

Использование органических растворителей для определения показателя «Бактериальные эндотоксины» в фармацевтических субстанциях, нерастворимых в воде

О. В. ШАПОВАЛОВА, Г. В. ДОЛГОВА, Н. П. НЕУГОДОВА, Г. А. САПОЖНИКОВА

Испытательный Центр экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ НЦ ЭСМП Минздрава России, Москва

Organic Solvents for Determination of Bacterial Endotoxin Index in Water-Insoluble Pharmaceutical Substances

O. V. SHAPOVALOVA, G. V. DOLGOVA, N. P. NEUGODOVA, G. A. SAPOZHNIKOVA

Scientific Centre for Expertise of Medical Application Products, Moscow

Субстанции, предназначенные для изготовления парентеральных лекарственных форм, необходимо контролировать по показателю «Бактериальные эндотоксины» (БЭ) с помощью ЛАЛ-теста. Проведённое исследование направлено на определение возможности применения органических растворителей для определения БЭ с помощью гель-тромб теста в случае использования водонерастворимых фармацевтических субстанций. Полученные результаты подтверждают предположение о том, что этиловый спирт практически не влияет на активность эндотоксина и при осуществлении рутинных анализов целесообразно испытывать растворы субстанций, в которых концентрация спирта ниже 6%.

Ключевые слова: водонерастворимые фармацевтические субстанции, бактериальные эндотоксины, этиловый спирт.

Substances for manufacture of parenteral drugs require control by the «Bacterial Endotoxin» (BE) index with the LAL-test. The aim of the study was to show possible applicability of organic solvents in BE determination by the gel-thromb test in case of water-insoluble pharmaceutical substances. The results confirmed that ethyl alcohol practically had no effect on the endotoxin activity. In the routine assays it is advisable to test solutions of the substances at the alcohol concentration of 6% below.

Key words: water-insoluble pharmaceutical substances, bacterial endotoxins, ethyl alcohol.

Субстанции, предназначенные для изготовления парентеральных лекарственных форм, следует контролировать по показателю «Бактериальные эндотоксины» с помощью ЛАЛ-теста. При этом они должны проверяться в том виде, в котором будут использоваться в производстве готовых лекарственных форм.

Фармацевтические субстанции обладают рядом характеристик, которые необходимо учитывать при определении наличия бактериальных эндотоксинов (БЭ), например: содержание активного вещества и влаги, pH готового раствора и пр. Растворимость субстанций имеет определяющее значение для испытания по показателю «Бактериальные эндотоксины»: в случае, если субстанция нерастворима в воде, то для оценки её качества необходимо подобрать соответствующий растворитель и подтвердить возможность его применения в опыте.

Обычно для растворения водонерастворимых субстанций используют органические растворители, кислоты или щелочи, но для того, чтобы рекомендовать конкретный растворитель, необходимо выяснить степень его влияния на ферментативную реакцию ЛАЛ-реактива и активность эндотоксинов.

Проведённое исследование направлено на определение возможности применения органических растворителей для определения БЭ с помощью гель-тромб теста в случае использования водонерастворимых фармацевтических субстанций.

Материал и методы

В экспериментах использовали набор реактивов фирмы «Associates of CAPE COD, Inc.»: ЛАЛ-реактив с чувствительностью (λ) 0,03 ЕЭ/мл (lot# 509-01-497), контрольный стандарт эндотоксина без наполнителя (КСЭ; lot# 117) [1].

Работу проводили в соответствии с требованиями разделов ОФС «Бактериальные эндотоксины» — «Мешающие факторы» и «Количественный анализ» [2].

Объектами данного исследования выбраны растворители, наиболее часто применяемые в ЛАЛ-тесте: этиловый спирт 96%, диметилформамид, диметилсульфоксид.

© Коллектив авторов, 2013

Адрес для корреспонденции: 127051 Москва, Петровский бульвар, д. 8. НЦ ЭСМП

Таблица 1. Определение бактериальных эндотоксинов в ряду последовательных разведений этилового спирта с помощью метода ЛАЛ-теста — «Количественный анализ» (ОФС 42-0062-07)

Этиловый спирт	Повторность №	Фактор разведения						Контроли	
		1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	положительный	отрицательный
Испытуемый растворитель	1	—	—	—	—	—	—		
	2	—	—	—	—	—	—		
Положительный контроль испытуемого растворителя	1	—	—	—	—	+	+	++	---
	2	—	—	—	—	+	+	++	---

Примечание. Здесь и в табл. 2–8: обозначение конечного результата гель-тромб теста: «+» — наличие геля; «—» — отсутствие геля.

