

Колонка редактора

В предыдущих номерах нашего бюллетеня мы не раз касались вопросов, связанных с валидацией метода и правилами подготовки к анализу. Валидация - это процедура многогранная и часто довольно сложная. К сожалению, возникают ситуации, когда по разным причинам техника подготовки образца для анализа может сильно отличаться от простого разведения водой. В этом случае приходится тратить много времени и сил на проведение предварительных исследований и на отработку процедуры пробоподготовки.

В первой статье этого номера мы попытались сделать обзор проблем, с которыми можно столкнуться при анализе препаратов, которые так и называют «проблемные». К сожалению, нет и не может быть единого подхода к решению этих проблем. Для каждого препарата или модификации метода приходится искать индивидуальные решения. Алгоритм этих решений в первом приближении един, но в каждой конкретной ситуации могут возникать дополнительные вопросы, пути решения которых приходится искать самостоятельно. Вторая статья этого номера как раз и является иллюстрацией такого случая.

Мы надеемся, что тема «проблемных» образцов будет интересна для наших читателей. Очень хотелось бы, чтобы специалисты, которые в своей работе сталкивались со сложностями в подготовке и проведении анализа, поделились бы своим опытом.

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

Факторы, мешающие реакции. Проблемные образцы.

Ситников А. Г.

На сегодняшний день технология проведения ЛАЛ-теста настолько хорошо отработана и опробована, а вариантов различной пробоподготовки предложено такое количество, что уже почти аксиомой стало утверждение «с помощью ЛАЛ-теста можно проверить практически любой лекарственный препарат». Однако в ряде случаев проведение такой проверки может представлять собой определенные проблемы.

Понимание этих проблем может быть значительно облегчено, если сначала рассмотреть ту теоретическую модель, на которой построена проверка содержания эндотоксина с помощью ЛАЛ-теста. Модель эта основана на реакции ЛАЛ-реактива с эталонным стандартом эндотоксина, растворенным в воде. Т.е. в чистом виде это реакция, в которой участвуют только ЛАЛ-реактив и эндотоксин. Состав ЛАЛ-реактива оптимизирован, т.е. в него введены катионы, являющиеся кофакторами реакции, реактив может быть забуферен и т.д. Эндотоксин представляет собой высокоочищенный препарат, липополисахарид грамотрицательных бактерий, причем конкретного штамма. В качестве растворителя для эндотоксина используется вода для ЛАЛ-теста. Таким образом, в реакционной смеси присутствуют два компонента: ЛАЛ и КСЭ, при этом ЛАЛ - это сложная смесь белков и различных солей. Реакция идет в оптимальных для нее условиях: значение pH, оптимальный баланс солей. Поведение этой системы предсказуемо, соответственно, вполне предсказуемы и результаты, которые при нормально поставленной технике эксперимента имеют достаточно высокую точность, гораздо более высокую, чем заявленный диапазон ошибки опыта в 50-200%. В общем, работа с очищенным эндотоксином демонстрирует идеальное совпадение теоретических расчетов и практических результатов.

Когда же эту аналитическую модель применяют к испытуемому лекарственному средству, от идеальной модели остается только ЛАЛ-реактив. Вместо чистой воды сложная смесь активных и вспомогательных веществ, наполнителей и т.д. Если же в препарате присутствуют эндотоксины, то это не высокоочищенный КСЭ, а случайные примеси «естественных эндотоксинов» неизвестного происхождения (уж точно не от одного штамма грамотрицательных бактерий). Все это может влиять на сложную биохимию реакции ферментативных белков лизата или на поведение молекул эндотоксина и привносит проблемы, которые приходится решать отдельно для каждого конкретного лекарственного средства. Сегодня, описывая эти проблемы, наиболее часто используют определение «Мешающие факторы». Этот термин принят всеми Фармакопейными статьями. И хотя данное определение очень аморфно, в эту группу без терминологических метаний может быть отнесено все, что не дает нормально работать, в том числе и рН, и плохая растворимость проверяемого препарата, и неудобная для проведения анализа форма выпуска, например, в виде масляного раствора.

