

ИНДИКАТОРЫ ЭНДОТОКСИНА 2,5 млн. ЕЭ

НАЗНАЧЕНИЕ

Индикаторы эндотоксина предназначены для валидации или мониторинга процессов депирогенизации, таких как, например, сухожаровая депирогенизация или мойка. Эффективность процесса депирогенизации может быть оценена путем сравнения результатов измерений содержания эндотоксинов до и после цикла депирогенизации с использованием ЛАЛ-реактива производства Charles River Endosafe. Согласно требованиям Фармакопеи США цикл депирогенизации должен приводить к снижению активности используемого индикатора эндотоксина как минимум в 1000 раз (3-log) при анализе с помощью ЛАЛ-теста (1).

ОБЪЯСНЕНИЕ ТЕСТА

Сухожаровая депирогенизация является наиболее предпочтительным способом удаления эндотоксинов, такая обработка применима для стеклянной посуды и других материалов, выдерживающих температурную обработку. Правила подготовки и использования эндотоксинов-индикаторов приведены в Фармакопее США, Техническом бюллетене №7 Ассоциации производителей парентеральных лекарственных препаратов (Parenteral Drug Associations), в рекомендациях LAL Users Group и в других нормативных документах (1-6).

Индикаторы эндотоксина производства Charles River Endosafe подготовлены и испытаны на предмет активности эндотоксинов таким образом, что концентрация эндотоксинов во флаконе может быть точно определена с помощью ЛАЛ-реактива в рамках допустимой ошибки опыта. Эффективность депирогенизации может быть оценена путем сравнения количества эндотоксинов в обработанных флаконах, содержащих индикаторы эндотоксина, с количеством эндотоксина в необработанных флаконах. Наиболее удобным способом количественной оценки содержания эндотоксина в эндотоксинах-индикаторах является кинетический анализ с использованием как ЛАЛ-реактива Charles River Endosafe: Endosafe КТА для проведения турбидиметрического кинетического анализа (каталожные номера R150), так и ЛАЛ-реактива Charles River Endosafe: Endochrome К для хромогенного кинетического анализа (каталожные номера R170).

СОСТАВ

Каждый флакон содержит приблизительно 2,5 миллион ЕЭ (Единиц Эндотоксина) лиофилизированного липополисахарида *E.coli* O55:B5., откалиброванного по международному стандарту. Индикатор находится во флаконах из боросиликатного стекла I гидролитического класса, препарат эндотоксина не содержит наполнителей и стабилизаторов.

Внимание: Биологическая активность индикаторов эндотоксина была определена с помощью ЛАЛ-реактива для гел-тромб теста. Однако, сертификат активности эндотоксина для каждой конкретной серии ЛАЛ-реактива не выпускается. В случае необходимости конечный пользователь может подтвердить или самостоятельно установить активность индикаторов эндотоксина в рамках допустимой ошибки опыта с используемой серией ЛАЛ-реактива.

ХРАНЕНИЕ

Хранить флаконы при 2 – 25° С при условии сохранения целостности упаковки.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ

Индикаторы эндотоксина содержат эндотоксины в количествах, способных вызвать пирогенную реакцию в случае парентерального введения. Эндотоксины-индикаторы предназначены только для использования *in vitro* и не предназначены для введения человеку или животным.

ПРОЦЕДУРА

Подготовка индикаторов эндотоксина. Флаконы с содержанием эндотоксинов, равным 2,5 млн. ЕЭ, могут быть использованы для подготовки растворов-индикаторов с желаемой концентрацией эндотоксина. Содержимое флакона растворяют с помощью воды для ЛАЛ-теста до получения раствора с желаемой концентрацией эндотоксина. Этот раствор может быть использован дробно, например, по 0,1 мл.

Процедура обработки. Для процедуры сухожаровой депирогенизации помещают флаконы в валидируемое оборудование. Непосредственно перед обработкой удаляют алюминиевый колпачок и

пробку, закрывают флакон алюминиевой фольгой. После этого флакон может быть подвергнут процедуре депирогенизации.

