

Уважаемые коллеги!

Мы рады сообщить Вам, что мы возобновили выпуск нашего бюллетеня, посвященного ЛАЛ-тесту. В этом номере мы решили рассмотреть вопросы, с которыми к нам наиболее часто обращаются в последнее время.

Один из них - это проверка на бактериальные эндотоксины вспомогательных веществ. Поэтому первую статью в новом номере мы посвятили очень востребованной в последнее время теме: контролю качества вспомогательных веществ по показателю «Бактериальные эндотоксины».

Еще один актуальный в настоящее время вопрос – это проверка воды для гемодиализа. Так как многие диализные центры не проводят проверку воды самостоятельно, предпочитая отдавать ее в независимые лаборатории, встает вопрос транспортировки и хранения образцов до анализа. Во второй статье данного номера мы рассматриваем различные типы контейнеров для транспортировки и хранения воды для гемодиализа.

Входной контроль качества вспомогательных веществ по показателю «Бактериальные эндотоксины»

Ситников А.Г.

Готовые лекарственные формы, как правило, кроме активной субстанции содержат и вспомогательные вещества. Это стабилизаторы, консерванты, поверхностно активные вещества, вещества для коррекции рН, и т.д. Современная концепция планируемого качества (quality by design) предполагает, что качество готовой формы обеспечивается правильно организованным производством и контролем качества всех компонентов, составляющих готовую форму. Очевидно, что производитель готовой лекарственной формы не может игнорировать вопрос содержания эндотоксинов в тех вспомогательных веществах, которые входят в состав готовой формы, ведь он отвечает за качество конечного продукта.

Проблема заключается в том, что для вспомогательных веществ нет устоявшихся норм по содержанию бактериальных эндотоксинов. Рекомендации по поводу содержания эндотоксинов для этой группы препаратов сложно найти в фармакопеях за несколькими исключениями. Есть, например, нормы на натрия хлорид или маннит. И то только потому, что они одновременно могут быть и активными субстанциями, и вспомогательными веществами.

Вопрос контроля эндотоксинов во вспомогательных веществах рассматривается в

литературе. Пожалуй, наиболее интересны концепции, предложенные Дж. Купером (Cooper J.F.) и К. Вильямсом (Williams K.L.). Если подход, предложенный Купером, вполне может претендовать на универсальность, то идеи, изложенные Вильямсом, в большей степени привязаны к конкретным ситуациям.

В настоящем номере мы рассмотрим подход, предложенный Джеймсом Купером. Как мы отметили, подход универсальный. Логика его рассуждений базируется на том допущении, что вспомогательные вещества являются частью инъекционных препаратов малого объема (*Small Volume Parenterals, USP*). Фармакопея США относит к этой группе все препараты, максимальная разовая доза которых не превышает 100 мл. Можно считать эти 100 мл разовой терапевтической дозой, в которой должно быть не более 350 ЕЭ или не более 3,5 ЕЭ в 1 мл.

Для расчётов допустимых пределов содержания эндотоксина необходимо знать максимальную концентрацию вспомогательного вещества в готовой форме, т.е. сколько миллиграмм вспомогательного вещества может содержаться в 1 мл готовой формы. Это, наверное, наиболее сложная часть расчетов, так как концентрация может очень сильно варьировать в зависимости от состава готовой формы. Тут автор ссылается на очень интересную работу, в которой приведен статистический анализ содержания вспомогательных веществ в разных лекарственных препаратах, и определены их максимально возможные концентрации (*Powell M.T., Nguyen T., Baloian L. Compendium of excipients for parenteral formulations.*). Работа очень объемная,

охватывающая множество лекарственных форм, сведенных в таблицу. Ниже приведен фрагмент этой таблицы:

EXCIPIENTS FOR PARENTERAL FORMULATIONS						
Excipient	Conc. %W/V	pH where applicable	Administration Route	Drug Name	Brand Name	Manufacturer
glycine			IM - intramuscular	combination of refined tetanus & diphtheria toxoids	Tetanus & Diphtheria Toxoids Adsorbed (Adult)	Lederle Laboratories
glycine			IM - intramuscular	refined tetanus toxoid	Tetanus Toxoid Adsorbed, aluminum	Lederle Laboratories
glycine			IM - intramuscular	diphtheria & tetanus toxoids & Pertussis Vaccine	Tri-Immunol	Lederle Laboratories
glycine	-0.09		ID - intradermal	Mumps Skin Test Antigen suspension killed	MSTA™	Connaught Laboratories, Inc.
glycine	0.034 - 0.34	-7.4	SC - subcutaneous	somatropin (dNA origin) for injection	Nutropin®	Genentech, Inc.
glycine	0.5	-7.5	IM - intramuscular	somatropin (dNA origin) for injection	Humatrope®	Eli Lilly & Company
glycine			IM - intramuscular	combination of refined diphtheria & tetanus toxoids	Diphtheria & Tetanus Toxoids Adsorbed	Lederle Laboratories
glycine			IM - intramuscular	Diphtheria and Tetanus Toxoids and Acellular	Acel-Imune	Lederle Laboratories
glycine	2.25	-6.8	IV - intravenous	horse gamma globulin	Atgam Sterile Solution	The Upjohn Company
glycine	2.25	6.8 ± 0.4	IV - intravenous	immune globulin (human) primarily IgG	Gammas®	Armour Pharmaceutical
glycine	2.25		IM - intramuscular	Rho (D) immune globulin human	Gamulin® Rh	Armour Pharmaceutical
glycine	2.25		IM - intramuscular	Rho(D) immune globulin (human)	Mini-gamulin™ Rh	Armour Pharmaceutical

