента; антикомплемментарная активность выражается как поглощение комплемента в процентах к контрольному образцу комплемента, принимаемому за 100 %.

За гемолитическую единицу активности комплемента (CH_{50}) принимают такое его количество, которое в данных реакционных условиях приводит к лизису $2,5 \cdot 10^8$ из общего количества $5 \cdot 10^8$ оптимальным образом сенсibilизированных эритроцитов.

Основной раствор магния и кальция. 1,103 г кальция хлорида *P* и 5,083 г магния хлорида *P* растворяют в воде *P* и доводят до объема 25 мл этим же растворителем.

Основной буферный раствор барбитала. 207,5 г натрия хлорида *P* и 25,48 г барбитал-натрия *P* растворяют в 4000 мл воды *P* и доводят 1 *M* раствором кислоты хлористоводородной до значения pH 7,3. Прибавляют 12,5 мл основного раствора кальция и магния и доводят водой *P* до объема 5000 мл. Фильтруют через мембранный фильтр (размер пор 0,22 мкм). Хранят при температуре 4 °C в стеклянных контейнерах.

Раствор желатина. 12,5 г желатина *P* растворяют приблизительно в 800 мл воды *P* и нагревают на водяной бане до кипения. Охлаждают до 20 °C и доводят водой *P* до объема 10 л. Фильтруют через мембранный фильтр (размер пор 0,22 мкм). Хранят при температуре 4 °C. Использованию подлежат только прозрачные растворы.

Раствор цитрата. 8,0 г натрия цитрата *P*, 4,2 г натрия хлорида *P* и 20,5 г глюкозы *P* растворяют в 750 мл воды *P*. Доводят раствором 100 г/л лимонной кислоты *P* до pH 6,1 и разводят водой *P* до объема 1000 мл.

Буферный раствор желатина и барбитала. 4 объема раствора желатина прибавляют к 1 объему основного буферного раствора барбитала и перемешивают. При необходимости доводят 1 *M* раствором натрия гидроксида или 1 *M* раствором кислоты хлористоводородной до pH 7,3. Хранят при температуре 4 °C. Ежедневно готовят свежие растворы.

Стабилизированная овечья кровь. Смешивают равные объемы овечьей крови и раствора цитрата и перемешивают. Хранят при температуре 4 °C не менее 7 и не более 28

дней. (Стабилизированная овечья кровь и эритроциты овцы доступны в различных коммерческих источниках).

Гемолизин. Антисыворотку против красных кровяных телец овцы готовят с использованием кроликов. (Такие антисыворотки доступны в различных коммерческих источниках).

Комплемент морских свинок. Готовят пул сыворотки из крови не менее 10 морских свинок. Сыворотку отделяют от свернувшейся крови центрифугированием при температуре около 4 °С. Сыворотку хранят в небольших количествах при температуре ниже –70 °С.

МЕТОД

Приготовление стандартизированной 5 % суспензии эритроцитов овцы. Эритроциты овцы отделяют центрифугированием соответствующего объема стабилизированной овечьей крови, промывают не менее трех раз буферным раствором желатина и барбитала и готовят в том же растворе суспензию с содержанием клеток 5 % (об/об). Плотность клеток в суспензии определяют следующим образом: 0,2 мл прибавляют к 2,8 мл воды *P* и центрифугируют лизированный раствор в течение 5 мин при 1000 g; плотность клеток соответствует требованиям, если оптическая плотность (2.2.25) супернатанта при 541 нм составляет (0,62±0,01). Плотность клеток корректируют прибавлением буферного раствора желатина и барбитала в соответствии с формулой:

$$V_f = \frac{V_i \cdot A}{0,62},$$

где:

V_f – окончательный объем после коррекции;

V_i – исходный объем;

A – оптическая плотность исходной суспензии при 541 нм.

Суспензия после коррекции содержит около $1 \cdot 10^9$ клеток в миллилитре.

Титрование гемолизина. Готовят разведения гемолизина в соответствии с таблицей 2.6.17.-1.

К каждой пробирке из серии разведения гемолизина, начиная с разведения 1:75, прибавляют по 1,0 мл 5 % суспензии эритроцитов овцы и перемешивают. Инкубируют при температуре 37 °С в течение 30 мин.

По 0,2 мл каждой из этих инкубированных смесей переносят в новые пробирки и прибавляют по 1,10 мл буферного раствора желатина и барбитала и по 0,2 мл разведенного компонента морских свинок (например, в разведении 1:150). Эти операции выполняют дважды.

В качестве контрольного образца негемолизированных клеток готовят три пробирки, содержащие по 1,4 мл буферного раствора желатина и барбитала и 0,1 мл 5 % суспензии эритроцитов овцы.

Таблица 2.6.17.-1

Требуемое разведение гемолизина	Готовят с использованием		
	Буферный раствор желатина и барбитала		Гемолизин
	Объем (мл)	Разведение (1:...)	Объем (мл)
7,5	0,65	неразведенный	0,1
10	0,90	неразведенный	0,1
75	1,80	7,5	0,2
100	1,80	10	0,2
150	1,00	75	1,0
200	1,00	100	1,0
300	1,00	150	1,0
400	1,00	200	1,0
600	1,00	300	1,0
800	1,00	400	1,0

1200	1,00	600	1,0
1600	1,00	800	1,0
2400	1,00	1200	1,0
3200*	1,00	1600	1,0
4800*	1,00	2400	1,0

* 1,0 мл смеси отбрасывают.

В качестве полностью гемолизированного контрольного образца готовят три пробирки, содержащие по 1,4 мл воды *P* и 0,1 мл 5 % суспензии эритроцитов овцы.

Все пробирки инкубируют при температуре 37 °С в течение 60 мин и центрифугируют при 1000 *g* в течение 5 мин. Измеряют оптическую плотность (2.2.25) супернатантов при 541 нм и рассчитывают для каждой из пробирок степень гемолиза в процентах по формуле:

$$\frac{A_a - A_1}{A_b - A_1} \cdot 100,$$

где:

A_a – оптическая плотность в пробирках с разведениями гемолизина;

A_b – средняя оптическая плотность в трех пробирках с полным гемолизом;

A_1 – средняя оптическая плотность в трех пробирках без гемолиза.

На миллиметровой бумаге строят график зависимости степени гемолиза в процентах (по оси ординат) от обратного значения соответствующего разведения гемолизина (по оси абсцисс). Определяют из графика оптимальное разведение гемолизина. Выбирают разведение таким образом, чтобы дальнейшее увеличение количества гемолизина не приводило бы к существенному изменению степени гемолиза. Это разведение принимают за одну минимальную гемолитическую единицу (1 МГЕ) в 1,0 мл. Оптимальное гемолитическое разведение гемолизина для приготовления сенсibilизированных эритроцитов овцы составляет 2 МГЕ/мл.

Результат титрования гемолизина считают достоверным при условии, что максимальная степень гемолиза составляет от 50 % до 70 %. Если максимальная степень гемолиза не находится в этих пределах, титрование повторяют с использованием более или менее разведенного раствора компонента.

Приготовление оптимизированных сенсibilизированных эритроцитов (гемолитической системы). Готовят подходящий объем разведенного гемолизина с содержанием 2 МГЕ/мл и равный объем стандартизированной 5 % суспензии эритроцитов овцы. Прибавляют разведение гемолизина к стандартизированной суспензии клеток и перемешивают. Инкубируют при температуре 37 °С в течение 15 мин, после чего хранят при температуре от 2 °С до 8 °С и используют в течение 6 ч.

Титрование компонента. Готовят подходящее разведение компонента (например, 1:250) с использованием буферного раствора желатина и барбитала и выполняют титрование в двух повторностях в соответствии с таблицей 2.6.17.-2.

Таблица 2.6.17.-2

Номер пробирки	Объем разведения компонента (например, 1:250), мл	Объем буферного раствора желатина и барбитала
1	0,1	1,2
2	0,2	1,1
3	0,3	1,0
4	0,4	0,9
5	0,5	0,8
6	0,6	0,7
7	0,7	0,6
8	0,8	0,5
9	0,9	0,4
10	1,0	0,3
11	1,1	0,2

12	1,2	0,1
Три пробирки в качестве контроля – гемолиз 0 %	–	1,3
Три пробирки со 100 % гемолизом	–	1,3 мл воды

К содержимому каждой пробирки прибавляют по 0,2 мл сенсibilизированных эритроцитов овцы, хорошо перемешивают и инкубируют при температуре 37 °С в течение 60 мин. Пробирки охлаждают на ледяной бане и центрифугируют при 1000 g в течение 5 мин. Измеряют оптическую плотность супернатанта при 541 нм и рассчитывают степень гемолиза (Y) по формуле

$$\frac{A_c - A_1}{A_b - A_1},$$

где:

A_c – оптическая плотность в пробирках 1–12;

A_b – средняя оптическая плотность в пробирках со 100 % гемолизом;

A_1 – средняя оптическая плотность в контролях с 0 % гемолизом.

На миллиметровой бумаге с логарифмическим масштабом по обеим осям строят график со значениями $Y / (1 - Y)$ на оси абсцисс и количеством разведенного комплемента на оси ординат. Строят наилучшую прямую, соответствующую нанесенным точкам, и определяют ординату для дозы комплемента, приводящей к 50 % гемолизу, т.е. $Y / (1 - Y) = 1,0$. Рассчитывают активность в гемолитических единицах ($CH_{50}/мл$) по формуле:

$$\frac{C_d}{C_a \cdot 5},$$

где:

C_d – обратное значение разведения комплемента;

C_a – объем (мл) разведенного комплемента, приводящий к 50 % гемолизу;

5 – масштабный множитель для учета количества эритроцитов.

Результат испытания считают достоверным при условии, что для диапазона гемодиализа от 15 % до 85 % выполняется линейная зависимость, а тангенс угла наклона прямой составляет от 0,15 до 0,40, предпочтительно от 0,18 до 0,30.

Испытание на антикомплементарную активность. Готовят разведение комплемента, содержащее 100 $CH_{50}/мл$, путем разбавления титрованного комплемента морских свинок буферным раствором желатина и барбитала. В зависимости от испытуемого иммуноглобулина и основываясь на данные по валидации, может быть необходимым доведение значения pH до 7. Для иммуноглобулина с содержанием 50 мг/мл готовят следующие смеси для инкубации:

Таблица 2.6.17.-3

	Испытуемый образец иммуноглобулина	Контроль комплемента (в повторе)
Иммуноглобулин (50 мг/мл)	0,2 мл	–
Буферный раствор желатина и барбитала	0,6 мл	0,8 мл
Комплемент	0,2 мл	0,2 мл

Проводят испытание образца иммуноглобулина и готовят положительный и отрицательный контроли АКА с использованием *БСП иммуноглобулина человеческого* в соответствии с указаниями на прилагающемся к нему листке-вкладыше. Если концентрация иммуноглобулина отличается от 50 мг/мл, используют большие либо меньшие объемы

образца и буферного раствора желатина и барбитала. Например, при концентрации иммуноглобулина 30 мг/мл к 0,33 мл его раствора прибавляют 0,47 мл буферного раствора желатина и барбитала с получением 0,8 мл. Пробирки укупоривают и инкубируют при 37 °С в течение 60 мин. По 0,2 мл каждой из инкубированных смесей прибавляют к 9,8 мл буферного раствора желатина и барбитала для разведения комплемента. Описанную выше операцию титрования комплемента проводят для каждой из пробирок, определяя остаточную активность комплемента (таблица 2.6.17.-2). Антикомплементарную активность испытуемого образца рассчитывают относительно контроля комплемента, принимаемого за 100 %, по формуле:

$$\frac{a-b}{a} \cdot 100,$$

где:

a – средняя активность комплемента (CH₅₀/мл) в контролях комплемента;

b – активность комплемента (CH₅₀/мл) в испытуемом образце.

Результаты испытания считают достоверными, если:

– антикомплементарные активности, определенные для АКА-отрицательного и АКА-положительного контролей находятся в пределах, указанных в листке-вкладыше, прилагающемся к стандартному биологическому препарату;

– активность комплемента в контроле комплемента (a) находится в пределах от 80 CH₅₀/мл до 120 CH₅₀/мл.

01/2013:20618

2.6.18. ИСПЫТАНИЕ ЖИВЫХ ВИРУСНЫХ ВАКЦИН НА НЕЙРОВИРУЛЕНТНОСТЬ

В каждом испытании используют не менее десяти серонегативных по отношению к испытуемому вирусу обезьян. Каждой из обезьян в таламический отдел каждого полушария вводят не менее 0,5 мл испытуемого материала, если нет других указаний в частной статье. Общее количество привитого каждой обезьяне вируса не должно быть менее количества, содержащегося в рекомендованной единичной человеческой дозе вакцины. Для проверки наличия диких нейровирулентных вирусов контрольную группу, состоящую не менее чем из четырех обезьян, содержат в тех же клетках, что и группу привитых обезьян, или в непосредственной близости от них. Привитых обезьян наблюдают в течение 17–21 дней, отмечая возникновение паралича и других неврологических симптомов; обезьян из контрольной группы наблюдают в течение того же периода и дополнительно 10 дней. Животные, погибшие в течение первых 48 ч после инъекции, считаются погибшими по причинам неспецифического характера и могут быть заменены другими. Результаты испытания признают недостоверными, если более 20 % привитых обезьян погибают по неспецифическим причинам и/или образцы сыворотки, отобранные у обезьян контрольной группы, в момент прививки испытуемых животных и через 10 дней после умерщвления последних, имеют признаки инфекции, вызванной диким вирусом испытуемого типа или вирусом кори. По окончании периода наблюдения выполняют вскрытие и гистопатологическое изучение соответствующих отделов мозга на предмет наличия воздействия на центральную нервную систему. Материал выдерживает испытание, если не обнаруживаются неожиданных клинических и гистопатологических признаков воздействия на центральную нервную систему, которые могут быть вызваны введенным вирусом.

01/2013:20619

2.6.19. ИСПЫТАНИЕ ПЕРОРАЛЬНОЙ ВАКЦИНЫ ПОЛИОМИЕЛИТА НА НЕЙРОВИРУЛЕНТНОСТЬ

Обезьяны, используемые в испытании на нейровирулентность, должны соответствовать требованиям, приведенным в частной статье *Вакцина полиомиелита, пероральная*, и иметь массу тела не менее 1,5 кг. Патогенность для обезьян семейств *Macaca* или *Cercopithecus monkeys* испытывается в сравнении с патогенностью стандартного вирусного препарата для испытания на нейровирулентность путем введения в поясничный отдел центральной нервной системы после седации с использованием подходящего агента, например, кетамина гидрохлорида. Для образца сыворотки, отобранного до инъекции, должно быть показано отсутствие нейтрализующих антител в разведении 1:4 при испытании против не более чем 1000 ССІВ₅₀ каждого из трех типов полиовируса.

Количество обезьян. Вакцину и подходящий гомотипический вирус сравнения испытывают одновременно в одной и той же группе обезьян. Вакцину и препарат сравнения (стандартный образец) вводят равному количеству животных. Животных с различающимися типами введенного препарата размещают случайным образом по клеткам, а их принадлежность кодируется таким образом, чтобы тип полученной ими прививки был скрыт от наблюдателей. Количество привитых обезьян должно быть таково, чтобы при оценке как вакцины, так и препарата сравнения было включено не менее одиннадцати обезьян, положительных по отношению к вирусу типов 1 и 2, и не менее восемнадцати обезьян, положительных по отношению к вирусу типа 3 (положительными считают обезьян, имеющих специфические нейронные повреждения в центральной нервной системе, вызванные полиовирусом). С одним и тем же гомотипическим препаратом сравнения могут испытываться несколько партий вакцины. По возможности, используют обезьян из одной и той же карантинной группы. В других случаях используют обезьян из двух групп, причем вакцина и препарат сравнения прививаются равному количеству обезьян из каждой группы. Если испытание проводится в течение двух рабочих дней, в каждый из дней вакциной и гомотипическим препаратом сравнения прививают равное количество обезьян.

Содержание вируса. Содержание вируса в вакцине и гомотипическом препарате сравнения регулируют таким образом, чтобы они были насколько возможно близки и находились в пределах от 10^{5.5} до 10^{6.5} ССІD в 0,1 миллилитре.

Наблюдение. Всех обезьян наблюдают в течение 17–22 дней, отмечая признаки полиомиелита или других вирусных инфекций. Обезьян, выживших в течение первых 24 ч, но погибших до 11-го дня после прививки, подвергают вскрытию для определения того, являлся ли причиной гибели полиомиелит. Животные, погибшие по причинам, не связанным с полиомиелитом, не учитываются при оценке результатов. Умиравших и в тяжелой степени парализованных животных умерщвляют и вскрывают. Также вскрывают всех животных, выживших в течение периода наблюдения. Результаты испытания считают недостоверными, если более чем у 20 % животных в течение периода наблюдения была обнаружена интеркуррентная инфекция.

Количество срезов, подлежащих испытанию. Гистологическому исследованию подлежат как минимум поясничный и шейный отделы, верхний и нижний продолговатый мозг, средний мозг, зрительный бугор и двигательная область коры головного мозга каждой обезьяны. Отбирают препараты толщиной 15 мкм и окрашивают их галлоцианином. Минимальные количества подлежащих испытанию срезов составляют:

- (a) 12 срезов, репрезентативных для поясничного утолщения;
- (b) 10 срезов, репрезентативных для шейного утолщения;
- (c) 2 среза продолговатого мозга;
- (d) 1 срез моста и мозжечка;
- (e) 1 срез среднего мозга;
- (f) 1 срез с левой и правой части зрительного бугра;
- (g) 1 срез с левой и правой части двигательной области коры головного мозга.

Подсчет вирусной активности. Для оценки вирусной активности в полусекциях поясничного корда и ствола мозга используют систему подсчета тяжести повреждений, по которой следующим образом дифференцируют клеточную инфильтрацию и разрушение нейронов:

- 1) наличие лишь клеточной инфильтрации (обезьяна не считается положительной);
- 2) клеточная инфильтрация с минимальным повреждением нейронов;

- 3) клеточная инфильтрация со значительным повреждением нейронов;
- 4) массовое повреждение нейронов в сочетании с клеточной инфильтрацией или без нее.

Полученные значения записывают на стандартном бланке (пример подходящей формы имеется в требованиях к биологическим субстанциям «*Requirements for Biological substances*», № 7, Всемирной организации здравоохранения в разделе «Требования к вакцине полиомиелита (пероральной)»). Обезьяна, на срезах тканей которой имеются поврежденные нейроны, но не имеется иголючатых трактов, считается положительной. Обезьяна, на срезах тканей которой имеются иголючатые тракты, но не имеется поврежденных нейронов, не считается положительной. Срезы, на которых имеются повреждения травматического происхождения, но не имеется специфических вирусных повреждений, при подсчете не учитываются.

Уровни тяжести повреждений основаны на данных, полученных при изучении полусекций поясничных (*L*), шейных (*C*) и мозговых (*B*) гистологических срезов. Для каждой положительной обезьяны рассчитывают уровень повреждений (*LS*) по формуле:

$$LS = \frac{\left[\frac{\text{Суммарное число } L}{\text{Суммарное число}} \right] + \left[\frac{\text{Суммарное число } C}{\text{Суммарное число}} \right] + \left[\frac{\text{Суммарное число } B}{\text{Суммарное число}} \right]}{3}$$

Для каждой группы положительных обезьян рассчитывают среднее значение уровня повреждений.

Оценка. Сравнение вирусной активности в вакцине и в препарате сравнения основано на активности в поясничном расширении корда и степени распространения активности из этого региона в шейное расширение и головной мозг. Положительное или отрицательное решение основано на общем уровне для всех животных, подвергнутых испытанию. Необычно высокая активность как в поясничном отделе, так и в результате распространения из этого региона, обнаруженная у отдельных животных, также должна приниматься во внимание при вынесении окончательного решения. Моновалентный материал выдерживает испытание, если имеется требуемое количество положительных животных и если ни в одном из клинических и гистопатологических исследований не выявлено существенных различий в патогенности между вирусом вакцины и препаратом сравнения. Критерии положительного решения приведены ниже.

Критерии. Для каждой из вакцин сравнения (типов 1, 2 и 3) проводят подходящее количество (например, четыре) квалификационных испытаний на вирулентность с целью получения данных об их активности как основы критериев для оценки испытываемых вакцин. Для повторных испытаний каждого из вирусов сравнения рассчитывают общий средний уровень повреждений (*M*), а также суммарную оценку дисперсии (*s*²) и отклонения (*s*) результатов испытания.

Критерии достоверности результатов испытания препарата сравнения устанавливаются на основе данных, накопленных в квалификационных испытаниях. Общепринятых критериев не имеется; для лабораторий с ограниченным опытом работы может быть полезен следующий эмпирический метод установления допустимых пределов среднего уровня повреждений для препарата сравнения (*X_{ref}*):

Таблица 2.6.19.-1

	Нижний предел	Верхний предел
Типы 1 и 2	$M - s$	$M + s$
Тип 3	$M - s/2$	$M + s$

Если средний уровень повреждений испытываемой вакцины равен *X_{test}*, а *C*₁, *C*₂ и *C*₃ – константы, определенные ниже, то:

$$X_{\text{test}} - X_{\text{ref}} > C_1,$$

вакцина не выдерживает испытание при:

$$X_{\text{test}} - X_{\text{ref}} > C_1,$$

вакцина может быть однократно подвергнута повторному испытанию при:

$$C_1 < X_{\text{test}} - X_{\text{ref}} < C.$$

Если вакцина испытывается повторно, средние значения уровней повреждений для испытуемой вакцины и препарата сравнения рассчитываются заново. Вакцина не выдерживает испытание при:

$$\frac{X_{(\text{test 1} + \text{test 2})} - X_{(\text{ref 1} + \text{ref 2})}}{2} > C_3,$$

Константы C_1 , C_2 и C_3 рассчитывают по формулам:

$$C_1 = 2,3 \sqrt{\frac{2s^2}{N_1}},$$

$$C_2 = 2,6 \sqrt{\frac{2s^2}{N_1}},$$

$$C_3 = 1,6 \sqrt{\frac{2s^2}{N_1}},$$

где:

N_1 – количество положительных обезьян при испытании вакцины;

N_2 – количество положительных обезьян в двух испытаниях;

2,3 – нормальное отклонение для 1 % уровня;

2,6 – нормальное отклонение для 0,5 % уровня;

1,6 – нормальное отклонение для 5 % уровня.

Испытание на нейровирулентность, в котором получен средний уровень повреждений препарата сравнения (X_{ref}), несовместимый с предшествующим опытом, не используется для оценки испытуемой вакцины. Если результаты испытания достоверны, рассчитывают средний уровень повреждений для испытуемой вакцины (X_{test}) и сравнивают его с соответствующим значением для гомотипического препарата сравнения.

01/2013:20620

2.6.20. АНТИ-А И АНТИ-В ГЕМАГГЛЮТИНИНЫ (НЕПРЯМОЙ МЕТОД)

Готовят два серийных разведения испытуемого образца в растворе 9 г/л *натрия хлорида* Р. К каждому разведению одного ряда прибавляют равный объем 5 % (об/об) суспензии эритроцитов группы А₁, предварительно трижды промытых раствором натрия хлорида. К каждому разведению другого ряда прибавляют равный объем 5 % (об/об) суспензии эритроцитов группы В, предварительно трижды промытых раствором натрия хлорида. Суспензии инкубируют при температуре 37 °С в течение 30 мин, затем клетки трижды промывают раствором натрия хлорида. Клетки оставляют в контакте с поливалентным антиреагентом человеческого иммуноглобулина в течение 30 мин. Каждую из суспензий, не подвергая центрифугированию, исследуют под микроскопом на агглютинацию.

2.6.21. МЕТОДЫ АМПЛИФИКАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

1. ВВЕДЕНИЕ

Методы амплификации нуклеиновых кислот основаны на двух различных подходах:

1) амплификация последовательности-мишени нуклеиновой кислоты с использованием, например, полимеразной цепной реакции (ПЦР, *PCR*), лигазной цепной реакции (ЛЦР, *LCR*) или изотермической амплификации рибонуклеиновой кислоты (РНК, *RNA*);

2) амплификация сигнала гибридизации с использованием, например, для дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК, *DNA*) метода разветвленной ДНК (*bdNA*); в этом случае амплификация сигнала достигается без подвергания нуклеиновой кислоты повторяющимся циклам амплификации.

В данной общей статье в качестве стандартного метода описывается метод ПЦР. Могут применяться и альтернативные методы, если они выдерживают требования к качеству, перечисленные ниже.

2. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

В данной статье устанавливаются требования к подготовке образца, к амплификации *in vitro* последовательностей ДНК и к детектированию специфического продукта ПЦР. С помощью ПЦР могут быть детектированы определенные последовательности ДНК. Последовательности РНК могут также быть детектированы путем обратной транскрипции РНК на комплементарную ДНК (*cDNA*) с последующей амплификацией.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

ПЦР представляет собой процедуру, позволяющую производить в условиях *in vitro* амплификацию сегментов ДНК или РНК (после обратной транскрипции на *cDNA*).

После денатурации двунитевой ДНК в одонитевую два синтетических олигонуклеотидных праймера противоположной полярности спариваются с их соответствующими комплементарными последовательностями в подлежащей амплификации ДНК. Короткие двунитевые участки, формирующиеся в результате специфического спаривания оснований праймеров и комплементарной ДНК-последовательности, образуют границы амплифицируемого сегмента ДНК и служат начальными точками для синтеза ДНК *in vitro* с участием термостабильной ДНК-полимеразы.

Процесс амплификации ДНК состоит из циклов, включающих:

– тепловую денатурацию нуклеиновой кислоты (последовательности-мишени) на две отдельные нити;

– специфический отжиг последовательности-мишени с праймерами в подходящих реакционных условиях;

– наращивание праймеров, присоединенных к обеим отдельным нитям, под воздействием ДНК-полимеразы при подходящей температуре (синтез ДНК).

Повторяющиеся циклы тепловой денатурации, отжига с праймерами и синтеза ДНК приводят к экспоненциальной амплификации сегмента ДНК, ограниченного праймерами.

Специфический продукт ПЦР, называемый ампликоном, может быть определен разнообразными методами соответствующей специфичности и чувствительности.

4. ИСПЫТУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

В связи с высокой чувствительностью ПЦР образцы должны быть оптимальным образом защищены от попадания извне последовательностей-мишеней. Отбор проб, хранение и транспортировку испытуемого материала производят в условиях, минимизирующих разрушение последовательности-мишени. В случае проведения испытания на РНК-последовательности необходимо принять особые меры предосторожности ввиду высокой чувствительности РНК к деструктивному воздействию

рибонуклеаз. Следует учитывать, что некоторые добавляемые реагенты, например, антикоагулянты или консерванты, могут оказывать влияние на ход определения.

5. МЕТОДИКА ИСПЫТАНИЯ

5.1. Предотвращение загрязнения

В связи с риском загрязнения следует строго разграничивать рабочие зоны в зависимости от используемых материалов и применяемой технологии. Учитываемые факторы включают передвижение персонала, использование спецодежды, перемещение материалов, подачу воздуха и процедуры деkontаминации.

Систему следует разделить на такие отсеки, как:

- зона основной смеси (зона, в которой работы осуществляются только с материалами, не содержащими шаблонных последовательностей, например, с праймерами, буферными растворами и т.д.);
- пре-ПЦР (зона, в которой ведется работа с реагентами, образцами и контролями);
- ПЦР-амплификация (амплифицируемый материал содержится в закрытой системе);
- пост-ПЦР детектирование (единственная зона, в которой операции с амплифицируемым материалом производятся в открытой системе).

5.2. Подготовка образцов

При подготовке образцов подлежащая амплификации последовательность-мишень должна быть эффективным и воспроизводимым образом экстрагирована или высвобождена из испытуемого материала так, чтобы амплификация в избранных реакционных условиях была осуществима. Могут быть использованы различные физико-химические процедуры экстракции и/или обогащения.

Добавки, присутствующие в испытуемом материале, могут оказывать влияние на ход ПЦР. Для контроля присутствия ингибиторов в испытуемом материале следует провести процедуры, описанные в пункте 7.3.2.

В случае РНК-матриц следует уделять внимание предотвращению проявления рибонуклеазной активности.

5.3. Амплификация

Амплификация последовательности-мишени методом ПЦР проводится в оптимизированных циклически изменяющихся условиях (температурный профиль для денатурации двунитевой ДНК, отжига и наращивания праймеров; периоды инкубации при выбранных температурах; скорость наращивания). Эти условия зависят от различных параметров, например:

- длины и состава праймера и последовательности-мишени;
- типа ДНК-полимеразы, буферной смеси и реакционного объема, используемых при амплификации;
- типа используемого устройства для термоциклирования и скорости передачи тепла между аппаратом, реакционным сосудом и реакционной жидкостью.

5.4. Детектирование

Ампликон, образовавшийся в результате ПЦР, может быть идентифицирован по размеру, последовательности химической модификации или комбинации этих параметров. Характеризация по размеру может быть проведена методами гель-электрофореза (с использованием слоев агарозного или полиакриламидного гелей или капиллярного электрофореза) или колоночной хроматографии (например, ВЭЖХ). Характеризация по составу последовательности может быть проведена путем специфической гибридизации зондов, содержащих последовательность, комплементарную мишени, или расщеплением амплифицированного материала, отражающим наличие мишень-специфических сайтов ферментативной рестрикции. Характеризация по химической модификации может быть проведена, например, введением в ампликоны флуорофора с дальнейшей детекцией флуоресценции, возникающей в результате возбуждения.

Детектирование ампликонов может быть достигнуто с помощью проб, помеченных для последующего радиоизотопного или иммуноферментного сопряженного детектирования.

6. ОЦЕНКА И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результат испытания является достоверным лишь при условии получения однозначно положительных результатов для положительного контроля (контролей) и однозначно отрицательных результатов для отрицательного контроля (контролей). В связи с исключительно высокой чувствительностью метода ПЦР и с риском попадания загрязняющих примесей, положительные результаты должны подтверждаться двукратным полным повторением процедуры испытания по возможности с новой аликвотой образца. Считают, что образец дает положительную реакцию, если не менее одного из повторных испытаний дает положительный результат. Как только определен измеряемый предел мишени, необходима система количественного определения.

7. ОБЕСПЕЧЕНИЕ КАЧЕСТВА

7.1. Валидация системы для количественного определения методом ПЦР

Программа валидации должна включать валидацию оборудования и используемого метода ПЦР. Следует учитывать положения, изложенные в руководстве *ICH* (тема *Q2B*) «Валидация аналитического метода: методология».

Для валидации ПЦР-испытания обязательным является применение официальных рабочих стандартных образцов или стандартных образцов внутреннего применения, калиброванных относительно Международных стандартных образцов, для последовательностей-мишеней, при определении которых будет использоваться система.

7.1.1. Определение положительного граничного значения

При валидации испытания должно быть определено положительное граничное значение. Положительное граничное значение определяется как минимальное количество последовательностей-мишеней в объеме образца, которые могут быть определены в 95 % испытаний. Положительное граничное значение зависит от таких взаимосвязанных факторов, как объем экстрагированного образца и эффективность методологии экстракции, транскрипция РНК-мишени в *cDNA*, процесс амплификации и детектирования.

При определении предела обнаружения системы следует учитывать положительные граничные значения для каждой последовательности-мишени и результаты проведения испытания выше и ниже этих значений.

7.1.2. Система количественного определения

При валидации количественного определения проверяются следующие параметры: правильность, точность, специфичность, предел количественного определения, линейность, диапазон и робастность.

7.2. Контроль качества реагентов

Все реагенты, имеющие критическое значение для используемой методологии, должны проходить контроль перед использованием в рутинных испытаниях. Их пригодность или непригодность основывается на заранее определенных критериях качества.

Праймеры являются важнейшими компонентами ПЦР-анализа, и поэтому следует уделять особое внимание их строению, чистоте и валидации для ПЦР-анализов. Праймеры могут быть подвергнуты модификации (например, связыванием с флуорофором или антигеном) для проведения детектирования ампликона специфическими методами при условии, что такие модификации не приведут к ингибированию правильного и эффективного протекания процесса амплификации последовательности-мишени.

7.3. Контроль хода испытания

7.3.1. Внешние контроли

Для минимизации риска загрязнения и обеспечения адекватной чувствительности в состав каждого ПЦР-испытания вводят следующие внешние контроли:

- положительный контроль: в нем содержится определенное количество копий последовательности-мишени; количество копий близко к положительному граничному значению, определяется индивидуально для каждой системы и кратно положительному граничному значению данной системы;

- отрицательный контроль: образец аналогичного основного состава, для которого доказано отсутствие последовательностей-мишеней.

7.3.2. Внутренний контроль

Внутренние контроли представляют собой определенные последовательности нуклеиновых кислот, содержащие сайты связывания с праймерами, если нет других указаний в частной статье. Внутренние контроли должны амплифицироваться так же эффективно, как и испытуемая последовательность-мишень, но ампликоны должны иметь четкие отличия. Тип нуклеиновой кислоты (ДНК/РНК), используемой в качестве внутреннего контроля, должен быть тем же, что и в испытуемом материале. Внутренний контроль предпочтительно добавлять к испытуемому материалу до выделения нуклеиновой кислоты; при этом он может использоваться для общего контроля процесса (экстракция, обратная транскрипция, амплификация, детектирование).

7.3.3. Контроль пороговых значений

Контроль пороговых значений для количественного определения – это испытуемый образец с таким содержанием аналита, которое не должно превышать. Он содержит аналит, калиброванный желательно в Международных единицах, и анализируется параллельно при каждом количественном определении.

7.4. Внешняя оценка качества

Участие во внешних программах оценки качества представляет собой важную процедуру обеспечения качества ПЦР-анализов для каждой лаборатории и каждого оператора.

Следующий раздел приводится для информации.

Валидация метода амплификации нуклеиновых кислот (МАНК, *NAT*) в определении РНК вируса гепатита С (*HCV*) в пулах плазмы: руководство

1. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Большинство аналитических методик, основанных на амплификации нуклеиновых кислот, представляют собой качественные испытания на наличие нуклеиновых кислот. Существует также некоторое количество методик количественного определения (либо внутренних, либо коммерчески доступных). Для определения загрязнения пулов плазмы РНК *HCV* адекватными являются качественные тесты, которые могут быть рекомендованы как предельные испытания при контроле содержания примесей в соответствии с указаниями в журнале «*Pharmeuropa*», декабрь 1999, Техническое руководство по разработке монографий, глава III «Валидация аналитических методик». В этом руководстве описаны лишь методы валидации качественных аналитических методик оценки загрязнения пулов плазмы РНК *HCV* на основе амплификации нуклеиновых кислот. Поэтому двумя наиболее важными характеристиками для валидации аналитического метода являются его специфичность и предел определения. Кроме того, должна быть оценена робастность аналитического метода.

Однако этот документ также может быть использован в качестве основы для валидации амплификации нуклеиновых кислот в общем.

В соответствии с данным документом за аналитическую процедуру принимают всю процедуру от экстракции нуклеиновой кислоты до детектирования амплифицированного продукта.

При использовании в аналитическом методе или его части коммерческого набора, валидацию пользователя может заменить документированное подтверждение валидации вышеуказанных положений, произведенной изготовителем набора. Тем не менее, пользователем должна быть продемонстрирована производительность набора в отношении его предполагаемого использования (т.е. предел определения, робастность, перекрестная контаминация).

2. СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Специфичность представляет собой способность к однозначной оценке присутствия нуклеиновой кислоты в смеси с компонентами, присутствие которых можно ожидать.

Специфичность аналитических методов, основанных на амплификации нуклеиновых кислот, зависит от выбора праймеров, выбора зонда (для анализа конечного продукта) и

обоснованности условий проведения испытания (как для стадии амплификации, так и для стадии детектирования).

При разработке праймеров и зондов должна быть исследована их специфичность в отношении детектирования только РНК *HCV* путем сравнения избранной последовательности с последовательностями, опубликованными в банках данных. В случае *HCV* праймеры (и зонды) обычно выбирают из областей 5'-некодируемого участка генома *HCV*, которые хорошо сохраняются для всех генотипов.

Амплифицированный продукт должен однозначно идентифицироваться одним из многих методов, например, проведением амплификации с вложенными праймерами, анализом с использованием ферментов рестрикции, секвенированием или гибридизацией со специфическим зондом.

Для валидации специфичности аналитического метода испытание должно быть проведено в отношении не менее 100 РНК *HCV*-отрицательных пулов плазмы, для которых должно быть показано отсутствие реакции. Подходящие образцы пулов, не дающих реакции, могут быть получены в Европейском управлении по качеству лекарственных средств и здравоохранению при Совете Европы (*European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare (Council of Europe)*).

Способность аналитического метода к обнаружению всех генотипов *HCV* также зависит от выбора праймеров, зондов и параметров метода. Эта способность должна быть продемонстрирована с использованием характеризованных эталонных панелей. Однако, ввиду сложности получения некоторых генотипов (например, генотипа 6), должны быть на подходящем уровне детектированы генотипы преобладающих типов (например, в Европе – генотипы 1 и 3).

3. ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

За предел обнаружения данной аналитической процедуры принимают наименьшее количество нуклеиновой кислоты в образце, которое может быть детектировано, но не обязательно определено как точное значение.

Аналитический метод с использованием амплификации нуклеиновых кислот, используемый для детекции РНК *HCV* в пулах плазмы, обычно дает качественные результаты. Количество возможных результатов ограничено двумя: либо положительным, либо отрицательным. Хотя рекомендуется определение предела обнаружения, в практических целях для аналитического метода на основе амплификации нуклеиновых кислот должно быть определено положительное граничное значение. Положительное граничное значение (в соответствии с определением в общем разделе 2.6.21) представляет собой минимальное количество последовательностей-мишеней в объеме образца, которые могут быть определены в 95 % испытаний. На это положительное граничное значение оказывают влияние распределение вирусных геномов в индивидуальных испытуемых образцах и такие факторы, как эффективность фермента. Это может привести к получению различных 95 % граничных значений для отдельных испытаний.

Для определения положительного граничного значения ряд разведений рабочего реагента или БСП вируса гепатита С, калиброванного в сравнении с Международным стандартным образцом *HCV* ВОЗ 96/790, должен быть подвергнут испытанию в разные дни для проверки изменчивости результатов анализа. Для проведения статистического анализа результатов должно быть испытано не менее трех независимых рядов разведений в достаточном количестве повторностей для получения 24 результатов испытания для каждого разведения.

Например, в лаборатории в разные дни могут быть проведены испытания трех рядов разведений в восьми повторностях для каждого из них, четырех рядов разведений в шести повторностях для каждого из них или шести рядов разведений в четырех повторностях для каждого из них. Для того, чтобы число разведений не было слишком большим, следует провести предварительное испытание (например, с использованием логарифмических разведений образца пула плазмы) с получением предварительного положительного граничного значения (т.е. наибольшего значения, дающего положительный результат). После этого диапазон разведений может быть выбран в области полученного предварительного значения (с использованием, например, логарифмического фактора

разведения 0,5 или менее и отрицательного пула плазмы для матрицы разведения). Концентрация РНК *HCV*, которая может быть детектирована в 95 % испытаний, может быть вычислена с использованием соответствующих методов статистической оценки.

Эти результаты также могут служить для демонстрации изменчивости результатов, получаемых данным аналитическим методом, в ходе испытания и в разные дни.

4. РОБАСТНОСТЬ

Робастность аналитического метода – мера его способности выдерживать воздействие малых, но определенных изменений параметров метода, являющаяся показателем его надежности при обычном использовании.

Оценка надежности должна проводиться в фазе разработки. Она должна показать надежность аналитической процедуры с учетом определенных вариаций параметров метода. Для случая МАНК небольшие изменения параметров метода могут иметь решающее значение. Однако в ходе разработки метода его устойчивость может быть продемонстрирована небольшим изменением концентраций реагентов (например, $MgCl_2$, праймеров или *dNTP*). Для демонстрации устойчивости не менее 20 РНК *HCV*-отрицательных пулов плазмы, отобранных случайным образом и инфицированных РНК *HCV* с получением конечной концентрации, в три раза превышающей заранее определенное 95 % граничное значение, должны быть испытаны и признаны положительными.

Проблемы с робастностью могут возникнуть также в связи с методами, в которых стадия ультрацентрифугирования предшествует экстракции вирусной РНК. Поэтому для испытания робастности таких методов не менее 20 пулов плазмы, содержащих различные уровни РНК *HCV*, но не содержащих специфических антител к *HCV*, должны быть испытаны и признаны положительными.

Предотвращение перекрестной контаминации должно быть продемонстрировано путем точного детектирования панели из не менее чем 20 образцов, попеременно заполненной образцами отрицательных пулов плазмы и отрицательных пулов плазмы, инфицированных высокими концентрациями *HCV* (не менее 100-кратного 95 % граничного значения или не менее 10^4 МЕ/мл).

5. ОБЕСПЕЧЕНИЕ КАЧЕСТВА

Для таких биологических испытаний, как МАНК, имеется вероятность возникновения специфических проблем, которые могут повлиять как на валидацию, так и на интерпретацию результатов. Методики испытаний должны быть четко описаны в форме стандартных операционных процедур (СОП). В них должно указываться:

- способ отбора проб (тип контейнеров и т.д.);
- приготовление мини-пулов (по потребности);
- условия хранения до анализа;
- четкое описание условий испытания, включая меры предосторожности против перекрестной контаминации и деструкции вирусной РНК, используемых реагентов и стандартных препаратов;
- четкое описание используемой аппаратуры;
- детальные формулы для вычисления результатов, включая статистическую обработку.

В качестве удовлетворительной проверки соответствия системы и надежности аналитической процедуры, когда бы она ни использовалась, может быть рекомендован подходящий контроль процесса (например, подходящее разведение *БСП вируса гепатита С* или образец плазмы, инфицированной *HCV*, калиброванный в сравнении с Международным стандартным образцом *HCV* ВОЗ 96/790).

Техническая квалификация. Каждой критической части используемого оборудования должна соответствовать программа квалификации по установке и эксплуатации. После замены критически важного оборудования (например, терморегуляторов) должна быть документально подтверждена функциональность аналитической процедуры путем проведения параллельного испытания в отношении 8 повторных образцов пула плазмы, инфицированного РНК *HCV* с получением конечной концентрации, соответствующей

ранее определенному трехкратному 95 % граничному значению. Все результаты должны быть положительными.

Квалификация оператора. В отношении каждого оператора, принимающего участие в испытании, должна действовать соответствующая квалификационная программа. Для подтверждения соответствующего уровня подготовки каждый оператор должен провести испытание не менее 8 повторяющихся образцов пула плазмы, инфицированного РНК *HCV* с получением конечной концентрации, соответствующей предварительно определенному трехкратному 95 % граничному значению. Это испытание (8 повторяющихся образцов) должно быть повторено дважды, в два различных дня. Таким образом, должно быть проведено 24 испытания на протяжении трех дней. Все результаты должны быть положительными.

Валидация метода амплификации нуклеиновых кислот (МАНК) для количественного определения ДНК вируса В19 (В19V) в пулах плазмы: руководство

1. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Фармакопея требует, чтобы пулы плазмы, используемые при производстве некоторых продуктов, были проверены на содержание ДНК вируса В19 (В19V), допустимая концентрация которой ограничена. Для выполнения этого требования выделены количественные МАНК. Наиболее важными характеристиками для валидации количественного МАНК являются: правильность, точность, специфичность, предел количественного определения, линейность и диапазон. Кроме того, должна быть оценена робастность аналитического метода.

В этом руководстве описаны способы валидации МАНК для определения контаминации пулов плазмы ДНК В19V, базирующиеся на руководствах *ICH*. Однако этот документ также может быть использован в качестве основы для валидации амплификации нуклеиновых кислот в общем.

В соответствии с данным документом за аналитическую процедуру принимают всю процедуру от экстракции нуклеиновой кислоты до детектирования амплифицированного продукта.

При использовании в аналитическом методе или его части коммерческого набора, валидацию пользователя может заменить документированное подтверждение валидации вышеуказанных положений, произведенной изготовителем набора. Тем не менее, пользователем должна быть продемонстрирована производительность набора в отношении его предполагаемого использования (т.е. точность, правильность, диапазон, робастность).

2. ПРАВИЛЬНОСТЬ

Правильность представляет собой близость совпадения между найденным значением и либо значением, которое определено как условно правильное, либо принятым значением сравнения. Правильность количественного определения зависит от градуировочного графика и от отклонений на различных стадиях количественного определения. Хотя рекомендовано определять точность во всем специфицированном диапазоне, наиболее важно подтвердить точность в диапазоне около предельного значения концентрации. В случае количественного определения ДНК В19V в пулах плазмы рекомендуется оценивать правильность метода путем количественного определения не менее 5 концентраций (с логарифмическим коэффициентом разведения 0,5) *БСП вирусной ДНК В19 для метода амплификации нуклеиновых кислот* или иного препарата, калиброванного в Международных единицах в сравнении с Международным стандартным образцом ВОЗ ДНК В19, в диапазоне рекомендованного на данный момент порогового значения 10,0 МЕ/мкл ДНК В19V (т.е. 10^5 МЕ/мл, $10^{4.5}$ МЕ/мл, 10^4 МЕ/мл, $10^{3.5}$ МЕ/мл и 10^3 МЕ/мл) не менее чем в трех повторностях для каждого разведения. Правильность должна быть документирована для различных концентраций в процентных единицах, определенных в сравнении с известным количеством ДНК В19V. Необходимо отражать уровень технологии соответствующего метода количественного определения, который следует также определять, например, с помощью совместных испытаний.

3. ТОЧНОСТЬ

Точность представляет собой близость совпадения между сериями измерений, полученных в многочисленных испытаниях различных проб одного и того же гомогенного образца. Точность определяется на трех уровнях:

– сходимость выражает точность при одних и тех же условиях испытания в течение короткого промежутка времени (*intra-assay precision*); она оценивается с использованием одного метода количественного определения, с помощью которого трижды анализируют подходящие разведения положительных образцов с ДНК В19V, калиброванных в Международных единицах и охватывающих весь диапазон этого метода количественного определения; коэффициент вариации рассчитывают для индивидуальных образцов (*intra-assay variability*);

– внутрилабораторная точность выражает внутрилабораторную вариабельность (*inter-assay precision*); она устанавливается оценкой повторов (как рутинный количественный анализ) подходящих разведений положительных образцов с ДНК В19V, калиброванных в Международных единицах и охватывающих весь диапазон этого метода количественного определения, в различной обстановке (т.е. различные дни, различные аналитики, различное оборудование, различные реактивы); коэффициент вариации рассчитывают для индивидуальных образцов;

– воспроизводимость выражает точность между различными лабораториями (межлабораторная точность); она оценивается путем участия в совместных количественных изучениях содержания ДНК В19V, например, по Программе профессионального тестирования (ППТ, *PTS – Proficiency Testing Scheme*).

4. СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Специфичность представляет собой способность к однозначной оценке присутствия нуклеиновой кислоты в смеси с компонентами, присутствие которых можно ожидать. Специфичность аналитических методов, основанных на амплификации нуклеиновых кислот, зависит от выбора праймеров, выбора зонда (для анализа конечного продукта) и обоснованности условий проведения испытания (как для стадии амплификации, так и для стадии детектирования).

При разработке праймеров и зондов должна быть исследована их специфичность в отношении детектирования только ДНК В19V путем сравнения избранной последовательности с последовательностями, опубликованными в банках данных. Не должно обнаруживаться значительное сходство с последовательностями, не относящимися к В19V.

Амплифицированный продукт должен однозначно идентифицироваться одним из многих методов, например, проведением амплификации с вложенными праймерами, анализом с использованием ферментов рестрикции, секвенированием или гибридизацией со специфическим зондом.

Для проверки специфичности аналитического метода испытание должно быть проведено в отношении не менее 20 ДНК В19V-отрицательных пулов плазмы, для которых должно быть показано отсутствие реакции.

Генотипы парвовируса В19. Международная комиссия по таксономии вирусов (*ICTV*) классифицирует представителей 3 генотипов как штаммы человеческого парвовируса В19. Генотип 1 представляет прототип В19V, генотип 2 представляет вирусные последовательности типа А6, и генотип 3 представляет V9-подобные последовательности. При проведении удлинения последовательности с использованием соответствующей последовательности генотипа В19V, доступной из баз данных последовательностей нуклеиновых кислот, праймеры и зонды должны быть выполнены с таким расчетом, чтобы была возможность обнаружения и количественного определения в равной степени различных генотипов парвовируса В19. Для проверки выбранного подхода следует использовать стандартные вещества. Так как получение биологических препаратов сравнения может быть затруднено, соответствующие препараты плазмид или синтетических нуклеиновых кислот также могут служить в качестве источника характеризованных последовательностей-целей. Однако они не могут быть использованы для валидации процедуры экстракции.

5. ПРЕДЕЛ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Предел количественного определения представляет собой минимальное количество нуклеиновой кислоты в образце, которое может быть количественно определено с требуемой правильностью и точностью. Предел количественного определения метода амплификации нуклеиновых кислот B19V оценивают при изучении сходимости и межлабораторных сличениях путем ограничения разведений. Определяют наименьшую концентрацию нуклеиновой кислоты-мишени, которая может быть определена количественно с достаточной правильностью и точностью.

6. ЛИНЕЙНОСТЬ

Линейность метода количественного определения – это возможность получения результатов, прямо пропорциональных концентрации нуклеиновой кислоты. Линейность метода амплификации нуклеиновых кислот B19V оценивают при изучении сходимости и межлабораторных сличениях путем испытания повторностей разведенных образцов с концентрациями, охватывающими весь диапазон количественного определения. Определяют интервал, расположенный между верхней и нижней концентрациями нуклеиновой кислоты-мишени, при которых получаемые результаты прямо пропорциональны ее содержанию.

