

Отработка методов проверки растворов кислоты и щелочи на содержание бактериальных эндотоксинов

Часть 2. Проверка растворов соляной кислоты с помощью ТАЛ-реактива Bioendo КТ методом С.

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

Продолжаем выкладывать данные по отработке техники проверки в ЛАЛ-тесте 0,1 М раствора соляной кислоты. Предыдущая статья:

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.

Постановка задачи

Общая задача у этой серии экспериментов была сформулирована ранее. Мы пытаемся подобрать наиболее оптимальные способы пробоподготовки, которые позволят оценить концентрацию эндотоксинов в растворе кислоты. Естественно, будем стремиться получить как можно более высокую чувствительность анализа.

В качестве разных вариантов пробоподготовки мы отработываем два направления – разведение исходного раствора водой для БЭТ или 0,1 М раствором Трис-буфера для БЭТ.

В настоящем исследовании мы продолжили проверку методом С, который проводили с ТАЛ-реактивом Bioendo КТ.

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 – 0,03. 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: Bioendo КТ, производства Xiamen Bioendo Technology Co, Китай.

Восстановление ТАЛ-реактива проводилось специальным буферным раствором, входящим в набор с ТАЛ-реактивом.

Растворители для образца: В качестве растворителей для испытуемого образца использовали воду для БЭТ и 0,1 М Трис-буфер для ЛАЛ-теста.

Подготовка испытуемого образца: Испытуемый раствор 0,1 М HCl проверяли без разведения (1/1) 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

Так же, как и в предыдущих опытах по проверке 0,1 М раствора HCl, которые были проведены с ЛАЛ-реактивом Pyrotell-T, мы проверяли серии разведений исходного раствора кислоты на воде для ЛАЛ-теста (воде для БЭТ) и на 0,1 М Трис-буфере для БЭТ. Основное внимание было уделено степени восстановления концентрации КСЭ в положительном контроле испытуемого препарата в разных разведениях. Результаты по восстановлению концентрации КСЭ в положительных контролях испытуемого образца приведены в таблице.

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

Растворитель	Разведение	PPC, %	Возможность проверки	Растворитель	Разведение	PPC, %	Возможность проверки
-	1/1	N/A*	нет				
Вода для БЭТ	1/5	N/A*	Нет	0.1 М Трис-буфер	1/5	31	Нет
Вода для БЭТ	1/10	24	Нет	0.1 М Трис-буфер	1/10	38	Нет
Вода для БЭТ	1/100	67	Да	0.1 М Трис-буфер	1/100	62	Да
Вода для БЭТ	1/1000	96	Да	0.1 М Трис-буфер	1/1000	75	Да

*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 практически идентичными. ТАЛ-реактив Bioendo КТ одинаково реагирует с пробами, разведенными водой для БЭТ и 0,1 М Трис-буфером для БЭТ. Проверка становится возможной начиная с разведения исходного раствора в 100 раз.

Производитель ТАЛ-реактива поставляет его в комплекте с растворителем – буферным раствором. К сожалению, подробной информации о том, какой это буфер и какова его молярность, производитель не указывает. Вполне возможно, что это наиболее распространенный Трис-буфер с молярностью 0,1 М или 0,2 М. Заметно, что производитель постарался обеспечить хорошую буферную емкость восстановленного этим буфером ТАЛ-реактива. Ведь таким образом разведенный ТАЛ-реактив смог спокойно измерить концентрацию КСЭ в растворах с рН = 3.11 и 4.21. Интересно, что для разведения 1/10 в 0,1 М Трис-буфере при значении рН равном 6.30 степень восстановления концентрации КСЭ в положительном контроле составила всего 38%.

Таблица 2. Значение рН для разных разведений испытуемого образца.

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

Оценка содержания эндотоксинов в испытуемом растворе

Во всех разведениях, в которых проверка была возможна, концентрация эндотоксинов была менее определяемого уровня.

Растворитель	Разведение	PPC, %	LOD для 0,1М раствора HCl
-	1/1	N/A	-
Вода для БЭТ	1/5	N/A	-
Вода для БЭТ	1/10	24	-
Вода для БЭТ	1/100	67	<0,5 ЕЭ/мл
Вода для БЭТ	1/1000	96	<5 ЕЭ/мл
0.1 М Трис-буфер для БЭТ	1/5	31	-
0.1 М Трис-буфер для БЭТ	1/10	38	-

0.1 М Трис-буфер для БЭТ	1/100	62	<0,5 ЕЭ/мл
0.1 М Трис-буфер для БЭТ	1/1000	75	<5 ЕЭ/мл

Предел количественного определения настоящей методики.

В опытах по проверке 0,1 М раствора HCl турбидиметрическим кинетическим методом (методом С) с ТАЛ-реактивом Bioendo КТ было показано, что проверка возможна с разведения 1/100, которое можно делать не только на 0,1 М Трис-буфере для БЭТ, но и на воде БЭТ. Предел количественного определения в такой методике составляет 0,5 ЕЭ/мл для 0,1 М раствора HCl.

Литература

- Инструкция ТАЛ-реактив Bioendo КТ
- Файл результатов опыта 415E26050800.plt

Продолжение цикла статей о подборх вариантов проверки в ЛАЛ-тесте растворов кислоты и основания читайте в части 3.