

14 апреля 2025 г

## Использование буферных растворов для разведения ЛАЛ-реактива Pyrotell-T для кинетического турбидиметрического анализа.

Демидова В.В., Ожерельева А.С., Калашиникова А.А., Ситников А.Г.

Реакция белков ЛАЛ-реактива с эндотоксином проходит при нейтральном значении pH. В ОФС «Бактериальные эндотоксины», указывается, что значение pH испытуемого образца должно находиться в интервале 6,0 – 8,0. На самом деле активация каскада белков ЛАЛ-реактива имеет индивидуальные оптимумы для каждого элемента каскада, но считается, что идеальный pH реакционной смеси составляет  $7,3 \pm 0,5$  (*Young N.S., et. all..1 972. An invertebrate coagulation system activated by endotoxin: evidence for enzymatic mediation.//1972 J. Clin. Invest. 51:1790-1797*). Поскольку, не все проверяемые в ЛАЛ-тесте препараты имеют нейтральную реакцию, закономерно встает вопрос компенсации значения pH образца или, точнее, приведения значения pH реакционной смеси ЛАЛ-реактив + образец к значениям, наиболее близким к оптимальным.

Вопрос создания максимально комфортных условий для прохождения реакции белков лизата с эндотоксином каждый производитель ЛАЛ-реактива решает самостоятельно. Собственно, сегодня мы имеем дело с двумя разными концептуальными подходами. По первому - ЛАЛ-реактив должен быть максимально забуферен еще на стадии производства. Такой реактив разводится водой и после разведения имеет приличную буферную емкость, которая позволяет проверять многие препараты без специального разведения или нейтрализации. Характерным примером следования этой концепции может служить ЛАЛ-реактив Endosafe, который сами производители считают наиболее забуференным, из всех выпускаемых реактивов. Так производитель подчёркивает, что устойчивость ЛАЛ-реактива Endosafe такова, что испытуемые образцы с основностью, эквивалентной 0,01 N NaOH, могут быть проверены этим реактивом напрямую без специальной пробоподготовки (*Cooper J.,F., Solving pH interference problems with Endosafe reagents.// LAL Times, 1996 Vol. 3*). Также предварительно забуферены ЛАЛ-реактивы Pyrogen и Pyrostar производства компаний Lonza и Wako. При этом компания Wako старается заранее решить не только вопрос оптимального pH реакционной смеси, но и на уровне состава реактива блокируют альтернативный путь гелирования, вызываемый гликанами.

Другой подход – не усложнять состав ЛАЛ-реактива, и без того сложный и не очень понятный. Ведь по сути ЛАЛ-реактив — это лизированные клетки крови или клеточная цитоплазма, в которой мы произвольно выделяем только пять белков, участвующих в каскаде коагуляции с эндотоксинами. Возможно, производителю ЛАЛ-реактива не стоит усложнять и без того сложный состав лизата, а постараться получить препарат, с воспроизводимыми характеристиками, стабильный и высокочувствительный.

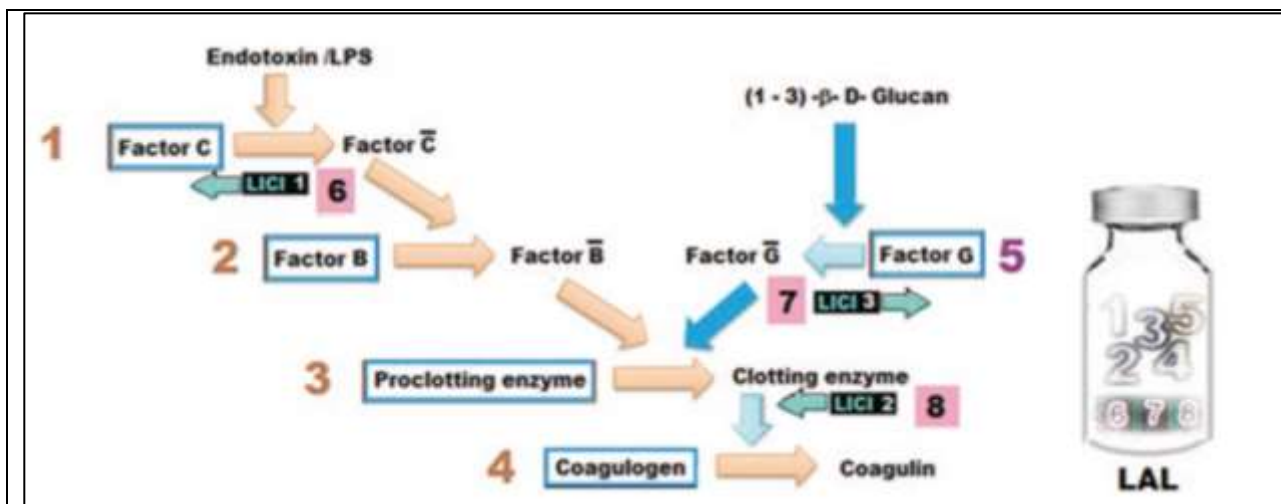


Рис 1. Что во флаконе с ЛАЛ-реактивом? Факторы свертывания - сериновые протеазы, ингибиторы сериновых протеаз, инактивированные или денатурированные ингибиторы сериновых протеаз. Это только более-менее известные нам белки ферменты прямо или косвенно связанные с реакцией лизата с эндотоксинами. А ведь там присутствуют еще и другие белки, ферменты, ингибиторы и т.д. из цитоплазмы амебоцитов мечехвоста. Вот такой бульон из белков и ферментов и пытаются стандартизовать производители реактива чтобы получить надежный, стабильный, чувствительный реактив для обнаружения эндотоксинов.

(Рисунок из Williams K.L. *Endotoxin Detection and Control in Pharma*. Springer Nature Switzerland AG 2019)

Характерный пример следования такому подходу – ЛАЛ-реактив под торговой маркой Pyrotell от компании Associates of Cape Code (АСС), США. Он в большей степени «натуральный», чем другие реактивы. Производитель, действительно старался не перегружать состав ЛАЛ-реактива в процессе производства и в результате у них получился очень надежный реактив. У ЛАЛ-реактива Pyrotell рекордный срок годности – 4 года и он отличается очень хорошей стабильностью, а после разведения может храниться в замороженном виде тоже рекордные три месяца.

Мотивы отказа от внесения буфера на стадии приготовления ЛАЛ-реактива до лиофилизации в основном связаны с опасениями, что это может оказать негативное влияние на стабильность реактива и его чувствительность. Также принималось во внимание, что дополнительные добавки в состав реактива могут повысить риск привнесения дополнительных загрязнений. Поэтому ЛАЛ-реактивы Pyrotell и Pyrotell-T лиофилированы без всяких буферных добавок (Gould M. J. *Pyrosol Reconstitution Buffer*. //LALUpdate 1989 Volume 7, No. 3).

Вопрос о том, нужна ли дополнительная буферизация ЛАЛ-реактива при проведении испытаний необходимо решать пользователю с учетом специфики проверяемых препаратов.

Понимая, что далеко не все испытываемые препараты могут быть проверены без доведения рН компания АСС, предлагает целый ряд буферных растворов для разведения ЛАЛ-реактива под торговым названием Pyrosol (Пиросол). Среди них интересный буфер для разведения ЛАЛ-реактива для гель-тромб теста, в который для удобства пользователя включен индикатор рН, феноловый красный. Этот индикатор по цвету реакционной смеси показывает, находится ли смесь в диапазоне рН, в котором может происходить гелеобразование, или нет. Красный цвет реакционной смеси указывает на подходящий диапазон, желтый (кислотный) или пурпурный (основной) цвет означает, что образец находится на крайних значениях диапазона рН. Это интересная находка, которая годится для реактива для гель-тромб теста, но не подходит для реактивов для кинетических анализов. Для реактива для кинетического турбидиметрического метода выпускается буферный раствор Пиросол без индикатора.

В настоящее время наша лаборатория много работает с реактивами АСС и особенно много с реактивом Pyrotell-T для кинетического турбидиметрического анализа. Мы используем этот реактив как разведенный водой для ЛАЛ-теста, так и разведенный на специализированном Трис буфере Pyrosol. Сравнительно недавно мы решили попробовать использовать для разведения собственного производства «0.1 М Трис HCl буфер». В настоящей статье мы обобщаем результаты нескольких исследований, целью которых была проверка возможности использования для разведения ЛАЛ-реактива Pyrotell-T 0,1 М Трис HCl буфера.

### **Буферные растворы.**

#### ***Буферный раствор Pyrosol, производства Associates of Cape Code (ACC), США.***

Pyrosol - это Трис HCl буфер с молярностью 0,2 М. Предназначен он, в основном, для разведения ЛАЛ-реактива Pyrotell-T. Молярность 0,2 М была выбрана производителем именно потому, что они готовили буфер для разведения реактива. Вообще высокие концентрации буфера способны ингибировать реакцию белков лизата с эндотоксином. В данном случае принимается во внимание, что разводить будут реактив, который исходно приготовлен без буфера, а затем к этому, уже разведенному, реактиву будут добавлять образец или раствор КСЭ, тоже без специальных буферов. В итоговой реакционной смеси (100 мкл ЛАЛ-реактива + 100 мкл образца) концентрация буфера будет равна 0,1 М, это концентрация, которая считается оптимальной для реакции и не вызывает ингибирования реакции гелеобразования.

Готовый буфер Pyrosol поставляется в двух фасовках – во флаконах по 5,5 мл и во флаконах по 55 мл. Использовать буфер во флаконах по 5,5 мл несколько удобнее, этот объем предназначен на разведение одного флакона ЛАЛ-реактива Pyrotell на 50 определений, который по инструкции разводится 5,0 мл воды для ЛАЛ-теста или буферного раствора. Для ЛАЛ-реактива для гель-тромб теста производитель рекомендует использовать буфер с индикатором рН. Для разведения ЛАЛ-

реактива Pyrotell-T для кинетического турбидиметрического метода используют буферный раствор Pyrosol без индикатора рН. Это каталожные номера:

**#BC051-25** Буфер Pyrosol без индикатора рН 5.5 мл/флак, 25 флак/упак

**#BC554-1** Буфер Pyrosol без индикатора рН 55 мл/флак

Буфер во флаконах на 55 мл предназначен как для разведения ЛАЛ-реактивов, так он может использоваться для разведения образцов с неоптимальными значениями рН.

Значение рН буфера Pyrosol при температуре же инкубирования 37°C равно 7,4, что соответствует значению, наиболее подходящему для прохождения реакции.

#### ***0,1 М Трис НСl буфер, производства ООО «НПО «ЛАЛ-Центр»***

Буферный раствор нашего производства, это также буфер на основе Трис со значением рН равным 7,4. Молярность нашего буфера равна 0,1М, это объясняется тем, что мы задумывали этот буфер как универсальный растворитель, который предназначен для разведения образцов. Для этой цели молярности 0,1М вполне достаточно. Таким образом, основное назначение нашего Трис НСl буфера - это разведение образцов с неоптимальными значениями рН. Изначально разведение ЛАЛ-реактивов как целевое назначение использования буфера нами не рассматривалось. Дело в том, что мы долго работали с ЛАЛ-реактивами Endosafe. Эти реактивы, как указывалось выше, имеют свою очень хорошую буферную емкость и для их разведения специальные растворы не требуются. Другие производители, если и считают необходимым разведение своих реактивов буфером, то как правило включают буфер в «набор» к такому реактиву, например, «набор» PYROGENT-5000 от компании Lonza включает ЛАЛ-реактив для кинетического турбидиметрического теста Pyrogent-5000 и буферный раствор для его разведения.

#### **Цели и задачи исследования**

В качестве эксперимента 0,1М Трис НСl буфер был использован для разведения ЛАЛ-реактива Pyrotell-T вместо предназначенного для этого «родного» буфера Pyrosol.

Интересно было сравнить реакционную способность ЛАЛ-реактива, разведенного разными буферными растворами. Собственно, различие заключается только в разной молярности двух проверяемых буферных растворов. После разведения Pyrosol ЛАЛ-реактив Pyrotell-T получает в свой состав 0,2 М Трис буфер, затем при добавлении к 100 мкл такого реактива еще 100 мкл образца или раствора контрольного стандарта эндотоксина, которые готовили на воде для ЛАЛ-теста получается реакционная смесь в буфере с молярностью 0,1М.

После разведения ЛАЛ-реактива Pyrotell-T 0,1М раствором Трис буфера нашего производства получается ЛАЛ-реактив в 0,1 М буфере, молярность этого буфера будет снижена до 0,05 М после добавления к этому ЛАЛ-реактиву равной аликвоты образца или КСЭ.

В теории реакционные смеси, полученные при разведении ЛАЛ-реактива двумя буферными растворами должны отличаться друг от друга молярностью буфера, входящего в состав этих смесей. В

случае разведения буфером Pyrogol молярность реакционной смеси будет равна 0,1 М, при разведении ЛАЛ-реактива 0,1 М Трис буфером молярность реакционной смеси будет равна 0,05 М.

Резюмируя вводную часть можно сказать, что в опытах сравнивалась реакционная способность ЛАЛ-реактива Pyrotell-T, один флакон которого был разведен 0,2М ТрисHCl буфером с pH 7,4 (при T 37°C), другой флакон этого реактива был разведен 0,1 М Трис HCl буфером, со значением pH равным 7,4. Интересно было узнать насколько «сильно» разная молярность используемых буферов влияет на результаты измерений и могут ли быть взаимозаменяемыми вышеупомянутые буферные растворы.

#### **Условия проведения испытаний.**

Анализ проводили на микропланшетном ридере BioTek ELx808IU под управлением прикладной программы для проведения кинетических анализов EndoScan-V 4,0 компании Charles River Endosafe, США.

Анализ проводили кинетическим турбидиметрическим методом (Метод С).

Измерения проводили при длине волны 340 нм.

Пороговое значение оптической плотности (OD) составляло 0.1

Температура инкубирования поддерживалась равной 37,0°C ±1°C.

Измерения проводили на плоскодонном 96-луночном планшете.

Для большей унификации условий проведения испытаний параллельные испытания проводились одновременно в одном инкубировании и на одном планшете. В опыт были выставлены две калибровочные кривые для двух ЛАЛ-реактивов, разведенных разными буферами. В опыт были поставлены 8 испытуемых образцов с положительными контролями по каждому образцу. Эти образцы проверялись в параллели, так что каждый образец был продублирован для возможности проверки на двух калибровочных кривых.

#### **Результаты**

##### ***Сравнение калибровочных кривых***

Первоначально нами оценивались получившиеся калибровочные кривые. Их соответствие критериям достоверности и степень сходства друг с другом.

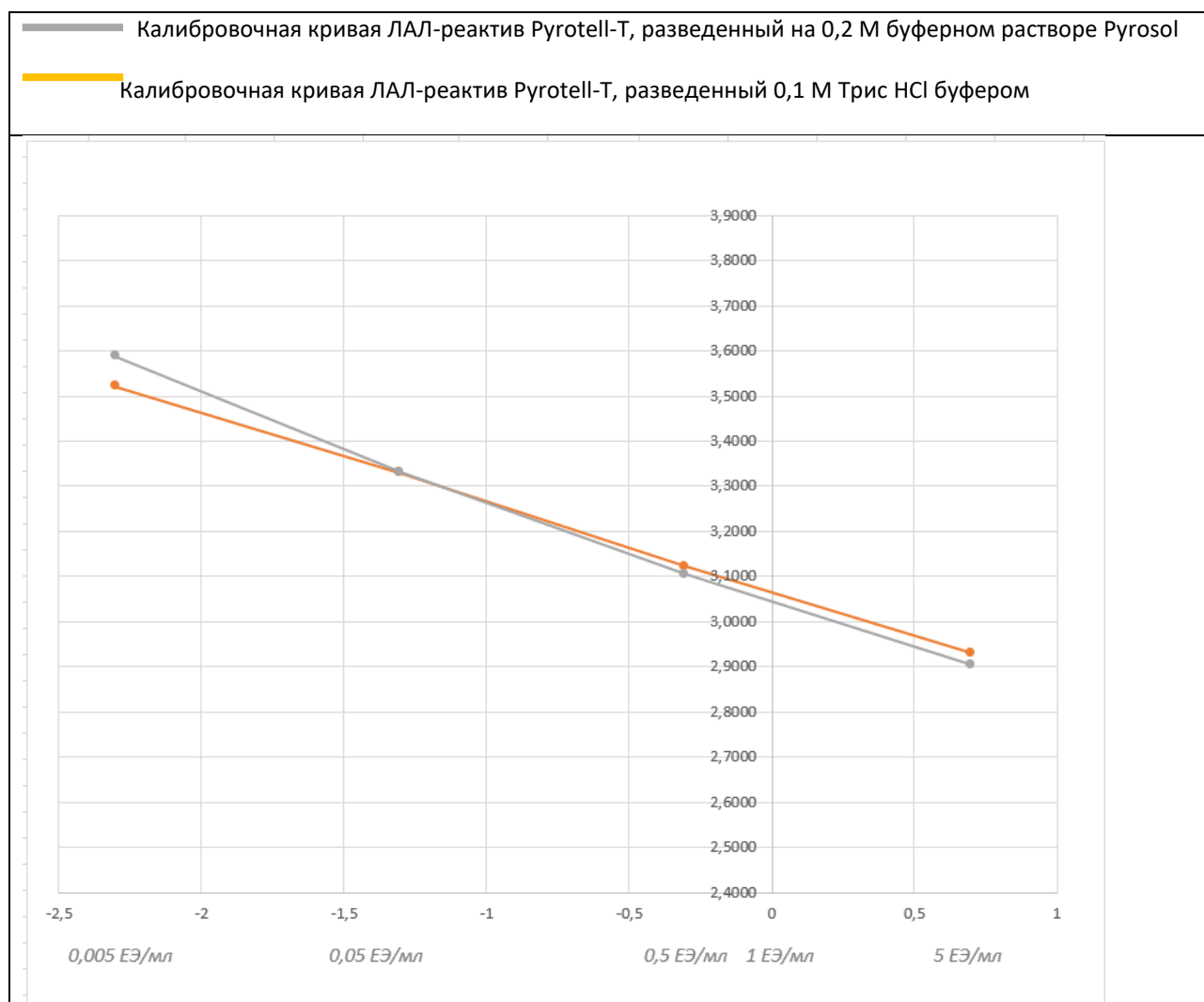
*Табл. 1. Результаты времени реакции по стандартам КСЭ для двух ЛАЛ-реактивов*

Концентрация КСЭ		ЛАЛ-реактив Pyrotell-T, разведенный Pyrogol 0,2 М		ЛАЛ-реактив Pyrotell-T, разведенный 0,1М Трис HCl буфер	
ЕЭ/мл	Log (Conc)	Время, сек	Log (Время)	Время, сек	Log (Время)
5	0,69897	802,9	2,9047	852,1	2,9305
0,5	-0,30103	1273,6	3,1050	1324,1	3,1219
0,05	-1,30103	2143,1	3,3310	2137,5	3,3299
0,005	-2,30103	3870,0	3,5877	3326,3	3,5220

Коеф. Коррел. (r)	<b>-0,9985</b>	<b>-0,9999</b>
Slope (угол)	-0,2275	-0,1982
Y-intercept (отрезок)	3,0499	3,0673

Нужно отметить, что в ОФС «Бактериальные эндотоксины» из критериев достоверности кинетических анализов упоминается только коэффициент корреляции (r), который должен быть по модулю равен или более 0,980. С этим показателем для обеих кривых все получилось очень хорошо. Для ЛАЛ-реактива, разведенного на буфере Pyrogol коэффициент корреляции составил -0,9985, а для ЛАЛ-реактива, разведенного на Трис буфере, r почти идеальный -0,9999. Вообще получившиеся калибровочные кривые очень схожи. Это хорошо видно, если представить их в виде графиков:

Рис. 2. Калибровочные кривые для ЛАЛ-реактива Pyrotell-T, разведенного на 0.2 М и 0.1 М Трис HCl буфере



Еще два параметра калибровочных кривых - Slope (угол наклона калибровочной кривой) и Y-intercept (пресечение калибровочной кривой оси y) никак не оговариваются ни в ОФС, ни в прикладных программах, в которых обрабатывают данные измерений. Между тем, эти значения важны, хотя бы потому, что они используются для расчёта измеряемых в опыте концентраций эндотоксина.

Значение y-intercept или точки пересечения калибровочной кривой с осью y. Считается что условно стандартный ЛАЛ-реактив реагирует с раствором КСЭ в концентрации равной 1 ЕЭ/мл

примерно за 1000 секунд. При построении калибровки мы используем шкалу логарифмическую, поэтому надо иметь в виду что логарифм концентрации 1 ЕЭ/мл равен 0. Концентрация эндотоксина откладывается по оси x. По оси y откладывается время реакции и, если для 1 ЕЭ/мл оно составило 1000 секунд, то логарифм этого времени равен 3 ( $\log(1000) = 3$ ). Значит калибровочная кривая пересекает ось x при значении y равном 3. Это в теории, на практике пользователем это значение не отслеживается. Хотя производитель всегда имеет y-intercept в виду и старается так оговаривать условия проведения анализа, чтобы получаемая цифра была ближе к желаемой. Один из способов попасть в желаемую норму, указать рекомендуемое значение пороговой оптической плотности, которое выставляется для считывания данных.

В случае наших двух калибровочных кривых значение y-intercept были практически равны:

Разведение на буфере	y-intercept	Время, сек
Pyrosol 0,2 М	3,0499	1121,7 сек
0,1 М Трис HCl	3,0673	1167,5 сек

Можно отметить, что данные по времени реакции при заданном значении оптической плотности (0,1 ОП) для обеих калибровочных кривых практически совпали, разница составила менее 40 секунд.

Третий значимый параметр – угол наклона калибровочной кривой. В данном случае совпадение хорошее, но не полное. Время реакции на среднем участке калибровочной кривой практически совпали. Некоторая разница заметна на краях калибровки. ЛАЛ-реактив, разведенный буфером 0,1 М Трис HCl реагирует с концентрацией КСЭ 5 ЕЭ/мл немного медленнее, чем реактив, разведенный на буфере Pyrosol – 852,1 секунды против 802,1 секунды. На другом краю калибровки – там, где очень низкая концентрация 0,005 ЕЭ/мл, ситуация обратная. Реактив, разведенный на 0,1 М Трис HCl, реагирует быстрее – всего 3326,3 сек, против 3870,0 сек для ЛАЛ-реактива, разведенного на 0,2 М Pyrosol.

В целом можно отметить очень неплохую сходимость этих двух калибровочных кривых. Есть такой способ самооценки точности калибровки, который программно используется в ПО Endoscan-V – после построения калибровочной кривой (сбора всех данных по всем стандартам) данные по времени реакции для каждого из использованных стандартов используются для расчета концентрации по построенной калибровке. Для расчета концентрации эндотоксина по измеренному времени реакции используется формула:

$$\text{Log}(EU) = (\text{Log}(RT) - Y\text{-intercept}) / \text{Slope}$$

*Концентрация БЭ = антилогарифм Log(EU)*

Так, для концентрации КСЭ равной 0,5 ЕЭ/мл в ЛАЛ-реактиве, разведенном 0,1 М Трис буфере, время реакции составило 1324,1 сек (логарифм = 3,1219):

$$(3,1219 - 3,0673) / (-0,1982) = -0,2757$$

$$\text{Антилогарифм}(-0,2757) = 0,5301 \text{ ЕЭ/мл}$$

Если это время наложить на результаты калибровки, построенной для реактива, разведенного на 0,2 М Пиросоле:

$$(3,1219 - 3,0499)/(-0,2275) = -0,3167$$

$$\text{Антилогарифм} (-0,3167) = 0,4823 \text{ ЕЭ/мл}$$

Вообще критериев оценки результатов обратного пересчета времени по калибровке нет, но тут и без критериев видно, что расчётные значения концентрации равные 0,5301 ЕЭ/мл и 0,4823 ЕЭ/мл очень незначительно отличаются от опорного значения 0,5 ЕЭ/мл. Если взять цифры по времени реакции для крайних значений концентраций калибровочной кривой и таким же образом подставить в одну из калибровок, то разброс будет несколько больше, но все еще незначителен.

Поскольку задачей этого сравнительного опыта была проверка влияния разных буферных растворов на реакционную способность ЛАЛ-реактива, то оценка полученных в результате калибровочных кривых, проведенная по основному параметру – коэффициенту корреляции и по двум дополнительным – у-intercept и углу наклона кривой, показала очень хорошую сходимость результатов. Можно отметить очень хорошие данные по линейности (r) в обоих случаях она почти равна идеалу - единице и почти полную сходимость значений по точке пересечения с осью у.

### **Сравнение результатов определения эндотоксинов в образцах**

Опыт имел и вполне практическое значение, в нем определялась концентрация бактериальных эндотоксинов в разных образцах. Каждый проверяемый образец ставился в опыт дважды – для калибровки, построенной для ЛАЛ-реактива Pyrotell-T, разведенного на 0,2 М буфере Pyrosol и для ЛАЛ-реактива Pyrotell-T, разведенного на 0,1 М Трис буфере. Для каждого образца естественно ставился и положительный контроль испытуемого образца. Совокупные данные результатов измерений приведены в таблице 2:

*Табл. 2. Результаты определения содержания БЭ по двум калибровочным кривым.*

Образец	ЛАЛ-реактив Pyrotell-T, разведенный на 0,2 М буфере Pyrosol			ЛАЛ-реактива Pyrotell-T, разведенный на 0,1 М Трис HCl буфере		
	Сод. БЭ, ЕЭ/мл	PPC, ЕЭ/мл	PPC, %	Сод. БЭ, ЕЭ/мл	PPC, ЕЭ/мл	PPC, %
№1	0,6423	1,2977	131	0,6395	1,3859	149
№2	<0,05	0,5588	111	<0,05	0,6017	119
№3	<0,05	0,4840	96	<0,05	0,5197	103
№4	0,1310	0,4702	91	<0,0523	0,4867	96
№5	<0,05	0,3573	70	<0,05	0,5043	100

В образце №1 был зарегистрирован эндотоксин, причем он был надежно и одинаково обнаружен по обоим калибровкам. Совпадение результатов очень высокое, что можно объяснить в том числе тем, что практическое содержание около 0,6 ЕЭ/мл — это середина калибровочных кривых, где, как выше указывалось, совпадение результатов почти полное.



В образце №4 по одной калибровке была обнаружена низкая концентрация эндотоксина, по второй – следовые количества, разброс результатов есть, но он вполне укладывается в допустимую ошибку опыта – 50-200%.

В остальных образцах содержание эндотоксинов было ниже определяемого в опыте уровня (образцы проверялись в разведении 1/10, поэтому все значения <0,05 ЕЭ/мл). Сравнить результаты можно и по результатам положительного контроля. Так как в образцах нет значимой концентрации эндотоксинов, то добавленный к положительному контролю спайк в 0,5 ЕЭ/мл должен определяться как концентрация равная 0,5 ЕЭ/мл. На практике так и получилось по обеим калибровкам, поскольку образцы испытываемые никак не проявляют ингибирования, то и все результаты положительного контроля очень близки к ожидаемым 0,5 ЕЭ/мл и восстановление спайка в большинстве случаев равно 100±10%. Это очень хорошие результаты для любого анализа, а в нашем случае, когда значение имеет сходимость результатов, тем более результаты можно признать очень хорошими.

### **Заключение**

В нашем исследовании мы хотели разобраться в том, насколько может отличаться реакционная способность ЛАЛ-реактива Pyrotell-T при разведении его различными буферными растворами. Оба использованных буфера очень похожи, оба они представляют собой хорошо известный Трис и значение рН у них практически одинаково – около 7,4. Разница в том, что Pyrosol имеет молярность 0,2 М, соответственно после разведения получается ЛАЛ-реактив Pyrotell-T в буферном растворе с молярностью 0,2 М и значением рН 7,4. Далее, после смешивания с испытуемым образцов получившаяся с таким реактивом реакционная смесь имеет молярность Трис буфера 0,1 М и рН 7,4, оба эти показателя считаются оптимальными для реакции ЛАЛ-реактива и эндотоксина.

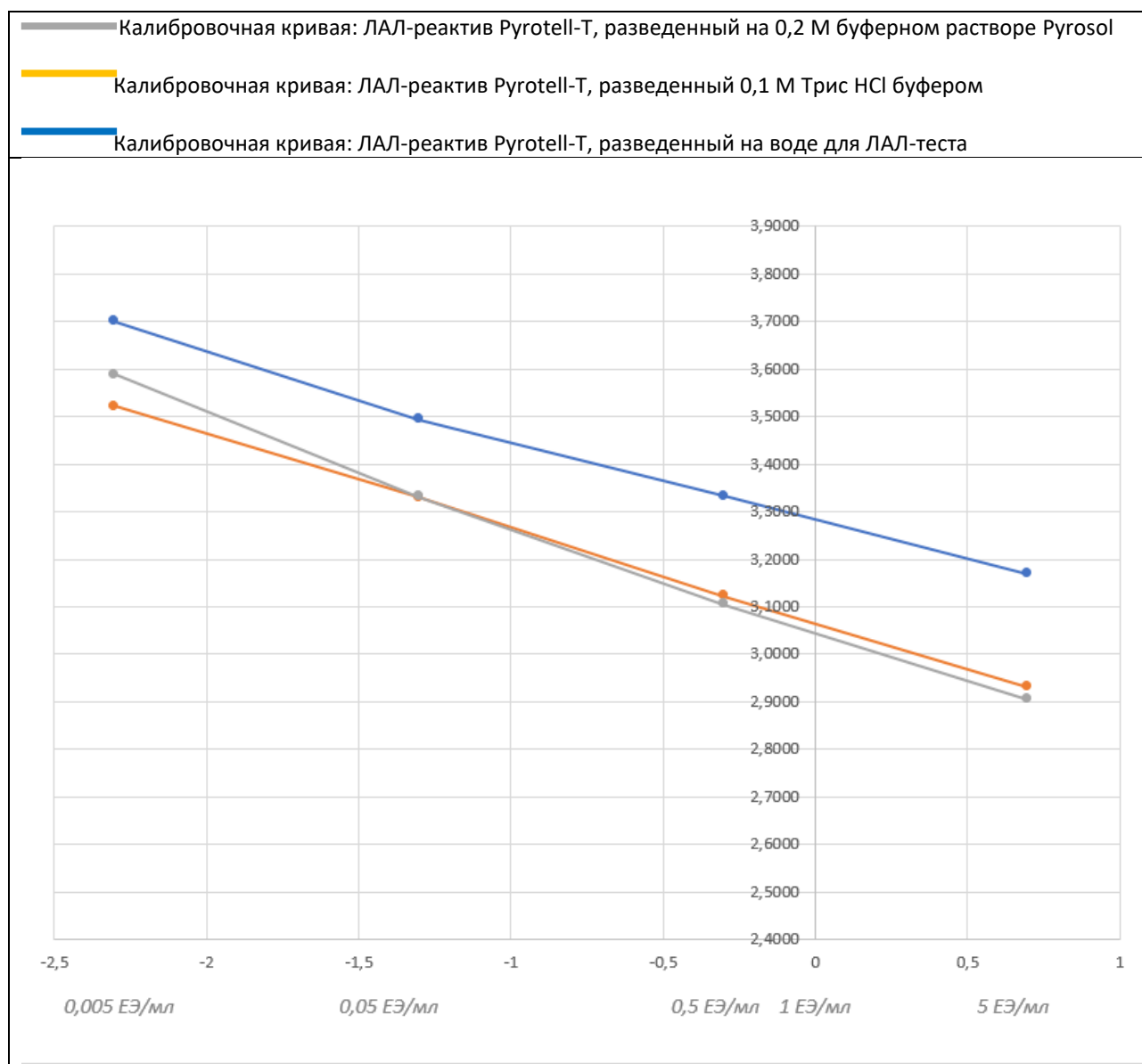
Разведённый 0,1 М Трис HCl буфером ЛАЛ-реактив Pyrotell-T отличается только молярность буфера в растворе реактива, которая равна 0,1 М, а молярность реакционной смеси, представляющей собой ЛАЛ-реактив + образец будет составлять 0,05 М при рН 7,4.

Как показали результаты, разницы в действии разных буферных растворов практически не наблюдается. Результаты по калибровочным кривым удивительно схожи, также и результаты измерения неизвестных концентраций эндотоксина в проверенных образцах или полностью совпадают, или очень близки. Общий вывод, который можно сделать по полученным результатам – оба буферных раствора пригодны для разведения ЛАЛ-реактива Pyrotell-T и разведённый такими буферными растворами реактив имеет примерно идентичную реакционную способность. Хочется подчеркнуть, что мы в данной ситуации сравнивали именно реакционную способность ЛАЛ-реактива, а не обычный вопрос для буферных растворов - их способность нейтрализовать крайние значения рН.

ЛАЛ-реактив Pyrotell-T очень интересный реактив, в его состав не включен буфер и при разведении использование буфера не обязательно. Производитель считает, что добавление буферов в состав ЛАЛ-реактива перед лиофилизацией могут нарушать активность, растворимость и стабильность ЛАЛ-реактива (Novitsky T,J. LAL formulation and environmental endotoxin.// LALUpdate 1999 Vol. 17,

№ 2). Этот реактив может быть стандартно разведен водой для ЛАЛ-теста и в таком виде может быть использован в анализе. По данным производителя, разведенный ЛАЛ-реактив имеет pH в диапазоне от 6,3 до 6,4 (Gould M., J Pyrosol Reconstitution Buffer.//LALUpdate 1989 Volume 7, No. 3). Поскольку большое количество готовых лекарственных препаратов имеют значение pH близкое к нейтральному, они не требуют специальной подготовки к анализу. В случае же необходимости, образец или реактив может быть разведен буферным раствором. Это в теории. На практике, желательно сразу определиться как работать с реактивом. Разводить его водой или буфером. Вообще практика показывает, что получаются два разных реактива. Реактив, разведенный буфером, лучше реагирует с эндотоксином. В кинетических анализах это проявляется в меньшем времени реакции с эндотоксином по сравнению с реакцией, в которой используется ЛАЛ-реактив, разведенный водой. В качестве наглядного примера можно привести таблицу 1, в которой добавлена еще одна калибровочная кривая, которая построена на реакции ЛАЛ-реактива Pyrotell-T той же серии, но разведенного на воде для ЛАЛ-теста.

Рис. 3. Калибровочные кривые для ЛАЛ-реактива Pyrotell-T, разведенного на воде и на 0,2 М и 0,1 М Трис HCl буфере.



Вот данные по калибровке на воде. Время, коэффициент корреляции и пр.

Табл. 3. Результаты времени реакции по стандартам КСЭ для ЛАЛ-реактива Pyrotell-T, разведенного на воде для ЛАЛ-теста

Концентрация КСЭ		ЛАЛ-реактив Pyrotell-T, разведенный водой для ЛАЛ-теста	
ЕЭ/мл	Log (Conc)	Время, сек	Log (Время)
5	0,69897	1475,1	3,1688
0,5	-0,30103	2151,4	3,3327
0,05	-1,30103	3120,0	3,4942
0,005	-2,30103	5010,0	3,6998
Коеф. Коррел. (r)		-0,9982	
Slope (угол)		-0,1754	
Y-intercept (отрезок)		3,2833	

На что сразу можно обратить внимание – сильно сдвинута точка пересечения с у. Это происходит потому, что реакция в растворе реакционной смеси без буфера идет медленнее. Кстати, стоит обратить внимание на то, что среда во всех пяти точках нейтральная, реакционная смесь состоит из ЛАЛ-реактива, КСЭ и воды для ЛАЛ-теста, на которой все это готовились. И хотя рН вполне нейтральный, реакция идет существенно медленнее.

Табл. 4. Время реакции для разных концентраций КСЭ для ЛАЛ-реактива, разведенного на воде для ЛАЛ-теста и 0,2 М и 0,1 М Трис НСl буфере.

Концентрация КСЭ, ЕЭ/мл	ЛАЛ-реактив Pyrotell-T, разведенный водой для ЛАЛ-теста. Время реакции, сек	ЛАЛ-реактив Pyrotell-T, разведенный Pyrosol. Время реакции, сек	ЛАЛ-реактив Pyrotell-T, разведенный 0,1М Трис НСl буфером. Время реакции, сек
5	1475,1	802,9	852,1
0,5	2151,4	1273,6	1324,1
0,05	3120,0	2143,1	2137,5
0,005	5010,0	3870,0	3326,3

В общем в этом нет ничего страшного, в рамках опыта расчет делается по полученной в опыте калибровке. Но тут есть одна тонкость, если по такой калибровке будет проверяться испытуемый образец, имеющий собственную буферную емкость, или если образец при подготовке разводили буфером, то в ячейке с таким образцом реакционная смесь будет в буферном растворе. По приведенной таблице видно, что если в реакционной смеси есть ЛАЛ-реактив, буфер и эндотоксин, например, 0,05 ЕЭ/мл, то такая смесь реагирует до заданной дельты оптической плотности (ОП 0,1) за 2130-2140 секунд (две правые колонки в таблице выше). А реакция с той же концентрацией эндотоксина, но без буфера реагирует за 3120 секунд (левая колонка). Если гипотетическое время реакции 0,05 ЕЭ/мл в буфере перенести на калибровку, построенную на воде, то получится значение концентрации эндотоксина примерно 0,5 – 0,6 ЕЭ/мл, т.е. расчетное значение окажется в 10 раз больше реальной концентрации. Все только из-за того, что калибровку строили с ЛАЛ-реактивом, разведенном в воде для ЛАЛ-теста, а в опыт поставили образец, который разводили буфером, за счет этого внесли в реакционную смесь буферный раствор. Вероятно, что и по положительному контролю испытуемого образца мы этот образец отложим как несоответствующий, поскольку в положительном контроле тоже

должно быть зарегистрировано слишком много эндотоксина, если будет превышение 200% восстановления спайка, результат будет признан недействительным.

Таким образом, можно отметить, что использование буферных растворов для разведения ЛАЛ-реактива Pyrotell-T для кинетического турбидиметрического теста можно признать правильным и необходимым действием. У разведенного на буфере ЛАЛ-реактива появляются широкие возможности проверки образцов с неоптимальными значениями рН. Однако, разведенный таким образом ЛАЛ-реактив приобретает новые характеристики, например, реакция с эндотоксинами идет намного быстрее, чем в среде ЛАЛ-реактива, разведенного водой для ЛАЛ-теста. Это обстоятельство следует учитывать, как при подготовке собственно ЛАЛ-реактива, так и при специальной подготовке образцов, требующих доведения рН.

По использованию буферных растворов с ЛАЛ-реактивом Pyrotell-T можно сделать следующие выводы:

1.Использование буферных растворов не только создает более комфортные, нейтральные условия для прохождения реакции, но и существенно ускоряет реакцию ЛАЛ-реактива с эндотоксином.

2.Разведенный буферным раствором ЛАЛ-реактив Pyrotell-T проявляет большую реакционную способность по сравнению с ЛАЛ-реактивом, разведенным на воде для ЛАЛ-теста.

3.При использовании буферных растворов с рН 7,4 и разной молярностью – 0,2 М и 0,1М не отмечается заметных изменений активности ЛАЛ-реактива, связанных с молярностью растворов (результатирующие значения молярности буфера в реакционных смесях 0,1 М и 0,05 М соответственно). Данные по времени реакции для разных концентраций КСЭ для реактивов, разведенных 0,2 М и 0,1 М буферными растворами, примерно одинаковы и сопоставимы.

Если при проведении проверки для подготовки образца предполагается доведение рН с помощью буферных растворов или растворов кислоты или щелочи, лучше сразу начинать с разведения ЛАЛ-реактива Pyrotell-T буферным раствором Pygosol или аналогичным. Таким образом, будет создана единая база забуференного ЛАЛ-реактива, который обеспечит содержание буфера во всех реакционных смесях, начиная с растворов КСЭ и заканчивая испытуемыми образцами. Как показали результаты наших опытов, не имеет большого значения разница молярности буфера в реакционной смеси. Это может быть и 0,1 М, и 0,05 М. Специальный буфер Pygosol 0,2 М лучше использовать для разведения ЛАЛ-реактива Pyrotell-T. Его можно использовать и для доведения рН испытуемых образцов, однако с помощью этого буфера стоит делать только первые несколько разведений. Если использовать этот буфер и на разведение образца, вплоть до последнего разведения, то это может привести к тому, что молярность реакционной смеси будет высокой - 0,2 М, что уже может приводить к ингибированию реакции. Высокие концентрации буфера угнетающе действуют на реакцию ЛАЛ-реактива с эндотоксином.

Трис HCl буфер 0,1 М может быть использован как для разведения ЛАЛ-реактива Pyrotell-T, так и для подготовки разведений испытуемого образца с неоптимальными значениями рН. При этом разведения на этом буфере можно делать без ограничений, при любом раскладе молярность реакционной смеси по буферу не будет превышать 0,1 М.