В таблице слева направо приведены: название вспомогательного вещества, его концентрация в готовой лекарственной форме, способ введения лекарственного препарата, название лекарственного средства, бренд, производитель.

По каждому вспомогательному веществу из списка можно выбрать самую большую из используемых концентраций и использовать ее для расчета допустимого содержания эндотоксинов. Соответственно, расчет делают по формуле:

$$\frac{\text{Допустимое содержание эндотоксинов}}{\text{Конц. мг/мл}} = \frac{3,5 \text{ ЕЭ/мл}}{\text{Конц. мг/мл}}$$

Например,

Полисорбат 80 – максимальная из возможных концентрация 10 мг/мл:

$$\frac{3,5 \text{ ЕЭ/мл}}{10 \text{ мг/мл}} = 0,35 \text{ ЕЭ/мг}$$

Купер считает, что это значение следует еще разделить на четыре, чтобы обеспечить фактор безопасности, равный четырем. Тогда $0,35 \text{ ЕЭ/мл} \div 4 = 0,0875$, значение округляется до 0,1 мг/мл.

Правда этому правилу автор следует не всегда. Просто значения могут оказаться такими низкими, что проверка будет невозможна.

Полный список вспомогательных веществ, используемых для производства парентеральных лекарственных препаратов с рекомендованными значениями содержания эндотоксинов, приведен в Таблице 1.

Особая ценность исследования Купера заключается в том, что он проверил реализуемость предложенной концепции и расчетных значений содержания эндотоксинов для каждого из препаратов. Препараты проверялись кинетическим турбидиметрическим методом с чувствительностью 0,05 ЕЭ/мл. Автор подчеркивает, что такая

чувствительность была выбрана специально, это наиболее часто используемая чувствительность метода (0,05 или 0,03 ЕЭ/мл). Таким образом, он хотел подчеркнуть, что рутинную проверку большинства вспомогательных веществ можно проводить привычными методами, не прибегая к высокочувствительным его модификациям.

В таблице указаны неингибирующие концентрации в мг/мл и, исходя из этого, рассчитаны те минимальные концентрации эндотоксина, которые могут быть определены в методе с чувствительностью 0,05 ЕЭ/мл. Так, например, сахараза применяется в концентрациях 50-200 мг/мл

$$\frac{3,5 \text{ ЕЭ/мл}}{200 \text{ мг/мл}} = 0,0175 \text{ ЕЭ/мг}$$

Делим полученное значение на 4, получаем значение 0,004 ЕЭ/мг. Это уровень тревоги для сахарозы. Из таблицы видно, что сахараза может быть проверена в концентрации 25 мг/мл. Если мы проверяем раствор с этой концентрацией методом с чувствительностью 0,05 ЕЭ/мл и ничего не обнаруживаем (или обнаруживаем 0,05 ЕЭ) в 25 мг/мл, то в одном миллиграмме содержание эндотоксина будет меньше (или равно) 0,002 ЕЭ/мг

$$\frac{0,05 \text{ ЕЭ/мл}}{25 \text{ мг/мл}} = 0,002 \text{ ЕЭ/мг}$$

Таким образом, при установленной норме 0,004 ЕЭ/мг методом с чувствительностью 0,05 ЕЭ/мл может быть обнаружена концентрация эндотоксина 0,002 ЕЭ/мг, в два раза меньшая допустимой. Следовательно, препарат может быть проверен предложенным методом.

Из таблицы следует, что все препараты могут быть проверены на соответствие установленным значениям, а многие даже на более низкие содержания эндотоксинов.

Правда, по результатам проверки в рекомендованные значения содержания эндотоксинов для некоторых препаратов были внесены корректировки, например, расчетное значение для глицерина должно было бы составлять

$$\frac{3,5 \text{ ЕЭ/мл}}{150 \text{ мг/мл}} = 0,023 \text{ ЕЭ/мг}$$

Но практически глицерин в концентрациях выше 1,0 мг/мл ингибирует реакцию. В концентрации 1 мг/мл расчетная концентрация эндотоксина составляет 0,023 ЕЭ/мл, а предел определения содержания бактериальных эндотоксинов в методе составляет 0,05 ЕЭ/мл, т.е. определение невозможно. Поэтому для глицерина значение содержания эндотоксинов скорректировано до 0,2 ЕЭ/мг.

