ЛАЛ-ЦЕНТР

# Аналитические заметки

Тел.: (495) 517-40-37, (495) 380-04-32 E-mail: lalnews@limulustest.ru www.limulustest.ru

№8

15 апреля 2023 г

## Использование буферных растворов в ЛАЛ-тесте.

*Демидова В.В. – Руководитель Испытательной лаборатории НПО «ЛАЛ-Центр»*

*Ожерельева А.С. – Руководитель организационного отдела Испытательной лаборатории НПО «ЛАЛ-Центр».*

*Рассмотрены основные буферные растворы для применения в ЛАЛ-тесте при подготовке разведений образца, приведены положительные примеры использования буферных растворов для устранения ингибирующего влияния образца на ход реакции лизата амебоцитов с эндотоксинами.*

В практике проведения ЛАЛ-теста испытатели довольно часто сталкиваются с образцами, проявляющими мешающие факторы при постановке опыта. Основным препятствием при проверке является ингибирование реакции в положительном контроле испытуемого образца, причиной чего является, но не исчерпывается, pH испытуемого раствора, выходящий за пределы (*6,0 – 8,0*), установленные в ОФС.1.2.4.0006.15 «Бактериальные эндотоксины».

В данной статье мы хотели подробно рассмотреть буферные растворы, предназначенные для разведения испытуемых образцов для анализа – трис-буфер (трис-гидроксиметиламинометана гидрохлорид) и раствор магния сульфата в трис-буфере, первый из которых позволяет гармонизировать pH испытуемого образца с установленным в ОФС диапазоном и, в целом, улучшить среду для протекания реакции гелеобразования, а второй, при необходимости, позволяет устранить недостаток двухвалентных катионов в испытуемом растворе.

Область применения трис-буфера в практике лабораторных биологических исследований выходит далеко за рамки применения в качестве среды подготовки разведений в ЛАЛ-тесте, так трис-буфер благодаря своей высокой буферной емкости поддерживает уровень pH раствора в диапазоне от 7,0 до 9,2, что благоприятно для проведения многих биохимических реакций и работы систем на основе ферментов в молекулярной биологии. Проведение анализа на «Бактериальные эндотоксины» также основано на реакции активации ферментативной системы из клеток мечехвоста (*Limulus polyphemus* или *Tachypleus tridentatus*), для которой благоприятно нейтральное или близкое к нейтральному значению pH проверяемого раствора. Несмотря на то, что многие производители лизата амебоцитов (*ЛАЛ-* или *ТАЛ- реактива*) вводят непосредственно в состав реактива буферные компоненты, тем самым позволяя при смешивании испытуемого раствора и лизата амебоцитов добиться приемлемого уровня pH смеси и образования геля в положительном контроле образца, буферной ёмкости реактива в некоторых случаях оказывается недостаточно для преодоления ингибирования в положительном контроле. И в таком случае, испытатель может провести дополнительные шаги разведений на воде для БЭТ (*вода для теста бактериальные эндотоксины*) для постановки в опыт, если позволяет рассчитанное значение МДР (*максимально допустимое разведение*). Но как быть если получаемое разведение образца уже близко или равно МДР, а ингибирующее значение pH сохраняется, или, если в лаборатории, нет реактива с большей чувствительностью для преодоления мешающего влияния pH испытуемого образца?

Для решения задачи проверки таких «проблемных» образцов и применяется трис-буфер, который производители выпускают в концентрациях 0,25М, 0,5М и 0,1М (*0,25 моль/л*, *0,5 моль/л* и *0,1 моль/л* соответственно). Наиболее часто в лабораторной практике ЛАЛ-теста применяется децимолярный раствор трис-буфера. Его используют как для приготовления разведения испытуемых растворов препаратов, так и для приготовления исходного раствора субстанций или вспомогательных веществ, и последующих шагов разведений полученного раствора.

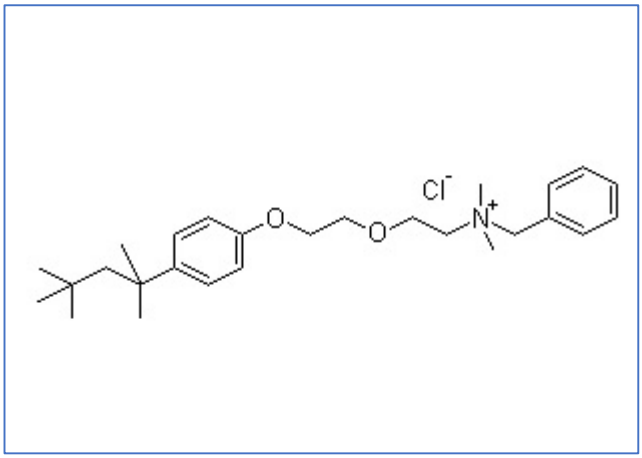
Для производителей лекарственных средств сейчас актуален вопрос о проведении входного контроля субстанций и вспомогательных веществ по показателю «Бактериальные эндотоксины», даже для таких «агрессивных» веществ как концентрированная уксусная, соляная кислоты и натриевые, калиевые щелочи. В таблице №1 приведены значения pH разведений (на *воде для БЭТ* и на *0,1М трис-буфере*) данных растворов вспомогательных веществ и результаты возможности проверки в ЛАЛ-тесте:

