

Отработка методов проверки растворов кислоты и щелочи на содержание бактериальных эндотоксинов.

Часть 1. Проверка растворов соляной кислоты с помощью ЛАЛ-реактива Pyrotell-T методом С.

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

Настоящей статьей мы начинаем цикл статей о подборках вариантов проверки в ЛАЛ-тесте растворов кислоты и основания.

Постановка задачи

Растворы кислоты и щелочи как вспомогательные вещества могут использоваться и в производстве лекарственных средств. Сейчас проверке на бактериальные эндотоксины вспомогательных веществ уделяется большое внимание и к нам часто обращаются представители компаний-производителей ЛС с вопросами, какие нормы установить для растворов кислоты или основания и как провести проверку на эндотоксины этих, очень непростых для проверки веществ.

Также вопрос необходимости проверки содержания бактериальных эндотоксинов в растворах кислоты или щелочи возникает и при подготовке к проведению ЛАЛ-теста. Когда необходимо оценить чистоту реактивов, используемых для доведения значения рН испытуемых растворов. Обычно для этого используются 0.1 Н растворы HCl или NaOH.

При проведении проверки таких растворов нужно найти ответы на два, очень непростых вопроса:

- Какой должна быть норма содержания БЭ в растворе кислоты или основания?
- Как провести пробоподготовку и какой метод выбрать, чтобы получить ответ на первый вопрос?

Непонятно, что важнее: можно ведь установить вполне хорошую, жесткую норму, но проверить ее не будет никакой возможности именно по техническим ограничениям.

По нормам содержания есть разные суждения и разные способы расчета. Мы решили оставить этот вопрос на потом. А для начала просто перевернуть задачу и не рассчитывать норму, а подобрать простые и эффективные способы пробоподготовки, которые позволят зарегистрировать наиболее низкий уровень содержания эндотоксинов в растворе кислоты и основания. Говоря умными словами, надо оценить возможный предел количественного

определения (Limit of quantitation, LOQ). Понятно, что ответ на этот вопрос лежит через серию проверок с разными способами пробоподготовки, разными методами проведения анализа и, даже через проверки разными ЛАЛ-реактивами.

Общие установки для проведения исследований

В качестве тестовых растворов было решено использовать децимолярные растворы соляной кислоты и гидроксида натрия. Эти растворы прямо или косвенно упоминаются и в ОФС «Бактериальные эндотоксины» и в инструкциях на ЛАЛ-реактивы. Полученные результаты по пределу количественной оценки для 0,1 М растворов HCl и NaOH, легко можно будет пересчитать на большую молярность или нормальность, тем более что в отношении HCl и NaOH нормальность совпадает с молярностью.

Проверку будем проводить гель-тромб тестом и, как минимум, одним фотометрическим методом. Предпочтение в настоящий момент мы отдаем методу С.

Опыты будут проводиться с коммерчески доступными на сегодняшний день ЛАЛ-реактивами.

Поскольку очевидно, что на результат будут влиять и пробоподготовка, и возможности метода, и индивидуальные свойства разных реактивов, то разбор результатов мы будем выкладывать последовательно, после отработки группы экспериментов с конкретным реактивом, использованном в конкретном методе.

Проведение проверки оценки содержания эндотоксинов в 0,1 М растворе HCl с использованием ЛАЛ-реактива Pyrotell-T при проведении анализа методом С.

Материалы и методы

Испытуемый образец: 0,1 М раствор HCl. Использовали 0,1 М раствор, приготовленный путем растворения концентрированной HCl (37%, х.ч.) в воде для БЭТ.

Измерительная система: Микропланшетный ридер Biotek ELx808IU и специализированное программное обеспечение Endoscan-V ver 4,5.

Метод анализа: Метод С, турбидиметрический кинетический метод. Измерение при длине волны 340 нм, значение пороговой ОП – 0,1. Калибровочная кривая 0,005 ЕЭ/мл – 5 ЕЭ/мл. Предел количественного определения метода (наименьшая концентрация калибровочной кривой), λ , составляет 0,005 ЕЭ/мл.

ЛАЛ-реактив: Pyrotell-T, производства Associates of Cape Code, США. Восстановление ЛАЛ-реактива на 0.1 М Трис-буфере для БЭТ.

Растворители для образца: В качестве растворителей для испытуемого образца использовали не содержащие эндотоксинов растворы: воду для БЭТ и 0,1 М Трис-буфер для БЭТ.

Подготовка испытуемого образца: Испытуемый раствор 0,1 М HCl проверяли без разведения и в разведениях 1/5; 1/10; 1/100 и 1/1000. Один ряд разведений делали на воде для БЭТ, параллельный ряд разведений готовили на 0.1 М Трис-буфере для БЭТ.

Положительный контроль испытуемого образца, PPC (Positive Product Control): К каждому испытуемому раствору добавляли КСЭ (Spike) в концентрации, необходимой до получения концентрации эндотоксина в испытуемом растворе равной 0,5 ЕЭ/мл.

Критерии оценки возможности регистрации концентрации БЭ: Основным критерием оценки возможности проверки была степень восстановления положительного контроля испытуемого образца. Приемлемыми были приняты значения, указанные в ОФС «Бактериальные эндотоксины» – восстановление в опыте от 50% до 200% от ожидаемой концентрации.

Результаты и их интерпретация

Была проведена серия опытов, которые проводились в одинаковых условиях и с одними и теми же сериями ЛАЛ-реактива Pyrotell-T и КСЭ. Во всех пробах со всеми разведениями содержание эндотоксинов было менее определяемого в тесте уровня. Основная оценка результатов делается по результатам положительного контроля, PPC.

Таблица 1. Результаты по PPC для разных разведений 0.1 М раствора HCl

Растворитель	Разведение	PPC, %	Растворитель	Разведение	PPC, %
-	1/1	N/A*			
Вода для БЭТ	1/5	N/A*	0.1 М Трис-буфер	1/5	43
Вода для БЭТ	1/10	42	0.1 М Трис-буфер	1/10	91
Вода для БЭТ	1/100	58	0.1 М Трис-буфер	1/100	121
Вода для БЭТ	1/1000	132	0.1 М Трис-буфер	1/1000	103

**Для неразведенного раствора кислоты и разведения 1/10, приготовленного на воде для БЭТ, значение концентрации в PPC было не определено.*

Результаты по разным растворителям оказались вполне предсказуемыми. Разведения, сделанные на 0,1 М Трис-буфере, позволяют раньше преодолеть ингибирование или действия мешающих факторов. Собственно «мешающим фактором» в данном случае выступает кислая реакция pH испытуемого раствора.

Таблица 2. Значение рН для разных разведений испытуемого образца.

Растворитель	Разведение	рН	Растворитель	Разведение	рН
-	1/1	1,43			
Вода для БЭТ	1/5	2,00	0.1 М Трис-буфер	1/5	2,40
Вода для БЭТ	1/10	2,26	0.1 М Трис-буфер	1/10	6,30
Вода для БЭТ	1/100	3,11	0.1 М Трис-буфер	1/100	6,80
Вода для БЭТ	1/1000	4,21	0.1 М Трис-буфер	1/1000	7,10

Очень характерная картина. При разведении раствора кислоты буферным раствором уже в разведении 1/10 рН испытуемого образца входит в упомянутый в ОФС «Бактериальные эндотоксины» диапазон допустимых значений рН в ЛАЛ-тесте: от 6,0 до 8,0. Соответственно, в этом разведении уже и возможна нормальная проверка, степень восстановления РРС для разведения 1/10 на буфере составила 91%. Интересно, что в разведении на воде 1/100 при рН этого раствора, равным 3,11 определение формально становится возможным – РРС составил 58%. Тут свою роль сыграл тот факт, что ЛАЛ-реактив Pyrotell-T был восстановлен буферным раствором (0.1 М Трис-буфером). Производитель ЛАЛ-реактива допускает два способа разведения этого реактива – водой для БЭТ или Трис-буфером. Понятно, что при проверке таких сложных растворов как растворы кислоты или основания, предпочтение следует отдавать разведению ЛАЛ-реактива буферным раствором.