Вопрос реального содержания эндотоксинов в вспомогательных веществах в значительной

степени зависит от их происхождения. Вещества, полученные из природного сырья, например, сахара или маннит, как правило, могут содержать эндотоксины и/или гликаноподобные вещества. Еще один пример – желатин, он настолько часто загрязнен эндотоксинами, что приходится просматривать несколько партий, чтобы найти серию, в которой содержание эндотоксина менее установленного значения в 0,7 ЕЭ/мг. Карбоксиметилцеллюлоза способна вызывать альтернативную реакцию, идущую по гликановому пути. Поэтому проверка этого препарата, как правило, требует применения блокаторов гликанов, чтобы избежать ложноположительной реакции.

Большинство же вспомогательных веществ – продукты химического синтеза и доступны в градациях ХЧ или фармацевтического качества с сертификатами соответствия. Поэтому в большинстве случаев проблем с содержанием эндотоксинов в них не возникает.

В тоже время, проверка многих вспомогательных веществ может быть сопряжена с техническими сложностями. Многие из них выпускаются в виде порошков, они могут быть практически не растворимы в воде, наконец, часто значение рН этих препаратов требует коррекции. Такие вспомогательные вещества как фенол, кислоты или слабые щелочи требуют обязательной нейтрализации, соответственно, щелочью или кислотой и последующего разведения водой. Процедуру проверки следует валидировать, причем под конкретный ЛАЛ-реактив, поскольку собственная буферная емкость реактива также влияет на ход реакции.

Растворимость вспомогательных веществ также имеет большое значение, поскольку анализ идет в водном растворе. Вспомогательные вещества, которые не растворяются в воде, можно растворять в органических растворителях и затем разводить водой до концентраций, в которых сам растворитель уже не мешает реакции. Так, наиболее часто используются в качестве растворителей этиловый спирт и диметилсульфоксид (ДМСО). Их в свою очередь надо разводить до концентраций 5% и 2% соответственно. Такие концентрации растворителей уже не оказывают ингибирующего действия на большинство ЛАЛ-реактивов.

Стоит обратить внимание и на отношение автора к терминологии. Все предложенные нормы содержания эндотоксинов определяются как «уровни тревоги» (*Endotoxin Alert Level*). Что отлично от используемого в фармакопее понятия «Предельное содержание бактериальных эндотоксинов» (*Endotoxin Limit*). Такое определение лишний раз подчеркивает, что эти значения:

- могут быть переменными в зависимости от контекста проверки,

- могут быть определены и утверждены в рамках предприятия, без необходимости утверждения на уровне Фармакопеи.

Несложно заметить, что в систему расчетов изначально введена дополнительная перестраховка. Исходный тезис о том, что препараты малого объема - это препараты объемом 100 мл, верен только в теории. В действительности такие препараты вводятся в значительно меньших объемах. Поэтому все предложенные нормы – это, как правило, нормы с большим запасом. Так, можно считать безопасным скорректированное для глицерина значение, даже несмотря на то, что оно в 10 раз большее расчетного.

Конечно, данные, представленные в таблице, надо рассматривать как рекомендательные. Это не официально утвержденные значения, которые должны быть обязательно приняты к исполнению. Все вышеприведенные рассуждения и расчеты в значительной степени относятся к сфере внутрипроизводственного контроля. Это область, в которой каждый производитель сам определяет свою политику и свои нормативы. Эти нормативы зависят от состава и количества вспомогательных веществ, входящих в состав готовой формы.

К сказанному можно добавить то, что проверку вспомогательных веществ необязательно проводить посерийно, в отличие от готовых форм. План проверки может быть гибким. Концепция обеспечения качества предполагает первоначальный широкий охват проверяемых параметров технологического процесса и всех используемых материалов. В тоже время, по мере накопления практических результатов план проверки корректируется в сторону уменьшения количества проверяемых точек. Так и с вспомогательными веществами, по мере накопления данных о надежности поставщика, количество проверок может сокращаться. В конечном счете известные препараты от известного поставщика можно проверять периодически.

В следующих номерах мы рассмотрим подход К. Вильямса (Williams K.L.). Он индивидуален и предполагает расчеты допустимого содержания эндотоксинов во вспомогательных веществах для конкретного препарата. Этот подход может быть применен также и ко многокомпонентным препаратам.

Литература

Cooper J.F. *Endotoxin alert level (EAL) for APIs and excipients.* // - LAL User Group Newsletter

Cooper J.F., Williams K.L. *Developing specifications for active pharmaceutical ingredients, excipients, raw materials, sterile pharmacy compounds, and nutritional supplements.* //In *-Endotoxins: Pyrogens, LAL testing, and depyrogenation. 3rd Edition.* - 2007 - NY: Informa Healthcare USA, Inc. - P. 285-299.