7. ДИАПАЗОН

Диапазон количественного определения – это интервал, расположенный между верхней и нижней концентрациями нуклеиновой кислоты в образце, для которого было показано, что процесс имеет приемлемый уровень правильности, точности и линейности. Диапазон метода амплификации нуклеиновых кислот B19V оценивают при изучении сходимости и межлабораторных сличениях путем испытаний повторностей разведенных образцов. Определяют интервал, расположенный между верхней и нижней концентрациями нуклеиновой кислоты-мишени, который может быть выражен с приемлемой степенью точности и правильности.

8. РОБАСТНОСТЬ

Робастность аналитического метода – мера его способности выдерживать воздействие малых, но определенных изменений параметров метода, являющаяся показателем его надежности при обычном использовании. Оценка надежности должна проводиться в фазе разработки. Она должна показать надежность аналитической процедуры с учетом определенных вариаций параметров метода. Для случая МАНК небольшие изменения параметров метода могут иметь решающее значение. Однако в ходе разработки метода его устойчивость может быть продемонстрирована небольшим изменением концентраций реагентов, например, $MgCl_2$, праймеров или *dNTP*. Для демонстрации устойчивости не менее 20 ДНК B19V-отрицательных пулов плазмы, инфицированных ДНК B19V с получением конечной концентрации около граничного значения, должны быть испытаны с получением приемлемых количественных значений.

Предотвращение перекрестной контаминации должно быть продемонстрировано путем точного детектирования панели из не менее чем 20 образцов, попеременно заполненной образцами пулов плазмы без ДНК B19V или с концентрацией ниже порогового значения (10 образцов) и пулов плазмы, инфицированных высокими концентрациями ДНК B19V (не менее 100-кратного граничного значения, 10 образцов).

9. ОБЕСПЕЧЕНИЕ КАЧЕСТВА

Для таких биологических испытаний, как МАНК, имеется вероятность возникновения специфических проблем, которые могут повлиять как на валидацию, так и на интерпретацию результатов. Методики испытаний должны быть четко описаны в форме стандартных операционных процедур (СОП). В них должно указываться:

- способ отбора проб (тип контейнеров и т.д.);
- приготовление мини-пулов производителем (по потребности);
- условия хранения до анализа;

- четкое описание условий испытания, включая меры предосторожности против перекрестной контаминации и деструкции вирусных нуклеиновых кислот, используемых реагентов и стандартных препаратов;
- четкое описание используемой аппаратуры;
- детальные формулы для вычисления результатов, включая статистическую обработку.

В качестве удовлетворительной проверки соответствия системы и надежности аналитической процедуры, когда бы она ни использовалась, может быть рекомендован подходящий контроль процесса (например, плазма, инфицированная образцом ДНК вируса В19V, калиброванным в Международных единицах в сравнении с *БСП вирусной ДНК В19 для метода амплификации нуклеиновых кислот*).

Техническая квалификация. Каждой критической части используемого оборудования должна соответствовать программа квалификации по установке и эксплуатации. После замены критически важного оборудования (например, терморегуляторов) должна быть документально подтверждена функциональность путем проведения параллельного испытания в отношении 8 повторных образцов пула плазмы, инфицированного ДНК В19V с получением конечной концентрации около граничного значения. Все результаты должны быть приемлемыми и должны отражать возможности метода количественного определения, как было определено при валидации.

Квалификация оператора. В отношении каждого оператора, принимающего участие в испытании, должна действовать соответствующая квалификационная программа. Для подтверждения соответствующего уровня подготовки каждый оператор должен провести испытания не менее 8 повторяющихся образцов пула плазмы, инфицированного ДНК В19V с получением конечной концентрации около граничного значения, ежедневно в течение трех дней (т.е. всего 24 образца). Все результаты должны быть приемлемыми и должны отражать возможности метода количественного определения, как было определено при валидации.

01/2013:20622

2.6.22. АКТИВИРОВАННЫЕ ФАКТОРЫ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ

При необходимости определяют количество присутствующего гепарина (2.7.12) и нейтрализуют его добавлением, например, *протамина сульфата Р* (10 мкг протамина сульфата нейтрализуют 1 МЕ гепарина). Готовят разведения испытуемого образца в соотношениях 1:10 и 1:100 с использованием *буферного раствора трис(гидроксиметил)аминометана рН 7,5 Р*. Ряд пробирок из полистирола помещают в водяную баню с температурой 37 °С и прибавляют в каждую из пробирок по 0,1 мл *плазмы с пониженным содержанием тромбоцитов Р* и по 0,1 мл подходящего разведения образца фосфолипида, действующего как заменитель тромбоцитов. Выдерживают в течение 60 с. В каждую пробирку прибавляют либо 0,1 мл одного из разведений, либо 0,1 мл буферного раствора (контрольная пробирка). К содержимому каждой пробирки немедленно прибавляют 0,1 мл предварительно нагретого до 37 °С раствора 3,7 г/л *кальция хлорида Р* и в течение 30 мин от момента первоначального разведения измеряют время между прибавлением раствора хлорида кальция и формированием сгустка. Результаты считают достоверными, если время коагуляции в контрольной пробирке составило от 200 с до 350 с.

01/2013:20626

2.6.26. ИСПЫТАНИЕ НА АНТИ-D АНТИТЕЛА В ИММУНОГЛОБУЛИНЕ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ

МАТЕРИАЛЫ

Забуференный солевой раствор (ЗСР). 8,0 г *натрия хлорида Р*, 0,76 г *натрия гидрофосфата безводного Р*, 0,2 г *калия хлорида Р* и 0,2 г *калия гидрофосфата Р* растворяют в *воде Р* и доводят до объема 1000 мл этим же растворителем. Если полученный

раствор необходимо хранить в течение нескольких дней, прибавляют 0,2 г *натрия азида Р* с целью предотвращения микробной контаминации.

Раствор папаина. Папаин серологической степени чистоты из коммерческого источника, активность которого подтверждена.

Эритроциты. Используют пул D-положительных эритроцитов от не менее 3 доноров, предпочтительно от групп OR_2R_2 . D-положительные эритроциты могут также быть получены от OR_1R_1 или OR_1R_2 доноров. Смешение различных эритроцитов не оценивалось, поэтому не рекомендуется.

Используют пул D-отрицательные эритроциты, предпочтительно от 3 доноров группы Orr . Если доступен только 1 донор группы Orr , допустимо использовать D-отрицательные эритроциты только 1 донора.

Клетки промывают ЗСР 4 раза или до тех пор, пока надосадочная жидкость не станет прозрачной. Клетки центрифугируют при 1800 g в течение 5 мин с целью уплотнения. Уплотненные клетки обрабатывают раствором папаина в соответствии с инструкциями производителя.

Эритроциты хранят не более 1 недели в консервирующем растворе. Состав пригодного консервирующего раствора:

Натрия цитрат	8 г/л
D-глюкоза	20 г/л
Кислота лимонная	0,5 г/л
Натрия хлорид	4,2 г/л
Инозин	0,938 г/л
Аденозинтрифосфат (АТФ)	0,4 г/л
Хлорамфеникол	0,34 г/л
Неомицина сульфат	0,1 г/л

Микропланшеты. Используют жесткие микропланшеты с V-образным дном.

Стандартные образцы. БСП иммуноглобулина (испытание на анти-D антитела) и БСП иммуноглобулина (испытание на анти-D антитела, отрицательный контроль) оптимальны для использования в качестве стандартного образца и отрицательного контроля соответственно.

МЕТОДИКА

Испытание, описанное в данном общем разделе, выполняется при комнатной температуре с использованием стандартных растворов, растворов отрицательного контроля и испытуемых растворов в одно и то же время и в одних и тех же условиях.

Стандартные растворы и растворы отрицательного контроля. Стандартный образец и отрицательный контроль восстанавливают в соответствии с инструкциями. Концентрация иммуноглобулина G (IgG) составляет 50 г/л в каждом из восстановленных препаратов. Выполняют 2-кратное разведение каждого восстановленного препарата с помощью забуференного солевого раствора, содержащего *альбумин бычий Р* концентрацией 2 г/л, получая раствор, содержащий IgG в концентрации 25 г/л. Готовят по 7 последовательных 2-кратных разведений для каждого препарата с помощью забуференного солевого раствора, содержащего *альбумин бычий Р* концентрацией 2 г/л, для получения разведений до 1/256 (0,195 г/л IgG). Помещают 20 мкл каждого разведения в микропланшет.

Испытуемые растворы. Испытуемый образец разводят с помощью забуференного солевого раствора, содержащего *альбумин бычий Р* концентрацией 2 г/л для получения начальной концентрации IgG 25 г/л. Для препаратов с концентрацией 50 г/л используют 2-кратное разведение; корректируют степень разведения для образцов, концентрация Ig в которых отличается от 50 г/л, таким образом, чтобы начальная концентрация иммуноглобулина в испытуемом образце составляла 25 г/л. Такому исходному 25 г/л раствору присваивается номинальный 2-кратный коэффициент разведения для сравнения со стандартными образцами, даже если это не отражает истинную кратность разведения,

использованную для получения концентрации 25 г/л. Готовят по 7 последовательных 2-кратных разведений для каждого образца с помощью забуференного солевого раствора, содержащего *альбумин бычий Р* концентрацией 2 г/л, для получения разведений до 1/256 (0,195 г/л IgG) для сравнения со стандартными образцами в одинаковом диапазоне концентраций IgG. Готовят 2 независимых ряда разведений. Помещают по 20 мкл каждого разведения в микропланшет.

Готовят 3 % (*об/об*) суспензию D-положительных (предпочтительно OR₂R₂, но OR₁R₂ или OR₁R₂ могут быть использованы) и D-отрицательных (Orr) эритроцитов, обработанных папаином, в забуференном солевом растворе, содержащем *альбумин бычий Р* концентрацией 2 г/л. Прибавляют по 20 мкл D-положительных эритроцитов к 1 ряду разведений каждого испытуемого образца, стандартного образца и отрицательного контроля и по 20 мкл D-отрицательных эритроцитов к другому ряду разведений каждого испытуемого образца, стандартного образца, отрицательного контроля. Содержимое планшетов перемешивают путем встряхивания в шейкере в течение 10 с.

Центрифугируют при 80 g в течение 1 мин для уплотнения клеток. Планшет располагают под углом приблизительно 70 °. Снимают показания не менее чем через 3 мин и более после того, как эритроциты были добавлены в ячейки, содержащие отрицательный контроль, и ячейки, в которые были добавлены D-отрицательные эритроциты. Агглютинация в виде «кнопки» на дне ячейки свидетельствует о положительном результате. Свободные клетки свидетельствуют об отрицательном результате. Фиксируют конечную точку титрования в виде обратной дроби фактора наибольшего разведения, при котором отмечается положительный результат. Отрицательный контроль должен иметь титр не выше 2, в противном случае необходимо провести проверку качества реактивов и условий испытания. Титр испытуемого образца не должен превышать титр стандартного образца при условии, что все препараты титруются в концентрации 25 г/л.

01/2013:20627

2.6.27. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ КЛЕТОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

Для данного испытания была доказана его предпочтительность использования для определенных клеточных продуктов вместо испытания на стерильность (2.6.1), так как данное испытание обладает лучшей чувствительностью, имеет более широкий диапазон применения и проводится быстрее. Данное испытание применяется вместо испытания на стерильность (2.6.1) в случаях, когда это предусмотрено частной статьей. Испытание выполняется ручным способом или с использованием автоматической системы.

ОБЩИЕ МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Испытание проводится в асептических условиях в соответствии с действующими правилами обращения с потенциально инфекционным материалом.

Предпринимаемые меры предосторожности по предупреждению контаминации не должны оказывать влияния на любые микроорганизмы, которые должны быть обнаружены при данном испытании. Испытание выполняется в рабочих условиях, которые регулярно проверяются путем отбора проб в рабочей зоне и проведения соответствующих контролей.

ИСПЫТАНИЕ НА РОСТОВЫЕ СВОЙСТВА

Используют по крайней мере 2 подходящие питательные среды обогащения (например, кровяные питательные среды), предназначенные для обнаружения грибов и аэробных и анаэробных бактерий.

Стерильность каждой серии среды подтверждают инкубированием репрезентативных контейнеров при температуре от 35 °C до 37 °C в течение не менее 7 дней. Каждая серия среды испытывается производителем и/или пользователем на наличие ростовых свойств путем засева контейнеров с каждой питательной средой 10–100 жизнеспособными микроорганизмами штамма каждого вида, приведенными в таблице 2.6.27.-1, в двукратной повторности. Контейнеры инкубируют при температуре от 35 °C до 37 °C или в течение 7 дней при использовании автоматических систем обнаружения микроорганизмов, или в

течение 14 дней при визуальной оценке роста микроорганизмов. Испытуемые среды отвечают требованиям, если во всех засеянных контейнерах наблюдается четкий рост микроорганизмов в течение указанного периода.

Таблица 2.6.27.-1

Микроорганизмы, используемые в испытании на ростовые свойства

Среда для аэробных бактерий	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Например, ATCC 6538, CIP 4.83, NCTC 10788, NCIMB 9518
<i>Bacillus subtilis</i>	Например, ATCC 6633, CIP 52.62, NCIMB 8054
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Например, ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118
<i>Candida albicans</i>	Например, ATCC 10231, IP 48.72, NCPF 3179
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Например, ATCC 16404, IP 1431.83, IMI 149007
Среда для анаэробных бактерий	
<i>Clostridium sporogenes</i>	Например, ATCC 19404, CIP 79.3, NCTC 532 или ATCC 11437
<i>Bacteroides fragilis</i>	Например, ATCC 25285, CIP 77.16, NCTC 9343

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ

Необходимость валидации методики в присутствии типа испытуемого образца должна определяться с учетом типа испытуемого образца, метода его получения, используемого объема инокулята и типа используемой в испытании системы. Если не обосновано и установлено иначе, используемая система валидируется в отношении специфичности (отсутствие ложноположительных результатов), чувствительности (предел обнаружения) и воспроизводимости. В процессе валидации, особенно при определении предела обнаружения, испытание проводится с использованием образца, в который специально добавлены в различном количестве следующие микроорганизмы, выбранные на основании вероятной контаминации и условий роста:

Aspergillus brasiliensis, например, ATCC 16404, IP 1431.83, IMI 149007;
Bacillus subtilis, например, ATCC 6633, CIP 52.62, NCIMB 8054;
Candida albicans, например, ATCC 10231, IP 48.72, NCPF 3179;
Clostridium sporogenes, например, ATCC 19404, CIP 79.3, NCTC 532 или ATCC 11437;
Propionibacterium acnes, например, ATCC 11827;
Pseudomonas aeruginosa, например, ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118;
Staphylococcus aureus, например, ATCC 6538, CIP 4.83, NCTC 10788, NCIMB 9518;
Streptococcus pyogenes, например, ATCC 19615, CIP 1042.26, NCIMB 13285;
Yersinia enterocolitica, например, ATCC 9610, CIP 80.27, NCTC 12982.

Перечень микроорганизмов может быть изменен в зависимости от происхождения клеток и предварительно обнаруженных микроорганизмов или микроорганизмов, связанных со специфическим типом клеток.

Могут быть также использованы другие подходы к валидации методики, например, проведение межлабораторного сравнительного испытания.

ИССЛЕДОВАНИЕ ИСПЫТУЕМОГО ОБРАЗЦА

Образец. Испытание проводится на репрезентативном образце, включая клетки и/или среду. Образец добавляется к питательной среде сразу после его отбора. Если образец не используется сразу после его отбора, он хранится при температуре $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ для предупреждения фагоцитоза микроорганизмов клетками, присутствующими в определенных типах продуктов (например, нейтрофилы). Для гемопоэтических продуктов минимальное количество, которое должно использоваться в испытании, в зависимости от общего объема продукта (V , мл) приведено ниже.

Общий объем продукта (миллилитры)	Объем инокулята
$V \geq 10$	1 % от общего объема
$1 \leq V < 10$	100 мкл
$V < 1$	Не применимо

Для гемопоэтических продуктов, для которых требуется разведение до замораживания, объем инокулята должен увеличиваться с помощью фактора разведения. Для других клеточных продуктов подходящие минимальные количества определяются в зависимости от объема или количества доз.

Анализ. Образцы вносятся в контейнеры с питательной средой сразу после отбора и инкубируются при температуре от 35 °С до 37 °С в течение не менее 7 или 14 дней в зависимости от используемой системы оценки роста микроорганизмов. Соответствующая порция инокулята добавляется к среде для инкубирования в аэробных условиях, а остаток инокулята добавляется к среде для инкубирования в анаэробных условиях.

НАБЛЮДЕНИЕ И ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Посеянные среды исследуют на наличие роста микроорганизмов ежедневно, визуально или с использованием автоматической системы, и в конце периода наблюдения. Если в течение и к концу периода наблюдения рост микроорганизмов отсутствует, продукт считается «микробиологически чистым» на данном пределе обнаружения («негативная культура»). Если в испытании, признанном достоверным, наблюдается рост микроорганизмов, продукт считается «микробиологически загрязненным» («позитивная культура»); обнаруженный микроорганизм идентифицируется до соответствующего таксономического уровня (вид, род), и составляется антибиограмма.

01/2013:20630

2.6.30. ИСПЫТАНИЕ НА АКТИВАЦИЮ МОНОЦИТОВ

1. ВВЕДЕНИЕ

Испытание на активацию моноцитов (ИАМ) используется для обнаружения или количественного определения веществ, активирующих моноциты человека или моноцитоподобные клетки, и как результат активирующих высвобождение эндогенных медиаторов: например, провоспалительных цитокинов, например, фактора некроза опухолей α ($TNF\alpha$), интерлейкина- 1β ($IL-1\beta$) и интерлейкина-6 ($IL-6$). Данные цитокины принимают участие в патогенезе лихорадки. Поэтому ИАМ будет выявлять наличие пирогенов в испытуемом образце. ИАМ подходит для замены испытания на пирогенность на кроликах после валидации методики для конкретного продукта.

У лекарственных средств, содержащих пирогенные вещества, отличные от эндотоксинов, или провоспалительные вещества, часто получают очень крутые кривые зависимости доза-эффект по сравнению с эндотоксиновыми кривыми зависимости доза-эффект. Часто наибольшую реакцию при испытании таких продуктов получают от неразведенных растворов испытуемых препаратов или небольших разведений испытуемых препаратов. Поэтому препараты, содержащие или которые могут содержать пирогенные вещества, отличные от эндотоксинов, должны испытываться при диапазоне концентраций, которые включают минимальное разведение.

В данном разделе описаны три метода.

Метод А. Количественное испытание.

Метод В. Полуколичественное испытание.

Метод С. Сравнительное испытание со стандартной партией.

Испытание проводится таким образом, чтобы избежать контаминации пирогенными веществами.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Максимальное допустимое разведение (МДР) – это максимальное разведение образца, при котором может быть определено предельно допустимое пирогенное вещество. МДР рассчитывают по формуле:

$$\frac{CLC \cdot C}{LOD},$$

где:

CLC – предельная концентрация пирогенного вещества;

C – концентрация испытуемого раствора;

LOD – предел обнаружения.

Критерием приемлемости для принятия положительного или отрицательного решения является предельная концентрация пирогенного вещества (CLC), которая выражается в эквивалентах эндотоксина на миллиграмм или миллилитр или в единицах биологической активности испытуемого образца.

CLC рассчитывают по формуле:

$$\frac{K}{M},$$

где:

K – пороговая пирогенная доза эндотоксина на килограмм массы тела;

M – максимальная рекомендованная разовая доза лекарственного средства на килограмм массы тела.

В случае введения продукта через частые интервалы или постоянно инфузионно, M – это максимальная общая доза, введенная в течение одного часового периода. В случае, когда для продукта установлена предельная концентрация эндотоксина (ELC), CLC будет такой же, что и ELC , если не указано иначе. В этом случае концентрация испытуемого раствора выражается в мг/мл, если предельное содержание эндотоксина установлено в массовых единицах (МЕ/мг); в Ед/мл, если предельное содержание эндотоксина выражено в пересчете на единицу биологической активности (МЕ/Ед); в мл/мл, если предельное содержание эндотоксина выражено в объемных единицах (МЕ/мл).

Эквиваленты эндотоксина – это значения концентрации пирогенного вещества, вычисленные по кривой доза-эффект стандарта эндотоксина (метод А) или оцененные путем сравнения реакций со стандартными растворами эндотоксина (метод В). Исходный стандартный раствор эндотоксина готовят из стандартного образца эндотоксина, калиброванного относительно Международного стандартного образца, например, *БСП стандартного образца эндотоксина*.

Пороговое значение рассчитывают по формуле:

$$\bar{x} + 3s,$$

где:

$\bar{x}$ – среднее значение 4 повторов для реакций контрольного опыта (R_0);

s – стандартное отклонение 4 повторов для реакций контрольного опыта (R_0).

Пороговое значение выражается в соответствующих единицах полученных данных.

Предел обнаружения (ПО) определяется с использованием кривой стандарта эндотоксина. ПО – это концентрация эндотоксина, соответствующая пороговому значению. Для целей данного испытания ПО выражается как эквиваленты эндотоксина на миллилитр.

3. ОБЩАЯ ПРОЦЕДУРА

Испытуемый раствор инкубируют с источником моноцитов человека, или с клетками моноцитов человека, например, с гепаринизированной периферической кровью человека, отобранной предпочтительно не более чем за 4 ч до испытания, или моноцит-содержащей фракцией данной крови, например, моноклеарные клетки периферической крови человека (*РВМС*), выделенные, например, путем центрифугирования в градиенте плотности, или с линией моноцитоподобных клеток (моноцитов) человека. Гепаринизированная периферическая кровь человека обычно разводится питательной средой или физиологическим раствором, например, до концентрации от 2 % до 50 % (*об/об*) (конечная концентрация). Обычно в испытании используют *РВМС* или линии

моноцитоподобных клеток в питательной среде с добавлением или плазмы донора, или АВ сыворотки с окончательной плотностью клеток $0,1-1,0 \cdot 10^6$ клеток/ячейка, пробирка или другой контейнер. При использовании линий моноцитоподобных клеток АВ сыворотку можно заменить на бычью эмбриональную сыворотку, инактивированную нагреванием. Культура клеток готовится при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в подходящей атмосфере, например, увлажненном воздухе с 5 % CO_2 . Устойчивость культуры должна быть достаточной для накопления выбранных маркеров присутствия пирогенного вещества. Реакцию выбранного маркера, например, провоспалительных или пирогенных цитокинов, сравнивают с реакциями на стандартный эндотоксин или на стандартную партию испытуемого лекарственного средства. Выбранная реакция калибруется с использованием соответствующего стандарта.

4. ОБОРУДОВАНИЕ

Всю стеклянную посуду и другую аппаратуру, устойчивую к нагреванию, депирогенизируют в стерилизационном воздушном шкафу с использованием валидированной процедуры. Широко используемое минимальное время и температура составляют 30 мин и 250°C соответственно. Если используется пластиковое оборудование, в частности микропланшеты и наконечники для автоматических пипеток, необходимо убедиться, что данное оборудование не содержит обнаруживаемых пирогенов и не влияет на испытание.

5. ИСТОЧНИКИ КЛЕТОК И КВАЛИФИКАЦИЯ

5-1. ЦЕЛЬНАЯ КРОВЬ

Цельную кровь получают от доноров или от пулов цельной крови, которые квалифицируются в соответствии с требованиями, описанными в разделах 5-3 и 5-4 соответственно.

5-2. МОНОНУКЛЕАРНЫЕ КЛЕТКИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ (РВМС)

РВМС выделяют из крови, полученной от доноров или пулов цельной крови, которые квалифицируются в соответствии с требованиями, описанными в разделах 5-3 и 5-4 соответственно.

5-3. КВАЛИФИКАЦИЯ ДОНОРОВ

Доноры, у которых берут кровь, должны соответствовать ниже приведенным квалификационным критериям наряду с другими действующими требованиями в отношении согласия на процедуру, здоровья, безопасности и этическими принципами. Доноры должны описывать себя как «здоровые», «не страдающие любыми бактериальными и вирусными инфекциями» и «не имеющие симптомов любой инфекции в течение периода не менее 1 недели перед сдачей крови». Доноры не должны принимать нестероидные противовоспалительные лекарственные средства в течение 48 ч перед сдачей крови и стероидные противовоспалительные лекарственные средства – в течение 7 дней перед сдачей крови. Физические лица не могут быть донорами, если им были назначены иммунодепрессанты или другие лекарственные средства, которые влияют на продукцию выбранных показателей. Донорская кровь должна быть обследована на инфекционные маркеры в соответствии с национальными требованиями к трансфузионной медицине.

5-4. КВАЛИФИКАЦИЯ КЛЕТОК, ОБЪЕДИНЕННЫХ ОТ РЯДА ДОНОРОВ

Пулы (цельной крови или компонентов крови, например, РВМС) должны состоять из порций крови от минимум 4 индивидуальных доноров, но предпочтительно от 8 и более доноров; пулы формируются путем отбора от каждого пакета донорской крови приблизительно одинаковых объемов крови или клеток от приблизительно одинакового объема крови. Для квалификации объединенных в пул клеток действуют следующим образом: в течение 4 ч с момента сбора крови строят кривые доза-ответ для пула с использованием стандартных растворов эндотоксина в не менее чем в 4-х разведениях,

например, в диапазоне от 0,01 МЕ/мл до 4 МЕ/мл. Кривые доза-ответ должны отвечать 2 критериям для стандартной кривой, описанным в разделе 6-1.

5-5. КВАЛИФИКАЦИЯ КРИОНОСЕРВИРОВАННЫХ КЛЕТОК

Источник клеток, предназначенных для использования в ИАМ, например, цельная кровь человека, компоненты крови, такие как РВМС или линии моноцитоподобных клеток, может быть криоконсервированным. Пулы криоконсервированных клеток получают объединением перед замораживанием, или объединением единичных криоконсервированных донорских порций сразу же после оттаивания. Пулы должны состоять из порций крови от минимум 4 индивидуальных доноров, но предпочтительно от 8 или более доноров; пулы формируются путем отбора приблизительно одинаковых объемов крови или клеток от приблизительно одинакового объема крови. Квалификация криоконсервированной крови или клеток выполняется сразу же после оттаивания (и объединения, в случае необходимости): кривые доза-ответ для криоконсервированных клеток и крови должны отвечать 2 критериям для стандартной кривой, описанным в разделе 6-1.

5-6. НЕПРЕРЫВНАЯ ЛИНИЯ МОНОЦИТОПОДОБНЫХ КЛЕТОК

Непрерывная клеточная линия моноцитов (моноцитоподобных клеток) человека постоянно культивируется для того, чтобы гарантировать наличие соответствующего субстрата для ИАМ. Для оптимизации метода могут использоваться клоны, полученные от клеточной линии. Клетки должны храниться в асептических условиях и регулярно испытываться на заражение микоплазмой. Дополнительно клетки должны регулярно проверяться на подлинность (например, время удвоения, морфологию и функцию) и стабильность.

Клетки должны содержаться в асептических условиях и регулярно контролироваться на наличие микоплазм. Дополнительно клетки должны регулярно проверяться на идентичность (т.е. время удвоения, морфология и функции) и стабильность. Функциональная стабильность клеточной линии оценивается путем наблюдения за ее состоянием с учетом количества пассажей в процессе повседневных испытаний. Критерии функциональной стабильности должны быть установлены и могут включать критерии роста, максимальную реакцию, полученную в испытании, фоновый шум и экспрессию рецептора. Экспрессия рецептора может проверяться с помощью специфических лигандов, например, липополисахарида (ЛПС) для *toll*-подобного рецептора 4 (*TLR4*), липотейхоевой кислоты (LTA) *Toll*-подобного рецептора 2 (*TLR2*), синтетического бактериального липопротеина для *TLR2-TLR1* или синтетического бактериального липопротеина для *TLR2-TLR6*.

6. ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ИСПЫТАНИЯ

Для обеспечения точности и достоверности испытания проводят предварительные испытания, в которых проверяют выполнение критериев для стандартной кривой, отсутствие взаимодействия растворов в ходе испытания, способность методики обнаруживать эндотоксины и пирогенные вещества, отличные от эндотоксинов, отсутствие влияния растворов на детектирующую систему.

6-1. КРИТЕРИИ ДОСТОВЕРНОСТИ СТАНДАРТНОЙ КРИВОЙ

Из стандартного раствора эндотоксина готовят не менее 4 концентраций эндотоксина для построения стандартной кривой. Проводят испытание, используя не менее 4 повторов каждой концентрации стандартного раствора эндотоксина.

Базовое высвобождение выбранного маркера (контрольный уровень) в отсутствие добавленного стандартного раствора эндотоксина должно быть оптимизировано до наиболее низкого возможного уровня.

Для стандартной кривой должны выполняться 2 критерия приемлемости:

– регрессионная зависимость ответов (соответственно преобразованных при необходимости) от логарифма дозы должна быть статистически значима ($p < 0,01$);

– регрессионная зависимость ответов от логарифма дозы не должна существенно отличаться от линейности ($p > 0,05$). При анализе 4-факторной логистической кривой наблюдаемая кривая не должна существенно отличаться от теоретической кривой, рассчитанной с помощью стандартных статистических методов (см. статью 5.3. *Статистический анализ результатов биологических испытаний и тестов*).

6-2. ИСПЫТАНИЕ НА МЕШАЮЩИЕ ФАКТОРЫ

Для обеспечения достоверности испытания проводятся предварительные испытания, подтверждающие отсутствие влияния испытуемого раствора на результаты испытания. Валидация аналитической методики требуется при внесении любых изменений в экспериментальные условия, которые способны повлиять на результаты испытания. Используя подходящий растворитель, готовят разведения испытуемого лекарственного средства с коэффициентом геометрической прогрессии (1:2, 1:4 и т.д.), не превышающие МДР. Готовят такие же разведения испытуемого лекарственного средства и прибавляют эндотоксин, в концентрации, равной или близкой к середине стандартной кривой (Метод А) или равной удвоенному значению ПО (Метод В), или используют растворитель, содержащий добавленный эндотоксин в концентрации, равной или близкой к середине стандартной кривой (Метод А) или равной удвоенному значению ПО (Метод В). Проводят испытания полученных рядов разведений параллельно в одном эксперименте. Для вычисления концентрации эквивалентов эндотоксина в каждом растворе используют стандартную кривую. Вычисляют среднее значение полученной концентрации раствора эндотоксина, содержащего добавленный эндотоксин, вычитанием средней концентрации эквивалентов эндотоксина в растворе (при его наличии) из средней концентрации раствора эндотоксина, содержащего добавленный эндотоксин.

Считают, что испытуемый раствор не содержит мешающих факторов, если в условиях испытания вычисленная концентрация эквивалентов эндотоксина, добавленного к испытуемому раствору, находится в пределах 50–200 % от известной концентрации добавленного эндотоксина после вычитания концентрации эндотоксина, обнаруженной в растворе, не содержащем добавленного стандартного эндотоксина. Если испытание не отвечает этому критерию, следует провести испытание Методом С. В методе С испытания проводят на 3 разведениях раствора испытуемого лекарственного средства: наибольшая концентрация (наименьший фактор разведения), при котором наблюдается наибольший выброс выбранного маркера, и двукратные разведения непосредственно больше или меньше выбранной концентрации. Так как концентрация испытуемого лекарственного средства, при которой наблюдается наибольший выброс выбранного маркера, может зависеть от особенностей донора клеток/крови, а также серии клеток, должна быть проведена валидация методики в отношении используемого субстрата на трех независимых испытаниях с использованием в каждом из них клеток от различных доноров. Наибольшая концентрация (наименьший фактор разведения), при которой регистрируется высвобождение наибольшего количества выбранного маркера у большинства доноров и 2-кратные разведения непосредственно ниже и выше выбранного разведения, считается валидированной для дальнейшего выполнения испытания. Если наибольшее высвобождение выбранного маркера происходит при испытании исходного испытуемого раствора, последующее испытание должно выполняться с использованием неразведенного испытуемого раствора, а также испытуемого раствора, разведенного в отношениях 1:2 и 1:4 перед его добавлением к РВМС. 3 разведения, используемые в последующем исследовании, не должны превышать МДР; коэффициенты разведения для этих 3 растворов обозначаются как f_1 , f_2 и f_3 . После валидации в отношении субстрата выполняется обычное испытание с клетками от 4 индивидуальных доноров, или с единичным пулом или с клетками от 1 пассажа линии моноцитоподобных клеток человека.

6-3. ВАЛИДАЦИИ МЕТОДИКИ В ОТНОШЕНИИ ВЕЩЕСТВ-АКТИВАТОРОВ МОНОЦИТОВ, ОТЛИЧНЫХ ОТ ЭНДОТОКСИНОВ

В предварительных испытаниях также подтверждают способность выбранной аналитической системы обнаруживать помимо бактериальных эндотоксинов провоспалительные или пирогенные вещества, отличные от эндотоксинов. Для этого можно

использовать ранее исследованные архивные серии, наличие в которых пирогенных веществ, отличных от эндотоксинов, было определено на основании положительных реакций в испытании «Пирогенность» на кроликах или развития побочных эффектов у человека. При отсутствии таких серий лекарственного средства в предварительные испытания должна быть включена валидация используемой аналитической системы при помощи специфических лигандов для *toll*-подобных рецепторов, например, пептидогликанов, липотейхоевых кислот или синтетических бактериальных липопroteинов.

6-4. ВЛИЯНИЕ НА СИСТЕМУ ДЕТЕКТИРОВАНИЯ

После подбора оптимального разведения раствора испытуемого лекарственного средства для дальнейшего исследования данное разведение испытывается на наличие влияния на систему детектирования (например, ИФА, *ELISA*) для выбранного маркера. Различие в определяемых концентрациях серий разведений стандарта выбранного маркера в присутствии и отсутствии испытуемого лекарственного средства должно находиться в диапазоне $\pm 20\%$.

7. МЕТОДЫ

7-1. МЕТОД А: КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ИСПЫТАНИЕ

В методе А проводится сравнение реакции испытуемого лекарственного средства с кривой доза-ответ стандартного раствора эндотоксина. Концентрация пирогенных веществ в испытуемом лекарственном средстве не должна превышать *CLC*.

7-1-1. Процедура испытания

Используя валидированную методику испытания, готовят растворы, приведенные в таблице 2.6.30.-1, и культивируют 4 повтора каждого раствора с клетками от каждого из 4 индивидуальных доноров или с единичным пулом или с клетками от 1 пассажа линии моноцитоподобных клеток человека.

Таблица 2.6.30.-1

Раствор	Раствор	Добавленный эндотоксин (МЕ/мл)	Число повторов
A	Испытуемый раствор / f	Нет	4
B	Испытуемый раствор / $2f$	Нет	4
C	Испытуемый раствор / $4f$	Нет	4
D	Испытуемый раствор / f	Середина стандартной кривой эндотоксина (R_3)	4
R_0	Апирогенный физиологический раствор или испытуемый растворитель	Нет (контроль)	4
$R_1 - R_4$	Апирогенный физиологический раствор или испытуемый растворитель	4 концентрации стандартного раствора эндотоксина	4 каждой концентрации

Раствор *A* – раствор испытуемого лекарственного средства в разведении, обозначенном в таблице как f , при котором было проведено испытание на мешающие факторы, то есть наибольшая концентрация (наименьшее разведение), для которой определяемая концентрация эндотоксина находится в пределах от 50 – 200 %.

Раствор *B* – 2-кратное разведение раствора *A*, не превышающее МДР.

Раствор *C* – 2-кратное разведение раствора *B*, не превышающее МДР.

Раствор *D* – раствор *A*, содержащий стандарт эндотоксина в концентрации около середины стандартной кривой (R_3).

Раствор R_0 – контроль.

Растворы $R_1 - R_4$ – растворы стандарта эндотоксина в концентрациях, использованных в испытании на мешающие факторы.

7-1-2. Вычисления и оценка результатов

Все результаты, включаемые в данные анализа, должны быть связаны с клетками, для которых выполнены 2 критерия стандартной кривой. Определяемая концентрация эквивалентов эндотоксина, рассчитанная путем вычитания концентрации эквивалентов эндотоксина в растворе *A* из концентрации в растворе *D* находится в пределах 50–200 %.

Для каждого различного источника клеток, например, индивидуального донора, пула доноров, клеточной линии, для вычисления концентрации эквивалентов эндотоксина в каждом из повторов растворов *A*, *B* и *C* используется кривая стандарта эндотоксина $R_1 - R_4$. Испытуемое лекарственное средство отвечает требованиям испытания для определенного источника клеток, если средние концентрации эквивалентов эндотоксина, измеренные в повторах растворов *A*, *B* и *C* с учетом разведений и концентрации, меньше *CLC*, установленного для испытуемого лекарственного средства.

7-1-3. Критерии соответствия/несоответствия лекарственного средства

При использовании клеток от индивидуальных доноров испытуемое лекарственное средство должно выдерживать испытание, проведенное с клетками от каждого из 4 различных доноров. Если испытуемое лекарственное средство выдерживает испытание с клетками от 3 из 4 доноров (клетки 1 донора исключены, поскольку не отвечают критериям проведения испытания или имеют положительную реакцию), испытание продолжают с клетками от других 4 доноров, клетки от которых не использовались в первом испытании; испытуемое лекарственное средство должно выдерживать испытание с клетками от 7 из 8 различных доноров (то есть допускается только 1 положительная реакция при использовании клеток от 8 доноров). Если источник моноцитов представляет собой клетки, объединенные от ряда индивидуальных доноров, испытуемое лекарственное средство должно выдерживать испытание с 1 пулом клеток. При использовании линии моноцитоподобных клеток человека испытуемое лекарственное средство должно выдерживать испытание с 1 пассажем линии клеток.

7-2. МЕТОД В. ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННОЕ ИСПЫТАНИЕ

В методе В проводится сравнение испытуемого лекарственного средства со стандартом эндотоксина. Концентрация пирогенного вещества в испытуемом лекарственном средстве должна быть не менее *CLC*. Раствор *A* должен быть выбран для принятия решения о соответствии, если не обоснованно и разрешено другое.

7-2-1. Процедура испытания

Используя валидированный метод испытания, готовят растворы, приведенные в Таблице 2.6.30.-2, и культивируют 4 повтора каждого раствора с клетками от каждого из 4 индивидуальных доноров, или с единичным пулом или с клетками от 1 пассажа линии моноцитоподобных клеток человека.

Таблица 2.6.30.-2

Раствор	Раствор	Добавленный эндотоксин (МЕ/мл)	Число повторов
<i>A</i>	Испытуемый раствор / <i>f</i>	Нет	4
<i>B</i>	Испытуемый раствор / <i>f</i> ₁	Нет	4
<i>C</i>	Испытуемый раствор / <i>f</i> ₂	Нет	4
<i>D</i>	Испытуемый раствор / <i>f</i>	Стандарт эндотоксина 2·ПО для испытуемой системы	4
<i>E</i>	Испытуемый раствор / <i>f</i> ₁	Стандарт эндотоксина 2·ПО для испытуемой системы	4
<i>F</i>	Испытуемый раствор / <i>f</i> ₂	Стандарт эндотоксина 2·ПО для испытуемой системы	4
<i>R</i> ₀	Апирогенный физиологический раствор или испытуемый растворитель	Нет (контроль)	4
<i>R</i> ₁	Апирогенный физиологический раствор или испытуемый растворитель	Стандарт эндотоксина 0,5·ПО для испытуемой системы	4
<i>R</i> ₂	Апирогенный физиологический раствор или испытуемый растворитель	Стандарт эндотоксина 1·ПО для испытуемой системы	4
<i>R</i> ₃	Апирогенный физиологический раствор или испытуемый растворитель	Стандарт эндотоксина 2·ПО для испытуемой системы	4

R_4	Апирогенный физиологический раствор или испытуемый растворитель	Стандарт эндотоксина 4·ПО для испытуемой системы	4

Раствор A – раствор испытуемого лекарственного средства в разведении, обозначенном в таблице как f , при котором было проведено испытание на мешающие факторы.

Раствор B – раствор испытуемого лекарственного средства в разведении, обозначенном в таблице как f_1 , не превышающем МДР, выбранном после рассмотрения данных, полученных при валидации методики в отношении субстрата, например 1:2·МДР (то есть 2-кратное разведение выше МДР).

Раствор C – раствор испытуемого лекарственного средства в разведении, обозначенном в таблице как f_2 , не превышающем МДР, выбранном после рассмотрения данных, полученных при валидации методики в отношении субстрата, то есть МДР.

Раствор D – раствор A , в который добавлен стандарт эндотоксина в концентрации 2·ПО для испытуемой системы (как определено в предварительном испытании).

Раствор E – раствор B , в который добавлен стандарт эндотоксина в концентрации 2·ПО для испытуемой системы.

Раствор F – раствор C , в который добавлен стандарт эндотоксина в концентрации 2·ПО для испытуемой системы.

Раствор R_0 – контроль.

Раствор R_1 – стандарт эндотоксина в количестве 0,5·ПО для испытуемой системы.

Раствор R_2 – стандарт эндотоксина в количестве 1·ПО для испытуемой системы.

Раствор R_3 – стандарт эндотоксина в количестве 2·ПО для испытуемой системы.

Раствор R_4 – стандарт эндотоксина в количестве 4·ПО для испытуемой системы.

7-2-2. Вычисление и оценка результатов

Все результаты, которые должны быть включены в анализ данных, должны быть связаны с клетками, для которых средние реакции на растворы $R_0 - R_4$ увеличиваются в прогрессии. Средняя реакция на R_0 может быть равной средней реакции на R_1 . Для каждого различного источника клеток, например, индивидуального донора, пула доноров, клеточной линии, средняя реакция на раствор R_2 должна быть больше положительного порогового значения. Результаты ниже этого положительного порогового значения рассматриваются как отрицательная реакция. Если средний ответ на R_1 или R_2 превышает пороговое значение, реакция на раствор, выбранный для оценки соответствия/несоответствия лекарственного средства требованиям, должна быть отрицательной (лекарственное средство выдерживает испытание).

Для каждого отрицательного раствора испытуемого лекарственного средства (A , B и C) средняя реакция на соответствующий раствор с добавленным стандартом эндотоксина (D , E или F соответственно) сравнивается со средней реакцией на R_3 для определения определяемой концентрации в % от ожидаемой. Концентрация пирогенного вещества в испытуемом лекарственном средстве менее CLC для данного источника клеток, если раствор испытуемого лекарственного средства, выбранный для оценки соответствия/несоответствия, и разведения ниже его дают отрицательные результаты и определяемая концентрация добавленного в растворы стандарта эндотоксина находится в диапазоне от 50–200 %.

7-2-3. Критерии соответствия/несоответствия лекарственного средства

Критерии те же, что и для метода А (см. п. 7-1-3).

7-3. МЕТОД С: СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИСПЫТАНИЕ СО СТАНДАРТНОЙ ПАРТИЕЙ

В методе С проводится сравнение испытуемого лекарственного средства с валидированной стандартной партией этого лекарственного средства. Стандартная партия выбирается в соответствии с обоснованными и утвержденными критериями. Данное испытание предназначено для случаев, когда испытуемое лекарственное средство оказывает заметное мешающее действие, но не может быть разведено в диапазоне МДР для устранения мешающего действия, поскольку данное лекарственное средство содержит (или предполагается, что содержит) пирогенные вещества, отличные от эндотоксинов. Реакции на пирогенные вещества, отличные от эндотоксинов, могут быть более быстрыми и выраженными, чем ответы на эндотоксин, что делает необходимым выполнение испытания в диапазоне разведений, который включает минимальное разведение. Процедура испытания описана ниже и включает пример сравнения испытуемой партии со стандартной партией.

7-3-1. Процедура испытания

Используя валидированную методику испытания, готовят растворы, указанные в таблице 2.6.30.-3 и культивируют 4 повтора каждого раствора с клетками от каждого из 4 индивидуальных доноров, или единичного пула или с клетками от 1 пассажа линии моноцитарных лейкоцитов человека.

Таблица 2.6.30.-3

Раствор	Раствор/фактор разведения	Число повторов
<i>A</i>	Раствор стандартной партии / f_1	4
<i>B</i>	Раствор стандартной партии / f_2	4
<i>C</i>	Раствор стандартной партии / f_3	4
<i>D</i>	Раствор стандартной партии / f_1	4
<i>E</i>	Раствор стандартной партии / f_2	4
<i>F</i>	Раствор стандартной партии / f_3	4
<i>G</i>	Положительный контроль (стандарт эндотоксина)	4
R_0	Растворитель (контроль)	4

Растворы *A*, *B* и *C* – это разведения стандартной партии в степенях разведения f_1 , f_2 и f_3 , определенных в испытании на мешающие факторы.

Растворы *D*, *E* и *F* – это разведения испытуемого лекарственного средства в степенях разведения f_1 , f_2 и f_3 , определенных для стандартной партии в испытании на мешающие факторы.

Раствор *G* – это положительный испытуемый контроль жизнеспособности клеток, он содержит концентрацию стандарта эндотоксина, при которой наблюдается четкий положительный ответ.

Раствор R_0 – это растворитель, используемый для разведения испытуемого лекарственного средства; отрицательный контроль.

7-3-2. Вычисления и оценка результатов

Все результаты, включаемые в анализ данных, должны быть связаны с клетками, у которых раствор *G* и хотя бы один из растворов *A*, *B* и *C* вызывают ответ, превышающий базовый уровень высвобождения выбранного маркера (раствор R_0). Для каждого различного источника клеток, например, индивидуального донора, пула доноров, клеточной линии, используют стандартную кривую для маркера (калибровочная кривая в двух повторах с отрицательным контролем и не менее 4 разведений стандарта маркера в геометрической прогрессии) и вычисляют среднюю величину ответов на растворы *A–F*. Суммируют средние ответы на растворы *A*, *B* и *C* и средние ответы на растворы *D*, *E* и *F*. Делят сумму средних ответов на растворы *D*, *E* и *F* на сумму средних ответов на растворы *A*, *B* и *C*. Испытуемое лекарственное средство отвечает требованиям испытания для данного источника клеток, если результирующее значение соответствует определенному критерию приемлемости, не превышающему 2,5.

7-3-3. Критерии соответствия/несоответствия лекарственного средства

Критерии те же, что и для метода А (см. 7-1-3).

Для более точного количественного определения уровня содержания пирогенного вещества методы *A*, *B* и *C* могут выполняться с использованием других разведений раствора испытуемого лекарственного средства, не превышающих МДР.

Следующий раздел приводится для информации.

Рекомендации

1. ВВЕДЕНИЕ

Испытание на активацию моноцитов (ИАМ) в первую очередь предназначено для использования в качестве альтернативного метода испытанию на пирогенность на кроликах. ИАМ позволяет обнаруживать пирогенные и провоспалительные вещества, включая эндотоксины грамотрицательных бактерий и пирогенные вещества, отличные от эндотоксинов, включая патогенно-ассоциированные характерные молекулярные паттерны грамположительных и грамотрицательных бактерий, вирусов и грибов, пирогенные биологические или химические вещества, характерные для продукта и/или образующиеся в процессе производства.

Так как пирогенные вещества, отличные от эндотоксинов, представляют собой молекулы с разнообразными физико-химическими характеристиками, и обычно природа

пирогенного вещества, присутствующего в испытуемом лекарственном средстве, неизвестна, уровень содержания этих веществ выражается или в единицах эндотоксин-эквивалента, полученных путем сравнения с реакциями на стандарт эндотоксина, или путем сравнения со стандартной партией испытуемого лекарственного средства.

В ИАМ концентрации маркеров, образующихся в результате реакции на стандарт эндотоксина, обычно разводят приблизительно в 10 раз (на 1 логарифм), и при испытании продуктов, содержащих пирогенные вещества, отличные от эндотоксинов (одних или в комбинации с эндотоксинами), часто получают очень крутые кривые доза-ответ, обычно только в диапазоне 1 или 2 степеней разведений при определении их способности стимулировать моноциты.

Часто наибольший ответ на такие продукты получают при использовании неразведенных растворов испытуемых лекарственных средств или небольших разведений растворов испытуемых лекарственных средств. По этой причине испытуемые растворы лекарственных средств, которые содержат или могут содержать пирогенные вещества, отличные от эндотоксинов, должны испытываться в диапазоне разведений, который включает минимальное разведение.

2. МЕТОДЫ

2-1. ИНФОРМАЦИЯ ОТНОСИТЕЛЬНО ВЫБОРА МЕТОДОВ

Методы А, В и С обычно не применяются в случае, когда само испытуемое лекарственное средство может активировать высвобождение из клеток выбранного маркера или когда одной из примесей в испытуемом лекарственном средстве является выбранный маркер. В обоих случаях эти обстоятельства должны привести к модификации и валидации выбранного метода. Предполагается, что при валидации выбранного метода в отношении субстрата (маркера) будет определена частота отсутствия реакции на соответствующую комбинацию продукт/пирогенные примеси и будет обеспечен выбор мер по обеспечению достоверности результатов испытаний, например, скрининг доноров, увеличение числа доноров, у которых получают клетки для каждого испытания, установление достаточно строгих критериев соответствия/несоответствия для максимального увеличения вероятности обнаружения серий продукта, содержащих существенное количество пирогенных веществ. Методы А и В могут использоваться, когда ответы на разведения испытуемого лекарственного средства приблизительно параллельны ответам на разведения стандарта эндотоксина. Метод В является полуколичественным испытанием, которое может также применяться, когда ответы на разведения испытуемого лекарственного средства не параллельны ответам на разведения стандарта эндотоксина.