Внимание: Этикетки флаконов выдерживают нагревание, поэтому нет необходимости удалять этикетки с флаконов перед депирогенизацией.

Подготовка к анализу. После проведения цикла депирогенизации обработанные флаконы и один - два необработанных флакона (положительный контроль) готовят для проведения анализа. Индикаторы следует проверять с помощью валидированной процедуры проведения ЛАЛ-теста, чувствительность используемого для проверки ЛАЛ-реактива должна быть подтверждена с помощью сертифицированного препарата КСЭ (Контрольный Стандарт Эндотоксина, Каталожный номер E110 или E120) или RSE. Содержимое всех испытуемых флаконов с индикаторами разводят с помощью 1,0 мл воды для ЛАЛ-теста, растворы перемешивают на вихревой мешалке сначала в течение двух минут, затем в течение получаса продолжают перемешивание по одной минуте каждые 10 минут. Анализ проводят сразу по окончании перемешивания.

Анализ с помощью кинетических методов. Наиболее удобным способом проверки эффективности процедуры депирогенизации являются кинетические методы проведения ЛАЛ-теста. Анализ может быть проведен кинетическим турбидиметрическим или кинетическим хромогенным методом. В анализе определяется концентрация эндотоксина в контрольных и в обработанных флаконах. Для определения концентрации эндотоксинов используется стандартная калибровочная кривая с диапазоном измеряемых концентраций эндотоксина от 0,05 ЕЭ/мл до 5,0 ЕЭ/мл. И для контрольных, и для обработанных флаконов необходимо ставить положительный контроль испытуемого препарата для подтверждения отсутствия мешающих факторов. Определенное в опыте содержание эндотоксинов в положительном контроле испытуемого образца должно быть в рамках допустимой ошибки опыта (50% - 200%).

Процесс депирогенизации может считаться удовлетворительными, если показано снижение концентрации эндотоксина более чем на 3 порядка (3-log). Т.е. \log (конц. эндотоксина в контрольных флаконах, ЕЭ/мл) - \log (конц. эндотоксина в обработанных флаконах, ЕЭ/мл) > 3.

В приведенном ниже примере рассматривается вариант, в котором концентрация эндотоксина в контрольных флаконах была равна 2 500 000 ЕЭ/флакон, а в обработанных оказалась менее значения лямбды (λ), т.е. минимальной концентрации эндотоксина, используемой для построения калибровочной кривой:

$$\begin{aligned} \text{Степень снижения концентрации эндотоксина} &= \log 2\,500\,000 \text{ ЕЭ/мл} - \log 0,05 \text{ ЕЭ/мл} \\ &= 6,4 - (-1,301) \\ &= 7,7 \end{aligned}$$

БИБЛИОГРАФИЯ

1. U.S. Pharmacopeia 33 - Official Monograph - Endotoxin Indicator for Depyrogenation.
2. Parenteral Drug Association, Inc., Depyrogenation, Technical Report No. 7, 1985.
3. LAL Users Group. Preparation and use of endotoxin indicators for depyrogenation process studies, J. Parenteral Drug Assoc., 43:109,1989.
4. Weary, M and F Pearson. A manufacturer's guide to depyrogenation. Biopharm. 1, 1988.
5. Nakata, T, Destruction of challenged endotoxin in a dry heat oven, PDA J. Pharm. Sci. Technol., 48:59, 1994.
6. Hecker, W, D Witthauer and A Staerk. Validation of dry heat inactivation of bacterial endotoxins, PDA J. Pharm. Sci. Technol., 48:197, 1994.

CHARLES RIVER ENDOSAFE

Division of Charles River Laboratories, Inc.

1023 Wappo Road, Suite 43B

Charleston, SC 29407, USA

Phone: (800) 762-7016

FAX: (843) 766-7576