Федеральная служба по надзору в сфере защиты
прав потребителей и благополучия человека

ПРОТИВОЭПИДЕМИЧЕСКИЕ МЕРОПРИЯТИЯ

Сборник официальных документов

Том II

Редакторы и составители:
Академик РАМН, профессор Г.Г. Онищенко
Академик РАМН, профессор Б.Л. Черкасский

Москва
«ИНТЕРСЭН»
2006

gost.e-ecolog.ru

ББК 51.9
УДК 614.4 (083)
П83

П83 Противоэпидемические мероприятия. Том 2 Санитарные правила и методические документы, в 2 томах. /Редакторы и составители: Г.Г. Онищенко, Б.Л. Черкасский. – М.: «ИНТЕРСЭН», 2006. – с. 1184

ISBN 5-89834-093-9
ISBN 5-89834-095-5

Сборник содержит основные действующие на территории Российской Федерации правила и методические документы, регламентирующие деятельность по борьбе и профилактике инфекционных (паразитарных) болезней, предназначен для работников службы Роспотребнадзора, а также представляет интерес для специалистов многих других ведомств и областей знания.

ББК 51.9

ISBN 5-89834-093-9

Набор, верстка Антипина Н.А.

Подписано в печать 10.01.06

Формат 70x100/16 Печ. л. 74

Тираж 1000 Зак. 2762

Отпечатано в ОАО «Можайский полиграфический комбинат».
143200, г. Можайск, ул. Мира, 93.

© «ИНТЕРСЭН», 2006

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Председателя
Госкомсанэпиднадзора России,
Заместитель Главного
государственного санитарного
врача Российской Федерации
С.В. Семенов
31 октября 1996 года
Дата введения с момента утверждения

4. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. МЕДИЦИНСКИЕ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ

МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ МЕДИЦИНСКИХ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ, ВВОДИМЫХ ЛЮДЯМ

TESTING OF INJECTABLE MEDICAL IMMUNOBIOLOGICAL PREPARATIONS

Методические указания МУК 4.1/4.2.588-96

1. Область применения

Настоящие Методические указания предназначены для работников предприятий, осуществляющих контроль качества вакцин, анатоксинов, сывороток, иммуноглобулинов, аллергенов, эубиотиков и других иммунобиологических препаратов, вводимых людям.

Все положения настоящего документа распространяются на предприятия, производящие МИБП, независимо от их ведомственной принадлежности и формы собственности.

2. Нормативные ссылки

2.1. Вакцинопрофилактика СП 3.1.1.95.

2.2. Приказ Министерства здравоохранения СССР от 13.01.83 N 31.

2.3. Производство и контроль медицинских иммунобиологических препаратов для обеспечения их качества.

3. Общие положения

3.1. Целью введения настоящих Методических указаний является регламентация методов контроля медицинских иммунобиологических препаратов на их соответствие требованиям нормативной технической документации и, прежде всего, Фармакопейной статьи (Временной фармакопейной статьи).

3.2. Задачей проведения общих методов контроля является преимущественно установление безопасности МИБП, вводимых людям.

3.3. Методические указания содержат описание общих методов контроля МИБП, вводимых людям. Особенности контроля качества МИБП, не охватываемые настоящим документом, описаны в нормативно-технической документации на эти препараты.

4. Термины и определения

4.1. Биологические термины и определения

4.1.1. *Медицинские иммунобиологические препараты, вводимые людям,* - вакцины, анатоксины, иммуноглобулины, сыворотки, аллергены, эубиотики и другие лекарственные средства, предназначенные для иммунопрофилактики, иммунотерапии и иммунодиагностики инфекционных заболеваний и аллергических состояний.

4.1.2. *Качество МИБП* - совокупность свойств продукции, обусловливающих ее способность удовлетворять определенные потребности в соответствии с ее назначением.

4.1.3. *Готовая серия препарата* - совокупность емкостей, полученных из одного готового к розливу полуфабриката, разлитых из одной емкости.

4.2. Химические термины и определения

4.2.1. Концентрация. Концентрация растворов в весобъемных процентах. Например, для приготовления 10%-ного раствора следует брать 10 г вещества и растворителя для получения 100 мл раствора.

4.2.2. *Точная навеска.* Взвешивание на аналитических весах с точностью до 0,0002 г. Если не указано: «точная навеска», то навеску берут с точностью до 0,01 г.

4.2.3. *Постоянная масса.* Разница в массе между последовательными взвешиваниями, не превышающая 0,0005 г.

4.2.4. *Растворитель* - дистиллированная вода, если нет других указаний.

4.2.5. *Оценка результатов.* Расчет результатов на основании 2-х параллельных определений.

4.2.6. *Квалификация реактивов.* Для анализа используют реактивы квалификации х.ч. и ч.д.а.

4.2.7. *Моющее средство.* Хромовая смесь для обработки посуды (5%-ный раствор калия дихромата в концентрированной серной кислоте).

4.2.8. *Контрольный опыт.* Определение, проводимое с теми же количествами реактивов в тех же условиях, но без испытуемого препарата. Вместо испытуемого препарата используется растворитель.

4.2.9. *Хранение растворов.* Хранение растворов реактивов при температуре 18 - 20 °С в течение 6 мес., если нет изменений их физических свойств.

4.2.10. *Спирт* - этиловый ректификованный, содержащий 96% спирта (по массе).

5. Определение электрофоретической чистоты и молекулярных масс генно-инженерных препаратов

Метод используется для анализа генно-инженерных продуктов, а также некоторых высокоочищенных биотехнологических препаратов, предназначенных для введения людям.

Для определения чистоты, гомогенности и молекулярной массы генно-инженерных продуктов применяют метод вертикального электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) с додецилсульфатом натрия (SDS) в редуцирующих и нередуцирующих условиях с последующей окраской геля как Кумасси ярко-голубым R-250, так и нитратом серебра. Образование комплекса SDS с белком устраняет различия между белками, связанные с их зарядом, и переводит молекулы белков в конформацию, при которой радиус Стокса является функцией молекулярной массы белка. При соблюдении этих условий подвижность белков отражает их молекулярные массы.

Испытания проводят на полуфабрикате препарата (очищенного продукта) до добавления каких-либо стабилизаторов, наполнителей, консервантов и других компонентов, входящих в состав лекарственной формы.

Электрофорез проводят в редуцирующих (в присутствии бета-меркаптоэтанола) и нередуцирующих (в отсутствии бета-меркаптоэтанола) условиях. Определение молекулярных масс генно-инженерных белков проводят при окрашивании Кумасси ярко-голубым R-250 с нагрузкой на лунку 10 мкг, а определение чистоты - при нагрузке 40 мкг.

Параллельно, для оценки содержания примесей как белковой, так и небелковой природы, проводят электрофорез в редуцирующих условиях при окрашивании нитратом серебра с нагрузкой на лунку 2 - 5 мкг белка.

Методика определения. Полимеризацию геля ведут в ячейке, образованной стеклами и прокладками, определяющими размер и толщину геля. Сборку ячейки проводят в соответствии с инструкцией по работе с конкретным типом прибора для вертикального электрофореза. Описание метода проводится на примере аппарата «Протеан 11» фирмы «Био-Рад», США. Для данного прибора размеры стекол ячейки составляют: внешнее стекло - 22 х 20 см, внутреннее стекло - 20 х 20 см. Размеры прокладок: длина - 20 см, ширина - 18 см, толщина - 0,75 - 1,0 мм. При наличии приборов с другими характеристиками необходимо внести соответствующие коррективы в постановку испытаний.

Проведение электрофореза

Нижнюю камеру аппарата для электрофореза заполняют электродным буферным раствором и вставляют в нее электрофоретическую ячейку с гелем. Верхний резервуар заполняют электродным буферным раствором, удаляют из лунок пузырьки воздуха. Под слой буферного раствора в лунку вносят исследуемые образцы. Электрофорез проводят при температуре 10 - 14 °С в режиме постоянного тока. При прохождении фронта красителя через концентрирующий гель сила тока составляет 10 - 12,5 мА на 1 кв. см сечения геля (20 - 25 мА/гель). После вхождения фронта красителя в нижний разделяющий слой на 5 - 7 мм силу тока увеличивают до 20 мА на 1 кв. см сечения геля (40 мА/гель). После продвижения красителя на 14 см от нижнего края концентрирующего геля ток отключают, отделяют гель от стекол ячейки и переносят в кювету для окрашивания. Для того чтобы можно было выявить присутствие в исследуемом образце агрегатов и других компонентов, не входящих в гель, концентрирующий гель полностью не обрезают, оставляя 0,5 - 10 мм. В случае необходимости можно обрезать часть нижнего геля по фронту красителя. Нанесение образцов на гель проводят в следующем порядке. В лунки 1 и 10 вносят соответствующий (с бета-меркаптоэтанолом или без) буфер для приготовления образцов, разбавленный деионизованной водой в 4 раза. В лунки 2 и 9 вносят по 7 мкл смеси стандартных белков, например фирмы «Фармация», Швеция. В остальные лунки вносят исследуемые образцы. При окрашивании Кумасси ярко-голубым R-250 вносят попарно такие объемы образца, чтобы количество белка в них составляло соответственно 10 и 40 мкг. При окрашивании геля нитратом серебра, в зависимости от препарата, в лунки вносят 2 - 5 мкг белка. Параллельно в одну из лунок вносят 0,002 - 0,01 мкг белка (в зависимости от чувствительности выявления минимальных количеств белка в данных условиях).

Окрашивание геля

1. *Окрашивание Кумасси ярко-голубым R-250.* Гель фиксируют 1 ч в фиксирующем растворе, после чего окрашивают в течение 16 ч. Затем окрашивающий раствор сливают, гель 2 - 3 раза споласкивают обесцвечивающим раствором и помещают в аппарат для обесцвечивания, заполненный обесцвечивающим раствором. Обесцвечивание проводят в течение 15 мин. при напряжении 24 В. Гель вынимают из аппарата для обесцвечивания и споласкивают раствором для обесцвечивания и деионизованной водой.

2. *Окрашивание нитратом серебра.* Окрашивание геля нитратом серебра проводят с использованием коммерческого набора реагентов (фирмы «Био-Рад», США, или других) согласно прилагаемой инструкции. Следует обратить внимание на время выдерживания геля в проявляющем растворе. Окрашивание прекращают в момент проявления полосы в лунке с минимальным количеством препарата (например, 0,005 мкг).

Высушивание геля

В кювету наливают 0,5 л раствора для высушивания геля, помещают лист целлофановой диализной мембраны, например фирмы «Фармация», Швеция. На нем размещают гель и сверху накрывают вторым листом целлофановой диализной мембраны. Кювету закрывают крышкой и помещают на качалку. При покачивании гель выдерживают 20 - 30 минут. Стекло смачивают раствором для высушивания геля и на него плотно, без пузырьков воздуха, натягивают смоченный лист целлофановой диализной мембраны, на нее помещают гель. Сверху плотно, без пузырьков воздуха прикрывают вторым смоченным листом целлофановой диализной мембраны. Закрепляют и оставляют на столе при комнатной температуре не менее чем на 18 - 20 ч. Высушенный гель снимают со стекла вместе с целлофановой диализной мембраной и аккуратно обрезают. Гель готов для проведения денситометрии и оценки результатов.

Денситометрия окрашенного геля

Проводится денситометром фирмы ЛКБ, Швеция, или другим не меньшей чувствительности. Денситометрию проводят в соответствии с инструкцией по эксплуатации данного прибора от верхнего края нижнего разделяющего геля по пути пробега белков в данной лунке. В зависимости от конструкции аппарата может проводиться денситометрия влажного и высушенного геля. Для учета фона геля может денситометрироваться дорожка с нанесенным буферным раствором для образцов, разбавленным деионизованной водой в 4 раза (в нашем примере дорожки 1 и 10). Площадь интегрирования самого большого зарегистрированного пика является нижним пределом для денситометрии анализируемых образцов. Однако при этом на дорожках с буферным раствором не должны обнаруживаться окрашенные полосы.

Определение молекулярных масс генно-инженерных белков

Молекулярные массы мономеров и олигомеров исследуемого продукта определяют на электрофореграмме, полученной после окрашивания Кумасси ярко-голубым R-250 в редуцирующих условиях при нагрузке на лунку 10 мкг белка. Для этого измеряют расстояние от верхнего края нижнего разделяющего геля до белковых зон стандартных белков (дорожки 2 и 9) - величина Rбелка. Таким же образом определяют расстояние пробега красителя (величина Rстандарт). Для каждого стандартного белка определяют коэффициент подвижности (Ra) по формуле:

$$R_a = \frac{R_{белка}}{R_{стандарт}}$$

Строят график зависимости Ra стандартного белка от логарифма молекулярной массы стандартного белка. Затем определяют Ra для каждой белковой зоны исследуемого образца и по калибровочному графику определяют логарифмы молекулярной массы, из которых рассчитывают молекулярную массу соответствующих белков.

Оценка результатов электрофореза

После завершения электрофореза исследуемые образцы не должны содержать неидентифицированных продуктов или их агрегатов в лунках гребенки геля или на границе при вхождении в гель. Для количественной оценки процента содержания целевого белка, его олигомеров, фрагментов и примесей проводят сканирование геля при помощи денситометра. Содержание генно-инженерного продукта в редуцирующих условиях при окрашивании Кумасси ярко-голубым R-250 должно быть не менее 95%. Требования к другим параметрам (относительное содержание мономеров, олигомеров, фрагментов, белковых и небелковых примесей, чистота и картина дорожки на электрофореграмме в нередуцирующих условиях и при окрашивании нитратом серебра) определяются характеристиками и назначением конкретных исследуемых препаратов и указываются в частных фармакопейных статьях.

Примечания.

I. Приготовление нижнего разделяющего геля

1. Для приготовления 15%-ного геля в химический стакан, емкостью 100 мл, наливают 25 мл 30%-ного раствора акриламида/бисакриламида, 12,5 мл буферного раствора трис-HCl концентрации 1,5 моль/л, pH 8,8, 11,75 мл деионизованной воды и 500 мкл 10%-ного раствора SDS. Полученный раствор дегазируют 15 мин. под вакуумом в колбе Бунзена. К дегазированному раствору прибавляют 250 мкл 10%-ного раствора ПСА и 25 мкл TEMED, перемешивают и заливают в электрофоретическую ячейку.

2. Для приготовления 12%-ного геля в химический стакан, емкостью 100 мл, наливают 20 мл 30%-ного раствора акриламида/бисакриламида, 12,5 мл буферного раствора трис-HCl концентрации 1,5 моль/л, pH 8,8, 16,75 мл деионизованной воды и 500 мкл 10%-ного раствора SDS. Полученный раствор дегазируют 15 мин. под вакуумом в колбе Бунзена. К дегазированному раствору добавляют 250 мкл 10%-ного раствора ПСА и 25 мкл TEMED, перемешивают и заливают в электрофоретическую ячейку.

Мениск раствора в ячейке должен находиться на расстоянии 3 - 4 см от верхнего края внутреннего стекла. На раствор в ячейке наслаивают 1,0 мл деионизованной воды так, чтобы гель и

вода не перемешивались. Полимеризация геля происходит в течение 30 - 40 мин. при температуре 18 - 20 °С. Сначала граница между гелем и водой размывается, а затем становится резкой. Это является моментом окончания полимеризации.

II. Приготовление верхнего концентрирующего геля

После окончания полимеризации нижнего разделяющего геля воду сливают, поверхность геля тщательно подсушивают с помощью фильтровальной бумаги и заливают в ячейку 4%-ный раствор верхнего концентрирующего геля. Для его приготовления в химический стакан, вместимостью 50 мл, наливают 1,3 мл 30%-ного раствора акриламида/бисакриламида, 2,5 мл раствора трис-HCl концентрации 0,5 моль/л, pH 6,8, 6,1 мл деионизованной воды и 100 мкл 10%-ного раствора SDS. Раствор дегазируют под вакуумом в колбе Бунзена 15 мин. К дегазированному раствору добавляют 50 мкл 10%-ного раствора ПСА, 10 мкл TEMED, перемешивают и заливают в электрофоретическую ячейку. После этого в ячейку вставляют гребенку с необходимым (например, десятью) количеством зубьев и толщиной, равной толщине прокладки. Полимеризация геля происходит в течение 30 - 40 мин. при температуре 18 - 20 °С. После завершения полимеризации гребенку удаляют и промывают образовавшиеся лунки 1 раз деионизованной водой и 10 раз электродным буферным раствором.

III. Приготовление растворов

1. Электродный буферный раствор (5х) pH 8,3.

45,0 г трис(гидроксиметил)аминометана, 216,0 г глицина, 15,0 г SDS помещают в градуированный стакан, прибавляют 2000,0 мл деионизованной воды, перемешивают до полного растворения, доводят объем деионизованной водой до 3000,0 мл, фильтруют, измеряют pH, который должен быть в пределах 8,3. Доводить pH раствора кислотой или щелочью до необходимого значения не допускается.

2. Электродный буферный раствор pH 8,3.

К 600,0 мл электродного буферного раствора (5х) прибавляют 2400,0 мл деионизованной воды и перемешивают.

3. 30%-ный раствор акриламида/бисакриламида.

29,20 г акриламида и 0,80 г бисакриламида помещают в градуированный химический стакан и прибавляют 80,0 мл деионизованной воды, перемешивают до полного растворения, доводят объем до 100,0 мл деионизованной водой. Раствор фильтруют и хранят в темной посуде при 4 - 6 °С не более месяца.

4. Буферный раствор трис-HCl концентрации 1,5 моль/л, pH 8,8.

54,450 г трис(гидроксиметил)аминометана помещают в градуированный химический стакан, прибавляют 150,0 мл деионизованной воды, перемешивают до полного растворения. Доводят pH до 8,8 раствором HCl концентрации 1 моль/л. Доводят объем до 300,0 деионизованной водой. Раствор фильтруют и хранят в течение месяца при 4 - 6 °С.

5. Буферный раствор трис-HCl концентрации 0,5 моль/л, pH 6,8.

6,0 г трис(гидроксиметил)аминометана помещают в градуированный химический стакан, прибавляют 60,0 мл деионизованной воды, перемешивают до полного растворения. Доводят pH до 6,8 раствором HCl концентрации 1 моль/л. Доводят объем до 100,0 мл деионизованной водой. Раствор фильтруют и хранят в течение месяца при 4 - 6 °С.

6. 10%-ный раствор SDS.

10,0 г додецилсульфата натрия помещают в градуированный химический стакан, прибавляют 80,0 мл деионизованной воды и тщательно перемешивают до полного растворения. Доводят объем до 100,0 мл деионизованной водой. Хранят при температуре 18 - 25 °С.

7. 10%-ный раствор ПСА.

100,0 мг аммония персульфата растворяют в 1,0 мл деионизованной воды. Используется только свежеприготовленный раствор.

8. 0,5%-ный бромфеноловый синий.

0,25 г бромфенолового синего разводят в 50,0 мл деионизованной воды до полного растворения. Раствор хранят при температуре 18 - 25 °С.

9. Раствор для приготовления образцов при проведении электрофореза в нередуцирующих условиях.

В химический стакан помещают 4,2 мл деионизованной воды, 1,0 мл буферного раствора трис-

HCl концентрации 0,5 моль/л, pH 6,8, 0,8 мл глицерина, 1,6 мл 10%-ного раствора SDS, 0,4 мл 0,5%-ного раствора бромфенолового синего. Раствор тщательно перемешивают и хранят при температуре 18 - 25 °С.

10. Раствор для приготовления образцов при проведении электрофореза в редуцирующих условиях.

В химический стакан помещают 3,8 мл деионизованной воды, 1,0 мл буферного раствора трис-HCl концентрации 0,5 моль/л, pH 6,8, 0,8 мл глицерина, 1,6 мл 10%-ного раствора SDS, 0,4 мл бета-меркаптоэтанола, 0,4 мл 0,5%-ного раствора бромфенолового синего. Раствор тщательно перемешивают и хранят при температуре 18 - 25 °С.

11. Образец исследуемого препарата смешивают в соотношении 3:1 с раствором для проведения электрофореза в нередуцирующих условиях или с раствором для проведения электрофореза в редуцирующих условиях. Смесь прогревают в кипящей водяной бане в течение 5 или 10 мин. (в зависимости от исследуемого белка) и охлаждают до температуры 18 - 25 °С.

12. Приготовление раствора стандартных белков для электрофореза.

Смесь стандартных белков для электрофореза («Фармация», Швеция, или подобные другие) с соответствующим для данного исследования диапазоном молекулярных масс (например, от 14400 до 94000) растворяют в 100 мкл разбавленного в 4 раза раствора для приготовления образцов при проведении электрофореза в редуцирующих условиях или в 100 мкл разбавленного в 4 раза раствора для приготовления образцов для проведения электрофореза в нередуцирующих условиях. Раствор прогревают в кипящей водяной бане в течение 5 мин. и охлаждают до температуры 18 - 25 °С. Разливают аликвоты и хранят при -20 °С.

13. Фиксирующий раствор.

В химический стакан наливают 250,0 мл этилового спирта, 100,0 мл ледяной уксусной кислоты, добавляют деионизованной воды до объема 1000,0 мл. Хранят при температуре 18 - 25 °С.

14. Окрашивающий раствор.

1,0 г Кумасси ярко-голубого R-250 помещают в химический стакан, доводят до объема 250,0 мл этиловым спиртом, перемешивают не менее 3,5 часа до полного растворения красителя, добавляют 100,0 мл ледяной уксусной кислоты и доводят объем деионизованной водой до 1000,0 мл. Хранят при температуре 18 - 25 °С.

15. Обесцвечивающий раствор.

В химический стакан наливают 250,0 мл этилового спирта, 100,0 мл ледяной уксусной кислоты и доводят объем деионизованной водой до 1000 мл.

16. Раствор для высушивания геля.

В химический стакан наливают 150,0 мл этилового спирта, 50,0 мл глицерина, перемешивают и доводят объем деионизованной водой до 500,0 мл. Хранят при температуре 18 - 25 °С.

17. При отборе проб и растворов используют автоматические пипетки с соответствующими диапазонами объемов:

- *от 1 мкл до 10 мкл;*
- *от 5 мкл до 40 мкл;*
- *от 40 мкл до 200 мкл;*
- *от 200 мкл до 1000 мкл;*
- *от 1 мл до 5 мл.*

6. Контроль содержания примесей клеточных ДНК в биотехнологических препаратах

Настоящему испытанию подлежат генно-инженерные препараты, моноклональные антитела и биотехнологические продукты, получаемые на перевиваемых клеточных линиях, предназначенные для введения людям. В частных фармакопейных статьях на отдельные препараты, учитывая их специфические характеристики и особенности производства, возможно внесение соответствующих изменений при проведении данного контроля.

Испытание проводят на полуфабрикате препарата (очищенного продукта) до добавления каких-либо стабилизаторов, наполнителей, консервантов и других компонентов, которые могут входить в состав конечной лечебной формы.

Выделение ДНК из клеток штамма продуцента

1 г биомассы клеток штамма продуцента суспендируют в 20 мл буфера ТЕ, добавляют 10%-ный раствор додецилсульфата натрия (SDS) до конечной концентрации 1%, лизируют в течение 15 мин., перемешивая. К полученному лизату добавляют равный объем смеси фенол-хлороформ (1:1). Смесь встряхивают в течение 15 мин., центрифугируют при 5000 об./мин. в течение 5 мин., собирают верхний слой (без интерфазы) и повторяют экстракцию фенол-хлороформом еще дважды. Собирают верхний слой, добавляют раствор 5 моль/л ацетата аммония до конечной концентрации 0,25 моль/л и 2 - 2,5 объема охлажденного до -20 °С этилового спирта. Полученную смесь оставляют на 1 час при -20 °С (можно оставить на ночь - 14 - 16 часов), затем центрифугируют при 5000 об./мин. в течение 5 мин. Этиловый спирт сливают, осадок подсушивают на воздухе и растворяют в 1,5 мл буфера ТЕ. К раствору ДНК добавляют раствор РНК-азы (10 мг/мл) до конечной концентрации 50 мкг/мл. Смесь выдерживают при периодическом помешивании в течение одного часа при 37 °С, после чего к ней добавляют сухую лиофилизированную протеиназу К до конечной концентрации 100 мкг/мл. Смесь инкубируют, периодически помешивая, в течение 30 мин. при 37 °С, затем депротеинизируют равным объемом смеси фенол-хлороформ (1:1) и далее равным объемом хлороформа. К водной фазе добавляют раствор 5 моль/л ацетата аммония до конечной концентрации 0,25 моль/л и 2 объема охлажденного до -20 °С этилового спирта. Выпавший осадок ДНК собирают центрифугированием, промывают в 70%-ном растворе этанола, подсушивают при комнатной температуре до удаления остатков этанола и растворяют в 2 мл буфера ТЕ.

Измерение концентрации ДНК

Концентрацию ДНК определяют спектрофотометрически при длине волны 256 нм в кювете с толщиной слоя 1 см. 30 мкл раствора ДНК разводят буфером ТЕ до 3,0 мл, помещают в кювету спектрофотометра и определяют оптическую плотность раствора. В качестве контроля используют буфер ТЕ. Концентрацию полученного раствора ДНК ($С_{ДНК}$, мкг/мл) вычисляют по формуле:

$$СДНК = А \times Э \times Р,$$

где:

А - оптическая плотность раствора при длине волны 256 нм;

Э - 50 мкг/мл (при такой концентрации оптическая плотность раствора ДНК при 256 нм равна одной оптической единице);

Р - кратность разведения исследуемого раствора, в данном случае равная 100.

Пример расчета: в результате спектрофотометрического анализа раствора ДНК установлено, что оптическая плотность раствора при 256 нм составляет 0,2 оптической единицы. Тогда:

$$СДНК = 0,2 \times 50 \times 100 = 1000 \text{ мкг/мл (1 мг/мл)}.$$

Критерием чистоты препарата ДНК является соотношение значений оптической плотности раствора ДНК при длинах волн 256 и 280 нм. Для чистых препаратов ДНК указанное соотношение выше 1,7. Например, светопоглощение исследуемого разведенного раствора ДНК при 280 нм равно 0,11 оптической единицы. Тогда соотношение 256/280 равно 0,20/0,11 = 1,81.

Полученный препарат очищенной клеточной ДНК в дальнейшем используют для приготовления меченой ДНК-зонда и построения калибровочного графика.

Получение меченой ДНК

В пробирку для микропроб вносят 2,0 МБк α ^{32}Р-дезоксиаденозинтрифосфата (удельная радиоактивность 8 - 12 x 10^7 МБк/ммоль).

Затем пробирку помещают в ледяную баню и вносят следующие компоненты реакции: 5 мкл буфера для ник-трансляции, 1 мкг ДНК клеток штамма-продуцента, 1 мкл раствора дезоксицитидинтрифосфата, тимидинтрифосфата и дезоксигуанозинтрифосфата в концентрации 1 моль/л и деионизованную воду до 45 мкл. Раствор ДНК-азы 1 (1 мг/мл) разводят деионизованной водой в 10000 раз и 0,5 мкл полученного раствора вносят в реакционную смесь. Далее добавляют 15 ед. ДНК-полимеразы 1 E.coli и смесь тщательно перемешивают. Реакционную смесь инкубируют в

течение 2-х часов при температуре 15 °С. Реакцию останавливают добавлением в реакционную смесь 2 мкл раствора ЭДТА концентрации 0,5 моль/л.

Определение удельной радиоактивности меченой ДНК

На 2 нитроцеллюлозных фильтра диаметром 2 см наносят по 1 мкл реакционной смеси. Один фильтр дважды отмывают в 20 мл холодного 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты в течение 5 мин., далее 2 мин. в 10 мл этанола и высушивают при комнатной температуре. Оба фильтра помещают в сцинтилляционные флаконы для определения радиоактивности, наливают во флаконы по 4 мл толуолового сцинтилляционного раствора и определяют на счетчике количество импульсов в минуту. По полученным данным определяют процент включения метки, рассчитывают общую радиоактивность в 50 мкл реакционной смеси и, соответственно, удельную радиоактивность ДНК, т.е. количество импульсов в минуту на 1 мкг ДНК. Удельная радиоактивность ДНК должна быть не менее 2,0 х 10^8 имп./мин. Для реакции гибридизации необходимо взять (2 +/- 0,5) х 10^6 имп./мин. на 1 мл гибридизационной смеси.

Очистка меченой ДНК

Предварительно готовят суспензию сефадекса G-25. Носик наконечника автоматической пипетки, вместимостью 1,0 мл, закрывают небольшим кусочком стекловаты и заполняют суспензией сефадекса. В полиэтиленовую центрифужную пробирку помещают пробирку для микропроб типа «Эппендорф», вместимостью 1,5 мл, а в нее наконечник пипетки с сефадексом. Пробирку центрифугируют при 18000 об./мин. в течение 2,5 мин. Сефадекс в наконечнике еще раз промывают буфером ТЕ, содержащим 20 мкг/мл денатурированной ДНК спермы лосося. Жидкость из эппендорфовской пробирки удаляют, в наконечник на гель наносят реакционную смесь с меченой ДНК и опять центрифугируют в том же режиме. Не включившиеся в ДНК меченые и немеченые нуклеозидтрифосфаты остаются в геле, меченая ДНК собирается на дне пробирки в объеме 50 мкл.

Иммобилизация ДНК на мембране

К полуфабрикату исследуемого препарата, объемом 0,5 мл, добавляют 1 мкл раствора ДНК спермы лосося концентрации 20 мг/мл, затем дважды проводят депротеинизацию равным объемом смеси фенол-хлороформ (1:1), собирают водный слой после центрифугирования в течение 5 мин. при 5000 об./мин. и осаждают двумя объемами этанола в присутствии ацетата аммония в конечной концентрации 0,3 моль/л. Пробы выдерживают 1 ч при температуре -20 °С (можно оставить на ночь - 14 - 16 часов). Осажденные нуклеиновые кислоты собирают центрифугированием при 13000 об./мин. в микроцентрифуге в течение 6 мин. Супернатант осторожно сливают, в пробирки с осадками нуклеиновых кислот добавляют 50 мкл 0,5 моль/л раствора гидроокиси натрия и выдерживают 20 мин. при температуре 18 - 25 °С. Пробы нейтрализуют на холоду равным объемом (50 мкл) нейтрализующего раствора и помещают в ледяную баню. Далее на нижнюю часть аппарата для дот-гибридизации кладут смоченную дистиллированной водой фильтровальную бумагу, на нее помещают мембрану Hybond-N («Амершам») и прижимают верхней частью аппарата, снабженной специальными зажимами. Верхняя часть аппарата для дот-гибридизации представляет собой пластину (132 х 100 х 18) с лунками. Исследуемые образцы вносят в лунки А (1 - 12) и в следующие ряды в зависимости от количества исследуемых проб.

Параллельно, рядом с исследуемыми образцами, наносят ряд известных разведений очищенной клеточной ДНК в концентрации от 20 нг до 0 пкг. Разведения готовят с помощью буфера ТЕ, содержащего ДНК-носитель (20 мкг/мл ДНК спермы лосося) следующим образом. В 8 пробирок для микропроб добавляют по 100 мкл буфера ТЕ, содержащего 20 мкг/мл ДНК носителя. Раствор ДНК штамма-продуцента разводят до концентрации 100 мкг/мл и 5 мкл этого раствора ДНК разводят до 500 мкл раствором ТЕ с 20 мкг/мл ДНК-носителя. Таким образом получают раствор с концентрацией 1000 нг/мл. 25 мкл этого раствора (25 нг) добавляют в первую пробирку, тщательно перемешивают, отбирают 25 мкл полученного раствора (5 нг) и переносят во вторую пробирку, тщательно перемешивают и отбирают 1/5 часть раствора (25 мкл, содержащие 1 нг ДНК) и переносят в третью пробирку, тщательно перемешивают. Таким образом разводят до восьмой пробирки. В восьмую пробирку ДНК не добавляют. В табл. 1 представлены концентрации стандартного ряда ДНК в 1 - 8 пробирках.

Содержимое каждой пробирки стандартного ряда ДНК обрабатывают равным объемом смеси фенол-хлороформ (1:1), центрифугируют при 5000 об./мин. в течение 5 мин., собирают вод-

Таблица 1

Концентрации стандартного ДНК в пробирках

N пробирки	Количество ДНК в пробирке	
1	20	нг
2	4	нг
3	0,8	нг
4	160	пг
5	32	пг
6	6,4	пг
7	1,28	пг
8	0	пг

ный слой и осаждают двумя объемами этанола в присутствии 0,3 моль/л ацетата аммония. Пробы выдерживают 1 ч при -20 °С. Осажденные нуклеиновые кислоты собирают центрифугированием на микроцентрифуге при 13000 об./мин. в течение 6 мин. Образцы стандартного ряда с известными концентрациями клеточной ДНК денатурируют аналогично пробам полуфабрикатов исследуемых препаратов, то есть добавляют в каждую пробирку 50 мкл раствора 0,5 моль/л гидроокиси натрия и инкубируют 20 мин. при температуре 18 - 25 °С. Далее нейтрализуют равным объемом нейтрализующего раствора и помещают на ледяную баню, затем наносят на мембрану через лунки. Аппарат для дот-гибридизации подключают к водоструйному насосу, чтобы растворы образцов полностью просочились через мембрану. Лунки промывают 200 мкл раствора 5х раствора SSC. Далее мембрану вынимают из аппарата, высушивают на фильтровальной бумаге при температуре 18 - 25 °С. Для иммобилизации ДНК на мембране мембрану облучают ультрафиолетовым светом в течение 2-х мин. или выдерживают 2 ч при 80 °С.