Powell M.T., Nguyen T., Baloian L. *Compendium of excipients for parenteral formulations.* // - 1998. - PDA J Pharm Sci. Technol. -Vol. 52. - P. 238-311.

Таблица 1. Справочная информация по наиболее часто используемым вспомогательным веществам – допустимое содержание БЭ и возможность проверки с помощью ЛАЛ-теста.

Pharmaceutical Excipient	Concentration (mg/mL)	Endotoxin Alert Level	LAL Test Concentration	LOD ($\lambda=0,05$)
Acetic Acid	2-5	0.7 EU/mg	0.1 mg/mL	0.5 EU/mg
Benzyl alcohol	10-30	0.03 EU/mg	2 mg/mL	0.025 EU/mg
Carboxymethyl-cellulose Na	8	1 EU/mg	1 mg/mL	0.05 EU/mg
Calcium chloride	0.1-1	0.2 EU/mg (USP)	1 mg/mL	0.05 EU/mg
Citric acid	0.1-1	0.5 EU/mg (EP)	0.25 mg/mL	0.2 EU/mg
Dextrose	10-50	10 EU/g (USP)	25 mg/mL	2 EU/g
Disodium EDTA	0.1	0.2 EU/mg (USP)	0.5 mg/mL	0.1 EU/mg
Ethanol	0.1 (v/v)	10 EU/mL	0.05 mL/mL	1 EU/mL
Gelatin	5	0.7 EU/mg	0.5 mg/mL	0.1 EU/mg
Glycerin	150	0.2 EU/mg	1.0 mg/mL	0.02 EU/mg
Glycine	10-24	0.15 EU/mg	2.5 mg/mL	0.02 EU/mg
Hydrochloric Acid	Trace	NA	NA	NA
Lactose	10	0.35 EU/mg	1 mg/mL	0.05 EU/mg
Lactic acid	7.5	0.45 EU/mg	2.5 mg/mL	0.02 EU/mg
Magnesium sulfate	100	0.1 EU/mg (USP)	2.5 mg/mL	0.02 EU/mg
Mannitol	100	4 EU/g (EP)	50 mg/mL	1 EU/g
Methylparaben	1.8	1 EU/mg	1 mg/mL	0.05 EU/mg
Phenol	5	0.7 EU/mg	0.25 mg/mL	0.2 EU/mg
Polyethylene glycol	500 (v/v)	0.007 EU/mL	20 mg/mL	0.0025 EU/mg
Polysorbate 80	10	0.1 EU/mg	2.5 mg/mL	0.02 EU/mg
Propylparaben	0.2	4.0 EU/mg	0.5 mg/mL	0.1 EU/mg
Sodium acetate	0.39	2.0 EU/mg	1 mg/mL	0.05 EU/mg
Sodium bisulfate	3.2	0.25 EU/mg	1 mg/mL	0.05 EU/mg
Sodium carbonate	1-33	0.025 EU/mg	2 mg/mL	0.025 EU/mg
Sodium chloride	9	5 EU/g	10 mg/mL	5 EU/g
Sodium citrate	10-28.5	1.2 EU/mg	2 mg/mL	0.025 EU/mg
Sodium hydroxide	Trace	Depyrogenating	NA	NA
Sodium lactate	10	0.1 EU/mg	1 mg/mL	0.05 EU/mg
Sodium methabisulfite	1-6.6	0.1 EU/mg	1 mg/mL	0.05 EU/mg
Sodium phosphate	1-10	0.1 EU/mg	1 mg/mL	0.05 EU/mg
Sorbitol	48	0.02 EU/mg	5 mg/mL	0.01 EU/mg
Sucrose	50-200	0.004 EU/mg	25 mg/mL	0.002 EU/mg
Thimerosal	0.1	10 EU/mg	0.1 mg/mL	0.5 EU/mg

Пояснения к таблице.

Concentration (mg/ml) – максимальная концентрация вспомогательного вещества в готовом лекарственном средстве (*Powell M.t., Nguyen T., Baloian L. Compendium of excipients for parenteral formulations, PDA J Pharm Sci. Technol 1998., Vol 52., P. 238-311.*)

Endotoxin alert limit – допустимое содержание БЭ во вспомогательном веществе. В основном это рекомендательные значения, в том случае, когда содержание БЭ указано в фармакопее, в скобках указан источник (USP - Фармакопея США или EP – Европейская фармакопея).

LAL Test concentration – имеется в виду рабочая концентрация, в которой возможна проверка В/В без проявления ингибирования с его стороны. Данные относятся кинетическому турбидиметрическому анализу (как показывает практика, разведения или концентрации, в которых преодолевается ингибирование, сопоставимы для кинетического турбидиметрического и гель-тромб теста).

