

УДК 615.076.9:57.021:57.021

Н. В. Ділай, Т. Г. Калинюк

Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького

(1→3)-β-D-ГЛЮКАНИ – ЗАВАЖАЮЧИЙ ФАКТОР ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ЛАЛ-ТЕСТУ

Розглянуто проблему вмісту (1→3)-β-D-глюканів у стерильних лікарських засобах для парентерального застосування та їх активних фармацевтичних інгредієнтів як заважаючого фактора для проведення ЛАЛ-тесту та способи її усунення.

Ключові слова: (1→3)-β-D-глюкани; бактерійні ендотоксини; пірогени, лікарські засоби для парентерального застосування; активні фармацевтичні інгредієнти; GMP

ВСТУП

Лікарські засоби (ЛЗ) для парентерального застосування повинні перевірятись на наявність пірогенів за допомогою лізату амебоцитів лімулюса-тесту (ЛАЛ-тесту) або тесту «Пірогени». Тест «Пірогени» проводиться на кроликах шляхом визначення підвищення температури тіла тварин у відповідь на введення ЛЗ для парентерального застосування, забруднених пірогенами. Проте не всі ЛЗ можна контролювати на кроликах, переважно, через токсичність та фармакологічні властивості. Світова тенденція зменшення використання тварин для випробувань, розвиток фармацевтичної галузі та впровадження належних виробничих практик (НВП) також спонукають до застосування альтернативних методів, таких як ЛАЛ-тест для контролю медичних та ветеринарних препаратів, а також води для ін'єкцій, активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ), первинного пакування тощо [3-4].

Визначення бактерійних ендотоксинів (БЕ) за допомогою ЛАЛ-тесту є перспективним та, водночас, складним процесом, оскільки для кожного окремого ЛЗ для парентерального застосування, АФІ та контролю технологічного процесу повинна бути розроблена та валідована окрема методика випробування.

При розробці та валідації методик, а також у рутинних тестуваннях за допомогою ЛАЛ-тесту виникає цілий ряд псевдопозитивних чи псевдо-негативних результатів, пов'язаних із заважаючими факторами, які перешкоджають перебігу реакції, тобто активують або інгібують її. Майже всі ЛЗ для парентерального застосування можуть впливати на взаємодію з лізатом амебоцитів лімулюсу, тому для одержання вірогідних результатів випробувань необхідно враховувати заважаючі фактори.

Одним із таких заважаючих (псевдопозитивних) факторів є наявність у ЛЗ для парентерального застосування (1→3)-β-D-глюканів. Цю проблему ми частково вивчили та описали при дослідженні БЕ у стерильних лікарських засобах рослинного походження [8]. Але (1→3)-β-D-глюкани зустрічаються в АФІ та ЛЗ для парентерального застосування не рослинного походження.

Бета-глюкани – полісахариди мономерів D-глюкози, з'єднаних за допомогою бета-глікозидних зв'язків [5]. (1,3;1,6)-β-D-Глюкани є нейтральними резервними полісахаридами морських бурих водоростей, лишайників, входять у склад клітинних стінок рослин (каллоза), а також грибів і мікроорганізмів [7]. D-глюкани продукуються деякими бактеріями у вигляді екзополісахаридів, а також є компонентами вуглеводного ланцюга целюлозовмісних фільтрів [6]. Домішки глюканів можуть з'являтися через те, що продукт мав контакт з целюлозними матеріалами, або з продуктів грибового походження. Певні бактеріальні чи водоростеві продукти можуть також впливати на наявність втручань глюканового походження. При наявності глюканів результати тесту можуть бути вищими через активацію ЛАЛ-реакції.

Причиною псевдопозитивних результатів є активація у ЛАЛ-тесті фактора глюкан-чутливості (фактора G) (рис. 1) [2].

ЛАЛ-реактив взаємодіє з полісахаридами, утворюючи гель, не розрізняючи полісахариди БЕ чи (1→3)-β-D-глюканів, що виглядає як невідповідність зразка за вмістом БЕ. БЕ складаються з ліпополісахаридів (ЛПС) та Ліпиду А. Ліпід А – це токсична та відповідальна за імунобіологічну активність частини макромолекули ЛПС [3].