Проведение реакции гибридизации

Мембрану с образцами ДНК помещают в полиэтиленовый пакет, запечатывают при помощи аппарата «Молния», оставляя небольшое отверстие для внесения в пакет растворов. Раствор для предгибридизации, подогретый до 42 °С, вносят автоматической пипеткой в пакет из расчета 0,20 мл на 1 см мембраны. Выдавливают как можно больше воздуха из мембраны, запечатывают отверстие нагреванием, помещают пакет между двумя стеклами и помещают в водяную баню при 42 °С на 2 - 3 часа. По истечении времени предгибридизации пакет вскрывают, отрезав один угол ножницами. Сливают раствор для предгибридизации как можно полнее и в пакет вносят раствор для гибридизации из расчета 0,10 мл на 1 см мембраны. Раствор для гибридизации - это тот же раствор для предгибридизации, но содержащий меченую (α ^{32}P) ДНК. Меченую радиоактивным фосфором и очищенную ДНК (2,0 х 10^6 имп./мл раствора предгибридизации) перед добавлением в раствор для гибридизации прогревают при температуре 100 °С 5 мин., с последующим быстрым охлаждением на ледяной бане. Из пакета удаляют воздух, запаивают отрезанный угол и инкубируют пакет с мембраной между стеклами в водяной бане при температуре 42 °С в течение 24-х ч.

Отмывка мембраны

После окончания инкубации вынимают пакет из водяной бани, разрезают его вдоль 3-х сторон, вынимают мембрану и немедленно погружают в сосуд с раствором А при температуре 18 - 25 °С. Через 5 мин. переносят мембрану в другой сосуд, содержащий раствор Б, и инкубируют в течение 15 мин. при температуре 18 - 25 °С, периодически помешивая. Затем переносят мембрану в сосуд с тем же раствором и инкубируют 2 часа при температуре 65 °С, слегка покачивая. Меняют буфер на свежий и еще раз инкубируют 30 мин. при температуре 18 - 25 °С, периодически помешивая. Нельзя допускать высыхания мембраны ни на одном этапе промывания. После промывки мембрану высушивают на воздухе при температуре 18 - 25 °С.

Радиоавтография

Сухую мембрану заворачивают в пленку типа «Saran wrap» («Амершам», США) и помещают в кассету для рентгеновской пленки с усиливающим экраном Э4-ВЗА. Туда же помещают рентгеновскую пленку (ТУ 6-17-1245-83) типа РМ-В, кассету закрывают и экспонируют при температуре -70 °С в течение 1 - 3 суток. Далее пленку проявляют погружением в раствор проявителя на

5 - 6 мин. (в темноте). Затем пленку промывают холодной водопроводной водой и погружают в раствор фиксатора на 10 мин., после чего промывают холодной водой и высушивают.

Оценка результатов

На местах нанесения ряда известных разведений очищенных клеточных ДНК и на местах нанесения ДНК из образцов исследуемых препаратов (если она в них присутствует) на рентгеновской пленке появляются темные пятна. Количество примеси ДНК в образцах препаратов определяют визуально или при помощи денситометра путем сравнения интенсивности потемнения пятен в месте нанесения исследуемых проб с калибровочным рядом известных количеств клеточных ДНК.

В соответствии с требованиями ВОЗ и национальными руководящими документами количество примесей клеточных ДНК в биотехнологических препаратах должно быть менее 100 пкг на дозу. Для препаратов, предназначенных для многократного введения людям, содержание примеси клеточных ДНК должно быть менее 10 пкг на дозу.

Примечания.

I. Приготовление растворов

1. Буферный раствор трис-HCl концентрации 1 моль/л, pH 8,0.

121,1 г трис(гидроксиметил)аминометана помещают в градуированный химический стакан, прибавляют 700,0 мл деионизованной воды, перемешивают до полного растворения. Доводят pH до 8,0 раствором HCl концентрации 1 моль/л. Доводят объем до 1000 мл деионизованной водой и фильтруют через стеклянный фильтр GF/B. Раствор хранят в течение месяца при 4 - 6 °С.

2. Буферный раствор трис-HCl концентрации 1 моль/л, pH 7,2.

121,1 г трис(гидроксиметил)аминометана помещают в градуированный химический стакан, прибавляют 700,0 мл деионизованной воды и перемешивают до полного растворения. Доводят pH до 7,2 раствором HCl концентрации 1 моль/л. Доводят объем до 1000,0 мл деионизованной водой и фильтруют через стеклянный фильтр GF/B. Раствор хранят в течение месяца при 4 - 6 °С.

3. Раствор динатриевой соли ЭДТА (трилон-Б) концентрации 0,5 моль/л, pH 8,0.

18,6 г ЭДТА динатриевой соли помещают в градуированный химический стакан, прибавляют 70,0 мл деионизованной воды, добавляют 45%-ный раствор гидроокиси натрия до полного растворения. Доводят pH до 8,0 45%-ным раствором гидроокиси натрия (NaOH). Доводят объем до 100,0 мл деионизованной водой, фильтруют через стеклянный фильтр GF/B. Раствор хранят в течение месяца при 4 - 6 °С.

4. Буферный раствор ТЕ.

1,0 мл раствора трис-HCl концентрации 1 моль/л, pH 8,0, вносят в градуированный химический стакан, прибавляют 0,2 мл буферного раствора трилона-Б концентрации 0,5 моль/л, pH 8,0, и доводят деионизованной водой до 100,0 мл. Раствор хранят в течение месяца при 4 - 6 °С.

5. 10%-ный раствор SDS.

50,0 г додецилсульфата натрия помещают в градуированный химический стакан, прибавляют 300,0 мл деионизованной воды и перемешивают до полного растворения. Доводят объем до 500,0 мл деионизованной водой. Раствор хранят при 18 - 25 °С.

6. Раствор ацетата аммония концентрации 5 моль/л.

38,5 г ацетата аммония помещают в градуированный химический стакан, прибавляют 70,0 мл деионизованной воды и перемешивают до полного растворения. Доводят объем до 100,0 мл деионизованной водой и фильтруют через стеклянный фильтр GF/B. Раствор хранят при 4 - 6 °С.

7. Раствор водонасыщенного фенола.

100,0 мл расплавленного фенола наливают в емкость и прибавляют 100,0 мл буферного раствора трис-HCl концентрации 1 моль/л, pH 8,0. Содержимое емкости перемешивают стеклянной палочкой. Раствор хранят при 4 - 6 °С в течение 1 - 2-х мес.

8. Раствор РНК-азы 1.

0,01 г РНК-азы 1 помещают в пробирку для микропроб и растворяют в 1,0 мл деионизованной воды. Раствор хранят при -20 °С.

9. Раствор NaOH концентрации 5 моль/л.

20,0 г гидроокиси натрия помещают в градуированный химический стакан, прибавляют 70,0 мл деионизованной воды и перемешивают до полного растворения. Доводят объем до 100,0 мл деионизованной водой. Раствор хранят при 18 - 25 °С.

10. Раствор MgCl2 концентрации 1 моль/л.

20,0 г магния хлористого шестиводного помещают в градуированный химический стакан, прибавляют 70,0 мл деионизованной воды и перемешивают до полного растворения. Доводят объем до 100,0 мл деионизованной водой. Плотность раствора ро = 1,075. Раствор фильтруют через стеклянный фильтр GF/B. Раствор хранят при 4 - 6 °С в течение 1 - 2-х мес.

11. Раствор ДНК-азы 1.

0,001 г ДНК-азы 1 помещают в пробирку для микропроб и растворяют в 0,1 мл 10%-ного раствора SDS, прибавляют 0,4 мл деионизованной воды и 0,5 мл глицерина. Содержимое пробирки перемешивают и хранят при -20 °С.

12. Раствор дезоксирибонуклеозидтрифосфатов концентрации 0,001 моль/л.

2,9 мг дезоксиаденозинтрифосфата, 3,1 тимидинтрифосфата и 3,0 мг дезоксигуанидинтрифосфата помещают в пробирку и растворяют в 5,0 мл деионизованной воды. Раствор разливают по 0,5 мл в пробирки для микропроб и хранят при -20 °С в течение шести месяцев.

13. Буферный раствор для ник-трансляции.

1,5 мг бычьего сывороточного альбумина (БСА) помещают в пробирку, прибавляют 5,0 мл раствора трис-HCl концентрации 1 моль/л, pH 7,2, 1,0 мл раствора MgCl2 концентрации 1 моль/л и доводят раствор до 10 мл деионизованной водой. Раствор хранят в течение 6-ти месяцев при -20 °С.

14. Приготовление сефадекса G-25.

В химический стакан наливают 80,0 мл раствора ТЕ и медленно прибавляют 5,0 г сефадекса G-25. Оставляют на ночь при 18 - 25 °С. Хранят суспензию при 4°С.

15. 20х раствор SSC (лимоннокислый натрий с натрием хлористым) концентрации 3 моль/л.

173,0 г натрия хлористого и 88,2 г лимоннокислого натрия помещают в градуированный химический стакан, прибавляют 700,0 мл деионизованной воды и перемешивают до полного растворения. Доводят объем до 1000,0 мл деионизованной водой. Раствор фильтруют через стеклянный фильтр GF/B. Хранят раствор при 18 - 25 °С в течение 2-х месяцев.

16. 5х раствор SSC (лимоннокислый натрий с натрием хлористым) концентрации 0,6 моль/л.

5,0 мл 20х раствора SSC вносят в градуированный химический стакан и доводят объем до 20,0 мл деионизованной водой. Раствор хранят при 18 - 25 °С в течение недели.

17. Нейтрализующий раствор.

0,87 г хлорида натрия помещают в градуированную мерную пробирку, прибавляют 5,0 мл раствора трис-HCl концентрации 1 моль/л, pH 8,0, и прибавляют 0,42 мл концентрированной HCl. Доводят объем до 10 мл деионизованной водой, фильтруют через стеклянный фильтр GF/B и хранят при 18 - 25 °С в течение месяца.

18. Очистка формамида.

5,0 г смешанной катионанионообменной смолы помещают в градуированный химический стакан и заливают 50,0 мл формамида, перемешивают магнитной мешалкой 30 - 40 мин. при 18 - 25 °С. Чистый формамид отделяют от смолы через стекловолокнистый фильтр GF/B. Хранят раствор при -20 °С.

19. Раствор денатурированной спермы лосося.

400,0 мг ДНК спермы лосося помещают в емкость, прибавляют 20,0 мл деионизованной воды и перемешивают до полного растворения. Затем кипятят раствор ДНК в течение 10 мин. на водяной бане, разливают по 1,0 мл в пробирки для микропроб и хранят при -20 °С в течение 2-х месяцев.

20. Раствор Денхарда 100х.

1,0 г фикола, 1,0 г поливинилпиролидона, 1,0 г БСА помещают в градуированный химический стакан, прибавляют 30,0 мл деионизованной воды и перемешивают до полного растворения. Доводят объем до 50,0 мл деионизованной водой. Раствор фильтруют через стеклянный фильтр GF/B и хранят при -20 °С в течение 2-х месяцев.

21. Раствор для предгибридизации.

В градуированный химический стакан вносят 25,0 мл раствора формамида, 0,75 мл раствора денатурированной ДНК спермы лосося, 2,5 мл 10%-ного раствора SDS, 12,5 мл 20х раствора SSC, 2,5 мл 100х раствора Денхарда и доводят объем до 50,0 мл деионизованной водой. Раствор фильтруют и хранят при -20 °С в течение месяца.

22. Раствор для гибридизации.

Это тот же раствор для предгибридизации, но содержащий меченую α^{32} Р ДНК. Меченную радиоактивным фосфором и очищенную ДНК (2,0 х 10^6 имп./мл) перед добавлением в раствор для гибридизации прогревают при 100 °С 5 мин. и быстро охлаждают на ледяной бане.

Раствор готовят перед использованием.

23. Раствор для отмывки мембраны.

Раствор А (2х раствор SSC с 0,5%-ным раствором SDS).

В градуированный химический стакан помещают 50,0 мл 20х раствора SSC, 25,0 мл 10%-ного раствора SDS и доводят объем до 500,0 мл деионизованной водой. Раствор готовят перед использованием.

Раствор Б (0,2х раствор SSC с 0,1%-ным раствором SDS).

В градуированный химический стакан помещают 5,0 мл 20х раствора SSC, 10,0 мл 10%-ного раствора SDS и доводят объем до 1000,0 мл деионизованной водой. Раствор готовят перед использованием.

24. Раствор проявителя.

К 700,0 мл деионизованной воды (температура воды 60 °С), 2,2 г метола, 8,8 г гидрохинона, 72,0 г безводного сульфита натрия, 48,0 г карбоната натрия и 4,0 г бромистого калия по очереди помещают в градуированный химический стакан и по очереди растворяют. Доводят объем до 1000,0 мл деионизованной водой. Хранят раствор при 18 - 25 °С в темной посуде.

25. Раствор фиксатора.

160,0 г тиосульфата натрия, 40,0 г хлористого аммония помещают в градуированный химический стакан, прибавляют 730,0 мл деионизованной воды (температура воды 60 °С) и перемешивают до полного растворения. Доводят объем до 1000,0 мл деионизованной водой и хранят при 18 - 25 °С в темной посуде.

26. 10%-ный раствор ТХУ.

10,0 г трихлоруксусной кислоты помещают в градуированный химический стакан, прибавляют 70,0 мл деионизованной воды и перемешивают до полного растворения. Доводят объем до 100,0 мл деионизованной водой. Раствор хранят при 4 - 6 °С.

27. Сцинтилляционный раствор.

4,0 г PPO (2,5-дифенилоксазола), 0,2 г POPOP (1,4-ди(2-(5-фенилоксазолил)бензина)) помещают в градуированный химический стакан, прибавляют 730,0 мл толуола, перемешивают до полного растворения стеклянной палочкой. Доводят объем до 1000,0 мл толуолом. Хранят раствор при 18 - 25 °С в темной посуде.

При отборе проб используют автоматические пипетки с соответствующими диапазонами объемов:

от 1 мкл до 10 мкл;

от 5 мкл до 40 мкл;

от 40 мкл до 200 мкл;

от 200 мкл до 1000 мкл;

от 1 мл до 5 мл.

7. Испытание на стерильность

Испытание на стерильность проводят с применением «Сухой питательной среды для контроля стерильности (тиогликолевой)» отечественного производства. Возможен выпуск варианта среды без тиогликолята натрия в составе сухого вещества. В этом случае тиогликолят натрия или тиогликолевую кислоту добавляют ex temporе. Вместо коммерческой тиогликолевой среды может быть использована тиогликолевая среда индивидуального приготовления.

Контроль стерильности МИБП проводят путем поэтапного исследования образцов готового препарата в полуфабрикате и готовой серии препарата.

Готовым препаратом в полуфабрикате считают препарат, находящийся в одной производственной емкости (или разлитый в бутылки из этой емкости), из которой производят розлив в ампулы или флаконы.

Примечание.

Контроль полуфабриката на более ранних стадиях должен осуществляться в соответствии с технологическими регламентами.

7.1. Правила отбора образцов препарата для испытания на стерильность

Образец для контроля - это количество препарата, необходимое для первичного посева на питательную среду по представленной ниже схеме (не менее 2 мл). В том случае, если емкости (ампулы или флаконы) содержат меньший объем препарата, то образец составляют из смеси содержимого нескольких емкостей.

7.1.1. Отбор образцов готового препарата в полуфабрикате

Объем выемки готового препарата в полуфабрикате для испытания на стерильность должен быть достаточным, чтобы обеспечить достоверность результатов контроля, но не менее 10 мл. Перед отбором выемки содержимое производственной емкости, в которой находится полуфабрикат, тщательно перемешивают. Взятая проба должна быть посеяна в виде 5-ти или более образцов по схеме 7.4 и с учетом антимикробного действия п. 7.2.

7.1.2. Отбор образцов препарата в процессе розлива

В процессе розлива препарата для испытания на стерильность берут не менее чем по одному образцу в начале, середине и в конце розлива. Для контроля могут быть взяты пробы, отобранные в процессе розлива в отдельные лабораторные емкости (пробирки, флаконы) или герметизированные емкости, в которые осуществляется розлив препарата.

Примечание.

При розливе препаратов, которые в дальнейшем подвергаются лиофильному высушиванию, необходимо оставлять до окончания контроля стерильности высушенной продукции утроенное количество образцов (не менее 9-ти) разлитого жидкого препарата в герметизированном виде. Эти образцы могут быть исследованы в случае прорастания образцов высушенного препарата для выяснения причин контаминации.

7.1.3. Отбор образцов готового препарата

При контроле стерильности готового (разлитого, высушенного) препарата количество контролируемых емкостей (ампул или флаконов) определяется с учетом общего количества емкостей в серии. Для определения минимального числа емкостей, необходимого для контроля стерильности, следует произвести расчет по формуле:

$$n = 0{,}4\sqrt{N}, где$$

n - необходимое для контроля число емкостей, не менее 10-ти и не более 40;

N - число емкостей в серии.

Принимая во внимание, что за образец для контроля принято количество препарата, необходимое для первичного посева на питательную среду (не менее 2 мл), число контролируемых емкостей и число засеваемых образцов может не совпадать. В случаях, когда объем препарата в каждой емкости равен или превышает 2 мл, число контролируемых емкостей и число засеваемых образцов будет одинаковым или количество образцов будет превышать число емкостей, взятых для испытания. При меньшем объеме розлива (менее 2 мл в емкости) число засеваемых образцов будет меньше, чем число контролируемых емкостей, за счет объединения нескольких емкостей в один образец.

Для удобства расчетов предлагаются таблицы 1 и 2, позволяющие определить число емкостей и образцов, необходимое для испытания на стерильность с учетом объема серии и количества препарата в каждой емкости.

Примечания.

1. Число емкостей, необходимое для контроля стерильности на предприятии, представляет собой суммарное число емкостей, контролируемых на разных этапах, - не менее n/2 в производственном отделении и не менее n/2 в ОБК.

2. Если серия включает в себя менее 500 емкостей, количество контролируемых емкостей должно быть не менее 10-ти.

3. При необходимости, с учетом особенностей технологического изготовления отдельных видов препаратов и особенностей фасовки, в соответствующей технической документации могут быть регламентированы дополнительные требования в отношении необходимого количества контролируемых емкостей, обеспечивающие надежность контроля стерильности препарата.

Таблица 2

Количество испытуемого препарата, необходимое для посева, в зависимости от объема содержимого емкостей, составляющих серию

Объем содержимого одной емкости (мл)	Минимальный объем препарата, взятый для посева из каждой емкости (мл)	Минимальный объем тиогликолевой среды для каждой температуры
Менее 2	Весь объем, объединения емкости до 2	В 10 раз больше объема препарата, взятого для посева из каждой емкости
2—24	2	
25—100	6	
более 100	10	

4. При отбраковке разлитого препарата из-за несоответствия физических свойств требованиям НТД (помутнение, появление хлопьев) отбракованные ампулы или флаконы должны быть переданы в ОБК для выяснения характера помутнений и, при необходимости, проведения контроля стерильности.

Количество емкостей, отправленное в ГИСК им. Л.А. Тарасевича, должно соответствовать общему количеству, контролируемому в производственном отделе и в ОБК, с учетом величины серии и объема препарата, разлитого в ампулы или флаконы.

7.2. Определение антимикробного действия МИБП

Во избежание неправильной оценки испытания на стерильность необходимо определить для каждого наименования МИБП (в том числе и для их полуфабрикатов), обладает ли он антимикробным действием.

Для этого в каждые две пробирки с 20 мл тиогликолевой среды вносят по 1,0 мл исследуемого препарата и добавляют по 0,1 мл микробной взвеси соответствующего тест-штамма в разведении 1000 клеток/мл. Содержимое пробирок осторожно перемешивают до равномерного распределения препарата в питательной среде. Посевы со штаммами для определения антимикробного действия инкубируют при температуре от 30 до 35 °С в течение 48 часов, а для определения антигрибкового действия от 20 до 25 °С в течение 72-х часов. В контрольные образцы вместо исследуемого препарата вносят аналогичное количество физиологического раствора и соответствующие тест-штаммы.

Для проверки антимикробного действия МИБП используют тест-микроорганизмы: Staphylococcus aureus ATCC 6538 P; Bacillus subtilis. ATCC 6633; Escherichia coli ATCC 25922, а для противогрибкового действия - Candida albicans ATCC 885-653.

При отсутствии антимикробного действия МИБП в опытных и контрольных пробирках должен наблюдаться рост перечисленных тест-микроорганизмов в указанные сроки. При наличии антимикробного действия возможно торможение роста одного или нескольких тест-штаммов, при сохранении их роста в контрольных образцах.

При выявлении антимикробного действия препарат разводят, изменяя соотношение объемов посевного материала и питательной среды. Первоначально увеличивают объем питательной среды до 250 мл. Если при этом сохраняется антимикробное действие МИБП, уменьшают объем посевного материала до 0,5 мл в каждой из 2-х пробирок (флаконов). Экспериментально установленное соотношение объемов питательной среды и посевного материала, обеспечивающее нейтрализацию антимикробного действия препарата, должно соблюдаться при испытании его на стерильность методом прямого посева.

В случае неэффективности разведения МИБП используют метод мембранной фильтрации.

7.3. Техника проведения контроля стерильности

Перед внесением в бокс ампулы (флаконы) с препаратами должны быть проверены на герметичность путем тщательного просмотра, а препараты, высушенные под вакуумом, должны быть проверены на вакуум. После этого ампулы (флаконы) обрабатывают методом погружения в 3%-ный раствор перекиси водорода не менее чем на 2 мин.

Лица, проводящие контроль стерильности, непосредственно перед работой в боксе тщательно моют руки с мылом при помощи щетки. В предбокснике обувь меняют на специальную боксо-

вую, надевают стерильный халат, колпак или косынку и 4-слойную марлевую повязку (маску), которая должна закрывать нос и рот. При работе в боксе движения, разговоры, перемещения должны быть максимально ограничены.

В начале и в конце посева образцов каждой серии проводится обработка рук 70° спиртом, а поверхности рабочего стола 96° спиртом с последующим прожиганием (при посеве, насчитывающем более 30 емкостей одной серии, подобная обработка проводится также и в середине посева этой серии).

Перед вскрытием ампул или флаконов оттянутый конец ампулы или горлышко флакона смачивают 96° спиртом и обжигают в пламени горелки.

Исследуемый препарат набирают стерильной пипеткой при помощи ножной или ручной груши, предварительно автоклавированной. Перед забором препарата пустая пипетка проводится через пламя горелки, но не прокаливается. Посев каждого образца препарата производят отдельной стерильной пипеткой на внутреннюю стенку пробирки у раздела сред (необходимо избегать вдувания воздуха в питательную среду). Использованные пипетки, ампулы и флаконы от препаратов помещают в 3%-ный раствор перекиси водорода и оставляют на 24 часа, после чего производится их дальнейшая обработка.

Примечания.

1. Запрещается прокаливать ампулы и пастеровские пипетки в пламени горелки.

2. Запрещается производить посев пипеткой без груши (ртом).

Перед посевом жидких препаратов содержимое ампул или флаконов необходимо встряхивать (т.к. микробы-контаминанты могут осесть на дно).

Образцы сухих препаратов предварительно растворяют тиогликолевой средой или стерильным растворителем (изотонический раствор хлорида натрия, дистиллированная вода и т.п.) в объеме, предусмотренном технической документацией, и после растворения засевают на питательную среду. Стерильность используемого растворителя проверяют путем его посева (по 1 мл) на 2 пробирки, содержащие по 20 мл тиогликолевой среды. Пробирки выдерживают при температуре 30 - 35 °С и 20 - 22 °С соответственно 14 сут. одновременно с опытными пробирками. Посев растворителя для контроля стерильности производят до начала работы и после ее окончания. Если при посеве сухих препаратов используют несколько флаконов растворителя, стерильность каждого должна быть проверена аналогичным способом.

Примечание.

Растворение препаратов тиогликолевой средой не используют для метода мембранной фильтрации.

7.4. Схема контроля стерильности

7.4.1. Метод прямого посева

Контролируемый на стерильность образец засевают пипеткой по 1 мл на две пробирки, содержащие по 20,0 мл тиогликолевой среды, одну из которых инкубируют при температуре от 30 до 35 °С для выявления аэробных и анаэробных микроорганизмов, а другую - при температуре от 20 до 25 °С для выявления грибов и бактерий с оптимумом роста в данном температурном режиме. Продолжительность инкубации посевов составляет не менее 14 сут. В течение всего срока проводится их периодический просмотр.

Для препаратов, вызывающих помутнение питательной среды (препараты, содержащие сорбенты, микробную массу, мозговую ткань и т.п.), посев производят по указанной выше схеме, но на 5 - 7 сутки из каждой пробирки производят пересев приблизительно по 0,5 мл на две пробирки, содержащие по 10,0 мл тиогликолевой среды. Все пробирки выдерживают после пересева при соответствующих температурах до окончания инкубации (14 сут.) со дня первичного посева.

Примечание.

При необходимости, с учетом особенностей технологии изготовления отдельных видов препаратов, в соответствующей технической документации могут быть регламентированы дополнительные экспериментально обоснованные требования в отношении срока и режима инкубации.

7.4.2. Метод мембранной фильтрации

При определении стерильности МИБП, обладающих выраженным антимикробным действием, и МИБП, разлитых в емкости более 100 мл, используют метод мембранной фильтрации.

Аппаратура

В работе используют любую, подходящую для этих целей фильтрационную систему, состоящую из закрытого резервуара и приемника, между которыми помещают закрепленную надлежащим образом мембрану, а также насоса, обеспечивающего фильтрацию жидкости.

Фильтрационные системы делятся на два типа: в одних мембрану после завершения процедуры фильтрации асептически извлекают, делят пополам и погружают в две емкости со 100 мл тиогликолевой среды для последующей инкубации при температурах от 30 до 35 °С и от 20 до 25 °С (тип I); в других - мембраны закреплены в двух резервуарах, куда после фильтрации помещают по 100 мл тиогликолевой среды, для последующей инкубации в этих же емкостях при соответствующих температурах (тип II). Установки второго типа могут быть многоразового использования (их стерилизуют в собранном виде, вместе с мембраной, насыщенным паром при избыточном давлении (0,11 +/- 0,02) МПа/(1,1 +/- 0,2) кгс/кв. см и температуре (121 +/- 1) °С в течение 18 - 20 мин.) или одноразовые стерильные системы (например, стеритесты фирмы Millipore для Steritest Compact System). Используют мембраны с размером пор 0,47 мкм, диаметром 47 мм, скорость прохождения потока 55 - 75 мл/мин. при давлении 93,3 кПа (70 см рт. ст.).

Примечание.

При содержании в МИБП масел фильтр стерилизуют отдельно, тщательно просушивают и с соблюдением асептики помещают в фильтродержатель или используют одноразовые стеритесты.

Методика испытания

Используют то количество емкостей или то количество готового препарата в полуфабрикате, которые требуются для проведения испытания стерильности (п. 7.1.1 и п. 7.1.3). Если содержимое емкости более 2 мл, но менее 500 мл, - фильтруется весь объем препарата. Для емкостей более 500 мл фильтруют только 500 мл из всего объема.

Фильтрование отобранных образцов проводят в асептических условиях. Фильтрационную систему целесообразно устанавливать в настольных ламинальных боксах. Обработку препаратов перед внесением в бокс проводят в соответствии с п. 7.3.

Испытуемый препарат растворяют, если это необходимо, соответствующим растворителем или 0,9%-ным раствором натрия хлорида, а затем объединяют либо непосредственно в резервуаре для установок I типа, либо в отдельной стерильной емкости, с последующим разделением объема препарата на две половины для фильтрации в 2-х резервуарах для установок II типа. Если емкости больших объемов, то фильтрацию можно проводить без предварительного объединения, разделив их содержимое приблизительно поровну между двумя резервуарами, если не предусмотрено автоматического разделения, как, например, в установке Steritest Compact System («Millipore»). Для препаратов, представляющих собой вязкую жидкость или суспензию, не поддающихся быстрой фильтрации, используют разведение достаточным количеством жидкости 1 для увеличения скорости фильтрации. При фильтрации препаратов, обладающих антимикробным действием, в конце процедуры фильтр промывают 3 порциями по 100 мл жидкости 1. Если препарат содержит лецитин или масла, вместо жидкости 1 используют жидкость 2 (Приложение).

Для контроля стерильности условий, в которых проводятся испытания, необходимо фильтровать растворитель без испытуемого МИБП, с последующим воспроизведением всех вышеописанных операций.

Тиогликолевую среду с помещенными в нее фильтрами выдерживают при температурах от 30 до 35 °С и от 20 до 25 °С в течение 7 сут. при ежедневном осмотре.

7.5. Учет результатов контроля стерильности

Посевы периодически просматривают в рассеянном свете и по окончании периода инкубации. Наличие роста микроорганизмов оценивается визуально по выявлению мутности, осадка, хлопьев и других микроскопических изменений. Выявленный рост микроорганизмов необходимо подтвердить микроскопированием мазков, окрашенных по Граму. В протоколах испытания отмечается: при какой температуре выявлен рост, его характер, морфологические признаки обнаруженных микроорганизмов, окраска по Граму.

Испытуемый препарат считают удовлетворяющим требованиям испытания на стерильность при отсутствии роста микроорганизмов во всех образцах. При обнаружении роста хотя бы в одной пробирке (колбе, флаконе) его подтверждают микроскопированием и повторяют испытание на стерильность на том же количестве образцов, что и в первый раз. При отсутствии роста микроорганиз-

мов при повторном посеве испытуемый препарат считают удовлетворяющим требованиям испытания на стерильность. В случае роста микроорганизмов при повторном посеве, морфологически сходных с выявленными при первичном посеве, испытуемый препарат считают нестерильным.

Для готового препарата в полуфабрикате допускается только одно повторное испытание на стерильность. В случае обнаружения роста при испытании на стерильность готового препарата в полуфабрикате при повторении теста, независимо от характера микрофлоры, его бракуют.

Для готового препарата возможно проведение испытания на стерильность в третий раз на удвоенном количестве образцов, если в первый и во второй раз выявлен рост различных по морфологии микроорганизмов. При отсутствии роста микроорганизмов после инкубации в третьем испытании готовый препарат считают удовлетворяющим требованиям испытания на стерильность. При наличии роста хотя бы в одной пробирке (колбе, флаконе) испытуемый препарат считают нестерильным.

Результаты контроля исследуемых препаратов регистрируются в специальных производственных журналах.

7.6. Требования, предъявляемые к боксам

Испытание на стерильность МИБП должно проводиться квалифицированным персоналом в специальных, предназначенных только для данного вида работ, боксах с обеспечением строгих правил асептики.

Боксы представляют собой изолированные застекленные камеры достаточной площади и кубатуры для проведения в них бактериологических исследований. Боксы должны быть хорошо освещены и обеспечены вентиляцией. Оптимальным является оборудование боксов приточно-вытяжной вентиляцией с подачей стерильного кондиционированного воздуха и с преобладанием притока (не менее 1,27 мм водн ст.). Скорость потока воздуха - 20 объемов в час.

Внутреннее устройство боксов должно обеспечивать легкость и надежность поддержания чистоты и возможность дезинфекционной обработки. С этой целью газовые и водопроводные трубы, а также электропроводку размещают вне бокса или в толще его стен. Отопительные батареи устанавливают гладкими без ребер, что препятствует осаждению пыли. Стены бокса на высоту не менее полутора метров от пола облицовывают метлахской плиткой, или, как и потолок, окрашивают в светлые тона масляной краской. Полы покрывают линолеумом, метлахской плиткой или пластиком. Такая отделка поверхностей позволяет использовать при уборке помещения дезинфицирующие растворы. В боксе должно находиться минимальное количество мебели - стол и табуреты. Запрещается размещение в боксах и предбоксниках водопроводных кранов и раковин, так как они являются источником грибковой микрофлоры.

Работу рекомендуется проводить в настольных ламинарных боксах с подачей стерильного воздуха в рабочую зону, что позволяет проводить исследования в условиях, исключающих возможность загрязнения испытуемого препарата.

Примечание.

В боксах, предназначенных для проведения контроля стерильности МИБП, работа с живыми микробными культурами не допускается.

К боксу должен прилегать предбокснник, отделенный от него стеклянной перегородкой с дверью и передаточными окнами, - помещение, куда вносятся подготовленные для посевов препараты, питательные среды, пипетки и биксы со стерильной одеждой для работы. В предбоксннке персонал переодевается в стерильную одежду и специальную обувь для боксов.

К предбокснику должна примыкать комната, где хранятся питательные среды, необходимые для работы, стерильная посуда. В этой комнате проводят всю вспомогательную работу (деконтаминация емкостей с МИБП, штативов для питательных сред, маркировка пробирок и т.п.).

Ежедневно бокс и предбокснник подвергаются тщательной уборке и деконтаминации путем протирания ветошью, смоченной в 3%-ной перекиси водорода с 0,5% сульфанола или порошка «Лотос». При приготовлении раствора воду добавляют в пергидроль, а затем моющее средство. Этот раствор используют после приготовления.

Для приготовления 10 л раствора берут следующие количества препаратов: 1200 мл пергидроля, 50 г моющего средства и 8750 мл воды при температуре от 40 до 50 °С. Для простоты приготовления используют вымеренную по объему ингредиентов посуду. Норма расхода дезинфицирующего раствора - 70 - 100 мл/кв. м.

Готовят раствор и обрабатывают бокс и предбокснник с соблюдением правил техники безопасности при работе с агрессивными веществами.

При отсутствии возможности использовать дезинфицирующий раствор производят обработку горячим (50 - 60 °С) мыльносодовым раствором (1% раствора соды или стирального порошка и 0,5% нашатырного спирта) с последующим протиранием стен, полов, мебели одним из следующих дезинфицирующих растворов:

- 2%-ный раствор хлорамина;
- 3%-ный раствор фенола;
- раствор антисептола.

Для приготовления антисептола берут 2 раствора: 50%-ный раствор хлорной извести и 5%-ный раствор кальцинированной соды. Перед употреблением растворы сливают в равных объемах и разбавляют в 50 раз водой. Работу с антисептолом производят в резиновых перчатках.

