

## Проведение анализа «Мешающие факторы»

Ситников А.Г.

**В** настоящей статье мы продолжим тему, начатую в предыдущем номере: «Валидация ЛАЛ-теста для лекарственного препарата». Валидация включает проведение анализа «Мешающие факторы» (МФ). В ОФС указывается:

*«Испытанию может быть подвергнут препарат в любом разведении, не превышающем значения МДР. Используемые в этом анализе пробы испытуемого препарата (или его разведения) не должны содержать бактериальных эндотоксинов в определяемых в тесте количествах».*

Определить содержание бактериальных эндотоксинов и возможность ингибирования можно на стадии проведения предварительных анализов. Когда свойства испытуемого препарата известны, можно переходить к проведению анализа «Мешающие факторы». Определенную проблему обычно вызывает выбор степени разведения, в котором стоит проводить этот анализ. Действительно, выбор степени разведения для проведения анализа «Мешающие факторы» прямо влияет на возможность использования ЛАЛ-реактивов разной чувствительности и, что более ценно, определяет возможность проведения контрольных анализов для нескольких образцов в объединенной выборке.

Последующие объяснения лучше всего приводить, используя в качестве примера гипотетический вариант: есть препарат, для которого установлено значение предельного содержания бактериальных эндотоксинов не более 10 ЕЭ/мл, а по результатам предварительных анализов известно, что ингибирование преодолевается в разведении 1/10.

Значение МДР для разных реактивов будет следующим:

ЛАЛ-реактив	МДР
0,25 ЕЭ/мл	40
0,125 ЕЭ/мл	80
0,06 ЕЭ/мл	160
0,03 ЕЭ/мл	320

Если валидировать метод для разведения, равного 1/40 или меньшего, то последующие анализы можно будет проводить с использованием ЛАЛ-реактивов любой чувствительности. Если

же провести анализ «Мешающие факторы» для разведения 1/80, то в дальнейших анализах нельзя будет использовать ЛАЛ-реактив с чувствительностью 0,25 ЕЭ/мл, поскольку согласно ОФС разрешается проводить анализы в разведении равном или большим, того разведения, в котором проводился анализ «Мешающие факторы».

Следующий аргумент представляется более весомым. Проверка серии лекарственного препарата предполагает проверку нескольких выборок из серии, количество которых определяется количеством единиц продукции в серии. Т.е. для проведения контрольных анализов, в том числе и анализа «Бактериальные эндотоксины», отбирается некоторое количество образцов, обычно представляющих начало, середину и конец проверяемой серии. В ОФС в разделе «Подготовка образца» указано, что каждый образец должен проверяться индивидуально. Несмотря на это указание можно объединять образцы и проводить проверку такой объединенной пробы. Однако, при этом необходимо делать поправку на возможность усреднения концентрации эндотоксинов в объединенной пробе. Делается это потому, что теоретически возможна ситуация, при которой у части образцов содержание эндотоксинов выше, а у части ниже допустимого значения. При объединении образцов проб может произойти усреднение концентрации эндотоксинов, при котором среднее значение будет соответствовать норме. Например:

	Содержание БЭ
Образец 1	3 ЕЭ/мл
Образец 2	5 ЕЭ/мл
Образец 3	15 ЕЭ/мл
<b>Среднее значение</b>	<b>7,67 ЕЭ/мл</b>

Среднее значение менее 10 ЕЭ/мл, но содержание эндотоксинов в одном из проверенных образцов выше допустимого предельного содержания эндотоксинов, установленного для препарата. Такая серия должна быть забракована именно по результатам, полученным для третьего образца.

Следовательно, при проверке нескольких образцов в объединенной выборке необходимо делать пересчет значения допустимой концентрации бактериальных эндотоксинов с поправкой на количество объединенных образцов. Например, если проверяется три образца одновременно, предельное содержание бактериальных эндотоксинов, установленное для препарата, делят на три. Полученное значение используют для расчета МДР для объединенной пробы. Очевидно, что значение МДР пропорционально уменьшается.