Таблица 2. Определение бактериальных эндотоксинов в ряду последовательных разведений диметилформамида с помощью метода ЛАЛ-теста — «Количественный анализ» (ОФС 42-0062-07)

Диметилформамид	Повторность №	Фактор разведения						Контроли	
		1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	положительный	отрицательный
Испытуемый растворитель	1	—	—	—	—	—	—		
	2	—	—	—	—	—	—		
Положительный контроль испытуемого растворителя	1	—	—	—	—	+	+	++	---
	2	—	—	—	—	+	+	++	---

Таблица 3. Определение бактериальных эндотоксинов в ряду последовательных разведений диметилсульфоксида с помощью метода ЛАЛ-теста — «Количественный анализ» (ОФС 42-0062-07)

Диметилсульфоксид	Повторность №	Фактор разведения						Контроли	
		1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	положительный	отрицательный
Испытуемый растворитель	1	—	—	—	—	—	—		
	2	—	—	—	—	—	—		
Положительный контроль испытуемого растворителя	1	—	—	—	+	+	+	++	---
	2	—	—	—	+	+	+	++	---

Результаты исследования

Экспериментальная часть.

I. Этап. Определение степени разведения растворителя водой для ЛАЛ-теста, в которой он не ингибирует реакцию гелеобразования. Исследуемые органические растворители без разбавления ингибируют реакцию гелеобразования ЛАЛ-реактива с бактериальными эндотоксинами. Однако по мере их разведения водой для ЛАЛ-теста концентрация снижается и вместе с тем уменьшается ингибирующее действие.

Растворители разводили водой для ЛАЛ-теста и готовили два параллельных ряда последовательных двукратных разведений. Одновременно, для контроля ингибирования готовили такие же два параллельных ряда разведений с концентрацией КСЭ 2 в каждом испытуемом растворе.

В проведённом эксперименте были получены следующие результаты:

— испытуемые растворы этилового спирта 96%, начиная с разведения 1:16, не ингибировали реакцию ЛАЛ-реактива с КСЭ (табл. 1).

— испытуемые растворы диметилформамида, начиная с разведения 1:64, не ингибировали реакцию ЛАЛ-реактива с КСЭ (табл. 2).

— испытуемые растворы диметилсульфоксида, начиная с разведения 1:32 не ингибировали реакцию ЛАЛ-реактива с КСЭ (табл. 3).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что оценка качества растворов исследуемых растворителей в гель-тромб тесте возможна, начиная с разведения этилового спирта водой для ЛАЛ-теста в 16 раз, диметилформамида — в 64 раза, диметилсульфоксида — в 32 раза.

Таким образом, можно сделать вывод, что использование разбавленных органических растворителей не препятствует образованию гель-тромба.

II. Этап. Исследование влияния растворителя на активность бактериальных эндотоксинов. Если для растворения фармацевтических субстанций используется органический растворитель, то нельзя исключить вероятность его влияния на структуру и активность ЛАЛ-реактива, состоящего из липополисахарида. Поэтому, в процессе растворения и подготовки образца к анализу, возможно, разрушение БЭ в испытуемой субстанции. В итоге велик риск получения ложноотрицательных результатов, которые будут свидетельствовать об отсутствии эндотоксинов [3].

Для исключения подобной ситуации проводили «модельный» опыт с использованием КСЭ. В качестве загрязненной эндотоксинами субстанции использовали контрольный стандарт эндотоксина (КСЭ) активностью 2500 ЕЭ во флаконе.

Во флакон с КСЭ добавляли по 5 мл каждого из органических растворителей таким образом, чтобы теоретическое содержание БЭ составляло 500 ЕЭ в 1 мл растворителя. Дальнейшие разведения основного раствора КСЭ готовили с помощью воды для ЛАЛ-теста. Реальное содержание БЭ в испытуемых растворах определяли в опыте «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива» [2]. Параллельно проводили контрольный опыт, в котором содержимое аналогичного флакона КСЭ (той же серии) растворяли в воде для ЛАЛ-теста. Схема разведений приведена в табл. 4.

Готовые растворы стандарта эндотоксина с концентрациями, начиная с 4 ЕЭ/мл (128λ) до 0,0075 ЕЭ/мл (λ/4) анализировали в ЛАЛ-тесте.

В опытах были получены следующие результаты (табл. 5–8).