Для обеззараживания боксов и предбоксников применяют бактерицидные лампы БУВ, установленные из расчета: 1 лампа БУВ-30 на 12 куб. м объема воздуха или 2 - 2,5 ватта мощности на кв. м поверхности (числа в названиях ламп обозначают их мощность в ваттах). Лампы размещают на потолках или стенах на уровне 1,5 м от пола. Облучение бокса производят до начала работы в течение 1,5 - 2 ч. Во время работы лампы должны быть выключены. Необходимо учитывать время эксплуатации ламп и, по окончании гарантийного срока, заменять лампы новыми, если даже они продолжают «светить».

В боксах, оборудованных принудительной вентиляцией и ламинарными настольными боксами, работа должна начинаться не ранее чем через 30 мин. после их включения. Это минимальное время, необходимое для замены воздуха стерильным, удаления пыли поднявшимся потоком воздуха и установления стационарного потока воздуха.

Ежедневно в начале и в конце работы контролируют бактериальную чистоту воздуха в боксе и в предбокснике, используя метод седиментации. Для этого чашки Петри с питательным агаром и средой Сабуро помещают открытыми на 15 мин. в нескольких точках (например, рабочий стол, ламинарный бокс и вблизи вентиляции). Затем выдерживают в термостате 48 ч чашки с питательным агаром при температуре от 30 до 35 °С и 72 ч чашки со средой Сабуро при температуре от 20 до 25 °С. При появлении роста колоний делают мазки, окрашенные по Граму, микроскопируют их и отмечают характер микрофлоры в специальных журналах.

Допустимым считается рост не более 3-х колоний микробов сапрофитов на одной чашке. Рост большего числа колоний указывает на повышенную бактериальную загрязненность воздуха в боксе. В этих случаях необходимо произвести дополнительную дезинфицирующую уборку бокса и предбокснника, а также проанализировать случай увеличения бактериальной контаминации и наметить мероприятия по ее устранению. В случаях появления колоний грибов, помимо дезинфекции, обращают особое внимание на снижение влажности в боксе и предбокснике путем просушивания их электронагревательными приборами. При проявлении спорообразующих микроорганизмов, а также грибов при уборке помещения увеличивают концентрацию перекиси водорода до 6%.

У лиц, работающих в боксе, периодически проверяют степень бактериальной обсемененности рук после мытья. Эту проверку проводят следующим образом: пальцами рук прикасаются к поверхности плотной питательной среды в чашке Петри и делают несколько круговых движений, «засеянные» чашки помещаются в термостат при температуре 30 - 35 °С на 48 ч для питательного агара и при температуре 20 - 25 °С на 72 ч для среды Сабуро. Появление более 3-х колоний на одной чашке Петри указывает на недостаточную чистоту рук для проведения асептической работы.

Результаты проверки контаминации воздуха бокса и предбокснника, бактериальной обсемененности рук работников должны быть зафиксированы в специальных журналах.

Постоянно следует обращать внимание на надежность стерилизации используемых для работы инструментов, лабораторной посуды, дистиллированной воды и различных растворов. Должен быть налажен надежный контроль указанных материалов, а также тщательный контроль стерильности используемых питательных сред.

Приложение

Жидкость 1	
пептона ферментативного	1 г
воды дистиллированной	до 1000 мл
pH после стерилизации	7,1 +/- 0,2
Жидкость 2	
пептона ферментативного	5 г
твина-80	10 г
воды дистиллированной	до 1000 мл
pH после стерилизации	7,1 +/- 0,2

Жидкости разливают в колбы или флаконы по 100 мл и стерилизуют так же, как питательные среды.

Таблица 3

Количество емкости для контроля стерильности в зависимости от общего числа емкости в серии и объема препарата в каждой емкости

Кол-во емкостей в серии	Объем препарата в емкости																	
	0,5 мл						1 - 1,5 мл						2,0 мл и более					
	Кол-во контролируемого препарата						Кол-во контролируемого препарата						Кол-во контролируемого препарата					
	всего		пр-во		ОБК		всего		пр-во		ОБК		всего		пр-во		ОБК	
	образцов	емкостей	образцов	емкостей	образцов	емкостей	образцов	емкостей	образцов	емкостей	образцов	емкостей	образцов	емкостей	образцов	емкостей	образцов	емкостей
501 - 1000	4	16	2	8	2	8	6	12	3	6	3	6	12	12	6	6	6	6
1001 - 2000	6	24	3	12	3	12	8	16	4	8	4	8	18	18	9	9	9	9
2001 - 3000	6	24	3	12	3	12	10	20	5	10	5	10	22	22	11	11	11	11
3001 - 4000	6	24	3	12	3	12	12	24	6	12	6	12	26	26	13	13	13	13
4001 - 5000	8	32	4	16	4	16	14	28	7	14	7	14	28	28	14	14	14	14
5001 - 6000	8	32	4	16	4	16	16	32	8	16	8	16	32	32	16	16	16	16
6001 - 7000	8	32	4	16	4	16	16	32	8	16	8	16	34	34	17	17	17	17
7001 - 8000	10	40	5	20	5	20	18	36	9	18	9	18	36	36	18	18	18	18
8001 - 9000	10	40	5	20	5	20	20	40	10	20	10	20	38	38	19	19	19	19
9001 - 10000 и более	10	40	5	20	5	20	20	40	10	20	10	20	40	40	20	20	20	20

Примечание. Расчет необходимого для контроля стерильности количества емкостей препарата в случаях иной расфасовки необходимо произвести по формуле, представленной в тексте инструкции.

7.7. Требования к качеству тиогликолевой среды

7.7.1. Готовая к употреблению тиогликолевая среда должна отвечать следующим требованиям:

7.7.1.1. Стерильность. Должна быть стерильной.

7.7.1.2. Ростовые свойства. Питательная среда должна обеспечивать рост аэробного и анаэробного тест-штаммов при посеве их в количестве менее 100 жизнеспособных клеток.

7.7.1.3. Нейтрализующие свойства. Питательная среда должна нейтрализовать действие мертиолята в концентрации 0,5 x 10^{-5} г/мл среды.

При контроле препаратов, не содержащих ртутный консервант (мертиолят), проверку нейтрализующих свойств можно не осуществлять. В этом случае тиогликолевая среда должна быть использована в течение 2-х недель со дня приготовления.

Для препаратов с ртутным консервантом среду используют не позднее 3-х суток. Конкретные сроки годности - сутки, двое или трое суток - устанавливают при «входном» контроле новой серии среды путем определения ее нейтрализующих свойств после хранения приготовленной среды в течение одних, двух и трех суток.

Готовую к употреблению тиогликолевую среду следует хранить в защищенном от света месте при температуре 18 - 25 °С.

7.7.2. Контроль качества тиогликолевой среды

7.7.2.1. Определение стерильности. Пробирки или другие емкости со средой после ее стерилизации, в количестве не менее 2% от партии, помещают в термостат при температуре (37 +/- 1) °С. Учет результатов проводят через 46 - 50 ч путем визуального просмотра всех пробирок со средой. В случае обнаружения прироста (помутнение среды) бракуют всю партию.

Образцы среды, выдержанные при температуре (37 +/- 1) °С, для испытания препаратов на стерильность не используют.

7.7.2.2. Определение ростовых свойств. Для определения ростовых свойств тиогликолевой среды используют следующие тест-штаммы:

- Alcaligenes faecalis 415;
- Clostridium novyi 198.

Alcaligenes faecalis 415. Получен из института Листера (г. Лондон) в 1946 г. Грамотрицательная палочка. Строгий аэроб. Непатогенен для человека и животных.

Clostridium novyi 198. Выделен в 1930 г. Крупная грамположительная спорообразующая палочка. Споры овальной формы, расположены субтерминально. Строгий анаэроб. Непатогенен для морских свинок и мышей.

Тест-штаммы получают из ГИСК им. Л.А. Тарасевича с соответствующим паспортом. Замена указанных тест-штаммов другими не допускается.

7.7.2.2.1. Хранение и подготовка тест-штаммов для контроля качества тиогликолевой среды. *Alcaligenes faecatis 415.*

Вскрывают ампулу с лиофилизированной культурой, стерильной пастеровской пипеткой добавляют (приблизительно 0,5 мл) бульон Хоттингера (Приложение, п. 2), тщательно перемешивают до получения гомогенной суспензии и переносят в пробирку с бульоном Хоттингера и со скошенным агаром Хоттингера (Приложение, п. 3). Посевы инкубируют в течение 20 - 24 ч при температуре (37 +/- 1) °С.

Выросшую на скошенном агаре Хоттингера культуру пересевают в 2 - 3 пробирки с той же средой (агар Хоттингера) *. Посевы инкубируют в течение 20 - 24 ч при температуре (37 +/- 1) °С, после чего полученную культуру «уколом» пересевают в 8 - 10 пробирок со средой Романова (Приложение, п. 4). Через 20 - 24 ч инкубации посевов при температуре (37 +/- 1) °С ватные пробки пробирок с культурой накрывают полиэтиленовой пленкой (для предотвращения высыхания). Пробирки с культурой хранят при температуре 2 - 8 °С (6 - 8 месяцев). Допускается, в случае необходимости (получение дополнительной партии пробирок с культурой, закладываемых на хранение), произвести пересев тест-штамма A.faecalis 415 со среды Романова на агар Хоттингера и вновь на среду Романова. Большее количество пассажей культуры не допускается.

---

* В случае отсутствия роста на агаре Хоттингера для последующего пассажа используют культуру, выращенную в бульоне.

Для получения рабочей культуры тест-штамм A.faecalis 415 со среды Романова пересевают в 2 - 3 пробирки со скошенным агаром Хоттингера. Посевы инкубируют в течение 20 - 24 ч при температуре (37 +/- 1) °С, затем вновь пересевают в 2 - 3 пробирки с агаром Хоттингера и, после выращивания в течение 18 - 24 ч при температуре (37 +/- 1) °С, используют для оценки ростовых и нейтрализующих свойств тиогликолевой среды.

Clostridium novyi 198.

Вскрывают ампулу с лиофилизированной культурой, стерильной пастеровской пипеткой добавляют (приблизительно 1 мл) предварительно регенерированную <*> среду Тароцци (Приложение, п. 5), тщательно перемешивают <**>. Полученную гомогенную суспензию переносят в 2 пробирки со средой Тароцци (посевной материал вносят в нижнюю часть пробирки). Посевы инкубируют в течение 44 - 48 ч при температуре (37 +/- 1) °С.

Культуру из обеих пробирок, соблюдая правила асептики, переносят во флакон, вместимостью 20 - 30 мл (кусочки мяса не должны попадать), и центрифугируют при частоте вращения 3000 об./мин. в течение 20 мин. Затем с помощью пипетки отсасывают надосадочную жидкость, а к полученной биомассе добавляют небольшое количество стерильного раствора для разведения культуры - разводящей жидкости (Приложение, п. 6), перемешивают, переносят в пробирку и готовят микробную взвесь, соответствующую 10-ти единицам по стандартному образцу мутности (ОСО 42-28-59-85).

По 1 мл полученной взвеси высевают <***> в 10 - 15 пробирок с 10 мл предварительно регенерированной <****> питательной среды для получения культуры в споровой форме (Приложение, п. 7). Посевы инкубируют в течение 44 - 48 ч при температуре (37 +/- 1) °С, после чего содержимое пробирок перемешивают с помощью стерильной пипетки, делают мазки культуры (окрашивание производят 1%-ным раствором генцианвиолета в течение 30 с), микроскопируют и определяют количество спор (М) в процентах по формуле:

$$M = \frac{n}{N} x100\%, \text{где}$$

n - число спор в 3 - 5 полях зрения;

N - общее число (не менее 100) сосчитанных клеток (палочки и споры) в 3 - 5 полях зрения.

Пробирки с культурой, в которой не менее 5% спор, накрывают полиэтиленовой пленкой и хранят при температуре 2 - 8 °С.

В случае необходимости иметь большее количество пробирок с культурой, закладываемых на хранение (частый контроль), культуру в споровой форме следует пересеять на среду Тароцци (5 - 6 пробирок), инкубировать посевы при температуре (37 +/- 1) °С в течение 44 - 48 ч и далее получить споровую культуру по описанной выше методике.

Для получения рабочей культуры C.novyi 198 споровую культуру тест-штамма, хранящуюся в среде для получения спор, перемешивают с помощью пипетки и по 1 мл пересевают в 2 - 3 пробирки с 10 мл среды Тароцци. Содержимое одной пробирки со споровой культурой C.novyi 198 используют для 2 - 3-х посевов. Посевы инкубируют в течение 24 - 48 ч при температуре (37 +/- 1) °С до обнаружения отчетливо видимого роста культуры в виде диффузного помутнения среды с четко выраженной прозрачной зоной. После чего осуществляют повторный пересев тест-штамма

---

* Во всех случаях при посеве культуры C.novyi 198 на среду Тароцци пользуются регенерированной средой. Регенерацию среды осуществляют перед посевом путем выдерживания пробирок со средой в кипящей водяной бане в течение 10 - 15 мин. и последующего быстрого охлаждения в воде.

** Следует иметь в виду, что при работе с анаэробной культурой перемешивание осуществляют с помощью пипетки; при этом во избежание аэрации среды пипетку не вынимают из жидкости и содержимое из пипетки не выдувают до конца.

*** Для определения чистоты культуры при всех пересевах тест-штамма C.novyi 198 следует производить высев на скошенный агар Хоттингера.

**** Регенерацию среды для получения споровой культуры осуществляют аналогично регенерации среды Тароцци.

в 2 - 3 пробирки со средой Тароцци. Через 17 - 19 ч инкубации при температуре (37 +/- 1) °С культуру используют для оценки ростовых свойств тиогликолевой среды.

При необходимости (срочный контроль тиогликолевой среды) культуру, выращенную в течение 24 - 48 ч после высева из ампулы, следует пересеять в 2 - 3 пробирки со средой Тароцци, инкубировать в течение 17 - 19 ч при температуре (37 +/- 1) °С и полученную культуру использовать для посева в тиогликолевую среду.

7.7.2.2.2. Посев тест-штаммов в тиогликолевую среду.

Alcaligenes faecalis 415.

Выросшую на скошенном агаре Хоттингера при температуре (37 +/- 1) °С в течение 18 - 24 ч культуру тест-штамма A.faecalis 415 смывают с поверхности среды стерильным 0,9%-ным раствором хлорида натрия, доводят концентрацию микробной взвеси до 10 единиц по стандартному образцу мутности. Из данной взвеси культуры десятикратным разведением (9 мл 0,9%-ного раствора хлорида натрия и 1 мл микробной взвеси) получают разведение 10^{-1}. Микробную взвесь из разведения 10^{-2} разводят стерильным 0,9%-ным раствором хлорида натрия в соотношении 1:1 (4,5 мл 0,9%-ного раствора хлорида натрия и 4,5 мл микробной взвеси) - разведение 10^{-2} (условно). Полученную взвесь культуры десятикратными разведениями доводят до разведения 10^{-8}, меняя пипетку для каждого разведения. Для контроля тиогликолевой среды используют разведения культуры тест-штамма A.faecalis 415 - 10^{-6}, 10^{-7} и 10^{-8}.

Из каждого указанного разведения по 0,1 мл микробной взвеси вносят в 3 пробирки с 10 мл тиогликолевой среды, погружая пипетку в середину столбика среды. Посев осуществляют, начиная с последнего разведения. Не позднее 48 ч инкубации при температуре 34 - 35 °С производят учет результатов.

Clostridium novyi 198.

Выросшую на среде Тароцци при температуре (37 +/- 1) °С в течение 17 - 19 ч культуру тест-штамма C.novyi 198 центрифугируют при частоте вращения 3000 об./мин. в течение 20 мин., удаляют надосадочную жидкость. Полученную биомассу разводят стерильной разводящей жидкостью до концентрации микробной взвеси, соответствующей 10 единицам по стандартному образцу мутности. Из данной взвеси культуры десятикратным разведением (9 мл разводящей жидкости и 1 мл микробной взвеси) получают разведение 10^{-1}. Микробную взвесь из разведения 10 разводят стерильной разводящей жидкостью в соотношении 1:3 (6 мл разводящей жидкости и 2 мл микробной взвеси) - разведение 10^{-2} (условно). Полученную взвесь культуры десятикратными разведениями доводят до разведения 10^{-5}, меняя пипетку для каждого разведения <*>. Для контроля тиогликолевой среды используют разведения культуры тест-штамма C.novyi 198 - 10^{-3}, 10^{-4} и 10^{-5}.

Из каждого указанного разведения по 0,1 мл микробной взвеси вносят в 3 пробирки с 10 мл тиогликолевой среды, погружая пипетку в середину столбика среды. Посев осуществляют, начиная с последнего разведения. Не позднее 48 ч инкубации при температуре 34 - 35 °С производят учет результатов.

7.8. Определение нейтрализующих свойств

Для определения нейтрализующих свойств тиогликолевой среды используют тест-штамм Alcaligenes faecalis 415, характеристика, хранение и подготовка которого для посева в тиогликолевую среду описаны выше (п. 2.2).

Предварительно перед посевом культуры в каждую из 9-ти пробирок с 10 мл тиогликолевой среды пипеткой, вместимостью 2 мл, вносят по 0,5 мл 0,01%-ного раствора мертиолята <**>, погружая пипетку в середину столбика среды. Одной пипеткой вносят раствор мертиолята в 3 - 4 пробирки.

Во избежание аэрирования не следует содержимое из пипетки выдувать до конца.

По 0,1 мл микробной взвеси, тест-штамма A.faecalis 415 из разведений 10^{-6}, 10^{-7} и 10^{-8}, полученных, как указано ранее в п. 2.2, вносят в 3 пробирки (для каждого разведения) с тиогликоле-

---

* Не допускается выдерживание культуры в разводящей жидкости более 30 мин.

** Приготовление 0,01 %-ного раствора мертиолята: 0,1 г мертиолята (импортного) растворяют в 100 мл стерильного 0,9%-ного раствора хлорида натрия. Полученный 0,1%-ный раствор мертиолята хранят во флаконе из темного стекла не более 3-х месяцев при температуре 2 - 8 °С. Перед посевом 0,1%-ный раствор мертиолята разводят в 10 раз стерильным 0,9%-ным раствором хлорида натрия (1 мл 0,1%-ного раствора мертиолята и 9 мл 0,9%-ного раствора хлорида натрия).

вой средой, содержащей раствор мертиолята, погружая пипетку в середину столбика среды. Не позднее 5-ти суток инкубации при температуре 34 - 35 °С производят учет результатов.

7.9. Учет результатов контроля

По окончании соответствующих сроков инкубации посевов осуществляют визуальный просмотр засеянных пробирок. Результаты контроля регистрируют в специальном журнале (Приложение, п. 8) и дают заключение о качестве тиогликолевой среды.

Среду признают годной по ростовым свойствам, если не позднее 48 ч инкубации посевов визуально обнаруживается рост культуры не менее чем в 2-х из 3-х засеянных пробирок при посеве тест-штамма A.faecalis 415 - из разведения 10^{-7} (около 40 жизнеспособных клеток в посевной дозе), а тест-штамма C.novyi 198 - из разведения 10^{-4} (около 50-ти жизнеспособных клеток в посевной дозе).

Допускается признать пригодной среду при следующих результатах роста тест-штаммов:

A.faecalis 415 -

при посеве из разведения: 10^{-6} - рост не менее чем в 2-х пробирках;
10^{-7} - рост не менее чем в 1 пробирке;
10^{-8} - рост не менее чем в 1 пробирке.

C.novyi 198 -

при посеве из разведения: 10^{-3} - рост не менее чем в 2-х пробирках;
10^{-4} - рост не менее чем в 1 пробирке;
10^{-5} - рост не менее чем в 1 пробирке.

При росте тест-штамма A.faecalis 415 в тиогликолевой среде отмечается помутнение верхней части столбика среды.

При росте тест-штамма C.novyi 198 через 24 ч наблюдается образование отдельных шарообразных колоний, через 48 ч - диффузное помутнение среды с выраженной прозрачной зоной в верхней части столбика среды.

Тиогликолевую среду признают годной по нейтрализующим свойствам, если не позднее 5 суток инкубации посевов визуально обнаруживается, в случае предварительного введения в среду мертиолята, выраженный рост тест-штамма A.faecalis 415 не менее чем в 2-х из 3-х засеянных пробирок при посеве из разведения 10^{-7}.

Допускается признать пригодной по нейтрализующим свойствам среду при следующих результатах роста тест-штамма:

A.faecalis 415 -

при посеве из разведения: 10^{-6} - рост не менее чем в 2-х пробирках;
10^{-7} - рост не менее чем в 1 пробирке;
10^{-8} - рост не менее чем в 1 пробирке.

Описание характера роста тест-штамма A.faecalis 415 изложено выше.

Тиогликолевая среда, не отвечающая по нейтрализующим свойствам необходимым требованиям (при полном соответствии качества среды по всем другим показателям), может быть использована для контроля стерильности препаратов, не содержащих ртутный консервант.

Приложение

1. Тиогликолевая среда

Состав:

1. Гидролизат казеина неглубокой степени расщепления ферментативный сухой	- 15,0 г
2. Экстракт кормовых дрожжей для микробиологических питательных сред сухой (ЭКД)	- 5,0 г
3. Натрия хлорид	- 2,5 г
4. Глюкоза	- 5,0 г
5. L-цистин	- 0,75 г
6. Кислота тиогликолевая или	- 0,3 мл
натрия тиогликолят	- 0,5 г
7. Агар микробиологический	- 0,75 г
8. Вода дистиллированная	- 1000 мл.
pH 7,0 +/- 0,2 (после стерилизации среды)	

Приготовление

В дистиллированную воду вносят гидролизат казеина, экстракт дрожжей, хлорид натрия, агар, размешивают и нагревают до температуры 60 - 70 °С. Цистин предварительно растворяют при постепенном добавлении 10%-ного раствора гидроксида натрия (до полного растворения). Раствор цистина вносят в приготовленную смесь, устанавливают pH 8,0 - 8,2 с помощью 10%-ного раствора гидроксида натрия, кипятят в течение 2 - 3 мин. до полного расплавления агара. Добавляют глюкозу и тиогликолевую кислоту, фильтруют через фильтровальную бумагу, устанавливают pH 7,2 - 7,3 с помощью 5%-ного раствора соляной кислоты. Среду разливают в стерильные пробирки и стерилизуют автоклавированием при температуре 121 °С в течение 15 мин. Готовую среду хранят в защищенном от света месте при температуре 18 - 25 °С.

2. Бульон Хоттингера

Состав:	г/л
1. Гидролизат Хоттингера	- 20,0
2. Натрия хлорид	- 5,0.

Приготовление

Гидролизат Хоттингера <*> смешивают с дистиллированной водой из расчета содержания в 1 л среды 20 г сухих веществ, вносят такое количество хлорида натрия, чтобы содержание его в среде составляло 5 г/л.

Устанавливают pH 8,0 - 8,2 с помощью 10%-ного раствора гидроксида натрия, кипятят в течение 2 - 3 мин., фильтруют через фильтровальную бумагу, устанавливают pH 7,2 - 7,4 с помощью 5%-ного раствора соляной кислоты. Разливают по 10 мл в стерильные пробирки и стерилизуют автоклавированием при температуре 121 °С в течение 15 мин.

Готовая среда годна к употреблению в течение 2-х месяцев со дня приготовления при условии хранения ее при температуре 2 - 8 °С.

---

* Во всех питательных средах, имеющих в своем составе гидролизат Хоттингера, используется гидролизат, *предварительно освобожденный от балластных белков*, которые удаляют путем подкисления до pH 4,5 - 4,7 с помощью раствора соляной кислоты (соотношение с водой 1:1), последующего кипячения в течение 1 - 2 минут и фильтрации через ватно-марлевый фильтр.

3. Агар Хоттингера

Состав:	г/л
1. Гидролизат Хоттингера	- 20,0
2. Натрия хлорид	- 5,0
3. Агар микробиологический	- 13,0 - 20,0 <*>.

Приготовление

Гидролизат Хоттингера (Приложение, п. 2) смешивают с дистиллированной водой из расчета содержания в 1 л среды 20 г сухих веществ, вносят такое количество хлорида натрия, чтобы содержание его в среде составляло 5 г/л и агар.

Устанавливают pH 8,0 - 8,2 с помощью 10%-ного раствора гидроксида натрия. Расплавление агара производят в автоклаве при температуре 100 °С в течение 1 ч, затем среду фильтруют через ватно-марлевый фильтр, устанавливают pH 7,2 - 7,4 с помощью 5%-ного раствора соляной кислоты. Разливают по 5 мл в стерильные пробирки и стерилизуют автоклавированием при температуре 121 °С в течение 15 мин.

Готовая среда годна к употреблению в течение 2-х месяцев со дня приготовления при условии хранения ее при температуре 2 - 8 °С.

4. Среда Романова

Состав:	г/л
1. Гидролизат казеина панкреатический	- 8,0
2. Натрия хлорид	- 5,0
3. Агар микробиологический	- 5,0 - 10,0 <*>.

Приготовление

Панкреатический гидролизат казеина <**> смешивают с дистиллированной водой из расчета содержания в 1 л среды 8,0 сухих веществ, вносят такое количество хлорида натрия, чтобы содержание его в среде составляло 5 г/л, и агар, устанавливают pH 8,0 - 8,2 с помощью 10%-ного раствора гидроксида натрия. Расплавление агара производят в автоклаве при температуре 100 °С в течение 1 ч, затем среду фильтруют через ватно-марлевый фильтр, устанавливают pH 7,2 - 7,4 с помощью 5%-ного раствора соляной кислоты. Разливают по 5 мл в стерильные пробирки и стерилизуют автоклавированием при температуре 121 °С в течение 15 мин.

Готовая среда годна к употреблению в течение 2-х месяцев со дня приготовления при условии хранения ее при температуре 2 - 8 °С.

5. Среда Тароцци

Состав:	г/л
1. Гидролизат Хоттингера	- 25,0
2. Глюкоза	- 5,0
3. Натрия хлорид	- 5,0
4. Агар микробиологический	- 1,0
5. Фарш мясной (на 1 пробирку с 10 мл среды)	- 0,3 - 0,5.

Приготовление

Гидролизат Хоттингера (Приложение, п. 2) смешивают с дистиллированной водой из расчета содержания в 1 л среды 25,0 г сухих веществ, вносят такое количество хлорида натрия, чтобы

---

* Варьирование величины связано с различной прочностью студня агара.

** Используют панкреатический гидролизат казеина с содержанием общего азота 12,0 - 12,5% и аминного азота 5 - 7%, предварительно освобожденный от балластных белков по методу, изложенному для гидролизата Хоттингера (Приложение, п. 2).

содержание его в среде составляло 5 г/л, и агар, устанавливают pH 8,0 - 8,2 с помощью 1%-ного раствора гидроксида натрия. Смесь кипятят до расплавления агара в течение 2 - 3 мин., фильтруют через ватно-марлевый фильтр, добавляют глюкозу и устанавливают pH 7,4 - 7,6 с помощью 5%-ного раствора соляной кислоты. Разливают по 10 мл в пробирки, содержащие мясной фарш, и стерилизуют автоклавированием при температуре 110 °С в течение 30 мин.

Готовая среда годна к употреблению в течение месяца со дня приготовления при условии хранения ее при температуре 2 - 8 °С.

Приготовление фарша

Мясной фарш заливают питьевой водой в соотношении 1:5 (по объему) и кипятят в течение 1 - 2 мин., затем сливают воду, фарш промывают водой и отжимают. Фарш заливают дистиллированной водой и повторяют операцию, используя дистиллированную воду, до получения полностью обезжиренного фарша. (В случае использования сырого фарша его предварительно кипятят в воде в течение 30 мин.) Отжатый с помощью ручного пресса и подсушенный на фильтровальной бумаге фарш закладывают в стерильные флаконы, стерилизуют автоклавированием при температуре 120 °С в течение 30 мин. и хранят при температуре 18 - 25 °С.

По мере необходимости фарш раскладывают по стерильным пробиркам (из расчета 0,3 - 0,5 г на 10 мл среды), стерилизуют автоклавированием при температуре 120 °С в течение 30 мин. и выдерживают при температуре 37 - 45 °С до полного высыхания фарша.

Следует иметь в виду, что при использовании недостаточно обезжиренного и высушенного фарша в среде может наблюдаться опалесценция.

6. Раствор для разведения культуры («разводящая» жидкость)

Состав (на 1 л раствора):	
1. Натрия хлорид	**- 8,5 г**
2. Кислота тиогликолевая	**- 0,3 мл.**

Приготовление

Растворяют 8,5 г хлорида натрия в 1 л дистиллированной воды, добавляют 0,3 мл тиогликолевой кислоты, устанавливают pH 7,2 +/- 0,2 с помощью 10%-ного раствора фосфата натрия двузамещенного, разливают во флаконы и стерилизуют автоклавированием при температуре 121 °С в течение 15 мин.

Разводящую жидкость можно использовать в течение недели со дня приготовления при соблюдении следующего условия: если срок хранения раствора превышает сутки со дня приготовления, его необходимо регенерировать перед посевом путем выдерживания флаконов в кипящей водяной бане в течение 10 - 15 мин. и последующего быстрого охлаждения в воде.

Для удобства работы разводящую жидкость перед регенерацией рекомендуется, соблюдая правила асептики, разлить по 9 мл в стерильные пробирки, регенерировать ее в пробирках и затем использовать для разведения культуры.

7. Среда для получения спор

Состав:	**г/л**
1. Гидролизат казеина неглубокой степени расщепления ферментативный сухой	**- 15,0**
2. Глюкоза	**- 2,0**
3. Натрия хлорид	**- 5,0**
4. Агар микробиологический	**- 1,0**
5. Казеин хлоркальциевый (на 1 пробирку с 10 мл среды)	**0,3 - 0,5.**

Приготовление

Гидролизат казеина смешивают с дистиллированной водой, вносят хлорид натрия и агар. Устанавливают pH 7,9 - 8,1 с помощью 10%-ного раствора гидроксида натрия. Смесь кипятят до расплавления агара в течение 2 - 3 мин., фильтруют через ватно-марлевый фильтр, добавляют

глюкозу. Разливают по 10 мл в пробирки, содержащие стерильный казеин <*>, и стерилизуют автоклавированием при температуре 121 °С в течение 15 мин.

Готовая среда годна к употреблению в течение 2-х мес. со дня приготовления при условии хранения ее при температуре 2 - 8 °С.

8. Испытание на токсичность

Настоящему испытанию подлежат препараты, предназначенные для внутривенного, внутримышечного и подкожного введения. Методы испытания на токсичность препаратов, вводимых человеку другими способами, излагают в частных фармакопейных статьях.

Испытание проводят на двух видах животных: белых мышах обоего пола, массой 18 - 20 г, и морских свинках обоего пола, массой 250 - 350 г. В исследованиях должны быть использованы здоровые животные, содержащиеся в соответствии с действующими правилами, на которых ранее не проводили какие-либо испытания. Массу животных определяют в день начала испытания.

8.1. *Испытание на белых мышах.* Препарат вводят внутрибрюшинно 5-ти животным в дозе, равной одной максимальной разовой дозе для человека, но не более 1 мл, если в частной фармакопейной статье нет указаний на другую дозировку. Сухой препарат растворяют соответствующим растворителем, который вносят в объеме, указанном на этикетке. Если препарат предназначен для внутривенного введения, то его токсичность определяют при внутривенном введении, при этом испытуемая доза не должна превышать 0,5 мл, а скорость введения 0,1 мл/сек. Препарат, вводимый внутривенно, должен иметь температуру (36 +/- 1) °С.

8.2. *Испытание на морских свинках.* Препарат вводят подкожно 2 животным в дозе, равной одной максимальной разовой дозе для человека, но не более 10 мл, если в частной фармакопейной статье нет указаний на другую дозировку. Сухой препарат растворяют соответствующим растворителем, который вносят в объеме, указанном на этикетке. Если препарат предназначен для внутривенного введения, то его токсичность определяют при внутрибрюшинном введении, при этом испытуемая доза не должна превышать 5 мл.

Препараты вводят стерильным шприцем, погрешность измерения которого не должна превышать 4%. Для введения объемов до 1 мл включительно используют шприцы, вместимостью 1 мл; свыше 1 мл - шприцы, вместимостью 2 или 5 мл. Наблюдение за животными осуществляют ежедневно в течение 7 сут.

Препарат считают выдержавшим испытание, если:

- в течение периода наблюдения все животные остались живы и ни у одного из них не были выявлены видимые признаки заболевания;
- масса каждого животного в день окончания наблюдения не уменьшилась по сравнению с исходной;
- ни у одной морской свинки, получившей препарат подкожно, не развился некроз или абсцесс в месте введения (возможность развития других проявлений реакции в месте введения препарата указывают в частной фармакопейной статье).

Если в течение периода наблюдения регистрируют гибель, заболевание, уменьшение массы, развитие некроза или абсцесса в месте введения хотя бы у одного животного, испытание должно быть повторено на удвоенном количестве животных того же вида. Повторное испытание считают удовлетворительным, если препарат отвечает вышеперечисленным требованиям.

9. Испытание на пирогенность

Испытание проводят на здоровых кроликах обоего пола, на альбиносах, массой 1,5 - 2,5 кг, содержащихся на полноценном рационе. Кроликов отбирают за 5 дней до опыта. Каждого кролика содержат в отдельной клетке в помещении с постоянной температурой (допустимые отклонения +/- 3 °С). При уборке клеток и взвешивании животных их оберегают от возбуждения (избегать шума, стука, резких движений).

---

* Стерилизацию казеина осуществляют в пробирках автоклавированием при температуре 120 °С в течение 30 мин.

