

Колонка редактора

Мы продолжаем цикл статей, посвященных разбору положений общей фармакопейной статьи «Бактериальные эндотоксины».

В этом номере мы постарались подробно разобрать смысл понятия «Максимально допустимое разведение» (МДР). В ОФС ему посвящен небольшой раздел. МДР упоминается в контексте и предварительных, и контрольных анализов. Расчеты МДР - только теоретическая часть подготовки опыта, но без этих расчетов невозможно грамотно провести ни один анализ. Отступление же от ограничений, которые определяются максимально допустимым разведением, чревато получением трудно интерпретируемых или ошибочных результатов со всеми вытекающими последствиями. В статье разбирается также смысл понятия «Минимально допустимая концентрация» (МДК). Это понятие используется значительно реже, чем МДР, но его можно встретить в зарубежной нормативной документации. Правила расчета МДР рассматриваются как в контексте традиционного гель-тромб теста, так и в рамках кинетических анализов.

Мы продолжаем нашу рубрику «Вопросы и ответы». Хотелось бы, чтобы она была постоянной, но это возможно только в случае активного участия наших читателей.

В разделе «Технические вопросы» приведен вариант решения проблемы, которая занимает очень многих. Это правила расчета среднего геометрического значения, по результатам опыта «Подтверждение заявленной чувствительности». Надеемся, что данная информация будет полезна в вашей работе.

С уважением, редакционная коллегия бюллетеня «ЛАЛ-тест».

Максимально допустимое разведение

Ситников. А. Г.

Понятие максимально допустимого разведения (МДР) является одним из фундаментальных понятий, играющих важную роль в обеспечении безопасности лекарственного препарата при проверке его с помощью ЛАЛ-теста. Особенно тесно это понятие связано с модификацией метода, называемой гель-тромб тест. Оно и возникло фактически одновременно с этим методом. Уже в первой редакции фармакопейной статьи «Бактериальные эндотоксины» Фармакопеи США вводилось определение Maximum Valid Dilution (MVD) и, в частности, указывалось следующее:

«.....Понятие Максимально Допустимого Разведения применимо к Инъекционным лекарственным формам или Растворам для парентерального введения в готовой или разведенной для введения форме...»

В том случае, если в частной статье норма содержания эндотоксина указана в объемных единицах (ЕЭ/мл), для получения значения МДР разделите указанную норму на λ , которая является заявленной чувствительностью лизата, используемого в методе....»

.....Полученное таким образом значение МДР является предельным значением разведения испытуемого препарата, при котором проводимый тест можно считать достоверным....»

Близкое по смыслу понятие «Кратность предельного разведения» использовалось в первой редакции отечественной статьи «Определение бактериальных эндотоксинов (ЛАЛ-тест)». Правда, смысл этого термина не был достаточно конкретизирован. Позже в ОФС «Бактериальные эндотоксины» был введен иной термин - МДР, при этом уже очень четко было определено и место этого понятия в структуре анализа.

Вообще, словосочетание *Maximum Valid Dilution (MVD)*, используемое в англоязычной литературе, может быть переведено как *Максимально Достоверное Разведение* или *Максимальное Валидируемое Разведение*. Каждый из этих вариантов по-своему верен, причем, это относится и к принятому в ОФС определению «Максимально допустимое разведение». Конечно, важны не семантические тонкости перевода, а тот смысл, который вкладывается в этот термин.

Сама природа гель-тромб теста предполагает получение качественного результата, демонстрации того, что содержание эндотоксина больше/меньше какой-либо величины. Так, если исходный раствор препарата проверяют без разведения, то по результатам можно сделать вывод о том, что содержание эндотоксинов равно/больше λ или менее λ . Однако, в большинстве случаев исходный раствор препарата разводят водой. Причины тут две. Первая: относительно высокая чувствительность ЛАЛ-реактива. Если для ЛС установлено предельное содержание БЭ – не более 30 ЕЭ/мл, совсем необязательно показывать, что эндотоксинов в препарате меньше 0,03 ЕЭ/мл. Вторая причина более веская: это ингибирование реакции со стороны препарата. Самый простой способ преодоления этого ингибирования – разведение исходного раствора водой. При разведении происходит снижение концентрации активного вещества и, соответственно, снижение ингибирующей способности. При этом же происходит и снижение концентрации эндотоксинов в препарате, если таковые там имеются, но благодаря высокой чувствительности ЛАЛ-реактива сохраняется возможность их определения. Понятно также, что если степень разведения никак не ограничивать, то концентрацию эндотоксинов в растворе препарата можно снизить настолько, что она окажется меньше значения λ . Можно привести следующий пример:

Предельное содержание БЭ не более 25 ЕЭ/мл.

