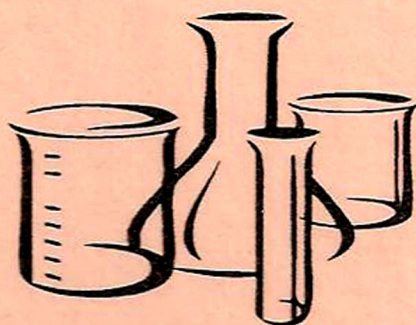
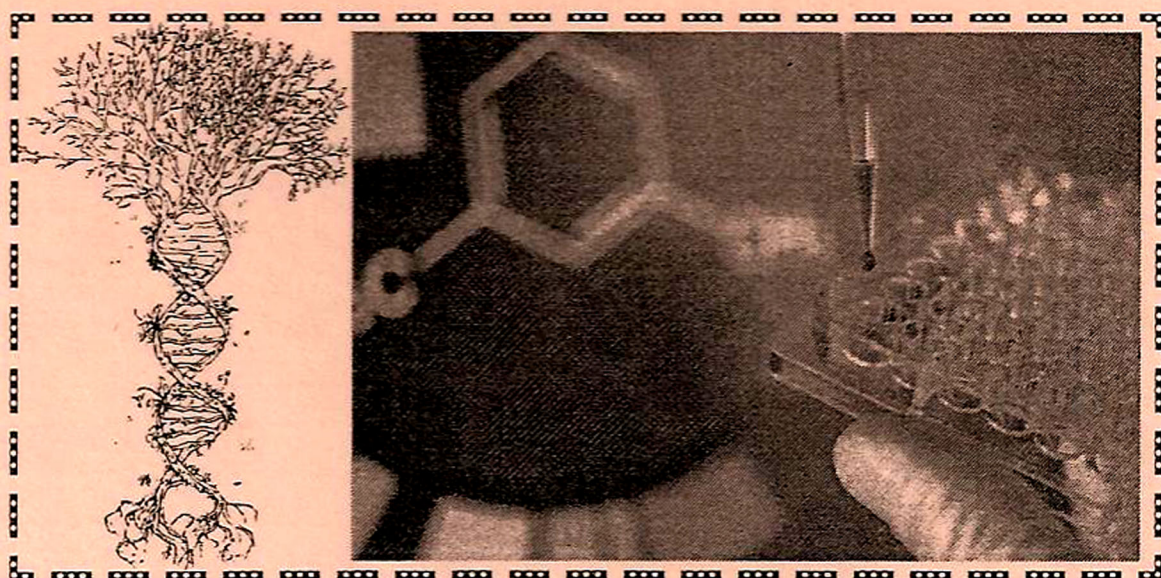


Ю. М. Краснопольский, Л. В. Северина



# ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ: ОСНОВЫ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ



Практикум

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ УКРАИНЫ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ  
«Харьковский политехнический институт»

**Ю. М. Краснопольский, Л. В. Северина**

**ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ:  
ОСНОВЫ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Практикум

для студентов направления подготовки «Биотехнология»,  
в том числе для иностранных студентов

Утверждено  
редакционно-издательским  
советом университета,  
протокол № 2 от 23.06.2016 г.

Харьков  
НТУ «ХПИ»  
2017

УДК 615.012 (075)  
ББК 52.6я7  
К78

Рецензенты:

*А. К. Гулевский*, д-р биол. наук, проф., Институт проблем криобиологии  
и криомедицины НАН Украины;  
*Е. М. Бабич*, д-р мед. наук, проф., ГП «Институт микробиологии и иммунологии  
им. И. И. Мечникова АМН Украины»

Практикум включає лабораторні методи дослідження необхідні для прове-  
дення контролю при розробці та виробництві основних продуктів фармацев-  
тичної біотехнології.

Призначений для студентів і аспірантів біотехнологічного напрямку під-  
готовки.

**Краснопольский Ю. М.**

К78 Фармацевтическая биотехнология: Основы лабораторных  
исследований : практикум / Ю. М. Краснопольский, Л. В. Северина.  
– Харьков : НТУ «ХПИ», 2017. – 208 с. – На рус. яз.

ISBN 978-617-05-0222-3

Практикум включает лабораторные методы исследований необходимых  
для проведения контроля при разработке и производстве основных продуктов  
фармацевтической биотехнологии.

Предназначен для студентов и аспирантов биотехнологического направ-  
ления подготовки.

Ил. 24. Табл. 10. Библиогр.: 29 назв.

УДК 615.012 (075)  
ББК 52.6я7

© Краснопольский Ю. М.,  
Северина Л. В., 2017

ISBN 978-617-05-0222-3

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>Введение</b> .....	5
<b>Раздел 1. Теоретические аспекты применения аналитических методов исследования в фармацевтической биотехнологии</b> .....	8
1.1. Измерение pH и буферные растворы .....	8
1.2. Хроматографические методы .....	12
1.2.1. Хроматография в тонком слое силикагеля .....	12
1.2.2. Высокоэффективная жидкостная хроматография .....	17
1.2.3. Эксклюзионная хроматография .....	27
1.2.4. Аффинная хроматография .....	30
1.3. Спектроскопические методы исследования .....	34
1.3.1. Спектрофотометрия в видимой и ультрафиолетовой областях .....	36
1.3.2. Колориметрия .....	48
1.4. Вискозиметрия .....	53
1.5. Оптическое вращение .....	58
1.6. Иммунохимические методы исследования .....	61
1.6.1. Иммунодиффузия .....	62
1.6.2. Иммуоферментный анализ .....	68
1.7. Методы определения биологической активности .....	71
1.7.1. Ферменты и определение их биологической активности .....	71
1.7.2. Гепарины и определение антикоагулянтной активности гепаринов .....	79
<b>Раздел 2. Фармацевтические биотехнологические продукты</b> .....	84
2.1. <b>Лабораторная работа 1.</b> Получение и контроль фосфолипидного комплекса, обогащенного фосфатидилхолином (лецитином) для использования в составе фармацевтических препаратов. Получение фармацевтических препаратов: искусственных мембран – липосом .....	84
2.2. <b>Лабораторная работа 2.</b> Изучение продуктов метаболизма в культуральной жидкости «чайного гриба» .....	101
2.3. <b>Лабораторная работа 3.</b> Характеристика моноклональных антител в составе лекарственных биотехнологических препаратов .....	113

2.4. <i>Лабораторная работа 4.</i> Выращивание штаммов микроорганизмов (пробиотиков) и контроль полученных продуктов .....	118
2.5. <i>Лабораторная работа 5.</i> Получение, выделение и контроль ферментативной активности бактериальной амилазы .....	128
2.6. <i>Лабораторная работа 6.</i> Определение протеолитической и створаживающей активности в препарате «Химопсин» .....	144
2.7. <i>Лабораторная работа 7.</i> Выделение фермента гиалуронидазы и определение ее биологической активности .....	154
2.8. <i>Лабораторная работа 8.</i> Проведение ферментативного гидролиза РНК панкреатической РНК-азой .....	159
<b>Раздел 3. Биотехнологические субстанции</b> .....	169
3.1. <i>Лабораторная работа 9.</i> Исследование биологической антикоагулянтной активности гепарина натрия .....	169
3.2. <i>Лабораторная работа 10.</i> Определение фракционного состава препаратов иммуноглобулинов .....	176
3.3. <i>Лабораторная работа 11.</i> Получение из растительного материала пектиновых веществ и их характеристика .....	181
3.4. <i>Лабораторная работа 12.</i> Исследование раствора бактериального декстрана в препарате «Реополиглюкин» .....	188
<b>Раздел 4. Иммунобиотехнологические продукты</b> .....	195
4.1. <i>Лабораторная работа 13.</i> Изучение реакции иммунопреципитации для идентификации антигенов вакцины против столбняка, дифтерии и коклюша .....	195
4.2. <i>Лабораторная работа 14.</i> Определение подлинности иммуноглобулинов крови человека методом иммунодиффузии .....	200
4.3. <i>Лабораторная работа 15.</i> Изучение продуктов иммунобиотехнологии методом иммуноферментного анализа (ИФА) .....	204
<b>Список литературы</b> .....	206

## ВВЕДЕНИЕ

На кафедре биотехнологии, биофизики и аналитической химии НТУ «ХПИ» проводится подготовка специалистов по современным направлениям исследований в области фармацевтической биотехнологии. Для студентов 4–5 курсов введены циклы лекций по ряду предметов: «Фармацевтическая биотехнология», «Биотехнология фармацевтических субстанций и биопрепаратов» и «Иммунобиотехнология».

Основные принципы подготовки специалистов в области фармацевтической биотехнологии на кафедре можно определить как:

- мультидисциплинарный характер образования, который основан на необходимых для будущих инженеров-биотехнологов дисциплинах: биофизика, биохимия, микробиология и вирусология, фармацевтическая и биоорганическая химия, фармакология, биология и др.
- практика на фармацевтических предприятиях и научно-исследовательских центрах, решающих вопросы фармацевтической биотехнологии, является обязательным компонентом учебного процесса.
- создание на кафедре биотехнологии, биофизики и аналитической химии специальных курсов и практикумов, посвященных современному развитию биотехнологии.
- постоянная связь учебного процесса как с фундаментальными научными исследованиями, направленными на изучение современных аспектов фармацевтической биотехнологии, так и с решением прикладных проблем при производстве фармацевтических препаратов на основе биотехнологии в условиях GMP.

Одним из актуальных направлений биотехнологии является фармацевтическая биотехнология, используемая для производства высокоэффективных лекарственных и диагностических препаратов.

Началом развития фармацевтической биотехнологии можно определить 1718 год, когда в Лондоне были начаты массовые прививки против одного из смертельных заболеваний – оспы. Вакцины явились первыми препаратами, полученными на основе биотехнологии. Ни одной медицинской науке человечество не обязано спасением стольких жизней, как фармацевтической биотехнологии и вакцинологии.

Вакцинопрофилактика доказала свою эффективность как наиболее экономичное средство предупреждения инфекционных болезней. Созданы вакцины против 34 социально значимых инфекций, что привело к значительному снижению заболеваемости дифтерией, столбняком, корью, туляремией, полиомиелитом и исчезновению оспы.

Невозможно сегодня представить нашу жизнь без рекомбинантных белковых субстанций, таких как инсулин, факторов некроза опухолей, моноклональных антител и антигенов. Препараты иммуноглобулинов последнего поколения и использование моноклональных антител подняли терапию на качественно новый уровень. Существенно изменилось лечение человека с созданием низкомолекулярных гепаринов, факторов свертываемости крови и антитромбиновых препаратов. Активно используется в клинике группа цитокинов, представленная интерферонами и интерлейкинами.

Высокий темп развития фармацевтической биотехнологии неразрывно связан с разработкой новых экспериментальных и теоретических методов исследования. Знание этих методов и умение их использовать позволит сегодняшним студентам в дальнейшем более эффективно развивать научные и производственные направления в фармацевтической биотехнологии.

Практикум по указанным курсам разработан сотрудниками кафедры биотехнологии, биофизики и аналитической химии НТУ «ХПИ» и включает описание современных приборов и методов: высокоэффективную жид-

костную хроматографию, аффинную хроматографию, хроматографию в тонком слое силикагеля, различные методы спектроскопии, иммунохимического анализа, методы определения биологической активности биофармацевтических препаратов и др.

Практикум состоит из 4 разделов. В первом разделе изложены теоретические аспекты применения аналитических методов исследования в фармацевтической биотехнологии. В 2,3 и 4 разделах приведены лабораторные работы по трем курсам: «Фармацевтическая биотехнология», «Биотехнология фармацевтических субстанций и биопрепаратов» и «Иммунобиотехнология». В данном Практикуме приведены методические описания поставленных задач, в которых теоретическими и экспериментальными методами изучают различные продукты фармацевтической биотехнологии: антигены, антитела, ферменты, пробиотики, низкомолекулярные гепарины и другие фармакологически активные вещества. Настоящий Практикум подготовлен на основе апробированных на кафедре биотехнологии, биофизики и аналитической химии НТУ «ХПИ» лабораторных работ.

Мы благодарим научные организации и фармацевтические предприятия в реализации проведения ряда лабораторных работ на их базе.

## РАЗДЕЛ 1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ АНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

### 1.1. Измерение pH и буферные растворы

На практике pH определяют экспериментально. **pH** – число, которое условно характеризует концентрацию ионов водорода в водных растворах. pH исследуемого раствора связано с pH стандартного раствора (pH<sub>s</sub>) следующим уравнением:

$$\text{pH} = \text{pH}_s - \frac{(E - E_s)}{k},$$

где  $E$  – потенциал электрода в исследуемом растворе, в вольтах;

$E_s$  – потенциал этого же электрода в растворе с известным pH (pH<sub>s</sub>), в вольтах;

$k$  – температурный коэффициент, измеряемый в вольтах, определяется по таблице (см. табл. 1).

Таблица 1 – Значения  $k$  при разных температурах

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

Потенциметрическое определение pH проводят путем измерения разницы потенциалов между двумя соответствующими электродами, погруженными в исследуемый раствор: один из электродов чувствительный к ионам водорода (обычно это один из видов стеклянных электродов, которые представлены на рис. 1), другой – электрод сравнения (например, насыщенный каломельный электрод, представленный на рис. 2).

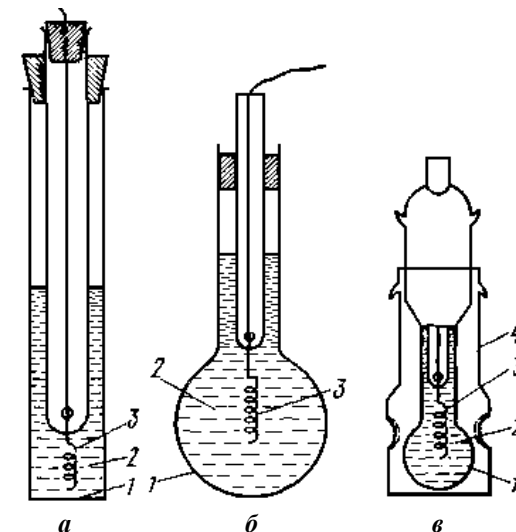


Рисунок 1 – Виды стеклянных электродов:  
а – электрод Мак-Иннеса; б – шариковый электрод;  
в – электрод с защитной муфтой;  
1 – стеклянная мембрана; 2 – 0,1 н раствор HCl;  
3 – хлорсеребряный электрод; 4 – защитная муфта

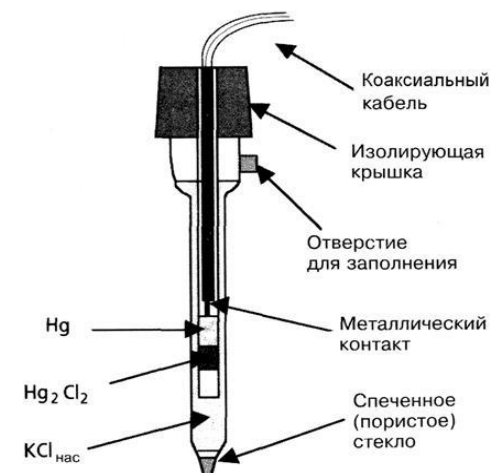


Рисунок 2 – Насыщенный каломельный электрод сравнения

**Прибор.** Измерительным прибором является вольтметр с входящим напряжением в 100 раз большим по сравнению с используемыми электродами. Прибор обычно градуируется в единицах рН и должен иметь такую чувствительность, чтобы можно было определить отличие как минимум 0,05 единиц рН или 0,0003 В. Применяемые для измерения рН оборудование состоит из стеклянного электрода, электрода сравнения с солевым мостиком и рН-метра. Конструкция стеклянного электрода (см. рис. 1): на конце стеклянной трубки электрода имеется тонкостенный шарик, сделанный из «мягкого» натриевого стекла с низкой точкой плавления. Толщина его стенок всего 0,005 см, поэтому обращаться со стеклянным электродом нужно очень осторожно, так как его легко повредить. Электрический контакт с внутренней стороной мембраны осуществляется через раствор, в который погружен внутренний хлорсеребряный электрод сравнения. Иногда в качестве внутреннего электрода сравнения применяют платиновый электрод, погруженный в 0,1 М раствор соляной кислоты, насыщенный гидрохиноном.

Э.д.с. создаваемую элементом, состоящим из стеклянного электрода и электрода сравнения, необходимо регистрировать с приборами, обладающими высоким сопротивлением, т.е. потребляющими незначительный ток в системе: большая сила тока вызывала бы изменения в концентрации ионов, а, следовательно, и рН.

**Методика.** Все измерения проводят при той же самой температуре в интервале от 20 °С до 25 °С, если нет других указаний в конкретной методике. В табл. 1 указывается зависимость значений рН от температуры для разных стандартных буферных растворов, используемых для калибрования. Если необходимо, то учитывают температуру поправки в соответствии с инструкцией предприятия изготовителя. Прибор калибруют при помощи буферного раствора калия гидрофталата (первичный стандарт) и одного из буферных растворов с другим значением рН. Показания прибора для третьего буферного раствора с промежуточным значением рН не должны отличаться более чем на 0,05 единиц рН от указанного значения рН этого раствора. Электроды погружают в исследуемый раствор и измеряют рН в тех же условиях, что и для буферных растворов. Если прибор

используют часто, его калибровки проводят регулярно. В ином случае калибровку прибора проводят перед каждым измерением. *Все буферные растворы должны быть приготовлены на воде, свободной от диоксида углерода, для чего ее необходимо прокипятить перед употреблением.* Вода, свободная от диоксида углерода, должна иметь рН 5,8–7,0.

Новые или высохшие электроды перед работой необходимо вымочить в течение нескольких часов при рН 7 в воде или буферном растворе. Рекомендуется также активировать электроды, выдерживая их от 12 до 24 часов в 0,1 М растворе соляной кислоты (однако эта процедура не обязательна). Электроды следует держать в дистиллированной воде, поскольку высушивание их приводит к изменению потенциала асимметрии, что требует частой калибровки прибора. Повторное вымачивание, как правило, восстанавливает электрод почти до нормального состояния, однако вследствие высыхания поверхность электродов изнашивается.

Для калибровки прибора необходимо иметь два буфера с разными рН. Исследуемый и стандартные буферные растворы должны иметь одну и ту же температуру. Ручку температурной компенсации необходимо установить в соответствующее положение. Стеклянный электрод (и внешний электрод сравнения, если он смонтирован отдельно) погружают в буферный раствор, осторожно перемешивают для приведения системы в равновесие. Прибор настраивают в соответствии с известным значением рН. Затем электроды вынимают из раствора и отмывают их дистиллированной водой. Просушивают фильтровальной бумагой, и после этого электроды погружают в другой буферный раствор; показания рН-метра должны соответствовать рН этого второго раствора. Отсутствие такого соответствия указывает на нарушения изоляции или повреждение электрода (трещины или царапины в мембране). На рис. 3 приведен общий вид передней панели потенциометра рН-340. Подсоединяют прибор к сети (220 В) с помощью сетевого шнура.

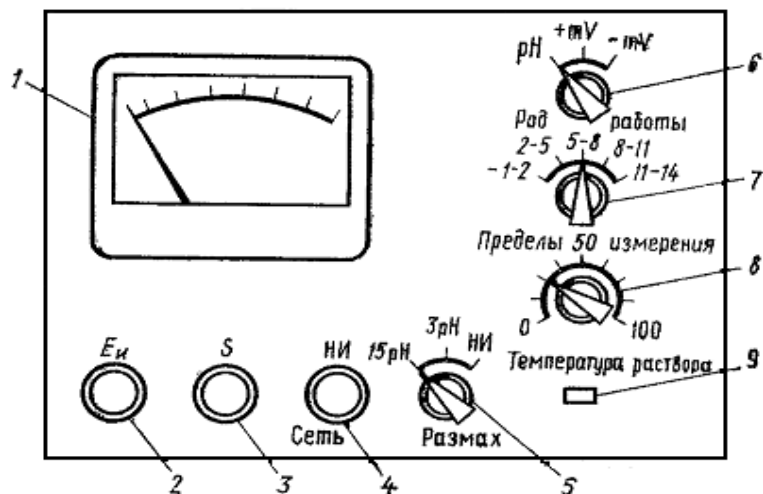


Рисунок 3 – Общий вид передней панели потенциометра рН-340:

1 – шкала прибора, градуированная в единицах рН и мВ;  
 2, 3 –  $E_{и}$  и  $S$  – ручки, предназначенные для настройки прибора по буферным растворам (калибровка стеклянного электрода); 4 – ручка включения; 5 – «размах» (служит для измерения на узком и широком диапазонах рН); 6, 7 – переключатели для включения прибора на род работы и требуемый предел измерения (соответственно); 8 – переменное сопротивление (служит для компенсации и изменения характеристик электродной системы при изменении температуры буферного раствора); 9 – светофильтр контрольной лампочки

## 1.2. Хроматографические методы

### 1.2.1. Хроматография в тонком слое силикагеля

Тонкослойная хроматография (ТСХ) представляет собой физико-химический метод разделения, при котором на хроматографической пластинке разделяется смесь веществ между неподвижной и подвижной фазой.

Неподвижная фаза (закрепленная, стационарная) состоит из слоя подходящего материала, нанесенного в виде стандартизованного тонкого

слоя и зафиксированного на основе (несущей пластинке) из стекла, металла, пластмассы.

Подвижная фаза (мобильная, элюирующая система) – это фаза, обеспечивающая перемещение разделяемых веществ по тонкому слою.

Материал, который анализируется, наносится на пластину. Разделение основано на процессах адсорбции, распределения, ионного обмена или их комбинации и осуществляется с помощью перемещения в тонком слое (неподвижной фазе) исследуемых веществ, растворенных в растворителе или соответствующей смеси растворителей (подвижной фазе).

### ОБОРУДОВАНИЕ:

**1. Пластинки.** Хроматографирование проводят с использованием пластинок, которые должны пройти предварительную подготовку. В ряде случаев может понадобиться промывание пластинок перед хроматографированием, которое может быть проведено с помощью предварительного элюирования чистых пластинок в подходящем растворителе. Пластинки могут быть импрегнированы (пропитаны) с помощью таких операций как элюирование, замачивания или опрыскивания. Перед использованием пластинки активируют, если необходимо, нагреванием в термостате при температуре от 100 °С до 105 °С в течение 1 часа.

**Оборудование для измерения непосредственно на пластинке** включает в себя:

- устройство для прямого нанесения в определенном месте пластины необходимого количества вещества;
- механическое устройство для передвижения пластины;
- самописец (регистрирующее устройство) и интегратор или компьютер;
- фотометр с источником света, оптический прибор, генерирующий монохроматический свет и фотоэлемент необходимой чувствительности (для веществ, поглощающих или флюоресцирующих в ультрафиолетовом или видимом свете для измерения отражения или пропускания);
- счетчик радиоактивности с необходимой проверкой линейности диапазона (для веществ, содержащих радионуклиды).

**2. Хроматографическая камера** представляет собой емкость из инертного прозрачного материала с плотно притертой крышкой и с плос-



ким дном или дном с двумя желобами, соответствующими по размеру пластинок, которые используются. Для горизонтального элюирования хроматографическая камера имеет желоб для подвижной фазы и дополнительно содержит устройство для подачи подвижной фазы к неподвижной фазе. На рис. 4 показан вид хроматографической камеры.

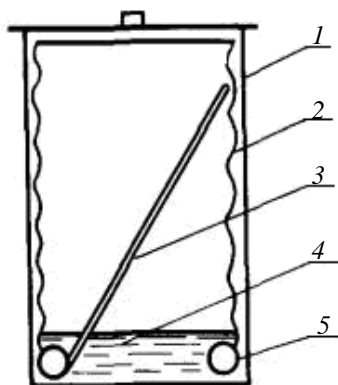


Рисунок 4 – Хроматографическая камера:

- 1 – хроматографическая камера; 2 – фильтровальная бумага;  
3 – хроматографическая пластина;  
4 – растворитель; 5 – стеклянная палочка

**3. Микропипетки, микрошприцы, калибровочные капилляры** или устройства, пригодные для нанесения растворов. Микропипетка вместимостью 0,002–0,010 см<sup>3</sup>; микрошприц вместимостью не более 0,01 см<sup>3</sup>.

**4. Реактивы для проявления.** Реактивы для выявления разделенных веществ с помощью опрыскивания, обработки парами.

**ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ:**

**Вертикальное элюирование (проявление).** Стенки хроматографической камеры выстилают фильтровальной бумагой. Подвижную фазу наливают в камеру в количестве достаточном для того, чтобы после смачивания фильтровальной бумаги наблюдалось покрытие дна камеры слоем жидкости, необходимом для проведения хроматографии. Для насыщения камеру с подвижной фазой закрывают крышкой и выдерживают в течение 1 часа

при температуре от 20 °С до 25 °С. Объем растворов анализируемых веществ, который определен в конкретной методике, наносят небольшими порциями, получая полосами или круглыми пятнами на подходящем расстоянии от нижнего края и от боковых краев пластины. Растворы наносят на линию, параллельную нижнему краю пластины с расстоянием не менее 10 мм между пробами. После испарения растворителя из нанесенных проб пластину помещают в хроматографическую камеру (как можно более вертикально) и следят за тем, чтобы пятна или полоски находились выше поверхности подвижной фазы. Камеру закрывают, оставляют её при температуре от 20 °С до 25 °С в месте, защищенном от прямых солнечных лучей. После того, как подвижная фаза пройдет необходимое расстояние, пластинку вынимают, сушат и проявляют пятна, указанным в используемой методике методом. В случае двухмерной хроматографии после первого хроматографирования пластинку сушат и выполняют вторую хроматографию в направлении перпендикулярном первому.

**Горизонтальное элюирование (проявление).** Объем раствора исследуемых веществ наносят небольшими порциями, получая круглые пятна (от 1 мм до 2 мм в диаметре) или полосками (длиной от 5 мм до 10 мм и шириной от 1 мм до 2 мм) на подходящем расстоянии от нижнего края и от боковых краев пластинки. Растворы наносят на линию, параллельную нижнему краю пластины с интервалом не меньше 5 мм между нанесенными пробами. После испарения растворителей из нанесенных проб в желоб хроматографической камеры вводят с помощью шприца или пипетки достаточное количество подвижной фазы, помещают пластинку горизонтально в хроматографическую камеру и присоединяют устройство для подачи подвижной фазы в соответствии с инструкцией производителя. Если в методике указано, то пластинку элюируют, начиная с двух концов. Камеру закрывают и проводят хроматографирование при температуре от 20 °С до 25 °С. После того как подвижная фаза пройдет необходимое расстояние, пластинку вынимают, сушат и проявляют пятна указанным методом. В случае двухмерной хроматографии после первого хроматографирования пластинку сушат и выполняют вторую хроматографию в направлении перпендикулярном первому.

## ВИЗУАЛЬНАЯ ОЦЕНКА:

**Идентификация.** Основное пятно на хроматограмме (результат хроматографического разделения), полученной для исследуемого раствора, сравнивают визуально с пятном на хроматограмме стандартного образца (раствор сравнения). *Сравнивают окрашивание* (цвет, флюоресценция), *размер и величину удерживания* обоих пятен.

*Величина удерживания* ( $R_f$ ) – это величина, определяемая отношением расстояния от центра пятна до старта к расстоянию от фронта подвижной фазы до старта ( $R_f = \frac{l_i}{l} \leq 1$ ). Величина  $R_f$  зависит от коэффициента распределения (адсорбции) и от соотношения объемов подвижной и неподвижной фаз. На рис. 5 показана хроматограмма, полученная при разделении смеси трех компонентов методом тонкослойной хроматографии.

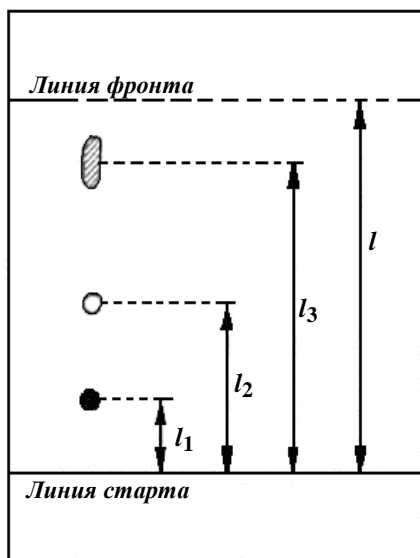


Рисунок 5 – Хроматограмма:

*линия старта* – место, на которое наносится раствор испытуемой пробы;  
*линия фронта* – место, которого достигла в данный момент подвижная фаза относительно старта

## КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ИЗМЕРЕНИЯ:

В том случае, если *вещества*, разделенные методом тонкослойной хроматографии, *поглощают или флюоресцируют в ультрафиолетовом или видимом свете* их можно количественно определять непосредственно на пластине, используя подходящее оборудование. Для этого измеряют отражение и пропускание падающего света, передвигая пластину или измерительный прибор. Аналогично, используя похожее оборудование, можно измерять флуоресценцию. *Вещества, которые содержат радионуклиды*, могут быть количественно *определены тремя способами*:

- непосредственно на пластине – передвижением пластины вдоль подходящего счетчика радиоактивности или счетчика радиоактивности вдоль пластины;
- разрезанием пластинки на линии и измерением радиоактивности в каждой полоске, используя подходящий счетчик радиоактивности;
- снятием слоя неподвижной фазы и растворением её в подходящем сцинтилляционном коктейле и измерением радиоактивности с использованием жидкостного сцинтилляционного счетчика.

### 1.2.2. Высокоэффективная жидкостная хроматография

*Высокоэффективная жидкостная хроматография* (ВЭЖХ) представляет собой метод хроматографического разделения, основанный на разнице распределения частиц между двумя фазами, которые не смешиваются. Подвижной фазой является жидкость (элюент), которая движется через неподвижную фазу, помещенную в колонку.

Жидкостная хроматография основана на механизмах адсорбции, массового распределения, ионного обмена или распределения по размерам молекул. В современной жидкостной хроматографии используют приборы различной степени сложности – от наиболее простых систем, до хроматографов высокого класса, снабженных различными дополнительными устройствами.

На рис. 6 изображен жидкостный хроматограф высокого класса «ЛЮМАХРОМ®». Жидкостный хроматограф «ЛЮМАХРОМ®» предназначен для качественного и количественного определения органических

веществ в сложных пробах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.



Рисунок 6 – Жидкостный хроматограф «ЛЮМАХРОМ®»

#### ОБОРУДОВАНИЕ:

Оборудование обычно состоит из системы подачи подвижной фазы, блока введения пробы (с использованием шприца или петлевого дозатора), хроматографической колонки, детектора и регистрирующего прибора.

**1. Устройства для подачи подвижной фазы** необходимы для подачи подвижной фазы с постоянной скоростью движения. Колебания давления при этом сводятся к минимуму, например, путем пропуска растворителя, который находится под давлением, через устройство уменьшающее импульсы. Трубопроводы и соединения способны выдерживать давление, которое создается в результате работы оборудования для подачи подвижной фазы. Насосы должны быть оборудованы системой для удаления пузырьков захваченного воздуха. Современные насосы для жидкостной

хроматографии представляют собой высокоточные устройства, обеспечивающие постоянную подачу растворителя в колонку и способные создавать давления до нескольких десятков МПа. Конструкция насоса определяется, прежде всего, рабочим давлением в системе.

Система, которая контролируется микропроцессором, должна точно подавать подвижную фазу постоянного состава (изократическое элюирование) или состава, который меняется (градиентное элюирование) в соответствии с установленной определенной программой. При градиентном элюировании существует устройство для подачи подвижной фазы. Устройство подает растворитель или растворители из нескольких емкостей, при этом смешивание растворителей происходит со стороны высокого или низкого давления относительно насоса (насосов).

**2. Блок введения пробы (инжектор).** Раствор исследуемого образца вводят в подвижную фазу, которая протекает в верхнюю часть колонки, используя блок ввода пробы, который может функционировать в условиях высокого давления. Используют дозаторы в виде петли или устройства с регулируемым объемом. Возможна подача образца в ручную или с помощью автосамплера. Необходимо отметить, что ручное заполнение петли может привести к снижению точности ввода объема пробы.

**3. Хроматографическая колонка.** Температуру хроматографической колонки поддерживают постоянно.

**Неподвижные фазы.** Существует много разновидностей неподвижных фаз, которые используют в жидкостной хроматографии:

- *силикагель, окись алюминия или пористый графит*, используемые в *нормально-фазовой хроматографии*, в которой разделение основано на разнице в адсорбции и / или массовом распределении;
- *смолы или полимеры с кислотными или основными группами*, которые используются в *ионно-обменной хроматографии*, в которой разделение основано на конкуренции между разделяемыми ионами и ионами подвижной фазы;
- *пористые силикагели и полимеры*, которые используются в *эксклюзивной хроматографии*, в которой разделение основано на разнице размеров молекул, соответствующих стерической эксклюзии;

- *множество химически модифицированных носителей*, полученных из полимеров, силикагеля или пористого графита, используемых в *обращено-фазовой хроматографии*, в которой распределение основано на разделении молекул между подвижной фазой и неподвижной фазой;

- *специально модифицированные неподвижные фазы*, например, производные целлюлозы или амилозы, протеинов или пептидов, циклодекстринов и др., используемые для разделения зеркальных изомеров (энантиомеров) в *хиральной хроматографии*.

Наиболее часто распределение основано на механизмах распределения между химически модифицированными силикагелями, которые используются как неподвижная фаза, и полярными растворителями, которые используются как подвижная фаза. Поверхность твердого носителя, например, силанольные группы силикагеля, взаимодействует с разными силановыми реагентами, образуя ковалентно-связанные силильные производные, которые охватывают количество, которое варьирует, активных участков поверхности твердого носителя. Природа связанных фаз является важнейшей характеристикой для определения разделяющих способностей хроматографической системы. В табл. 2 приведены обычно используемые связанные фазы.

Таблица 2 – Характеристика используемых фаз

Название группы	Структура фазы	Условные обозначения
Октильная	$\text{Si} - (\text{CH}_2)_7 - \text{CH}_3$	$\text{C}_8$
Октадецильная	$\text{Si} - (\text{CH}_2)_{17} - \text{CH}_3$	$\text{C}_{18}$
Фенильная	$\text{Si} - (\text{CH}_2)_n - \text{C}_6\text{H}_5$	$\text{C}_6\text{H}_5$
Цианопропильная	$\text{Si} - (\text{CH}_2)_3 - \text{CN}$	CN
Аминопропильная	$\text{Si} - (\text{CH}_2)_3 - \text{NH}_2$	$\text{NH}_2$
Диольная	$\text{Si} - (\text{CH}_2)_3 - \text{O} - \text{CH}(\text{OH}) - \text{CH}_2 - \text{OH}$	–

Если не существует других условий в методике, то обращенно-фазовые колонки на основе силикагеля считаются стойкими в подвижных фазах, если они выдерживают значение pH в диапазоне от 2,0 до 8,0. Ко-

лонки, заполненные пористым графитом или частицами полимерного материала, такого как сополимер стиролдивинилбензол, стабильны в более широком диапазоне pH.

В ряде случаев используют нормально-фазовую хроматографию с не модифицированными силикагелями, пористым графитом или полярными химически модифицированными силикагелями, например, цианопропильными или диольными в качестве неподвижной фазы с неполярной подвижной фазой.

Для разделения в аналитических целях чаще всего используют стационарные фазы с размером частиц от 3 мкм до 10 мкм. Частицы могут быть сферическими или неправильной формы, различной пористости и с характерной площадью поверхности. Эти параметры определяют хроматографические свойства конкретных неподвижных фаз. Для обращенных неподвижных фаз природа неподвижной фазы, степень связывания, выражается как содержание углерода, а также присутствием «эндкепирования» неподвижных фаз (т.е. силанизации остаточных силанольных групп) является дополнительными определяющими факторами. Если присутствуют остаточные силанольные группы, может возникать асимметрия пиков, особенно для веществ с основными свойствами.

В аналитической хроматографии используют колонки, изготовленные из нержавеющей стали с определенной длиной и внутренним диаметром. Колонки с внутренним диаметром менее 2 мм называют микроколонками. В большинстве случаев хроматографию проводят при комнатной температуре, однако, для повышения эффективности в ряде случаев колонки могут нагревать. Рекомендуется не нагревать колонки выше 60 °С, так как это может привести к разрушению неподвижной фазы и изменить состав подвижной фазы.

**Подвижные фазы.** Для нормально-фазовой хроматографии используют малополярные растворители. Содержание воды строго контролируется для получения воспроизводимых результатов. В обращенно-фазовой жидкостной хроматографии используют водные подвижные фазы с органическими модификаторами или без них.

Подвижную фазу обычно подают под давлением с одной или нескольких емкостей. Подвижная фаза проходит через блок введения пробы, колонку, а затем через детектор с заданной скоростью устройства.

Температура подвижной фазы должна постоянно поддерживаться в течение всего анализа.

Компоненты подвижной фазы обычно фильтруют с целью удаления частиц размером более 0,45 мкм. Многокомпонентные подвижные фазы готовят смешиванием необходимых объемов индивидуальных компонентов. Как альтернатива растворители могут быть поданы различными насосами или одним насосом с дозирующим клапаном, с помощью которого осуществляется смешивание в необходимых пропорциях. Растворители необходимо дегазировать перед использованием с целью устранения пузырьков газа в кювете детектора путем барботирования гелием, обработки ультразвуком или используя мембранно-вакуумные модули в режиме «on line».

Растворители для приготовления подвижной фазы должны быть свободны от стабилизаторов и прозрачны при длине волны детектирования, если используется ультрафиолетовый детектор. Используемые растворители и другие компоненты должны быть соответствующего качества. Корректировка pH, если необходимо, осуществляется для водного компонента подвижной фазы, а не для смеси. При использовании буферных растворов осуществляют соответствующие промывания системы смесью воды и органического модификатора подвижной фазы (5 % об/об) для предупреждения выпадения солей после окончания хроматографирования.

Подвижные фазы могут содержать другие компоненты, например, противоионы для ионпарной хроматографии.

**4. Детектор.** Используемый детектор должен обеспечивать определение тех количеств анализируемых веществ, которые элюируются из колонки. Обычно для детектирования используют абсорбционную спектрофотометрию; используют также дифференциальную рефрактометрию, флуориметрию, сжигание и электрохимические методы.

**5. Регистрирующий прибор** в простейшем случае состоит из дифференциального усилителя и самописца. В сложных хроматографических системах используется блок интерфейса, соединяющий хроматограф с пер-

сональным компьютером, который осуществляет не только сбор и обработку информации, но и управляет прибором.

На рис. 7 представлена блок-схема жидкостного хроматографа, содержащая минимально необходимый набор составных частей, в том или ином виде присутствующих в любой хроматографической системе.

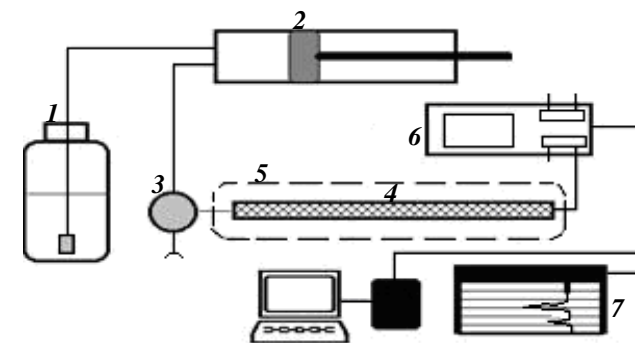


Рисунок 7 – Блок-схема жидкостного хроматографа:  
1 – сосуд для подвижной фазы; 2 – насос; 3 – инжектор; 4 – колонка;  
5 – термостат; 6 – детектор; 7 – регистрирующая система

#### ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ:

Колонку уравнивают указанным составом подвижной фазы. Готовят испытуемый раствор и раствор (растворы) сравнения, которые предлагаются в методике. Растворы не должны содержать твердых частиц. Используя растворы сравнения, настраивают прибор и подбирают объемы проб, которые вводятся и позволяют получить необходимый (адекватный сигнал). Выполняют повторные введения для проверки сходимости сигнала и проверяют, если необходимо, число теоретических тарелок. Вводят растворы и регистрируют результаты хроматографирования. Определяют площади пиков анализируемых компонентов. В случае если коэффициент симметрии, вычисленный, как описано ниже, имеет значения от 0,8 до 1,2, допускается проводить определение по высоте пиков. При использовании градиентного элюирования необходимо проводить определение по площадям пиков. При использовании внутреннего стандарта необходимо убедиться, что каждый из пиков анализируемого вещества или его примеси не

маскируется пиком внутреннего стандарта. Из полученных значений вычисляют содержание определяемого компонента или компонентов. Процентное содержание одного или нескольких компонентов анализируемой пробы (если указано в методике) определяют с помощью вычисления процентной части площади соответствующего пика или пиков к суммарной площади всех пиков, исключая пики растворителей или добавленных реагентов (метод внутренней нормализации). В этих случаях рекомендуется использование широкодиапазонного усилителя и автоматического интегратора.

**Коэффициент емкости ( $k'$ )** (известный также как **коэффициент распределения масс  $D_m$** ) определяют как:

$$D_m = k' = \text{КРНФ} / \text{КРПФ} = K \cdot (V_s / V_m),$$

где: КРНФ – количество растворенного вещества в неподвижной фазе;

КРПФ – количество растворенного вещества в подвижной фазе;

$K$  – равновесный коэффициент распределения;

$V_s$  – объем неподвижной фазы;

$V_m$  – объем подвижной фазы.

Коэффициент емкости компонента может быть определен из данных хроматограмм по формуле:

$$D_m = k' = \frac{t_R - t_{R'}}{t_{R'}},$$

где:  $t_R$  – расстояние вдоль базовой линии от точки ввода пробы до перпендикуляра, опущенного из максимума пика анализируемого компонента, (мм);

$t_{R'}$  – расстояние вдоль базовой линии от точки ввода пробы до перпендикуляра, опущенного из максимума пика неударживаемого компонента, (мм).

**Коэффициент симметрии ( $A_S$ )** пика может быть вычисленный по формуле:

$$A_S = \frac{b_{0,05}}{2A},$$

где:  $b_{0,05}$  – ширина пика на 5 % (1/20) его высоты;

$A$  – расстояние между перпендикуляром, опущенным из максимума пика и передней границей пика на 5 % (1/20) высоты пика.

**Коэффициент разделения ( $R_S$ )** может быть вычислен по формуле:

$$R_S = 1,18 \cdot (t_{Rb} - t_{Ra}) / (b_{0,5a} + b_{0,5b}), \quad \text{при } t_{Rb} \geq t_{Ra},$$

где:  $t_{Rb}$  и  $t_{Ra}$  – расстояние вдоль базовой линии от точки ввода пробы до перпендикуляров, опущенных из максимумов двух соседних пиков, (мм);

$b_{0,5a}$  и  $b_{0,5b}$  – ширина пиков на половине высоты, (мм).

Если отсутствуют другие значения в отдельных методиках, результаты считаются достоверными при коэффициенте разделения для измеряемых пиков на хроматограмме больше 1 ( $R_S > 1$ ).

**Число теоретических тарелок ( $N$ )** может быть вычислено из данных, полученных в изократическом режиме по формуле:

$$N = 5,54 \cdot \left( \frac{t_R}{b_{0,5}} \right)^2,$$

где:  $t_R$  – расстояние вдоль базовой линии от точки ввода пробы до перпендикуляра, опущенного из максимума пика анализируемого вещества, (мм);

$b_{0,5}$  – ширина пика на половине высоты, (мм).

**Соотношение сигнал / шум ( $S / N$ )** вычисляют по формуле:

$$S / N = \frac{2H}{h_n},$$

где:  $H$  – высота пика соответствующего компонента на хроматограмме, полученной для указанного раствора сравнения;

$h_n$  – абсолютное значение наибольшей флуктуации шума базовой линии на хроматограмме холостого опыта, обнаруженное в промежутке, который равен двадцатикратной ширине на половине высоты пика на хроматограмме раствора сравнения, расположенного равномерно около места расположения пика.

## ВИЗУАЛЬНАЯ ОЦЕНКА:

**Идентификация.** *Относительное время удерживания* – это отношение времени удерживания анализируемого вещества ко времени удерживания вещества, используемого в качестве стандарта.

Идентификацию обычно проводят одним из таких способов:

- 1) сравнение времени удерживания анализируемого вещества в изучаемой пробе и в растворе сравнения;
- 2) сравнение относительного времени удерживания анализируемого вещества в изучаемой пробе и в растворе сравнения;
- 3) сравнение хроматограммы анализируемого образца с хроматограммой раствора сравнения или с хроматограммой приведенной в других материалах (в другой статье).

Обычно используют первый способ. Второй способ целесообразно использовать, если возможна невоспроизводимость условий хроматографии. Третий способ можно использовать для образцов растительного или животного происхождения.

## КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ:

**Абсолютное калибрование.** Исследуемый раствор и раствор сравнения попеременно хроматографируют на жидкостном хроматографе, получая не менее пяти хроматограмм в условиях указанных в конкретной методике. Для исследуемого образца и раствора сравнения рассчитывают среднее значение площадей или высоты пиков анализируемого вещества. По полученным средним значениям площадей рассчитывают концентрацию анализируемого вещества в исследуемом образце.

**Метод внутреннего стандарта.** Для каждой хроматограммы первоначально рассчитывают отношение площади или высоты пика анализируемого вещества к площади или высоте пика внутреннего стандарта. Полученные соотношения усредняют для анализируемого раствора и раствора сравнения и по вычисленным средним значениям определяют концентрацию анализируемого вещества в исследуемом образце.

## КОНТРОЛЬ ПРИМЕСЕЙ:

Для контроля примесей обычно используют следующие подходы:

1. *Количественное определение примесей* при использовании раствора сравнения с известной концентрацией примеси (обычно в варианте аб-

солютного калибрования). Такой подход предполагает одинаковый отклик у примеси в присутствии и отсутствии основного вещества.

2. *Метод внутренней нормализации.* Такой подход предполагает выполнения линейности в широком диапазоне и требует учитывать отличия в откликах примеси и основного вещества. Этот метод часто используют для определения суммы примесей. При этом сумму площадей всех пиков на хроматограмме (без учета пика растворителей) принимают за 100 % и содержание каждой примеси определяют как часть площади пика этой примеси или суммы площадей пиков в общей площади всех площадей пиков на хроматограмме.

3. *Сравнение с разведенным раствором основного вещества.*

4. *Метод стандартных добавок.* К анализируемой пробе прибавляют известное количество примеси. По данным хроматографирования исследуемой пробы и исследуемой пробы с добавкой вычисляют содержание примеси. Для повышения точности возможно использование метода внутреннего стандарта.

## 1.2.3. Эксклюзионная хроматография

*Эксклюзионная хроматография* («exclusion» — исключение; имеется в виду исключение из гранул крупных молекул) представляет собой хроматографический метод, при котором процесс *распределения молекул в растворе происходит в соответствии их размерам*. В случае использования органической подвижной фазы метод называется *гель-проникающей хроматографией*, а в случае использования водной подвижной фазы – *гель-фильтрационной хроматографией*.

Малые молекулы в образце могут проникать внутрь гранул, вследствие этого они протекают через колонку медленнее. Крупные молекулы, которые не могут проникнуть в гранулы через поры, проходят сквозь колонку быстрее, чем более мелкие. Правильный размер пор и свойства растворителя являются решающими для хорошего разделения.

Различие степени доступности объема неподвижной фазы для молекул различных компонентов исходной смеси веществ является фактором, определяющим возможность их фракционирования. Очевидно, что оно будет происходить по размерам молекул. Если в составе смеси имеются

очень крупные молекулы, вовсе не проникающие внутрь гранул, то они будут выходить из колонки или достигать края хроматографической пластины вместе с передним фронтом подвижной фазы («фронтом элюции»). В то же время мелкие молекулы, свободно диффундирующие внутрь гранул, часть времени будут находиться в неподвижной фазе. Статистически эта часть времени одинакова для всех молекул такого размера и зависит от соотношения объемов жидкости в неподвижной и подвижной фазах. Таким образом, как показано на рис. 8, все мелкие молекулы достигнут конца хроматографического пути более или менее одновременно и заведомо позднее, чем крупные. Молекулы промежуточных размеров, для которых из-за разброса значений эффективных диаметров пор внутри гранул неподвижной фазы доступна только часть ее объема, должны, очевидно, перемещаться вдоль колонки или пластины с промежуточной скоростью.

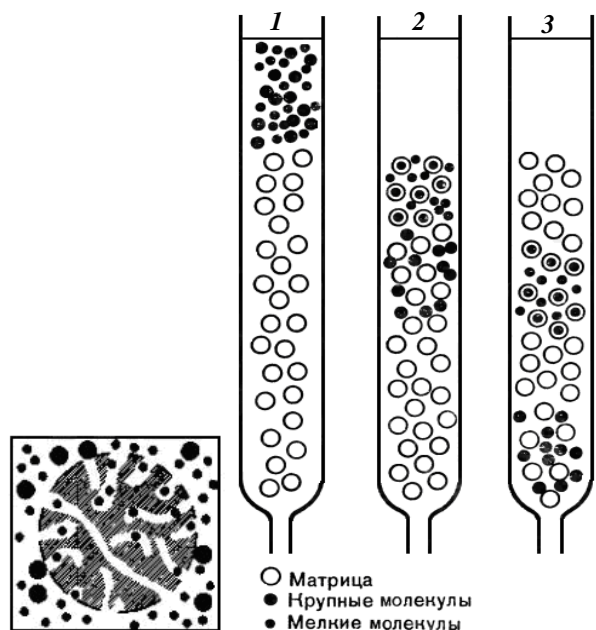


Рисунок 8 – Разделение веществ методом гель-фильтрации:  
1, 2, 3 – последовательные стадии разделения

#### ОБОРУДОВАНИЕ:

Оборудованием для проведения данного метода является хроматографическая колонка подходящих размеров, заполненная материалом, который обеспечивает распределение молекул по размерам в необходимом диапазоне. Колонки заполняют различными сорбентами: мягкими (сефадексы), полужесткими (полиакриламидные гели), жесткими (пористые стекла). При необходимости колонку термостатируют.

Через колонку с постоянной скоростью пропускают элюент. К одному концу колонки присоединяют устройство введения пробы, например, инжектор с ограничением потока, шприцевой инжектор с мембранной для введения пробы или петлевой инжектор с клапаном, которым прекращает поток. К этому же концу колонки может быть присоединен соответствующий насос для подачи элюента с контролируемой скоростью. Проба может наноситься непосредственно на сухую поверхность материала колонки или, если плотность пробы превышает плотность элюента, может наслаиваться на поверхность материала колонки под элюент. Другой конец колонки обычно присоединяют к соответствующему детектору с устройством, которое регистрирует и обеспечивает контроль относительных концентраций разделяющихся компонентов пробы. Обычно используют такие детекторы: фотометрический, рефрактометрический или люминесцентный. Если необходимо, может быть присоединен автоматический коллектор фракций. Как наполнитель может использоваться или мягкий материал, такой как набухший гель, или жесткий, такой как пористое стекло, силикагель или подходящий для данного растворителя поперечно-сшитый органический полимер. При использовании жестких материалов обычно используют принудительную подачу подвижной фазы, что ускоряет распределение. Подвижную фазу выбирают исходя из природы пробы, наполнителя и метода детектирования.

В отличие от других видов хроматографии на выполнение испытания требуются небольшие затраты времени. На рис. 9 показан прибор для проведения эксклюзионной хроматографии.





Рисунок 9 – Прибор для проведения эксклюзионной хроматографии

#### ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ:

Проба вводится в колонку, заполненную гелем или пористыми частицами наполнителя, и переносится подвижной фазой через колонку. Распределение по размерам происходит за счет многократных обменов молекул растворенного вещества между растворителем подвижной фазы и этим растворителем (неподвижная фаза) в порах материала, которым заполнена колонка. Диапазон размеров разделяемых молекул определяется диапазоном размеров пор наполнителя. Достаточно мелкие молекулы, способные проникать во все поры материала (столбика), элюируются в полном объеме колонки ( $K_T$  – *полный проникающий объем или предел эксклюзии*). Молекулы с размерами, превышающими размер всех пор материала колонки, мигрируют только сквозь пространство между частицами наполнителя, не задерживаемые им и элюируются в свободном объеме колонки ( $K_0$  – *объем эксклюзии или мертвый объем*). Распределение молекул по размерам происходит между свободным объемом и полным объемом колонки; наиболее эффективное разделение происходит в первых двух третях данного диапазона.

#### 1.2.4. Аффинная хроматография

*Аффинная хроматография (АХ)* – это разновидность адсорбционной лигандной хроматографии.

В биохимии и фармакологии *лиганд* – это химическое соединение (часто, но не всегда, малая молекула), которое образует комплекс с той или иной биомолекулой (чаще всего белком, например клеточным рецептором,

но иногда, например, с ДНК) и производит, вследствие такого связывания, те или иные биохимические, физиологические или фармакологические эффекты.

*Основной особенностью аффинной хроматографии* является наличие комплементарности (взаимодополнение) между иммобилизованным на матрице лигандом и вторым партнером пары взаимодействующих компонентов, который извлекается из смеси с другими, не комплементарными лиганду веществами. *Использование высокоизбирательного взаимодействия позволяет за одну стадию достичь очень высокой степени очистки искомого вещества.* Аффинное взаимодействие является нековалентным и может быть ослаблено путем изменения рН, ионной силы раствора, введения в раствор веществ, препятствующих образованию комплементарных связей.

*Очистка высокомолекулярных биологических соединений методом аффинной хроматографии* основана на уникальном свойстве макромолекул – их биологической специфичности. Именно благодаря этой особенности с помощью аффинной хроматографии теоретически можно получать абсолютно чистые вещества в отличие от таких методов разделения, как проникающая хроматография и электрофорез, основанных на физико-химических свойствах макромолекул. Аффинная хроматография применяется для очистки белков, антигенов, антител, ферментов, витаминов, гормонов, рецепторов и др. На рис. 10 показан прибор для разделения смеси белков методом аффинной хроматографии.



Рисунок 10 – Хроматографическая система Bio-Rad BioLogic LP

**Важными преимуществами аффинной хроматографии** являются:

- высокая избирательность;
- эффект концентрирования искомого вещества на аффинной матрице;
- освобождение от гидролитических ферментов.

**Выбор нерастворимой матрицы.** Идеальная нерастворимая матрица для аффинной хроматографии должна удовлетворять следующим требованиям:

- содержать большое число химических групп, способных ковалентно связываться с лигандом, и при сшивании с ним не разрушаться;
- не разрушаться при связывании и последующей элюции макромолекул;
- минимально взаимодействовать с другими молекулами, чтобы неспецифическое связывание было минимальным;
- обеспечивать быстрое протекание растворителя.

Обычно в качестве матрицы применяют однородные твердые сферические гранулы: агарозу и поперечно сшитые декстраны (например, сефароза 4В), полиакриламидные гели, производные целлюлозы, пористые стеклянные шарики и др.

**Выбор лиганда и его сшивание с матрицей.** Лиганд должен содержать определенную химическую группу, которая не участвует в специфическом связывании лиганда с макромолекулой, но посредством которой происходит его сшивание с матрицей. Чтобы в процессе смешивания с матрицей не нарушалась способность лиганда связываться макромолекулой, целесообразно связывать лиганд с матрицей с помощью удлинителей «мостиков».

Наиболее распространенный способ пришивания лиганда к матрице заключается в предварительной обработке полисахаридной матрицы бромцианом (CNBr) при pH = 11,0. Так же возможно использовать активированную бромцианом сефарозу 4В.

Бромциан реагирует с гидроксильными группами полисахарида с образованием карбаматных групп, а также с соседними гидроксильными группами (при их наличии) с образованием имидокарбонатных групп. Одновременно происходит образование поперечных связей внутри матричной

структуры геля, что способствует ее стабилизации. Удлиняющие «мостики» вводят несколькими способами, в частности при помощи диаминов типа  $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_x\text{NH}_2$  ( $x = 2-6$ ) или  $\epsilon$ -аминокапроновой кислоты. Окончательное сшивание замещенной матрицы с лигандом, который должен содержать определенную реакционноспособную группу (как правило, это амино- или карбоксильная группа), осуществляется при помощи соответствующих методов органического синтеза.

**Адсорбция и элюция при аффинной хроматографии на колонке.**

Колонка для аффинной хроматографии заполняется связанной с лигандом матрицей и уравнивается тем же буферным раствором, который используется для растворения исследуемого соединения. Буферный раствор должен иметь такие pH и ионную силу, чтобы обеспечить оптимальные условия для сшивания лиганда с белком. После нанесения исследуемого препарата и связывания макромолекул колонку промывают другими буферными растворами для удаления неспецифически адсорбированных примесей, а затем элюируют макромолекулы.

Характер элюции зависит исключительно от константы скорости. Если сродство макромолекулы к лиганду высоко, то даже в самых благоприятных условиях элюция будет протекать довольно медленно (1–2 часа). Обычно в элюирующий раствор добавляют свободный субстрат или ингибитор, что предотвращает повторное связывание макромолекул с лигандом. Лучше всего проводить элюцию при комнатной температуре (или при температуре несколько выше комнатной) и время от времени прекращать пропускание растворителя. Обычно pH и (или) ионную силу элюирующего раствора направленно изменяют, добавляя такие реагенты, как 0,1 М раствора уксусной кислоты или гидроокись аммония. При этом происходят небольшие изменения конформации макромолекул, способствующие высвобождению лиганда, но не вызывающие их денатурации.

**Примеры использования аффинной хроматографии.** Аффинная хроматография успешно применяется для выделения биологически активных веществ, которые используются в составе лекарственных и профилактических препаратов (вакцин).

Так, например, аффинную хроматографию используют для получения антигенов коклюша. Очистка коклюшного токсина хроматографией

проводится на колонках с аффинным сорбентом. Затем коклюшный токсин элюируют с колонки буферным раствором и подвергают диализу против трис-буфера (рН ≈ 8,0), содержащим 0,6 М натрия хлорида. Полученный раствор повторно хроматографируют на аффинном сорбенте и после элюирования и очистки ультрафильтрацией определяют содержание коклюшного токсина (не менее 98 %). Аналогично, дважды проводят очистку еще одного коклюшного антигена – филламентозного гемагглютина (степень чистоты не менее 98 %).

Используя аффинную хроматографию проводят выделение и очистку моноклональных антител. Выделяют моноклональные антитела путем аффинной хроматографии на сорбенте А-сефароза. Асцитную жидкость, содержащую моноклональные антитела центрифугируют для отделения осадка. Надосадочную жидкость диализуют против 0,1 М натрия фосфатного буфера (рН = 8,0) Полученный диализат наносят на колонку с протеин А-сефарозой предварительно уравновешенную натрий фосфатным буфером (рН = 8,0) и промывают тем же раствором до отсутствия белка. После этого связавшиеся с сорбентом моноклональные антитела элюируют 0,1 М натрия цитратным буфером (рН = 3,0). Полученный элюат концентрируют, например, ультрафильтрацией и используют для получения лекарственного препарата.

Активно используют в качестве лигандов различные рецепторы. Так, например, используя в качестве лиганда ганглиозиды, возможно выделение и очистка различных специфичных для них токсинов (анатоксинов): холерного, столбнячного или гангренозного.

### 1.3. Спектроскопические методы исследования

**Спектроскопия** – это изучение спектров различных видов излучения. Методы спектроскопии используются для исследования энергетической структуры атомов, молекул и макроскопических тел, образованных из них. Они применяются при изучении таких макроскопических свойств тел как температура и плотность, а в аналитической химии – для обнаружения и определения веществ.

К преимуществам спектроскопии относится возможность диагностики *in situ*, то есть непосредственно в «среде обитания» объекта, бесконтактно, дистанционно, без какой-либо специальной подготовки объекта.

Спектроскопические методы анализа основаны на избирательном поглощении электромагнитного излучения анализируемым веществом и служат для исследования строения, идентификации и количественного определения светопоглощающих соединений.

По объектам исследования обычно выделяют **виды спектроскопии**, каждый из которых использует набор методов:

- **Атомная спектроскопия** – исследование энергетических переходов между состояниями электронов на атомных орбиталях:
  - Атомно-абсорбционная спектроскопия (ААС);
  - Атомно-эмиссионная спектроскопия (АЭС);
  - Атомная флуоресценция.
- **Молекулярная спектроскопия** – исследование энергетических переходов между электронными, колебательными и вращательными уровнями энергии молекул.

В зависимости от используемой аппаратуры в фармацевтическом анализе различают следующие методы анализа, основанные на поглощении электромагнитного излучения и испускании света:

- Спектрофотометрия в ультрафиолетовой (УФ) и видимой областях;
- Колориметрия;
- Спектрометрия в инфракрасной (ИК) области;
- Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР);
- Масс-спектрометрия;
- Рамановская спектрометрия;
- Рентгеновская порошковая дифрактометрия.

Ряд длин волн, для которых проводятся измерения методами абсорбционной спектрофотометрии, охватывает спектральную область от коротких длин волн в УФ-области до ИК-области. Для удобства отнесений этот спектральный ряд делится на следующие диапазоны длин волн: УФ (от 190 нм до 380 нм), видимый (от 380 нм до 800 нм), ИК (от 0,76 мкм до 4 мкм).

### 1.3.1. Спектрофотометрия в видимой и ультрафиолетовой областях

Спектрофотометрические измерения в ультрафиолетовой (УФ) и видимой областях чаще всего проводят для растворов, хотя такие измерения могут быть проведены и для веществ, находящихся в парообразном, жидком и твердом состоянии.

Образец анализируемого вещества при спектрофотометрических определениях обычно растворяют в соответствующем растворителе. Для этих областей пригодны многие растворители, в том числе вода, спирты, хлороформ, низшие углеводороды, эфиры, разведенные растворы аммиака, едкого натра, хлористоводородной или серной кислоты. Следует использовать растворители, не содержащие примесей, поглощающих в данной спектральной области. Для спектрофотометрии выпускаются специальные растворители, гарантирующие отсутствие примесей.

#### ОБОРУДОВАНИЕ:

**1. Спектрофотометры**, предназначенные для измерений в УФ и видимой областях спектра, состоят из оптической системы, выделяющей монохроматическое излучение в области от 190 до 800 нм и обеспечивающей его прохождение через образец, и устройства для измерения оптической плотности.

Основными частями этих приборов являются: источник излучения, диспергирующий прибор (призма или решетка), щель для выделения полосы длин волн, кюветы для образцов, детектор излучаемой энергии, встроенные усилители и измерительные приборы. На рис. 11 показан внешний вид спектрофотометра СФ-26. Однолучевой спектрофотометр СФ-26 предназначен для измерения пропускания и оптической плотности растворов и твердых веществ в диапазоне 190–1000 нм.

В спектрофотометре индикатором служит фотоэлемент, ток в котором пропорционален интенсивности падающего на него света. В качестве источников света в *видимой области* применяются лампы накаливания, а в *ультрафиолетовой* – водородные или дейтериевые лампы.

Чтобы спектрофотометр работал хорошо, стабильно и долго его следует держать в чистой комнате, при постоянной температуре и влажности.

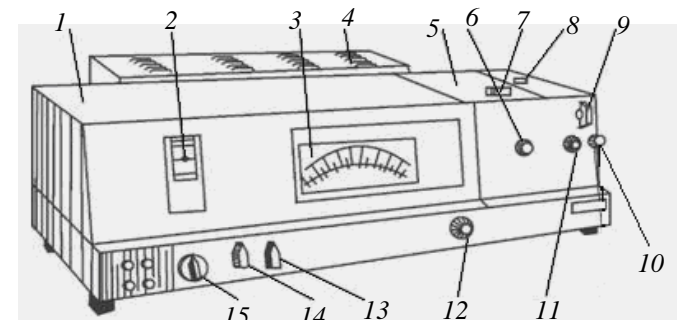


Рисунок 11 – Внешний вид спектрофотометра СФ-26:

- 1 – монохроматор; 2 – шкала длин волн; 3 – измерительный прибор (микроамперметр); 4 – осветитель с источником излучения и стабилизатором; 5 – кюветное отделение; 6 – рукоятка перемещения каретки с кюветами; 7 – камера с фотоприемниками и усилителем; 8 – рукоятка переключения фотоприемников; 9 – рукоятка установления чувствительности; 10 – рукоятка установления «0»; 11 – рукоятка шторки; 12 – рукоятка раскрытия входной и исходной щелей (щели открываются в пределах 0,01–2 мм); 13 – рукоятка «Отсчет»; 14 – рукоятка компенсации; 15 – рукоятка установки длин волн

**2. Монохроматоры.** *Монохроматор* – это оптическая система, выделяющая из всего спектра источника света излучение определенной длины волны. Это **обычно призмы**, по-разному преломляющие свет разных длин волн. В *видимой области* используются обычные *стеклянные призмы*. Но в *ультрафиолетовой области* они не годятся, поскольку стекло начинает поглощать уже при  $\lambda < 400$  нм, поэтому *призмы делают из кварца*. На самом деле к образцу от монохроматора поступает не монохроматическое излучение, а свет в некотором диапазоне длин волн, называемом *спектральной шириной щели (S)*. При анализе спектров используется понятие *ширина полосы ( $\Delta\lambda$ )* – диапазон длин волн, в котором интенсивность прошедшего света больше половины интенсивности при длине волны максимума пика. Эта величина зависит как от ширины щели  $S$ , так и от обратной линейной дисперсии материала призмы ( $d\lambda / dS$ ). Величина  $d\lambda / dS$ , как видно из табл. 3, зависит от длины волны. Данная таблица хорошо иллюстрирует также, насколько лучше в видимой области применять стеклянные призмы, чем кварцевые.

Таблица 3 – Зависимость обратной линейной дисперсии от длины волны

Длина волны, нм	Обратная линейная дисперсия $d\lambda / dS$ – кварц	Обратная линейная дисперсия $d\lambda / dS$ – стекло
200	0,5	–
300	2,3	–
400	6,2	2,4
500	12,0	5,5
600	21,5	10,0
800	40,0	24,0
1000	55,0	40,0

**В качестве монохроматоров** применяются также **дифракционные решетки**, которые представляют собой плоскопараллельную пластину с нанесенными на ней параллельными линиями – бороздками. Белый свет из-за дифракции на параллельных бороздках разлагается в непрерывный спектр. Обычно в монохроматорах сначала выделяют пучок света с определенным диапазоном длин волн с помощью призмы, а затем разлагают его еще раз решеткой. Так получают строго монохроматический свет. *Основное достоинство дифракционных решеток* в том, что *можно увеличивать их разрешающую способность*, поскольку она прямо пропорциональна плотности линий. Кроме того, во всем диапазоне длин волн *дифракционные решетки имеют линейное разрешение*, тогда как разрешение призмного монохроматора с увеличением длины волны уменьшается.

**3. Кюветы.** *Кювета* – это оптически прозрачный сосуд для измерений, куда помещают исследуемое вещество, растворенное в соответствующем растворе. Для определения поглощения только исследуемого вещества используется кювета сравнения, идентичная кювете с образцом; в неё наливают только растворитель. Перед проведением измерений кюветы сравнивают. Поскольку стекло поглощает ультрафиолетовый свет, для проведения измерений в этой области спектра используют кварцевые кюветы. Для работы с летучими или химически активными веществами кюветы закрывают.

Поскольку кювета, помещенная в спектрофотометр, становится составной частью его оптической системы, с ней нужно обращаться очень аккуратно. Царапины и грязь на стенках кюветы сильно рассеивают и поглощают свет, искажая результаты измерений. Особенно об этом надо помнить при работе в ультрафиолетовой области. Поскольку органические молекулы поглощают в ультрафиолетовой области, ни в коем случае нельзя касаться руками оптических стенок кюветы и вообще стараться по возможности меньше брать кюветы в руки. Раствор лучше заливать в кюветы, поставив их в предварительно вынутый из прибора кюветодержатель. Манипулируя с пипетками, необходимо помнить, что кюветы довольно хрупки, особенно кварцевые, поэтому заполнять их нужно, не касаясь стенок пипеткой.

Содержимое кюветы должно быть гомогенным – это необходимое условие получения воспроизводимых данных. Нужно следить за тем, чтобы раствор не был мутным. Особенно мешают измерениям пузырьки воздуха, сильно увеличивающие рассеяние. Нельзя наливать в кювету очень холодный раствор, поскольку при этом на наружных стенках кюветы конденсируются пары воды воздуха, и стенки становятся непрозрачными.

Если кюветы загрязнены посторонними примесями, их следует промыть дистиллированной водой и (или) растворителем, в котором растворено исследуемое вещество. Кюветы можно мыть мягкими серными детергентами, но стараться не пользоваться горячими концентрированными кислотами или щелочами, а также другими травящими агентами. Как правило, для работы применяют кюветы с оптическим путем 1 см, заливая в них 2,5–3 мл.

**4. Фотоэлементы.** *Фотоэлементы* преобразовывают световую энергию в электрическую. Электрический сигнал затем усиливается и регистрируется. Фотоны, бомбардируя поверхность фотоэлемента, выбивают из нее электроны, количество которых пропорционально интенсивности света. Эти электроны летят к положительному электроду. В результате в замкнутой цепи возникает электрический ток, который регистрируется по падению напряжения на сопротивлении, находящимся в этой цепи. Напряжение можно усилить, и, после компенсации такого сигнала потен-

циометром, отградуированном в единицах поглощения, на датчике регистрируются непосредственно поглощения образца.

Обычные фотозаэлементы наиболее чувствительны к свету с длиной волны  $\lambda \approx 400$  нм и мало чувствительны к свету с длинами волн  $\lambda > 550$  нм. Поэтому для работы в этой области необходимы специальные фотозаэлементы, обладающие достаточной чувствительностью в данном спектральном диапазоне. Теоретическая точность таких фотозаэлементов  $1 \pm 0,003$  единиц поглощения, т.е. 0,3 %.

Фотоумножители более чувствительны, чем простые фотозаэлементы. Это происходит из-за того, что электроны, вылетевшие из фоточувствительного слоя, ускоряются высоким напряжением, а из-за соударений в газе возникают вторичные электроны, что и приводит к возрастанию тока.

#### СПЕКТР ПОГЛОЩЕНИЯ:

**Спектр поглощения вещества** представляет собой зависимость количества поглощенного света от длины волны. Спектры поглощения в ультрафиолетовой и видимых областях отражают переходы связанных и несвязанных электронов в молекуле. Это обычно делокализованные  $\pi$ -электроны двойных  $C = C$  связей и общие пары азота и кислорода.

Для получения спектра поглощения необходимо измерить экстинкцию (оптическую плотность) при различных длинах волн.

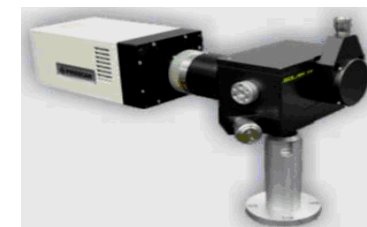
**Ширина щели** – это важный параметр, который определяет тот диапазон длин волн, при которых на самом деле проводятся измерения.

**Экстинкция** (от лат. *extinctio* – гашение) или **оптическая плотность** – это мера ослабления пучка света прозрачными объектами (такими, как кристаллы, стекла, фотоплёнка) или отражения света непрозрачными объектами (такими, как фотография, металлы и т.д.) при его распространении в веществе за счёт действия поглощения света и рассеяния света.

Поглощение в видимой и ультрафиолетовой областях можно регистрировать глазом в первом случае или фотографированием в обоих случаях. Такие приборы называются соответственно **спектроскопами** или **спектрографами** (см. рис. 12).



Спектроскоп



Спектрограф

Рисунок 12 – Внешний вид спектроскопа и спектрографа

Измеряемая экстинкция (оптическая плотность), как правило, зависит от размера щели. Это обусловлено двумя факторами: во-первых, от размера щели зависит диапазон длин волн света, падающего на образец, а во-вторых, чувствительность фотозаэлемента зависит от длины волны. Поэтому для получения надежных данных надо работать при минимально узкой для данных условий эксперимента щели. Если щель выбрана правильно, при изменении её размеров вдвое экстинкция не меняется. Обычно нулевое значение поглощения устанавливают щелью (на ряде спектрофотометрах это делают, изменяя усиления тока или напряжения фотозаэлемента). Такая регулировка позволяет работать при постоянной ширине щели.

**Основной закон поглощения света.** Оптическая плотность ( $A$ ) или экстинкция ( $E$ ) раствора вычисляется как десятичный логарифм отношения потока излучения падающего на объект, к потоку излучения прошедшего через него (отразившегося от него), то есть это есть логарифм от величины, обратной к коэффициенту пропускания (отражения)  $T$ . Коэффициент пропускания обычно измеряется в процентах и меняется от 0 до 100 %.

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

где  $I_0$  – интенсивность падающего монохроматического излучения;

$I$  – интенсивность прошедшего монохроматического излучения.

$$A = E = \lg \left( \frac{1}{T} \right) = \lg \left( \frac{I_0}{I} \right)$$

Экстинкция (оптическая плотность) – величина безразмерная и изменяется от 0 до ∞.

При отсутствии других физико-химических факторов, согласно **закону Бугера – Ламберта – Бера** измеренная оптическая плотность ( $A$ ) или экстинкция ( $E$ ) пропорциональна длине пути ( $l$ ), через которое проходит излучение, и концентрации ( $c$ ) вещества в растворе в соответствии с уравнением:

$$A = E = \varepsilon \cdot c \cdot l,$$

где  $\varepsilon$  – молярный коэффициент экстинкции светопоглощения;

$l$  – оптический путь или толщина светопоглощающего слоя, см;

$c$  – молярная концентрация вещества в растворе, мол/л.

Физический смысл молярного коэффициента поглощения становится ясен, если принять  $l = 1$  см,  $c = 1$  моль/л, тогда  $A = E = \varepsilon$ . Следовательно, молярный коэффициент поглощения равен оптической плотности одномолярного раствора с толщиной слоя 1 см. *Молярный коэффициент поглощения – индивидуальная характеристика вещества*, он зависит от природы вещества и длины волны и не зависит от концентрации и длины кюветы. Размерность величины  $\varepsilon$  обычно не указывают, а приводят численное значение. Значение  $\varepsilon$  отражает способность вещества поглощать свет; максимально возможное значение  $\varepsilon$  составляет  $\approx 10^5$ .

Поскольку молярный коэффициент экстинкции, как правило, довольно большой, используют другую величину – *удельный показатель поглощения* – поглощение света образцом в 1 см, содержащим однопроцентный раствор исследуемого вещества ( $E^{1\%}_{1\text{ см}}$ ) или ( $A^{1\%}_{1\text{ см}}$ ).

**Проверка шкалы оптической плотности.** Проверяют значения оптических плотностей, используя раствор калия дихромата Р при длинах волн, указанных в табл. 4., в которой приведены точные значения удельного показателя поглощения и его допустимые пределы для каждой длины волны. Раствор калия дихромата готовится следующим образом: от 57,0 мг до 63,0 мг (точная навеска) калия дихромата Р, предварительно высушенного до постоянной массы при температуре 130 °С, растворяют в 0,005 М растворе кислоты серной и доводят до 1000,0 мл этим же растворителем.

Таблица 4 – Значения удельного показателя поглощения и его допустимые пределы

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

Если нет других требований, обозначенных в отдельной методике, измерение оптической плотности проводят при указанной длине волны с использованием кюветы длиной 1 см и при температуре  $(20 \pm 1)$  °С, при сравнении с тем же растворителем или той же смесью растворителей, в которой растворено исследуемое вещество. Оптическая плотность растворителя, измеренная против воздуха при указанной длине волны не должна превышать 0,4 и желательнее, чтобы она была меньше, чем 0,2. Спектр поглощения представляют таким образом, чтобы оптическая плотность или её определенная функция были приведены на оси ординат, а длина волны или определенная функция от длины волны – на оси абсцисс. Если в отдельной методике приводят лишь одно значение для расположения максимума поглощения, то это означает, что полученное значение максимума не отличается от указанного больше, чем на  $\pm 2$  нм.

Закон Бугера – Ламберта – Бера применим не для всех систем. Во-первых, при поглощении света образец может ионизоваться, а при высоких концентрациях – полимеризоваться. Иногда образец при облучении коагулирует, образуя мутную суспензию. Эти эффекты увеличивают или уменьшают экстинкцию.

#### КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ИЗМЕРЕНИЯ:

С помощью спектрофотометрии в видимой и ультрафиолетовой областях можно изучать ряд важных биологических соединений. Например, измеряя поглощение белков при 280 нм, а нуклеиновых кислот при 260–270 нм – длинах волн, соответствующих максимуму поглощения этих соединений. Экстинкция белка при 280 нм зависит от содержания в нем ароматических аминокислот – тирозина и триптофана, потому что значения

молярной экстинкции при 280 нм для всех белков различны, и для определения содержания каждого из них требуется индивидуальная калибровочная кривая. Как правило, биотехнологи работают со смесью белков, и тогда можно пользоваться градуировочной кривой, полученной для белка или смеси белков со средним содержанием тирозина и триптофана. Это может быть сывороточный альбумин или смесь сывороточных белков. Таким образом, для контрольных измерений надо выбирать соответствующий белок.

**1. Однокомпонентный одноволновой анализ.** Однокомпонентный одноволновой анализ или «обычная спектрофотометрия» – это количественное определение одного из компонентов раствора с помощью измерения оптической плотности раствора испытуемого образца при одной аналитической длине волны (АДВ). Такой анализ может проводиться методом показателя поглощения (МПП) или методом стандарта (МС).

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

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

где:  $A_{1\text{см}}^{1\%}$  – удельный показатель поглощения анализируемого компонента при АДВ.

При использовании МС количественное определение проводят с помощью измерения при АДВ оптической плотности ( $A$ ) раствора исследуемого образца и оптической плотности ( $A_0$ ) раствора сравнения с концентрацией  $c_0$  и расчетом концентрации ( $c$ ) анализируемого компонента, исходя из формулы:

$$\frac{c}{c_0} = \frac{A}{A_0}.$$

Измерение оптических плотностей исследуемого раствора и раствора сравнения необходимо проводить в одних и тех же условиях с минимальным интервалом времени. В общем случае наиболее надежным является

МС. Возможность использования МПП необходимо в каждом конкретном случае обосновывать, исходя из допуска количественного содержания анализируемого компонента, метрологических характеристик методики и требований к спектрофотометру. Обычно МПП применим при допусках содержания анализируемого компонента не менее  $\pm 10\%$  от номинального содержания.

Во всех случаях использования одноволнового однокомпонентного анализа необходимо, чтобы остальные компоненты препарата не оказывали существенного влияния на результаты. Обычно доля их суммарного поглощения в оптическом поглощении образца при АДВ не должна превышать 1/10 части допусков содержания анализируемого компонента.

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

**2. Многокомпонентный спектрофотометрический анализ.** Многокомпонентный спектрофотометрический анализ используют для одновременного количественного определения компонентов исследуемого образца (препарата). В отличие от «обычной спектрофотометрии», спектрофотометрическая ошибка многокомпонентного анализа определяется не только классом прибора, но значительно зависит от состава анализируемого раствора (препарата) и особенно от выбора аналитических длин волн. Эта ошибка может быть охарактеризована коэффициентом усиления ( $K$ ), который показывает, во сколько раз спектрофотометрическая ошибка определения данного вещества в анализируемой смеси с помощью многокомпонентной спектрофотометрии превышает спектрофотометрическую ошибку определения этого самого вещества в чистом растворе (без других компонентов) методом «обычной спектрофотометрии».

Обычными являются величины  $K = 5-10$ , но возможны значения  $K = 100$  и больше, что может привести к общей ошибке анализа, что составляет десятки и даже сотни процентов. Для получения надежных ре-



результатов при количественном определении вещества в смеси других компонентов коэффициент усиления не должен превышать 5 ( $K \leq 5$ ).

Поэтому прогноз ошибки определения и сравнения её с пределами содержания анализируемого компонента является обязательным условием при обосновании использования методик многокомпонентной спектрофотометрии. Если отсутствует соответствующее обоснование, то должно выдерживаться следующее соотношение между полной относительной ошибкой количественного определения  $k$ -ого компонента анализируемого образца ( $\Delta_{k, r}, \%$ ) и допусками ( $\pm B, \%$ ) содержания этого компонента в образце:

$$\Delta_{k, r} \leq 0,32 \cdot B,$$

$$\Delta_{k, r} = 2 \cdot S_{ck, r},$$

где  $S_{ck, r}$  – относительное генеральное стандартное отклонение полной ошибки количественного определения  $k$ -ого компонента анализируемого образца.

*Количественное определение* в многокомпонентном спектрофотометрическом анализе базируется на уравнении:

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

где  $A_i$  – оптическая плотность исследуемого раствора при  $i$ -ой длине волны;

$E_{ij}$  – показатель поглощения (зависимый от способа выражения концентрации)  $j$ -ого компонента в образце при  $i$ -ой длине волны;

$c_j$  – концентрация  $j$ -ого компонента образца.

Для решения данного уравнения могут быть использованы различные подходы, среди которых можно выделить три основных:

- *метод наименьших квадратов* (МНК) – является обобщенным методом показателя поглощения одноволнового однокомпонентного анализа. При использовании этого метода не требуется использование стандартных образцов;

- *модифицированный метод наименьших квадратов* (ММНК) – является одним из вариантов обобщения метода стандарта на случай многокомпонентной спектрофотометрии. Недостатком ММНК является необходимость приготовления точной номинальной смеси образца, однако он является самым надежным и точным из всех многоволновых методов количественного определения лекарственных средств;

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

**3. Производная спектрофотометрия.** Данный метод основан на тех же принципах, что и «обычная спектрофотометрия», однако, аналитическим сигналом служит не оптическая плотность, а её производная  $n$ -го порядка (обычно по длине волны). При проведении производной спектрофотометрии используется преобразование исходного спектра поглощения (нулевой порядок) в производные спектров первого, второго и более высоких порядков. Внешний вид спектральной полосы поглощения, а также её первой и второй производных представлен на рис. 13.

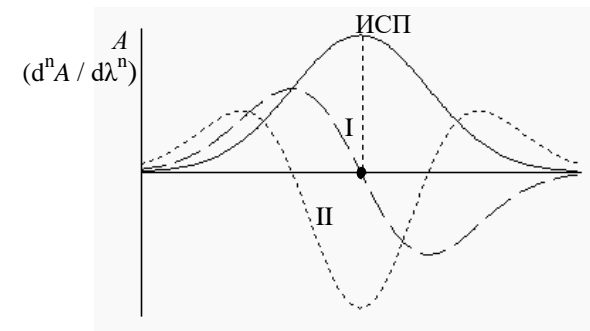


Рисунок 13 – Спектральная полоса поглощения и ее производные:

ИСП – исходный спектр поглощения (нулевой порядок);

I – производная спектра 1-го порядка; II – производная спектра 2-го порядка

**Первая производная полосы поглощения**, описываемой законом нормального распределения, имеет два пика – положительный, соответствующий максимальной скорости увеличения оптической плотности ( $A$ ), и отрицательный, соответствующий максимальной скорости уменьшения оптической плотности ( $A$ ). Максимум  $A$  находится в точке пересечения первой производной с нулевой линией. Аналогичный вид имеют и другие производные нечётного порядка. **Контур второй производной** и других производных чётного порядка похож на исходный спектр, но имеет меньшую ширину. **Основное преимущество производных спектров** – уменьшение ширины пиков. Полуширина пика второй производной в 3 раза меньше полуширины исходной полосы поглощения, полуширина пика четвёртой производной – в 5 раз.

### 1.3.2. Колориметрия

**Колориметрия** – это визуальное определение концентрации вещества по интенсивности окраски раствора на простейших оптических приборах (колориметр Дюбоска, фотометр Пульфриха). В фотоколориметрии и колориметрии измеряют интенсивность света, прошедшего через окрашенный раствор, цвет которого дополняет цвет поглощенного света.

Колориметрия широко применяется в аналитической химии, в том числе для гидрохимического анализа, в частности – для количественного анализа содержания биогенных веществ в природных водах, для измерения рН, в медицине, фармации, а также в промышленности при контроле качества продукции.

**Колориметр** не «измеряет» цвет, а *производит* его *сравнение* (оценку) относительно некоего образца цвета. Колориметры подразделяются на визуальные и фотоэлектрические.

**Визуальный колориметр** – это прибор, в котором некоторое излучение (цветовой стимул) заполняет одну часть поля зрения, а другая прилегающая часть (поле сравнения) может заполняться одним за другим известными стимулами. Оператор, наблюдающий оба эти поля, регулирует стимул в поле сравнения до тех пор, пока он не станет неотличимым (по его мнению) от исходного неизвестного стимула. Известные показания регулировок принимаются в качестве характеристики цвета исследуемого стимула.

**Фотоэлектрический колориметр** в конструкции не содержит поля сравнения, сигналы регистрируются с помощью фотоэлемента. Фотоэлектрический колориметр позволяет получить более точные результаты, чем визуальный, поскольку исключает человеческий фактор и особенности работы органа зрения.

В колориметрии количество вещества определяется по интенсивности окраски или светопоглощению окрашенных соединений. Раствор или предмет кажутся окрашенными, если он по-разному пропускает или поглощает видимый свет различных длин волн. В видимой области цвет раствора обусловлен длиной волны излучения, не поглощенного этим раствором. Например, раствор, поглощающий излучение в синей части спектра ( $\lambda \approx 435$  нм), окрашен в желтый цвет, т.е. синий цвет является дополнительным к окраске раствора. В табл. 5 приводятся такие данные для всей области видимого излучения.

Таблица 5 – Цвета видимого излучения

Наблюдаемый цвет (цвет раствора)	Область максимального поглощения, нм	Дополнительный цвет (поглощаемое излучение)
Зелено-желтый	380–420	Фиолетовый
Желтый	420–440	Синий
Оранжевый	440–470	Голубой
Красный	470–500	Голубовато-зеленый
Пурпурный	500–520	Зеленый
Фиолетовый	520–550	Желто-зеленый
Синий	550–580	Желтый
Голубой	580–620	Оранжевый
Голубовато-зеленый	620–680	Красный
Зеленый	680–780	Пурпурный

Основное применение спектрофотометров и фотоколориметров в лаборатории – точная колориметрия, т.е. измерение количества хромофора, образующегося в ходе реакции.

Многие соединения, слабо поглощающие в видимой области, после реакции с другими веществами дают окрашенные продукты, количество которых однозначно связано с концентрацией исходного вещества. Такую цветную реакцию используют для обнаружения этих веществ. При некоторых стандартных условиях и определенных концентрациях вещества про-

водят реакцию, а затем измеряют поглощение смеси. В качестве сравнения используют ту же смесь, но без исследуемого вещества. При помощи этого контрольного образца изменением ширины щели устанавливают нулевое значение экстинкции. После ряда измерений строят график зависимости поглощения образца от концентрации исследуемого вещества. Теперь, когда нужно определить количество вещества, в стандартных условиях проводят реакцию, измеряют поглощение образца и по градуировочной кривой определяют концентрацию исходного вещества. В биотехнологических и биохимических исследованиях этот способ применяется довольно часто, поскольку во многих случаях удается подобрать такие реакции, когда незначительные количества вещества дают интенсивное окрашивание. В табл. 6 приведены некоторые часто применяемые цветные реакции.

Таблица 6 – Общие колориметрические количественные определения

Определяемое вещество	Используемые реагенты	Длина волны, нм
1	2	3
Неорганические фосфаты	Молибдат аммония; H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 1,2,4-амино-нафтол; NaHSO <sub>3</sub> ; Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	660
Аминокислоты	Нингидрин Соли меди	570 (пролин 420) 620 или 230
Белки (пептидные связи)	NaOH; (K, Na) виннокислый; CuSO <sub>4</sub>	540
Фенол, тирозин	Реактив Фолина (фосфомолибдат; соли меди; фосфовольфрамат)	660 (750)
Белки	Реактив Фолина Биурет	660 540
Углеводы	Фенол; H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Разная (например, для глюкозы – 490; для ксилозы – 480)
Восстановленные сахара	Антрагон (антрагон, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	620 или 625
Пентозы	Биал (орсин, этанол, FeCl <sub>3</sub> , HCl); Цистеин, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	665 380–415

Продолжение таблицы 6

1	2	3
Гексозы	Карбазол, этанол, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; Цистеин, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; Молибдат мышьяка	540 или 440 380–415 500–570
Глюкоза	Глюкозоксидаза; пероксидаза; о-дианизидин; фосфатный буфер	420
Кетогексоза	Резорцин; тиомочевина, уксусная кислота; HCl	520
	Карбазол, этанол; цистеин; H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	560
	Дифениламин, этанол; ледяная уксусная кислота; HCl	635
Гексозамины	Реактив Эрлиха (диэтиламинобензальдегид, этанол; HCl)	530
ДНК РНК	Цистеин; H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	420
	Биал	665
α-Оксикислоты	Динитрофенилгидразин; Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ; этилацетат	435
Стероиды	Реагент Либермана – Бухардта (уксусный ангидрид / H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> / хлороформ)	625 425 (гормоны)

При проведении данных реакций необходимо помнить следующее:

1. Измерение поглощения следует проводить в дополнительной для цветной реакции области спектра. Так, если при реакции раствор окрашивается в желтый цвет, нужно измерять поглощение этим раствором синего цвета.

2. Исследовать цветную реакцию лучше всего в максимуме поглощения – этим достигается наибольшая чувствительность. Если положение максимума неизвестно, его следует определить. Такие предосторожности гарантируют получение хороших результатов даже на малочувствительном приборе.

3. В кювете с контрольным раствором обязательно должны содержаться все компоненты, кроме исследуемого вещества.

4. Контрольный раствор должен быть приготовлен очень тщательно, поскольку от этого зависит получение правильных результатов.

5. Если зависимость линейна, для получения хорошей градуировочной кривой нужно не менее пяти точек. Для нелинейной кривой их нужно существенно больше. Построение градуировочной кривой позволяет исключить точки, поглощение для которых получено ошибочно.

6. Измерение концентрации необходимо проводить дважды, и на кривую наносить оба значения, а не их среднюю величину. Такой способ построения наглядно показывает точность определения концентрации по полученной градуировочной кривой. Кроме того, он позволяет сразу обнаружить неправильные измерения по их сильному отклонению от кривой.

7. Калибровочные кривые, полученные с реагентами разных партий, как правило, не совпадают. Поэтому при смене реагента градуировочную кривую необходимо получить заново.

8. Наилучшая кривая, проведенная по всем экспериментальным точкам, не обязательно должна точно проходить через нуль. Это связано с тем, что для поглощающего контрольного раствора практически невозможно получить точно такое же соотношение всех компонентов, как и для образца.

9. Не следует экстраполировать градуировочную кривую к значениям экстинкции, лежащим выше последних экспериментально полученных данных. Если нет крайней необходимости работать при поглощении, близком к 1,0, все измерения нужно проводить в интервале 0,0–0,6, тогда результаты будут наиболее точными. Это связано с тем, что шкала поглощений логарифмическая.

10. Если поглощение образца лежит за пределами градуировочной кривой, надо заново приготовить раствор такой концентрации, чтобы попасть на градуировочную кривую. Можно поступить проще: разбавить образец, приготовленный для первого определения, одновременно разбавить точно так же и контрольную смесь. Эти операции правомочны, однако, лишь в том случае, если поглощение образца подчиняется закону Бугера – Ламберта – Бера. Обе пробы – и исследуемую, и контрольную – правиль-

нее разбавлять таким же раствором, как и в контрольном препарате, но если концентрация реагента не важна, можно разбавлять оба раствора другим растворителем. Лучше, однако, не разбавлять растворы, а воспользоваться тонкими кюветами (с меньшим оптическим путем).

11. В колориметрических определениях воспроизводимость данных более важна, чем выполнение закона Бугера – Ламберта – Бера. Как и при всех аналитических процедурах, для экспериментатора важно именно совпадение данных, указывающее на точность количественного определения, а не конкретная схема проведения измерений. Результаты будут идентичны, если экспериментатор работает на исправной аппаратуре, тщательно измеряет все сливаемые объемы и контролирует время и температуру опыта.

#### 1.4. Вискозиметрия

**Вискозиметрия** – это совокупность методов измерения вязкости. Преимуществом этих методов являются техническая доступность, относительная простота интерпретации результатов исследования. Вискозиметрия остается наиболее востребованным методом для контроля качества сырья и готовой продукции.

**Вязкость («внутреннее трение»)** – это одно из явлений переноса, свойство текучих тел (жидкостей и газов) оказывать сопротивление перемещению одной их части относительно другой, приводимой в движение внешними силами при определенных условиях окружающей среды. В результате работа, затрачиваемая на это перемещение, рассеивается в виде тепла.

При измерении вязкости жидкости различают ньютоновские (идеальные) и неньютоновские жидкости (большинство жидкостей, которые нас окружают).

*Ньютоновская жидкость* подчиняется при своём течении закону вязкости (внутреннего трения) Ньютона, то есть *её вязкость зависит только от температуры жидкости и не зависит от скорости сдвига* (по крайней мере, в области ламинарного потока). Практическим следствием

этого является одинаковое значение вязкости при одной и той же температуре для одной и той же жидкости даже на вискозиметрах разных систем.

*Неньютоновские жидкости* отклоняются от закона Ньютона. Такие вещества при увеличении скорости перемешивания разжижаются (кремы и мази) или, наоборот, загущаются (суспензия крахмала). Для этих жидкостей *вязкость перестает быть константой и меняется в зависимости от скорости сдвига*. Чтобы охарактеризовать вязкость данной жидкости, нужно указать не только температуру, но и скорость сдвига, при которой проводилось измерение. Среди неньютоновских жидкостей различают тиксотропные и реопексные жидкости. Если вязкость жидкости со временем уменьшается, то жидкость называют *тиксотропной*, а если, наоборот, увеличивается, то – *реопексной*.

Прибор для измерения вязкости называется *вискозиметром*. По способу определения и типу вискозиметра различают динамическую, кинематическую и условную вязкости.

**1. Динамическая вязкость или коэффициент динамической вязкости ( $\eta$ )** – это тангенциальная сила сопротивления, которое возникает при перемещении со скоростью 1 см/с двух слоев жидкости площадью в 1 см<sup>2</sup>, находящихся друг от друга на расстоянии 1 см. В единицах СИ динамическая вязкость выражается в Паскаль-секундах (Па · с).

$$\eta = \frac{F}{S \cdot g}; \quad g = \frac{dV}{dy},$$

где  $F$  – сила внутреннего трения;

$S$  – площадь соприкосновения слоев;

$g$  – градиент скорости, характеризующий быстроту изменения величины скорости в направлении нормали к поверхности трущихся слоев или скорость деформации сдвига.

Динамическая вязкость жидкостей уменьшается с увеличением температуры, и растёт с увеличением давления.

Для измерения динамической вязкости применяются динамические вискозиметры: ротационные, пузырьковые и вискозиметры «падающего шарика». На рис. 14 представлен внешний вид программируемого ротационного вискозиметра Brookfield DV модели DV -II+ Pro.



Рисунок 14 – Динамический ротационный вискозиметр Brookfield DV модели DV -II+ Pro

Кроме классической динамической вязкости часто используют *удельную вязкость* ( $\eta_{удел}$ ), которая показывает, какой вклад вносит в вязкость раствора присутствие растворенного вещества:

$$\eta_{удел} = \frac{\eta - \eta_1}{\eta_1},$$

где:  $\eta$  – динамическая вязкость раствора;

$\eta_1$  – динамическая вязкость растворителя.

Удельную вязкость, отнесенную на единицу концентрации раствора, называют *приведенной вязкостью* ( $\eta_{прив}$ ):

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

где:  $c$  – концентрация раствора.

Для растворов полимеров, например декстранов, вязкость является функцией молекулярных масс, формы, размеров. Для определения структурных характеристик полимеров приведенную вязкость экстраполируют к нулевой концентрации. В этом случае вводят понятие *характеристической вязкости* ( $[\eta]$ ):

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \eta_{прив} = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{удел}}{c}.$$

Отношение вязкости вещества ( $\eta$ ) к вязкости растворителя ( $\eta_0$ ) называют **относительной вязкостью** ( $\eta_{\text{отн}}$ ):

$$\eta_{\text{отн}} = \frac{\eta}{\eta_0}.$$

**2. Кинематическая вязкость** ( $\nu$ ) может быть получена как отношение динамической вязкости к плотности вещества и своим происхождением обязана классическим методам измерения вязкости, таким как измерение времени вытекания заданного объема через калиброванное отверстие под действием силы тяжести.

$$\nu = \frac{\eta}{\rho},$$

где  $\eta$  – коэффициент динамической вязкости;

$\rho$  – плотность жидкости.

В единицах СИ кинематическая вязкость выражается в  $\text{м}^2 / \text{с}$ , в единицах СГС – в сантистоксах (сСт):  $1 \text{ сСт} = 10^{-6} \text{ м}^2 / \text{с}$ .

Для измерения кинематической вязкости применяются капиллярные вискозиметры, в которых жидкость течет под воздействием силы земного притяжения. Это наиболее часто встречающиеся в лабораториях приборы, которые легко термостатировать, погружая в прозрачную водяную баню.

На рис. 15 представлен внешний вид капиллярного вискозиметра Viscosizer 200, который позволяет быстро и в автоматическом режиме проводить точный и неразрушающий анализ вязкости и размера молекул в биофармацевтических препаратах, используя критически малые объемы образцов, начиная от 10 мкл.



Рисунок 15 – Капиллярный вискозиметр Viscosizer 200, Malvern Instruments (Великобритания)

**3. Условная вязкость** ( $E_t^\circ$ ) – величина, косвенно характеризующая гидравлическое сопротивление течению, измеряемая временем истечения заданного объема раствора через вертикальную трубку (определенного диаметра). Измеряют условную вязкость в градусах Энглера (по имени немецкого химика К.О. Энглера) и обозначают – °ВУ. Данная величина является фактически безразмерной и отражает отношение времени (с) истечения 200 мл испытываемой жидкости ко времени истечения (с) 200 мл дистиллированной воды при температуре 20 °С.

Условную вязкость до 16 °ВУ переводят в кинематическую вязкость по таблице ГОСТ, а условную вязкость, превышающую 16 °ВУ, по эмпирической формуле:

$$\nu = 7,4 \cdot 10^{-6} \cdot E_t^\circ,$$

где  $\nu$  – кинематическая вязкость, ( $\text{м}^2 / \text{с}$ );

$E_t^\circ$  – условная вязкость при температуре  $t^\circ$ , (°ВУ).

На рис. 16 представлен внешний вид вискозиметра Энглера, который представляет собой трубку определенного диаметра, через которую протекает 200 мл жидкости.



Рисунок 16 – Вискозиметр Энглера 1-31Е

**Метод капиллярной вискозиметрии.** Капиллярная вискозиметрия (определение кинематической вязкости) наиболее часто используется для контроля растворов фармацевтических препаратов.

Определение кинематической вязкости проводят, используя подходящий капиллярный вискозиметр при температуре  $(20 \pm 0,1)$  °С, если не указана другая температура в используемой методике. Время вытекания жидкости от одной отметки вискозиметра до другой измеряется секундомером с точностью до одной пятой секунды. Полученные данные являются приемлемыми при условии, что результаты двух последовательных измерений отличаются не более чем на 1,0 %.

Значения кинематической вязкости  $\nu_1$  и  $\nu_2$  рассчитывают, используя измеренные значения времени истечения  $t_1$  и  $t_2$ , и постоянную вискозиметра  $k$  по формуле:

$$\nu_{1,2} = k \cdot t_{1,2},$$

где  $\nu_{1,2}$  – определяемые значения кинематической вязкости  $\nu_1$  и  $\nu_2$  соответственно, (мм<sup>2</sup> / с);

$k$  – калибровочная постоянная вискозиметра, (мм<sup>2</sup> / с<sup>2</sup>);

$t_{1,2}$  – измеренные значения времени истечения  $t_1$  и  $t_2$  соответственно, с.

Постоянную  $k$  определяют с использованием *соответствующего фармакопейного вещества* для калибрования вискозиметров.

Кинематическую вязкость рассчитывают как среднее арифметическое  $\nu_1$  и  $\nu_2$ .

Далее рассчитывают динамическую вязкость  $\eta$ , выраженную в миллипаскаль-секундах (мПа · с), используя рассчитанное значение кинематической вязкости  $\nu$  и плотности  $\rho$ :

$$\eta = \nu \cdot \rho,$$

где:  $\nu$  – кинематическая вязкость, (мм<sup>2</sup> / с);

$\rho$  – плотность исследуемого раствора при температуре определения кинематической вязкости, полученная умножением относительной плотности ( $d^{20}$ ) на 0,9982, (мг / мм<sup>3</sup>).

### 1.5. Оптическое вращение

**Оптическое вращение** – это способность вещества (соединения) вращать (поворачивать) плоскость поляризации при прохождении через него поляризованного света. Этим свойством обладают *некоторые вещества*, которые называются *оптически активными*. В настоящее время из-

вестно много таких веществ: кристаллические вещества (кварц), чистые жидкости (скипидар), растворы некоторых оптически активных веществ (соединений) в неактивных растворителях (водные растворы глюкозы, сахара, молочной кислоты и другие). Все они делятся на два типа:

- вещества, которые в любом агрегатном состоянии оптически активны (камфара, сахара, винная кислота);
- вещества, которые активны в кристаллической фазе (кварц).

Когда поляризованный луч света пропускают через оптически активное вещество, тогда плоскость поляризации изменяется и поворачивается на некоторый определенный угол  $\alpha$  – угол оптического вращения плоскости поляризации.

**Угол оптического вращения**  $[\alpha]^{20}_D$  вещества в растворе представляет собой угол вращения  $\alpha$ , выраженный в градусах (°), плоскости поляризации при длине волны линии D спектра натрия ( $\lambda = 589,3$  нм), измеренный при температуре 20 °С (или при температуре указанной в методике), рассчитанный для толщины слоя испытуемого вещества 1 дециметр в пересчете на содержание 1 грамма вещества в 1 миллилитре раствора.

Значение угла вращения конкретного оптически активного вещества зависит от его природы, от его толщины слоя, от длины волны света. Значение угла  $\alpha$  для растворов также зависит от концентрации содержащегося вещества (оптически активного) и от природы растворителя. Если заменить растворитель, то может измениться угол оптического вращения, как по величине, так и по знаку.

Величина этого угла определяется с помощью специальных оптических приборов – поляриметров. Для измерений используют поляриметры различных систем, но все они основаны на одном принципе работы. На рис. 17 представлен универсальный поляриметр.



Рисунок 17 – Универсальный поляриметр

Для измерения оптического вращения луч света от лампы внутри поляриметра сначала проходит через поляризатор для получения определенной ориентации плоскости поляризации, и затем уже поляризованный луч света проходит через исследуемый образец, который размещают между поляризатором и анализатором. Сам термин «поляризация» (греч. *polos* – ось) означает возникновение направленности световых колебаний.

Если образец является оптически активным, то его плоскость поляризации поворачивается. Далее поляризованный луч света с измененной плоскостью поляризации попадает в анализатор и не может полностью пройти через него, происходит затемнение. А чтобы луч света прошел через анализатор полностью, его необходимо повернуть на такую величину угла, которая будет равна величине угла вращения плоскости поляризации исследуемым образцом.

Существует два возможных источника света. *Галогенные лампы* (более дорогие и более долговечные) производят белый свет, а для выработки монохромного света желаемой длины волны требуется интерференционный светофильтр. Фильтр вставляется во входное отверстие света поляризатора. Таким образом могут производиться измерения на различной длине волны без трудоемких изменений аппарата (галогенная лампа не требует замены). *Натриевая спектральная лампа* (для получения более высокой абсолютной точности) испускает свет определенной волны (линейный спектр). Для блокировки нежелательных боковых спектральных линий, используется фильтр из цветного стекла. Он также вставляется во входное отверстие света поляризатора.

Поляриметрическим методом проводят *испытания по* идентификации веществ (оптически активных), проверки их чистоты и количественного анализа. Чистоту вещества оценивают по величине удельного оптического вращения, которая является константой.

**Удельное оптическое вращение**  $[\alpha_m]_{\lambda}^t$ , указанное в радианах (рад), представляет собой вращение, вызванное слоем жидкости или раствора толщиной 1 метр, который содержит 1 кг оптически активного вещества в 1 м<sup>3</sup> при прохождении сквозь него поляризованного света с длиной волны  $\lambda$  при температуре  $t$ . Для практических целей удельное оптическое вращение  $[\alpha_m]_{\lambda}^t$ , обычно выражают в миллирадианметрах квадратных на кило-

грамм (мрад.м<sup>2</sup> / кг). Для удельного оптического вращения вещества в растворе всегда указывают используемый растворитель и концентрация раствора.

В фармакопеех целях метод используется для определения количественного содержания и подлинности веществ в лекарственных средствах, а также применяется как испытание на чистоту, подтверждение отсутствия оптически неактивных посторонних веществ. Важность определения оптической активности для лекарственных средств связано с особенностью оптических изомеров оказывать на организм человека различное физиологическое действие: биологическая активность левовращающих часто сильнее правовращающих изомеров. Например, некоторые лекарственные средства, которые получают синтетически, существуют в виде оптических изомеров, но при этом биологической активностью обладают только в виде левовращающего изомера. Например, лекарственное средство левометицин биологически активно только в левовращающей форме.

Поляриметрический метод испытаний ценен своей высокой точностью, он прост и занимает мало времени.

## 1.6. Иммунохимические методы исследования

Иммунохимические методы исследования основаны на специфическом связывании определяемого соединения соответствующими антителами / антигенами. Эти методы анализа широко вошли в аналитическую практику и используются в различных областях медицины, сельского хозяйства, микробиологической и пищевой промышленности, для целей охраны окружающей среды. Индикация образующегося комплекса антиген-антитело может быть осуществлена, если в один из исходных компонентов реакционной системы ввести метку, которая легко детектируется соответствующим высокочувствительным физико-химическим методом. Весьма удобными для этой цели оказались изотопные, ферментные, флуоресцентные, парамагнитные и другие метки, использование которых дало возможность увеличить чувствительность классических иммунохимических методов анализа в миллионы раз, а время анализа уменьшить до нескольких минут.



Иммунохимические методы, основанные на реакции преципитации, очень удобны для качественного и количественного анализа белков, для определения гомогенности белковых препаратов и наличия в них примесей, а также для идентификации компонентов белковых смесей.

*Реакция преципитации* (РП) (от лат. *praecipilo* – осаждать) – это формирование и осаждение комплекса растворимого молекулярного антигена с антителами в виде помутнения, называемого *преципитатом*. Он образуется при смешивании антигенов и антител в эквивалентных количествах, избыток одного из них снижает уровень образования иммунного комплекса. Как вспомогательный метод реакция преципитации применяется для изучения структуры белка. *Преимущество этого метода* по сравнению с другими состоит в том, что он может быть использован тогда, когда нельзя провести количественный химический анализ, например при определении данного компонента в смеси белков. Именно в этих случаях результаты, полученные с помощью иммунохимических реакций, могут быть очень полезны.

Наиболее простой способ исследования растворимых антигенов в РП заключается в том, что исследуемый раствор смешивают со специфической иммунной сывороткой, а затем наблюдают образование преципитата. Эта реакция применяется главным образом для определения титров. Только в том случае, когда реакция ставится с иммунной сывороткой, специфичной к данному белку, величина титра может служить характеристикой белкового препарата. Действительно широкое применение иммунохимического подхода к анализу белков началось только после того, как появились иммунодиффузионные методы исследования.

### 1.6.1. Иммунодиффузия

*Иммунодиффузия* (ИД) – наиболее распространенный из всех методов, основанных на реакции преципитации.

Развитие ИД стало возможным благодаря использованию гелевых носителей. В 1946 году Уден описал *метод простой линейной ИД*. Он основан на следующем принципе: стеклянные пробирки заполняют жидким агаром, содержащим антисыворотку (АС). После застывания геля (агара) раствор антигена (например, сыворотка) наслаивают на гель (нисходящая

ИД), или же нижний открытый конец пробирки с гелем погружают в сыворотку так, что антиген проникает в столб геля снизу (восходящая ИД). В зависимости от специфичности заключенных в геле антител, в ходе ИД возникает одна из несколько линий преципитации, длину пробега которых от линии старта можно измерить. *Длина пробега полосы преципитации при прочих равных условиях пропорциональна концентрации антигена*.

**Гели и их свойства.** *Основная функция геля* – локализация преципитата. Она становится возможной, если растворенные антигены и антитела легко диффундируют в геле, но образующиеся иммунные комплексы ввиду их величины остаются внутри ячеек геля. Благодаря локализации преципитата достигается следующее:

1. В множественных системах антиген – антитело отдельные компоненты реакции диффундируют с различной скоростью, обусловленной неодинаковой величиной молекул и их концентрацией. В связи с этим могут образовываться множественные пространственно разделенные преципитаты, т.е. создается возможность анализа множественных систем.

2. По форме и расположению преципитатов можно судить о диффузионных свойствах и, следовательно, об относительной молекулярной массе антигена или антитела.

3. Порядок расположения линий преципитации по отношению друг к другу позволяет делать выводы о полном или частичном иммунохимическом сходстве, а также об отсутствии такового.

4. Исходя из величины ареала и удаленности от линии старта иммунных комплексов, можно проводить их количественное определение.

Наиболее распространены гели агара и агарозы; гели желатины, пектина, полиакриламида или ацетата целлюлозы применяются реже для ИД.

**Диффузия и преципитация в геле.** При концентрации агара 20 г/л средний размер пор геля составляет 3 нм. Можно считать достоверным, что обычно применяемые концентрации геля от 3 до 15 г/л существенно не влияют на диффузию большинства компонентов реакции антиген – антитело. Поэтому для всех компонентов процесса до их соединения справедливы законы свободной диффузии. В соответствии со вторым законом Фика концентрация вещества ( $C$ ) на определенном расстоянии от линии старта ( $h$ ) является функцией времени ( $t$ ).

$$\frac{\partial \tilde{N}}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial h^2},$$

где  $D$  – коэффициент диффузии, зависит от температуры, вязкости среды и радиуса диффундирующей молекулы.

$$D = \frac{R \cdot T}{6 \pi N \cdot \eta \cdot r},$$

где  $R$  – универсальная газовая постоянная;  $N$  – число Авогадро;

$T$  – температура в градусах Кельвина;  $\eta$  – вязкость среды;

$r$  – молекулярный радиус.

При всех прочих условиях  $D$  представляет собой постоянную величину. Это означает, что для получения сравнимых результатов при ИД необходимо стандартизовать такие показатели как концентрация геля, температура и время диффузии, концентрацию антигена и антител. Встреча компонентов реакции антиген – антитело изменяет или прекращает свободную диффузию. Важно отметить, что наиболее выраженная преципитация наблюдается в зоне эквивалентности. В месте первого контакта молекул антигена и антител образуются преципитаты, которые увеличиваются в размерах по мере поступления эквивалентных количеств партнеров реакции. Если один из компонентов реакции диффундирует медленнее, чем другой, то комплексы антиген – антитело, возникшие при первом контакте, медленно растворяются вследствие смещения зоны эквивалентности под влиянием притока более медленно диффундирующего партнера компонента. Вновь образующиеся комплексы формируются все ближе и ближе к резервуару быстро диффундирующего компонента.

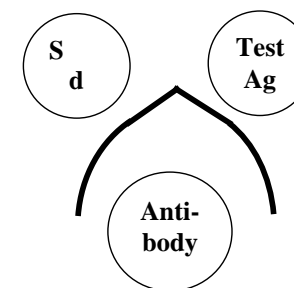
**Факторы, влияющие на преципитацию.** Образование первичных комплексов после контакта антигена и антитела происходит в течение нескольких минут. Для полной преципитации необходимо 24–48 часов. Для высокомолекулярных композиций при наличии «слабых» сывороток время полной преципитации увеличивается до 8 дней. Температура не играет особой роли, она может быть 0–4 °С, 20 °С или 37 °С. Антисыворотки лошади дают лучшую преципитацию при температуре ниже комнатной. Колебания рН в пределах 6,4–8,5 на процесс преципитации влияния не ока-

зывают. АС млекопитающих дают оптимальную преципитацию при физиологических концентрациях NaCl; АС птиц лучше преципитируют специфические антигены в средах с высокой ионной силой, например, в 1,2 М NaCl. Наличие детергентов, органических растворителей, мочевины и других соединений может препятствовать образованию иммунных комплексов. Они могут вызвать денатурацию белка или распад молекул белка на субъединицы. АС лошади дают преципитацию в зоне эквивалентности, образуют тонкие полосы. Преципитаты, образуемые АС морских свинок или АС «типа морских свинок» со специфическими антигенами, образуют более широкие зоны. При избытке антител такого типа образуются так называемые «флаги», «шлейфы».

**Чувствительность методов ИД.** С помощью методов ИД можно проводить изучение растворов с низкой концентрацией белка. При концентрации белка 50–5 мкг/мл в соответствующих системах антиген – антитело еще можно наблюдать образование преципитатов. Если в лунку вносят 2–10 мкл раствора, то удастся определить присутствие белка в растворе в количестве 10–500 нг. Разброс данных при постановке серии количественных определений составляет около 5 %.

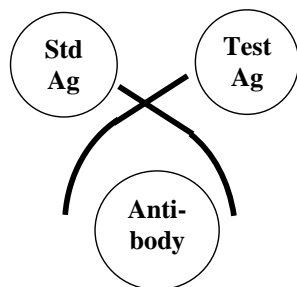
**Пример.** Получены линии преципитации при взаимодействии антиген – антитело.

1. Обе линии преципитации полностью сливаются. Это говорит об идентичности обоих антигенов.



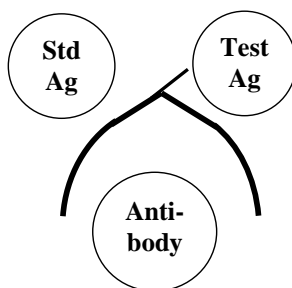
ИДЕНТИФИЦИРОВАНО

2. Линии преципитации пересекаются, Это значит, что реагирующие с антисывороткой детерминанты антигена неидентичны и, следовательно, сами антигены различны.



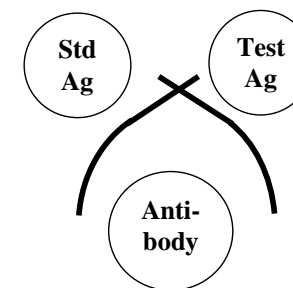
НЕ ИДЕНТИФИЦИРОВАНО

3. Одна линия длиннее и продолжается за другую в виде так называемой «шпоры» «Шпора» часто бывает тоньше основной линии преципитации. Линия преципитации от второй лунки с антигенами сливается с первой линией. Это означает, что оба антигена обладают некоторыми общими детерминантами и образуют с соответствующими антителами иммунные комплексы, приводящие к слиянию линий.



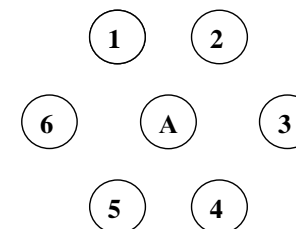
ИДЕНТИФИЦИРОВАНО

4. Обе линии преципитации перекрещиваются и сливаются одновременно. Это означает, что оба антигена содержат как одинаковые, так и различные детерминанты, которые вступают в реакцию с антителами полиспецифической антисыворотки.



НЕ ИДЕНТИФИЦИРОВАНО

Для титрования растворов антигенов или антител располагают лунки следующим образом:



Одинаковые объемы растворов антигена, приготовленных двукратным разведением, вносят в периферические лунки. Такой же объем антисыворотки вносят в центральную лунку.

При оценке иммунодиффузии учитывают:

1. Расстояние от линии преципитации до центральной и периферических лунок.
2. Наибольшее разведение антигена, при котором еще заметно образование преципитата.
3. Интенсивность и ширину полос преципитации. Наибольшее разведение, при котором еще образуются видимые преципитаты, дает значение титра.

### 1.6.2. Иммуноферментный анализ

*Иммуноферментный анализ* (ИФА) – это группа методов, которые позволяют выявить комплекс антиген – антитело с помощью субстрата, который расщепляется ферментом с появлением окраски. Для выявления активности фермента в комплексе антиген – антитело с целью визуального и инструментального учета реакции используют хромогенные субстраты, растворы которых, изначально бесцветные, в процессе ферментативной реакции приобретают окраску, интенсивность которой пропорциональна количеству фермента. Необходимым прибором для ИФА является спектрофотометр.

Метод иммуноферментного анализа был предложен в начале 70-х годов тремя независимыми группами исследователей: в Швеции, Нидерландах и США. Антиген (АГ) или антитела (АТ), вступающие в иммунную реакцию, метятся ферментом. По превращению субстрата ферментом можно судить о количестве вступившего во взаимодействие компонента реакции АГ – АТ. Чувствительность ИФА позволяет определить минимальные количества вещества (нанограммы). Известно много вариантов постановки ИФА. Различают гомогенный и гетерогенный вариант иммуноферментного анализа.

В основе *гомогенного ИФА*, применяемого для определения низкомолекулярных субстанций (гаптены – стероиды, простагландины, медикаменты (кодеин, антибиотики, морфин, дигоксин и продукты их метаболизма, циклические нуклеозидмонофосфаты и др.) лежит ингибирование активности фермента при соединении его с гаптенем – активность фермента восстанавливается в результате реакции АГ – АТ, либо, наоборот, потеря активности маркерного фермента в результате реакции АГ – АТ. Поэтому удаление свободного АГ из смеси, содержащей АГ в связанном виде, в составе иммунных комплексов невозможно.

Метод *гетерогенного ИФА*, получивший наибольшее распространение, состоит из трех основных этапов.

*Первый этап* – иммобилизация антигена или антитела на твердой фазе. Полученный комплекс называется *иммуносорбентом*.

*Второй этап* заключается в удалении несвязавшегося реагента и блокировании сайтов связывания на твердой подложке с помощью блоки-

рующих белков, таких, например, как альбумин, казеин и инкубации анализируемого препарата с иммуносорбентом для того, чтобы произошло их связывание.

*Третий этап* – детекция. Процесс детекции осуществляется либо благодаря ферментативной активности самого исследуемого вещества, либо благодаря связанной с анализируемым препаратом ферментативной меткой, либо производится дополнительная инкубация комплекса иммуносорбент – исследуемое вещество с вторичными антителами, конъюгированными с ферментативной меткой. Не прореагировавшие компоненты реакции удаляются многократным отмыванием.

По методике постановки метод гетерогенного ИФА подразделяют на два основных вида: неконкурентный иммуноферментный анализ и конкурентный иммуноферментный анализ.

**Конкурентный метод.** Если на первой стадии присутствуют анализируемое соединение (антиген) и его аналог (меченный ферментом антиген), конкурирующие между собой за связывание с имеющимися в недостатке центрами специфического связывания (антителами), то метод является *конкурентным*. В этом случае, чем больше исследуемого антигена содержится в растворе, тем меньше количество связывающихся меченых антигенов.

Если существует необходимость количественного определения АГ, который может быть получен в чистом виде, то адекватный анализ при помощи конъюгата антиген – фермент и фиксированных на твердой фазе АТ может быть проведен в форме конкурентного взаимодействия. Первым этапом в этом случае будет присоединение АТ к носителю за счет химической реакции или физико-химических взаимодействий. Избыток АТ удаляют отмыванием и, внося строго определенное количество меченого АГ и различные количества немеченого АГ, строят калибровочную кривую. По окончании реакции АГ – АТ иммунные комплексы оказываются присоединенными к твердой фазе за счет АТ. Избыток АГ удаляют отмывкой, добавляют субстрат для фермента, останавливают реакцию по истечении определенного времени и проводят калориметрическое определение продуктов ферментативной реакции. В другом варианте конкурентного ИФА с твердой фазой первично связывается АГ. После отмывки добавляют мече-

ные ферментом АТ и стандартный или исследуемый АГ. Связывание меченых АТ конкурентно тормозится растворенным АГ. Количество продуктов ферментативной реакции обратно пропорционально концентрации растворенного АГ.

**Неконкурентные методы.** Если на первой стадии в системе присутствуют только анализируемое соединение и соответствующие ему центры связывания (антиген и специфические антитела), то метод является *неконкурентным*.

1. *Метод двойных антител – «сендвич-метод».* Фиксированные на твердой фазе АТ инкубируют со стандартным или анализируемым АГ. После отмывания добавляют избыток меченых АТ (специфичных к этому же АГ). Не связавшиеся АТ отмывают. Продукт ферментативной реакции образуется в количествах, пропорциональных количеству связанного АГ. Достаточно часто используют немеченые вторые АТ. Тогда о реакции судят по связыванию энзиммеченых АТ, специфичных по отношению к IgG (вторые антитела) В любом случае первые и вторые АТ должны принадлежать животным разных видов.

2. *Прямой метод ИФА* подразделяется на два вида анализа:

- исследуемое вещество непосредственно иммобилизовано на твердую фазу, а связавшееся с антигеном меченое антитело является детектором;
- на твердой фазе иммобилизованы антитела, а детектором является исследуемое вещество, меченое ферментативной меткой.

3. *Косвенный (непрямой) метод ИФА* (для иммуноферментного определения антител). Антиген фиксируют на твердой фазе, после отмывания проводят инкубацию с раствором АТ. Если произошло специфическое связывание АТ, их можно количественно определить при помощи меченой ферментом антиглобулиновой сыворотки ферментативной реакции.

В качестве маркеров для ИФА используют пероксидазу, щелочную фосфатазу или глюкозооксидазу. Коммерческие препараты пероксидазы требуют дополнительной очистки до RZ (число частоты) более 2,5. Число частоты определяется как соотношение экстинкции на длинах волн 405 нм и 280 нм. Высокоочищенные препараты пероксидазы имеют RZ 3,0 и выше.

Воспроизводимость результатов ИФА зависит от многих факторов, в том числе от условий измерения, оптимизации фермент-субстратного взаимодействия, толщины слоя, поглощающих свойств анализируемых растворов, чистоты антител и антигенов-стандартов. Негомогенность материала планшетов отрицательно влияет на воспроизводимость.

Для присоединения ферментов к белку чаще всего используют глутаральдегидный метод. Очистку конъюгатов проводят гельфильтрацией – это самое сложное. Антитела получают методом иммуноадсорбции или аффинной хроматографией. В качестве твердой фазы для ИФА применяют такие материалы, как полистирол, поливинилхлорид, полипропилен, полиакриламид, агарозу и др. Твердая фаза может быть использована в виде пробирок, планшетов, бусин, шариков, гранул или пленок.

## 1.7. Методы определения биологической активности

За последние десятилетия создается огромное количество биологически активных пищевых добавок и фармацевтических препаратов. Поэтому в настоящее время актуален поиск методов, позволяющих в короткий срок и достаточно объективно оценить биологическую активность этих препаратов.

### 1.7.1. Ферменты и определение их биологической активности

Производство ферментных препаратов является одним из ведущих направлений в развитии фармацевтической биотехнологии во всем мире. Ежегодно увеличивается объем выпускаемых ферментных препаратов, расширяется их ассортимент.

*Ферменты обладают узкой специфичностью, избирательностью действия на субстраты*, т.е. на вещества, превращение которых они катализируют. Высокая специфичность ферментов обусловлена конформационной и электростатической комплементарностью между молекулами субстрата и фермента и уникальной структурой активного центра фермента, обеспечивающими «узнавание», высокое сродство и избирательность протекания одной какой-либо реакции из тысячи других химических реакций, осуществляющихся одновременно в живых клетках.

В зависимости от механизма действия различают ферменты с относительной (или групповой) специфичностью и абсолютной специфичностью.

Относительная специфичность наблюдается при действии некоторых гидролитических ферментов, для них наибольшее значение имеет тип химической связи в молекуле субстрата. Например, пепсин расщепляет белки животного и растительного происхождения, хотя они могут существенно отличаться друг от друга как по химическому строению и аминокислотному составу, так и по физико-химическим свойствам. Однако пепсин не расщепляет углеводы или жиры. Объясняется это тем, что местом действия пепсина является пептидная –СО – NH связь. Для действия липазы, катализирующей гидролиз жиров на глицерин и жирные кислоты, таким местом является сложноэфирная связь. Аналогичной относительной специфичностью обладают также некоторые внутриклеточные ферменты, например, гексокиназа, катализирующая в присутствии АТФ фосфорилирование почти всех гексоз, хотя одновременно в клетках имеются специфические для каждой гексозы ферменты, выполняющие такое же фосфорилирование.

Абсолютной специфичностью действия называют способность фермента катализировать превращение только единственного субстрата. Любые модификации в структуре субстрата делают его недоступным для действия фермента. Примерами таких ферментов могут служить уреазы, глюкозооксидаза, многие дегидрогеназы.

Стереохимическая специфичность (имеются экспериментальные доказательства существования) ферментов обусловлена существованием оптически изомерных L- и D-форм или геометрических изомеров химических веществ (цис- и транс- изомерия), в ароматических производных – орто-, мета-, пара- изомерия, изомерия положенная в алифатических производных  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - и т.д. Так, например, известны оксидазы L- и D-аминокислот, хотя в природных белках обнаружены только L-аминокислоты. Каждый из видов оксидаз действует только на свой специфический стереоизомер. Наглядным примером стереохимической специфичности является бактериальная аспаратдекарбоксилаза, катализирующая отщепление CO<sub>2</sub> только от L-аспарагиновой кислоты с превращением её в L-аланин.

Классификация ферментов основана на механизме их действия и включает 6 классов – по типу катализируемой реакции; каждый класс подразделяется на подклассы – по природе атакуемой химической группы; подклассы делятся на подподклассы – по характеру атакуемой связи или по природе акцептора. Каждый фермент имеет тривиальное и систематическое название, а также кодовый номер (шифр).



Основные классы ферментов указаны в табл. 7.

Таблица 7 – Классы ферментов

Класс фермента	Тип катализируемой реакции
Оксидоредуктазы	Окислительно-восстановительные реакции
Трансферазы	Перенос отдельных групп атомов от донорной молекулы к акцепторной молекуле
Гидролазы	Гидролитическое (с участием воды) расщепление связей
Лиазы	Расщепление связей способом, отличным от гидролиза или окисления
Изомеразы	Взаимопревращение различных изомеров
Лигазы (синтетазы)	Образование связей в реакции конденсации двух различных соединений (используется энергия АТФ)

Источники ферментов и применение ферментов в фармации. Источником фермента может служить любой живой объект. Первоначально ферменты получали, используя растительные или животные объекты. Ряд

ферментов животного и растительного происхождения до сих пор используются в медицине. В настоящее время начато использование ферментов, полученных из микроорганизмов.

Высокоочищенные ферментные препараты используются в медицине для лечения и диагностики. Существенным достоинством ферментов перед химическими катализаторами является то, что они действуют при нормальном давлении, при температуре от 20 °С до 70 °С и в диапазоне рН от 4 до 9, имеют в большинстве случаев исключительно высокую субстратную специфичность, что позволяет в сложной смеси биополимеров направленно воздействовать на определенные соединения.

Производство ферментных препаратов занимает одно из ведущих мест в современной биотехнологии. Для удовлетворения растущих потребностей фармацевтической промышленности в ферментных препаратах необходимо не только значительное увеличение объема выпускаемых ферментов, но и значительное расширение ассортимента ферментных препаратов, получение ферментных препаратов с новыми свойствами – с высокой активностью, повышенной термостабильностью, с высокой степенью очистки. Для примера можно привести *использование ферментов при получении медицинских препаратов*:

- $\alpha$ -амилаза – гидролиз крахмала при производстве этилового спирта (сырье для получения десятков различных фармацевтических препаратов);
- $\beta$ -амилаза – повышение выхода лекарственных веществ из растительного сырья;
- Аминоацилаза – разделение рацемических смесей аминокислот;
- Аспартаза – синтез L-аспарагиновой кислоты из фумаровой кислоты и аммиака;
- Глюкоамилаза – гидролиз крахмала при производстве глюкозы;
- Глюкозоизомераза – производство глюкозо-фруктозных сиропов и фруктозы;
- Пенициллинацилаза – при производстве 6-АПК гидролизом бензилпенициллина, синтез новых  $\beta$ -лактамных антибиотиков на основе 6-АПК;

- Лактамгидролаза – получение лизина гидролизом  $\alpha$ -аминокапролактама.

*В медицине применяется ряд ферментных препаратов животного происхождения.* Наиболее известны трипсин, пепсин, химотрипсин А и В и панкреатическая липаза.

*Пепсин* расщепляет пептидные связи, образованные ароматическими аминокислотами (L-тирозин, L-фенилаланин). Пепсин синтезируется в форме неактивного предшественника пепсиногена слизистой оболочки человека и многих животных (крупный рогатый скот, свиньи и др.). Пепсиноген (м.м. 42 kDa) переходит в пепсин (м.м. 35 kDa) под действием кислот или самого пепсина (автокатализ). В промышленных масштабах пепсин получают из слизистой оболочки желудка свиньи. Для этого размельченную слизистую оболочку смешивают с разбавленной хлористоводородной или фосфорной кислотой для активации пепсиногена. После фильтрации экстракт сушат и подвергают очистке. В медицине пепсин используют в качестве препарата улучшающего процесс пищеварения.

Важную роль играют *препараты трипсина* (м.м. трипсина 23,8 kDa), который гидролизует пептидные связи, образованные с участием карбоксильных групп L-аргинина или L-лизина. Поэтому при гидролизе белка трипсином образуются большие пептидные фрагменты с концевыми карбоксильными группами, принадлежащими аргинину или лизину. Трипсин образуется из неактивного предшественника трипсиногена, содержащегося в поджелудочной железе. Активация трипсиногена происходит под действием трипсина в присутствии ионов кальция. При отсутствии кальция образуется неактивный белок. Используется в медицине для улучшения пищеварения.

В поджелудочной железе также содержится *химотрипсин А и В*. Эти ферменты гидролизуют пептидные связи, в образовании которых участвуют карбоксильные группы ароматических аминокислот, а также их амиды и эфиры. Образуются химотрипсины из зимогенов при каталитическом действии трипсина.

*Панкреатическая липаза* из всех липолитических ферментов наиболее исследован. Данную липазу можно использовать в качестве модели и

прототипов других участвующих в пищеварении липаз, а также липаз растительного или микробного происхождения.

**Общая характеристика методов определения ферментативной активности.** Прежде чем приступить к определению ферментативной активности, необходимо избрать и тщательно продумать метод определения активности. Активность фермента зависит от различных условий реакции и зависит от температуры, pH среды, от концентрации субстратов и кофакторов. Учитывая это, при определении активности фермента необходимо строго соблюдать одни и те же условия. Желательно не ограничиваться определением активности по одному какому-либо методу. Количество субстрата, превращаемого в условиях теста по определению активности фермента, должно быть пропорционально количеству последнего времени инкубирования. Если же нет такой пропорциональности, то активность рассчитывают по предварительно построенному калибровочному графику, отражающему зависимость скорости реакции от количества единиц фермента. Когда ход реакции нелинеен во времени, следует определять начальную скорость реакции (по тангенсу угла наклона касательной к начальному отрезку кривой превращения). Для этого легче всего применять такие методы изменения активности, которые позволяют непрерывно следить за ходом превращения во времени: спектрофотометрические методы, потенциометрические, полярографические и др. Для измерения ферментативной активности необходимо выбрать буфер, который не тормозит исследуемую активность и обеспечивает поддержание pH раствора, близкой к оптимальной для данного фермента. Реакцию проводят при температуре, лежащей в большинстве случаев в пределах 25–40 °С. При исследовании ферментов, требующих присутствие кофакторов (ионов металлов, коферментов и др.), концентрация которых может снижаться по мере очистки фермента, в реакционную смесь следует добавлять недостающие кофакторы, например, соли металлов, АТФ (аденозинтрифосфат), НАДФ (никотинамидадениндинуклеотидфосфат) и др. Также для определения активности ферментов вводят стабилизаторы в состав опытных смесей. Во многих случаях добавление желатина, альбумина и других добавок предотвращает денатурацию ферментативного белка.

**Спектрофотометрические методы.** Спектрофотометрические методы основаны на поглощении света в определенных участках спектра (области ультрафиолета, видимая и инфракрасная области) функциональными группами, входящими в состав ферментов, субстратов или продуктов реакции. Анализируется максимум поглощения при определенной длине волны, положение которого определяется наличием в исследуемом материале характеристических функциональных групп (аналитических форм). Для измерения спектров используют спектрофотометры, фотометрические абсорбциометры и другие приборы. Этот метод отличается высокой чувствительностью, быстротой определения, малым расходом ферментов и реактивов и позволяет следить за течением реакции во времени. Для этого реакционную смесь помещают в кювету, вставленную в термостатируемый кюветодержатель. Через малый промежуток времени после добавления фермента (или субстрата) и быстрого перемешивания измеряют поглощение при длине волны, характерной для используемого субстрата или конечного продукта, образующегося в данной реакции. С помощью спектрофотометрического метода можно измерять непосредственно концентрацию некоторых ферментов (после достаточной очистки) по величине характерных максимумов поглощения прочно связанных коферментов (простетических групп).

Необходимо иметь произвольно выбранную единицу фермента, с помощью которой можно было бы количественно выразить чистоту и активность различных фракций. В большинстве случаев выбор единицы зависит от избираемого метода определения. В случае спектрофотометрического метода такой единицей может служить количество фермента, которое вызывает определенное изменение в оптической плотности за определенное время при данных условиях опыта. Если определяется продукт реакции, то единицей будет количество фермента, которое вызывает образование определенного количества вещества в минуту, и т.д. Тогда удельную активность фермента, которая является мерилем чистоты ферментного препарата, выражают числом единиц в 1 мг вещества (белка). Для целей определения ферментов могут быть использованы не только измерение поглощения света, но также измерения флюоресценции – спектрофлюорометрические методы. Такое определение активности фермента в ряде слу-



чаев по чувствительности превосходит спектрофотометрические методы на целый порядок величины. Некоторые коферменты и субстраты обладают сильной флюоресценцией. НАД и НАДФ в восстановленном состоянии имеют сильную флюоресценцию и не флюоресцируют в окисленном состоянии. Поэтому спектрофлюорометрию используют для изучения кинетики и механизма действия никотинамидных и флавиновых ферментов.

**Колориметрические (фотометрические) методы.** В основе этих методов лежит измерение при помощи визуального или фотоэлектрического колориметра окрашенного продукта, образующегося при взаимодействии субстрата или продукта действия фермента со специфическими реактивами, которые обычно добавляются в фиксированную опытную форму, взятую после остановки ферментативной реакции. *Разработаны количественные методы, основанные на биуретовой реакции*, при которой состав белка, очевидно, не должен сказываться на результатах определения, так как эта реакция на пептидные связи, а не на боковые группы в молекуле белка. Предлагаются *биуретовые микрометоды*, основанные на поглощении ультрафиолетовых лучей медно-белковыми комплексами: они позволяют определять 0,1–0,2 мг белка в пробе. Число небелковых веществ, которые могут влиять на определение с помощью биуретовой реакции, невелико, но следует вносить поправки на те вещества, которые присутствуют в высоких концентрациях (соли аммония, сахара). Наиболее ценными являются те фотометрические методы, которые позволяют следить во времени за ходом ферментативной реакции без её прекращения по изменению окраски хромогенного субстрата или добавленного индикатора.

**Метод с отбором проб** – наиболее часто используется для определения активности самих разнообразных ферментов. В этом случае из реакционной среды через разные промежутки времени производится отбор проб, в которых содержание продукта / субстрата реакции определяется после проведения определенных химических его преобразований с получением чаще всего окрашенного продукта реакции.

**Другие методы.** К этим методам относится обширный ряд методов, включающих поляриметрию, вискозиметрию, потенцио- и кондуктометрические измерения и т.п. Также определение активности можно выполнять,

используя методы хроматографии и электрофореза на бумаге. Эти методы высокочувствительны и специфичны.

### 1.7.2. Гепарины и определение антикоагулянтной активности гепаринов

*Гепарин натрия* – биотехнологическая субстанция, которая содержит натриевую соль сульфатированного глюкозоамингликана, содержащаяся в тканях млекопитающих. При полном гидролизе субстанция освобождает D-глюкозоамин, кислоту D-глюкуроновую, кислоту L-идуроновую, кислоту уксусную и кислоту серную. Гепарин натрия обладает характерологической особенностью задерживать свертывание крови. Субстанцию гепарина натрия получают из легких крупного рогатого скота или слизистой оболочки кишечника крупного рогатого скота, свиней и овец.

Препараты на основе гепаринов сегодня хорошо известны, и трудно представить профилактику и лечение патологических поражений сосудов и тканей без этой группы биологически активных соединений. Известно, что гепарины применяют для лечения большого числа заболеваний: тромбозы и тромбоэмболии, ишемическая болезнь сердца и инфаркт миокарда, гломерулонефрит и другие. Препараты гепарина вводят человеку в виде инъекций, гелей, перорально.

На рис. 18 представлена структура мономера гепарина.

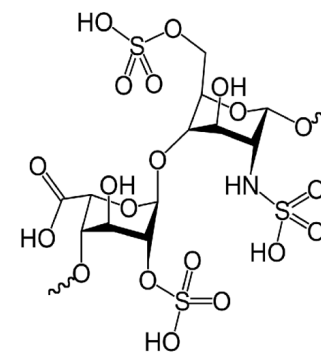


Рисунок 18 – Структура мономера гепарина

*Нефракционированные гепарины* (НФГ) представляют собой гетерогенную смесь мукополисахаридов. Они связываются с поверхностью эндотелиальных клеток и различными белками плазмы. Биологическая активность НФГ зависит от плазменного протеазного ингибитора – антитромбина III. Антитромбин III ингибирует факторы свертывания – протеазы, особенно тромбин (фактор IIa), факторы IX и Xa, при помощи формирования эквимольных стабильных комплексов с ними. При отсутствии гепарина эти реакции протекают медленно, присутствие гепарина ускоряет их в 1000 раз. Только 3 молекулы в коммерческих препаратах НФГ имеют этот ускоряющий эффект ввиду наличия уникального пентасахаридного участка, необходимого для высокоаффинной связи с антитромбином. Активная молекула гепарина связывается с антитромбином и вызывает конформационные изменения этого ингибитора. Конформационные изменения антитромбина предоставляют его активный участок для более интенсивного взаимодействия с протеазами.

С тканевым фактором (ТФ) фактор VII формирует активированный комплекс (VII-ТФ), который катализирует активацию ферментного каскада от фактора IX до фактора IXa. Активированный фактор XIa также катализирует эту реакцию. Ингибитор тканевого фактора (ИТФ) ингибирует каталитическое действие VIIa-ТФ комплекса. Результатом этого каскада является превращение фибриногена в фибрин – эссенциальный компонент функционального сгустка. Гепарин, действующий в крови, прямо активизирует противосвертывающие факторы, особенно антитромбин, который инактивирует ряд факторов.

НФГ неоднороден по своему составу. Его молекулярная масса колеблется от 2000 до 80000 дальтон. Фракции НФГ с низкой молекулярной массой (менее 5000 дальтон) обладают более мощной анти-Xa активностью, но меньшей антитромбиновой активностью. Фракции гепарина с высокой молекулярной массой (более 20000 дальтон) имеют противоположные свойства, т.е. в основном, обладают антитромбиновой активностью. Обнаружено, что антикоагулянтная активность гепарина связана с особенностями строения его молекулы. Так, антикоагулянтная активность зависит от содержания серы, степени сульфатирования, количества и расположения О-сульфатных групп, а также от размера скелета молекулы. Актив-

ность выше в препаратах с большим содержанием эфирсвязанной серы. Показано, что активность фракции, в которой на дисахаридную структурную единицу приходится четыре остатка серной кислоты, в 1,4 раза превышает активность фракции гепарина с тремя остатками.

В начале 70-х годов XX века было начато фракционирование НФГ с выделением фракций гепарина с меньшей молекулярной массой – полученные низкомолекулярного гепарина.

*Низкомолекулярные гепарины* (НМГ) – препараты короткоцепочечных мукополисахаридов с молекулярной массой 4000–7000 дальтон. В отличие от нефракционированного гепарина, НМГ оказывают антитромботическое действие, ингибируя преимущественно фактор Xa, а не IIa.

*Достоинство НМГ* – их способность тормозить свертывание крови на более высокой ступени (на уровне фактора Xa, а не IIa) и уменьшать образование тромбина. Уменьшение длины цепей гепарина снижает его способность связываться с белками крови, матрикса сосудов, эндотелиальными клетками, макрофагами и тромбоцитами. Это повышает время существования НМГ в плазме крови больных, обеспечивает более прогнозируемый лечебный эффект назначенной дозировки. Показано, что снижение молекулярной массы до 5,4 kDa (18–19 моносахаридных остатков) вызывает значительные качественные изменения активности гепарина.

Существующие **методы измерения активности гепарина** могут быть разделены *по природе гепарина* – НФГ или НМГ, *или по характеру анализируемой пробы* – препарат гепарина или образцы крови больных, получающих лечение гепарином. Это разделение достаточно условно, так как отдельные методы (например, хромогенные) могут быть использованы во всех вариантах тестирования. **К основным стандартизированным методам определения гепарина** в настоящее время относятся представленные в Европейской, Британской и Американской (США) Фармакопеях методы АЧТВ (активированное частичное тромбопластиновое время, за которое образуется сгусток крови после присоединения к плазме хлорида кальция и других реагентов) и хромогенные способы измерения степени ингибирования антитромбином, активированным гепарином, фактора Xa и тромбина (анти-Xa и анти-IIa активности гепарина).

Препараты гепарина представляют собой гетерогенную смесь сульфатированных мукополисахаридов (гликозаминогликанов) с различными молекулярными массами. В полимере гепарина **главная повторяющаяся дисахаридная единица** состоит из D-глюкурона-2-сульфата и N-ацетилглюкозамин-6-сульфата. Повторяющаяся единица составляет в гепарине из легких крупного рогатого скота свыше 90 %, а в слизистой оболочке (мукозе) тонкого кишечника свиней около 75 %. В макромолекуле мукозного гепарина, кроме указанных дисахаридных фрагментов, присутствуют остатки 2-ацета-мидо-2-дезоксид-альфа-D-глюкопиранозы и бета-D-глюкуроновой кислоты. Высокое содержание сульфатных и карбоксильных групп обуславливает высокий отрицательный заряд гепарина; изоэлектрическая точка составляет  $pI - 3,2-4,2$ . Наиболее частый тип дисахаридной единицы представлен на рис. 19.

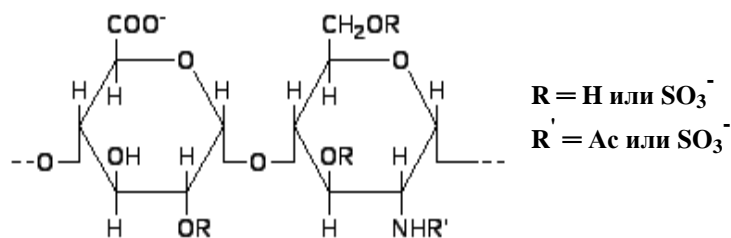


Рисунок 19 – Повторяющаяся дисахаридная единица гепарина

**Методы анализа препаратов гепарина** можно классифицировать следующим образом.

**Химические методы** (определение мукополисахаридов). Измерение концентрации гепарина основано на карбазольной реакции гексуроносовой кислоты или ацетилацетоновой конденсации гексозаминов с дальнейшим определением пиррольных производных с помощью реагента Эрлиха (p-диметиламинобензальдегид). Тестируемые препараты гепарина оценивают по карбазольной реакции в серной кислоте. Чувствительность метода позволяет определять 12 мкг или 1,6 Ед. гепарина в 1 мл.

**Метахроматические методы.** Методы основаны на изменении максимума спектра поглощения раствора гепарина некоторыми красителями. В качестве красителей используют азуран А, толуидиновый синий и карбоцианиновый краситель. Условием правильного проведения метода является отсутствие в анализируемой системе белков, высоких концентраций солей, изменяющих спектр поглощения. Метод чувствителен к присутствию 10 мкг или 1 МЕ гепарина в 1 мл.

**Коагулологические методы.** Метод основан на способности НФГ удлинять время свертывания плазмы крови, в частности, АЧТВ. По рекомендации Европейской и Американской Фармакопей сравнивают время свертывания плазмы овец после добавления к ней разведений Международного стандарта НФГ или разведений испытуемого препарата. Метод предполагает различные способы регистрации момента образования сгустка, а именно визуальный, механический или оптический при длине волны не менее 600 нм.

**Хромогенные методы.** Наиболее широко применяемыми в настоящее время являются методы измерения остаточной амидолитической активности факторов Ха или тромбина (фактор IIa) после катализируемой гепарином инактивации их антитромбином III. Амидолитическую активность определяют с помощью хромогенных субстратов, специфичных для фактора Ха или тромбина, по количеству отщепляемого от субстрата p-нитроанилина, обратно пропорциональному активности исследуемого гепарина. Тест проводят в условиях, при которых фактическая скорость инактивации фермента связана линейной зависимостью с содержанием гепарина в анализируемом препарате гепарина. Методы характеризуются повышенной точностью по сравнению с коагулологическим тестированием и обладают высокой чувствительностью – 0,01 МЕ/мл.

## РАЗДЕЛ 2. ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОДУКТЫ

**2.1. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 1. Получение и контроль фосфолипидного комплекса, обогащенного фосфатидилхолином (лецитином) для использования в составе фармацевтических препаратов. Получение фармацевтических препаратов: искусственных мембран - липосом**

**Цель работы.** Ознакомиться с принципами работы при выделении фосфолипидных компонентов биологических мембран. Освоить методики контроля фосфолипидных субстанций, используемых для получения фармацевтических препаратов на основе липидов: эмульсий, суспензий и липосом. Ознакомиться с методами получения липосом.

**Основные задания:**

1. Выделение фосфолипидного комплекса, обогащенного фосфатидилхолином (лецитином) для использования в составе нанобиотехнологических препаратов.

2. Освоить методики контроля фосфолипидных компонентов: освоение метода хроматографии в тонком слое силикагеля, изучение степени окисления фосфолипидов (индекс окисленности), реакции подлинности фосфолипидов, определение массовой доли фосфатидилхолина.

3. Получение липосомальных наночастиц и их контроль.

Номер задания	1	2	3	
<b>Приборы и аппаратура</b>	1. Центрифуга с пробирками	+		
	2. Весы аналитические	+	+	
	3. Спектрофотометр	+		
	4. Печка электрическая	+		
	5. Мешалки электрическая	+	+	
	6. Насос водоструйный	+		
	7. Шкаф сушильный (50–200 °С)	+	+	
	8. Холодильник с морозильной камерой	+	+	
	9. Испаритель ротационный	+		
	10. Баня водяная	+	+	
	11. Ультразвуковой дезинтегратор УЗДН-1			+
	12. Воронка Бюхнера	+	+	
	13. Колба Бунзена	+		
	14. Пипетки 5 мл, 10 мл	+	+	+
	15. Цилиндры мерные	+	+	
	16. Колбы вместимостью 50 мл и 100 мл	+	+	+
	17. Бюксы стеклянные	+	+	+
	18. Воронки конусные	+	+	+
	19. Воронка делительная	+		
	20. Камера для восходящей хроматографии		+	
	21. Бумага фильтровальная	+	+	+
	22. Колбы Кьельдаля		+	
<b>Сырье</b>	1. Яйца куриные	+		
<b>Реактивы</b>	1. Ацетон, Р	+		
	2. Хлороформ, Р	+	+	
	3. Этанол, Р	+	+	
	4. Метанол, Р		+	
	5. Кадмий хлористый, Р	+		
	6. Натрий серноокислый, Р	+		
	7. Вода очищенная, Р	+	+	+
	8. Йод кристаллический, Р		+	
	9. Силикагель для хроматографии, Р		+	
	10. Перхлорная кислота, Р		+	
	11. Аммония молибдат, Р		+	
	12. Кислота аскорбиновая, Р		+	

**Теоретическая подготовка к выполнению работы.** В последнее время во многих исследовательских центрах развернут широкий фронт работ фундаментального и прикладного характера, направленный на всестороннее изучение обширной группы природных биологически активных соединений, объединенных общим названием «фосфолипиды». Представления, основанные на результатах структурно-функциональных исследований, отводят им, их надмолекулярным клеточным образованиям – биологическим мембранам – важнейшую роль в функционировании биохимических механизмов, определяющих физиологическое состояние клетки, ее реакции и взаимодействие как с соседними клетками, так и с факторами окружающей среды. И как следствие, важная роль отводится изучению таких сторон медицинской биотехнологии, связанных с ролью фосфолипидов, как биология, биохимия, биофизика, иммунология, физиология, фармакология и др. В прикладном варианте это явилось основой того, что определенные типы фосфолипидов, их фрагменты и модифицированные синтетические аналоги привлекают внимание исследователей как перспективный источник для конструирования диагностических и лекарственных препаратов и их использования в практической медицине.

Вопросы использования препаратов и биологически активных добавок, содержащих фосфолипиды для лечения лекарственных поражений в организме больного, сегодня становятся весьма актуальными. Возможность использования таких препаратов, прежде всего, связана с уникальностью структуры фосфолипидов и их ролью в биологических мембранах.

*Значимость препаратов, содержащих фосфолипиды, определяется ролью последних в биологических мембранах:*

- торможение процессов перекисного окисления липидов;
- ускорение регенерации поврежденных клеточных мембран, например, гепатоцитов или нервных клеток;
- использование фосфолипидов в качестве «строительного» материала для поврежденных органов;
- изменение процессов метаболизма.

*Фосфолипиды являются специализированными липидами, входящими в состав цитоплазматической мембраны клеток и ее органелл (митохондрий, эндоплазматического ретикулума и др.). Фосфолипиды называют эссенциальными, что подразумевает их незаменимость при функционировании клеток в организме. Говоря о роли фосфолипидов в функционировании биологических мембран, следует отметить, что клеточные мембраны, включая плазматическую мембрану и внутренние мембраны эукариотиче-*

ских клеток, представляют собой ансамбли фосфолипидных и белковых молекул. Как показано на рис. 20, содержание других компонентов составляет менее 5 %.



Рисунок 20 – Структура биологической мембраны – основные компоненты мембран

Поскольку фосфолипиды являются основным структурным компонентом всех клеточных мембран, то от них напрямую зависят многочисленные функции клетки. В качестве примеров приводятся наиболее важные биологические функции.

*Структурная функция* – смесь фосфолипидов должна быть способна образовывать *стабильный бислой* для функционирования мембранных белков (к таким фосфолипидам относятся фосфатидилхолин, фосфатидилглицерин, сфингомиелин и ряд гликолипидов), и в то же время в мембране присутствуют некоторые фосфолипиды, которые *способны к образованию небислойных структур* (фосфатидилэтаноламин, кардиолипин, фосфатидная кислота и основной метаболит фосфолипидов – диацилглицерин). Образование таких сильно искривленных участков мембраны необходимо при контакте между мембранами (процесс слияния клеток) или при связывании определенных белков в мембране, что обеспечивает существование мембраны в функционально активном состоянии.

Задача получения фосфолипидов в препаративных количествах решается выделением их из природных объектов на основе биотехнологических приемов. Этот подход проиллюстрирован схемой, изображенной на рис. 21. На этой схеме изображено выделение фосфатидилхолина из яичного желтка.



Рисунок 21 – Выделение и очистка фосфатидилхолина

Проведены работы, направленные на создание технологий получения фосфолипидных субстанций для конструирования диагностических и лекарственных препаратов. Наибольшее количество (более 50) фосфолипидсодержащих препаратов представлено липосомами. Липосомы представляют собой наноразмерные коллоидные сферы, которые состоят из фосфолипидного слоя, окружающего активное лекарственное средство. *Создание и применение липосом* – искусственных сферических мембранных конструкций на основе липидов – составляет *одно из перспективных направлений современной бионанотехнологии*. Липосомы впервые были получены Бенгхемом при исследовании роли фосфолипидов в процессе свертывания крови. Липосомы можно «нагрузить» различными лекарственными средствами, среди которых могут быть витамины, гормоны, ферменты, цитостатики и другие соединения. Вводимые в организм липосомы, нагруженные лекарственным средством, взаимодействуют с мембранами клеток, связываются с ними и передают клетке лекарственный препарат. Использование липосом в медицине за последние 30 лет нашло широкое применение, как в лечебных, так и в диагностических целях.

*Липосомальные препараты обладают рядом преимуществ:*

- пролонгируют действие введенного в организм лекарственного препарата;
- изменяют фармакокинетику лекарственных препаратов, существенно повышая их фармакологическую эффективность;
- защищают лекарственные вещества от деградации;
- защищают здоровые клетки и патологические органы от токсического действия лекарственных препаратов;
- способны увеличивать биодоступность лекарственных субстанций.

Необходимо также отметить высокую эффективность липосом при использовании их в качестве адъювантов в составе вакцин. *Липосомальные формы лекарственных препаратов являются единственным реальным примером применения нанопрепаратов в медицине.*

**Задание 1. Выделение фосфолипидного комплекса, обогащенного фосфатидилхолином (лецитином) для использования в составе нанобиотехнологических препаратов**

Выделение фосфолипидного комплекса проводят по схеме, изображенной на рис. 21.

**Приготовление растворов:**

1. Приготовление 50 %-ного раствора кадмия хлорида.

В дозированной таре взвешивают на весах 11 г кадмия хлорида, помещают в емкость вместимостью 50 мл и приливают 11 мл воды и перемешивают до полного растворения. Полученный раствор фильтруют на воронке через бумажный фильтр во флакон вместимостью 50 мл и перекрывают пробкой.

На флакон крепят этикетку, где указано: наименование раствора, количество, концентрация и дата приготовления. Раствор готовят перед использованием.

2. Приготовление 30 %-ного раствора этилового спирта.

В 2 бутылки вместимостью 10 л приливают по 7,45 л воды, а затем добавляют по 3,35 л спирта этилового. Полученный раствор перемешивают и определяют концентрацию спирта этилового. Она должна быть  $(30 \pm 2) \%$ . Определение по спиртомеру. Бутылку перекрывают пробкой. На бутылку крепят этикетку, где указано: наименование раствора, концентрация и дата приготовления. Раствор готовят перед использованием.

**ХОД РАБОТЫ**

Выделение целевого продукта – фосфатидилхолина из животных тканей проводят путем его экстракции и осаждения. В данной работе для выделения фосфатидилхолина будут использоваться методы экстракции переосаждения органическими растворителями: ацетоном, этанолом, хлороформом.

Экстракция – это процесс избирательного извлечения одного или нескольких веществ с помощью жидкого растворителя. Различают твердожидкостную и жидко-жидкостную типы экстракции. При твердожидкофазной экстракции вещество (липиды) из твердой фазы переходит в жидкую; при жидко-жидкофазной – из одной жидкости в другую, напри-

мер, в проводимой методике из спиртового раствора кадмий хлористый переходит в водную фазу.

В данном случае первоначально нейтральные липиды экстрагируют ацетоном, а фосфолипиды этанолом. Эффективность экстракции может быть повышена за счет повторной экстракции свежим экстрагентом, выбором оптимального растворителя. При экстракции для снижения потерь целевого продукта можно использовать растворители с пониженной температурой. Так, например, используя ацетон при температуре минус 10–15 °С можно значительно снизить потери фосфолипидов, которые имеют низкую растворимость при низких температурах.

**1. Обезвоживание желтков и экстракция нейтральных липидов.**

Наличие в исходном материале воды усложняет дальнейшую экстракцию липидных компонентов. Так в яичном желтке присутствует высокое содержание нейтральных липидов: свободных жирных кислот, холестерина, глицеридов и др. Необходимо провести их экстракцию. Оптимальным экстрагентом является абсолютный ацетон, обработка которым удаляет как воду, так и нейтральные липиды.

Яйца (в количестве 2-х штук) разбивают, отделяя белки от желтков вручную. Желтки собирают в емкость, белки собирают отдельно. К желткам приливают ацетон в количестве 40 мл, предварительно охлажденный до температуры минус (10–15) °С. Включают мешалку и ведут размельчение желтков в течение 3–4 минут при температуре от минус 5 °С до минус 10 °С и скорости вращения 500–600 об/мин. Полученную смесь отфильтровывают на воронке Бюхнера через фильтровальную бумагу с помощью вакуума. Бумагу перед фильтрацией смачивают ацетоном. Желтки на фильтре промывают ацетоном в конце фильтрации. Расход ацетона для промывания составляет 5 мл на каждую фильтрацию. Обезвоженные желтки опять помещают в емкость, добавляют охлажденный ацетон (40 мл) и повторяют размельчение. Процесс удаления нейтральных липидов повторяют еще 5 раз.

2. **Экстрагирование фосфолипидов.** Обезжиренные желтки загружают в емкость и приливают спирт этиловый (96,5 %) в количестве 100 мл. Производят перемешивание смеси при комнатной температуре в течение 1,5 часов при 500–600 об/мин. Смесь отфильтровывают на воронке Бюхне-

ра через фильтровальную бумагу, предварительно смоченную этиловым спиртом (5 мл). Фильтрат собирают в емкость. На емкость помещают этикетки с обозначением продукта, даты.

Емкость с фильтратом помещают в холодильник и охлаждают до температуры  $(6 \pm 2)$  °С.

**3. Получение очищенного концентрированного хлороформного раствора смеси фосфолипидов.** В емкость приливают при постоянном помешивании 2,6 мл 50 %-ного раствора кадмия хлорида, предварительно охлажденного в холодильнике до температуры  $(6 \pm 2)$  °С. Добавление раствора кадмия хлорида ведут медленно при помешивании. Полученную смесь помещают в холодильник при температуре  $(6 \pm 2)$  °С на 1–2 часа для полного осаждения фосфолипидов.

Образовавшийся осадок отделяют на центрифуге при температуре  $(0 \pm 2)$  °С, 2500 об/мин. в течение 10 минут.

Осадок из центрифужных пробирок смывают 5 мл хлороформа в емкость и направляют на пересадение.

В емкость с осадком фосфолипидов, при перемешивании, приливают 12,0 мл хлороформа. Смесь перемешивают в течение 2–3 минут до полного растворения. Затем в емкость приливают смесь, содержащую 100 мл спирта этилового, 1,6 мл 50 %-ного раствора кадмия хлорида, при постоянном помешивании.

Смесь помещают в холодильник и выдерживают при температуре минус  $(10 \pm 2)$  °С в течение 20 минут. Образовавшийся осадок отделяют на центрифуге при температуре  $(0 \pm 2)$  °С, 2500 об/мин, в течение 15–20 мин.

Осадок из центрифужных стаканов смывают хлороформом, и процесс повторяют еще 2 раза. В емкость с осадком фосфолипидов прибавляют 24 мл хлороформа и перемешивают в течение 2–3 минут до полного растворения осадка. Приливают в каждую емкость 24 мл 30 %-ного раствора этилового спирта при помешивании. Полученную смесь разделяют на делительной воронке. Нижний слой (хлороформный раствор) фосфолипидов помещают в емкость, а верхний слой (водно-спиртовой) удаляют. Хлороформный раствор липидов вновь обрабатывают 30 %-ным раствором этилового спирта. Для лучшей очистки липидов данную операцию повторяют еще 4–5 раз. Окончанием отмывки хлороформного раствора лецитина

от ионов  $\text{Cl}^-$  является отрицательная реакция на ион  $\text{Cl}^-$  в водно-спиртовом экстракте. После очистки раствор липидов сразу передают на обезвоживание.

#### **4. Получение очищенного комплекса фосфолипидов:**

**Обезвоживание хлороформного раствора.** В емкость с хлороформным раствором фосфолипидов добавляют взвешенный на весах сернокислый натрий – 20 г.

*Примечание:* натрий сернокислый перед употреблением прокалывают в сушильном шкафу при температуре 180–200 °С в течение 2-х часов. Применяют обезвоженный натрий сернокислый охлажденный до комнатной температуры.

Раствор фосфолипидов с натрием сернокислым перемешивают в течение пяти минут, закрывают емкость пробкой и помещают в холодильник при температуре  $(6 \pm 2)$  °С не менее чем на 18 часов.

Осадок соли отфильтровывают на воронке с фильтровальной бумагой. Бумагу предварительно смачивают хлороформом (5 мл). Фильтрат помещают в емкость вместимостью 50 мл.

**Получение фосфолипидного комплекса.** Хлороформный раствор фосфолипидов помещают в колбу ротационного испарителя и отгоняют хлороформ при температуре  $(37 \pm 1)$  °С при разрежении 0,08–0,1 МПа до постоянной массы. К маслу фосфолипидов приливают 10 мл спирта. Содержимое колбы перемешивают до полного растворения липидов.

На емкость помещают этикетку, где указывают наименование, номер серии, количество. Из емкости отбирают контрольную пробу, и продукт хранят в холодильнике при температуре минус  $(15 \pm 5)$  °С. Продукт должен быть прозрачным и бесцветным.

**Задание 2. Освоить методики контроля фосфолипидных компонентов: освоение метода хроматографии в тонком слое силикагеля, изучение степени окисления фосфолипидов (индекс окисленности), реакции аутентичности фосфолипидов, определение массовой доли фосфатидилхолина**

Для определения фракционного состава фосфолипидов, их аутентичности и содержания примесей можно использовать методы хроматогра-



фии: тонкослойную хроматографию и высокоэффективную жидкостную хроматографию. Для определения фракционного состава фосфолипидов и их идентификации наиболее часто используется метод тонкослойной хроматографии в тонком слое сорбента, например, силикагеля:

#### ХОД РАБОТЫ

1. **Освоение метода хроматографии в тонком слое силикагеля.** На хроматограмме должны быть видны три пятна желтого цвета: фосфатидилхолина (лецитина) с  $R_f (0,27 \pm 0,03)$ , фосфатидилэтаноламина с  $R_f (0,43 \pm 0,03)$ , лизолецитина с  $R_f (0,13 \pm 0,03)$ . Допускается наличие четвертого пятна. Идентификацию фосфатидилхолина необходимо проводить, используя стандартные образцы фосфатидилхолина (лецитина), фосфатидилэтаноламина, лизолецитина.

Определение проводится методом хроматографии в тонком слое силикагеля: 0,05 мл 1,0 %-ного раствора исследуемых липидов с помощью микропипетки наносят в виде полоски длиной 5–7 мм и шириной 1–2 мм на линию старта стеклянной пластинки размером 120 x 90 мм с закрепленным слоем силикагеля. Аналогично наносят 1,0 %-ные растворы стандартных образцов.

Пластинку с нанесенной пробой высушивают на воздухе в течение 5–6 минут, после чего помещают в камеру высотой 190–220 мм, диаметром 150–200 мм, которая содержит смесь растворителей: хлороформ – метанол – вода в соотношении 65 : 25 : 4 и хроматографируют восходящим методом. Когда фронт растворителя дойдет до края пластины, её вынимают из камеры, высушивают на воздухе в течение 15–20 минут. Хроматограмму проявляют парами йода в течение 2–5 минут.

#### Примечания:

1. При отсутствии коммерческих пластин для тонкослойной хроматографии («Silufol», «Merk» и др.) возможно приготовление пластин по следующей методике.

*Приготовление пластинки с тонким слоем силикагеля.* В ступке тщательно перемешивают 3,2 г силикагеля и 7,5 мл воды до получения однородной массы, которую наносят ровным слоем на пластинку. Пластинку высушивают на горизонтальной поверхности в течение 3-х часов при тем-

пературе  $(20 \pm 2)$  °С, а потом активируют в сушильном шкафу при температуре  $(110 \pm 5)$  °С в течение 40–50 минут.

2. Камеру для проведения хроматографии готовят за 40–50 минут до нанесения липидных образцов.

3. Проверка пригодности хроматографической системы:

-  $R_f$  стандартного образца лецитина («Sigma», каталожный номер Р 4279), должен быть около  $(0,27 \pm 0,03)$ ;

- при нанесении раствора лецитина в количестве 50 мкг на хроматограмме должно быть четко видимое пятно.

2. **Изучение степени окисления фосфолипидов (индекс окисленности).** Для изучения свободно-радикального окисления фосфолипидов наиболее часто используют определение *перекисного индекса Клейна* как соотношение оптических плотностей в УФ-спектре (233 нм / 215 нм), который характеризует степень окисления липидов. Содержание первичных продуктов перекисного окисления липидов – диеновых конъюгатов определяют путем измерения оптической плотности при длине волны 233 нм. При длине волны 215 нм поглощение липидов примерно одинаково. В связи с этим увеличение перекисного окисления фосфолипидов отражается в увеличении индекса Клейна.

Препарат (0,25 мл) помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем спиртом этиловым до отметки; перемешивают и измеряют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при длине волн 215 нм и 233 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

В качестве раствора сравнения используют этиловый спирт. Индекс окисленности ( $X$ ) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{D_{233 \text{ нм}}}{D_{215 \text{ нм}}}, \quad X \leq 0,3.$$

3. **Определение содержания липидов в растворе.** Препарат (0,5 мл) помещают в стеклянный бюкс, предварительно высушенный до постоянной массы в сушильном шкафу при температуре 100–105 °С, и высушивают при температуре  $(75 \pm 5)$  °С до постоянной массы. Взвешивание проводят с точностью до четвертого десятичного знака.

Содержание липидов в препарате ( $X$ ) в процентах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(a-b) \cdot 100}{0,5},$$

где 0,5 – объем исследуемого препарата, мл;

$a$  – масса бюкса с препаратом, высушенным до постоянной массы, г;

$b$  – масса пустого бюкса, высушенного до постоянной массы, г.

Содержание липидов вычисляют из двух параллельных определений.

**4. Определение массовой доли фосфатидилхолина.** Массовая доля должна быть не менее 80 %. Определение проводят методом хроматографии в тонком слое силикагеля. Окрашенные в желтый цвет пятна липидов, полученные на хроматограмме при определении аутентичности препарата, обводят иголкой. Пластинку нагревают в сушильном шкафу при температуре  $(60 \pm 2)$  °С в течение 40–50 мин до исчезновения окрашивания пятен. Отмеченное пятно лецитина и остальные пятна липидов (суммарно) переносят в отдельные колбы Кьельдаля, прибавляют 1 мл перхлорной кислоты и минерализуют на электроплитке в течение 5–6 часов до полного обесцвечивания растворов. После охлаждения к растворам прибавляют по 5 мл воды, 1 мл 2,5 %-ного раствора аммония молибдата и 1 мл свежеприготовленного 10 %-ного раствора кислоты аскорбиновой. Стенки колб дополнительно промывают 2 мл воды и нагревают колбы на кипящей водяной бане 5–6 минут. После охлаждения содержимое колб переносят в центрифужные пробирки вместимостью 15–20 мл и центрифугируют при скорости вращения 3000–4000 об/мин в течение 10–12 мин. Измеряют оптические плотности полученных надосадочных жидкостей на спектрофотометре при длине волны 820 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Параллельно таким же способом обрабатывают равный участок чистого силикагеля и используют полученный раствор в качестве раствора сравнения. Содержание лецитина в препарате ( $X$ ) в процентах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \cdot 100}{D + D_1},$$

где  $D$  – оптическая плотность раствора лецитина;

$D_1$  – оптическая плотность растворов суммарных липидов.

### **Задание 3. Получение липосомальных наночастиц и их контроль.**

**Получение липидной пленки.** Этот этап проводят при постоянном перемешивании раствора липида в органическом растворителе при температуре 37–42 °С. Получение липидной пленки осуществляют при упаривании раствора в вакууме. При использовании гидрофобного препарата его растворяют в соответствующем органическом растворителе и смешивают с раствором липида. На этой стадии температура и величина вакуума, обеспечивающего быструю концентрацию липидов, являются критическими факторами.

На следующем этапе полученную липидную пленку или пленку липида с лекарственной субстанцией эмульгируют в буферном растворе с целью получения мультиламеллярных везикул. Необходимо отметить, что температура в процессе ресуспендирования должна быть выше температуры фазового перехода липидов. При получении везикул кроме температуры необходимо учитывать ряд факторов: ионную силу буфера и величину рН, концентрацию липидов и соотношение липид : лекарственная субстанция, физико-химические свойства используемых компонентов. Размер образующихся везикул определяется так же интенсивностью и временем перемешивания.

**Образование липосом.** Критической стадией получения липосомального лекарственного препарата является образование липосом и включение в них активной фармакологической субстанции. В настоящее время известен ряд способов получения липосомальных препаратов: озвучивание, экструзия, инъекция, методы, основанные на спонтанной везикуляции и на удалении детергентов и ряд других.

**Ультразвуковая обработка** – процесс получения липосом с помощью ультразвука.

**Недостатком этого метода** является крайне низкая производительность; окисление и гидролиз липидов; длительность технологического процесса; повышение температуры реакционной смеси. Серьезным недостатком данного метода также является то, что полученные липосомы недостаточно устойчивы в процесс хранения и требуют дополнительных мероприятий по стабилизации. Кроме того, обнаружена низкая стандартность полученных препаратов, проявляющаяся в неоднородности состава. Ис-

пользование озвучивания неэффективно в ряде случаев, т.к. некоторые лекарственные вещества не выдерживают режимов обработки ультразвуком. Обработка ультразвуком приводит к развитию процессов перекисного окисления фосфолипидных компонентов липосом. Так, например, по нашим данным, ультразвуковая обработка фосфолипидных смесей различного состава при 22 кГц в течение 10–45 минут при температуре  $(25 \pm 5)^\circ\text{C}$  сопровождается увеличением индекса окисленности в 2–3 раза.

Рядом авторов предложено комбинированное использование методов для получения липосом. Так, например, при получении липосом, содержащих цитостатик цисдиаминдихлорплатин, первоначально проводили ультразвуковую обработку при 22 кГц в течение 3–5 минут, а затем замораживание в жидком азоте, с последующим оттаиванием при комнатной температуре. Процесс повторяли 6 раз. По данным авторов, в липосомы включалось 50–60 % от исходной концентрации платины. По данным большинства авторов, *использование ультразвуковой обработки позволяет получать липосомы с низкой эффективностью включения веществ во внутреннее пространство.*

**Метод спонтанной везикуляции** – основан на спонтанном образовании липосом при быстром подщелачивании водных дисперсий, содержащих фосфолипиды.

*К недостаткам данного метода* можно отнести ограниченность в использовании фосфолипидного состава (фосфатидилхолин, фосфатидная кислота); высокую скорость процесса, что затрудняет использование этого метода в промышленных условиях при получении больших объемов липосомальных препаратов; высокое значение рН (более 9,0); определяющее значение температурного режима делает данный метод не приемлемым для ряда лекарственных и биологически активных веществ.

**Инъекция** – получение липосом путем впрыскивания в водную среду раствора фосфолипидов в летучем органическом растворителе.

*К недостаткам этого метода* необходимо отнести низкую эффективность включения в липосомы лекарственных веществ; необходимость удаления растворителя из препарата; нестандартность состава липосом. Кроме того, липосомы, полученные инъекцией или методом удаления детергента, отличаются низкой стабильностью.

*К преимуществам метода* можно отнести возможность влияния на размер липосом за счет температуры водной среды, растворителя, скорости перемешивания и концентрации фосфолипидов.

**Экструзия** – данный процесс осуществляется в гомогенизаторах высокого давления, в результате происходит разрушение крупных мицелл при пропускании липидной эмульсии под высоким давлением через специальный клапан при температуре выше фазового перехода липидов, используемых в составе липосом.

*Преимуществом этого метода* является стандартность состава липосом; высокая производительность метода; минимальное окисление и гидролиз фосфолипидов; сохранность лекарственного препарата; стабильность липосом. Существенное значение имеет наличие стандартного промышленного оборудования для работ под высоким давлением и получение препарата в асептических условиях в закрытом режиме, при этом в ходе процесса возможен контроль значений температуры и давления.

#### ХОД РАБОТЫ

При подтверждении соответствия комплекса фосфолипидов предъявляемым требованиям (доля фосфатидилхолина – не менее 80,0 %; индекс окисленности – не более 0,3) аликвотную часть раствора липидов (около 200 мг) переносят в круглодонную колбу и концентрируют упариванием в вакууме до постоянной массы. К полученной липидной пленке прибавляют 200 мл воды очищенной и суспендируют до получения гомогенной эмульсии. Полученную эмульсию охлаждают до 4–8 °С, а затем помещают в ультразвуковой дезинтегратор УЗДН-1. стакан с эмульсией помещают в емкость со льдом. Обработку проводят при 22 кГц в течение 25 минут. Каждые 5 минут отбирают пробу для определения индекса окисленности, оптической плотности (размера частиц) и величины рН.

Полученные данные заносятся в таблицу. Делается вывод о влиянии времени обработки на оптическую плотность при 540 нм, индексе окисленности и рН.

Показатели	Через 5 мин.	Через 10 мин.	Через 15 мин.	Через 20 мин.	Через 25 мин.
Индекс окисленности					
Оптическая плотность при 540 нм					
pH					

### **Контрольные вопросы и задания**

1. Опишите основные методические подходы к проведению хроматографии в тонком слое силикагеля.
2. С какой целью определяют индекс окисленности фосфолипидов? По какой формуле рассчитывают величину индекса окисленности?
3. Какова роль фосфолипидов в биологических мембранах?
4. Укажите свойства липидов в лекарственных препаратах и обоснуйте преимущества липосомальных препаратов.
5. Почему при выделении фосфолипидов используют различные органические растворители? Обоснуйте это.
6. С какой целью используются стандартные образцы фосфолипидов при проведении хроматографии?
7. Опишите реакцию подлинности на фосфолипиды.
8. Каким методом определяют количественное содержание примесей в препаратах фосфолипидов?
9. Что такое экстракция?
10. Проведите оценку различных методов получения липосом.
11. Как влияет время обработки ультразвуком на процессы окисления липидов?

## **2.2. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 2. Изучение продуктов метаболизма в культуральной жидкости «чайного гриба»**

**Цель работы.** Ознакомиться с принципом методов определения в культуральной жидкости: pH, аминного азота, суммарных сахаров, нуклеиновых кислот, витамина С, общего белка и кислотного числа.

### **Основные задания:**

1. Приготовление питательной среды и посев культуры «чайного гриба».
2. Освоить метод определения концентрации водородных ионов (pH) в культуральной жидкости.
3. Освоить методику определения аминного азота в культуральной жидкости.
4. Освоить методику определения нуклеиновых кислот в культуральной жидкости.
5. Освоить методику определения витамина С (аскорбиновой кислоты) в культуральной жидкости.
6. Освоить методику определения суммарных сахаров в культуральной жидкости.
7. Освоить методику определения общего белка в культуральной жидкости при помощи биуретовой реакции.
8. Освоить методику определения кислотного числа в культуральной жидкости.

Номер задания		1	2	3	4	5	6	7	8
<b>Приборы и аппаратура</b>	1. Термостат с температурой 25–30 °С	+							
	2. Весы аналитические	+		+	+	+	+	+	+
	3. рН-метр		+	+					
	4. Стаканы стеклянные, 50 мл		+	+				+	+
	5. Бумага фильтровальная		+	+	+	+	+	+	+
	6. Пипетки 5 мл, 10 мл			+	+	+	+	+	+
	7. Цилиндры мерные			+	+	+	+		
	8. Колбы мерные на 50 и 100 мл			+			+		
	9. Печка электрическая				+		+		
	10. Шкаф сушильный (50–200 °С)				+		+		
	11. Баня водяная (100 °С)				+		+		
	12. Центрифуга, 2000 об/мин				+				
	13. Спектрофотометр				+		+		
	14. Конические колбы, 100 мл						+		
	15. Холодильник (4–8 °С)						+		
	16. Пробирки						+		
	17. Фотоэлектрокалориметр								+
<b>Сырье</b>	1. Культура чайного гриба	+							
<b>Реактивы</b>	1. Сахарный песок	+							
	2. Вода кипяченая	+							
	3. Чай заварочный	+							
	4. Раствор NaOH 0,1 моль/л, Р				+			+	
	5. Раствор HCl 0,1 моль/л, Р				+				
	6. Формалин нейтральный, Р				+				
	7. Раствор 10 % NaOH, Р				+				
	8. Хлорная кислота 0,5 моль/л, Р				+				
	9. Раствор 2 % хлористоводородной кислоты, Р						+		
	10. Раствор 1 % калия иодида, Р						+		
	11. Раствор крахмала (0,5 %), Р						+		
	12. Вода очищенная, Р						+		

	13. Раствор калия иодата (0,00167 моль/л), Р								+										
	14. Антроновый реактив (свежеприготовленный), Р																		+
	15. Серная кислота концентрированная, Р																		+
	16. Глюкоза, Р																		+
	17. Раствор натрия хлорида 0,9 %																		+
	18. Стандартный образец белка – альбумин																		+
	19. Калий-натрий тартрат, Р																		+
	20. Медь сернокислая, Р																		+
	21. Калия иодид, Р																		+
	22. Фенолфталеина раствор, Р																		+
	23. Раствор калия гидроксида 0,1 М, Р																		+

**Теоретическая подготовка к выполнению работы.** «Чайный гриб» собственно грибом не является. В природе широко распространен симбиоз микроорганизмов. В качестве объекта симбиотического исследования нами будет использован «чайный гриб», представляющий собой культуру дрожжевых грибков и уксуснокислых бактерий среди которых главными являются два вида: дрожжеподобный гриб (*Schizosaccharomyces ludwigii*) и бактерия *Acetobacter xylinum*. Эти микроорганизмы образуют на поверхности подсахаренного чайного раствора толстую слизистую пленку. В результате жизнедеятельности микроорганизма образуется раствор, напоминающий квас, приобретающий слегка газированный кисловато-сладкий вкус. На поверхности жидкости плавает «толстый диск» – сверху белый плотный и блестящий, а снизу сероватый и рыхлый слой. Чайный гриб могут называть «медузомицет» в связи с его сходством с медузой. Дрожжи, находящиеся в нижней части, перерабатывают в растворе сахар на спирт и углекислый газ, тем самым, подготавливая среду для уксуснокислых бактерий, которые «склеены» между собой особым веществом и образуют верхнюю часть гриба. Состав уксуснокислых бактерий неоднороден, а по-

этому и вырабатываемые ими вещества неоднородны. Одни из них окисляют образованный дрожжами этиловый спирт в уксусную кислоту, другие превращают сахарозу в глюкозу и фруктозу и окисляют моносахара до глюконовых кислот. Образующиеся кислоты используются дрожжами для синтеза витаминов. Существует предположение, что колонии дрожжевых грибов и уксуснокислых бактерий произошли от микроорганизмов, населяющих почвы Приморского края, которые с мельчайшими частицами земли, прилипшие к корням женьшеня или копытня, попадали в настой и, очутившись в благоприятных условиях, активно размножались, образуя колонию в виде пленки на поверхности жидкости. Исследователи предполагают, что таким образом возникла культура «чайного гриба», которая затем была распространена по всему миру. В ряде аптек Европы настой «чайного гриба» продается и пользуется большой популярностью. Концентрированный «чайный гриб», запатентованный в Германии под названием «Комбука», сохраняет все необходимые активные вещества, за исключением уксусной кислоты и спирта. Установлено, что в состав напитка «чайного гриба» входят вещества, жизненно необходимые для организма человека: витамины группы С, В и РР; органические кислоты (уксусная, глюкононовая, щавелевая, молочная, лимонная); ферменты (каталаза, амилаза, протеаза, липаза). В составе культуральной жидкости обнаружено небольшое количество антибиотиков, подавляющих развитие стафилококков, стрептококков и других бактерий. Наиболее благоприятное воздействие на организм человека оказывает глюкононовая кислота, обладающая дезинтоксикационным действием. Молочная кислота подавляет патогенную микрофлору кишечника и нормализует его деятельность. «Чайный гриб» эффективен при атеросклерозе, нормализует давление при гипертонии, способствует уменьшению головной боли и нормализует сон.

#### ***Задание 1. Приготовление питательной среды и посев культуры «чайного гриба»***

**Внимание!** При получении культуры «чайного гриба» необходимо проводить работу в асептических условиях.

*Работу проводят в лаборатории фармацевтической биотехнологии кафедры биотехнологии, биофизики и аналитической химии НТУ «ХПИ».*

#### **ХОД РАБОТЫ**

Рекомендуемая концентрация сахара для выращивания гриба около 10 %, температура выращивания 25–30 °С. Продолжительность культивирования 14 дней. Выращивание проходит на среде, содержащей экстракт чая и сахар. Экстракт чая служит источником азотистых веществ для дрожжей и уксуснокислых бактерий, а сахар – источник углерода.

1. Вскипятить 1 л водопроводной воды, добавить одну чайную ложку чая. Для получения эффективного напитка необходимо использовать воду с небольшим содержанием кальция, например, кипяченую. Если кальция в избытке, то при соединении с глюкононовой кислотой он образует на дне сосуда осадок глюконата кальция.

2. Через 25–30 минут добавить в раствор 100 г сахарного песка, тщательно перемешать до полного растворения, охладить до температуры 25–30 °С.

3. Подготовленный раствор отфильтровать через металлическую сетку в стерильную емкость вместимостью 2 л.

4. В фильтрованную питательную среду внести слой «чайного гриба», полученного путем отделения от растущего гриба (маточная культура). «Чайный гриб» разрезают на небольшие кусочки, как по горизонтали, так и по вертикали.

5. Культивирование проводить при температуре 25–30 °С, накрыв емкость стерильной тканевой салфеткой. Жидкость приобретает приятный кисло-сладкий вкус и превращается в слегка газированный напиток – «чайный квас».

6. При необходимости в емкость можно доливать чайный экстракт, содержащий 10 % сахара для образования новой порции «чайного гриба».

Полученную при выращивании гриба культуральную жидкость можно использовать для определения в ней продуктов метаболизма: белка, нуклеиновых кислот, аминного азота и др.

#### ***Задание 2. Освоить метод определения концентрации водородных ионов (рН) в культуральной жидкости***

В биологических системах постоянная величина рН поддерживается с помощью эффективных буферных систем, которые по своей химической

природе таковы, что они препятствуют изменениям рН, возникающим в ходе метаболического образования кислот (например, молочной или уксусной кислоты) и оснований (например, аммиака). Большинство буферных систем, содержащихся в клеточных жидкостях, включают фосфаты, бикарбонат, ацетаты, лимонную и барбитуровую кислоты и их соли. При проведении биотехнологических процессов буферные смеси добавляют непосредственно в питательные среды. Так, например, при выращивании *Cl. Tetani* для получения столбнячного токсина или при производстве β-каротина выращивают культуру гриба *Blakeslea trispora*, используя фосфатные соли калия и натрия.

*Чувствительность биологических процессов к рН обусловлена целым рядом причин.* Ионы водорода могут выступать в качестве катализатора ряда процессов, быть реагентом или продуктом реакции. Кроме того, при изменении рН может измениться проницаемость клеточной мембраны, а, следовательно, и распределение веществ или ионов по обе стороны мембраны. Подобно другим биологическим структурам, мембраны содержат способные к ионизации группы, и в зависимости от степени их ионизации меняется конформация, а значит и биологическая активность молекул, в которые эти группы входят. Это, прежде всего, касается белков, а, следовательно, и ферментов.

#### ХОД РАБОТЫ

1. Перед началом измерения рН культуральной жидкости необходимо провести контроль прибора по двум буферным растворам. Установить температуру раствора.

2. Определение рН проводят потенциометрически с применением стеклянного электрода. Полученные данные заносят в лабораторный журнал.

#### *Задание 3. Освоить методику определения аминного азота в культуральной жидкости*

#### ХОД РАБОТЫ

Принцип метода основан на блокировании формальдегидом при рН 7,0 свободных аминогрупп и титровании щелочью эквивалентного ко-

личества карбоксильных групп. Начало и конец титрования определяют потенциометрически.

**Методика определения.** В стакан вместимостью 50 мл наливают 10 мл анализируемого раствора культуральной жидкости и доводят объем водой до 20 мл. Electroды потенциометра погружают в исследуемый раствор, рН которого доводят до 7,0 с помощью раствора NaOH 0,1 моль/л или HCl 0,1 моль/л. Во время определения electroды должны все время оставаться погруженным в раствор. К нейтрализованному раствору добавляют 2 мл нейтрального формалина (рН которого доводят до 7,0 при помощи 10 % раствора NaOH), перемешивают и, не вынимая electroдов, титруют содержимое раствором NaOH 0,1 моль/л до рН 9,1. При титровании используют бюретку. Проводят три параллельных измерения.

Содержание аминного азота в образце (*X*) в мг % определяют по формуле:

$$X = V \cdot K \cdot 1,4 \cdot \frac{100}{N},$$

где *V* – количество раствора NaOH 0,1 моль/л в мл, прошедшее на титрование испытуемой пробы от рН 7,0 до 9,1;

*K* – поправка к титру раствора NaOH 0,1 моль/л;

1,4 – количество аминного азота в миллиграммах, эквивалентное 1 мл раствора NaOH 0,1 моль/л;

100 – коэффициент пересчета миллиграммов в проценты;

*C* – анализируемая навеска сухого препарата в миллиграммах, содержащаяся в титруемом объеме.

#### *Задание 4. Освоить методику определения нуклеиновых кислот в культуральной жидкости*

Определение нуклеиновых кислот проводят методом спектрофотометрии в ультрафиолетовой области.

#### ХОД РАБОТЫ

Метод основан на измерении разности показателей оптической плотности гидролизатов препарата, характеризующей содержание фосфора нуклеиновых кислот. При длине волны 270 нм определяют максимум поглощения нуклеиновых кислот, а при длине волны 290 нм – максимум поглощения белков в присутствии нуклеиновых кислот.

**Методика определения.** К 1 мл образца прибавляют 5 мл раствора кислоты хлорной (0,5 моль/л). Смесь нагревают на 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 с толщиной слоя 10 мм при двух длинах волн: 270 нм и 290 нм по сравнению с контрольным раствором, которым служит раствор хлорной кислоты (0,5 моль/л).

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

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

где  $D_{270}$  и  $D_{290}$  – значение оптической плотности при соответствующей длине волны;

0,19 – удельная экстинкция;

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

6 – разведение препарата.

**Задание 5. Освоить методику определения витамина С (аскорбиновой кислоты) в культуральной жидкости**

#### ХОД РАБОТЫ

В коническую колбу вместимостью 100 мл помещают 10 мл раствора, прибавляют 1 мл 2 % раствора хлористоводородной кислоты, 0,5 мл 1 % раствора калия йодида, 2 мл 0,5 % раствора крахмала, воды до общего объема 20 мл и титруют раствором калия йодата (0,00167 моль/л) до появления стойкого светло-синего окрашивания.

Параллельно проводят контрольный опыт. Для этого в коническую колбу вместимостью 100 мл, помещают 10 мл воды, прибавляют 1 мл 2 % раствора хлористоводородной кислоты, 0,5 мл 1 % раствора калия йодида, 2 мл 0,5 % раствора крахмала, воды до общего объема 20 мл и титруют раствором калия йодата (0,00167 моль/л) до появления стойкого светло-синего окрашивания.

Определяем содержание аскорбиновой кислоты из расчета, что 1 мл раствора калия йодата (0,00167 моль/л) соответствует 0,0008806 г  $C_6H_8O_6$  (кислоты аскорбиновой).

**Задание 6. Освоить методику определения суммарных сахаров в культуральной жидкости**

Основное применение спектрофотометров и фотоколориметров в лаборатории – это точная калориметрия, т.е. измерение количества хромофора, образующегося в ходе реакции.

В данной лабораторной работе калориметрия будет использована для Задания 6 (определение сахаров с антроновым реагентом) и Задания 7 (определение белка с биуретовым реагентом).

**Приготовление раствора.** Антроновый реактив: 0.1 г антрона растворяют в 50 мл кислоты серной концентрированной и перемешивают.

#### ХОД РАБОТЫ

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

**Методика определения.** Получение исследуемого раствора разведенной культуральной жидкости: 1 мл культуральной жидкости помещают в мерную колбу, вместимостью 100 мл; прибавляют 70–80 мл воды, тщательно перемешивают и доводят объем до 100 мл водой; 1 мл полученного раствора переносят в стакан емкостью 50 мл и прибавляют 9 мл воды и перемешивают.

В пробирку помещают 1 мл разведенной культуральной жидкости, охлаждают на бане со льдом и осторожно, по стенке пробирки приливают 2 мл свежеприготовленного антронового реактива. Смесь тщательно перемешивают и нагревают на кипящей водяной бане в течение 15 мин, после чего охлаждают.

Оптическую плотность определяют в кювете с толщиной слоя 10 мм на спектрофотометре при длине волны 625 нм по сравнению с контрольным раствором, содержащем 2 мл антронового реактива и 1 мл воды.

По калибровочному графику находят содержание сахаров в препарате.

**Калибровочный график.** 0,01 г глюкозы растворяют в мерной колбе вместимостью 100 мл в воде и доводят объем раствора водой до метки (0,01 % -ный раствор). В шесть пробирок вносят 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 мл полученного раствора (10–50 мкг глюкозы), в каждую пробирку



прибавляют воду соответственно до 1 мл. Далее проводят анализ, как указано выше.

Все данные заносят в таблицу.

№№ пробирок	1	2	3	4	5	6
Объем раствора глюкозы, мл	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	-
Объем воды, мл	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	1,0
Количество глюкозы, Мкг						
Количество антронового реактива, мл	2	2	2	2	2	2
Результат						

**Задание 7. Освоить методику определения общего белка в культуральной жидкости при помощи биуретовой реакции**

*Биуретовая реакция* – цветная реакция, которую дают с солями меди в щелочной среде биурет: амиды и имиды кислот, белки, полипептиды и некоторые другие соединения. Биуретовая реакция обусловлена наличием в молекулах перечисленных соединений группировки – CO – NH. Образующиеся при биуретовой реакции окрашенные соединения являются комплексами. Для медных биуретовых комплексов каждого соединения характерна окраска (красная, фиолетовая, синяя (только белки)) с максимумом поглощения в интервале 440–640 нм. Биуретовая реакция используется как цветная реакция на белок (при 540 нм) и лежит в основе количественных колориметрических определений. Чувствительность реакции ограничена.

**Приготовление раствора.** Биуретовый реактив: 9 г калия – натрия виннокислого растворяют в 40 мл раствора натрия гидроксида (0,2 моль/л), прибавляют 1 г меди сернокислой. После растворения соли прибавляют 1 г калия иодида и доводят объем тем же раствором натрия гидроксида до 200 мл.

**ХОД РАБОТЫ**

Метод основан на способности пептидной связи молекулы белка образовывать цветное комплексное соединение меди в щелочной среде.

**Методика определения.** К 5 мл культуральной жидкости прибавляют 5 мл биуретового реактива. Параллельно готовят образцы стандартного раствора: к 5 мл каждого из 5 разведений стандартного раствора прибавляют 5 мл биуретового реактива. Одновременно готовят контрольную смесь, состоящую из 5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и 5 мл биуретового реактива. Все пробы перемешивают и оставляют на 30 мин. Оптическую плотность раствора определяют на ФЭКе при длине волны 540 нм в кюветках с толщиной слоя 10 мм по сравнению с контрольным раствором.

Содержание белка (X) в процентах вычисляют по формуле:

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

где  $C_{\text{ст}}$  – концентрация белка стандартного раствора, %;

$D_{\text{ст}}$  – показатель оптической плотности стандартного раствора;

$D_{\text{исп}}$  – показатель оптической плотности испытуемого раствора.

*Стандартный раствор* готовят из стандартного образца белка путем разведения 1 мл образца белка при помощи 0,9 % раствора натрия хлорида до конечной концентрации 0,5–1,0 мг в мл.

**Задание 8. Освоить методику определения кислотного числа в культуральной жидкости**

*Кислотным числом* ( $I_A$ ) называют количество калия гидроксида в мг, необходимое для нейтрализации свободных кислот, которые содержатся в 1 мл испытуемого раствора.

**ХОД РАБОТЫ**

К 10 мл раствора прибавляют 0,5 мл раствора фенолфталеина. Полученный раствор титруют 0,1 М раствором калия гидроксида до появления розового окрашивания, которое не исчезает в течение 15 мин. Кислотное число ( $I_A$ ) вычисляют по формуле:

$$I_A = 5,61 \cdot \frac{B}{10},$$

где  $B$  – количество 0,1 М раствора калия гидроксида, ушедшее на титрование, мл;

5,61 – количество калия гидроксида, которое соответствует 1 мл 0,1 М калия гидроксида, мл;

10 – объем испытуемого раствора культуральной жидкости.

### **Контрольные вопросы**

1. Чем вызвано научное название «чайного гриба» медузомицет?
2. Какие компоненты напитка «чайного гриба» полезны для здоровья человека?
3. Какие компоненты питательной среды служат источниками углерода и азота в процессе культивирования «чайного гриба»? Какие условия необходимо поддерживать в процессе культивирования? При какой продолжительности культивирования достигаются оптимальные органолептические показатели?
4. Какие культуры представлены в симбиозе «чайного гриба»?
5. Указать продукты метаболизма, представляющие наибольший интерес.
6. Какую роль играет величина рН в биологических системах?
7. Что характеризует величина рН в растворе?
8. Каким образом влияет температура на рН раствора?
9. Указать на каком приборе проводят определение рН.
10. Описать электроды, используемые при измерении рН.
11. Описать методику измерения рН в водных растворах.
12. Какова роль буферных растворов при потенциометрии? Что такое калибровка прибора?
13. Какой метод лежит в основе определения аминного азота?
14. С какой целью используют спектроскопию в ультрафиолетовой и видимой областях?
15. Сформулируйте закон Ламберта – Бэра и укажите какие факторы определяют величину экстинкции?
16. Опишите принципы работы прибора для измерения экстинкции в ультрафиолетовой и видимой областях.
17. Что представляет собой однокомпонентный однолучевой анализ?
18. Что представляет собой многокомпонентный спектрофотометрический анализ?

19. Опишите роль фотоэлементов при проведении спектрофотометрии.

20. Как может влиять состояние кювет на результат спектрофотометрии?

21. Какую роль при спектрофотометрии играет ширина щели?

22. Объясните использование формулы при определении количества нуклеиновых кислот в биологической среде.

23. Какой принцип лежит в методике определения витамина С в культуральной жидкости?

24. Каковы основные принципы колориметрии при определении сахаров и других веществ?

25. Опишите принцип определения белков при помощи биуретовой реакции.

26. С какой целью используется стандартный образец при определении белка в культуральной жидкости?

27. С какой целью, и каким методом определяют кислотное число?

### **2.3. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 3. Характеристика моноклональных антител в составе лекарственных биотехнологических препаратов**

**Цель работы.** Овладеть методикой контроля препарата, полученного с помощью биотехнологии – моноклональных антител Трастузумаба (Герцептин) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: распределение молекул по размерам.

#### **Основное задание:**

1. Освоить методику проведения высокоэффективной жидкостной хроматографии и изучить распределение антител в препарате моноклональных антител по молекулярным массам.

Номер задания		1
<b>Приборы и аппаратура</b>	1. Соответствующая система для изократической ВЭЖХ, способная подавать растворитель со скоростью 0,5 мл/мин, и система УФ детектирования при длине волны 280 нм	+
	2. Компьютерная система для интеграции площади пика	+
	3. Колонка: TSK G3000SWXL, 7,8 x 300 мм (от фирмы TosoHaas no. 08541)	+
	4. Колонка: Bio-Sil SEC 250 (от фирмы Bio-Rad no. 125-0062) или равноценная	+
<b>Сырье</b>	1. Препарат моноклональных антител	+
<b>Реактивы</b>	1. Концентрированная фосфорная кислота, P	+
	2. Фосфат калия двухосновной, P	+
	3. Вода очищенная, P	+
	4. Мембраны с размером пор – 0,45 мкм («Millipore» или аналогичные)	+
	5. Азид натрия (Fluca 71289 или равноценный)	+
	6. L-гистидин HCl моногидрат (Sigma, H-8125)	+
	7. L-гистидин (Sigma, H-8000)	+
	8. Трегалоза дигидрат (Sigma, T-5251)	+
	9. Полисорбат 20 (Fluka, 93773)	+

**Теоретическая подготовка к выполнению работы.** Препарат представляет собой противоопухолевое средство. Трастузумаб – рекомбинантные гуманизированные моноклональные антитела, производные ДНК, которые селективно взаимодействуют с внеклеточным доменом белка, который является рецептором-2 к эпидермальному фактору роста человека (HER2). Гуманизированные антитела содержат 90–95 % белка человека и 5–10 % белка мыши. Антитела принадлежат к классу IgG и состоят из участков регионов человека (константные участки тяжелых цепей) и определяющих комплементарность мышиных участков антитела p185 HER2 к HER2.

**HER2** (Neu, ErbB-2, CD340) – мембранный белок, является протоонкогеном из семейства рецепторов эпидермального фактора роста – рецепторных тирозинкиназ. HER2 кодируется трансмембранным рецептороподобным белком с молекулярной массой 185 кДа, который структурно похож на другие члены семейства рецепторов эпидермального ростового фактора. Амплификация гена HER2 приводит к гиперэкспрессии белка HER2 на мембране клеток опухоли, что в свою очередь вызывает постоянную активацию рецептора HER2.

**Форма выпуска.** Порошок лиофилизированный для приготовления концентрата для инфузий.

**Назначение.** Лечение больных на метастазирующий рак молочной железы с опухолевой гиперэкспрессией HER2:

Определение проводят при использовании метода высокоэффективной жидкостной хроматографии.

#### **Приготовление растворов:**

1. **Подвижная фаза** (100 мМ фосфата калия, pH 6,8). Растворить 17,4 грамма двухосновного фосфата калия приблизительно в 900 мл воды. Установить pH раствора на уровне 6,8 с помощью концентрированной фосфорной кислоты. Довести объем раствора до 1 л и профильтровать через мембрану с размером пор 0,45 мкм. Перед использованием дегазировать. Хранить при комнатной температуре. Использовать в течение 1 месяца относительно даты изготовления.

2. **Раствор для хранения колонки** (100 мМ фосфата калия и 0,05 % азида натрия, pH = 6,8). Азид натрия (Fluca 71289 или равноценный) – 0,5 г; 100 мМ фосфата калия и 0,05 % азида натрия; pH = 6,8.

Подвижную фазу (необходимое количество – до 1 литра) профильтровать через мембрану с размером пор 0,45 мкм. Хранить при комнатной температуре. Использовать в течение 6 месяцев относительно даты изготовления.

3. **Рецептурный буфер (Плацебо)** (5 мМ L-гистидина; 60 мМ трегалозы; 0,01 % полисорбата-20). Реактивы: L-гистидин HCl моногидрат – 0,56 г; L-гистидин – 0,36 г; трегалозы дигидрат – 22,7 г; полисорбат-20 – 0,1 г; вода очищенная – до 1 л.

Смешать перечисленные выше реактивы в 800 мл воды и перемешать до полного растворения. Довести объем раствора до 1,0 л и профильтровать через мембрану с размером пор 0,45 мкм; pH = 6,0 ± 0,5.

Хранить при температуре 2–8 °С. Использовать в течение 1 месяца относительно даты изготовления.

#### ХОД РАБОТЫ

##### *Условия кондиционирования новых колонок:*

1. Уравновесить колонку подвижной фазой до получения стабильной нулевой линии.

2. Ввести по 20 мкл rhumab HER2 с концентрацией 10 мг/мл до получения стабильной хроматографии (форма пика, высота пика и площадь пика) трех последовательных инъекций.

##### *Параметры хроматографии:*

1. Скорость потока – 0,5 мл/мин.
2. Температура колонки – комнатная.
3. Общая длительность анализа – 30 мин.
4. Установка монитора – 280 нм.
5. Объем пробы – 20 мкл (≈ 200 мкг).

##### *Анализ пробы:*

1. Развести образец и эталон до концентрации приблизительно 10 мг/мл рецептурным буфером.

2. Ввести 20 мкл эталонного вещества (≈ 200 мкг при концентрации 10 мг/мл).

3. Ввести такое же количество образца и эталона.

4. Ввести 20 мкл эталонного вещества.

5. Ввести 20 мкл рецептурного буфера для продукта или плацебо продукта.

6. Хранить колонку в растворе для хранения колонки.

##### *Анализ данных:*

1. Не учитываются пики, присутствующие на хроматограмме рецептурного буферного раствора.

2. Для расчета процентного содержания мономера при каждой инъекции используют следующую формулу:

$$\% \text{ мономера} = \frac{\text{Площадь пика мономера}}{\text{Общая площадь rhumab HER2}} \cdot 100 \%$$

##### *Соответствие системы:*

1. Провести расчет разделения ( $R$ ) в соответствии с требованиями Европейской Фармакопеи или Фармакопеи США между агрегированным пиком и пиком мономера для одной инъекции, использованной как тест на соответствие системы. Расчет разделения проводится по формуле:

$$R = 1,18 \cdot \frac{(t_2 - t_1)}{W_1(0,5) + W_2(0,5)},$$

где  $t_1$  – время удерживания агрегированного пика;

$t_2$  – время удерживания пика мономера;

$W_1(0,5)$  – ширина агрегированного пика на половине высоты;

$W_2(0,5)$  – ширина пика мономера на половине высоты.

2. Для прохождения теста на соответствие системы разделения ( $R$ ) должно быть  $> 1,5$ .

##### *Требования спецификации:*

Распределение молекул трастузумаба по размерам:

- при выпуске должно быть  $\geq 98 \%$ ;
- при хранении должно быть  $\geq 95 \%$ .

##### *Контрольные вопросы и задания*

1. Опишите свойства моноклональных антител, которые позволяют их использование в лекарственных препаратах.

2. Указать, какие виды моноклональных антител известны в настоящее время?

3. С какой целью используется препарат моноклональных антител Трастузумаб?

4. Какая методика используется для определения молекулярного состава препарата моноклональных антител?

5. Опишите основные условия проведения ВЭЖХ.

6. По какой формуле проводят определение в препарате содержание мономера (в %)?

7. Укажите нормы содержания мономера в препарате при выпуске и в процессе хранения. С чем связано уменьшение содержания мономера в препарате во время хранения?

8. С какой целью проводят определение «соответствия системы» при проведении ВЭЖХ?

#### 2.4. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 4. Выращивание штаммов микроорганизмов (пробиотиков) и контроль полученных продуктов

**Цель работы.** Овладеть методиками изготовления и контроля питательных сред. Освоить методы контроля содержания живых бифидобактерий и лактобацилл. Освоить методы контроля кислотообразования бифидобактерий и лактобацилл и провести изучение влияния количества посевного материала на содержание продуктов метаболизма.

*Работу проводят в условиях асептики в лаборатории фармацевтической биотехнологии кафедры биотехнологии, биофизики и аналитической химии НТУ «ХПИ».*

##### Основные задания:

1. Освоение методик изготовления и контроля питательных сред.
2. Освоить методы контроля содержания живых бифидобактерий и лактобацилл.
3. Освоить методы контроля кислотообразования бифидобактерий и лактобацилл.
4. Провести изучение влияния количества посевного материала на содержание продуктов метаболизма.

Номер задания	1	2	3	4	
<b>Приборы и аппаратура</b>	1. Весы аналитические	+	+	+	+
	2. Печка электрическая	+			
	3. Мешалки электрические	+			
	4. Шкаф сушильный (50–200 °С)	+	+	+	+
	5. Термостат ( $t = (38 \pm 1) \text{ } ^\circ\text{C}$ )		+	+	+
	6. Холодильник 4–8 °С	+	+	+	+
	7. рН-метр	+		+	+
	8. Воронка Бюхнера	+			
	9. Колба Бунзена	+			
	10. Пипетки 5 мл, 10 мл	+	+	+	+
	11. Цилиндры мерные	+	+	+	+
	12. Колбы вместимостью 50 и 100 мл		+	+	+
	13. Воронки конусные		+	+	+
	14. Бумага фильтровальная	+			
	15. Автоклав паровой	+			
	16. Пробирки стеклянные 20 и 50 мл	+	+	+	+
<b>Сырье</b>	1. Печень говяжья	+			
	2. Дрожжи или автолизат дрожжей (коммерческий)	+			
	3. Казеин или ферментативный гидролизат казеина (коммерческий)	+			
	4. Пептон	+			
	5. Агар-агар	+			
	6. Говяжья поджелудочная железа	+			
<b>Реактивы</b>	1. Натрия хлорид, Р	+			
	2. Лактоза, Р	+			
	3. Марганца сульфат, Р	+			
	4. Магния сульфат, Р	+			
	5. L-цистин, Р 10	+			
	6. Калия дигидрофосфат, Р	+			
	7. Глюкоза, Р	+			
	8. Пептон сухой ГОСТ 13805-76	+			
	9. ТВИН-80, Р	+			

10. Аммония цитрат, Р	+			
11. Натрия ацетат, Р	+			
12. Гидролизованное молоко по Богданову (500 мл)	+			
13. Натр едкий, Р		+	+	+
14. Кислота хлористоводородная, Р	+			
15. Вода очищенная, Р	+	+	+	+
16. Раствор фенолфталеина, Р			+	+
17. Раствор NaOH, 0,1 N, Р			+	+
18. Штаммы:				
▪ Флаконы «Лактобактерин» (коммерческий)		+	+	+
▪ Флаконы «Бифидумбактерин» (коммерческий)		+	+	+

**Теоретическая подготовка к выполнению работы.** Вопросы использования фармацевтических препаратов и биологически активных добавок, содержащих штаммы микроорганизмов-пробиотиков, сегодня становятся весьма актуальными. Возможность использования таких препаратов, прежде всего, связана с уникальностью их роли в биологических процессах.

*Кишечный микробиоценоз* – сложная экосистема. В её состав входит более 400 видов микроорганизмов. Пробиотики, восстанавливают пристеночное пищеварение и колонизационную резистентность. В кишечнике человека, млекопитающих и птиц обитает более 400 видов микроорганизмов, которые выполняют различные функции. По численности и физиологической значимости преобладают бифидобактерии и лактобациллы. *Лактобациллы* – аэротолерантные аэробы, *бифидобактерии* – облигатные анаэробы. В норме они заселяют слой, прилегающий к клеткам ворсинок в нижних отделах тонкого и толстого кишечника. Постоянно находясь там, они участвуют в примембранном пищеварении, создают колонизационную резистентность, закрепляясь на поверхности слизистой, препятствует её заселению патогенной и условно-патогенной микрофлорой. У женщин лактобациллы и бифидобактерии также колонизируют нижние отделы гени-

тального тракта, причем, у женщин репродуктивного возраста бифидобактерии обнаруживаются сравнительно редко (в 10–15 % случаев) и основной нормобиоценоз составляют ассоциации представителей *Lactobacillus* с сапрофитными стрептококками и каталазопродуцирующими коринобактериями и стафилококками. Пробиотики можно использовать одновременно с антибиотиками, если пробиотики включают устойчивые к антибиотикам штаммы (например, лактобифидол). Если штаммы, входящие в препарат не устойчивы к антибиотикам, то его применяют после антибиотикотерапии для восстановления нормальной микрофлоры. Антагонизм к патогенной флоре проявляется в разной степени у разных препаратов за счет продукции органических кислот, перекисей, низкомолекулярных пептидов. Существует мнение, что именно бифидобактерии, составляющие 85–98 % микрофлоры кишечника, играют определяющую роль в регуляции нормобиоценоза и его стабильности. Клеточные стенки бифидобактерий содержат большое количество мурамилдипептида, высвобождение которого способствует активации Т- и В-лимфоцитов и макрофагов, играющих роль в создании общей резистентности организма.

К началу XXI века накоплены данные о роли естественных микробиоценозов организма. Симбиотические ассоциации, составляющие нормальную микрофлору человека, сформировались в результате взаимодействия макро- и микроорганизмов, эволюционирующих параллельно и взаимосвязано.

*Пробиотики (pro bios – для жизни)* – препараты, содержащие живые микроорганизмы, относящиеся к нормальной, физиологически и эволюционно обоснованной флоре кишечного тракта. Они положительно влияют на организм хозяина, способствуют восстановлению пищеварения, биологического статуса, иммунного ответа, повышают эффект вакцинации. Пробиотики являются бактериальными препаратами, которые содержат те или иные микроорганизмы облигатной микрофлоры (бифидобактерии, лактобациллы, энтерококки, аэрококки, эшерихии и др.), осуществляющие при естественном способе введения положительное влияние на микробиоценоз кишечника хозяина. Симбионтное пищеварение происходит при содействии анаэробной кишечной микрофлоры и осуществляется преимущественно в восходящем отделе толстой кишки. При этом разлагаются не только

непереваренные в верхних отделах желудочно-кишечного тракта остатки пищи (преимущественно растительные волокна), но и другие органические соединения. В нормальных физиологических условиях протеолитические и сахаролитические бактерии совместно участвуют в этом процессе. Среди метаболитов особого внимания заслуживают так называемые короткоцепочечные летучие жирные кислоты: уксусная, пропионовая, масляная, молочная и др. В состав препаратов входят представители нормальной микрофлоры человека, продуцирующие разнообразные по химическому составу вещества, проявляющие антимикробную активность: перекиси, низкомолекулярные кислоты, антибиотикоподобные пептиды, лизоцим и др. К настоящему времени установлено, что короткоцепочечные летучие жирные кислоты выполняют в организме ряд важнейших функций: энергетическую поддержку, стимуляцию функций непатогенной симбионтной флоры, противовоспалительную и бактериостатическую (в отношении патогенной микрофлоры) активность, поддержание необходимых значений pH в кишечнике. В настоящее время препараты, содержащие пробиотические штаммы, выпускают в виде лиофильно высушенной биомассы, таблеток, капсул, микрокапсул и в других формах. В состав этих препаратов помимо штаммов бактерий могут входить пребиотики.

*Пребиотики* – субстраты, стимулирующие естественную микрофлору, которые в норме поступают в организм человека, и которые не перевариваются и не всасываются в желудке и тонком кишечнике, а, поступая в толстый кишечник, используются в качестве питательной среды для нормальной микрофлоры. У людей в первые дни после рождения основным пребиотиком является лактулоза, входящая в состав грудного молока.

*Синбиотики* – это рациональная комбинация пробиотиков и пребиотиков.

### **Задание 1. Освоение методик изготовления и контроля питательных сред**

#### **ХОД РАБОТЫ**

##### **1. Приготовление среды Блаурокка**

Для изготовления питательной среды используют продукт, полученный путем экстракции измельченной говяжьей печени водой (при соотно-

шении 1 : 1) с последующим кипячением в течение одного часа и стерилизацией при температуре  $(120 \pm 1) ^\circ\text{C}$  в течение 20 минут при 0,1 МПа. К экстракту печени прибавляют пептон (1,0 %), натрия хлорид (0,5 %), лактозу (1,0 %), агар-агар (0,2 %), цистеин (0,01 %). Устанавливают pH таким образом, чтобы после стерилизации значение pH составляло  $(6,8 \pm 0,3)$ ; кипятят, фильтруют и стерилизуют при  $112 ^\circ\text{C}$  30 минут (0,05 МПа). Среду хранят при температуре  $(6 \pm 2) ^\circ\text{C}$  не более 2-х месяцев.

На флаконы крепят этикетки, где указано: наименование среды, количество и дата приготовления. Питательную среду возможно хранить при температуре 2–8 °C в течение 60 суток.

##### **2. Приготовление казеиново-дрожжевой среды**

Выбор казеиново-дрожжевой среды, прежде всего, связан с тем, что эта среда в значительной степени отвечает требованиям массового производства по совокупности биологических, технологических и экономических параметров. Для изготовления казеиново-дрожжевой среды необходимы ферментативный гидролизат казеина и автолизат пекарских дрожжей.

*Гидролизат казеина получают* путем проведения ферментативного гидролиза казеина поджелудочной железой при pH 8,0–8,2 и температуре  $(58–62) ^\circ\text{C}$  в течение 5–7 суток (на 200 г казеина используют 1,0 л воды и 200 г измельченной свиной поджелудочной железы). В течение всего указанного срока значение pH поддерживается на указанном уровне. Начиная с 4-го дня, проводят определение аминного азота. Прекращение его нарастания свидетельствует о том, что процесс ферментативного гидролиза окончен. Содержание аминного азота в гидролизате казеина должно быть от 450 до 600 мг %. Прозрачную надосадочную жидкость отделяют и подвергают фильтрации. Гидролизат казеина подвергают стерилизации при температуре  $(120 \pm 1) ^\circ\text{C}$  в течение 30 минут и давлении 0,11 МПа. Хранят гидролизат при температуре 2–10 °C.

*Приготовление автолизата пекарских дрожжей* проводят путем лизирования дрожжевых клеток при температуре 56–58 °C в течение 48 часов. К дрожжам прибавляют воду (в соотношении 1 : 4) и смесь стерилизуют при температуре 119–121 °C и давлении 0,11 МПа в течение

30 минут. Содержание аминного азота в автолизате 150–180 мг %. Хранят при температуре 4–10 °С не более 1,5 месяцев.

*Приготовление казеиново-дрожжевой среды:* ферментативный гидролизат казеина, разведенный водой до содержания аминного азота (150 ± 10) мг % смешивают с дрожжевым автолизатом (соотношение 1 : 2), прибавляют натрия хлорид (0,5 %), устанавливают рН таким образом, чтобы после стерилизации значение рН составляло (7,0 ± 0,2), кипятят, добавляют лактозу, агар-агар и цистеин. Смесь фильтруют и стерилизуют при температуре 119–121 °С и давлении 0,11 МПа в течение 30 минут.

На флаконы крепят этикетки, где указано: наименование среды, количество и дата приготовления. Питательную среду возможно хранить при температуре 2–8 °С в течение 7 суток.

### 3. Приготовление среды МРС-4

Марганца сульфат (50 мг), магния сульфат (200 мг), L-цистеин (200 мг), калий фосфорнокислый (2 г), аммония цитрат (2 г), натрия ацетат (5 г), глюкозу (20 г) растворяют при нагревании в 200 мл воды, прибавляют пептон сухой (10 г), Твин-80 (1 мл), дрожжевой автолизат (150 г), печеночной воды (100 мл), агар-агар (20 г), воду до объема 500 мл, гидролизованное молоко (500 мл). В полученной смеси устанавливают рН таким образом, чтобы после стерилизации в готовой среде значение рН составляло (6,4 ± 0,2), кипятят в течение 1 минуты, разливают во флаконы по 100 мл и стерилизуют при температуре 112 °С 30 минут.

На флаконы крепят этикетки, где указано: наименование среды, количество и дата приготовления. Питательную среду возможно хранить при температуре 2–8 °С в течение 30 суток.

*Примечание:* определение аминного азота проводят по методике, изложенной в Лабораторной работе № 2 (Задание № 3).

### Задание 2. Освоить методы контроля содержания живых бифидобактерий и лактобацилл

#### ХОД РАБОТЫ

##### 1. Количество живых лактобацилл в одной дозе

Для определения количества живых лактобацилл в одной дозе препарата содержащее одного флакона растворяют раствором 0,9 % натрия

хлорида из расчета 1 мл на 1 дозу. Полученную суспензию лактобацилл в объеме 1 мл переносят в пробирку с 9 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, тщательно перемешивают, получая 1 дозу лактобацилл в 10 мл суспензии. Из этой пробирки получают последующие десятикратные разведения от  $10^{-1}$  до  $10^{-9}$ . Из полученных разведений  $10^{-6}$  и  $10^{-7}$  высевают по 0,1 мл микробной суспензии на две чашки Петри со средой МРС-4. Биомассу втирают шпателем в питательную среду. После инкубирования при температуре (37 ± 1) °С в течение (44 ± 4) часов производят подсчет колоний живых лактобацилл. Проводят подсчет колоний для каждого разведения и вычисляют среднее арифметическое.

*Пример расчета:*

60 колоний – в разведении  $10^7$ ;

540 колоний – в разведении  $10^6$ .

$$\frac{60 \cdot 10^7 + 540 \cdot 10^6}{2} \cdot 10 = \frac{6 \cdot 10^8 + 5,4 \cdot 10^8}{2} \cdot 10 = \frac{11,4 \cdot 10^8}{2} \cdot 10 = 5,7 \cdot 10^9 = 5,7 \text{ млрд}$$

**10** – учет степени разведения, т.к. высевали на чашку 0,1 мл.

В одной дозе препарата должно быть не менее 4-х миллиардов живых лактобацилл.

##### 2. Количество живых бифидобактерий в одной дозе

Для определения количества живых бифидобактерий в одной дозе препарата содержащее каждого флакона растворяют раствором 0,9 % натрия хлорида из расчета 1 мл на 1 дозу. Полученную суспензию бифидобактерий в объеме 1 мл переносят в пробирку с 9 мл среды Блаурокка, тщательно перемешивают, получая 1 дозу бифидобактерий в 10 мл среды. Из этой пробирки получают последующие десятикратные разведения от  $10^{-1}$  до  $10^{-9}$ . Указанные пробирки инкубируют при температуре (38 ± 1) °С в течение 2–4 дней в зависимости от используемого штамма бифидобактерий. После окончания инкубации определяют разведение, в котором наблюдается рост колоний бифидобактерий в виде «зерен», «гвоздиков» и др. Препарат считается соответствующим, если рост бифидобактерий в серии десятикратных разведений определяется не менее чем в пробирке с разведением  $10^{-7}$  (седьмая пробирка), что соответствует содержанию  $10^7$  живых бифидобактерий в одной дозе.



### **Задание 3. Освоить методы контроля кислотообразования бифидобактерий и лактобацилл**

#### **ХОД РАБОТЫ**

##### **1. Определение активности кислотообразования бактерий**

Определение проводят титрометрическим методом при выращивании бактерий в соответствующих питательных средах. К высушенному препарату пробиотика прибавляют культуральную среду из расчета 1 мл среды на одну дозу препарата: среду МРС-4 для лактобацилл или среду Блаурокка для бифидобактерий.

##### **2. Определение кислотообразования лактобацилл**

*Для лактобацилл:* в 2 пробирки с 25 мл среды МРС-1 вносят по 2,5 мл суспензии препарата. Смесь перемешивают и инкубируют в течение 48 часов при температуре  $(37 \pm 0,5)$  °С. После окончания инкубирования определяют кислотность в каждой пробирке путем титрования 10 мл образца 0,1 моль/л раствором натрия гидроксида в присутствии индикатора фенолфталеина (3 капли) до величины рН –  $(8,5 \pm 0,1)$ . Вычисляют средний показатель из двух определений.

##### **3. Определение кислотообразования бифидобактерий**

*Для бифидобактерий:* в 2 пробирки с 25 мл среды Блаурокка вносят по 2,5 мл суспензии препарата. Смесь перемешивают и инкубируют в течение 72 часа при температуре  $(38 \pm 0,5)$  °С. После окончания инкубирования определяют кислотность в каждой пробирке путем титрования 10 мл образца 0,1 моль/л раствором натрия гидроксида в присутствии индикатора фенолфталеина (3 капли) до величины рН –  $(8,5 \pm 0,1)$ . Вычисляют средний показатель из двух определений.

Кислотность в градусах Тернера (°Т) определяют по формуле:

$$^{\circ}\text{T} = A \cdot k \cdot 10,$$

где  $A$  – количество мл раствора натрия гидроксида, пошедшее на титрование;

$k$  – поправка к титру раствора натрия гидроксида.

*Активность кислотообразования:*

- для лактобацилл – не менее 200 °Т;

- для бифидобактерий – не менее 90 °Т.

### **Задание 4. Провести изучение влияния количества посевного материала на содержание продуктов метаболизма**

Изучение влияния объема посевного материала на интенсивность роста штаммов пробиотиков при определении продуктов метаболизма (кислот). Во флаконы, содержащие 300 мл полученной казеиново-дрожжевой питательной среды добавляют 20 % и 40 % инокулята, лактобацилл или бифидобактерий, полученных после 48 часов инкубирования при  $(38 \pm 0,5)$  °С. Флаконы перемешивают и помещают в термостат при температуре  $(38 \pm 0,5)$  °С. Через каждый час в асептических условиях отбирают по 10 мл суспензии, в которой определяют кислотность. *Оформляют данные в виде графика* зависимости кислотного числа в °Т от времени культивирования и объема посевного материала. Из каждой пробы должно быть получено пять точек (в течение 5 часов).

#### **Контрольные вопросы и задания**

1. Дайте определение показателя «кислотообразование штаммов».
2. Обоснуйте технологическую схему получения питательных сред.
3. Опишите зависимость накопления кислот при культивировании штаммов пробиотиков от объема внесенного инокулята.
4. Перечислите правила работы с компонентами питательных сред.
5. С какой целью осуществляется прием препаратов пробиотиков?
6. Укажите основные свойства штаммов пробиотиков. Какова роль пребиотиков в препаратах?
7. Каковы морфологические признаки колоний бифидобактерий?
8. С какой целью в составе питательных сред используют сахара?
9. Укажите формулу расчета кислотообразования штаммов пробиотиков.
10. Опишите реакции при определении аминного азота. С какой целью проводят определение аминного азота?

## 2.5. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 5. Получение, выделение и контроль ферментативной активности бактериальной амилазы

**Цель работы.** Провести поиск и выделение наиболее активных продуцентов амилолитических ферментов из объектов окружающей среды. Провести подбор среды культивирования оптимальной для накопления максимального количества амилазы в среде. Изучить процесс выделения амилазы из культуральной жидкости методом осаждения фермента сульфатом аммония.

*Работу проводят в условиях асептики в лаборатории фармацевтической биотехнологии кафедры биотехнологии, биофизики и аналитической химии НТУ «ХПИ».*

### Основные задания:

1. Выделение микроорганизмов – продуцентов из объектов окружающей среды и культивирование их поверхностным способом на плотных питательных средах.
2. Подбор среды культивирования для накопления максимального количества амилазы.
3. Определение амилолитической активности (АС).
4. Выделение амилазы из культуральной жидкости.

Номер задания		1	2	3	4
<b>Приборы и аппаратура</b>	1. Пробирки стеклянные	+	+	+	+
	2. Колбы плоскодонные 0,25 л, 0,5 л, 1,0 л	+	+	+	+
	3. Пипетки на 0,2 мл, 0,5 мл, 1,0 мл, 5,0 мл, 10,0 мл	+	+	+	+
	4. Чашки Петри	+	+		
	5. Микробиологические петли	+	+		
	6. Предметные стекла	+	+		
	7. Водяная баня	+	+	+	+
	8. Термостат с температурой 20–50 °С	+	+	+	+

	9. Микроскоп	+	+			
	10. Цилиндр мерный 0,05 л; 0,25 л; 0,1 л;		+		+	
	11. Покровные стекла		+			
	12. Горелки		+			
	13. Фотоэлектроколориметр		+	+	+	
	14. Автоклав паровой		+			
	15. pH-метр		+		+	
	16. Весы аналитические		+		+	
	17. Стеклянные стаканы на 0,25 л				+	
	18. Центрифуга				+	
	19. Воронка Бюхнера		+			
	20. Холодильник бытовой				+	
	<b>Сырье</b>	1. Измельченное сено	+			
		2. Картофель	+			
		3. Набор реактивов и красителей для микробиологических работ	+	+		
		4. Мука различных видов		+		
	<b>Реактивы</b>	1. Раствор Люголя	+			
		2. Мясопептонный агар (МПА) с 1 % растворимого крахмала	+			
		3. Вода водопроводная	+			
		4. Вода очищенная, Р			+	+
5. Пробирки со стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида		+	+			
6. Крахмал, Р			+	+	+	
7. Сульфат аммония, Р			+		+	
8. Калия гидрофосфат, Р			+			
9. Магния сульфат, Р			+			
10. Натрия хлорид, Р			+			
11. Мел, Р			+			
12. Мочевина, Р			+			
13. Натрия нитрат, Р			+			
14. Йод кристаллический, Р			+	+	+	
15. Кислота уксусная ледяная, Р					+	
16. Натрий уксуснокислый, Р					+	

**Теоретическая подготовка к выполнению работы.** Лекарственные препараты на основе ферментов различного происхождения используются во многих направлениях медицины: гастроэнтерологии, кардиологии, пульмонологии и т.д. В качестве примера приведены некоторые ферментные препараты различного происхождения. В табл. 8 представлены препараты ферментов, зарегистрированные в Украине.

Таблица 8 – Препараты ферментов, зарегистрированные в Украине

Наименование препарата	Источник выделения	Механизм действия	Фармакологическое действие
1	2	3	4
Имиглюцераза, д/ин.	Рекомбинантная $\beta$ -глюкоцереброзидаза – аналог лизосомальной $\beta$ -глюкоцереброзидазы человека	Компенсирует функциональную недостаточность ферментативной активности $\beta$ -глюкоцереброзидазы. Катализирует гидролиз гликолипида глюкоцереброзида до глюкозы и церамида и предупреждает накопление глюкоцереброзида в макрофагах, то есть препятствует образованию клеток Гоше	Заместительная ферментная терапия при болезни Гоше I типа с клинически значимыми проявлениями (анемия, тромбоцитопения, патологические изменения костей)

Продолжение таблицы 8

1	2	3	4
Панкреатин, per os	Препарат выделяют из поджелудочной железы крупного рогатого скота и свиней	Панкреатин содержит панкреатические пищеварительные ферменты: липазу, $\alpha$ -амилазу, трипсин	Эндокринная недостаточность поджелудочной железы при хроническом панкреатите, муковисцидозе, диспепсических явлениях и др.
Химотрипсин, д/ин.	Препарат выделяют из поджелудочной железы крупного рогатого скота	Расщепляет пептидные связи в молекуле белка, образованные остатками ароматических аминокислот, обуславливая противовоспалительный эффект	Трахеит, бронхит, пневмония, абсцесс легкого и др.
Серрапептаза, табл.	Препарат выделен из непатогенной кишечной бактерии <i>Serratia E15</i>	Протеолитический фермент. Оказывает фибринолитическое, противовоспалительное действие. Фермент уменьшает боль, снижая высвобождение болевых аминов из воспаленных тканей	Спортивные травмы, растяжения, разрывы связок, переломы и вывихи. Препарат оказывает противовоспалительное действие и содействует репаративным процессам
Гиалуронидаза, д/ин.	Препарат выделен из семенников крупного рогатого скота	Фермент, вызывающий распад гиалуроновой кислоты, основной формообразующий субстанции соединительной ткани	Применяют при контрактуре суставов, рубцы после ожогов и операций, гематомах, кератите и др.

Продолжение таблицы 8

1	2	3	4
Стрептокиназа, д/ин.	Препарат выделен при культивировании штамма $\beta$ -гемолитического стрептококка группы С	Фермент обладает фибринолитической активностью	Острый инфаркт миокарда, тромбоз глубоких вен, острая массивная тромбоэмболия легочной артерии и др.
Урокиназа, д/ин.	Препарат получен из культур клеток почек человека	Фермент оказывает фибринолитическое действие, активирует глу- и лиз-плазминогены, превращает их в плазмин, вызывающий ферментативное разрушение фибрина	Острые тромбозы и тромбоэмболии ветвей легочной артерии, острый инфаркт миокарда
Церулоплазмин, д/ин.	Препарат получен из крови человека	Медьсодержащий многофункциональный фермент. Повышает стабильность клеточных мембран за счет способности тормозить ПОЛ, регулирует ионный обмен, стимулирует гемопоэз	Комплексная терапия онкологических заболеваний, у больных анемией, стимуляция гемопоэза и др.

Продолжение таблицы 8

1	2	3	4
Цитохром С, д/ин.	Препарат получен из сердечной ткани лошади, крупного рогатого скота	Является катализатором клеточного дыхания, стимулирует окислительные реакции и активизирует метаболизм в тканях, уменьшает гипоксию в тканях	Состояние тканевой гипоксии, в том числе отравление угарным газом и наркотиками, ишемический инсульт, хроническая недостаточность мозгового кровообращения и др.
Трипсин, д/ин.	Препарат получен из поджелудочной железы крупного рогатого скота	Оказывает противовоспалительное и противоотечное действие	Деструктивные формы туберкулеза легких и шейных лимфатических узлов, неспецифическая пневмония, бронхит, трахеит и др.

Биотехнологическая промышленность выпускает большой спектр ферментных препаратов микробного происхождения, продуцентами которых являются микроорганизмы различных таксономических групп: бактерии, актиномицеты, грибы, дрожжи и др. В настоящее время основная часть ферментов производится на основе культур бацилл, актиномицетов и микроскопических грибов. Среди микроорганизмов – продуцентов, обладающих высокой активностью определенного фермента, предпочтение отдается тем, которые синтезируют преимущественно один фермент или группу родственных ферментов. Это связано с тем, что при этом достигается наиболее высокая ферментативная активность и тогда эти препараты могут применяться для воздействия на индивидуальные компоненты сложных субстратов. *К продуцентам ферментов* кроме высокой продуктивности и высокой скорости роста *предъявляется требование генетической стабильности по признаку синтеза фермента*. Неустойчивость генетических признаков может являться причиной частой смены продуцентов

ферментов в условиях промышленного производства, что влечет за собой значительные трудности, как технологического свойства, так и изменение характеристик ферментного препарата.

**Задание 1. Выделение микроорганизмов – продуцентов из объектов окружающей среды и культивирование их поверхностным способом на плотных питательных средах**

**Цель этапа:** Осуществить выделение накопительных культур микроорганизмов – продуцентов амилаз (сенной палочки и / или картофельной палочки) из объектов окружающей среды. Произвести рассев полученной накопительной культуры на плотные агаризованные питательные среды с целью получения изолированных колоний и определения наличия амилаолитической активности у выделенных культур микроорганизмов.

#### ХОД РАБОТЫ

**1. Получение накопительной культуры сенной палочки (*Bacillus subtilis*)**

Мелко нарезанное сено (3–5 г) заливают 20–25 мл теплой водопроводной воды (35–40 °С), тщательно перемешивают и настаивают в течение 30–35 минут. Полученный таким образом экстракт фильтруют или сливают в колбу закрытую ватно-марлевой пробкой и выдерживают на кипящей водяной бане в течение 15 минут. Полученную накопительную культуру сенной палочки используют как посевной материал.

**2. Получение накопительной культуры картофельной палочки (*Bacillus subtilis*, var. *Mesentericus*)**

Картофель тщательно очищают и нарезают мелкими ломтиками. Нарезанный картофель (3–5 г) заливают 20–25 мл теплой водопроводной воды (35–40 °С), тщательно перемешивают и настаивают в течение 30–35 минут. Полученный таким образом экстракт фильтруют или сливают в колбу закрытую ватно-марлевой пробкой и выдерживают на кипящей водяной бане в течение 15 минут. Полученную накопительную культуру картофельной палочки используют как посевной материал.

**3. Определение морфологических и культуральных признаков полученных культур**

Для получения изолированных колоний микроорганизмов – продуцентов амилаз, полученные накопительные культуры картофельной и сенной палочки разводят стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида в 10–1000 раз. Из полученных таким образом разведений производят высев 0,5–1,0 мл соответствующего разведения на агаризованную среду (МПА, содержащий растворимый крахмал). После посева чашки помещают в термостат при температуре 30 °С на 2–3 суток для образования колоний микроорганизмов. После образования колоний определяют, какие из полученных культур (штаммов) обладают наиболее высокой амилаолитической активностью. Для этого поверхность среды заливают раствором Люголя. Крахмал, содержащийся в среде, окрашивается в синий цвет. Если же микроорганизм обладает амилаолитической активностью, то вокруг соответствующей колонии образуются зоны просветления среды. Чем больше ширина зоны, тем выше амилаолитические свойства культуры. После выбора культуры с наиболее высокими амилаолитическими свойствами производится описание её морфологических и физиолого-биохимических свойств (форма, размер, наличие и расположение спор, наличие капсул, подвижность жгутиков, наличие запасных веществ, описание колоний).

**4. Рассев полученных накопительных культур продуцентов**

Для получения необходимого посевного материала для дальнейшей работы необходимо произвести рассев выбранной культуры микроорганизмов из описанных колоний петлей на поверхность в пробирки с подходящей питательной средой (МПА с крахмалом). После посева пробирки помещают в термостат при температуре 30 °С на 2–3 суток для получения посевного материала.

**Полученные данные заносятся в таблицу:** свойства выделенной культуры микроорганизмов; характеристику питательной среды; возраст культуры; описание выделенной культуры микроорганизмов; характер на плотной питательной среде (при описании колоний отмечают следующие признаки: форму, величину, цвет, поверхность, профиль, край, консистенцию); морфологические признаки культуры (форма и размеры клеток, соединение клеток, подвижность, расположение и количество жгутиков, вид

спорообразования и образование капсул (при наличии), запасные вещества и вид, окраска по Граму, кислотоустойчивость).

**Задание 2. Подбор среды культивирования для накопления максимального количества амилазы**

**Цель этапа:** Осуществить подбор компонентов среды культивирования (источников углерода и азота) для накопления максимального количества амилазы в среде.

**Приготовление растворов:**

1. *1,0 % раствор крахмала.* 1,0 г крахмала растворимого растирают в порошок с 5 мл воды. Смесь медленно при постоянном помешивании вливают в 100 мл кипящей воды.

2. *Ацетатный буфер, рН 4,7.* В 50 мл воды растворяют 5,4 г натрия ацетата. Добавляют 2,4 г кислоты уксусной ледяной, доводят водой до объема 100 мл. Если необходимо, доводят рН.

3. *Основной раствор йода.* В воде растворяют 12,7 г йода и 20 г калия иодида и доводят водой объем раствора до 1000 мл. Хранят в защищенном от света месте.

4. *Рабочий раствор йода.* К 10 мл 0,05 М раствора йода прибавляют 0,6 г калия иодида и доводят объем раствора водой до 100 мл. Раствор готовят непосредственно перед использованием.

**ХОД РАБОТЫ**

**1. Подготовка питательной среды и емкости для культивирования. Выбор источника углерода**

В качестве источника углерода для выращивания продуцентов амилаз могут использоваться разнообразные крахмалосодержащие субстраты: крахмал, мука различных видов (пшеничная, кукурузная, ржаная и др.). Внесение субстрата осуществляется таким образом, чтобы содержание крахмала (с учетом условной крахмалистости сырья и влажности субстрата) в среднем составляет около 1,0 %. Варианты возможных сред с выбранным источником углерода указаны в табл. 9.

Таблица 9 – Варианты питательных сред с выбранным источником углерода для *Bacillus*

Варианты	Компоненты питательной среды	Содержание компонента, г/л
I	Крахмал	10
	Сульфат аммония	2
	Гидрофосфат калия	1
	Сульфат магния	1
	Натрия хлорид	1
	Мел	3
II	Мука пшеничная	10
	Сульфат аммония	2
	Гидрофосфат калия	1
	Сульфат магния	1
	Натрия хлорид	1
	Мел	3
III	Мука кукурузная	10
	Сульфат аммония	2
	Гидрофосфат калия	1
	Сульфат магния	1
	Натрия хлорид	1
	Мел	3

Для приготовления среды крахмал или мука предварительно смешиваются в соотношении 1 : 10 с холодной водой при постоянном перемешивании и завариваются на кипящей водяной бане. Затем в подготовленный таким образом раствор крахмалосодержащего сырья вносят раствор, содержащий соли в необходимых концентрациях и все тщательно перемешивают. Подготовленную питательную среду после охлаждения до 40–45 °С при перемешивании отмеряют и разливают в колбы для ферментации. В колбы объемом 250 мл разливают 70–100 мл среды; в колбы объемом 100 мл разливают по 20–25 мл среды. Колбы закрывают ватно-марлевыми пробками и бумажными колпачками помещают в автоклав для стерилизации. Также стерилизуют завернутые в бумагу пипетки на 2 мл, закрытые с широкого конца ватными тампонами и пробирки с 10 мл 0,9 % раствора

натрия хлорида. Стерилизацию проводят в течение 30 мин при температуре  $121 \pm 2$  °С.

### 2. Засев питательной среды

Колбы с питательной средой вынимают из автоклава и охлаждают до температуры 30–35 °С. Засев питательной среды производят, соблюдая правила стерильности. Для этого в пробирку, содержащую посевной материал, вносят 10 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида и тщательно перемешивают для получения суспензии микроорганизмов. Затем 2 мл суспензии бактерий стерильно переносят в колбу с питательной средой (на 20–25 мл среды). Если объем среды больше, то объем суспензии бактерий, соответственно увеличивают. Содержимое колб тщательно перемешивают, колбы закрывают и подписывают. Колбы устанавливают на качалках и закрепляют. При отсутствии качалок возможно многократное перемешивание вручную. Температура культивирования 30 °С, время культивирования 24 часа.

### 3. Отделение биомассы и твердой фазы среды

Для отделения биомассы бактерий и твердой фазы среды используют фильтрование или центрифугирование. При фильтровании, содержимое колбы фильтруют под вакуумом через воронку Бюхнера, используя специальные бактериальные фильтры. В полученной культуре проводят определение амилитической активности.

### 4. Выбор источника азота

После выбора наиболее подходящего источника углерода, рассматривают различные источники азота и как они влияют на выход целевого фермента. В качестве источника азота для выращивания продуцентов амилаз могут использоваться разнообразные органические и неорганические субстраты – соли, пептон, аминокислоты, мочевины. Варианты сред с выбранным источником азота указаны в табл. 10.

Таблица 10 – Варианты питательных сред с выбранным источником азота для *Bacillus*

Варианты	Компоненты питательной среды	Содержание компонента, г/л
I	Крахмал (или другой источник углерода в оптимальной концентрации)	10
	Сульфат аммония	2
	Гидрофосфат калия	1
	Сульфат магния	1
	Натрия хлорид	1
	Мел	3
II	Крахмал (или другой источник углерода в оптимальной концентрации)	10
	Мочевина	2
	Гидрофосфат калия	1
	Сульфат магния	1
	Натрия хлорид	1
	Мел	3
III	Крахмал (или другой источник углерода в оптимальной концентрации)	10
	Нитрат натрия	2 (3)
	Гидрофосфат калия	1
	Сульфат магния	1
	Натрия хлорид	1
	Мел	3

### Задание 3. Определение амилолитической активности (АС)

Определение проводят колориметрическим методом. Метод основан на гидролизе крахмала ферментами амилолитического комплекса до декстринов различной молекулярной массы.

*Амилолитическая активность характеризует* способность амилолитических ферментов катализировать гидролиз крахмала до декстринов различной молекулярной массы и выражается числом единиц указанных ферментов в одном грамме препарата. *За единицу активности амилолитических ферментов* принято такое число, которое в строго определенных условиях температуры, рН и времени действия катализирует до декстринов различной молекулярной массы 1 грамм растворимого крахмала, или 30 % от введенного в реакцию вещества.

#### ХОД РАБОТЫ

В две пробирки диаметром 2 см и высотой 18 см приливают по 10 мл 1 %-ного раствора крахмала и помещают пробирки на водяную баню или термостат при температуре  $30 \pm 0,2$  °С на 5–10 минут. Затем, не вынимая пробирки из термостата, приливают в первую пробирку 5 мл воды (контрольная проба), во вторую 5 мл культуральной жидкости – опытная проба (раствор исследуемого фермента). Смесь интенсивно перемешивают и выдерживают в термостате 10 мин. Затем из контрольной и опытной пробирки отбирают по 0,1 мл раствора и переносят их в колбы с 10 мл рабочего раствора йода. Содержимое колб перемешивают. Полученные растворы приобретают следующую окраску: контрольный – синюю, опытный – фиолетовую с различной интенсивностью в зависимости от количества негидролизованного крахмала. Непосредственно после смешивания растворов определяют их оптическую плотность на ФЭКе, используя светофильтр с максимумом светопропускания при  $\lambda = 656$  нм (650–670 нм), пользуясь кюветами с толщиной поглощающего света 0,5–1 см. Контрольным раствором при колориметрировании исследуемых растворов является вода. *Оптическая плотность контрольного раствора ( $D_1$ )* соответствует количеству исходного крахмала в субстрате. *Оптическая плотность опытного раствора ( $D_2$ )* соответствует количеству крахмала, оставшегося после действия фермента. *Разница* между показателями оптических плотностей рас-

творов *соответствует гидролизованному количеству крахмала субстрата.*

Количество гидролизованного крахмала субстрата (г) определяют по формуле:

$$C = 0,1 \cdot \frac{D_1 - D_2}{D_1},$$

где 0,1 – количество крахмала, взятого на испытание  
в качестве субстрата, г.

Если количество гидролизованного крахмала меньше 0,02 г или больше 0,07 г, то испытания повторяют. Для этого при приготовлении рабочего раствора фермента берут большее или меньшее количество исходного раствора для разбавления. Если в результате количество превращенного крахмала находится в указанных пределах, полученные данные используют для расчета амилолитической активности.

Амилолитическую активность (АС-ед/мл) препаратов бактериально-го происхождения определяют по формуле:

$$АС = (5,885 \cdot C + 0,001671) \cdot \frac{1000}{n},$$

где 5,885; 0,001671 – коэффициенты расчетного уравнения, полученные при математической обработке экспериментальных данных зависимости количества гидролизованного крахмала от количества фермента, взятого для испытания (в коэффициенты введен множитель для пересчета на 1 час действия фермента);

$C$  – количество прогидролизованного крахмала, г;

1000 – коэффициент пересчета миллиграммов в граммы;

$n$  – количество ферментного препарата, взятое для испытания, мг или мл.

Данные, полученные при исследовании амилолитической активности, заносятся в таблицу.

Культура бактерий	Источник углерода	Амилолитическая активность культуральной жидкости, АС-ед/мл



#### **Задание 4. Выделение амилазы из культуральной жидкости**

**Цель этапа:** Изучить процессы выделения амилазы из культуральной жидкости методом осаждения фермента сульфатом аммония и по полученным данным определить, какие концентрации сульфата аммония вызывают выпадение в осадок целевого фермента.

##### **Приготовление растворов:**

1. 1,0 % раствор крахмала.
2. Ацетатный буфер, рН 4,7.
3. Основной раствор йода.
4. Рабочий раствор йода.

5. **Насыщенный раствор сульфата аммония.** В колбу вносят 400 мл воды очищенной и добавляют растертый в ступке порошок сульфата аммония до прекращения его растворения.

##### **ХОД РАБОТЫ**

**Высаливание белков из культуральной жидкости.** В ряд стеклянных стаканов помещают по 50 мл культуральной жидкости, предварительно освобожденной от клеток микроорганизмов, содержащей амилазу. К содержимому первого стакана по каплям добавляют 150 мл насыщенного раствора сульфата аммония и оставляют в покое для выпадения осадка. К содержимому второго стакана по каплям добавляют 10 мл насыщенного раствора сульфата аммония и оставляют в покое для выпадения осадка. К содержимому третьего стакана по каплям добавляют 50 мл насыщенного раствора сульфата аммония и оставляют в покое для выпадения осадка. К содержимому четвертого стакана по каплям добавляют 25 мл насыщенного раствора сульфата аммония и оставляют в покое для выпадения осадка. Все колбы выдерживают при комнатной температуре.

Длительность высаливания – 1 час. Для ускорения процесса возможно помещение стаканов с материалом в холодильник при температуре 4–8 °С. После формирования осадка его отделяют путем центрифугирования при 3–8 тыс. об/мин 20–40 минут. Все полученные осадки перерастворяют в 50 мл воды очищенной и определяют активность амилазы в полученных растворах с использованием приведенной выше методики. Определить при какой концентрации сульфата аммония наблюдается наибольший выход амилазы. Сделать выводы по проделанной работе.

#### **Контрольные вопросы и задания**

1. Каковы основные методы выделения ферментов?
2. Какие Вам известны фармацевтические препараты, содержащие ферменты? В каких случаях используют в медицине ферментные препараты?
3. С какой целью проводят получение «накопительной культуры» бактерий?
4. Опишите методики получения накопительной культуры сенной палочки *Bacillus subtilis*.
5. Опишите методики получения накопительной культуры картофельной палочки *Bacillus subtilis var. Mesentericus*.
6. Какие морфологические и культуральные признаки определяют при культивировании бактерий?
7. Каковы принципы подбора состава культуральной среды?
8. Охарактеризуйте компонентный состав питательных сред для выращивания *Bacillus*.
9. Опишите режимы засева и культивирования бактерий.
10. Каким образом проводят выбор источника азота для питательной среды?
11. Охарактеризуйте фермент амилазу и амилолитическую активность.
12. Каким методом определяют амилолитическую активность фермента?
13. Приведите формулу расчета для определения количества гидролизованного крахмала.
14. Приведите формулу расчета для определения амилолитической активности.
15. Опишите метод выделения амилазы из культуральной жидкости.

## 2.6. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 6. Определение протеолитической и створаживающей активности в препарате «Химопсин»

**Цель работы.** Определить специфическую ферментативную (протеолитическую и створаживающую) активность тканевых ферментов.

### Основные задания:

1. Определение протеолитической активности коммерческого препарата «Химопсин».
2. Определение створаживающей активности коммерческого препарата «Химопсин».

Номер задания		1	2
<b>Приборы и аппаратура</b>	1. Весы аналитические	+	+
	2. Спектрофотометр	+	
	3. Термостат электрический	+	+
	4. Печка электрическая	+	+
	5. Мешалка электрическая	+	+
	6. Шкаф сушильный (50–200 °С)	+	+
	7. Холодильник бытовой	+	+
	8. Баня водяная	+	+
	9. Центрифуга лабораторная, пробирки	+	+
	10. Пробирки стеклянные	+	+
	11. Пипетки 2мл, 5 мл, 10 мл	+	+
	12. Цилиндры мерные	+	+
	13. Мерные колбы вместимостью 200 мл, 1000 мл	+	+
	14. Бюксы стеклянные	+	
	15. Воронки конусные	+	+
	16. Бумага фильтровальная	+	+
	17. Мембранные фильтры типа «MF-Millipore» с диаметром пор 0,45 мкм	+	

<b>Сырье</b>	1. Коммерческий препарат «Химопсин» или суммарный экстракт поджелудочной железы	+	
	2. Натуральное свежее коровье молоко (ГОСТ 13264-88, сорт высший)	+	+
<b>Реактивы</b>	1. Кислота хлористоводородная, Р	+	
	2. Вода очищенная, Р	+	+
	3. Кислота трихлоруксусная, Р	+	
	4. Натрий едкий, Р	+	
	5. Натрия хлорид, Р	+	
	6. Мочевина, Р	+	
	7. Калий фосфат однозамещенный, Р	+	
	8. Вольфрамат натрия, Р	+	
	9. Молибдат натрия, Р	+	
	10. Кислота фосфорная, Р	+	
	11. Лития сульфат, Р	+	
	12. Бром	+	
	13. Тирозин	+	
	14. Натрий уксуснокислый 3-х водный, Р		+
	15. Кислота уксусная, Р		+
16. Кальций хлористый, Р		+	

**Теоретическая подготовка к выполнению работы.** Протеолитическая активность – это процесс ферментативного расщепления белка до пептидов и аминокислот, осуществляемый протеолитическими ферментами. Протеолитическая активность выражается в тирозиновых единицах и определяется по методу Ансона.

**Принцип метода Ансона.** Ферментным препаратом, выделенным из растительного материала, действуют на раствор стандартного белка (казеина или гемоглобина), затем неразложившийся белок осаждают, а в фильтрате определяют количество разложившегося белка по колориметрической реакции Фолина или на спектрофотометре. Принимается, что количество разложившегося белка пропорционально содержанию в растворе тирозина. Рассчитывают протеолитическую активность ферментного препарата на 1 мг белка или на 1 г навески за 1 час.

Препарат «Химопсин» обладает протеолитической активностью в 1 тирозиновую единицу, если при воздействии препарата на субстрат в течение одной минуты освобождается такое количество продуктов гидролиза, неосаждаемых трихлоруксусной кислотой, (в реакции с фенольным реактивом), соответствующее 1 миллимоль тирозина.

*Створаживающая активность* выражается в секундах.

**Задание 1. Определение протелитической активности коммерческого препарата «Химопсин»**

**Приготовление растворов:**

1. *Приготовление лиофилизованного гемоглобина.* Свежесобранную кровь крупного рогатого скота смешивают с охлажденным 1 % раствором натрия хлорида в соотношении 1 : 2 и центрифугируют при температуре 0 °С в течение 15 минут с частотой вращения 3000 об/мин. Осадок эритроцитов смешивают с двумя объемами охлажденного 1 % раствора натрия хлорида и центрифугируют при 0 °С в течение 15 мин с частотой вращения 3000 об/мин. Надосадочную жидкость удаляют декантацией. Промывку эритроцитов проводят 1 % раствором натрия хлорида еще 1 раз.

Эритроциты суспендируют в равном объеме воды очищенной, количественно переносят в диализные мешочки VISKING фирмы «SERVA» и диализируют против воды в течение 24 часов при температуре от 0 до 5 °С. Затем раствор гемоглобина лиофилизируют.

*Условия лиофилизации (сублимирования):*

- замораживание при температуре минус 30 °С в течение не менее 8 часов;

- сушка при температуре не более 35 °С под вакуумом не выше  $10^{-3}$  бар.

*Срок годности* лиофилизованного гемоглобина составляет 6 месяцев при температуре 1–5 °С.

2. *Приготовление 1 % раствора натрия хлорида.* В мерную колбу вместимостью 1 л помещают 10 г натрия хлорида, растворяют в 500 мл воды, перемешивают и доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

*Срок годности* – 7 суток при температуре 1–5 °С. Раствор используют охлажденным.

3. *Приготовление перекристаллизованной мочевины.* В колбу 100 мл помещают 120 г мочевины, прибавляют 80 мл нагретой до температуры 40 °С воды и растворяют на водяной бане при температуре 40 °С. Затем фильтруют через бумажный фильтр. Полученный раствор помещают в холодильник при температуре 2–8 °С. Образовавшиеся кристаллы мочевины отфильтровывают через бумажный фильтр и высушивают на воздухе.

*Срок годности* перекристаллизованной мочевины составляет 10 суток.

4. *Приготовление раствора субстрата.* К 8 мл 1 М раствора натра едкого прибавляют 2 мл воды, 36 г перекристаллизованной мочевины и 10 мл 22 % раствора гемоглобина. Смесь выдерживают в течение 1 часа при температуре 25 °С в термостате, после чего прибавляют 4 г перекристаллизованной мочевины в 10 мл 1 М раствора калия фосфата однозамещенного и перемешивают. Измеряют рН полученного раствора субстрата, которое должно быть  $(7,5 \pm 0,05)$  (потенциметрически). При необходимости рН корректируют, прибавляя 1–2 кристалла калия фосфата однозамещенного.

Перед проведением анализа раствор субстрата выдерживают в термостате при температуре 20 °С в течение 15 минут.

*Срок годности* раствора субстрата составляет 7 суток при температуре от +1 °С до +5 °С.

5. *Приготовление 22 % раствора гемоглобина.* Предварительно проводят определение потери в массе при высушивании. Около 0,2 г (точная навеска) лиофилизованного гемоглобина сушат при температуре 100–105 °С до постоянной массы. Потеря в массе при высушивании не должна превышать 10 %.

Количество гемоглобина ( $X_2$ ) (в граммах), необходимое для приготовления 25 г раствора определяют по формуле:

$$X_2 = \frac{100 \cdot 22}{(100 - A) \cdot 4} = \frac{550}{(100 - A)},$$

где  $A$  – потеря в массе при высушивании, %.

Объем воды ( $X_3$ ) (в миллилитрах), в котором необходимо растворить навеску лиофилизированного гемоглобина ( $X_2$ ) определяют по формуле:

$$X_3 = 25 - X_2.$$

Раствор используют свежеприготовленным.

6. *Приготовление 1 М раствора калия фосфата однозамещенного.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 13,61 г перекристаллизованного калия фосфата однозамещенного. Растворяют в 50 мл воды, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

7. *Приготовление 0,2 М раствора хлористоводородной кислоты.* В мерную колбу вместимостью 1 л помещают 17 мл концентрированной кислоты хлористоводородной (плотность 1,19), доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

8. *Приготовление 0,0025 М раствора хлористоводородной кислоты.* В мерную колбу вместимостью 1 л помещают 12,5 мл 0,2 М кислоты хлористоводородной, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

9. *Приготовление 0,3 М раствора кислоты трихлоруксусной.* В мерную колбу вместимостью 1 л помещают 49,02 г кислоты трихлоруксусной, растворяют в 500 мл воды, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

10. *Приготовление фенольного реактива 1 и 2.* В колбу вместимостью 1,5 л помещают 100 г вольфрамата натрия и 25 г молибдата натрия, растворяют в 700 мл воды, прибавляют 50 мл концентрированной кислоты фосфорной и 100 мл концентрированной кислоты хлористоводородной (плотность 1,19) и осторожно нагревают в течение 10 ч с обратным холодильником, затем охлаждают и прибавляют 150 г сульфата лития, 50 мл воды и несколько капель брома. Остаток брома отгоняют на водяной бане при нагревании смеси без холодильника (под тягой!), охлаждают, переносят в мерную колбу вместимостью 1 л, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр (*реактив 1*). Реактив должен быть золотисто-желтого цвета без зеленого оттенка.

*Срок годности реактива 1* – 1–6 месяцев при хранении в защищенном от света месте.

К 5 мл реактива 1 прибавляют 10 мл воды и перемешивают (*реактив 2*). Реактив 2 используют свежеприготовленным.

#### ХОД РАБОТЫ

В мерную колбу вместимостью 200 мл помещают 0,05 г (точная навеска) препарата, растворяют в 100 мл 0,0025 М раствора кислоты хлористоводородной, доводят объем раствора этим же растворителем до метки и перемешивают. В мерную колбу вместимостью 200 мл помещают 10 мл полученного раствора, доводят объем раствора 0,0025 М раствором кислоты хлористоводородной до метки и перемешивают (*рабочий раствор препарата*).

По 5 мл раствора субстрата помещают в две пробирки (№ 1 и № 2 – опытные пробирки) и 3 мл рабочего раствора препарата помещают в пробирку № 3 – контрольная пробирка. Пробирки выдерживают на водяной бане при температуре ( $35,5 \pm 0,1$ ) °С в течение 3 минут. После этого в пробирки № 1 и № 2 прибавляют по 1 мл раствора из пробирки № 3, тщательно перемешивают и выдерживают в тех же условиях в течение 10 минут. Затем в пробирки № 1 и № 2 прибавляют по 10 мл 0,3 М раствора кислоты трихлоруксусной, перемешивают и выдерживают в термостате при температуре 20 °С в течение 30 минут.

Параллельно проводят *контрольный опыт*. В пробирку помещают 5 мл раствора субстрата, прибавляют 10 мл 0,3 М раствора кислоты трихлоруксусной, перемешивают и прибавляют 1 мл рабочего раствора препарата, перемешивают и выдерживают в термостате при температуре 20 °С в течение 30 минут. Затем содержимое контрольной и опытных пробирок фильтруют через мембранные фильтры типа «MF-Millipore» с диаметром пор 0,45 мкм, отбрасывая первый 1 мл фильтрата. По 5 мл полученных фильтратов помещают в конические колбы вместимостью 25 мл, прибавляют в каждую по 10 мл 0,5 М раствора натра едкого и затем, при перемешивании, по 3 мл фенольного реактива 2 и помещают в защищенное от света место. Через 10 минут измеряют оптическую плотность опытных растворов на спектрофотометре при длине волны 670 нм в кювете с тол-

щиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения *контрольный раствор*, приготовленный следующим образом: 5 мл воды помещают в коническую колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 10 мл 0,5 М раствора натра едкого и затем, при перемешивании, 3 мл фенольного *реактива 2* и помещают в защищенное от света место на 10 минут.

По найденной оптической плотности и по калибровочному графику в опытных пробах находят содержание тирозина в  $\text{мМ} \cdot 10^{-4}$ .

Количество тирозиновых единиц в 1 г препарата ( $X_1$ ) вычисляют по формуле:

$$X_1 = \frac{A \cdot 0,128}{m},$$

где  $A$  – содержание тирозина в опытной пробе,  $\text{мМ} \cdot 10^{-4}$  (среднее из двух определений);

$m$  – масса навески препарата, г.

В 1 г препарата должно содержаться не менее 5,0 ТЕ<sub>35,5°</sub>.

**Построение калибровочного графика.** В мерную колбу вместимостью 200 мл помещают 0,02899 г (точная навеска) тирозина фирмы SIGMA Chemical Co. (каталожный номер Т 8909) или фирмы MERCK KGaA (каталожный номер 108371), растворяют в 100 мл 0,2 М раствора кислоты хлористоводородной, доводят объем раствора этим растворителем до метки и перемешивают (*раствор А* – 1 мл раствора А содержит  $8 \cdot 10^{-4}$  мМ тирозина).

В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 10 мл *раствора А*, доводят объем раствора 0,2 М раствором кислоты хлористоводородной до метки и перемешивают (*стандартный раствор*).

Для построения калибровочного графика готовят в 10 пробирках следующие разведения *стандартного раствора*.

№ проб	Стандартный раствор тирозина, мл	0,2 М раствор кислоты хлористоводородной, мл	Содержание тирозина в пробе, $\text{мМ} \cdot 10^{-4}$
1	5,00	–	8,0
2	4,00	1,00	6,4
3	3,00	2,00	4,8
4	2,00	3,00	3,2
5	1,75	3,25	2,8
6	1,50	3,50	2,4
7	1,20	3,80	1,92
8	1,00	4,00	1,6
9	0,50	4,50	0,8
10	0,25	4,75	0,4
Контрольный опыт	Контрольный опыт	5,00	Контрольный опыт

После этого к содержимому каждой пробирки прибавляют по 10 мл 0,5 М раствора натра едкого, при перемешивании прибавляют по 3 мл фенольного *реактива 2* и помещают в защищенное от света место. Через 10 минут измеряют оптическую плотность полученных растворов на спектрофотометре при длине волны 670 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения *раствор контрольного опыта*. Затем строят калибровочный график, откладывая по оси абсцисс количество тирозина в  $\text{мМ} \cdot 10^{-4}$ , а по оси ординат – соответствующие оптические плотности.

## **Задание 2. Определение створазживающей активности коммерческого препарата «Химипосин»**

### **Приготовление растворов:**

1. **Приготовление раствора молока.** Молоко центрифугируют с частотой вращения 8000 об/мин в течение 30 минут при температуре 5–10 °С, удаляют шпателем верхний слой отделившегося жира и лиофилизируют.

*Условия лиофилизации (сублимирования):*

- замораживание при температуре минус 30 °С в течение не менее 8 часов;

- сушка при температуре не более +35 °С под вакуумом не выше  $10^{-3}$  бар (обезжиренное молоко).

*Срок годности обезжиренного молока* 6 месяцев в банке с притертой пробкой в холодильнике при температуре +5 °С.

В ступке с 20 мл воды растирают 0,75 г обезжиренного молока. Растиертую массу количественно переносят в мерный цилиндр вместимостью 50 мл, прибавляют 1 мл 3 М раствора кальция хлористого и 5 мл ацетатного буферного раствора рН 5,6; доводят объем раствора водой до 50 мл и перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

2. *Приготовление ацетатного буферного раствора рН 5,6.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 5,73 мл уксусной кислоты, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают (*раствор 1*). В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 13,6 г натрия уксуснокислого 3-водного, доводят водой до метки и перемешивают (*раствор 2*).

В колбу вместимостью 100 мл помещают 5,5 мл раствора 1, прибавляют 44,5 мл раствора 2 и перемешивают; рН полученного раствора должен быть  $(5,6 \pm 0,05)$  (потенциометрически). При необходимости рН корректируют 1 М раствором кислоты уксусной.

*Срок годности раствора 7* суток при температуре +5 °С.

3. *Приготовление 3 М раствора кальция хлористого.* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 3,33 г кальция хлористого, растворяют в 5 мл воды, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

*Срок годности раствора 3* суток при температуре +5 °С.

#### ХОД РАБОТЫ

*Створаживающая активность.* 0,03 г (точная навеска) препарата растворяют в 10 мл ацетатного буферного раствора рН 5,6 и перемешивают (*испытываемый раствор*).

По 3 мл раствора молока помещают в две пробирки (опытные) и прогревают в течение 15 минут в водяном термостате с прозрачными стенками из стекла или оргстекла при температуре  $(35,5 \pm 0,1)$  °С. Затем в каждую

пробирку (последовательно) прибавляют по 0,5 мл раствора испытуемого препарата и тщательно перемешивают, не вынимая пробирки из термостата.

Наблюдение проводят в проходящем свете, взбалтывая и не вынимая пробирки из термостата. Конец реакции отмечают по появлению первых признаков створаживания молока.

Параллельно проводят *контрольный опыт*. К 3 мл раствора молока прибавляют 0,5 мл ацетатного буферного раствора рН 5,6 и выдерживают в водяном термостате в течение 60 минут при температуре  $(35,5 \pm 0,1)$  °С. В контрольном опыте молоко не должно створаживаться.

Створаживающая активность препарата определяется временем, прошедшим с момента прибавления испытуемого раствора до появления первых признаков створаживания молока. За результат принимают среднее из 2 определений.

Время створаживания раствора молока химопсином должно быть не более 60 секунд.

#### **Контрольные вопросы и задания**

1. Охарактеризуйте ферментный препарат «Химопсин».
2. Опишите методику приготовления субстрата для определения протеолитической активности.
3. Объясните выбор поджелудочной железы в качестве сырья для экстракции химопсина.
4. Опишите методику определения протеолитической активности.
5. С какой целью в медицине применяют препарат «Химопсин»?
6. Опишите методику приготовления субстрата для определения створаживающей активности.
7. Опишите методику определения створаживающей активности химопсина.

## 2.7. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 7. Выделение фермента гиалуронидазы и определение ее биологической активности

**Цель работы.** Осуществить выделение и очистку тканевого фермента гиалуронидазы из семенников крупного рогатого скота. Изучить влияние pH на выход целевого продукта. Определить наличие гиалуронидазной активности у полученных образцов фермента в экстракте.

### Основное задание:

1. Выделение фермента гиалуронидазы из животной ткани при различных условиях технологического процесса. Приготовление субстрата для определения гиалуронидазной активности и определение ее в полученном экстракте.

Номер задания		1
<b>Приборы и аппаратура</b>	1. Центрифуга лабораторная	+
	2. Пробирки	+
	3. Весы аналитические	+
	4. Спектрофотометр	+
	5. Печка электрическая	+
	6. Мешалка электрическая	+
	7. Насос водоструйный	+
	8. Шкаф сушильный (50–200 °С)	+
	9. Холодильник с морозильной камерой	+
	10. Баня водяная	+
	11. Центрифуга лабораторная	+
	12. Воронка Бюхнера	+
	13. Колба Бунзена	+
	14. Пипетки 5 мл, 10 мл	+
	15. Цилиндры мерные	+
	16. Колбы вместимостью 50 мл и 100 мл	+
	17. Бюксы стеклянные	+
	18. Воронки конусные	+
	19. Бумага фильтровальная	+

<b>Сырье</b>	1. Семенники крупного рогатого скота	+
	2. Пупочные канатики человека (пуповина)	+
<b>Реактивы</b>	1. Ацетон, Р	+
	2. Вода очищенная, Р	+
	3. Альбумин человека	+
	4. Кислота уксусная, Р	+

**Теоретическая подготовка к выполнению работы.** Гиалуронидаза – это фермент, вызывающий гидролиз гиалуроновой кислоты, основной формообразующей субстанции соединительной ткани. В результате гидролиза гиалуроновой кислоты до образования глюкозамина и глюкуроновой кислоты снижается её вязкость и повышается проницаемость соединительной ткани. На рис. 22 представлена структура повторяющейся дисахаридной единицы в молекуле гиалуроновой кислоты.

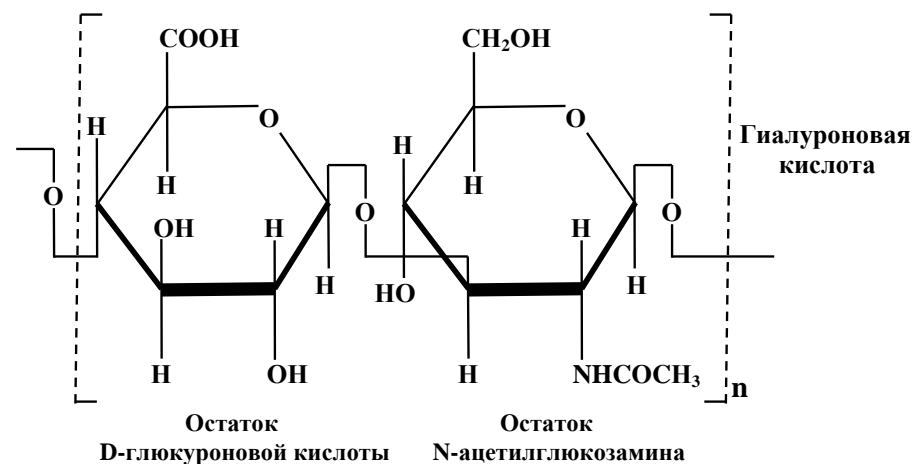


Рисунок 22 – Структура повторяющейся дисахаридной единицы в молекуле гиалуроновой кислоты

Гиалуроновая кислота в соединении с белком составляет основу межклеточной субстанции соединительной ткани, так называемой «основной субстанции». Гиалуронидаза используется в составе лекарственных препаратов, например, препарат под названием «Лидаза». Препарат используется для лечения рубцов после ожогов и операций, гематом, контрактуры суставов, рубцов роговицы.

Фермент присутствует в оболочках патогенных бактерий, сперме, яде змей, пауков, пчел, слюнных выделениях пиявок, быстро растущих опухолях. Гиалуронидаза микробов и ядов, разрушая гиалуроновую кислоту межклеточного вещества, способствует распространению инфекции в глубь ткани организма. Гиалуронидаза спермы, растворяя фолликулярный слой яйцеклетки, создает благоприятные условия для её оплодотворения.

*Гиалуронидазную активность* определяют по реакции гидролиза гиалуроновой кислоты.

#### **Приготовление растворов:**

##### **1. Приготовление 1 % раствора альбумина бычьего сывороточного.**

В 15 мл воды в мерной колбе вместимостью 25 мл растворяют 0,25 г бычьего сывороточного альбумина Р (ДФУ 1002300), доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

**2. Приготовление 15 % раствора уксусной кислоты.** В коническую колбу вместимостью 100 мл помещают 15 мл уксусной кислоты (ДФУ 1000401), прибавляют 50 мл воды и перемешивают. Раствор доводят водой до объема 100 мл.

Срок годности раствора составляет 1 месяц.

**3. Приготовление раствора гиалуронидазы.** Семенники крупного рогатого скота освобождают от оболочек и измельчают гомогенизацией. Измельченную ткань (200 г) помещают в две емкости (по 100 г) и в каждую прибавляют по 150 мл воды (соотношение ткань : вода – 1 : 1,5). Смесь перемешивают, при помощи уксусной кислоты доводят величину рН до  $4,5 \pm 0,2$  (1-я емкость) и рН до  $5,5 \pm 0,2$  (2-я емкость). Смесь перемешивают в течение 2–3 часов, отбирают по 20 мл смеси (1-я и 2-я проба), подвергают фильтрации через бумажный фильтр или центрифугируют при 2000 об/мин в течение 20 минут. Оставшуюся смесь продолжают экстрагировать в течение 2–3 часов, отбирают по 20 мл смеси (3-я и 4-я проба), подвергают фильтрации через бумажный фильтр или центрифугируют при 2000 об/мин в течение 20 минут. *Надосадочная жидкость содержит фермент гиалуронидазу.* Получены 4 пробы экстрактов, отличающиеся временем экстракции и величиной рН, содержащие гиалуронидазу.

**Приготовление субстрата.** Пупочные канатики человека (пуповина) собирают в ацетон, освобождают от сосудов и крови, снова помещают в новую порцию ацетона и хранят при температуре  $(4 \pm 2) ^\circ\text{C}$  не более 3 месяцев. При необходимости канатики извлекают из ацетона, помещают между двумя полосками фильтровальной бумаги и оставляют на воздухе до полного удаления следов ацетона. Затем канатики измельчают на кусочки около  $1 \text{ мм}^2$ , взвешивают и заливают водой (на 1 г ткани – 10 мл воды).

Полученная смесь набухает при комнатной температуре от 30 до 40 минут, затем массу нагревают на слабом огне при постоянном перемешивании и кипятят в течение 2 минут.

Раствор фильтруют в горячем виде через ватный фильтр.

Фильтрат хранят при температуре  $(4 \pm 2) ^\circ\text{C}$  не более 2 суток. Для работы используют субстрат с относительной вязкостью 4,0–4,5 при температуре  $(24 \pm 1) ^\circ\text{C}$ . Относительную вязкость определяют с помощью капиллярного вискозиметра. В день определения гиалуронидазной активности вязкость доводят водой до нужного значения.

**Определение рабочей дозы субстрата.** По 0,5 мл воды помещают в две пробирки. Затем в 1-ю пробирку помещают 0,1 мл субстрата, во 2-ю пробирку – 0,2 мл субстрата, затем в каждую пробирку прибавляют по 0,05 мл 1 % раствора бычьего сывороточного альбумина, перемешивают и прибавляют 0,1 мл 15 % раствора уксусной кислоты. *За рабочую дозу принимают минимальное количество субстрата, образующего четко оформленный муциновый сгусток.* При отсутствии сгустка – субстрат бракуют.

Рабочую дозу устанавливают перед началом опыта.

#### **ХОД РАБОТЫ**

По 0,5 мл воды помещают в 6 пробирок. В первую пробирку прибавляют 0,5 мл полученного раствора препарата, содержимое пробирки тщательно перемешивают и переносят 0,5 мл смеси из первой пробирки во вторую и т.д. Таким образом, получают разведения препарата от 1 : 2 до 1 : 64.

В каждую пробирку помещают рабочую дозу субстрата, перемешивают и пробирки выдерживают в водяной бане при температуре  $(37 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$  в течение 20 минут. Затем пробирки охлаждают в течение



3 минут в холодной водопроводной воде, в каждую прибавляют по 0,05 мл 1 % раствора альбумина бычьего сывороточного и по 0,1 мл 15 % раствора уксусной кислоты.

Гиалуронидазную активность препарата рассчитывают по разведению препарата в последней пробирке, где не образовался муциновый сгусток по нижеприведенной шкале.

Шкала гиалуронидазной активности

Номер пробирки	1	2	3	4	5	6
Гиалуронидазная активность, ед.	2	4	8	16	32	64

Полученные данные внести в протокол исследования.

№№ пробы	Температура экстракции, °С	рН при экстракции	Время экстракции, мин	Гиалуронидазная активность, ед.

Оформить выводы о результатах экстракции гиалуронидазы.

#### **Контрольные вопросы и задания**

1. Характеризуйте действие фермента – гиалуронидазы.
2. Опишите методику приготовления субстрата гиалуроновой кислоты.
3. Объясните выбор семенников в качестве сырья для экстракции гиалуронидазы.
4. Опишите методику определения гиалуронидазной активности.
5. Перечислите правила работы с рН-метром.
6. С какой целью в медицине применяют препараты, содержащие гиалуронидазу?
7. Привести механизм гидролиза гиалуроновой кислоты.
8. Существует ли зависимость выхода фермента гиалуронидазы от рН в экстрагируемой смеси?
9. Существует ли зависимость выхода фермента гиалуронидазы от времени экстракции?

## **2.8. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 8. Проведение ферментативного гидролиза РНК панкреатической РНК-азой**

**Цель работы.** Осуществить изучение зависимости образования продуктов гидролиза РНК от времени проведения процесса и получение очищенной субстанции продуктов ферментативного гидролиза РНК.

#### **Основные задания:**

1. Изучение зависимости образования продуктов гидролиза РНК от времени проведения процесса.
2. Получение очищенной субстанции продуктов ферментативного гидролиза РНК.

Номер задания	1	2	
<b>Приборы и аппаратура</b>	1. Весы аналитические	+	+
	2. Спектрофотометр	+	+
	3. Термостат электрический	+	
	4. Печка электрическая	+	
	5. Мешалка электрическая	+	
	6. Шкаф сушильный (50–200 °С)	+	
	7. Вакуум-сушильный шкаф		+
	8. Холодильник бытовой	+	+
	9. Баня водяная	+	+
	10. Мембраны ультрафильтрационные (10 kDa)		+
	11. Центрифуга лабораторная		+
	12. Пробирки стеклянные	+	+
	13. Пипетки 2мл, 5 мл, 10 мл	+	+
	14. Цилиндры мерные	+	+
	15. Мерные колбы 100 мл, 1000 мл	+	
	16. Бюксы стеклянные	+	+
	17. Воронки конусные	+	+
	18. Бумага фильтровальная		
	19. Пластины для хроматографии	+	

	20. Камера для восходящей хроматографии	+	
	21. Мембранные фильтры типа «MF-Millipore» с диаметром пор 0,45 мкм	+	
	22. Ультрахемископом	+	
<b>Сырье</b>	1. Дрожжевая РНК	+	
	2. Панкреатическая РНКазы	+	
<b>Реактивы</b>	1. Натрий едкий, Р	+	
	2. Этанол, Р		+
	3. Вода очищенная, Р	+	+
	4. Натрия хлорид, Р		+
	5. Изопропанол	+	
	6. Аммиак, 25 %, Р	+	

**Теоретическая подготовка к выполнению работы.** Экзогенные нуклеиновые кислоты, и, в частности, РНК, а также продукты её частичного гидролиза имеют широкий спектр биологических эффектов: стимуляция процессов клеточного метаболизма с активацией синтеза эндогенных нуклеиновых кислот, специфических белков и ферментов; повышение митотической активности клеток; активация гипофиз-адреналовой системы; стимуляция репаративных процессов с освобождением регенерирующей ткани от необходимости осуществления сложного и энергоёмкого синтеза оснований для простых предшественников; иммуномодулирующая активность; активация образования белков в клетках костного и головного мозга; стимуляция синтеза АТФ. К этим свойствам за последнее время добавлены данные о противовоспалительном действии низкомолекулярной дрожжевой РНК, которая за счет механизмов угнетения, расщепления фосфолипидов клеточной мембраны до свободной арахидоновой кислоты и её дальнейшего окисления по липоксигеназному и циклогеназному путях, стабилизирует клеточные мембраны.

Промышленное культивирование большинства микроорганизмов с целью выделения ДНК и РНК экономически нецелесообразно. Поэтому выбор определен микроорганизмами, которые культивируют в промышленных масштабах, например, пекарские или пивные дрожжи.

*Дрожжевая РНК и продукты её гидролиза* являются субстанциями для получения ряда фармацевтических препаратов, таких как нуклеинат натрия, ридостин, энкад и др.

Основным направлением в предотвращении распространения инфекционных заболеваний в течение ряда десятилетий является вакцинация населения. Однако, проводимые мероприятия не всегда достигают цели. Так, например, при высоком проценте привитых против гриппа отмечается снижение среднегодовых показателей заболеваемости лишь на 10–20 % против ожидаемого уровня. Как показывает опыт, профилактика инфекционных заболеваний с помощью вакцинации может быть успешной в том случае, если возбудитель не подвержен антигенной изменчивости. Поэтому в последние годы внимание обращается на средства, влияющие на статус системы неспецифической резистентности. Известно, что от состояния этой системы зависит эффективность лечения и профилактики многих заболеваний, в том числе и инфекционной природы. Разработка способов активации механизмов резистентности к инфекционным агентам включает создание новых препаратов, схем их применения и сочетание с известными фармакологическими средствами. Достижения био- и генной инженерии, современной биотехнологии позволили получать принципиально новые средства для нужд здравоохранения. Одним из таких препаратов является индуктор интерферона на основе двуспиральной РНК – микробиологического происхождения – «Ридостин». В настоящее время препарат разрешен для лечения различных видов герпеса (простой, опоясывающий и генитальный), инфекционных урогенитальных заболеваний (хламидиоз) и как иммуностимулятор. В 1967 году была доказана ведущая роль двуспиральных рибонуклеиновых кислот (дсРНК) в индукции интерферона. Обширный опыт экспериментального использования синтетических полирибонуклеотидов на различных животных и моделях патологий, выдвинул ряд задач, связанных с преодолением их побочных и кумулятивных свойств. Это поставило перед исследователями задачу – искать другие источники и способы получения двуспиральных РНК – индукторов интерферона из микробиологического сырья. Наиболее перспективными с точки зрения продуктивности дсРНК и экологической безопасности являются непатогенные

штаммы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, которые были выбраны в качестве штамма продуцента дсРНК.

Одним из основных моментов выделения дсРНК из дрожжей явился поиск методов разрушения чрезвычайно прочных клеточных стенок биомассы *Saccharomyces cerevisiae*. На начальных этапах для разрушения клеточных стенок и извлечения дсРНК из дрожжей более предпочтительным является применение детергентного метода, который заключается в последовательном применении 2-этилгексановой кислоты и додецилсульфата натрия при оптимальном температурном режиме. Это позволяет извлечь дсРНК, свободной от белковых примесей. Дробное фракционирование экстрагированных нуклеиновых кислот хлористым литием и дополнительная депротеинизация конечного продукта позволили получить препараты дсРНК со следующими показателями качества: содержание дсРНК –  $41 \pm 9$  %; содержание нуклеотидного материала –  $72 \pm 5$  %; содержание белка –  $0,7 \pm 0,5$  %; содержание ДНК – не более 1,0 %. Выход такого препарата из 1 кг биомассы составлял  $16,3 \pm 2,4$  мг. Препарат хорошо зарекомендовал себя при лечении гриппа и ОРВЗ, при рассеянном склерозе, тяжелых форм клещевого энцефалита и других заболеваниях.

При ферментативном гидролизе ферментом РНКазой дрожжевой РНК получают смесь нуклеотидов с высокой фармакологической активностью. Одним из таких препаратов является продукт под названием «Энкад», оригинальный препарат, выпускаемый в Украине. Субстанцию получают путем гидролиза дрожжевой РНК панкреатической РНК-азой при температуре 65 °С и рН 5,1 в течение 5 часов. Полученный гидролизат РНК осаждают этанолом и проводят ультрафильтрацию с целью очистки гидролизата от высокомолекулярных примесей. После контроля субстанции продукт используют для получения готовой формы препарата «Энкад – 3,5 % раствор для инъекций». Препарат регулирует обмен нуклеотидов в тканях, обладает иммуномодулирующими свойствами, способствует улучшению функций клеточных мембран, проведению импульса по двигательным нервам, уменьшению миодистрофических процессов и оптимизации биоэнергетики мышц. Препарат применяется для лечения наследственных тапеторетинальных абiotрофий – заболеваний, приводящих к слабовидению и слепоте. До настоящего времени не существует эффективных методов лечения этой группы заболеваний в мире. Препарат

разрешен к применению при болезни Шегрена, при дегенеративных заболеваниях нервно-мышечной системы: наследственных формах миопатий (ранние стадии), врожденном и приобретенном миопатическом синдроме, различных формах невралгических абiotрофий, последствиях нейроинфекций, спинальных амиотрофиях. С помощью препарата «Энкад» проведено совершенствование методов патогенетической терапии больных псориазом. Наблюдается укорочение сроков лечения на 14,9 % и увеличение сроков ремиссии в два раза. Существенным моментом комплексной терапии с препаратом «Энкад» является тенденция к нормализации интерлейкинов ИЛ-2 и ИЛ-4, играющих важную патогенетическую роль при псориазе. Показана клиническая эффективность применения препарата «Энкад – 3,5 % раствор для инъекций» при ряде других социально значимых заболеваний (язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки, псориаз, рассеянный склероз и др.). Несомненный интерес представляют модифицированные антикомплементарные олигонуклеотиды, полученные при гидролизе РНК ферментом РНК-азой, выделенной из поджелудочной железы крупного рогатого скота. Препарат проявляет противоопухолевую активность не только *in vitro*, но и *in vivo* на моделях бензадиновой саркомы крыс и асцитной аденокарциномы Эрлиха у мышей.

В заключение, хотелось бы отметить, что перечисленные разноплановые свойства РНК обуславливают широкий спектр фармакологической активности её препаратов, полученных путем гидролиза дрожжей, и оказывающих при различных путях введения столь же разнообразные фармакотерапевтические эффекты при различных заболеваниях человека. Примером может служить данные последних лет о кардиопротекторном действии 3 %-го инъекционного раствора дрожжевой РНК, представляющего собой гомогенную низкомолекулярную РНК с молекулярной массой около 7000 Da. Результаты получены на модели индуцированного инфаркта миокарда у крыс. Использование препарата из РНК приводит к нормализации в крови маркеров кардиоцитолита – креатинфосфокиназы и аспартатаминотрансферазы. Кардиопротекторное действие дрожжевой РНК реализуется за счет свойственных для неё мембранно-стабилизирующих, антиоксидантных и энергосберегающих эффектов. К настоящему времени созданы иммуномодуляторы, ингибиторы ферментов, препараты для направленного мутагенеза, противовирусные и противоопухолевые препараты на основе интерферирующих РНК.

**Ферментативный гидролиз нуклеиновых кислот.** Ферменты, участвующие в гидролизе нуклеиновых кислот приводят к разрыву фосфодиэфирных связей. Некоторые из них РНК-азы активны исключительно по отношению к РНК, другие – ДНК-азы – действуют на ДНК. Отдельная группа, так называемые неспецифические нуклеазы, проявляют активность в отношении как РНК, так и ДНК.

Среди причин, привлекающих внимание к изучению нуклеаз и условий ферментативного гидролиза нуклеиновых кислот, следует указать на *перспективность использования нуклеаз:*

- при получении нуклеотидов и нуклеозидов;
- в качестве фармацевтических препаратов, в том числе, и противовирусных;
- в качестве инструментов исследования структуры ДНК, создании рекомбинантных молекул, изучении генетического материала, в том числе геномной дактилоскопии;
- для удаления примесей РНК из препаратов ДНК и, наоборот, для удаления ДНК из РНК-содержащих препаратов;
- для использования в качестве объектов изучения структурно-функциональных связей в химии белка;
- для активации реакций клеточного и гуморального иммунитета.

**Классификация нуклеаз.** Принципы, используемые для классификации нуклеаз, связаны с *тремя их главными свойствами:*

- *субстратная специфичность*, которая определяет их способность узнавать в виде субстратов либо РНК, либо ДНК, либо обе нуклеиновые кислоты;
- *способ атаки субстрата*, который позволяет различать эндонуклеазы (ферменты, расщепляющие связи внутри полимерной цепи) от экзонуклеаз, последовательно отщепляющих нуклеотиды с одного из концов цепи;
- *способ разрыва фосфодиэфирной связи* – гидролиз связи между 5' – ОН – группой и фосфатом или связи между 3' – ОН – группой и фосфатом с образованием продуктов, несущих соответственно 3'- или 5'-концевые фосфатные группы.

Для характеристики действия нуклеаз привлекают и *другие критерии:*

- *отношение к вторичной структуре субстрата.* По этому признаку ДНК-азы разделяют на ферменты, расщепляющие двухцепочечную, одностороннюю или обе указанные формы ДНК;

- *способность расщеплять ДНК по одно- или двухударному механизму*, разрывая обе цепи полимера в одном и том же участке или производя беспорядочные одиночные разрывы;

- *специфичность к азотистым основаниям у гидролизуемой фосфодиэфирной связи.* Этот критерий, введенный после обнаружения специфичности панкреатической РНК-азы к участкам РНК, содержащим пиримидины, оправдывает себя по отношению к некоторым РНК-азам и особенно рестрикционным эндонуклеазам;

- *специфичность к определенным нуклеотидным последовательностям* (так называемые рестриктазы).

Механизм разрыва фосфодиэфирных связей эндонуклеазами в молекулах нуклеиновых кислот может быть различным. Некоторые из них (так называемые циклизующие) вначале выступают как трансферазы, образуя по месту будущего разрыва циклофосфаты, а затем как гидролазы, гидролизуют циклические (2', 3')-фосфодиэфирные связи образованных на первом этапе промежуточных продуктов. Это свойство присуще РНК-азам, фрагментирующим РНК на олигонуклеотиды, несущие фосфат в положении 3'. Другие эндонуклеазы ведут себя как истинные гидролазы, одноактно гидролизуют межнуклеотидные связи нуклеиновых кислот. К ним относятся все ДНК-азы, а также ферменты, деградирующие РНК на олигонуклеотиды с концевым 5' фосфатом. Гидролазами являются также все экзонуклеазы. ДНК-азы подразделяются на ДНК-азы I, продукты которых несут фосфат на 5'-конце цепи, и ДНК-азы II, образующие олигонуклеотиды с концевой фосфатной группой в положении 3'.

**Гидролиз РНК до нуклеозидов.** Гидролиз РНК до нуклеозидов можно осуществлять как химически, так и ферментативно. При этом в обоих случаях первоначально гидролизуются фосфодиэфирные связи с образованием мононуклеотидов, которые затем дефосфорилируются до нуклеозидов.

*Химический гидролиз РНК до нуклеозидов*, как правило, осуществляется с помощью какого-то одного агента, например, ионов  $Rb^{2+}$   $Ca^{2+}$ , в то время как ферментативный гидролиз требует, как правило, двух ферментов – эндонуклеазы и фосфатазы. Химический гидролиз РНК до нуклео-

зидов протекает наиболее эффективно (глубина гидролиза достигает 85–100 %) под действием ионов  $Pb^{2+}$ . Однако из-за высокой токсичности соединений свинца указанный подход не нашел широкого применения. В связи с этим для гидролиза РНК используют ионы  $Ca^{2+}$ . Эффективность гидролиза меньшая, токсичность отсутствует.

*Ферментативный гидролиз РНК* обладает более высокими потенциальными возможностями получения нуклеозидов, чем химический гидролиз. Гидролиз ферментами отличается более высокой специфичностью и мягкими условиями проведения процесса.

Проведено изучение количественных закономерностей процесса гидролиза РНК с точки зрения влияния их параметров на показатели  $A_{260/280}$  и  $A_{260/230}$ . Было установлено, что на исследуемые показатели  $A_{260/280}$  и  $A_{260/230}$  наибольшее влияние оказывает время гидролиза. Результаты исследований свидетельствуют, что изменение величины максимума поглощения при 260 нм связано с накоплением в гидролизате аденина и других оснований, а также нуклеозидов вследствие неспецифических ферментативных процессов. Содержание низкомолекулярных компонентов превышает 20 % после 5–6 часового гидролиза, при этом расходование высокомолекулярной фракции прекращается. Таким образом, *критерием окончания процесса гидролиза с целью получения препарата можно считать момент окончания расходования высокомолекулярной фракции РНК дрожжей*. Изучено влияние рН среды и температуры на показатели оптических соотношений при различных длинах волн. По максимальному и минимальному допустимым значениям показателя качества определены возможно допустимые отклонения рН и температуры от оптимальных.

**Задание 1. Изучение зависимости образования продуктов гидролиза РНК от времени проведения процесса**

#### **Приготовление раствора:**

2 Н раствор натрия едкого. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 8 г натрия едкого, прибавляют 60–70 мл воды, перемешивают и доводят объем до метки водой, и перемешивают.

#### **ХОД РАБОТЫ**

В 43 мл воды растворяют 700 мг дрожжевой РНК и при помощи 2 Н раствора натрия едкого доводят рН до величины 5,0–5,2 (потенциометри-

чески). Раствор нагревают до 63–65 °С и добавляют 1,4 мг РНК-азы поджелудочной железы, перемешивают до полного растворения фермента. Быстро отбирают «нулевую пробу» (10 мкл) и наносят её на пластинку для хроматографии. Раствор помещают в термостат при температуре 63–65 °С и выдерживают в течение 5 часов. Через 1 час, 2 часа, 3 часа, 4 часа и 5 часов из реакционной смеси отбирают аликвоты (по 10 мкл) маркируя каждую пробу. Нулевую пробу и пробы, взятые в процессе гидролиза, по 10 мкл наносят на пластинку для тонкослойной хроматографии. Пластину помещают в хроматографическую камеру с подвижной фазой (изопропанол – 25 % аммиак – вода (7 : 2 : 2)) и проводят методом восходящей хроматографии. После завершения процесса хроматографии пластинки тщательно высушивают в токе нагретого воздуха и просматривают в УФ-свете под ультрамикроскопом. Идентифицируют положение продуктов гидролиза на хроматограммах, сравнивая с «нулевой пробой». Пятна продуктов реакции аккуратно обводят простым карандашом, вырезают ножницами и помещают в пробирки для элюирования. Вносят в пробирки по 5 мл воды и инкубируют их в течение 30 минут при комнатной температуре, периодически встряхивая. Полученные пробы центрифугируют при 3000 об/мин 10–15 минут. Надосадочную жидкость сливают в чистые промаркированные пробирки. Измеряют оптическую плотность при 270 нм против воды.

Содержание РНК ( $X$ ) в мкг на 1 мл в каждой пробе вычисляют по формуле Спирина:

$$X = \frac{(D_{270} - D_{290}) \cdot 10,5}{0,19},$$

где  $D_{270}$  – экстинкция исследуемого образца при 270 нм;

$D_{290}$  – экстинкция исследуемого образца при 290 нм;

0,19 – удельная экстинкция фосфора нуклеиновых кислот в концентрации 1 мг/мл;

10,5 – коэффициент пересчета содержания фосфора на нуклеиновые кислоты, исходя из теоретического содержания фосфора в РНК (около 9,5 %).

По полученным данным содержания продуктов гидролиза РНК в каждой пробе необходимо построить график гидролиза: зависимость выхода продуктов гидролиза от времени.

**Задание 2. Получение очищенной субстанции продуктов ферментативного гидролиза РНК**

**ХОД РАБОТЫ**

Основной раствор после 5 часов гидролиза охлаждают до 25–30 °С, добавляют 12 мл этанола, смесь выдерживают в течение 1 часа при комнатной температуре и негидролизированный продукт отделяют центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10–15 минут. Полученный центрифугат подвергают ультрафильтрации через микроколону для ультрафильтрации с порогом отсечения 10 кДа. К 10 мл ультрафильтрата прибавляют 100 мл этанола для осаждения смеси рибонуклеотидов. Суспензию охлаждают до 4–6 °С и выдерживают в течение 4 часов. Полученный осадок отделяют центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10–15 минут. Надосадочную жидкость удаляют, а осадок высушивают при температуре 40–42 °С в вакуум-сушильном шкафу.

Полученный осадок растворяют в 10 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Проводят измерение оптических плотностей при 230, 260 и 280 нм. Оптические соотношения поглощения при рН 7,0 и указанных длинах волн должно соответствовать:  $A_{260/230}$  – не менее 3,9;  $A_{260/280}$  – не менее 1,7.

При этих соотношениях состав целевого продукта, в масс. %: нуклеозиды – ~ 5,0; нуклеотиды – ~ 95,0 (моонуклеотиды, динуклеотиды, тринуклеотиды и др.).

**Контрольные вопросы и задания**

1. Перечислите типы нуклеиновых кислот.
2. Охарактеризуйте основные компоненты РНК.
3. Охарактеризуйте основные компоненты ДНК.
4. С чем связана классификация нуклеаз?
5. Какие главные свойства нуклеаз?
6. В чем заключается биологическая роль нуклеаз?
7. Какие условия проведения химического гидролиза нуклеиновых кислот?
8. Охарактеризуйте условия ферментативного гидролиза РНК.
9. Опишите преимущества препаратов, полученных при гидролизе РНК.

**РАЗДЕЛ 3. BIOTEХНОЛОГИЧЕСКИЕ СУБСТАНЦИИ**

**3.1. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 9. Исследование биологической антикоагулянтной активности гепарина натрия**

**Цель работы.** Освоение методики определения антикоагулянтной активности гепаринсодержащих препаратов.

**Основное задание:**

1. Приготовление растворов необходимых для изучения антикоагулянтной активности. Проведение количественного определения гепарина методом *in vitro*.

Номер задания		1
<b>Приборы и аппаратура</b>	1. Центрифуга с пробирками	+
	2. Весы аналитические	+
	3. Термостат 20–100 °С	+
	4. Печка электрическая	+
	5. Шкаф сушильный (50–200 °С)	+
	6. Холодильник с морозильной камерой	+
	7. Пипетки 5 мл, 10 мл	+
	8. Цилиндры мерные	+
	9. Колбы вместимостью 50 и 100 мл	+
	10. Бюксы стеклянные	+
	11. Воронки конусные	+
	12. Пробирки стеклянные	+
	13. Бумага фильтровальная	+
	14. Пленка «Парафилм»	+
<b>Сырье</b>	1. Кровь баранья	+
<b>Реактивы</b>	1. Стандартный раствор гепарина натрия	+
	2. Исследуемый раствор гепарина натрия	+
	3. Натрия хлорида, Р	+
	3. Натрия цитрат, Р	+
	4. Кальция хлорид, Р	+
5. Вода очищенная, Р	+	

**Теоретическая подготовка к выполнению работы.** *Антикоагулянты* – химические вещества и лекарственные средства, угнетающие активность свёртывающей системы крови и препятствующие образованию тромбов.

Антикоагулянты оказывают влияние на различные звенья процесса свёртывания крови. Различают *антикоагулянты прямого действия* (гепарин, гирудин и др.), понижающие активность тромбина в крови, и *антикоагулянты непрямого действия* (дикумарин, варфарин, неодикумарин или пелентан, фенилин, синкумар и др.), нарушающие образование протромбина в печени, участвующего в свёртывании крови.

Уменьшают свёртываемость крови также не относящиеся к антикоагулянтам препараты, такие как цитрат натрия, салицилат натрия, ацетилсалициловая кислота.

*Антикоагулянты применяют* при инфарктах миокарда и лёгких, тромботических и эмболических инсультах, тромбозах и др.; профилактически – при атеросклерозе коронарных артерий, мозговых сосудов, ревматических митральных пороках сердца; в хирургии – для предупреждения образования тромбов в послеоперационном периоде; в гематологии – для использования с устройствами автоматического плазмафереза, для заготовки компонентов крови человека (эритроциты, тромбоциты, плазма).

*Антикоагулянтная активность.* Количественное определение гепарина натрия в препарате проводится биологическим методом *in vitro* по способности испытуемого препарата задерживать свертывание рекальцифинированной бараньей плазмы в сравнении *со стандартным образцом* (СО) гепарина натрия. *Принцип данного метода основан на визуальной оценке* изменения текучести плазмы при прибавлении гепарина натрия.

### **Приготовление растворов:**

1. *Приготовление исходного раствора СО гепарина натрия.* Навеску СО гепарина натрия (EPCRS) растворяют в 0,9 % растворе натрия хлорида с таким расчетом, чтобы в 1 мл раствора содержалось 50 МЕ гепарина натрия.

*Срок годности раствора* 1 месяц при температуре 0–4 °С.

2. *Приготовление плазмы.* Кровь барана собирают из яремной артерии в подходящий для сбора и хранения крови пластиковый или обработанный силиконом стеклянный сосуд, содержащий 8 % раствор натрия цитрата в соотношении один объем на 19 объемов собранной крови. Используют иглы и канюлю длиной достаточной для достижения дна сосуда. Первые 5 мл крови отбрасывают и собирают только свободно стекающую кровь. В течение сбора и сразу после его окончания кровь осторожно перемешивают вращением сосуда без встряхивания, не допуская вспенивания. Затем сосуд закрывают и охлаждают до температуры 10–15 °С. *Кровь не пригодна к дальнейшему использованию при наличии в ней явлений гемолиза или сгустков.*

Как можно скорее и не более чем через 4 часа после сбора, собранную кровь центрифугируют от 1000 до 2000 об/мин в течение 30 минут при температуре 10–15 °С. При необходимости очистки плазмы возможно использование скоростного центрифугирования, например, при 20000 г. Не следует использовать фильтрацию.

Отделяют плазму и определяют ее пригодность для количественного определения активности гепарина натрия следующим образом: к 1 мл плазмы прибавляют 0,2 мл раствора кальция хлорида, тщательно перемешивают, не допуская образования пузырьков. *Плазма считается пригодной, если твердый гель образуется в течение 5 минут.*

С целью сохранения полученной плазмы для последующего использования ее делят на порции объемом не более 50 мл, быстро охлаждают до температуры минус 70 °С (например, погружая в жидкий азот) и хранят в замороженном состоянии при температуре не выше минус 30 °С, избегая оттаивания.

*Срок годности плазмы* 1 год.

Перед употреблением плазму размораживают в водяной бане или термостате при температуре (37 ± 0,5) °С. При необходимости размороженную плазму центрифугируют при 1000 об/мин в течение 10 минут при температуре 10–15 °С.

3. *Приготовление раствора кальция хлорида.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1,00 г кальция хлорида, растворяют в 50 мл воды, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

4. *Приготовление 8 % раствора натрия цитрата.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 8,00 г натрия цитрата, растворяют в 50 мл воды, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

5. *Приготовление 0,9 % раствора натрия хлорида.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,9 г натрия хлорида, растворяют в 50 мл воды, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

**Выбор концентрации рабочего раствора СО гепарина натрия.**

В предварительном опыте определяют концентрацию рабочего раствора СО для каждой новой серии СО гепарина натрия и новой партии плазмы.

В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 1 мл исходного раствора СО гепарина натрия, доводят объем раствора 0,9 % раствором натрия хлорида до метки и перемешивают. Концентрация полученного раствора должна быть 5 МЕ / мл (МЕ – международные единицы). В 9 пробирок помещают последовательно 0,2; 0,25; 0,3; 0,35; 0,4; 0,45; 0,5; 0,55 и 0,6 мл полученного раствора, доводят объем раствора в каждой пробирке 0,9 % раствором натрия хлорида до 0,8 мл и перемешивают. Содержание гепарина натрия в каждой пробирке составляет соответственно 1,0; 1,25; 1,5; 1,75; 2,0; 2,25; 2,5; 2,75 и 3,0 МЕ. Затем в каждую пробирку прибавляют по 1 мл плазмы и по 0,2 мл раствора кальция хлорида. Отмечают время, закрывают пробирку пленкой «Парафилм» или стеклянной пробкой и немедленно осторожно перемешивают, не допуская образования пузырьков воздуха.

В качестве рабочего раствора СО гепарина натрия при анализе испытуемого раствора препарата выбирают из полученных 9 растворов раствор СО гепарина натрия с минимальным содержанием гепарина натрия, который предотвращает коагуляцию плазмы после прибавления раствора кальция хлорида в течении 1 часа.

*Рабочий раствор СО гепарина натрия готовят в день проведения анализа.*

**ХОД РАБОТЫ**

В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1 мл препарата, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. К 1 мл полученного раствора, содержащего 50 МЕ гепарина натрия в 1 мл, прибавляют такой объем 0,9 % раствора натрия хлорида, чтобы 1 мл испытуемого раствора препарата содержал столько же МЕ гепарина натрия, сколько содержит 1 мл рабочего раствора СО гепарина натрия.

В 6 тщательно вымытых, высушенных и пронумерованных пробирок размером 13 x 100 мм помещают возрастающие приблизительно в 1,05 раза объемы рабочего раствора СО гепарина натрия.

Раствор, мл	Номера пробирок					
	1	2	3	4	5	6
Рабочий раствор СО гепарина натрия (или испытуемый раствор препарата)	0,5	0,53	0,55	0,58	0,61	0,64
0,9 % раствор натрия хлорида	0,3	0,27	0,25	0,22	0,19	0,16
Плазма	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Раствор кальция хлорида	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20

Затем готовят ряд из 6 пробирок с такими же объемами испытуемого раствора препарата.

Доводят объемы растворов в каждой пробирке 0,9 % раствором натрия хлорида до 0,8 мл, прибавляют по 1 мл плазмы и по 0,2 мл раствора кальция хлорида. Отмечают время, закрывают пробирку пленкой «Парафилм» или стеклянной пробкой и немедленно осторожно перемешивают, не допуская образования пузырьков воздуха.

Через 1 час (точное время) после прибавления раствора кальция хлорида определяют, осторожно наклоняя пробирку, степень коагуляции в каждой пробирке, условно различая три ее степени – 0,25; 0,5 и 0,75.

За «0» принимают отсутствие коагуляции, за «1» – полную коагуляцию плазмы.

Если в каждом ряду пробирок содержится как минимум две пробирки со степенью коагуляции 0,75 и две со степенью коагуляции 0,25, то результаты используют для количественного расчета активности препарата.



Если в каждом ряду пробирок не содержится как минимум две пробирки со степенью коагуляции 0,75 и две – со степенью коагуляции 0,25, то опыт повторяют с другими объемами рабочего раствора СО гепарина натрия и испытуемого раствора препарата.

Если в каждом ряду не содержится как минимум две пробирки со степенью коагуляции 0,25, то с учетом полученных результатов готовят новый ряд из 6 пробирок с увеличивающимися объемами рабочего раствора СО гепарина натрия и испытуемого раствора препарата.

Если в каждом ряду не содержится как минимум две пробирки со степенью коагуляции 0,75, то с учетом полученных результатов новый ряд из 6 пробирок начинают с меньшего объема рабочего раствора СО гепарина натрия и испытуемого раствора препарата.

**Расчет активности.** Вычисляют логарифмы объемов рабочего раствора СО гепарина натрия и испытуемого раствора препарата в каждой пробирке и составляют две таблицы отдельно для рабочего раствора СО гепарина натрия и испытуемого раствора препарата. В каждую таблицу вносят номера пробирок, объем рабочего раствора СО гепарина натрия или испытуемого раствора препарата в пробирке, логарифм этого объема и степень наблюдаемой для него коагуляции, объединяя результаты анализа в группы как указано в таблице. Вычисляют для каждой группы среднее значение  $\log$  объемов и степеней коагуляции ( $x_i$  и  $y_i$ ).

Номера пробирок	Объем рабочего раствора СО гепарина натрия, мл	$\log$ объема	Среднее $\log$ объема ( $x_i$ )	Степень коагуляции	Среднее степени коагуляции ( $y_i$ )
1					
2					
3					
2					
3					
4					
3					
4					
5					
4					
5					
6					

Для дальнейшего расчета находят  $X_{st}$  для рабочего раствора СО гепарина натрия. Если одно из полученных средних значений степени коагуляции рабочего раствора СО гепарина натрия ( $y_{i0}$ ) равно 0,5, то соответствующее ему среднее значение  $\log(x_{i0})$  и является искомой величиной ( $X_{st}$ ). В противном случае  $X_{st}$  вычисляют по формуле, в которую подставляют те значения  $x_{i0}$  и  $x_{i0+1}$ , для которых  $y_{i0}$  и  $y_{i0+1}$  меньше и больше 0,5 соответственно:

$$X_{st} = x_{i0} + \frac{(y_{i0} - 0,5) \cdot (x_{i0+1} - x_{i0})}{(y_{i0} - y_{i0+1})}$$

Аналогично находят  $X_x$  для испытуемого раствора препарата.

На основании найденных величин рассчитывают логарифм активности ( $M$ ) испытуемого препарата по формуле:

$$M = X_{st} - X_x + \log R,$$

где  $R$  – произведение содержания МЕ (международных единиц) гепарина в 1 мл рабочего раствора СО гепарина натрия на разведение препарата.

Повторяют испытание, начиная со слов: «В 6 тщательно вымытых, высушенных и пронумерованных пробирок.....». Если второе значение  $M$  отличается от первого более чем на 0,05, то испытания повторяют до тех пор, пока величина доверительного интервала составит 0,2 и менее. Доверительный интервал определяют стандартным статистическим методом при  $P = 95\%$ .

Каждое испытание проводят на свежеразмороженной порции плазмы с использованием свежеприготовленного рабочего раствора СО гепарина натрия.

Содержание гепарина натрия ( $A$ ) в 1 мл препарата, в МЕ, вычисляют по формуле:

$$A = \text{antilog } M,$$

где antilog – антилогарифм (обращенный логарифм);

$M$  – среднее значение всех  $M$ , полученных в испытаниях.

Содержание гепарина натрия в 1 мл препарата должно быть не менее 4500 МЕ и не более 5500 МЕ.

### Контрольные вопросы и задания

1. Какие виды гепаринов, используемых в медицине, Вам известны?
2. Опишите, в каких случаях используют инъекции низкомолекулярного гепарина.
3. Каким методом проводят определение антикоагулянтной активности?
4. Какой методикой определяют пригодность плазмы для определения антикоагулянтной активности?
5. Опишите метод определения концентрации рабочего раствора гепарина натрия.
6. Охарактеризуйте методику определения антикоагулянтной активности низкомолекулярного гепарина.
7. Укажите преимущества низкомолекулярного гепарина перед нефракционированным препаратом.
8. Каким образом проводят расчет антикоагулянтной активности гепарина натрия?
9. Укажите основные биотехнологические методы получения низкомолекулярных гепаринов.

### 3.2. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 10. Определение фракционного состава препаратов иммуноглобулинов

**Цель работы.** Определение фракционного состава препаратов иммуноглобулина человека (фрагменты, полимеры, мономеры, агрегаты) методом эксклюзивной хроматографии.

#### Основное задание:

1. Приготовление растворов для определения фракционного состава препаратов иммуноглобулина человека, хроматографическое разделение белков и проведение расчета содержания белка в каждой фракции.

Номер задания		1
<b>Приборы и аппаратура</b>	1. Колонка стеклянная (высота 100–120 см, диаметр 2,5–3,0 см)	+
	2. Весы аналитические	+
	3. Коллектор для сбора пробирок	+
	4. УФ-спектрофотометр	+
	5. Холодильник домашний (4–8 °С)	+
	6. Шкаф сушильный (50–200 °С)	+
	7. Пипетки 5 мл, 10 мл	+
	8. Цилиндры мерные	+
	9. Колбы вместимостью 500 мл и 1000 мл	+
	10. Бюксы стеклянные	+
	11. Воронки конусные	+
	12. Бумага фильтровальная	+
	13. Пробирки стеклянные	+
	14. Стакан вместимостью 2,0 л	+
<b>Сырье</b>	1. Раствор иммуноглобулина человека, 10 %	+
<b>Реактивы</b>	1. Сефадекс G-200	+
	2. Калий фосфорнокислый двузамещенный, Р	+
	3. Натрий фосфорнокислый однозамещенный, Р	+
	4. Вода очищенная, Р	+
	5. Хлороформ, Р	+

**Теоретическая подготовка к выполнению работы.** Иммуноглобулины человека представляют собой иммунологически активную белковую фракцию сыворотки или плазмы крови человека, несущую антительную активность различной специфичности. Препараты иммуноглобулинов представляют собой жидкость или порошок (гигроскопичную массу), содержащие иммуноглобулины, преимущественно класса G (Ig G) – антитела против различных возбудителей бактериальных и вирусных инфекций и/или их токсинов.

Иммуноглобулины человека подразделяют на:

- *иммуноглобулины нормальные* (для внутримышечного, подкожно-го, внутривенного введения и энтерального применения), которые используют для специфической профилактики бактериальных и вирусных инфекций, для повышения неспецифической резистентности организма, а также для лечения инфекционно-токсических и вирусных заболеваний;

- *иммуноглобулины специфические*, применяемые для профилактики и/или лечения определенной инфекции;

- *иммуноглобулины специального назначения* (для лечения аллергических заболеваний и др.)

В состав иммуноглобулинов человека входит не менее 95 % иммуноглобулинов класса G.

Иммуноглобулины человека не содержат консервантов и антибиотиков.

#### **Приготовление растворов:**

1. *Подготовка геля-сефадекса G-200.* В стакан вместимостью 2,0 л, содержащий 1,0 л воды, помещают 15–17 г взвешенного геля-сефадекса. Гель-сефадекс оставляют для набухания в холодильнике в течение 3-х дней (консервант – 2–3 капли хлороформа). Затем проводят отделение мелких частиц декантацией раствора. Взвесь сефадекса осторожно помещивают стеклянной палочкой и через 20 минут после отстаивания проводят декантацию раствора. Декантацию повторяют многократно (5–6 раз) пока в надосадочной жидкости не остается взвеси мелких частиц.

2. *Приготовление 0,1 М фосфатного буферного раствора, рН – 7,2.*

Приготавливают два раствора – двузамещенного фосфорнокислого калия (13,6 г) и однозамещенного фосфорнокислого натрия (17,8 г). Навески солей (каждая в отдельности) растворяют в воде, объем доводят до 1 литра. Растворы смешивают в соотношении 3 : 7 (300 мл раствора двузамещенного фосфорнокислого калия и 700 мл раствора однозамещенного фосфорнокислого натрия).

3. *Приготовление испытуемого образца иммуноглобулина.* Берут 0,5 мл 10 % раствора иммуноглобулина, смешивают с 1,5 мл 0,1 М фосфатного буферного раствора, рН – 7,2. Раствор перемешивают.

#### **ХОД РАБОТЫ**

Определение фракционного состава основано на разделении белковых фракций по их молекулярной массе с помощью геля-сефадекса G-200.

1. **Заполнение колонки.** Стеклянную колонку укрепляют в строго вертикальном положении. Над колонкой укрепляют стеклянную воронку, в которую помещают стеклянную палочку так, чтобы конец её частично закрывал выход из воронки, и суспензия могла проходить в колонку тонкой струйкой. Суспензию порциями равномерно переносят в колонку (суспензия не должна быть слишком густой). Кран колонки открывают, когда слой сефадекса осядет на 2–5 см. Колонку заполняют гелем на 2/3 высоты. Для уменьшения взмучивания верхнего слоя сефадекса на поверхность геля, после его осаждения, помещают диск фильтровальной бумаги. К колонке присоединяют резервуар с 0,1 М фосфатным буферным раствором, рН – 7,2. Гель промывают до достижения рН вытекающей из колонки жидкости рН исходного буферного раствора.

**Внимание!** При заполнении колонки гелем-сефадекса необходимо следить за тем, чтобы *не попали пузырьки воздуха*.

2. **Методика определения.** На колонку наносят разведенный препарат иммуноглобулина (2,0 мл). Исследуемую пробу медленно насаивают пипеткой на поверхность геля. Как только раствор профильтруется, стенки колонки ополаскивают небольшим количеством буферного раствора (5–6 мл). Затем начинают элюирование. Элюирование препарата с колонки проводят 0,1 М фосфатным буферным раствором, рН – 7,2. Фракции собирают в объеме 5,0 мл каждую со скоростью 1 капля в 15 секунд. Оптическую плотность растворов измеряют на спектрофотометре при длине волны 280 нм. Распределение белковых фракций препарата выражают графически. Первой (в свободном объеме) выходит крупномолекулярная фракция с молекулярной массой более 600 kDa, затем с молекулярной массой 160–180 kDa, и последним выходит фракция альбумина с молекулярной массой около 60 kDa.

3. **Анализ результатов.** На основании результатов хроматографического анализа вычерчивают график, на горизонтальной оси которого от-

кладывают номера фракций или объем, прошедший через колонку жидкости, а на вертикальной – показатель оптической плотности.

4. **Определение соотношения фракций в препарате.** Содержание белка определяют в каждой пробе по поглощению раствора при 280 нм. Условно можно считать, что при концентрации белка 1 мг/мл величина оптической плотности (для кюветы 1 см) равна 1,0. Проводят расчет содержания белка в каждой фракции (агрегаты, полимеры, фрагменты расщепления, мономеры и димеры). Полученную сумму принимают за 100 % и вычисляют, какой процент по отношению к ней составляет количество белка каждой фракции.

#### **Контрольные вопросы и задания**

1. В каких случаях в медицине используются препараты иммуноглобулинов человека?
2. Какие методы применяются для выделения иммуноглобулинов из крови человека?
3. Охарактеризуйте технологические этапы (факторы), влияющие на фракционный состав препаратов, содержащих иммуноглобулины.
4. Опишите фракционный состав препаратов, содержащих иммуноглобулины.
5. Какой принцип заложен в использовании метода гелевой фильтрации?
6. Укажите расположение веществ на хроматограмме в зависимости от молекулярной массы компонентов.
7. Какие материалы и оборудование необходимы для проведения процесса гелевой фильтрации?
8. Опишите методику проведения гелевой фильтрации препаратов, содержащих иммуноглобулины.
9. Укажите метод расчета соотношений фракций в препарате иммуноглобулина.
10. Оцените полученные результаты и постройте график зависимости оптической плотности (при 280 нм) фракции от объема фракции.

### **3.3. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 11. Получение из растительного материала пектиновых веществ и их характеристика**

**Цель работы.** Выделение пектина и перевод его в растворенное состояние. Определение содержания пектина в продуктах.

#### **Основные задания:**

1. Выделение пектина и перевод его в растворенное состояние.
2. Определение пектина кальций – пектатным методом.
3. Определение пектина этанольным методом.
4. Определение пектина карбазольным методом.

Номер задания	1	2	3	4	
<b>Приборы и аппаратура</b>	1. Весы аналитические	+	+	+	+
	2. Печка электрическая	+	+	+	
	3. Шкаф сушильный (50–200 °С)		+	+	
	4. Холодильник 4–8 °С	+			
	5. рН-метр	+	+	+	+
	6. Ступка и пестик	+			
	7. Баня водяная (40 °С)	+			
	8. Баня водяная (100 °С)	+			
	9. Обратный холодильник	+			
	10. Бюксы стеклянные		+		
	11. Кюветы				+
	12. Тигли			+	
	13. Пипетки 5 мл, 10 мл	+	+	+	+
	14. Цилиндры мерные	+	+	+	+
	15. Колбы 250 мл и 500 мл	+			
	16. Коническая колба 150 мл и 250 мл	+			
	17. Воронки конусные	+	+	+	+
	18. Бумага фильтровальная	+	+	+	+
	19. ФЭК-М				+
<b>Сырье</b>	1. Яблоки	+			

<b>Реактивы</b>	1. Аммоний лимоннокислый, Р	+				
	2. Уксусная кислота, Р		+			
	3. Кальция хлорид, Р		+			
	4. Серебро азотнокислое, Р		+			
	5. Глюкоза, Р					+
	6. Галактуроновая кислота, «SIGMA»					+
	7. Спирт этиловый, Р			+	+	
	8. Карбазол, Р					+
	9. Натр едкий, Р	+				
	10. Кислота хлористоводородная, Р			+		
	11. Кислота серная, Р					+
	12. Вода очищенная, Р	+	+	+	+	
	13. 0,3 М раствор кислоты хлористоводородной	+				
	14. 1 % раствор аммония лимоннокислого	+				
	15. 1 М раствор натрия гидроксида		+			
	16. 1 М раствор уксусной кислоты		+			
	17. 11 % раствор кальция хлорида		+			
	18. 0,5 % раствор кальция хлорида		+			
	19. Раствор азотнокислого серебра, Р		+			
	20. 0,2 % спиртовый раствор карбазолового реактива					+

**Теоретическая подготовка к выполнению работы.** Пектин – (греч. *Pectos* – затвердевший, застывший) – природный полимер D-галактуронозой кислоты с молекулярной массой 30 000–100 000. Содержится в растительном сырье, плодах, овощах, корнеплодах; принадлежит к растворимым пищевым волокнам. Пектины были открыты в 1825 году.

Молекулы пектина представляют собой цепочки пектиновой кислоты (рамногалактуронан), которая содержит 20 и больше остатков галактуронозой кислоты, частично метоксилированной, частично нейтрализованной. Количество замещенных карбоксильных групп определяет степень этерификации пектина. Если более 50 % карбоксильных групп содержат остатки этилового спирта – это *высокоэтерифицированные* (высокометок-

силированные) пектины, если степень этерификации ниже 50 % – это *низкоэтерифицированные* (низкометоксилированные) пектины. Пектин образуется из протопектина под действием кислот, щелочей или фермента протопектиназы.

Цепь пектиновой кислоты состоит из рамнозы и остатков молекул галактуроновых и полигалактуроновых кислот, карбоксильные группы которых частично этерифицированы метиловым спиртом. К главной цепи ковалентными связями присоединяются боковые цепи гемицеллюлоз – галактанов и арабианов. Соли пектиновой кислоты называются пектинатами. На рис. 23 показан фрагмент структурной формулы пектиновой кислоты.

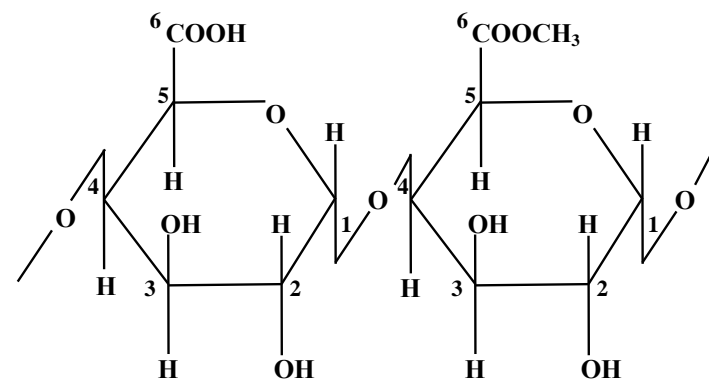


Рисунок 23 – Фрагмент структурной формулы пектиновой кислоты

Карбоксильные группы галактуронозой кислоты часто образуют метиловые эфиры. Омылением сложноэфирных групп получают *пектовые кислоты*, которые не содержат нейтральных моносахаридов. Соли пектовой кислоты называются *пектатами*.

Пектин получают из отходов производства фруктовых соков (яблочного, лимонного, апельсинового, мандаринового), иногда – из отходов производства свекловичного сахара или подсолнечного масла путем экстракции при нагреве обычно с раствором фосфорной кислоты или другой минеральной кислоты. Экстракт концентрируют, фильтруют и осаждают пектиновые вещества спиртом. Для очистки пектина используют его свойства

образовывать пектинаты с металлами. Содержание пектина в белой части кожуры цитрусовых достигает 25–30 %, в кожуре яблок – 40 %, а в жоме – 10–20 % сухой массы.

Пектины используются в фармацевтической и пищевой промышленности как гелеобразователи, адсорбенты, эмульгаторы, как компоненты полимерных терапевтических систем с контролируемым высвобождением действующих веществ. Пектины обладают способностью пролонгировать действие лекарств. Для пектинов характерны адсорбционные, гастропротекторные, гипохолестеринемические свойства. Суточная потребность в пектиновых веществах в рационе взрослого человека составляет 5–6 грамм. Низкоэтерификованные и амидированные пектины используют как загустители и стабилизаторы консистенции кисломолочных продуктов, молочных десертов, напитков, кетчупов. С добавлением пектинов изготавливают термостабильные фруктовые начинки.

Пектины являются компонентом природных пищевых продуктов, которые не перевариваются, не всасываются и не расщепляются микрофлорой кишечника. Низкометилованный пектин способствует выведению из организма тяжелых металлов и радионуклидов благодаря высокой способности к комплексообразованию.

#### ***Приготовление растворов:***

1. *0,3 М раствор хлористоводородной кислоты.* 30,9 г кислоты хлористоводородной доводят водой до объема 100 мл.
2. *1 % раствор аммония лимоннокислого.* 1 г аммония лимоннокислого доводят водой до объема 100 мл.
3. *1 М раствор натрия гидроксида.* 4 г натрия гидроксида растворяют в воде и доводят водой до объема 100 мл.
4. *1 М раствор уксусной кислоты.* 6 г уксусной кислоты ледяной разводят водой до объема 100 мл.
5. *11 % раствор кальция хлорида.* 11 г кальция хлорида в пересчете на безводное вещество растворяют в воде и доводят водой до объема 100 мл.
6. *0,2 % спиртовой раствор карбазолового реактива.* 0,2 г карбазола доводят спиртом этиловым до 100 г.

### ***Задание 1. Выделение пектина и перевод его в растворенное состояние***

#### **ХОД РАБОТЫ**

Навеску яблок массой 25 г влажного или 10 г сухого исследуемого материала, тщательно растирают его в ступке до однородной массы. Количественно переносят в коническую колбу на 150 мл, смывая ступку водой, затем добавляют в колбу 100 мл воды температурой 40 °С. Колбу с материалом выдерживают на водяной бане при температуре 40 °С в течение 30 минут. По истечении этого времени содержимое колбы отфильтровывают через бумажный складчатый фильтр. Операцию повторяют, заливая твердый остаток в колбе 75 мл, а затем еще раз 50 мл воды. Полученные экстракты собирают в мерную колбу на 250 мл и доводят водой до метки. Полученный раствор гидратопектинов используют для дальнейших анализов.

Для определения массовой доли в растительном сырье протопектина и пектовой кислоты остаток на фильтре измельченного растительного материала заливают 50 мл 0,3 М раствором кислоты хлористоводородной и переносят в коническую колбу на 250 мл, закрывают колбу пробкой с обратным холодильником и выдерживают 30 минут на кипящей водяной бане. Затем экстракт отфильтровывают через складчатый бумажный фильтр в мерную колбу на 500 мл. Остаток на фильтре 3–4 раза промывают 75 мл воды. Промывные воды фильтруют через бумажный фильтр в ту же колбу. Фильтр вместе с остатком растительного материала переносят в коническую колбу, заливают 60 мл 1 % раствор лимоннокислого аммония и помещают на кипящую водяную баню на 30 минут. Полученный экстракт отфильтровывают через бумажный фильтр в ту же колбу. Фильтр промывают горячей водой, и объем доводят водой до метки 500 мл.

Полученные экстракты гидратопектина и протопектина исследуют одним из следующих методов.

### **Задание 2. Определение пектина кальций – пектатным методом**

#### **ХОД РАБОТЫ**

*Метод основан на осаждении пектовых кислот в виде кальциевых солей.* В зависимости от цели исследования можно определить отдельно растворимый пектин, протопектин и сумму пектиновых веществ.

Ход анализа при определении пектинов в обоих растворах одинаков. Отличие в том, что раствор протопектина предварительно нейтрализуют NaOH до прибавления щелочи, необходимой для его гидролиза.

Для гидролиза пектиновых веществ к 50 мл исследуемого раствора прибавляют равный объем 1 М раствора натра едкого и оставляют на 8–10 часов при комнатной температуре. По истечении этого времени раствор подкисляют тем же объемом 1 М уксусной кислоты. Образовавшиеся пектовые кислоты осаждают 50 мл 11 % раствора кальция хлорида. Полученный осадок пектата кальция отфильтровывают через заранее высушенный до постоянной массы и взвешенный с бюксом бумажный фильтр. Осадок на фильтре промывают 0,5 % раствором кальция хлорида, а затем 5–6 раз холодной (4–6 °С) водой для удаления ионов хлора (проверка по реакции на ионы хлора с азотнокислым серебром) Для снижения зольности осадок дополнительно промывают 3–4 раза горячей (70–80 °С) водой. Фильтр с осадком переносят в бюкс и сушат до постоянной массы при температуре 100–105 °С. Массу осадка, полученную по разности между массой бюкса с осадком на фильтре и массой бюкса с фильтром, умножают на 0,9235 для пересчета на пектовую кислоту. Погрешность метода составляет 0,3 %. *Источники ошибок:* возможность перехода в осадок пектата кальция не пектиновых примесей.

### **Задание 3. Определение пектина этанольным методом**

#### **ХОД РАБОТЫ**

К 50 мл исследуемого раствора прибавляют концентрированную хлористоводородную кислоту до её конечной концентрации 0,15 М. Затем при непрерывном энергичном перемешивании вводят по каплям 100 мл 95 % этилового спирта. Через 1 час полученный осадок отфильтровывают через бумажный складчатый фильтр, тщательно промывают смесью вода : этанол (1 : 2), содержащей 0,2 % хлористоводородной кислоты.

Промытый осадок растворяют на фильтре горячей водой. При плохой растворимости осадка, к горячей воде прибавляют несколько капель щелочи. Количество фильтрата должно быть равным 50 мл. Полученный фильтрат нейтрализуют и снова осаждают этиловым спиртом. Образовавшийся осадок снова отфильтровывают, промывают сначала смесью вода : этанол (1 : 2), затем 95 % этиловым спиртом, переносят количественно горячей водой в предварительно высушенный до постоянной массы и взвешенный тигель и сушат до постоянной массы при температуре 100–105 °С. Разность между массой тигля с осадком после сушки и пустого тигля представляет собой количество пектина в 50 мл раствора.

### **Задание 4. Определение пектина карбазольным методом**

#### **ХОД РАБОТЫ**

*Метод основан на определении пектинов по образованию прогидролизованного до D-галактурановой кислоты исследуемого пектинового раствора с карбазоловым реактивом.*

Пектиновый раствор подкисляют серной кислотой до pH 1,0–1,5, затем пектины осаждают подкисленным этиловым спиртом с pH 4,7–4,8 (к 50 мл раствора прибавляют 100 мл этанола). Образовавшийся осадок отделяют центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 минут и промывают подкисленным спиртом. Промытый осадок гидролизуют 1 мл концентрированной серной кислоты (при температуре 37 °С в течение 1 часа), добавляют 10 мл воды и 1 мл 0,2 % спиртового раствора карбазолового реактива и производят измерение оптической плотности на ФЭК-М при длине волны 535 нм с зеленым фильтром. Предпочтительно использовать кювету 20 мм. Количество пектиновых веществ определяют с помощью калибровочной кривой, построенной по чистой галактурановой кислоте.

#### **Контрольные вопросы и задания**

1. Охарактеризуйте свойства пектиновых веществ.
2. Какие сырьевые источники для выделения пектиновых веществ Вам известны?
3. В каких областях промышленности нашли использование пектины, и на каких свойствах основано их действие?

4. Опишите метод выделения пектинов.
5. Охарактеризуйте определение пектина кальций – пектатным методом.
6. Охарактеризуйте определение пектина этанольным методом.
7. Охарактеризуйте определение пектина карбазольным методом.
8. С какой целью при определении пектина карбазольным методом используется галактуроновая кислота и почему?

### 3.4. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 12. Исследование раствора бактериального декстрана в препарате «Реополиглюкин»

**Цель работы.** Овладеть методиками изучения фармакопейных характеристик бактериальных декстранов и их лекарственных форм: оптическое вращение, вискозиметрия. Определить подлинность продукта, концентрацию вещества и среднюю молекулярную массу полиглюканов.

#### Основные задания:

1. Определение подлинности бактериальных декстранов.
2. Определение концентрации декстрана в растворе.
3. Определение характеристической вязкости и вискозиметрической средней молекулярной массы.

Номер задания		1	2	3
<b>Приборы и аппаратура</b>	1. Весы аналитические	+	+	
	2. Пипетки 1 мл, 5 мл, 10 мл, 20 мл	+	+	
	3. Стаканы стеклянные 50 мл	+	+	
	4. Пробирки стеклянные	+		
	5. Бумага фильтровальная	+	+	
	6. Поляриметр		+	
	7. Сертифицированные кварцевые пластинки		+	
	8. Термостат, обеспечивающий температуру (25 ± 0,1) °С			+
	9. Мерные колбы 50 мл			+

	10. Вискозиметр типа ВПЖ-4 (вискозиметр Освальда) 11. Секундомер 12. Водяная баня 13. Стеклянные фильтры класса ПОР 16	+		+
<b>Сырье</b>	1. Декстран или коммерческий препарат «Раствор Реополиглюкина»		+	
<b>Реактивы</b>	1. Кислота хлористоводородная, Р 2. Раствор медно-гартратный, Р 3. Вода очищенная, Р 4. Раствор сахарозы 5. 0,9 % раствор натрия хлорида	+	+	+

**Теоретическая подготовка к выполнению работы.** Декстраны – группа бактериальных полиглюканов общей формулы  $(C_6H_{10}O_5)_n$ . Декстраны синтезируются из сахарозы бактериями *Leuconostoc mesenteroides* и *Leuconostoc dextranicum* семейства стрептококков.

Линейные участки декстранов построены из остатков  $\alpha$ -D-глюкопиранозы, где чередуются с 1,3-связями; в других частях цепи – 1,2; 1,3; 1,4-связи. Боковые цепи состоят из 1,2-остатков глюкозы. Декстраны имеют молекулярную массу  $10^7$ – $10^8$  дальтон,  $[\alpha]_D^{25}$  – в пределах от 208° до 233°. Свойства декстранов зависят от структуры и молекулярной массы. Известны декстраны растворимые в воде, формамиде, ДМСО (диметилсульфоксид), некоторые растворимы только в щелочах. Декстраны с заданными свойствами получают с помощью очищенной декстрасахарозы. Макромолекулы декстрана сильно разветвлены. На рис. 24 показана структурная формула макромолекулы декстрана.



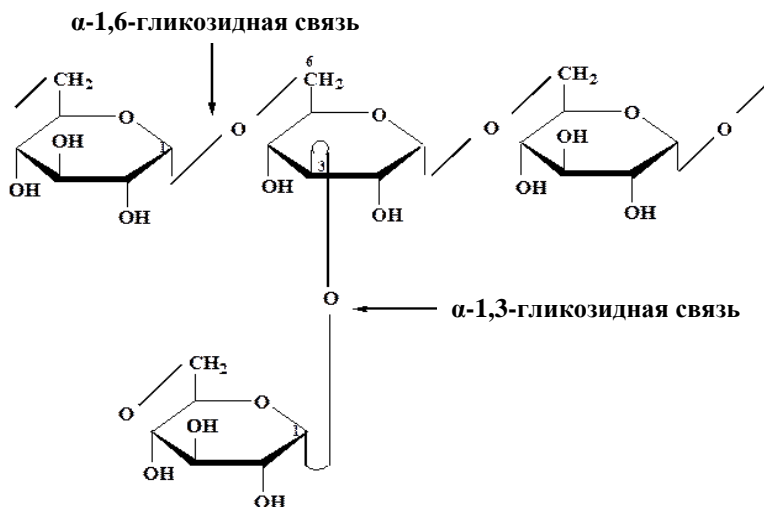


Рисунок 24 – Структурная формула макромолекулы декстрана

Частично гидролизованные декстраны, так называемые медицинские, с молекулярной массой 30 000–80 000 дальтон содержат не менее 95 % 1→6 связей. Декстраны обеспечивают нормальное осмотическое давление, которое соответствует осмотическому давлению крови, еще их используют как плазмозаменители.

Показаниями к применению высокомолекулярных декстранов являются выраженная постгеморрагическая гиповолемия, обусловленная потерей плазмы крови (ожоги, синдром сдавления), кровопотери в период родов, предоперационная и послеоперационная профилактика тромбозов.

Сшитые декстраны (сефадексы) используются как сорбенты для гель-фильтрации, ионно-обменной хроматографии и электрофореза.

### Задание 1. Определение подлинности бактериальных декстранов

#### Приготовление растворов:

##### Медно-тарtratный раствор:

(1). 3,46 г меди (II) сульфата Р растворяют в воде, доводят объем раствора водой до 50 мл.

(2). 17,3 г калия-натрия тартрата Р и 5 г натрия гидроксида Р растворяют в 40 мл воды. Нагревают до кипения, охлаждают, доводят объем полученного раствора водой, свободной от двуокиси углерода до 50 мл.

Непосредственно перед использованием смешивают равные объемы растворов (1) и (2).

#### ХОД РАБОТЫ

К 0,5 мл препарата, помещенного в пробирку, прибавляют 0,1 мл кислоты хлористоводородной и упаривают на водяной бане до объема около 0,1 мл. К полученному остатку прибавляют 3 мл раствора медно-тарtratного и выдерживают на водяной бане 30 секунд. Образуется красный или красно-коричневый осадок.

### Задание 2. Определение концентрации декстрана в растворе

Определение концентрации декстрана в растворе можно провести, используя метод оптического вращения.

Используемый поляриметр должен обеспечивать измерения с точностью до 0,01°. Шкалу обычно проверяют с помощью сертифицированных кварцевых пластинок. Линейность шкалы может быть проверена с помощью растворов сахарозы.

#### Приготовление растворов:

1. 0,9 % раствор натрия хлорида. В воде очищенной растворяют 0,9 г натрия хлорида и доводят объем раствора водой до 100 мл.

2. Раствор декстрана. В 0,9 % растворе натрия хлорида растворяют 1,0 г декстрана 40000, доводят объем раствора до 10 мл тем же растворителем.

#### ХОД РАБОТЫ

Удельное вращение раствора декстрана от +195° до +201° в пересчете на сухое вещество (10 % раствора препарата декстрана, толщина слоя 1 дм).

Определяют ноль поляриметра и угол вращения плоскости поляризации при длине волны линии D спектра натрия ( $\lambda = 589,3$  нм) при температуре (20 + 0,5) °С. Определяют ноль прибора с закрытой пробкой; проводят не меньше пяти измерений и рассчитывают среднее значение. Удель-

ное оптическое вращение вычисляют по формулам, указывая правое и левое вращение соответственно (+) и (-).

Для вещества в растворе:

$$[\alpha]_D^{20} = 1000 \cdot \alpha / C \cdot l,$$

где  $C$  – концентрация раствора, в г/л.

Содержание  $C$  вычисляют по формуле:

$$C = 1000 \cdot \alpha / l \cdot [\alpha]_D^{20},$$

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

$l$  – длина поляриметрической трубки, в дециметрах.

### **Задание 3. Определение характеристической вязкости и вязкозиметрической средней молекулярной массы**

*Вязкость* является мерой внутреннего трения жидкостей и характеризует сопротивление их течению при воздействии внешних напряжений.

*Коэффициент динамической вязкости* ( $\eta$ ) определяется тепловым движением в системе, размером и формой молекул и зависит от межмолекулярных сил. Это определяет возможность использования метода вискозиметрии для определения молекулярной массы линейных полимеров, какими и являются молекулы бактериальных декстранов.

*Характеристическая вязкость* ( $\sigma$ ) определяет гидродинамическое сопротивление макромолекул потоку жидкости в растворах, в которых полимерные молекулы находятся на столь больших расстояниях друг от друга, что практически не взаимодействуют. Для измерения характеристической вязкости необходимо большое разбавление раствора, что позволяет исключить взаимодействие между молекулами, в частности, молекулами декстрана. *Характеристическая вязкость* не зависит от концентрации растворенного вещества, но *зависит формы молекулы и её молекулярной массы*.

### **ХОД РАБОТЫ**

Для *определения характеристической вязкости* приготавливают *не менее пяти исследуемых растворов разной концентрации*.

Первоначально необходимо установить температуру в термостате  $(25 \pm 0,1)^\circ\text{C}$ . Затем помещают в термостат вискозиметр и выдерживают 5–7 минут. В качестве контрольного раствора используют 0,9 % раствор натрия хлорида (растворитель декстрана). Вискозиметр заполняют 0,9 % раствором натрия хлорида и выдерживают в течение 10–15 минут для достижения необходимой температуры. При прохождении уровня жидкости через верхнюю метку вискозиметра включают секундомер, при прохождении уровня жидкости через нижнюю метку секундомер выключают.

В мерные колбы вместимостью 50 мл помещают 5,0 мл (*раствор 1*), 7,5 мл (*раствор 2*), 10,0 мл (*раствор 3*), 12,5 мл (*раствор 4*) и 15,0 мл (*раствор 5*) 10 % раствора препарата; доводят объем раствора водой до метки; перемешивают и фильтруют через стеклянный фильтр ПОР 16.

Определяют *относительную вязкость* ( $\eta_{\text{отн}}$ ) полученных растворов в вискозиметре типа ВПЖ-4 с диаметром капилляра от 0,60 до 0,65 мм при температуре  $(25 \pm 0,1)^\circ\text{C}$  по отношению к 0,9 % раствору натрия хлорида по формуле:

$$\eta_{\text{отн}} = \eta / \eta_0,$$

где  $\eta$  – вязкость вещества;

$\eta_0$  – вязкость растворителя.

Величину *приведенной вязкости* ( $\eta_{\text{прив } i}$ ) каждого из растворов вычисляют по формуле:

$$\eta_{\text{прив } i} = (\eta_{\text{отн } i} - 1) / C_i,$$

где  $\eta_{\text{отн } i}$  – относительная вязкость *каждого* испытуемого раствора;

$C_i$  – концентрация, т.е. содержание декстрана в 100 мл *каждого* испытуемого раствора, в граммах.

Величину *характеристической вязкости* ( $[\eta]$ ) вычисляют по формуле:

$$[\eta] = \frac{\sum_{i=1}^5 C_i^2 \sum_{i=1}^5 \eta_{\text{прив } i} - \sum_{i=1}^5 C_i \sum_{i=1}^5 (C_i \cdot \eta_{\text{прив } i})}{5 \sum_{i=1}^5 C_i^2 - \left( \sum_{i=1}^5 C_i \right)^2}.$$

Характеристическая вязкость препарата должна быть от 0,181 до 0,205.

Среднюю молекулярную массу препарата ( $M_{\text{ср.}}$ ) вычисляют по формуле:

$$M_{\text{ср.}} = 10^{\left( \frac{2 \cdot \lg [\eta] \cdot 10^4}{9,66} \right)}$$

Средняя молекулярная масса препарата должна быть от 35000 до 45000.

Все полученные данные заносят в таблицу результатов (протокол).

№ растворов	1	2	3	4	5
Содержание декстрана в 100 мл испытуемого раствора, в граммах					
Относительная вязкость (1 определение)					
Относительная вязкость (2 определение)					
Относительная вязкость (3 определение)					
Средняя относительная вязкость (из трех определений)					
Приведенная вязкость					
Характеристическая вязкость					
Средняя молекулярная масса					

#### Контрольные вопросы и задания

1. Дайте определение показателя «удельное оптическое вращение».
2. По какой формуле рассчитывают величину приведенной вязкости?
3. Как устроен вискозиметр (типа «ВПЖ»)? Опишите принцип работы на нем.
4. Перечислите правила работы с поляриметром.
5. Дайте определение кинематической вязкости.
6. Дайте характеристику бактериальных декстранов.
7. Опишите реакцию подлинности на декстран.
8. Каково основное применение декстранов?
9. Дайте определение термина «вязкость раствора».

## РАЗДЕЛ 4. ИММУНОБИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОДУКТЫ

### 4.1. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 13. Изучение реакции иммунопреципитации для идентификации антигенов вакцины против столбняка, дифтерии и коклюша

**Цель работы.** Подтвердить подлинность вакцины и определить состав антигенов в вакцине против дифтерии, столбняка и коклюша. Освоить методики контроля готовых препаратов, полученных при помощи иммунобиотехнологии.

#### Основное задание:

1. Освоение метода идентификации дифтерийного, столбнячного и коклюшного антигена (АКДС-вакцина), основанного на реакции преципитации между антигенами и специфическими антителами к ним.

Номер задания		1
<b>Приборы и аппаратура</b>	1. Центрифуга с пробирками	+
	2. Весы аналитические	+
	3. Печка электрическая	+
	4. Мешалка электрическая	+
	5. Насос водоструйный	+
	6. Шкаф сушильный (50–200 °С)	+
	7. Холодильник (4–8 °С)	+
	8. Баня водяная	+
	9. Микропипетки	+
	10. Пипетки 5 мл, 10 мл	+
	11. Цилиндры мерные	+
	12. Колбы вместимостью 50 и 100 мл	+
	13. Бюксы стеклянные	+
	14. Воронки конусные	+
	15. Чашки Петри	+

	16. Бумага фильтровальная	+
	17. Фильтры с размером пор 0,22 мкм	+
<b>Сырье</b>	1. Вакцина АКДС	+
<b>Реактивы</b>	1. Вода Р	+
	2. Калия хлорид, Р	+
	3. Калия дигидрофосфат, безводный, Р	+
	4. Натрия хлорид, Р	+
	5. Натрия фосфат двуосновный, безводный, Р	+
	6. Кислота хлористоводородная, Р	+
	7. Полисорбат 20, Р	+
	8. Натрия цитрат, Р	+
	9. Спирт этиловый, Р	+
	10. Спирт метиловый, Р	+
	10. Кислота ледяная уксусная, Р	+
	11. Кумасси синий, Р	+
	12. Агароза для электрофореза, Р	+
13. Альбумин бычий, Р	+	

**Теоретическая подготовка к выполнению работы.** Реакция *преципитации* (РП) – это осаждение комплекса антиген – антитело, образующегося в результате соединения растворимого антигена со специфическими антителами. Осадок комплекса антиген – антитело называется *преципитатом*.

*Иммунопреципитация* – это метод выделения белка из сложных смесей, таких как клеточные лизаты, сыворотки и тканевые гомогенаты, при помощи специфичных к белку антител. Иммунопреципитация позволяет детектировать изменения экспрессии белка, характеризовать белки, с которыми исследуемый белок образует комплекс, выявлять сайты связывания белка с нуклеиновыми кислотами.

#### **Приготовление растворов:**

##### **Реагенты:**

1. *Фосфатный буфер рН 7,4.* В 800 мл воды растворяют 0,2 г калия хлорида, 0,2 г калия дигидрофосфата, безводного, 8 г хлорида натрия, 2,9 г фосфата натрия двуосновного, безводного. Доводят рН раствора до  $7,4 \pm 0,05$  при по-

мощи 1 М кислоты хлористоводородной, и доводят объем раствора водой до объема 1 литр. Раствор фильтруют через фильтры с размером пор 0,22 мкм.

2. *20 % раствор полисорбата 20.* Смешивают 2 мл полисорбата 20 с 8 мл воды.

3. *Раствор натрия цитрата.* В воде растворяют 5,88 г натрия цитрата и доводят объем до 10 мл.

4. *Раствор для обесцвечивания.* Смешивают этанол, ледяную уксусную кислоту и воду в соотношении 4 : 1 : 5.

5. *Раствор Кумасси синего.* Растворяют 4 г Кумасси голубого в 400 мл 100 %-го метанола, 100 мл ледяной уксусной кислоты и доводят объем раствора водой до 1 литра.

##### **Стандарты:**

1. *Стандарт дифтерийного антигена.* Дифтерийный анатоксин (NIBSC 02/176) разводят в фосфатном буфере рН 7,4 до  $20 \pm 0,5$  Лf/мл.

2. *Стандарт столбнячного антигена.* Столбнячный анатоксин (NIBSC 04/150) разводят в фосфатном буфере рН 7,4 до  $4 \pm 0,2$  Лf/мл.

3. *Стандарт антигена коклюшного токсина.* Разводят токсин коклюша (NIBSC JNH-5, 10μg PN/мл) в фосфатном буфере рН 7,4 в 4 раза.

4. *Стандарт антигена филламентозного гемагглютинина.* Разводят филламентозный гемагглютинин (NIBSC JNH-4, 10 μg PN/мл) в фосфатном буфере рН 7,4 в два раза.

5. *Стандартные антитела против антигена дифтерии.* Разводят стандарт протидифтерийных антител (NIBSC 66/153 (110 ME/мл)) в фосфатном буфере рН 7,4 в десять раз.

6. *Стандартные антитела против антигена столбняка.* Разводят стандарт антител против столбняка (NIBSC 60/13 (230 ME/мл)) в фосфатном буфере рН 7,4 в десять раз.

7. *Стандартные антитела против токсина коклюша.* Разводят стандарт антител против коклюша (NIBSC 97/572) в фосфатном буфере рН 7,4 в десять раз.

8. *Стандарт антител против филламентозного гемагглютинина.* Разводят стандарт ФНА антител (NIBSC 97/564) в фосфатном буфере рН 7,4 в 100 раз.

9. *Контроль.* 10 мг альбумина бычьего разводят в 80 мл фосфатного буфера pH 7,4 и доводят объем раствора этим же растворителем до 100 мл.

#### ХОД РАБОТЫ

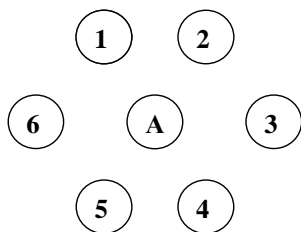
Для идентификации столбнячного антигена и филламентозного гемагглютинина используют концентрат вакцины, который получают путем центрифугирования при 3000 об /мин в течение 6 минут 2 мл исследуемой вакцины АКДС, отбрасывая 1,8 мл супернатанта (концентрация вакцины в 10 раз).

Для идентификации дифтерийного и коклюшного антигена используют 0,2 мл исследуемой вакцины.

К 0,2 мл концентрата вакцины и 0,2 мл исследуемой вакцины прибавляют 10 мкл раствора три натрия цитрата и перемешивают. После этого прибавляют 10 мкл 1 М натрия гидроксида и перемешивают.

Нейтрализуют полученный раствор прибавлением 10 мкл хлористоводородной кислоты, после чего пробы инкубируют при перемешивании в термостате с шейкером при  $37 \pm 0,2$  °C в течение 48 часов.

Растапливают 0,25 г агарозы для электрофореза в 25 мл фосфатного буфера pH 7,4 и добавляют 25 мкл 20 % раствора полисорбата 20. Раствор переливают в чашки Петри и делают лунки.



В лунки № 1, № 2, № 3 прибавляют 50 мкл тест антигена для идентификации. В лунку № 4 прибавляют 50 мкл контроля. В лунку № 5 прибавляют 50 мкл фосфатного буфера pH 7,4. В лунку № 6 прибавляют 50 мкл стандартного антигена. В лунку А прибавляют 50 мкл раствора стандартных антител.

Чашки герметично закрывают и инкубируют при комнатной температуре 18 часов. Содержимое чашек промывают 2–3 раза по 5–10 мл фосфатного буфера pH 7,4.

Агаровый гель осторожно помещают на стеклянную пластину, между двумя слоями фильтровальной бумаги для удаления влаги, после чего на пластину помещают груз (0,3–0,5 кг) и выдерживают от 30 до 60 минут. При необходимости бумагу меняют.

Бумагу отделяют от геля и сушат гель при температуре  $37 \pm 0,5$  °C. Высушенный гель переносят в емкость с Кумасси синим, и красят в течение 15 минут. Затем раствор Кумасси сливают и промывают гель раствором для обесцвечивания 2–4 раза до полного обесцвечивания геля.

Линии преципитации между стандартом антител и исследуемой вакциной должны быть идентичны линиям преципитации между растворами стандартных антигенов и стандартных антител. Линии преципитации между контролем или фосфатным буфером pH 7,4 и стандартом антител должны отсутствовать.

Полученные результаты необходимо зафиксировать в лабораторном журнале.

#### ***Контрольные вопросы и задания***

1. Охарактеризуйте принцип метода иммунопреципитации.
2. На каких данных основано подтверждение идентичности исследуемых антигенов?
3. Опишите процесс проведения подтверждения антигенной структуры вакцины.
4. Какую функцию выполняет агаровый гель в реакции иммунопреципитации и как влияет его плотность на скорость и эффективность реакции?
5. Охарактеризуйте условия определяющие эффективность реакции между антигеном и антителом в реакции иммунопреципитации.
6. С какой целью в реакции иммунопреципитации используются стандартные образцы?

#### 4.2. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 14. Определение подлинности иммуноглобулинов крови человека методом иммунодиффузии

**Цель работы.** Определение состава антител в иммунобиотехнологических препаратах: лекарственный препарат иммуноглобулина человека для инъекций.

**Основное задание:**

1. Освоение метода идентификации иммуноглобулина человека, основанного на процессе диффузии и реакции преципитации между иммуноглобулином человека и специфическими антителами к нему.

Номер задания		1
<b>Приборы и аппаратура</b>	1. Весы аналитические	+
	2. Печка электрическая	+
	3. Мешалка электрическая	+
	4. Насос водоструйный	+
	5. Шкаф сушильный (50–200 °С)	+
	6. Холодильник (4–8 °С)	+
	7. Баня водяная	+
	8. Микропипетки	+
	9. Пипетки 5 мл, 10 мл	+
	10. Цилиндры мерные	+
	11. Колбы вместимостью 50 и 100 мл	+
	12. Бюксы стеклянные	+
	13. Воронки конусные	+
	14 Чашки Петри	+
	15. Бумага фильтровальная	+
	16. Фильтры с размером пор 0,22 мкм	+
<b>Сырье</b>	1. Иммуноглобулин человека нормальный	+
<b>Реактивы</b>	1. Вода Р	+
	2. Калия хлорид, Р	+
	3. Калия дигидрофосфат, безводный, Р	+

	4. Натрия хлорид, Р	+
	5. Натрия фосфат двуосновный, безводный, Р	+
	6. Кислота хлористоводородная, Р	+
	7. Полисорбат 20, Р	+
	8. Натрия цитрат, Р	+
	9. Спирт этиловый, Р	+
	10. Спирт метиловый, Р	+
	10. Кислота ледяная уксусная, Р	+
	11. Кумасси синий, Р	+
	12. Агароза для электрофореза, Р	+

**Теоретическая подготовка к выполнению работы.** Сырьем для производства иммуноглобулинов человека является плазма крови здоровых доноров, соответствующая требованиям НД «Плазма для фракционирования». Метод идентификации основан на реакции преципитации между антигенами и специфическими антителами к ним.

**Приготовление растворов:**

**Реагенты:**

1. *Фосфатный буфер рН 7,4.* В 800 мл воды растворяют 0,2 г калия хлорида, 0,2 г калия дигидрофосфата, безводного, 8 г хлорида натрия, 2,9 г фосфата натрия двуосновного, безводного. Доводят рН раствора до  $7,4 \pm 0,05$  при помощи 1 М кислоты хлористоводородной и доводят объем раствора водой до объема 1 литр. Раствор фильтруют через фильтры с размером пор 0,22 мкм.

2. *20 % раствор полисорбата 20.* Смешивают 2 мл полисорбата 20 с 8 мл воды.

3. *Раствор натрия цитрата.* В воде растворяют 5,88 г натрия цитрата и доводят объем до 10 мл.

4. *Раствор для обесцвечивания.* Смешивают этанол, ледяную уксусную кислоту и воду в соотношении 4 : 1 : 5.

5. *Раствор Кумасси синего.* Растворяют 4 г Кумасси синего в 400 мл 100%-го метанола, 100 мл ледяной уксусной кислоты и доводят объем раствора водой до 1 литра.

### **Стандарты:**

1. *Стандарт иммуноглобулинов сыворотки крови человека.* Разводят стандарт в фосфатном буфере pH 7,4 в 10 раз.

2. *Стандарт альбумина сыворотки крови человека.* Разводят стандарт в фосфатном буфере pH 7,4 в 10 раз.

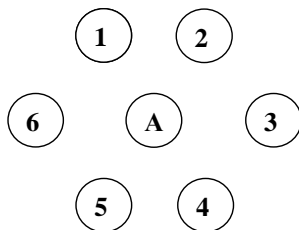
3. *Стандартная сыворотка против антигенов крови человека.* Разводят сыворотку в фосфатном буфере pH 7,4 в соответствии с инструкцией по применению.

4. *Сыворотка крови человека.* Разводят сыворотку крови человека в фосфатном буфере pH 7,4 в 10 раз.

5. *Контроль.* Фосфатный буфер pH 7,4.

### **ХОД РАБОТЫ**

Растапливают 0,25 г агарозы для электрофореза 25 мл фосфатного буфера pH 7,4 и добавляют 25 мкл 20 % раствора полисорбата 20. Раствор переливают в чашки Петри и делают лунки.



В лунки № 1, № 2 прибавляют 50 мкл раствора иммуноглобулина человека. В лунки № 3, № 4 прибавляют 50 мкл раствора альбумина человека. В лунку № 5 прибавляют 50 мкл раствора сыворотки человека. В лунку № 6 прибавляют 50 мкл контроля. В лунку А прибавляют 50 мкл раствора сыворотки против антигенов крови человека.

Чашки герметично закрывают и инкубируют при комнатной температуре 18 часов. Содержимое чашек промывают 2–3 раза по 5–10 мл фосфатного буфера pH 7,4.

Агаровый гель осторожно помещают на стеклянную пластину, между двумя слоями фильтровальной бумаги для удаления влаги, после чего

на пластины помещают груз (0,3–0,5 кг) и выдерживают так от 30 до 60 минут. При необходимости бумагу меняют.

Бумагу отделяют от геля и сушат гель при температуре  $37 \pm 0,5$  °С. Высушенный гель переносят в емкость с Кумасси синим и красят в течение 15 минут.

Раствор Кумасси сливают и промывают гель раствором для обесцвечивания 2–4 раза до полного обесцвечивания геля.

Должны быть линии преципитации между стандартом антител против антигенов крови человека и испытуемым раствором иммуноглобулина, альбумином и сывороткой человека.

Линий преципитации между контролем (фосфатным буфером pH 7,4) не должно быть.

Полученные результаты необходимо зафиксировать в лабораторном журнале.

### **Контрольные вопросы и задания**

1. Охарактеризуйте принцип метода иммунопреципитации.
2. На чем основано подтверждение идентичности исследуемых растворов иммуноглобулинов?
3. Что используется в реакции иммунопреципитации в качестве антигенов и антител?
4. Опишите процесс установления состава раствора иммуноглобулина.
5. Какую функцию выполняет агаровый гель в реакции иммунопреципитации и как влияет его плотность на скорость и эффективность реакции?
6. Охарактеризуйте условия определяющие эффективность реакции между антигеном и антителом в реакции иммунопреципитации.
7. С какой целью в реакции иммунопреципитации используются стандартные образцы?

### 4.3. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 15. Изучение продуктов иммунобиотехнологии методом иммуноферментного анализа (ИФА)

**Цель работы.** Овладеть методикой определения HBs-антигена в вакцине против гепатита В двойным «сендвич-методом», используя ИФА.

#### Основное задание:

1. Приготовление растворов для проведения ИФА и проведение анализа HBs-антигена методом ИФА.

Номер задания		1
<b>Приборы и аппаратура</b>	1. Иммуноферментный анализатор	+
<b>Сырье</b>	1. Вакцина против гепатита В	+
<b>Материалы и реактивы</b> (по НД производителя)	1. Анти-HBs-гамма-глобулин морской свинки (первые антитела)	+
	2. Анти-HBs-гамма-глобулин кролика (вторые антитела)	+
	3. Бараньи антитела к IgG кролика, меченные пероксидазой (фракция IgG)	+
	4. HBs-стандарт	+
	5. HBs-позитивная сыворотка (вторичный стандарт)	+
	6. ФСБ (0,1 М фосфатный буфер с pH 7,2, 1 М NaCl)	+
	7. Орто-дианизидин, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	+
	8. 5 М HCl	+
	9. Полистироловые пробирки или планшеты	+

**Теоретическая подготовка к выполнению работы.** Рассмотрим ИФА применительно к определению HBs-антигена двойным «сендвич-методом». *Процесс количественного определения проводят по следующему алгоритму:*

1. Сенсибилизация полистироловых пробирок (антисыворотка морской свинки (200 мкл) против HBs-антигена) – 16 часов при 4 °С.

2. Стандартный раствор HBs-антигена или исследуемая сыворотка (200 мкл) – 2 часа при 37 °С.

3. Анти-HBs антитела кролика (200 мкл) – 2 часа при 37 °С.  
4. Антикروличий бараний IgG (200 мкл) – 2 часа при 37 °С.  
5. Субстрат, меченный пероксидазой (дианизидин / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (500 мкл) – 2 часа при 20 °С.

6. Остановка реакции, 5 М HCl (500 мкл).

7. Определение экстинции при длине волны 535 нм.

#### ХОД РАБОТЫ

Полистироловые пробирки в течение ночи при 4 °С инкубируют с 200 мкл Анти-HBs-гамма-глобулина морской свинки (10 мг/л в ФСБ). После инкубирования трижды отмывают порциями ФСБ по 600 мкл. В подготовленные таким образом пробирки добавляют по 200 мкл различных разведений стандарта или анализируемых сывороток. Пробы инкубируют 2 часа при 37 °С или 16 часов при комнатной температуре, затем трижды отмывают ФСБ. Связавшийся с первыми АТ HBs-антиген на следующем этапе насыщается вторыми антителами. Для этого в пробы добавляют по 200 мкл Анти-HBs-гамма-глобулин кролика (вторые антитела) (10 мг/л в ФСБ, содержащий 0,5 мМ ЧСА) и снова инкубируют в течение 2 часов при 37 °С, трижды отмывают ФСБ и вносят в пробы по 200 мкл антител к IgG кролика, меченных пероксидазой (1,2 мг/л ФСБ, содержащий 0,5 мМ ЧСА). Снова инкубируют в течение 2 часов при 37 °С. После трехкратного отмывания ФСБ проводят ферментативную реакцию. В пробы вносят по 500 мкл субстрата (Орто-дианизидин 0,32 мМ; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,7 мМ; сорбитовый эфир полиоксиэтилена 1,1 г/лв ФСБ). Инкубируют 2 часа при комнатной температуре, останавливают ферментативную реакцию добавлением 500 мкл 5 М HCl и измеряют экстинцию при длине волны 535 нм в объеме 1 мл.

#### Контрольные вопросы и задания

1. Какие вопросы позволяет решать метод ИФА?  
2. Что представляет собой HBs-антиген и с какой целью проводится его определение?

3. Охарактеризуйте приведенную схему проведения определения HBs-антигена методом ИФА.

4. Опишите основные этапы определения HBs-антигена методом ИФА.

5. Какую функцию несет меченый фермент пероксидазы хрена в методе ИФА?

6. Что используется для остановки реакции ИФА?



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Барановский А.Ю. Дисбактериоз кишечника / А.Ю. Барановский, Э.А. Кондрашина. – Издательство: «Питер», 2008. – 240 с.
2. Беккер Ю. Спектроскопия / Ю. Беккер. – М.: Техносфера, 2009. – 528 с.
3. Бергельсон Л.Д. Препаративная биохимия липидов / Л.Д. Бергельсон, Э.В. Дятловицкая, Ю.Г. Молотковский. – М.: Наука, 1981. – 260 с.
4. Брок Т. Мембранная фильтрация / Т. Брок – М. Мир, 1987. – 464 с.
5. Вавилова Т.П. Практикум по биохимии / Т.П. Вавилова, О.Л. Евстафьева, И.Г. Островская. – М.: Веди, 2009. – 128 с.
6. Владимиров Ю.А. Лекции по медицинской биофизике / Ю.А. Владимиров, Е.В. Проскурнина. – М.: Издательство МГУ, 2007. – 432 с.
7. Воронин Е.С. Биотехнология / Е.С. Воронин. – С-Петербург, Гиорд, 2008. – 703 с.
8. Галимова М.Х. Ферментативная кинетика: справочник по механизмам реакций / М.Х. Галимова. – М.: Дом книги, 2007. – 320 с.
9. Гамаюрова В.С. Ферменты: лабораторный практикум / В.С. Гамаюрова, М.Е. Зиновьева. – Федеральное агенство по образованию. Казанский Государственный Технический Университет. Казань, 2010. – 272 с.
10. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. – 590 с.
11. Грибов Л.А. Элементы квантовой теории, строения и свойств молекул / Л.А. Грибов. – М.: Ителлект, 2010. – 312 с.
12. Гусаров Д.А. Использование ОФ ВЭЖХ для очистки генно-инженерного инсулина человека / Д.А. Гусаров, В.В. Востриков, Е.А. Ручко. – Биотехнология, 2006, № 2. – С. 44–49.
13. Державна фармакопея України. Первое издание. Дополнение 1 – Харьков, 2008. – 608 с.
14. Державна фармакопея України. Первое издание. Дополнение 2 – Харьков, 2008. – 617 с.
15. Егорова Т.А. Основы биотехнологии / Т.А. Егорова, С.М. Клунова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2003. – С. 72–102.

16. Елинов Н.П. Основы биотехнологии / Н.П. Елинов. – СПб «Наука», 1995. – 601 с.
17. Ельяшевич М.А. Молекулярная спектроскопия / М.А. Ельяшевич. – М.: Либроком, 2008. – 527 с.
18. Кейтс М. Техника липидологии. Выделение, очистка и идентификации липидов / М. Кейтс. – М.: Мир, 1975. – 305 с.
19. Ковалів Б. Гепарин і гепариноїди у клінічній практиці / Б. Ковалів. – Львівський державний Університет. Львів, 2003. – 346 с.
20. Коэн-Таннуджи К. Квантовая механика. Т. 1 / К. Коэн-Таннуджи, Б. Диу, Ф. Лалюэ. – Екатеринбург: Изд-во Уральского ун-та, 2000. – 944 с.
21. Краснополяский Ю.М. Липосомальные лекарственные формы в онкологии / Ю.М. Краснополяский, В.Ю. Балабаньян, Д.Л. Шоболов, В.И. Швец. // Российский Биотерпевтический журнал, 2013. Т. 12. № 2. – С. 48.
22. Краснополяский Ю.М. Технологические принципы получения липосомальных лекарственных препаратов и их применение в клинике / Ю.М. Краснополяский, В.И. Швец. // Нанотехнология и охрана здоровья, 2013. Т. 5. № 2. – С. 10–19.
23. Краснополяский Ю.М. Фармацевтическая биотехнология: Технология производства иммунобиологических препаратов: Учебное пособие / Ю.М. Краснополяский, М.И. Борщевская. – Харьков, НТУ «ХПИ», 2009. – 351 с.
24. Краснополяский Ю.М. Фармацевтическая биотехнология: Технология биологически активных веществ. Часть I: Учебное пособие / Ю.М. Краснополяский, Н.Ф. Клещев. – Харьков, НТУ «ХПИ», 2012. – С. 81–111.
25. Кругляков П.М. Физическая и коллоидная химия: Учебное пособие / П.М. Кругляков, Т.Н. Хаскова. – М.: Высшая школа, 2005. – 319 с.
26. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот / Л.А. Остерман. – М.: МЦНМО, 2002. – 248 с.
27. Уильямс Б. Методы практической биохимии / Б. Уильямс, К. Уилсон. – М.: Мир, 1978. – 270 с.
28. Фримель Г. Иммунологические методы / Г. Фримель. – М.: Медицина, 1987. – С. 73–89.
29. Швец В.И. Фосфолипидсодержащие препараты при лечении различных заболеваний / В.И. Швец, Ю.М. Краснополяский. // Провизор, 2007. № 2. – С. 24–26.

Навчальне видання

КРАСНОПОЛЬСЬКИЙ Юрій Михайлович  
СЕВЕРІНА Любов Валентинівна

**ФАРМАЦЕВТИЧНА БІОТЕХНОЛОГІЯ:  
ОСНОВИ ЛАБОРАТОРНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ**

Практикум

для студентів напряму підготовки «Біотехнологія»,  
у тому числі для іноземних студентів

Російською мовою

Відповідальний за випуск *О. М. Огурцов*  
Роботу до видання рекомендувала *М. Г. Зінченко*  
В авторській редакції

План 2016 р., поз. 81.

Підписано до друку 11.11.2016 р. Формат 60 × 84 1/16.  
Папір офсетний. Riso-друк. Гарнітура Таймс. Ум. друк. арк. 12,1.  
Наклад 300 пр., 1-й з-д 1–50. Зам. № 16. Ціна договірна.

---

Видавець і виготовлювач  
Видавничий центр НТУ «ХП»,  
вул. Кирпичьова (Фрунзе), 2, м. Харків-2, 61002

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 3656 від 24.12.2009 р.