Limit of Detection (LOD) – Предел определения содержания БЭ. Данное значение тесно связано с чувствительностью метода, в этом случае все данные приведены для кинетического турбидиметрического теста, в котором минимальная концентрация КСЭ, используемая для построения калибровочной кривой, составляла 0,05 ЕЭ/мл.

* Для кислоты и щелочи (*Hydrochloric Acid – Соляная кислота и Sodium hydroxide – Гидроксид натрия*) значения содержания БЭ не установлены и, соответственно, не определяются. Содержание их в готовой форме незначительно (*Trace - следы*)

Выбор контейнеров для хранения и транспортировки образцов воды для гемодиализа.

Демидова В.В., Стрельникова Л.И., Чиркова М.Н.

В нашу испытательную лабораторию часто передают на проверку образцы воды для гемодиализа. Проверка проводится по ГОСТ Р 52556-2006 «Вода для гемодиализа. Технические условия», в котором указывается, что предельное содержание эндотоксинов должно быть менее 0,25 ЕЭ/мл. По смыслу такая проверка – внутрипроизводственный контроль, проводимый с периодичностью раз в месяц. Очевидно, что лучше проводить проверку на месте и сразу после отбора проб. Однако, анализ «бактериальные эндотоксины» достаточно сложен в проведении, и поэтому многие гемодиализные центры предпочитают передавать его независимым контрольным лабораториям.

Получается, что пробы воды попадают в лабораторию через несколько суток после отбора. При этом возникает вопрос выбора контейнеров для транспортировки. С практической точки зрения удобнее использовать одноразовые контейнеры из пластика, предварительно стерилизованные, с низким содержанием эндотоксина. Однако, пластиковая посуда не нашла широкого применения в ЛАЛ-тесте, ввиду возможной адсорбции эндотоксина на поверхности определенных видов пластика, а также возможной экстракции из материала веществ, способных ингибировать реакцию. Есть сведения о том, что полиэтилен и полипропилен очень хорошо адсорбируют эндотоксины на поверхности. Другие исследователи считают, что в случае полипропилена дело не в адсорбции, а в вымывании из материала сильного ингибитора, который тормозит реакцию ЛАЛ-реактива и эндотоксина. Пластиковая посуда потенциально может оказывать мешающее действие на реакцию, но понять, что есть на самом деле, можно только проверив конкретные контейнеры.

Мы решили провести исследование, целью которого был подбор наиболее подходящего контейнера для хранения образцов воды до анализа. Мы не ставили задачи провести глобальное исследование, а взяли наиболее часто используемые заказчиками контейнеры и проверяли, какое воздействие они могут оказать на образец во время хранения и транспортировки.

Исследования проводили в два этапа, на первом выясняли, какой материал может быть более предпочтителен. На втором подбирали оптимальные объемы наполнения и условия хранения образцов.

Для опыта были взяты пробирки из полистирола и полипропилена, а также стеклянные пробирки, которые планировалось использовать для сравнения:

- Пробирки полипропиленовые в опыте означены индексом **ПП**.
- Пробирки полистироловые, в опыте обозначены индексом **ПС**.
- Пробирки щелочного стекла в опыте обозначены индексом **АБ**.

Стеклянные пробирки депирогенизировали при температуре 250°C в течение 30 минут.

Пробирки полистироловые и полипропиленовые согласно сертификатам производителей, стерильны и апиrogenны.

Суть опыта сводилась к следующему: пробирки наполняли раствором КСЭ известной концентрации и выдерживали несколько суток, при этом ежедневно проводили проверку концентрации эндотоксина в контейнерах. В случае адсорбции или ингибирования концентрация должна снижаться. По степени снижения можно определить, какой из материалов наиболее подходит для хранения образцов.

Для постановки опыта была выбрана концентрация КСЭ, равная 1,5 ЕЭ/мл. Выбор концентрации легко объясним: если произойдет снижение активности за счет адсорбции или ингибирования, возможен переход такого образца от очевидного брака к формальной норме (менее 0,25 ЕЭ/мл). Это то, что называется ложноотрицательными результатами – самое плохое, что может быть при проведении анализа.

Все контейнеры, хотя и назывались пробирками, имели разную геометрию и разные номинальные объемы. Адсорбция или ингибирование происходят на поверхности материала (адсорбция) или с поверхности материала (вымывание ингибитора), следовательно, в разные по геометрии контейнеры нужно добавлять такие объемы, при которых выдерживалось бы одинаковое соотношение площади соприкосновения стенок с раствором и объема добавленного раствора (S в мм^2 / V в мл). В таблице 1 приведены выбранные объемы заполнения контейнеров, при которых отношение S/V оказалось примерно одинаковым.