$\lambda = 0,25$ ЕЭ/мл.

Препарат проверяется в одном произвольно выбранном разведении, например, 1/1; 1/10; 1/100 или 1/1000.

Отрицательные результаты могут быть интерпретированы следующим образом:

Разведение	Сод. БЭ	Качество ЛС
1/1	< 0,25 ЕЭ/мл	хорошее
1/10	< 2,5 ЕЭ/мл	хорошее
1/100	< 25 ЕЭ/мл	норма
1/1000	< 250 ЕЭ/мл	неизвестно

Если же получены положительные результаты, то они могут быть оценены следующим образом:

Разведение	Сод. БЭ	Качество ЛС
1/1	$\geq 0,25$ ЕЭ/мл	неизвестно
1/10	$\geq 2,5$ ЕЭ/мл	неизвестно
1/100	≥ 25 ЕЭ/мл	Брак
1/1000	≥ 250 ЕЭ/мл	Брак

Сразу заметно, что в этом ряду есть совершенно бесполезное разведение 1/1000. Если в нем результаты отрицательные, то никаких выводов сделать невозможно, если

положительные, то это заведомый брак. Два первых разведения имеют разную значимость в зависимости от того, какие результаты получены. Если результаты отрицательные, то это очень хорошо, если положительные, то без перестановки определить качество препарата невозможно. И, наконец, в разведении 1/100 качество препарата однозначно трактуется в зависимости от результата анализа. Если результат положительный, то это брак, если результат отрицательный, то препарат соответствует требованиям НД. Видно также, что это как раз тот рубеж, за который переходить не имеет никакого смысла, поскольку в больших разведениях результаты невозможно будет нормально оценить. Вот собственно это, пограничное разведение и называется МДР.

МДР и чувствительность ЛАЛ-реактива, λ .

Значение МДР рассчитывается по формуле:

$$\text{МДР} = \frac{\text{Предельное содержание бактериальных эндотоксинов}}{\lambda}$$

λ - Чувствительность ЛАЛ-реактива [ЕЭ/мл].

Предельное содержание бактериальных эндотоксинов – значение, указанное в частной фармакопейной статье на препарат [ЕЭ/мл].

Предельное содержание бактериальных эндотоксинов должно быть выражено в виде концентрации эндотоксина в растворе в ЕЭ/мл, т.е. в той же размерности, в которой выражается чувствительность ЛАЛ-реактива, λ в ЕЭ/мл. Значение МДР зависит от чувствительности ЛАЛ-реактива: чем выше чувствительность, тем больше МДР.

Например,

Предельное содержание не более 0,5 ЕЭ/мл

Чувствительность ЛАЛ-реактива	МДР
0,25 ЕЭ/мл	2
0,125 ЕЭ/мл	4
0,0625 ЕЭ/мл	8
0,03125 ЕЭ/мл	16

Значение МДР - величина безразмерная. Обычно в протоколах анализов степень разведения препарата обозначают в виде простой дроби: 1/4, 1/64 и т.д.

Согласно положениям ОФС анализ не может быть проведен в разведении большем, чем МДР. Это положение в равной степени относится к обеим модификациям гель-тромб теста. Особенно оно важно в количественном анализе, поскольку может возникнуть искушение продолжить ряд разведений за

МДР. В этом случае теоретически возможна следующая картина:

Предельное содержание эндотоксинов - не более 0,5 ЕЭ/мл,

λ - 0,03 ЕЭ/мл,

МДР = 16.

1/4	1/8	1/16	1/32	Конечная точка
+	+	+	-	0,5 ЕЭ/мл
+	+	-	-	0,25 ЕЭ/мл

Среднее геометрическое значение содержания БЭ = 0,35 ЕЭ/мл.

