

Отработка методов проверки растворов кислоты и щелочи на содержание бактериальных эндотоксинов

Часть 3. Проверка растворов 0,1 М NaOH с помощью ЛАЛ и ТАЛ реактивов 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 основания. Предыдущие статьи:

- *Часть 1. Проверка растворов соляной кислоты с помощью ЛАЛ-реактива Pyrotell-T методом С.*
- *Часть 2. Проверка растворов соляной кислоты с помощью ТАЛ-реактива Bioendo КТ методом С.*

После цикла проверок растворов соляной кислоты на содержание эндотоксинов мы, вполне закономерно, подошли к задаче аналогичной проверки раствора щелочи. Объектом проверки закономерно стал 0.1 М раствор NaOH.

Проверку раствора щелочи приводили кинетическим турбидиметрическим тестом, методом С. Использовали два коммерчески доступных ЛАЛ-/ТАЛ-реактива – Pyrotell-T и Bioendo КТ. Целью работы был подбор наиболее простого и рационального способа пробоподготовки, обеспечивающей максимально возможный предел обнаружения эндотоксинов. В качестве растворителей для исходного раствора использовали воду для БЭТ и 0.1 М раствор Трис буфера для БЭТ.

Материалы и методы

Испытуемый образец: 0,1 М раствор NaOH.

Использовали 0,1 М раствор, приготовленный путем растворения гранул щелочи 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 при использовании ТАЛ-реактива Bioendo КТ и ОП – 0,1 при использовании ЛАЛ-реактива Pyrotell-T.

Калибровочная кривая при работе с обоими реактивами составляла 0,005 ЕЭ/мл – 5 ЕЭ/мл. Предел количественного определения метода (наименьшая концентрация калибровочной кривой), λ , составляла 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.

ТАЛ-реактив: Bioendo КТ, производства Xiamen Bioendo Technology Co, Китай. Восстановление ТАЛ-реактива проводилось специальным буферным раствором, входящим в состав набора с ТАЛ-реактивом.

Растворители для образца: в качестве растворителей для испытуемого образца использовали воду для БЭТ и 0.1 М Трис-буфер для БЭТ.

Подготовка испытуемого образца: Испытуемый раствор 0,1 М NaOH 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 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» действующего издания ГФ РФ – восстановление в опыте в диапазоне от 50% до 200% от ожидаемой концентрации.

Результаты и их интерпретация

1. Проверка с помощью ЛАЛ-реактива Pyrotell-T

В исходном растворе 0,1 М NaOH проверка содержания бактериальных эндотоксинов невозможна. Во всех разведениях испытуемого образца, в которых определение БЭ возможно не было зарегистрировано бактериальных эндотоксинов. Возможность проверки для разных вариантов разведений испытуемого образца приведена в Таблице №1.

Таблица 1. Возможность проведения проверки содержания БЭ для разных разведений 0,1 М раствора NaOH при проверке с ЛАЛ-реактивом Pyrotell-T

Растворитель	Разведение	Возможность проверки
-	1/1	Нет
Вода для БЭТ	1/5	Да
Вода для БЭТ	1/10	Да
Вода для БЭТ	1/100	Да
Вода для БЭТ	1/1000	Да
0.1 М Трис-буфер для БЭТ	1/5	Да
0.1 М Трис-буфер для БЭТ	1/10	Да
0.1 М Трис-буфер для БЭТ	1/100	Да
0.1 М Трис-буфер для БЭТ	1/1000	Да

Возможность проверки по разным растворителям оказалась практически идентичной. ЛАЛ-реактив Pyrotell-T одинаково реагирует с пробами, разведенными водой для БЭТ и 0.1 М Трис-буфером для БЭТ. Проверка становится возможной, начиная с разведения в пять раз.

Если обратить внимание на степень восстановления концентрации КСЭ в положительном контроле, то можно заметить, что во всех разведениях с помощью буферного раствора она ниже, чем степень восстановления КСЭ в растворах на воде.

Таблица 2. Значение степени восстановления КСЭ в процентах для разных способов разведения исходного 0,1 М раствора NaOH

Степень разведения	Восстановление КСЭ в РРС, %	
	Для разведений на воде для БЭТ	Для разведений Трис-буфером для БЭТ
1/5	85	62
1/10	84	66
1/100	92	66
1/1000	89	81

Значения pH растворов и возможность проверки.

Измерение значений pH растворов показало, что исходный сильнощелочной раствор при разведении довольно быстро входит в нейтральную зону. Можно отметить, что в разведениях на воде равных 1/5 и 1/10 значение pH испытуемого образца больше стандартной нормы, которая составляет pH 6-8. Значение pH этих растворов оказалось 8,91 и 8,71 соответственно. При разведении Трис-буфером для БЭТ картина для таких же двух разведений

более подходящая: в разведении 1/5 рН равно 8,23, а в разведении 1/10 практически соответствует норме при значении 8,05.

Проверка возможна для всех растворов несмотря на то, что в некоторых из них значение рН не полностью соответствуют рекомендациям. Небольшая корректировка рН уже реакционной смеси происходит благодаря буферу, которым был разведен ЛАЛ-реактив.

Таблица. 3. Значение рН растворов при разведении исходного раствора водой для БЭТ и 0,1 М Трис буфером для БЭТ

Разведение	Значение рН	
	Разведение водой для БЭТ	Разведение Трис-буфером для БЭТ
1/5	8,91	8,23
1/10	8,71	8,05
1/100	7,37	7,73
1/1000	6,56	7,84

Оценка предела количественного определения бактериальных эндотоксинов в испытуемом растворе 0,1 М NaOH с помощью ЛАЛ-реактива Pyrotell-T

В опытах по проверке 0,1 М раствора NaOH турбидиметрическим кинетическим методом (методом С) с ЛАЛ-реактивом Pyrotell-T было показано, что проверка возможна начиная с разведения 1/5 любым растворителем для 0.1 М раствора NaOH. Предел количественного определения в такой методике составляет 0,025 ЕЭ/мл для 0,1 М раствора NaOH.

Таблица 4. Предел обнаружения метода для разных разведений 0.1 М раствора NaOH при проведении анализа методом С с помощью ЛАЛ-реактива Pyrotell-T

Растворитель	Разведение	PPC, %	LOD для 0.1М раствора NaOH
Исходный раствор 0,1 М NaOH	-	N/A	-
Вода для БЭТ	1/5	85	<0,025 ЕЭ/мл
Вода для БЭТ	1/10	84	<0,05 ЕЭ/мл
Вода для БЭТ	1/100	92	<0,5 ЕЭ/мл
Вода для БЭТ	1/1000	89	<5 ЕЭ/мл
0.1 М Трис-буфер для БЭТ	1/5	62	<0,025 ЕЭ/мл
0.1 М Трис-буфер для БЭТ	1/10	66	<0,05 ЕЭ/мл
0.1 М Трис-буфер для БЭТ	1/100	66	<0,5 ЕЭ/мл

0.1 М Трис-буфер для БЭТ	1/1000	81	<5 ЕЭ/мл
--------------------------	--------	----	----------

2. Проверка с помощью ТАЛ-реактива Bioendo КТ

Результаты проверки, проведенной с помощью ТАЛ-реактива Bioendo КТ кинетическим турбидиметрическим методом, оказались практически идентичны, результатам, полученным в опытах с ЛАЛ-реактивом Pyrotell-Т, за исключением разведения 1/5 на воде для БЭТ, которое выпало из проверки из-за ингибирования реакции.

Таблица 5. Степень восстановления концентрации КСЭ и возможность проверки для разных разведений 0.1 М раствора NaOH при проверке с ТАЛ-реактивом Bioendo КТ

Растворитель	Разведение	PPC, %	LOD для 0.1М раствора
Исходный раствор 0,1 М NaOH	-	N/A	Нет
Вода для БЭТ	1/5	N/A	Нет
Вода для БЭТ	1/10	117	Да
Вода для БЭТ	1/100	82	Да
Вода для БЭТ	1/1000	99	Да
0.1 М Трис-буфер для БЭТ	1/5	120	Да
0.1 М Трис-буфер для БЭТ	1/10	57	Да
0.1 М Трис-буфер для БЭТ	1/100	57	Да
0.1 М Трис-буфер для БЭТ	1/1000	63	Да

Оценка предела количественного определения бактериальных эндотоксинов в испытуемом растворе 0,1 М NaOH с помощью ТАЛ-реактива Bioendo КТ

В опытах по проверке 0,1 М раствора NaOH турбидиметрическим кинетическим методом (методом С) с ТАЛ-реактивом Bioendo КТ было показано, что проверка возможна, начиная с разведения 1/10 приготовленном с помощью любого растворителя. Предел количественного определения в этом случае составляет 0,05 ЕЭ/мл для 0,1 М раствора NaOH. В случае приготовления разведения с помощью Трис-буфера можно получить результаты и в разведении 1/5, в этом случае предел определения составит 0,025 ЕЭ/мл.

Таблица 6. Предел обнаружения метода для разных разведений 0.1 М раствора NaOH при проведении анализа методом С ТАЛ-реактивом Bioendo КТ

Растворитель	Разведение	PPC, %	LOD для 0.1М раствора NaOH
Исходный раствор 0,1 М NaOH	-	N/A	-
Вода для БЭТ	1/5	N/A	-
Вода для БЭТ	1/10	117	<0,05 ЕЭ/мл
Вода для БЭТ	1/100	82	<0,5 ЕЭ/мл
Вода для БЭТ	1/1000	99	<5 ЕЭ/мл
0.1 М Трис-буфер для БЭТ	1/5	120	<0,025 ЕЭ/мл
0.1 М Трис-буфер для БЭТ	1/10	57	<0,05 ЕЭ/мл
0.1 М Трис-буфер для БЭТ	1/100	57	<0,5 ЕЭ/мл
0.1 М Трис-буфер для БЭТ	1/1000	63	<5 ЕЭ/мл

Общее заключение по результатам проверки 0,1 М раствора NaOH

Гарантированный предел обнаружения для 0,1 М раствора NaOH методом С составляет 0,05 ЕЭ/мл. Для проведения анализа исходный раствор 0.1 М щелочи следует развести как минимум в десять раз. В качестве растворителя могут быть использованы и вода для БЭТ и 0.1 М Трис буфер для БЭТ.

Для проверки с равным успехом можно использовать ЛАЛ-реактив Pyrotell-T или ТАЛ-реактив Bioendo КТ. Оба реактива следует разводить буфером. Для ТАЛ-реактива буфер является частью набора, в случае ЛАЛ-реактива Pyrotell-T использование буферного раствора рассматривается производителем как опция. При проведении проверки кислых или щелочных растворов это опция превращается в обязательное условие.

Если при проведении проверки есть желание или необходимость показать наименее возможную концентрацию эндотоксина в проверяемом растворе, то предпочтение следует отдать ЛАЛ-реактиву Pyrotell-T, а разведение испытуемого раствора NaOH следует проводить 0.1 М Трис буфером для БЭТ. В этом случае вполне достижим предел обнаружения равный 0,025 ЕЭ/мл.

Литература

- *Инструкция ЛАЛ-реактив Pyrotell-T*
- *Инструкция ТАЛ-реактив Bioendo КТ*
- *Файл результатов опыта 969426051501.plt*
- *Файл результатов опыта 969426052100.plt*