Метод С, сравнительное испытание со стандартной партией испытуемого лекарственного средства, был разработан для случаев значительной индивидуальной вариабельности реакции донорских клеток на определенные комбинации продукт/пирогенные примеси. Следует отметить, что в то время, как реакция моноцитов большинства доноров на бактериальный эндотоксин приблизительно одинакова, ответы моноцитов отдельных доноров на пирогенные вещества, отличные от эндотоксинов, могут существенно различаться, поэтому возможно идентифицировать клетки, у которых ответ на определенные комбинации продукт/пирогенные примеси отсутствует.

2-2. ВЫЧИСЛЕНИЕ ПРЕДЕЛЬНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ ПИРОГЕННОГО ВЕЩЕСТВА

Критерием приемлемости для принятия решения о соответствии/несоответствии является предельная концентрация пирогенного вещества (*CLC*), которая выражается в эквивалентах эндотоксина на миллиграмм или миллилитр или в единицах биологической активности испытуемого лекарственного средства. Если предельная концентрация эндотоксина (*ELC*) для продукта установлена, то *CLC* будет равен *ELC*, если не указано иное. *CLC* выражается в эквивалентах эндотоксина.

CLC рассчитывают по формуле:

$$\frac{K}{M},$$

где:

K – пороговая пирогенная доза эндотоксина на килограмм массы тела;

M – максимальная рекомендованная разовая доза препарата на килограмм массы тела.

В случае введения продукта через частые интервалы или постоянно инфузионно, M – это максимальная общая доза, введенная в течение одного часового периода. Предельная концентрация эндотоксина зависит от продукта и пути его введения и устанавливается в фармацевтических статьях.

Значения для K представлены в Таблице 2.6.20.-4.

Таблица 2.6.30.-4

Путь введения	K (МЕ эндотоксина на килограмм массы тела)
Внутривенно	5,0
Внутривенно, для радиофармацевтических ЛС	2,5
Инtrateкальный (в полость позвоночного канала)	0,2

Для продуктов с другими путями введения предельная концентрация бактериальных эндотоксинов обычно определяется на основе результатов, полученных в процессе разработки лекарственного средства.

2-3. ИНФОРМАЦИЯ ОТНОСИТЕЛЬНО КРИОКОНСЕРВАНТОВ

Влияние криоконсервантов, например, диметилсульфоксида (ДМСО), и их остаточных количеств в размороженных клетках должны быть оценены: ДМСО оказывает токсичное действие на клеточные культуры, и, даже если клетки были тщательно промыты, криоконсервирование может изменять свойства клеток, например, проницаемость клеточных мембран.

2-4. ИСПЫТАНИЕ НА МЕШАЮЩИЕ ФАКТОРЫ

Если требуется, проводится испытание на мешающие факторы по крайней мере 3 различных партий испытуемого лекарственного средства. Испытуемые лекарственные средства, у которых отмечается значительная вариабельность реакций от серии к серии, должны подвергаться испытанию на мешающие факторы в рамках каждого индивидуального испытания, то есть сопутствующей валидации.

Испытание на мешающие факторы в большинстве случаев выполняется на сериях испытуемого лекарственного средства, которые не содержат эндотоксинов и других пирогенных/провоспалительных веществ, а если это невозможно, на сериях с минимальным содержанием пирогенных веществ. Если имеется только 1 серия испытуемого лекарственного средства, валидация должна выполняться на этой серии в трех независимых испытаниях. Должны выполняться параметры точности для воспроизводимости, например, $\pm 50\%$.

3. ЗАМЕНА ИСПЫТАНИЯ НА ПИРОГЕННОСТЬ НА КРОЛИКАХ НА АКТИВАЦИЮ МОНОЦИТОВ

Как отмечалось ранее, испытание на активацию моноцитов (ИАМ) прежде всего предназначено для использования в качестве альтернативы испытанию на пирогенность на кроликах. В фармакопейных статьях на лекарственные средства, предназначенные для парентерального введения, которые могут содержать пирогенные вещества, содержатся требования проведения испытания на бактериальные эндотоксины или испытания на активацию моноцитов.

Общие принципы.

– В любой фармакопейной статье при наличии требований к содержанию пирогенных веществ указывается только 1 испытание: или испытание на бактериальные эндотоксины, или ИАМ. Перед включением ИАМ в фармакопейную статью требуется подтверждение

пригодности одного из трех методов, описанных в общем разделе «испытания на активацию моноцитов» для оценки продукта, являющегося предметом данной фармакопейной статьи.

– Необходимая информация предоставляется производителями. Заинтересованным производителям предлагается предоставить любые данные по валидации, относящиеся к применимости ИАМ для контроля субстанций и лекарственных форм. Такие данные включают подробное описание приготовления образцов, а также любые процедуры по удалению мешающих факторов. В дополнение требуются любые доступные данные по параллельному испытанию продукта на пирогенность на кроликах, способствующие доказательству того, что замена испытания на пирогенность на кроликах на ИАМ применима.

4. ВАЛИДАЦИЯ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ МЕТОДОВ

Замена испытания на пирогенность на кроликах на ИАМ или замена метода определения противовоспалительных/пирогенных веществ на другой метод должна рассматриваться согласно положений раздела «Общие сведения» о замене фармакопейных методик на альтернативные: [#]«Испытания и методики определения, приведенные в Фармакопее, являются официальными методиками, однако по согласованию с компетентными уполномоченными органами могут использоваться и другие методики при условии, что они дают результаты, соответствующие фармакопейным методикам. В случае сомнений или разногласий решающей является фармакопейная методика»[#].

Для валидации методики для ИАМ, отличной от описанной в фармакопейной статье, предполагается выполнение следующих работ:

– процедура, материалы и реактивы, используемые в испытании, должны быть валидированы в соответствии с рекомендациями для данного испытания;

– присутствие мешающих факторов (и, если необходимо, процедура по их устранению) должно испытываться на образцах не менее 3 производственных серий.

ИАМ должен применяться ко всем новым продуктам, предназначенным для парентерального введения, которые должны испытываться на присутствие веществ, активирующих моноциты, в соответствии с требованиями Фармакопеи.

2.7. БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ

01/2013:20701

2.7.1. ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Иммунохимические методы основаны на селективном обратимом нековалентном связывании антигенов антителами. Эти методы используются для обнаружения и количественного определения как антигенов, так и антител. Факт образования комплекса антигена с антителом и количество этого комплекса могут быть определены различными путями. Положения данного общего метода относятся к иммунохимическим методам с использованием меченых или немеченых реагентов.

Результаты, получаемые иммунохимическими методами, зависят от реакционных условий, а также природы и качества используемых реагентов. Важно стандартизировать компоненты, используемые в ходе иммуноанализа и, где это возможно, использовать для количественных определений Международные стандартные образцы.

Реагенты, необходимые для многих иммунохимических методов, содержатся в составе коммерчески доступных наборов, т.е. наборов, включающих реагенты (антигены или антитела) и материалы, предназначенные для оценки *in vitro* указанной субстанции, а также инструкции по их надлежащему применению. Наборы используются в соответствии с инструкциями производителя; важно убедиться в том, что наборы являются подходящими для анализа испытуемой субстанции с особым учетом их селективности и чувствительности. Всемирной организацией здравоохранения представлено руководство по использованию иммунохимических наборов (*Technical Report Series 658* (1981)).

МЕТОДЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕЧЕНОГО АНТИГЕНА ИЛИ АНТИТЕЛА

В методах с использованием меченых веществ могут применяться подходящие метки, например, ферменты, флуорофоры, люминофоры и радиоизотопы. Если меткой является радиоизотоп, метод называют «радиоиммунологическим анализом». Рекомендации по измерению радиоактивности, приведенные в статье *Радиоактивные фармацевтические препараты*, подходят также и для иммунологических анализов с использованием радиоизотопов. Работа с радиоактивными материалами должна выполняться в соответствии с национальным законодательством и международными документами по защите от радиационной опасности.

МЕТОДЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НЕМЕЧЕНОГО АНТИГЕНА ИЛИ АНТИТЕЛА

Методы иммунопреципитации

Методы иммунопреципитации включают процессы флокуляции и осаждения. При смешивании растворов антигена с соответствующим антителом в подходящих условиях реактанты образуют флокулирующие или преципитационные агрегаты. Отношение реактантов, при котором достигается минимальное время флокуляции или наиболее заметное осаждение, называют оптимальным отношением. Такое отношение обычно составляют эквивалентные количества антигенов и антител. Иммунопреципитация может оцениваться визуально или по светорассеянию (нефелометрическое и турбидиметрическое определение). Увеличение чувствительности может быть достигнуто использованием в качестве реактантов частиц (например, из латекса), покрытых антигенами или антителами.

В методах флокуляции обычно используют ступенчатые разведения одного из реактантов, в то время как в иммунодиффузионных (ИД) методах разведение достигается путем диффузии в гелеобразную среду: достигаются концентрационные градиенты одного из реактантов или обоих. Таким образом, в геле образуются зоны, в которых отношение реактантов способствует преципитации. В то время как флокуляционные методы выполняются в пробирках, в иммунодиффузионных методах используются различные носители: пробирки, пластины, стекла, ячейки или камеры.

Если система иммунопреципитации состоит из одного антигена в комбинации с соответствующим антителом, система определяется как *простая*; если в ней участвуют родственные, но серологически неидентичные реактанты, система является *сложной*, а если в ней участвуют несколько серологически не связанных друг с другом реактантов, ее называют *комплексной*.

В методах *простой диффузии* концентрационный градиент устанавливается только для одного из реактантов, диффундирующего из внешнего источника в гелевую среду, содержащую соответствующий реактант в относительно низкой концентрации.

Простая радиальная иммунодиффузия (ПРИД) представляет собой простой количественный иммунодиффузионный метод. При достижении равновесия между внешним и внутренним реактантами круговая область преципитации, начинающаяся от места локализации внешнего реактанта, прямо пропорциональна количеству нанесенного антигена и обратно пропорциональна концентрации антитела в геле.

В *двойных диффузионных методах* концентрационные градиенты устанавливаются для обоих реактантов. И антиген, и антитело диффундируют из различных участков в гель, который первоначально был иммунологически нейтральным.

Сравнительные методы двойной диффузии используются для количественного сравнения различных антигенов против подходящих антител или наоборот. Сравнение основано на наличии или отсутствии взаимодействия между образцами преципитации. Могут быть выделены реакции идентичности, неидентичности и частичной идентичности антигенов или антител.

Иммуноэлектрофоретические методы

Иммуноэлектрофорез (ИЭ) – качественный метод, сочетающий две процедуры: гель-электрофорез и последующая иммунодиффузия.

Перекрестный иммуноэлектрофорез представляет собой модификацию метода ИЭ и является подходящим как для качественного, так и для количественного анализа. Первая часть процедуры представляет собой обычный гель-электрофорез. По ее окончании протяженную полосу геля, содержащую разделенные фракции, подлежащие определению,

вырезают и переносят на другую пластину. Электрофорез во втором направлении проводят перпендикулярно предыдущему электрофоретическому процессу в геле, содержащем относительно небольшую концентрацию антитела, соответствующего используемому антигену. Зависимость площади соответствующих пиков преципитации от количества соответствующего антигена является линейной для данной концентрации антитела и толщины геля.

Электроиммунный анализ, часто называемый *ракетным иммуноэлектрофорезом*, представляет собой быстрый метод количественного определения антигенов с зарядом, отличным от заряда антител, и наоборот. Выполняют электрофорез антигена, подлежащего определению, в геле, содержащем относительно низкую концентрацию соответствующих антител. Испытуемый материал и разведения стандартного антигена, используемые для калибровки, вносят в разные лунки в геле. В процессе электрофореза появляются мигрирующие пикообразные зоны преципитации, начинающиеся от лунок. Фронт преципитации становится неподвижным, когда количество антигена перестает быть избыточным. Зависимость расстояния, пройденного фронтом преципитации, от количества нанесенного антигена является линейной для данной концентрации антител.

Обратный иммуноэлектрофорез представляет собой быстрый метод количественного определения, позволяющий устанавливать концентрационные градиенты внешних антител и антигенов в электрическом поле в зависимости от разницы зарядов. Разведения стандарта для градуировки и разведения испытуемого образца вносят в ряд лунок в геле, а в противоположный ряд лунок вносят фиксированное количество соответствующего реактанта. Титр испытуемого образца может быть определен как максимальное разведение, для которого наблюдается линия преципитации.

Существует ряд модификаций методов перекрестного иммуноэлектрофореза и электроиммунного анализа.

В других методах сочетается разделение антигенов по размеру молекул и серологическим свойствам.

Визуализация и характеристика линий иммунопреципитации

Эти операции могут быть выполнены с использованием селективных или неселективных красителей, по флуоресценции, введением ферментных или изотопных меток или другими подходящими методами. Для характеристики в преципитатах веществ небелковой природы обычно используют методы селективного окрашивания.

В полупрозрачных гелях, например, на основе агара или агарозы, линии осаждения четко различимы визуально при условии наличия достаточной концентрации каждого из реактантов.

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДА

Критерии валидации

Количественный иммунохимический метод является достоверным при выполнении следующих условий.

1. Антитела и антигены не имеют существенных отличий в стандартном и испытуемом образце. В случае меченых реактантов различия меченого и немеченого компонента соответствующего реактанта должны быть незначительными.

2. На результат не оказывает влияние матрица, т.е. любой компонент испытуемого образца или используемые вспомогательные вещества, которые в разных образцах могут отличаться. В образцах могут содержаться высокие концентрации посторонних белков, солей, консервантов или веществ, обладающих протеолитической активностью.

3. Предел количественного определения ниже критерия, установленного в частной статье.

4. Точность определения достаточна для выполнения требований, предъявляемых в частных статьях.

5. Порядок, в котором проводится определение, не приводит к увеличению системных ошибок.

Методы валидации

Для проверки выполнения этих критериев разрабатывается процесс валидации, включающий следующие элементы.

1. Испытание выполняют не менее чем в трех повторностях.
2. Испытание проводят не менее чем для трех различных разведений стандартного образца и трех разведений испытуемых образцов, предполагаемая активность которых аналогична активности стандартного образца.
3. Используют рандомизированную схему количественного определения.
4. Если испытуемый образец находится в сыворотке или в смеси с иными компонентами, стандартный образец готовят аналогичным образом.
5. Испытание включает измерение неспецифического связывания меченого реактанта.
6. В случае заместительного иммунного анализа:
 - а) определяют максимальное связывание (нулевое замещение);
 - б) разведения должны охватывать весь диапазон откликов от значений, близких к неспецифическому связыванию, до максимального связывания, предпочтительно как для стандартного, так и для испытуемого образца.

СТАТИСТИЧЕСКИЕ РАСЧЕТЫ

Кривые откликов, полученные для испытуемого и стандартного образцов, могут быть проанализированы с использованием методов, описанных в разделе 5.3. *Статистический анализ результатов биологических испытаний и тестов.*

Существенная степень непараллельности указывает на то, что между антителом и антигеном в испытуемом и стандартном образцах имеются различия и результаты испытания являются недостоверными.

В заместительных иммунологических количественных определениях не должно быть существенных различий между значениями неспецифического связывания и максимального замещения при высокой концентрации испытуемого и стандартного образцов. Различия могут указывать на наличие эффектов, связанных с матрицей: ингибирование связывания либо разложение метки.

01/2013:20702

2.7.2. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИБИОТИКОВ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Активность антибиотика определяют путем сравнения степени угнетения роста чувствительных микроорганизмов под действием испытуемого антибиотика и стандартного образца в известных концентрациях.

Стандартные образцы, используемые для количественного определения, представляют собой субстанции, активность которых точно установлена по отношению к Международному стандартному образцу или Международному стандартному препарату.

Определение должно выполняться способом, позволяющим производить проверку достоверности математической модели, на которой основан расчет активности. Если выбрана модель параллельных линий, линии логарифмической зависимости активности от дозы для испытуемого и стандартного образцов должны быть параллельны; они должны быть линейны в области доз, использовавшихся при вычислении. Эти условия должны быть проверены тестами соответствия для определенной вероятности, обычно $P = 0,05$.

[#]Расчеты целесообразно проводить по схеме латинских квадратов (если при проведении анализа методом диффузии в агар были использованы прямоугольные кюветы) или по схеме рандомизированных блоков (если при проведении анализа методом диффузии в агар были использованы чашки Петри или анализ проводился турбидиметрическим методом).[#]

Могут быть использованы и другие математические модели, например, модель углового коэффициента, при условии доказательства их достоверности.

Если в частной статье нет других указаний, доверительные интервалы ошибки количественного определения активности ($P = 0,95$) должны составлять от 95 % до 105 % от оцениваемой активности.

Определение выполняют методом А или методом В.

А. МЕТОД ДИФФУЗИИ

Питательную среду определенного состава расплавляют, засевают суспензией микроорганизмов, чувствительных к испытуемому антибиотику, при подходящей температуре, например, (48–50) °С для вегетативных форм[#] и (65–70) °С при использовании суспензии спор[#]. Количество суспензии микроорганизмов выбирают таким образом, чтобы образовывались четко определенные зоны ингибирования требуемого диаметра при концентрациях антибиотика, используемых в определении. Инокулированная среда немедленно разливается по чашкам Петри или по прямоугольным кюветам на строго горизонтальной поверхности в количестве, достаточном для формирования однородного слоя толщиной от 2 мм до 5 мм. Среда может также состоять из двух слоев, из которых только верхний подвергался инокуляции.

Чашки хранят таким образом, чтобы не происходило заметного роста или гибели микроорганизмов до их использования, а поверхность среды была сухой к моменту использования.

Используя растворитель и буферный раствор, указанный в таблице 2.7.2.-1, готовят растворы стандартного образца и испытуемого антибиотика, имеющие известные концентрации и предположительно равные активности. Растворы наносят на поверхность среды, например, в стерильных цилиндрах из фарфора, нержавеющей стали или другого подходящего материала, или в лунки, сделанные в агаре. В каждый цилиндр или лунку должны быть помещены равные объемы раствора. Кроме того, можно использовать стерильные диски абсорбирующей бумаги подходящего качества; диски пропитывают растворами стандартного образца и растворами испытуемого антибиотика и помещают на поверхность агара.

Для оценки достоверности количественного определения используют не менее трех доз стандартного образца и трех доз испытуемого антибиотика, имеющих равные предполагаемые активности. Предпочтительно использовать ряды доз, меняющихся в геометрической прогрессии[#] (например, в соотношении 1:2:4)[#]. В рутинных анализах, когда линейность системы продемонстрирована в адекватном количестве экспериментов с определением по трем значениям, по согласованию с компетентными органами может считаться достаточным определение по двум значениям. Однако во всех спорных случаях должно применяться вышеописанное определение по трем значениям.

Растворы в каждой чашке Петри или прямоугольной кювете располагают статистически предпочтительным образом, кроме чашек Петри малого размера, на которых невозможно разместить больше шести растворов; растворы испытуемого антибиотика и стандартного образца чередуют таким образом, чтобы исключить взаимное влияние более концентрированных растворов.

Таблица 2.7.2.-1

Количественное определение антибиотиков методом диффузии

Антибиотик	Стандартный образец	Растворитель для приготовления основного раствора	Буферный раствор (pH)	Микроорганизм	Среда и конечное значение pH (±0,1 ед. pH)	Температура инкубации
#Азитромицин	<i>Азитромицина ФСО</i>	Буфер № 6, pH 6,0	Буфер № 6, pH 6,0	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	№ 9 pH 7,8–8,0	(35–37) °С
		1 мл спирта Р на 10 мг навески, затем буфер № 4 до 1000 ЕД/мл	Буфер № 4, pH 7,8–8,0	<i>Bacillus subtilis</i> var. Л ₂ <i>Bacillus cereus</i> var. <i>mycoides</i> HB	№ 9 pH 7,8–8,0	(30–37) °С (35–37) °С
#Ампициллин	<i>Ампициллина тригидрата ФСО</i>	Буфер № 1, pH 6,8–7,0	Буфер № 1, pH 6,8–7,0	<i>Staphylococcus aureus</i> 209 P	№ 11, № 7 + 0,1 % раствор глюкозы pH 6,8–7,0	(35–39) °С
Амфотерицин В	<i>Амфотерицина В ФСО</i>	Диметилсульфоксид Р	pH 10,5 (0,2 М)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763 IP 1432-83	F – pH 6,1	(35–37) °С
			#Буфер № 1 pH 6,8–7,0	# <i>Candida utilis</i> ЛИА-01	#№ 16 + 0,1 % глюкозы pH 5,8–6,0	№(29–31) °С

Бацитрадин цинка	Бацитрацина цинка ФСО	0,01 М раствор кислоты хлористоводородной	pH 7,0 (0,05 М)	<i>Micrococcus luteus</i> NCTC 7743 CIP 53,160 ATCC 10240	A – pH 7,0	(35–39) °C
#Бензилпенициллин	Бензилпенициллин натрия ФСО	Буфер № 1 pH 6,8–7,0	Буфер № 1 pH 6,8–7,0	<i>Staphylococcus aureus</i> 209 P	№ 11, № 7 + 0,1 % глюкозы pH 6,8–7,0	(35–37) °C
Блеомицина сульфат	Блеомицина сульфата ФСО	Вода P	pH 6,8 (0,1 М)	<i>Mycobacterium smegmatis</i> ATCC 607	G – pH 7,0	(35–37) °C
Ванкомицина гидрохлорид	Ванкомицина гидрохлорида ФСО	Вода P	pH 8,0	<i>Bacillus subtilis</i> NCTC 8236 CIP 52,62 ATCC 6633	A – pH 8,0	(37–39) °C
#Гелиомицин	Гелиомицина ФСО	0,1 М раствор натрия гидроксида	0,1 М раствор натрия гидроксида	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	№ 9 pH 7,8–8,0	(35–37) °C
#Гентамицин	Гентамицина сульфата ФСО	Буфер № 4 pH 7,8–8,0	Буфер № 4 pH 7,8–8,0	<i>Bacillus pumilus</i> NCTC 8241	№ 9 pH 7,8–8,0	(35–37) °C
Гентамицина сульфат	Гентамицина сульфата ФСО	Вода P	pH 8,0 (0,05 М)	<i>Bacillus pumilus</i> NCTC 8241 CIP 76,18 <i>Staphylococcus epidermidis</i> NCIB 8853 CIP 68,21 ATCC 12228	A – pH 7,9 A – pH 7,9	(35–39) °C (35–39) °C
#Грамицидин С	Грамицидина С ФСО	Спирт (95 %, об/об) P	Вода P	<i>Bacillus cereus</i> var. <i>mycoides</i> 537	№ 13 pH 7,0–7,2	(35–37) °C
#Дактиномицин	Дактиномицина ФСО	Вода P	Буфер № 4 pH 7,8–8,0	<i>Bacillus cereus</i> var. <i>mycoides</i> HB	№ 14 pH 7,8–8,0	(35–37) °C
Джозамицин	Джозамицина ФСО	Метанол P (см. частную статью)	pH 5,6	<i>Bacillus subtilis</i> CIP 52,62 ATCC 6633 NCTC 10400	A – pH 6,6	(35–37) °C
Джозамицина пропионат	Джозамицина пропионата ФСО	Метанол P (см. частную статью)	pH 5,6	<i>Bacillus subtilis</i> CIP 52,62 ATCC 6633 NCTC 10400	A – pH 6,6	(35–37) °C
#Дигидростреп- томицин	Дигидрострептомицина сульфата ФСО	Буфер № 3 pH 6,0–6,2	Буфер № 4 pH 7,8–8,0	<i>Bacillus cereus</i> var. <i>mycoides</i> 537	№ 9 pH 7,8–8,0	(35–37) °C
#Дигидростреп- томицина сульфат	Дигидрострептомицина сульфата ФСО	Вода P	pH 8,0 (0,05 М)	<i>Bacillus subtilis</i> NCTC 82-36 CIP 1.83 <i>Bacillus subtilis</i> NCTC 10400 CIP 52.62 ATCC 6633	A – pH 7,9 A – pH 7,9	(30–37) °C (30–37) °C
#Диклоксациллин	Диклоксациллина натрия ФСО	Буфер № 1 pH 6,8–7,0	Буфер № 1 pH 6,8–7,0	<i>Staphylococcus aureus</i> 209 P	№ 11, № 7 + 0,1 % глюкозы pH 6,8–7,0	(35–37) °C
#Доксициклин	Доксициклина гидрохлорида ФСО	0,01 М раствор кислоты хлористоводородной	Буфер № 2 pH 5,8–6,0	<i>Bacillus subtilis</i> , var. J12	№ 6 + 1 % глюкозы pH 6,8–7,0	(35–37) °C
Канамицин моносulfат	Канамицина моносulfата ФСО	Вода P	pH 8,0 (0,05 М)	<i>Bacillus subtilis</i> NCTC 10400 CIP 52,62 ATCC 6633 <i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 7447 CIP 53,156 ATCC 6538 P	A – pH 7,9 A – pH 7,9	(30–37) °C (35–39) °C
#Канамицин В	Канамицина моносulfата ФСО	Вода P	Буфер № 4 pH 7,8–8,0	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	№ 12 pH 7,8–8,0 № 8 pH 7,8–8,0	(35–37) °C
#Карбенициллин	Карбенициллина динатрия ФСО	Буфер № 1 pH 6,8–7,0	Буфер № 2 pH 5,8–6,0	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC 2134	№ 7 pH 6,8–7,0	(35–37) °C
#Карминомицин	Карминомицина гидрохлорида ФСО	Вода P	Буфер № 4 pH 7,8	<i>Bacillus cereus</i> var. <i>mycoides</i> 537	№ 5 pH 7,8–8,0	(35–37) °C
Колистиметат натрия	Колистиметата натрия ФСО	Вода P	pH 6,0 (0,05 М)	<i>Bordetella bronchiseptica</i> NCTC 8344 CIP 53,157 ATCC 4617	B – pH 7,3	(35–39) °C

				<i>Escherichia coli</i> NCIB 8879 CIP 54,127 ATCC 10536		
#Леворин	Леворина ФСО	Диметилсульфоксид Р	Диметилсульфоксид Р до концентрации 100 мкг/мл, а затем в буфере № 1, рН 6,8–7,0 (Срок годности растворов при Комнатной температуре не более 30 мин)	<i>Candida utilis</i> ЛИА-01	№ 16 + 1 % глюкозы рН 5,8–6,0	(29–31) °C
#Линкомицин	Линкомицина гидрохлорида ФСО	Вода Р	Буфер № 4 рН 7,8–8,0	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	№ 8 рН 7,8–8,0	(35–37) °C
#Метациклин	Метациклина гидрохлорида ФСО	0,01 М раствор кислоты хлористоводородной	Буфер № 2 рН 5,8–6,0	<i>Bacillus subtilis</i> , var. J12	№ 6 + 1 % глюкозы рН 6,8–7,0	(30–37) °C
#Метициллин	Метициллина натрия ФСО	Буфер № 1 рН 6,8–7,0	Буфер № 1 рН 6,8–7,0	<i>Staphylococcus aureus</i> 209-Р	№ 11, № 7 + 0,1 % глюкозы рН 6,8–7,0	(35–37) °C
#Мидекамицин	Мидекамицина ацетата ФСО	Метанол Р до концентрации 500 мкг/мл, а затем в буфере № 7 рН 4,5	Метанол Р до концентрации 500 мкг/мл, а затем в буфере № 7 рН 4,5	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	№ 9 рН 7,8–8,0	(35–37) °C
#Микогептин	Микогептина ФСО	Диметилсульфоксид Р	Диметил-сульфоксид Р до концентрации 50 мкг/мл, а затем в буфере № 5, рН 7,8–8,0 (Срок годности растворов при комнатной температуре не более 30 мин)	<i>Candida utilis</i> ЛИА-01	№ 16 + 1 % глюкозы рН 5,8–6,0	(29–31) °C
#Мономицин	Мономицина ФСО	Вода Р	3 % раствор калия хлорида Р	<i>Bacillus cereus</i> var. <i>mycoides</i> 537	№ 9 рН 7,8–8,0	(35–37) °C
#Неомицин	Неомицина сульфата ФСО	Буфер № 4 рН 7,8–8,0	Буфер № 4 рН 7,8–8,0	<i>Bacillus cereus</i> var. <i>mycoides</i> 537	№ 9 рН 7,8–8,0	(35–37) °C
Неомицина сульфат	Неомицина сульфата для микробиологического определения ФСО	Вода Р	рН 8,0 (0,05 М)	<i>Bacillus pumilus</i> NCTC 8241 CIP 76,18 <i>Bacillus subtilis</i> NCTC 10400 CIP 52,62 ATCC 6633	Е – рН 7,9 Е – рН 7,9	(30–37) °C (30–37) °C
Нетилмицин сульфат	Нетилмицина сульфата ФСО	Вода Р	рН 8,0±0,1	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538Р CIP 53,156	А – рН 7,9	(32–35) °C
Нистатин	Нистатина ФСО	Диметилформамид Р	рН 6,0 (0,05 М), содержащий 5 % (об/об) диметил-формамида Р # Буфер № 3 рН 6,0–6,2	<i>Candida tropicalis</i> CIP 1433-83 NCYC 1393 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC 87 CIP 1432-83 ATCC 9763 # <i>Candida utilis</i> ЛИА-01	Е – рН 6,0 F – рН 6,0 # № 16 + 0,1 % глюкозы рН 5,8–6,0	(30–37) °C (30–32) °C #(29–31) °C
#Оксациллин	Оксациллина натрия ФСО	Буфер № 1 рН 6,8–7,0	Буфер № 1 рН 6,8–7,0	<i>Staphylococcus aureus</i> 209-Р	№ 11, № 7 + 0,1 % глюкозы рН 6,8–7,0	(35–37) °C
#Окситетрациклин	Окситетрациклина гидрохлорида ФСО	0,01 М раствор кислоты хлористоводородной	Буфер № 2 рН 5,8–6,0	<i>Bacillus subtilis</i> var. J12	№ 6 + 1 % глюкозы рН 6,8–7,0	(30–37) °C
#Олеандомицин	Олеандомицина фосфата ФСО	Буфер № 3 рН 6,0–6,2	Буфер № 4 рН 7,8–8,0	<i>Bacillus cereus</i> var. <i>mycoides</i> HB	№ 9 рН 7,8–8,0	(35–37) °C
#Оливомицин	Оливомицин-кислоты ФСО	Стандартный образец в 96 % спирте Р из расчета 5 мг в 1 мл, затем буфер № 1, рН 6,8–7,0	Буфер № 1 рН 6,8–7,0	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	№ 11, № 18 рН 6,8–7,0	(35–37) °C
#Полимиксин В	Полимиксина В сульфата ФСО	Буфер № 3 рН 6,0–6,2	Буфер № 5 рН 6,0–6,2	<i>Bordetella bronchiseptica</i> ATCC 4617	№ 15 рН 7,0–7,2	(35–37) °C

#Полимиксин М	Полимиксина М сульфата ФСО	Буфер № 3 pH 6,0–6,2	Буфер № 5 pH 6,0–6,2	<i>Bordetella bronchiseptica</i> ATCC 4617	№ 15 pH 7,0–7,2	(35–37) °C
#Рифампицин	Рифампицина ФСО	1 мл диметилформамида Р на 10 мг навески, затем вода дистиллированная Р	Буфер № 3 pH 6,0–6,2	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	№ 10 + 0,1 % глюкозы pH 6,0–6,2	(35–37) °C
Рифамицин натрия	Рифамицина натрия ФСО	Метанол Р	pH 7,0 (0,05 М)	<i>Micrococcus luteus</i> NCTC 8340 CIP 53,45 ATCC 9341	A – pH 6,6	(35–39) °C
#Рубомицин	Рубомицина гидрохлорида ФСО	Вода Р	Буфер № 4 pH 6,8–7,0	<i>Bacillus cereus</i> var. <i>mycoides</i> 537	№ 5 pH 7,8–8,0	(35–37) °C
#Сизомицин	Сизомицина ФСО	Буфер № 4 pH 6,8–7,0	Буфер № 4 pH 6,8–7,0	<i>Bacillus pumilus</i> NCTC 8241	№ 12, № 8 pH 7,8–8,0	(35–37) °C
Спирамицин	Спирамицина ФСО	Метанол Р	pH 8,0 (0,05 М)	<i>Bacillus subtilis</i> NCTC 10400 CIP 52,62 ATCC 6633	A – pH 7,9	(30–32) °C
#Стрептомицин	Стрептомицина ФСО	Буфер № 3 pH 6,0–6,2	Буфер № 3 pH 6,0–6,2	<i>Bacillus cereus</i> var. <i>mycoides</i> 537	№ 9 pH 7,8–8,0	(35–37) °C
Стрептомицина сульфат	Стрептомицина сульфата ФСО	Вода Р	pH 8,0 (0,05 М)	<i>Bacillus subtilis</i> NCTC 8236 CIP 1,83 <i>Bacillus subtilis</i> NCTC 10400 CIP 52,62 ATCC 6633	A – pH 7,9 A – pH 7,9	(30–37) °C (30–37) °C
Тейкопланин	Тейкопланина ФСО	pH 6,0 (0,05 М)	pH 6,0 (0,05 М)	<i>Bacillus subtilis</i> NCTC 10400 CIP 5262 ATCC 6633	H – pH 7,8–8,0	(35–37) °C
#Тетрациклин	Тетрациклина гидрохлорида ФСО	0,01 М раствор кислоты хлористоводородной	Буфер № 2 pH 5,8–6,0	<i>Bacillus subtilis</i> var. J12	№ 6 + 1 % глюкозы pH 6,8–7,0	(35–37) °C
#Тобрамицин	Тобрамицина ФСО	Вода Р	pH 8,0 (0,05 М)	<i>Bacillus subtilis</i> NCTC 10 400 CIP 5262 ATCC 6633	A – pH 7,9	(30–37) °C
#Феноксиметилпенициллин	Феноксиметил пенициллина ФСО	Буфер № 1 pH 6,8–7,0	Буфер № 1 pH 6,8–7,0	<i>Staphylococcus aureus</i> 209-Р	№ 11 + 0,1 % глюкозы pH 6,8–7,0	(35–37) °C
#Флоримицин	Флоримицина сульфата ФСО	Вода Р	Буфер № 4 pH 6,8–7,0	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	№ 8 pH 7,8–8,0	(35–37) °C
#Фузидин	Фузидиевой кислоты ФСО	Стандартный образец в 96 % спирте Р из расчета 10 мг/мл, затем буфер № 4; испытуемый образец в буфере № 4 pH 7,8–8,0	Буфер № 3 pH 6,0–6,2	<i>Bacillus cereus</i> var. <i>mycoides</i> HB	№ 10 + 0,1 % глюкозы pH 6,0–6,2	(35–37) °C
Фрамицетина сульфат	Фрамицетина сульфата ФСО	Вода Р	pH 8,0 (0,05 М)	<i>Bacillus subtilis</i> NCTC 10400 CIP 52,62 ATCC 6633 <i>Bacillus pumilus</i> NCTC 8241 CIP 76,18	E – pH 7,9 E – pH 7,9	(30–37) °C (30–37) °C
#Цефалексин	Цефалексина ФСО	Буфер № 1 pH 6,8–7,0	Буфер № 1 pH 6,8–7,0	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	№ 11, № 7 + 0,1 % глюкозы pH 6,8–7,0	(35–37) °C
#Цефалотин	Цефалотина натрия ФСО	Буфер № 1 pH 6,8–7,0	Буфер № 1 pH 6,8–7,0	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	№ 11, № 7 + 0,1 % глюкозы pH 6,8–7,0	(35–37) °C
#Хлортетрациклин	Хлортетрациклина гидрохлорида ФСО	0,01 М раствор кислоты хлористоводородной	Буфер № 2 pH 5,8–6,0	<i>Bacillus subtilis</i> var. J12	№ 6 + 1 % глюкозы pH 6,8–7,0	(35–37) °C
#Эритромицин	Эритромицина ФСО	1 мл 96 % спирта Р на 10 мг навески, затем буфер № 4 до 1000 ЕД/мл	Буфер № 4 pH 6,8–7,0	<i>Bacillus cereus</i> var. <i>mycoides</i> HB	№ 9 pH 7,8–8,0	(35–37) °C
#Эритромицина эстолат Эритромицина	Эритромицина ФСО	Метанол Р (см. частные статьи)	pH 8,0 (0,05 М)	<i>Bacillus pumilus</i> NCTC 8241 CIP 76.18	A – pH 7,9	(30–37) °C

этилсукцинат Эритромицина стеарат				<i>Bacillus subtilis</i> NCTC 10400 CIP 5262 ATCC 6633	A – pH 7,9	(30–37) °C

#Рекомендуется следующая последовательность внесения стандартного (S) и испытуемого (U) образцов в цилиндры или лунки каждой чашки: первыми вносятся растворы стандартного и испытуемого образца с малой концентрацией (S_1, U_1), затем со средней концентрацией (S_2, U_2), последними вносят растворы с большими концентрациями (S_3, U_3).

Все растворы стандартного и испытуемого образцов вносят в цилиндры или лунки одной чашки Петри таким образом, чтобы растворы с большими концентрациями не соприкасались между собой. Предлагаемый вариант закапывания $S_1 U_3 S_2 U_1 S_3 U_2$.[#]

Чашки инкубируют при подходящей температуре около 18 ч. Чашки могут выдерживаться до инкубации при комнатной температуре или, если необходимо, при температуре 4 °C в течение определенного промежутка времени, обычно от 1 до 4 ч для протекания диффузии, что уменьшает эффекты вариаций временных интервалов между нанесением растворов и улучшает качество кривой регрессии.

Измеряют диаметры (с точностью не ниже 0,1 мм) или площади кольцевых зон ингибирования (с соответствующей точностью) и вычисляют активность с использованием подходящих статистических методов.

В каждом определении используют достаточное для получения требуемой точности количество повторов. Может быть проведено несколько определений, результаты которых статистически обработаны для получения требуемой точности и для подтверждения того, что активность испытуемого антибиотика не ниже минимальных требований.

В. МЕТОД ТУРБИДИМЕТРИИ

Подходящую питательную среду с суспензией выбранного микроорганизма, обладающего чувствительностью к тестируемому антибиотику, инокулируют таким образом, чтобы в условиях определения происходило достаточно значительное ингибирование микробного роста. Количество суспензии выбирают таким образом, чтобы получить после 4 ч инкубации помутнение, легко поддающееся количественной оценке.

Инокулированную среду используют немедленно после ее приготовления.

Используя растворитель и буферный раствор, указанные в таблице 2.7.2.-2, готовят растворы стандартного образца и испытуемого антибиотика, имеющие известные концентрации и предположительно равные активности.

Для оценки достоверности количественного определения используют не менее трех доз стандартного образца и трех доз испытуемого антибиотика. Предпочтительно использовать ряды доз, меняющихся в геометрической прогрессии. Для получения необходимой линейности может оказаться необходимым осуществить выбор из большого количества трех последовательных доз, используя соответствующие дозы для стандартного образца и испытуемого антибиотика.

Помещают равные объемы каждого из растворов в идентичные пробирки и прибавляют в каждую пробирку равные объемы инокулированной среды (например, 1 мл раствора и 9 мл среды). Для количественного определения тиротрицина прибавляют 0,1 мл раствора и 9,9 мл инокулированной среды.

Одновременно готовят две контрольные пробирки без антибиотика, содержащие инокулированную среду. В одну из них немедленно прибавляют 0,5 мл *формальдегида Р*. Эти пробирки используют для настройки оптического прибора, используемого для измерения роста. Все пробирки, распределенные случайным образом, методом латинского квадрата или рандомизированного блочного распределения, помещают в водяную баню или в другой подходящий аппарат, позволяющий быстро довести температуру всех пробирок до соответствующей температуры инкубации и поддерживать пробирки при этой температуре в течение 3–4 ч, обеспечивая однородность температурного режима и равное время инкубации.

По окончании инкубации рост микроорганизмов останавливают прибавлением 0,5 мл *формальдегида Р* в каждую пробирку или тепловой обработкой и измеряют степень мутности, используя подходящий оптический прибор. Можно использовать метод,

позволяющий измерять степень мутности в каждой пробирке по окончании одинаковых периодов инкубации.

Рассчитывают активность с использованием подходящих статистических методов.

Линейность преобразованной или непреобразованной зависимости реакции от дозы часто получается лишь в ограниченном интервале. Именно в этом промежутке необходимо производить расчет активности. Для подтверждения линейности определение проводят на трех последовательных дозах из этого интервала. В рутинных анализах по согласованию с компетентными органами определение может проводиться по двум значениям при условии, что линейность подтверждена адекватным количеством экспериментов с использованием трех значений. Однако во всех спорных случаях должно применяться вышеописанное определение по трем значениям.

В каждом определении используют достаточное количество повторов для получения требуемой точности. Определение может быть проведено повторно, и результаты статистически объединены для получения требуемой точности и подтверждения того, что активность испытуемого антибиотика не менее минимальных требований.

Таблица 2.7.2.-2

Количественное определение антибиотиков турбидиметрическим методом

Антибиотик	Стандартный образец	Растворитель для приготовления основного раствора	Буферный раствор (pH)	Микроорганизм	Среда и конечное значение pH ($\pm 0,1$ ед. pH)	Температура инкубации
Ванкомицина гидрохлорид	Ванкомицина гидрохлорида ФСО	Вода Р	pH 8,0	<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 53,156 ATCC 6538 P	С – pH 7,0	(37–39) °C
Гентамицина сульфат	Гентамицина сульфата ФСО	Вода Р	pH 7,0	<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 7447 CIP 53,156 ATCC 6538 P	С – pH 7,0	(35–37) °C
Грамицидин	Грамицидина ФСО	Метанол Р	pH 7,0*	<i>Enterococcus hirae</i> CIP 58,55 ATCC 10541 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 P	С – pH 7,0	(35–37) °C
* – может оказаться необходимым добавление детергента для предотвращения адсорбции материала в ходе разведения, например, полисорбата 80 Р в концентрации 0,1 мг/мл						
Джозамицин	Джозамицина ФСО	Метанол Р (см. частную статью)	pH 5,6	<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 53,156 ATCC 6538 P NCTC 7447	С – pH 8,0	(35–37) °C
Джозамицина пропионат	Джозамицина пропионата ФСО	Метанол Р (см. частную статью)	pH 5,6	<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 53,156 ATCC 6538 P NCTC 7447	С – pH 8,0	(35–37) °C
Канамицина моносульфат Канамицина кислый сульфат	Канамицина моносульфата ФСО	Вода Р	pH 8,0	<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 7447 CIP 53,156 ATCC 6538 P	С – pH 7,0	(35–37) °C
Колистиметат натрия	Колистиметата натрия ФСО	Вода Р	pH 7,0	<i>Escherichia coli</i> NCIB 8666 CIP 2,83 ATCC 9637	С – pH 7,0	(35–37) °C
Неомицина сульфат	Неомицина сульфата для микробиологического определения ФСО	Вода Р	pH 8,0	<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 7447	С – pH 7,0	(35–37) °C

				CIP 53,156 ATCC 6538 P		
Рифамицин натрия	Рифамицина натрия ФСО	Метанол P	pH 7,0	<i>Escherichia coli</i> NCIB 8879 CIP 54,127 ATCC 10536	C – pH 7,0	(35–37) °C
Спирамицин	Спирамицина ФСО	Метанол P	pH 8,0	<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 7447 CIP 53,156 ATCC 6538 P	C – pH 7,0	(35–37) °C
Стрептомицина сульфат	Стрептомицина сульфата ФСО	Вода P	pH 8,0	<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 7427 CIP 53,153 ATCC 10031	C – pH 7,0	(35–37) °C
Тиротрицин	Грамицидина ФСО	96 % спирт P	96 % спирт P	<i>Enterococcus hirae</i> ATCC 10541	C – pH 7,0	37 °C
Фрамицетина сульфат	Фрамицетина сульфата ФСО	Вода P	pH 8,0	<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 7447 CIP 53,156 ATCC 6538 P	C – pH 7,0	(35–37) °C

Следующий раздел приводится для информации.

Рекомендуемые микроорганизмы

В нижеследующем тексте приводятся рекомендуемые микроорганизмы и условия их применения. Могут также использоваться и другие микроорганизмы при условии, что доказана их чувствительность к испытываемому антибиотику и они могут использоваться в подходящей среде и при подходящих значениях температуры и pH. Концентрации используемых растворов должны быть выбраны таким образом, чтобы в условиях испытания обеспечивалось наличие линейной зависимости между логарифмом дозы и реакцией.

Приготовление посевного материала. *Bacillus cereus* var. *mycoides*; *Bacillus subtilis*; *Bacillus pumilus*. Суспензия спор микроорганизмов, используемая в качестве посевного материала, готовится следующим образом.

Микроорганизм выращивается при температуре (35–37) °C в течение 7 дней на поверхности подходящей среды, к которой добавлен марганца (II) сульфат P в концентрации 0,001 г/л. Выраченную культуру, состоящую в основном из спор, смывают стерильной водой P. Суспензию нагревают при температуре 70 °C в течение 30 мин и разводят для получения подходящей концентрации спор, обычно от $10 \cdot 10^6$ до $100 \cdot 10^6$ в миллилитре. Суспензия спор может храниться в течение продолжительного времени при температуре, не превышающей 4 °C. Суспензия спор также может быть приготовлена путем культивирования организмов в среде C при температуре 26 °C в течение 4–6 дней с последующим добавлением в асептических условиях марганца (II) сульфата P в количестве, достаточном для получения концентрации 0,001 г/л, и инкубированием в течение 48 ч. Суспензию микроскопируют для подтверждения спорообразования (около 80 %) и центрифугируют. Осадок ресуспендируют в стерильной воде P, получая концентрацию спор от $10 \cdot 10^6$ до $100 \cdot 10^6$ в миллилитре, после чего нагревают при температуре 70 °C в течение 30 мин. Суспензию хранят при температуре, не превышающей 4 °C.

Bordetella bronchiseptica. Микроорганизм выращивают на среде В при температуре (35–37) °C в течение 16–18 ч. Выраченную культуру смывают стерильной водой P и разводят до требуемой степени мутности.

Staphylococcus aureus; *Klebsiella pneumoniae*; *Escherichia coli*; *Micrococcus luteus*; *Staphylococcus epidermidis*. Посевной материал готовят по методу, описанному выше для *B. bronchiseptica*, но с использованием среды А и доведением степени мутности до значения,

дающего, в зависимости от метода, удовлетворительную зависимость реакции от дозы в турбидиметрическом определении или четкие зоны ингибирования подходящего диаметра.

Saccharomyces cerevisiae; *Candida tropicalis*. Микроорганизм выращивают на среде F при температуре (30–37) °C в течение 24 ч. Смывают выращенную культуру стерильным раствором 9 г/л натрия хлорида P. Разводят до требуемой степени мутности этим же раствором.

[#]Допустимо использование следующих методов приготовления посевного материала.

Candida utilis ЛИА-01. Выращивают в пробирках со скошенной средой № 3 в течение 48 ч при температуре (30±1) °C.

Staphylococcus aureus. Выращивают в пробирках со скошенной средой № 1 в течение 24 ч при температуре (36±1) °C.

Bordetella bronchiseptica. Выращивают в пробирках со скошенной средой № 1 в течение 30–36 ч при температуре (36±1) °C.

Pseudomonas aeruginosa NCTC 2134. Выращивают на мясо-пептонном бульоне (МПБ) pH 7,2–7,4 в течение 18–20 ч при температуре (36±1) °C.

Bacillus pumilus, NCTC 8241; *Bacillus subtilis* ATCC 6633; *Bacillus cereus* var. *mycoides* HB; *Bacillus cereus* var. *mycoides* 537.

Для получения суспензии спор тест-микроорганизмы выращивают на скошенной среде в пробирках (среда № 1 для *B. subtilis* var. *L2*, *B. pumilus* NCTC 8241, *B. subtilis* ATCC 6633, *B. cereus* var. *mycoides* HB; среда № 2 для *B. cereus* var. *mycoides* 537), при температуре (36±1) °C в течение 18–20 ч. Культуру, выращенную в пробирках, смывают 5–10 мл стерильного раствора 9 г/л натрия хлорида P засевают ею несколько матрасов с 300 мл питательной среды со скошенной поверхностью, (среда № 4 для *B. pumilus*, *B. cereus* var. *mycoides* 537; среда № 5 для *B. subtilis* ATCC 6633, *B. cereus* var. *mycoides* HB). На матрасах посеы инкубируют при температуре (36±1) °C в течение 5–7 сут. В процессе выращивания проводят микроскопический контроль культуры. Культуру, содержащую 80–90 % спор, смывают стерильной водой P.

