

СБОРНИК ВОПРОСОВ И ЗАДАЧ

К СЕМИНАРУ

ПРОВЕДЕНИЕ КОНТРОЛЬНЫХ АНАЛИЗОВ В
СООТВЕТСТВИИ С ТРЕБОВАНИЯМИ ОФС
«БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЭНДОТОКСИНЫ»

ООО «ЛАЛ-ЦЕНТР»
МОСКВА

Настоящий сборник задач является дополнением к курсу, «Проведение контрольных анализов в соответствии с требованиями ОФС «Бактериальные эндотоксины».

Подготовка к проведению ЛАЛ-теста, в основном, сводится к приготовлению разведений контрольного стандарта эндотоксина и испытуемого препарата. И хотя целевое назначение этих работ разное, с технической точки зрения никакой разницы между подготовкой разведений КСЭ и препарата нет. Поэтому в настоящем сборнике собраны теоретические вопросы и задачи прямо или опосредованно связанные с подготовкой различных разведений.

Мотивом к созданию этого сборника послужил анализ многолетней практики проведения учебных занятий по ЛАЛ-тесту. Оценка уровня подготовки слушателей и степени усвоения материала позволила нам сделать несколько следующих наблюдений:

- Суть метода, биохимические принципы положенные в его основу понятны сразу. Вопросы, если и возникают, то уточняющие или расширяющие программный курс.
- У человека, знакомого с техникой лабораторных работ, проведение ЛАЛ-теста не вызывает никаких сложностей. Впервые проводимые анализы получаются сразу и практически без помарок.
- Аналитик, занимающийся проведением контрольных анализов, имеет набор базовых знаний более чем достаточный для самостоятельного составления плана подготовки к анализу. Тем более, что этот план состоит из серии расчетов, базирующихся на четырех арифметических действиях.

Однако, с началом самостоятельной работы возникают серьезнейшие проблемы с определением плана опыта, правил и последовательности подготовки реакционных смесей. Заметной частью этих проблем являются затруднения в расчетах концентраций КСЭ и степени разведения препарата. Это как раз те самые простые арифметические действия, которые ни у кого из нас обычно затруднений не вызывают. Дело в том, что на практических занятиях и курсах большая часть времени отводится на теорию и практику и это вполне логично. Вопросы расчетов также разбираются, но времени на отработку навыков и на решение контрольных задач уделяется очень мало. Да и странно было бы заставлять взрослых людей рассчитывать у доски концентрацию активного вещества в 0,9% растворе. Вместе с тем для приобретения навыка имеет смысл потратить некоторое время на решение практических задач. При этом необходимо стремиться к тому, чтобы выработать умение осуществлять подготовительные расчеты, если можно, так сказать, «на аппаратном уровне».

Для этой цели и создан этот сборник вопросов и задач. Сборник состоит из нескольких тематических разделов, в которых собраны задачи и упражнения, которые должны помочь понять смысл и содержание отдельных «фрагментов» подготовки. Деление на «фрагменты» достаточно условное, поскольку все они вместе составляют единую ткань анализа. В самом конце сборника приведены несколько «синтетических» задач, решение которых логично базируется на ранее отработанных темах. Каждый раздел имеет короткое введение и несколько примеров решения задач. Многие задачи носят совершенно абстрактный характер и не связаны с конкретными лекарственными препаратами и их свойствами.

Задачник рассчитан примерно на 2-3 часа самостоятельной работы. Форма оформления решений выбрана абсолютно свободная, и мы совершенно не призываем принимать ее как какую-то кальку для дальнейшей работы.

Мы не стремились повторять школьные задачники, у которых на последней странице приведены ответы на все вопросы. Нет никакого сомнения, что любой специалист, начавший осваивать ЛАЛ-тест, сможет найти решения самостоятельно.

Мы были бы очень рады любым отзывам, критике и предложениям по этому сборнику. Самые важные вопросы для нас:

- Нужен ли этот сборник вообще
- Помогает ли он составить более полную картину подготовительных работ перед анализом.
- Имеет ли смысл развивать этот сборник и нужны ли такие сборники к другим тематическим семинарам.

Надеемся, что работа над задачами, если и не доставит вам большого удовольствия, то, окажется полезной в дальнейшей работе.

Желаем успехов.
ООО «ЛАЛ-Центр»

РАЗДЕЛ 1 «ПОДГОТОВКА РАЗВЕДЕНИЙ»

В данном разделе приведены задачи по составлению схем подготовки разведений. Проводя такие расчеты, целесообразно учитывать следующие обстоятельства:

- Разведения указываются в виде простой дроби - $1/2$, $1/40$ и т.д. Разведение $1/2$ (в два раза) означает содержание 1 части растворяемого вещества в 2 частях получившегося раствора. Для подготовки смешивают 1 часть растворяемого вещества и 1 часть растворителя.
- Не стоит делать разведения с шагом более $1/10$. При подготовке больших разведений обычно начинают именно с серии разведений $1/10$, а затем переходят к более мелким разведениям.
- Не имеет смысла использовать большие объемы воды и разводимого раствора. Обычно 0,5-1,0 мл бывает достаточно.
- При расчетах немаловажным является учет тех полезных объемов, которые окажутся в пробирках.
- Можно также по ходу расчетов оценить и общий объем растворителя (воды), который понадобится на всю операцию.

ПРИМЕР

Предложите схему подготовки разведения $1/80$

Степень разведения	Раствор, мл	Вода, мл	Общий объем, мл	Оставшийся объем, мл
$1/10$	0,1	0,9	1,0	0,9
$1/80$	0,1	0,7	0,8	0,8
		$\Sigma = 1,6$ мл		

РАЗДЕЛ 2 «ПОДГОТОВКА ИСХОДНОГО РАСТВОРА КСЭ»

Контрольный стандарт эндотоксина поставляется в лиофилизированном виде, обычно во флаконах содержится по 10 нг или 500 нг ЛПС. Перед работой контрольный стандарт следует развести водой для ЛАЛ-теста. Активность КСЭ может быть разной при реакции с ЛАЛ-реактивом разных серий. Эта важная информация указана в Сертификате Анализа.