Довольно сложным делом оказывается определение причин, усложняющих процедуру определения эндотоксина в том или ином лекарственном препарате. Традиционно считается, что наиболее удачная классификация этих причин приведена Джеймсом Купером (Cooper J F). Он приводит следующие группы проблем, которые вызывают как ингибирование, так и усиление реакции:

- Неоптимальное значение рН.
- Агрегация или адсорбция эндотоксинов.
- Неоптимальная концентрация катионов.
- Воздействие на ферменты и белки коагуляционной системы.
- Неспецифическая активация ЛАЛ-реактива.

Имеет смысл рассмотреть эти позиции более подробно.

Неоптимальное значение рН - это наиболее частая причина «ингибирования» реакции, она же наиболее легко решаемая. Вопрос влияния значения рН испытуемого образца на реакцию мы разбирали в одном из последних номеров («ЛАЛ-тест» №3, 2006), поэтому подробно этой теме касаться не имеет смысла. Единственное, что хотелось бы отметить еще раз: лучшим способом решения проблемы рН является разведение водой для ЛАЛ-теста. В случае явной необходимости коррекции рН, в первую очередь, следует использовать буферные растворы для разведения препарата. С осторожностью надо

подходить к доведению рН с помощью растворов кислоты или основания.

Агрегация или адсорбция эндотоксинов. Эндотоксины или липополисахариды, ЛПС, это сложные молекулы, одновременно проявляющие гидрофильные и гидрофобные свойства, они не образуют истинных растворов, а в разных средах формируют сложные агрегаты различной формы и размера. Биологическая активность ЛПС зависит от размеров этих агрегатов. Катионы, находящиеся в растворе, оказывают большое значение на статус эндотоксина в растворе. Так, двухвалентные катионы, такие как Mg^{2+} Mn^{2+} или Ca^{2+} нейтрализуют отрицательный заряд ЛПС и являются центрами, вокруг которых образуются крупные агрегаты ЛПС. Это в принципе неплохо, но очень крупные агрегаты замедляют реакцию, во всяком случае, она идет не так, как в модельной среде «ЛАЛ + эндотоксин в воде». Другая сторона вопроса - это адсорбция ЛПС на поверхности контейнеров. В результате этой адсорбции молекулы эндотоксина «выходят из игры» и не приводят к гелированию ЛАЛ-реактива. Именно поэтому в анализе из-за высокой степени адсорбции не используется пластиковая посуда.

К этому перечню причин получения ложноотрицательных результатов можно добавить еще одну. Долгое хранение подготовленных растворов положительного контроля крайне нежелательно. Очищенный липополисахарид значительно менее стабилен по сравнению с «естественными» эндотоксинами. Поэтому КСЭ в растворе может быстро разрушаться, что приводит к получению отрицательных результатов в положительных контролях.

Неоптимальная концентрация катионов подразумевает недостаток или избыток двухвалентных катионов, которые являются кофакторами реакции. Это упомянутые выше Mn^{2+} Ca^{2+} и особенно Mg^{2+} . Эти катионы добавляя в ЛАЛ-реактив в процессе его производства, что приводит к значительному увеличению его чувствительности.

Поэтому проверка препаратов, обладающих хелатирующим действием, таких как гепарин, ЭДТА или цитрат натрия, может давать ложные результаты из-за снижения активной концентрации этих ионов в реакционной смеси. Это может приводить к потере активности ферментной системы (как вследствие изменения конформации ЛПС, так и вследствие снижения активности белков лизата). Решением проблемы может быть разведение испытуемого препарата. Альтернативный вариант, предлагаемый многими производителями ЛАЛ-реактива, - добавление специальных растворов,

содержащих ионы Mg^{2+} , для компенсации недостатка катионов.

Если катионов слишком много, это тоже плохо, например, Ca^{2+} может серьезно ингибировать реакцию в высоких концентрациях (6-50 мМ). Подход к разрешению этой проблемы довольно курьезный. Конечно, и в этом случае лучшим решением оказывается дежурный вариант: разведение препарата до концентрации $CaCl_2$ примерно 1-2 мМ. Однако, наиболее интересен другой вариант решения этой проблемы: добавление веществ, обладающих хелатирующим действием, например, ЭДТА.