Полученную взвесь спор прогревают при температуре от 60 °C до 70 °C в течение 30 мин. Затем промывают стерильной водой P при центрифугировании до полной прозрачности надосадочной жидкости. Промытую взвесь спор вновь прогревают в течение 30 мин при температуре от 60 °C до 70 °C. Взвесь спор хранят при температуре от 4 °C до 10 °C и используют до тех пор, пока интенсивность роста и четкость зон при определении антимикробной активности удовлетворяют предъявляемым требованиям.[#]

Таблица #2.7.2.-0

Характеристики культуральных свойств тест-микроорганизмов

Название тест-микроорганизма	При росте на плотной питательной среде		При росте на жидкой питательной среде		При микроскопическом изучении мазка агаровой культуры, окрашенной по Граму
	условия выращивания	описание культуры	условия выращивания	описание культуры	
<i>Staphylococcus aureus</i> 209 P	Среда № 1, (36±1) °C 18–20 ч, затем при комнатной температуре – 24 ч	Гладкие с ровными краями колонии с равномерной золотистой пигментацией	Мясо-пептонный бульон pH 7,2–7,4 18–20 ч	Равномерное помутнение бульона без пленки и слизистого осадка на дне	Однородные по величине и расположению в виде гроздьев кокки с хорошо выраженной грамположительной окраской
<i>Candida utilis</i> ЛИА-01	Среда № 3, (30±1) °C 48 ч	Круглые кремового цвета с матовой поверхностью колонии с ровными краями	МПБ, pH 7,2–7,4 с 1 % глюкозы 18–20 ч	Рост в виде равномерной мути и осадка на дне	Овальные, иногда с отростками, клетки, расположены отдельно, цепочками или группами
<i>Bacillus subtilis</i> var. L2	Среда № 1, (36±1) °C 18–20 ч, затем при комнатной	Колонии желтоватого цвета, круглой формы влажно блестящие с шагреновой	МПБ, pH 7,2–7,4 18–20 ч	Рост в виде пленки с осадком на дне	Палочки с закругленными краями, располагающиеся отдельно и

	температуре – 24 ч	поверхностью, слегка зазубренными краями и приподнятым центром			цепочками, с хорошо выраженной грамположительной окраской
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Среда № 1, (36±1) °C 18–20 ч	Мелкие сероватые колонии с зубчатым краем	МПБ, pH 6,8–7,0 18–20 ч	Рост в виде пленки с осадком на дне	Тонкие палочки, располагающиеся отдельно или цепочками, с хорошо выраженной грамположительной окраской
<i>Bacillus cereus</i> var. <i>mycoides</i> 537	Среда № 2, (36±1) °C 18–20 ч	Шероховатые колонии с краем, сформированным из переплетающихся волокон	МПБ, pH 7,8–8,0 18–20 ч	Морщинистая пленка, вся среда прозрачная без осадков	Палочки с закругленными краями, располагающиеся отдельно и цепочками, с хорошо выраженной грамположительной окраской
<i>Bacillus cereus</i> var. <i>mycoides</i> HB	Среда № 1, (36±1) °C 18–20 ч	Гладкие колонии с ровными краями и сферической поверхностью	МПБ, pH 7,2–7,4 18–20 ч	Равномерное помутнение бульона без образования пленки и осадка	Тонкие с закругленными концами палочки, располагающиеся отдельно или короткими цепочками, с хорошо выраженной грамположительной окраской
<i>Bacillus pumilus</i> NCTC 8241	Среда № 1, (36±1) °C 18–20 ч	Мелкие сероватоголубого цвета колонии с зазубренными краями и приподнятым центром	МПБ, pH 7,2–7,4 18–20 ч	Равномерное помутнение бульона без образования пленки и осадка	Тонкие, мелкие палочки с закругленными концами, располагающиеся отдельно или короткими цепочками, с хорошо выраженной грамположительной окраской
<i>Bordetella bronchiseptica</i> ATCC 4617	Мясо-пептонный агар (МПА), pH 7,2 – 7,4 (36±1) °C 18–20 ч	Мелкие мутные белые слегка выпуклые фарфоровидные колонии	МПБ, pH 7,2–7,4	Заметное помутнение, серая пленка, тягучий осадок	Одиночные короткие тонкие палочки с хорошо выраженной грамотрицательной окраской
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC 2134	МПА, pH 7,2–7,4 (36±1) °C 18–20 ч	Широкие расплывчатые прозрачные с неровным краем колонии	МПБ, pH 7,2–7,4	Заметное помутнение, толстая пленка, среда может приобретать желтовато-зеленую окраску	Одиночные палочки либо короткие цепочки с хорошо выраженной грамотрицательной окраской

Буферные растворы. Буферные растворы с показателем pH в интервале от 5,8 до 8,0 готовят смешиванием 50,0 мл 0,2 М раствора калия дигидрофосфата Р с указанным в таблице 2.7.2.-3 объемом 0,2 М раствора натрия гидроксида. Разбавляют свежеприготовленной водой дистиллированной Р до объема 200,0 мл.

Таблица 2.7.2.-3

pH	0,2 М раствор натрия гидроксида
5,8	3,72

6,0	5,70
6,2	8,60
6,4	12,60
6,6	17,80
6,8	23,65
7,0	29,63
7,2	35,00
7,4	39,50
7,6	42,80
7,8	45,20
8,0	46,80

Эти буферные растворы используются для всех микробиологических определений, указанных в таблице 2.7.2.-1, за исключением блеомицина сульфата и амфотерицина В.

Буферный раствор рН 6,8 для блеомицина сульфата готовят следующим образом: 6,4 г калия дигидрофосфата Р и 18,9 г динатрия гидрофосфата Р растворяют в воде Р и доводят до объема 1000 мл этим же растворителем.

[#]Кроме описанных выше буферных растворов могут использоваться растворы следующего состава:

Буфер № 1

Калия дигидрофосфат Р	3,63 г
Динатрия гидрофосфат Р	7,13 г
Вода дистиллированная Р	до 1000 мл
рН раствора	(6,9±0,1)

Буфер № 2

Натрия цитрат Р	20,6 г
Кислота хлористоводородная Р	1,81 г
Вода дистиллированная Р	до 1000 мл
рН раствора	(5,9±0,1)

Буфер № 3

Калия дигидрофосфат Р	7,72 г
Динатрия гидрофосфат Р	1,78 г
Вода дистиллированная Р	до 1000 мл
рН раствора	(6,1±0,1)

Буфер № 4

Калия дигидрофосфат Р	0,68 г
Динатрия гидрофосфат Р	10,99 г
Вода дистиллированная Р	до 1000 мл
рН раствора	(7,9±0,1)

Буфер № 5

Калия дигидрофосфат Р	32,0 г
Динатрия гидрофосфат Р	8,0 г
Вода дистиллированная Р	до 1000 мл
рН раствора	(6,1±0,1)

Буфер № 6

Динатрия гидрофосфат Р	35,8 г

<i>Вода дистиллированная Р</i>	до 1 000 мл
рН раствора	(6,0±0,1)
Буфер № 7	
<i>Натрия дигидрофосфат Р</i>	0,64 г
<i>Динаatria гидрофосфат Р</i>	0,195 г
<i>Вода дистиллированная Р</i>	до 1000 мл
рН раствора	(4,5±0,1)

Буферные растворы стерилизуют насыщенным паром под давлением при температуре 121 °С в течение 15 мин.[#]

Питательные среды. Могут быть использованы следующие или эквивалентные питательные среды.

Среда А

Пептон	6 г
Панкреатический гидролизат казеина	4 г
Говяжий экстракт	1,5 г
Дрожжевой экстракт	3 г
Глюкоза моногидрат	1 г
Агар	15 г
Вода	до 1000 мл

Среда В

Панкреатический гидролизат казеина	17 г
Папаиновый гидролизат соевых бобов	3 г
Натрия хлорид	5 г
Дикалия гидрофосфат	2,5 г
Глюкоза моногидрат	2,5 г
Агар	15 г
Полисорбат 80	10 г
Вода	до 1000 мл

Полисорбат 80 добавляется к горячему раствору остальных ингредиентов после кипячения непосредственно перед доведением до объема.

Среда С

Пептон	6 г
Говяжий экстракт	1,5 г
Дрожжевой экстракт	3 г
Натрия хлорид	3,5 г
Глюкоза моногидрат	1 г
Дикалия гидрофосфат	3,68 г
Калия дигидрофосфат	1,32 г
Вода	до 1000 мл

Среда D

Экстракт сердца	1,5 г
Дрожжевой экстракт	1,5 г

Пептон-казеин	5 г
Глюкоза моногидрат	1 г
Натрия хлорид	3,5 г
Дикалия гидрофосфат	3,68 г
Калия дигидрофосфат	1,32 г
Калия нитрат	2 г
Вода	до 1000 мл

Среда Е

Пептон	5 г
Мясной экстракт	3 г
Динатрия гидрофосфат, $12\text{H}_2\text{O}$	26,9 г
Агар	10 г
Вода	до 1000 мл

Динатрия гидрофосфат добавляется в виде стерильного раствора после стерилизации среды.

Среда F

Пептон	9,4 г
Дрожжевой экстракт	4,7 г
Говяжий экстракт	2,4 г
Натрия хлорид	10,0 г
Глюкоза моногидрат	10,0 г
Агар	23,5 г
Вода	до 1000 мл

Среда G

Глицерин	10 г
Пептон	10 г
Мясной экстракт	10 г
Натрия хлорид	3 г
Агар	15 г
Вода	до 1000 мл

После стерилизации pH ($7,0 \pm 0,1$).

Среда H

Пептон	5,0 г
Агар	15,0 г
Говяжий экстракт, порошок	3,0 г
Вода	до 1000 мл

Доводят 0,1 М раствором натрия гидроксида до pH ($7,9 \pm 0,1$).

Кроме описанных выше сред могут использоваться следующие питательные среды:

Среда № 1

Мясо-пептонный бульон	1000 мл
Агар-агар	20 г

После стерилизации pH 7,1±0,1.

Среда № 2

Мясо-пептонный бульон	1000 мл

Агар-агар	20 г

После стерилизации pH (7,9±0,1).

Среда № 3

Мясо-пептонный бульон	1000 мл

Агар-агар	17 г

Глюкоза моногидрат	10 г

Натрия хлорид	5 г

После стерилизации pH (7,1±0,1).

Среда № 4

Раствор гидролизата мяса по Хоттингеру с содержанием аминного азота 350–400 мг/л (35–40 мг %)	1000 мл

Агар-агар	25 г

После стерилизации pH (6,1±0,1).

Среда № 5

Раствор гидролизата мяса по Хоттингеру с содержанием аминного азота 350–400 мг/л (35–40 мг %)	1000 мл

Агар-агар	25 г

После стерилизации pH (7,9±0,1).

Среда № 6

Раствор гидролизата мяса по Хоттингеру с содержанием аминного азота 1300–1400 мг/л (130–140 мг %)	1000 мл

Агар-агар	10–15 г

После стерилизации pH (6,9±0,1).

Среда № 7

Раствор гидролизата мяса по Хоттингеру с содержанием аминного азота 1300–1400 мг/л (130–140 мг %)	1000 мл

Агар-агар	10–12 г

Динатрия гидрофосфат, 12H ₂ O	3 г

После стерилизации pH (6,9±0,1).

Среда № 8

Раствор гидролизата мяса по Хоттингеру с содержанием аминного азота 1300–1400 мг/л (130–140 мг %)	1000 мл

Агар-агар	10–12 г

Динатрия гидрофосфат, 12H ₂ O	3 г

После стерилизации pH (7,9±0,1).

Среда № 9

Раствор гидролизата мяса по Хоттингеру с содержанием аминного азота 350–400 мг/л (35–40 мг %)	1000 мл

Агар-агар	15 г

Динатрия гидрофосфат, 12H ₂ O	3 г

После стерилизации pH (7,9±0,1).

Среда № 10

Раствор гидролизата мяса по Хоттингеру с содержанием аминного азота 1300–1400 мг/л (130–140 мг %) 1000 мл

Агар-агар 10–15 г

Калия дигидрофосфат 5 г

После стерилизации pH (6,1±0,1).

Среда № 11

Агар-агар 10–15 г

Динатрия гидрофосфат, 12H₂O 3 г

Вода дистиллированная до 1000 мл

После стерилизации pH (6,9±0,1).

Среда № 12

Агар-агар 15 г

Динатрия гидрофосфат, 12H₂O 3 г

Вода дистиллированная до 1000 мл

После стерилизации pH (7,9±0,1).

Среда № 13

Раствор гидролизата мяса по Хоттингеру с содержанием аминного азота 350–400 мг/л (35–40 мг %) 1000 мл

Агар-агар 20 г

Калия хлорид 20 г

После стерилизации pH (7,1±0,1).

Среда № 14

Раствор гидролизата мяса по Хоттингеру с содержанием аминного азота 350–400 мг/л (35–40 мг %) 1000 мл

Агар-агар 15 г

После стерилизации pH (7,9±0,1).

Среда № 15

Раствор гидролизата мяса по Хоттингеру с содержанием аминного азота 350–400 мг/л (35–40 мг %) 1000 мл

Агар-агар 15 г

Калия дигидрофосфат 25 г

После стерилизации pH (7,1±0,1).

Среда № 16

Агар-агар 18–20 г

Динатрия гидрофосфат, 12H₂O 5 г

Натрия хлорид 20 г

Аммония цитрат 5 г

Калия хлорид 20 г

Вода дистиллированная до 1000 мл

После стерилизации pH (5,9±0,1).

Среда № 17

Агар-агар	18 г
Глюкоза моногидрат	5 г
Динатрия гидрофосфат	15 г
Мочевина	2 г
Аммония хлорид	2 г
Вода дистиллированная	до 1000 мл
После стерилизации pH (7,9±0,1).	

Среда № 18

Раствор гидролизата мяса по Хоттингеру с содержанием аминного азота 1300–1400 мг/л (130–140 мг %)	1000 мл
Агар-агар	15–20 г
Глюкоза моногидрат	5 г
Натрия хлорид	30 г
После стерилизации pH (6,9±0,1).	

Среды стерилизуют насыщенным паром под давлением при 121 °С в течение 15 мин.

При приготовлении питательных сред вместо раствора гидролизата мяса по Хоттингеру можно использовать питательные среды на основе рыбного или мясо-пептонного бульона с таким же содержанием аминного азота.[#]

01/2013:20704

2.7.4. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФАКТОРА СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ VIII

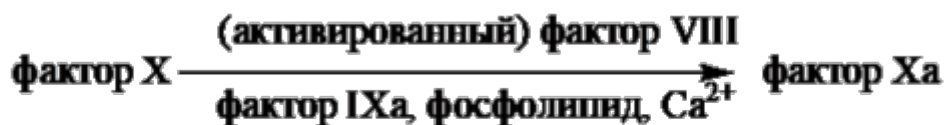
Количественное определение фактора свертывания крови VIII производят по его биологической активности в качестве кофактора активации фактора X активированным фактором IX (фактором IXa) в присутствии ионов кальция и фосфолипидов. Активность препарата фактора VIII оценивают путем сравнения количества, необходимого для достижения определенной скорости образования фактора Ха в испытуемой смеси, содержащей вещества, принимающие участие в активации фактора X, и количества Международного стандартного образца или стандартного образца, калиброванного в Международных Единицах, которое требуется для получения такой же скорости образования фактора Ха.

За Международную Единицу принимают активность фактора VIII в установленном количестве Международного стандартного образца, состоящего из лиофильно высушенного концентрата человеческого фактора свертывания крови VIII. Эквивалентность Международного стандартного образца в Международных Единицах устанавливается Всемирной организацией здравоохранения.

БСП человеческого фактора свертывания крови VIII калиброван в Международных Единицах в сравнении с Международным стандартным образцом.

Хромогенный метод количественного определения включает две последовательные стадии: зависящая от фактора VIII активация фактора X в реагенте факторов свертывания, состоящем из очищенных компонентов, и ферментативное расщепление хромогенного субстрата фактором Ха с образованием хромофора, который определяют спектрофотометрически. В соответствующих условиях испытания существует линейная зависимость между скоростью образования фактора Ха и концентрацией фактора VIII. Содержание метода количественного определения описывается следующей схемой:

1-я стадия



2-я стадия



В обеих стадиях используются реагенты, доступные из ряда коммерческих источников. Хотя в состав реагентов могут вноситься некоторые изменения, их основные свойства должны соответствовать нижеприведенным спецификациям. Отклонения от этого описания допустимы при условии, что с использованием Международного стандарта образца концентрата человеческого фактора свертывания крови VIII в качестве стандартного образца показано отсутствие существенных различий в результатах.

Необходимо подтвердить пригодность используемого набора путем проверки времени образования фактора Xa. При этом определяют время, необходимое для достижения 50 % от максимального количества образовавшегося фактора Xa.

РЕАГЕНТЫ

Реагент факторов коагуляции состоит из очищенных белков человеческого или говяжьего происхождения, включающих фактор X, фактор IXa и активатор фактора VIII, обычно тромбин. Эти белки частично очищены, обычно не менее чем до 50 %, и не содержат примесей, мешающих активации фактора VIII или фактора X. Тромбин может присутствовать в форме его предшественника – протромбина при условии, что его активация в реагенте протекает с достаточной скоростью для практически мгновенной и полной активации в эксперименте фактора VIII. Фосфолипиды могут быть получены из природных источников или синтетическим путем и должны состоять в существенной степени из фосфатидилсеринов. Компоненты реагента обычно разделяют не менее чем на два отдельных реагента, каждый из которых не обладает способностью самостоятельно генерировать фактор Xa. Один из реагентов содержит ионы кальция. После восстановления реагенты могут быть объединены при условии, что в отсутствие фактора VIII не происходит образования существенных количеств фактора Xa. В окончательной инкубационной смеси фактор VIII должен быть единственным компонентом, лимитирующим скорость.

Вторая стадия включает количественное определение образовавшегося фактора Xa с использованием специфичного в отношении фактора Xa хромогенного субстрата. Обычно он представляет собой производное короткого пептида, состоящего из 3–5 аминокислотных остатков, соединенное с хромофорной группой. При отщеплении этой группы от пептидного субстрата ее хромофорные свойства смещаются к длине волны, при которой становится возможным произвести спектрофотометрическое определение. Субстрат также может содержать подходящие ингибиторы для прекращения дальнейшего образования фактора Xa (такие как хелатообразующие агенты) и супрессирования активности тромбина.

МЕТОДИКА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Восстанавливают полное содержимое одной ампулы стандартного образца и испытуемого образца; используют немедленно. К восстановленным образцам прибавляют прерастворитель в количестве, достаточном для получения растворов с содержанием 0,5–2,0 МЕ/мл.

Прерастворитель представляет собой плазму, собранную у пациента, страдающего острой гемофилией А, или искусственно приготовленный реагент, содержащий достаточное количество фактора фон Виллебранда, который приводит к получению результатов, существенно не отличающихся от результатов, получаемых при использовании гемофилической плазмы. Полученные материалы предварительного

растворения должны быть стабильны в течение времени, необходимого для проведения количественного определения.

Готовят дальнейшие разведения испытуемого и стандартного образцов с использованием нехелатирующего и буферизированного необходимым образом раствора (например, трис(гидроксиметил)аминометан или имидазол), содержащего 1 % человеческого или бычьего альбумина. Готовят не менее трех отдельных, независимых разведений каждого препарата в не менее чем двух повторах. Разведения готовят таким образом, чтобы окончательная концентрация фактора VIII на стадии образования фактора Ха была ниже 0,01 МЕ/мл.

Готовят контрольный раствор, включающий все компоненты, кроме фактора VIII.

Все разведения готовят в пластиковых пробирках и используют незамедлительно.

1-я стадия. Предварительно нагретые разведения стандартного образца фактора VIII и испытуемого образца смешивают с соответствующим объемом предварительно нагретого реагента факторов свертывания крови или со смесью компонентов, его составляющих, и инкубируют смесь в пластиковых пробирках или ячейках планшета при температуре 37 °С. Активацию фактора X проводят в течение подходящего промежутка времени, предпочтительно прерывая реакцию (2-ая стадия) до достижения концентрацией фактора Ха 50 % от ее максимального уровня (плато) с целью получения удовлетворительной линейной зависимости отклика от дозы. Время активации выбирается также таким образом, чтобы достичь линейного во времени образования фактора Ха. Подходящие периоды активации обычно находятся в пределах от 2 мин до 5 мин.

2-я стадия. Активацию прерывают добавлением предварительно нагретого реагента, содержащего хромогенный субстрат. Проводят количественную оценку скорости расщепления субстрата, которая должна находиться в линейной зависимости от концентрации образовавшегося фактора Ха, измеряя изменение оптической плотности при соответствующей длине волны с помощью спектрофотометра. Оптическую плотность отслеживают постоянно, получая таким образом возможность вычислить начальную скорость расщепления субстрата, либо прерывают реакцию гидролиза по окончании подходящего промежутка времени путем понижения pH прибавлением подходящего реактива, например, 50 % (об/об) раствора уксусной кислоты или 1 М цитратного буферного раствора с pH 3. Время гидролиза регулируют с целью достижения линейного характера образования хромофора во времени. Подходящими обычно являются периоды гидролиза от 3 мин до 15 мин, но допускаются и другие значения при условии получения таким образом лучшей линейности зависимости отклика от дозы.

Активность испытуемого образца рассчитывают с использованием обычных статистических методов (например, 5.3).

01/2013:20705

2.7.5. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕПАРИНА

Антикоагулянтную активность гепарина определяют *in vitro* путем сравнения его способности в заданных условиях замедлять свертывание обогащенной кальцием и цитратом овечьей плазмы с аналогичной способностью стандартного образца гепарина, калиброванного в Международных Единицах.

Международная Единица (МЕ) – активность, проявляемая установленным количеством Международного стандартного образца, состоящего из лиофильно высушенного гепарина натрия, полученного из слизистой оболочки кишечника свиньи. Эквивалент Международного стандартного образца в МЕ устанавливается Всемирной организацией здравоохранения.

БСП гепарина натрия откалиброван в МЕ по сравнению с Международным стандартным образцом с использованием изложенной ниже методики количественного определения.

Количественное определение выполняют одним из следующих методов установления начала свертывания с использованием пробирок и другого оборудования, соответствующего выбранному методу:

- а) прямое визуальное наблюдение, предпочтительно в отраженном свете на черном матовом фоне;
- б) спектрофотометрическая регистрация изменения оптической плотности при длине волны около 600 нм;
- с) визуальная фиксация изменения текучести путем опрокидывания пробирок;
- д) механическая запись изменения текучести, определяемого по перемешиванию, с соблюдением мер предосторожности, направленных на минимизацию возмущений раствора в начальной стадии свертывания.

МЕТОДИКА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Приведенные в тексте объемы являются примерными и могут быть адаптированы к используемой аппаратуре при условии соблюдения соотношений между различными объемами.

БСП гепарина натрия разводят раствором 9 г/л натрия хлорида *P* до получения точно известного количества МЕ в миллилитре и готовят аналогичный раствор испытуемого образца, для которого ожидается такая же активность. Используя раствор 9 г/л натрия хлорида *P*, из каждого раствора готовят ряд разведений в геометрической прогрессии так, чтобы время свертывания, получаемое для низшей концентрации, не менее чем в 1,5 раза превышало время в контрольном опыте [#](время рекальцификации)[#], а время свертывания, получаемое для высшей концентрации, находилось в пределах удовлетворительной логарифмической кривой зависимости доза/эффект, построенной в ходе предварительного испытания.

Помещают двенадцать пробирок в ледяную баню, маркируя их в дубликатах следующим образом: *T*₁, *T*₂ и *T*₃ для разведений испытуемого образца и *S*₁, *S*₂ и *S*₃ для разведений стандартного образца. В каждую из пробирок помещают по 1,0 мл размороженного субстрата плазмы *P1* и 1,0 мл соответствующего разведения испытуемого образца или стандартного образца. После каждого из добавлений производят перемешивание, не допуская образования пузырьков.

Пробирки обрабатывают в порядке: *S*₁, *S*₂, *S*₃, *T*₁, *T*₂, *T*₃, при этом каждую из пробирок помещают в водяную баню, выдерживают при температуре 37 °С в течение около 15 мин и прибавляют к каждой из них по 1 мл подходящего АЧТВ (активированное частичное тромбопластиновое время, *Activated Partial Thromboplastin Time – APTT*) реагента, содержащего фосфолипидный и контактный активаторы, в таком разведении, чтобы время контрольного опыта [#](время рекальцификации)[#] было подходящим и не превышало 60 с.

Ровно через 2 мин прибавляют 1 мл раствора 3,7 г/л кальция хлорида *P*, предварительно нагретого до температуры 37 °С, и регистрируют в качестве времени свертывания интервал в секундах между последним прибавлением и началом свертывания, определяемым с помощью выбранного метода. В начале и в конце процедуры аналогичным образом определяют время контрольного опыта, используя вместо одного из разведений гепарина 1 мл раствора 9 г/л натрия хлорида *P*; два полученных контрольных значения не должны существенно различаться.

Время свертывания переводят в логарифмы, используя средние значения для дубликатов. Процедуру повторяют со свежими разведениями, проводя обработку пробирок в порядке: *T*₁, *T*₂, *T*₃, *S*₁, *S*₂, *S*₃. Результаты рассчитывают с использованием обычных статистических методов (5.3).

Проводят не менее трех независимых определений. Для каждого из таких определений готовят свежие растворы стандартного и испытуемого образцов и используют новую свежеразмороженную порцию субстрата плазмы.

Активность испытуемого образца рассчитывают путем комбинирования результатов этих определений с использованием обычных статистических методов (5.3). Если отклонение, вызванное различиями между результатами определений, является достоверным при *P* = 0,01, комбинированная оценка активности может быть получена путем расчета простого среднего значения определенной активности.

#МЕТОДИКА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПО РЕАКЦИИ АНТИКОАГУЛЯЦИИ

Количественное определение гепарина в фармацевтических субстанциях и готовых лекарственных средствах может быть выполнено с использованием реакции антикоагуляции следующим методом.

Антикоагулянтная активность. Определение активности гепарина проводят биологическим методом по способности его задерживать свертывание бараньей или бычьей плазмы путем сопоставления активности испытуемого образца с активностью стандартного образца гепарина.

В два ряда тщательно вымытых и высушенных пробирок вносят возрастающее количество рабочих растворов стандартного образца гепарина, испытуемого образца и раствора 9 г/л натрия хлорида P в количествах, указанных в таблице #2.7.5.-1. Затем в каждую пробирку прибавляют по 1 мл плазмы, 0,2 мл раствора 10 г/л кальция хлорида безводного P (попеременно в пробирки из ряда с раствором стандартного образца гепарина и испытуемого образца), осторожно перемешивают содержимое поворачиванием и легким встряхиванием, не допуская образования пузырей. Отмечают время и оставляют при комнатной температуре (или в термостате при температуре $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$) на 1 ч. По истечении указанного времени определяют состояние плазмы в каждой пробирке и отмечают в каждом ряду крайнюю слева пробирку, в которой не произошло полное свертывание плазмы. Эти пробирки содержат наименьшие объемы растворов стандартного образца гепарина и испытуемого образца, которые задерживают свертывание плазмы.

Степень свертывания (0,2; 0,4; 0,6; 0,8) между нулем и полным свертыванием (1,0) определяется визуально.

Таблица #2.7.5.-1

Наименование раствора	Порядок внесения раствора										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Раствор гепарина, мл	0,30	0,35	0,40	0,45	0,50	0,55	0,60	0,65	0,70	0,75	0,80
Раствор 9 г/л натрия хлорида P , мл	0,50	0,45	0,40	0,35	0,30	0,25	0,20	0,15	0,10	0,05	—

Антикоагулянтную активность испытуемого образца, рассчитывают по формуле:

$$\frac{V_1 - (V_1^* - V_1) \cdot \alpha_1}{V_2 - (V_2^* - V_2) \cdot \alpha_2} \cdot A,$$

где:

V_1 — объем раствора стандартного образца гепарина, содержащийся в крайней левой пробирке, в которой не произошло полное свертывание плазмы, в миллилитрах;

V_2 — объем раствора испытуемого образца гепарина, содержащийся в крайней левой пробирке, в которой не произошло полное свертывание плазмы, в миллилитрах;

V_1^* — объем раствора стандартного образца гепарина, содержащийся в крайней левой пробирке, в которой произошло полное свертывание плазмы, в миллилитрах;

V_2^* — объем раствора испытуемого образца гепарина, содержащийся в крайней левой пробирке, в которой произошло полное свертывание плазмы, в миллилитрах;

α_1 — степень свертываемости стандартного образца;

α_2 — степень свертываемости испытуемого образца;

A — предполагаемая активность гепарина в 1 г испытуемого образца.

Определение проводят не менее 3 раз, используя среднее значение из трех определений.

Приготовление раствора 80 г/л натрия цитрата. 8,0 г *натрия цитрата Р* растворяют в 70 мл *воды Р* и доводят до объема 100,0 мл этим же растворителем. Раствор используют свежеприготовленным.

Приготовление раствора 10 г/л кальция хлорида. 1,0 г *кальция хлорида безводного Р* растворяют в 70 мл *воды Р* и доводят до объема 100,0 мл этим же растворителем. Хранят при температуре от 0 °С до 4 °С в течение 1 мес.

Приготовление плазмы. Кровь, вытекающую из сосудов убойного животного (крупного рогатого скота или баранов), собирают в банки из полиэтилена вместимостью 1 л, содержащие 25–30 мл раствора 80 г/л *натрия цитрата Р*. Кровь осторожно смешивают с раствором 80 г/л *натрия цитрата Р*, поворачивая банку, и как можно быстрее центрифугируют при 2500 об/мин в течение 30 мин, после чего отбирают плазму.

Перед использованием плазму размораживают на водяной бане или термостате при температуре (37±0,5) °С. Затем фильтруют через марлю, проверяют время ее свертывания и определяют оптимальное количество кальция хлорида, необходимое для определения активности, для чего: в 5 пробирок с 1 мл плазмы в каждой прибавляют возрастающие количества раствора 10 г/л *кальция хлорида Р* (0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,10 мл) и осторожно смешивают. Для опыта используют плазму, время свертывания которой не превышает 10 мин и то оптимальное количество кальция хлорида, которое вызывает полное свертывание плазмы в указанное время. Найденное оптимальное количество кальция хлорида должно содержаться в 0,2 мл рабочего раствора (этот раствор готовят разведением раствора 10 г/л *кальция хлорида Р*). Хранят при температуре от –10 °С до –20 °С в течение 1 года.

Допускается использование лиофилизированной плазмы, разведенной в соответствии с инструкцией производителя.

Приготовление раствора рабочего стандартного образца гепарина. Навеску рабочего стандартного образца гепарина, откалиброванного по *БСП гепарина натрия*, растворяют в растворе 9 г/л *натрия хлорида Р* с таким расчетом, чтобы в 1 мл раствора содержалось 50 ЕД гепарина натрия. Хранят при температуре от 0 °С до 4 °С в течение 6 мес. Для определения активности гепарина в фармацевтической субстанции в качестве стандартного образца используют *БСП гепарина натрия*.

Из полученного раствора готовят растворы, содержащие в 1 мл 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 ЕД гепарина натрия. По 0,5 мл и 0,72 мл полученных растворов помещают в пробирки, доводят объем в пробирке до 0,8 мл раствором 9 г/л *натрия хлорида Р*.

Прибавляют в каждый раствор по 1 мл плазмы и 0,2 мл раствора кальция хлорида с оптимальной концентрацией и перемешивают.

Через 1 ч определяют состояние плазмы в каждой пробирке и устанавливают активность рабочего стандартного образца гепарина, при которой в пробирке, содержащей 0,5 мл раствора гепарина, происходит полное свертывание плазмы, а в другой пробирке, содержащей 0,72 мл этого раствора гепарина, плазма не свернулась. Выбранная активность обеспечивает наблюдение за влиянием испытуемого рабочего стандартного образца гепарина на свертывание плазмы по истечении часа. Обычно эта активность находится в пределах 1–1,5 ЕД для плазмы крупного рогатого скота и 1–3,5 ЕД для плазмы барана.

Приготовление раствора испытуемого образца гепарина. Навеску испытуемого образца растворяют в растворе 9 г/л *натрия хлорида Р*, исходя из его предполагаемой активности с таким расчетом, чтобы 1 мл полученного раствора содержал столько же ЕД гепарина, сколько содержит 1 мл рабочего стандартного образца гепарина натрия. Раствор используют свежеприготовленным.

При необходимости допускается сдвигать ряд пробирок, указанный в таблице #2.7.5.-1, в сторону уменьшения концентрации раствора гепарина.

01/2013:20706

Активность дифтерийной вакцины определяется путем назначения вакцины морским свинкам с последующей провокацией дифтерийным токсином (методы А или В) или путем определения титра антител против дифтерийного токсина или анатоксина в сыворотке крови морских свинок (метод С). В обоих случаях активность вакцины рассчитывается по сравнению со стандартным образцом, калиброванным в Международных Единицах.

За Международную Единицу принимают активность в установленном количестве Международного стандартного образца, состоящего из дифтерийного анатоксина, адсорбированного на гидроксиде алюминия. Эквивалентность Международного стандартного образца в Международных Единицах устанавливается Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ). *БСП адсорбированной дифтерийной вакцины* может использоваться в качестве стандартного образца (образца сравнения).

Выбор метода исследования адсорбированной дифтерийной вакцины зависит от предполагаемой цели.

Методы А или В применяются:

1) в процессе разработки вакцины при количественном определении на сериях продукта, произведенных для валидации производственного процесса;

2) в любом случае необходимости ревалидации (при значительных изменениях производственного процесса).

Метод А или В может также использоваться для рутинной проверки серий вакцины, но в интересах защиты животных, по возможности, следует использовать метод С.

Метод С может использоваться за исключением случаев, описанных в пунктах 1 и 2, после валидации его для конкретного продукта. Для этой цели подходящее количество серий (обычно 3) испытываются методом С и методом А или В.

Если различные вакцины (моновалентные или комбинированные) приготовлены из дифтерийного анатоксина одного и того же происхождения и содержат сопоставимые уровни анатоксина (выраженные $Lf/мл$), валидация, проведенная для лекарственного средства с максимальным количеством компонентов, распространяется на комбинированные лекарственные средства с меньшим числом компонентов и на моновакцины. Любые комбинированные лекарственные средства, содержащие цельноклеточную коклюшную вакцину или конъюгированную вакцину против *Haemophilus B* и дифтерийный анатоксин или дифтерийный белок CRM 197 в одном флаконе, должны исследоваться отдельно.

Для комбинированных лекарственных средств, содержащих дифтерийный и столбнячный анатоксины, серологический тест (метод С) может быть проведен на группе животных, использовавшихся для количественного определения адсорбированной столбнячной вакцины (2.7.8), если общие условия иммунизации для дифтерийного и столбнячного компонентов (доза, продолжительность) валидированы для комбинированного лекарственного средства.

Дизайн описанных ниже исследований использует множественные серийные разведения испытуемых и стандартных образцов. При накоплении определенного опыта работы с методом определения на конкретной вакцине возможен переход на упрощенную схему исследования одного разведения испытуемого и стандартного образцов. Такая схема позволяет установить факт существенного превышения активности испытуемого образца минимально допустимого уровня, но не дает информации о линейности, параллелизме и других параметрах зависимости доза/эффект. Упрощенная схема позволяет значительно сократить потребность в экспериментальных животных и должна приниматься во внимание любой лабораторией в соответствии с положениями Европейской Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей.

В случае перехода на упрощенную схему испытаний соответствие метода тестирования следует постоянно мониторировать по подходящим индикаторам, а также путем периодической постановки теста с множественными серийными разведениями (каждые 2 года). Для серологического теста подходящими индикаторами для мониторинга являются:

– среднее значение и стандартное отклонение относительных титров антитоксина или индексов сывороток, полученных после назначения фиксированных доз стандартного образца вакцины;

- титры антитоксинов или индексы рабочих контролей (положительные или отрицательные образцы сыворотки);
- соотношение титров антитоксина или индекса положительной контрольной сыворотки и образцов сыворотки, соответствующих стандартному образцу вакцины.

МЕТОД А: ВНУТРИКОЖНЫЙ ПРОВОКАЦИОННЫЙ ТЕСТ НА МОРСКИХ СВИНКАХ

ОТБОР И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

Используют здоровых белых морских свинок из одной партии; их размер должен быть достаточным для проведения назначенного количества тестов; разница в массе между наиболее тяжелым и легким животным не должна превышать 100 г. Следует использовать животных одного пола; в противном случае самцов и самок необходимо равномерно распределить между группами. Животных распределяют не менее чем на 6 равных групп. Число животных в группе должно быть достаточным для получения достоверных результатов в ходе описанных ниже испытаний. Если токсин, используемый для провокации, предварительно не валидирован на стабильность или не стандартизирован, следует создать группу из 5 животных в качестве невакцинированного контроля.

ВЫБОР ПРОВОКАЦИОННОГО ТОКСИНА

Следует выбрать стандартный образец токсина, содержащий от 67 до 133 $Lr/100$ в 1 Lf и от 25 000 до 50 000 минимальных доз, вызывающих реакцию на коже морских свинок в 1 Lf . Если стабильность токсина подтверждена предварительно, нет необходимости определять его активность для каждого испытания.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРА ТОКСИНА

Непосредственно перед использованием разводят токсин подходящим растворителем до концентрации 0,0512 Lf в 0,2 мл. Далее готовят серию пятикратных разведений (0,0128, 0,0032, 0,0008, 0,0002 и 0,00005 Lf в 0,2 мл).

РАЗВЕДЕНИЕ ИСПЫТУЕМЫХ И СТАНДАРТНЫХ ОБРАЗЦОВ

С помощью раствора 9 г/л натрия хлорида R готовят разведения испытуемой вакцины и стандартного образца таким образом, чтобы шаг разведения в серии был не более 2,5-кратным, а внутрикожная инъекция промежуточных разведений морской свинке в дозе 1,0 мл приводила бы к индексу 3 при постановке провокационного теста.

ИММУНИЗАЦИЯ И ПРОВОКАЦИЯ

Назначают по одному разведению одной группе морских свинок и вводят подкожно по 1,0 мл разведения каждой морской свинке в группе. Спустя 28 дней каждой свинке выбривают оба бока и вводят внутрикожно по 0,2 мл каждого из 6 разведений токсина в 6 различных мест на коже животного так, чтобы минимизировать влияние соседних инъекций.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПРОВОКАЦИОННОГО ТОКСИНА

При необходимости вводят невакцинированным контрольным животным разведения токсина, содержащие 80, 40, 20, 10 и $5 \cdot 10^{-6}$ Lf .

ПОЛУЧЕНИЕ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Все места инъекций обследуют через 48 часов и записывают наличие специфической дифтерийной эритемы. Записывают также число мест инъекций без реакции (внутрикожный провокационный индекс, ВПИ). Сводят в таблицу внутрикожные провокационные индексы всех животных, получивших одинаковое разведение вакцины, и производят преобразование данных: $(ВПИ)^2$ или $\arcsin ((ВПИ/6)^2)$ для расчета относительной активности каждого испытуемого образца с применением параллельного количественного определения.

ТРЕБОВАНИЯ К ДОСТОВЕРНОСТИ ИСПЫТАНИЯ

Тест является достоверным, если:

- испытуемый и стандартный образцы дают при введении минимальной дозы средний индекс менее 3, а при введении максимальной дозы – более 3;
- разведение токсина $40 \cdot 10^{-6}$ Lf вызывает дифтерийную эритему не менее чем у 80 % контрольных животных, а разведение токсина $20 \cdot 10^{-6}$ Lf – менее чем у 80 % (если это требование не выполняется, следует применить другой провокационный токсин);
- границы доверительного интервала ($P = 0,95$) составляют не менее 50 % и не более 200 % установленной активности;
- статистический анализ подтверждает отсутствие отклонений в линейности и параллелизме.

Тест можно повторить, однако в случае проведения более одного испытания результаты всех достоверных испытаний должны учитываться для определения активности.

МЕТОД В: ЛЕТАЛЬНЫЙ ПРОВОКАЦИОННЫЙ ТЕСТ НА МОРСКИХ СВИНКАХ

ОТБОР И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

Используют здоровых морских свинок из одной партии весом 250–350 г. Следует использовать животных одного пола; в противном случае самцов и самок необходимо равномерно распределить между группами. Животных распределяют в 6 равных групп. Число животных в группе должно быть достаточным для получения достоверных результатов в ходе описанных ниже испытаний. Если токсин, используемый для провокации предварительно не валидирован на стабильность или не стандартизирован, следует создать 4 дополнительные группы по 5 животных в качестве невакцинированного контроля.

ВЫБОР ПРОВОКАЦИОННОГО ТОКСИНА

Выбирают стандарт дифтерийного токсина, содержащий не менее 100 LD₅₀/мл. Если стабильность токсина подтверждена предварительно, нет необходимости определять летальную дозу для каждого исследования.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАЗВЕДЕНИЙ ПРОВОКАЦИОННОГО ТОКСИНА

Непосредственно перед использованием разводят токсин подходящим растворителем до концентрации 100 LD₅₀/мл. При необходимости выполняют разведения токсина 1:32, 1:100 и 1:320.

РАЗВЕДЕНИЕ ИСПЫТУЕМЫХ И СТАНДАРТНЫХ ОБРАЗЦОВ

С помощью раствора 9 г/л натрия хлорида *P* готовят разведения испытуемой вакцины и стандартного образца таким образом, чтобы шаг разведения в серии был не более 2,5-кратного, а подкожная инъекция промежуточных разведений морской свинке в дозе 1 мл защищала бы 50 % животных от летального действия определенного количества дифтерийного токсина, установленного для данного теста.

ИММУНИЗАЦИЯ И ПРОВОКАЦИЯ

Назначают по одному разведению одной группе морских свинок и вводят подкожно по 1 мл разведения каждой морской свинке в группе. Спустя 28 дней каждой свинке вводят подкожно по 1 мл раствора токсина (100 LD₅₀).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПРОВОКАЦИОННОГО ТОКСИНА

При необходимости назначают рабочее разведение провокационного токсина и три разведения, приготовленных из него, одной из 4 групп (по 5 животных) невакцинированных животных и вводят по 1 мл соответствующего разведения каждой свинке в группе.

УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Считают число выживших животных спустя 4 дня после инъекции токсина. Рассчитывают активность испытуемой вакцины по отношению к активности стандартного образца на основании пропорции выживших животных в каждой группе вакцинированных морских свинок с применением обычных статистических методов (5.3).

ТРЕБОВАНИЯ К ДОСТОВЕРНОСТИ ТЕСТА

Тест является достоверным, если:

- для испытуемого и стандартного образцов 50 % протективная (защищающая) доза определяется между минимальной и максимальной дозами образцов, введенных морским свинкам;
- количество погибших животных в 4 невакцинированных группах после введения рабочего раствора токсина и 3 его разведений указывает на то, что введенная доза токсина составляет около 100 LD_{50} ;
- границы доверительного интервала ($P = 0,95$) составляют не менее 50 % и не более 200 % установленной активности;
- статистический анализ подтверждает отсутствие отклонений в линейности и параллелизме.

Тест можно повторить, однако в случае проведения более одного теста результаты всех достоверных тестов должны учитываться для определения активности.

МЕТОД С: ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИТЕЛ У МОРСКИХ СВИНОК

ОТБОР И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

Используют здоровых морских свинок из одной партии с массой тела 250–350 г. Следует использовать животных одного пола; в противном случае самцов и самок необходимо равномерно распределить между группами. Животных распределяют не менее чем на 6 равных групп. Число животных в группе должно быть достаточным для получения достоверных результатов в ходе описанных ниже испытаний. Для получения негативной контрольной сыворотки используют дополнительную группу животных того же происхождения. При условии валидации может быть применена референсная отрицательная контрольная сыворотка.

СТАНДАРТНЫЙ ОБРАЗЕЦ

Используют подходящий стандартный образец, например, *БСП адсорбированной дифтерийной вакцины, серию вакцины с доказанной клинической эффективностью* или другую репрезентативную серию, активность которой измерена в Международных Единицах по сравнению с *БСП адсорбированной дифтерийной вакцины* или Международным стандартным образцом адсорбированного дифтерийного анатоксина.

РАЗВЕДЕНИЕ ИСПЫТУЕМЫХ И СТАНДАРТНЫХ ОБРАЗЦОВ

Готовят серийные разведения испытуемой вакцины и стандартного образца на растворе 9 г/л *натрия хлорида Р*; разведения выполняют с 2,5–5-кратным шагом. Следует приготовить не менее трех разведений, например 0,5–16 МЕ/мл для стандартного образца вакцины и 1:2–1:125 для испытуемой вакцины. Следует использовать разведения для иммунизации не позже 1 часа с момента приготовления. Одно разведение вводят одной группе свинок.

ИММУНИЗАЦИЯ

Каждой свинке вводят подкожно 1,0 мл разведения, предназначенного для данной группы животных.

ЗАБОР КРОВИ

Через 35–42 дня после иммунизации подходящим методом берут образцы крови у каждого вакцинированного и контрольного животного.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ СЫВОРОТКИ

Следует избегать повторного замораживания/оттаивания образцов сыворотки. Для предотвращения микробной контаминации образцов все манипуляции лучше производить в ламинарном боксе.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИТРА АНТИТЕЛ

Определяют титры или индексы для каждого образца сыворотки с помощью подходящего иммунохимического метода (2.7.1). Методы, приведенные ниже, (иммуноферментный анализ – тИФА (*enzyme-linked immunosorbent assay* – *ELISA*) и *Vero*-тест) признаны подходящими.

РАСЧЕТ АКТИВНОСТИ

Активность испытуемой вакцины в МЕ относительно стандартного образца рассчитывают, используя обычные методы статистики (например, 5.3).

ТРЕБОВАНИЯ К ДОСТОВЕРНОСТИ ТЕСТА

Тест является достоверным, если:

- границы доверительного интервала ($P = 0,95$) составляют не менее 50 % и не более 200 % установленной активности;

- статистический анализ показывает значительный наклон и отсутствие отклонений в линейности и параллелизме графика зависимости доза-ответ (в главе 5.3 описаны возможные альтернативы при получении значительных отклонений в линейности).

Тест может быть проведен повторно, при этом при проведении более одного теста для расчета активности используют объединенные результаты всех достоверных испытаний.

Следующий раздел приводится для информации.

Руководство по исследованию адсорбированной дифтерийной вакцины

МЕТОД С: ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИТЕЛ У МОРСКИХ СВИНОК

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ СЫВОРОТКИ

Следующая методика пригодна для приготовления образца сыворотки. Переворачивают пробирку с образцом крови 6 раз и выдерживают при температуре 37 °С в течение 2 ч, затем при температуре 4 °С в течение 2 ч. Центрифугируют при комнатной температуре с ускорением 800 g в течение 20 мин. Сыворотку переносят в стерильные пробирки и хранят при температуре –20 °С. Данная методика позволяет получить на выходе не менее 40 % сыворотки.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИТРА АНТИТЕЛ

тИФА (*ELISA*) и *Vero*-тест, приведенные ниже, являются примером иммунохимических методов, признанных подходящими для определения титра антител.

Определение титра антител в сыворотке морской свинки с помощью иммуноферментного анализа (тИФА (*ELISA*)). В лунки планшета для тИФА с адсорбированным дифтерийным анатоксином вносят разведения испытуемой и референсной сывороток. Положительную и отрицательную контрольные сыворотки морской свинки включают в каждую постановку для контроля работы системы. Далее добавляют конъюгированные с пероксидазой антитела кролика или козы против IgG морской свинки, после чего вносят субстрат. Измеряют оптическую плотность и рассчитывают относительный титр антител, используя обычные методы статистики (например, 5.3).

Реактивы и оборудование:

- планшеты для тИФА: 96 лунок, колонки 1–12, строки А–Н;

- противодифтерийная антисыворотка морской свинки (положительная контрольная сыворотка), полученная при иммунизации морских свинок БСП дифтерийной адсорбированной вакцины;

– конъюгат пероксидазы: конъюгированные с пероксидазой хрена кроличьи или козы антитела против IgG морской свинки;

– дифтерийный анатоксин;

– карбонатный буферный раствор для сорбции антигена pH 9,6. 1,59 г натрия карбоната безводного *P* и 2,93 г натрия гидрокарбоната *P* растворяют в 1000 мл воды *P*. Разливают в бутылки по 150 мл и стерилизуют автоклавированием при температуре 121 °C в течение 15 мин;

– забуференный солевой раствор pH 7,4 (ЗСР). 80,0 г натрия хлорида *P*, 2,0 г калия дигидрофосфата *P*, 14,3 г динатрия гидрофосфата дигидрата *P* и 2,0 г калия хлорида *P* растворяют в 1000 мл воды *P*. Хранят при комнатной температуре для предотвращения кристаллизации. Перед использованием разводят в 10 раз водой *P*;

– раствор кислоты лимонной. 10,51 г кислоты лимонной *P* растворяют в 1000 мл воды *P* и доводят до значения pH 4,0 раствором 400 г/л натрия гидроксида *P*;

– промывочный буферный раствор. ЗСР, содержащий 0,5 г/л полисорбата 20 *P*;

– блокирующий буферный раствор. ЗСР, содержащий 0,5 г/л полисорбата 20 *P* и 25 г/л высушенного обезжиренного молока;

– субстратный раствор. Незадолго до использования 10 мг диаммоний 2,2-азинобис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоната) *P* (ABTS) растворяют в 20 мл раствора кислоты лимонной. Немедленно перед использованием прибавляют 5 мкл концентрированного раствора водорода пероксида *P*.

Методика

Ниже приведен пример подходящей раскладки образцов и контролей. Лунки ряда 1А–Н используют для отрицательной контрольной сыворотки, лунки рядов 2А–Н и 12А–Н – для положительной контрольной сыворотки для мониторинга количественного определения. Лунки рядов 3–11А–Н используют для испытуемых образцов.

Покрывают лунки планшета для тИФА 100 мкл раствора дифтерийного анатоксина (0,5 Лf/мл в карбонатном буферном растворе для сорбции антигена pH 9,6). Планшет оставляют на ночь при температуре 4 °C во влажной камере. Чтобы избежать эффекта температурного градиента, не следует складывать в стопку больше 4 пластин.