При проведенні контролю за допомогою тесту «Пірогени» у кроликів не відбувається підвищення температури у відповідь на присутність (1→3)-β-D-

© Ділай Н. В., Калинюк Т. Г., 2015

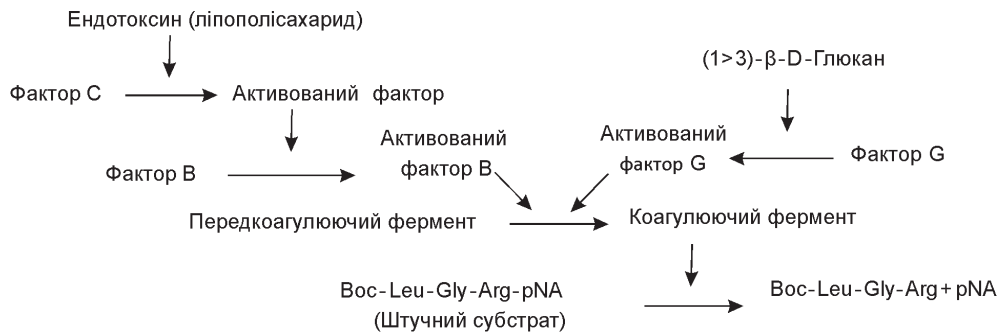


Рис. 1. Зміна шляху взаємодії ЛАЛ-реактиву.

Таблиця 1

КОНТРОЛЬ АФІ ІНОЗИНУ ТА ВИГОТОВЛЕНИХ НА ЙОГО ОСНОВІ ЛЗ ДЛЯ ПАРЕНТЕРАЛЬНОГО ЗАСТОСУВАННЯ РИБОКСИН, РОЗЧИН ДЛЯ ІН'ЄКЦІЙ 20 МГ/МЛ

АФІ та ЛЗ	Кількість серій	Кількість серій, що відповідала вимогам за вмістом БЕ	Кількість серій, що відповідала вимогам тесту «Пірогени»
Інозин	30	0	30
Рибоксин, розчин для ін'єкцій 20 мг/мл	50	43	50

глюканів, тому проблема їх вмісту у ЛЗ для парентерального застосування стала неочікуваним та невивченим чинником, який не становить ризику для пацієнта, але активує реакцію гелеутворення при проведенні ЛАЛ-тесту і часто стає причиною бракування вільних від БЕ зразків.

Причиною вивчення та дослідження цієї проблеми стали позитивні результати при проведенні ЛАЛ-тесту АФІ та ЛЗ для парентерального застосування не рослинного походження, які не викликали підвищення температури тіла у кроликів при контролі за допомогою тесту «Пірогени».

Дослідження проводили на ПАТ «Галичфарм». Зразки: АФІ Інозин та ЛЗ для парентерального застосування Рибоксин, розчин для ін'єкцій 20 мг/мл.

Вміст БЕ визначали за допомогою ЛАЛ-тесту (п. 2.6.14. «Бактерійні ендотоксини, методи А, В, С» [1, 9, 10]). Для проведення досліджень використовували набори реактивів «Associates of Cape Cod Inc.» (США).

Нами було проконтрольовано 30 серій АФІ Інозину. Усі вони не відповідали вимогам за вмістом БЕ, однак відповідали вимогам тесту «Пірогени» (табл. 1).

З АФІ Інозину виготовлено 50 серій ЛЗ для парентерального застосування Рибоксин, розчин для ін'єкцій 20 мг/мл. Граничний вміст БЕ (ГВЕ) для АФІ Інозин менше 0,9 МО/мг, для ЛЗ Рибоксин, розчин для ін'єкцій 20 мг/мл менше 17,6 МО/мл.

У результаті застосування заходів щодо зниження вмісту БЕ (рис. 2), а саме різних варіантів фільтрації з різною періодичністю заміни фільтрів для кожної серії, нам вдалося досягнути ГВЕ у ЛЗ для парентерального застосування.