Можно отметить, что в отличие от ионов Ca^{2+} избыток ионов Mg^{2+} не приводит к ингибированию реакции.

Воздействие на ферменты ЛАЛ-реактива. В группу веществ, которые воздействуют на ферменты лизата, могут быть отнесены вещества, оказывающие непосредственное деструктивное воздействие на ферментативные белки ЛАЛ-реактива, например, органические растворители. Также в эту группу, без всякого сомнения, могут быть отнесены и ингибиторы свертывания, воздействующие на сериновые протеазы ЛАЛ-реактива. Поэтому определенные сложности могут возникнуть при проверке плазмы или сыворотки, в которых могут содержаться естественные ингибиторы свертывания, оказывающие на систему свертывания ЛАЛ-реактива такое же действие, как и на систему свертывания человека. Наиболее распространенный способ устранения этих явлений: разведение и нагревание образцов плазмы для денатурации факторов, которые могут оказывать нежелательное воздействие на реакцию.

Неспецифическая активация ферментов ЛАЛ-реактива - это активация ферментной системы под действием веществ, отличных от эндотоксинов. Такая неспецифическая активация приводит к получению положительного результата в отсутствие эндотоксинов. Ложноположительные результаты могут вызывать фрагменты полисахаридного матрикса клеточных стенок грамположительных бактерий, (1→3)- β -D-гликаны. Основной сложностью в ситуации неспецифического гелирования является то, что такие результаты очень трудно правильно интерпретировать. Положительные результаты воспринимаются как свидетельство присутствия эндотоксина с соответствующими выводами. В том случае, если есть подозрение, что положительные результаты вызваны присутствием в проверяемом образце β -гликанов, можно использовать специальные препараты, которые снимают их действие.

Следует отметить, что большая часть перечисленных проблем приводит к тому, что обычно называют ингибированием реакции. И пусть это не очень точный термин, явление ингибирования (торможения, блокирования реакции, денатурации белков лизата и т.д.) встречается очень часто и представляет наибольшую опасность, поскольку в случае неверной интерпретации результатов возможен выпуск в реализацию препаратов, потенциально опасных для человека.

Классификация, приведенная Купером, считается одной из наиболее удачных, однако и она не может быть признана абсолютно исчерпывающей. Так к перечисленному списку позже был добавлен еще один пункт, к которому были отнесены белковые препараты, способные маскировать присутствие эндотоксинов. Вполне вероятно, что и в дальнейшем этот список будет расширяться.

Вообще, приходится констатировать, что очень сложно сформулировать стройную систему классификации по единообразной системе определений. Можно попытаться провести разделение не по причинам, вызывающим сложности при проверке, а по группам веществ, эти проблемы вызывающих. Такая классификация возможно даже более информативна, поскольку она описывает не природу ингибирования/усиления в общем виде, а несколько более конкретно определяет, какие группы веществ (препаратов) или какие свойства этих препаратов способны вызвать затруднения при проверке. Часто в литературе можно встретить и соответствующее определение «проблемные препараты». К этой группе можно отнести любой препарат или активную субстанцию, проверка которых сопряжена с трудностями. Есть группы препаратов, которые можно было бы назвать проблемными не столько из-за их влияния на реакцию, сколько из-за сложности их предварительной подготовки к проведению анализа. К таким проблемным препаратам можно отнести:

- Белки.
- Органические растворители.
- Поверхностно-активные вещества.
- Нерастворимые вещества (препараты или субстанции).
- Масла или масляные растворы.
- Препараты с высокой концентрацией ионов.
- Препараты, обладающие хелатирующим действием.

