

19 декабря 2022

## Использование индикаторов эндотоксинов для верификации сложной пробоподготовки.

*Специальные препараты - индикаторы эндотоксина могут быть использованы для самых разных задач – от валидации процедур депирогенизации до моделирования загрязнений эндотоксинами. В данной работе они были использованы для оценки пригодности сложной техники пробоподготовки.*



При проведении проверки на бактериальные эндотоксины сложного препарата, представляющего собой суспензию цефалоспоринового антибиотика в масле, возникла проблема с пробоподготовкой. Попытка добавить воду и получить раствор препарата, который можно было бы поставить в опыт привела к формированию бесформенного осадка. Для анализа препарат надо развести в 4000 раз (с имеющимся лал-реактивом определенной

чувствительности), но выпадение осадка это очень высокий риск потери определяемой концентрации эндотоксина, поэтому прямое разведение исходного препарата водой не приемлемо.

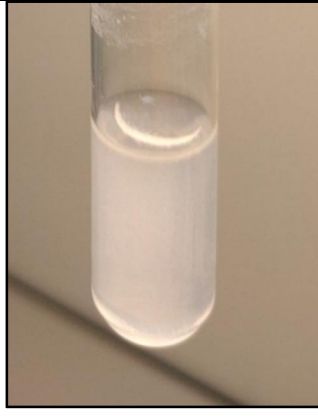
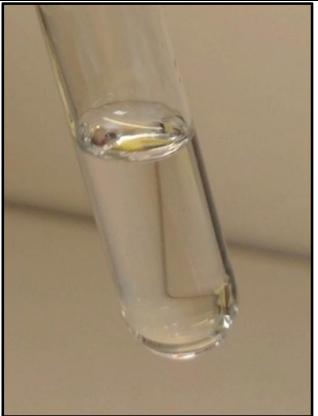
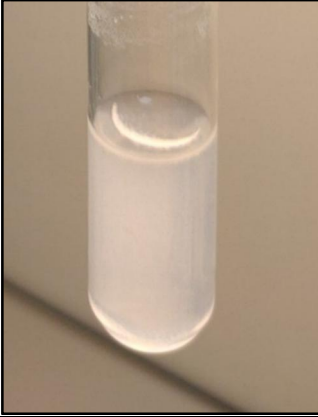


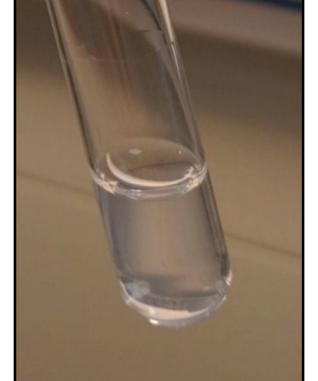


Из возможных решений – надо подобрать какой-нибудь проходящий растворитель, который позволил бы относительно спокойно снизить концентрацию активного вещества и масла, чтобы после этого можно было бы перейти к разведению водой.

Были испробованы два растворителя - спирт этиловый 95% и диметилсульфоксид, ДМСО. Первые несколько шагов разведений препарата делали на растворителях, затем переходили на разведение водой.

Оба растворителя дали приличные результаты при оценке внешнего вида растворов в степени разведения 1/10 и 1/100. Начиная с разведения 1/100 в растворителе можно уже переходить на разведения водой (не образуется осадка), сначала растворы имеют слабую опалесценцию, при дальнейшем разведении до 1/4000 раз опалесценция пропадает, и полученные растворы совершенно прозрачные.

Разведение	Спирт этиловый	ДМСО
1/10 разведение в растворителе		

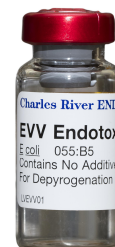
<p>1/100 разведение в растворителе</p>		
<p>Разведение водой для ЛАЛ-теста до 1/1000</p>		
<p>Разведение водой для ЛАЛ-теста до 1/4000</p>		

Так мы довольно быстро нашли технически приемлемое решение проведения пробоподготовки для анализа. Однако, оставался один вопрос – как такого рода обработка влияет на возможность определения эндотоксинов? Необходимо было экспериментально доказать, что сложная обработка, включающая переход масляной суспензии в водную фазу не влияет на регистрируемую концентрацию эндотоксина.

Сразу надо отметить, что само по себе использование спирта этилового и ДМСО в практике ЛАЛ-теста достаточно хорошо исследовано. Известно, что сами растворители никак не влияют на активность эндотоксинов в растворах, единственное ограничение по использованию этих растворителей – для проверки концентрация самого растворителя должна быть снижена как минимум до 5%. В нашем исследовании концентрация растворителей снижалась в 40 раз, т.е. составляла 2.5%, что вполне приемлемо для проведения анализа.

Ответ на вопрос, какой из растворителей в данном случае может считаться более предпочтительным, можно получить после модельного эксперимента, в котором к испытуемому препарату сначала был бы добавлен эндотоксин в известной концентрации, а затем после всех процедур растворения и перевода из одной фазы в другую, эта ожидаемая концентрация эндотоксина была бы определена в опыте. Для такой работы нужны специальные очищенные препараты эндотоксина – индикаторы эндотоксина, ИЭ.

Мы использовали индикаторы эндотоксина EVV2K с заявленной активностью  $\geq 2000$  ЕЭ/флакон (Endotoxin indicators 2 000 EU) производства Charles River Endosafe, США.



Концентрация эндотоксина во флаконе нас вполне устраивала, так как общее разведение растворов должно было быть в 4000 раз, что для исходной концентрации в 2000 ЕЭ/мл давало вполне определяемую концентрацию итогового раствора примерно 0,5 ЕЭ/мл.

Естественно, все измерения лучше проводить с помощью кинетических анализов. Эти анализы позволяют проводить измерение концентрации эндотоксинов в широком диапазоне (использовали калибровочную кривую 0,005 – 5 ЕЭ/мл) и опыт для параллельно приготовленных растворов можно проводить в одно измерение на одной планшете, что существенно снижает неопределенность результатов.

### **Общий принцип проверки.**

1. В опыте нужно оценить содержание эндотоксинов во флаконе ИЭ после разведения водой. Это будет референсное или опорное значение концентрации эндотоксина во флаконе. Для этого флакон индикатора эндотоксина разводят водой, в нашем случае 1 мл воды для ЛАЛ-теста, и опытным путем определяют полученную концентрацию эндотоксина.

*Примечание. Содержание эндотоксина во флаконах ИЭ указано примерно (обычно производители пишут «не менее XXXX ЕЭ/во флаконе»), поэтому в любом опыте необходимо поставить хотя бы один контрольный образец, разведенный водой, по которому будет определена опорная или контрольная для опыта концентрация эндотоксина.*

2. Проверяемый препарат должен быть разведён или обработан выбранным для пробоподготовки способом, но при этом до начала обработки к нему должен быть прибавлен эндотоксин в известной концентрации. После проведения обработки в полученном растворе должен определяться эндотоксин в ожидаемой концентрации.

Самый простой из возможных для нас вариантов был – добавление к двум флаконам с индикатором эндотоксина по 1 мл исходного раствора испытуемого препарата (суспензии). В результате мы получаем концентрацию эндотоксинов в испытуемом препарате эквивалентную концентрации в контрольном флаконе ИЭ, разведенным водой.

Далее один флакон ИЭ+Препарат разводили сначала спиртом этиловым, потом водой, второй с помощью ДМСО и затем воды. Оба раствора доводили до разведений равных 1/4000, в которых и проверяли остаточную концентрацию эндотоксина.

3. Условия приемлемости или достоверности результатов. Было принято, что обработка будет считаться приемлемой и не влияющей на результаты определения эндотоксинов в испытуемом препарате, если разница в определенной концентрации для опытных образцов будет в пределах 50-200 %.

Контрольный и опытные образцы были подготовлены по описанной программе, измерение было проведено в одном опыте. Результаты сведены в таблицу, концентрация эндотоксина приведена в пересчете на исходную концентрацию во флаконе ИЭ после его разведения 1 мл воды или препаратом.

В контрольном флаконе ИЭ концентрация эндотоксина после разведения 1 мл воды для ЛАЛ-теста оказалась выше заявленных 2000 и была равна 3 343 ЕЭ/мл.

Во флаконе ИЭ, который был разведен 1 мл испытуемого препарата и далее разводился спиртом этиловым и на конечном этапе водой для ЛАЛ-теста, была получена расчетная концентрация для исходного раствора равная 2 080 ЕЭ/мл, что составляет 62,2 % от опорной величины. Это значение может считаться приемлемым, оно укладывается в принятый нами критерий достоверности 50-200%.

Во флаконе ИЭ, который был разведен 1 мл испытуемого препарата и затем ДМСО и водой для ЛАЛ-теста, расчетная концентрация эндотоксина оказалась равной всего 494 ЕЭ/мл, что составляет 14,78% от опорной величины. Это существенное снижение определяемой концентрации эндотоксина.

<b>Контрольные и обработанные флаконы Способы обработки</b>	<b>Концентрация эндотоксина в исходном растворе</b>	<b>В % от опорного значения</b>
Индикатор эндотоксина в воде	3 343,0359 ЕЭ/мл	100 %
Индикатор эндотоксина + испытуемый препарат+ спирт этиловый + вода	2 080,0021 ЕЭ/мл	62,22%

Индикатор эндотоксина + испытуемый препарат + ДМСО+ вода	494,0747 ЕЭ/мл	14,78%
--	----------------	--------

Из двух вариантов пробоподготовки был выбран вариант с использованием спирта этилового в качестве первичного растворителя препарата – суспензии. Использование ДМСО привело к неудовлетворительным результатам, причины не понятны, но в данном опыте и не ставилась задача выяснить механизм воздействия растворителей на сложную среду, в которую добавлен эндотоксин.

Оценить пригодность двух, внешне очень похожих вариантов пробоподготовки для проведения испытания на содержание бактериальных эндотоксинов помог модельный опыт, в котором центральную роль играли индикаторы эндотоксина. Такие индикаторы могут быть использованы для самых разных задач – от валидации процедур депирогенизации, до моделирования загрязнения сложных систем или растворов. Содержание эндотоксина в них может быть от нескольких тысяч до миллионов Единиц эндотоксина во флаконе.