

2.1.2.30. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

Общая фармакопейная статья соответствует аналогичному тексту, гармонизированному в рамках Фармакопейной дискуссионной группы (PDG). Негармонизированный текст обозначен символами «♦».

♦1. ОБЩИЙ ПРИНЦИП

Под действием электрического поля заряженные частицы, растворенные или диспергированные в растворе электролита, передвигаются в направлении электрода противоположной полярности. При электрофорезе в геле движение частиц замедляется взаимодействием с окружающей гель-матрицей, действующей как молекулярное сито. Противоположные взаимодействия электрического тока и молекулярного сита приводят к различиям в скорости миграции частиц в зависимости от их размеров, форм и зарядов. Вследствие различий физико-химических свойств разные макромолекулы в смеси будут мигрировать с разной скоростью при электрофорезе и, таким образом, будут разделены на отдельные фракции. Электрофоретическое разделение может быть проведено в системах без неподвижных носителей (например, разделение в свободном растворе в капиллярном электрофорезе) и в стационарных средах, таких, как тонкослойные пластины, пленки или гели.

2. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В СВОБОДНОМ РАСТВОРЕ ИЛИ ФРОНТАЛЬНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

Этот метод в основном используется для определения электрофоретической подвижности заряженных частиц, являющейся экспериментальной непосредственно измеряемой и воспроизводимой характеристикой веществ. Метод обычно применяется для веществ с высокой относительной молекулярной массой, которые имеют малую способность к диффузии. Перед началом определения фиксируют месторасположение границ раздела растворов веществ физическими методами, например, рефрактометрией или кондуктометрией. После приложения электрического поля с заданными характеристиками в течение точно измеренного времени определяют новые границы раздела растворов веществ и их относительное положение. Условия испытания подбирают так, чтобы можно было определять столько границ, сколько компонентов присутствует.

3. ЗОННЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НЕПОДВИЖНОГО НОСИТЕЛЯ

Для проведения этого испытания требуется лишь небольшое количество образца.

Природа носителей, таких как бумага, агарозный гель, ацетат целлюлозы, крахмал, агароза, полиакриламид, смешанный гель, служит причиной появления ряда дополнительных факторов, влияющих на подвижность:

а) вследствие присутствия в неподвижном носителе каналов, кажущееся пройденное расстояние меньше реального пройденного расстояния;

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

в) нагревание в результате эффекта Джоуля может вызвать испарение жидкости с носителя, влекущее, вследствие капиллярного действия, движение раствора в направлении от краев к центру. Ионная сила в этом случае постепенно возрастает.

Скорость миграции, таким образом, зависит от четырех основных факторов: подвижности заряженной частицы, скорости электроэндоосмотического потока, скорости испарения жидкости и напряженности поля. В связи с этим необходимо проводить испытание в строго определенных экспериментальных условиях и, по возможности, использовать вещества сравнения.

Составляющими прибора для электрофореза являются:

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

– *электрофоретическая камера*. Как правило, это прямоугольная камера из стекла или жесткого полимера с двумя отдельными емкостями (анодной и катодной), содержащими раствор электролита. В каждую емкость камеры погружают электрод, например, платиновый или графитовый. Электроды подключают с помощью надлежащим образом изолированной цепи к соответствующему выходу источника питания (являются анодом и катодом). Для предотвращения переливания за счет сифонного эффекта, уровень жидкости в обеих емкостях поддерживают одинаковым. Электрофоретическая камера снабжена воздухонепроницаемой крышкой, которая поддерживает атмосферу насыщенную влажностью на протяжении испытания и уменьшает испарение жидкости. Может быть использовано защитное устройство, отключающее ток при снятии крышки. Если мощность тока, измеренная на носителе, превышает 10 Вт, носитель желательно охладить.

– *приспособление для установки носителя*:

– *электрофорез на плоском носителе (полоске)*. Каждый конец носителя, предварительно смоченного тем же электролитом, погружают в емкости с электродами, растягивают и фиксируют на соответствующем держателе, конструкция которого предотвращает диффузию электролита. Такими держателями могут быть горизонтальная рамка, перевернуто-V-образная подставка или однородная поверхность с точками контакта через подходящие интервалы.

– *гель-электрофорез*. Приспособление состоит из стеклянной пластинки (например, предметного стекла), на всю поверхность которой нанесен плотно прилегающий слой геля однородной толщины. Приведение в контакт геля и электролита осуществляют разными способами в зависимости от типа используемого прибора. Необходимо принимать меры для предупреждения конденсации влаги или высыхания плотного слоя.

– *измерительное устройство или средства детекции*.

Методика. Раствор электролита помещают в емкости с электродами. Носитель, соответствующим образом пропитанный раствором электролита, помещают в камеру в соответствии с инструкцией для используемого прибора. Устанавливают линию начала и наносят образец. Подают электрический ток в течение указанного времени. После отключения тока носитель вынимают из камеры, высушивают и проявляют.

4. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА КОЛОНКАХ ПОЛИАКРИЛАМИДНОГО ГЕЛЯ

При электрофорезе на колонках полиакриламидного геля неподвижной фазой является гель, приготовленный из смеси акриламида и N,N' -метиленбисакриламида. Колонки геля готовят с использованием трубок длиной 7,5 см и внутренним диаметром 0,5 см; во всех трубках используется один и тот же раствор.

Прибор. Прибор состоит из двух вертикально составленных одна над другой емкостей для буферного раствора, изготовленных из подходящего материала, например, поли(метилметакрилата). Каждая емкость снабжена платиновым электродом. Электроды присоединены к источнику тока, позволяющему проводить испытание при постоянном токе или при постоянном напряжении. В основании верхней емкости имеется ряд держателей, равноудаленных от электрода.

Методика. Как правило до начала полимеризации растворы дегазируют, гели используют сразу после приготовления. Готовят как предписано гелевую смесь, заливают ее в подходящие закрытые снизу стеклянные трубки до одинакового уровня, не достигая около 1 см от верхнего края, избегая попадания пузырьков воздуха в трубки. Смесь покрывают слоем *воды Р*, чтобы исключить контакт с воздухом, и оставляют для полимеризации. Гелеобразование обычно занимает около 30 мин и завершается, когда образуется четкая граница разделения поверхности геля и слоя воды. Водный слой удаляют. Нижнюю емкость наполняют предписанным буферным раствором. Стеклянные трубки открывают (снимают колпачки с нижнего конца) и вставляют в держатели верхней емкости так, чтобы дно трубок было погружено в буферный раствор нижней емкости. Трубки осторожно наполняют предписанным буферным раствором. Готовят испытуемые растворы и растворы сравнения, содержащие предписанный индикаторный краситель, и уплотняют их путем растворения в них, например, *сахарозы Р*. Приготовленные образцы наслаивают на поверхность геля, используя для каждого образца отдельную трубку. Верхнюю емкость наполняют тем же буферным раствором. Электроды подключают к источнику тока и проводят процесс электрофореза при заданной температуре и с использованием заданного постоянного напряжения или тока. Источник тока отключают, когда индикаторный краситель почти переходит в нижнюю емкость. Каждую трубку сразу вынимают из прибора и путем выдавливания извлекают гель. Определяют, как предписано, местоположение полос на электрофореграмме.*

5. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ В ПРИСУТСТВИИ ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТА НАТРИЯ (ДСН-ПААГ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ)

5-1. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ В ПРИСУТСТВИИ ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТА НАТРИЯ – ГЕЛИ С ОДНОРОДНОЙ КОНЦЕНТРАЦИЕЙ

Область применения. Электрофорез в полиакриламидном геле применяется для определения качественных параметров белков в биологических препаратах, контроля их чистоты и количественных определений.

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

Коммерчески доступные готовые гели и реактивы могут быть использованы вместо описанных в данной общей фармакопейной статье, при условии, что они дают эквивалентные результаты и отвечают требованиям раздела «Валидация испытания», приведенного ниже.

5-1-1. Свойства полиакриламидных гелей

Разделяющие свойства полиакриламидных гелей (ПААГ) обусловлены трехмерной сетью волокон и пор, появляющихся благодаря поперечным связям, образованным бифункциональным бис-акриламидом между соседними полиакриламидными цепями. Процесс полимеризации катализируется системой, генерирующей свободные радикалы, состоящей из аммония персульфата и *N,N,N',N'*-тетраметилэтилендиамина (ТЕМЭД).

При увеличении концентрации акриламида уменьшается эффективный размер пор в геле. Эффективный размер пор геля функционально определяется его просеивающими свойствами, то есть сопротивлением, которое он оказывает при миграции макромолекул. Существуют ограничения на концентрации акриламида, которые могут быть использованы. При высоких концентрациях акриламида гели становятся более ломкими и сложны в обращении. С уменьшением размера пор геля скорость миграции белка через гель уменьшается. Регулируя размер пор путем манипулирования концентрацией акриламида, можно оптимизировать разрешающую способность метода для конкретного белкового

продукта. Таким образом, свойства конкретного геля определяются процентным содержанием акриламида и бисакриламида в растворах для приготовления геля.

Кроме состава геля, важным компонентом электрофоретической подвижности является состояние белка. Для белков электрофоретическая подвижность зависит от значения pK заряженных групп и размера молекулы. На подвижность влияют тип, концентрация и pH буферного раствора, температура и напряжение электрического поля, а также природа материала носителя.

5-1-2. Электрофорез в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях

Данный метод, приведенный в качестве примера, позволяет анализировать мономеры полипептидов с молекулярной массой от 14 000 до 100 000 дальтон. Возможно расширение границ диапазона молекулярных масс с использованием различных способов (например, путем использования градиентных гелей, определенных буферных систем). Например, трицин-ДСН гели, содержащие трицин в качестве отстающего иона в разделяющем буферном растворе для электрофореза (вместо глицина, как в методе, описанном ниже), позволяют разделять очень маленькие белки и пептиды от менее 10 000 до 15 000 дальтон.

Глицин-ДСН-ПААГ электрофорез в денатурирующих условиях является наиболее распространенным методом электрофореза, который используется для оценки качества белков в фармацевтической продукции и описан ниже в качестве примера метода. Как правило аналитический электрофорез белков проводят в ПААГ в условиях, обеспечивающих их диссоциацию на отдельные полипептидные субъединицы и минимизирующих агрегацию. Чаще всего перед нанесением на гель белки подвергают диссоциации нагреванием с сильным анионным детергентом – натрия додецилсульфатом (ДСН). Денатурированные полипептиды связываются с ДСН, превращаясь в отрицательно заряженные частицы с постоянным отношением заряда к массе независимо от типа белка. Поскольку количество связанного ДСН почти всегда пропорционально молекулярной массе полипептида и не зависит от его последовательности, ДСН-полипептидные комплексы мигрируют в ПААГ со скоростью, зависящей от размера полипептида.

Электрофоретическая подвижность полученных детергент-полипептидных комплексов находится в такой же функциональной взаимосвязи с их молекулярными массами. Миграция ДСН-комплексов происходит предсказуемым образом в направлении к аноду, при этом комплексы с низкими молекулярными массами движутся быстрее, чем комплексы с большими молекулярными массами. Следовательно, молекулярная масса белка может быть оценена по его относительной подвижности в калиброванном ДСН-ПААГ, а интенсивность отдельной полосы по сравнению с интенсивностью других нежелательных полос в таком геле может являться критерием чистоты белка.

Модификации полипептидной цепи, например, *N*- или *O*-связанное гликозилирование, может влиять на кажущуюся молекулярную массу белка, поскольку ДСН не связывается с углеводным компонентом в такой же степени, как с полипептидным. В этом случае постоянное отношение заряда к молекулярной массе не сохраняется.

В зависимости от степени гликозилирования и других посттрансляционных модификаций кажущаяся молекулярная масса белков может не отражать истинную массу полипептидной цепи.

Восстанавливающие условия. Полипептидные субъединицы и трехмерная структура белков часто поддерживаются благодаря присутствию дисульфидных связей. При анализе с помощью ДСН-ПААГ электрофореза в восстанавливающих условиях происходит разрушение такой структуры белков путем восстановления дисульфидных связей. Полная денатурация и диссоциация белков обработкой 2-меркаптоэтанолом или дитиотреитолом (ДТТ) приводит к разворачиванию полипептидной цепи и последующему комплексообразованию с ДСН. В этих условиях молекулярную массу полипептидных субъединиц обоснованно можно рассчитать с помощью линейной регрессии (или, для

получения более точного результата, нелинейной регрессии) при использовании подходящих стандартов молекулярных масс.

Невосстанавливающие условия. Для ряда испытаний полная диссоциация белка на полипептидные субъединицы нежелательна. В отсутствии обработки восстанавливающими агентами, такими, как 2-меркаптоэтанол или ДТТ, дисульфидные ковалентные связи остаются неповрежденными, сохраняя олигомерную форму белка. Олигомерные ДСН-белковые комплексы мигрируют медленнее, чем их ДСН-полипептидные субъединицы. Кроме того, невосстановленные белки могут не быть целиком насыщены ДСН и, соответственно, могут не связывать детергент в постоянном массовом отношении. Более того, дисульфидные связи внутри цепей поддерживают форму молекулы, как правило уменьшая радиус Стокса молекулы и, следовательно, уменьшая кажущуюся молекулярную массу M_r . По этой причине определение молекулярной массы таких молекул с использованием ДСН-ПААГ электрофореза является менее стандартизованным, чем определение молекулярной массы полностью денатурированных полипептидных субъединиц, так как необходимо, чтобы и стандарты, и анализируемые белки имели одинаковые конфигурации для достоверного сравнения.

5-1-3. Особенности электрофореза в геле с прерывистой буферной системой

Наиболее широко применяемый электрофоретический метод определения параметров сложных белковых смесей использует прерывистую буферную систему, включающую два смежных, но разных геля: разрешающий или разделяющий (нижний) гель и концентрирующий (верхний) гель. Эти два геля отличаются размерами пор, рН и ионной силой. Кроме того, в геле и электродных буферных растворах используются разные подвижные ионы. Благодаря наличию прерывистости буферной системы происходит концентрирование больших объемов образца в концентрирующем геле, что улучшает разрешающую способность метода. После подключения источника тока проявляется падение напряжения на образце, которое заставляет белки проникать в концентрирующий гель. Глицинат-ионы из электродного буферного раствора двигаются вслед за белками в концентрирующий гель. Быстро образуется движущаяся граница между высокоподвижными хлорид-ионами и малоподвижными глицинат-ионами. Образуется локализованный высоковольтный градиент между фронтами высокоподвижных и малоподвижных ионов, в результате чего ДСН-белковые комплексы формируют тонкую зону и мигрируют между областями хлорид-иона и глицинат-иона.

В общем случае, независимо от высоты нанесенного образца, все ДСН-белковые комплексы концентрируются в очень узкую область и двигаются по направлению к разделяющему гелю в виде четко определенной тонкой зоны с высокой плотностью белка. Крупнопористый концентрирующий гель не замедляет миграцию большинства белков и, в основном, служит антиконвекционной средой. На границе раздела концентрирующего и разделяющего гелей происходит резкое возрастание эффекта замедления ДСН-белковых комплексов вследствие ограниченного размера пор разделяющего геля и прерывистости буферного раствора, что также способствует фокусированию. В разделяющем же геле движение белков продолжает замедляться вследствие ситовых (разделяющих) свойств матрицы. Глицинат-ионы догоняют ДСН-белковые комплексы, которые далее передвигаются в пространстве с равномерным рН, образованным трис(гидроксиметил)аминометаном и глицином. Молекулярно-ситовые свойства фазы приводят к разделению ДСН-полипептидных комплексов в соответствии с их молекулярными массами.

5-1-4. Приготовление вертикальных прерывисто-буферных ДСН-полиакриламидных гелей

Раздел описывает приготовление гелей с использованием специального оборудования. Это не относится к готовым полиакриламидным гелям. В случае применения

готовых гелей или любого другого коммерчески доступного оборудования необходимо руководствоваться инструкциями производителя.

Рекомендуется использовать коммерчески доступные реактивы соответствующей чистоты. В ином случае, а также при использовании недостаточно очищенных реактивов, проводят предварительную обработку. Например, раствор, имеющий такую степень загрязнения, что его необходимо фильтровать, должен быть также деионизирован с использованием ионообменной смолы смешанного типа (катионообменной/анионообменной) для удаления акриловой кислоты и других заряженных продуктов разложения. Растворы акриламида/бисакриламида и персульфат в твердом состоянии остаются стабильными в течение длительного периода при условии хранения в соответствии с рекомендациями производителя.

Сборка кассет, формирующих гель. Две стеклянные пластинки (например, размером 10 см × 8 см), политетрафторэтиленовую гребенку, две прокладки (два спейсера) и силиконовые трубки (например, диаметром 0,6 мм и длиной 35 см) моют с использованием мягких моющих средств и тщательно ополаскивают водой, а затем безводным этанолом и высушивают при комнатной температуре. Прокладки и трубки смазывают несиликоновым смазочным материалом. Прокладки укладывают вдоль двух коротких сторон стеклянных пластин на расстоянии 2 мм от их краев и 2 мм от длинной стороны, являющейся дном геля. Используя одну прокладку в качестве основы, начинают укладывать трубку. Осторожно загибают трубку к низу прокладки и протягивают вдоль длинной стороны стеклянной пластинки. Придерживая трубку вдоль длинной стороны пластинки, снова загибают трубку и протягивают ее по короткой стороне стеклянной пластинки, используя прокладку в качестве направляющей. Накрывают, тщательно выравнивая края, другой стеклянной пластинкой, плотно прижимая кассету руками. Устанавливают по два зажима на две короткие стороны кассеты. Осторожно устанавливают четыре зажима на длинную сторону кассеты геля, формируя дно кассеты. Необходимо удостовериться, чтобы трубка проходила вдоль края стеклянной пластинки и нигде не выдавливалась при размещении зажимов. Кассета готова для заливания гелем.

Приготовление геля. В случае приготовления прерывистого буферного ДСН-ПААГ рекомендуется сначала залить разделяющий гель, дождаться его полимеризации, а затем залить концентрирующий гель, поскольку гели различаются содержанием акриламида-бисакриламида, буферным раствором и рН.

Приготовление разделяющего геля. В конической колбе готовят подходящий объем раствора с необходимой концентрацией акриламида для формирования разделяющего геля, используя соотношения, приведенные в таблице 2.1.2.30.-1. Компоненты смешивают в указанной последовательности. При необходимости перед добавлением раствора аммония персульфата и ТЕМЭДа раствор фильтруют под вакуумом через ацетатцеллюлозную мембрану (диаметр пор 0,45 мкм); раствор выдерживают под вакуумом, взбалтывая фильтрационное приспособление до окончания образования в растворе пузырьков. Затем добавляют соответствующее количество раствора аммония персульфата и ТЕМЭДа, как указано в таблице 2.1.2.30.-1, взбалтывают и сразу заливают в пространство между двумя пластинками кассеты. Оставляют необходимое место для концентрирующего геля (длина зубцов гребенки плюс 1 см). Используя заостренную стеклянную пипетку, осторожно наслаивают изобутанол, насыщенный водой. Гель выдерживают в вертикальном положении при комнатной температуре до полимеризации геля.

Таблица 2.1.2.30.-1. – *Приготовление разделяющего геля*

Компоненты раствора	Объем компонента (мл) на 1 кассету геля вместимостью							
	5	10	15	20	25	30	40	50
6 % акриламид								
<i>Вода Р</i>	2,6	5,3	7,9	10,6	13,2	15,9	21,2	26,5
Раствор акриламида ⁽¹⁾	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	8,0	10,0

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

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

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

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

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

(5) ТЕМЭД: тетраметилэтилендиамин Р.

Приготовление концентрирующего геля. После завершения полимеризации (около 30 мин) сливают изобутанол и промывают верхнюю поверхность геля несколько раз водой для удаления нанесенного изобутанола и неполимеризованных излишков акриламида. С

верхней поверхности геля сливают как можно больше воды, а затем удаляют остатки воды при помощи кончика бумажной салфетки.

В конической колбе готовят подходящий объем раствора с необходимой концентрацией акриламида для формирования геля, используя значения, приведенные в таблице 2.1.2.30.-2. Компоненты смешивают в указанной последовательности. При необходимости перед добавлением раствора аммония персульфата и ТЕМЭДа раствор фильтруют под вакуумом через ацетатцеллюлозную мембрану (диаметр пор 0,45 мкм); раствор выдерживают под вакуумом, встряхивая фильтрационное приспособление до окончания образования в растворе пузырьков. Прибавляют соответствующее количество раствора аммония персульфата и ТЕМЭДа, как указано в таблице 2.1.2.30.-2, взбалтывают и сразу заливают в пространство между двумя стеклянными пластинками кассеты прямо на поверхность ранее запolyмеризованного разделяющего геля. В раствор концентрирующего геля сразу вставляют чистую политетрафторэтиленовую гребенку, избегая попадания пузырьков воздуха. Добавляют еще раствор концентрирующего геля до полного заполнения пространства между гребенкой и разделяющим гелем. Гель выдерживают в вертикальном положении при комнатной температуре до полимеризации геля.

Таблица 2.1.2.30.-2. – *Приготовление концентрирующего геля*

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

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

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

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

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

(5) ТЕМЭД: тетраметилэтилендиамин Р.

Приготовление образцов. Если иное не указано в частной фармакопейной статье, образцы могут быть приготовлены приведенными ниже способами.

Приготовление образцов (невосстанавливающие условия). Смешивают равные объемы смеси, состоящей из воды Р и испытуемого препарата или препарата сравнения, и концентрированного буферного раствора для приготовления образцов при электрофорезе в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия Р.

Приготовление образцов (восстанавливающие условия). Смешивают равные объемы смеси, состоящей из воды Р и испытуемого препарата или препарата сравнения, и концентрированного буферного раствора для приготовления образцов в восстановительных условиях при электрофорезе в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия Р, содержащего 2-меркаптоэтанол (или ДТТ) в качестве восстановителя.

Концентрация, указанная в частной фармакопейной статье, может варьировать в зависимости от белка и способа окрашивания.

Обработка образца: образец выдерживают в кипящей водяной бане в течение 5 мин или нагревательном блоке при температуре 100 °С, затем охлаждают. Температура и время,

указанные в частной фармакопейной статье могут варьировать в связи с возможным расщеплением белка, которое может произойти при термической обработке.

Установка геля в приборе для электрофореза и электрофоретическое разделение. После завершения полимеризации (около 30 мин) политетрафторэтиленовую гребенку осторожно удаляют. Лунки незамедлительно промывают водой или *буферным рабочим раствором для электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия Р* для удаления неполимеризованного акриламида. При необходимости выравнивают перегородки концентрирующего геля с помощью тупой иглы для подкожных инъекций, прикрепленной к шприцу. Снимают зажимы с одной короткой стороны, осторожно вытягивают трубку и возвращают зажимы на место. Повторяют эти операции с другой короткой стороны. Удаляют трубку со дна геля. Помещают гель в прибор для электрофореза. Верхнюю и нижнюю емкости наполняют буферным раствором для электрофореза. Удаляют все пузырьки, образующиеся на дне геля между двумя стеклянными пластинками. Для этих целей лучше всего использовать изогнутую иглу, прикрепленную к шприцу. Никогда не следует проводить предварительный электрофорез до нанесения образцов, так как это приведет к нарушению прерывистости буферной системы. Перед нанесением образцов осторожно ополаскивают каждую лунку *буферным рабочим раствором для электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия Р*. Готовят испытуемый раствор и раствор сравнения в рекомендованном буферном растворе для образцов и обрабатывают, как указано в частной фармакопейной статье. Наносят необходимое количество каждого раствора в лунки концентрирующего геля.

Электрофорез проводят в условиях, рекомендованных производителем оборудования. Производители оборудования для ДСН-ПААГ электрофореза могут предоставлять гели различной площади и толщины. Время проведения электрофореза и значения тока или напряжения могут варьировать для достижения оптимального разделения. Необходимо удостовериться, что фронт красителя мигрирует в разделяющий гель. Когда краситель достигает нижнего края геля, электрофорез прерывают. Кассету с гелем вынимают из прибора и осторожно разделяют стеклянные пластины. Удаляют прокладки, отрезают и выбрасывают концентрирующий гель и немедленно начинают окрашивание оставшегося геля.

5-2. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ В ПРИСУТСТВИИ ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТА НАТРИЯ – ГЕЛИ С ГРАДИЕНТНОЙ КОНЦЕНТРАЦИЕЙ

Градиентные гели (разделяющие гели) готовят с увеличением концентрации акриламида в направлении сверху вниз. Для приготовления градиентных гелей требуется устройство для формирования градиента. Могут быть применимы готовые градиентные гели, используемые в соответствии с рекомендацией производителя.

Градиентные гели обладают некоторыми преимуществами, так как они позволяют разделять белки, которые совместно мигрируют в гелях с фиксированной концентрацией акриламида. При электрофорезе белки мигрируют до тех пор, пока размер пор не препятствует их дальнейшему продвижению и способствует накоплению, которое приводит к появлению более четких зон. Как показано в таблице 2.1.2.30.-3, градиентные гели также позволяют разделять белки с более широким диапазоном молекулярных масс по сравнению с гелями с одной фиксированной концентрацией.

В таблице приведены рекомендованные концентрации акриламида, использованные при создании линейных градиентных гелей, для соответствующих диапазонов молекулярных масс белка. Необходимо учитывать, что могут быть приготовлены другие формы градиента (например, вогнутая) для специального применения.

Таблица 2.1.2.30.-3. – *Разделяющая способность гелей с линейным градиентом концентрации**

Акриламид (%)	Диапазон молекулярных масс белка (кДа)
5–15	20–250
5–20	10–200
10–20	10–150
8–20	8–150

Градиентные гели также применяются для определения молекулярной массы и степени чистоты белка.

5-3. ОБНАРУЖЕНИЕ БЕЛКОВ В ГЕЛЯХ

Ниже детально описаны наиболее широко применяемые методы окрашивания белков раствором Кумасси и серебром. Могут быть использованы и другие коммерчески доступные красители, методы обнаружения и наборы. Например, флуоресцентные красители визуализируются флуоресцентным устройством для получения изображений и часто обеспечивают линейную зависимость аналитического сигнала в широком диапазоне концентраций белка, часто в пределах нескольких порядков, в зависимости от природы белка.

Окрашивание раствором Кумасси позволяет определять приблизительно от 1 мкг до 10 мкг белка в одной полосе. Окрашивание серебром – самый чувствительный метод окрашивания белков, при этом могут быть обнаружены полосы, содержащие от 10 нг до 100 нг белка. Эти цифры считаются надежными в контексте данных гелей. Иногда в литературе указывается чувствительность окрашивания серебром на 1 или 2 порядка выше.

Окрашивание раствором Кумасси обеспечивает более линейный сигнал, чем окрашивание серебром; однако сигнал и диапазон зависят от природы белка и времени выдерживания с красителем. Воспроизводимость результатов при окрашивании раствором Кумасси и серебром может ухудшаться, если окрашивание прекращают из субъективных соображений, то есть в момент, когда оно кажется достаточным. Очень важно использовать динамические диапазоны белков сравнения, так как они помогают оценить чувствительность метода и линейность результатов при проведении испытания. Все стадии окрашивания геля выполняются в одноразовых перчатках, при комнатной температуре, при осторожном перемешивании (например, на платформе орбитального шейкера) и с использованием любого удобного контейнера.

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

Гель обесцвечивают большим объемом *обесцвечивающего раствора R*. Обесцвечивающий раствор меняют несколько раз до четкого проявления окрашенных белковых полос на прозрачном фоне. Чем тщательнее обесцвечен гель, тем меньшее количество белка можно обнаружить данным методом. Обесцвечивание можно ускорить добавлением в *обесцвечивающий раствор R* нескольких граммов анионообменной смолы или маленького кусочка пористого материала.

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

Окрашивание серебром. Гель погружают в большой объем *фиксирующего раствора R* и выдерживают в течение 1 ч. Фиксирующий раствор сливают, добавляют новую порцию фиксирующего раствора, выдерживают в течение не менее 1 ч или, если возможно, в течение ночи. Затем фиксирующий раствор сливают и гель промывают большим объемом *воды R* в течение 1 ч. Далее гель выдерживают в 1 % (об/об) растворе

глутарового альдегида P в течение 15 мин, дважды промывают большим объемом воды P , каждый раз в течение 15 мин, помещают в свежеприготовленный реактив серебра нитрата P и выдерживают в течение 15 мин в темном месте. Затем трижды промывают большим объемом воды P , каждый раз в течение 5 мин. Гель выдерживают в растворе проявителя P в течение около 1 мин до достаточного окрашивания. Проявление останавливают, помещая гель в блокирующий раствор P на 15 мин. Ополаскивают гель водой P .

5-4. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Гели фотографируют или сканируют пока они еще мокрые или после соответствующей процедуры сушки. В настоящее время доступны системы для сканирования гелей, оснащенные программным обеспечением для анализа данных и позволяющие незамедлительно фотографировать и анализировать мокрые гели.

В зависимости от используемого метода окрашивания обработка гелей незначительно отличается. Окрашенные раствором Кумасси гели после стадии обесцвечивания выдерживают в растворе 100 г/л глицерина P в течение не менее 2 ч (возможно выдерживание в течение ночи). При окрашивании серебром на конечной стадии отмывания гели выдерживают в растворе 20 г/л глицерина P в течение 5 мин.

Высушивание окрашенных ДСН-ПААГ является одним из методов, применяемых для долговременного документирования. Этот метод часто приводит к растрескиванию геля во время высушивания между целлюлозными пленками.

Два листа пористой целлюлозной пленки погружают в воду P и выдерживают в течение 5–10 мин. Растягивают один из листов пленки на рамке для высушивания, на растянутую целлюлозную пленку аккуратно помещают пропитанный в растворе гель, удаляют все случайно попавшие воздушные пузыри, заливают вокруг граней геля несколько миллилитров воды P , помещают второй лист пленки сверху и снова удаляют все воздушные пузыри, заканчивают сборку рамки для сушки геля и помещают ее в сушильный шкаф или оставляют при комнатной температуре до полного высыхания геля.

5-5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ

Молекулярные массы белков определяют, сравнивая их подвижность с подвижностью нескольких маркерных белков с известной молекулярной массой. Для калибровки гелей доступны подобранные для получения равномерного окрашивания смеси из предварительно окрашенных и неокрашенных белков с точно известными молекулярными массами. Доступны смеси для различных диапазонов молекулярных масс. Концентрированные исходные растворы белков с известной молекулярной массой разводят соответствующим буфером образца и наносят на тот же гель, что и испытуемый образец.

Сразу после проведения электрофореза отмечают положение полосы красителя бромфенолового синего, которая соответствует передней кромке электрофоретического ионного фронта. Это можно сделать надрезом края геля или проколом в зоне окрашенного геля иглой, предварительно смоченной в черную тушь или другой подходящий контрастный краситель. После окрашивания геля измеряют расстояние миграции для каждой белковой полосы (маркеров и определяемых) от вершины разделяющего геля. Вычисляют отношение расстояния миграции каждой полосы белка к расстоянию миграции, пройденному красителем. Нормализованные расстояния миграции, вычисленные таким образом, называются относительными подвижностями белков (относительно фронта красителя) и обозначаются, как R_F . Строят график зависимости логарифма относительных молекулярных масс стандартных образцов белков от полученных значений R_F . Неизвестные молекулярные массы определяют с помощью метода линейной регрессии (или, для получения более точного результата, нелинейной регрессии) или интерполяцией кривых зависимости $\lg M_r$ от R_F , если полученные значения располагаются вдоль приблизительно линейной части графика.

5-6. ВАЛИДАЦИЯ ИСПЫТАНИЯ

Результаты испытания не признаются достоверными, если требуемый диапазон разрешения геля не подтвержден распределением маркерных белков с известными молекулярными массами, например, на протяжении 80 % длины геля. Разделение, полученное для маркерных белков, должно иметь линейную зависимость $\lg M_r$ от R_f . Если график имеет сигмоидную форму, то в расчетах могут быть использованы только данные участка линейной области кривой. В частной фармакопейной статье могут быть указаны дополнительные требования к валидации методики в зависимости от испытуемого образца.

Чувствительность также должна быть валидирована. Для проверки пригодности системы может применяться контрольный образец белка сравнения с концентрацией, соответствующей необходимому пределу, анализируемый параллельно с испытуемыми образцами.

5-7. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРИМЕСЕЙ

ДСН-ПААГ электрофорез часто используется при проведении испытания на предельное содержание примесей. В случае, если содержание примесей определяется методом нормализации по отношению к основной полосе с использованием денситометрического интегрирования или путем анализа изображений, линейность сигнала должна быть валидирована. Необходимо учитывать, что, как указано в вводной части раздела 5-3 данной общей фармакопейной статьи, в зависимости от метода обнаружения и белка диапазон линейности может варьировать, но он может быть определен при каждом анализе с использованием одного или более контрольных образцов, содержащих белки в подходящем диапазоне концентраций.

В тех случаях, когда предельное содержание примесей указано в частной фармакопейной статье, в испытании необходимо использовать раствор сравнения, соответствующий этому уровню содержания примеси, приготовленный разведением испытуемого раствора. Например, если предельное содержание примесей составляет 5 %, необходимо приготовить раствор сравнения путем разведения испытуемого раствора в соотношении 1:20. На электрофореграмме испытуемого раствора ни одна полоса, кроме основной, не должна быть интенсивнее полосы, полученной на электрофореграмме раствора сравнения.

В валидированных условиях содержание примесей может быть количественно определено методом нормализации по отношению к основной полосе с использованием денситометрического интегрирования или путем анализа изображений.