Формально полученное значение меньше, чем допустимая норма, и препарат можно было бы пропустить. Однако если бы препарат был проверен с помощью Качественного анализа в МДР, то по полученным результатам следовало бы провести повторный анализ с весьма высокой вероятностью выбраковки серии.

Минимально допустимая концентрация.

Для лекарственных форм, производимых в виде лиофилизатов, порошков или лекарственных субстанций, для которых содержание эндотоксинов выражено в ЕЭ/мг, более информативным является значение Минимально допустимой концентрации, МДК (*Minimum valid concentration*). По сути, МДК и МДР это одно и то же, просто в зависимости от общего контекста в одном случае удобнее говорить о разведении препарата, в другом - о концентрации активного вещества в этом разведении. Понятно, что зависимость обратная: в максимальном разведении концентрация активного вещества минимальна.

Значение Минимально допустимой концентрации, так же как и МДР, зависит от чувствительности ЛАЛ-реактива и предельного содержания эндотоксинов в препарате. Значение МДК рассчитывается следующим образом:

$$\text{МДК} = \frac{\lambda}{\text{Предельное содержание бактериальных эндотоксинов}}$$

Например:

Предельное содержание БЭ не более 1 ЕЭ/мг.

$\lambda = 0,25$ ЕЭ/мл.

$$\text{МДК} = \frac{0,25 \text{ ЕЭ/мл}}{1 \text{ ЕЭ/мг}} = 0,25 \text{ мг/мл}$$

Для перевода МДК в МДР используется формула:

$$\text{МДР} = \frac{\text{Концентрация препарата}}{\text{МДК}}$$

Концентрация препарата - концентрация исходного раствора препарата [мг/мл].

Так, например, если в приведенном выше примере концентрация активного вещества в исходном растворе составляет 10 мг/мл, то значение МДР будет равно:

$$\text{МДР} = \frac{10 \text{ мг/мл}}{0,25 \text{ мг/мл}} = 40$$

Если же сделать расчеты МДР для этого препарата «традиционным способом», то получится то же самое значение:

$$\text{МДР} = \frac{10 \text{ мг/мл} \times 1 \text{ ЕЭ/мг}}{0,25 \text{ ЕЭ/мл}} = 40$$

Поскольку в большинстве случаев содержание эндотоксинов в препаратах выражается в ЕЭ/мг, возможно, правильнее было бы оперировать именно понятием минимальной концентрации. Особенно это актуально для порошков или субстанций, для которых упоминание о максимальной степени разведения возможно только после указания их концентрации в исходном растворе. Поэтому не случайно, что в первых редакциях Фармакопеи США и в Руководстве FDA по валидации метода понятия МДК использовались наряду с МДР.

В действующей Гармонизированной статье «Бактериальные эндотоксины» и в отечественной документации понятие Минимально допустимая концентрация не используется. Объясняется это тем, что в практической работе удобнее и понятнее оказалось использование значения МДР.

МДР и фактор безопасности.

В нормативной документации и протоколах анализов обычно указывается значение МДР и значение разведения препарата в опыте. Часто испытываемое разведение значительно меньше МДР. Так гарантируется большая безопасность проверенного препарата. Само же понятие «фактор безопасности» практически не используется, несмотря на то, что в определенных ситуациях оно может быть очень уместно. Дело в том, что общая идеология проверки готовой формы заключается не в том, чтобы забраковать препарат, а в том, чтобы убедиться в его безопасности для человека.

Например:

Предельное содержание БЭ не более 0,5 ЕЭ/мл,

$\lambda = 0,03$ ЕЭ/мл,

МДР равно 16.

Допустим, в каждом из возможных разведений могут быть получены отрицательные результаты:

Отрицательный результат в разведении:	Содержание БЭ
1/1	менее 0,03 ЕЭ/мл
1/2	менее 0,06 ЕЭ/мл

1/4	менее 0,125 ЕЭ/мл
1/8	менее 0,25 ЕЭ/мл
1/16	менее 0,5 ЕЭ/мл

Какой из данных результатов предпочтительнее? Очевидно, что это отрицательный результат, полученный для препарата без разведения. Этот результат означает, что в препарате содержание эндотоксинов гарантированно меньше предельного в 16 раз. В этом случае говорят, что фактор безопасности результатов опыта равен шестнадцати.

Знакомая рекомендация проверять препарат в разведениях, меньших расчетного значения МДР: хотя бы в 1/2 МДР, это не что иное, как призыв обеспечить фактор безопасности результатов, равный двум.

Конечно, само понятие «фактор безопасности» далеко не идеально, хотя бы потому, что реакция человека на эндотоксины не линейна. И все же этот термин очень удачно смотрится именно в базовых документах, сопровождающих разделы БЭ в ФСП. Так, если в Пояснительной записке к ФСП или в СОПе указано, что выбранная схема проверки готовой формы обеспечивает фактор безопасности, равный десяти, смысл послания оказывается абсолютно ясным и без пересчетов степеней разведения.

Разведения ЛС в кинетических анализах.

Весьма интересна ситуация с МДР в кинетических анализах. Основное отличие состоит в том, что проверка идет не по одной концентрации, а для широкого их ряда. В этих анализах за λ принимается наименьшая концентрация КСЭ, используемая для построения калибровочной кривой. Например:

Предельное содержание БЭ не более 10 ЕЭ/мл.

Калибровочная кривая строится по трем концентрациям: 0,05 ЕЭ/мл, 0,5 ЕЭ/мл, 5 ЕЭ/мл, $\lambda = 0,05$ ЕЭ/мл;

$$\text{МДР} = \frac{10 \text{ ЕЭ/мл}}{0,05 \text{ ЕЭ/мл}} = 200$$

Поскольку калибровочная кривая позволяет определить концентрацию эндотоксина в довольно широком диапазоне, эту возможность желательно использовать по максимуму. Поэтому кроме МДР можно рассчитать и значение разведения для наибольшей концентрации эндотоксина в калибровочной кривой (5 ЕЭ/мл), в этом случае разведение будет равно 2. Далее можно решить, в каком разведении поставить анализ. Очевидно, что ставить опыт в разведении 1/200 совершенно неинтересно. Если вынести за скобки вопрос возможного ингибирования реакции, то наиболее интересные и информативные результаты будут получены при анализе препарата в

разведении 1/2. Какие могут быть результаты, и как они могут быть интерпретированы?

1. Если содержание эндотоксинов в препарате очень низкое, по результатам будет сделан вывод, что оно менее 0,1 ЕЭ/мл (фактор разведения, умноженный на минимальную концентрацию КСЭ в калибровочной кривой).

2. Если содержание эндотоксинов в препарате высокое, по результатам будет сделан вывод, что оно более 10 ЕЭ/мл (фактор разведения, умноженный на максимальную концентрацию КСЭ в калибровочной кривой).

3. Если в препарате присутствуют эндотоксины в диапазоне, измеряемом калибровочной кривой, по результатам анализа будет получена конкретная цифра, например, 1 ЕЭ/мл.

Если вернуться к вопросу фактора безопасности, то в первом случае этот фактор равен 100, т.к. содержание эндотоксинов в 100 раз менее допустимого уровня. В третьем случае фактор безопасности менее 10, что впрочем, вполне приемлемо. И, наконец, во втором примере препарат бракуется.

Приведенный пример лишний раз подчеркивает то, насколько более информативны кинетические анализы. В гел-тесте приходится выбирать одно разведение, причем такое, в котором полученные результаты были бы действительно безопасными, а требования по качеству не были излишне жесткими. Если гипотетические представления о содержании эндотоксина в препарате окажутся неверными, опыт придется переставлять. В кинетических же анализах делать такие расчеты значительно проще, поскольку измерения проводятся для широкого диапазона концентраций, а оценка степени безопасности делается по результатам анализа и может опираться на конкретные цифры.

Заключение

Расчеты МДР - важный элемент теоретических расчетов, определяющих естественные ограничения опыта. Конечно, технически не всегда возможно проверить препарат в очень малых разведениях, а при проверке неизвестного препарата такие эксперименты могут привести к необходимости перестановки опыта. Но в любом случае «добровольно-обязательная» рекомендация проводить анализ в разведении, меньшем МДР, хотя бы в 1/2 МДР, стала уже нормой, которая ни у кого не вызывает возражений.

Технические вопросы

Среднее геометрическое значение концентрации эндотоксина, определенное в опыте

Тутнова А.Д., Демидова В.В., Ситников А.Г.

Расчет среднего геометрического значения концентрации эндотоксина, как правило, представляет собой техническую и во многом формальную задачу. Так как мы, работающие с ЛАЛ-тестом, довольно далеки от математики, то вопрос таких расчетов, особенно получения значения антилогарифма, может оказаться проблемой. Конечно, решение найти можно всегда. В качестве примера можно привести весьма нетривиальный способ решения, оказавшийся очень простым и не менее эффективным. Пример реальный. Сотрудники спрашивают: как считать? Начальник снимает трубку и звонит на мехмат городского университета. Далее следует примерно следующий диалог:

- Ребята, можете объяснить, как рассчитать антилогарифм с помощью инженерного калькулятора?

- Наверное, сможем, посмотреть надо. Ага, там надо циферки сначала ввести, потом нажать такую-то комбинацию клавиш одновременно. Получится антилогарифм. Так, кажется...

- Спасибо, выручили.

Вариант решения, наверное, самый простой. Но даже если рядом нет мехмата, почти всегда в лаборатории есть компьютер, а на нем стоит пакет MSOffice, неизменным компонентом которого является электронная таблица MSExcel. Вот в этой программе и можно не только рассчитать среднее геометрическое значение, но и сделать один раз шаблон такого расчета и затем просто менять в нем цифры - значения концентрации эндотоксина. Остальные расчеты будут выполняться программой автоматически, по введенным в соответствующие ячейки формулам. Мы пользуемся примерно следующим шаблоном:

Пример расчета среднего геометрического значения в MSExcel

Координаты ячеек	A	B	C
1	Повторности (f)	Концентрация эндотоксина, ЕЗ/мл	Логарифм концентрации (e)
2	1	0,03	-1,5229
3	2	0,015	-1,8239
4	Сумма логарифмов (Σe)		-3,3468
5	Среднее значение логарифмов		-1,6734
6	Антилогарифм среднего значения логарифмов		0,0212

Пояснения к таблице:

Адрес ячейки	Содержание ячейки	Формула в ячейке
D2 и D3	Значения концентрации БЭ, определенные для каждой из повторностей	Формулы нет. В ячейки вводятся только цифры, разделитель - запятая.
C2	Расчет значения логарифма для повторности	=LOG10(D2)
C3	Расчет значения логарифма для повторности	=LOG10(D3)
C4	Расчет суммы логарифмов	=СУММ(C2:C3)
C5	Расчет среднего значения логарифмов	=C4/2
C6	Расчет значения антилогарифма	=10^(C5)

Примечания:

1. Общее правило введения формул в ячейку: знак «=» - начало введения формулы, далее идут ее аргументы. Это могут быть цифры, формулы, адреса ячеек. Адрес ячейки представляет собой ее цифробуквенное обозначение, взятое в круглые скобки.
2. Расчет антилогарифма - действие, обратное логарифмированию. Последняя операция - это возведение десяти (основание логарифма) в степень, соответствующую среднему значению логарифмов (ячейка C5). (Знак возведения в степень (^) находится в верхнем ряду клавиатуры на клавише с цифрой «6». Английская раскладка клавиатуры, верхний регистр).
3. Пересчет по всем формулам делается автоматически после изменения значений в ячейках D2 или D3 и нажатия Enter.
4. Количество знаков после запятой в ячейках с формулами можно ограничить 2-3 знаками (см. команды или кнопки «Увеличить разрядность» и «Уменьшить разрядность» в главном меню программы).

Этот шаблон сделан для расчета результатов количественных анализов, в которых количество повторностей - две. Если надо рассчитать среднее значение, полученное в опыте «Подтверждение заявленной чувствительности», то можно сделать аналогичный шаблон, добавив к нему еще две строки для данных по содержанию эндотоксинов в третьей и четвертой повторностях. Соответственно, суммировать значения надо будет уже по четырем ячейкам, и делить полученное значение на четыре.

Вот собственно и все. Надеемся, что это несложное объяснение поможет вам в вашей работе.

Вопросы и ответы

Нужны ли специальные наборы для валидации ЛАЛ-теста?

Специальных реактивов для валидации метода нет, напротив, валидационные процедуры должны проводиться с использованием тех реактивов, которые используются для постановки контрольных анализов. Точнее, сначала проводится валидация, затем уже можно делать контрольные анализы готовых серий ЛС.

Валидация метода - процедура многоуровневая. Первый этап можно назвать общей валидацией метода, на котором подтверждается, что весь измерительный комплекс в целом нормально работает и обеспечивает получение ожидаемых результатов. На этом же этапе подтверждается квалификация экспериментатора, проводящего анализ. Эти задачи могут быть решены с помощью модельного эксперимента, результаты которого заранее известны. Таким является анализ «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива», который может быть использован для:

- проверки новой серии ЛАЛ-реактива;
- аттестации лаборатории;
- аттестации сотрудников.

Второй этап валидации относится уже к каждому конкретному лекарственному препарату. На этом этапе необходимо показать, что препарат не ингибирует и не усиливает реакцию ЛАЛ-реактива с эндотоксином и, следовательно, он может быть проверен по показателю «Бактериальные эндотоксины». Эта задача решается с помощью анализа «Мешающие факторы». Анализ очень похож на проверку чувствительности ЛАЛ-реактива. Разница заключается в том, что в опыте используется серия разведений стандарта эндотоксина в проверяемом препарате, а не в воде для ЛАЛ-теста. Анализ проводят на трех разных сериях испытуемого препарата.

В каких случаях требуется ревалидация метода?

Необходимость в ревалидации метода возникает в том случае, если в методику проверки или в состав препарата вносятся изменения. Такими изменениями могут быть:

1. Начало использования ЛАЛ-реактива другого производителя. В этом случае ревалидацию можно провести на одной серии ЛС.

2. Переход на другой метод проведения анализа, например, переход с геле-тромб теста на кинетический хромогенный анализ. В

этом случае ревалидацию надо проводить на трех сериях испытуемого препарата.

3. Изменения технологии производства или состава препарата, которые могут привести к изменению свойств препарата. В данном случае ревалидация проводится на одной серии испытуемого препарата.

Может ли лекарственный препарат быть нестерильным, но апиrogenным и наоборот?

Оба этих варианта возможны. Принципиальная разница заключается в том, что первый вариант может быть закреплен в нормативной документации. Например, в НД на активную субстанцию, используемую для производства инъекционных лекарственных средств, могут быть включены показатели «Микробиологическая чистота» и «Бактериальные эндотоксины» или «Пирогенность». Субстанция может быть нестерильной, в процессе производства ГЛС присутствующие в ней бактерии могут быть удалены (стерилизующая фильтрация) или разрушены (финишная стерилизация). Содержание же бактериальных эндотоксинов должно быть заранее ограничено. Эндотоксины имеют сравнительно небольшую молекулярную массу и очень стабильны. Поэтому ни фильтрация, ни стерилизация не приводят к значительному снижению их содержания. Следовательно, если в субстанции содержание эндотоксинов было выше, чем допустимо для готовой формы, полученная серия может быть стерильной, но не пройдет по показателю «Бактериальные эндотоксины». Собственно это ответ на вторую часть вопроса. Стерильный препарат может иметь высокую концентрацию эндотоксинов, т.е. быть пирогенным. Естественно, такая ситуация ни в одном НД не может быть прописана. Это брак по одному из показателей качества.

При внутрипроизводственного контроля отобранные образцы испытываются не сразу, а собираются в течение нескольких дней. Существуют ли правила хранения таких проб?

Очень трудно однозначно ответить на этот вопрос. Дело в том, что отобранные образцы воды, смывы и пр. нельзя считать стерильными. Соответственно, в растворах может идти рост бактерий и изменение первоначальной концентрации эндотоксинов (как в большую, так и в меньшую сторону). Поэтому концентрация эндотоксина, определенная в пробе, взятой несколько суток назад, может не соответствовать первоначальной концентрации эндотоксина.

Самым простым вариантом решения этой проблемы была бы заморозка образцов. Однако, замораживание и последующее размораживание приводят к заметному снижению определяемой концентрации эндотоксинов (потери могут быть 20% и более от первоначальной концентрации). Можно посоветовать хранить образцы в холодильнике при 4°C и по возможности сокращать временной интервал между отбором образца и его анализом. Самым правильным было бы проведение нескольких модельных опытов с использованием растворов КСЭ разных концентраций, т.е. провести предварительную валидацию выбранной процедуры хранения образцов.

Как рассчитать значение МДР для препарата, который выпускается в виде порошка, например, Цефазолин 0,5г и 1,0г предельное содержание бактериальных эндотоксинов не более 0,15 ЕЭ/мг?

Для расчета значения МДР используют значения предельного содержания БЭ в исходном растворе и значение чувствительности ЛАЛ-реактива (λ). В данном случае форма выпуска - порошок, поэтому сначала надо определиться с тем, какая концентрация препарата будет в исходном растворе, другими словами, сколько добавить воды для растворения порошка. Например, вы хотите получить раствор цефазолина с концентрацией 200 мг /мл. Далее делается пересчет значения предельного содержания эндотоксинов для этого раствора: 200 мг/мл \times 0,15 ЕЭ/мг = 30 ЕЭ/мл. В формулу расчета МДР подставляется это значение и значение λ , например, 0,03125 ЕЭ/мл.

$$\text{МДР} = \frac{30 \text{ ЕЭ/мл}}{0,03125 \text{ ЕЭ/мл}} = 960$$

Почему в сертификатах анализа КСЭ разных серий могут быть указаны разные объемы воды, необходимой для получения исходного раствора?

В качестве Контрольного Стандарта Эндотоксина (КСЭ) при проведении ЛАЛ-теста, как правило, используются высокоочищенные препараты, полученные из E.Coli (обычно штаммов 0113:H10 или 055:B5). Во флаконе КСЭ содержится определенное количество лиофилизированного ЛПС, обычно 10 нг. Средняя активность этих препаратов составляет 10 ЕЭ/нг, но с каждой конкретной серией ЛАЛ-реактива она может быть немного больше или немного меньше. Для каждой серии ЛАЛ-реактива производитель проверяет эту активность по Международному Стандарту Эндотоксина и указывает ее значение в Сертификате Активности. Вот тут проявляется различный подход к сертификатам. Часть производителей считает, что если активность

находится в диапазоне 5 ЕЭ/нг -15 ЕЭ/нг, значение может быть округлено до 10 ЕЭ/нг. Соответственно, для подготовки исходного раствора КСЭ требуются одинаковые объемы воды - 5 мл. Другие, напротив, считают, что надо указывать реальное значение активности. Так, если одна серия КСЭ с разными сериями ЛАЛ-реактива проявляет активность, равную 5 ЕЭ/нг и 10 ЕЭ/нг, то для получения исходного раствора КСЭ (20 ЕЭ/мл) в первом случае к флакону надо добавить 2,5 мл, во втором 5 мл воды. Очевидно, что реальная активность исходного раствора будет в обоих случаях точно равна 20 ЕЭ/мл. Если использовать округленное значение, то добавлять можно было бы по 5 мл, но в первом случае раствор был бы намного слабее. При проверке чувствительности в этом случае, скорее всего, на λ был бы отрицательный результат, на 2λ - положительный. В принципе это приемлемо. Однако представляется, что лучше оперировать значениями реальной активности КСЭ, тем более, что для этого надо только внимательно прочитать, что написано в Сертификате анализа.

Каким образом можно проверить субстанции, нерастворимые в воде?

Единого ответа на этот вопрос нет. Вообще считается, что с помощью ЛАЛ-теста может быть проверен практически любой препарат. В определенных случаях сложности могут возникнуть с выбором метода и обработкой процедуры пробоподготовки. Что касается нерастворимых в воде препаратов, то проблема проверки сводится к выбору подходящего растворителя и к отработке процедуры пробоподготовки. В этом случае валидационные процедуры оказываются значительно более сложными, поскольку кроме исследования собственно препарата необходимо провести также и исследования растворителя. Надо показать, что используемый растворитель не оказывает влияния на ход реакции и не содержит эндотоксинов в определяемых в тесте количествах. Если для растворения используются органические растворители, например, спирты, то они явно могут оказывать ингибирующее влияние на ход реакции (попросту вызывать денатурацию белков лизата). Вопрос ингибирования может быть решен с помощью разведения водой. Если можно подобрать такое разведение растворителя, в котором он перестает ингибировать реакцию, а активная субстанция находится в приемлемой для анализа концентрации, то метод может быть валидирован относительно легко. Вообще же вопросы проверки нерастворимых препаратов, масляных растворов и прочих «проблемных» препаратов решаются для каждого препарата и метода индивидуально.

Новости ЛАЛ-Центра

Семинары

Мы начали проведение семинаров еще в 2002 году. С тех пор многое изменилось, в том числе лекционная часть, и сопроводительные документы, изменилась и наша лаборатория и ее оснащенность. С новыми возможностями появились и новые темы для занятий. Появилась возможность проведения стажировок, смысл которых заключается в более детальном и адресном разборе правил проведения анализа, например, для группы конкретных препаратов. Мы начали проводить семинары по кинетическим анализам. И все же основной цикл семинаров остался прежним, и посвящен он, конечно, гель-тромб тесту. Это семинары:

Семинар №1. «Проведение контрольных анализов в соответствии с требованиями ОФС "Бактериальные эндотоксины"». Основное внимание на этом семинаре уделяется правилам проведения контроля готовых лекарственных форм. Разбираются основные положения ОФС "Бактериальные эндотоксины", касающиеся правил проведения выходного контроля.

Семинар №2. «Введение раздела "Бактериальные эндотоксины" в Фармакопейную статью предприятия. Валидация метода». На семинаре обсуждается широкий круг вопросов, которые возникают при введении ЛАЛ-теста в фармакопейную статью на конкретный препарат. Значительное внимание уделено и заключительному этапу этой работы: составлению стандартных операционных процедур (СОПов).

К числу приятных изменений можно отнести и устоявшийся цикл проведения занятий. Семинары №1 проводятся ежемесячно, как правило, это вторая половина месяца. Семинар №2 проводится обычно один раз в квартал. Подробное описание программ семинаров можно найти на нашем сайте www.limulustest.ru.

Мы рады пригласить наших старых и новых коллег принять участие в этих семинарах.

Библиотека

Совершенно неожиданно для нас самих у нас сформировалась новая программа, которую мы пока условно называем «Библиотека специалиста». Началось все с формирования собственной библиотеки. Оказалось, что многие из выбранных нами книг интересны и нашим слушателям. Впрочем, им книги даже более интересны, поскольку, для нас литература, например, по микробиологии является исключительно справочной. Так сложилось, что ЛАЛ-тест достается, как правило, микробиологам в нагрузку, или можно сказать, в награду за их знание предмета исследования. Ну и естественно литература по микробиологии представляет вполне профессиональный интерес для микробиологов.

В результате сформировался пока не очень большой список (каталог и прайс) учебной и справочной литературы по вопросам, с которыми обычно сталкиваются сотрудники контрольно-аналитических лабораторий. Если программа приживется, этот список будет обновляться и расширяться.

Собственно говоря, подбор литературы по микробиологии или аналитической химии - дело, наверно, нужное и интересное. Но мы понимаем, что наш долг - формирование приличной библиотеки по нашей профессиональной тематике: ЛАЛ-тесту. Тут и жаловаться на отсутствие доступной литературы некому. Первым нашим шагом по решению этой проблемы был настоящий бюллетень. Несмотря на многие сложности, он все же состоялся, и в той или иной степени в нем уже нашли отражения многие вопросы по теории и практике метода. Сейчас мы думаем о втором этапе: издании книг и методических пособий или практикумов по ЛАЛ-тесту. Задача довольно масштабная, но мы надеемся, что сможем реализовать и эту программу.

«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.

Для оформления подписки просим отправлять заявки:

ООО «ЛАЛ-Центр» 117105, г. Москва, ул. Нагатинская, д. 3а, офис Б-421.

Тел.: (495) 517-40-37, факс: (495) 223-07-29. E-mail: LALNews@Limulustest.ru

Бюллетень зарегистрирован в Министерстве РФ по делам печати, телерадиовещания и средств массовых коммуникаций. Свидетельство о регистрации № 77-16115 от 11.08.03 г.

Главный редактор: Ситников А.Г.

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

Печать: Офсет; Объем: 8 стр.; Тираж: 400 экземпляров.

Отпечатано в типографии ООО «Копиринг», Москва.



ЛАЛ-ЦЕНТР

О П Р Е Д Е Л Е Н Н Е
БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭНДОТОКСИНОВ