

## **Метод 6 (Флуорометрический метод с о-фталальдегидом)**

Метод основан на дериватизации белка о-фталальдегидом, который реагирует с первичными аминогруппами белка (N-концевая аминокислота и ε-аминогруппа остатков лизина) с последующим измерением флуоресценции полученного комплекса. Чувствительность количественного определения может быть увеличена гидролизом белка перед добавлением о-фталальдегида. Гидролиз делает α-аминогруппу, входящую в структуру аминокислот, доступной для взаимодействия с фталальдегидным реактивом. Метод является высокочувствительным и требует небольшого количества белка.

Определению мешают буферные растворы, содержащие первичные амины, такие как трис(гидроксиметил)аминометан, и аминокислоты, которые взаимодействуют с о-фталальдегидом. Аммиак в больших концентрациях также взаимодействует с о-фталальдегидом. Флуоресценция, полученная при взаимодействии аминов с о-фталальдегидом, может быть нестабильной. Использование автоматизированных методик для стандартизации данного метода позволяет повысить точность и воспроизводимость определения.

*Стандартные растворы.* Растворяют соответствующий стандартный образец белка в 0,9 % растворе натрия хлорида. Части полученного раствора разводят 0,9 % раствором натрия хлорида для получения не менее пяти стандартных растворов с концентрациями в интервале от 10 мкг/мл до 200 мкг/мл. Доводят значение рН раствора до 8,0 - 10,5 перед добавлением фталальдегидного реактива.

*Испытуемый раствор.* Готовят раствор испытуемого лекарственного средства в 0,9 % растворе натрия хлорида с концентрацией белка, находящейся в пределах интервала концентраций стандартных растворов. Доводят значение рН раствора до 8,0-10,5 перед добавлением фталальдегидного реактива.

*Контрольный раствор.* Используют 0,9 % раствор натрия хлорида.