Таблица 4

Журнал
учета результатов оценки качества *тиогликолевой среды*

№ пп	Дата контроля	серии среды. Контрольный номер	Дата приготовления среды	Ростовые свойства				Нейтрализующие свойства			Заключение о пригодности среды	Подпись, отв. за контроль	Примечание
				A. faccalis 415		C. novyi 198		A. faecalis 415					
				24 ч	48 ч	24 ч	48 ч	24 ч	48 ч	5 сут.			
				Разведение				Разведение					
				10^{-6} 10^{-7} 10^{-8}	10^{-6} 10^{-7} 10^{-8}	10^{-3} 10^{-4} 10^{-5}	10^{-3} 10^{-4} 10^{-5}	10^{-6} 10^{-7} 10^{-8}	10^{-6} 10^{-7} 10^{-8}	10^{-6} 10^{-7} 10^{-8}			
Пример													
1.	21.09.94	07 к/N 123	20.09.94	+++ +++ +++	+++ +++ +++	+++ ++– ++–	+++ +++ ++–	––– ––– –––	++– ++– +––	+++ +++ ++–	Пригодна		

Взвешивание кроликов производят через день до дачи корма, всего не менее 3-х раз. В течение срока, предшествующего опыту, кролики не должны терять в массе. Животные, теряющие в массе, к опыту не пригодны. В течение 3-х суток перед испытанием у каждого подопытного кролика измеряют температуру. Измерения производят ежедневно утром, до дачи корма, при помощи медицинского термометра или электротермометра, точность которого не должна уступать точности медицинского термометра. Датчик электротермометра или ртутные термометры вводят ректально за внутренний сфинктер на глубину не менее 5 см на время, необходимое для достижения максимальной температуры, но не менее чем на 5 мин. Измерение температуры следует проводить не ранее чем через 1 ч после фиксирования кроликов. Исходная температура подопытных кроликов должна быть в пределах 38,5 - 39,5 °С. Животные с более высокой или более низкой температурой для опыта не пригодны.

За 24 ч до опыта кроликов переводят в помещение, в котором производят испытание на пирогенность. Испытание должно проводиться в отдельной комнате с постоянной температурой 18 - 22 °С, изолированной от шума, в спокойной обстановке. Вечером накануне опыта у животных отбирают остаток корма. До опыта и во время опыта животные корма не получают (воду до опыта дают без ограничения). Испытуемый препарат проверяют на 3-х кроликах. Перед инъекцией испытуемого раствора температура кроликов измеряется не менее 2 раз с промежутками в 30 мин. Разница между результатами обоих измерений не должна превышать 0,2 °С. Средняя величина обоих измерений считается нормальной температурой и берется в основу определения повышения температуры.

Шприцы, иглы и используемую стеклянную посуду стерилизуют в суховоздушном шкафу при температуре 180 °С в течение 60 мин. или кипятят в дистиллированной воде в течение 30 мин.

Стерильный испытуемый препарат медленно вводят кроликам в ушную вену стерильным шприцем и иглой. Для каждого кролика берут отдельную иглу. Препарат вводят подогретым до (37 +/- 1) °С не более чем через 30 мин. после измерения исходной температуры. После введения препарата температуру измеряют 3 раза с промежутками 1 ч.

Объем вводимого препарата и критерии оценки результатов испытания должны быть указаны в фармакопейных статьях на каждый испытуемый препарат.

Кролики, бывшие в опыте, могут быть использованы для определения пирогенности аналогичного препарата повторно (но всего не более 3-х раз) с интервалом 2 - 3 дня, если ранее введенный им препарат был апирогенным. Если введенный в первый раз препарат оказался пирогенным, кролики не могут быть использованы повторно.

10. Определение эндотоксина в тесте с лизатом амебоцитов

Принцип метода заключается в образовании геля при контакте лизата амебоцитов и эндотоксина. Чувствительность теста составляет 0,1 ЭЕ/мл, что значительно превышает чувствительность метода определения пирогенности на кроликах. 1 нг эндотоксина равен 5 ЭЕ (эндотоксинных единиц). Требования к его содержанию в вакцинных препаратах составляют не более 0,5 ЭЕ/мл.

Референс-стандарт эндотоксина содержит 10000 ЭЕ во флаконе (5 мл).

10.1. Проведение реакции

10.1.1. Предварительный тест

Готовят десятикратные разведения (с 1:10 по 1:100000) контрольного стандарта (референс-вакцины) и исследуемой вакцины в апирогенной дистиллированной воде в объеме 1 мл. Затем отбирают 0,1 мл из каждого разведения в агглютинационную пробирку (10 х 75 мм) и добавляют 0,1 мл лизата. Смесь инкубируют 1 ч в водяной бане при 37 °С.

Разведение, в котором образовался твердый гель (гель остается в пробирке при ее переворачивании), принимают за положительный результат.

10.1.2. Заключительный тест

Готовят 4 ряда по 5 пробирок двукратных разведений испытуемой вакцины. Исходным материалом служит разведение вакцины, которое в предварительном тесте дало положительный результат. Проводят реакцию так же, как предварительный тест. Высчитывают среднегеометрическую титров по результатам учета реакции в 4-х рядах.

10.1.3. Титрование референс-вакцины

Готовят разведение референс-вакцины (неразвед. и с 1:1000 двукратные разведения по 1:32000). Проводят реакцию с лизатом, как и в предварительном тесте. Высчитывают среднегеометрическую титров по результатам учета реакции в 4-х рядах. Далее высчитывают отношение среднегеометрических значений вакцины и референс-вакцины.

За положительный результат (соответствие требованиям) принимают соотношение, равное 1 или меньше 1.

10.1.4. Проведение теста, подтверждающего чувствительность лизата

Готовят двукратные разведения эндотоксина с 1 ЭЕ/мл по 0,0312 ЭЕ/мл. Проводят реакцию с лизатом. Среднегеометрическая титров должна быть не менее 0,1 ЭЕ/мл.

11. Испытание на отсутствие посторонних агентов

Настоящему испытанию подлежат: производственные клеточные культуры; объединенный вирусный сбор, полученный при приготовлении вакцинного штамма, посевного вируса для живых и инактивированных вирусных вакцин; объединенный вирусный сбор каждой серии живых вирусных вакцин.

В частных фармакопейных статьях на отдельные препараты, учитывая специфические особенности их производства, возможно введение дополнительных методов контроля.

11.1.1. Контроль производственной клеточной культуры

Контролю подвергается не менее 500 мл клеточной суспензии в концентрации, используемой для посева клеточных культур - продуцентов вакцины.

Клеточную суспензию разливают во флаконы, удобные для проведения контрольных исследований, но не менее двух.

Клетки, отобранные в качестве контрольных, оставляют незараженными и инкубируют так же, как и клетки, используемые для производства вакцины до последнего сбора вирусов с культур-продуцентов, но не менее 14 сут. В конце периода наблюдения контрольные клеточные культуры исследуют под микроскопом на наличие цитопатических изменений (увеличение 70Х). За время культивирования клеток не должно выявляться признаков дегенерации, вызываемых инфекционным агентом.

1. По истечении срока наблюдения не менее 25% клеточных культур проверяют на наличие феномена гемадсорбции. Для этого культуральную жидкость сливают, клеточный монослой отмывают раствором Хенкса или 0,85%-ным раствором натрия хлорида, имеющим температуру 20 - 25 °С, и в матрасы с культурой вносят 0,25%-ную взвесь эритроцитов морской свинки в 0,85%-ном растворе натрия хлорида в объеме, достаточном для того, чтобы покрыть весь клеточный монослой. После инкубации в течение 30 мин. при температуре (4 +/- 1) °С и последующей инкубации 30 мин. при 20 - 25 °С взвесь эритроцитов сливают, клеточный монослой трижды отмывают раствором Хенкса или 0,85%-ным раствором натрия хлорида, имеющим температуру 20 - 25 °С, и просматривают под микроскопом на наличие гемадсорбции (увеличение 70Х).

2. Из всех матрасов с культурами отбирают пробы культуральной жидкости пипеткой, вместимостью 10 мл (если на протяжении срока инкубации контрольных культур производят сливы вируссодержащей жидкости из производственных культур, то в те же сроки берут пробы культуральной жидкости из матрасов с контрольными культурами и сохраняют их в замороженном состоянии). Все пробы культуральной жидкости объединяют (сливая равные объемы пипеткой, вместимостью 10 мл) и вводят из расчета одна часть контролируемой смеси проб (не менее 10 мл на каждую клеточную культуру) на 4 части питательной среды в три различные клеточные культуры: гомологичную культуру другой партии; культуру клеток человека; клеточную культуру, наиболее чувствительную для выявления вирусов - возможных контаминантов испытуемой культуры-продуцента. От каждой клеточной культуры оставляют по одному контрольному незараженному флакону. Все культуры выдерживают при температуре (36 +/- 1) °С в течение 14 сут. с однократной сменой среды через 4 - 6 сут. после инокуляции и просматривают под микроскопом на наличие цитопатических изменений (увеличение 70Х). По окончании срока наблюдения культуры проверяют на наличие феномена гемадсорбции с эритроцитами морской свинки, как указано выше.

Пробы считают прошедшими контроль, если в опытных и контрольных культурах отсутствуют цитопатические изменения и гемадсорбция. При наличии цитопатических изменений и (или) гемадсорбции в контрольных культурах опыт следует повторить в клеточной культуре другой партии.

Если при исследовании контрольных клеточных культур в одном из испытаний обнаружены цитопатические изменения или феномен гемадсорбции, вирус, полученный в соответствующих зараженных культурах, не должен быть использован для производства вакцины.

11.1.2. Контроль вируссодержащего материала

Контролю подлежит объединенный вирусный сбор, полученный в процессе приготовления вакцинного штамма, посевного вируса и вакцины. Контроль проводят в клеточных культурах, на животных и куриных эмбрионах. Если контроль осуществляют не позднее чем через 24 ч после отбора проб вируссодержащей жидкости, то последние до проведения контроля хранят при температуре (4 +/- 1) °С. При проведении контроля в более поздние сроки пробы замораживают и хранят при температуре, не превышающей -20 °С. Оттаивание материала разрешается проводить не более одного раза.

11.1.3. Контроль в клеточных культурах

Испытуемый материал (не менее 50 мл на каждую клеточную культуру, если в частной фармакопейной статье нет других указаний) смешивают с иммунной сывороткой, взятой в количестве, достаточном для полной нейтрализации содержащегося в пробе вируса. Для получения иммунных сывороток используют животных, ткани которых не применяют для приготовления клеточных культур. Антиген для иммунизации животных готовят в клеточных культурах, не используемых для проведения контроля. Промежуток времени между извлечением испытуемого образца из холодильника (в случае хранения его при температуре (4 +/- 1) °С) или его размораживанием и добавлением иммунной сыворотки не должен превышать 30 мин.

Смесь выдерживают при заданной температуре в течение необходимого для нейтрализации данного вируса времени, после чего вносят в матрасы с тремя указанными выше видами культур клеток. Для каждого вида культуры клеток оставляют один контрольный незараженный флакон.

Культуры выдерживают при температуре (36 +/- 1) °С 14 сут. со сменой среды на 4 - 6 сут., просматривая под микроскопом на наличие цитопатических изменений. По истечении 14 сут. опытные и контрольные клеточные культуры замораживают, оттаивают и производят пассаж на одноименной культуре, внося в нее не менее 25 мл неосветленной культуральной жидкости. Разведение вносимого материала поддерживающей средой не должно превышать 1:4. В случае, если контроль производится в перевиваемой клеточной линии, по истечении указанного срока инкубации возможен субпассаж клеток.

Культуры клеток (опытную и контрольную) выдерживают при температуре (36 +/- 1) °С 14 сут. со сменой среды на 4 - 6 сут., просматривая под микроскопом на наличие цитопатических изменений. По истечении срока наблюдения культуры проверяют в реакции гемадсорбции, как указано выше. Материал считают прошедшим контроль, если в опытных и контрольных культурах отсутствуют цитопатические изменения и гемадсорбция. При наличии цитопатических изменений и (или) гемадсорбции в контрольных культурах опыт повторяют на другой партии клеточной культуры.

11.2. Контроль на животных

Используют здоровых животных, на которых ранее не проводили какие-либо испытания. В случае, если содержащийся в контролируемом материале вакцинный вирус патогенен для животных, используемых при контроле, его предварительно нейтрализуют иммунной сывороткой.

11.2.1. Контроль на взрослых мышах

Используют не менее 20 мышей, массой 15 - 20 г. Каждому животному вводят по 0,03 мл испытуемого материала интрацеребрально и по 0,5 мл интраперитонеально. Материал вводят шприцем, вместимостью 1 мл (здесь и далее погрешность объема дозы не более 4%). Животных наблюдают 28 сут. Все мыши, которые погибают позднее первых 24 ч после введения материала, а также животные с видимыми признаками заболевания должны быть вскрыты и исследованы макроскопически на наличие признаков патологии, не связанной с введением препарата. При отсутствии последней из внутренних органов (печень, почки, селезенка, легкие) и головного мозга готовят 10%-ные суспензии на 0,85%-ном растворе хлорида натрия и вводят их не менее чем 5 мышам интрацеребрально и интраперитонеально в дозах, указанных выше. Животных наблюдают 21 сут.

Материал считается прошедшим контроль, если на протяжении периода наблюдения остаются здоровыми не менее 80% инокулированных в первом и втором случае животных и ни у одного из них не выявляют признаков, указывающих на присутствие в вакцине каких-либо посторонних агентов.

11.2.2. Контроль на новорожденных мышах

Используют не менее 20 новорожденных мышей не старше 24 ч. Каждому животному вводят по 0,01 мл испытуемого материала интрацеребрально и по 0,1 мл интраперитонеально. Животных наблюдают 14 сут. Все мыши, которые погибают через 24 ч после введения материала или у которых наблюдают признаки заболевания, должны быть вскрыты и исследованы макроскопически на наличие спонтанной патологии, не связанной с введением препарата. При отсутствии последней из внутренних органов (печень, почка, селезенка, легкие) и головного мозга готовят 10%-ные суспензии на 0,85%-ном растворе натрия хлорида и вводят их не менее чем 5 новорожденным мышам интрацеребрально и интраперитонеально в дозах, указанных выше. Животных наблюдают 14 сут. Материал считается прошедшим контроль, если на протяжении периода наблюдения остаются здоровыми не менее 80% инокулированных в первом и втором случае животных и ни у одного не выявляется признаков, указывающих на присутствие в вакцине каких-либо посторонних агентов.

11.2.3. Контроль на морских свинках

Используют не менее 5 морских свинок, массой 300 - 350 г. Каждому животному вводят по 0,1 мл испытуемого материала интрацеребрально и по 5,0 мл интраперитонеально. Животных наблюдают 42 сут. Все животные, которые погибают позднее первых 24 ч после введения материала или у которых наблюдаются признаки заболевания, должны быть вскрыты и исследованы макроскопически на наличие признаков вирусной или туберкулезной инфекции. Внутренние органы (селезенка, почка, легкое, печень, сальник) и лимфоузлы (паховые, подмышечные, забрюшинные, трахеобронхиальные, портальные) должны быть исследованы макроскопически, а 10%-ные суспензии на 0,85%-ном растворе хлорида натрия этих органов и лимфоузлов исследуют путем посева на среду Левенштейна. В конце периода наблюдения всех выживших животных вскрывают и исследуют макроскопически на наличие признаков вирусной или туберкулезной инфекции. Материал считают прошедшим контроль, если не менее 80% инокулированных животных остаются здоровыми к концу периода наблюдения и ни у одного из них не наблюдается признаков вирусной или туберкулезной инфекции и результаты посева отрицательны.

11.2.4. Контроль на куриных эмбрионах

В случае, если содержащийся в контролируемом материале вирус патогенен для куриных эмбрионов, его необходимо предварительно нейтрализовать иммунной сывороткой. Испытуемый материал вводят трем группам куриных эмбрионов по 10 штук в каждой группе.

Первой группе куриных эмбрионов 9 - 10-дневного возраста материал вводят по 0,25 мл в аллантоисную полость. Эмбрионы инкубируют при температуре (36 +/- 1) °С 5 - 6 сут. По истечении указанного срока аллантоисную жидкость проверяют в реакции гемагглютинации с эритроцитами морской свинки и петуха. При этом в лунках агглютинационных досок готовят 5 - 6 последовательных двукратных разведений (на 0,85%-ном растворе натрия хлорида) аллантоисной жидкости из каждого инокулированного эмбриона. Затем в лунки добавляют равные объемы 0,5% суспензии (на 0,85%-ном растворе натрия хлорида) эритроцитов. После 30 - 40 мин. выдерживания при температуре 20 - 25 °С учитывают результаты. Материал считают прошедшим контроль, если в течение указанного срока инкубации остаются живыми не менее 80% инокулированных эмбрионов и при отрицательной реакции гемагглютинации во всех случаях.

Второй группе куриных эмбрионов 7 - 8-дневного возраста материал вводят по 0,25 мл в желточный мешок. Эмбрионы выдерживают при температуре (37 +/- 1) °С 10 сут. Материал считается прошедшим контроль, если к концу указанного срока инкубации остаются живыми не менее 80% инокулированных эмбрионов.

Третьей группе куриных эмбрионов 10 - 11-дневного возраста материал вводят по 0,2 мл на хорионаллантоисную оболочку с боковой поверхности яйца через искусственную воздушную полость или со стороны естественного воздушного мешка. Эмбрионы инкубируют при (37 +/- 1) °С в течение 5 - 6 сут. По истечении указанного срока оболочки извлекают и просматривают. Материал считается прошедшим контроль, если к концу указанного срока инкубации остаются

живыми не менее 80% инокулированных эмбрионов и на хорионаллантоисных оболочках всех эмбрионов отсутствуют изменения, видимые невооруженным взглядом.

11.3. Контроль на отсутствие микоплазм

Контролю подлежат: культуральная жидкость контрольных клеточных культур, объединенный вирусный сбор, полученный в процессе приготовления вакцинного штамма, посевного вируса и вакцины, а также готовые формы живых и инактивированных вирусных вакцин.

Применяют питательную среду следующего состава:	г/л
триптический гидролизат бычьего сердца	- 20,0
мясной экстракт	- 13,0
экстракт хлебопекарных дрожжей	- 1,5
хлорид натрия	- 5,0
агар	- 3,0.

pH 7,8 (после стерилизации)

Приготовление 1 л среды (взвешивание производят с погрешностью не более 0,01 г):

К гидролизату бычьего сердца в количестве 200 мл (с содержанием сухих веществ 8 - 10%) добавляют 400 мл мясного экстракта 1:2 с содержанием сухих веществ 3,0 - 3,5% и экстракт дрожжей из расчета 1,5 г сухих веществ на 1 л среды, а также 5,0 г хлорида натрия и 3,0 г агара. С помощью 10%-ного раствора NaOH устанавливают значение pH, равное 7,8 - 8,0. Среду нагревают до расплавления агара в водяной бане, фильтруют при необходимости, разливают и стерилизуют при 50 кПа (0,5 кгс/кв. см) 30 мин.

Перед употреблением среду разогревают в водяной бане до полного расплавления агара, охлаждают до 40 - 45 °С, добавляют 15 - 20% сыворотки лошади (без консерванта) и 100 ед./мл пенициллина и разливают по 10 мл в пробирки. Каждую серию среды проверяют на чувствительность к микоплазмам, используя тест-штаммы микоплазм Mycoplasma arginini G230 (ОСО 42-28-105-87). Подлежащий контролю материал вносят по 0,5 мл в каждую пробирку со средой. Посев производят пипеткой, вместимостью 1 мл, столбиком от дна пробирки. Пробирки выдерживают 14 сут. при температуре (37 +/- 1) °С. Просмотр пробирок проводят на 3, 7, 10 и 14 сут. При наличии роста микоплазм хотя бы в одной пробирке материал бракуют.

11.4. Контроль на отсутствие микобактерий

Вакцинный препарат не должен содержать микобактерий птичьего вида, источником которых может быть вакцинный субстрат (культура клеток перепелиных эмбрионов), и микобактерий туберкулеза, источником которых может быть сыворотка крупного рогатого скота (СКРС).

11.4.1. Контроль на отсутствие микобактерий птичьего вида

Контролируют сливы с контрольных (не зараженных вирусом) матрацев с культурой клеток перепелиных эмбрионов.

Контроль на отсутствие микобактерий птичьего вида проводят путем высева исследуемого материала на среду Левенштейна - Йенсена. 20 мл исследуемого материала центрифугируют в течение 15 мин. при (3500 +/- 500) об./мин. 19 мл надосадочной жидкости удаляют, а осадок ресуспендируют в оставшемся 1 мл и высевают по 0,2 мл на 5 пробирок со средой Левенштейна - Йенсена.

Учет производят через 30 сут. экспозиции при температуре (38 +/- 1) °С. На поверхности среды не должно быть колоний микобактерий.

11.4.2. Контроль на отсутствие микобактерий туберкулеза

Контролируют каждую серию СКРС. Контроль проводят на морских свинках. 20 мл СКРС центрифугируют 15 мин. при (3500 +/- 500) об./мин., 19 мл надосадочной жидкости удаляют. Осадок ресуспендируют в оставшемся 1 мл сыворотки и вводят по 0,5 мл в/б двум морским свинкам, массой (325 +/- 25) г. Животных наблюдают в течение 42 сут. Морские свинки должны оставаться здоровыми и не иметь признаков туберкулезной интоксикации (потеря массы тела).

Через 42 сут. животных вскрывают и проводят макроскопическое, гистологическое и бактериологическое исследование внутренних органов: селезенки, легких, печени, сальника, брюшины, лимфатических узлов (паховых, подмышечных, забрюшинных, трахеобронхиальных, портальных, брыжеечных).

Животные, павшие или заболевшие в течение срока наблюдения, тоже подлежат обязательному вскрытию и исследованию.

Макроскопически не должно быть во внутренних органах туберкулезных поражений (специфических узелков), в лимфатических узлах не должно быть фиброзно-казеозных изменений.

При гистологическом исследовании не должно быть специфических туберкулезных поражений.

При бактериологическом исследовании не должно быть роста микобактерий на поверхности среды Левенштейна - Йенсена через 45 суток инкубации при температуре (38 +/- 1) °С.

Проведение бактериологических исследований

В отдельных фарфоровых ступках тщательно растирают лимфатические узлы (все вместе), часть селезенки, 1/4 весовую часть печени и одно легкое, обрабатывают 5%-ным раствором серной кислоты в течение (10 +/- 1) мин., центрифугируют при (3000 +/- 500) об./мин. в течение (15 +/- 5) мин. (общее время воздействия серной кислоты не должно превышать 25 мин.). Сливают супернатант и ресуспендируют осадок в 5 - 6 мл стерильного 0,9%-ного раствора натрия хлорида и засевают на яичную среду Левенштейна - Йенсена. Для посева каждого органа используется не менее 5-ти пробирок.

Посевы выдерживают 45 сут. при температуре (38 +/- 1) °С.

Приготовление среды Левенштейна - Йенсена

Для определения свежести яиц используют 7%-ный и 3%-ный раствор поваренной соли. Яйца, тонущие в 7%-ном растворе, - вполне свежие; яйца, плавающие в 3%-ном растворе, - не пригодны для изготовления питательных сред.

Свежие яйца (1 л - 20 - 22 шт.) тщательно моют мылом и щеткой, затем протирают 70° спиртом. На обоих концах делают отверстия стерильным пинцетом и содержимое яйца выливают в стерильную литровую банку с бусами. Эту массу перемешивают энергичным встряхиванием и добавляют 20 мл 2%-ной малахитовой зелени и фильтруют через стерильную марлю. Затем добавляют солевой раствор (см. пропись ниже) в количестве 600 мл с 30 г картофельного крахмала. Среду смешивают, разливают в 20 мл пробирки БЦЖ (ТУ 115-15-63) по 6 мл, скашивают под углом 30 - 40 °С и помещают в аппарат для свертывания при (85 +/- 1) °С на 40 минут.

Для проверки стерильности среду ставят на 2 сут. в термостат при температуре (37 +/- 1) °С.

30 г крахмала растворить в солевом растворе, разлить в колбы примерно по 150 мл. Поставить в водяную баню и кипятить до загустения (постоянно перемешивая). Затем стерилизовать при 110 °С в течение 30 мин.

12. Контроль качества герметизации ампул и флаконов с медицинскими иммунобиологическими препаратами

Настоящая методика используется для контроля качества герметизации ампул и флаконов с медицинскими иммунобиологическими препаратами (*МИБП*), герметизированными при пониженном давлении (**«под вакуумом»**) или после заполнения их защитным газом при атмосферном давлении.

Таблица 5

Солевой раствор для среды Левенштейна-Йенсена

Название, формула	ГОСТ	Квалификация	Количество
Калий фосфорнокислый однозамещенный (KH_2PO_4)	ГОСТ 4198-75	х.ч.	2,4 г
Магний сернокислый ($MgSO_4 \times 7H_2O$)	ГОСТ 4523-77	х.ч.	0,24 г
Лимонная кислота ($C_6H_8O_7 \times H_2O$)	ТУ 6-09-584-75	х.ч.	0,6 г
Аспарагин	фирма	х.ч.	3,6 г
Глицерин $CH_2OH\text{-}CHOH\text{-}CH_2OH$	ГОСТ 6259-75	х.ч.	12 мл
Дистиллированная вода непирогенная для инъекций	ФС 42-2620-89	см. ФС	до 600 мл

При контроле качества герметизации ампул и флаконов с МИБП под вакуумом определяющим параметром является давление воздуха в ампулах и флаконах. Диапазон измеряемых величин - от 10 Па до 100 кПа. Допустимыми величинами являются давления порядка 10 Па - 1 кПа.

Метод измерения - визуальное определение цвета свечения газовой среды ампул и флаконов с МИБП при возбуждении ее высокочастотным электрическим полем с помощью аппаратов типа д'Арсонваль или Тесла. Частота электрических колебаний колеблется от 20 до 50 кГц, напряжение - от 15 до 20 кВ.

В зависимости от величины давления (глубины вакуума) цвет свечения будет различным. Общепринятой является следующая приближенная зависимость цвета свечения от величины давления:

Таблица 6

Зависимость цвета свечения от величины давления

Величина давления	Цвет свечения
10 - 100 Па	бледно-голубое
100 - 1000 Па	розово-голубое
1 - 5 кПа	фиолетовое
5 - 100 кПа	нет свечения

При работе следует соблюдать технику безопасности по эксплуатации источников высокочастотных электрических сигналов.

Оператор должен пройти обучение работе с используемым аппаратом д'Арсонваля или Тесла и выполнять требования техники безопасности. Оператор должен иметь медицинскую справку об отсутствии дальтонизма.

Условия измерения нормальные, по ГОСТу 395-80.

Контролю на наличие вакуума подвергаются все ампулы и флаконы серии.

Перед началом испытаний следует убедиться, что ампулы и флаконы приняли температуру в соответствии с ГОСТом 395-80. Это особенно важно, если перед проведением испытаний ампулы и флаконы хранились при пониженной температуре.

Выполнение измерений проводят в соответствии с инструкцией по эксплуатации используемого источника высокочастотных электрических полей. Не следует прикасаться высокочастотным электродом к месту запайки ампул.

Определение величины давления проводят в соответствии с вышеприведенной таблицей. Требования к величине давления (глубине вакуума) регламентируются частными фармакопейными статьями.

Контроль точности определения следует проводить по свечению образцов ампул и флаконов, герметизированных в строго контролируемых условиях при точно известных величинах давления (стандартные образцы предприятий - СТП).

При контроле качества герметизации ампул и флаконов с МИБП, герметизированных после заполнения защитным газом при атмосферном давлении, испытанию подлежат все ампулы серии. Контроль флаконов осуществляют выборочно, объем выборки составляет $0,5\sqrt{N}$, где N - число флаконов в серии. При обнаружении в выборке хотя бы одного негерметичного флакона проводят контроль всех флаконов серии.

Для проведения испытаний ампулы и флаконы помещают в кассеты, которые погружают в емкость, заполненную водой, подкрашенной любым водно-растворимым красителем (например, метиленовая синь). Кассеты погружают таким образом, чтобы ампулы и флаконы полностью находились в воде.

Емкость герметически закрывают и создают в ней избыточное, по сравнению с атмосферным, давление (100 +/- 20) кПа. Это давление выдерживают в течение 20 - 25 мин., после чего устанавливают в емкости давление, равное атмосферному. Емкость открывают, кассеты с ампулами и флаконами вынимают и просматривают на наличие в них подкрашенной воды. Ампулы и флаконы, содержащие подкрашенную воду, бракуют.

При работе необходимо соблюдать требования техники безопасности по эксплуатации сосудов, находящихся под повышенным давлением.

13. Определение остаточного кислорода в ампулах и флаконах с МИБП, герметизированных после заполнения защитным газом

Настоящая методика используется для определения величины остаточного кислорода в ампулах и флаконах с медицинскими иммунобиологическими препаратами (МИБП), герметизированных после заполнения их защитным газом, не содержащим кислород (азот, аргон и др.).

Концентрация кислорода в составе защитных газов, содержащихся в ампулах и флаконах с МИБП, регламентируется частными фармакопейными статьями, но во всех случаях она не должна превышать 2% (по объему).

За величину концентрации кислорода принимают среднюю арифметическую величину концентрации, полученную из данных всех испытанных образцов. При этом ни в одной ампуле или флаконе концентрация кислорода не должна превышать сумму средней арифметической и утроенной среднеквадратичной ошибки результатов отдельных измерений.

Измерительные устройства, используемые для данного испытания, должны определять кислород в диапазоне концентраций 0,05 - 25%, при этом класс точности должен составлять 10,0 от измеряемой величины. Минимальный объем пробы газа, предназначенный для анализа, должен быть не более 1 куб. см.

В качестве таких средств измерений могут быть использованы различные газоанализаторы, отвечающие вышеперечисленным требованиям, например газовый хроматограф типа ЛХМ-8МД, масс-спектрометры, полярографы.

Используемые газоанализаторы должны быть аттестованы и поверены.

При проведении испытаний следует соблюдать технику безопасности в соответствии с инструкцией предприятий, определяющей безопасность работы с МИБП, со стеклом, а также инструкцией по технике безопасности при работе с соответствующим типом газоанализатора.

Оператор, выполняющий данный вид испытаний, должен пройти обучение работе на газоанализаторе и технике безопасности в соответствии с вышеприведенными требованиями.

Измерения проводят при нормальных условиях по ГОСТу 395-80.

Подготовку к выполнению измерений, отбор проб газа для анализа из ампул и флаконов и выполнение измерений проводят в соответствии с инструкцией по эксплуатации используемого газоанализатора. Следует принять все меры предосторожности, чтобы в анализируемую пробу не попал газ из окружающей среды.

Контроль содержания кислорода осуществляют в каждой серии препарата. Ампулы или флаконы с МИБП от каждой серии отбирают выборочно, объем выборки составляет $0{,}2\sqrt{N}$, где N - число образцов в контролируемой серии. Порядок отбора образцов зависит от способа герметизации: при машинном способе герметизации следует отбирать образцы из числа последних в каждой кассете; при ручном способе герметизации отбор образцов следует осуществлять равномерно в процессе герметизации (в начале, середине и конце) от каждого оператора, производящего герметизацию.

Вычисление результатов измерений проводят в соответствии с инструкцией по эксплуатации используемого газоанализатора.

14. Определение белкового азота с реактивом Несслера

Метод основан на свойстве реактива Несслера давать цветную реакцию с ионами аммония, образующимися после минерализации белковых продуктов.

14.1. Метод с использованием трихлоруксусной кислоты

Рекомендован для определения белкового азота в вирусных вакцинах, анатоксинах и инфекционных аллергенах.

14.1.1. Анализ препарата с содержанием белкового азота 0,01 - 0,40 мг/мл

Методика определения. В центрифужную пробирку вносят пипеткой необходимый объем (А) препарата и прибавляют раствор трихлоруксусной кислоты до конечной концентрации 10%. Пробу оставляют на 18 - 20 ч при температуре 4 - 8 °С. Осадок отделяют центрифугированием при частоте вращения 2000 об./мин., температуре 4 - 6 °С в течение 30 мин., надосадочную жидкость сливают, осадок промывают 1 мл 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты, вновь центрифугиру-

ют в тех же условиях и удаляют надосадочную жидкость. К осадку прибавляют 0,1 мл концентрированной серной кислоты. Пробирку закрывают стеклянным колпачком. Пробу минерализуют на песочной бане. Одновременно в аналогичных условиях минерализуют контрольную пробу, содержащую 0,1 мл концентрированной серной кислоты. Для ускорения минерализации используют пергидроль, который периодически прибавляют в предварительно охлажденную пробирку по 1 - 2 капли. Минерализацию продолжают до обесцвечивания содержимого пробирки не менее 10 ч. Объем минерализата доводят водой до 10 мл и раствор перемешивают.

Для колориметрирования отбирают в пробирку необходимое количество (Б) полученного раствора, содержащее 10 - 20 мкг азота, доводят его объем водой до 9,5 мл, перемешивают, прибавляют 0,5 мл реактива Несслера и вновь перемешивают. Оптическую плотность раствора определяют на фотоэлектроколориметре при длине волны 400 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм по сравнению с контрольным раствором, приготовленным аналогичным образом из контрольной пробы.

Содержание белкового азота в препарате в миллиграммах на 1 мл (X) вычисляют по формуле:

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

а - количество азота, рассчитанное по калибровочному графику, **мкг;**

А - количество анализируемого препарата, мл;

В - количество раствора минерализата, взятое для колориметрирования, **мл.**

Калибровочный график. Готовят основной раствор, содержащий 0,1 мг азота в 1 мл: 0,2357 г аммония сульфата (х.ч.), доведенного до постоянной массы в эксикаторе над безводным кальция хлоридом, растворяют в мерной колбе, вместимостью 500 мл, в воде и доводят объем раствора водой до метки.

Основной раствор хранят в течение 1 г при температуре 4 - 8 °С в колбе с притертой пробкой.

Перед определением основной раствор разводят водой в 2 раза. Отбирают в пробирки 0,1 - 0,5 мл (5 - 25 мкг азота) полученного раствора с интервалом в 0,1 мл, доводят объем раствора водой до 9,5 мл, перемешивают, прибавляют по 0,5 мл реактива Несслера и вновь перемешивают. Пробы колориметрируют, как описано выше, по сравнению с контрольным раствором, содержащим 9,5 мл воды и 0,5 мл реактива Несслера.

Калибровочный график воспроизводят при каждом анализе.

Примечания.

1. При проведении анализа необходимо руководствоваться данными таблицы 7, в которой указаны оптимальные условия для выполнения методики в зависимости от концентрации белкового азота в анализируемом препарате.

2. Приготовление реактива Несслера. В мерную колбу, вместимостью 100 мл, наливают воду до метки, в дальнейшем пользуются только этой водой, 10 г ртути (II) йодида растирают в фарфоро-

Таблица 7

Оптимальное соотношение анализируемого препарата и реагентов при определении беклового азата с реактивом Несслера

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

вой ступке с небольшим количеством воды и переливают в склянку из темного стекла. Ступку ополаскивают небольшим количеством воды и сливают в ту же склянку. Прибавляют 5 г калия йодида. В оставшейся воде растворяют 20 г натрия гидроксида и после охлаждения раствора переливают его в ту же емкость. В течение нескольких дней осаждается избыток ртутных солей. Прозрачную жидкость осторожно сливают с осадка в темную склянку. Реактив хранят в темном месте.

3. Приготовление 80%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. 150 г трихлоруксусной кислоты растворяют в 100 мл воды. 1 мл полученного раствора титруют раствором натрия гидроксида концентрации 1 моль/л; индикатор - фенолфталеин.

Концентрацию трихлоруксусной кислоты в анализируемом растворе в процентах (X) рассчитывают по формуле:

$$X = a \times 0{,}1634 \times 100 = a \times 16{,}34,$$

где:

a - количество натрия гидроксида концентрации 1 моль/л, пошедшее на титрование испытуемой пробы, мл;

0,1634 - количество трихлоруксусной кислоты, соответствующее 1 мл раствора натрия гидроксида концентрации 1 моль/л, г.

Раствор разводят до концентрации 80%. (Растворы трихлоруксусной кислоты меньших концентраций готовят соответствующим разведением 80%-ного раствора.)

14.1.2. Анализ препаратов с содержанием белкового азота 2,5 - 10,0 мкг/мл

Методика определения. В центрифужную пробирку вносят 5 мл препарата, прибавляют 0,72 мл 80%-ного раствора трихлоруксусной кислоты, если нет других указаний. Пробы оставляют на 18 - 20 ч при температуре 4 - 8 °С. Осадок отделяют центрифугированием при частоте вращения 2000 об./мин., температуре 4 - 6 °С в течение 30 мин., промывают 1 мл 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты и вновь центрифугируют в тех же условиях. К осадку прибавляют 0,1 мл концентрированной серной кислоты. Пробирку закрывают стеклянным колпачком. Пробу минерализуют на песочной бане. Одновременно в аналогичных условиях минерализуют контрольную пробу, содержащую 0,1 мл концентрированной серной кислоты. Для ускорения минерализации используют пергидроль, который периодически прибавляют в предварительно охлажденную пробирку по 1 - 2 капле. Минерализацию продолжают до обесцвечивания содержимого пробирки, но не менее 10 ч. Объем минерализата доводят водой до 5 мл и раствор перемешивают. Для колориметрирования отбирают в пробирку 1 мл полученного раствора, доводят его объем водой до 9,5 мл, перемешивают, прибавляют 0,5 мл реактива Несслера и вновь перемешивают. Оптическую плотность раствора измеряют на фотоэлектроколориметре при длине волны 400 нм в кюветах с толщиной слоя 20 мм по сравнению с контрольным раствором, приготовленным аналогичным образом из контрольной пробы.

Содержание белкового азота в миллиграммах на 1 мл (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{a \cdot 5}{5 \cdot 1 \cdot 1000} = \frac{a}{1000}, \text{где}$$

a - количество азота, рассчитанное по калибровочному графику, мкг.

Калибровочный график. Основной раствор аммония сульфата, содержащий 0,1 мг/мл азота, полученный, как описано в разделе 14.1.1, разводят водой в 5 раз. Отбирают в пробирки от 0,1 до 0,6 мл полученного раствора (2 - 12 мкг азота) с интервалом 0,1 мл, прибавляют воду до объема 9,5 мл, перемешивают, прибавляют по 0,5 мл реактива Несслера и вновь перемешивают. Пробы колориметрируют, как описано выше, по сравнению с контрольным раствором, содержащим 9,5 мл воды и 0,5 мл реактива Несслера.

Калибровочный график воспроизводят при каждом анализе.

Примечание.

Приготовление реактива Несслера и раствора трихлоруксусной кислоты проводят, как указано в разделе 14.1.1.

14.2. Метод с использованием фосфорно-вольфрамовой кислоты

Рекомендован для определения белкового азота в неинфекционных аллергенах.

Методика определения (для препаратов с содержанием белкового азота 0,016 - 0,400 мг/мл). В центрифужную пробирку вносят пипеткой необходимое количество (А) (табл. 7, раздел 14.1.1) препарата, доводят объем до 3 мл 0,9%-ным раствором натрия хлорида, прибавляют 0,3 мл 20%-ного раствора фосфорно-вольфрамовой кислоты, 0,3 мл концентрированной серной кислоты и перемешивают. Пробу оставляют на 18 - 20 ч при температуре 4 - 8 °С. Осадок отделяют центрифугированием при частоте вращения 2000 об./мин. в течение 30 мин. при температуре 4 - 6 °С, промывают его смесью, состоящей из 1 мл воды, 0,1 мл концентрированной серной кислоты, 0,1 мл 20%-ного раствора фосфорно-вольфрамовой кислоты, и вновь центрифугируют в тех же условиях. К осадку прибавляют 0,1 мл концентрированной серной кислоты. Пробирку закрывают стеклянным колпачком и минерализуют на песочной бане. Одновременно минерализуют контрольную пробу, содержащую 0,1 мл концентрированной серной кислоты. Для ускорения минерализации используют пергидроль, периодически прибавляя его по 1 - 2 капле в предварительно охлажденную пробирку. Минерализацию продолжают до образования осадка желтого цвета (не менее 10 ч), прибавляют 1 - 2 капли пергидроля и минерализуют еще 5 - 6 ч. Если цвет осадка не изменяется, то сжигание прекращают. Объем минерализата доводят водой до 10 мл, раствор тщательно перемешивают и центрифугируют при частоте вращения 2000 об./мин. в течение 30 мин. при температуре 4 - 6 °С. Надосадочную жидкость сливают в пробирки. Для колориметрирования отбирают необходимый объем надосадочной жидкости (В) и проводят анализ, как описано в разделе 14.1.1.

15. Определение общего азота с реактивом Несслера

Принцип метода аналогичен описанному в разделе 14.1.1.

Методика определения. В пробирку вносят пипеткой 0,5 мл препарата с содержанием общего азота 100 - 400 мкг и прибавляют 0,1 мл концентрированной серной кислоты. Пробирку закрывают стеклянным колпачком. Пробу минерализуют на песочной бане. Параллельно минерализуют контрольную пробу, содержащую 0,1 мл концентрированной серной кислоты. Далее анализ проводят, как указано в разделе 14.1.1.

16. Определение белка с биуретовым реактивом

Метод основан на способности пептидной связи молекулы белка давать цветное комплексное соединение меди в щелочной среде. Метод рекомендован для определения белка в иммуноглобулинах и в антитоксических сыворотках.

Методика определения. 1 мл иммуноглобулина помещают в мерную колбу, вместимостью 50 мл, и доводят объем раствора 0,9%-ным раствором натрия хлорида до метки. К 5 мл полученного раствора прибавляют 5 мл биуретового реактива. Одновременно готовят контрольную смесь, состоящую из 5 мл 0,9%-ного раствора натрия хлорида и 5 мл биуретового реактива. Все пробы перемешивают и оставляют на 30 мин. Оптическую плотность раствора определяют на фотоэлектроколориметре при длине волны 540 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм по сравнению с контрольным раствором.

Содержание белка в процентах (Х) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D_{исп.} \cdot C_{ст.}}{D_{ст.}}, \text{ где}$$

$C_{ст}$ - концентрация белка стандартного раствора, %;

$D_{ст}$ - показатель оптической плотности стандартного раствора;

$D_{исп}$ - показатель оптической плотности испытуемого раствора.

Стандартный раствор готовят из стандартного образца предприятия (СОП) путем разведения 1 мл СОП в мерной колбе, вместимостью 50 мл, стерильным 0,9%-ным раствором натрия

хлорида до метки. Стандартный раствор консервируют прибавлением мертиолята до концентрации 100 мкг/мл. Раствор пригоден к употреблению в течение месяца при температуре 4 - 8 °С.

Содержание белка в СОП определяют по отраслевому стандартному образцу (ОСО содержания белка в иммуноглобулине).

Определение содержания белка в СОП. Для определения содержания белка в СОП используют 5 ампул раствора иммуноглобулина, предназначенного для СОП, и 2 ампулы ОСО.

Из каждой ампулы берут пипеткой по 1 мл пробы и разводят 0,9%-ным раствором натрия хлорида в мерной колбе, вместимостью 50 мл, до метки. Из каждого полученного раствора СОП и ОСО отбирают 4 пробы по 5 мл и к каждой прибавляют по 5 мл биуретового реактива. Пробы перемешивают. Контролем служит смесь, состоящая из 5 мл 0,9%-ного раствора натрия хлорида и 5 мл биуретового реактива. Все пробы колориметрируют через 30 мин., как указано выше. Измерение оптической плотности каждой пробы проводят трижды и рассчитывают средний арифметический показатель.

Отклонение показателей оптической плотности параллельных проб должно быть в пределах +/- 2,5% от среднего арифметического значения показателя. Если отклонение не соответствует +/- 2,5%, то проводят повторное определение из тех же растворов, отобрав по 5 проб. При больших отклонениях цифровых значений в пробах следует весь анализ проводить заново, используя для этого новые ампулы ОСО и СОП.

Примечания.

1. При определении белка в антитоксических сыворотках в качестве стандартного раствора используют серию сыворотки (СОП), содержание белка в котором установлено по ОСО, приготовленному на основе сыворотки в Государственном научно-исследовательском институте стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича.

2. Приготовление биуретового реактива. Растворяют 90 г калия-натрия виннокислого в 400 мл раствора натрия гидроксида концентрации 0,2 моль/л, прибавляют 10 г меди сульфата, после растворения соли прибавляют 10 г калия йодида и доводят объем тем же раствором натрия гидроксида до 2 л.

17. Определение белка по методу Лоури

Метод основан на свойстве ароматических аминокислот давать цветную реакцию с реактивом Фолина в сочетании с биуретовой реакцией на пептидные связи.

17.1. Метод без предварительного осаждения белка

Метод рекомендован для определения белка в химических вакцинах.

Методика определения. К 1 мл исследуемого раствора, содержащего 50 - 150 мкг белка, прибавляют 5 мл реактива С. Содержимое пробирки перемешивают и оставляют на 10 мин. при температуре 18 - 20 °С. Затем прибавляют 0,5 мл реактива Фолина и пробу оставляют на 30 мин. Оптическую плотность измеряют на фотоэлектроколориметре или спектрофотометре при длине волны 750 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм по сравнению с контрольным раствором, содержащим 1 мл растворителя, 5 мл реактива С и 0,5 мл реактива Фолина.

Содержание белка в препарате рассчитывают по калибровочному графику.

Калибровочный график. ОСО содержания белка для метода Лоури разводят в соответствии с инструкцией по применению до концентрации 200 мкг/мл. К 0,2 - 0,8 мл полученного раствора (40 - 160 мкг белка) с интервалом 0,2 мл прибавляют воду соответственно до 1 мл, далее проводят анализ, как указано выше.

Калибровочный график воспроизводят при каждом анализе.

Примечания.

1. Приготовление реактива Фолина. В круглодонную колбу, вместимостью 1 л, наливают 350 мл воды, прибавляют 50 г натрия вольфрамата и 12,5 г натрия молибдата, перемешивают до полного растворения. К полученному раствору прибавляют 25 мл 85%-ного раствора ортофосфорной кислоты, 50 мл концентрированной соляной кислоты и смесь кипятят с обратным холодильником в течение 10 ч. В остывшую смесь прибавляют 75 г лития сульфата, 25 мл воды и 3 капли бромной воды. Кипятят (без холодильника) на асбестовой сетке в течение 15 мин. для удаления избытка брома. Смесь охлаждают до температуры 18 - 20 °С и доводят объем раствора

водой до 500 мл. Перемешивают и фильтруют через стеклянный фильтр N 1. Из фильтрата отбирают 1 мл в колбу, вместимостью 100 мл, прибавляют 45 - 50 мл воды и титруют раствором натрия гидроксида концентрации 0,1 моль/л (индикатор - фенолфталеин). Перед употреблением реактив Фолина разводят водой до концентрации кислоты 1 N.

2. Приготовление реактива А. 2 г натрия карбоната растворяют в растворе натрия гидроксида концентрации 0,1 моль/л и доводят объем раствора этим же раствором до 100 мл.

3. Приготовление реактива В. 0,5 г меди сульфата растворяют в 1%-ном растворе калия-натрия винокислого и доводят объем раствора этим же раствором до 100 мл.

4. Приготовление реактива С. Перед анализом смешивают 50 мл реактива А и 1 мл реактива В.

17.2. Метод с предварительным осаждением белка

Метод рекомендован для препаратов, содержащих компоненты, влияющие на результаты анализа, например мертиолят, ароматические аминокислоты и т.д.

Методика определения. В центрифужную пробирку вносят 1 мл препарата, содержащего 100 - 300 мкг белка, прибавляют 1 мл 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты и перемешивают. Пробу оставляют на 18 - 20 ч при температуре 4 - 8 °С. Осадок отделяют центрифугированием при частоте вращения 2000 об./мин. при температуре 5 °С в течение 30 мин., промывают 1 мл 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты и вновь центрифугируют в тех же условиях. Осадок растворяют в 0,2 мл раствора натрия гидроксида концентрации 0,1 моль/л, доводят объем раствора водой до 1 мл. К 0,5 мл полученного раствора, содержащего 50 - 150 мкг белка, прибавляют 0,5 мл воды, перемешивают и прибавляют 5 мл реактива С. Содержимое пробирок перемешивают и оставляют при температуре 18 - 20 °С на 10 мин. Затем прибавляют 0,5 мл реактива Фолина и перемешивают. Через 30 мин. измеряют оптическую плотность проб на спектрофотометре или фотоэлектроколориметре в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 750 нм по сравнению с контрольной пробой, содержащей 0,1 мл раствора натрия гидроксида концентрации 0,1 моль/л, 0,9 мл дистиллированной воды, 5 мл реактива С и 0,5 мл реактива Фолина. Содержание белка рассчитывают по калибровочному графику. Калибровочный график воспроизводят при каждом анализе.

Примечания.

1. Построение калибровочного графика, приготовление реактива Фолина и реактива С проводят в соответствии с разделом 17.1.

2. Приготовление 10 и 20%-ного растворов трихлоруксусной кислоты проводят в соответствии с разделом 14.1.1.

В целях унификации методов контроля биологических препаратов целесообразно использовать один метод для оценки химических показателей в однотипных препаратах.

В частности, для определения белка в препаратах с высоким его содержанием (9 - 15%, сыворотки, иммуноглобулины) рекомендуется метод определения белка с биуретовым реактивом, отличающийся простотой, доступностью и наименьшей погрешностью.

При низком содержании белка в препаратах (менее 0,1%), а также в присутствии других азотсодержащих компонентов целесообразно использовать методы с предварительным осаждением белка трихлоруксусной кислотой - метод с реактивом Несслера или метод Лоури.

В очищенных белковых препаратах, как правило, используется метод Лоури без предварительного осаждения белка.

18. Определение аминного азота формольным титрованием

Принцип метода основан на блокировании формальдегидом при pH 7,0 свободных аминогрупп и титровании щелочью эквивалентного количества карбоксильных групп. Начало и конец титрования определяют потенциометрически.

Методика определения. В стакан, вместимостью 50 мл, наливают необходимый объем (А) анализируемого раствора препарата, содержащего 1,5 - 5,0 мг аминного азота, и доводят общий объем дистиллированной водой до 20 мл. Электроды потенциометра погружают в исследуемый раствор, pH которого доводят до 7,0 с помощью раствора натрия гидроксида концентрации 0,1 моль/л. Во время определения электроды должны все время оставаться погруженными в раствор. К нейтрализованному раствору добавляют 2 мл нейтрального формалина (pH которого перед каждым определением доводят до 7,0 10%-ным раствором натрия гидроксида), перемешивают и,

не вынимая электродов, титруют содержимое раствором натрия гидроксида концентрации 0,1 моль/л до pH 9,1. При титровании следует использовать бюретку, вместимостью 5 мл. Проводят три параллельных измерения.

Содержание аминного азота в исследуемом препарате в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{V \cdot K \cdot 1{,}4 \cdot 100}{C}, \text{где}$$

V - количество раствора натрия гидроксида концентрации 0,1 моль/л, использованное на титрование испытуемой пробы, мл;

K - поправка к титру раствора натрия гидроксида концентрации 0,1 моль/л;

1,4 - количество аминного азота, эквивалентное 1 мл раствора натрия гидроксида концентрации 0,1 моль/л, мг;

C - анализируемая навеска сухого препарата, содержащаяся в титруемом объеме А, мг.

19. Определение сахаров с антроновым реактивом

Метод основан на способности углеводов после дегидратации образовывать производные фурфурола, которые дают цветную реакцию с антроном.

Методика определения. К 1 мл препарата, содержащего 10 - 50 мкг сахаров, предварительно охлажденного в бане со льдом, по стенке пробирки осторожно приливают 2 мл свежеприготовленного антронового реактива (0,2%-ный раствор антрона в концентрированной серной кислоте, х.ч.). Смесь хорошо перемешивают и нагревают в кипящей водяной бане в течение 15 мин., после чего охлаждают.

Оптическую плотность определяют в кювете толщиной слоя 10 мм на спектрофотометре при длине волны 625 нм по сравнению с контрольным раствором, содержащим 2 мл антронового реактива и 1 мл растворителя, используемого для приготовления исследуемого препарата.

По калибровочному графику находят содержание сахаров в препарате.

Калибровочный график. 0,01 г (точная навеска) глюкозы растворяют в мерной колбе, вместимостью 100 мл, в воде и доводят объем раствора водой до метки (0,01%-ный раствор). К 0,1 - 0,5 мл полученного раствора (10 - 50 мкг глюкозы) с интервалом 0,1 мл прибавляют воду соответственно до 1 мл. Далее анализ проводят, как указано выше.

Калибровочный график воспроизводят при каждом анализе.

20. Определение О-ацетильных групп

Метод основан на способности О-ацетильных групп образовывать с гидроксиламином в щелочной среде гидроксановую кислоту, которая дает цветную реакцию с ионами трехвалентного железа в кислой среде.

Метод рекомендован для анализа группоспецифических полисахаридов менингококковых и других полисахаридных вакцин.

Методика определения. К 1 мл исследуемого раствора, содержащего 1,5 - 2,5 мкмоля О-ацетильных групп (0,1%-ный раствор испытуемого препарата в воде), прибавляют 2 мл свежеприготовленного реактива 1, перемешивают и оставляют на 4 мин. при температуре 18 - 20 °С. Прибавляют 1 мл разведенной соляной кислоты, перемешивают, прибавляют 1 мл раствора железа (III) хлорида концентрации 0,37 моль/л, перемешивают и оставляют на 15 мин.

Оптическую плотность измеряют на фотоэлектроколориметре или спектрофотометре при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм по сравнению с контрольным раствором, содержащим 1 мл воды и указанные выше реактивы, добавленные в той же последовательности.

По калибровочному графику определяют количество микромолей О-ацетильных групп на 1 мг полисахарида с учетом содержания влаги в препарате.

Калибровочный график. Растворяют 0,136 г (точная навеска) ацетилхолина йодистого в мерной колбе, вместимостью 100 мл, в растворе натрия ацетата концентрации 0,001 моль/л и доводят общий объем раствора тем же растворителем до метки (5 мкмоль О-ацетильных групп в 1 мл). К 0,1 - 0,6 мл полученного раствора (0,5 - 3,0 мкмоля О-ацетильных групп) с интервалом 0,1 мл прибавляют воду соответственно до 1 мл и далее проводят анализ, как указано выше.

Калибровочный график воспроизводят при каждом анализе.

Примечания.

1. Приготовление реактива 1. Смешивают равные объемы раствора гидроксиламина концентрации 2 моль/л и раствора натрия гидроксида концентрации 3,5 моль/л.

2. Приготовление раствора гидроксиламина концентрации 2 моль/л. Растворяют 69,5 г (точная навеска) гидроксиламина солянокислого (х.ч.) в мерной колбе, вместимостью 500 мл, и доводят объем водой до метки. Раствор хранят при температуре 4 - 8 °С в течение 1 мес.

3. Приготовление раствора натрия гидроксида концентрации 3,5 моль/л. Растворяют 70,0 г натрия гидроксида (х.ч.) в воде в мерной колбе, вместимостью 500 мл, и доводят объем раствора водой до метки.

4. Приготовление разведенной соляной кислоты. Смешивают один объем концентрированной соляной кислоты (х.ч.) с двумя объемами воды.

5. Приготовление раствора железа (III) хлорида концентрации 0,37 моль/л. Растворяют 50,0 г железа (III) хлорида водного (х.ч.) в растворе соляной кислоты концентрации 0,1 моль/л в мерной колбе, вместимостью 500 мл, и доводят объем раствора тем же растворителем до метки.

6. Приготовление раствора натрия ацетата концентрации 0,001 моль/л. Растворяют 0,068 г натрия ацетата трехводного (х.ч.) в воде в мерной колбе, вместимостью 500 мл, и доводят объем раствора водой до метки. Устанавливают в растворе pH 4,5 с помощью раствора уксусной кислоты концентрации 1 моль/л.

21. Определение фосфора

Метод основан на способности неорганического фосфора в кислой среде образовывать с молибденовой кислотой фосфорно-молибденовую кислоту, которая в присутствии аскорбиновой кислоты дает цветную реакцию.

Метод рекомендован для химических вакцин.

Методика определения. В пробирку из тугоплавкого стекла 200 х 20 мм вносят 1 мл раствора препарата, содержащего 40 - 50 мкг фосфора. Пробу помещают в сушильный шкаф при температуре 100 - 110 °С до полного удаления влаги, не допуская обугливания препарата, и прибавляют 0,2 мл концентрированной серной кислоты (х.ч.). Пробирку закрывают стеклянным колпачком и пробу минерализуют на песочной бане до появления белых паров. Для ускорения минерализации используют пергидроль, который периодически прибавляют в предварительно охлажденные пробирки по 1 - 2 капли. После обесцвечивания раствора и появления белых паров продолжают минерализацию в течение 1 ч. Одновременно в аналогичных условиях выпаривают и минерализуют контрольную пробу, содержащую 1 мл воды.

Содержимое каждой пробирки охлаждают, количественно переносят в мерную колбу, вместимостью 25 мл, смывая 4 - 5 раз порциями воды по 4 - 5 мл, и доводят объем водой до метки. В пробирку с притертой пробкой вносят 4 мл полученного раствора и 4 мл реактива, перемешивают и выдерживают в течение 1 ч в водяной бане при температуре 37 °С. Измеряют оптическую плотность охлажденных образцов на фотоэлектроколориметре марки КРК-3 при длине волны 750 нм в кювете с толщиной слоя 5 мм по сравнению с контрольным раствором, приготовленным аналогичным образом из контрольной пробы. Содержание фосфора в 1 мл исследуемого образца в микрограммах (X) вычисляют по формуле:

$$X = a \times 25, \text{ где}$$

a - количество фосфора, найденное по калибровочному графику, мкг;

25 - разведение исследуемого образца.

Калибровочный график. 0,3509 г калия дигидрофосфата (х.ч.), доведенного до постоянной массы в эксикаторе над безводным кальция хлоридом, помещают в мерную колбу, вместимостью 1 л, прибавляют 700 - 800 мл воды, 20 мл раствора серной кислоты концентрации 0,05 моль/л и доводят объем водой до метки (80 мкг фосфора в 1 мл).

Отбирают в мерные колбы, вместимостью 100 мл, от 1 до 4 мл полученного раствора с интервалом 0,5 мл (0,8 - 3,2 мкг фосфора). Прибавляют 70 - 80 мл воды, 0,2 мл раствора серной кислоты концентрации 0,05 моль/л и доводят объем водой до метки. Пробы колориметрируют, как описано выше, по сравнению с контрольным раствором, содержащим 99,8 мл воды и 0,2 мл раствора серной кислоты концентрации 0,05 моль/л.

Калибровочный график **воспроизводят при каждом анализе.**

Примечания.

1. Приготовление раствора серной кислоты концентрации 3 моль/л. В мерную колбу, вместимостью 1 л, приливают 600 - 700 мл воды, 167,4 мл концентрированной серной кислоты и доводят объем водой до метки.

2. Приготовление 2,5%-ного раствора аммония молибдата. Растворяют 25 г аммония молибдата в колбе, содержащей 700 мл кипящей воды, при помешивании. Раствор оставляют при температуре 18 - 25 °С на сутки, переносят количественно в мерную колбу, вместимостью 1 л, и доводят объем водой до метки. Раствор фильтруют через два слоя фильтровальной бумаги и сохраняют в склянке из темного стекла с притертой пробкой.

3. Приготовление 10%-ного раствора аскорбиновой кислоты. Растворяют 2 г аскорбиновой кислоты в воде в мерном цилиндре и доводят объем раствора водой до 20 мл. Раствор готовят в день проведения анализа.

4. Приготовление реактива. Смешивают один объем раствора серной кислоты концентрации 3 моль/л, два объема воды, один объем 2,5%-ного раствора аммония молибдата и один объем 10%-ного раствора аскорбиновой кислоты. Все реактивы прибавляют при помешивании. Реактив готовят в день проведения анализа.

22. Определение нуклеиновых кислот по методу Спирина

Метод основан на измерении разности показателей оптической плотности гидролизатов **препарата**, характеризующей содержание фосфора нуклеиновых кислот.

Методика определения. К 1 мл препарата (15 - 35 мкг нуклеиновых кислот) прибавляют 5 мл 0,5 моль/л раствора хлорной кислоты. Смесь нагревают в кипящей водяной бане в течение 20 мин. После охлаждения пробы центрифугируют в течение 20 мин. при 2000 об./мин. Измеряют оптическую плотность надосадочной жидкости на спектрофотометре в кювете толщиной слоя 10 мм при двух длинах волн: 270 нм и 290 нм по сравнению с контрольным раствором, которым служит раствор хлорной кислоты концентрации 0,5 моль/л.

Содержание нуклеиновых кислот в микрограммах на 1 мл (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D_{270} - D_{290}}{0{,}19} \cdot 10{,}3 \cdot 6, \textit{где}$$

D_{270} и D_{290} - значения оптической плотности при соответствующей длине волны;

0,19 - удельная экстинкция;

10,3 - коэффициент пересчета количества фосфора на нуклеиновые кислоты;

6 - разведение препарата.

Примечание.

Метод применим при выполнении условия: D270 и D290 - не должны отличаться более чем на 15%.

23. Определение однородности сывороточных препаратов методом электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы

Метод основан на различной скорости перемещения белков в электрическом поле в зависимости от соотношения основных и кислотных групп белка, pH и ионной силы буферного раствора. Метод рекомендован для препаратов иммуноглобулина.

Методика определения. На увлажненные пленки размером 90 х 90 мм, заправленные в специальные рамки, наносят исследуемые препараты дозирующим устройством (2 - 4 мкл). Одновременно для идентификации фракций наносят контрольный образец - плацентарную или донорскую сыворотку. Предварительно в электродные секции камеры (аппарат для электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы) наливают барбиталовый буферный раствор (100 мл) до риски, обозначенной на камере.

В камеру помещают две рамки так, чтобы линии нанесения препаратов находились ближе к катоду, а не к краю рамки. Затем разделительную камеру закрывают крышкой, включают источник питания (сила тока 8 - 10 мА, напряжение 100 - 120 В). Разделение проводят 30 - 40 мин. По истечении этого времени прибор выключают и снимают крышку разделительной камеры, при этом конденсационная вода не должна попадать на пленки. Рамки с пленками извлекают из камеры и дают подсохнуть на воздухе. Пленки вынимают из рамок пинцетом, избегая контакта с участками, где проходил электрофорез препаратов.

Пленки отрезают с обоих концов (около 2,5 мм) и помещают в кювету с 50 мл раствора красителя, выдерживают в течение 5 мин. (не более, т.к. пленка сморщивается). С уменьшением концентрации красителя время окраски можно увеличить до 10 мин. Пленку вынимают из кюветы и после стекания избыточной жидкости помещают на 5 мин. поочередно в три кюветы, которые содержат по 100 мл отмывочной смеси. Покачивание кюветы ускоряет процесс отмывки. Фон пленки после отмывки должен быть белым. После чего пленку тщательно промывают водой и сушат между листами фильтровальной бумаги, слегка промокая.

Идентификацию белковых фракций препарата проводят путем сравнения его электрофореграммы с электрофореграммой нормальной сыворотки, полученной при том же разделении. Сыворотка должна разделиться не менее чем на 5 фракций: альбумин, альфа 1 и альфа 2-глобулины, бета-глобулин и гамма-глобулин, считая от анодного конца пленки. В случае неоднородности препарата проводят количественное определение примесей путем извлечения краски из пленки элюирующим раствором с последующим колориметрированием или путем денситометрирования электрофореграмм.

а) Обработка электрофореграмм путем извлечения краски из пленок и колориметрического определения фракций. Извлечение краски отдельных фракций проводят в 3 мл элюирующего раствора с 2-х параллельных электрофореграмм. Элюцию проводят в течение 40 мин. при многократном встряхивании. Оптическую плотность элюата измеряют на спектрофотометре при длине волны 620 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм по отношению к элюату неокрашенного участка электрофореграммы. Сумму оптических плотностей фракций принимают за 100% и определяют, какой процент по отношению к ней составляет оптическая плотность каждой фракции.

б) Обработка электрофореграмм при помощи денситометра. Электрофореграммы препаратов высушивают между листами фильтровальной бумаги в полиэтиленовом пакетике. Эти условия высушивания исключают сморщивание пленки. Высушенные пленки просветляют вазелиновым маслом. Пропитывают пленки вазелиновым маслом таким образом, чтобы в пленке не остались пузырьки воздуха. Пленку держат горизонтально и нижней поверхностью осторожно касаются масла. Избыток вазелинового масла удаляют, промокая пленки между двумя листами фильтровальной бумаги.

Просветленные полосы вставляют в денситометр так, чтобы против щели находился неокрашенный участок. Писчик денситометра устанавливают на нуль, после чего включают протягивающее и записывающее устройство. Записанную денситометром кривую делят на ряд участков, соответствующих отдельным фракциям. Величина площади каждого пика пропорциональна количеству краски, соединившейся с белком. Соотношение между этими фракциями вычисляют по формуле площади прямоугольника (h x d, где h - максимальная высота пика, d - ширина пика, измеренная на уровне 1/2 высоты). Общую площадь прямоугольников принимают за 100% и вычисляют, какой процент по отношению к ней составляет площадь каждого прямоугольника.

Примечания.

1. Подготовка пленки. Пленки смачивают в барбиталовом буферном растворе. Для этого пленку гладкой стороной помещают в кювету на поверхность буферного раствора на 2 мин., после чего ее погружают пинцетом на дно кюветы и выдерживают в течение 5 мин. Пленку вынимают пинцетом, избыток влаги удаляют, промокнув ее между двумя листами фильтровальной бумаги. На увлажненной пленке с матовой стороны формируют стартовые канавки (вдоль волокон), используя специальное устройство.

Аналогичные операции проводят со второй пленкой. Пленки заправляют в рамки, избегая неравномерного натяжения и провисания.

2. Подготовка препаратов. Исследуемые препараты наносят на пленку дозирующим устройством. Предварительно эти препараты, подкрашенные бромфеноловым синим, заливают в каждую лунку лотка (краситель позволяет контролировать нанесение проб дозаторами и продвижение фракций).

3. Приготовление барбиталового буферного раствора (pH 8,4). 8,5 г барбитал-натрия помещают в мерную колбу, вместимостью 1 л. Навеску растворяют в 600 - 700 мл воды, прибавляют 11 мл соляной кислоты концентрации 1 моль/л и объем раствора доводят водой до метки.

4. Приготовление раствора соляной кислоты концентрации 1 моль/л.

85 мл концентрированной соляной кислоты помещают в мерную колбу, вместимостью 1 л. Объем раствора доводят водой до метки.

5. Приготовление красителя. К 0,5 г амидочерного 10Б (импортный) прибавляют 10 мл ледяной уксусной кислоты, 3 г трихлоруксусной кислоты и 90 мл спирта. Смесь для насыщения оставляют на 24 ч, периодически встряхивают. Раствор фильтруют.

6. Приготовление раствора для отмывки электрофореграмм. К 40 мл концентрированной уксусной кислоты прибавляют 700 мл воды, перемешивают. Затем объем раствора доводят водой до 1 л в мерном цилиндре.

7. Приготовление элюирующего раствора. 5 объемов раствора натрия гидроксида концентрации 1 моль/л смешивают с 0.5 объемами раствора трилона В концентрации 0,1 моль/л.

8. Приготовление раствора трилона Б концентрации 0,1 моль/л. 37,22 г трилона Б растворяют в 700 мл воды, перемешивают. Затем объем раствора доводят водой до 1 л в мерной колбе.

9. Приготовление раствора натрия гидроксида концентрации 1 моль/л. 40,0 г натрия гидроксида растворяют в 700 мл воды в фарфоровом стакане, после охлаждения раствор перемешивают, переливают в мерную колбу, вместимостью 1 л, и объем раствора доводят водой до метки.

24. Определение антигенного состава сывороточных препаратов методом иммуноэлектрофореза

Метод основан на способности заряженных частиц к перемещению в агаром геле или на пленках из ацетата целлюлозы в электрическом поле. В последующем проводят анализ полученных фракций методом двойной диффузии в агаре или на пленке. Антисыворотку вносят в траншею, расположенную параллельно направлению электрофоретического разделения белковых фракций. При встрече антигена с антителом образуются линии преципитации. По количеству этих линий судят о чистоте препарата. Метод рекомендован для препаратов иммуноглобулина.