ПРИМЕР

- Содержание КСЭ во флаконе - 10 нг.
- Активность КСЭ по Международному стандарту - 10 ЕЭ/нг.

Предложите способ подготовки исходного раствора КСЭ с концентрацией эндотоксина 20 ЕЭ/мл.

Содержание эндотоксина во флаконе, нг/флакон	10 нг
Активность эндотоксина по Сертификату, ЕЭ/нг	10 ЕЭ/нг
Содержание эндотоксина во флаконе, в ЕЭ	100 ЕЭ
Концентрация эндотоксина в исходном растворе, ЕЭ/мл	20 ЕЭ/мл
Объем воды, необходимый для получения исходного раствора с желаемой концентрацией, мл	$\frac{100 \text{ ЕЭ}}{20 \text{ ЕЭ/мл}} = 5 \text{ мл}$

ЗАДАЧИ

- Содержание КСЭ во флаконе - 10 нг.
- Активность КСЭ по Международному стандарту - 7,5 ЕЭ/нг.

Предложите способ подготовки исходного раствора КСЭ с концентрацией эндотоксина 20 ЕЭ/мл.

Содержание эндотоксина во флаконе, нг/флакон	
Активность эндотоксина по Сертификату, ЕЭ/нг	
Содержание эндотоксина во флаконе, в ЕЭ	
Концентрация эндотоксина в исходном растворе, ЕЭ/мл	
Объем воды, необходимый для получения исходного раствора с желаемой концентрацией, мл	

- Содержание КСЭ во флаконе - 10 нг.
- Активность КСЭ по Международному стандарту - 13 ЕЭ/нг.

Предложите способ подготовки исходного раствора КСЭ с концентрацией эндотоксина 20 ЕЭ/мл.

Содержание эндотоксина во флаконе, нг/флакон	
Активность эндотоксина по Сертификату, ЕЭ/нг	
Содержание эндотоксина во флаконе, в ЕЭ	
Концентрация эндотоксина в исходном растворе, ЕЭ/мл	
Объем воды, необходимый для получения исходного раствора с желаемой концентрацией, мл	

Раздел 2 «Подготовка исходного раствора КСЭ»

- Содержание КСЭ во флаконе - 500 нг.
- Активность КСЭ по Международному стандарту - 10 ЕЭ/нг.

Предложите способ подготовки исходного раствора КСЭ с концентрацией эндотоксина 1000 ЕЭ/мл.

Содержание эндотоксина во флаконе, нг/флакон	
Активность эндотоксина по Сертификату, ЕЭ/нг	
Содержание эндотоксина во флаконе, в ЕЭ	
Концентрация эндотоксина в исходном растворе, ЕЭ/мл	
Объем воды, необходимый для получения исходного раствора с желаемой концентрацией, мл	

- Содержание КСЭ во флаконе - 500 нг.
- Активность КСЭ по Международному стандарту - 5 ЕЭ/нг.

Предложите способ подготовки исходного раствора КСЭ с концентрацией эндотоксина 1000 ЕЭ/мл.

Содержание эндотоксина во флаконе, нг/флакон	
Активность эндотоксина по Сертификату, ЕЭ/нг	
Содержание эндотоксина во флаконе, в ЕЭ	
Концентрация эндотоксина в исходном растворе, ЕЭ/мл	
Объем воды, необходимый для получения исходного раствора с желаемой концентрацией, мл	

РАЗДЕЛ 3 «ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ЛАЛ-РЕАКТИВА И КСЭ»

Чувствительность каждой серии ЛАЛ-реактива представляет собой конкретное значение - это наименьшая концентрация эндотоксина, приводящая к образованию геля. Обозначается эта чувствительность греческой буквой λ (лямбда). В Общих фармакопейных статьях, инструкциях и рекомендациях буквой λ обозначается еще и концентрация КСЭ, необходимая для осуществления тех или иных операций, например, 2λ или 20λ . В этом контексте λ рассматривается как величина относительная, показывающая, как соотносится концентрация КСЭ в растворе с той или иной чувствительностью ЛАЛ-реактива. Целесообразно выработать привычку «автоматически» соотносить такие индексированные значения с реальными концентрациями КСЭ.

Например, для ЛАЛ-реактива с $\lambda = 0,03$ ЕЭ/мл
 2λ означает концентрацию КСЭ $0,06$ ЕЭ/мл,
 $0,5\lambda$ означает концентрацию КСЭ $0,015$ ЕЭ/мл.

Следует обратить внимание, что при расчетах для реактивов с чувствительностью, обозначенной как $0,03$ ЕЭ/мл и $0,06$ ЕЭ/мл, целесообразно использовать не округленные значения (указанные на этикетке), а реальные значения чувствительности.

Для $0,06$ ЕЭ/мл - $0,0625$ ЕЭ/мл
Для $0,03$ ЕЭ/мл - $0,03125$ ЕЭ/мл

ЗАДАЧИ:

- Чувствительность ЛАЛ-реактива 0,03 ЕЭ/мл.

Укажите, какие концентрации КСЭ соответствуют приведенным обозначениям:

	20λ	4λ	2λ	λ	0,5λ	0,25λ
КСЭ, ЕЭ/мл						

- Чувствительность ЛАЛ-реактива 0,25 ЕЭ/мл.

Укажите, какие концентрации КСЭ соответствуют приведенным обозначениям:

	20λ	4λ	2λ	λ	0,5λ	0,25λ
КСЭ, ЕЭ/мл						

- Чувствительность ЛАЛ-реактива 0,06 ЕЭ/мл.

Укажите, какие концентрации КСЭ соответствуют приведенным обозначениям:

	20λ	4λ	2λ	λ	0,5λ	0,25λ
КСЭ, ЕЭ/мл						

РАЗДЕЛ 4. «ПОДГОТОВКА РАЗВЕДЕНИЙ КСЭ».

Исходный раствор КСЭ используют для подготовки растворов с различной концентрацией эндотоксина и, которые нужны для постановки положительных контролей. Способы подготовки положительных контролей могут быть различными, соответственно и концентрации КСЭ необходимы самые разные.

ПРИМЕР

- Исходный раствор КСЭ 20 ЕЭ/мл.
- ЛАЛ-реактив $\lambda = 0,125$ ЕЭ/мл.

Рассчитайте степень разведения исходного раствора КСЭ, в которых концентрация эндотоксина равна 20λ и 2λ .

Концентрация эндотоксина в исходном растворе КСЭ, ЕЭ/мл.	20 ЕЭ/мл	20 ЕЭ/мл
Обозначение концентрации в итоговом растворе (λ)	20λ	2λ
Концентрация эндотоксина в итоговом растворе КСЭ, ЕЭ/мл	2,5 ЕЭ/мл	0,25 ЕЭ/мл
Отношение концентраций	$\frac{20 \text{ ЕЭ/мл}}{2,5 \text{ ЕЭ/мл}} = 8$	$\frac{20 \text{ ЕЭ/мл}}{0,25 \text{ ЕЭ/мл}} = 80$
Степень разведения исходного раствора.	1/8	1/80

ЗАДАЧИ

Исходный раствор КСЭ 20 ЕЭ/мл.

ЛАЛ-реактив, $\lambda = 0,03$ ЕЭ/мл.

Рассчитайте степень разведения исходного раствора КСЭ, в которых концентрация эндотоксина равна 20λ и 2λ .

Концентрация эндотоксина в исходном растворе КСЭ, ЕЭ/мл.		
Обозначение концентрации в итоговом растворе (λ)		
Концентрация эндотоксина в итоговом растворе КСЭ, ЕЭ/мл		
Отношение концентраций		
Степень разведения исходного раствора.		

2. Исходный раствор КСЭ 20 ЕЭ/мл

ЛАЛ-реактив $\lambda = 0,06$ ЕЭ/мл.

Рассчитайте степень разведения исходного раствора КСЭ, в которых концентрация эндотоксина равна 4λ и λ .

Концентрация эндотоксина в исходном растворе КСЭ, ЕЭ/мл.		
Обозначение концентрации в итоговом растворе (λ)		
Концентрация эндотоксина в итоговом растворе КСЭ, ЕЭ/мл		
Отношение концентраций		
Степень разведения исходного раствора.		

Раздел 4 «Подготовка разведений КСЭ»

- Исходный раствор КСЭ 1000 ЕЭ/мл
- ЛАЛ-реактив, $\lambda=0,125$ ЕЭ/мл.

Рассчитайте степень разведения исходного раствора КСЭ, в которых концентрация эндотоксина равна 20 λ и 2 λ .

Концентрация эндотоксина в исходном растворе КСЭ, ЕЭ/мл.		
Обозначение концентрации в итоговом растворе (λ)		
Концентрация эндотоксина в итоговом растворе КСЭ, ЕЭ/мл		
Отношение концентраций		
Степень разведения исходного раствора.		

- Исходный раствор КСЭ 1000 ЕЭ/мл.
- ЛАЛ-реактив 0,125 ЕЭ/мл.

Рассчитайте степень разведения исходного раствора КСЭ, в которых концентрация эндотоксина равна 0,5 λ и 0,25 λ .

Концентрация эндотоксина в исходном растворе КСЭ, ЕЭ/мл.		
Обозначение концентрации в итоговом растворе (λ)		
Концентрация эндотоксина в итоговом растворе КСЭ, ЕЭ/мл		
Отношение концентраций		
Степень разведения исходного раствора.		

РАЗДЕЛ 5 «ПРЕДЕЛЬНОЕ СОДЕРЖАНИЕ БЭ В ЛС»

Предельное содержание бактериальных эндотоксинов в лекарственных препаратах указывается в Фармакопейных статьях предприятия. Это значение выражают в ЕЭ в мл, мг или г активного вещества. Для проведения расчетов наиболее удобно выражение в ЕЭ/мл, однако чаще содержание эндотоксинов выражают в ЕЭ/мг или ЕЭ/г.

В таком случае первым этапом подготовки к анализу является пересчет приведенного значения в ЕЭ/мл, т.е. определение концентрации бактериальных эндотоксинов в исходном растворе.

Исходным раствором называется раствор готового ЛС с указанной концентрацией активного вещества в нем, например 2% раствор, раствор с концентрацией 25 мг/мл и т.д.

В том случае, если препарат представляет собой порошок, то первым шагом будет определение объема воды, необходимого для подготовки исходного раствора с приемлемой концентрацией, и затем пересчет значения БЭ.

В случае проверки субстанции, к описанным действиям добавляется еще один шаг - подготовка аналитической навески, далее следует решение о желаемой концентрации исходного раствора и пересчет значения предельного содержания эндотоксинов.

В последних двух случаях можно придерживаться следующих правил:

- Объем воды не должен быть очень большим – обычно 2,5-10,0 мл,
- Не стоит готовить растворы с высокими исходными концентрациями – обычно достаточно 50 мг/мл – 200 мг/мл.
- Значение концентрации исходного раствора, определенное самостоятельно перед опытом, необходимо указывать в протоколах анализов, в СОПах и пр. документации, сопровождающей проверку ЛС.
- Желаемая концентрация исходного раствора в отдельных случаях может быть указана и в основном документе - ФСП.

ПРИМЕР

- Испытывается 3% раствор ЛС.
- Предельное содержание бактериальных эндотоксинов - не более 5 ЕЭ/мг.

Рассчитайте значение предельного содержания бактериальных эндотоксинов для исходного раствора препарата.

Предельное содержание бактериальных эндотоксинов по ФСП	не более 5 ЕЭ/мг
Исходный раствор, мг/мл	30 мг/мл
Предельное содержание для исходного раствора, ЕЭ/мл	не более 150 ЕЭ/мл

- Испытывается ЛС в виде порошка 500 мг во флаконе.
- Предельное содержание бактериальных эндотоксинов - не более 0,1 ЕЭ/мг.

Предложите вариант подготовки исходного раствора препарата.

Рассчитайте значение предельного содержания бактериальных эндотоксинов для исходного раствора препарата.