Результаты, приведённые в таблицах 5–8, подтверждают, что в условиях эксперимента чувствительность ЛАЛ-реактива — 0,03 ЕЭ/мл, определённая с КСЭ в разведении на воде для

Таблица 4. Схема разведения растворов контрольного стандарта эндотоксина (КСЭ)

№№	Органический растворитель или вода для ЛАЛ-теста	Концентрация БЭ в растворе
1	Во флакон с КСЭ (2500 ЕЭ) добавляли 5 мл исследуемого растворителя или воды для ЛАЛ-теста	500 ЕЭ/мл
2	0,2 мл раствора (1) + 0,8 мл воды для ЛАЛ-теста	100 ЕЭ/мл
3	0,1 мл раствора (2) + 0,9 мл воды для ЛАЛ-теста	10 ЕЭ/мл (320 λ)
4	0,5 мл раствора (3) + 0,75 мл воды для ЛАЛ-теста	4 ЕЭ/мл (128 λ)
5	0,5 мл раствора (4) + 0,5 мл воды для ЛАЛ-теста	2 ЕЭ/мл (64 λ)
6	0,5 мл раствора (5) + 0,5 мл воды для ЛАЛ-теста	1 ЕЭ/мл (32 λ)
7	0,5 мл раствора (6) + 0,5 мл воды для ЛАЛ-теста	0,5 ЕЭ/мл (16 λ)
8	0,5 мл раствора (7) + 0,5 мл воды для ЛАЛ-теста	0,25 ЕЭ/мл (8 λ)
9	0,5 мл раствора (8) + 0,5 мл воды для ЛАЛ-теста	0,125 ЕЭ/мл (4 λ)
10	0,5 мл раствора (9) + 0,5 мл воды для ЛАЛ-теста	0,06 ЕЭ/мл (2 λ)
11	0,5 мл раствора (10) + 0,5 мл воды для ЛАЛ-теста	0,03 ЕЭ/мл (λ)
12	0,5 мл раствора (11) + 0,5 мл воды для ЛАЛ-теста	0,015 ЕЭ/мл (λ/2)
13	0,5 мл раствора (12) + 0,5 мл воды для ЛАЛ-теста	0,0075 ЕЭ/мл (λ/4)

Таблица 5. Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива (0,03 ЕЭ/мл) с использованием КСЭ, исходный раствор которого приготовлен на воде для ЛАЛ-теста

№ ряда	Концентрация БЭ исходного раствора КСЭ, приготовленного на воде для ЛАЛ-теста										Концентрация эндотоксина в конечной точке реакции	Геометрическое среднее значений концентрации эндотоксина	Контроль отрицательный (вода для ЛАЛ-теста)
	128λ	64λ	32λ	16λ	8λ	4λ	2λ	λ	0,5λ	0,25λ			
1	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	0,03 ЕЭ/мл	0,03 ЕЭ/мл	—
2	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	0,03 ЕЭ/мл		—
3	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	0,03 ЕЭ/мл		—
4	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	0,03 ЕЭ/мл		—

Таблица 6. Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива (0,03 ЕЭ/мл) с использованием КСЭ, исходный раствор которого приготовлен на спирте этиловом 96%

№ ряда	Концентрация БЭ исходного раствора КСЭ, приготовленного на спирте этиловом										Концентрация эндотоксина в конечной точке реакции	Геометрическое среднее значений концентрации эндотоксина	Контроль отрицательный (вода для ЛАЛ-теста)
	128λ	64λ	32λ	16λ	8λ	4λ	2λ	λ	0,5λ	0,25λ			
1	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	0,03 ЕЭ/мл	0,035 ЕЭ/мл	—
2	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	0,03 ЕЭ/мл		—
3	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	0,03 ЕЭ/мл		—
4	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	0,06 ЕЭ/мл		—

Таблица 7. Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива (0,03 ЕЭ/мл) с использованием КСЭ, исходный раствор которого приготовлен на диметилформамиде

№ ряда	Концентрация БЭ исходного раствора КСЭ, приготовленного на диметилформамиде										Концентрация эндотоксина в конечной точке реакции	Геометрическое среднее значений концентрации эндотоксина	Контроль отрицательный (вода для ЛАЛ-теста)
	128λ	64λ	32λ	16λ	8λ	4λ	2λ	λ	0,5λ	0,25λ			
1	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	0,24 ЕЭ/мл	0,339 ЕЭ/мл	—
2	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	0,48 ЕЭ/мл		—
3	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	0,24 ЕЭ/мл		—
4	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	0,48 ЕЭ/мл		—

Таблица 8. Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива (0,03 ЕЭ/мл) с использованием КСЭ, исходный раствор которого приготовлен на диметилсульфоксиде

№ ряда	Концентрация БЭ исходного раствора КСЭ, приготовленного на диметилсульфоксиде										Концентрация эндотоксина в конечной точке реакции	Геометрическое среднее значений концентрации эндотоксина	Контроль отрицательный (вода для ЛАЛ-теста)
	128λ	64λ	32λ	16λ	8λ	4λ	2λ	λ	0,5λ	0,25λ			
1	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	0,24 ЕЭ/мл	0,404 ЕЭ/мл	—
2	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	0,48 ЕЭ/мл		—
3	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	0,48 ЕЭ/мл		—
4	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	0,48 ЕЭ/мл		—