Используя полученные данные, можно определить каким может быть предел количественного определения для 0.1 М раствора HCl.

Таблица 3. Значение LOQ для разных разведений 0,1 М HCl.

Растворитель	Разведение	РРС, %	Возможность проверки	LOQ для 0,1М раствора HCl
-	1/1	N/A	Нет	-
Вода для БЭТ	1/5	N/A	Нет	-
Вода для БЭТ	1/10	42	Нет	-
Вода для БЭТ	1/100	58	На грани допустимого	0,5 ЕЭ/мл
Вода для БЭТ	1/1000	132	Да	5 ЕЭ/мл
0.1 М Трис-буфер	1/5	43	Нет	-
0.1 М Трис-буфер	1/10	91	Да	0,05 ЕЭ/мл
0.1 М Трис-буфер	1/100	121	Да	0,5 ЕЭ/мл
0.1 М Трис-буфер	1/1000	103	Да	5 ЕЭ/мл

Предел количественного определения методики определяется двумя факторами:

- Первый – это чувствительность метода, λ.
- Второй – степень разведения образца в принятой методике.

Так в нашем случае в Методе С чувствительность или наименьшая концентрация КСЭ в калибровочной кривой составляет 0,005 ЕЭ/мл. Наименьшее разведение, в котором возможна проверка – 1/10 на 0.1 М Трис-буфере. Соответственно эндотоксинов в методике, в

которой предполагается разведение в десять раз, предел количественного измерения концентрации сдвигается вправо на фактор 10, в нашем случае он составит 0,05 ЕЭ/мл.

Таким образом, по полученным в опытах данным можно утверждать, что проверка 0,1 М раствора HCl в методе С возможна, и она позволяет обнаружить как минимум 0,05 ЕЭ/мл. Другими словами, поскольку мы вполне обосновано ожидаем полное отсутствие бактериальных эндотоксинов в 0,1 М растворе соляной кислоты можно говорить, что предложенный метод позволяет сделать заключение, что содержание бактериальных эндотоксинов в 0,1 М растворе HCl менее 0,05 ЕЭ/мл.

Заключение

Для аналитической методики обнаружения бактериальных эндотоксинов методом С с помощью ЛАЛ-реактива Pyrotell-T, восстановленном Трис-буфером, предел количественного определения для испытуемого 0.1 М раствора HCl составляет 0,05 ЕЭ/мл. Для проведения испытания исходный раствор 0.1 М соляной кислоты следует развести как минимум в десять раз с помощью 0.1 М Трис-буфера для БЭТ.

Сводная таблица. Разведения, восстановление в РРС, значения рН, возможность количественной оценки содержания БЭ в 0,1 М растворе HCl

Растворитель	Разведение	РРС, %	рН	Возможность проверки	LOD для 0.1М р- ра
-	1/1	-	1,43	Нет	-
Вода для БЭТ	1/5	-	2,00	Нет	-
Вода для БЭТ	1/10	42	2,26	Нет	-
Вода для БЭТ	1/100	58	3,11	На грани допустимого	0,5 ЕЭ/мл
Вода для БЭТ	1/1000	132	4,21	Да	5 ЕЭ/мл
0.1 М Трис-буфер	1/5	43	2,40	Нет	-
0.1 М Трис-буфер	1/10	91	6,30	Да	0,05 ЕЭ/мл
0.1 М Трис-буфер	1/100	121	6,80	Да	0,5 ЕЭ/мл
0.1 М Трис-буфер	1/1000	103	7,10	Да	5 ЕЭ/мл

Литература

- Инструкция ЛАЛ-реактив Pyrotell-T
- Файл результатов опыта 969426042801.plt
- Файл результатов опыта 969426050500.plt

Продолжение цикла статей о подборе вариантов проверки в ЛАЛ-тесте растворов кислоты и основания читайте в части 2.