После подготовки раствора КСЭ проводили измерение полученной концентрации, которая составила 1,58 ЕЭ/мл. Этот раствор разливали по пробиркам в объемах, указанных в Таблице 1. Первое измерение было принято за нулевую точку. Контейнеры ставили на хранение в холодильник при температуре 4°C. Далее ежедневно в течение четырех суток измеряли концентрацию эндотоксина во всех контейнерах.

Таблица 1. Площадь соприкосновения (мм²) и рабочие объемы (мл)

Тип контейнера	Габариты рабочей зоны (по заполнению)			Отношение S:V
	Объем, мл	Высота столба, мм	Площадь соприкосновения, мм ²	
ПП	10	22	754	75,4
ПС	5	32	402	80,4
АБ	7	72	585	83,5

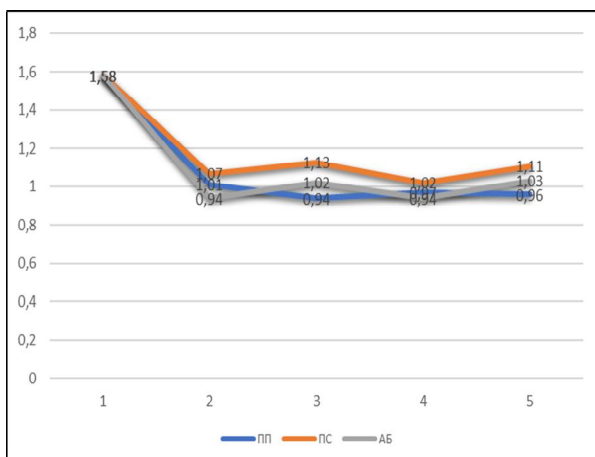
Определение эндотоксинов проводили хромогенным кинетическим методом (Метод D). Калибровочную кривую строили по трем стандартным концентрациям КСЭ: 0,05 ЕЭ/мл; 0,5 ЕЭ/мл; 5,0 ЕЭ/мл. Все пробы проверяли без разведения. Результаты измерений приведены в Таблице 2 и Рис. 1.

Таблица 2. Снижение концентрации эндотоксина в разных контейнерах.

Контейнеры	0 проба	1 день	2 день	3 день	4 день
ПП	1,58 ЕЭ/мл	1,01 ЕЭ/мл	0,94 ЕЭ/мл	0,97 ЕЭ/мл	0,96 ЕЭ/мл
ПС	1,58 ЕЭ/мл	1,07 ЕЭ/мл	1,13 ЕЭ/мл	1,02 ЕЭ/мл	1,11 ЕЭ/мл
АБ	1,58 ЕЭ/мл	0,94 ЕЭ/мл	1,02 ЕЭ/мл	0,94 ЕЭ/мл	1,03 ЕЭ/мл

Во всех исследуемых контейнерах произошло снижение определяемой концентрации эндотоксинов. По всей видимости, можно говорить о частичной и необратимой адсорбции эндотоксинов на поверхности контейнеров.

Рис. 1 Снижение концентрации эндотоксина в разных контейнерах



Серьезной разницы между результатами, полученными для пластиковых контейнеров и щелочному стеклу, не наблюдается. Что касается ингибирования (вымывание из материала веществ, способных ингибировать реакцию), то в данном

случае можно с уверенностью говорить, что его нет.

Во всех контейнерах произошло практически идентичное снижение активной концентрации. К тому же в кинетических анализах ингибирование хорошо распознается по положительному контролю. В нашем случае все спайки были в пределах допустимой нормы.

Остаточное содержание эндотоксинов в растворах КСЭ в процентах от первоначальной концентрации оставило:

Для полипропиленовых пробирок – 61,4%

Для полистироловых пробирок – 68,5%

Для флаконов щелочного стекла – 62,2%.

Поскольку основной целью опыта было выяснение возможности использования пластиковых контейнеров, можно считать, что оба типа материалов - полипропилен и полистирол - могут быть использованы для хранения воды до анализа.

Дальше мы выбирали уже собственно контейнеры и решили остановиться на полипропиленовых центрифужных пробирках. Как контейнеры они в наибольшей степени подходят для хранения и транспортировки. Они очень прочные, снабжены навинчивающейся крышкой и имеют достаточный номинальный объем – 50 мл.



В части адсорбции результаты у этих пробирок были формально хуже всех, но все же эти отличия нельзя считать принципиальными.

Для постановки опыта была выбрана та же концентрация КСЭ, что и в первой части эксперимента - 1,5 ЕЭ/мл. Однако, при измерении нулевой точки, сразу после разведения КСЭ, реальная концентрация оказалась меньше и составила 1,01 ЕЭ/мл.

В данном случае мы решили довести объем наполнения пробирок до номинального – 50 мл. При этом исходили из того, что адсорбция происходит на поверхности, а при увеличении объема до номинального площадь поверхности соприкосновения раствора со стенками пробирок увеличится всего в 1,5 раза (в первом опыте площадь соприкосновения составила 754 мм² на 10 мл, в настоящем опыте она составит 1130 мм² на 50 мл), при этом объем раствора увеличится в пять раз. Можно ожидать меньшей потери активной концентрации по сравнению с результатами первого опыта.

