



## **ИНСТРУКЦИЯ**

### **Индикаторы эндотоксина для депирогенизации**

## **Важно: Прочитайте всю брошюру перед выполнением анализа**

### **Назначение**

Индикаторы эндотоксина используются для валидации циклов процедуры сухожаровой депирогенизации. Способность каждого конкретного цикла депирогенизации к разрушению/инактивации эндотоксинов измеряется путем сравнения уровня содержания эндотоксинов в обработанных флаконах с уровнем содержания эндотоксинов в необработанных (контрольных) флаконах. В Американской Фармакопее указано, что достаточно продемонстрировать уменьшение содержания индикаторов эндотоксина, используемых для депирогенизации, как минимум на три порядка (3-log) в единицах эндотоксина (1,2). С помощью данных индикаторов эндотоксина можно показать уменьшение содержания эндотоксинов минимум на три порядка (3-log) при использовании в ЛАЛ-тесте с реактивами PYROGENT, QCL-1000, Kinetic-QCL или PYROGENT-5000.

### **Объяснение теста**

Сухожаровая стерилизация используется для депирогенизации стеклянной посуды и других нетермолабильных материалов. В соответствии с исследованиями по распределению тепла индикаторы эндотоксина помещают в predetermined наиболее труднопрогреваемые места (холодные точки). После того, как цикл депирогенизации завершен, порядок снижения уровня эндотоксинов (log) может быть определен путем сравнения уровня содержания эндотоксинов в обработанных флаконах с уровнем содержания в необработанных (контрольных) флаконах. С помощью ЛАЛ-теста можно измерить количественное содержание эндотоксинов в индикаторах эндотоксина.

В Американской Фармакопее (1), в Технических бюллетенях №3 (4) и №7 (5) Ассоциации производителей парентеральных лекарственных препаратов (Parenteral Drug Associations), в рекомендациях LAL Users Group (6) описано использование ЛАЛ-теста для валидации таких сухожаровых процессов.

### **Реактивы, входящие в поставку, и условия хранения**

#### **Реактив (00555447) флакон с красной этикеткой**

Каждый флакон с индикатором эндотоксина содержит не менее 1000 ЕЭ очищенного эндотоксина, полученного из штамма E.coli 055:B5. Хранить в оригинальной упаковке при температуре 2 – 8 °С. Предназначены для однократной депирогенизации при температуре 250°С в течение 120 минут.

**Внимание:** данный продукт не содержит наполнителей или стабилизаторов. Из-за очень маленького содержания эндотоксинов во флаконе флаконы с индикаторами могут казаться пустыми. Это нормально. Этикетки и пробки флаконов выдерживают цикл депирогенизации при 250°С в течение 30 минут. При температуре свыше 250°С этикетка может стать нечитаемой.

### **Предварительная подготовка**

Поместите соответствующее количество флаконов с индикаторами эндотоксина в сухожаровый шкаф в predetermined труднопрогреваемые места. Не удаляйте с флакона колпачок, резиновую пробку и этикетку. Прожарьте флаконы в соответствии с выбранными параметрами цикла депирогенизации. После окончания цикла достаньте флаконы для проверки на содержание эндотоксинов. Разведите каждый обработанный флакон и соответствующее количество необработанных контрольных флаконов 1,0 мл воды для ЛАЛ-теста (или эквивалентом). Перемешайте флаконы на вортексе на высоких оборотах в течение 30 минут. Подготовьте соответствующие разведения из

необработанных флаконов, используя воду для ЛАЛ-теста (см. ниже). Сразу же проверьте разведения в ЛАЛ-тесте, используя реактивы PYROGENT, QCL-1000, Kinetic-QCL или PYROGENT-5000. Следует обратиться к инструкции, включенной в набор с каждым конкретным реактивом.

### **Процедура анализа и расчет результатов**

#### **Для использования с реактивом PYROGENT для гель-тромб теста**

Определите концентрацию эндотоксина в необработанных флаконах путем разведения растворенных необработанных флаконов с использованием воды для ЛАЛ-теста или эквивалента. Разведения должны охватывать диапазон до разведения 1/10000. **Не разводите** исходный раствор в обработанных флаконах.

В следующем примере приведены расчеты для использования ЛАЛ-реактива с чувствительностью 0,125 ЕЭ/мл. Концентрация эндотоксина в разведенных флаконах может быть рассчитана следующим образом:

Концентрация эндотоксина (ЕЭ/флак) = чувствительность ЛАЛ-реактива x объем воды для разведения x максимальное разведение, в котором образуется гель.

(В качестве значения максимального разведения используется знаменатель фактора этого разведения, например, для разведения 1/10000 знаменатель = 10000, для неразведенного образца знаменатель = 1).

Положительный результат во всех разведениях означает, что содержание эндотоксина больше, чем расчетное значение эндотоксина.

Отрицательный результат во всех разведениях означает, что содержание эндотоксина меньше, чем расчетное значение эндотоксина.

Положительный результат вплоть до разведения 1/10000 для необработанных флаконов означает, что изначальная концентрация эндотоксинов во флаконе больше чем 1250 ЕЭ/флак. Например:

$$\text{Концентрация эндотоксина} = 0,125 \text{ ЕЭ/мл} \times 1 \text{ мл/флак} \times 10\,000 = 1250 \text{ ЕЭ/флак}$$

Отрицательный результат в неразведенных обработанных флаконах означает, что конечная концентрация эндотоксина меньше чем 0,125 ЕЭ/флак.

$$\text{Концентрация эндотоксина} = < 0,125 \text{ ЕЭ/мл} \times 1 \text{ мл/флак} \times 1 = < 0,125 \text{ ЕЭ/мл}$$

Рассчитайте минимальную степень снижения концентрации эндотоксина как в примере ниже:

Степень снижения концентрации эндотоксина =  $\log$  концентрации эндотоксинов в необработанных флаконах –  $\log$  концентрации эндотоксинов в обработанных флаконах

$$\text{Степень снижения концентрации эндотоксина} = \log 1250 \text{ ЕЭ/флак} - \log 0,125 \text{ ЕЭ/флак} = 3,097 - (-0,903) = 4$$

#### **Для использования с реактивом QCL-1000 в хромогенном анализе по конечной точке**

Разведите растворенный необработанный контрольный флакон до разведения 1/10000, используя воду для ЛАЛ-теста или эквивалент. **Не разводите** исходный раствор в обработанных флаконах.

Концентрация эндотоксинов в разведенных флаконах может быть рассчитана следующим образом:

Концентрация эндотоксина (ЕЭ/флак) = концентрация эндотоксина в испытуемом образце (по стандартной калибровочной кривой) x объем для разведения эндотоксина x фактор разведения (Для неразведенных образцов фактор разведения равен 1).

Если полученное для разведения контрольного раствора индикатора эндотоксина среднее значение оптической плотности укладывается в диапазон значений оптической плотности стандартной калибровочной кривой, можно рассчитать концентрацию эндотоксина в исходном растворе индикатора. Расчеты делаются по приведенной выше формуле. Например:

Концентрация эндотоксина = 0,37 ЕЭ/мл (по стандартной калибровочной кривой) x 1 мл/флак x 10 000 = 3700 ЕЭ/флак.

Если полученное для раствора обработанного индикатора эндотоксина среднее значение оптической плотности укладывается в диапазон значений оптической плотности стандартной калибровочной кривой, можно рассчитать концентрацию эндотоксина в растворе обработанного индикатора. Расчеты делаются по приведенной выше формуле. Например:

Концентрация эндотоксина = 0,21 ЕЭ/мл (по стандартной калибровочной кривой) x 1 мл/флак x 1 = 0,21 ЕЭ/флак.

Степень снижения концентрации эндотоксина в приведенном выше примере может быть рассчитана следующим образом:

Степень снижения концентрации эндотоксина = log концентрации эндотоксинов в необработанных флаконах – log концентрации эндотоксинов в обработанных флаконах.

Степень снижения концентрации эндотоксина = log 3700 ЕЭ/флак – log 0,21 ЕЭ/флак = 3,568 – (-0,678) = 4,25

Если полученное для раствора обработанного индикатора эндотоксина среднее значение оптической плотности менее чем значение оптической плотности для самого низкого стандарта эндотоксина, следует использовать значение самого низкого стандарта как концентрацию эндотоксинов в образце. Расчетная степень снижения концентрации эндотоксина будет равна минимальной степени снижения концентрации эндотоксина.

#### **Для использования с реактивами Kinetic-QCL-1000 в хромогенном анализе или PYROGENT-5000 в турбидиметрическом анализе**

Разведите растворенный необработанный флакон в 10000 раз, используя воду для ЛАЛ-теста или эквивалент. **Не разводите** исходный раствор в обработанных флаконах.

После завершения анализа программное обеспечение WinKQCL автоматически рассчитает концентрации эндотоксинов в контрольном и обработанном флаконах.

Рассчитайте степень снижения концентрации эндотоксина как в следующем примере:

Степень снижения концентрации эндотоксина = log концентрации эндотоксинов в необработанных флаконах – log концентрации эндотоксинов в обработанных флаконах = log 3700 – log 0,21 = 3,568 – (-0,678) = 4,25

## Литература

1. Chapter Sterilization and Sterility Assurance of Compendial Articles. Rockville, MD: United States Pharmacopeia.
2. Endotoxin Indicator For Depyrogenation. Rockville, MD: United States Pharmacopeia.
3. Weary, M., and F. Pearson. A manufacturer's guide to depyrogenation. Biopharm. 1, 4 (1988).
4. Parenteral Drug Association. Validation of dry heat processes used for sterilization and depyrogenation. Technical Report No. 3 (1981).
5. Parenteral Drug Association. Depyrogenation by dry heat. Technical Report No. 7 (1985).
6. LAL Users' Group. Preparation and use of endotoxin indicators for depyrogenation process studies. J. Parenter. Sci. Technol. 43, 3 (1989).



Тел: +7 499 682 61 09

E-mail: [mail@algimed.ru](mailto:mail@algimed.ru)