24.1. Методика иммуноэлектрофореза в агаре

Методика определения. На стеклянную пластину размером 120 х 90 мм наливают 18 - 20 мл расплавленного агара концентрации 1,25%, чтобы получился слой толщиной 2 - 3 мм. После застывания агарового геля вырезают лунки, используя для этого специальный штамп (рис. 1 - не приводится).

Препараты вносят в лунки при помощи тонко оттянутого капилляра. В одну из лунок вносят нормальную сыворотку.

В электродные камеры наливают барбиталовый буферный раствор (pH 8,2). Пластинки с агаровым гелем помещают в аппарат для электрофореза. На оба конца пластинок помещают полоски хроматографической или фильтровальной бумаги размером 120 х 60 мм, сложенной в 5 - 6 слоев, которые соединяют с электродными камерами. Электрофорез проводят при силе тока 10 мА и напряжении 100 В в течение 1,0 - 1,5 ч.

После проведения электрофореза между лунками в агаровом геле вырезают траншеи и вносят в них антисыворотку, преципитирующую сывороточные белки. Пластинку помещают во влажную камеру, в которую ставят бюкс с водой и несколькими кристалликами фенола, через 24 - 48 ч пластинку вынимают из влажной камеры, погружают в кювету с 0,9%-ным раствором натрия хлорида (консервант - несколько кристалликов фенола) и отмывают в течение 2 - 3 сут. от белка, не принявшего участие в образовании преципитата. Раствор меняют 3 - 4 раза в сутки.

Отмытые пластинки высушивают на воздухе. Для равномерного высушивания пластинки с агаровым гелем накрывают фильтровальной бумагой, бумагу над лунками и траншеями прокалывают иглой. Чтобы ускорить процесс высушивания, можно использовать вентилятор. После высушивания пластинки бумагу смачивают водой и удаляют.

Пластинки с высушенным агаровым гелем окрашивают в течение 2 ч в растворе красителя.

Оценивают локализацию и число линий преципитации препаратов иммуноглобулинов относительно линий преципитации сыворотки крови, которая должна проявлять не менее 15 линий преципитации с антисывороткой. Оценку качества каждой новой серии антисыворотки проводят со стандартным образцом тест-системы для определения антигенного состава препаратов из сыворотки крови человека методом иммуноэлектрофореза.

Примечания.

1. Приготовление 1,25%-ного агарового геля. 12,5 г агара помещают в химический стакан, вместимостью 1 л, приливают 500 мл воды и оставляют для набухания геля в течение часа при температуре 18 - 20 °С. Стакан с содержимым помещают в кипящую водяную баню и выдерживают до полного расплавления агара. Объем раствора геля доводят водой до 500 мл и затем добавляют равный объем барбиталового буферного раствора (pH 8,2) (концентрацию соли и кислоты, указанную в п. 2 следует увеличить в 2 раза). Раствор агара фильтруют через марлю (2 - 3 слоя), прибавляют мертиолят до концентрации 100 мкг/мл и разливают во флаконы по 40 - 50 мл (количество, необходимое на две пластинки). Расплавленный агар должен быть прозрачным.

Рекомендуется использовать отечественный агар высокоочищенный (ВФС 42-90 ВС-87), а также агар иностранных фирм (например, агар Дифко).

2. Приготовление барбиталового буферного раствора (pH 8,2). 47,6 барбитал-натрия и 69 мл соляной кислоты концентрации 1 моль/л растворяют в 4,3 л воды.

3. Обработка стеклянных пластинок. На стеклянные пластинки (лучше использовать фотопластинки), обработанные хромовой смесью, наносят несколько капель расплавленного 1,25%-ного агара и растирают тонким слоем (чтобы агаровый гель лучше прилипал к стеклу). Пластинку высушивают при температуре 75 - 80 °С.

4. Приготовление пластинок с агаровым гелем. Стеклянные пластинки помещают на горизонтальную поверхность и наливают расплавленный при температуре 60 - 80 °С 1,25%-ный агар осторожно, без образования пузырьков воздуха.

В геле вырезают лунки для анализируемых проб, а после проведения электрофореза - траншеи для преципитирующей иммунной сыворотки (рис. 1 - не приводится).

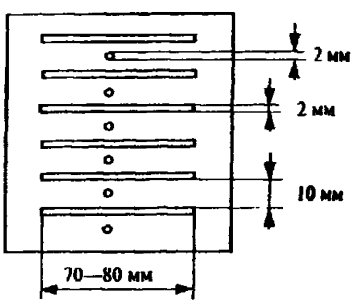

Рис. 1. Схема пластинки для иммуноэлектрофореза.

Траншеи вырезают специальным резцом, лунки для антигена вырезают поперечно-срезанным концом пастеровской пипетки. Лунки и траншеи можно вырезать, положив пластинку на бумагу с нанесенным рисунком, или используют специальный штамп (коробочка со съемной металлической крышкой, на которой вырезаны траншеи и лунки).

5. Состав красителя: амидочерный 10Б - 1,0 г, 450 мл раствора уксусной кислоты концентрации 0,1 моль/л, 550 мл раствора натрия ацетата концентрации 0,1 моль/л.

6. Приготовление 2%-ного раствора уксусной кислоты. 20 мл ледяной уксусной кислоты вносят в мерный цилиндр, вместимостью 1 л, объем раствора доводят водой до метки.

24.2. Метод иммуноэлектрофореза на пленках из ацетата целлюлозы

Методика определения. На увлажненной буферным раствором пленке из ацетата целлюлозы формируют стартовые канавки и продольные траншеи, используя для этого специальное устройство (штамп). На пленку наносят препараты, проводят электрофорез, как указано в методике 23 («Определение однородности сывороточных препаратов методом электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы»). После проведения электрофореза по линии траншей помещают узкие полоски (1 х 4,5 мм) фильтровальной бумаги, пропитанные антисывороткой. Пленку на рамке оставляют во влажной камере в течение 24 ч, после чего пленку 3 - 4 раза отмывают от избытка антисыворотки 0,9%-ным раствором натрия хлорида. Пленку окрашивают красителем, промывают, высушивают, просветляют в вазелиновом масле и оценивают результаты, как указано в методике (23, 24).

Для окрашивания линий преципитации, помимо красителя амидочерного 10Б, можно использовать 1%-ный раствор фуксина кислого в растворе уксусной кислоты концентрации 2 моль/л. Время выдерживания пленки с красителем составляет 3 - 5 мин. Избыток красителя отмывают в растворе уксусной кислоты концентрации 1 моль/л.

Примечание.

Приготовление красителя на основе фуксина кислого. К 1 г фуксина кислого прибавляют 10 мл ледяной уксусной кислоты, 3 г трихлоруксусной кислоты и 90 мл спирта. Смесь для насыщения оставляют на 24 ч, периодически встряхивают.

25. Определение агрегатов и фрагментов в препаратах иммуноглобулина методом гель-фильтрации

Метод гель-фильтрации основан на разделении препарата на фракции в зависимости от размера и молекулярной массы белковых компонентов, входящих в его состав.

Препараты иммуноглобулинов фракционируют на хроматографической колонке с сефадексом G-200 или на ультрагеле АсА-34 и определяют процентное содержание следующих фракций: полимеров, димеров, мономеров, фрагментов.

Методика определения. Для проведения анализа рекомендуется использовать комплекс оборудования, включающий: холодильную камеру, коллектор фракций, анализатор с проточной кюветой (увикорд), самописец и перистальтический насос. В колонку 100 х 2,5 см с сефадексом G-200 или ультрагелем АсА-34 вносят 1 - 3 мл 5%-ного раствора иммуноглобулина. До концентрации 5% препарат разводят трис-буферным раствором (pH 8,0 - 8,2). Фракционирование препарата проводят в течение 12 - 14 ч со скоростью 15 - 20 мл/ч. Объем жидкости в каждой пробирке должен составлять 5 - 7 мл.

При отсутствии автоматической системы измеряют оптическую плотность содержимого каждой пробирки на спектрофотометре при длине волны 280 нм в кювете толщиной слоя 10 мм. Распределение белковых фракций выражают графически. Сливают в отдельные емкости содержимое пробирок, соответствующих каждой фракции препарата, измеряют их объем и определяют оптическую плотность. Делают разведение фракций препарата, если показатель величины оптической плотности превышает оптимальную зону работы прибора. Рассчитывают суммарную оптическую плотность (Э) для каждой фракции препарата по формуле:

$$X = \frac{D_{270} - D_{290}}{0{,}19} \cdot 10{,}3 \cdot 6, \text{где}$$

D_{280} - оптическая плотность фракции;
V_x - объем фракции;
P_x - разведение фракции.

Сумму оптической плотности всех фракций принимают за 100%. Вычисляют процентное содержание каждой фракции в препарате по отношению к полученной сумме.

Для установления последовательности выхода каждой фракции препарата и нахождения молекулярной массы проводят калибрование колонки с гелем по стандартным белкам-калибрантам: ферритину (молекулярная масса - М.м. - 440000), каталазе (М.м. - 232000), альдолазе (М.м. - 158000), бычьему сывороточному альбумину (БСА, М.м. - 67000), овальбумину (М.м. - 43000). Объем раствора стандартного белка, наносимого на колонку, должен составлять 1 - 2% от общего объема колонки. Раствор ферритина готовят в концентрации 1 мг/мл, а растворы каталазы, альдолазы, БСА и овальбумина готовят в концентрации 5 - 10 мг/мл.

Измеряют объем выхода (V_e) каждого калибранта. Вычисляют общий объем колонки с гелем (V_t) по формуле:

$$V_t = \pi r^2 h, \text{где}$$
$$\pi = 3{,}14,\ r = 1{,}25 \text{ см},$$

h - высота столба геля, см.

Рассчитывают значение коэффициента распределения (Kav) для каждого белка по формуле:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}, \text{где}$$

V_e - объем выхода фракции калибранта, мл;

V_o - свободный объем, равный объему выхода фракции голубого декстрана, мл;

V_t - общий объем колонки с гелем, мл.

Строят график зависимости коэффициента распределения (Kav) от десятичного логарифма (lg) молекулярной массы каждого калибранта.

Примечания.

1. Приготовление геля сефадекса G-200. 18 - 20 г сефадекса G-200 помещают в химический стакан или цилиндр с водой (800 - 1000 мл) и оставляют набухать при температуре 18 - 22 °С в течение 3-х сут. После этого проводят декантацию надосадочной жидкости. Наливают новую порцию воды, содержимое стакана осторожно перемешивают стеклянной палочкой и оставляют для оседания геля. Декантацию проводят до тех пор, пока в надосадочной жидкости не останется мелких частиц геля, которые могут закупорить колонку. Измеряют высоту столба полностью осевшего геля и наносят метку на уровне, на половину превышающем высоту осадка геля сефадекса G-200. Удаляют жидкость до метки. Содержимое осторожно перемешивают стеклянной палочкой до получения гомогенной суспензии, которую полностью выливают в хроматографическую колонку с воронкой.

2. Приготовление геля сефадекса G-25. 1,0 - 1,5 г сефадекса G-25 помещают в пробирку с 8 - 10 мл воды и оставляют набухать при температуре 18 - 22 °С в течение 3,0 - 3,5 ч. После этого проводят операции, аналогичные приготовлению сефадекса S-200.

3. Приготовление суспензии ультрагеля АсА-34. 400 мл ультрагеля АсА-34 помещают в химический стакан или цилиндр, вместимостью 1000 мл, добавляют 160 мл трис-буферного раствора, составляющего 40% от объема геля, осторожно перемешивают содержимое стеклянной палочкой до получения однородной суспензии. Рекомендуется удалять под вакуумом растворенный газ из полученной суспензии.

4. Приготовление трис-буферного раствора (pH 8,0 - 8,2). В цилиндр, вместимостью 1000 мл, наливают 200 - 300 мл воды и помещают 6,06 г трис-(оксиметил)-аминометана и 58,5 г натрия хлорида, перемешивают и прибавляют 275 мл раствора соляной кислоты концентрации 0,1 моль/л. После растворения реактивов объем раствора доводят водой до метки. Буферный раствор фильтруют и хранят при температуре 4 - 8 °С.

5. Заполнение колонки. Колонку закрепляют в вертикальном положении и закрывают нижнее отверстие. В верхнее отверстие колонки вставляют воронку с притертым шлифом или резервуар

с насадкой. Всю подготовленную гомогенную суспензию гель-сефадекса или ультрагеля по стеклянной палочке выливают в колонку. После того, как осевшие частицы геля образуют слой высотой 5 - 10 см, открывают нижнее отверстие колонки. Продолжают заполнять колонку до тех пор, пока высота сформировавшегося столба не составит 75 - 95 см. Закрывают нижнее отверстие колонки (при работе с гелем сефадекса G-200 наслаивают слой сефадекса G-25 высотой 5 - 7 мм). Соединяют верхнее отверстие колонки с резервуаром буферного раствора, открывают нижнее отверстие и промывают ее 2 - 3-кратным объемом буферного раствора. Высота резервуара с буферным раствором по отношению к уровню выхода капли жидкости из колонки не должна превышать 250 - 300 мм. При наличии перистальтического насоса данное требование не соблюдают.

6. Внесение вещества в колонку. Удаляют жидкость над столбом геля путем отсасывания или открывают нижнее отверстие колонки. Наслаивают исследуемое вещество пипеткой по стенке колонки, при этом нижнее отверстие колонки должно быть закрыто. Соединяют нижнее отверстие колонки с коллектором фракций или с автоматической системой для гель-фильтрации. Открывают нижнее отверстие колонки, включают автоматическую систему или коллектор фракций. Дают возможность исследуемому веществу впитаться в верхний слой геля. Закрывают нижнее отверстие колонки и промывают буферным раствором верхнюю часть колонки, осторожно наслаивая его по 4 - 5 мл 2 - 3 раза на поверхность геля. Операция внесения препарата в колонку значительно упрощается при наличии адаптеров. При помощи перистальтического насоса вещество по соединительной трубке поступает непосредственно в колонку.

7. Проверка правильности заполнения колонки. Определение правильности заполненной колонки проводят с помощью свежеприготовленного 0,2%-ного раствора. 8 - 10 мг голубого декстрана (молекулярная масса 2 х 10^6) растворяют в 4 - 5 мл буферного раствора, вносят в колонку и проводят гель-фильтрацию, как указано выше. Качество заполнения колонки оценивают по графическому изображению фракции голубого декстрана. Пик фракций должен начинаться под углом 93 - 98° и заканчиваться прямой линией, в противном случае колонку следует заполнить заново. Проверку правильности заполненной колонки проводят каждый раз при новом ее заполнении.

8. Определение свободного объема (Vo) колонки. Свободный объем равен объему жидкости, собранной с момента внесения вещества в колонку до появления пика фракции, соответствующей максимуму элюции голубого декстрана.

9. Хранение геля в колонке. Через колонку, заполненную гелем, пропускают трис-буферный раствор, содержащий 0,02%-ный раствор натрия азида, со скоростью 10 - 12 мл/ч, закрывают верхнее и нижнее отверстия колонки и хранят ее при постоянной температуре. Перед использованием вновь хроматографическую колонку промывают 2 - 3-кратным объемом буферного раствора.

26. Определение агрегатов в препаратах иммуноглобулина с применением полиэтиленгликоля

Метод основан на способности полиэтиленгликоля с молекулярной массой 4000 и 6000 осаждать агрегаты (полимеры) из препаратов иммуноглобулинов.

Метод может быть использован для определения агрегатов (полимеров) в полуфабрикатах препаратов иммуноглобулинов.

Методика определения. Иммуноглобулин разводят до 1%-ной концентрации боратным буферным раствором pH 8,0. К 1 мл полученного раствора добавляют 2 мл 7%-ного раствора полиэтиленгликоля с молекулярной массой 4000 или 4,7%-ного раствора с молекулярной массой 6000. Пробы оставляют на 2 ч при температуре (20 +/- 5) °С. Осадок отделяют центрифугированием в течение 40 мин. при 3500 - 4000 об./мин. при температуре 4 - 8 °С. Центрифугат удаляют, осадок растворяют в 3 мл 0,09 моль/л раствора натрия гидроксида и перемешивают. Измеряют оптическую плотность опытной пробы на спектрофотометре при длине волны 280 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм против раствора, содержащего 0,5 мл боратного буферного раствора и 14,5 мл 0,1 моль/л раствора натрия гидроксида. Одновременно готовят раствор контрольной пробы: к 0,5 мл 1%-ного раствора иммуноглобулина добавляют 14,5 мл 0,1 моль/л раствора натрия гидроксида. Измеряют оптическую плотность контрольной пробы, как описано выше, по сравнению с раствором, содержащим 0,5 мл боратного буферного раствора и 14,5 мл 0,1 моль/л раствора натрия гидроксида.

Содержание агрегатов (полимеров) в препаратах иммуноглобулина с учетом объема и разведения проб рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{D_{опыт} \cdot 3}{D_{контр} \cdot 30} \cdot 100 = \frac{D_{опыт} \cdot 10}{D_{контр}}, где$$

$D_{опыт}$ - оптическая плотность опытной пробы;
$D_{контр}$ - оптическая плотность контрольной пробы;
3 - разведение опытной пробы;
30 - разведение контрольной пробы.

Примечания.

1. Приготовление 1 моль/л раствора натрия гидроксида. 40 г натрия гидроксида помещают в фарфоровый стакан и растворяют в 500 мл дистиллированной воды, после растворения щелочи раствор переливают в мерную колбу, вместимостью 1000 мл, и доводят объем раствора водой до метки.

2. Приготовление 0,1 моль/л раствора натрия гидроксида. 100 мл 1 моль/л раствора натрия гидроксида наливают в мерную колбу, вместимостью 1000 мл, и доводят объем раствора водой до метки.

3. Приготовление 0,09 моль/л раствора натрия гидроксида. 90 мл 0,1 моль/л раствора натрия гидроксида наливают в мерную колбу, вместимостью 100 мл, и доводят объем раствора водой до метки.

4. Приготовление боратного буферного раствора pH 8,0: а) приготовление раствора N 1. 12,4 г борной кислоты помещают в мерную колбу, вместимостью 1000 мл, добавляют 100 мл 1 моль/л раствора натрия гидроксида, перемешивают и после растворения кислоты доводят объем раствора водой до метки; б) приготовление 0,1 моль/л раствора соляной кислоты. В мерную колбу, вместимостью 1000 мл, наливают 500 мл дистиллированной воды и 8,25 мл концентрированной соляной кислоты (пл - 1,185), осторожно перемешивают и доводят объем раствора водой до метки. Для приготовления 0,1 моль/л раствора соляной кислоты можно использовать растворы фиксаналов. В мерную колбу, вместимостью 1000 мл, наливают 350 мл раствора N 1 и 450 мл 0,1 моль/л раствора соляной кислоты, перемешивают и доводят объем раствора водой до метки, раствор имеет pH 8,0 +/- 0,1.

5. Приготовление 7%-ного раствора полиэтиленгликоля 4000. 7 г полиэтиленгликоля 4000 помещают в мерную колбу, вместимостью 100 мл, добавляют 50 мл боратного буферного раствора, перемешивают и после растворения доводят объем этим же раствором до метки.

6. Приготовление 4,7%-ного раствора полиэтиленгликоля 6000. 4,7 г полиэтиленгликоля 6000 помещают в мерную колбу, вместимостью 100 мл, добавляют 50 мл боратного буферного раствора, перемешивают и после растворения доводят объем этим же раствором до метки.

27. Определение молекулярных параметров полисахаридов

Молекулярные параметры полисахаридов оценивают методом гель-фильтрации на колонке с сефарозой 4В. Выход полисахарида в объеме элюата до Kd = 0,5 выражают в процентах по отношению к общему количеству полисахарида, вышедшему с колонки.

Метод рекомендован для менингококковых и других полисахаридных вакцин.

Методика определения. В колонку размером 90 х 1,5 см с сефарозой В вносят 1 мл 0,5%-ного раствора исследуемого препарата (раствор препарата готовят, используя буферный солевой раствор pH 7,4). Фракционирование препарата проводят со скоростью 15 - 20 мл/ч, используя для элюции буферный солевой раствор. Собирают фракции по 2 мл. Вычисляют объем элюата (Ve в мм) фракции, соответствующей Kd = 0,5 по формуле:

$$V_e = V_o + 0{,}5 \times (V_t - V_o), где$$

V_o - свободный объем колонки, мл;
V_t - общий объем колонки с гелем, мл;

0,5 - коэффициент распределения вещества (Kd) на колонке.

Фракции элюата объединяют в два пула. Первый пул включает фракции, начиная с той, которая соответствует Vo, до фракции, соответствующей Kd = 0,5. Второй пул включает последующие фракции до той, которая соответствует Vt. В каждом из пулов определяют содержание фосфора, используя для анализа 1 мл. Определение проводят по методу, изложенному в разделе «Определение фосфора», за исключением следующего: для анализа используют весь минерализат, объем которого доводят водой до 4 мл; для колориметрирования используют кюветы с толщиной слоя 5 мм. Содержание фосфора в обоих пулах принимают за 100%. Выход полисахарида в процентах в объеме элюата до Kd = 0,5 равен процентному содержанию фосфора в первом пуле.

Примечания.

1. Приготовление геля сефарозы 4В. 250 - 300 мл геля сефарозы 4В заливают 500 - 600 мл буферного солевого раствора (pH 7,4), перемешивают, переносят в цилиндр, вместимостью 1 л, и оставляют на 2 - 3 мин. для осаждения крупных частиц геля. Надосадочный слой переливают в другой цилиндр, а крупные частицы геля отбрасывают. Операцию повторяют 2 - 3 раза. Затем суспензию геля оставляют в цилиндре на 1,0 - 1,5 ч. Надосадочную жидкость с очень мелкими частицами геля удаляют декантацией. Операцию повторяют 2 - 3 раза, прибавляя 500 - 600 мл свежей порции буферного солевого раствора до тех пор, пока в надосадочной жидкости не останется мелких частиц геля.

2. Приготовление буферного солевого раствора (pH 7,4). Смешивают 250 мл раствора трис-(оксиметил)-аминометана (х.ч.) концентрации 0,1 моль/л. 200 мл раствора соляной кислоты (х.ч.) концентрации 0,1 моль/л и 550 мл воды. К 1 л смеси прибавляют 11,7 г натрия хлорида (х.ч.). Раствор имеет pH 7,4.

3. Заполнение колонки. Колонку закрепляют в вертикальном положении, закрывают нижнее отверстие и заполняют буферным солевым раствором до высоты 30 - 35 см. В верхнее отверстие колонки вставляют насадку с резервуаром. Весь приготовленный гель сефарозы вносят в резервуар, осторожно сливая его по стенке. Устанавливают уровень выхода капли из колонки на высоте 70 - 75 см от уровня геля в резервуаре и открывают нижнее отверстие. После того, как сформируется слой геля высотой 89 - 85 см, резервуар отсоединяют и колонку соединяют с резервуаром, заполненным буферным солевым раствором; промывают колонку 2 - 3 объемами буферного солевого раствора при том же рабочем давлении.

4. Внесение препарата в колонку. Препарат вносят в колонку, как указано в методике «Определение агрегатов и фрагментов в препаратах иммуноглобулина методом гель-фильтрации».

5. Проверка качества заполнения колонки. На колонку наносят 1 мл свежеприготовленного 0,5%-ного раствора голубого декстрана в буферном солевом растворе и проводят гель-фильтрацию, как указано в разделе 25. Измеряют оптическую плотность фракции на спектрофотометре при длине волны 280 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Правильность заполнения колонки оценивают по графическому изображению фракции голубого декстрана. Пик фракции должен начинаться под углом 93 - 98° и заканчиваться прямой линией.

6. Определение свободного объема (Vo) колонки. Vo определяют по объему выхода голубого декстрана. Vo равен объему элюата, собранному с момента внесения вещества в колонку до появления фракции, соответствующей максимуму пика при элюции голубого декстрана.

7. Определение общего объема (Vt) колонки. Vt определяют по объему выхода натрия азида. На колонку наносят 1 мл 1%-ного раствора натрия азида (импортного), приготовленного с использованием буферного солевого раствора. Гель-фильтрацию и анализ фракций проводят, как указано в разделе 25. Vt равен объему элюата, собранному с момента внесения вещества на колонку до появления фракции, соответствующей максимуму пика при элюции натрия азида.

28. Определение степени расщепления белковых препаратов по наличию низкомолекулярных фракций, неосаждаемых трихлоруксусной кислотой

Метод основан на определении низкомолекулярных белковых фракций по цветной реакции циклических аминокислот с реактивом Фолина. Содержание низкомолекулярных фракций выражают количеством тирозина. Метод предназначен для анализа антитоксических сывороток.

Методика определения. В центрифужную пробирку вносят 0,1 мл антитоксической сыворотки, добавляют 2,9 мл дистиллированной воды и 2,5 мл 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Пробы оставляют на 18 - 20 ч при 4 - 8 °С. Осадок отделяют центрифугированием при 2000 об./мин. при 5 °С в течение 30 - 40 мин. Прозрачную надосадочную жидкость осторожно сливают в чистую пробирку.

К 0,5 мл надосадочной жидкости добавляют 1,5 мл воды, 2 мл натрия гидроксида в концентрации 1 моль/л и 1 мл реактива Фолина (в разведении 1:3). Параллельно готовят контрольную пробу, содержащую все вышеуказанные реактивы, кроме надосадочной жидкости; в пробу добавляют 0,5 мл раствора ТХУ в концентрации 4,5%. Все пробы оставляют на 30 мин. и затем на спектрофотометре измеряют оптическую плотность испытуемых проб по отношению к контрольной пробе при длине волны 750 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм.

Содержание низкомолекулярных фракций выражают количеством тирозина в мг/мл и рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{a \cdot 5{,}5 \cdot 1{,}0}{0{,}5 \cdot 0{,}1 \cdot 1000} = \frac{a \cdot 110}{1000}, \text{ где}$$

а - количество тирозина, найденное по калибровочному графику, мкг;

0,5 - количество надосадочной жидкости, взятое для колориметрирования, мл;

5,5 - разведение исходного препарата при осаждении белка;

0,1 - количество препарата, взятое на осаждение белка, мл;

1,0 - пересчет тирозина на 1 мл препарата;

1000 - перевод мкг в мг.

Калибровочный график. 0,1 - 0,5 мл (с интервалом 0,1 мл) стандартного раствора помещают в пробирки. Объем проб доводят до 0,5 мл 4,5%-ным раствором ТХУ, добавляют 2 мл 1 моль/л раствора натрия гидроксида и 1 мл реактива Фолина (в разведении 1:3). Оптическую плотность проб измеряют на спектрофотометре против контрольной пробы, содержащей все реактивы, указанные выше, кроме стандартного раствора; в эту пробу добавляют 0,5 мл 4,5%-ного раствора ТХУ. Строят калибровочный график, откладывая на оси ординат соответствующие величины оптической плотности, а на оси абсцисс - количество тирозина (мкг).

Примечания.

1. Приготовление 10%-ного раствора ТХУ. К 10 мл 80%-ного раствора ТХУ добавляют 70 мл дистиллированной воды.

2. Приготовление 4,5%-ного раствора ТХУ. К 25 мл 10%-ного раствора ТХУ добавляют 30 мл воды.

3. Приготовление 80%-ного раствора ТХУ (см. раздел 14.1.1).

4. Приготовление 1 моль/л раствора натрия гидроксида. 40 г гранулированной щелочи растворяют в 500 мл воды и после охлаждения до комнатной температуры доводят общий объем раствора до 1 л. Раствор фильтруют через стеклянный фильтр N 2 и хранят в склянке, закрытой пробкой с хлоркальциевой трубкой.

5. Приготовление реактива Фолина (раздел 17.1). Возможно использование коммерческого реактива Фолина.

6. Приготовление стандартного раствора тирозина в концентрации 0,01%. 5 мг тирозина растворяют в растворе 4,5% ТХУ в мерной колбе, вместимостью 50 мл, и объем доводят этой же кислотой до метки.

7. Требование к тирозину. Показатель оптической плотности 0,01% раствора тирозина в 5 моль/л соляной кислоте должен быть 0,66 при длине волны 280 нм и 0,35 при длине волны 260 нм.

29. Определение примеси протеолитических ферментов в иммуноглобулинах

Метод основан на расщеплении пептидных связей субстрата протеолитическими ферментами, присутствующими в качестве примеси в препаратах иммуноглобулина.

Протеолитическую активность фермента выражают количеством тирозина, освобождающегося под действием ферментов.

Методика определения. К 1 мл препарата иммуноглобулина добавляют 1 мл денатурированного гемоглобина (субстрат). Одновременно готовят контрольные пробы: на субстрат К1 - 1 мл гемоглобина и 1 мл фосфатного буферного раствора рН 7,2; на иммуноглобулин К2 - 1 мл иммуноглобулина и 1 мл фосфатного буферного раствора рН 7,2.

Все пробы выдерживают при 37 °С в водяном термостате в течение 24 ч. Затем проводят осаждение белка 5%-ным раствором трихлоруксусной кислоты (ТХУ), добавляя его в количестве 2,5 мл. Одновременно проводят осаждение белка в контрольной пробе К: 1 мл препарата иммуноглобулина, 1 мл денатурированного гемоглобина и 2,5 мл 5%-ного раствора ТХУ.

Все пробы центрифугируют при 2000 об./мин. в течение 30 мин. при 5 °С. Надосадочную жидкость фильтруют через ватный тампон.

К 1 мл фильтрата добавляют 2 мл 0,5 моль/л раствора натрия гидроксида и 1 мл реактива Фолина в разведении 1:3, перемешивают и через 30 мин. измеряют оптическую плотность проб на спектрофотометре при длине волны 750 нм против контрольной пробы К.

Калибровочный график. Готовят стандартный раствор тирозина в концентрации 1 мг/мл (50 мг тирозина растворяют в мерной колбе, вместимостью 50 мл). 0,05, 0,1 - 0,6 мл стандартного раствора с интервалом 0,1 мл помещают в пробирки. Объем проб доводят раствором ТХУ (0,2 моль/л) до 1 мл, затем добавляют 2 мл 0,5 моль/л раствора натрия гидроксида и 1 мл реактива Фолина в разведении 1:3. Оптическую плотность испытуемых проб измеряют против контрольной пробы, содержащей все вышеуказанные реактивы, кроме стандартного раствора.

Рассчитывают количество тирозина в микрограммах на 1 мл иммуноглобулина (Х) по формуле:

$$X = (a - (K1 + K2)) \times 4,5, где$$

а - количество тирозина в опытной пробе, найденное по калибровочному графику, мкг;

$К_1$, $К_2$ - количество тирозина в контрольных пробах К1 и К2;

4,5 - общий объем проб после добавления ТХУ.

Строят калибровочный график, откладывая на оси абсцисс количество тирозина (мкг), а на оси ординат - соответствующие им величины оптической плотности.

Примечания.

1. Приготовление фосфатного буферного раствора рН 7,2.

1,250 г Na2HPO4 x 2H2O и 0,40 г KH2PO4 растворяют в дистиллированной воде и объем доводят водой до 1 л.

2. Приготовление денатурированного гемоглобина.

800 мг лиофильно высушенного гемоглобина растворяют в 10 мл 8 моль/л раствора мочевины. Выдерживают в течение 2 ч при 60 °С на водяной бане.

Раствор мочевины после охлаждения разводят в 4 раза фосфатным буферным раствором рН 7,2.

3. Приготовление реактива Фолина (раздел 17.1).

30. Определение содержания бычьего сывороточного альбумина методом ракетного иммуноэлектрофореза

Метод основан на способности антигена мигрировать в электрическом поле в гель, содержащий антисыворотку, в результате чего происходит реакция преципитации. Линия преципитации образует пик (ракету), высота которого пропорциональна концентрации внесенного антигена.

Методика предназначена для определения концентрации бычьего сывороточного альбумина (БСА) в диапазоне 0,5 - 2,0 мкг/мл.

Методика определения. В химическую пробирку с 16 мл расплавленного и охлажденного до температуры 56 °С 1%-ного геля агарозы вносят 16 мкл сыворотки против БСА с титром 1:1000 (или 32 мкл сыворотки с титром 1:500) и перемешивают. Содержимое пробирки выливают на стеклянную пластинку, установленную на горизонтальной поверхности. Пластина должна покрыться агарозовым гелем равномерно и полностью, толщина геля (1,0 +/- 0,1) мм. После засты-

вания геля агарозы пластинку накладывают на трафарет (рис. 2) и пробивают лунки пробойником диаметром 4 мм.

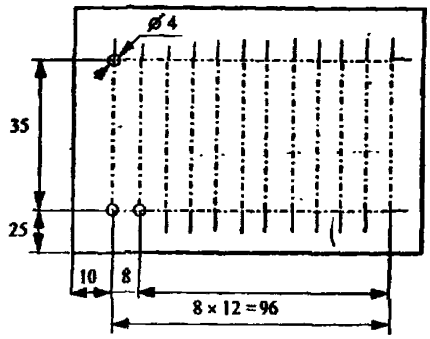

Рис. 2. Трафарет для ракетного иммуноэлектрофореза (размеры в мм).

Гель из лунок удаляют с помощью вакуумного насоса или иглы. Помещают пластинку в прибор для электрофореза ПЭФ-3.

В камеры прибора наливают 1,5 л электродного буферного раствора. Соединяют поверхность агарозы с буферным раствором с помощью фитилей (5 слоев фильтровальной бумаги размером 120 х 60 мм или 1 слой бумаги «Ватман 3М»). Расстояние от края фитиля до лунок должно быть не менее 15 мм.

В лунки микрошприцем или автоматической пипеткой вносят по 15 мкл растворов БСА для калибровочного графика и испытуемые пробы. Каждую пробу вносят в 2 лунки. Время от начала нанесения образцов до включения прибора в сеть не должно превышать 10 мин. Включают прибор в сеть и проводят электрофорез при напряжении 6 - 8 В на 1 см длины геля и силе тока 6 мА в течение 18 - 20 ч. По окончании электрофореза пластинку переносят в кювету с 0,9%-ным раствором натрия хлорида и промывают, дважды меняя этот раствор. Пластинку вынимают, накрывают фильтровальной бумагой, прокалывают иглой бумагу над лунками и высушивают при температуре 18 - 20 °С.

