



О.В. Шаповалова 
Н.П. Неугодова 
Г.А. Сапожникова 

Кинетические методы определения бактериальных эндотоксинов: особенности условий анализа на примере лекарственных препаратов разных классов

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

✉ Шаповалова Ольга Владимировна; shapovalova@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Кинетические методы определения бактериальных эндотоксинов (БЭ) в лекарственных препаратах для парентерального применения с помощью лизата амебоцитов из гемолимфы мечахвостов позволяют количественно определять содержание эндотоксинов в широком диапазоне концентраций. Для разработки конкретной методики на основе этих методов для контроля качества и стандартизации лекарственных препаратов необходимо уточнить условия ее использования, в частности установить наименьшее разведение, в котором отсутствуют мешающие факторы.

ЦЕЛЬ. Разработка методики количественного определения бактериальных эндотоксинов хромогенным кинетическим методом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Испытывали растворы образцов лекарственных препаратов с действующими веществами различных фармакологических групп: моноклональные антитела – «меполизумаб» и антикоагулянт прямого действия – «надропарин», с нормами предельного содержания БЭ «не более 20 ЕЭ/мл» и «не более 95 ЕЭ/мл» соответственно, с разной кратностью разведения, но не превышающей значения максимально допустимого разведения. Исследование выполняли с использованием фотокolorиметра «BioTek EL×800» и программного обеспечения «Endoscan-V».

РЕЗУЛЬТАТЫ. В исследовании препарата с действующим веществом «меполизумаб» установлено, что в диапазоне разведений от 1:10 до 1:40 хромогенным кинетическим методом возможно обнаружить БЭ в количествах 0,0078–0,224 ЕЭ/мл. Начиная с разведения 1:50 метод позволяет осуществить только качественную оценку наличия БЭ. Содержание БЭ в лекарственном препарате с действующим веществом «надропарин» следует определять начиная с разведения 1:1000, в котором влияние мешающих факторов отсутствует.

ВЫВОДЫ. Разработаны методики определения БЭ хромогенным кинетическим методом (метод D) для препаратов меполизумаба и надропарина. Рекомендовано при разработке методик количественного определения БЭ в индивидуальных лекарственных препаратах определять наименьшее разведение образца, в котором отсутствуют мешающие факторы, и вносить эту информацию в документацию методики. Данный подход повышает точность выполнения анализа, обеспечивает экономию материальных ресурсов и времени при проведении рутинных испытаний.

Ключевые слова: бактериальные эндотоксины; лизат амебоцитов; фотометрический метод; кинетический метод; хромогенный метод; мешающие факторы; пирогенные примеси; ЛАЛ-тест

Для цитирования: Шаповалова О.В., Неугодова Н.П., Сапожникова Г.А. Кинетические методы определения бактериальных эндотоксинов: особенности условий анализа на примере лекарственных препаратов разных классов. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2024;14(5):547–552. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-5-547-552>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00026-24-01 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 124022200096-0).

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Olga V. Shapovalova 
Natalia P. Neugodova 
Galina A. Sapozhnikova 

Kinetic Bacterial Endotoxin Testing Methods: Specifics of Analytical Conditions Exemplified by Medicinal Products from Different Classes

*Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation*

✉ **Olga V. Shapovalova;** shapovalova@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Kinetic bacterial endotoxin (BE) testing methods based on amoebocyte lysate from the haemolymph of the horseshoe crab can quantify BEs in parenteral medicinal products across a broad range of concentrations. To develop a specific analytical procedure that is based on these methods and can be implemented into pharmaceutical quality control and standardisation, it is required to ascertain the conditions for its use, in particular, to determine the lowest product dilution that would neutralise interfering factors.

AIM. This study aimed to develop an analytical procedure for the quantitative determination of BEs by the kinetic chromogenic method.

MATERIALS AND METHODS. The study examined samples of medicinal products containing active substances from different classes, including a monoclonal antibody (mepolizumab) and a direct-acting anticoagulant (nadroparin). The BE limits for mepolizumab and nadroparin were ≤ 20 EU/mL and ≤ 95 EU/mL, respectively. The samples were tested at different dilutions, which did not exceed the maximum valid dilution. The measurements were performed using a BioTek ELx800 photocolourimeter and EndoScan-V software.

RESULTS. The results for mepolizumab samples show that the kinetic chromogenic method can quantify BEs in mepolizumab medicinal products in the dilution range of 1:10 to 1:40. The study detected BEs in quantities of 0.0078–0.224 EU/mL within this dilution range. However, at a dilution ratio of 1:50 or higher, the method is suitable only for qualitative BE tests. For nadroparin medicinal products, the quantitative determination of BEs should start at a dilution of 1:1000 (the study demonstrated no influence of interfering factors at this dilution).

CONCLUSIONS. The authors developed analytical procedures for the determination of BEs in mepolizumab and nadroparin medicinal products by the kinetic chromogenic method (method D). When developing analytical procedures for the quantification of BEs in individual medicinal products, the developer should determine the lowest sample dilution that would neutralise interfering factors. Subsequently, the dilution should be specified in the documentation for the analytical procedure. This approach can enhance assay accuracy and save time and resources in routine testing.

Keywords: bacterial endotoxins; *Limulus* amoebocyte lysate; photometric method; kinetic method; chromogenic method; interfering factors; pyrogens; LAL test

For citation: Shapovalova O.V., Neugodova N.P., Sapozhnikova G.A. Kinetic bacterial endotoxin testing methods: specifics of analytical conditions exemplified by medicinal products from different classes. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2024;14(5):547–552. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-5-547-552>

Funding. This study was conducted by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products as part of the applied research funded under State Assignment No. 056-00026-24-01 (R&D Registry No. 124022200096-0).

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Инструментальные методы определения бактериальных эндотоксинов (БЭ) в России начали активно использовать с момента утверждения ОФС 1.2.4.0006.15 «Бактериальные эндотоксины» Государственной фармакопеи Российской Федерации XIII изд. (далее – ОФС 1.2.4.0006.15)¹, в которой описаны фотометрические методы определения БЭ, применяемые в мире на тот момент [1]. Эти методы основаны на регистрации оптической плотности смеси реактива с испытуемым образцом при определенной длине волны на протяжении времени реакции (кинетические методы) или по окончании инкубации реакционной смеси при 37 °С (методы по конечной точке). Кинетические методы характеризуются более простыми условиями выполнения испытаний. Выбор в пользу кинетических методов основывается на следующих факторах: количественное определение БЭ; высокая чувствительность; возможность автоматизации эксперимента за счет использования соответствующего оборудования; минимизация ошибок, связанных с субъективной оценкой результатов оператором; возможность архивирования и хранения данных; возможность одновременного анализа нескольких образцов. Высокая чувствительность и специфичность инструментальных методов позволяет оценивать растворы лекарственных препаратов, устраняя влияние мешающих факторов за счет увеличения разведения [2].

Концентрация БЭ может определяться кинетическими методами путем сравнения продолжительности протекания реакции реактива с растворами лекарственного препарата и контрольным стандартом эндотоксина (КСЭ) по стандартной кривой зависимости содержания БЭ от времени реакции, построенной в соответствующем диапазоне концентраций растворов КСЭ [3]. Требования к критериям стандартной кривой регламентированы ОФС 1.2.4.0006.15: значение коэффициента корреляции $|r| \geq 0,98$.

Вторым фармакопейным критерием испытания для положительного контроля образца является соответствие полученного результата («степень извлечения или восстановления БЭ», «открываемость эндотоксина»², «PPC (product positive control)», «Spike Recovery (SR%)») установленному диапазону 50–200%. Положительный

контроль образца готовят либо в пробирках, либо непосредственно в лунках микропланшета: к испытуемому раствору добавляют заданное количество эндотоксина, используя раствор КСЭ, и выполняют анализ параллельно с испытуемым раствором [2]. При этом важно учитывать изменение концентраций эндотоксина и образца при их смешивании. Затем с учетом трех значений (теоретическое или номинальное значение концентрации КСЭ в образце, обнаруженное количество БЭ в растворах образца и положительного контроля образца) с помощью специальной программы рассчитывается величина, которая должна укладываться в диапазон 50–200% [4]. Очевидно, что выполнение данного критерия аналогично требованиям, предъявляемым к результатам геля-тромб теста, где допускается двукратное отличие найденной величины чувствительности реактива лизата амебоцитов от заявленной. В целом, такой подход учитывает возможность инструментальной ошибки анализа, например при изменении техники дозирования, неравномерном нагреве микропланшета, момента добавления реактива, при наличии других мешающих факторов лекарственного препарата и пр.³

Общие правила выполнения методик кинетическими методами приведены в ОФС 1.2.4.0006.15. При описании схемы испытаний в фармакопейной статье намеренно исключены детали, которые могли бы препятствовать внедрению новых подходов и усложнять выполнение анализа с использованием кинетических методов. Например, статья не определяет, какую лабораторную посуду и материалы лучше использовать (стекло или пластик); точное число растворов КСЭ с разными концентрациями для построения стандартной кривой; используемый прибор; параметры измерения оптической плотности (диапазон заданных уровней оптической плотности, длина волны, временной интервал между считываниями и т.д.). Таким образом, для испытания любого индивидуального лекарственного препарата методика определения БЭ может быть модифицирована в части условий, не установленных в ОФС 1.2.4.0006.15, в том числе могут быть свободно выбраны тип кинетического метода; набор реактивов с определенной чувствительностью; прибор для измерения; программное обеспечение.

¹ ЛАЛ-тест. Специальный номер. Август 2002. Центр по биотехнологии, медицине и фармации. 2002.

² 2.1.6.21 Применение испытания на бактериальные эндотоксины. Фармакопея Евразийского экономического союза. Т. 1, ч. 3. 2020.

³ McCullough KZ. Variability in the Bacterial Endotoxins Test.

Cornelis P, Pett N, Spackman E. What is a PPC? What is inhibition and enhancement? 2024. <https://www.nelsonlabs.com/what-is-a-ppc-what-is-inhibition-and-enhancement>

Выделяют два типа кинетических методов: турбидиметрический (метод С) и хромогенный (метод D). Процедура подготовки испытуемых растворов идентична, а принципы взаимодействия реактива с БЭ различны. При работе по методу С результаты оцениваются по степени изменения мутности реакционной смеси, по методу D – по окрашиванию реакционной смеси в желтый цвет за счет высвобождения хромофора – пара-нитроанилина⁴.

Для проведения анализа используется набор реактивов: лизат амебоцитов, который имеет определенный состав в зависимости от выбранного метода; КСЭ; вода для определения БЭ (вода для БЭТ) и (или) буфер для разведения реактива. Набор реактивов сопровождается сертификатом, где приводится информация о чувствительности реактива и активности КСЭ. В инструкции к каждому набору даны индивидуальные рекомендации по работе с реактивами (диапазон концентраций растворов КСЭ, условия приготовления и хранения восстановленных реактивов). Также приводятся параметры инструментальной регистрации результатов, зависящие от используемого типа прибора (микропланшетного фотоколориметра или оптического ридера для пробирок) и набора реактивов [5]. Обработка результатов анализа кинетическими методами выполняется с применением специально разработанного программного обеспечения. В программах расчета учитываются требования ведущих мировых фармакопей к фотометрическим анализам, специфика используемых реактивов.

Кинетические методы можно использовать для качественного и количественного анализа. В первом случае испытание выполняют в максимально допустимом разведении (МДР) или МДР/2. Такой подход позволяет установить, соответствует ли содержание БЭ установленному значению предельного содержания БЭ или нет. Если инструментальные методы используются для обнаружения фактического содержания БЭ, то для конкретного лекарственного препарата необходимо дополнительно привести указание о наименьшем разведении, в котором отсутствуют мешающие факторы⁵. Условия методик, применяемые при анализе каждого препарата, уникальны; в частности, различаются используемые разведения, что требует разработки или модификации методики определения содержания БЭ в каждом индивидуальном препарате.

Цель работы – разработка методики количественного определения БЭ кинетическим хромогенным методом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов экспериментальной работы были выбраны два инъекционных препарата с действующими веществами различных фармакологических групп: моноклональные антитела – «меполизумаб» (образец № 1) и антикоагулянт прямого действия – «надропарин» (образец № 2) с нормами предельного содержания БЭ «не более 20 ЕЭ/мл» и «не более 95 ЕЭ/мл» соответственно.

Испытания выполняли с помощью наборов реактивов для хромогенного кинетического метода производства компании Associates of Care Cod, в состав которых входили: реактив лизата амебоцитов с чувствительностью 0,005 ЕЭ/мл, КСЭ, вода для БЭТ. В исследовании использовали фотоколориметр для микропланшет «BioTek ELx800» со специальным программным обеспечением «Endoscan-V». Для построения стандартной кривой готовили растворы из КСЭ с концентрациями 5,0; 0,5; 0,05; 0,005 ЕЭ/мл. Положительный контроль образца готовили с концентрацией эндотоксина 0,5 ЕЭ/мл. Для разведения образцов использовали воду для БЭТ.

Испытывали растворы образцов лекарственных препаратов с разной кратностью разведения, но не превышающей значения МДР (для образца № 1 МДР = 1:4000; для образца № 2 МДР = 1:19000). В процессе исследований фиксировали содержание БЭ в образцах в виде точного числового значения или в виде приблизительного (со знаком сравнения «<»). Результаты считали достоверными при соблюдении следующих условий⁶:

- 1) коэффициент корреляции стандартной калибровочной кривой составляет 0,988–0,999 (при норме $\geq 0,980$);
- 2) концентрация эндотоксина в положительном контроле образца составляет 50–200% от номинальной величины⁷;
- 3) результат, полученный для воды БЭТ (отрицательный контроль), не превышает значения наименьшей концентрации эндотоксина на калибровочной стандартной кривой.

⁴ LAL/TAL Endotoxin Detection Test Methods. <https://horseshoecrab.org/horseshoe-crabs-bacterial-endotoxin-test-methods/>

⁵ Guidance for industry. Pyrogen and endotoxins testing: questions and answers. FDA; 2012.

Monograph (1085) Guidelines on the endotoxins. Test 85. United States Pharmacopeia. 43rd ed. 2019.

⁶ ОФС.1.2.4.0006.15 Бактериальные эндотоксины. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. I. М.; 2018. Исрафилов АГ, Тутнова АД. Некоторые преимущества кинетических методов контроля бактериальных эндотоксинов над гелем-тромб-тестом.

⁷ Charles River Endoscan IV Manual.

Таблица 1. Результаты определения бактериальных эндотоксинов в образцах меполизумаба и надропарина

Table 1. Results of bacterial endotoxin determination in samples of mepolizumab and nadroparin

Кратность разведения <i>Dilution factor</i>	Содержание эндотоксинов, ЕЭ/мл <i>Endotoxin content, EU/mL</i>	Степень извлечения, % <i>Spike recovery, %</i>
Меполизумаб <i>Mepolizumab</i>		
4000	<20,0	116
2000	<10,0	105
50	<0,250	114
40	0,224	102
30	0,129	100
10	0,078	76
1	<0,01	19
Надропарин <i>Nadroparin</i>		
4000	<20	123–167
2000	<10	104–118
1000	<5	61–80
800	<4	38–43
400	<2	24–31

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В исследовании использовали хромогенный кинетический метод как наиболее высокочувствительный с пределом обнаружения до 0,005 ЕЭ/мл. Кроме того, в испытаниях препарата с действующим веществом надропарин использование данного метода предпочтительнее – данный препарат обладает прямым антикоагулянтным действием, нарушающим механизм свертывания реакционной смеси, на котором основан турбидиметрический метод [6].

Образцы препаратов в неразведенном виде обладали ингибирующим действием в реакции взаимодействия лизата амебоцитов с эндотоксином, поэтому выполняли испытания образцов в разных разведениях и устанавливали индивидуальное наименьшее разведение, при котором отсутствуют мешающие факторы.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Шаповалова ОВ, Неугодова НП, Рябцева МС, Агаширнинова АА, Гунар ОВ. Альтернативные биологические методы оценки качества лекарственных средств. *Фармация*. 2017;66(2):7–10.

Согласно результатам анализов образца меполизумаба в разведениях от 1:10 до 1:40 обнаружена примесь БЭ в количестве 0,0078–0,224 ЕЭ/мл (табл. 1), тогда как в МДР (1:4000) и МДР/2 (1:2000) фиксировали значение «менее 20 ЕЭ/мл» и «менее 10 ЕЭ/мл». Соответственно, анализ образца в наибольшем разведении выполняется как качественный анализ содержания БЭ.

Первое испытание с образцом надропарина выполняли в разведении 1:4000, затем кратность разведения уменьшали в 2–4 раза. Начиная с разведения 1:1000 влияния мешающих факторов не обнаружено, так как степень извлечения БЭ в положительном контроле образца соответствует установленному диапазону 50–200% (табл. 1). При использовании данного разведения в рутинных анализах будет соблюдаться экономия растворителя (воды для БЭТ) и расходных материалов, а также время приготовления испытуемых разведений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате выполненных исследований разработаны методики определения БЭ хромогенным кинетическим методом в препаратах меполизумаба и надропарина, установлены их наименьшие разведения, начиная с которых не наблюдалось ингибирующего или усиливающего действия в реакциях взаимодействия лизата амебоцитов с эндотоксином. Количественное определение содержания БЭ в препарате меполизумаба может быть выполнено в разведении 1:10. Анализ препарата в разведении более чем в 50 раз позволяет осуществить только качественную оценку наличия БЭ. Содержание БЭ в лекарственном препарате «надропарин» возможно определить начиная с разведения 1:1000.

При разработке методик количественного определения БЭ с использованием кинетических методов необходимо определять наименьшее разведение образца, в котором отсутствуют мешающие факторы, и в дальнейшем вносить эту информацию в документацию методики. Данный подход повышает точность выполнения анализа, обеспечивает экономию материальных ресурсов и времени при проведении рутинных испытаний.

- Shapovalova OV, Neugodova NP, Ryabtseva MS, Agashirniнова AA, Gunar OV. Alternative biological methods for assessing the quality of medicines. *Pharmacy*. 2017;66(2):7–10 (In Russ.). EDN: [YGEWSJ](#)

2. Bonilla JV, Srivatsa GS, eds. *Handbook of analysis of oligonucleotides and related products*. Boca Raton: CRC Press; 2011. P. 325–8.
<https://doi.org/10.1201/b10714>
3. Rosamund MB, Norman AH, Stephen PD, eds. *Handbook of microbiological quality control in pharmaceuticals and medical devices*. London: CRC Press; 2000. P. 151–64.
<https://doi.org/10.1201/9780203305195>
4. Методы определения бактериального эндотоксина в медицине критических состояний (обзор). *Общая реаниматология*. 2017;13(5):109–20.
Kopitsyna MN, Morozov AS, Bessonov IV, Pisarev VM. Methods for determining bacterial endotoxin in critical care medicine (review). *General Reanimatology*. 2017;13(5):109–20 (In Russ.).
<https://doi.org/10.15360/1813-9779-2017-5-109-120>
5. Шаповалова ОВ, Тутнова АД, Неугодова НП, Сапожникова ГА. Обзор современного рынка реактивов для обнаружения бактериальных эндотоксинов в лекарственных средствах. *Химико-фармацевтический журнал*. 2024;58(2):51–5.
<https://doi.org/10.30906/0023-1134-2024-58-2-51-55>
Shapovalova OV, Tutnova AD, Neugodova NP, Sapozhnikova GA. Review of the modern market of reagents for the detection of bacterial endotoxins in drugs. *Pharm Chem J*. 2024;58(2):327–31.
<https://doi.org/10.1007/s11094-024-03149-3>
6. Solaimanian R, Mahboubi A, Sadjady SK, Naghdi N. Evaluation of the suitability of kinetic chromogenic LAL assay for determination of endotoxin levels in heparin sodium injection. *Trends Pept Protein Sci*. 2017;1(2):73–82.
<https://doi.org/10.22037/tpps.v1i2.15308>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Вклад авторов распределен следующим образом: *О.В. Шаповалова* – планирование исследования, сбор данных литературы, написание текста рукописи; *Н.П. Неугодова* – обоснование концепции исследования, критический пересмотр текста рукописи и утверждение окончательного варианта статьи для публикации; *Г.А. Сапожникова* – получение первичных данных, их анализ и систематизация.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. *Olga V. Shapovalova* planned the study, collected literature data, and drafted the manuscript. *Natalia P. Neugodova* substantiated the study concept, critically revised the manuscript, and approved the final version of the manuscript for publication. *Galina A. Sapozhnikova* obtained, analysed, and systemised primary data.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Шаповалова Ольга Владимировна, канд. фарм. наук / **Olga V. Shapovalova**, Cand. Sci. (Pharm.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0305-7769>

Неугодова Наталия Петровна, канд. биол. наук / **Natalia P. Neugodova**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8615-952X>

Сапожникова Галина Алексеевна / **Galina A. Sapozhnikova**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0379-5980>

Поступила 22.08.2024

После доработки 16.09.2024

Принята к публикации 21.10.2024

Received 22 August 2024

Revised 16 September 2024

Accepted 21 October 2024