Несложно заметить, что данная классификация отчасти повторяет пункты, приведенные выше. Разница в том, что сгруппированные таким образом вещества или препараты предполагают относительно унитарные способы решения вызываемых ими проблем. Так, например, подходы к

пробоподготовке препаратов, выпускаемых в виде масляных растворов, могут быть одинаковыми вне зависимости от характера активного вещества, растворенного в масле. Алгоритм решения вопросов возможности применения органических растворителей вне зависимости от характера растворяемых с их помощью субстанций или готовых форм может быть более или менее одинаковым. Уже одно понимание того, что активная субстанция может связывать катионы, позволяет еще до начала исследований подобрать наиболее приемлемую стратегию пробоподготовки. Логическим следствием такой группировки должна быть систематизация информации по приемлемым способам предварительной обработки, вариантам пробоподготовки для каждой из упомянутых групп. Такой банк данных по разным стратегиям проведения анализа может быть очень полезным в практической работе.

Заключение

Любая классификация, даже самая совершенная, представляет только академический интерес, если она лишь заявляет о проблеме. С практической точки

зрения наибольший интерес представляет не раскладывание проблем по полочкам, а работоспособные сценарии разрешения этих проблем. Это, наверное, самое важное. Ведь недостаточно сказать, что практически каждый препарат может быть проверен. Важно знать: как подготовить препарат к проверке, как правильно провести анализ.

Мы полагаем, что эта статья станет началом нового цикла публикаций, которые будут посвящены практическим решениям, связанным со специальными приемами пробоподготовки так называемых «проблемных препаратов».

Литература

Cooper J.F. "Resolving LAL Test interferences." *J Parenter Sci Technol* 1990 Jan;44(1):13-15

Pearson F.C. "Pyrogens: Endotoxins, LAL testing and depyrogenation." *Marcel Dekker Inc.* 1985. N.Y.

Williams K.L. "Endotoxins: Pyrogens, LAL Testing and Depyrogenation, Third Edition". *Informa Healthcare* 2007 N.Y.

Техника работы

Использование этилового спирта при проведении ЛАЛ-теста.

Тутнова А.Д., Демидова В.В., Шаповалова О.В., Долгова Г.В.

При проведении анализа качества по показателю «Бактериальные эндотоксины» подготовка испытуемых образцов, как правило, осуществляется с помощью разведения их водой для ЛАЛ-теста. В тех редких случаях, когда вместо воды используется другой растворитель, предметом валидации оказывается как сама процедура пробоподготовки, так и используемый растворитель. Пример такого исследования приведен в настоящей статье.

В статье разбирается ряд вопросов, с которыми столкнулись авторы при отработке технологии пробоподготовки ряда субстанций, растворимых только в этиловом спирте. Следует обратить внимание на то, что в контексте статьи испытуемые препараты упоминаются только как абстрактные «субстанции». Конкретизация данных в этом случае совершенно бессмысленна, поскольку на результаты анализа очень большое влияние могут оказывать как сами испытуемые препараты конкретного производителя, так и свойства

ЛАЛ-реактивов, используемых в опыте. Приведенные в статье таблицы также следует рассматривать только как иллюстративный материал. В них суммированы результаты многих опытов, повторов и перестановок.

В настоящей статье нашли отражение результаты опытов, проведенных в ЛАЛ-центре, секторе фармакологии ФГУП «ГНЦА» и лаборатории фармакологии ИСКЛС.

Стратегия проверки нерастворимых препаратов может быть различной, в значительной степени она зависит от используемого метода анализа, также приходится учитывать и назначение проверяемого препарата. Так, если проведение анализа суспензии или эмульсии с помощью гель-тромб теста не имеет технических ограничений, то фотометрическому анализу, напротив, могут подвергаться только истинные растворы.

Если проверяется готовая форма, которая человеку вводится в виде суспензии, то проведение ЛАЛ-теста для суспензии в какой-то мере может считаться моделью реакции *in vivo*. Впрочем, вопрос о том, насколько правомерна или корректна такая проверка, можно считать открытым.

Совершенно иная ситуация складывается с проверкой нерастворимых субстанций.