Также было решено проводить экспозицию не только при температуре 4°C, но и при комнатной температуре 20°C с тем чтобы выяснить, какие

температурные условия лучше подходят для транспортировки образцов. Вопрос заморозки образцов мы не рассматривали, поскольку из литературы известно, что при замораживании степень адсорбции увеличивается настолько, что даже в инструкциях на КСЭ указывается, что растворы эндотоксинов нельзя замораживать.

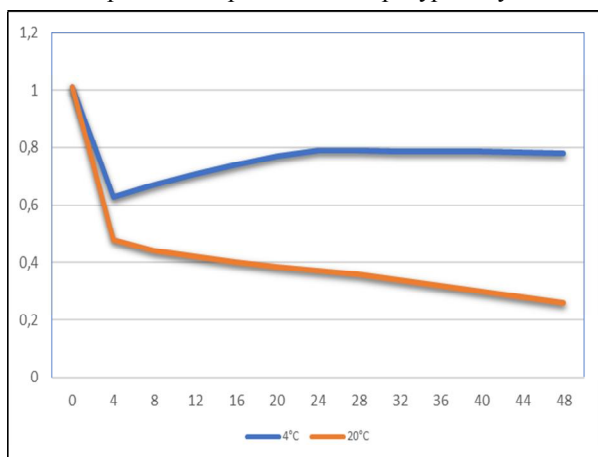
После подготовки раствора КСЭ и измерения его концентрации этот раствор переносили в две пробирки по 50 мл в каждую, закрывали штатными крышками и распределяли на хранение – одну группу хранили в холодильнике при 4°C, вторую – при комнатной температуре 20°C.

Поскольку в первом опыте было показано, что основные потери активности КСЭ происходили в первые сутки хранения, было решено первое измерение провести через 4 часа после наполнения контейнеров. Далее проверка проводилась через каждые сутки хранения в течение двух суток. Полученные результаты приведены в Таблице 3 и Рис 2.

Таблица 3. Снижение концентрации эндотоксина в полипропиленовых пробирках при хранении в разных температурных условиях.

Название	0 проба	4 ч	24 ч	48 ч
ПП_4С	1,01 ЕЭ/мл	0,63 ЕЭ/мл	0,79 ЕЭ/мл	0,78 ЕЭ/мл
ПП_20С	1,01 ЕЭ/мл	0,48 ЕЭ/мл	0,37 ЕЭ/мл	0,26 ЕЭ/мл

Рис. 2. Снижение концентрации эндотоксина при хранении в разных температурных условиях



Хранение при 4°C. Как и предполагалось, основное снижение концентрации происходит в первые несколько часов хранения. В первые четыре часа измеряемая концентрация упала примерно на 30%. Далее происходит стабилизация концентрации. В первый и во второй день получились концентрации 0,79 ЕЭ/мл и 0,78 ЕЭ/мл,

что составило 78% или 77% от исходной величины. Остаточное содержание эндотоксинов в растворах КСЭ в процентах от первоначальной концентрации для растворов в течение всего времени хранения в среднем составило 72,6%.

Хранение при 20°C. Снижение концентрации, произошедшее в первые 4 часа, было более выраженным, чем для группы хранения при 4°C, и составило примерно 50%. В дальнейшем такой стабилизации, которая наблюдалась в группе 4°C, не произошло, и концентрация продолжала снижаться. Правда резких скачков уже не было и снижение было плавным. В итоге ко второму дню хранения исходная концентрация 1,0 ЕЭ/мл снизилась до 0,26 ЕЭ/мл. Это составило всего 26% от исходной величины. Этот раствор из квалификации «брак» за двое суток вплотную подошел к квалификации «соответствует требованиям».

Таким образом, после цикла исследований нами было установлено, что проверенные центрифужные полипропиленовые пробирки на 50 мл с крышкой могут быть использованы для хранения образцов воды для гемодиализа до проведения анализа

Хранение и транспортировку образцов следует осуществлять при температурах 4-8°C. Эти условия значительно снижают степень адсорбции эндотоксина и, соответственно, снижение его концентрации при хранении будет незначительным. Также в этих условиях значительно снижается возможность роста микроорганизмов.

Заполнять пробирки или флаконы водой следует до номинального объема, поскольку чем больше общий объем, тем меньше процентные потери, связанные с адсорбцией.

Интервал между забором проб и анализом может составлять несколько суток.

Конечно нельзя исключить того, что в определенных случаях, при концентрациях, близких к пороговым, возможна неверная оценка качества проверяемого образца, получение ложных результатов. Как указывалось выше, проводимый таким образом анализ является ретроспективным, гораздо лучше проводить анализ на месте отбора пробы.

В случае смены типа контейнера или выбора другого производителя аналогичных пробирок целесообразно провести исследования по оценке степени адсорбции, поскольку изменения типа материала может сказаться и на его взаимодействии с эндотоксинами.

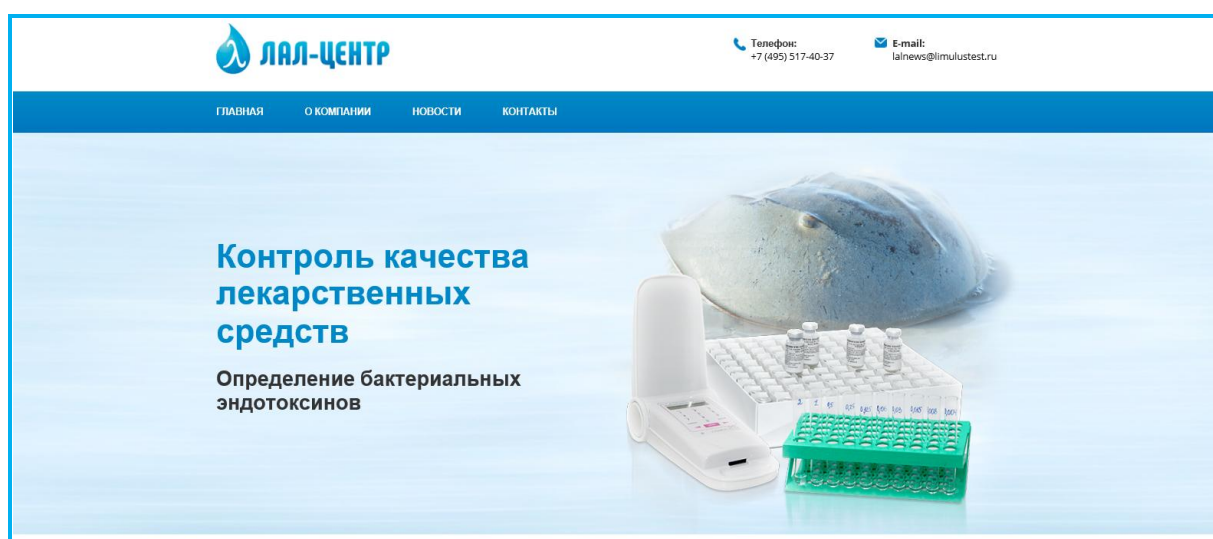
Новый сайт НПО «ЛАЛ-Центр»

Возможно, многие из наших читателей уже заметили, что не так давно по адресу www.limulustest.ru заработала новая версия сайта. На нашем новом сайте представлено значительно больше информации обо всех предлагаемых нами товарах и услугах. В разделе «Реактивы и материалы» приведена детальная информация по каждой товарной позиции, включая инструкции, описания, технические характеристики, регистрационные удостоверения и паспорта безопасности. В этом же разделе на странице «Сертификаты» можно самостоятельно скачать сертификаты анализа на реактивы и паспорта качества на вспомогательные материалы на все текущие серии.

В разделе «Обучение» приведено подробное описание всех семинаров и представлен график их проведения с возможностью отправить заявку на семинар прямо с сайта. В разделе «Проведение испытаний» мы предлагаем подробно ознакомиться со всеми видами работ, проводимых в нашей Испытательной лаборатории.

Также в скором времени мы планируем сделать возможным выбор и заказ реактивов и материалов прямо с сайта. Будет доступна возможность самостоятельно сделать заказ и распечатать коммерческое предложение или счет на оплату.

Надеемся, что наш новый сайт окажется для Вас удобным и полезным.



«ЛАЛ-тест» - периодический бюллетень для специалистов, работающих в области фармации, медицины и биологии.

Бюллетень «ЛАЛ-тест» выходит с периодичностью 4 раза в год, распространяется бесплатно.

ООО «НПО «ЛАЛ-Центр» 117105, г. Москва, ул. Нагатинская, д. 3а.

Тел.: (495) 517-40-37, факс: (495) 380-04-32. E-mail:

lalnews@limulustest.ru

Главный редактор: Демидова В.В.

Формат: А4; Бумага: супербелый лен 90 г/м²;

Печать: Офсет; Объем: 8 стр.; Тираж: 150 экземпляров.

Отпечатано в типографии ООО «Типография Копиринг», Москва.



Уважаемые коллеги!

Каждый новый номер бюллетеня будет выкладываться на сайте. Там же вы можете найти все предыдущие номера.

Если Вы хотите получать новый номер сразу после его выхода, пожалуйста, сообщите нам о своем желании и оставьте свои координаты:

Фамилия Имя Отчество

Должность

Название организации

Город

E-mail

Заявки отправляйте на почту:

demidova@limulustest.ru