*Таблица 1. Результаты измерений pH и проверка в ЛАЛ-тесте концентрированных растворов вспомогательных веществ*

| **Наименование вспомогательного вещества** | **Разведение на воде для БЭТ** | **pH** | **Результат проверки в ЛАЛ-тесте (метод С)** | **Разведение на 0,1М трис-буфере** | **pH** | **Результат проверки в ЛАЛ-тесте (метод С)** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Калия гидроксид<br>**10%** | 1/1000 | 10 | Нет | 1/10<br>**1/50** | 12,5<br>**8** | Нет<br>**Да (менее 0,25 ЕЭ/мл)** |
| Соляная кислота<br>**37%** | 1/100<br>1/1000 | 0,95<br>1,92 | Нет<br>Нет | 1/100<br>**1/1000** | 1,01<br>**6,18** | Нет<br>**Да (менее 5 ЕЭ/мл)** |
| Уксусная кислота<br>**30%** | 1/100<br>1/1000 | 3,01<br>3,59 | Нет<br>Нет | 1/100<br>**1/1000** | 3,99<br>**7,01** | Нет<br>**Да (менее 5 ЕЭ/мл)** |

Другим примером улучшения свойств проверяемого образца при использовании в качестве растворителя трис-буфера при подготовке ЛАЛ-теста, является известное вспомогательное вещество, используемое в составе вакцин, анестетиков и прочих растворов для инъекций, в качестве консерванта, а также используемое в создании производных гепарина – бензэтония хлорид.

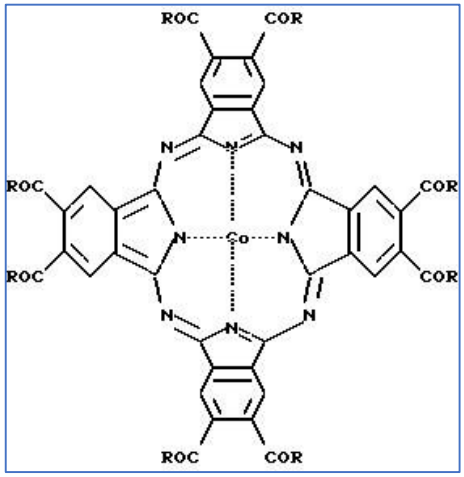
*Рисунок №1. Структурная формула бензэтония хлорида.*



При испытании в ЛАЛ-тесте субстанция проявляет ингибирующие свойства в положительном контроле образца, вплоть до значения МДР, равного 1/1600 (*при чувствительности 0,03 ЕЭ/мл лизата амебоцитов*), несмотря на приемлемое значение pH испытуемого раствора (*6,5 – 6,7*), приготовленного на воде для БЭТ. Решением задачи проверки данного вспомогательного вещества в ЛАЛ-тесте явилось использование 0,1М трис-буферного раствора в подготовке исходного раствора и его разведений. При таком подходе ингибирование в положительном контроле испытуемого раствора преодолевается с разведения 1/200, значение pH в этом разведении также укладывается в допустимый диапазон и равно 7,13.

Ещё один буферный раствор, использующийся в практике ЛАЛ-теста для корректирования уровня pH и устранения недостатка двухвалентных катионов – 0,5М магния сульфат в 1,0 М Трис буферном растворе. Данный раствор актуален при проверке лекарственных препаратов, обладающий хелатирующими свойствами – т.е. способностью удерживать и создавать в испытуемом растворе дефицит двухвалентных ионов. На активацию каскада ферментов в реактиве лизата амебоцитов особенно значимое влияние имеют катионы магния ($Mg^{2+}$), т.к. при их отсутствии активация ферментов происходит значительно медленнее или не происходит совсем, из-за чего эндотоксин, добавленный в положительный контроль испытуемого препарата, не обнаруживается, и проявляется ингибирование. Примером препарата, обладающего подобными свойствами удерживать катионы из испытуемого раствора, является «Терафтал» - противоопухолевый препарат, представляющий собой эфиры окта-4,5-карбокси фталоцианина кобальта общей формулы I, где R-CH3O[CH2CH2O]nили HO[CH2CH2O]n, где n = 3-7.

*Рисунок №2. Общая формула эфиров окта-4,5-карбокси фталоцианина кобальта.*




При подготовке разведений на воде для БЭТ испытуемого раствора реакция гелеобразования в положительном контроле образца наблюдается, начиная с разведения

1/640, а при подготовке разведений на буфере магния сульфата – начиная с разведения 1/160. Таким образом, наблюдается 4-кратное улучшение «видимости» эндотоксинов в испытуемом растворе, что позволяет не только проводить проверку в разведениях, достаточно далеко стоящих от МДР, но и иметь возможность использовать более широкую линейку чувствительности реактивов лизата амебоцитов.

Конечно, не следует воспринимать буферные растворы, трис- и магния сульфата, как панацею, спасающую от любых проявлений ингибирования со стороны испытуемого препарата или субстанции, однако использование при подготовке исходных растворов и/или разведений испытуемого образца может быть полезным для препаратов со значением pH ниже 6,0, а также низким уровнем предельного содержания бактериальных эндотоксинов.

И в заключении, хотелось бы отметить, что на смену зарубежным буферным растворам пришли трис-буферные растворы для ЛАЛ-теста отечественного производства. Аналогичные импортным буферные растворы производства ООО «НПО «ЛАЛ-Центр» стали более доступными как в ценовой характеристике, так и по наличию готовой продукции на складе.

*Библиография:*

*1. Шаповалова О.В., Неугодова Н.П., Сапожникова Г.А., Агаширинова А.А., Гунар О.В. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭНДОТОКСИНОВ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВАХ: МЕШАЮЩИЕ ФАКТОРЫ И ИХ УСТРАНЕНИЕ . Фармация, 2017; 66 (6): 10-14.*

*2. Donovan, M.A. Overcome Your Inhibitions. BioWhittaker LAL Review. Winter, 1994.*