



## Гель-тромб тест. Специальные растворители

### Спирт этиловый ( $C_2H_5OH$ )



Этиловый спирт является хорошим растворителем многих органических веществ и некоторых неорганических солей, и может быть использован для подготовки разведений нерастворимых в воде субстанций при проведении ЛАЛ-теста.

В тех случаях, когда вместо воды используется другой растворитель, необходимо выяснить:

1. Влияние растворителя на ход реакции (ингибирование/усиление).

- 1.1. Влияние на ЛАЛ-реактив (белки лизата).

- 1.2. Влияние на эндотоксины.

2. Проверка растворителя на наличие эндотоксина.

#### 1. Влияние растворителя на ход реакции

##### 1.1. Влияние на ЛАЛ-реактив (воздействие на ферментную систему ЛАЛ-реактива).

Спирт этиловый 95% ингибирует реакцию ЛАЛ-реактива с бактериальными эндотоксинами, точнее, высокая концентрация спирта приводит к денатурации белков лизата амебоцитов, соответственно, никакой реакции не происходит даже в присутствии эндотоксинов. По мере разведения спирта этилового водой концентрация его снижается, и ингибирующее действие снимается.

Для исследования возможности проверки спиртовых растворов различной концентрации в ЛАЛ-тесте необходимо проверить серию простых разведений спирта этилового в воде для ЛАЛ-теста. В качестве положительного контроля испытуемого образца (контроля ингибирования) к каждому из этих разведений необходимо добавить КСЭ до получения конечной концентрации, равной 2λ. Эндотоксин в такой концентрации должен вызвать образование плотного геля, в противном случае можно сделать заключение, что препарат в проверяемой концентрации ингибирует реакцию ЛАЛ-реактива и эндотоксина.



Таблица 1. Разведения этилового спирта водой для ЛАЛ-теста

|   | 1/1 | 1/2 | 1/4 | 1/8 | 1/16 | 1/32 | 1/64 | 1/128 |
|---|-----|-----|-----|-----|------|------|------|-------|
| 1 | -   | -   | -   | -   | -    | -    | -    | -     |
| 2 | -   | -   | -   | -   | -    | -    | -    | -     |

Таблица 2. Положительный контроль (Разведения этилового спирта водой для ЛАЛ-теста с КСЭ 2λ)

|   | 1/1 | 1/2 | 1/4 | 1/8 | 1/16 | 1/32 | 1/64 | 1/128 |
|---|-----|-----|-----|-----|------|------|------|-------|
| 1 | -   | -   | -   | -   | +    | +    | +    | +     |
| 2 | -   | -   | -   | -   | +    | +    | +    | +     |

Полученные результаты указывают на то, что проверка спиртовых растворов в гель-тромб тесте возможна, начиная с разведения спирта в 16 раз водой для ЛАЛ-теста, что соответствует его концентрации, равной 5,9%. Данная концентрация может считаться неингибирующей концентрацией, в которой спирт этиловый не мешает проведению анализа.

При осуществлении рутинных анализов целесообразно испытывать растворы, в которых концентрация спирта ниже этой концентрации. Если пользоваться понятием степени разведения, то разведение спирта в 16 раз является его «неингибирующим разведением», и проведение анализа возможно для спирта в этом или в большем разведении.

## 1.2. Влияние спирта этилового на активность бактериальных эндотоксинов.

Нельзя исключить вероятность того, что данный растворитель изменяет структуру липополисахарида или влияет на его биологическую активность. Если такое действие имеет место, то в процессе растворения и подготовки образца к анализу будет происходить разрушение эндотоксинов. В итоге велик риск получения ложноотрицательных результатов.

Проверить такую возможность можно только после проведения модельного опыта с использованием стандартизованного препарата КСЭ. Для этого при подготовке исходного раствора КСЭ вместо установленного в Сертификате количества воды в качестве растворителя во флакон с лиофилизированным КСЭ необходимо добавить спирт этиловый 95%.

Далее из полученного исходного раствора КСЭ с расчетной активностью 20 ЕЭ/мл можно готовить разведения эндотоксина для проведения опыта по схеме анализа «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива». Концентрация КСЭ должна соответствовать стандартному для такого анализа ряду 2λ, λ, 0,5λ, и 0,25λ.

При подготовке разведений такого раствора КСЭ необходимо было учитывать и то, что во всех поставленных в опыт растворах КСЭ концентрация спирта должна быть не более 5,9%.

*Таблица 3. Разведения КСЭ на растворе этилового спирта с концентрацией 5,9%*

| Концентрация КСЭ                  | 2λ  | 1 λ | 0,5λ | 0,25λ | К-  |
|-----------------------------------|-----|-----|------|-------|-----|
| Концентрация этилового спирта [%] | 5,9 | 5,9 | 5,9  | 5,9   | 5,9 |
| 1                                 | +   | +   | -    | -     | -   |
| 2                                 | +   | +   | -    | -     | -   |
| 3                                 | +   | +   | -    | -     | -   |
| 4                                 | +   | +   | -    | -     | -   |

В опыте были получены результаты, подтверждающие заявленную чувствительность используемого ЛАЛ-реактива. Это позволяет сделать вывод о том, что использование этилового спирта 95% не приводит к разрушению КСЭ или снижению его биологической активности.

## **2. Проверка растворителя на содержание эндотоксинов**

Опасность фонового содержания бактериальных эндотоксинов в 95% этиловом спирте маловероятна, что и подтверждают результаты из таблиц 1 и 2.

### **Выводы.**

Спирт этиловый 95% может быть использован в качестве растворителя для нерастворимых лекарственных средств или субстанций.

Спирт этиловый 95% сильно «ингибирует» реакцию, это свойство обратимо и исчезает по мере разведения спирта водой для ЛАЛ-теста.

Спирт этиловый 95% не разрушает и не изменяет биологическую активность эндотоксинов. Эндотоксины, содержащиеся в спиртовых растворах, могут быть определены после разведения спирта водой до концентраций, в которых он не ингибирует реакцию.

### **Примечание.**

*В каждом конкретном случае приведенную схему надо адаптировать под конкретный ЛАЛ-реактив и метод проведения испытаний.*

*В приведенном примере использовали:*

- Спирт этиловый 95%
- ЛАЛ-реактив Endosafe KTA, Charles River Endosafe
- Контрольный стандарт эндотоксина, КСЭ *E.coli* 055:B5, Charles River Endosafe
- Метод: Количественный гель-тромб тест (Метод В)

### **Подробности:**

ООО «НПО «ЛАЛ-Центр», Москва, Нагатинская ул. Д. 3А., строение 5  
[analiz@limulustest.ru](mailto:analiz@limulustest.ru)