На следующий день пластины тщательно отмывают промывочным буферным раствором. Планшеты блокируют прибавлением 100 мкл блокирующего буферного раствора в каждую лунку. Инкубируют во влажной камере при температуре 37 °C в течение 1 ч. Отмывают планшеты промывочным буферным раствором.

Вносят по 100 мкл блокирующего буферного раствора во все лунки за исключением ряда А. Готовят подходящие разведения отрицательной и положительной контрольных сывороток (приблизительно от 0,01 МЕ/мл) и испытуемых сывороток. Располагают сыворотки в соответствии с раскладкой теста: отрицательную контрольную сыворотку для ряда 1, положительную контрольную сыворотку для рядов 2 и 12 и испытуемые сыворотки для рядов 3–11 и прибавляют по 100 мкл из каждой сыворотки в первые две лунки соответствующих рядов. Используя многоканальную микропипетку, делают двойные последовательные разведения от ряда В к ряду Н. Удаляют 100 мкл из лунок последнего ряда так, чтобы все лунки содержали по 100 мкл. Инкубируют при температуре 37 °C в течение 2 ч. Отмывают промывочным буферным раствором.

Готовят подходящее разведение (например, 2000-кратное) конъюгата пероксидазы в блокирующем буферном растворе и прибавляют по 100 мкл в каждую лунку. Инкубируют при температуре 37 °C во влажной камере в течение 1 ч. Отмывают планшет промывочным буферным раствором.

Прибавляют по 100 мкл субстратного раствора в каждую лунку. Инкубируют при комнатной температуре в темноте в течение 30 мин.

Учитывают реакцию на ридере при длине волны 405 нм в том же порядке, как прибавляли субстрат.

Определение титра антител в сыворотке морской свинки с помощью Vero-теста. Метод основан на регистрации угнетения метаболизма (1) или цитотоксичности (2) в качестве конечного эффекта. Регистрация может быть выполнена путем микроскопии клеток (определение клеточной морфологии) или макроскопически (по изменению цвета).

Предел определения специфичен для каждого антитоксина и обычно составляет 0,015 МЕ/мл для метода 1 и 0,05 МЕ/мл для метода 2.

Конечная точка метода может быть определена как максимальное разведение сыворотки, которое защищает клетки от дифтерийного токсина. Активность антитоксина рассчитывается по сравнению с референсной сывороткой морской свинки или стандартным образцом ВОЗ и выражается в МЕ/мл.

Реактивы и оборудование:

- плоскодонные планшеты для культур клеток: 96 лунок, колонки 1–12, строки А–Н;
- флаконы для культур клеток 75 см²;
- дифтерийный токсин;
- противодифтерийная антисыворотка морской свинки (положительная контрольная сыворотка), полученная при иммунизации морских свинок БСП дифтерийной адсорбированной вакцины;
- культура клеток *Vero* (клетки почки африканской зеленой мартышки). Для постановки теста пригодны пассажи П2–П15.

Метод 1

Дифтерийный токсин оказывает цитопатическое действие (ЦПД) на клетки *Vero* и их лизис. Антитела против токсина могут нейтрализовать указанное ЦПД. Следовательно, активность дифтерийной вакцины можно определить с помощью описанной культуральной клеточной системы, если добавлять в культуру различные разведения сыворотки от иммунизированных животных и фиксированное количество токсина. При проведении *Vero*-теста желтый цвет среды указывает, что клетки живые; красный – что клетки погибли. В случае гибели части клеток цвет среды может быть оранжевым.

Реактивы и оборудование:

- модифицированная среда МОС (MEM): минимальная основная среда (МОС, *Minimum Essential Medium* – MEM) на растворе Эрла (*Earle*) без глутамина и бикарбоната натрия;
- модифицированная среда 199: среда 199 на растворе Хэнкса (*Hanks*) с глутамином и без бикарбоната натрия;
- эмбриональная телячья сыворотка;
- 7,5 % раствор натрия бикарбоната;
- раствор трипсина: 2,5 % раствор трипсина;
- раствор ЭДТА: 0,02 % раствор ЭДТА (раствор Версена (*Versene*) 1:5000);
- модифицированный Д-ФБСР (*D-PBS*): фосфатный буферный солевой раствор Дюльбекко (Д-ФБСР, *Dulbecco's phosphate buffered saline* – *D-PBS*) без кальция или магния;
- 200 мМ раствор L-глутамин;
- раствор пенициллин/стрептомицина;
- среда для первичной культуры: к 50 мл модифицированной среды МОС (MEM) прибавляют 440 мл воды Р, 5 мл 200 мМ раствора L-глутамин и 10 мл 7,5 % раствора натрия бикарбоната. К 25 мл полученной среды прибавляют 1,25 мл эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС);
- поддерживающая среда: готовится, как среда для первичной культуры, но к 20 мл обогащенной среды МОС (MEM) прибавляют 0,5 мл ЭТС вместо 1,25 мл;
- среда А: к 50 мл модифицированной среды 199 прибавляют 440 мл воды Р, 5 мл 200 мМ раствора L-глутамин и 10 мл 7,5 % раствора натрия бикарбоната;
- среда В: к 150 мл среды А прибавляют 3 мл эмбриональной телячьей сыворотки и 0,3 мл раствора пенициллин/стрептомицина;
- среда С: к 22 мл среды А прибавляют 0,44 мл эмбриональной телячьей сыворотки и 0,44 мл раствора пенициллин/стрептомицина.

Клетки *Vero* культивируют в культуральных флаконах (75 см²/250 мл) в термостате при температуре (36±1) °С в атмосфере с 5 % содержанием СО₂ при относительной влажности 90 %. Сначала клетки культивируют в среде для первичной культуры. После 2–3 дней роста среду для первичной культуры заменяют на поддерживающую. После получения монослоя питательную среду удаляют и аккуратно отмывают клетки модифицированным Д-ФБСР (*D-PBS*). Прибавляют смесь из 1 объема раствора трипсина и 1 объема раствора ЭДТА во флакон. Флакон слегка встряхивают и инкубируют около 3 мин

в термостате (до отлипания клеток от субстрата). Сильно встряхивают флакон для открепления клеток. Ресуспендируют клетки в 5–6 мл свежей среды С до получения гомогенной суспензии. Готовят суспензию клеток в среде С с концентрацией $1 \cdot 10^5$ клеток/мл.

Вносят по 25 мкл среды В в каждую лунку планшета кроме колонки 1. Вносят по 25 мкл антисыворотки морской свинки (положительная контрольная сыворотка, рабочее разведение в среде В – 0,40 МЕ/мл) в лунки А1, А2 и А11. Вносят по 25 мкл испытуемых сывороток в лунки В–С колонок 1, 2 и 11. Вносят по 25 мкл отрицательной контрольной сыворотки в лунки ряда Н колонок 1, 2 и 11. Многоканальной микропипеткой делают двукратные серийные разведения колонок 2–10 для рядов А–С и 2–8 для ряда Н. Удаляют по 25 мкл из лунок колонки 10 для рядов А–С и лунки колонки 8 ряд Н.

Дифтерийный токсин разводят физиологическим раствором до получения концентрации 50 МЕ/мл. Готовят 50-кратное разведение токсина в среде В для получения рабочего раствора 1,0 МЕ/мл. Прибавляют по 25 мкл рабочего раствора в лунки А12 и В12 (контроль токсина). Делают двукратные серийные разведения путем переноса 25 мкл жидкости из одной лунки в другую в лунках В12–Н12, каждый раз меняя наконечник. Удаляют 25 мкл из лунки Н12. Прибавляют по 25 мкл среды В в лунки В12–Н12. Вносят по 25 мкл рабочего раствора токсина (1,0 МЕ/мл) в каждую лунку рядов А–Н, колонки с 1 по 10, за исключением лунок Н9 и Н10 (контроль клеток без токсина и антисыворотки).

Планшет накрывают крышкой или пленкой и осторожно встряхивают. Инкубируют планшеты не менее 2 ч при температуре 37 °С во влажной камере в атмосфере 5 % CO₂.

Прибавляют по 200 мкл суспензии клеток *Vero* $1 \cdot 10^5$ клеток/мл в каждую лунку. Заклеивают планшеты и инкубируют при температуре 37 °С в течение 5 дней. Проверяют микробиологическую чистоту микроскопически.

Желтые лунки учитываются как негативные, красные лунки свидетельствуют о гибели клеток и учитываются как положительные. Промежуточные цвета (между желтым и красным) указывают на наличие в лунке живых и мертвых клеток и учитываются как положительные/отрицательные. Результаты, полученные на основе учета цвета лунок, могут быть подтверждены путем микроскопического изучения живых и мертвых клеток.

Активность антисыворотки морской свинки рассчитывают, сравнивая последнюю лунку с разведением стандартного образца, полностью нейтрализующим токсин, с последней лункой разведения испытуемой сыворотки, демонстрирующим такой же эффект. При расчете активности следует помнить, что конечная точка эксперимента может находиться между отрицательной и положительной/отрицательной лунками.

Метод 2

Тиазолил синий *MTT* восстанавливается в сине-черный формазан митохондриальными дегидрогеназами живых клеток и, следовательно, может быть использован для количественной оценки присутствия живых клеток, указывая на степень нейтрализации токсина антитоксином. Белые или бесцветные лунки указывают на отсутствие живых клеток вследствие недостаточной нейтрализации токсина.

Реактивы и оборудование:

- МОС (МЕМ) (минимальная основная среда);
- эмбриональная телячья сыворотка (ЭТС);
- раствор антибиотиков (содержит 10 000 единиц пенициллина, 10 мг стрептомицина и 25 мг амфотерицина В в 1 мл);
- 200 мМ раствор L-глутамина;
- трипсин-ЭДТА;
- тиазолил синий *MTT* [3-(4,5-диметилтиазолил)-2,5-дифенилтетразолий бромид];
- 1 М буферный (HEPES) раствор pH 8,1. 18,75 г 2-[4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-ил] этансульфоновой кислоты Р (HEPES) растворяют в 82,5 мл воды Р и 30,0 мл 2 М раствора гидроксида натрия Р;
- 10 % раствор глюкозы;
- полная культуральная среда: смешивают 200 мл МОС (МЕМ) с 10 мл ЭТС, 3,0 мл 1 М буферного (HEPES) раствора pH 8,1, 2,0 мл 10 % раствора глюкозы, 2,0 мл раствора антибиотиков и 2,0 мл 200 мМ раствора L-глутамина;

– забуференный солевой раствор pH 7,4 (ЗСР). 10,0 г натрия хлорида *P*, 0,125 г калия дигидрофосфата *P*, 1,44 г династрия гидрофосфата дигидрата *P* и 0,75 г калия хлорида *P* растворяют в 1000 мл воды *P*, при необходимости доводят до pH 7,4 (2.2.3), стерилизуют автоклавированием при температуре 120 °С в течение 15 мин;

– раствор тиазолил синего *MTT*: 0,1 г тиазолил синего *MTT* растворяют в 20 мл ЗСР. Стерилизуют фильтрацией (0,2 мкм) и хранят во флаконах из темного стекла;

– раствор для доведения pH: 40 мл кислоты уксусной *P* смешивают с 1,25 мл 1 *M* раствором кислоты хлористоводородной и 8,75 мл воды *P*;

– буферный раствор для экстракции pH 4,7: 10 г натрия лаурилсульфата *P* растворяют в воде *P* и прибавляют 50 мл диметилформамида *P*, доводят до 100 мл водой *P*, доводят pH с помощью раствора для доведения pH.

Клетки *Vero* культивируют в культуральных флаконах (75 см²/250 мл) в термостате при температуре (36±1) °С в атмосфере с 5 % содержанием CO₂ при относительной влажности 90 %. Для выращивания используют полную питательную среду. После 6–7 дней роста получают монослой, после чего среду удаляют, а клетки трижды отмывают смесью трипсин-ЭДТА: среду осторожно удаляют пипеткой, прибавляют 1 мл смеси трипсин-ЭДТА, распределяют смесь по монослою и удаляют пипеткой. Повторяют процедуру дважды, а на третий раз помещают флакон в термостат на 5 минут, пока клетки не начнут отделяться от пластика. Сильно постукивают по боковой стенке флакона для отделения клеток. Ресуспенсируют клетки в 6–25 мл свежей полной культуральной среды до получения гомогенной суспензии. Готовят суспензию клеток в полной культуральной среде с концентрацией 4·10⁵ клеток/мл.

Вносят по 50 мкл полной культуральной среды во все лунки планшета кроме колонки 1. Вносят 100 мкл антитоксической сыворотки морской свинки (положительная контрольная сыворотка; рабочее разведение на полной культуральной среде 0,12 МЕ/мл) в лунку A1 и 50 мкл в лунку A11. Вносят по 100 мкл испытуемых сывороток (в случае необходимости их разводят) в лунки B1–G1. Добавляют по 50 мкл этих же сывороток в лунки B11–G11 соответствующего ряда. Вносят 100 мкл негативной контрольной сыворотки в лунку H1 и 50 мкл – в лунку H11. С помощью многоканального дозатора делают серийные двукратные разведения, перенося по 50 мкл из лунки в лунку (колонки 1–10 для рядов A–G и 1–8 для ряда H).

Дифтерийный токсин с известной активностью и *Lf* разводят полной культуральной средой до удобной рабочей концентрации, содержащей не менее 4 минимальных цитопатических доз. Вносят по 50 мкл разведенного токсина в каждую лунку, кроме H9 и H10 (контроль клеток), A11–H11 (контроль сывороток) и A12–H12 (контроль токсина). Вносят 100 мкл разведенного токсина в лунку A12 и выполняют двукратные серийные разведения, перенося по 50 мкл из лунки в лунку (A12–H12). Удаляют 50 мкл из лунки H12. Прибавляют по 50 мкл полной среды в лунки H9 и H10.

Закрывают планшет крышкой или клейкой лентой и инкубируют 1 час при комнатной температуре.

Прибавляют по 50 мкл суспензии 5·10⁵ клеток/мл в каждую лунку. Планшет заклеивают и инкубируют в течение 6 дней при температуре 37 °С. Проверяют микробиологическую чистоту микроскопически.

10 мкл раствора тиазолил синего *MTT* прибавляют в каждую лунку. Планшеты инкубируют при температуре 37 °С еще в течение 2–4 ч. Далее удаляют питательную среду и прибавляют в каждую лунку по 100 мкл буферного раствора для экстракции pH 4,7. Планшеты инкубируют при температуре 37 °С в течение ночи для завершения процесса экстракции.

После завершения экстракции и растворения формаза планшеты оценивают визуально или на ридере при длине волны 570 нм. Сине-черные лунки учитываются как отрицательные (все клетки живы, токсин нейтрализован антитоксином); белые или бесцветные лунки учитываются как положительные (клетки погибли, нейтрализация была не эффективной).

Активность антисыворотки морской свинки рассчитывают, сравнивая последнюю лунку с разведением стандартного образца, полностью нейтрализующим токсин, с последней лункой разведения испытуемой сыворотки, демонстрирующим такой же эффект.

Титр нейтрализующих антител может быть получен путем умножения фактора разведения на число МЕ/мл стандартного образца в конечной точке. Тест считают достоверным, если все клетки в лунках контроля токсина погибли, а референсный антитоксин полностью нейтрализует токсин, по крайней мере, в первых двух разведениях.

01/2013:20707

2.7.7. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВАКЦИНЫ КОКЛЮША

Активность вакцины коклюша определяют путем сравнения дозы вакцины, необходимой для защиты мышей от эффектов летальной дозы *Bordetella pertussis*, вводимой интрацеребрально, с количеством стандартного образца, калиброванного в Международных Единицах, требующимся для получения такой же защиты. За Международную Единицу принимают активность в установленном количестве Международного стандартного образца, состоящего из высушенной вакцины коклюша. Эквивалентность Международного стандартного образца в Международных Единицах устанавливается Всемирной организацией здравоохранения.

Выбор и распределение испытуемых животных. В испытании используют здоровых мышей подходящей линии из одной партии возрастом менее 5 недель. Разница в массе между самым тяжелым и самым легким животным не должна превышать 5 г. Мышей делят на 6 групп не менее чем по 16 особей и 4 группы по 10 особей. Используют мышей одного пола; в иных случаях самцы и самки должны быть равномерно распределены по группам.

Выбор провокационного штамма и приготовление суспензии для провокации. Выбирают подходящий штамм *B. pertussis*, способный привести к гибели мышей в течение 14 дней после интрацеребральной инъекции. Если в течение 48 ч после инъекции погибает более 20 % мышей, штамм является неподходящим. Выполняют один пересев штамма и суспендируют собранные *B. pertussis* в растворе, содержащем 10 г/л гидролизата казеина Р и 6 г/л натрия хлорида Р и имеющем показатель рН от 7,0 до 7,2, либо в другом подходящем растворе. Определяют степень мутности суспензии. Готовят ряд разведений с использованием того же раствора и назначают их по одному каждой из групп по десять мышей. Каждой мышке вводят интрацеребрально дозу (0,02 мл или 0,03 мл) разведения, назначенного группе, к которой она принадлежит. Через 14 дней подсчитывают в каждой группе количество выживших мышей. Из этих результатов вычисляют ожидаемую степень мутности суспензии, содержащей 100 LD₅₀ в каждой провокационной дозе. Для оценки активности испытуемой вакцины производят свежий пересев того же штамма *B. pertussis* и готовят из собранных организмов суспензию со степенью мутности, соответствующей приблизительно 100 LD₅₀ в каждой провокационной дозе. Готовят 3 разведения провокационной суспензии.

Определение активности. Готовят 3 серийных разведения испытуемой вакцины и 3 аналогичных разведения стандартного образца так, чтобы для каждого из промежуточных разведений ожидаемая степень защиты мышей от летальных эффектов провокационной дозы *B. pertussis* составляла 50 %. Предлагаемые дозы составляют 1/8, 1/40 и 1/200 доли человеческой дозы испытуемой вакцины и 0,5 МЕ, 0,1 МЕ и 0,02 МЕ препарата сравнения. Каждая из доз содержится в объеме, не превышающем 0,5 мл. 6 разведений назначают по одному каждой из групп, состоящих не менее чем из 16 мышей, и вводят каждой из мышей внутривентрально одну дозу разведения, назначенного группе, к которой относится данное животное. Через 14–17 дней каждому животному из этих групп вводят интрацеребрально одну дозу суспензии для провокации. Суспензию для провокации и три ее разведения назначают по одному каждой из групп по 10 мышей и вводят каждой из мышей интрацеребрально одну дозу каждой суспензии, назначенной группе, к которой относится данное животное. Мышей, погибших в течение 48 ч после провокации, не учитывают при оценке результатов. В каждой из групп подсчитывают количество мышей, выживающих после 14 дней. Активность испытуемой вакцины рассчитывают относительно активности стандартного образца на основе количества животных, выживших в каждой из групп из не менее чем 16 особей.

Результаты испытания являются достоверными, если:

- как для испытуемой вакцины, так и для стандартного образца 50 % защитная доза заключена в интервале между наибольшей и наименьшей дозами, введенными морским свинкам;

- количество погибших животных в 4 группах по 10 мышей, которым была введена провокационная суспензия и ее разведения, указывает на то, что провокационная доза приблизительно соответствует 100 LD₅₀;

- при статистическом анализе не выявляется отклонений от линейности и параллельности. Испытание может быть выполнено повторно, но если было проведено более одного определения, то при оценке активности должны учитываться результаты всех достоверных экспериментов.

01/2013:20708

2.7.8. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АДсорБИРОВАННОЙ СТОЛБНЯЧНОЙ ВАКЦИНЫ

Активность столбнячной вакцины определяется путем назначения вакцины животным (морским свинкам или мышам) с последующей провокацией столбнячным токсином (методы А или В) или путем определения титра антител против столбнячного анатоксина в сыворотке крови морских свинок (метод С). В обоих случаях активность вакцины рассчитывается по сравнению со стандартным образцом, калиброванным в Международных Единицах.

В странах, где метод паралича не является обязательным, вместо методов А и В может использоваться метод LD₅₀. Для метода LD₅₀ количество животных и процедура исследования идентичны описанным для метода паралича, но конечной точкой является гибель животного, а не паралич.

За Международную Единицу принимают активность в установленном количестве Международного стандартного образца адсорбированного столбнячного анатоксина. Эквивалентность Международного стандартного образца в Международных Единицах устанавливается Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ).

БСП адсорбированная столбнячной вакцины откалибрована в МЕ по сравнению с Международным стандартным образцом.

Выбор метода исследования адсорбированной столбнячной вакцины зависит от предполагаемой цели.

Методы А или В применяются:

- 1) в процессе разработки вакцины при количественном определении на сериях продукта, произведенных для валидации производственного процесса;

- 2) в любом случае необходимости ревалидации (при значительных изменениях производственного процесса).

Метод А или В может также использоваться для рутинной проверки серий вакцины, но в интересах защиты животных, по возможности, следует использовать метод С.

Метод С может использоваться, за исключением случаев, описанных в пунктах 1 и 2, после валидации его для конкретного продукта. Для этой цели подходящее количество серий (обычно 3) испытываются методом С и методом А или В.

Если различные вакцины (моновалентные или комбинированные) приготовлены из столбнячного анатоксина одного и того же происхождения и содержат сопоставимые уровни анатоксина (выраженные Lf/мл), валидация, проведенная для лекарственного средства с максимальным количеством компонентов, распространяется на комбинированные лекарственные средства с меньшим числом компонентов и на моновакцины. Любые комбинированные лекарственные средства, содержащие цельноклеточную коклюшную вакцину или конъюгированную вакцину против *Haemophilus B* и столбнячный анатоксин в одном флаконе, должны исследоваться отдельно.

Для комбинированных лекарственных средств, содержащих дифтерийный и столбнячный анатоксины, серологический тест (метод С) может быть проведен на группе животных, использовавшихся для тестирования адсорбированной дифтерийной вакцины

(2.7.6), если общие условия иммунизации для столбнячного и дифтерийного компонентов (доза, продолжительность) валидированы для комбинированного лекарственного средства.

Дизайн описанных ниже исследований использует множественные серийные разведения испытуемых и стандартных образцов. Основываясь на данных активности, полученных при исследовании серийных разведений, можно уменьшить количество животных для получения статистически значимых результатов путем применения упрощенной модели, включающей исследование одного разведения испытуемого и стандартного образцов. Такая схема позволяет установить факт существенного превышения активности испытуемого образца минимально допустимого уровня, но не дает информации о линейности, параллелизме и других параметрах зависимости доза/эффект. Упрощенная схема позволяет значительно сократить потребность в экспериментальных животных и должна приниматься во внимание любой лабораторией в соответствии с положениями Европейской Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей.

В случае перехода на упрощенную схему испытаний соответствие метода тестирования следует постоянно мониторировать по подходящим индикаторам, а также путем периодической постановки теста с множественными серийными разведениями (каждые 2 года). Для серологического теста подходящими индикаторами для мониторинга являются:

- среднее значение и стандартное отклонение относительных титров антитоксина или индексов сывороток, полученных после назначения фиксированных доз стандартного образца вакцины;
- титры антитоксинов или индексы рабочих контролей (положительные или отрицательные образцы сыворотки);
- соотношение титров антитоксина или индекса положительной контрольной сыворотки и образцов сыворотки, соответствующих стандартному образцу вакцины.

МЕТОД А: ПРОВОКАЦИОННЫЙ ТЕСТ НА МОРСКИХ СВИНКАХ

ОТБОР И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

Используют здоровых морских свинок из одной партии с массой тела от 250–350 г. Следует использовать животных одного пола; в противном случае самцов и самок необходимо равномерно распределить между группами. Животных распределяют не менее чем на 6 равных групп. Число животных в группе должно быть достаточным для получения достоверных результатов в ходе описанных ниже испытаний. Если необходимо определить активность используемого токсина, следует создать еще 3 группы из 5 животных в качестве невакцинированного контроля.

ВЫБОР ПРОВОКАЦИОННОГО ТОКСИНА

Следует выбрать стандартный образец столбнячного токсина, содержащий не менее пятидесятикратной 50 %-ной паралитической дозы в миллилитре. Если стабильность токсина подтверждена предварительно, нет необходимости определять его паралитическую дозу для каждого испытания.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРА ТОКСИНА

Непосредственно перед использованием разводят токсин подходящим растворителем (например, забуференным солевым раствором пептона pH 7,4) с получением раствора провокационного токсина, содержащего около пятидесятикратной 50 %-ной паралитической дозы в миллилитре. При необходимости для определения активности токсина используют порции раствора провокационного токсина, разведенные аналогичным растворителем в соотношениях 1:16, 1:50 и 1:160.

РАЗВЕДЕНИЕ ИСПЫТУЕМЫХ И СТАНДАРТНЫХ ОБРАЗЦОВ

С помощью раствора 9 г/л натрия хлорида *R* готовят разведения испытуемой вакцины и стандартного образца таким образом, чтобы шаг разведения в серии был не более 2,5-кратным, в котором промежуточные разведения при подкожном введении морской свинке

в дозе 1,0 мл защищали около 50 % животных от паралитических эффектов, вызываемых подкожным введением количества столбнячного токсина, предписанного для этого испытания.

ИММУНИЗАЦИЯ И ПРОВОКАЦИЯ

Назначают по одному разведению одной группе морских свинок и вводят подкожно по 1,0 мл разведения каждой морской свинке в группе. Спустя 28 дней каждой свинке вводят подкожно 1,0 мл раствора провокационного токсина (содержащего пятидесятикратную 50 %-ную паралитическую дозу).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПРОВОКАЦИОННОГО ТОКСИНА

При необходимости раствор провокационного токсина и три приготовленных из него разведения назначают по одному каждой из 3 групп по 5 морских свинок и вводят подкожно по 1,0 мл каждого разведения каждой из морских свинок группы, которой это разведение было назначено. Активность и стабильность провокационного токсина устанавливают проведением подходящего количества исследований, подтверждающих 50 %-ную паралитическую дозу. В дальнейшем нет необходимости в повторном установлении дозы для каждого исследования.

ПОЛУЧЕНИЕ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Состояние морских свинок оценивают дважды в день. Животных с четкими признаками столбнячного паралича изымают и гуманным образом умерщвляют. Через 5 дней после инъекции провокационного токсина подсчитывают число непарализованных морских свинок. Активность испытуемой вакцины рассчитывают относительно активности стандартного образца вакцины на основе пропорции непарализованных животных в каждой из групп вакцинированных морских свинок. Расчеты проводят, используя обычные статистические методы (например, 5.3).

ТРЕБОВАНИЯ К ДОСТОВЕРНОСТИ ИСПЫТАНИЯ

Тест является достоверным, если:

- для испытуемого и стандартного образца 50 % защитная доза лежит в интервале между наибольшей и наименьшей дозами образцов, введенными морским свинкам;
- где применимо, количество парализованных животных в 3 группах по 5 морских свинок, которым были введены разведения раствора провокационного токсина указывает на то, что провокация составляла около пятидесятикратной 50 %-ной паралитической дозы;
- границы доверительного интервала ($P = 0,95$) составляют не менее 50 % и не более 200 % установленной активности;
- статистический анализ показывает значительный наклон и отсутствие отклонений в линейности и параллелизме графика зависимости доза-ответ (в главе 5.3 описаны возможные альтернативы при получении значительных отклонений в линейности).

Тест может быть проведен повторно, при этом при проведении более одного теста для расчета активности используют объединенные результаты всех достоверных испытаний.

МЕТОД В: ПРОВОКАЦИОННЫЙ ТЕСТ НА МЫШАХ

ОТБОР И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

Используют здоровых мышей из одной партии в возрасте около 5 недель подходящей породы (линии) с массой тела 14–20 г. Следует использовать мышей одного пола; в противном случае самцов и самок необходимо равномерно распределить между группами. Животных распределяют не менее чем на 6 равных групп. Число животных в группе должно быть достаточным для получения достоверных результатов в ходе описанных ниже испытаний. Если необходимо определить активность используемого токсина, следует создать еще 3 группы из 5 мышей в качестве невакцинированного контроля.

ВЫБОР ПРОВОКАЦИОННОГО ТОКСИНА

Следует выбрать стандартный образец столбнячного токсина, содержащий не менее стократной 50 %-ной паралитической дозы в миллилитре. Если стабильность токсина подтверждена предварительно, нет необходимости определять его паралитическую дозу для каждого испытания.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРА ТОКСИНА

Непосредственно перед использованием разводят токсин подходящим растворителем (например, забуференным солевым раствором пептона pH 7,4) с получением раствора провокационного токсина, содержащего около пятидесятикратной 50 %-ной паралитической дозы в 0,5 мл. При необходимости для определения активности токсина, используют порции раствора провокационного токсина разведенные аналогичным растворителем в соотношениях 1:16, 1:50 и 1:160.

РАЗВЕДЕНИЕ ИСПЫТУЕМЫХ И СТАНДАРТНЫХ ОБРАЗЦОВ

С помощью раствора 9 г/л натрия хлорида *P* готовят разведения испытуемой вакцины и стандартного образца таким образом, чтобы шаг разведения в серии был не более 2,5-кратным, в котором промежуточные разведения при подкожном введении в дозе 0,5 мл на мышь защищали около 50 % животных от паралитических эффектов, вызываемых подкожным введением количества столбнячного токсина, предписанного для этого испытания.

ИММУНИЗАЦИЯ И ПРОВОКАЦИЯ

Назначают по одному разведению одной группе мышей и вводят подкожно по 0,5 мл разведения каждому животному в группе. Спустя 28 дней каждому животному вводят подкожно 0,5 мл раствора провокационного токсина (содержащего пятидесятикратную 50 %-ную паралитическую дозу).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПРОВОКАЦИОННОГО ТОКСИНА

При необходимости раствор провокационного токсина и три приготовленных из него разведения назначают по одному каждой из 3 групп по не менее 5 мышей и вводят подкожно по 0,5 мл каждого разведения каждому животному группы, которому это разведение было назначено.

ПОЛУЧЕНИЕ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Состояние мышей оценивают дважды в день. Животных с четкими признаками столбнячного паралича изымают и гуманным образом умерщвляют. Через 4 дня после инъекции провокационного токсина подсчитывают число непарализованных мышей. Активность испытуемой вакцины рассчитывают относительно активности стандартного образца с использованием обычных статистических методов (например, 5.3) на основе пропорции непарализованных животных в каждой группе вакцинированных мышей.

Тест является достоверным, если:

- для испытуемого и стандартного образца 50 % защитная доза лежит в интервале между наибольшей и наименьшей дозами образцов, введенными мышам;
- где применимо, количество парализованных животных в 3 группах по 5 мышей, которым были введены разведения раствора провокационного токсина, указывает на то, что провокация составляла около пятидесятикратной 50 %-ной паралитической дозы;
- границы доверительного интервала ($P = 0,95$) составляют не менее 50 % и не более 200 % установленной активности;
- статистический анализ показывает значительный наклон и отсутствие отклонений в линейности и параллелизме графика зависимости доза-ответ (в главе 5.3 описаны возможные альтернативы при получении значительных отклонений в линейности).

Тест может быть проведен повторно, при этом при проведении более одного теста для расчета активности используют объединенные результаты всех достоверных испытаний.

МЕТОД С: ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИТЕЛ У МОРСКИХ СВИНОК

ОТБОР И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

Используют здоровых морских свинок из одной партии с массой тела 250–350 г. Следует использовать животных одного пола; в противном случае самцов и самок необходимо равномерно распределить между группами. Животных распределяют не менее чем на 6 равных групп. Число животных в группе должно быть достаточным для получения достоверных результатов в ходе описанных ниже испытаний. Для получения негативной контрольной сыворотки используют дополнительную группу животных того же происхождения. При условии валидации может быть применена референсная отрицательная контрольная сыворотка.

СТАНДАРТНЫЙ ОБРАЗЕЦ

Используют подходящий стандартный образец, например *БСП адсорбированной столбнячной вакцины*, серию вакцины с доказанной клинической эффективностью или другую репрезентативную серию, активность которой измерена в Международных Единицах по сравнению с *БСП адсорбированной столбнячной вакцины* или Международным стандартным образцом адсорбированного дифтерийного анатоксина.

РАЗВЕДЕНИЕ ИСПЫТУЕМЫХ И СТАНДАРТНЫХ ОБРАЗЦОВ

Готовят серийные разведения испытуемой вакцины и стандартного образца на растворе 9 г/л *натрия хлорида Р*; разведения выполняют с 2,5–5-кратным шагом. Следует приготовить не менее трех разведений, например, 0,5–16 МЕ/мл для каждой серии. Следует использовать разведения для иммунизации не позже 1 часа с момента приготовления. Одно разведение вводят одной группе свинок.

ИММУНИЗАЦИЯ

Каждой свинке вводят подкожно 1,0 мл разведения, предназначенного для данной группы животных.

ЗАБОР КРОВИ

Через 35–42 дня после иммунизации подходящим методом берут образцы крови у каждого вакцинированного и контрольного животного.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ СЫВОРОТКИ

Следует избегать повторного замораживания/оттаивания образцов сыворотки. Для предотвращения микробной контаминации образцов все манипуляции лучше производить в ламинарном боксе.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИТРА АНТИТЕЛ

Определяют титры или индексы для каждого образца сыворотки с помощью подходящего иммунохимического метода (2.7.1). Методы, приведенные ниже, (иммуноферментный анализ – тИФА (*enzyme-linked immunosorbent assay – ELISA*) и токсинсвязывающее ингибирование (*toxin-binding inhibition – ToBI*)) признаны подходящими.

РАСЧЕТ АКТИВНОСТИ

Активность испытуемой вакцины в МЕ относительно стандартного образца рассчитывают, используя обычные методы статистики (например, 5.3).

ТРЕБОВАНИЯ К ДОСТОВЕРНОСТИ ТЕСТА

Тест является достоверным, если:

- границы доверительного интервала ($P = 0,95$) составляют не менее 50 % и не более 200 % установленной активности;
- статистический анализ показывает значительный наклон и отсутствие отклонений в линейности и параллелизме графика зависимости доза-ответ (в главе 5.3 описаны возможные альтернативы при получении значительных отклонений в линейности).

Тест может быть проведен повторно, при этом при проведении более одного теста для расчета активности используют объединенные результаты всех достоверных испытаний.

Следующий раздел приводится для информации.

Руководство по исследованию адсорбированной столбнячной вакцины

МЕТОД А: ПРОВОКАЦИОННЫЙ ТЕСТ НА МОРСКИХ СВИНКАХ

ПОЛУЧЕНИЕ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

С целью минимизации страданий испытуемых животных рекомендуется учитывать паралитический ответ согласно шкале, приведенной ниже. Шкала учитывает типичные признаки, когда подкожные инъекции провокационного токсина проводятся в средостение прямо позади грудины острой иглой по направлению к шее морской свинки. Степень Т3 принимается за конечную точку, но, при наличии определенного опыта, может быть использована степень Т2.

Токсин столбняка вызывает паралич по крайней мере одной из передних конечностей, который может быть выявлен на ранней стадии. Шкала воздействия столбнячного токсина на морских свинок может быть охарактеризована следующим образом:

- Т1: небольшая тугоподвижность одной передней конечности, идентификация паралича затруднена;
- Т2: парез одной передней конечности, которая все еще может функционировать;
- Т3: паралич одной передней конечности; животное двигается неохотно, тело часто немного искривлено (в форме банана) вследствие сколиоза;
- Т4: передняя конечность полностью напряжена, пальцы лапы неподвижны; мускульное сокращение передней конечности очень выражено, обычно наблюдается сколиоз;
- Т5: столбнячные судороги, продолжительные тонические судороги;
- D: смерть.

МЕТОД В: ПРОВОКАЦИОННЫЙ ТЕСТ НА МЫШАХ

ПОЛУЧЕНИЕ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Чтобы минимизировать страдания испытуемых животных, рекомендуется оценивать степень паралича по шкале, приведенной ниже. Шкала учитывает типичные признаки, если инъекция токсина выполнена со спины, вблизи от одной из задних ног. Степень Т3 является конечной точкой, но при приобретении некоторого опыта вместо нее может быть использована стадия Т2. Токсин столбняка вызывает парез и последующий паралич задней ноги, что может быть выявлено на ранней стадии. Шкала поражения токсином на мышах учитывает следующие признаки:

- Т1: небольшая тугоподвижность задней ноги, которая наблюдается только когда мышшь поднимают за хвост;
- Т2: парез задней ноги, которая все еще может функционировать;
- Т3: паралич задней ноги, функция невозможна;
- Т4: задняя нога полностью ригидна, пальцы неподвижны;
- Т5: непрерывная тоническая судорога мышц ноги;
- D: смерть.

МЕТОД С: ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИТЕЛ У МОРСКИХ СВИНОК

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ СЫВОРОТКИ

Следующая методика пригодна для приготовления образца сыворотки. Переворачивают пробирку с образцом крови 6 раз и выдерживают при температуре 37 °С в течение 2 ч, затем при температуре 4 °С в течение 2 ч. Центрифугируют при комнатной температуре с ускорением 800 g в течение 20 мин. Сыворотку переносят в стерильные

пробирки и хранят при температуре -20°C . Данная методика позволяет получить на выходе не менее 40 % сыворотки.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИТРА АНТИТЕЛ

тИФА и *ToBI*, приведенные ниже, являются примером иммунохимических методов, признанных подходящими для определения титра антител.

Определение титра антител в сыворотке морской свинки с помощью иммуноферментного анализа (тИФА (*ELISA*)). В лунки планшета для тИФА с адсорбированным столбнячным анатоксином вносят разведения испытуемой и референсной сывороток. Положительную и отрицательную контрольные сыворотки морской свинки включают в каждую постановку для контроля работы системы. Далее добавляют конъюгированные с пероксидазой антитела кролика или козы против IgG морской свинки, после чего вносят субстрат. Измеряют оптическую плотность и рассчитывают относительный титр антител, используя обычные методы статистики (например, 5.3).

Реактивы и оборудование:

- *планишеты для тИФА*: 96 лунок, колонки 1–12, строки А–Н;
- *БСП противостолбнячной антисыворотки морской свинки* (положительная контрольная сыворотка);
- *конъюгат пероксидазы*: конъюгированные с пероксидазой хрена кроличьи или козы антитела против IgG морской свинки;
- *столбнячный анатоксин*;
- *карбонатный буферный раствор для сорбции антигена рН 9,6*: 1,59 г натрия карбоната безводного *P* и 2,93 г натрия гидрокарбоната *P* растворяют в 1000 мл воды *P*. Разливают в бутылки по 150 мл и стерилизуют автоклавированием при температуре 121°C в течение 15 мин;
- *забуференный солевой раствор рН 7.4 (ЗСР)*: 80,0 г натрия хлорида *P*, 2,0 г калия дигидрофосфата *P*, 14,3 г династрия гидрофосфата дигидрата *P* и 2,0 г калия хлорида *P* растворяют в 1000 мл воды *P*; хранят при комнатной температуре для предотвращения кристаллизации, перед использованием разводят в 10 раз водой *P*;
- *раствор кислоты лимонной*: 10,51 г кислоты лимонной *P* растворяют в 1000 мл воды *P* и доводят до значения рН 4,0 раствором 400 г/л натрия гидроксида *P*;
- *промывочный буферный раствор*: ЗСР, содержащий 0,5 г/л полисорбата 20 *P*;
- *блокирующий буферный раствор*: ЗСР, содержащий 0,5 г/л полисорбата 20 *P* и 25 г/л высушенного обезжиренного молока;
- *субстратный раствор*: незадолго до использования 10 мг диаммоний 2,2-азинобис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоната) *P* (*ABTS*) растворяют в 20 мл раствора кислоты лимонной; немедленно перед использованием прибавляют 5 мкл концентрированного раствора водорода пероксида *P*.

Методика

Ниже приведен пример подходящей раскладки образцов и контролей. Лунки ряда 1А–Н используют для отрицательной контрольной сыворотки, лунки рядов 2А–Н и 12А–Н – для положительной контрольной сыворотки для мониторинга количественного определения. Лунки рядов 3–11А–Н используют для испытуемых образцов.

Покрывают лунки планшета для тИФА 100 мкл раствора столбнячного анатоксина (0,5 *Lf*/мл в карбонатном буферном растворе для сорбции антигена рН 9,6). Планшет оставляют на ночь при температуре 4°C во влажной камере. Чтобы избежать эффекта температурного градиента, не следует складывать в стопку больше 4 пластин.

На следующий день пластины тщательно отмывают отмывочным буфером. Планшеты блокируют прибавлением 100 мкл блокирующего буферного раствора в каждую лунку. Инкубируют во влажной камере при температуре 37°C в течение 1 ч. Отмывают планшеты промывочным буферным раствором.

Вносят по 100 мкл блокирующего буферного раствора во все лунки за исключением ряда А. Готовят подходящие разведения отрицательной и положительной контрольных сывороток (приблизительно от 0,01 МЕ/мл) и испытуемых сывороток. Располагают

сыворотки в соответствии с раскладкой теста: отрицательную контрольную сыворотку для ряда 1, положительную контрольную сыворотку для рядов 2 и 12 и испытуемые сыворотки для рядов 3–11 и прибавляют по 100 мкл из каждой сыворотки в первые две лунки соответствующих рядов. Используя многоканальную микропипетку, делают двойные последовательные разведения от ряда В к ряду Н. Удаляют 100 мкл из лунок последнего ряда так, чтобы все лунки содержали по 100 мкл. Инкубируют при температуре 37 °С в течение 2 ч. Отмывают промывочным буферным раствором.

Готовят подходящее разведение (например, 2000-кратное) конъюгата пероксидазы в блокирующем буферном растворе и прибавляют по 100 мкл в каждую лунку. Инкубируют при температуре 37 °С во влажной камере в течение 1 ч. Отмывают планшет промывочным буферным раствором.

Прибавляют по 100 мкл субстратного раствора в каждую лунку. Инкубируют при комнатной температуре в темноте в течение 30 мин.

Учитывают реакцию на ридере при длине волны 405 нм в том же порядке, как прибавляли субстрат.

Определение титра антител в сыворотке морской свинки методом токсин связывающего ингибирования (ToBI). Токсин или анатоксин столбняка прибавляют к последовательным разведениям испытуемых или референсных сывороток; смеси сыворотки/ антигена инкубируют в течение ночи. Для определения несвязанного токсина или анатоксина смеси вносят в лунки планшета для тИФА с сорбированными антителами. Далее прибавляют конъюгат пероксидазы с лошадиными противостолбнячными антитоксическими антителами и субстратом. Измеряют оптическую плотность и рассчитывают титр антител, используя обычные статистические методы (например, 5.3). Положительную и отрицательную контрольные сыворотки включают в каждую постановку, чтобы контролировать работу системы.

Реактивы и оборудование:

- круглодонные планшеты из полистирола для приготовления разведений;
- плоскодонные пластины для тИФА (ELISA);
- столбнячный токсин или анатоксин;
- БСП противостолбнячной сыворотки морской свинки (положительная контрольная сыворотка);
- лошадиные противостолбнячные антитела (IgG);
- конъюгат пероксидазы хрена с лошадиными противостолбнячными антителами (IgG);
- карбонатный буферный раствор pH 9,6: 1,5 г натрия карбоната безводного R, 2,39 г натрия гидрокарбоната R и 0,2 г натрия азиды R растворяют в 1000 мл воды R, доводят до pH 9,6 и автоклавируют при температуре 120 °С в течение 20 мин;
- ацетатный буферный раствор pH 5,5: 90,2 г натрия ацетата безводного R растворяют в 900 мл воды R, доводят до pH 5,5 насыщенным раствором кислоты лимонной R и разводят водой R до объема 1000 мл.
- забуференный солевой раствор pH 7,2 (ЗСР): 135,0 г натрия хлорида R, 20,55 г динатрия гидрофосфата дигидрата R и 4,80 г натрия дигидрофосфата моногидрата R растворяют в воде R и доводят до объема 15 л этим же растворителем; автоклавируют при температуре 100 °С в течение 60 мин;
- буферный раствор для разведения: ЗСР, содержащий 5 г/л бычьего альбумина R и 0,5 г/л полисорбата 80 R;
- блокирующий буферный раствор: ЗСР, содержащий 5 г/л бычьего альбумина R;
- раствор тетраметилбензидина: раствор 6 г/л тетраметилбензидина R в 96 % спирте R; вещество растворяется в течение 30–40 мин при комнатной температуре;
- субстратный раствор: смешивают 90 мл воды R, 10 мл ацетатного буферного раствора pH 5,5, 1,67 мл раствора тетраметилбензидина и 20 мкл концентрированного раствора водорода пероксида R;
- промывочный раствор: вода из-под крана, содержащая 0,5 г/л полисорбата 80 R.

Методика

Блокируют планшеты для приготовления разведений, помещая в каждую лунку 150 мкл блокирующего буферного раствора. Закрывают планшеты крышкой или пленкой.

Инкубируют во влажной камере при температуре 37 °С в течение 1 ч. Отмывают планшеты промывочным раствором.

Вносят по 100 мкл ЗСР в каждую лунку. Вносят 100 мкл референсного противостолбнячного антитоксина морской свинки в первую лунку ряда А. Вносят по 100 мкл неразведенных испытуемых сывороток в первые лунки необходимого числа рядов. Используя многоканальную микропипетку, делают двойные последовательные разведения (до колонки 10), перенося по 100 мкл от одной лунки к следующей. Удаляют 100 мкл из последней колонки так, чтобы все лунки содержали по 100 мкл.

Готовят разведение токсина или анатоксина столбняка 0,1 Lf/мл в ЗСР. Вносят по 40 мкл этого разведения во все лунки, за исключением колонки 12. Колонка 11 содержит положительный контроль. Вносят по 40 мкл ЗСР в лунки колонки 12 (отрицательный контроль). Осторожно встряхивают планшеты и закрывают крышками.

Покрывают лунки планшета для тИФА: немедленно перед использованием делают подходящее разведение лошадиных противостолбнячных антител (IgG) в карбонатном буферном растворе pH 9,6 и прибавляют по 100 мкл полученных разведений в каждую лунку. Инкубируют 2 серии планшетоов во влажной камере при температуре 37 °С в течение ночи. Чтобы избежать эффекта температурного градиента, не следует складывать больше 4 пластин в стопку. Закрывают планшеты крышками.

На следующий день планшеты отмывают промывочным раствором. Блокируют планшеты, прибавляя по 125 мкл блокирующего буферного раствора в каждую лунку. Инкубируют во влажной камере при температуре 37 °С в течение 1 ч. Отмывают планшеты промывочным раствором.

Переносят по 100 мкл преинкубированных смесей из планшетоов для разведения в соответствующие лунки планшетоов для тИФА, начиная с колонки 12 и продолжая с 1 по 11. Закрывают планшеты крышками. Инкубируют во влажной камере при температуре 37 °С в течение 2 ч. Отмывают планшеты промывочным раствором.

Готовят подходящее разведение (например, 4000-кратное) конъюгата пероксидазы с лошадиными противостолбнячными антителами (IgG) в буферном растворе для разведения. Вносят по 100 мкл в каждую лунку и закрывают планшеты. Инкубируют во влажной камере при температуре 37 °С в течение 1,5 ч. Отмывают планшеты промывочным раствором.

Вносят по 100 мкл раствора субстрата в каждую лунку. Инкубируют при комнатной температуре. Останавливают реакцию в установленный срок (в пределах 10 мин) прибавлением 100 мкл 2 М раствора кислоты серной в каждую лунку в том же порядке, в каком вносили субстрат.

Измеряют оптическую плотность при длине волны 450 нм немедленно после прибавления серной кислоты или хранят планшеты в темноте до снятия результатов.

01/2013:20709

2.7.9. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ Fc-ФРАГМЕНТА ИММУНОГЛОБУЛИНА

Определение функционального состояния Fc-фрагмента иммуноглобулина выполняется методом А или В. Метод В является адаптацией метода А для микропланшетоов при измерении комплемент-зависимого лизиса. Различия в проведении теста между методами А и В указаны ниже.

РЕАКТИВЫ

Стабилизированная человеческая кровь. Человеческую кровь группы О собирают в антикоагулянтный раствор АСД. Стабилизированную кровь хранят при температуре 4 °С не более 3 недель.

Буференный солевой раствор pH 7,2. 1,022 г динатрия гидрофосфата безводного Р, 0,336 г натрия дигидрофосфата безводного Р и 8,766 г натрия хлорида Р растворяют в 800 мл воды Р и доводят до объема 1000 мл этим же растворителем.

Раствор магния и кальция. 1,103 г кальция хлорида Р и 5,083 г магния хлорида Р растворяют в воде Р и доводят до объема 25 мл этим же растворителем.

Основной буферный раствор барбитала. 207,5 г натрия хлорида *P* и 25,48 г барбиталнатрия *P* растворяют в 4000 мл воды *P* и доводят до pH 7,3, используя 1 *M* раствор кислоты хлористоводородной. Прибавляют 12,5 мл раствора магния и кальция и доводят водой *P* до объема 5000 мл. Фильтруют через мембранный фильтр (размер пор 0,22 мкм). Хранят при температуре 4 °С в прозрачных контейнерах.

Альбумин-барбиталовый буферный раствор. 0,150 г бычьего альбумина *P* растворяют в 20 мл основного буферного раствора барбитала и доводят водой *P* до объема 100 мл. Готовят непосредственно перед использованием.

Раствор таниновой кислоты. 10 мг таниновой кислоты *P* растворяют в 100 мл забуференного солевого раствора pH 7,2. Готовят непосредственно перед использованием.

Комплемент морской свинки. Готовят пул сыворотки из крови не менее 10 морских свинок. Сыворотку отделяют от свернувшейся крови центрифугированием при температуре около 4 °С. Сыворотку хранят в небольших количествах при температуре ниже –70 °С. Непосредственно перед использованием разводят альбумин-барбиталовым буферным раствором до 125–200 CH₅₀/мл и хранят в течение испытания в ледяной бане.