Пластинку с высушенным гелем переносят в кювету с красителем на 15 - 20 мин., затем в кювету с раствором для обесцвечивания окрашенных гелей на 1 - 3 мин., далее промывают в водопроводной воде и высушивают при температуре 18 - 20 °С. Измеряют высоту пика (h) с помощью линейки. Измерение делают от края лунки до внешнего края пика (рис. 3). Концентрацию БСА в испытуемой пробе определяют по калибровочному графику, который воспроизводят при каждом анализе. Калибровочный график должен проходить через начало координат.

Калибровочный график. ОСО содержания бычьего альбумина разводят в соответствии с инструкцией по применению до концентрации 2,0 мкг/мл. К 0,1; 0,2; 0,3 мл полученного раствора прибавляют воду соответственно до 0,4 мл (БСА - 0,5; 1,0 и 1,5 мкг/мл). Для построения калибровочного графика используют растворы БСА концентрации 0,5; 1,0; 1,5 и 2,0 мкг/мл.

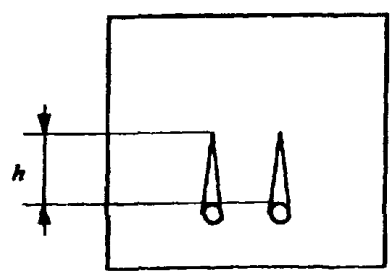

Рис. 3. Измерение высоты пика.

Растворы хранят не более 2 суток при температуре 4 - 8 °С.

Примечания.

1. Получение сыворотки против бычьего сывороточного альбумина (сыворотка против БСА). Кроликов породы Шиншилла, массой 2,5 - 3,5 кг, иммунизируют 0,15%-ным раствором БСА. Используют БСА любой марки с содержанием белка не менее 95%. Раствор БСА готовят на 0,9%-ном растворе натрия хлорида.

I цикл иммунизации состоит из двух инъекций раствора БСА с интервалом 7 сут. в дозе 1,0 мл в смеси с 1,0 мл адъюванта Фрейнда в область подколенных лимфатических узлов (последовательно в правую и левую, или наоборот).

II цикл иммунизации проводится через 30 сут. после 1 цикла и состоит из пяти внутрибрюшинных инъекций с интервалом 2 сут. в возрастающих дозах - 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 мл (за 1 ч до первой инъекции проводится десенсибилизация - 0,1 мл раствора БСА подкожно).

III цикл иммунизации проводится через 30 сут. после II цикла иммунизации и состоит из трех внутривенных инъекций с интервалом 2 сут. в возрастающих объемах - 0,5; 1,0; 1,5 мл раствора БСА (за 1 ч до первой инъекции проводится десенсибилизация - 0,1 мл раствора БСА подкожно).

Через 7 сут. после последней иммунизации у кроликов берут 2 - 3 мл крови и в сыворотке определяют титр антител против БСА методом ракетного иммуноэлектрофореза (разведение сыворотки, дающее пик высотой не менее 1 мм с раствором БСА в концентрации 0,5 мкг/мл). Сыворотка, имеющая титр не ниже 1:500, годна к дальнейшему использованию, в этом случае кроликов обескровливают тотально. Если титр сыворотки ниже 1:500, через 30 сут. проводят IV цикл иммунизации (аналогичный III циклу), через 7 сут. кроликов обескровливают тотально и устанавливают титр антител против БСА. Сыворотка, имеющая титр ниже 1:500, подлежит уничтожению.

При обескровливании кроликов кровь от каждого из них собирают в отдельный флакон.

Флаконы с кровью ставят в термостат при температуре (37 +/- 1) °С на 60 - 65 мин., затем обводят образовавшийся сгусток пастеровской пипеткой и оставляют при температуре 4 - 8 °С на 18 - 20 ч, затем сыворотку отсасывают в стерильную посуду, прибавляют борную кислоту из расчета 20 - 25 мг на 100 мл сыворотки и разливают по 0,5 мл в ампулы из стекла НС-1, ампулы запаивают и хранят при температуре минус (20 +/- 1) °С в течение 2-х лет.

2. Приготовление концентрированного трис-боратного буферного раствора с трилоном Б (pH 8,6 - 8,8). 60,5 г трис-(оксиметил)-амнометана, 6,0 г трилона Б, 19,0 г борной кислоты последовательно растворяют в воде и доводят объем водой до 1 литра в мерном цилиндре. При необходимости раствор фильтруют через бумажный фильтр.

3. Приготовление электродного буферного раствора (pH 8,6 - 8,8). Концентрированный трис-боратный буферный раствор с трилоном Б (pH 8,6 - 8,8) разводят водой в 6 раз. Используют не более 4 раз.

4. Приготовление 1%-ного геля агарозы. 1 г агарозы помещают в колбу, вместимостью 100 мл, прибавляют 80 мл воды и растворяют при нагревании на кипящей водяной бане, прибавляют 20 мл концентрированного трис-боратного буферного раствора с трилоном Б и вновь нагревают на кипящей водяной бане 30 мин. Разливают по 16 мл в пробирки. Хранят при температуре 4 - 8 °С не более 2-х месяцев.

5. Приготовление красителя. 0,30 г Кумасси бриллиантового голубого R-250 растворяют в 100 мл раствора, применяемого для обесцвечивания окрашенных гелей, и затем фильтруют.

6. Приготовление раствора для обесцвечивания окрашенных гелей. К 200 мл ледяной уксусной кислоты прибавляют 500 мл этилового спирта и 300 мл воды.

7. Подготовка стеклянных пластинок. На стеклянные пластинки размером 120 х 90 мм, обработанные хромовой смесью, наносят одну каплю расплавленного 1%-ного геля агарозы, растирают ее по поверхности пластинки с помощью пипетки и подсушивают.

31. Определение фенола

31.1. Метод определения фенола с реактивом Фолина

Метод основан на свойстве реактива Фолина давать цветную реакцию с фенолом.

Методика определения. 0,5 мл препарата помещают в мерную колбу, вместимостью 50 мл, и доводят объем раствора водой до метки. К 0,5 мл полученного раствора прибавляют 9,5 мл воды и

0,5 мл реактива Фолина, содержимое перемешивают. Прибавляют 2 мл 20%-ного раствора натрия карбоната, перемешивают, затем пробу помещают в кипящую водяную баню на 1 мин. После охлаждения измеряют оптическую плотность растворов на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 310 нм по сравнению с контрольной пробой, содержащей 10 мл воды, 0,5 мл реактива Фолина, 2 мл 20%-ного раствора натрия карбоната.

Содержание фенола в препарате вычисляют по калибровочному графику.

Калибровочный график. 0,5 г (точная навеска) фенола растворяют в воде в мерной колбе, вместимостью 50 мл, и доводят объем раствора водой до метки (10 мг/мл фенола).

Полученный раствор хранят в склянке из темного стекла при температуре 4 - 8 °С в течение года. Перед употреблением 1 мл раствора разводят водой в 100 раз (100 мкг/мл фенола). К 0,05 - 0,25 мл полученного раствора (5 - 25 мкг фенола), взятого микропипеткой с интервалом 0,05 мл, прибавляют воду до 10 мл, реактивы перемешивают и проводят анализ, как указано выше.

Примечание.

Приготовление реактива Фолина. Метод изложен в разделе «Определение белка по методу Лоури» 17.1.

31.2. Спектрофотометрический метод

Метод основан на способности фенола поглощать ультрафиолетовый свет и заключается в измерении оптической плотности растворов при длинах волн 269 нм и 290 нм с последующим определением содержания фенола по калибровочному графику. Метод может быть применен для препаратов с содержанием белкового азота не более 0,5 мг/мл.

Методика определения. 0,5 мл препарата помещают в мерную колбу, вместимостью 50 мл, и доводят объем раствора водой до метки. Измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длинах волн 269 и 290 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм по сравнению с контрольным раствором, которым является вода. Находят разность между первым и вторым показателем и по калибровочному графику определяют концентрацию фенола в разведенном препарате. Концентрацию фенола в исходном препарате в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{a \cdot 100 \cdot 100}{1000000} = \frac{a}{100}, где$$

а - количество фенола на 1 мл, найденное по калибровочному графику, мкг.

Калибровочный график. Готовят раствор фенола с концентрацией 10 мг/мл, как указано в разделе 31.1. Перед определением раствор фенола разводят водой в 100 раз (100 мкг/мл). К 0,5 - 2,5 мл полученного раствора с интервалом 0,5 мл прибавляют воду до объема 5 мл (концентрация фенола 10 - 50 мкг/мл) и измеряют оптическую плотность, как указано выше.

32. Определение формальдегида

Метод основан на образовании хиноидного красителя при взаимодействии фуксинсернистого реактива с водно-растворимыми альдегидами.

Методика определения. Необходимый объем препарата (0,5; 1,0 или 2,0 мл) с концентрацией формальдегида 20 - 80 мкг/мл помещают в пробирку, доводят объем раствора водой до 5 мл, прибавляют 1 мл раствора фуксинсернистой кислоты, перемешивают, пробирки закрывают резиновыми пробками и оставляют на 1 ч. Измеряют оптическую плотность полученного раствора на фотоэлектроколориметре при длине волны 590 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм по сравнению с контрольной пробой, содержащей 5 мл воды и 1 мл раствора фуксинсернистой кислоты. Содержание формальдегида в препарате в микрограммах на 1 мл (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{a}{A}, где$$

а - концентрация формальдегида на 1 мл, рассчитанная по калибровочному графику, мкг;
А - количество анализируемого препарата, мл.

При наличии опалесценции в препарате производят визуальное определение путем сравнения окраски препарата с образцом с известной концентрацией формальдегида. Сравнение проводят на фоне белой бумаги.

Калибровочный график. Готовят основной раствор формальдегида (концентрация формальдегида около 4 мг/мл): 1,0 мл формалина помещают в мерную колбу, вместимостью 100 мл, и доводят объем раствора водой до метки. Определяют содержание формальдегида в основном растворе. Основной раствор хранят не более 1 мес. Перед употреблением из основного раствора готовят рабочий раствор с концентрацией формальдегида 20 мкг/мл.

Например, содержание формальдегида в основном растворе 4,4 мг/мл, 0,45 мл такого раствора помещают в мерную колбу, вместимостью 100 мл, и доводят объем водой до метки. К 1,0 - 4,0 мл рабочего раствора с интервалом 0,5 мл (концентрация формальдегида в пробах 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 мкг/мл) прибавляют воду до объема 5 мл и 1 мл раствора фуксинсернистой кислоты, далее анализ проводят, как описано выше.

Примечания.

1. Приготовление раствора фуксинсернистой кислоты. 1 г фуксина основного или парафуксина для фуксинсернистой кислоты растворяют в 500 мл воды на кипящей водяной бане. Раствор охлаждают до температуры 18 - 20 °С, фильтруют в мерную колбу, вместимостью 1 л, и прибавляют 30 мл 20%-ного раствора калия пиросернистокислого (или 25 мл 20%-ного раствора натрия пиросернистокислого), через 20 мин. к смеси прибавляют 10 мл концентрированной соляной кислоты, доводят объем раствора водой до метки и выдерживают не менее суток. Перед использованием раствора фуксинсернистой кислоты его титруют раствором йода концентрации 0,05 моль/л (индикатор - 0,5%-ный раствор крахмала). На титрование 3 мл фуксинсернистой кислоты должно расходоваться от 3 до 4 мл раствора йода. Если объем раствора йода, израсходованного на титрование, меньше 3 мл, то к 100 мл приготовленного реактива прибавляют калий (или натрий) пиросернистокислый из расчета 200 мг на каждый миллилитр разницы между 3 мл и израсходованным объемом раствора йода. Если объем раствора йода, израсходованного на титрование, больше 4 мл, то к 100 мл реактива прибавляют раствор фуксина основного или парафуксина (VI) в количестве, рассчитываемом по формуле:

$$V_1 = \frac{V + 100}{27}, \text{ где}$$

V *- объем раствора йода концентрации 0,05 моль/л, израсходованного на титрование 3 мл реактива, мл;*

100 *- объем фуксинсернистой кислоты, мл;*

27 *- коэффициент пересчета.*

Приготовленный реактив применяется не раньше чем через сутки. Реактив должен быть бесцветным, допускается слегка желтоватая окраска. Для осветления раствора допускается применение активированного угля. Реактивы хранят в склянке из темного стекла с притертой пробкой.

2. Приготовление раствора фуксина. 1 г фуксина основного или парафуксина для фуксинсернистой кислоты растворяют в 500 мл воды на кипящей водяной бане. Раствор охлаждают до температуры 18 - 20 °С и фильтруют.

3. Количественное определение формальдегида в основном растворе. 5 мл основного раствора формальдегида помещают в колбу с притертой пробкой, прибавляют 20 мл раствора йода концентрации 0,05 моль/л и 10 мл раствора натрия гидроксида концентрации 1 моль/л, перемешивают и оставляют в темном месте на 10 мин. Затем прибавляют 11 мл раствора серной кислоты концентрации 0,5 моль/л, выделившийся йод титруют раствором натрия тиосульфата концентрации 0,05 моль/л (индикатор - 0,5%-ный раствор крахмала). 1 мл раствора йода концентрации 0,05 моль/л соответствует 0,001501 г формальдегида, которого в препарате должно быть не менее 36% и не более 40%. Если содержание формальдегида в препарате меньше 40%, то для приготовления раствора, содержащего 4 мг/мл формальдегида, производят соответствующий перерасчет.

Содержание формальдегида в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(а - б) \cdot к \cdot 0{,}001501 \cdot 100 \cdot 100}{5{,}0}, где$$

а - количество раствора натрия тиосульфата концентрации 0,05 моль/л, использованное на титрование контрольного раствора, мл;

б - количество раствора натрия тиосульфата концентрации 0,05 моль/л, использованное на титрование испытуемого препарата, мл;

к - поправка к титру раствора натрия тиосульфата концентрации 0,05 моль/л;

0,001501 - количество формальдегида, соответствующее 1 мл раствора йода концентрации 0,05 моль/л, г;

5,0 - объем препарата, мл;

100 - разведение препарата;

100 - коэффициент пересчета в проценты.

Содержание формальдегида в основном растворе формальдегида проверяют по вышеуказанной методике не реже 1 раза в месяц.

33. Определение мертиолята

33.1. Колориметрический метод

Метод основан на выделении из мертиолята ртути в виде свободных ионов и последующем колориметрическом определении дитизоната ртути.

Методика определения. 0,2 мл препарат вносят в колбу с притертой пробкой, вместимостью 100 мл, прибавляют 1,2 мл разведенной по объему в 2 раза концентрированной серной кислоты (при наличии алюминия гидроокиси в препарате смесь осторожно нагревают на водяной бане до полного ее растворения), 5 мл 5%-ного раствора калия перманганата, хорошо перемешивают и оставляют на один час. Избыток калия перманганата удаляют добавлением 1,5 мл 20%-ного раствора сульфата гидроксиламина, прибавляют 30 мл воды, 5 мл раствора уксусной кислоты концентрации 6 моль/л и перемешивают. К полученному раствору из бюретки прибавляют 10 мл 0,001%-ного раствора дитизона и встряхивают 30 с. Содержимое колбы переносят в делительную воронку и после разделения слоев нижний хлороформный слой фильтруют через предварительно прокипяченную и высушенную вату в кювету с толщиной слоя 20 мм. Определяют оптическую плотность хлороформного раствора на фотоэлектроколориметре типа КФК-3 при длине волны 597 нм. Одновременно по этой же методике готовят контрольный раствор, содержащий все вышеперечисленные компоненты, кроме испытуемого препарата. На основании оптической плотности, измеренной по сравнению с контрольным раствором, по калибровочному графику находят содержание ртути в испытуемом растворе.

Содержание мертиолята в растворе в микрограммах на 1 мл (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{а \cdot 100}{0{,}2 \cdot 49{,}55} = а \cdot 10{,}1, где$$

а - количество ртути, найденное по калибровочному графику, мкг;

0,2 - количество испытуемого препарата, мл;

49,55 - содержание ртути в 100 частях мертиолята.

Калибровочный график. 0,5 г металлической ртути (точная навеска) помещают в мерную колбу, вместимостью 500 мл, и растворяют в 15 мл концентрированной азотной кислоты и доводят объем раствора до метки (1 мг/мл). Определяют содержание ртути. Перед употреблением раствор

разводят водой в 100 раз. К 0,4 - 1,2 мл полученного раствора (4 - 12 мкг ртути) с интервалом 0,2 мл прибавляют по 1,2 мл разведенной по объему в два раза концентрированной серной кислоты, 30 мл воды, 5 мл 0,9%-ного раствора натрия хлорида, 5 мл раствора уксусной кислоты концентрации 6 моль/л, далее проводят анализ, как в опытной пробе.

Калибровочный график воспроизводят перед каждым определением.

Примечания.

1. Приготовление 0,001%-ного раствора дитизона. 10 мг дитизона (точная навеска) помещают в мерную колбу, вместимостью 100 мл, растворяют в хлороформе и доводят объем раствора до 100 мл.

Раствор хранят в темном месте при температуре 4 - 8 °С в течение месяца. Перед употреблением раствор разводят в 10 раз.

В целях стандартизации условий определения рекомендуется измерять оптическую плотность полученного раствора на фотоэлектроколориметре, контрольной пробой при этом служит вода. Колебания оптической плотности 0,001%-ного раствора дитизона от опыта к опыту не должны превышать +/- 0,25 оптических единиц.

2. Определение содержания ртути. К 10 мл раствора (с концентрацией ртути 1 мг/мл) прибавляют 10 капель 10%-ного раствора железоаммонийных квасцов и медленно титруют раствором аммония роданида концентрации 0,01 моль/л до изменения окраски в оранжевый цвет.

1,0 мл раствора аммония роданида концентрации 0,01 моль/л соответствуют 0,001003 г ртути.

33.2. Полярографический метод

Метод основан на полярографической активности мертиолята.

Методика определения. К 4,5 мл испытуемого препарата прибавляют 0,5 мл раствора калия хлорида концентрации 2 моль/л. Пробу помещают в электролизер, термостатируемый при температуре (20 +/- 1) °С.

Через испытуемый раствор пропускают в течение 10 - 15 мин. газообразный азот. Ртутный капельный электрод опускают в электролизер и снимают полярограмму на полярографе с регистрирующим устройством в области потенциала от 0,2 до 1,0 В (внутренний анод).

Содержание мертиолята в препарате в микрограммах на 1 мл (X) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{a \cdot 5{,}0}{4{,}5} 1{,}1 \cdot a, \text{где}$$

а - концентрация мертиолята в анализируемой пробе, рассчитанная по калибровочному графику, мкг/мл;

5,0 - общий объем пробы, мл;

4,5 - количество испытуемого препарата в пробе, мл.

Калибровочный график. 1,5 г мертиолята (точная навеска) помещают в мерную колбу, вместимостью 100 мл, растворяют в воде и доводят объем раствора водой до метки. Раствор хранят при температуре 4 - 8 °С в течение 3 мес. Перед определением раствор разводят в 100 раз. К 1,0 - 4,5 мл полученного раствора (содержание ртути 30 - 150 мкг/мл) с интервалом в 0,5 мл прибавляют 0,5 мл раствора хлорида калия концентрации 2 моль/л, доводят общий объем до 5 мл и проводят анализ, как описано выше. На полученных полярограммах измеряют высоту волны и строят калибровочный график, на оси ординат которого откладывают значение высоты волны (среднее 3-х определений), а на оси абсцисс - соответствующие значения концентрации мертиолята в микрограммах на миллилитр.

Калибровочный график пригоден неограниченное время для данного капилляра при постоянных условиях определения (температура, время каплеобразования).

Мертиолят, используемый для приготовления стандартного раствора, должен соответствовать требованиям, перечисленным ниже.

Методы оценки качества мертиолята

Мертиолят (тиомерсал)

о-этилртутьтиосалицилат натрия М.м. 404,8

$C_9H_9HgNaO_2S$

Описание. Легкий кремоватый кристаллический порошок со слабым характерным запахом.

Растворимость. 1 г препарата без остатка растворяется при температуре 18 - 22 °С в 1 г воды, а также в 35 мл спирта. Раствор должен быть бесцветным или светло-желтым. Препарат почти нерастворим в бензоле и эфире.

Концентрация водородных ионов (pH) 6,0 - 8,0. Используют 1%-ный раствор на свежепрокипяченной воде. Определение проводят потенциометрически.

Подлинность. 0,05 г препарата растворяют в 5,0 мл воды. К раствору прибавляют 1,0 мл 10%-ного раствора серебра нитрата. Образуется белый осадок.

0,05 г препарата растворяют в 5,0 мл воды. К раствору прибавляют 1,0 мл 10%-ного раствора меди сульфата. Образуется осадок зеленого цвета.

0,5 г препарата растворяют в 10 мл воды и прибавляют 2,0 мл раствора соляной кислоты концентрации 2 моль/л. Выделившийся белый осадок отфильтровывают на воронке Бюхнера и промывают водой до исчезновения хлорид-ионов. Осадок, высушенный в присутствии фосфора (V) оксида при давлении не более 0,667 кПа (5,0 мм рт. ст.) до постоянной массы, имеет температуру плавления 110 °С.

Ртутные соли. 0,1 г препарата растворяют в 5,0 мл воды. К раствору прибавляют 1,0 мл 5%-ного свежеприготовленного раствора натрия сульфида. Выпавший белый осадок не должен изменять цвета при выдерживании в темном месте в течение 30 мин.

Растворимые в эфире вещества. 0,5 г препарата (точная навеска) встряхивают с 20,0 мл эфира в течение 10 мин, фильтруют. После испарения эфира остаток, высушенный в течение 22 - 24 ч в присутствии фосфора (V) оксида при давлении не более 0,667 кПа (5,0 мм рт. ст.), должен весить не более 4,0 мг.

Потеря в массе при высушивании. 0,5 г препарата высушивают в течение 24 ч в присутствии фосфора (V) оксида при давлении не более 0,667 кПа (5,0 мм рт. ст.). Потеря в массе при высушивании не должна превышать 0,5%.

Количественное определение. 0,3 г препарата (точная навеска) растворяют в 10,0 мл воды, прибавляют 1,5 г растертого калия перманганата и хорошо перемешивают. Через 5 мин. в колбу осторожно прибавляют при постоянном перемешивании по каплям 5 мл концентрированной серной кислоты.

Через 5 - 10 мин. выделившийся осадок растворяют при постепенном прибавлении 4,0 - 8,0 мл 3%-ного раствора перекиси водорода. К обесцвеченному раствору прибавляют по каплям 5%-ный раствор калия перманганата до неисчезающего розового окрашивания. Раствор вновь обесцвечивают добавлением по каплям 4%-ного раствора щавелевой кислоты. Полученный раствор после прибавления 5,0 мл 10%-ного раствора железоаммонийных квасцов медленно титруют раствором аммония роданида концентрации 0,1 моль/л до изменения окраски. 1,0 мл раствора аммония роданида концентрации 0,1 моль/л соответствует 0,02024 г мертиолята.

Высушенный в присутствии фосфора (V) оксида препарат должен содержать не менее 98% и не более 101% мертиолята.

Хранение. Яд! Хранят в банке с притертой пробкой, в защищенном от света месте.

Препарат подвергают переконтролю 1 раз в 3 мес.

Если мертиолят не соответствует одному из перечисленных требований, его бракуют.

34. Определение гидроксиламина

Метод основан на получении окрашенного продукта взаимодействия гидроксиламина и альфа-нафтиламина.

Метод рекомендован для препаратов, представляющих собой антигенные комплексы, полученные с применением гидроксиламина (протейная, клебсиеллезная, дизентерийные вакцины).

Методика определения. К 1 мл препарата прибавляют 0,5 мл 20%-ного раствора натрия ацетата и при постоянном помешивании вносят последовательно 0,5 мл 1%-ного раствора сульфаниловой кислоты, 0,15 мл 1,3%-ного раствора йода, 0,5 мл 1,6%-ного раствора натрия тиосульфата. После обесцвечивания раствора прибавляют 0,3 мл 0,3%-ного раствора альфа-нафтиламина.

При наличии гидроксиламина появляется красное окрашивание. Определяют оптическую плотность окрашенного раствора на фотоэлектроколориметре при длине волны 540 нм и кювете с тол-

щиной слоя 10 мм по сравнению с контрольной пробой, состоящей из 1 мл воды и всех реактивов. Содержание гидроксиламина в микрограммах на 1 мл вычисляют по калибровочному графику.

Калибровочный график. Перед определением 0,1%-ный раствор гидроксиламина разводят водой в 100 раз в мерной колбе, вместимостью 100 мл (10 мкг/мл). К 0,1 - 1,0 мл полученного (1 - 10 мкг гидроксиламина) раствора с интервалом 0,1 мл прибавляют воду до объема 1 мл, прибавляют реактивы и проводят анализ, как указано выше. Калибровочный график воспроизводят перед каждым определением.

Примечания.

1. Приготовление 0,1%-ного раствора гидроксиламина. 0,1 г гидроксиламина солянокислого растворяют в воде в мерной колбе, вместимостью 100 мл, и объем доводят водой до метки.

2. Приготовление 1,3%-ного раствора йода. 1,3 г йода кристаллического растворяют в небольшом количестве ледяной уксусной кислоты и объем доводят кислотой до 100 мл в мерном цилиндре.

3. Приготовление 1%-ного раствора сульфаниловой кислоты. 1 г сульфаниловой кислоты растворяют в 75 мл воды и прибавляют 25 мл ледяной уксусной кислоты.

4. Приготовление 0,3%-ного раствора альфа-нафтиламина, 0,3 г альфа-нафтиламина растворяют в 70 мл воды и прибавляют 30 мл ледяной уксусной кислоты. Раствор готовят за 18 ч до применения.

5. Приготовление 1,6%-ного раствора натрия тиосульфата. 1,6 г натрия тиосульфата растворяют в воде и объем доводят до 100 мл в мерном цилиндре.

6. Приготовление 20%-ного раствора натрия ацетата. 20 г натрия ацетата растворяют в воде и объем доводят водой до 100 мл в мерном цилиндре.

7. Метод не применим в присутствии нитратов.

35. Определение остаточного спирта

Метод основан на окислении спирта калия дихроматом. Метод рекомендован для иммуноглобулинов.

Методика определения. В наружные отделения 4-х чашек Конвея вносят по 15 мл окислительной смеси. Во внутренние отделения 2-х чашек Конвея приливают по 0,5 мл препарата, разведенного в 100 раз 0,9%-ным раствором натрия хлорида (в мерной колбе), в две другие - по 0,5 мл 0,9%-ного раствора натрия хлорида (контрольные пробы). Чашки закрывают пришлифованными стеклами, на которые ставят груз массой 100 - 200 г, помещают в термостат при температуре (80 +/- 1) °С и выдерживают в течение 2 ч. После чего окислительную смесь из наружного отделения чашки осторожно переносят пипеткой в колбу с притертой пробкой. Наружное отделение трижды промывают водой по 15 мл. В колбу прибавляют по 1 мл 10%-ного раствора калия йодида и через 1 - 2 мин. выделившийся йод титруют раствором натрия тиосульфата концентрации 0,005 моль/л (индикатор - 0,5%-ный раствор крахмала). Индикатор в количестве 3 - 5 капель прибавляют перед концом титрования, когда раствор имеет соломенно-желтое окрашивание. После прибавления индикатора раствор приобретает синее окрашивание. Титрование проводят до обесцвечивания.

Содержание спирта в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(а - б) \cdot К \cdot 0{,}000115 \cdot 100 \cdot 1{,}1 \cdot 100}{1 \cdot 0{,}5}, где$$

а - количество раствора натрия тиосульфата концентрации 0,005 моль/л, пошедшее на титрование контрольной пробы, мл;

б - количество раствора натрия тиосульфата концентрации 0,005 моль/л, пошедшее на титрование испытуемого препарата, мл;

0,000115 - количество спирта, соответствующее 1 мл раствора натрия тиосульфата концентрации 0,005 моль/л, г;

К - поправка к титру раствора натрия тиосульфата концентрации 0,005 моль/л;

1,1 - коэффициент пересчета;

0,5 - объем препарата, мл;
100 - разведение препарата;
100 - коэффициент пересчета в проценты.

Примечания.

1. Приготовление окислительной смеси. Окислительная смесь состоит из 2-х объемов раствора калия дихромата концентрации 0,005 моль/л и 1 объема концентрированной серной кислоты.

2. Приготовление раствора натрия тиосульфата концентрации 0,005 моль/л. 5 мл раствора натрия тиосульфата концентрации 0,1 моль/л помещают в мерную колбу, вместимостью 100 мл, и доводят объем раствора водой до метки. Раствор применяют свежеприготовленным.

36. Определение остаточного риванола

Метод определения основан на свойстве молекул риванола флюоресцировать в ультрафиолетовой области.

Метод рекомендован для специфических гетерологических иммуноглобулинов, при получении которых используют риванол.

Методика определения. В одну кварцевую кювету толщиной слоя 10 мм вносят препарат иммуноглобулина, в другую - стандартный раствор риванола. Кюветы помещают в источник УФ-лучей (ртутно-кварцевая лампа ПРК-4). Препарат визуально сравнивают со стандартным раствором, содержащим 0,2 мкг/мл риванола. В иммуноглобулине должна отсутствовать характерная для риванола желто-зеленая флюоресценция.

Примечание. Приготовление стандартного раствора риванола. Готовят основной раствор риванола в концентрации 100 мкг/мл (5 мг риванола помещают в мерную колбу, вместимостью 50 мл, растворяют в воде и доводят объем раствора водой до метки). Перед определением основной раствор разводят в 50 раз водой. Отбирают 0,5 мл этого раствора, добавляют 4,5 мл воды (концентрация риванола - 0,2 мкг/мл).

37. Определение натрия хлорида

Метод основан на определении ионов хлора после окисления белков калия перманганатом в кислой среде в присутствии серебра нитрата, избыток которого оттитровывают раствором аммония роданида.

Методика определения. К 0,2 мл препарата, содержащего 0,5 - 1 мг/мл натрия хлорида, внесенного в коническую колбу, вместимостью 50 мл, прибавляют 5 мл раствора серебра нитрата концентрации 0,01 моль/л и 1 мл концентрированной азотной кислоты, осторожно нагревают с использованием асбестовой сетки до кипения. К испытуемому раствору прибавляют по каплям насыщенный раствор калия перманганата до бледно-розового окрашивания, не исчезающего в течение 5 мин. Затем прибавляют глюкозу (около 10 мг) до исчезновения окраски. По охлаждении раствора избыток ионов серебра титруют раствором аммония роданида концентрации 0,01 моль/л. Титруют до образования розового окрашивания (индикатор - железо-аммонийные квасцы).

Параллельно проводят контрольный опыт.

Содержание натрия хлорида в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(A-B)\cdot K\cdot 0{,}000585}{0{,}2}\cdot 100, \text{ где}$$

A - количество раствора аммония роданида концентрации 0,01 моль/л, израсходованного на титрование в контрольном опыте, мл;

B - количество раствора аммония роданида концентрации 0,01 моль/л, израсходованного на титрование испытуемого препарата, мл;

K - поправка к титру раствора аммония роданида;

0,2 - количество испытуемого раствора, мл;

0,000585 - количество натрия хлорида, соответствующее 1 мл раствора аммония роданида концентрации 0,01 моль/л, г;

100 - коэффициент пересчета в проценты.

Примечания.

1. Приготовление раствора серебра нитрата концентрации 0,01 моль/л. Готовят, используя стандарт-титр (фиксанал) в ампуле.

2. Приготовление раствора аммония роданида концентрации 0,01 моль/л. Готовят, используя стандарт-титр (фиксанал) в ампуле.

3. Приготовление индикатора - насыщенного раствора железо-аммониевых квасцов (~ 40%). Водный, насыщенный на холоду, раствор железо-аммониевых квасцов фильтруют через складчатый фильтр и к мутному раствору прибавляют по каплям концентрированную азотную кислоту до просветления раствора (следует избегать большого избытка азотной кислоты).

38. Определение ионов алюминия

Метод основан на реакции комплексообразования ионов алюминия с динатриевой солью этилендиаминтетрауксусной кислоты (трилон Б) и последующем обратном титровании избытка трилона Б.

Метод рекомендован для сорбента (геля алюминия гидроксида) и сорбированных препаратов.

Методика определения. В колбу из термостойкого стекла, вместимостью 100 мл, вносят 2 мл препарата, содержащих 0,5 - 1,0 мг алюминия (или 1 мл препарата, содержащего 1 - 2 мг алюминия) и 2 мл 10%-ного раствора серной кислоты. При анализе сухого препарата (например, секстаанатоксина) его разводят в соответствии с инструкцией к препарату, отбирают 1 мл раствора и прибавляют 4 - 5 мл 5%-ного раствора серной кислоты (уменьшают концентрацию кислоты во избежание обугливания наполнителя). Колбу накрывают часовым стеклом и доводят до слабого кипения. Во избежание выпаривания жидкости после закипания в колбу вносят 1 - 2 раза по 5 мл воды и минерализуют до полного растворения осадка сорбента. Прозрачный раствор охлаждают до температуры 10 - 20 °С, прибавляют 10 мл ацетатного буферного раствора (pH 4,5 - 5,0) и 10 мл отмеренного из бюретки раствора трилона Б концентрации 0,01 моль/л. Смесь нагревают до кипения. После охлаждения раствора прибавляют 25 мл спирта и 1 мл раствора дитизона.

Избыток трилона Б оттитровывают раствором цинка сульфата концентрации 0,01 моль/л до перехода окраски от зеленой к красной.

1 мл раствора трилона Б концентрации 0,01 моль/л соответствует 0,2698 мг алюминия.