Визначення БЕ проводили на стадії «розчин приготований» і після отриманих результатів застосували наведені схеми фільтрації.

Під час подальшого вивчення причин позитивних результатів у визначенні АФІ та ЛЗ для парентерального застосування було прийнято рішення провести випробування на заважаючі фактори з використанням буфера, призначеного для блокування втручань, викликаних концентрацією глюканів до 100 мг/мл; у нашому випадку – це буфер Glucashield® виробництва «Associates of Cape Cod Inc.» (США), оскільки всі дослідження проводилися з використанням реактивів даного виробника.

У табл. 2 та на рис. 3-4 наведені результати випробувань з використанням буфера Glucashield® і без нього для тих же зразків. При проведенні випробувань з використанням буфера Glucashield® спостерігається вміст БЕ у зразках з випробуваним розчином та у зразках з додаванням контрольного стандарту ендотоксину (КСЕ) у діапазоні від 50 % до 200 %, що відповідає вимогам ДФУ. Отже, використавши буфер Glucashield®, який зв'язується з (1→3)-β-D-глюканами, ми визначили реальний рівень БЕ у зразках АФІ Інозин та ЛЗ для парентерального застосування Рибоксин, розчин для ін'єкцій 20 мг/мл.

У результаті проведених досліджень нами було визначено, що АФІ Інозин та ЛЗ для парентерального застосування Рибоксин, розчин для ін'єкцій 20 мг/мл містять (1→3)-β-D-глюкани, які активують реакцію гелеутворення.

Причиною позитивних результатів були використання некоректної методики та некоректно проведеного випробування на заважаючі фактори, а проблемою – вміст (1→3)-β-D-глюканів невеликої концентрації в межах ГВЕ у зразках.

На підставі отриманих результатів можна рекомендувати наступний алгоритм проведення ЛАЛ-тесту для розробки та валідації методик, а також для

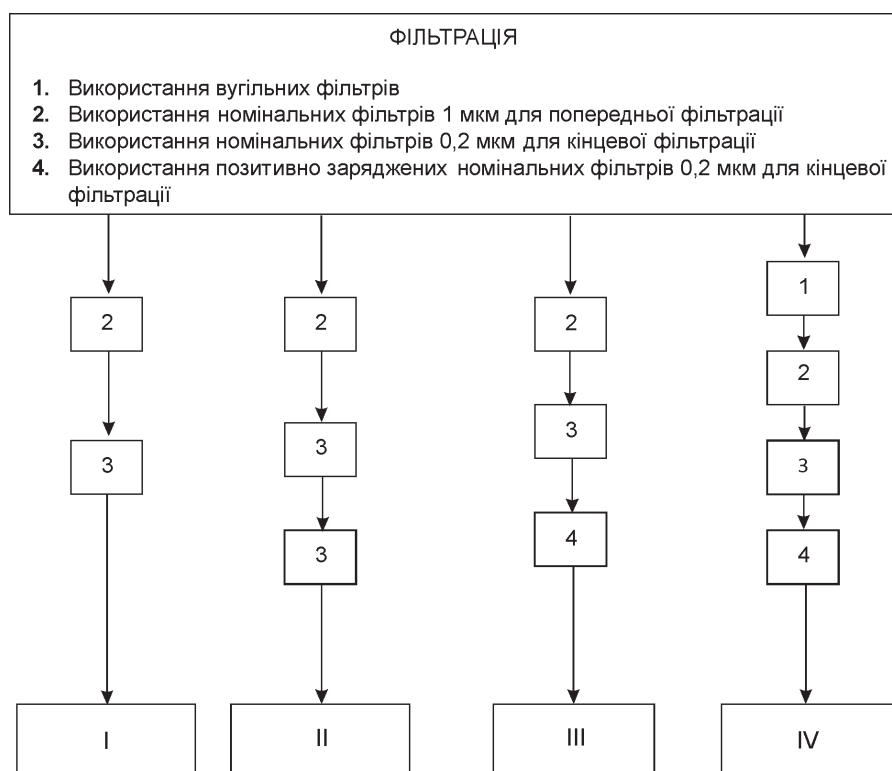


Рис. 2. Блок-схема заходів щодо зниження вмісту БЕ
(I – БЕ < ГВЕ; II – БЕ ≈ ГВЕ; III – БЕ > ГВЕ; IV – БЕ >> ГВЕ) на стадії фільтрації.

Таблиця 2

ВИЗНАЧЕННЯ БЕ У ЗРАЗКАХ АФІ ІНОЗИН ТА ЛЗ ДЛЯ ПАРЕНТЕРАЛЬНОГО ЗАСТОСУВАННЯ РИБОКСИН, РОЗЧИН ДЛЯ ІН'ЄКЦІЙ 20 МГ/МЛ З ВИКОРИСТАННЯМ І БЕЗ БУФЕРА GLUCASHIELD® ЗА ДОПОМОГОЮ КІНЕТИЧНОГО ТУРБІДИМЕТРИЧНОГО МЕТОДУ ЛАЛ-ТЕСТ

№ з/п	АФІ та ЛЗ	МО/мл	Вміст БЕ з використанням Glucashield®			Вміст БЕ без використання Glucashield®		
			МО/мл(мг)		%	МО/мл(мг)		%
			КСЕ*	зразок		зразок з КСЕ	зразок	
1	Інозин	0,090	0,203	0,321	87,879	1,203	2,588	48,159
2		0,040	0,521	0,513	110,148	1,521	3,782	40,647
3		0,128	0,569	0,654	108,175	0,929	1,999	49,653
4		0,200	0,412	0,481	146,619	0,999	2,465	44,106
5		0,126	0,399	0,427	132,558	1,399	2,983	48,967
6		0,111	0,284	0,399	98,611	2,284	4,981	46,899
7		0,128	0,111	0,312	60,326	1,111	2,481	47,216
8		0,125	0,521	0,700	90,609	1,521	3,281	48,194
9		0,124	0,569	0,684	101,607	1,569	3,381	48,173
10		0,125	0,764	0,854	104,801	0,764	1,681	49,100
1	Рибоксин, розчин для ін'єкцій 20 мг/мл	0,125	5,400	5,564	99,283	17,100	36,410	47,127
2		0,250	4,990	5,340	98,035	17,500	42,510	41,410
3		0,149	4,270	4,421	99,953	18,700	44,570	42,097
4		0,130	10,320	10,320	101,276	22,400	44,980	49,944
5		0,124	15,400	15,531	99,955	19,800	39,965	49,698
6		0,122	9,460	9,642	99,370	17,900	37,650	47,698
7		0,199	4,240	4,567	97,070	20,400	43,110	47,540
8		0,125	3,170	3,432	95,857	25,300	59,000	42,972
9		0,280	6,110	6,379	100,180	24,800	51,350	48,561
10		0,126	3,640	3,847	97,823	19,510	39,650	49,362

*Примітка: КСЕ – контрольного стандарту ендотоксину.

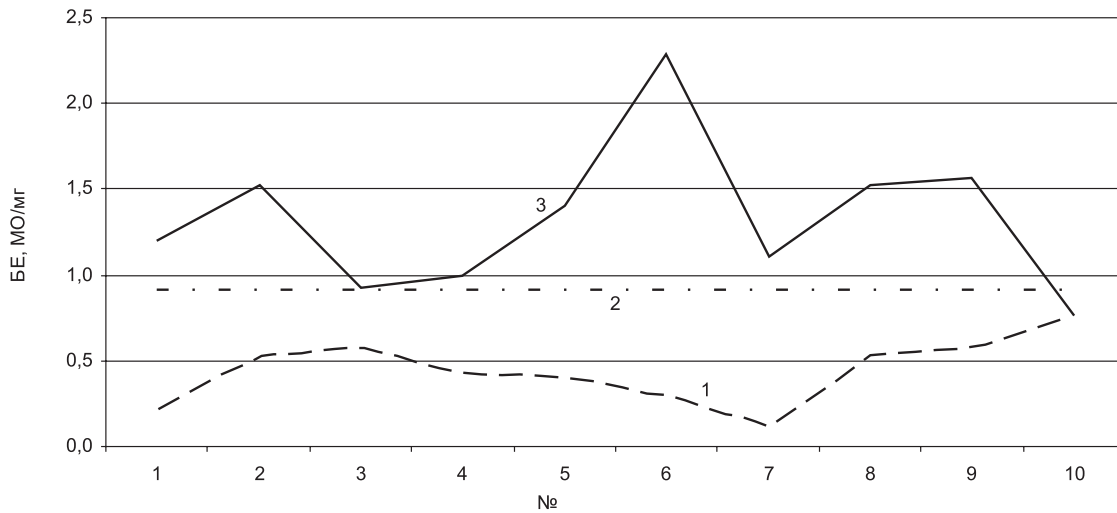


Рис. 3. Контроль АФІ Інозин: 1 – вміст БЕ з використанням буфера Glucashild®, 2 – ГВЕ згідно з НД, 3 – вміст БЕ без використання буфера Glucashild®.

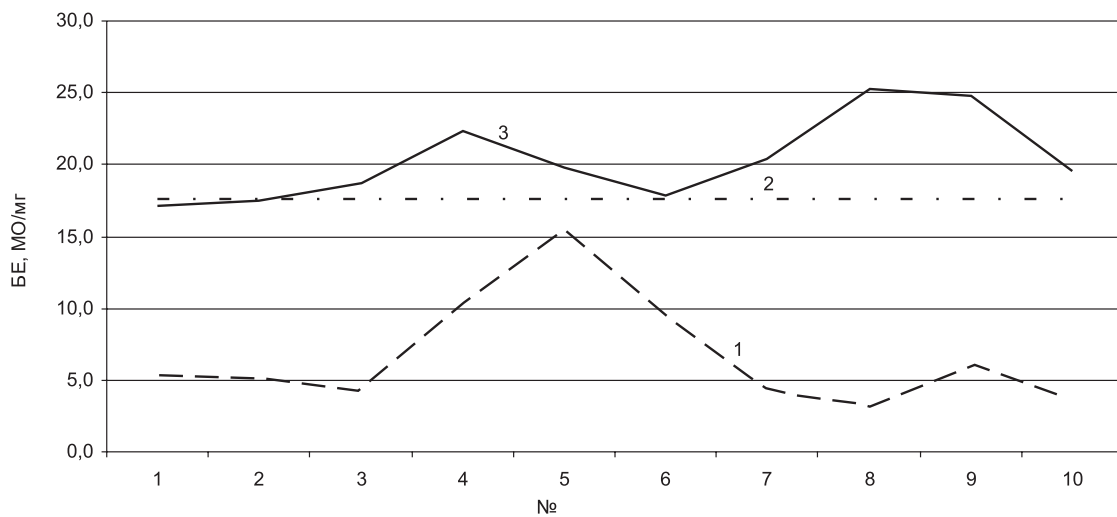


Рис. 4. Контроль ЛЗ Рибоксин, розчин для ін'єкцій 20 мг/мл: 1 – вміст БЕ з використанням буфера Glucashild®, 2 – ГВЕ згідно з НД, 3 – вміст БЕ без використання буфера Glucashild®.

рутинних випробувань. Щоб визначити, чи містять зразки (1→3)-β-D-глюкани, потрібно порівняти рівень ендотоксину, який вони мали у контролі з використанням буфера Glucashild® і без його використання. Якщо показники суттєво нижчі у зразках, які контролювались з використанням буфера Glucashild®, тоді, ймовірно, вони містять (1→3)-β-D-глюкани.

ВИСНОВКИ

1. Усі активні фармацевтичні інгредієнти та лікарські засоби для парентерального застосування при розробці, валідації та ревалідації методик з використанням ЛАЛ-тесту потрібно перевіряти на вміст (1→3)-β-D-глюканів.
2. Необхідно проводити при отриманні позитивних результатів для активних фармацевтичних інгредієнтів та лікарських засобів для парентерального застосування повторне випробування

на наявність заважаючих факторів, а саме (1→3)-β-D-глюканів. При підтвердженні наявності (1→3)-β-D-глюканів слід провести ревалідацію методики з використанням буфера, що їх зв'язує і попереджає активацію ЛАЛ-реакції.

3. Бактерійні ендотоксини та (1→3)-β-D-глюкани однаково поведуть себе при застосуванні різних варіантів фільтрації, і їх вміст у приготованих розчинах лікарських засобів для парентерального застосування знижується за допомогою певної послідовності використовуваних фільтрів.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Доп. 4. – X, 2008. – 620 с.

2. Інструкція до застосування буфера Glucashield® «Associates of Cape Cod Inc.» (США).
3. Калинюк Т. Г. Перспективи удосконалення біологічного контролю стерильних лікарських засобів для парентерального застосування / Т. Г. Калинюк, Н. В. Ділай // Науковий журн. «Клінічна фармація, фармакотерапія та медична стандартизація». – 2012. – № 1-2. – С. 102-107.
4. Коцюмбас І. Я. Проблема визначення ендотоксинів як основної причини пірогенності / [І. Я. Коцюмбас, Г. Ю.Тесляр, А. О. Костюк та ін.] // Ветеринарна медицина України. – 2001. – № 8. – С. 34-36.
5. Лукьянчук В. Д. Бета-глюканы как основа создания средств иммуномодулирующего действия / В. Д. Лукьянчук, Е. М. Мищенко, М. Н. Бабенко // Укр. мед. часопис. – 2011. – № 5. – С. 92-93.
6. Меркулова Ю. В. Современные подходы к испытанию «Бактериальные эндотоксины» / Ю. В. Меркулова // Матер. семинара. – К., 2014. – С. 65.
7. Федорцева В. Я. Влияние 1,3;1,6- β-D-глюкана и продуктов его ферментативной трансформации на формирование проростков гречихи *Fagopyrum esculentum* Monch / [В. Я. Федорцева, Е. Л. Чайкина, И. Ю. Бакунина и др.] // Химия растит. сырья. – 2009. – № 3. – С. 139-146
8. Dilai N. The problem of bacterial endotoxin determination in sterile herbal medicines / N. Dilai // II Międzynarodowa Konferencja Naukowo-Szkoleniowa [“Plant – the source of research material”]. – Poland, Lublin, 2012. – P. 198.
9. European Pharmacopoeia, 8-th ed. 2014. – 3656 p.
10. The United States Pharmacopoeia, 37-th ed., NF 32., 2014. – 5230 p.

УДК 615.076.9:57.021:57.021**Н. В. Дилай, Т. Г. Калинюк****(1→3)-β-D-ГЛЮКАНЫ – МЕШАЮЩИЙ ФАКТОР ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ЛАЛ-ТЕСТА**

Рассмотрена проблема содержания (1→3)-β-D-глюканов в стерильных лекарственных средствах для парентерального введения и их активных фармацевтических ингредиентов как мешающего фактора для проведения ЛАЛ-теста и способы ее устранения.

Ключевые слова: (1→3)-β-D-глюканы; бактериальные эндотоксины; пирогены; парентеральные лекарственные средства; активные фармацевтические ингредиенты; GMP

UDC 615.076.9:57.021:57.021**N. V. Dilay, T. G. Kalynyuk****(1→3)-β-D-GLUCANES – NEGATIVE FACTOR FOR LAL-TEST**

The problem of (1→3)-β-D-glucanes' content in sterile remedies for parenteral introduction and their active pharmaceutical ingredients as negative factor for LAL-test as well as methods of its neutralization has been shown.

Key words: (1→3)-β-D-glucanes; bacterial endotoxines; pyrogens; parenteral remedies; active pharmaceutical ingredients; GMP

Адреса для листування:
79010, м. Львів, вул. Пекарська, 69.
Львівський національний медичний університет
ім. Данила Галицького

Надійшла до редакції
15.12.2014 р.