[#]CH₅₀ (гемолитическая единица активности комплемента) – концентрация комплемента в контрольной сыворотке, вызывающая в данных реакционных условиях теста агглютинации лизис 50 % эритроцитов.[#]

Антиген краснухи. Подходит антиген краснухи для титрования по ингибированию гемагглютинации (HIT). Титр должен составлять более 256 НА единиц.

Приготовление танизированных человеческих эритроцитов. Эритроциты отделяют центрифугированием соответствующего объема стабилизированной человеческой крови. Промывают клетки не менее трех раз забуференным солевым раствором pH 7,2 и ресуспендируют в этом же растворе в концентрации 2 % (об/об). 0,2 мл раствора таниновой кислоты прибавляют к 14,8 мл забуференного солевого раствора pH 7,2. Смешивают 1 объем свежеприготовленного разведения с 1 объемом суспензии эритроцитов человека и инкубируют при температуре 37 °С в течение 10 мин. Клетки отделяют центрифугированием (800 g в течение 10 мин), супернатант удаляют, а клетки однократно промывают забуференным солевым раствором pH 7,2. Танизированные клетки ресуспендируют в забуференном солевым растворе pH 7,2 в концентрации 1 % (об/об).

Нагрузка танизированных человеческих эритроцитов антигеном. К соответствующему объему (V_s) танизированных клеток добавляют антиген краснухи (0,2 мл на 1,0 мл клеток) и инкубируют при температуре 37 °С в течение 30 мин. Клетки отделяют центрифугированием (800 g в течение 10 мин) и удаляют супернатант. Прибавляют альбумин-барбиталовый буферный раствор в объеме, равном объему удаленного супернатанта, клетки ресуспендируют и отделяют, как описано выше, и повторяют операцию промывки. Клетки ресуспендируют альбумин-барбиталовым буферным раствором, используя объем, эквивалентный $3/4 V_s$, получая таким образом начальный объем (V_i).

900 мкл альбумин-барбиталового буферного раствора смешивают с 100 мкл V_i , получая таким образом остаточный объем (V_r), и определяют исходную оптическую плотность при длине волны 541 нм (A). V_r разводят альбумин-барбиталовым буферным раствором с коэффициентом разведения, эквивалентным A , получая таким образом конечный скорректированный объем $V_f = V_r \cdot A$ сенсibilизированных человеческих эритроцитов и устанавливая значение A ($1,0 \pm 0,1$) для десятикратного разведения.

Связывание антителами сенсibilизированных эритроцитов. Готовят один за другим в дубликатах перечисленные растворы, используя для каждого из них отдельную одноразовую кювету или пробирку.

(1) *Испытуемые растворы.* При необходимости доводят значение pH испытуемого иммуноглобулина до 7,0.

При выполнении метода А объемы испытуемого образца разводят альбумин-барбиталовым буферным раствором до получения 30 мг и 40 мг иммуноглобулина и доводят до объема 900 мкл альбумин-барбиталовым буферным раствором. При выполнении метода В объемы испытуемого образца разводят альбумин-барбиталовым буферным раствором до получения 15 мг и 30 мг иммуноглобулина и доводят до объема 1200 мкл альбумин-барбиталовым буферным раствором.

(2) *Растворы сравнения.* Готовят так же, как и испытуемые растворы с использованием *БСП человеческого иммуноглобулина*.

(3) *Контроль комплемента.* 900 мкл альбумин-барбиталового буферного раствора.

При выполнении метода А к содержимому каждой кюветы или пробирки прибавляют по 100 мкл сенсibilизированных человеческих эритроцитов и хорошо перемешивают.

Инкубируют при комнатной температуре в течение 15 мин, прибавляют 1000 мкл альбумин-барбиталового буферного раствора, отделяют клетки центрифугированием (1000 g в течение 10 мин) и удаляют 1900 мкл супернатанта. Прибавляют 1900 мкл альбумин-барбиталового буферного раствора повторяют операцию отмывки, оставляя объем 200 мкл. Испытуемые образцы могут храниться в закупоренных кюветах (пробирках) при температуре 4 °С не более 24 ч.

При выполнении метода В к содержимому каждой кюветы или пробирки прибавляют по 300 мкл сенсibilизированных человеческих эритроцитов и хорошо перемешивают (конечная концентрация иммуноглобулина колеблется в пределах 10–20 мг/мл). Инкубируют при комнатной температуре в течение 15 мин, прибавляют 1500 мкл альбумин-барбиталового буферного раствора, отделяют клетки центрифугированием (1000 g в течение 10 мин) и удаляют супернатант. Прибавляют 3000 мкл альбуминбарбиталового буферного раствора и повторяют всю операцию промывки, оставляя объем 300 мкл. Испытуемые образцы могут храниться в закупоренных пробирках при температуре 4 °С не более 24 ч.

Комплемент-зависимый гемолиз. При выполнении метода А для измерения гемолиза к испытуемому образцу прибавляют 600 мкл предварительно нагретого до температуры 37 °С альбумин-барбиталового буферного раствора, тщательно ресуспендируют клетки путем пипетирования (не менее пяти раз) и помещают кювету в термостатированный держатель кювет спектрофотометра. Через 2 мин прибавляют 200 мкл разведенного комплемента морских свинок (125–200 CH₅₀/мл), тщательно перемешивают путем двукратного пипетирования и тотчас после второго пипетирования начинают регистрацию оптической плотности при длине волны 541 нм с использованием альбумин-барбиталового буферного раствора в качестве компенсационного раствора. Измерение прекращают при очевидном прохождении точки перегиба графика зависимости оптической плотности от времени.

При выполнении метода В для измерения степени гемолиза к испытуемому образцу прибавляют 900 мкл предварительно нагретого до температуры 37 °С альбумин-барбиталового буферного раствора, осторожно ресуспендируют клетки путем пипетирования (не менее пяти раз). Микропланшеты должны быть предварительно нагреты до температуры 37 °С. Переносят по 240 мкл каждого раствора в 4 лунки микропланшета и инкубируют при температуре 37 °С в течение 6 мин, осторожно встряхивая каждые 10 с. В каждую лунку микропланшета прибавляют по 60 мкл разведенного комплемента морских свинок (150 CH₅₀/мл), тщательно перемешивают в течение 10 с и тотчас начинают регистрацию оптической плотности при длине волны 541 нм при температуре 37 °С; измерение проводят каждые 20 с. Измерение прекращают при очевидном прохождении точки перегиба графика зависимости оптической плотности от времени.

Оценка. Для каждой кюветы, пробирки, лунки определяют угол наклона (S) кривой гемолиза в районе точки перегиба путем сегментации участка с наибольшим уклоном на подходящие временные отрезки (например, $\Delta t = 1$ мин) и вычисляют значения S между соседними точками пересечений, выраженные в $\Delta A/\text{мин}$. Наибольшее значение S принимают за (S_{exp}). Кроме того, определяют оптическую плотность в начале измерения (A_s) путем экстраполяции кривой, практически линейной и параллельной оси времени в течение первых нескольких минут. Корректируют значение S_{exp} по формуле:

$$S' = \frac{S_{\text{exp}}}{A_s},$$

Рассчитывают среднее арифметическое значений S' для каждого образца (испытуемых растворов и растворов сравнения).

Рассчитывают индекс функции F_c (I_{Fc}) по формуле:

$$I_{Fc} = \frac{100 \cdot (\bar{S}' - \bar{S}_c')}{\bar{S}_s' - \bar{S}_c'},$$

где:

$\bar{S}'$ – среднее арифметическое скорректированного угла наклона для испытуемого раствора;

$\bar{S}_s'$ – среднее арифметическое скорректированного угла наклона для раствора сравнения;

$\bar{S}_c'$ – среднее арифметическое скорректированного угла наклона для контроля комплемента.

Рассчитывают индекс функции Fc для испытуемого образца: значение должно быть не ниже указанного в листке-вкладыше, сопровождающем стандартный образец.

01/2013:20711

2.7.10. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФАКТОРА СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА VII

Количественное определение фактора свертывания крови VII производят по его биологической активности в виде комплекса фактора VIIa с тканевым фактором при активации фактора X в присутствии ионов кальция и фосфолипидов. Активность препарата фактора VII оценивают путем сравнения количества, необходимого для достижения определенной скорости образования фактора Ха в испытуемой смеси, содержащей вещества, принимающие участие в активации фактора X, и количества Международного стандартного образца или стандартного образца, калиброванного в Международных Единицах, которое требуется для достижения такой же скорости образования фактора Ха.

За Международную Единицу принимают активность фактора VII в установленном количестве Международного стандартного образца, состоящего из лиофилизированной плазмы. Эквивалентность Международного стандартного образца в Международных Единицах устанавливается Всемирной организацией здравоохранения.

БСП фактора свертывания крови VII калиброван в МЕ в сравнении с Международным стандартным образцом.

Хромогенный метод количественного определения включает две последовательные стадии. Первая стадия состоит в зависящей от фактора VII активации фактора X смесью реагентов, включающей тканевый фактор, фосфолипиды и ионы кальция. На второй стадии происходит ферментативное расщепление хромогенного субстрата фактором Ха с образованием хромофора, который определяют спектрофотометрически. В соответствующих условиях испытания существует линейная зависимость между скоростью образования фактора Ха и концентрацией фактора. Содержание метода количественного определения описывается следующей схемой.

1-я стадия



2-я стадия



В обеих стадиях используются реагенты, доступные из ряда коммерческих источников. Хотя в состав реагентов могут вноситься некоторые изменения, их основные свойства должны соответствовать нижеприведенным спецификациям.

РЕАГЕНТЫ

Реагент факторов коагуляции состоит из очищенных белков человеческого или говяжьего происхождения, включающих фактор X и тромбопластиновый тканевый фактор/фосфолипид в качестве активатора фактора VII. Эти белки подвергнуты частичной очистке и не должны содержать примесей, мешающих активации фактора VII или фактора X. Фактор X содержится в количествах, приводящих к конечной концентрации на первой стадии определения, находящейся в пределах 10–350 нмоль/л, предпочтительно 14–70 нмоль/л. В качестве тканевого фактора/фосфолипида может использоваться тромбопластин, полученный из природных источников, например, из мозга крупного рогатого скота или кроликов или синтетический препарат. Тромбопластин, подходящий для использования в определении протромбинового периода, разбавляют буфером в соотношении от 1:5 до 1:50 так, чтобы окончательная концентрация ионов кальция составляла 15–25 ммоль/л. Образование конечного фактора Xa проводят в растворе, содержащем человеческий или бычий альбумин в концентрации, не допускающей потери адсорбции, и соответствующим образом буферизированного до pH 7,3–8,0. В окончательной инкубационной смеси фактор VII должен быть единственным компонентом, лимитирующим скорость.

Вторая стадия включает количественное определение образовавшегося фактора Xa с использованием специфичного в отношении фактора Xa хромогенного субстрата. Обычно он представляет собой короткий пептид, состоящий из 3–5 аминокислотных остатков, присоединенный к хромофорной группе. При отщеплении этой группы от пептидного субстрата ее хромофорные свойства смещаются к длине волны, при которой становится возможным произвести спектрофотометрическое определение. Субстрат обычно растворяют в *воде Р* и используют в конечных концентрациях 0,2–2 ммоль/л. Субстрат также может содержать подходящие ингибиторы для прекращения дальнейшего образования фактора Xa (прибавляют эдетат).

МЕТОДИКА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Восстанавливают полное содержимое одной ампулы стандартного образца и испытуемого образца путем прибавления подходящего количества *воды Р*; используют в течение 1 ч. Восстановленные образцы дополнительно разводят прератворителем, получая растворы с содержанием от 0,5 МЕ/мл до 2,0 МЕ/мл фактора VII.

Готовят дальнейшие разведения испытуемого образца и стандартного образца с использованием изотонического нехелатирующего буфера, содержащего 1 % человеческого или бычьего альбумина и предпочтительно буферизированного при pH от 7,3 до 8,0. Готовят не менее трех отдельных, независимых разведений каждого образца.

Предпочтительно каждое из разведений готовить в двух повторностях. Разведения готовят таким образом, чтобы окончательная концентрация фактора VII была ниже 0,005 МЕ/мл.

Готовят контрольный раствор, включающий все компоненты, кроме фактора VII.

Все разведения готовят в пластиковых пробирках и используют в течение 1 часа.

1-я стадия. Разведения стандартного образца фактора VII и испытуемого образца смешивают с подходящим объемом предварительно нагретого реагента факторов свертывания крови или со смесью реагентов, его составляющих, и инкубируют смесь в пластиковых пробирках или ячейках планшета при температуре 37 °С. Концентрации компонентов в процессе образования фактора Ха должны соответствовать спецификациям, приведенным выше при описании реагентов.

Активацию фактора X проводят в течение подходящего промежутка времени, предпочтительно прерывая реакцию до достижения концентрацией фактора Ха ее максимального уровня с целью получения удовлетворительной линейной зависимости отклика от дозы. Время активации выбирается также таким образом, чтобы достичь линейного во времени образования фактора Ха. Подходящие периоды активации обычно находятся в пределах от 2 мин до 5 мин, но допускаются и другие значения при условии получения приемлемой линейности зависимости отклика от дозы.

2-я стадия. Активацию прерывают добавлением предварительно нагретого реагента, содержащего хромогенный субстрат. Проводят количественную оценку скорости расщепления субстрата, которая должна находиться в линейной зависимости от концентрации образовавшегося фактора Ха, измеряя изменение оптической плотности при соответствующей длине волны с помощью спектрофотометра. Оптическую плотность отслеживают постоянно, получая таким образом возможность вычислить начальную скорость расщепления субстрата, либо прерывают реакцию гидролиза по окончании подходящего промежутка времени путем понижения pH добавлением подходящего реагента, например, уксусной кислоты (500 г/л C₂H₄O₂) или раствора цитрата (1 моль/л) с pH 3. Время гидролиза регулируют с целью достижения линейного характера образования хромофора во времени. Подходящими обычно являются периоды гидролиза от 3 мин до 15 мин, но допускаются и другие значения при условии получения таким образом лучшей линейности зависимости отклика от дозы.

Проверяют достоверность определения и рассчитывают активность испытуемого образца с использованием обычных статистических методов (например, 5.3).

01/2013:20711

2.7.11. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФАКТОРА СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА IX

Принцип исследования состоит в измерении способности препарата фактора IX сокращать время свертывания плазмы, дефицитной по фактору IX. Реакция ускоряется при добавлении реагента, содержащего фосфолипиды и контактные активаторы: каолин, кремнезем или элагиевую кислоту. Активность оценивается путем сравнения кривой доза/эффект испытуемого образца и стандартного образца, калиброванного в Международных Единицах.

За Международную Единицу (МЕ) принимают активность фактора IX, проявляемую установленным количеством Международного стандартного образца, состоящего из лиофильно высушенного концентрата фактора свертывания крови человека IX. Эквивалентность Международного стандартного образца в Международных Единицах устанавливается Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ).

БСП концентрата фактора свертывания человека IX калибруется в МЕ путем сравнения с Международным стандартным образцом.

Восстанавливают по отдельности испытуемый и стандартный образцы в соответствии с указаниями на этикетке и используют немедленно. В случае необходимости определяют количество присутствующего гепарина (2.7.12) и нейтрализуют гепарин прибавлением *протамина сульфата Р* (10 мкг протамина сульфата нейтрализуют 1 МЕ гепарина). Испытуемый и стандартный образцы разводят плазмой, дефицитной по фактору IX

(например, *субстратом плазмы R2*) до получения растворов с содержанием от 0,5 МЕ/мл до 2,0 МЕ/мл. Готовят не менее трех разведений всех образцов, предпочтительно в дубликатах, с помощью подходящего буфера (например, *имидазольного буферного раствора pH 7,3 P*), содержащего 10 г/л бычьего или человеческого альбумина. Разведения используют немедленно.

При определении применяют аппаратуру, позволяющую многократно измерять время свертывания, либо проводят исследование при постоянной инкубации пробирок в водяной бане при температуре 37 °С.

В каждую пробирку помещают по 0,1 мл плазмы, дефицитной по фактору IX (например, *субстрат плазмы P2*) и по 0,1 мл одного из разведений испытуемого или стандартного образцов. К содержимому каждой пробирки прибавляют по 0,1 мл подходящего реагента активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ, *Activated Partial Thromboplastin Time – APTT*), содержащего фосфолипиды или контактный активатор, и инкубируют смесь в течение рекомендуемого времени при температуре 37 °С. К содержимому каждой пробирки прибавляют по 0,1 мл раствора 3,7 г/л *кальция хлорида P*, предварительно подогретого до температуры 37 °С.

С помощью секундомера измеряют время коагуляции, т.е. интервал времени между прибавлением кальция хлорида и первыми признаками образования фибрина. Объемы реактивов, приведенные выше, могут быть адаптированы для используемых реагентов АЧТВ или аппаратуры. Рассчитывают активность с использованием обычных статистических методов (например, 5.3).

Для подтверждения отсутствия в *субстрате плазмы P2* существенного количества фактора IX выполняют контрольный опыт с использованием вместо испытуемого образца соответствующего количества смеси из 1 объема раствора 38 г/л *натрия цитрата P* и 5 объемов *имидазольного буферного раствора pH 7,3 P*. Результаты испытания считают достоверными, если время коагуляции в контрольном опыте составляет от 100 с до 200 с.

01/2013:20712

2.7.12. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕПАРИНА В КОНЦЕНТРАТАХ ФАКТОРОВ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ

Гепарин определяют в виде комплекса с антитромбином III (АТ) по его способности к ингибированию фактора свертывания крови Ха (анти-Ха активность). В реакционной смеси поддерживают избыток АТ для обеспечения постоянной концентрации комплекса гепарина с АТ. Фактор Ха нейтрализуется комплексом гепарина с АТ, а его избыток гидролизует специфический хромофорный пептидный субстрат с высвобождением хромофора. Количество хромофора обратно пропорционально активности гепарина.

Хромогенный субстрат фактора Ха. Специфический хромогенный субстрат для фактора Ха, например, *N*-бензоил-L-изолейцил-L-глутамил-глицил-L-аргинин-4-нитроанилида гидрохлорид. Субстрат восстанавливают в соответствии с указаниями изготовителя.

Буфер для разведений. Раствор 6,05 г/л *трис(гидроксиметил)аминометана P*. При необходимости доводят *кислотой хлористоводородной P* до pH 8,4.

Испытуемый раствор. Испытуемый образец разводят буфером для разведений, получая раствор с ожидаемым содержанием гепарина 0,1 МЕ/мл.

Раствор сравнения. Стандартный образец разводят буфером для разведений, получая раствор с ожидаемым содержанием гепарина 0,1 МЕ/мл.

Нижеописанные условия определения относятся к титрационным микропланшетам. Если определение производят в пробирках, объемы могут изменяться при условии неизменности соотношений компонентов в смесях.

Перед началом испытания все растворы быстро нагревают на водяной бане до 37 °С.

В ряд ячеек распределяют по 20 мкл нормальной человеческой плазмы и по 20 мкл *раствора антитромбина III P1*. Прибавляют в ячейки ряда по 20, 60, 100 и 140 мкл испытуемого раствора или раствора сравнения и доводят объемы в каждой из ячеек до

200 мкл с использованием буфера для разведений (содержание гепарина в конечной смеси 0,02–0,08 МЕ/мл).

Метод конечной точки. По 40 мкл содержимого каждой из ячеек переносят во второй ряд ячеек, прибавляют по 20 мкл *раствора бычьего фактора Ха Р* и инкубируют при температуре 37 °С в течение 30 с. Прибавляют по 40 мкл раствора 1 ммоль/л хромогенного субстрата фактора Ха и инкубируют при 37 °С в течение 3 мин. Реакцию прерывают путем снижения показателя рН прибавлением подходящего реагента, например, 20 % (об/об) раствора *кислоты уксусной ледяной Р*, и определяют оптическую плотность при длине волны 405 нм (2.2.25). Обычно подходящей является продолжительность реакции от 3 мин до 15 мин, но допускаются отклонения от этого интервала при условии получения лучшей линейности зависимости отклика от дозы.

Кинетический метод. По 40 мкл содержимого каждой из ячеек переносят во второй ряд ячеек, прибавляют по 20 мкл *раствора бычьего фактора Ха Р* и инкубируют при температуре 37 °С в течение 30 с. Прибавляют по 40 мкл раствора 2 ммоль/л хромогенного субстрата фактора Ха, инкубируют при температуре 37 °С и регистрируют скорость расщепления субстрата путем постоянного измерения оптической плотности при длине волны 405 нм (2.2.25), определяя таким образом начальную скорость расщепления субстрата. Это значение должно находиться в линейной зависимости от остаточной концентрации фактора Ха.

Проверяют достоверность определения и рассчитывают активность гепарина в испытуемом образце с использованием обычных статистических методов, подходящих для анализа результатов измерения углов наклона (например, 5.3).

01/2013:20713

2.7.13. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ИММУНОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

АНТИ-D-

МЕТОД А

Активность человеческого анти-D-иммуноглобулина определяют путем сравнения количества образца, необходимого для агглютинации D-положительных эритроцитов, с количеством стандартного образца, калиброванного в Международных Единицах, необходимым для получения того же эффекта.

За Международную Единицу принимают активность установленного количества Международного стандартного образца. Эквивалентность Международного стандартного образца в Международных Единицах устанавливается Всемирной организацией здравоохранения.

БСП человеческого анти-D-иммуноглобулина калиброван в Международных Единицах в сравнении с Международным стандартным образцом и предназначен для использования в количественных определениях человеческого анти-D-иммуноглобулина.

Используют пул D-положительных эритроцитов, собранных не более чем за 7 дней до испытания, хранившихся соответствующим образом и полученных не менее чем от четырех групп доноров с группой O R₁R₁. К подходящему объему клеток, предварительно трижды промытых раствором 9 г/л *натрия хлорида Р*, прибавляют равный объем *раствора бромелайнов Р*, выдерживают при температуре 37 °С в течение 10 мин, центрифугируют, отделяют супернатант и промывают трижды раствором 9 г/л *натрия хлорида Р*. 20 объемов эритроцитов суспендируют в смеси из 15 объемов инертной сыворотки, 20 объемов раствора 300 г/л *бычьего альбумина Р* и 45 объемов раствора 9 г/л *натрия хлорида Р*. Полученную суспензию охлаждают ледяной водой при постоянном перемешивании.

С использованием калиброванного автоматического прибора для разведения и раствора для разведений, содержащего 5 г/л *бычьего альбумина Р* и 9 г/л *натрия хлорида Р*, готовят подходящие разведения испытуемого образца и стандартного образца.

Определение обычно проводят по изложенной ниже методике, используя соответствующий прибор для непрерывного автоматического гемолитического анализа. Температуру в трубопроводе, за исключением инкубационных ячеек, поддерживают на уровне 15,0 °С. Вводят с помощью насоса в трубопровод аппарата суспензию эритроцитов

со скоростью 0,1 мл/мин и раствор 3 г/л метилцеллюлозы 450 Р со скоростью 0,05 мл/мин. В течение 2 мин со скоростью 0,1 мл/мин вводят разведения испытуемого образца и стандартного препарата. Перед введением очередного разведения вводят в течение 4 мин со скоростью 0,1 мл/мин раствор для разведений. Вводят воздух со скоростью 0,6 мл/мин. Инкубируют при температуре 37 °С в течение 18 мин, после чего рассеивают столбики эритроцитов путем введения со скоростью 1,6 мл/мин раствора 9 г/л натрия хлорида Р, содержащего подходящий увлажняющий агент (например, полисорбат 20 Р в окончательной концентрации 0,2 г/л) для предотвращения разрушения аппликаций. После оседания агглютинатов дважды декантируют: вначале со скоростью 0,4 мл/мин, затем – со скоростью 0,6 мл/мин. Эритроциты, не подвергшиеся агглютинации, лизируют раствором, содержащим 5 г/л октоксинола 10 Р, 0,2 г/л калия феррицианида Р, 1 г/л натрия гидрокарбоната Р и 0,05 г/л калия цианида Р и подаваемым со скоростью 2,5 мл/мин. Система включает петлю для получения десятиминутной задержки, необходимой для конверсии гемоглобина. Оптическую плотность (2.2.25) гемолизата регистрируют непрерывно при длине волны, выбранной в интервале от 540 нм до 550 нм. Определяют диапазон концентраций антител, на протяжении которого существует линейная зависимость между концентрацией и полученным изменением оптической плотности (ΔA). Исходя из полученных результатов строят градуировочную кривую, участок линейности которой используют для определения активности испытуемого образца.

Активность испытуемого образца рассчитывают с использованием обычных статистических методов (5.3).

МЕТОД В

Активность человеческого анти-D-иммуноглобулина определяют методом конкурентного твердофазного иммуоферментного анализа, производимого на титрационных микропланшетах, покрытых эритроцитами. Метод основан на конкурентном связывании между поликлональным препаратом анти-D-иммуноглобулина и биотинированными моноклональными анти-D-антителами, направленными против специфического эпитопа D-антигена. Активность испытуемого образца сравнивают со стандартным образцом, калиброванным в Международных Единицах.

За Международную Единицу принимают активность установленного количества Международного стандартного образца. Эквивалентность Международного стандартного образца в Международных Единицах устанавливается Всемирной организацией здравоохранения.

БСП человеческого анти-D-иммуноглобулина калиброван в Международных Единицах в сравнении с Международным стандартным образцом и предназначен для использования в количественных определениях человеческого анти-D-иммуноглобулина.

МАТЕРИАЛЫ

Реагенты, для которых нет особых указаний, должны быть аналитической степени чистоты.

СФБ (раствор натрия хлорида в фосфатном буферном растворе, PBS). 8,0 г натрия хлорида Р, 0,76 г динатрия гидрофосфата безводного Р, 0,2 г калия хлорида Р, 0,2 г калия дигидрофосфата Р и 0,2 г натрия азиды Р растворяют в воде Р и доводят до объема 1000 мл этим же растворителем.

СТБ (раствор натрия хлорида в трисбуферном растворе, TBS). 8,0 г натрия хлорида Р и 0,6 г трис(гидроксиметил)аминометана Р растворяют в воде Р, доводят 1 М раствором хлористоводородной кислоты до pH 7,2 (2.2.3) и разводят водой Р до объема 1000 мл.

Раствор папаина. Раствор готовят перемешиванием при 37 °С в течение 30 мин 1 г папаина Р в 10 мл 0,067 М фосфатного буферного раствора pH 5,4 Р, центрифугированием при 10 000 g в течение 5 мин и фильтрованием через мембранный фильтр или фильтр с размером пор 0,22 мкм. Для активации смешивают 1 мл фильтрата, 1 мл раствора 48,44 г/л L-цистеина Р и 1 мл раствора 3,72 г/л натрия эдетата Р и доводят 0,067 М фосфатным буферным раствором pH 5,4 Р до объема 10 мл. Аликвоты замораживают при температуре –20 °С или ниже.

Эритроциты. Используют пул В-положительных эритроцитов, полученных не менее чем из трех групп доноров с группой O R₂R₂. Клетки четырежды промывают СФБ. Центрифугируют при 1800 g в течение 5 мин, смешивают подходящий объем предварительно нагретых упакованных клеток с подходящим объемом предварительно нагретого раствора папаина (объемное соотношение 2:1 является подходящим) и инкубируют при температуре 37 °C в течение 10 мин. Клетки четырежды промывают СФБ. Хранят при температуре 4 °C с подходящим стабилизатором не более недели.

Биотинированный Brad-5. Используют в соответствии с инструкциями.

Щелочной авидин-стрептавидиновый реагент, связанный с фосфатазой. Предпочтительно использовать модифицированный реагент, сочетающий высокую специфическую активность с низким уровнем неспецифического связывания. Используют в соответствии с инструкциями.

Раствор субстрата. Используют пара-нитрофенилфосфат в соответствии с инструкциями.

Буфер для фиксации клеток. 18,02 г глюкозы R, 4,09 г натрия хлорида R, 1,24 г борной кислоты R, 10,29 г натрия цитрата R и 0,74 г натрия эдетата R растворяют в воде R. Доводят 1 M раствором натрия гидроксида или 1 M раствором хлористоводородной кислоты до pH 7,2–7,3 (2.2.3) и разводят водой R до объема 1000 мл. Хранят при температуре 4 °C. Используют непосредственно из места хранения.

Раствор глутарового альдегида. Непосредственно перед применением 90 мкл раствора 250 г/л глутарового альдегида R прибавляют к 24 мл холодного СФБ.

Титрационные микропланшеты. Планшеты, предназначенные для покрытия эритроцитами, представляют собой плоскодонные планшеты из полистирола со свойствами поверхности, оптимизированными для иммуноферментного анализа, и с большой емкостью в отношении связывания с белками. Планшеты, используемые для приготовления разведений иммуноглобулина, представляют собой планшеты из полистирола или поливинилхлорида с U- или V-образными формами ячеек.

МЕТОДИКА

Готовят 0,1 % (об/об) суспензию обработанных папаином эритроцитов в холодном буфере для фиксации клеток. В каждую ячейку плоскодонного титрационного микропланшета помещают по 50 мкл суспензии.

Планшет центрифугируют при 350 g в течение 3 мин предпочтительно при температуре 4 °C. Не удаляя супернатант, к содержимому каждой из ячеек осторожно прибавляют по 100 мкл раствора глутарового альдегида и выдерживают в течение 10 мин. Содержимое ячеек сливают путем быстрого переворачивания планшета и трижды промывают каждую ячейку 250–300 мкл СФБ. Эта операция может производиться либо вручную, либо с использованием автоматического устройства для промывания планшетов. Планшет либо используют в нижеописанном испытании, либо после сливания СФБ, прибавления в каждую ячейку по 100 мкл буфера для фиксации клеток и запечатывания пластиковой пленкой хранят при температуре 4 °C не более 1 месяца.

Испытуемые растворы. В случае лиофильно высушенных препаратов их восстанавливают в соответствии с указаниями на этикетке. Готовят в четырех независимых повторностях 5 серийных двукратных разведений, начиная с концентрации 30 МЕ/мл с использованием СФБ, содержащего 10 г/л бычьего альбумина R. При необходимости исходное разведение корректируют с целью получения откликов, попадающих в область линейности графика зависимости отклика от дозы.

Растворы сравнения. Восстанавливают стандартный образец в соответствии с указаниями на этикетке. Готовят в четырех независимых повторностях 5 серийных двукратных разведений, начиная с концентрации 30 МЕ/мл с использованием СФБ, содержащего 10 г/л бычьего альбумина R.

В ячейки каждого из рядов титрационного микропланшета с U- или V-образными формами ячеек вносят по 35 мкл каждого из разведений испытуемого раствора или раствора сравнения. К содержимому каждой из ячеек прибавляют по 35 мкл биотинированного Brad-5 с содержанием 250 нг/мл.

Освобождают ячейки планшета, покрытого эритроцитами, путем переворачивания и высушивания бумажным полотенцем. Прибавляют по 250 мкл СФБ, содержащего 20 г/л *бычьего альбумина Р* и выдерживают при комнатной температуре в течение 30 мин.

Освобождают ячейки планшета, покрытого эритроцитами, путем переворачивания и высушивания бумажным полотенцем и помещают в каждую из ячеек по 50 мкл каждого из разведений испытуемого раствора и раствора сравнения, содержащих биотинированный *Brad-5*.

50 мкл СФБ, содержащего 10 г/л *бычьего альбумина Р*, используют в качестве отрицательного контроля. Планшет запечатывают пластиковой пленкой и инкубируют при комнатной температуре в течение 1 ч.

Удаляют жидкость из ячеек планшета, покрытого эритроцитами, и трижды промывают каждую ячейку 250–300 мкл СТБ.

Щелочной авидин-стрептавидиновый реагент, связанный с фосфатазой, разбавляют СТБ, содержащим 10 г/л *бычьего альбумина Р*, и прибавляют в количестве по 50 мкл в каждую из ячеек. Инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре.

Удаляют жидкость из ячеек планшета, покрытого эритроцитами, и трижды промывают каждую ячейку 250–300 мкл СТБ.

В каждую из ячеек прибавляют по 100 мкл раствора субстрата и инкубируют в темноте при комнатной температуре в течение 10 мин. Для остановки реакции в каждую из ячеек прибавляют по 50 мкл *3 М раствора натрия гидроксида*. Измеряют значения оптической плотности при длине волны 405 нм и вычитают значение, полученное для отрицательного контроля. Значения оптической плотности в области линейности кривой титрования используют для оценки активности испытуемого образца с использованием обычных статистических методов (5.3).

МЕТОД С

Активность человеческого анти-D-иммуноглобулина определяют методом поточной цитометрии в формате титрационного микропланшета. Метод основан на специфическом связывании между анти-D-иммуноглобулином и D-положительными эритроцитами. Активность испытуемого образца сравнивают со стандартным образцом, калиброванным в Международных Единицах.

За Международную Единицу принимают активность установленного количества Международного стандартного образца. Эквивалентность Международного стандартного образца в Международных Единицах устанавливается Всемирной организацией здравоохранения.

БСП человеческого анти-D-иммуноглобулина калиброван в Международных Единицах в сравнении с Международным стандартным образцом и предназначен для использования в количественных определениях человеческого анти-D-иммуноглобулина.

МАТЕРИАЛЫ

Реагенты, для которых нет особых указаний, должны быть аналитической степени чистоты.

СФБ. 8,0 г *натрия хлорида Р*, 0,76 г *динатрия гидрофосфата безводного Р*, 0,2 г *калия хлорида Р*, 0,2 г *калия дигидрофосфата Р* и 0,2 г *натрия азиды Р* растворяют в *воде Р* и доводят до объема 1000 мл этим же растворителем.

Раствор СФБ-БСА. СФБ, содержащий 10,0 г/л *бычьего альбумина Р*.

Эритроциты. Используют D-положительные эритроциты, полученные из группы доноров с группой O R₁R₁ не более чем за две недели до определения. При необходимости хранят с соответствующим стабилизатором при температуре 4 °С. Клетки промывают не менее двух раз раствором СФБ-БСА и готовят суспензию, содержащую 1·10⁴, но не более 5·10⁴ клеток в микролитре с использованием раствора СФБ-БСА.

Используют D-отрицательные эритроциты, полученные из группы доноров с группой O rг и подготовленные аналогичным образом.

Вторичные антитела. Используют подходящий фрагмент анти-IgG-антитела, связанный с флуоресцентным красителем, обладающий специфичностью в отношении

человеческого IgG или его частей. Хранят и используют в соответствии с инструкциями изготовителя.

Титрационные микропланшеты. Используют плоскодонные планшеты без поверхностной обработки для иммуноферментного анализа.

МЕТОДИКА

Испытуемые растворы. В случае лиофильно высушенных препаратов их восстанавливают в соответствии с указаниями на этикетке. Готовят не менее чем в трех независимых повторностях не менее 3 серийных полутора- или двукратных разведений, начиная с концентрации в диапазоне 1,2–0,15 МЕ/мл, с использованием раствора СФБ-БСА. При необходимости исходное разведение корректируют с целью получения откликов, попадающих в область линейности графика зависимости отклика от дозы.

Растворы сравнения. Восстанавливают стандартный образец в соответствии с указаниями на этикетке. Готовят не менее чем в трех независимых повторностях не менее трех серийных полутораили двукратных разведений, начиная с концентрации в диапазоне 1,2–0,15 МЕ/мл, с использованием раствора СФБ-БСА. При необходимости исходное разведение корректируют с целью получения откликов, попадающих в область линейности графика зависимости отклика от дозы.

В каждую ячейку титрационного микропланшета распределяют по 50 мкл D-положительных эритроцитов. К содержимому ячеек каждого ряда прибавляют по 50 мкл каждого из разведений испытуемого раствора или раствора сравнения. Используют 50 мкл раствора СФБ-БСА в качестве отрицательного контроля. По 50 мкл D-отрицательных эритроцитов распределяют в четыре ячейки того же микропланшета и прибавляют по 50 мкл наименьшего разведения испытуемого образца. Для отслеживания ложных реакций распределяют по 50 мкл D-положительных эритроцитов в четыре ячейки того же микропланшета и прибавляют по 50 мкл раствора СФБ-БСА. Запечатывают пластиковой пленкой и инкубируют при температуре 37 °С в течение 40 мин.

Планшеты центрифугируют при 50 g в течение 3 мин, отбрасывают супернатант и промывают ячейки 200–250 мкл раствора СФБ-БСА. Повторяют промывку еще не менее одного раза. Планшеты центрифугируют при 50 g в течение 3 мин, отбрасывают супернатант и прибавляют по 50 мкл вторичного антитела, разведенного раствором СФБ-БСА до подходящей концентрации белка. Запечатывают пластиковой пленкой и инкубируют при комнатной температуре в защищенном от света месте в течение 20 мин.

Планшеты центрифугируют при 50 g в течение 3 мин, отбрасывают супернатант и промывают ячейки 200–250 мкл раствора СФБ-БСА. Повторяют промывку еще не менее одного раза. Планшеты центрифугируют при 50 g в течение 3 мин, клетки ресуспендируют в 200–250 мкл раствора СФБ-БСА.

Суспензию клеток переносят в трубку, совместимую с имеющимся оборудованием для поточной цитометрии, и проводят дальнейшее разбавление прибавлением СФБ для обеспечения подходящей скорости потока.

Немедленно приступают к измерению медианной интенсивности флуоресценции в поточном цитометре. Регистрируют не менее 10 000 событий без гейтинга, но с исключением шумов. С использованием медианной интенсивности флуоресценции в области линейности кривой зависимости отклика от дозы оценивают активность испытуемого образца обычными статистическими методами (5.3).

01/2013:20714

2.7.14. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИГЕННОЙ (ИММУНОГЕННОЙ) АКТИВНОСТИ ВАКЦИНЫ ГЕПАТИТА А

Количественное определение вакцины гепатита А производят либо *in vivo*, путем сравнения ее способности приводить в данных условиях к образованию специфических антител у мышей с такой же способностью стандартного образца, либо *in vitro*, путем иммунохимического определения содержания антигена.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ *IN VIVO*

Испытание на мышах, описанное ниже, приводится в качестве примера подходящего для данной вакцины метода; могут использоваться и другие валидированные методы.

Выбор и распределение испытуемых животных. В испытании используют здоровых мышей подходящей линии из одной партии возрастом около 5 недель, одного пола. Животных делят не менее чем на семь равных групп; количество мышей в группе должно быть подходящим для выполнения требований испытания.

Определение антигенной активности испытуемой вакцины. Готовят не менее трех серийных разведений испытуемой вакцины и соответствующие разведения стандартного препарата с использованием раствора 9 г/л *натрия хлорида Р*, содержащего алюминийсодержащий адъювант, используемый в вакцине. Каждое разведение назначают одной из групп мышей, каждой из которых вводят подкожно не более 1,0 мл этого разведения. Контрольной невакцинированной группе вводят подкожно такой же объем раствора 9 г/л *натрия хлорида Р*, содержащего адъювант, используемый в вакцине. Через 28–32 дня всех животных анестезируют и производят забор крови. Индивидуальные сыворотки хранят отдельно друг от друга. Выполняют количественное определение специфических антител к вирусу гепатита А в индивидуальных сыворотках, используя подходящий иммунохимический метод (2.7.1).

Расчеты. Расчеты проводят обычными статистическими методами, используемыми для количественных определений с конечным числом возможных результатов (5.3).

Из распределения уровней реакции, измеренных для всех сывороток группы невакцинированных животных определяют максимальный ожидаемый уровень реакции невакцинированного животного в данном количественном определении. При получении отклика, превышающего этот уровень, у вакцинированного животного, его по определению считают результатом сероконверсии.

Производят подходящее преобразование (например, пробит-преобразование) процентной численности животных с обнаруженной сероконверсией в каждой из групп и анализируют данные в соответствии с моделью параллельных линий логарифмической зависимости дозы от отклика. Активность испытуемого образца определяют относительно стандартного образца.

Условия достоверности. Результаты испытания являются достоверными, если:

- как для испытуемой вакцины, так и для стандартного образца ED₅₀ заключена в интервале между наибольшей и наименьшей дозами, введенными животным;
- статистический анализ подтверждает отсутствие отклонений в линейности и параллелизме;
- границы доверительного интервала ($P = 0,95$) относительной активности не менее 33 % и не более 300 % установленной активности.

Требования к активности. Верхняя граница доверительного интервала ($P = 0,95$) оцениваемой относительной активности должна быть не менее 1,0.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ *IN VITRO*

Выполняют иммунохимическое определение (2.7.1) содержания антигена с критериями приемлемости, валидированными в сравнении с испытанием *in vivo*. Критерии приемлемости для данного стандартного образца подлежат утверждению компетентными органами с учетом данных валидации.

БСП вакцина гепатита А (инактивированная, не адсорбированная) пригодна для использования в качестве стандартного образца.

01/2013:20715

2.7.15. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВАКЦИНЫ ГЕПАТИТА В (рДНК)

Количественное определение вакцины гепатита В (рДНК, *rDNA*) производят либо *in vivo*, путем сравнения ее способности приводить в данных условиях к образованию специфических антител против поверхностного антигена гепатита В (HbsAg) у мышей или

морских свинок с такой же способностью стандартного образца, либо *in vitro*, путем иммунохимического определения содержания антигена.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ *IN VIVO*

Выбор и распределение испытуемых животных. В испытании используют здоровых мышей из одной партии возрастом около 5 недель. Используемая в данном испытании линия мышей должна обеспечивать получение существенного уклона кривой зависимости отклика от дозы в отношении антигена; подходящими являются мыши гаплотипов H-2^a и H-2^d. Также могут использоваться здоровые морские свинки из одной партии с массой тела от 300 г до 350 г и возрастом около 7 недель. Используют животных одного пола. Животных делят не менее чем на семь равных групп; количество в группе должно быть подходящим для выполнения требований испытания.

Определение активности испытуемой вакцины. Готовят не менее трех серийных разведений испытуемой вакцины и соответствующие разведения стандартного образца с использованием раствора 9 г/л *натрия хлорида* *P* с добавлением алюминийсодержащего адьюванта, используемого в вакцине, или другого подходящего растворителя. Каждое из полученных разведений назначают одной из групп животных, каждому из которых вводят внутрибрюшинно не более 1,0 мл этого разведения. Одну группу животных не вакцинируют, а вводят внутрибрюшинно такой же объем растворителя. Через подходящий промежуток времени (например, от 4 до 6 недель) всех животных анестезируют и производят забор крови. Индивидуальные сыворотки хранят отдельно друг от друга. Выполняют количественное определение специфических антител против HBsAg в индивидуальных сыворотках, используя подходящий иммунохимический метод (2.7.1).

Расчеты. Расчеты проводят обычными статистическими методами, используемыми для количественных определений с конечным числом возможных результатов (5.3).

Из распределения уровней реакции, измеренных для всех сывороток группы невакцинированных животных, определяют максимальный ожидаемый уровень реакции невакцинированного животного в данном количественном определении. При получении отклика, превышающего этот уровень, у вакцинированного животного, его по определению считают результатом сероконверсии.

Производят подходящее преобразование (например, пробит-преобразование) процентной численности животных с обнаруженной сероконверсией в каждой из групп и анализируют данные в соответствии с моделью параллельных линий логарифмической зависимости дозы от отклика. Активность препарата определяют относительно активности стандартного образца.

Условия достоверности. Результаты испытания являются достоверными, если:

- как для испытуемой вакцины, так и для стандартного образца ED₅₀ заключена в интервале между наибольшей и наименьшей дозами, введенными животным;
- статистический анализ подтверждает отсутствие отклонений в линейности и параллелизме;
- границы доверительного интервала ($P = 0,95$) относительной активности не менее 33 % и не более 300 % установленной активности.

Требования к активности. Верхняя граница доверительного интервала ($P = 0,95$) оцениваемой относительной активности должна быть не менее 1,0.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ *IN VITRO*

Выполняют иммунохимическое определение (2.7.1) содержания антигена с критериями приемлемости, валидированными в сравнении с испытанием *in vivo*.

Показано, что методы твердофазного иммуноферментного анализа (тИФА, *ELISA*) и радиоиммунологического анализа (РИА) с использованием моноклональных антител, специфичных к индуцирующим защитную реакцию эпитопам HBsAg, являются подходящими. Используют соответствующее число разведений испытуемой вакцины и стандартного препарата. Полученные данные, которые могут быть подвергнуты преобразованию, анализируют методом параллельных линий. Наборы для оценки HBsAg *in vitro* являются коммерчески доступными, и возможна адаптация методов их использования для определения активности *in vitro*.

Критерии приемлемости для данного стандартного образца подлежат утверждению компетентными органами с учетом данных валидации.

01/2013:20716

2.7.16. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВАКЦИНЫ КОКЛЮША (БЕСКЛЕТОЧНОЙ)

Способность вакцины вызывать образование специфических антител сравнивают с аналогичным свойством параллельно испытываемого стандартного препарата; антитела определяют с использованием подходящего иммунохимического метода (2.7.1), например, твердофазного иммуноферментного анализа (тИФА, *ELISA*). В приведенном ниже описании испытания на мышах используется трехточечная модель, однако, после валидации для рутинных испытаний может быть использован метод однократного разведения.

Стандартная вакцина. В качестве стандартной вакцины используют партию вакцины, эффективность которой доказана клиническими испытаниями, или репрезентативную партию этой вакцины. Для приготовления репрезентативной партии необходимо строгое соблюдение технологического процесса при производстве партии, подвергающейся клиническим испытаниям. Стабильность вакцины сравнения должна быть документально подтверждена.

Стандартная антисыворотка. В качестве стандартной антисыворотки возможно использовать БСП мышинной антисыворотки *Bordetella pertussis*.

Требования. Способность вакцины вызывать образование антител не должна быть существенно ниже ($P = 0,95$) по сравнению с аналогичным свойством стандартного образца.

Следующая модель испытания приводится в качестве примера метода, пригодность которого для данного испытания подтверждена.

Отбор и распределение испытуемых животных. В испытании используют здоровых мышей (например, линии CD1) из одной партии возрастом от 4 до 8 недель. Животных распределяют по шести группам, состоящим из количества особей, достаточного для выполнения требований испытания. Используют три разведения испытуемой вакцины и три разведения стандартного образца и назначают каждой из групп одно из разведений. Каждому животному внутрибрюшинно или подкожно вводят по 0,5 мл разведения, которое было назначено группе, к которой данное животное относится.

Отбор образцов сыворотки. Через 4–5 недель после вакцинации проводят забор крови у мышей под анестезией. Сыворотки до определения содержания антител хранят при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Определение антител. Выполняют количественное определение содержания специфических в отношении каждого из компонентов антител в сыворотках с использованием метода с подтвержденной достоверностью, например, *ELISA*, методика которого приведена ниже.

Испытание ELISA. Титрационные микропланшеты, выполненные из поливинилхлорида или полистирола, в соответствии с требованиями специфического антигена покрывают очищенным антигеном в концентрации 100 нг на одну ячейку. После промывки непрореагировавшие участки блокируют путем инкубации с раствором бычьего сывороточного альбумина и последующей промывки. Производят на планшетах двукратные разведения сывороток мышей, иммунизированных испытуемой вакциной и стандартной вакциной. После инкубации при температуре $22\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 1 ч планшеты промывают. После промывки добавляют хромогенный субстрат, высвобождающий под воздействием присоединенного ферментного конъюгата хромофор, который может быть количественно определен путем измерения оптической плотности (2.2.25). Выбирают такие условия испытания, чтобы в рабочем диапазоне измерений имелась линейная зависимость оптической плотности от содержания антител, а значения оптической плотности находились в пределах от 0,1 до 2,0.

В испытании используется контрольная антисыворотка установленной активности, служащая основанием для вычисления содержания антител в испытуемой сыворотке. Также в испытании используется стандартизированная контрольная сыворотка.

Результаты испытания являются недостоверными, если:

- значение, определенное для контрольной сыворотки, отличается от приписанной величины более чем на удвоенное значение стандартного отклонения;
- границы доверительного интервала ($P = 0,95$) относительной активности менее 50 % и более 200 % установленной активности. *Расчеты.* Рассчитывают титры антител в сыворотках мышей, иммунизированных испытуемой вакциной и стандартной вакциной, и из полученных значений с использованием обычных статистических методов определяют активность испытуемой вакцины относительно стандартной вакцины (5.3).

01/2013:20717

2.7.17. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИТРОМБИНА III ЧЕЛОВЕКА

Содержание антитромбина III в испытуемом образце определяют путем сравнения его способности к инаktivации тромбина в присутствии избыточного количества гепарина с такой же способностью стандартного образца антитромбина III человека, калиброванного в Международных Единицах. Различные количества испытуемого образца смешивают с определенным количеством тромбина и определяют активность остаточного количества тромбина с использованием подходящего хромогенного субстрата.

За Международную Единицу принимают активность установленного количества Международного стандартного образца концентрата антитромбина III человека. Эквивалентность Международного стандартного образца в Международных Единицах устанавливается Всемирной организацией здравоохранения.

Методика. Готовят два независимых ряда из трех или четырех разведений испытуемого образца и стандартного образца в диапазоне от 1/75 до 1/200 исходя из концентрации 1 МЕ/мл с использованием *буферного раствора трис-EDTA-BSA pH 8,4 P*, содержащего 15 МЕ гепарина в миллилитре.