Если продолжить пример с препаратом, для которого предельное содержание эндотоксинов должно быть менее 10 ЕЭ/мл, то картина изменения значений МДР для нескольких образцов будет выглядеть следующим образом:

Чувствительность ЛАЛ-реактива	Кол-во объединенных образцов			
	2	3	4	5
0,25 ЕЭ/мл	20	13,3	10	8
0,125ЕЭ/мл	40	26,6	20	16
0,06 ЕЭ/мл	80	53,3	40	32
0,03 ЕЭ/мл	160	106,6	80	64

Расчеты делаются следующим образом:

Количество объединенных образцов – два. Значение предельного содержания БЭ для двух образцов = 10 ЕЭ/мл / 2 = 5 ЕЭ/мл, МДР для ЛАЛ-реактива 0,25 ЕЭ/мл = 5ЕЭ/мл / 0,25 ЕЭ/мл = 20.

Если анализ «Мешающие факторы» провести для разведения 1/40, контрольные анализы можно будет проводить в разведениях 1/40 и больших, следовательно, в случае использования ЛАЛ-реактива 0,25 ЕЭ/мл возможна только индивидуальная проверка каждого образца, с ЛАЛ-реактивом 0,06 ЕЭ/мл можно проверять 4 образца одновременно. А с ЛАЛ-реактивом 0,03 ЕЭ/мл возможна проверка объединенной выборки, включающей до 8 единиц.

Если анализ «Мешающие факторы» провести в разведении 1/320, то проверка препарата будет возможна только с помощью ЛАЛ-реактива 0,03 ЕЭ/мл, и каждый образец должен будет проверяться индивидуально. Конечно, не всегда следует стремиться к объединению очень большого количества образцов. Вполне разумным представляется анализ для трех объединенных выборок. В любом случае, чем меньше степень разведения, в которой проводится анализ «Мешающие факторы», и чем выше чувствительность ЛАЛ-реактива, тем больше образцов может быть проверено одновременно.

Третий аргумент в пользу валидации малых разведений испытуемого препарата заключается в том, что рутинная проверка в разведениях, меньших МДР, может служить дополнительной гарантией безопасности препарата. Действительно, часто производители сами устанавливают свои внутренние нормы качества, которые гораздо жестче показателей, включенных в НД. Это дает большую уверенность при выпуске серии и может служить в качестве внутривыпускной нормы, которая может использоваться в качестве уровня тревоги или действия аналогично нормам, устанавливаемым для технологических процессов. Проведение постоянного контроля в разведениях, значительно меньших МДР, позволя-

ет вовремя заметить изменения, приводящие к ухудшению качества. Важно и то, что если при выпуске на реализацию препарат проходит тест в разведении, меньшем МДР, это означает, что он точно пройдет любую повторную проверку, которую независимые контрольные лаборатории проводят в разведении, близком к МДР.

Из всего сказанного следует, что проводить анализ «Мешающие факторы» надо в разведении как можно меньшем. Принимая этот тезис в качестве руководства к действию, не надо стремиться избавиться во что бы то ни стало от ингибирования в малых разведениях и не стоит вводить без необходимости специальные приемы устранения ингибирования, и вводить их в методику подготовки образца.

Известно, что почти все препараты способны ингибировать реакцию в высоких концентрациях (исходные растворы). В большинстве случаев разведение водой для ЛАЛ-теста оказывается достаточным для того, чтобы преодолеть это ингибирование. Так самый простой и распространенный пример ингибирования – это значение рН, выходящее за рамки оптимального диапазона, в котором проводится реакция. Но даже в этом случае можно ограничиться простым разведением водой, а не вводить в методику процедуру доведения рН. Можно проиллюстрировать эти рассуждения следующим примером. Предположим, что рассматриваемый нами препарат в случае подготовки его разведений с помощью буферного раствора может быть валидирован в разведении 1/10, а в случае доведения значения рН исходного раствора с помощью раствора кислоты (или щелочи) анализ можно проводить в разведении 1/2. Лучше все-таки проводить валидацию в разведении 1/40 на воде. В этом случае все операции по подготовке к проведению контрольных анализов будут минимальны и не будут требовать использования специальных растворов. Учитывая тот факт, что контрольные анализы могут проводиться ежедневно: чем проще процедура подготовки – тем лучше. Введение специальных методов подготовки образца требует проведения дополнительной проверки этих методов или растворов на содержание эндотоксинов и на их способность оказывать влияние на ход реакции. Дополнительные процедуры по подготовке образца нужны тогда, когда без них невозможно обойтись или в случае проведения исследований, когда необходимо определить концентрацию эндотоксинов в препарате, не смотря на ингибирование.

Резюмировать рассуждения о выборе степени разведения для постановки опыта «Мешающие факторы» можно следующими рекомендациями:

1. Разведение, выбранное для постановки

опыта «Мешающие факторы», должно быть как можно меньшим;

2. В выбранном разведении не должно проявляться ингибирование;

3. В выбранном разведении во всех сериях, используемых для проведения анализа МФ, не должно содержаться эндотоксинов;

4. В качестве подготовки испытуемого образца для анализа лучше всего использовать его разведение водой для ЛАЛ-теста.

Как уже отмечалось, решение по валидируемому разведению принимают после проведения предварительных анализов. В качестве общих рекомендаций можно посоветовать следующий подход: анализ «Мешающие факторы» следует проводить в разведении, в котором ингибирование пропадает для всех испытанных в предварительных анализах сериях. Если значение МДР для данного препарата велико, то лучше проводить анализ в разведении в 2-4 раза большем максимального неингибирующего разведения.

Например, если препарат не ингибирует реакцию в разведении 1/10, то валидировать можно в разведении 1/20 (в два раза большем) или лучше в 1/40 (в четыре раза большем). При этом учитывается возможность колебаний от серии к серии способности препарата ингибировать реакцию.

Проведение анализа «Мешающие факторы» является не очень сложной процедурой, правда подготовка к этому анализу отличается от обычной подготовки к проведению опыта. В ОФС приведена следующая схема опыта «Мешающие факторы»:

Раствор	Исходный раствор	Растворитель	Фактор разведения	Конечная концентрация эндотоксина в испытуемом растворе	Количество повторностей
<b>A</b>	Испытуемый препарат, содержащий КСЭ в концентрации 2λ	Испытуемый препарат	1	2λ	4
			2	1λ	4
			4	0,5λ	4
			8	0,25λ	4
<b>B</b>	Испытуемый препарат	-	-	-	4
<b>C</b>	Раствор КСЭ в Воде для ЛАЛ-теста с концентрацией КСЭ - 2λ	Вода для ЛАЛ-теста	1	2λ	2
			2	1λ	2
			4	0,5λ	2
			8	0,25λ	2
<b>D</b>	Вода для ЛАЛ-теста	-	-	-	2

Опыт в обычном табличном представлении результатов выглядит несколько проще, например:

Концентрация КСЭ в растворе препарата					
повторности	1/40 (2λ)	1/40 (λ)	1/40 (0,5λ)	1/40 (0,25λ)	1/40 (К-)
1	+	+	-	-	-
2	+	+	-	-	-
3	+	+	-	-	-
4	+	+	-	-	-
Концентрация КСЭ в воде для ЛАЛ-теста (контроли)					
повторности	2λ	λ	0,5λ	0,25λ	К-
1	+	+	-	-	-
2	+	+	-	-	-

В данном примере анализ ставится для разведения испытуемого препарата, равного 1/40. Можно легко заметить, что верхняя часть таблицы практически полностью повторяет схему опыта «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива». Имеются два отличия: КСЭ разводится не водой для ЛАЛ-теста, а испытуемым препаратом, раствор которого используется и для постановки отрицательного контроля. Этот отрицательный контроль ставится в четырех повторностях – это второе отличие от стандартного подтверждения чувствительности.

Вторая часть таблицы – стандартный анализ разведений КСЭ, служащий контролем всего опыта, это уже точное повторение опыта «Подтверждение заявленной чувствительности» только в двух повторностях. В сущности, анализ «Мешающие факторы» является подтверждением чувствительности ЛАЛ-реактива. Его результаты должны показать, что ЛАЛ-реактив реагирует с серией разведений КСЭ в растворе испытуемого препарата так же, как он реагирует с эндотоксином в водном растворе. Среднее значение определенной в опыте концентрации эндотоксина рассчитывается так же, как и по результатам опыта «Подтверждение заявленной чувствительности». В ОФС приводятся следующие требования к результатам опыта:

*«Если полученное среднее значение чувствительности оказалось не менее 0,5λ и не более 2λ, испытуемый препарат в выбранном разведении не содержит мешающих факторов, способных ингибировать и/или усиливать реакцию ЛАЛ-реактива с бактериальными эндотоксинами, и может быть подвергнут анализу на содержание бактериальных эндотоксинов».*

Еще раз подчеркнем, что особых сложностей подготовка этого опыта не представляет, единственный его недостаток это то, что он достаточно громоздкий, т.к. анализ должен проводиться в четырех повторностях, и опыт должен быть повторен на трех сериях. Некоторые сложности представляет техническая сторона подготовки растворов, отличная от обычных количественных анализов, в которых испытываются убывающие концентрации испытуемого препарата. В данном же случае концентрация (разведение) испытуемого препарата должна быть одинаковой, а меняться должна концентрация КСЭ от 2λ до 0,25λ. Способы подготовки растворов могут быть разными. Можно рекомендовать следующий, пожалуй, самый простой способ подготовки испытуемых растворов:

1. Подготовка разведения испытуемого препарата вдвое большего того, которое будет поставлено в опыте (например, подготовка разведения 1/20, при постановке

в опыте разведения 1/40). Объем раствора должен быть 0,6-0,7 мл;

2. Подготовка разведения испытуемого препарата 1/40. Общий объем раствора должен быть 2,2- 2,5 мл;

3. Подготовка раствора КСЭ с концентрацией 4λ, объем которого должен быть 0,6-1,0 мл.

Пустые пробирки для разведений подписывают, указывая концентрацию КСЭ и степень разведения препарата, например, «1/40 (2λ)» и т.д. В первую пробирку, концентрация КСЭ в которой будет 2λ, вносят равные части раствора препарата 1/20 и раствора КСЭ 4λ (например, по 0,5 мл), раствор перемешивают на вихревой мешалке. В получившемся растворе концентрации КСЭ и препарата снизились вдвое. Концентрация КСЭ стала 2λ, а разведение препарата стало 1/40. Далее надо только снижать концентрацию КСЭ, оставляя степень разведения препарата неизменной. Для этого в следующую пробирку переносят 0,5 мл полученного раствора и добавляют 0,5 мл раствора испытуемого препарата в разведении 1/40, концентрация КСЭ снижается вдвое до λ, степень разведения препарата не изменяется. Операцию повторяют до получения концентрации КСЭ 0,25λ. На эти растворы используется 1,5 мл раствора препарата в разведении 1/40. Остаток раствора 1/40 (0,5 - 1,0 мл) используют для постановки контроля (К-). Одновременно с подготовкой разведений КСЭ в растворе испытуемого препарата готовят разведение КСЭ в воде для ЛАЛ-теста. Для их подготовки можно использовать раствор КСЭ с концентрацией 4λ, продолжая его разведения на воде для ЛАЛ-теста. По 0,1 мл каждого из приготовленных растворов переносят в пробирки для реакции (10x75мм), добавляют по 0,1 мл ЛАЛ-реактива и проводят инкубирование.

Приведенный способ подготовки к опыту, возможно, не самый короткий, его достоинство в том, что он прост, а использование относительно больших объемов (отношение 0,5 мл + 0,5 мл) дает большие гарантии точности их приготовления. Могут быть и другие способы подготовки растворов для проведения анализа, отличные от приведенного в данном примере. Закончить часть, посвященную технике подготовки и постановки опыта, хочется советом. Не следует стремиться, особенно в первый раз, проводить опыт сразу для нескольких серий в одном инкубировании. Один такой тест - это 30 пробирок с разными растворами. В таком количестве можно запутаться, допустить ошибки и, наконец, проблемой может оказаться быстрое добавление ЛАЛ-реактива ко всем пробиркам и такое же быстрое считывание результатов опыта.

Говоря о правилах проведения анализа «Мешающие факторы», нельзя не коснуться

вопроса статистической достоверности опыта. Иными словами, вопрос в том: на скольких сериях он должен быть проведен, и какое количество образцов из серии должно быть в выборке. Этот вопрос хуже всего освещен в нормативной документации, причем не только в отечественной, но и в зарубежной. Единственный источник, который довольно четко определяет требования к отбору образцов - это «Руководство по валидации ЛАЛ-теста, проводимого для контроля качества парентеральных лекарственных средств, вводимых человеку и используемых в ветеринарии, препаратов биологического происхождения и изделий медицинского назначения», изданное FDA в 1987 году. В Руководстве указывается, что анализ должен проводиться на трех сериях испытуемого препарата. Если препарат выпускается в разных формах, например, растворы 10%, 20%, 40%, то проверять можно серии с наименьшей и наибольшей концентрациями препарата при получении удовлетворительных результатов. Анализ для промежуточных концентраций можно не проводить. Что касается количества проверяемых образцов каждой серии, то их должно быть не менее трех и не более десяти, и представлять они должны начало, середину и конец серии. Такой подход к количеству испытуемых образцов представляется весьма обоснованным, особенно в части ограничения верхнего предела выборки. К сожалению, у нас пока нет аналогичного документа, детально описывающего правила проведения валидации метода, а приведенную выше информацию можно использовать только как справочную.

В заключении хочется еще раз отметить, что анализ «Мешающие факторы» является не пустой формальностью, а необходимым элементом построения системы контроля качества по показателю «Бактериальные эндотоксины». Этот анализ может считаться ключевым, обязательным и необходимым для каждого препарата, который предполагается испытывать в тесте «Бактериальные эндотоксины».

#### Литература.

1. ОФС 42-0002-00 "Бактериальные эндотоксины"
2. "Guideline on validation of the Limulus amoebocyte lysate test as an end-product endotoxin test for human and animal parenteral drugs, biological products, and medical devices". // U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, December 1987.
3. The United States Pharmacopoeia, 26-th Ed. 2003.

## **Использование механических дозаторов при проведении ЛАЛ-теста.**

Чиркова М.Н., Демидова В.В.

**П**ри проведении ЛАЛ-теста значительная часть работ по подготовке к анализу сводится к приготовлению разведений испытуемого препарата. Соответственно при организации рабочего места следует уделять внимание и инструментам, необходимым для данной операции. Лет десять – пятнадцать назад для такой работы использовались исключительно стеклянные пипетки. Отдавая дань уважения этому заслуженному инструменту, нельзя не заметить, что сегодня стандартом стали механические дозаторы, а им на смену уже идет новое поколение - электронные дозаторы.

По сравнению с обычными стеклянными пипетками точность и воспроизводимость результатов дозирования механических дозаторов значительно выше и в меньшей степени зависят от подготовки аналитика. Использование одноразовых наконечников освобождает от необходимости проведения предварительной подготовки посуды – мойки и депирогенизации. В общем, механические дозаторы очень удобны и сегодня являются стандартным оборудованием любой лаборатории. Проблемой часто оказывается то, что моделей и типов дозаторов много, и из большого ассортимента бывает трудно выбрать то, что нужно для работы. В этой статье мы попытались обобщить собственный опыт использования механических дозаторов и предложить не столько готовые решения, сколько поделиться рассуждениями, на основании которых принимались эти решения.

Прежде чем перейти к рекомендациям, следует обратить внимание на некоторые распространенные заблуждения и устойчивые стереотипы, связанные со специфичностью ЛАЛ-теста. Отправная точка таких рассуждений всегда одинакова - ЛАЛ-тест «особенный анализ», следовательно для его проведения нужны особенные дозаторы и наконечники. В известной степени это верно, как верно и то, что любой анализ обладает своими специфическими особенностями. Выводы же, сделанные из откровенного тезиса, оказываются скорее вредными, чем полезными. Обычно упор делается на то, что дозаторы должны быть автоклавируемы, а наконечники обязательно должны быть с интегрированными фильтрами. В действительности оба эти качества следует рассматривать в лучшем случае как факультативные. Так, возможность автоклавирования дозаторов, безусловно, важна для микробиологов и специалистов, работающих с биологически активными

жидкостями, при проведении ЛАЛ-теста совершенно необязательна. При работе с дозатором достаточно аккуратного обращения и периодической обработки его дезинфицирующими растворами. Автоклавирование требует более частого осмотра и профилактического обслуживания дозатора, без которых невозможно обеспечение точности дозирования. Аналогичная ситуация и с наконечниками с интегрированными фильтрами. Такие фильтры нужны только в том случае, если необходимо защитить поршневую систему дозатора от летучих или агрессивных веществ, для защиты от попадания биологически активных или опасных жидкостей, для предупреждения перекрестной контаминации дозируемых жидкостей. При постановке ЛАЛ-теста такая специальная защита необязательна (если этого не требуют свойства исследуемого препарата). Вполне достаточно стандартных сменных фильтров, вставляемых в посадочный конус дозаторов.

В то же время нельзя не согласиться и с тем, что подготовка растворов для проведения ЛАЛ-теста имеет свою специфику, и ее надо учитывать при комплектации набора дозаторов. Можно выделить наиболее характерные детали:

- Все работы связаны с довольно узким диапазоном рабочих объемов от 100 мкл до 1000 мкл;
- В этом диапазоне мкл есть часто используемые объемы. Среди них наиболее часто приходится дозировать объемы, равные 100 мкл, при подготовке реакционных смесей и при разведении с шагом 1/10. Очень распространенным объемом при подготовке разведений является объем, равный 500 мкл, используемый для подготовки разведений с шагом 1/2;
- Есть редкие исключения: иногда приходится дозировать объемы больше 1 мл, и может возникнуть необходимость в точном отборе очень маленького объема (10 мкл).

Если в лаборатории проводится небольшое количество опытов, то можно обойтись одним дозатором переменного объема, перекрывающим весь рабочий диапазон дозирования (100 – 1000 мкл). При систематической работе гораздо удобнее использовать несколько дозаторов. Набор можно формировать вокруг дозатора переменного объема, добавив к нему дозаторы, рассчитанные на дозирование наиболее распространенных объемов - 100 мкл и 500 мкл. Использование дозаторов фиксированного объема не только очень удобно, но и позволяет снизить риск ошибки - случайной или системной.

Поскольку время от времени возникает необходимость в разведении лиофилизированных ЛАЛ-реактива и КСЭ, а также в разведении сухих или лиофилизированных испытуемых

препаратов, полезным может оказаться дозатор, рассчитанный на дозирование больших объемов. Например, дозатор переменного объема на 1000-5000 мкл. Если такая необходимость возникает не часто, то можно вполне обойтись и стеклянными пипетками на 5 мл.

Наконец, стоит сказать еще об одном часто используемом объеме - 10 мкл. Это объем раствора КСЭ, который добавляется в реакционную смесь, для получения нужной концентрации эндотоксина в положительном контроле. Такой способ подготовки положительного контроля требует определенного навыка, но освоив его, можно значительно упростить процедуру подготовки опыта. Поскольку добавляется очень маленькое количество раствора КСЭ, а точность дозирования должна быть высокой, мы рекомендуем для этого приема использовать специальный дозатор фиксированного объема на 10 мкл.

Если резюмировать сказанное, то получится следующий перечень дозаторов, необходимых при подготовке к проведению анализа:

- Дозатор фиксированного объема на 100 мкл – используется для подготовки реакционных смесей и для приготовления разведений с шагом 1/10;
- Дозатор фиксированного объема на 500 мкл - используется для приготовления разведений с шагом 1/2;
- Дозатор фиксированного объема на 10 мкл - используется для приготовления положительных контролей;
- Дозатор переменного объема на 100-1000 мкл (200-1000 мкл) - используется для приготовления разведений с разным шагом;
- Дозатор переменного объема на 1000-5000 мкл - используется для разведений ЛАЛ-реактива, КСЭ, испытуемого препарата.

Поскольку корпуса дозаторов внешне абсолютно одинаковы, целесообразно вводить их цветовую маркировку. В комплектацию дозаторов входят цветные колпачки, которыми можно маркировать дозаторы в соответствии с назначением. Такая цветовая маркировка значительно облегчает повседневную работу. И послед-

нее, комплект из 4-5 дозаторов лучше всего хранить на специальном штативе- карусели.

Обзор дозаторов будет неполным без краткого описания наконечников, которые будут с ними использоваться. К подбору наконечников надо относиться достаточно серьезно. Может быть стоит сначала выбирать именно подходящие наконечники, оценивая их по показателям цена/качество. Действительно, покупка дозаторов - это разовая процедура, а покупка расходных материалов – процедура постоянная. Совокупная же стоимость расходных материалов может во много раз превышать стоимость инструментов, с которыми они используются. Стоит помнить и еще одну важную деталь - лучше использовать дозаторы и наконечники одного производителя, т.к. дозатор и наконечник являются единой системой, и использование наконечников сторонних производителей может привести к серьезным нарушениям точности дозирования.

Вопрос качества наконечников уже поднимался в одном из номеров нашего бюллетеня («ЛАЛ-тест» №2, 2003 г). Стоит еще раз обратить внимание на то, что наконечники должны быть как минимум стерильными. Маркировка «апиrogenный» может быть желательна, но она не гарантирует однозначной пригодности наконечников для ЛАЛ-теста. К сожалению, тестируют наконечники на их возможность использования при проведении ЛАЛ-теста только производители ЛАЛ-реактива.

Определенных рекомендаций по выбору торговой марки дать довольно сложно, поскольку не

возможно выделить какую-то одну компанию, назвав ее самой лучшей. Во многом такой выбор определяется прежним опытом работы, уже имеющимися в лаборатории дозаторами, наконец, внешней привлекательностью или стоимостью, иными словами - делом вкуса и экономических возможностей предприятия. Повторим только, что выбирая торговую марку, надо выбирать одновременно и дозаторы, и наконечники.



*Механические дозаторы BIOHIT Proline на штативе-карусели.*

## Вопросы и ответы

Ведущий рубрики Долгова Г.В.

Не могли бы Вы дать разъяснения по следующему вопросу: возможно ли определение бактериальных эндотоксинов с помощью ЛАЛ-теста в препаратах, которые нерастворимы в воде, а образует с ней суспензию (Бициллин-3, Бициллин-5)? Растворяются данные препараты лишь в диметилформамиде. Или в этом случае использовать ЛАЛ-тест нельзя?

Существуют различные приемы работы с нерастворимыми в воде субстанциями или препаратами.

Во-первых, можно проводить ЛАЛ-тест с водными суспензиями лекарственных веществ. В этом эксперименте необходимо обратить внимание на тщательное и постоянное перемешивание суспензий во время приготовления разведений.

Во-вторых, возможна работа с супернатантом водной суспензии нерастворимого препарата. В этом случае способ получения супернатанта должен быть отработан и описан в деталях с указанием концентрации анализируемой суспензии, длительности контакта препарата с водой, параметров центрифугирования и т.д.

Кроме того, исходный раствор препарата можно получить, растворив его в соляной кислоте, щелочи, диметилсульфоксиде, спирте и т.д., а затем продолжить разведения на воде для ЛАЛ-теста. Использование растворителей должно быть экспериментально обосновано, а в рутинную методику проведения ЛАЛ-теста включены дополнительные контроли, оценивающие влияние растворителей на реакцию ЛАЛ-реактива с бактериальными эндотоксинами.

В том случае, когда речь идет о готовой лекарственной форме, лучше всего использовать тот растворитель, который используется для ее разведения перед введением человеку. В случае с бициллином, в качестве растворителя используется вода. Человеку вводится не истинный раствор, а суспензия. Следовательно, проверять можно содержание бактериальных эндотоксинов в этой суспензии. В данном случае ЛАЛ-тест ничем не отличается от анализа «Пирогенность», проводимого на кроликах. Если в полученной суспензии содержится большое количество эндотоксинов, они вызовут пирогенную реакцию у кроликов или гелирование ЛАЛ-реактива. Отличие от истинного раствора только в том, что молекулы эндотоксина находятся не в растворе, а преимущественно связаны с частицами испытуемого препарата, образующими суспензию. Как указано выше, при проведении анализа следует обращать особое внимание на гомогенность суспензии (исходного раствора и его разведений), то есть необходимо тщатель-

ное перемешивание, также надо следить и за тем, чтобы интервалы между перемешиванием и разведением или подготовкой реакционной смеси были минимальными.

Как измерять pH раствора испытуемого препарата и нужно ли измерять его при проведении рутинных анализов?

Реакция ЛАЛ-реактива с эндотоксинами, как и любая другая ферментативная реакция, зависит от внешних условий. Не последнюю роль играет и значение pH: важно чтобы в оптимальных рамках находилось pH именно реакционной смеси. Оптимальным для реакции является диапазон от 6,0 до 8,0. Очевидно, что измерение pH реакционной смеси представляет собой определенную проблему. Во-первых, это связано в малыми объемами раствора - всего 0,2 мл, следовательно, для измерения нужен микроэлектрод. Во-вторых, такая проверка может привести к привнесению загрязнений и, следовательно, к получению ложноположительных результатов. Намного проще измерять значение pH испытуемого раствора. В этом случае готовят нужное разведение испытуемого препарата, объем может быть произвольный, достаточный для проведения измерения на обычном лабораторном pH-метре. Требования к pH испытуемого препарата несколько более жесткие, чем к реакционной смеси от 6,5 до 7,5. Для препаратов, максимальная степень разведения которых высока (порядка 500-1000 раз), вопрос доведения pH обычно не возникает, так как значение выравнивается в ходе подготовки разведений водой для ЛАЛ-теста.

На стадии подготовки проекта ФСП отрабатывается (валидируется) рутинная методика проведения ЛАЛ-теста с лекарственным препаратом. В методике должны быть отражены уровень и pH рабочего разведения препарата.

Если существует необходимость в коррекции pH, то указывается, какой раствор для этой процедуры предпочтительнее. Во избежание изменения объема разведения препарата, учитывается количество добавляемых растворов кислоты, щелочи или буфера. Таким образом, выполнение рутинного анализа должно проходить по строго стандартизированной методике, и тогда измерение pH, как правило, не требуется.

Каким образом независимой контрольной лаборатории проверять препарат, если в ФСП нет никаких указаний на способ подготовки испытуемого образца.

Отсутствие указаний по подготовке испытуемого образца для проведения анализа означает, что никаких специальных манипуляций с испытуемым препаратом проводить не нужно. Самое простое решение в данном случае - проведение качественного анализа в разведении, равном или близком к МДР.

**«ЛАЛ-тест» - периодический бюллетень для специалистов, работающих в области фармации, медицины и биологии.**

#### Подписка

**Бюллетень «ЛАЛ-тест» выходит с периодичностью 4 раза в год.**

**Бюллетень распространяется бесплатно. Номера высылаются подписчикам по почте. Для оформления подписки необходимо оформить заявку с указанием названия организации, почтового адреса, фамилии и должности подписчика.**

**Просим отправлять заявки по почте: 117525, г. Москва, а/я 20, ООО «ЛАЛ-Центр». Тел.: (095) 517-40-37, факс: (095) 265-32-54, E-mail: LALNews@Limulustest.ru**

Бюллетень зарегистрирован в Министерстве РФ по делам печати, телерадиовещания и средств массовых коммуникаций. Свидетельство о регистрации № 77-16115 от 11.08.03 г.

Главный редактор:

Ситников А.Г.

Редакционная коллегия:

Неугодова Н.П.

Долгова Г.В.

Чиркова М.Н.

Демидова В.В.

Подписано к печати: 15.12.2004 г.

Формат: А4; Бумага: супербелый лен 90 г/м<sup>2</sup>; Печать: Офсет; Объем: 8 стр.; Тираж: 300 экземпляров. Отпечатано в типографии ООО «Формула Цвета», Москва.