Предельное содержание бактериальных эндотоксинов по ФСП	не более 0,1 ЕЭ/мг
Исходный раствор, мг/мл	500 мг + 5 мл воды = 100 мг/мл
Предельное содержание для исходного раствора, ЕЭ/мл	не более 10 ЕЭ/мл

- Испытывается субстанция.
- Предельное содержание бактериальных эндотоксинов - не более 5 ЕЭ/г.

Предложите вариант подготовки исходного раствора препарата.

Рассчитайте значение предельного содержания бактериальных эндотоксинов для исходного раствора препарата.

Предельное содержание бактериальных эндотоксинов по ФСП	не более 5 ЕЭ/г
Исходный раствор, мг/мл	0,125 г(навеска) + 2,5 мл воды = 0,05 г/мл
Предельное содержание для исходного раствора, ЕЭ/мл	не более 0,25 ЕЭ/мл

ЗАДАЧИ:

- Испытывается 5% раствор ЛС.
- Предельное содержание бактериальных эндотоксинов - не более 5 ЕЭ/мг.
Рассчитайте значение предельного содержания бактериальных эндотоксинов для исходного раствора препарата.

Предельное содержание бактериальных эндотоксинов по ФСП	
Исходный раствор, мг/мл	
Предельное содержание для исходного раствора, ЕЭ/мл	

- Испытывается 20% раствор ЛС.
- Предельное содержание бактериальных эндотоксинов - не более 10 ЕЭ/г.
Рассчитайте значение предельного содержания бактериальных эндотоксинов для исходного раствора препарата.

Предельное содержание бактериальных эндотоксинов по ФСП	
Исходный раствор, мг/мл	
Предельное содержание для исходного раствора, ЕЭ/мл	

- Испытывается 15% раствор ЛС.
- Предельное содержание бактериальных эндотоксинов - не более 7,5 ЕЭ/мг.
Рассчитайте значение предельного содержания бактериальных эндотоксинов для исходного раствора препарата.

Предельное содержание бактериальных эндотоксинов по ФСП	
Исходный раствор, мг/мл	
Предельное содержание для исходного раствора, ЕЭ/мл	

- Испытывается 2,5% раствор ЛС.
- Предельное содержание бактериальных эндотоксинов - не более 2,5 ЕЭ/мг.

Рассчитайте значение предельного содержания бактериальных эндотоксинов для исходного раствора препарата.

Предельное содержание бактериальных эндотоксинов по ФСП	
Исходный раствор, мг/мл	
Предельное содержание для исходного раствора, ЕЭ/мл	

- Испытывается ЛС в виде порошка 250 мг во флаконе.
- Предельное содержание бактериальных эндотоксинов - не более 0,15 ЕЭ/мг.

*Предложите вариант подготовки исходного раствора препарата.
Рассчитайте значение предельного содержания бактериальных эндотоксинов для исходного раствора препарата.*

Предельное содержание бактериальных эндотоксинов по ФСП	
Исходный раствор, мг/мл	
Предельное содержание для исходного раствора, ЕЭ/мл	

- Испытывается ЛС в виде порошка по 0,5 г и 1,0 г во флаконе.
- Предельное содержание бактериальных эндотоксинов - не более 0,05 ЕЭ/мг.

*Предложите вариант подготовки исходного раствора препарата.
Рассчитайте значение предельного содержания бактериальных эндотоксинов для исходного раствора препарата.*

Предельное содержание бактериальных эндотоксинов по ФСП	
Исходный раствор, мг/мл	
Предельное содержание для исходного раствора, ЕЭ/мл	

- Испытывается ЛС в виде порошка во флаконах по 250 мг или 500 мг.
- Предельное содержание бактериальных эндотоксинов - не более 0,2 ЕЭ/мг.

*Предложите вариант подготовки исходного раствора препарата.
Рассчитайте значение предельного содержания бактериальных эндотоксинов для исходного раствора препарата.*

Предельное содержание бактериальных эндотоксинов по ФСП	
Исходный раствор, мг/мл	
Предельное содержание для исходного раствора, ЕЭ/мл	

- Испытывается субстанция.
- Предельное содержание бактериальных эндотоксинов - не более 0,1 ЕЭ/мг.

*Предложите вариант подготовки исходного раствора препарата.
Рассчитайте значение предельного содержания бактериальных эндотоксинов для исходного раствора препарата.*

Предельное содержание бактериальных эндотоксинов по ФСП	
Исходный раствор, мг/мл	
Предельное содержание для исходного раствора, ЕЭ/мл	

- Испытывается субстанция.
- Предельное содержание бактериальных эндотоксинов - не более 10 ЕЭ/г.

*Предложите вариант подготовки исходного раствора препарата.
Рассчитайте значение предельного содержания бактериальных эндотоксинов для исходного раствора препарата.*

Предельное содержание бактериальных эндотоксинов по ФСП	
Исходный раствор, мг/мл	
Предельное содержание для исходного раствора, ЕЭ/мл	

РАЗДЕЛ 6. «РАСЧЕТ ЗНАЧЕНИЯ МДР»

При проведении контрольного анализа препарат может быть проверен в любом разведении, но не превышающем значения Максимально Допустимого Разведения, МДР, которое рассчитывается по формуле:

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

Расчеты значения МДР не представляют никакой сложности, однако некоторую проблему может представлять сама суть этого понятия. Возможно, несколько легче будет понять это, обратившись к теме расчета степени разведения КСЭ. Во флаконе КСЭ содержится раствор с концентрацией, равной 20 ЕЭ/мл, для ЛС может быть установлено значение предельного содержания эндотоксинов - не более 20 ЕЭ/мл. Принципы расчетов в обоих случаях одинаковые - расчет степени разведения, в которой концентрация эндотоксина уравнивается с чувствительностью ЛАЛ-реактива. Цели действий принципиально разные - для раствора КСЭ должен быть получен гель, т.е. в расчетном разведении концентрация действительно РАВНА чувствительности ЛАЛ-реактива. Для раствора препарата геля быть не должно, так как концентрация в нем должна быть МЕНЕЕ значения предельного содержания БЭ.

	КСЭ	ГЛС
Концентрация в исходном растворе, ЕЭ/мл	20 ЕЭ/мл	не более 20 ЕЭ/мл
Чувствительность ЛАЛ-реактива (λ), ЕЭ/мл	0,25 ЕЭ/мл	0,25 ЕЭ/мл
Отношение концентраций	$\frac{20 \text{ ЕЭ/мл}}{0,25 \text{ ЕЭ/мл}} = 80$	$\frac{20 \text{ ЕЭ/мл}}{0,25 \text{ ЕЭ/мл}} = 80$
Концентрация в разведении 1/80, ЕЭ/мл	должна быть равна 0,25 ЕЭ/мл	должна быть менее 0,25 ЕЭ/мл

Для расчета МДР в формулу подставляется значение чувствительности ЛАЛ-реактива и значение предельного содержания бактериальных эндотоксинов в препарате. При этом очевидно, что последнее значение 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. Если предельное содержание выражено в ЕЭ/мг, его надо перевести в значение концентрации в исходном растворе.

Для получения большей уверенности в отсутствии эндотоксина в препарате его рекомендуют проверять в разведениях меньших расчетного значения МДР, хотя бы в $1/2$ МДР, например, если МДР = 80, то $1/2$ МДР = 40.

ПРИМЕР

- Испытывается 2,5% раствор ЛС.
- Предельное содержание бактериальных эндотоксинов - не более 2,5 ЕЭ/мг.
- ЛАЛ-реактив $\lambda = 0,25$ ЕЭ/мл.

Рассчитайте значение МДР и $1/2$ МДР.

Предельное содержание бактериальных эндотоксинов по ФСП	не более 2,5 ЕЭ/мг
Исходный раствор, мг/мл	25 мг/мл
Предельное содержание для исходного раствора, ЕЭ/мл	не более 62,5 ЕЭ/мл (25 мг/мл x 2,5 ЕЭ/мг)
λ , ЕЭ/мл	0,25 ЕЭ/мл
МДР	250
$1/2$ МДР	125

ЗАДАЧИ:

- Испытывается 20% раствор ЛС.
- Предельное содержание бактериальных эндотоксинов - не более 10 ЕЭ/г.
- ЛАЛ-реактив $\lambda = 0,125$ ЕЭ/мл.

Рассчитайте значение МДР и 1/2 МДР .

Предельное содержание бактериальных эндотоксинов по ФСП	
Исходный раствор, мг/мл	
Предельное содержание для исходного раствора, ЕЭ/мл	
λ , ЕЭ/мл	
МДР	
1/2 МДР	

- Испытывается ЛС в виде порошка 250 мг во флаконе.
- Предельное содержание бактериальных эндотоксинов - не более 0,15 ЕЭ/мг.
- ЛАЛ-реактив $\lambda = 0,03$ ЕЭ/мл.

Рассчитайте значение МДР и 1/2 МДР .

Предельное содержание бактериальных эндотоксинов по ФСП	
Исходный раствор, мг/мл	
Предельное содержание для исходного раствора, ЕЭ/мл	
λ , ЕЭ/мл	
МДР	
1/2 МДР	

- Испытывается 0,9% раствор ЛС.
- Предельное содержание бактериальных эндотоксинов - не более 0,25 ЕЭ/мл.
- ЛАЛ-реактив $\lambda = 0,06$ ЕЭ/мл.

Рассчитайте значение МДР и 1/2 МДР .

Предельное содержание бактериальных эндотоксинов по ФСП	
Исходный раствор, мг/мл	
Предельное содержание для исходного раствора, ЕЭ/мл	
λ , ЕЭ/мл	
МДР	
1/2 МДР	

- Испытывается раствор ЛС, содержание активного вещества 30 мг/мл.
- Предельное содержание бактериальных эндотоксинов - не более 1,5 ЕЭ/мл.
- ЛАЛ-реактив $\lambda = 0,25$ ЕЭ/мл.

Рассчитайте значение МДР и 1/2 МДР .

Предельное содержание бактериальных эндотоксинов по ФСП	
Исходный раствор, мг/мл	
Предельное содержание для исходного раствора, ЕЭ/мл	
λ , ЕЭ/мл	
МДР	
1/2 МДР	

РАЗДЕЛ 7. «РАСЧЕТЫ ЗНАЧЕНИЯ МДР ДЛЯ ОБЪЕДИНЕННОЙ ВЫБОРКИ»

Согласно общим правилам проверки лекарственных препаратов, каждый образец должен проверяться индивидуально. Однако, если при проверке новой серии для контроля отобрано несколько ампул или флаконов, может возникнуть желание смешать их содержимое и проверить получившуюся смесь в одном опыте. Это заманчиво, поскольку позволяет экономить и время, и реактивы. К сожалению, при этом возникает риск получения недостоверных результатов из-за того, что смешиваемые растворы могут иметь разные концентрации эндотоксинов.

Возможность проверки объединенной пробы возникает после введения поправки на объединение и пересчета значения предельного содержания эндотоксинов в препарате. Для этого предельное содержание эндотоксинов, установленное для препарата делят на количество образцов в объединенной выборке.

Важно, что после этого необходимо сделать и пересчет значения МДР, которое для объединенной выборки также будет снижено.

ПРИМЕР

- Испытывается 0,9% раствор ЛС.
- Предельное содержание бактериальных эндотоксинов - не более 0,25 ЕЭ/мл.
- Проверяется 3 флакона одновременно.
- ЛАЛ-реактив $\lambda = 0,06$ ЕЭ/мл.

Рассчитайте предельное содержание бактериальных эндотоксинов и значение МДР для объединенной выборки из трех флаконов

	1 образец	3 образца
Предельное содержание бактериальных эндотоксинов ЕЭ/мл	0,25 ЕЭ/мл	0,083 ЕЭ/мл
λ , ЕЭ/мл	0,06 ЕЭ/мл	0,06 ЕЭ/мл
МДР	4	1,3

Полезно уметь рассчитывать и «обратную» величину, т.е. сколько образцов можно проверить с использованием того или иного реактива. В данном случае это не более 3х образцов.

ЗАДАЧИ

- Испытывается 5% раствор ЛС.
- Предельное содержание бактериальных эндотоксинов - не более 0,5 ЕЭ/мл.
- ЛАЛ-реактив $\lambda = 0,03$ ЕЭ/мл.

Рассчитайте предельное содержание бактериальных эндотоксинов и значение МДР для объединенной выборки из 5 флаконов

Предельное содержание бактериальных эндотоксинов ЕЭ/мл		
λ , ЕЭ/мл		
МДР		

- Испытывается 20% раствор ЛС.
- Предельное содержание бактериальных эндотоксинов - не более 10 ЕЭ/г.
- ЛАЛ-реактив $\lambda = 0,125$ ЕЭ/мл.

Рассчитайте предельное содержание бактериальных эндотоксинов и значение МДР для объединенной выборки из 3 флаконов

Предельное содержание бактериальных эндотоксинов ЕЭ/мл		
λ , ЕЭ/мл		
МДР		

Раздел 7 «Расчеты значения МДР для объединенной выборки»

- Испытывается раствор ЛС с концентрацией активного вещества 40 мг/мл.
- Предельное содержание бактериальных эндотоксинов - не более 0,5 ЕЭ/мг.
- ЛАЛ-реактив $\lambda = 0,03$ ЕЭ/мл.

Рассчитайте предельное содержание бактериальных эндотоксинов и значение МДР для объединенной выборки из 2 флаконов.

Предельное содержание бактериальных эндотоксинов ЕЭ/мл		
λ , ЕЭ/мл		
МДР		

- Испытывается раствор ЛС с концентрацией активного вещества 100 мг/мл.
- Предельное содержание бактериальных эндотоксинов - не более 0,15 ЕЭ/мг.
- ЛАЛ-реактив $\lambda = 0,03$ ЕЭ/мл.

Рассчитайте предельное содержание бактериальных эндотоксинов и значение МДР для объединенной выборки из 4 флаконов.

Предельное содержание бактериальных эндотоксинов ЕЭ/мл		
λ , ЕЭ/мл		
МДР		

РАЗДЕЛ 8. «ИНГИБИРОВАНИЕ – ОГРАНИЧЕНИЕ НИЖНЕГО ПОРОГА РАЗВЕДЕНИЯ»

Значение МДР определяет наибольший, или верхний порог разведения, при котором может быть проверен препарат. В большом количестве случаев препараты стремятся проверять в разведениях, значительно меньших МДР. Однако нижний порог разведения препарата ограничен таким его свойством как ингибирование реакции со стороны препарата. К сожалению, это явление очень распространено, и препараты в высоких концентрациях (20 мг/мл – 100 мг/мл), как правило, ингибируют реакцию. Если известно разведение, в котором преодолевается ингибирование, открывается возможность выбора разведения для проверки в довольно большом диапазоне.

ПРИМЕР

- Исходный раствор препарата имеет концентрацию активного вещества 50 мг/мл.
- Предельное содержание бактериальных эндотоксинов в препарате не более 50 ЕЭ/мл.
- Ингибирование преодолевается в разведении 1/100.

В каком ряду разведений возможна проверка препарата с использованием ЛАЛ-реактива с $\lambda = 0,125$ ЕЭ/мл?

Предельное содержание эндотоксинов, по ФСП	50 ЕЭ/мл
Исходный раствор препарата, мг/мл	50 мг/мл
λ , ЕЭ/мл	0,125 ЕЭ/мл
МДР	400
Минимально возможное разведение	100
Возможный диапазон разведений для проведения анализа	1/100 – 1/400

Разведение, в котором точно преодолевается ингибирование, называют «неингибирующим разведением». Но для многих препаратов может использоваться термин «неингибирующая концентрация». Так, для вышеприведенного препарата неингибирующему разведению 1/100 соответствует концентрация активного вещества в растворе 0,5 мг/мл, эта концентрация может быть названа неингибирующей.

ПРИМЕР

- Исходный раствор препарата имеет концентрацию активного вещества 50 мг/мл.
- Предельное содержание бактериальных эндотоксинов в препарате не более 50 ЕЭ/мл.
- Ингибирование преодолевается для раствора препарата с концентрацией 0,5 мг/мл.

В каком ряду возможна проверка препарата с использованием ЛАЛ-реактива с $\lambda = 0,125$ ЕЭ/мл?

Предельное содержание эндотоксинов по ФСП	50 ЕЭ/мл
Исходный раствор препарата мг/мл	50 мг/мл
λ , ЕЭ/мл	0,125 ЕЭ/мл
МДР	400
Минимальная неингибирующая концентрация	0,5 мг/мл
Минимально возможное разведение	$\frac{50 \text{ мг/мл}}{0,5 \text{ мг/мл}} = 100$
Возможный диапазон разведений для проведения анализа	1/100 – 1/400

Особенно важно знание нижнего порога разведений в случае, если предполагается проверка нескольких образцов в объединенной выборке. В этом случае происходит снижение значения предельного содержания эндотоксинов и, соответственно, значения МДР. Если расчетное значение МДР окажется меньше нижнего порога, проверка в объединенной выборке будет невозможна.

ПРИМЕР

- Исходный раствор препарата имеет концентрацию активного вещества 50 мг/мл.
- Предельное содержание бактериальных эндотоксинов в препарате не более 50 ЕЭ/мл.
- Ингибирование преодолевается в разведении 1/100.
- Используется ЛАЛ-реактив с $\lambda = 0,125$ ЕЭ/мл.

Может ли вышеприведенный препарат проверяться в объединенной выборке из 5 флаконов?

Предельное содержание эндотоксинов по ФСП	50 ЕЭ/мл
Предельное содержание эндотоксинов для 5 фл	10 ЕЭ/мл
λ , ЕЭ/мл	0,125 ЕЭ/мл
МДР для объединенной выборки	80
Минимально возможное разведение	100
Возможный диапазон разведений для проведения анализа	отсутствует

Вывод: проверка 5 образцов одновременно невозможна.

ЗАДАЧИ

- Предельное содержание бактериальных эндотоксинов в препарате не более 1 ЕЭ/мг.
- Концентрация активного вещества в исходном растворе 5%.
- Ингибирование преодолевается в концентрации, равной 1 мг/мл.

В каком ряду возможна проверка препарата с использованием ЛАЛ-реактива с $\lambda = 0,125$ ЕЭ/мл?

Предельное содержание эндотоксинов по ФСП	
Исходный раствор препарата, мг/мл	
λ , ЕЭ/мл	
МДР	
Минимальная неингибирующая концентрация	
Минимально возможное разведение	
Возможный диапазон разведений для проведения анализа	

- Предельное содержание бактериальных эндотоксинов в препарате не более 0,1 ЕЭ/мг.
- Концентрация активного вещества в исходном растворе 100 мг/мл.
- Ингибирование преодолевается при разведении исходного раствора в 200 раз.

В каком ряду возможна проверка препарата с использованием ЛАЛ-реактива с $\lambda = 0,03$ ЕЭ/мл?

Предельное содержание эндотоксинов по ФСП	
Исходный раствор препарата, мг/мл	
λ , ЕЭ/мл	
МДР	
Минимально возможное разведение	
Возможный диапазон разведений для проведения анализа	

- Предельное содержание бактериальных эндотоксинов в препарате не более 0,5 ЕЭ/мл.
- Препарат не ингибирует реакцию.

Возможна ли проверка для объединенной выборки из 4 образцов с использованием ЛАЛ-реактива $\lambda = 0,03$ ЕЭ/мл?

Предельное содержание эндотоксинов по ФСП	
Исходный раствор препарата, мг/мл	
Предельное содержание эндотоксинов для выборки из 4 образцов	
λ , ЕЭ/мл	
МДР для объединенной выборки	
Минимально возможное разведение	
Возможный диапазон разведений для проведения анализа	

Раздел 8 «Ингибирование – ограничение нижнего порога разведения»

- Предельное содержание бактериальных эндотоксинов в препарате не более 0,15 ЕЭ/мг.
- Концентрация активного вещества в исходном растворе 200 мг/мл.
- Ингибирование преодолевается при концентрации активного вещества 4 мг/мл.

В каком ряду возможна проверка препарата с использованием ЛАЛ-реактива с $\lambda = 0,06$ ЕЭ/мл?

Предельное содержание эндотоксинов по ФСП	
Исходный раствор препарата, мг/мл	
λ , ЕЭ/мл	
МДР	
Минимальная неингибирующая концентрация	
Минимально возможное разведение	
Возможный диапазон разведений для проведения анализа	

РАЗДЕЛ 9. «ОПТИМИЗАЦИЯ РАСЧЕТНЫХ ЗНАЧЕНИЙ»

Верный расчет степени разведения для проверки препарата очень важен. Но и теоретические расчеты иногда стоит подправлять, используя здравый смысл. Например, если расчетное значение МДР получилось равным 1/320, то препарат совершенно необязательно разводить в 320 раз. Можно округлить это значение, а значит, и обеспечить себе более «щадящую» процедуру подготовки разведений. Правил при этом два:

- Нельзя округлять значения МДР в большую сторону: если значение МДР оказалось 986, проверять в разведении 1/1000 нельзя.
- Выбранное разведение должно быть простым в подготовке.

ПРИМЕР

- Предельное содержание бактериальных эндотоксинов не более 70 ЕЭ/мл.
- Используется ЛАЛ-реактив $\lambda = 0,125$ ЕЭ/мл.

Предложите разведение для проверки, близкое к значению МДР.

Предложите способ подготовки этого разведения.

Предельное содержание для исходного раствора, ЕЭ/мл	70 ЕЭ/мл
λ , ЕЭ/мл	0,125 ЕЭ/мл
МДР	560
Анализ целесообразно проводить в разведении	1/500

Степень разведения	Раствор, мл	Вода, мл	Общий объем, мл	Оставшийся объем, мл
1/10	0,1	0,9	1,0	0,9
1/100	0,1	0,9	1,0	0,8
1/500	0,2	0,8	1,0	1,0
		$\Sigma = 2,6$ мл		

Раздел 9 «Оптимизация расчетных значений»

- Предельное содержание бактериальных эндотоксинов не более 175 ЕЭ/мл.
- Используется ЛАЛ-реактив $\lambda = 0,03$ ЕЭ/мл.

Предложите разведение для проверки, близкое к значению 1/2МДР.

Предложите способ подготовки этого разведения.

Предельное содержание эндотоксинов по ФСП	
Исходный раствор препарата, мг/мл	
Предельное содержание для исходного раствора, ЕЭ/мл	
λ , ЕЭ/мл	
МДР	
1/2 МДР	
Анализ целесообразно проводить в разведении	

Степень разведения	Раствор, мл	Вода, мл	Общий объем, мл	Оставшийся объем, мл

$\Sigma =$

Раздел 9 «Оптимизация расчетных значений»

- Препарат представляет собой порошок д/и, содержание во флаконе 250 мг.
- Предельное содержание бактериальных эндотоксинов не более 0,05 ЕЭ/мг
- Используется ЛАЛ-реактив $\lambda = 0,06$ ЕЭ/мл.

Предложите концентрацию для исходного раствора.

Предложите разведение для проверки, близкое к значению 1/2МДР.

Предложите способ подготовки этого разведения.

Предельное содержание эндотоксинов по ФСП	
Исходный раствор препарата, мг/мл	
Предельное содержание для исходного раствора, ЕЭ/мл	
λ , ЕЭ/мл	
МДР	
1/2 МДР	
Анализ целесообразно проводить в разведении	

Степень разведения	Раствор, мл	Вода, мл	Общий объем, мл	Оставшийся объем, мл

$\Sigma =$

РАЗДЕЛ 10 «ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДАННЫХ, ПРИВЕДЕННЫХ В ФСП»

Во всех предыдущих разделах отрабатывались отдельные фрагменты подготовительных расчетов, а в качестве примеров и вопросов часто использовались совершенно абстрактные цифры. В последнем разделе собраны примеры из реальных нормативных документов.

Анализ данных, приведенных в ФСП, может быть очень полезным. Так, например, в некоторых ФСП указывается, исходный раствор какой концентрации следует готовить для порошков. Может быть указано и разведение, при котором преодолевается ингибирование препарата. Это очень полезная информация, но она может быть не совсем точной. Дело в том, что на ингибирование влияют не только свойства испытуемого препарата, но и специфические свойства ЛАЛ-реактивов, которые могут быть различны у разных производителей. Однако, всегда лучше хоть какая-нибудь информация, чем ее полное отсутствие.

Работу с НД и ФСП можно строить по следующей схеме:

- Пересчет концентрации активного вещества в исходном растворе, если необходимо самостоятельное определение объема воды, используемого для получения исходного раствора нужной концентрации.
- Пересчет значения предельного содержания бактериальных эндотоксинов в ЕЭ/мл, если это необходимо.
- Расчет значения МДР с учетом чувствительности используемого ЛАЛ-реактива.
- Определение диапазона возможных разведений для проведения анализа.
- Решение о разведении для анализа, как правило в пользу меньших разведений.
- Определение схемы подготовки этого разведения.

Если предполагается проверка в объединенной выборке, то в эти расчеты всей по цепочке вводится поправка на количество объединяемых образцов.

Если проводится качественный анализ, а опорных данных о свойствах препарата нет, наиболее целесообразное решение – проверять препарат в 1/2 МДР.

ПРИМЕР

- Цефазолина натриевая соль порошок для приготовления раствора для внутримышечного введения 0,5 г и 1,0 г.
- ЛАЛ-реактив, $\lambda = 0,03$ ЕЭ/мл.

В ФСП приведена следующая информация:

Бактериальные эндотоксины. Предельное содержание бактериальных эндотоксинов не более 0.1 ЕЭ на 1 мг цефазолина (ОФС 42-0002-00). Для проведения анализа готовят исходный раствор препарата с концентрацией 200 мг цефазолина в 1 мл, а затем разводят его не менее чем в 100 раз.

Рассчитайте значение 1/2 МДР.

Предложите разведение, в котором целесообразно проводить анализ.

Предложите способ подготовки выбранного разведения.

Предельное содержание бактериальных эндотоксинов по ФСП	0,1 ЕЭ/мг
Исходный раствор, мг/мл	200 мг/мл
Предельное содержание для исходного раствора, ЕЭ/мл	20 ЕЭ/мл
λ , ЕЭ/мл	0,03125 ЕЭ/мл
МДР	640
1/2 МДР	320
Анализ целесообразно проводить в разведении	1/300

Степень разведения	Раствор, мл	Вода, мл	Общий объем, мл	Оставшийся объем, мл
1/10	0,1	0,9	1,0	0,9
1/100	0,1	0,9	1,0	0,8
1/300	0,2	0,4	0,6	0,6
		$\Sigma = 2,2$		

ЗАДАЧИ

- Амикацин порошок для приготовления раствора для внутримышечного введения 250 мг и 500 мг
- ЛАЛ-реактив, $\lambda = 0,03$ ЕЭ/мл

В ФСП приведена следующая информация:

Бактериальные эндотоксины. Предельное содержание бактериальных эндотоксинов не более 0.33 ЕЭ на 1 мг амикацина (ОФС 42-0002-00). Для проведения анализа готовят исходный раствор препарата с концентрацией 100 мг цефепима в 1 мл, а затем разводят его не менее чем в 300 раз.

Рассчитайте значение 1/2 МДР.

Предложите разведение, в котором целесообразно проводить анализ.

Предложите способ подготовки выбранного разведения.

Предельное содержание бактериальных эндотоксинов по ФСП	
Исходный раствор, мг/мл	
Предельное содержание для исходного раствора, ЕЭ/мл	
λ , ЕЭ/мл	
МДР	
1/2 МДР	
Анализ целесообразно проводить в разведении	

Степень разведения	Раствор, мл	Вода, мл	Общий объем, мл	Оставшийся объем, мл

$\Sigma =$

- Тиамин, раствор для внутримышечного введения 50 мг/мл
- ЛАЛ-реактив, $\lambda = 0,06$ ЕЭ/мл

В ФСП приведена следующая информация:

Бактериальные эндотоксины. Предельное содержание бактериальных эндотоксинов не более 3,5 ЕЭ на 1 мг тиамин (ОФС 42-0002-00). Для проведения анализа препарат разводят водой для ЛАЛ-теста не менее, чем в 300 раз.

Рассчитайте значение МДР для объединенной выборки из 3 образцов.

Предложите разведение, в котором целесообразно проводить анализ.

Предложите способ подготовки выбранного разведения.

Предельное содержание бактериальных эндотоксинов по ФСП	
Исходный раствор, мг/мл	
Предельное содержание для исходного раствора, ЕЭ/мл	
λ , ЕЭ/мл	
МДР	
1/2 МДР	
Анализ целесообразно проводить в разведении	

Степень разведения	Раствор, мл	Вода, мл	Общий объем, мл	Оставшийся объем, мл

$\Sigma =$

- Три соль раствор для инъекций
- ЛАЛ-реактив, $\lambda = 0,03$ ЕЭ/мл

Бактериальные эндотоксины. Предельное содержание бактериальных эндотоксинов не более 0,5 ЕЭ на 1 мл препарата (ОФС 42-0002-00).

В ФСП дополнительных данных по проверке препарата нет.

Рассчитайте значение МДР и 1/2 МДР .

Предложите разведение, в котором целесообразно проводить качественный анализ.

Предельное содержание бактериальных эндотоксинов по ФСП	
Исходный раствор, мг/мл	
Предельное содержание для исходного раствора, ЕЭ/мл	
λ , ЕЭ/мл	
МДР	
1/2 МДР	
Анализ целесообразно проводить в разведении	

Степень разведения	Раствор, мл	Вода, мл	Общий объем, мл	Оставшийся объем, мл

$\Sigma =$