По 200 мкл каждого из разведений выдерживают при температуре 37 °C в течение 1–2 мин. К каждому разведению прибавляют по 200 мкл раствора 2 МЕ/мл *бычьего тромбина P* в *буферном растворе трис-EDTA-BSA pH 8,4 P*, перемешивают и выдерживают при температуре 37 °C в течение ровно 1 мин. Прибавляют 500 мкл подходящего хромогенного субстрата (например, D-фенилаланил-L-пипеколил-L-аргинин-4-нитроанилида, растворенного в *воде P*, с получением раствора концентрацией 4 ммоль/л и дополнительно разведенного до концентрации, подходящей для проведения количественного определения с использованием *буферного раствора трис-EDTA-BSA pH 8,4 P* без добавления альбумина). Тотчас же начинают фиксировать изменение оптической плотности при длине волны 405 нм (2.2.25) и продолжают измерение в течение не менее 30 с. Рассчитывают скорость изменения оптической плотности ($\Delta A/\text{мин}$). (Определение также может производиться методом конечной точки путем прерывания реакции прибавлением уксусной кислоты и измерением оптической плотности при длине волны 405 нм).

Скорость изменения оптической плотности ($\Delta A/\text{мин}$) обратно пропорциональна активности антитромбина III.

Проверяют достоверность определения и рассчитывают активность испытуемого образца с использованием обычных статистических методов (5.3).

01/2013:20718

2.7.18. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФАКТОРА СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ II ЧЕЛОВЕКА

Количественное определение фактора свертывания крови II производят по его специфической активации с образованием фактора IIa. Фактор IIa оценивают на основании

сопоставления его активности по расщеплению специфического хромогенного пептидного субстрата с такой же активностью Международного стандартного образца или стандартного образца, калиброванного в Международных Единицах.

За Международную Единицу принимают активность фактора II в установленном количестве Международного стандартного образца, состоящего из лиофилизированного концентрата человеческого фактора свертывания крови II. Эквивалентность Международного стандартного образца в Международных Единицах устанавливается Всемирной организацией здравоохранения.

Хромогенный метод количественного определения включает две последовательные стадии: индуцируемая змеиным ядом активация фактора II и ферментативное расщепление хромогенного субстрата фактором IIa с образованием хромофора, который определяют спектрофотометрически. В соответствующих условиях испытания существует линейная зависимость между активностью фактора IIa и расщеплением хромогенного субстрата.

РЕАГЕНТЫ

Специфический активатор фактора II из яда эфы (Экарин). Белок, получаемый из яда эфы (*Echis carinatus*), специфически активирующий фактор II, восстанавливают в соответствии с инструкциями производителя. Восстановленный препарат хранят при температуре 4 °С и используют в течение 1 месяца.

Хромогенный субстрат фактора IIa. Специфический хромогенный субстрат для фактора IIa, например: *H*-D-фенилаланил-L-пипеколил-L-аргинин 4-нитроанилида дигидрохлорид, 4-толуолсульфонил-глицил-пролил-L-аргинин-4-нитроанилид, *H*-D-циклогексилглицил- α -аминобутирил-L-аргинин-4-нитроанилид, D-циклогексилглицил-L-аланил-L-аргинин-4-нитроанилида диацетат. Восстанавливают в соответствии с инструкциями изготовителя.

Буфер для разведений. Раствор, содержащий 6,06 г/л *трис*(гидроксиметил)аминометана *R*, 17,53 г/л *натрия хлорида R*, 2,79 г/л (этилендинитрил)тетрауксусной кислоты *R* и 1 г/л *бычьего альбумина R* или *человеческого альбумина R*. При необходимости доводят до pH 8,4 *кислотой хлористоводородной R*.

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Испытуемый раствор. Испытуемый образец разбавляют буфером для разведений, получая раствор с содержанием 0,015 МЕ фактора II в миллилитре. Готовят не менее трех дальнейших разведений с использованием того же буфера.

Раствор сравнения. Стандартный образец разбавляют буфером для разведений, получая раствор с содержанием 0,015 МЕ фактора II в миллилитре. Готовят не менее трех дальнейших разведений с использованием того же буфера.

Все растворы перед испытанием нагревают на водяной бане до 37 °С.

Нижеописанные условия определения относятся к титрационным микропланшетам. Если определение производят в пробирках, объемы могут изменяться при условии неизменности соотношений компонентов в смесях.

Определение выполняют с использованием титрационного микропланшета, поддерживаемого при температуре 37 °С. По 25 мкл каждого из разведений испытуемого раствора или раствора сравнения вносят в каждый из рядов ячеек. К содержимому каждой ячейки прибавляют по 125 мкл буфера для разведений, затем по 25 мкл экарина и инкубируют ровно 2 мин. К содержимому каждой ячейки прибавляют по 25 мкл хромогенного субстрата фактора IIa.

Регистрируют скорость изменения оптической плотности (2.2.25) при длине волны 405 нм непрерывно в течение 3 мин и получают среднюю скорость изменения оптической плотности (ΔA /мин). При невозможности непрерывной регистрации оптическую плотность при 405 нм регистрируют с подходящими последовательными интервалами, например, продолжительностью 40 с, строят на миллиметровой бумаге график зависимости оптической плотности от времени и вычисляют из уклона полученной прямой значение ΔA /мин. Из значений ΔA /мин для каждого разведения испытуемого и стандартного

образцов рассчитывают активность испытуемого образца и проверяют достоверность определения с использованием обычных статистических методов (5.3).

01/2013:20719

2.7.19. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФАКТОРА СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ X ЧЕЛОВЕКА

Количественное определение фактора свертывания крови X производят по его специфической активации с образованием фактора Ха. Фактор Ха оценивают на основании его активности по расщеплению специфического хромогенного пептидного субстрата с такой же активностью Международного стандартного образца или стандартного образца, калиброванного в Международных Единицах.

За Международную Единицу принимают активность фактора X в установленном количестве Международного стандартного образца, состоящего из лиофилизированного концентрата человеческого фактора свертывания крови X. Эквивалентность Международного стандартного образца в Международных Единицах устанавливается Всемирной организацией здравоохранения.

Хромогенный метод количественного определения включает две последовательные стадии: индуцируемая змеиным ядом активация фактора X и ферментативное расщепление хромогенного субстрата фактором Ха с образованием хромофора, который определяют спектрофотометрически. В соответствующих условиях испытания существует линейная зависимость между активностью фактора Ха и расщеплением хромогенного субстрата.

РЕАГЕНТЫ

Специфический активатор фактора X из яда цепочной гадюки (RVV). Белок, полученный из яда цепочной гадюки (*Vipera russelli*), который специфически активирует фактор X. Восстанавливают в соответствии с инструкциями производителя. Восстановленный препарат хранят при температуре 4 °C и используют в течение 1 месяца.

Хромогенный субстрат фактора Ха. Специфический хромогенный субстрат для фактора Ха, например: N-α-бензилоксикарбонил-D-аргинил-L-глицил-L-аргинин-4-нитроанилида дигидрохлорид, N-бензоил-L-изолейцил-L-глутамил-глицил-L-аргинин-4-нитроанилида гидрохлорид, метансульфонил-D-лейцил-глицил-L-аргинин-4-нитроанилид, метоксикарбонил-D-циклогексилаланил-глицил-L-аргинин-4-нитроанилида ацетат. Восстанавливают в соответствии с инструкциями изготовителя.

Буфер для разведений. Раствор, содержащий 3,7 г/л трис(гидроксиметил)аминометана R, 2,1 г/л имидазола R, 0,02 г/л гексадиметрина бромида R и 1 г/л бычьего альбумина R или человеческого альбумина R. При необходимости доводят кислотой хлористоводородной R до pH 8,4.

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Испытуемый раствор. Испытуемый образец разбавляют буфером для разведений, получая раствор с содержанием 0,18 МЕ фактора X в миллилитре. Готовят не менее трех дальнейших разведений с использованием того же буфера.

Раствор сравнения. Стандартный образец разбавляют буфером для разведений, получая раствор с содержанием 0,18 МЕ фактора X в миллилитре. Готовят не менее трех дальнейших разведений с использованием того же буфера.

Все растворы перед испытанием быстро нагревают на водяной бане до 37 °C.

Нижеописанные условия определения относятся к титрационным микропланшетам. Если определение производят в пробирках, объемы могут изменяться при условии неизменности соотношений компонентов в смесях.

Определение выполняют с использованием титрационного микропланшета, поддерживаемого при температуре 37 °C. По 12,5 мкл каждого из разведений испытуемого раствора или раствора сравнения вносят в каждый из рядов ячеек. К содержимому каждой ячейки прибавляют по 25 мкл RVV и инкубируют ровно 90 с. К содержимому каждой

ячейки прибавляют по 150 мкл хромогенного субстрата фактора Ха, разбавленного в соотношении 1:6 буфером для разведений.

Регистрируют скорость изменения оптической плотности (2.2.25) при длине волны 405 нм непрерывно в течение 3 мин и получают среднюю скорость изменения оптической плотности ($\Delta A/\text{мин}$). При невозможности непрерывной регистрации оптическую плотность при 405 нм регистрируют с подходящими последовательными интервалами, например, продолжительностью 40 с, строят на миллиметровой бумаге график зависимости оптической плотности от времени и вычисляют из уклона полученной прямой значение $\Delta A/\text{мин}$. Из значений $\Delta A/\text{мин}$ для каждого разведения испытуемого и стандартного образцов рассчитывают активность испытуемого образца и проверяют достоверность определения с использованием обычных статистических методов (5.3).

01/2013:20720

2.7.20. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПОЛИОМИЕЛИТА *IN VIVO*

Способность вакцины вызывать образование нейтрализующих антител определяют *in vivo* по одному из следующих методов.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЦЫПЛЯТ ИЛИ МОРСКИХ СВИНОК

Готовят подходящий ряд, состоящий не менее чем из трех разведений испытуемой вакцины с использованием подходящего буферизированного раствора натрия хлорида. Морских свинок с массой тела 250–350 г или цыплят возрастом 3 недели распределяют по группам, состоящим из 10 особей, и назначают каждой из групп одно из разведений вакцины. Каждому животному внутримышечно вводят по 0,5 мл разведения, которое было назначено группе, к которой данное животное относится. Через 5–6 дней проводят забор крови и отделяют сыворотки. Определяют наличие в разведениях сывороток (1:4) нейтрализующих антител к каждому из человеческих полиовирусов: 1, 2 и 3. 100 CCID₅₀ вируса смешивают с разведением сыворотки и инкубируют при температуре 37 °C в течение 4,5–6 ч. Хранят при температуре (5±3) °C в течение 12–18 ч. Смеси прививают клеточным культурам для определения присутствия вирусов, не подвергшихся нейтрализации, и ведут регистрацию результатов в течение периода до 7 дней после инокуляции. Для каждой группы животных отмечают количество сывороток, в которых обнаружено наличие нейтрализующих антител, и вычисляют разведение вакцины, дающее такой отклик у 50 % животных. Параллельно выполняют контрольный опыт с использованием подходящего стандартного образца. Вакцина выдерживает испытание, если обнаруживается наличие нейтрализующих антител к каждому из трех типов вируса у 50 % животных в разведении вакцины в соотношении 1:100 или более.

ИСПЫТАНИЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КРЫС

Метод количественного определения *in vivo* состоит из внутримышечного введения в задние конечности не менее трех разведений испытуемой вакцины и вакцины сравнения с использованием для каждого разведения группы из 10 крыс подходящей линии не содержащих патогенов. Для получения достоверных результатов для всех серотипов часто бывает необходимо использовать четыре разведения. Количество животных в группе должно быть достаточным для получения результатов, отвечающих критериям достоверности; десяти крыс в группе обычно достаточно, хотя достоверные результаты могут быть получены и с меньшим числом животных в группе. Масса тела животного не должна отличаться более чем на 10 % от средней по группе. Каждой крысе вводят по 0,5 мл материала. Диапазон доз выбирают таким образом, чтобы получить дозовый отклик для всех трех типов полиовируса. Забор крови у животных производят через 20–22 дня. Определяют по отдельности нейтрализующие титры против всех трех типов полиовируса с использованием в качестве провокационных вирусов 100 CCID₅₀ штаммов *Sabin*, в качестве индикаторных клеток *Vero* или *Hep2* в условиях нейтрализации, состоящих в инкубации в течение 3 ч при температуре 35–37 °C и 18 ч при температуре 2–8 °C. Для получения

результатов производят фиксацию и окрашивание после семидневной инкубации при температуре 35 °С. Для признания определения достоверным необходимо показать, что титр провокационных вирусов находится в пределах от 10 CCID₅₀ до 1000 CCID₅₀, а титр нейтрализующих антител в контрольной сыворотке должен находиться в пределах двух двукратных разведений среднего геометрического титра сыворотки. Активность вакцины рассчитывают путем сопоставления количества респондеров на испытуемую вакцину и вакцину сравнения. Анализ выполняют с использованием пробит-метода или, после проверки достоверности, метода параллельных линий. В случае пробитметода для определения респондера необходимо установить граничный титр нейтрализующих антител для каждого из типов полиовируса. В связи с изменчивостью результатов в разных лабораториях определить общепринятые граничные значения не представляется возможным. Вместо этого граничные значения определяют в каждой лаборатории, основываясь не менее чем на трех результатах испытаний вакцины сравнения. За граничное значение принимают среднюю точку в шкале log₂ минимального и максимального значений среднего геометрического титров, вычисленных для ряда из трех или более испытаний. Для каждого из трех типов полиовируса активность вакцины не должна быть существенно ниже такой же активности стандартного образца. Результаты испытания являются достоверными, если:

- как для испытуемой вакцины, так и для стандартного образца ED₅₀ заключена в интервале между наибольшей и наименьшей дозами препарата, введенными животным;
- при статистическом анализе не выявляется отклонений от линейности и параллельности;
- границы доверительного интервала ($P = 0,95$) относительной активности находятся между 25 % и 400 % от оцененного значения активности.

Следующий раздел приводится для информации.

Руководство по отказу от проведения исследования *in vivo* вакцины против полиомиелита (инактивированной) и ее комбинированных препаратов

*Эта рекомендация относится к вакцинам, полученным на основе «диких» штаммов полиовирусов. Описанную процедуру валидации следует проводить для каждого продукта перед тем, как отказаться от анализа *in vivo*, и необходимо повторять в случае существенного изменения процесса производства, которое может повлиять на результаты исследования *in vitro* или *in vivo*.*

Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей требует, чтобы тесты на животных не проводились, если имеются удовлетворительные альтернативные научно обоснованные и практически доступные методы анализа.

Целью настоящего руководства является стимулирование отказа от исследований с использованием животных любого данного продукта, для которого существует метод *in vitro* анализа (определение D-антигена), обеспечивающий удовлетворительные результаты в ходе рутинного серийного контроля.

Для *in vivo* анализа испытание на крысах считается методом выбора.

Для вакцин, которые анализируют с использованием цыплят или морских свинок и для которых существуют утвержденные протоколы и устоявшаяся история производства, от проведения анализа *in vivo* можно отказаться, если исследования на крысах также применимы для их анализа и включены в валидационные исследования, описанные ниже.

Для еще не утвержденных вакцин, результаты анализа на крысах для всей готовой партии должны быть включены во все данные, представленные для демонстрации качества продукции до отказа от анализа *in vivo*.

С момента отказа от анализа *in vivo* партии вакцины должны выпускаться на основе анализа *in vitro*, и анализ *in vivo* не должен использоваться как альтернатива для выпуска партии, которая не соответствует требованиям при исследовании *in vitro*. Повторение анализа *in vitro* может быть выполнено в соответствии с утвержденной процедурой.

ИСПЫТАНИЯ

Следующие условия должны быть соблюдены перед выполнением валидационного исследования:

- соответствующий опыт в использовании анализа на крысах;
- полная валидация исследования D-антигена (линейность, повторяемость, промежуточная точность, погрешность и пределы количественного определения);
- установление критериев приемлемости для D-антиген теста, основанных на определенном числе последовательных исследований;
- установление соответствия продукции требованиям на основе исследования последних серий с применением действующей в настоящее время процедуры *in vivo* анализа; взятые в исследование серии должны соответствовать лотам, использованным для установления критериев приемлемости для теста на D-антиген, и должны представлять различные инактивированные культуры каждого из 3 типов вируса полиомиелита.

Валидационные исследования должны быть выполнены на:

- готовой серии, полученной в соответствии с действующим регламентом производства;
- двух несоответствующих требованиям сериях, полученных, например, путем прогрева нормальной вакцины или смешивания нормальной вакцины с термоинактивированной; титры при исследовании несоответствующих требованиям вакцин должны составлять примерно половину от нормальных.

Эти серии исследуются с применением в качестве стандарта гомологичных серий продукта:

- с применением утвержденного в настоящее время *in vivo* теста;
- с применением исследования на крысах в случае отсутствия утвержденного *in vivo* теста;
- с применением теста на D-антиген.

Отказ от анализа с использованием лабораторных животных является приемлемым, если репрезентативная серия готовой продукции соответствует требованиям при испытании *in vivo* и *in vitro*, а заведомо несоответствующие требованиям серии не проходят тесты. В случае, если заведомо несоответствующие серии не проходят тест на D-антиген, но удовлетворяют требованиям теста *in vivo*, последний может быть повторен.

01/2013:20721

2.7.21. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФАКТОРА ВИЛЛЕБРАНДА ЧЕЛОВЕКА

Биологические функции фактора Виллебранда (*von Willebrand*) многочисленны. В настоящее время для количественного определения могут использоваться его ристоцетиновая коферментная активность и коллаген-связывающая активность. Активность фактора Виллебранда человека определяется путем сравнения его активности в данных условиях с той же активностью стандартного образца, откалиброванного относительно Международного стандартного образца, при необходимости в Международных Единицах.

За Международную Единицу принимают активность установленного количества Международного стандартного образца, состоящего из лиофилизированного концентрата фактора Виллебранда человека. Эквивалентность Международного стандартного образца в Международных Единицах устанавливается Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ).

РИСТОЦЕТИНОВАЯ КОФЕРМЕНТНАЯ АКТИВНОСТЬ

Ристоцетиновая коферментная активность фактора Виллебранда определяется путем измерения агглютинации суспензии тромбоцитов в присутствии ристоцетина А. Испытание может проводиться количественными методами с использованием автоматизированного

оборудования или полуколичественным методом путем визуальной оценки конечной точки агглютинации в серии разведений. Количественные методы являются предпочтительными.

РЕАКТИВЫ

Суспензия тромбоцитов. Используют стандартизованные или фиксированные, например, формальдегидом или параформальдегидом, препараты свежеполученных и отмытых тромбоцитов человека. Суспензия может быть также лиофилизированной. При необходимости добавляется соответствующее количество ристоцетина А. Некоторые реактивы тромбоцитов могут содержать ристоцетин А.

Стандартный образец. Стандартный образец фактора Виллебранда представляет собой Международный стандартный образец ВОЗ концентрата фактора Виллебранда.

МЕТОДИКА

Полуколичественный метод. Готовят подходящие разведения испытуемого и стандартного образцов с использованием в качестве растворителя раствора, содержащего 9 г/л натрия хлорида *P* и 10–50 г/л альбумина человеческого *P*. К каждому разведению прибавляют соответствующее количество суспензии тромбоцитов и, при необходимости, ристоцетин А. Смешивают на предметном стекле путем аккуратного вращения в течение 1 мин. Выдерживают в течение еще 1 мин и учитывают результаты на темном фоне при боковом освещении. Последнее разведение, при котором четко наблюдается видимая агглютинация, представляет собой ристоцетиновый коферментный титр образца. В качестве отрицательного контроля используют растворитель.

Количественный метод. Восстанавливают содержимое 1 ампулы со стандартным и испытуемым образцами путем прибавления соответствующего рекомендуемого растворителя (например, воды *P*); используют незамедлительно. К восстановленным образцам прибавляют достаточное количество предварительного растворителя до получения растворов с активностью 0,5–2,0 МЕ/мл. Предварительный растворитель состоит из изотонического нехелатирующего буферного раствора, содержащего, например, 1–5 % человеческого или бычьего альбумина и трис(гидроксиметил)аминометан или имидазол, забуференного соответствующим образом.

Испытание выполняется в соответствии с инструкциями производителя не менее, чем на 2 сериях разведений, необходимых для получения не менее 3 различных концентраций в линейном диапазоне количественного определения.

Проверяют достоверность испытания и рассчитывают активность испытуемого образца с помощью обычных статистических методов (например, 5.3).

КОЛЛАГЕН-СВЯЗЫВАЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ

Связывание коллагена определяется с помощью иммуноферментного анализа на микропланшетах с сорбированным коллагеном. Метод основан на специфическом связывании фактора Виллебранда с фибриллами коллагена и последующим связыванием поликлональных антител к фактору Виллебранда, конъюгированных с ферментом, который при добавлении к хромогенному субстрату образует продукт, который может быть количественно определен спектрофотометрически. В соответствующих условиях существует линейная взаимосвязь между связыванием коллагена с фактом Виллебранда и оптической плотностью.

РЕАКТИВЫ

Коллаген. Используют природные лошадиные или человеческие фибриллы коллагена типа I или III. Для удобства обращения могут использоваться растворы коллагена.

Растворитель коллагена. 50 г глюкозы *P* растворяют в воде *P*, доводят значение pH полученного раствора до 2,7–2,9 с помощью 1 *M* раствора кислоты хлористоводородной и доводят водой *P* до объема 1000 мл.

СФБ (раствор натрия хлорида в фосфатном буферном растворе, PBS). 8,0 г натрия хлорида *P*, 1,05 г динатрия гидрофосфата дигидрата *P*, 0,2 г натрия дигидрофосфата *P* и 0,2 г калия хлорида *P* растворяют в воде *P*, доводят до значения pH полученного раствора

7,2 с помощью 1 М раствора натрия гидроксида или 1 М раствора кислоты хлористоводородной и доводят водой *P* до объема 1000 мл.

Промывочный буферный раствор. СФБ, содержащий 1 г/л полисорбата *P*.

Блокирующий реактив. СФБ, содержащий 1 г/л полисорбата *P* и 10 г/л сыворотки альбумина бычьего *P*.

Буферный раствор для разведения. СФБ, содержащий 1 г/л полисорбата *P* и 50 г/л сыворотки альбумина бычьего *P*.

Конъюгат. Кроличья антисыворотка против фактора Виллебранда человека, конъюгированная с пероксидазой хрена. Используют в соответствии с инструкциями производителя.

Раствор субстрата. Непосредственно перед использованием растворяют таблетку офенилендиамина дигидрохлорида и таблетку гидроперита в 20 мл воды *P* или используют соответствующий объем водорода пероксида. Хранят в защищенном от света месте.

Микропланшеты. Используют плоскодонные полистироловые планшеты со свойствами поверхности, оптимизированными для иммуноферментного анализа и с высокой способностью связывать белки.

МЕТОДИКА

Испытуемые растворы. Испытуемый образец восстанавливают в соответствии с указаниями на этикетке. Растворяют в буферном растворе для разведения до получения раствора, содержащего приблизительно 1 МЕ фактора Виллебранда. Готовят 2 серии из не менее 3 последовательных разведений с использованием буферного раствора для разведения.

Стандартные растворы. Стандартный образец восстанавливают в соответствии с указаниями и разводят буферным раствором для разведения до получения раствора, содержащего приблизительно 1 МЕ фактора Виллебранда. Готовят 2 серии из не менее 3 последовательных разведений с использованием буферного раствора для разведения. Раствор коллагена доводят до комнатной температуры и разводят растворителем коллагена до получения раствора, содержащего 30–75 мкг/мл коллагена, осторожно смешивают до получения однородной суспензии фибрилл коллагена. С помощью микропипетки в каждую лунку микропланшета вносят по 100 мкл полученной суспензии. Планшет накрывают пластиковой пленкой и оставляют на ночь при температуре 37 °С. Лунки планшета с сорбированным коллагеном сушат, переворачивая и высушивая бумажным полотенцем. В каждую лунку планшета прибавляют по 250 мкл промывочного буферного раствора. Лунки планшета сушат, переворачивая и высушивая бумажным полотенцем. Повторяют данную процедуру 3 раза. В каждую лунку планшета прибавляют по 250 мкл блокирующего реактива, накрывают планшет пластиковой пленкой и инкубируют при температуре 37 °С в течение 1 ч. Лунки планшета сушат, переворачивая и высушивая бумажным полотенцем. В каждую лунку планшета прибавляют по 250 мкл промывочного буферного раствора. Лунки планшета сушат, переворачивая и высушивая бумажным полотенцем. Повторяют данную процедуру 3 раза.

В лунки планшета прибавляют по 100 мкл каждого испытуемого и стандартного растворов. Прибавляют 100 мкл промывочного буферного раствора в серию лунок, сохраняемых в качестве отрицательного контроля. Планшет накрывают пластиковой пленкой и инкубируют при температуре 37 °С в течение 2 ч. Удаляют из планшета жидкость, переворачивая и высушивая бумажным полотенцем. Прибавляют по 250 мкл промывочного буферного раствора. Лунки планшета сушат, переворачивая и высушивая бумажным полотенцем. Повторяют данную процедуру 3 раза.

Готовят соответствующее разведение конъюгата (например, фактор разведения 1:4000) в *СФБ*, содержащего 5 г/л альбумина бычьего *P*, и прибавляют по 100 мкл в каждую лунку. Планшет накрывают пластиковой пленкой и инкубируют при температуре 37 °С в течение 2 ч. Удаляют из планшета жидкость, переворачивая и высушивая бумажным полотенцем. Прибавляют по 250 мкл промывочного буферного раствора. Лунки планшета сушат, переворачивая и высушивая бумажным полотенцем. Повторяют данную процедуру 3 раза.

В каждую лунку планшета прибавляют по 100 мкл раствора субстрата и инкубируют при комнатной температуре в темном месте в течение 20 мин. В каждую лунку прибавляют по 100 мкл 1 М раствора кислоты хлористоводородной.

Измеряют оптическую плотность при длине волны 492 нм. Используют значения оптической плотности для оценки активности испытуемого образца с использованием обычных статистических методов (5.3).

Результаты испытаний считают недостоверными, если оптическая плотность отрицательных контролей выше 0,05.

01/2013:20722

2.7.22. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФАКТОРА СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ XI ЧЕЛОВЕКА

Принцип исследования состоит в измерении способности препарата фактора XI сокращать время свертывания плазмы дефицитной по фактору XI. Реакция может быть ускорена путем добавления реагентов, содержащих фосфолипиды и контактные активаторы, каолин, кремнезем или эллагиевую кислоту.

Активность фактора XI в испытуемом лекарственном средстве оценивается путем сравнения кривой доза/эффект испытуемого образца с таковой для референсного образца, состоящего из нормальной человеческой плазмы.

1 единица фактора XI равна активности 1 мл нормальной человеческой плазмы. Нормальную человеческую плазму получают путем объединения в пул единиц плазмы, полученных не менее чем от 30 доноров, и хранят при температуре –30 °С и ниже.

Восстанавливают по отдельности испытуемый образец и стандартный образец в соответствии с указаниями на этикетке и используют немедленно. В случае необходимости определяют количество присутствующего гепарина (2.7.12) и нейтрализуют гепарин добавлением *протамина сульфата Р* (10 мкг протамина сульфата нейтрализуют 1 МЕ гепарина).

Испытуемый и стандартный образцы разводят человеческой плазмой, дефицитной по фактору XI (например, *субстрата плазмы Р3*), для получения растворов с содержанием от 0,5 ЕД/мл до 2,0 ЕД/мл. Готовят не менее трех разведений каждого образца, предпочтительно в дубликатах, используя подходящий буферный раствор (например, *имидазольный буферный раствор рН 7,3 Р*, содержащий 10 г/л бычьего или человеческого альбумина. Разведения используют немедленно.

При определении применяют аппаратуру, позволяющую многократно измерять время свертывания, либо проводят исследование при постоянной инкубации пробирок в водяной бане при температуре 37 °С.

В каждую пробирку помещают по 0,1 мл плазмы, дефицитной по фактору XI (например, *субстрата плазмы Р3*) и по 0,1 мл одного из разведений испытуемого или стандартного образца. К содержимому каждой пробирки прибавляют по 0,1 мл реагента активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ, *Activated Partial Thromboplastin Time – APTT*), содержащего фосфолипиды или контактный активатор, и инкубируют при температуре 37 °С в течение рекомендованного времени. В каждую пробирку прибавляют по 0,1 мл раствора 3,7 г/л *кальция хлорида Р*, предварительно подогретого до температуры 37 °С.

С помощью секундомера измеряют время коагуляции, т.е. интервал времени между прибавлением кальция хлорида и первыми признаками образования фибрина. Объемы реактивов, приведенные выше, могут быть адаптированы для используемых реагентов АЧТВ или аппаратуры. Рассчитывают активность с использованием обычных статистических методов (например, 5.3).

01/2013:20723

2.7.23. ПОДСЧЕТ КЛЕТОК CD34/CD45+ В ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ ПРОДУКТАХ

Эта глава описывает методологию определения числа CD34/CD45+ клеток, содержащихся в гемопоэтических биопрепаратах проведения иммунного мечения и анализа методом проточной цитометрии (2.7.24). Определение выполняют на основе одноплатформенного метода с использованием калиброванных флуоросфер после лизиса эритроцитов в образце крови при необходимости.

Этот метод применим ко всем типам биопрепаратов и цельной крови. Однако уровень точности делает его особенно подходящим для продуктов с очень низким содержанием CD34/CD45+ клеток.

Оценка качества трансплантата по подсчету CD34/CD45+ клеток

С помощью разнообразных исследований установлено, что 1–3 % клеток в костном мозге, выделяющие антиген поверхности клеток CD34, способны к восстановлению долгосрочного, многоросткового кроветворения после миелоаблативной терапии. CD34/CD45+ клетки также найдены в периферической крови нормальных людей, но они чрезвычайно редки (от 0,01 % до 0,1 %). Однако CD34/CD45+ клетки могут также быть мобилизованы из костного мозга в периферическую кровь в значительных количествах под действием гемопоэтических цитокинов, таких как гранулоцитарный колониестимулирующий фактор и/или химиотерапия. Техника, используемая для подсчета CD34/CD45+ клеток, должна соответствовать следующим требованиям:

- высокая чувствительность, так как гемопоэтические стволовые клетки встречаются редко;
- точность, чтобы обеспечить клинически значимые результаты;
- воспроизводимость, чтобы обеспечить клинически надежные результаты;
- скорость, чтобы обеспечить анализ в реальном времени.

Выбор параметров

Метод проточной цитометрии использует коммерчески доступные, конъюгированные флуорохром-меченные моноклональные антитела, стандартные процедуры окрашивания и лизиса цельной крови, а также стратегию установки системы пропуска данных с использованием светорассеивания и иммунофлуоресцентного анализа с применением комбинации всех CD45/CD34 моноклональных антител.

Возможно определение жизнеспособности CD34/CD45+ клеток с помощью соответствующей окраски нуклеиновых кислот красителями, не окрашивающими мембраны неповрежденных клеток (например, 7-аминоактиномицин D).

Выбор моноклональных антител

Антитела CD34. Для обнаружения всех гликозилированных вариантов молекулы (например, клон 8G12 или 581) используют класс III антител CD34. Для обнаружения редких происшествий используют антитела, конъюгированные с флуорохромами (например, фикоэритрином (*PE*)), имеющими максимальное свечение при использовании цитометра на основе аргонового лазера.

Антитела CD45. Необходимы антитела, которые способны обнаруживать все изоформы и все гликоформы со структурой CD45. Обычно используют антитела CD45, конъюгированные с флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ, *FITC*) в роли флуорохрома (например, J33, HLe1, 2D1).

Контроли изотипов и изоклонов. Для обнаружения неспецифичных сигналов в области использования *PE* анализируют негативный контроль. При применении контроля изотипов (моноклональные антитела к нерелевантным антигенам того же типа, что и используемые антитела CD45) *PE*-конъюгированный изотип объединяют с *CD45-FITC* (*PerCP*). При применении контроля изоклонов неконъюгированные (в избытке) и *PE*-конъюгированные моноклональные тела, идентичные CD34, объединяют с конъюгированными CD45. Могут быть использованы альтернативные комбинации.

Абсолютное количество CD34/CD45+

Калиброванные флуоросферы. В зависимости от применяемой технологии, внутренний стандарт или состоит из калиброванных сфер, находящихся в суспензии, или помещен непосредственно в присоединяемые пробирки производителем.

Абсолютное количество клеток CD34/CD45+ в миллилитре рассчитывают по формуле:

$$\frac{A}{B} \cdot C,$$

где:

A – количество подсчитанных клеток CD34/CD45+;

B – количество подсчитанных флуоросфер;

C – известная концентрация флуоросфер.

Стратегии селекции

Целью последовательной селекции является выбор популяции, представляющей интерес, и одновременная минимизация интерференции, вызываемой осколками и зрелыми клетками, с которыми могут неспецифически связываться антигены. При использовании коммерческих наборов применяют селекцию, рекомендованную производителем набора. При использовании собственной методики желательно применять существующие рекомендуемые критерии селекции. Стратегия селекции, учитывающая параметры рассеяния света и флуоресценцию CD34/CD45, будет способствовать правильной идентификации и подсчету клеток CD34/CD45+.

Количество анализируемых событий

Для достижения приемлемой точности анализируют достаточное количество событий, например, не менее 100 событий CD34+ и не менее 60 000 событий CD45+; общее количество клеток может быть выше при условии, если процентное содержание CD34 составляет 0,1 % или менее.

Сбор образцов

Антикоагулянтом при процедуре афереза является формула А кислой цитратной декстрозы (*ACD*). Данный антикоагулянт позволяет проводить на одном и том же образце как автоматический подсчет лейкоцитов, так и испытание с помощью проточной цитометрии. Антикоагулянтом выбора при отборе проб периферической крови является этилендиаминтетрауксусная кислота (*ЭДТА, EDTA*).

Транспортирование образцов

Условия транспортирования образцов должны гарантировать физическую и температурную безопасность образцов.

Целостность и хранение образцов

Могут быть исследованы свежие (хранившиеся не более 24 ч) образцы продуктов афереза, цельной крови, пуповинной крови или костного мозга. Старые образцы (хранившиеся более 24 ч) и образцы, которые претерпели заморозку и размораживание, должны окрашиваться красителями, позволяющими оценить количество живых клеток. При получении образцов проверяется температура внутри упаковки.

МЕТОДИКА

Приготовление образца

Перед окрашиванием с помощью моноклональных антител необходимо убедиться, что концентрация лейкоцитов является подходящей. При необходимости образец разводят средой, совместимой с испытуемым образцом и системой для лизиса. Отмечают коэффициент разведения. Рекомендуется проводить испытание с использованием отрицательного контроля.

Анализ с помощью проточной цитометрии

Автоматическая стандартизация

Для анализа клеток, меченных с применением коммерчески доступных наборов, производители разработали некоторые критерии для настройки проточного цитометра. Данные настройки затем автоматически переносятся в протокол анализа образцов. Для настройки фотоумножительной трубки на заданные значения используют специальные флуоросферы, устанавливают поправку и проверяют систему с помощью контрольных образцов.

Настройки системы

– *Дискриминатор/порог*: во избежание учета осколков (низкое прямое рассеяние), но не мелких форм лимфоцитов, в графике рассеяния света устанавливают порог прямого рассеяния.

– *Высоковольтные настройки фотоумножительной трубки*: они должны быть совместимы с анализом маркеров поверхности клеток и должны быть установлены в каждой лаборатории таким образом, чтобы была возможность различить негативные и позитивные популяции клеток с умеренной плотностью антигенов; напряжение фотоумножительной трубки необходимо периодически проверять и настраивать в соответствии с установленными в лаборатории процедурами.

– *Поправка*: она должна быть применима в случае перекрытий в видимом диапазоне спектра (например, *FITC/PE*), случающихся при анализе маркеров поверхности клеток; поправку на цвет анализируют и настраивают в соответствии с установленными в лаборатории процедурами.

– *Скорость потока*: должна подходить для рутинного анализа маркеров поверхности клеток.

– *Диапазоны селекции (ворота)*: диапазоны, установленные для анализа образцов CD34/CD45 оставляют неизменными для анализа отрицательного диапазона.

Расчет абсолютного количества клеток CD34/CD45+

Абсолютное количество клеток CD4/CD45+ рассчитывают по формуле:

$$n \cdot D \cdot V,$$

где:

n – общее количество клеток CD34/CD45+ в микролитре;

D – фактор разведения;

V – объем испытуемого образца, мкл.

Результаты испытания выражаются как в процентном содержании клеток CD34/CD45+, так и в абсолютном числе клеток на микролитр. Где это возможно, результаты могут быть выражены в абсолютном числе на килограмм массы тела реципиента.

01/2013:20724

2.7.24. ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ

Суть проточной цитометрии состоит в многопараметрическом анализе оптических свойств отдельных частиц в жидкой системе.

Клетки или частицы в суспензии должны быть индивидуально распределены в линейном потоке, который протекает через измерительное устройство. Плотные ткани для анализа должны быть превращены в суспензию клеток.

Спектр параметров, определяемых проточной цитометрией, включает объем и морфологическую структуру клеток или клеточных частиц, клеточные пигменты, содержание ДНК, содержание РНК, белки, маркеры поверхности клеток, внутриклеточные маркеры, ферментативная активность, значение pH, состояние мембраны, текучесть.

Существует возможность определять 2 морфологических параметра и 1 или более сигналов флуоресценции на каждую отдельную клетку. Многопараметрический анализ позволяет определять клеточные популяции по их фенотипу.

ПРИБОР

Фокусировка, умножение сигнала и выбор источника света должны быть оптимизированы для автоматического обнаружения и измерения морфологических различий и особенностей окрашивания. Анализ методом проточной цитометрии обязательно предусматривает:

– выбор источника света в зависимости от параметров, которые будут проанализированы;

– настройку цитометра в зависимости от типа анализируемых клеток (например, клеточные культуры, лейкоциты, тромбоциты, бактерии, сперматозоиды, дрожжи) и вида анализа, который должен быть выполнен (например, фенотипирование, клеточный цикл, апоптоз, цитокины, мембранная текучесть, флуоресцентный белок).

Проточная цитометрия характеризуется автоматизированным количественным определением ряда установленных параметров для большого числа единичных клеток во время каждого сеанса анализа. Например, 100 000 частиц или более (фактически неограниченное количество) анализируются одна за другой, как правило, приблизительно в течение 1 минуты. Предел обнаружения достаточно низок и составляет 100 флуоресцентных молекул на клетку.

Прибор для проточной цитометрии (проточный цитометр) имеет 5 основных блоков:

- система подачи растворов и проточная ячейка;
- источник света;
- система обнаружения и система аналого-цифрового преобразования (АЦП);
- система умножения (амплификации);
- компьютер с программным обеспечением для анализа сигналов.

СИСТЕМА ПОДАЧИ РАСТВОРОВ И ПРОТОЧНАЯ ЯЧЕЙКА

Единичные клетки освещаются лучом света и детектируются в проточной ячейке. Система подачи растворов несет отдельные клетки от пробирки с образцом клеточной взвеси до точки детектирования, для чего поток клеточной взвеси сужается до единичных клеток в проточной ячейке (гидродинамическое фокусирование). Луч света фокусирован в эллипсоидном пространстве 2 конфокальными линзами в канале проточной ячейки, через который проходят клетки. Скорость потока во время анализа маркеров поверхности клеток должна быть постоянной и должна гарантировать подходящее расстояние между клетками для возможности их подсчета.

ИСТОЧНИКИ СВЕТА

Обычно используют следующие источники света:

- лампы (ртутная, ксеноновая);
- охлаждаемые водой лазеры большой мощности (аргоновый, криптоновый и лазер на красителях);
- охлаждаемые воздухом лазеры низкой мощности (аргоновый (488 нм), красный гелий-неоновый (633 нм), зеленый гелий-неоновый, гелий-кадмиевый, (ультрафиолетовый));
- полупроводниковые (диодные) лазеры (синий, зеленый, красный, фиолетовый).

ОБНАРУЖЕНИЕ СИГНАЛА

Когда частица проходит через пучок света, она рассеивает часть света во всех направлениях. Флуоресцентные красители, добавленные к частице, испускают свой собственный свет (флуоресценцию), которая также излучается во всех направлениях. Таким образом, могут генерироваться 2 типа сигналов:

- рассеяние света;
- эмиссия флуоресценции.

Световые датчики прибора собирают часть этого рассеянного света и флуоресценции и преобразуют в электрические сигналы пропорционально количеству собранного света.

Рассеяние света. Измеряются 2 параметра рассеяния света:

- прямое рассеяние (*FS, forward scatter*);
- боковое рассеяние, под углом 90 ° к направлению пучка света (*SS, side scatter*).

Прямое рассеяние коррелирует с объемом клетки, в то время как боковое рассеяние, связанное с такими параметрами, как форма ядра, количество и тип цитоплазматических гранул или шероховатость мембран, коррелирует с морфологической сложностью клетки: чем выше интенсивность бокового рассеяния, тем выше сложность клетки.

При анализе потока всегда будут генерироваться сигналы светорассеяния, являющиеся функцией морфологических характеристик клеток; они определяются как внутренние параметры.

Флуоресценция. В зависимости от типа и количества источников света, когда клетка проходит через область освещения, она будет испускать свет флуоресценции. Флуоресцентные сигналы образуются флуоресцентными красителями естественно находящимися в клетках (например, коферменты, хлорофилл, пигменты морской водоросли) и/или от флуоресцентных проб, захваченных клетками в процессе маркирования для анализа определенных особенностей (например, флуоресцирующие антитела, красители нуклеиновых кислот, пробы для исследования pH, пробы на кальций, флуоресцирующие белки). В настоящее время доступно большое количество флуоресцентных меток различных типов. Оптические фильтры должны быть приспособлены к используемым флуорохромам. Каждая флуоресцентная метка характеризуется своим спектром возбуждения и спектром эмиссии. Они выбираются в зависимости от природы источника возбуждения, системы обнаружения и согласно специфической цели анализа.

УПРАВЛЕНИЕ СИГНАЛОМ И АНАЛОГО-ЦИФРОВОЕ ПРЕОБРАЗОВАНИЕ

Сигналы светорассеивания и флуоресценции, испускаемые клетками при прохождении через лазерный луч, разделяются и направляются к детекторам за счет использования оптических фильтров. Детекторы являются преобразователями (фотоумножительные трубки (*PMTs, photomultiplier tubes*)), которые преобразуют световые сигналы, испускаемые клетками, в импульсы напряжения.

Процесс подсчета каждого импульса в соответствующем канале известен как аналого-цифровое преобразование (АЦП). Процесс отображается графически в виде частотной гистограммы.

Умножение (амплификация). Для оптимальной визуализации импульсы напряжения должны быть усилены. Процесс умножения подчеркивает различия между сигналами клетки и, следовательно, увеличивает разрешение между популяциями клеток с различными характеристиками (например, отличие жизнеспособных от нежизнеспособных клеток, или неспецифической флуоресценции от антиген-специфической флуоресценции после окраски мечеными моноклональными антителами).

Есть 2 метода умножения сигнала: линейный или логарифмический. Выбор между двумя типами делается для каждого отдельного сигнала в соответствии с морфологическими характеристиками клеток и использованными красителями (например, флуоресцентно-меченые моноклональные антитела, красители нуклеиновой кислоты).

Линейное умножение, которое усиливает различия среди сильных импульсов, используется с теми параметрами, которые производят сигналы высокой интенсивности, например:

- параметры рассеяния клетки;
- флуоресценция красителей нуклеиновых кислот при изучении клеточного цикла.

Логарифмическое умножение, напротив, предназначено для слабых импульсов и параметров или аналитических условий, которые могут произвести и слабый, и сильный импульсы, например:

- антигены клетки;
- светорассеивание от тромбоцитов, бактерий, дрожжей;
- флуоресценция от красителей нуклеиновых кислот при исследовании апоптоза.

Компенсация сигналов флуоресценции. У каждого флуоресцирующего красителя есть определенный спектр поглощения и спектр эмиссии. При использовании 2 или более флуоресцентных проб одновременно для того, чтобы окрасить клетки (например, иммунофенотипирование по 4 антигенам), спектры эмиссии флуорохромов могут перекрываться. Как следствие, каждый детектор флуоресценции регистрирует определенную люминесценцию «своей» пробы и какое-то количество света, излучаемого другими флуоресцентными пробами. Это может привести к переоценке сигнала и плохому разделению популяций клеток.

Решением является использование электронной матрицы, которая позволяет селективно разделять перекрестные сигналы после их улавливания детектором (компенсация флуоресценции).

Компенсация флуоресценции требует использования калибраторов флуоресценции, предпочтительно образцов позитивных клеток, меченных необходимыми флуорохромами в порядке, соответствующем меченым антителам, использованным для анализа.

ОТОБРАЖЕНИЕ СИГНАЛОВ

После усиления и компенсации сигналы отображаются в виде двух- или трехмерных гистограмм. Гистограммы показывают интенсивность сигнала и количество клеток для данного параметра. Цитограммы, в которых каждая точка представляет клетку, основаны на комбинации 2 сигналов (двухсигнальные точечные диаграммы). Тип и число распределений и комбинаций сигналов выбирают в зависимости от образцов клеток и использованных меток. Когда анализируются полученные данные, программное обеспечение проточной цитометрии может также генерировать и другие виды графических изображений (такие как накладывания, поверхностные гистограммы, томограммы (срезовые гистограммы), контурные гистограммы, гистограммы плотности/интенсивности, накладывающиеся гистограммы). Могут также использоваться статистические данные, такие как средние интенсивности флуоресценции (и их изменения по времени или в зависимости от функции клетки).

АНАЛИЗ ДАННЫХ

Клеточная взвесь для анализа может содержать различные виды объектов, некоторые из которых нежелательны (такие как мертвые клетки, обломки клеток или макроагрегаты) или просто не подходят для анализа (например, гранулоциты при изучении лимфоцитов). Это зависит от типа образца (цельная кровь, костный мозг, клеточные культуры, биологические жидкости, клеточные взвеси из плотных тканей) и процедуры обработки (например, методы окрашивания, лизиса (эритроцитов), фиксации, криоконсервирования, размораживания, депарафинирования).

Как следствие, не все сигналы, генерированные во время анализа, принадлежат изучаемым клеткам. Чтобы исключить нежелательные и несоответствующие сигналы применяют два подхода.

Первый используется при получении и накоплении данных. Это шумовой порог, относящийся к одному (или более) существенному параметру (параметрам), устанавливающий включение в анализ только клеток с интенсивностью сигнала выше, чем предопределенное дискриминационное значение для данного параметра. Благодаря характеристике параметра как мощного сигнала с низким уровнем перекреста, прямое рассеивание является параметром, чаще всего используемым в качестве дискриминатора (фактора разделения).

Второй подход применяется при анализе данных и состоит в использовании систем пропуска данных, ограничивающих анализ только сигналами от тех популяций клеток, которые удовлетворяют определенным морфологическим и экспрессионным (по флуоресценции) профилям. Обычно используются 2 типа селекции сигнала (логических ворот). Первый тип основан на морфологии клеток. Клеточные популяции идентифицируются по их морфологическим характеристикам (FS и SS). Диапазон селекции сигнала определяет пределы представляющей интерес популяции (например, лимфоциты, жизнеспособные клетки), затем графики флуоресценции вводятся через выбранную область. Второй тип селекции сигнала основан на флуоресценции. Интересующая нас клеточная популяция идентифицируется на основании интенсивности экспрессии антигена или красителя, затем определяются границы диапазона селекции. Впоследствии графики флуоресценции строятся в рамках выбранной области. Аналитическое программное обеспечение позволяет создавать множественные диапазоны селекции, используя последовательный логический запрос. Это особенно информативно при изучении редких популяций клеток или с целью сортировки клеток.

КОНТРОЛИ

Внутренний контроль. Перед анализом должна быть проведена настройка оптической системы с использованием подходящих флуоросфер, а также должна быть проверена стабильность проточной системы. Полученные данные сводятся в отчет и

используются при проведении периодического анализа показателей лабораторной эффективности метода. Наличие положительного контроля весьма желательно для доказательства того, что используемые для тестирования антитела функциональны и позволяют надлежащим образом использовать проточный цитометр. Положительный контроль должен включать образцы, которые известны как положительные для интересующего нас маркера.

Внешний контроль. Чтобы гарантировать надежность полученных данных или проверить межлабораторную воспроизводимость, рекомендуется участвовать в межлабораторных сличениях (программах профессионального тестирования).

01/2013:20725

2.7.25. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ИНГИБИТОРА ПЛАЗМИНА ЧЕЛОВЕКА

Ингибитор плазмينا человека, также названный человеческим α_2 -антиплазмином, является плазменным белком, который подавляет связанный с плазмином (сериновой протеазы) путь фибринолиза путем быстрого формирования комплекса со свободным плазмином. Более того, при свертывании крови ингибитор плазмينا человека поперечно связывается с нитями фибрина посредством фактора XIII, и интерферирует со связыванием профермента плазминогена с фибрином.

Активность ингибитора плазмينا человека оценивают путем сравнения способности испытуемых образцов подавлять расщепление специфического хромогенного субстрата плазмином с той же самой способностью стандартного образца ингибитора плазмينا человека. Расщепление плазмином хромогенного субстрата приводит к образованию хромофора, который может быть определен количественно спектрофотометрически.

Реактивы для испытания могут быть получены отдельно или в составе коммерческих наборов. Применяется как метод определения конечной точки, так и кинетический метод. При использовании различных наборов методики и реактивы могут отличаться в соответствии с инструкциями производителя. Существенные особенности методики описаны в следующем примере микропланшетного кинетического метода.