Содержание алюминия в миллиграммах на 1 мл (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{K_{ZnSO_4} \cdot (V - V_o) \cdot 0{,}2698}{V_n}, где$$

K_{ZnSO4} - поправочный коэффициент к титру раствора цинка сульфата концентрации 0,01 моль/л;

V - количество раствора цинка сульфата концентрации 0,01 моль/л, израсходованного на титрование контрольной пробы, мл;

V_o - количество раствора цинка сульфата концентрации 0,01 моль/л, израсходованного на титрование испытуемой пробы, мл;

$V_п$ - количество препарата, взятое на анализ, мл.

Примечания.

1. При содержании алюминия в пробе выше 1 мг/мл объем прибавляемых реактивов (трилона Б и буферного раствора) увеличивают в 2 раза.

2. Объем прибавляемого спирта должен составлять не менее половины конечного объема реакционной смеси.

3. Приготовление растворов:

3.1. Аммиачный буферный раствор (pH 9,5 - 10,0). 20 г аммония хлорида растворяют в 200 - 300 мл воды в мерной колбе, вместимостью 1 л, прибавляют 100 мл концентрированного раствора аммиака и доводят объем раствора водой до метки.

Срок годности - 3 мес.

3.2. Ацетатный буферный раствор (pH 4,5 - 5,0). 60 мл ледяной уксусной кислоты и 77 г аммония ацетата растворяют в 800 мл воды и доводят объем раствора водой до 1 л в мерном цилиндре.

Срок годности - 3 мес.

3.3. Раствор дитизона. 25 мг дитизона (ч) растворяют в 100 мл ацетона. Раствор хранят при температуре 4 - 8 °С в течение 1 мес.

3.4. Индикаторная смесь. 0,25 г индикатора эриохрома черного Т растирают в фарфоровой ступке с 25 г натрия хлорида и перемешивают. На 100 мл титруемого раствора берут около 0,2 г индикаторной смеси.

3.5. Раствор трилона Б концентрации 0,01 моль/л готовят из фиксанала. При отсутствии фиксанала 3,7225 г трилона Б растворяют в 500 мл воды и доводят объем раствора водой до метки в мерной колбе, вместимостью 1 л.

Титр раствора трилона Б устанавливают по раствору магния сульфата концентрации 0,01 моль/л.

К 20 мл отмеренного из бюретки раствора магния сульфата концентрации 0,01 моль/л прибавляют 5 мл аммиачного буферного раствора (pH 9,5 - 10,0), около 0,2 г индикаторной смеси, 80 мл воды, перемешивают и титруют раствором трилона Б. Рассчитывают поправочный коэффициент.

3.6. Раствор магния сульфата концентрации 0,01 моль/л.

Используя фиксанал, готовят раствор магния сульфата концентрации 0,05 моль/л. 200 мл приготовленного раствора отмеривают с помощью мерной колбы, вместимостью 200 мл, помещают в мерную колбу, вместимостью 1 л, и доводят объем раствора водой до метки.

3.7. Раствор цинка сульфата концентрации 0,01 моль/л. Готовят из фиксанала. При отсутствии фиксанала готовят одним из указанных способов:

3.7.1. 2,8755 г цинка сульфата растворяют в воде в мерной колбе, вместимостью 1 л, и доводят объем раствора водой до метки.

3.7.2. 0,6538 г металлического цинка растворяют в 40 мл 50%-ного раствора серной кислоты в мерной колбе, вместимостью 1 л, и доводят объем раствора водой до метки.

Титр растворов устанавливают по титрованному раствору трилона Б.

К 20 мл отмеренного из бюретки раствора трилона Б концентрации 0,01 моль/л прибавляют 10 мл ацетатного буферного раствора (pH 4,5 - 5,0), 25 мл спирта и 1 мл раствора дитизона, перемешивают и титруют раствором цинка сульфата концентрации 0,01 моль/л. Рассчитывают поправочный коэффициент.

39. Определение сульфат-ионов

Метод основан на реакции между ионами сульфатов и ионами бария с образованием осадка или появлением опалесценции (в зависимости от концентрации сульфат-ионов).

Метод рекомендован для сывороточных препаратов, вакцин (сорбированных и несорбированных) и сорбента вакцинных препаратов.

39.1. Анализ препаратов с содержанием сульфат-ионов 50 - 450 мкг/мл

Методика определения. К 1 мл препарата (при анализе сорбированных препаратов используют центрифугат после центрифугирования 3 мл препарата при 2000 об./мин., 20 мин.) прибавляют 3,5 мл воды, 0,5 мл 5%-ного раствора бария хлорида и перемешивают. Через 15 мин. измеряют оптическую плотность суспензии на фотоэлектроколориметре при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 5 мм по сравнению с контрольным раствором, содержащим 1 мл препарата и 4 мл воды, если нет других указаний в фармакопейной статье на препарат.

Расчет содержания сульфат-ионов проводят по калибровочному графику.

Калибровочный график. Готовят основной раствор калия сульфата, содержащий 1 мг/мл сульфат-ионов: 1,8140 г калия сульфата, высушенного до постоянной массы при температуре 100 - 105 °С, растворяют в воде в мерной колбе, вместимостью 1 л, и доводят объем раствора водой до метки. Перед определением основной раствор разводят водой в 10 раз. К 0,5 - 4,5 мл полученного раствора (50 - 450 мкг сульфат-ионов) с интервалом 0,5 мл прибавляют воду до объема 4,5 мл, 0,5

мл 5%-ного раствора бария хлорида и проводят анализ, как указано выше. Строят график зависимости оптической плотности от концентрации сульфат-ионов.

Калибровочный график строят при каждом анализе.

39.2. Анализ препаратов с содержанием сульфат-ионов менее 50 мкг/мл

Методика определения. К 10 мл центрифугата сорбированных препаратов прибавляют 1 мл 5%-ного раствора бария хлорида. Одновременно прибавляют 1 мл 5%-ного раствора бария хлорида к 10 мл эталонного раствора, содержащего 20 мкг/мл сульфат-ионов (основной раствор калия сульфата, содержащий 1 мг/мл сульфат-ионов, разводят водой в 50 раз). Измеряют оптическую плотность испытуемой пробы и эталонного раствора на фотоэлектроколориметре при длине волны 540 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм против контрольных растворов. Контрольным раствором для испытуемой пробы служит раствор, состоящий из 10 мл центрифугата и 1 мл воды, для эталонного раствора используется вода.

Расчет содержания сульфат-ионов проводят по пропорции на основании сравнения оптической плотности препарата и эталонного раствора.

40. Определение ионов аммония

Метод основан на свойстве реактива Несслера давать цветную реакцию с ионами аммония.

Метод рекомендован для сорбированных препаратов и сорбента алюминия гидроокиси, приготовленного с применением аммиака.

Методика определения. К 1 мл центрифугата после центрифугирования при 2000 об./мин. 20 мин. (не допускается фильтрование для отделения осадка сорбента) прибавляют 8,8 мл воды, 0,2 мл реактива Несслера и перемешивают. Определяют оптическую плотность раствора на фотоэлектроколориметре при длине волны 400 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм по сравнению с контрольным раствором, содержащим 1 мл препарата и 9 мл воды, если нет других указаний в фармакопейной статье на препарат.

Расчет содержания ионов аммония проводят по калибровочному графику.

Калибровочный график. Готовят основной раствор аммония хлорида, содержащий 200 мкг/мл ионов аммония: 0,5931 г аммония хлорида, высушенного до постоянной массы в эксикаторе в присутствии кальция хлорида безводного, растворяют в воде в мерной колбе, вместимостью 1 л, и доводят объем раствора водой до метки. Перед определением основной раствор разводят водой в 100 раз (2 мкг/мл ионов аммония). К 2,5 - 7,5 мл полученного раствора с интервалом 0,5 мл прибавляют воду до объема 9,8 мл, прибавляют 0,2 мл раствора Несслера и проводят анализ, как указано выше. Калибровочный график строят при каждом анализе.

Примечание.

Приготовление реактива Несслера (см. раздел 14.1.1).

41. Определение гликокола

Метод основан на определении небелкового азота в надосадочной жидкости после осаждения белка трихлоруксусной кислотой (ТХУ). Определение азота проводят с реактивом Несслера, который дает цветную реакцию с ионами аммония ($NH4^+$), образующимися после минерализации гликокола. Метод предназначен для контроля иммуноглобулинов. Гликокол добавляют в препарат для стабилизации белка.

Методика определения. В мерной колбе, вместимостью 50 мл, разводят 1 мл препарата иммуноглобулина 0,9%-ным раствором натрия хлорида. В центрифужную пробирку вносят 2 мл препарата и добавляют 2 мл раствора ТХУ до конечной концентрации 10%. Пробы оставляют на ночь в холодильнике. Осадок отделяют центрифугированием при 4000 об./мин. при 5 °С в течение 30 мин. Надосадочную жидкость сливают в чистую пробирку. К 1 мл надосадочной жидкости добавляют 0,1 мл концентрированной серной кислоты и закрывают стеклянными колпачками. Пробы минерализуют на песочной бане. Для ускорения минерализации используют пергидроль, добавляя его по 1 - 2 капле. Сжигание продолжают до обесцвечивания содержимого пробирки. (Пробу после обесцвечивания выдержать на песочной бане дополнительно 2 - 2,5 часа без добав-

ления пергидроля. Если она останется бесцветной, минерализацию заканчивают.) Объем минерализата доводят дистиллированной водой до 10 мл и раствор тщательно перемешивают. Для колориметрирования отбирают 2 мл этого раствора, доводят дистиллированной водой до 9,5 мл, перемешивают, добавляют 0,5 мл реактива Несслера и снова тщательно перемешивают. Определяют оптическую плотность раствора на фотоэлектроколориметре при длине волны 400 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм против контрольного раствора, приготовленного аналогично испытуемой пробе.

Содержание гликокола в препарате в процентах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{a \cdot 50 \cdot 2 \cdot 10 \cdot 5{,}28 \cdot 100}{2 \cdot 1 \cdot 2 \cdot 1000000} = \frac{a \cdot 5{,}28}{40}, \text{где}$$

а - количество азота, найденное по калибровочному графику, мкг;
5,28 - коэффициент пересчета азота в гликокол;
50 - разведение препарата;
2 - количество препарата, взятое на осаждение белка, мл;
2 - разведение надосадочной жидкости;
1 - количество надосадочной жидкости, взятое для минерализации, мл;
2 - количество минерализата, взятое для колориметрирования, мл;
100 - коэффициент перевода в проценты;
10 - количество минерализата, мл;
1000000 - коэффициент перевода в граммы.

Примечания.

1. Построение калибровочного графика (см. раздел 14.1.1).

2. Приготовление реактива Несслера (см. раздел 14.1.1).

3. Приготовление стандартного раствора сернокислого аммония (см. раздел 14.1.1).

42. Определение показателя дисперсности сорбента и сорбированных препаратов

Метод основан на зависимости оптической плотности суспензии от величины частиц и заключается в определении оптической плотности при разных длинах волн с последующим вычислением показателя дисперсности. Установлена корреляция между средней величиной частиц и величиной, обратной показателю дисперсности.

Метод рекомендован для сорбированных препаратов и сорбента алюминия гидроксида.

Методика определения. Непосредственно после перемешивания суспензии измеряют оптическую плотность препарата на фотоэлектроколориметре при определенных длинах волн: на приборе марки ФЭК - 400 нм (λ_1) и 630 нм (λ_2); на приборе марки КФК - 400 нм (λ_1) и 540 нм (λ_2) (обозначены на панели прибора черным цветом).

Измерение проводят при использовании кювет с любой толщиной слоя таким образом, чтобы показания на приборе ФЭК находились в пределах 0,2 - 0,6, а на приборе КФК - в пределах 0,3 - 0,5. На приборе КФК кювету следует ставить в положение, максимально удаленное от фотоприемника (крайнее левое положение кюветодержателя).

При смене длины волны возможно использование кювет с разной толщиной слоя. В этом случае показание прибора, полученное при применении меньшей кюветы, должно быть увеличено во столько раз, во сколько раз различается толщина слоя кювет.

Показатель дисперсности (У) определяют по формуле:

$$У = \lg \frac{D_1}{D_2} : K, \text{где}$$

D_1 и D_2 - оптическая плотность при соответствующих длинах волн λ_1 и λ_2;
K - константа прибора, рассчитанная для каждого прибора конкретно по формуле:

$$K = \lg \frac{\lambda_2}{\lambda_1}, где$$

где λ_1 и λ_2 - длины волн в нанометрах (соответствующие максимумам пропускания используемых светофильтров).

43. Определение потери в массе при высушивании

Бюксы высотой 35 мм и диаметром 25 мм доводят до постоянной массы при температуре 100 - 105 °С.

0,15 - 0,20 г препарата помещают в бюксы и сушат в вакуум-сушильном шкафу в течение 3 ч при температуре (60 +/- 1) °С и остаточном давлении, не превышающем 0,667 кПа (5 мм рт. ст.). Бюксы с закрытыми крышками выдерживают в эксикаторе в присутствии кальция хлорида безводного в течение 30 - 40 мин. до полного охлаждения и взвешивают. Расчет массовой доли влаги в процентах проводят по разности масс до и после высушивания.

При определении массовой доли влаги в питательных средах высушивание препарата проводят в сушильном шкафу при температуре (100 +/- 2) °С в течение 2 ч. Остальные условия метода (величина навески и размер бюксов) описаны выше.

Примечание.

Анализ проводится при температуре (20 +/- 5) °С и относительной влажности воздуха 40 - 80%.

44. Определение точности розлива в лиофилизированных препаратах

44.1. Весовой метод

Принцип метода заключается в определении массы вещества в каждой емкости и расчете коэффициента вариации.

Методика определения. Флаконы или ампулы (10 штук) без этикеток обрабатывают смесью спирта с эфиром (1:1), помещают в коробку с пронумерованными ячейками и ставят в эксикатор на 3 ч, затем верхнюю часть каждой ампулы надпиливают и удаляют, во флаконах удаляют пробки. Вскрытые ампулы или флаконы с веществом взвешивают на аналитических весах, после чего содержимое емкостей удаляют, ампулы или флаконы моют водой и помещают в соответствующие ячейки коробки.

Емкости выдерживают при температуре 100 - 105 °С в сушильном шкафу до постоянной массы. По разности масс ампулы или флакона с содержимым и без него находят массу вещества.

Для определения точности розлива рассчитывают коэффициент вариации (V) в процентах по формуле:

$$V = \frac{S \cdot 100}{\overline{X}}, где \qquad S = \sqrt{\frac{\sum (X - \overline{X})^2}{n-1}}, где$$

S - стандартное отклонение;
X - среднее арифметическое значение массы вещества в емкости;
X - масса вещества в каждой емкости;
n - число емкостей.

44.2. Колориметрический метод

Принцип метода заключается в определении содержания белка в каждой емкости и расчете коэффициента вариации.

Метод может быть применен при содержании в ампуле 2 - 4 мг сухого вещества, содержащего не менее 25% белка.

Методика определения. Ампулы вскрывают (10 штук), содержимое каждой ампулы растворяют в 5 мл 0,9%-ного раствора натрия хлорида (pH 7,0 - 7,2). К 0,2 мл (дозировка 2 мг) или 0,1 мл (дозировка 4 мг) полученного раствора прибавляют до объема 1 мл 0,9%-ный раствор натрия хлорида и далее проводят анализ в соответствии с разделом «Определение белка по методу Лоури» (раздел 17).

Содержание белка в каждой ампуле определяют по калибровочному графику. Коэффициент вариации вычисляют по вышеуказанной формуле:

$\bar{X}$ - среднее арифметическое значение содержания белка в ампуле;

X - количество белка в каждой ампуле.

45. Определение прозрачности и цветности

Метод основан на измерении поглощения раствора в видимой области спектра при разных длинах волн: при определении цветности длина волны должна быть 400 нм (максимум поглощения гемоглобина), при определении прозрачности длина волны 540 нм (максимум поглощения для мутных растворов). Метод рекомендован для препаратов иммуноглобулинов.

Методика определения. В кювету с толщиной слоя 3 мм наливают раствор и измеряют оптическую плотность на фотоэлектроколориметре при указанных длинах волн по сравнению с водой.

46. Определение pH

Определение pH проводят потенциометрическим методом с применением стеклянного электрода в соответствии с ГФ XI, вып. 1, с. 113.

При определении pH в иммуноглобулинах и сыворотках препарат разводят 0,9%-ным раствором натрия хлорида (pH 7,0 - 7,2) до содержания белка 1%.

Сорбированный препарат не разводят и определение pH проводят в суспензии.

Определение pH в лиофилизированном препарате производят после добавления к содержимому ампулы (флакона) рекомендованного растворителя.

Для определения pH в сухих питательных средах готовят 2%-ный раствор препарата. Среды с агаром настаивают в течение 1 ч с последующей фильтрацией.

47. Определение равномерности розлива сорбированных препаратов

Метод основан на измерении оптической плотности мутных растворов в каждой емкости и расчете коэффициента вариаций.

Методика определения. Используют по 10 ампул в начале, середине и конце розлива. В кювету с толщиной слоя 1 мм наливают содержимое каждой ампулы и измеряют оптическую плотность на фотоэлектроколориметре при длине волны 540 нм (максимум поглощения мутных растворов) по сравнению с водой.

Рассчитывают коэффициенты вариаций для каждых 10 ампул. Коэффициент вариаций (V) вычисляют по формуле:

$$V = \frac{S \cdot 100}{\bar{X}}, \text{где} \qquad S = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n-1}}, \text{где}$$

S - стандартное отклонение;

X - среднее арифметическое значение оптической плотности препарата (расчет производят из 10-ти емкостей);

X - оптическая плотность препарата в каждой ампуле;

n - число емкостей.

Коэффициенты вариаций в начале, середине и конце розлива не должны превышать 5%.

Средние арифметические значения оптической плотности препарата в начале, середине и конце розлива не должны отличаться между собой более чем на 5%. При этом за 100% принимают максимальное среднее арифметическое значение оптической плотности.

Приложение

Буферные растворы

В данном разделе представлены материалы по приготовлению различных буферных растворов с широким диапазоном pH (фосфатный, цитратный, фосфатно-цитратный, боратный, барбиталовый, ацетатный, карбонат-бикарбонатный), которые могут применяться при контроле МИБП, а также использоваться при разработке новых дополнительных методов контроля препаратов.

Буферными растворами называются такие растворы, которые сохраняют pH при разведении, а также при добавлении к ним небольших количеств кислот или оснований. Водородный показатель pH - это отрицательный десятичный логарифм активности ионов водорода ($pH = -lgaH^+$).

Буферные растворы обладают определенной буферной емкостью, которая выражается в грамм-эквивалентах количества сильной кислоты или сильного основания, прибавление которых к 1 л буферного раствора изменяет pH этого раствора на единицу. Чем выше концентрация солей буферного раствора, тем выше и буферная емкость. Кроме того, буферная емкость зависит и от молярного соотношения участвующих в буфере растворов. Емкость буферного раствора достигает максимальной величины при молярном отношении, близком к единице.

Общие указания

А. Приготовление буферных растворов.

1. Величины pH, приведенные в таблицах, относятся к водным растворам и охватывают область pH от 3,7 до 9,5.

2. Для приготовления буферных растворов применяют дистиллированную воду, не содержащую угольной кислоты. Для удаления угольной кислоты воду кипятят в течение 30 - 45 мин., после чего сосуд закрывают резиновой пробкой, снабженной трубкой, заполненной натронной известью (2 весовые части CaO + 1 весовая часть NaOH). pH воды должен быть в пределах 5,8 - 7,0.

3. Для приготовления буферных растворов рекомендуется использовать реактивы квалификации «химически чистый» или «чистый для анализа».

4. Навески реактивов взвешивают с точностью 0,001 г, растворяют в дистиллированной воде и объем раствора в мерной колбе, вместимостью 1 л, доводят до метки. Концентрацию исходных растворов-компонентов, входящих в состав буферного раствора, выражают в моль/л.

5. Для приготовления исходных растворов применяют мерные колбы.

6. Исходные растворы после тщательного перемешивания переносят в сухие колбы с хорошо притертыми пробками.

7. Буферные растворы следует хранить в емкостях из боросиликатного стекла (например, «пирекс») или полиэтилена («чистого»).

8. Исходные растворы для приготовления буферных растворов отмеривают при температуре (20 +/- 1) °C при помощи бюреток или мерных цилиндров.

9. Буферные растворы хранят при температуре (6 +/- 4) °C в течение 10 - 12 дней. Исходные растворы сохраняют не более 30 дней.

10. При добавлении к буферному раствору нейтральной соли (например, 0,1 моль/л натрия хлорида) его pH меняется (солевой эффект).

11. Для приготовления фосфатно-буферного раствора используют соль натрия фосфорнокислого двузамещенного. Коммерческий препарат содержит 12 молекул воды. В связи с тем, что в процессе хранения этой соли количество молекул кристаллической воды уменьшается, используют соль с 2 молекулами воды. Для получения соли с 2 молекулами воды исходную соль рассыпают тонким слоем на чашки Петри и оставляют в защищенном от пыли месте при комнатной температуре. Препарат постепенно теряет воду. При высушивании соль нужно перемешивать. Через каждые 3 дня соль взвешивают (с точностью 0,01 г), пока два взвешивания не дадут одинакового результата.

Б. Измерение pH.

1. Измерение проводят с помощью pH-метров со стеклянными электродами.

2. Калибровка прибора проводится по стандартным буферным растворам, приготовление которых указано в ГФ XI, вып. 1, с. 113, либо используются стандарт-титры заводского изготовления.

3. Определение pH проводят при температуре, соответствующей показателям температуры буферного раствора, которую устанавливают на приборе (pH-метре).

4. При измерении pH контролируемых растворов отсчет величины pH по шкале прибора производится после того, как показания прибора примут установившиеся значения. Время установления показаний определяется буферными свойствами и температурой раствора и обычно не превышает 2 мин.

В. Прописи буферных растворов.

Прописи различных буферных растворов в широком диапазоне pH представлены в таблицах 1 - 9 и взяты из справочной литературы. Для получения буферного раствора с определенным pH следует смешать указанные в таблице объемы растворов, входящие в данный буферный раствор. В случае отклонения значения pH буферного раствора от заданной величины (не более чем на 0,1 ед. pH) его доводят до нужной величины одним из этих растворов.

Таблица 1

Ацетатные буферные смеси (pH 3,72-5,57), содержащие уксусную кислоту и натрия ацетат

pH	3,72	4,05	4,27	4,45	4,63	4,8	4,99	5,23	5,37	5,57
растворы	Соотношение растворов, мл									
CH3COOH, 0,2 моль/л (конц. CH3COOH пл. 1,049 12 мл/л)	9,0	8.0	7,0	6,0	5,0	4,0	3,0	2,0	1,5	1,0
CH3COCNa, 0,2 моль/л (27,2 г/л)	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	8,5	9,0

Таблица 2

Цитратные буферные смеси (pH 5,02-6,33), содержащиенатрия цисрат и натрия гидроксид

pH	5,02	5,11	5,31	5,57	5,97	6,33
растворы	Соотношение растворов, мл					
Na2C6H6O7 0,1 моль/л (33,51 г/л)	9,5	9,0	8,0	7,0	6,0	5,5
NaOH 0,1 моль/л (4,0 г/л)	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0	4,5

Таблица 4

Фосфатные буферные смеси (pH 5,91-8,04), содержащиенатрия дигидрофосфат и натрия гидрофосфат

pH	5,91	6,24	6,47	6,64	6,68	6,98	7,12	7,38	7,73	8,04
растворы	Соотношение растворов, мл									
NaH2PO4 x 2H2O 1/15 моль/л (10,46 г/л)	9,0	8,0	7,0	6,0	5,0	4,0	3,0	2,0	1,0	0,5
Na2HPO4 x 2H2O 1/15 моль/л (11,87 г/л)	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	9,5

Таблица 3

Цитратно-фосфатные буферные смеси (pH 4,6-7,6), содержащие натрия гидрофосфат и лимонную кислоту

pH	4,6	4,8	5,0	5,2	5,4	5,6	5,8	6,0	6,2	6,4	6,6	6,8	7,0	7,2	7,4	7,6
растворы	Соотношение растворов, мл															
Na2HPO4 x 2H2O 0,2 моль/л (35,6 г/л)	9,35	9,86	10,30	10,72	11,15	11,60	12,09	12,63	13,22	13,85	14,55	15,45	16,47	17,39	18,17	18,76
C6H8O7 x H2O 0,1 моль/л (21,01 г/л)	10,65	10,14	9,70	9,28	8,85	8,40	7,91	7,37	6,78	6,15	5,45	4,55	3,53	2,61	1,83	1,27

Таблица 8

Боратные буферные смеси (pH 6,77-9,11), содержащие борную кслоту и натрий тетраборнокислый

pH	6,77	6,90	7,36	7,60	7,78	7,94	8,08	8,20	8,41	8,60	8,69	8,84	8,98	9,11
растворы	Соотношение растворов, мл													
H3BO3 0,2 моль/л (12,4 г/л)	9,7	9,4	9,0	8,5	8,0	7,5	7,0	6,5	5,5	4,5	4,0	3,0	2,0	1,0
Na2B4O7 x 10H2O 0,5 моль/л (19,06 г/л)	0,3	0,6	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,5	5,5	6,0	7,0	8,0	9,0

Таблица 5

Фосфатные буферные смеси (pH 6,81-8,68), содержащиенатрия гидрофосфат и калия дигидрофосфат

pH	6,81	6,98	7,17	7,38	7,73	8,04	8,34	8,68
растворы	Соотношение растворов, мл							
Na2HPO4 x 2H2O 1/15 моль/л (11,87 г/л)	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	9,5	9,75	9,9
KH2PO4 1/15 моль/л (9,08 г/л)	5,0	4,0	3,0	2,0	1,0	0,5	0,25	0,1

Таблица 6

Барбиталовые буферные смеси (pH 6,8-9,5), содержащие натрия барбатал и соляную кислоту

pH	6,8	7,0	7,2	7,4	7,6	7,8	8,0	8,2	9,0	9,5
растворы	Соотношение растворов, мл									
C8H11N2NaO3 0,1 моль/л (20,62 г/л)	5,22	5,36	5,54	5,81	6,15	6,62	7,16	7,69	8,23	8,71
HCl 0,1 моль/л (конц. HCl пл = 1,19 8,5 мл/л)	4,78	4,64	4,46	4,19	3,85	3,38	2,84	2,31	1,77	1,29

Таблица 7

Карбонат-бикарбонатные буферные смеси (pH 9,2-10,8), содержащие натрия карботат и натрия гидрокарбонат

pH	9,2	9,4	9,5	9,8	9,9	10,1	10,3	10,5	10,8
растворы	Соотношение растворов, мл								
Na2CO3 x 10H2O 0,1 моль/л (28,62 г/л)	10	20	30	40	50	60	70	80	90
NaHCO3 0,1 моль/л (8,4 г/л)	90	80	70	60	50	40	30	20	10

Таблица 9

Трис-буферные смеси (pH 7,2-9,0), содержащие трис-(оксиметил)-аминометан и соляную кислоту

pH	7,2	7,4	7,6	7,8	8,0	8,2	8,4	8,6	8,8	9,0
растворы	Соотношение растворов <*>, мл									
C4H11O3 0,2 моль/л (24,2 г/л)	27,9	29,3	30,8	33,7	36,6	39,0	41,7	43,9	45,9	47,5
HCl 0,2 моль/л (конц. HCl пл = 1,19 17 мл/л)	22,1	20,7	19,2	16,3	13,4	11,0	8,3	6,1	4,1	2,5
* Смешивают растворы в указанных количествах и общий объем доводят до 100 мл.										

48. Методика контроля жидких инъекционных МИБП на механические включения

Механические включения - это посторонние подвижные нерастворимые вещества, кроме пузырьков газа, случайно присутствующие в препарате. На предприятиях осуществляется трехкратный контроль препаратов на механические включения: первичный - внутрицеховой сплошной (100% емкостей), вторичный - внутрицеховой выборочный (5% емкостей от серии) и третий - выборочный, осуществляемый ОБТК.

Требования к помещению и рабочему месту просмотрщика

Помещение для контроля чистоты препаратов должно быть защищено от прямого попадания солнечных лучей. Рабочее место просмотрщика должно быть оснащено просмотровым столом типа АП-9М или установкой типа KVLC-10 от автоматической линии розлива «Штрунк» (допускается оснащение столами и установками другого типа).

Контроль на механические включения проводится невооруженным глазом на черном и белом фонах. Зона контроля при просмотре должна быть освещена матовой электролампой или лампой дневного света. Освещенность зоны контроля должна быть не менее 2000 лк. Мощность источника света при контроле окрашенных растворов или бесцветных препаратов в емкостях из светозащитного стекла должна быть больше.

Техника и условия просмотра

Просмотрщик должен иметь зрение - 1, которое при необходимости корригируется очками. Через каждый 1,5 - 2 часа работы устанавливается 10-минутный перерыв.

Расстояние от глаз до объекта контроля должно быть в пределах 25 - 30 см, угол между оптической осью просмотра и направлением лучей света должен соответствовать примерно 90°. Глаза просмотрщика должны быть ограждены от попадания света непосредственно от источника, линия зрения должна быть направлена несколько книзу при вертикальном положении головы.

Просмотрщик берет в руку ампулы за капилляр, флаконы и бутылки за горловины, шприцы-тюбики за колпачки, вносит в зону контроля в положении «вверх донышком» и просматривает на черном и белом фонах. Затем плавным движением, не встряхивая, переводит их в положение «вниз донышком» и вторично просматривает на черном и белом фонах.

Установка KVLC снабжена линзами, обеспечивающими увеличение в 10 раз. При просмотре на этой установке препараты в зону просмотра подаются автоматически. Бутылки или флаконы вращаются в течение 2 сек., затем останавливаются, а раствор продолжает вращаться. Препараты освещаются снизу вверх. В момент, когда емкости находятся между матовым стеклом (снизу) и черным фоном (с боков), просмотрщик проводит браковку. После просмотра на установке емкости по транспортной ленте поступают на визуальный просмотр на белом фоне.

Емкости с препаратами, в которых обнаружены механические включения, отбраковываются на каждом этапе просмотра.

При проведении вторичного (выборочного) контроля при обнаружении более 2% емкостей с механическими включениями всю партию, от которой отобрана средняя проба, возвращают для первичного контроля.

При проведении контроля в ОБТК (третий выборочный) в случае обнаружения более 4% контролируемых единиц с механическими включениями проводят повторный контроль на удвоенном их количестве. Если при повторном контроле подтверждаются неудовлетворительные результаты, всю серию препарата бракуют и возвращают в цех (участок).

49. Методика контроля на механические включения сухих МИБП для парентерального введения, применяемых в виде раствора

Контроль препаратов на механические включения и все операции по вскрытию ампул (флаконов) и растворению их содержимого должны проводиться в условиях, исключающих попадание посторонних частиц в контролируемые образцы. Контролер должен работать в халате, шапочке из безворсовой ткани. Подготовка образцов должна проводиться в помещениях 2-го класса чистоты, а вскрытие, растворение, визуальный или инструментальный конт-

роль - на рабочем месте, соответствующем 1 классу чистоты. Оборудование, химическую посуду и принадлежности для работы после обработки 0,1%-ным раствором моющего средства промывают несколько раз горячей водой и ополаскивают профильтрованной водой, не содержащей механических включений.

Отобранные для контроля емкости освобождают от этикеток, с флаконов снимают металлические колпачки, емкости обмывают очищенной водой, не содержащей видимых невооруженным глазом механических включений, и подсушивают в ламинарном потоке стерильного воздуха. Ампулы вскрывают, нанося на капилляр насечки победитовым ножом и прикасаясь к краю насечки раскаленной молибденовой проволокой. После охлаждения капилляр осторожно снимают. Возможен любой другой способ вскрытия, исключающий попадание стекла в содержимое ампулы.

Растворитель в емкости вводят через горловину с помощью фильтрующего приспособления типа «Пистолет» или др. или промытым медицинским шприцем. Растворитель вводится в количестве, достаточном для полного растворения препарата (около половины емкости). Флаконы закрывают пробками. Для растворения МИБП используют очищенную воду или при необходимости другой растворитель, указанный в инструкции по применению препарата, предварительно профильтрованный через мембрану с диаметром пор не более 1,2 мкм. Для контроля растворителя берут 10 тщательно отмытых флаконов, вместимостью 10 мл, и с помощью промытого медицинского шприца или фильтрующего приспособления типа «Пистолет» вливают в каждую емкость по 5 мл растворителя. Флаконы закрывают резиновыми пробками, свободными от механических включений (МУ 64-3-95-83 и МУ 64-3-97-83), и просматривают визуально. Растворитель пригоден для испытания, если в 9 из 10 флаконов не обнаружено механических включений.

Контроль и подсчет количества частиц в препаратах может проводиться визуально или инструментально с помощью анализаторов механических примесей, основанных на фотометрическом принципе (типа ФС, Royco и др.). От каждой серии произвольно отбирают выборку не менее 5-ти емкостей.

Визуальный контроль

Порядок визуального контроля механических примесей такой же, как при контроле жидких МИБП по этому тесту. Однако при просмотре в руку берут 1 образец (ампулу держат слегка наклонно вверх капилляром, флакон - в любом положении). Емкость осторожно встряхивают и после выделения из раствора пузырьков газа подсчитывают механические включения. Время просмотра каждого бесцветного образца - 10 - 15 сек., окрашенного - 30 сек.

При обнаружении в выборке суммарно во всех емкостях 31 и более механических включений серию бракуют, при обнаружении 26 - 30 механических включений проводят контроль повторной выборки. Если число механических включений в двух выборках превысит суммарно 56 - серию бракуют.

При обнаружении в выборке хотя бы одной частицы стекла отбирают повторную выборку. Серию бракуют, если хотя бы в одной емкости повторной выборки обнаруживают 1 или более частичку стекла.

Инструментальный контроль

Порядок инструментального контроля и оценка его результатов подробно описаны в РДИ 42-1-89.

gost.e-ecolog.ru