Таблица 9. Перечень водонерастворимых субстанций, исследуемых по показателю «Бактериальные эндотоксины» с помощью гель-тромб теста

Наименование субстанции	Растворимость	Формулировка раздела «Бактериальные эндотоксины»
Липоевая кислота (тиоктовая кислота)	Практически нерастворим в воде, легко растворим в спирте 96% и хлороформе.	Предельное содержание не более 0,29 ЕЭ на 1 мг субстанции. Для проведения анализа готовят исходный раствор субстанции с концентрацией 25 мг липоевой кислоты в 1 мл этилового спирта 96%, а затем разводят его не менее чем в 100 раз.
Медроксипрогестерона ацетат	Легко растворим в метиленхлориде, умеренно растворим в спирте этиловом 96%, растворим в ацетоне и диоксане, практически нерастворим в воде.	Предельное содержание не более 0,35 ЕЭ на 1 мг медроксипрогестерона ацетата. Для проведения анализа готовят исходный раствор субстанции с концентрацией 100 мг медроксипрогестерона ацетата в 1 мл этилового спирта 96%. Полученную суспензию перемешивают на вихревой мешалке каждые 10 минут на протяжении 1 часа. Испытания проводят с разведением исходного раствора не менее чем в 200 раз.
Паклитаксел	Растворим в хлороформе, спирте метиловом, спирте этиловом абсолютированном, умеренно растворим в спирте 96%, практически нерастворим в воде.	Предельное содержание не более 3,0 ЕЭ на 1 мг паклитаксела. Для проведения анализа готовят исходный раствор субстанции с концентрацией 10 мг паклитаксела в 1 мл этилового спирта 96%. Полученную суспензию перемешивают на вихревой мешалке каждые 10 минут на протяжении 1 часа до полного растворения субстанции. Испытания проводят с разведением исходного раствора не менее чем в 500 раз.
Рифампицин	Практически нерастворим в воде, трудно растворим в формамиде, мало растворим в этиловом спирте.	Предельное содержание не более 0,5 ЕЭ на 1 мг рифампицина (ГФ XII). Субстанцию растворяют в спирте этиловом 96% при постоянном перемешивании для получения исходного раствора с концентрацией 5 мг рифампицина в 1 мл. Для проведения анализа исходный раствор разводят водой для ЛАЛ-теста не менее чем в 40 раз.

ЛАЛ-теста, по величине совпадает с его заявленной чувствительностью. Значение чувствительности ЛАЛ-реактива, определенное с КСЭ, исходный раствор которого был приготовлен на растворе этилового спирта 96%, равнялось 0,035 ЕЭ/мл, то есть менее чем в два раза отличалось от заявленной чувствительности — 0,03 ЕЭ/мл (см. табл. 6).

Данные, приведённые в таблицах 7 и 8, свидетельствуют о том, что при исходном растворении КСЭ на диметилформамиде и диметилсульфоксиде, чувствительность ЛАЛ-реактива отличается от заявленной величины в 11,3 и 13,5 раза соответственно.

Результаты и обсуждение

Полученные результаты подтверждают предположение о том, что этиловый спирт практически не влияет на активность эндотоксина. Таким образом, можно сделать вывод, что этиловый спирт 96% в качестве растворителя водонерастворимых субстанций не оказывает разрушающего действия на БЭ и при осуществлении рутинных анализов целесообразно испытывать растворы субстанций, в которых концентрация спирта ниже 6%, то есть в разведении 1:16 или больше.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сертификат на реактивы фирмы Associates of CAPE COD, Inc.
2. Государственная фармакопея Российской Федерации, ГФ XII, 1: 128—136.
3. Тутнова А. Д., Демидова В. В., Шаповалова О. В., Долгова Г. В. ЛАЛ-тест. М.: 2007; 4—19.

В качестве подтверждения проведённых исследований при определении бактериальных эндотоксинов методом гель-тромб теста для субстанций нерастворимых в воде был использован этиловый спирт 96%.

В лаборатории фармакологии разработаны и валидированы методики для проектов нормативных документов для раздела «Бактериальные эндотоксины» на такие фармацевтические субстанции как «Липоевая кислота», «Медроксипрогестерона ацетат», «Паклитаксел», «Рифампицин» (табл. 9).

На основании проведённых исследований считаем возможным использовать этиловый спирт 96% в качестве растворителя для субстанций нерастворимых в воде в опытах гель-тромб теста. Использование концентрированных органических растворителей, таких как диметилформамид и диметилсульфоксид, недопустимо, так как они приводят к разрушению КСЭ или уменьшению его биологической активности.