РЕАКТИВЫ

Буферный раствор для разведения pH 7,5. Используют подходящий буферный раствор согласно инструкциям производителя. При необходимости корректируют значение pH.

Плазмин. Предпочтительно использовать препарат человеческого плазмينا, который не содержит существенного количества других протеаз. Готовят раствор и хранят согласно инструкциям производителя.

Хромогенный субстрат плазмينا. Используется подходящий специфический хромогенный субстрат для плазмينا: Н-D-циклогексилаланил-норвалил-лизил-*n*-нитроанилина гидрохлорид (H-D-CHA-Nva-Lys-pNA·HCl) или L-пироглутамил-L-фенилаланил-L-лизил-*n*-нитроанилина гидрохлорид (Glp-Phe-Lys-pNA·HCl). Готовят раствор в воде Р, чтобы получить подходящую концентрацию согласно инструкциям производителя.

МЕТОДИКА

Различные количества испытуемого образца смешивают с определенным количеством плазмينا и определяют остаточную активность плазмينا с использованием подходящего хромогенного субстрата.

Готовят или размораживают испытуемый образец согласно инструкциям производителя. Разводят буферным раствором для разведения pH 7,5 и готовят по крайней мере по 2 независимые серии из 3 или 4 разведений для испытуемого образца и для стандартного образца.

Смешивают по 0,020 мл каждого разведения с 0,020 мл буферного раствора для разведения pH 7,5 и нагревают до температуры 37 °С. Прибавляют по 0,04 мл раствора

плазмина (концентрации для испытания в диапазоне от 0,2 нкат/мл до 1,6 нкат/мл), ранее нагретого до температуры 37 °С, и выдерживают при температуре 37 °С в течение 1 мин. К каждой смеси прибавляют по 0,02 мл раствора хромогенного субстрата, предварительно нагретого до температуры 37 °С. Немедленно начинают измерение изменения оптической плотности при длине волны 405 нм (2.2.25), используя микропланшеточный ридер (спектрофотометр). Рассчитывают скорость изменения оптической плотности ($\Delta A/\text{мин}$). Альтернативно может быть использован метод определения конечной точки – остановка реакции уксусной кислотой и измерение оптической плотности при длине волны 405 нм.

В обоих случаях продолжительность расщепления хромогенного субстрата должна быть выбрана таким образом, чтобы наблюдалось линейное увеличение оптической плотности при длине волны 405 нм прежде, чем существенное влияние начнет оказывать недостаток субстрата. Если испытание выполняют в пробирках или кюветах с использованием спектрофотометрического метода, объемы растворов реактива изменяют пропорционально.

Отнимают значение оптической плотности контрольного опыта (приготовленного с буферным раствором для разведения рН 7,5) от оптической плотности испытуемых образцов. Проверяют правильность выполнения испытания и рассчитывают активность испытуемого образца, используя обычные статистические методы (5.3).

01/2013:20727

2.7.27. ЗНАЧЕНИЕ ФЛОККУЛЯЦИИ (L_f) ТОКСИНОВ И АНАТОКСИНОВ ДИФТЕРИИ И СТОЛБНЯКА (ПРОБА РАМОНА)

Содержание токсина или анатоксина (токсоида) в образце может быть выражено в виде значения флоккуляции (L_f), определенного пробой Рамона. В этой пробе антитоксин добавляется в повышающихся концентрациях к серии пробирок, содержащих постоянное количество токсина или анатоксина. В точке эквивалентности токсина/анатоксина и антитоксина в 1 или более пробирках происходит образование флоккулятов (комочков). Первая пробирка, в которой происходит образование комочков, используется для определения значения L_f образца.

Значение L_f для токсина или анатоксина определяется количеством единиц антитоксина, которое при смешивании с образцом образует оптимально выпадающую хлопьями смесь (проба Рамона).

Практический опыт показал, что результаты калибровки антитоксинов в Международных Единицах (МЕ), например, в сравнении с Международными стандартными образцами антитоксина, зависят от использованного иммунохимического метода. По этой причине антитоксины, используемые для пробы Рамона, должны быть напрямую калиброваны с использованием *международных биологических стандартных реагентов для дифтерии или столбнячного анатоксина для теста флоккуляции*, используя принципы, описанные ниже. Концентрация, определенная таким образом, может быть обозначена в L_f -эквивалентах на миллилитр (L_f -экв./мл).

По определению 1 L_f – это количество токсина или анатоксина, которое вызывает флоккуляцию в течение минимального времени с 1 L_f -экв. специфического антитоксина.

Диапазон объемов стандартного образца антитоксина, доведенного до концентрации 100 L_f -экв./мл, распределяется в серию пробирок (например, размером 7 см × 1 см) для реакции на флоккуляцию. К каждой пробирке для получения постоянного суммарного объема, например, 1 мл, прибавляют достаточное количество раствора 9 г/л *натрия хлорида Р*. Испытуемый образец разводят таким образом, чтобы получить ожидаемую концентрацию приблизительно 50 L_f /мл, и, например, по 1 мл этого раствора переносят в каждую из пробирок, содержащих антитоксин. Пробирки тщательно перемешиваются путем встряхивания, затем помещаются в водяную баню с постоянной температурой в диапазоне от 30 °С до 52 °С, затем наблюдают через регулярные интервалы времени до первого появления флоккулятов. Это может потребовать использования лупы и яркого освещения.

Первая и вторая пробирки со смесями, где наблюдалась флоккуляция, отмечаются, как и время, потраченное для первого образования визуально определяемых комочков. В 2 пробирках хлопья могут выпасть одновременно.

Первая пробирка, в которой выпадут хлопья, является той, которая содержит количество антитоксина, наиболее эквивалентного количеству антигена в образце. Содержание антитоксина в этой пробирке может быть использовано для расчета значения Lf образца. Если в 2 пробирках выпадают хлопья в одно и то же время, как конечный результат используют среднее значение обеих пробирок.

Время флоккуляции в первой пробирке (Kf) является полезным индикатором качества антигена. Если при используемых температуре и концентрации анатоксина и антитоксина значение Kf увеличено по сравнению с нормальным, это указывает на то, что антиген был поврежден. Значение Kf может также измениться в связи с качеством используемого антитоксина.

Пример

Пробирка	A	B	C	D	E	F
Добавленный антитоксин (Lf -экв.)	40	45	50	55	60	65
Добавленный антитоксин (мл)	0,40	0,45	0,50	0,55	0,60	0,65
Добавленный физиологический раствор (мл)	0,60	0,55	0,50	0,45	0,40	0,35
Добавленный разведенный образец	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Если в этом примере первой пробиркой, в которой выпали хлопья, является пробирка С, тогда значение Lf разведенного образца равняется 50 Lf /мл. Однако, если первой пробиркой, в которой выпали хлопья, является пробирка А или пробирка F, это указывает на отсутствие эквивалентности на том уровне. В этом случае необходимо выполнить повторное испытание, используя или иное разведение испытуемого образца, или выбирая иной диапазон доз стандартного образца антитоксина.

Большая точность может быть получена при учете поправки на последовательность образования хлопьев после первой пробирки. Так в указанном примере, если бы вторая пробирка после той, где выпали хлопья, была пробиркой D, конечное значение для разведенного образца было бы 52, тогда как, если бы вторая пробирка за той, где выпали хлопья, была пробиркой В, конечное значение было бы 48. Испытание может быть выполнено повторно с немного отличающимися разведениями испытуемого образца.

Если нет никаких указаний на предполагаемое значение Lf у доступного образца, желательно получить грубую оценку (значения), используя более широкий диапазон содержания антитоксина в пробирках перед проведением завершающего теста.

Пример

Пробирка	A	B	C	D	E	F
Содержание антитоксина (Lf -экв.)	20	30	45	70	100	150

Уровень токсина или анатоксина и концентрация антитоксина в испытании могут варьировать, что будет заметно влиять на время флоккуляции. Таким образом, на очень низких уровнях испытание будет длиться слишком долго, в то время как при высокой концентрации начало образования хлопьев может быть настолько быстрым, что затруднит различие первой и второй пробирки, в которых выпадают хлопья.

Определение низких концентраций методом совместной флоккуляции

Для очень низких концентраций желательно измерять токсин или анатоксин методом совместной флоккуляции. Это предполагает сравнение значения Lf известного токсина или анатоксина и значения смеси образца с таким же токсином или анатоксином.

Когда токсин или анатоксин с известным значением Lf и токсин или анатоксин с неизвестным значением Lf образуют хлопья вместе, смесь сформирует хлопья как результат суммы их значений, если они были гомогенными. Если негомогенные токсины или

анатоксины будут смешаны, то они вызовут абберантную (отклоняющуюся от нормы) флокуляцию с 2 максимумами образования хлопьев (флокуляции).

01/2013:20728

2.7.28. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИЦ ЧЕЛОВЕКА ПО КОЛОНИЕОБРАЗУЮЩИМ КЛЕТКАМ

Система кроветворения представляет собой совокупность клеток, фенотип которых и свойства изменяются по мере их развития от стволовых клеток до дифференцированных клеток.

Гемопоэтические клетки-предшественницы (ГСК, HPCs) способны к формированию колоний или «клеточных кластеров» в культурах, выращенных в плотных питательных средах, и называются «колониеобразующими». Определение числа колониеобразующих клеток (КОЕ, *CFCs*) в клеточном продукте является индикатором функциональной способности клеток-предшественниц и является показателем восстановления кроветворения. Измеренное число КОЕ коррелирует с минимальным числом клеток-предшественниц кроветворения, присутствующих в образце.

МАРКЕРЫ ПОВЕРХНОСТИ КЛЕТОК

Способность колониеобразующих клеток давать начало кроветворным колониям *in vitro* и/или восстанавливать систему кроветворения коррелирует с экспрессией определенных антигенов поверхности клеток. Экспрессия мембранного антигена CD34 является принятым маркером для большинства клеток-предшественниц кроветворения и стволовых клеток.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ИСПЫТАНИЯ

Колониеобразующие клетки распознаются в соответствии с номенклатурой, основанной на линейной принадлежности зрелых клеток, присутствующих в колониях (например, КОЕ-смешанные, КОЕ гранулоцитов, эритроцитов, моноцитов, макрофагов (КОЕ-ГЭММ), КОЕ гранулоцитов и макрофагов (КОЕ-ГМ), КОЕ гранулоцитов (КОЕ-Г), КОЕ макрофагов (КОЕ-М), буст-образующие единицы эритроцитов (БОЕ-Э), КОЕ эритроцитов (КОЕ-Э), КОЕ мегакариоцитов (КОЕ-Meg)), и являются популяциями клеток-предшественниц, способных образовать колонии, содержащие клетки одной или более линий (дифференцировки) кроветворных клеток. Для этой популяции ГСК по сравнению с самыми незрелыми стволовыми клетками были описаны отсутствие или низкая способность к самовосстановлению.

Количество и тип факторов роста, внесенных во время культивирования, изменяют тип и размер колоний, которые будут сформированы.

Более высокая специфичность по общему классу ГСК и по их относительному пролиферативному потенциалу обеспечивается временем, требуемым для дифференцировки *in vitro* в зрелые клетки. Время, необходимое для формирования колоний зрелых клеток *in vitro* у послеродовых колониеобразующих клеток (взрослого типа), составляет 10–14 дней.

ОБЕСПЕЧЕНИЕ КАЧЕСТВА ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ИСПЫТАНИЯ

Важнейшим условием для обеспечения общего качества испытания является использование строго стандартизованных процедур. Поэтому рекомендуется выполнить внутри лабораторные валидации. Источник материалов, включая реактивы, факторы роста и расходный материал, должен быть идентифицирован.

Основными факторами, влияющими на вариабельность испытания, являются число внесенных в лунки клеток и идентификация колоний. Для одного и того же испытания может наблюдаться внутрилабораторная вариабельность до 15 %. При необходимости оценки числа колониеобразующих клеток в очищенной популяции клеток возможно использование метода лимитирующих разведений с подсчетом числа лунок, положительных по клеточной пролиферации, с помощью автоматизированной системы.

Другой важной причиной вариабельности является использование в испытании неопределенных материалов (например, эмбриональная бычья сыворотка или бычий сывороточный альбумин). Эти продукты происходят из пулов исходных материалов и обеспечивают неспецифическую стимуляцию клеточной пролиферации. Однако довольно часто встречаются серии/партии материалов с особыми характеристиками, которые выборочно стимулируют пролиферацию клеток определенных линий кроветворения.

Для клоногенного количественного анализа рекомендуется использовать материалы только с низким уровнем содержания эндотоксинов (менее 0,01 МЕ/мл или менее 0,01 МЕ/мг), поскольку более высокие уровни приводят сначала к прогрессивному искажению линейной принадлежности ГСК в культурах, а впоследствии к более общему подавлению клеточной пролиферации и образованию клонов ГСК.

КЛОНОГЕННОЕ КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Клоногенное количественное определение основано на способности клеток-предшественниц формировать колонию при внесении в плотную питательную среду или в гель в присутствии специфических факторов роста. В зависимости от желаемого метода учета могут использоваться различные типы плотных сред (например, метилцеллюлоза, коллаген, агар и плазменный сгусток). Коммерчески доступные среды обычно дают более воспроизводимые результаты.

МАТЕРИАЛЫ

Валидация выполняется, по крайней мере, для следующих критических материалов.

Факторы роста. Для того, чтобы получать наибольшее количество колоний от клеточной взвеси, содержащей смешанную популяцию ГСК, требуются как мультилинейные (такие как *kit*-лиганд или фактор стволовой клетки (ФСК), интерлейкин 3, фактор стимуляции колоний макрофагов и гранулоцитов (ГМ-КСФ)), так и линейно-специфические (эритропоэтин, фактор стимулирования колонии гранулоцитов (Г-КСФ)) факторы роста.

Другие компоненты питательной среды. В среды могут быть добавлены сыворотки (особенно эмбриональная бычья сыворотка) и/или альбумин.

КЛЕТОЧНАЯ КУЛЬТУРА

Клетки. Образец, помещенный в культуру, должен быть представительным для всего введенного клеточного продукта. Для этого теста требуются суспензии клеток. В случае использования пунктата костного мозга такие суспензии могут быть получены, продавливая костный мозг через решетчатые фильтры или через иглы прогрессивно уменьшающего калибра. Повторные продавливания через иглу 21 размера обычно достаточны, чтобы разбить клеточные кластеры до клеточной суспензии.

ПОМЕЩЕНИЕ В ЧАШКУ И ПОДСЧЕТ

Клетки, взвешенные в питательной среде, смешивают с плотной питательной средой. Обычно делают посев 1 мл смеси в необработанную стерильную чашку Петри (диаметром 35 мм).

Из-за вязкости среды раствор не может быть помещен в пипетки со сменяемыми насадками, и требуется использование шприцов с иглами большого размера ($\leq$ номер 18).

Число клеток, которые будут помещены в чашку, зависит от концентрации ГСК в испытуемом образце. Так как колонии не будут получены из 2 различных ГСК, число помещенных в чашку клеток должно позволить подсчитать от 40 до 80 колоний на чашку (диаметром 35 мм). Конечное число колоний на чашку может быть рассчитано из процентного содержания CD34⁺ (или из концентрации CD34⁺ клеток в миллилитре), определенного методом проточной цитометрии (2.7.24) или от различных разведений клеточной суспензии (обычно не менее 2 концентраций для проверки).

Чашки инкубируются в аэробных условиях с концентрацией углекислого газа 5 % при температуре 37 °C во влажной (насыщенной) атмосфере в течение 10–14 дней, число колоний затем подсчитывают под инвертированным микроскопом. При манипуляциях с чашками (платами), содержащими колонии, должна быть проявлена осторожность,

поскольку среда, содержащая метилцеллюлозу, является вязкой, но не желеобразной. Культивирование на наклоненной чашке может привести к смещению и формированию кометоподобных колоний, делающих подсчет некорректным.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ КОЛОНИЙ

Размер и структура колоний зависят от типа зрелых клеток и их составляющих. Количество в 50 клеток на колонию обычно рассматривается как минимальное. Присутствие гемоглобинизированных клеток указывает на наличие клеток-предшественников эритробластного ряда. Поскольку количество зрелых клеток для каждой линии происхождения в значительной степени зависит от факторов роста, добавленных к культурам, выполнение дифференцированного подсчета не рекомендуется, если иное не указано в частной статье.

ПРЕДСТАВЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты испытания обычно выражают как среднее арифметическое число колоний, посчитанных не менее чем в 3 чашках. Среднее число колоний затем соотносится к 10^4 или 10^5 жизнеспособным ядродержащим клеткам, помещенным в культуру.

01/2013:20729

2.7.29. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ЯДРОСОДЕРЖАЩИХ КЛЕТОК

Определение качества клеточных суспензий требует точного измерения как количественного содержания, так и процента жизнеспособных клеток. Эти данные важны для процесса принятия решений в отношении подготовленных клеточных продуктов и поддержания оптимальных условий культивирования. Количество клеток может быть представлено числом клеток на объем клеточной суспензии, а жизнеспособность клеток – как число жизнеспособных клеток на объем клеточной суспензии. Процедура подсчета клеток может быть выполнена вручную (счетчик клеток крови) или с использованием автоматического аппарата (например, счетчик частиц, проточная цитометрия). Кроме описанных ниже могут быть использованы и другие методы.

ЧИСЛО КЛЕТОК

РУЧНОЙ ПОДСЧЕТ

Описание прибора и принципа испытания. Требуются следующие материалы.

– Счетчик клеток крови: специализированная камера для микроскопического подсчета доступна в различном исполнении. Камера состоит из толстого предметного стекла и покровного шлифованного стекла, установленного так, чтобы разграничить камеры с определенным объемом для каждого исполнения. Толстое предметное стекло различных счетчиков клеток крови состоит из счетной камеры, разделенной глубокими бороздками, чтобы избежать перекрестного заполнения. Счетная камера выгравирована в стекле и содержит сетку, которая является специфической для каждой модели.

– Оптический микроскоп – слабое увеличение от 10× до 40×.

– Пипетки подходящего объема.

Счетчик клеток крови используется для определения количества клеток в данном растворе путем подсчета концентрации клеток в миллилитре (C), используя следующее выражение:

$$a \cdot 10^n \cdot d,$$

где:

a – число подсчитанных клеток;

d – фактор разведения (если необходимо);

n – фактор, меняющийся в зависимости от объема камеры счетчика клеток крови.

Клетки в смешанной популяции различают на основании их отличий по размеру или пигментации (например, лейкоциты и эритроциты).

Подготовка камеры для подсчета и анализ. Устанавливают покровное стекло (слегка увлажненное по краям) на предметное стекло. Двигают покровное стекло взад и вперед по предметному стеклу, нажимая на края покровного стекла. Готовят подходящее разведение клеточной суспензии в изотоническом или в гемолизирующем буферном растворе.

Подходящий объем разведения вносят в камеру подсчета. Жидкость помещают в щель, образующуюся между покровным стеклом и счетной камерой, и она заполняет камеру подсчета благодаря капиллярности. Осторожно помещают камеру для подсчета клеток крови под микроскоп и фокусируют. Подсчитывают клетки в зоне сетки. Рассчитывают концентрацию клеток в разведенных и неразведенных образцах.

Чтобы увеличить точность измерения, важно соблюдать следующие основные меры предосторожности:

- используют покровное стекло только соответственной толщины;
- везде, где возможно, подсчитывают более чем 100 клеток (в случае необходимости, считают большее количество квадратов);
- при обнаружении кластеров/групп клеток (то есть взвесь клеток не является моноклеточной), клетки ресуспендируют, отбирают образец и снова подсчитывают;
- необходимо избегать неполного заполнения или переполнения счетной камеры, иначе объем для подсчета не будет достоверным.

АВТОМАТИЗИРОВАННЫЕ МЕТОДЫ ПОДСЧЕТА

Счетчики частиц, основанные на изменении проводимости. Электронные счетные устройства измеряют размер и число частиц в растворе.

Перед использованием счетчики частиц калибруют раствором частиц с известной концентрацией и размером. Чтобы проводить подсчет частиц большего размера, применяют пробирки, оснащенные другими калибровочными насадками. Эти приборы не позволяют различать мертвые и живые клетки. Поскольку осколки клеток могут также производить импульсы, которые вызывают ошибки, счетные устройства также оснащают пороговым контролем, позволяющим подсчитывать только большие частицы.

Прибор должен быть пригоден для подсчета клеточных продуктов (с точки зрения линейности, точности, и т.д.).

Счетчики частиц, основанные на проточной цитометрии (2.7.24). Проточный цитометр калибруют по стандартным частицам известной концентрации и размера, чтобы подсчитать абсолютное количество клеток в объеме. При этом калибровочный раствор больше не является необходимым при использовании приборов с двумя электродами, погруженными в счетную камеру для образца, в которых постоянный размер камеры и расстояние между двумя электродами позволяет проводить измерение в фиксированном объеме. Этот тип оборудования редко требует калибровки после первоначальной установки.

ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ

Приведенные методы определения процента жизнеспособных клеток основаны на окрашивании жизнеспособных клеток красителями и ручном или автоматизированном анализе с использованием оптического микроскопа либо путем проточной цитометрии суспензий клеток.

В зависимости от типа клеток и используемого метода результаты могут отличаться.

РУЧНОЙ МЕТОД ИСКЛЮЧЕНИЯ КРАСИТЕЛЯ

Принцип испытания. Испытание основано на невключении красителя в жизнеспособные клетки, тогда как мертвые или поврежденные клетки абсорбируют краситель и окрашиваются. Это дает информацию о целостности цитоплазматической мембраны, но ее результаты не обязательно отражают функциональную активность клетки. Недавно трипсинизированные или размороженные живые клетки могут иметь липкие мембраны способные абсорбировать краситель.

Краситель. Наиболее часто используемым красителем для того, чтобы различить жизнеспособные и нежизнеспособные клетки, является трипановый синий, но также могут использоваться и другие подходящие красители, такие как эритрозин В или нигрозин.

Трипановый синий – кислотный краситель (М.м. 961), анион с 4 сульфонатными группами, которые могут легко связаться с белками; поэтому концентрация белка в испытуемом образце должна быть настолько низкой, насколько возможно.

Условия проведения испытания. Фиксация окраски сильно зависит от значения pH, поэтому оно должно быть в пределах от 6,6 до 7,6. Фиксация оптимальна при pH 7,5. Другие условия, такие как концентрация красителя и время окраски, должны быть валидированы.

Условия хранения красителя. Обычно используют 0,4 % или 0,5 % раствор трипанового синего в стерильном фосфатном забуференном физиологическом растворе. Хранят в защищенном от воздействия света и воздуха месте.

Подготовка к испытанию и анализ. Суспензию клеток в требуемом разведении (обычно в фосфатном забуференном физиологическом растворе) окрашивают, например, с использованием раствора трипанового синего с конечной концентрацией от 0,1 % до 0,2 %. Аккуратно перемешивают. Инкубируют в течение не более 2–4 мин при комнатной температуре. Аккуратно перемешивают и помещают подходящий объем в счетную камеру. Без промедления проводят подсчет.

Определяют процент жизнеспособных клеток как отношение числа неокрашенных клеток к общему количеству клеток под оптическим микроскопом, считая все окрашенные клетки как мертвые. Жизнеспособность (V) в процентах рассчитывают по формуле:

$$\frac{n}{N} \cdot 100,$$

где:

n – число неокрашенных (жизнеспособных) клеток;

N – общее количество клеток (окрашенных и неокрашенных).

Важно, чтобы время инкубации не превышало 4 мин, поскольку впоследствии число окрашенных клеток может значительно увеличиться. Поэтому для повторного определения необходимо подготовить новый образец.

АВТОМАТИЗИРОВАННЫЕ МЕТОДЫ

Проточная цитометрия

Принцип испытания. Испытание основано на способности определенных красителей проникать через поврежденные мембраны и связываться с ДНК таким образом, чтобы мертвые клетки могли флуоресцировать и регистрироваться с помощью проточной цитометрии (2.7.24). Нежизнеспособные клетки оценивают по различиям, выявляемым по положительному окрашиванию клеток, тогда как жизнеспособные клетки остаются неокрашенными. Этот анализ обычно выполняют с 7-аминоактиномицином D (7-ААД, 7-ААД) или пропидий-йодидом (ПИ, PI), но также могут использоваться и другие подходящие красители.

Красители. 7-ААД и ПИ взяты как примеры мембранопроникающих веществ, которые могут быть использованы в качестве красителей для определения жизнеспособности.

7-ААД является аналогом актиномицина D, у которого в положении 7 хромофора заменена аминокислотная группа. Он вставляется между цитозиновыми и гуаниновыми основаниями ДНК. Спектральные свойства 7-ААД делают эту молекулу наиболее подходящей для анализа методом проточной цитометрии. Максимум поглощения комплекса 7-ААД/ДНК расположен в зеленом спектральном диапазоне и, таким образом, подходит для определения с помощью цитометра, оснащенного аргоновым лазером (длина волны возбуждения 488 нм). Сильная красная флуоресцентная эмиссия 7-ААД для оценки жизнеспособности (от 635 нм до 675 нм) облегчает использование пробы в комбинации с флуоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ, FITC) и фикоэритрин (ФЭ, PE) конъюгированными

антителами, потому что в отличие от ПИ, комплекс 7-ААД/ДНК имеет минимальное наложение с ФИТЦ и ФЭ.

ПИ связывается с двунилевой ДНК, встраиваясь между пар оснований с небольшими предпочтениями или безкаких-либо предпочтений и со стехиометрией 1 молекула красителя на 4–5 пар оснований ДНК. Как только краситель связывается с нуклеиновыми кислотами, их флуоресценция увеличивается в 20–30 раз, максимум возбуждения флуоресценции перемещается приблизительно на 30–40 нм к красному (пику флуоресценции) и максимум эмиссии флуоресценции (615 нм) перемещается приблизительно на 15 нм к синему (пику флуоресценции). Хотя способность ПИ к оптическому поглощению довольно низка, он проявляет достаточно большой Стоксовский сдвиг, что позволяет одновременное обнаружение нуклеиновых кислот и флуоресцеин-меченых антител при условии использования подходящих оптических фильтров.

Условия хранения растворов красителей нуклеиновой кислоты. При температуре $(5\pm 3)^\circ\text{C}$.

Подготовка к испытанию и анализ. В случае гемопоэтических клеток краситель может быть добавлен после маркирования CD45 на клетках, чтобы получить лучшее разделение клеток от клеточных осколков и тромбоцитов на основе установления области соответствия объектов по боковому светорассеиванию (SS) и мечения CD45+. Условия инкубации клеточной популяции с красителем должны быть валидированы.

Инкубация выполняется при комнатной температуре, в защищенных от света условиях. При необходимости лизиса эритроцитов его выполняют, используя, например, аммония хлорид. Если в проведении лизиса нет необходимости, прибавляют только буферный раствор.

Процентное содержание жизнеспособных клеток определяется непосредственно с помощью проточного цитометра и анализа положительных клеток (мертвые клетки) на SS/7-ААД или SS/ПИ цитограммах (графиках).

Положительные контроли могут состоять из стабилизированных клеток (мертвые клетки), смешанных со свежими жизнеспособными клетками в необходимом соотношении.

Цифровое изображение окрашенных клеток. Цифровое изображение позволяет автоматизировать методы, основанные на исключении красителя. Суспензия клеток и раствор красителя смешиваются непосредственно прибором. Система, которая позволяет проводить аспирацию образца, работу с реактивами и последующую очистку инструмента, полностью автоматизирована. Как только клеточная суспензия была отобрана и смешана с раствором красителя, она закачивается в проточную ячейку для анализа. Окрашенная клеточная суспензия прокачивается через камеру, где стробоскопический свет позволяет фотокамере фотографировать протекающие через счетную камеру клетки. Изображение оцифровывается и число мертвых или живых клеток подсчитывается с использованием программного обеспечения.

01/2013:20730

2.7.30. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО БЕЛКА С

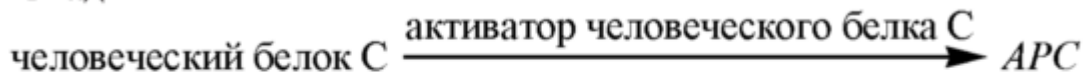
1. ХРОМОГЕННОЕ КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Человеческий белок С является витамин К-зависимым плазменным белком, который после активации (активированный белок С (APC)) может подавлять свертывание крови путем протеолитического расщепления факторов Va и VIIIa. Активность человеческого белка С определяют двухэтапным методом:

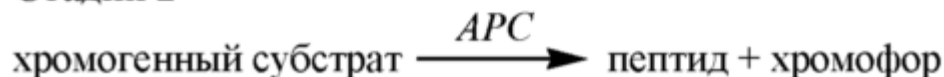
– на первом этапе человеческий белок С в образце активируют специфическим активатором, выделенным из яда змей;

– на втором этапе APC расщепляет специфический хромогенный субстрат с образованием окрашенного продукта, который может быть измерен количественно спектрофотометрически.

Стадия 1



Стадия 2



Активность человеческого белка С оценивают путем сравнения способности испытуемого образца расщеплять хромогенный субстрат с активностью стандартного образца человеческого белка С, калиброванного в Международных Единицах. За Международную Единицу принимают активность установленного количества Международного стандартного образца человеческого белка с. Эквивалентность Международного стандартного образца в Международных Единицах устанавливается Всемирной организацией здравоохранения.

Реактивы для испытания могут быть получены отдельно или в составе коммерческих наборов. Применяется как метод определения конечной точки, так и кинетический метод. При использовании различных наборов методики и реактивы могут отличаться в соответствии с инструкциями производителя. Существенные особенности методики описаны в следующем примере микропланшетного метода определения конечной точки.

РЕАКТИВЫ

Буферный раствор для разведения pH 8,4. 6,055 г *трис(гидроксиметил)аминометана Р* и 16,84 г *цезия хлорида Р* растворяют в *воде Р*, при необходимости доводят значение pH (2.2.3) и разводят *водой Р* до объема 1000,0 мл.

Активатор человеческого белка С. Белок, который специфично активирует человеческий белок с, выделяют из яда гадюки *Agkistrodon contortrix contortrix*. Восстанавливают и хранят в соответствии с инструкциями производителя. Перед использованием в испытании разводят *водой Р* до концентрации 0,25 ЕД/мл.

Хромогенный субстрат активированного белка С. Специфический хромогенный субстрат для APC, например, L-пироглутамил-L-пролил-L-аргинин-паранитроанилинагидрохлорид (пироGlu-Pro-Arg-pNA·HCl). Восстанавливают *водой Р* для получения концентрации 4,5 ммоль/л. Перед использованием разводят буферным раствором для разведения pH 8,4 до концентрации 1,1 ммоль/л.

МЕТОДИКА

Восстанавливают или размораживают испытуемый образец согласно инструкциям производителя. Разбавляя *водой Р*, для каждого образца готовят не менее 3 отдельных разведений с концентрацией в диапазоне 0,050–0,200 МЕ/мл, желательно с повторами.

Этап 1. Смешивают по 0,025 мл каждого разведения с 0,050 мл активатора человеческого белка С (предварительно нагревают все растворы до температуры 37 °С), и инкубируют при температуре 37 °С в течение ровно 10 мин. Для каждого разведения проводят холостой опыт, используя *воду Р* вместо активатора человеческого белка С.

Этап 2. К каждой смеси прибавляют по 0,150 мл разведенного субстрата, предварительно нагретого до температуры 37 °С, и инкубируют ровно 10 мин при температуре 37 °С. При необходимости время инкубации должно быть уточнено для получения линейной зависимости развития окрашивания от времени. Останавливают реакцию добавлением 0,050 мл раствора 50 % (об/об) *кислоты уксусной ледяной Р*.

Расщепление хромогенного субстрата под действием APC вызывает образование окрашенного продукта пропорционально концентрации человеческого белка С в образце. Измеряют оптическую плотность при длине волны 405 нм. Оптическую плотность холостого опыта вычитают из оптической плотности испытуемого образца. Проверяют достоверность испытания и рассчитывают активность испытуемого образца с использованием стандартных статистических методов (5.3).

2. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПО ВРЕМЕНИ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ

Активность человеческого белка С устанавливают после расщепления его до *APC* специфическим активатором, выделенным из яда гадюки *Agkistrodon contortrix contortrix*. Полученный *APC* инактивирует факторы Va и VIIa и таким образом удлиняет АЧТВ (активированное частичное тромбопластиновое время, *APTT*) системы, в которой присутствуют все факторы свертывания, на постоянном уровне и в избытке, за исключением человеческого белка с, который находится в испытуемом образце. Удлинение времени свертывания пропорционально концентрации человеческого белка С в образце.

Активность человеческого белка С оценивают путем сравнения способности испытуемого образца продлевать время свертывания с активностью стандартного образца человеческого белка С, калиброванного в Международных Единицах. За Международную Единицу принимают активность установленного количества Международного стандартного образца человеческого белка с. Эквивалентность Международного стандартного образца в Международных Единицах устанавливается Всемирной организацией здравоохранения.

Реактивы для испытания могут быть получены отдельно или в составе коммерческих наборов. При использовании различных наборов методики и реактивы могут отличаться в соответствии с инструкциями производителя. Ниже описаны существенные особенности методики.

РЕАКТИВЫ

Буферный раствор для разведения pH 7,4. Изотонический буфер, не содержащий хелатирующих соединений.

Человеческая плазма, дефицитная по белку С. Цитратная плазма человека без определяемого количества человеческого белка С. Восстанавливают и хранят в соответствии с инструкциями производителя.

Активатор человеческого белка С. Белок, выделенный из яда гадюки *Agkistrodon contortrix contortrix*, который специфически активирует человеческий белок с. Восстанавливают и хранят в соответствии с инструкциями производителя.

Активатор свертывания. Может быть использован подходящий реактив для АЧТВ, содержащий фосфолипиды и контактный активатор. Он может быть комбинирован с активатором человеческого белка С.

МЕТОДИКА

Восстанавливают или размораживают испытуемый образец согласно инструкциям производителя. Разбавляя буферным раствором для разведения pH 7,4, для каждого образца готовят не менее 3 отдельных разведений с концентрацией в диапазоне 0,010–0,150 МЕ/мл, желательно с повторами.

Смешивают 1 объем каждого разведения с 1 объемом человеческой плазмы, дефицитной по человеческому белку С, и 1 объемом активатора человеческого белка С (объединенного с реагентом для АЧТВ). Все растворы должны быть предварительно нагреты до температуры 37 °С. Прибавляют 1 объем *раствора кальция хлорида Р*, предварительно нагретого до температуры 37 °С, и регистрируют время свертывания.

Время свертывания пропорционально концентрации человеческого белка С в каждом разведении. Проверяют достоверность испытания и рассчитывают активность испытуемого образца с использованием стандартных статистических методов (5.3).

01/2013:20731

2.7.31. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО БЕЛКА S

Человеческий белок S является витамин К-зависимым белком плазмы, который действует как кофактор активированного белка С (*APC*). Активность человеческого белка S может быть определена в испытании свертывания, описанного ниже, которое чувствительно к способности человеческого белка S ускорять инактивацию фактора Va под действием *APC*. Постановка испытания включает прибавление человеческого белка S к смеси реактивов, содержащей *APC*, фактор Va и человеческую плазму, дефицитную по

белку S. Увеличение времени свертывания пропорционально концентрации человеческого белка S в образце. Методы, в которых APC добавляется непосредственно как реагент, предпочтительнее по сравнению с теми, в которых APC генерируется во время проведения теста путем добавления специфического активатора человеческого белка C, выделенного из яда змеи. Активация свертывания инициируется добавлением активирующего реагента, такого как тромбопластин или активированный фактор X, вместе с фосфолипидами и хлоридом кальция. Во время теста фактор Va генерируется из фактора V в человеческой плазме, дефицитной по белку S, с последующей активацией свертывания. Процедура теста должна гарантировать, что человеческий белок S является единственным фактором ограничения реакции свертывания.

Активность человеческого белка S оценивают путем сравнения способности испытуемого образца удлинять время свертывания с активностью стандартного образца человеческого белка S, калиброванного в Международных Единицах. За Международную Единицу принимают активность установленного количества Международного стандартного образца человеческого белка S. Эквивалентность Международного стандартного образца в Международных Единицах устанавливается Всемирной организацией здравоохранения.

Реактивы для испытания могут быть получены отдельно или в составе коммерческих наборов. При использовании различных наборов методики и реактивы могут отличаться в соответствии с инструкциями производителя. Существенные особенности методики описаны в следующем примере.

РЕАКТИВЫ

Буферный раствор для разведения pH 7,4. Изотонический буфер, не содержащий хелатирующих соединений, приготовленный следующим образом: 6,08 г *трис(гидроксиметил)аминометана P* и 8,77 г *натрия хлорида P* растворяют в *воде P* и при необходимости доводят значение pH (2.2.3); прибавляют 10 г *бычьего альбумина P* или *человеческого альбумина P* и доводят *водой P* до объема 1000,0 мл.

Человеческая плазма, дефицитная по белку S. Цитратная человеческая плазма без определяемого количества человеческого белка S и, желательно, также свободная от C4b-связывающего белка.

Активатор коагуляции. Этот реактив используется для того, чтобы инициировать свертывание человеческой плазмы, дефицитной по белку S и, следовательно, также обеспечивать появление активированного фактора V. Активатор может состоять из тканевого фактора, активированного фактора X или агента, способного прямо активировать фактор X. Такой агент может быть выделен из яда гадюки Рассела (*Vipera russelli*). Реактив также содержит APC, фосфолипиды и *кальция хлорид P*, или, альтернативно, *кальция хлорид* может быть добавлен отдельно после определенного периода активации.

МЕТОДИКА

Восстанавливают или размораживают испытуемый образец согласно инструкциям производителя. Разбавляя буферным раствором для разведения pH 7,4, для каждого образца готовят не менее 3 отдельных разведений с концентрацией в диапазоне 0,020–0,100 МЕ/мл, желательно с повторами.

Смешивают по 1 объему каждого разведения с 1 объемом человеческой плазмы, дефицитной по белку S (предварительно нагревают все растворы до температуры 37 °C). Прибавляют 2 объема активатора свертывания, нагретого до температуры 37 °C, и отмечают время свертывания.

Альтернативная процедура может предусматривать использование активатора коагуляции без *кальция хлорида* и требовать точного измерения периода активации перед добавлением *кальция хлорида* и времени свертывания.

Время образования сгустка пропорционально концентрации человеческого белка S в каждом разведении. Проверяют достоверность испытания и рассчитывают активность испытуемого образца с использованием стандартных статистических методов (5.3).

2.7.32. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНГИБИТОРА α -1-ПРОТЕИНАЗЫ ЧЕЛОВЕКА

Содержание ингибитора α -1-протеиназы человека (также известного как α -1-антитрипсин или α -1-антипротеиназа) определяют путем сравнения способности испытуемого образца инактивировать сериновую протеазу – эластазу (свиную панкреатическую эластазу или человеческую эластазу нейтрофилов) с такой же способностью стандартного образца ингибитора α -1-протеиназы человека, калиброванного в миллиграммах активного (функционального) ингибитора α -1-протеиназы. Различные количества испытуемого образца, смешивают с определенным количеством эластазы, остающуюся активность эластазы измеряют с использованием подходящего хромогенного субстрата. Метод, описанный ниже, приводится в качестве примера.

РЕАКТИВЫ

Трис-альбуминовый буферный раствор. 24,23 г *триметамола Р* растворяют в *воде Р*, доводят *кислотой хлористоводородной Р1* до значения pH ($8,0 \pm 0,3$) и разводят *водой Р* до объема 1000 мл. К 100 мл полученного раствора прибавляют 0,5 мл 20 % раствора *человеческого альбумина Р* или *бычьего альбумина Р*.

Буферный раствор, содержащий человеческий или бычий альбумин, должен быть приготовлен в день его использования; иначе раствор стерилизуют фильтрацией (0,2 мкм) и хранят при температуре от 2 °C до 8 °C до 2 недель.

МЕТОДИКА

Используя трис-альбуминовый буферный раствор, готовят по 2 серии из 4 или 5 разведений с подходящим диапазоном концентраций ингибитора α -1-протеиназы человека как для испытуемого образца, так и для стандартного образца.

По 50 мкл разведений стандартного образца помещают в лунки микропланшета и в каждую лунку прибавляют по 150 мкл раствора свиной панкреатической эластазы, разведенного до необходимой концентрации трис-альбуминовым буферным раствором. Инкубируют в течение определенного промежутка времени, 3–10 мин, при комнатной температуре. Так как активность растворов различных свиных панкреатических эластаз может варьировать, концентрация эластазы может быть уточнена путем оценки активности в контрольных лунках, содержащих эластазу без ингибитора α -1-протеиназы человека, для получения подходящего изменения оптической плотности при длине волны 405 нм в данных конкретных условиях проведения испытания.

В каждую лунку прибавляют по 100 мкл рабочего раствора хромогенного субстрата *N*-сукцинил-три-L-аланил-4-*n*-нитроанилида (Suc-Ala-Ala-Ala-pNA), растворенного в *диметил сульфоксиде Р* (концентрация 4,5 мг/мл), затем разведенного трис-альбуминовым буферным раствором до рабочей концентрации 0,45 мг/мл. Немедленно начинают измерение изменения оптической плотности (2.2.25) при длине волны 405 нм, используя микропланшетный ридер (спектрофотометр), снимая показания в течение не менее 5 мин. Рассчитывают скорость изменения оптической плотности (ΔA /мин). Альтернативно для испытания может быть использован метод определения конечной точки: реакцию останавливают уксусной кислотой и измеряют поглощение при длине волны 405 нм. Если испытание выполняют в пробирках, используют спектрофотометр для измерения оптической плотности, объемы растворов реактивов изменяют пропорционально.

Скорость изменения оптической плотности (ΔA /мин) обратно пропорциональна активности человеческого ингибитора α -1-протеиназы.

Проверяют достоверность количественного определения и рассчитывают активность испытуемого образца обычными статистическими методами (5.3).

01/2013:РБ20750

#2.7.50. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ИНСУЛИНА

Активность испытуемого образца инсулина определяют путем сопоставления его гипогликемического (сахаропонижающего) действия с гипогликемическим действием стандартного образца инсулина.

Стандартный образец инсулина представляет собой препарат высокоочищенного инсулина, активность которого определена путем многократного сопоставления с активностью Международного стандартного образца и составляет не менее 25 ЕД в 1 мг. За единицу действия (ЕД) принимают специфическую активность количества массы стандартного образца, эквивалентного по биологическому действию 1 Международной Единице инсулина.

Примечание: приготовление растворов стандартного образца и испытуемого образца инсулина. Навеску стандартного образца инсулина растворяют в растворе *кислоты хлористоводородной Р* (0,003 моль/л) с рН 2,7–3,0, содержащем консервант в такой же концентрации, как испытуемый образец.

Срок годности основного раствора стандартного образца инсулина 4 месяца при температуре 4 °С.

Перед опытом основной раствор стандартного образца инсулина разводят раствором хлористоводородной кислоты (0,003 моль/л) до концентрации 1 ЕД в 1 мл. Испытуемый образец инсулина разводят этим же раствором хлористоводородной кислоты до концентрации 1 ЕД в 1 мл, исходя из его предполагаемой активности.

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Определение биологической активности инсулина проводят на здоровых кроликах массой 2,5–3,5 кг. Животных массой 1,8–2,3 кг предварительно не менее 14 суток содержат в условиях вивария, где они получают овес, сено или свежую траву, корнеплоды, комбинированный корм и воду. По истечении этого срока определяют чувствительность кроликов к инсулину. Для этого кроликам дважды с интервалом 7–8 суток после 18 ч голодания вводят подкожно раствор стандартного образца инсулина из расчета 0,5 ЕД на 1 кг массы тела животного и определяют величину снижения концентрации сахара в крови в процентах. Кровь для исследования берут из краевой вены уха животных до введения инсулина и через 1,5 и 2,5 часа после его введения (для расчета берут среднюю концентрацию сахара в крови из двух определений после введения инсулина). Кровь берут в условиях, не допускающих чрезмерного волнения кроликов. Из опытов исключают животных с исходной концентрацией сахара в крови ниже и выше пределов, установленных для используемого метода определения содержания сахара в крови (ниже 75 мг % и выше 120 мг % для феррицианидного метода, ниже 52 мг % и выше 94 мг % для глюкозооксидазного метода), а также тех животных, которые реагируют на введение инсулина судорогами или у которых снижение концентрации сахара в крови составляет менее 15 % по отношению к исходной концентрации. Определение биологической активности инсулина проводят не ранее чем через 7–8 суток после испытания на чувствительность.

Отобранных для опытов кроликов лишают корма (но не воды) на 18 ч, предшествующих введению инсулина. Животных распределяют на две группы способом случайного выбора (в каждой группе должно быть не менее 9 кроликов). Непосредственно перед введением инсулина кроликов взвешивают и определяют исходную концентрацию сахара в крови. Кроликам одной группы вводят подкожно по 0,5 ЕД стандартного образца инсулина (*S*) на 1 кг массы тела, кроликам другой группы – такую же дозу испытуемого образца инсулина (*T*). Через 1,5 и 2,5 ч после введения инсулина у животных снова определяют концентрацию сахара в крови.

Для каждого кролика рассчитывают снижение концентрации сахара в крови в процентах по формуле:

$$\frac{a-b}{a} \cdot 100,$$

где:

a – исходная концентрация сахара в крови в миллиграмм-процентах;

b – средняя концентрация сахара в крови в миллиграмм-процентах из двух определений, проведенных через 1,5 ч и 2,5 ч после введения инсулина.

Как и при испытании кроликов на чувствительность к инсулину, при расчетах не учитывают животных с исходной концентрацией сахара в крови ниже и выше пределов, установленных для используемого метода, а также реагирующих на указанную дозу инсулина судорогами или дающих снижение концентрации сахара в крови менее 15 % по отношению к исходной концентрации.

Через 3–5 суток на этих же кроликах проводят повторное испытание с той разницей, что животным из группы, получавшей стандартный образец инсулина (S), вводят испытуемый образец инсулина (T), а животным группы, получавшей (T), вводят (S).

Рассчитывают среднюю величину снижения концентрации сахара в крови на стандартный образец ($\%S$) и на испытуемый образец ($\%T$) по данным всего опыта. Отношение $\%T / \%S$ выражает относительную активность (R) испытуемого образца (T). Для выражения активности испытуемого образца (T) в ЕД его предполагаемую активность (A) умножают на относительную активность ($T = R \cdot A$).

Пример: при определении биологической активности инсулина для инъекций с предполагаемой активностью 40 ЕД в 1 мл получили следующие величины снижения концентрации сахара в крови в процентах (Y).

Первая часть испытания		Вторая часть испытания	
YS	YT	YT	YS
49	48	50	50
61	50	58	51
35	48,5	53	41
55	65	55	55
39	46	39	45
28	22,5	68	60
53	15	38	43
38	48	44	60
50	63	44	56

$$\sum Y_s = 869; \%S = 869 / 18 = 48,28,$$

$$R = \%T / \%S = 45,83 / 48,28 = 0,949,$$

$$\sum Y_t = 825; \%T = 825 / 18 = 45,83.$$

Активность T в ЕД, по данным этого опыта, равна:

$$T = 0,949 \cdot 40 = 37,96 \text{ ЕД в 1 мл.}$$

Определение проводят не менее 2 раз с каждым испытуемым образцом (T). Среднюю величину при этом получают, объединяя индивидуальные цифры снижения концентрации сахара в крови в процентах в обоих опытах. При расчете окончательного результата должны быть использованы данные, полученные не менее чем на 30 кроликах. Если средняя величина R по данным двух или большего числа опытов будет меньше 0,85 или больше 1,15, испытание проводят заново, исходя из новой величины предполагаемой активности испытуемого препарата.

Кролики могут быть использованы повторно для определения биологической активности не ранее чем через 2 недели после окончания предшествующего опыта. Продолжительность использования кроликов в опытах по определению биологической активности инсулина не должна превышать 5 месяцев.

ИСПЫТАНИЕ НА ПРОЛОНГИРОВАННОЕ (УДЛИНЕННОЕ) ДЕЙСТВИЕ ПРЕПАРАТОВ ИНСУЛИНА

Испытание на пролонгированное действие препаратов инсулина основано на сопоставлении длительности гипогликемического эффекта испытуемого препарата и стандартного образца инсулина.

18 здоровых кроликов массой 3–4 кг распределяют на две группы по 9 животных способом случайного выбора. Животных содержат в отдельных клетках, за 18 ч до введения инсулина лишают корма (но не воды). В начале опыта у кроликов определяют исходное содержание сахара в крови и рассчитывают среднюю концентрацию сахара в крови для каждой группы. Животным первой группы вводят стандартный образец инсулина, а животным второй группы – испытуемый препарат инсулина. Навеску стандартного образца инсулина растворяют в растворе хлористоводородной кислоты (0,003 моль/л) pH 2,7–3,0, содержащем консервант в такой же концентрации, как и препарат. Доза испытуемого препарата и стандартного образца составляет 0,8 ЕД на 1 кг массы тела животного. Испытуемый препарат вводят в неразведенном виде. Концентрация (количество ЕД в 1 мл) стандартного образца должна быть равна концентрации неразведенного испытуемого препарата. Через 1,5; 3,0; 4,5 и 6,0 ч после введения препарата инсулина и стандартного образца определяют концентрацию сахара в крови у кроликов и подсчитывают среднее содержание сахара для каждой группы.

Требования в отношении пролонгированного действия отдельных препаратов инсулина изложены в соответствующих частных статьях.

Методы анализа (2.8–2.9)

Контейнеры. Реактивы

Общие тексты. Экстемпоральные лекарственные средства

Общие статьи