Субстанции в процессе производства могут претерпевать ряд изменений. В готовой же форме эта субстанция может быть в виде водорастворимой соли, может быть переведена в масляный раствор и т.д. Следовательно, проверка нерастворимой субстанции в виде суспензии может быть слишком поверхностной и не будет отражать реального содержания эндотоксинов, которые гипотетически могут в готовой форме иметь более активный статус.

Часто в качестве растворителей используются различные органические растворители. И хотя в настоящей статье разбирается ситуация, когда в качестве растворителя субстанции использовался спирт этиловый, предложенный алгоритм может быть применен к иным растворителям. Общие требования к специальным растворам, которые могут быть использованы в анализе, сформулированы в ОФС. Эти растворы «... не должны содержать бактериальных эндотоксинов в определяемых количествах и не должны оказывать влияния на ход реакции...». Несмотря на лаконичность этой формулировки, круг вопросов, которые приходится решать для убедительной демонстрации соответствия растворителя этим требованиям, оказывается довольно широким.

Конечно, главным вопросом является выяснение того, в какой степени растворитель оказывает влияние на активность ферментной системы ЛАЛ-реактива, и не изменяет ли он активность (свойства) эндотоксинов. Вопрос же присутствия эндотоксинов в самом растворителе по понятным причинам вынесен за скобки, и специальных исследований этой возможности не проводилось.

Таким образом, в настоящих экспериментах выясняли возможность проведения ЛАЛ-реакции в растворителе, а именно в растворе этилового спирта, определяли концентрацию спирта, в которой он не оказывает ингибирующего влияния на ход реакции, а также степень воздействия растворителя на активность бактериальных эндотоксинов, если таковые присутствуют в проверяемом препарате.

Определение максимальной неингибирующей концентрации спирта этилового.

Спирт этиловый 95% ингибирует реакцию ЛАЛ-реактива с бактериальными эндотоксинами, точнее, высокая концентрация спирта приводит к денатурации белков лизата амебоцитов, соответственно, никакой реакции не происходит даже в присутствии эндотоксинов. Однако по мере разведения спирта водой концентрация его снижается, и ингибирующее действие снимается.

Целью первого этапа экспериментов было определение значения максимальной

неингибирующей концентрации этилового спирта, в которой возможно проведение анализа. Для исследования возможности проверки спиртовых растворов различной концентрации в ЛАЛ-тесте была проверена серия разведений спирта этилового в воде для ЛАЛ-теста. Испытаниям были подвергнуты следующие растворы этилового спирта:

Степень разведения	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16
Концентрация этилового спирта	95%	47,5%	23,7%	11,9%	5,9%

В качестве положительного контроля испытуемого образца (контроля ингибирования) к каждому из этих разведений был добавлен раствор КСЭ до получения конечной концентрации, равной 2λ. Эндотоксин в такой концентрации должен вызвать образование плотного геля, в противном случае можно сделать заключение, что препарат в проверяемой концентрации ингибирует реакцию ЛАЛ-реактива и эндотоксина. Результаты анализов приведены в виде сводной таблицы:

Разведения этилового спирта водой для ЛАЛ-теста					
№	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-
Положительный контроль (Разведения этилового спирта водой для ЛАЛ-теста с КСЭ 2λ)					
№	1/1+	1/2+	1/4+	1/8+	1/16+
1	-	-	-	-	+
2	-	-	-	-	+

Полученные результаты указывают на то, что проверка спиртовых растворов в гел-тесте возможна, начиная с разведения спирта в 16 раз водой для ЛАЛ-теста, что соответствует его концентрации, равной 5,9%. Данная концентрация может считаться максимальной неингибирующей концентрацией, в которой спирт не мешает проведению анализа.

При осуществлении рутинных анализов целесообразно испытывать растворы, в которых концентрация спирта ниже указанной «Максимальной неингибирующей концентрации», то есть в концентрациях, меньших 5,9%. Если пользоваться понятием степени разведения, то разведение спирта в 16 раз является его «Минимальным неингибирующим разведением», и проведение анализа возможно для спирта в этом или в большем разведении.

Опасность фонового содержания бактериальных эндотоксинов в 95% этиловом спирте маловероятна, что и подтвердила

проверка содержания бактериальных эндотоксинов в данных опытах, поскольку в разведении 1/16 гель не образовывался.

Исследование влияния спирта этилового на активность бактериальных эндотоксинов.

На второй стадии экспериментов исследовали влияние этилового спирта на активность бактериальных эндотоксинов.

Поскольку для разведения субстанции используется органический растворитель, нельзя исключить вероятность того, что этот растворитель изменяет структуру липополисахарида или влияет на его биологическую активность. Если такое действие имеет место, то в процессе растворения и подготовки образца к анализу будет происходить разрушение эндотоксинов в случае их присутствия в испытуемой субстанции. В итоге велик риск получения ложноотрицательных результатов, которые будут восприниматься, как свидетельство отсутствия эндотоксинов.

Проверить такую возможность можно только после проведения модельного опыта с использованием стандартизованного препарата КСЭ. Для этого при подготовке исходного раствора КСЭ вместо установленного в Сертификате количества воды в качестве растворителя во флакон с лиофилизированным КСЭ добавляли спирт этиловый 95%.

Далее из полученного исходного раствора КСЭ с расчетной активностью 20 ЕЭ/мл готовили разведения эндотоксина для проведения опыта по схеме анализа «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива». При подготовке разведений такого раствора КСЭ необходимо было учитывать и то, что во всех поставленных в опыт растворах КСЭ концентрация спирта должна быть не более 5,9%.

Первое разведение исходного раствора эндотоксина в 10 раз делали на спирте этиловом, дальнейшие разведения готовили на воде для ЛАЛ-теста. В растворе с концентрацией КСЭ, равной 4λ содержание спирта составляло 5,9%, т.е. достигло значения неингибирующей концентрации. В первом опыте (1) проверяли растворы КСЭ с концентрациями 4λ, 2λ, λ, 0,5λ, и 0,25λ, в которых концентрация спирта составляла от 5,9% до 0,37%.

В другом варианте опыта (2) все растворы КСЭ от 2λ до 0,25 λ готовили на спиртовом растворе 5,9%.

В опыте (1) были получены следующие результаты:

<i>Разведения раствора КСЭ на этиловом спирте водой для ЛАЛ-теста</i>						
Концентрация КСЭ	4λ	2λ	1 λ	0,5λ	0,25λ	К-
Концентрация этилового спирта [%]	5,9	2,95	1,48	0,74	0,37	5,9
1	+	+	+	-	-	-
2	+	+	+	-	-	-
3	+	+	+	-	-	-
4	+	+	+	-	-	-

В опыте (2) были получены такие результаты:

<i>Разведения раствора КСЭ на растворе этилового спирта с концентрацией 5,9%</i>					
Концентрация КСЭ	2λ	1 λ	0,5λ	0,25λ	К-
Концентрация этилового спирта [%]	5,9	5,9	5,9	5,9	5,9
1	+	+	-	-	-
2	+	+	-	-	-
3	+	+	-	-	-
4	+	+	-	-	-

Таким образом, в обоих вариантах опытов были получены аналогичные результаты, подтверждающие заявленную чувствительность используемого ЛАЛ-реактива. Это позволило сделать вывод о том, что использование этилового спирта не приводит к разрушению КСЭ или уменьшению его биологической активности. Следовательно, испытуемые препараты, которые в процессе пробоподготовки растворяют в спирте этиловом, могут быть проверены в ЛАЛ-тесте без риска получения ложноотрицательных результатов.

Возможность проведения анализа в случае рекристаллизации активной субстанции.

Кроме перечисленных выше вопросов в ходе отработки методики проверки некоторых субстанций возникла дополнительная проблема. Эта проблема связана с естественными ограничениями метода, одним из которых является ингибирование со стороны растворителя и значение МДР. Так, например, если МДР равен 1/200, то для проведения опыта остается очень узкий «зазор» разведений исходного спиртового раствора от 1/20 (ограничение по спирту) до 1/200 (значение МДР). Очевидно, что все разведения должны быть сделаны на воде. Если в этих разведениях объемная доля воды оказывается слишком большой, то происходит образование осадка, т.е. рекристаллизация активной субстанции. Это неизбежное зло, с которым приходится мириться, поскольку при большей объемной доли спирта анализ вообще невозможен. К сожалению, нельзя полностью исключить гипотетическую

возможность связывания эндотоксинов при рекристаллизации и выхода их из раствора вместе с осадком. Еще раз надо подчеркнуть, что осадок не является техническим ограничением для гель-трома теста. Опасность представляет вовсе не мелкодисперсная взвесь субстанции, а возможная инактивация эндотоксинов и, вследствие этого, получение ложноотрицательных результатов.

Принимая во внимание последнее обстоятельство, необходимо было выяснить, связываются ли эндотоксины при образовании осадка. С этой целью к исходному раствору субстанции, приготовленному в 95% этиловом спирте, добавляли КСЭ. Концентрация КСЭ в исходном растворе подбиралась таким образом, чтобы в разведениях, возможных для проведения анализа она составляла 2λ, λ и так далее. Так, если возможный диапазон проверки определялся разведениями от 1/20 до 1/200, в исходном растворе концентрацию КСЭ доводили до 40λ. Далее этот исходный раствор, содержащий КСЭ, разводили с помощью воды для ЛАЛ-теста. В процессе этого разведения в растворе образовывался осадок в виде мелких кристаллов испытуемого препарата. Несмотря на это, разведения продолжали до концентраций КСЭ, равных 2λ, λ, 0,5λ и 0,25 λ (разведения, равные 1/20, 1/40, 1/80 и 1/160).

Если предполагать, что эндотоксин не выводится из раствора вместе с осадком, то можно ожидать, что положительные результаты должны быть получены хотя бы для концентрации КСЭ, соответствующей 2λ. В опыте были зарегистрированы следующие результаты:

Концентрация КСЭ в рекристаллизованной суспензии субстанции, исходно растворенной на этиловом спирте					
№	2λ	1 λ	0,5λ	0,25λ	К-
1	+	+	-	-	-
2	+	+	-	-	-

Полученные результаты позволяют с большой степенью уверенности считать, что эндотоксины остаются в растворе и при продолжении разведения исходного спиртового раствора водой для ЛАЛ-теста. Даже если отношение спирт/вода за счет увеличения объемной доли воды изменяется таким образом, что происходит рекристаллизация активной субстанции, эндотоксин остается в растворе (водной фазе) и может быть определен в опыте с ЛАЛ-реактивом. Безусловно, желательным является проведение проверки испытуемой субстанции в истинном растворе, но даже если происходит ее рекристаллизация, это не

исключает возможность проведения контрольного анализа с помощью ЛАЛ-теста.

По приведенным примерам необходимо сделать еще одно важное замечание. В ряде опытов с разведениями КСЭ концентрация спирта была переменной, учитывалось только то, что она должна быть не более 5,9%. Вполне возможны ситуации, когда при проведении аналогичных анализов может возникнуть необходимость подготовки различных растворов КСЭ или испытуемой субстанции при единой концентрации растворителя.

Заключение

Цикл исследований, связанных с растворителем является составной частью валидационных процедур. Эти исследования позволяют определить те дополнительные ограничения, которые связаны непосредственно с растворителем, отличным от обычной воды для ЛАЛ-теста. Остальная часть работы не отличается от обычных предварительных анализов, в которых выясняются особенности поведения испытуемого препарата в опыте. В том числе и ингибирование, связанное со свойствами самого препарата. Завершаются эти исследования проведением анализа «Мешающие факторы». Разведение, выбранное для этого анализа, должно отвечать, как минимум, трем требованиям:

- В этом разведении растворитель не должен оказывать ингибирующего влияния на ход реакции.
- В этом разведении испытуемый препарат (субстанция) не должен оказывать ингибирующего действия на ход реакции.
- Выбранное для проведения рутинных анализов разведение должно обеспечивать приемлемый фактор безопасности проверки (как минимум, должно быть равно 1/2МДР).

Процедура же проведения рутинного анализа будет мало отличаться от проверки обычных препаратов. Единственным исключением будет то, что на первом этапе препарат (навеска субстанции) будет разводиться не водой, а спиртом.

Нерастворимые в воде препараты могут быть отнесены к группе «проблемных препаратов». Как видно из приведенного примера, способы решения этих проблем не являются таким уж и сложными. Правда они могут занять много времени и оказываются привязанными к конкретному препарату или растворителю. Как уже не раз упоминалось, проведение пробоподготовки, отличной от простого разведения препарата водой, порождает трудности. К сожалению, каждый раз эти проблемы по-своему уникальны и должны решаться в индивидуальном порядке.

CHARLES RIVER ENDOSAFE: реактивы и материалы для ЛАЛ-теста**ЛАЛ-реактив Endosafe во флаконах на 10 определений.**

В одном из предыдущих номеров мы рассказывали о ЛАЛ-реактиве Endosafe КТА, предназначенном для проведения анализа двумя различными методами: гель-тромб тестом и кинетическим турбидиметрическим тестом. Реактив под названием Endosafe (без КТА) является его «младшим братом» и предназначен только для проведения анализа гель-тромб тестом. С точки зрения потребителя свойства этого реактива ничем не отличаются от свойств реактива КТА. Этот реактив также забуферен, получающийся гель очень устойчив и не оставляет места для двусмысленных толкований результатов. Ряд чувствительностей для этого реактива также стандартный: от 0,03 ЕЭ/мл до 0,25 ЕЭ/мл. Собственно, единственное отличие данного реактива от реактива КТА заключается в том, что он выпускается не только во флаконах по 5,2 мл (флаконы на 50 определений), но и во флаконах по 1,2 мл (флаконы на 10 определений). Это обстоятельство делает реактив Endosafe очень привлекательным для лабораторий с малой загрузкой анализами. Такая фасовка оказывается очень удобной для лабораторий, которые должны проводить анализы, но проводят их редко, в небольшом объеме и не систематически. Малая потребность заставляет заказывать единичные флаконы на 50 определений, однако, в течение одного месяца рационально использовать такие флаконы сложно. Особенно жалко, что приходится мириться с неизбежными потерями, связанными с хранением и повторным использованием замороженного реактива.

В таких ситуациях флаконы с малым содержанием ЛАЛ-реактива оказываются наиболее предпочтительными. Эти флаконы

поставляются в коробках по 6, 12 и даже по 100 флаконов. Конечно, наиболее интересна упаковка из 6 флаконов по 1,2 мл (60 определений). С ее помощью можно сделать около 7-8 индивидуальных качественных анализов. Это примерно соответствует количеству определений, которое можно сделать с помощью одного флакона на 5,2 мл (50 определений или 6-7 качественных анализов). Зато мелкая фасовка (1,2 мл) позволяет значительно сократить потери, связанные с хранением вскрытого флакона. При малом количестве анализов это означает практически «безотходное» использование реактива.

С экономической точки зрения себестоимость одного анализа для упаковки из 6 флаконов по 1,2 мл представляет собой эквивалент стоимости единичного флакона на 5,2 мл в пересчете на количество определений.

Мы уже отмечали, что предлагаемый ряд реактивов компании Charles River Endosafe отличается хорошей продуманностью и гибкостью. Упомянутые в настоящей статье флаконы на 10 определений еще одно этому подтверждение.

В заключении необходимо обратить внимание на то, что реактив в таких мелких фасовках очень удобен при малой потребности в проводимых анализах. Единственное необходимое дополнение: экономическая целесообразность заказа ЛАЛ-реактива во флаконах по 1,2 мл сохраняется при потребности примерно в 1 - 5 упаковок (6 флаконов по 1,2 мл) на квартал. При более интенсивной работе преимущества, присущие мелким фасовкам, теряются, и экономически более выгодными становятся флаконы на 5,2 мл в упаковках по 6 или 12 флаконов.

«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 И Е
БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭНДОТОКСИНОВ