

DOI: 10.30906/0023-1134-2020-54-5-58-61  
© Коллектив авторов, 2020

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

## ОСОБЕННОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭНДОТОКСИНОВ В МАСЛЯНЫХ РАСТВОРАХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

ФГБУ “Научный центр экспертизы средств медицинского применения” Министерства здравоохранения РФ, Россия, 127051, Москва, Петровский б-р, д. 8, стр. 2.

Рассмотрены вопросы, связанные с достоверной оценкой качества масляных растворов лекарственных средств по показателю “Бактериальные эндотоксины”. Максимальному извлечению бактериальных эндотоксинов в жирорастворимых лекарственных средствах способствует интенсивное смешивание предварительно нагретых до 60 °С образцов с водой и последующее разделение 2 фаз с помощью центрифугирования при 2300 об/мин в течение 10 мин.

**Ключевые слова:** бактериальные эндотоксины; экстракция; масляные растворы; диспергирующий растворитель.

Для производства инъекционных лекарственных форм, кроме воды для инъекций, используют неводные растворители, что позволяет получать растворы из нерастворимых или трудно растворимых в воде веществ, а также лекарственные формы пролонгированного действия [1]. Согласно требованиям ОФС.1.4.1.0007.15 “Лекарственные формы для парентерального применения” в качестве неводных растворителей используются жирные растительные масла, которые являются безвредными и фармакологически индифферентными [2, 3].

Номенклатура масляных растворов для инъекций представлена достаточно широким перечнем препаратов. Это в первую очередь гормональные препараты и их аналоги, а также анаболические стероиды. Инъекционные лекарственные формы на масляной основе широко используются в психиатрии для получения длительно действующих препаратов. В ветеринарии часто применяют подкожное или внутримышечное введение масляных растворов витаминных препаратов [1].

Согласно современным фармакопейным требованиям, лекарственные формы для парентерального применения, а также фармацевтические субстанции, используемые для их приготовления, подвергают испытанию на наличие бактериальных эндотоксинов (БЭ) или пирогенов в соответствии с требованиями ОФС.1.4.1.0007.15 “Лекарственные формы для парентерального применения”, ОФС.1.2.4.0006.15 “Бактериальные эндотоксины” или ОФС.1.2.4.0005.15 “Пирогенность”. Оценка наличия пирогенных примесей в инъекционных масляных растворах является сложной задачей. Так при испытании на пирогенность, учитывая, что масляные растворы нельзя вводить внутривенно, требуется внутримышечное введение испытуемых препаратов животным и измерение температуры тела в течение 5 ч [1, 2, 4, 5].

Определение содержания БЭ с помощью ЛАЛ (или ТАЛ) теста в неводных растворах также сопряжено со значительными трудностями. Это обусловлено особенностями поведения пирогенных примесей в масляных растворах при смешивании их с водой и поэтому требует наличия специальных приемов пробоподготовки [4].

Самый простой способ подготовки и анализа образцов жирорастворимых лекарственных средств (ЖЛС) – это определение БЭ в воде для БЭТ (вода для испытаний на бактериальные эндотоксины), после смешивания её с ЖЛС. Содержание БЭ оценивают в водной среде после расслаивания с учётом нормы “не более 0,25 ЕЭ/мл”, что соответствует требованиям ФС.2.2.0019.18 “Вода для инъекций” [2]. Такой подход согласовывается с требованиями статьи Фармакопеи США “Medical devices – bacterial endotoxin and pyrogen tests <161>”, где содержание БЭ оценивают в водных смывах с изделий медицинского назначения, и поэтому это исследование можно рассматривать как методику анализа для нерастворимых в воде масляных средств [6, 7].

Другой наиболее распространённый подход к оценке наличия БЭ заключается не только в интенсивном смешивании ЖЛС с водой, но и в дальнейшем разделении 2 фаз с помощью центрифугирования, как правило, при 2300 об/мин в течение 10 мин. В этом случае анализируют водную среду в установленном разведении, не превышающем максимально допустимое разведение с учётом нормы для ЖЛС [8 – 10].

Утверждают, что для экстракции БЭ из ЖЛС одной воды для БЭТ недостаточно, так как эндотоксины могут оставаться связанными с маслами. Так как БЭ по своей химической природе являются липополисахаридами и обладают выраженными липидными свойствами, поэтому их сложно перевести в водную среду из водно-масляных эмульсий. Для повышения степени извлечения БЭ из масла рекомендуют использовать диспергирующий агент, позволяющий повысить переход БЭ в водную среду [11, 12].

При определении БЭ нередко прибегают к растворению ЖЛС в органических спиртах, как правило, в этиловом или метиловом спирте. В дальнейшем анализ выполняют, используя в качестве разбавителя воду для БЭТ. Данный путь пробоподготовки повышает вероятность, перехода БЭ из масляной среды в водную [13].

Целью работы являлся выбор простой и надёжной методики пробоподготовки масляных растворов для опре-

Well Layout	Reaction Time	Mean Reaction Time	Endotoxin Value	Mean Endotoxin Value	(RT) CV%
B5	1310,8	1285,4	0,2395 EU/mL	0,2604 EU/mL	1,97
B6	1260,0		0,2836		
<b>Criteria Computations:</b>					
Name:	SPL4				
Condition:	CV(SPL4.RTIME) < 20%				
Status:	PASS				

Рис. 1. Результаты определения БЭ в водной среде из смеси “масло – вода для БЭТ”.

деления истинного содержания БЭ с помощью ЛАЛ-теста без использования органических растворителей. Для этого необходимо провести сравнительный анализ методики пробоподготовки ЖЛС и подтвердить полученные результаты в модельных опытах.

### Экспериментальная часть

В качестве объектов экспериментальной работы были выбраны лекарственный препарат – раствор для внутримышечных инъекций, в состав которого входит жирорастворимое вещество фулвестрант, растворённое в касторовом масле, и стерильное касторовое масло в качестве растворителя.

С помощью гель-тромб теста исследовали процессы экстракции БЭ из масляной дисперсионной фазы в водную среду: для этого проводили “модельный” опыт. В качестве модели оценивали переход контрольного стандарта эндотоксина (КСЭ), растворённого в касторовом масле, в водную дисперсионную среду. Во флакон, содержащий 5000 ЕЭ, добавляли 5 мл стерильного касторового масла, нагревали на водяной бане до температуры 60 °С и встряхивали в течение 30 с. Выполняли процесс экстракции БЭ из масла. Для этого смешивали в равных количествах раствор КСЭ на касторовом масле с водой для БЭТ и встряхивали на вихревой мешалке в течение 5 мин. Раствор для последующего анализа получали 2 способами: 1) после естественного расслаивания водно-масляной эмульсии отбирали водную среду; 2) выполняли разделение эмульсии с помощью центрифугирования в течение 10 мин при 2300 об/мин и затем отбирали водную среду.

Оценивали водную среду на содержание БЭ в количестве 1000 ЕЭ/мл согласно схеме, приведенной в ОФС “Бактериальные эндотоксины”, подраздел “Подтверждение заявленной чувствительности лизата амёбоцитов” [2]. Параллельно проводили контрольный опыт с исходным раствором КСЭ, растворённым в воде для БЭТ в такой же концентрации – 1000 ЕЭ/мл. Для этого готовили растворы КСЭ в воде для БЭТ в соответствии с табл. 1 и оценивали содержание БЭ в растворах 4 – 7 лизатом амёбоцитов с чувствительностью  $\lambda = 0,03$  ЕЭ/мл.

Дополнительно выполняли анализ хромогенным кинетическим тестом с использованием металлосодержащего полианионного диспергента Pyrogense (Lonza, США). Диспергент предварительно разводили в 1/50 водой для БЭТ согласно инструкции производителя реактива. Для экстракции БЭ из КСЭ в касторовом масле использовали раствор диспергента вместо воды для БЭТ для получения смеси “масло – раствор диспергента”. Для этого смешивали в равных количествах раствор КСЭ на касторовом масле с раствором диспергента и встряхивали на вихревой мешалке в течение 5 мин. Затем отбирали водную среду и выполняли разведения согласно табл. 1.

Воспроизводимость методики определения БЭ в препарате, содержащем фулвестрант, оценивали хромогенным кинетическим методом в разведении 1/200. Соответствие нормы предельного содержания БЭ – “не более 35 ЕЭ/мл” подтверждали с помощью калибровочной кривой для растворов КСЭ с концентрациями 5; 0,5; 0,05 и 0,005 ЕЭ/мл. Положительный контроль испытуемого ЖЛС готовили с концентрацией эндотоксина 0,5 ЕЭ/мл, используя КСЭ, растворённый в касторовом масле (табл. 2).

Таблица 1

#### Приготовление серий разведений раствора контрольного стандарта эндотоксина

Раствор	Соотношение объемов	Теоретическая концентрация БЭ, ЕЭ/мл
1	0,1 мл КСЭ 1000 ЕЭ/мл + 0,9 мл воды для БЭТ	100
2	0,1 мл раствора 1 + 0,9 мл воды для БЭТ	10
3	0,1 мл раствора 2 + 1,5 мл воды для БЭТ	0,6
4	0,1 мл раствора 3 + 0,9 мл воды для БЭТ	0,06
5	0,5 мл раствора 4 + 0,5 мл воды для БЭТ	0,03
6	0,5 мл раствора 5 + 0,5 мл воды для БЭТ	0,015
7	0,5 мл раствора 6 + 0,5 мл воды для БЭТ	0,0075

Таблица 2

#### Приготовление растворов положительного контроля фулвестранта с концентрацией эндотоксина 0,5 ЕЭ/мл

Раствор	Соотношение объемов	Кратность разведения препарата	Концентрация КСЭ, ЕЭ/мл
1	0,45 мл раствора препарата + 0,05 мл КСЭ (1000 ЕЭ/мл)	-	100
2	1 мл раствора 1 + 1 мл воды для БЭТ перемешивание	-	100
3	0,1 мл водной среды раствора 2 + 1,9 мл воды для БЭТ	1:20	5
4	0,1 мл раствора 3 + 0,9 мл воды для БЭТ	1:200	0,5

Well Layout	Reaction Time	Mean Reaction Time	Endotoxin Value	Mean Endotoxin Value	(RT) CV%
C5	1306,4	1310,7	0,2429 EU/mL	0,2395 EU/mL	0,33
C6	1315,0		0,2362		

**Criteria Computations:**  
Name: SPL5  
Condition: CV(SPL5.RTIME) < 20%  
Status: PASS

Рис. 2. Результаты определения БЭ в водной среде из смеси “масло – раствор диспергента”.

Well Layout	Reaction Time	Mean Reaction Time	Endotoxin Value	Mean Endotoxin Value	(RT) CV%
H3	>3330,0	>3330,0	<1,0000 EU/mL	<1,0000 EU/mL	> 0,00
H4	>3330,0		<1,0000		

**Criteria Computations:**  
Name: SPL3  
Condition: CV(SPL3.RTIME) < 20%  
Status: PASS

**Spike Identifier:** SPK3  
**Theoretical Spike Value:** 0,5  
**Spike Recovery:** 50 <= SPK3.RY <= 200 : PASS

Well Layout	Reaction Time	Mean Reaction Time	Endotoxin Value	Mean Endotoxin Value	(RT) CV%	Spike Recovery %
A5	1285,4	1255,2	0,2604 EU/mL	0,2882 EU/mL	2,41	57
A6	1225,0		0,3199			

Рис. 3. Результаты определения бактериальных эндотоксинов в препарате фулвестранта.

### Результаты и их обсуждение

Заявленная чувствительность лизата амёбоцитов ( $\lambda = 0,03$  ЕЭ/мл) подтверждена в результате выполнения гель-тромб теста с КСЭ, растворённым в воде для БЭТ и касторовом масле (табл. 3, 4).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что БЭ из касторового масла возможно перевести в водную среду при следующих условиях: нагревание до 60 °С и интенсивное перемешивание при 2300 об./мин в течение 10 мин.

Также следует отметить, что разделение водной и масляной фаз центрифугированием (2300 об./мин в течение 10 мин) является более эффективным способом извлече-

ния БЭ из масла, по сравнению с расслаиванием в естественных условиях. Данный вывод сделан на основании полученных результатов (табл. 4). Подтверждённая чувствительность лизата амёбоцитов с растворами водной среды, полученной после разделения эмульсии центрифугированием, отличалась в 1,3 раза от заявленного зна-

Таблица 4  
Результаты определения заявленной чувствительности лизата амёбоцитов с помощью раствора КСЭ в касторовом масле (анализ водной среды)

Повторность	Концентрация БЭ в конечной точке реакции, ЕЭ/мл	Логарифм (lg) концентрации БЭ	Среднее геометрическое значение концентрации БЭ, чувствительность, $\lambda$
<b>Водная среда после естественного отстаивания водно-масляной смеси</b>			
1	0,06	-1,22	0,06 (2 $\lambda$ )
2	0,06	-1,22	
3	0,06	-1,22	
4	0,06	-1,22	
<b>Водная среда после разделения с помощью центрифугирования (2300 об/мин, 10 мин)</b>			
1	0,03	-1,52	0,04 (1,3 $\lambda$ )
2	0,03	-1,52	
3	0,06	-1,22	
4	0,06	-1,22	

Таблица 3  
Результаты определения заявленной чувствительности лизата амёбоцитов с помощью раствора КСЭ в воде для БЭТ

Повторность	Концентрация БЭ в конечной точке реакции, ЕЭ/мл	Логарифм (lg) концентрации БЭ	Среднее геометрическое значение концентрации БЭ, чувствительность, $\lambda$
1	0,03	-1,52	0,03 ( $\lambda$ )
2	0,03	-1,52	
3	0,03	-1,52	
4	0,03	-1,52	

чения чувствительности реактива, а в случае естественного расслаивания – в 2 раза и составляла соответственно 0,06 ЕЭ/мл (2 λ).

На основании полученных данных для следующих экспериментов применяли разделение водно-масляной эмульсии с помощью центрифугирования.

Результаты экстракции БЭ из смеси “масло – раствор диспергента” с помощью инструментального метода на примере раствора 3, получение которого представлено в табл. 1 (0,1 мл раствора 2 + 1,5 мл воды для БЭТ), позволяют предположить, что добавление диспергента не влияет на степень извлечения БЭ из касторового масла. Это подтверждено в сравнительном испытании, где полученные результаты содержания БЭ в смеси “масло – вода для БЭТ” и “масло – раствор диспергента” составили 0,26 и 0,24 ЕЭ/мл, соответственно (рис. 1, 2).

Результаты оценки положительного контроля испытуемых образцов фулвестранта хромогенным кинетическим методом в условиях экстракции БЭ водой для БЭТ свидетельствуют о пригодности методики определения БЭ в образцах фулвестранта. Правильность извлечения содержания БЭ равнялась 57 % и соответствуют критериям приемлемости программного обеспечения, то есть находятся в диапазоне от 50 до 200 % от номинального значения. Истинная концентрация БЭ в растворе препарата составила менее 1 ЕЭ/мл (рис. 3).

В ходе анализа нормативной документации на все масляные растворы для инъекций установлено, что 12 % нуждаются в уточнении условий пробоподготовки. В остальных случаях приведено описание процедуры приготовления испытуемого раствора. В органических растворителях, таких как метанол, этанол, бензилбензоат, ацетонитрил растворяют ЖЛС в 25 % случаев.

Наиболее распространенные методики пробоподготовки ЖЛС – это получение водно-масляной смеси и последующий анализ водной среды (рис. 4).

Проведенные исследования подтвердили необходимость разработки процедуры пробоподготовки ЖЛС, гарантирующей наибольшую степень извлечения БЭ в водную среду, для её дальнейшей оценки на наличие пирогенных примесей.

Установлено, что для оптимального перехода БЭ в водную среду обязательно нагревание масла и водно-масляной эмульсии до 60 °С с последующим тщательным перемешиванием. Расслаивание эмульсии и в естественной среде, и с помощью центрифугирования позволяет получить результаты, соответствующие требованиям ОФС. Однако наилучшие результаты, подтверждающие переход максимального содержания эндотоксинов в водную среду, отмечены после разделения 2 фаз с помощью центрифугирования при 2300 об/мин, в течение

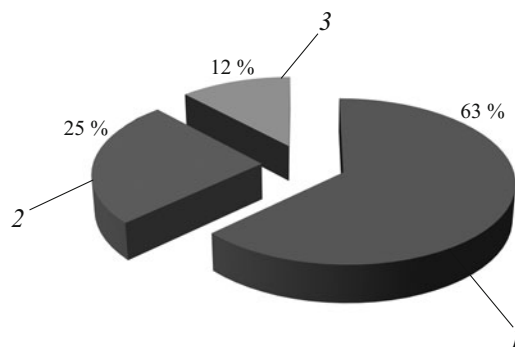


Рис. 4. Анализ методик пробоподготовки масляных инъекционных препаратов: 1 – экстракция в воду; 2 – растворение в органических растворителях; 3 – методика отсутствует.

10 мин. Поэтому данный способ получения анализируемой водной среды рекомендован как наиболее эффективный.

В исследованиях хромогенным кинетическим методом использование диспергирующего растворителя не способствовало повышению извлечения БЭ из касторового масла.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ “НЦЭСМП” Минздрава России № 056-00154-19-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590049-0).

## ЛИТЕРАТУРА

1. В. И. Чуешов, Е. В. Гладох, О. А. Ляпунова и др., *Технология лекарств промышленного производства* (2010).
2. *Государственная фармакопея Российской Федерации*, XIV изд., ОФС 1.2.4.0006.15 (2018).
3. Р. А. Лавренчук, И. В. Сакаева, Е. И. Саканян, *Ведомости научного центра экспертизы средств мед. применения*, № 2, 40 – 42 (2012).
4. Ю. В. Меркулова, Г. В. Долгова, Л. А. Чайка и др., *Фармаком*, № 1, 67 – 73 (2008).
5. А. А. Иевлева, В. А. Плисов, Е. Ю. Храмова, *Справочник основных лекарственных средств*, Москва (2012).
6. <https://online.uspnf.com/uspnf>.
7. Chen. A Dandan, *J. Anal. Methods Chem.* (2014).
8. R. Pennamareddy, *Thesis* (2010), pp. 123 – 126.
9. Milan B. Arambašić, *Conference paper* (2010).
10. Milan B. Arambašić, *Conference paper* (2012).
11. *Testing Oil Solutions with PYROGENT™ Gel Clot LAL Assay Technical Tips*; Lonza Walkersville, Inc. (2013).
12. K. L. Williams, *Endotoxins Pyrogens, LAL Testing and Depyrogenation third Edition (Drugs and the Pharmaceutical Sciences)*, CRC Press (2007).
13. *The necessity of LAL endotoxin testing*, Blog (2014).

Поступила 26.04.19

## PECULIARITIES OF DETERMINING BACTERIAL ENDOTOXINS IN OIL SOLUTIONS OF DRUGS

O. V. Shapovalova, N. P. Neugodova, and G. A. Sapozhnikova

Scientific Center for Expert Evaluation of Medicinal Products, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow127051, Russia

Issues related to reliable assessment of the quality of oil solutions of medicines in respect of the presence of bacterial endotoxins are considered. Maximum isolation of bacterial endotoxins from fat-soluble drugs for subsequent determination is ensured by heating the samples to 60°C on intense stirring with water, followed by separation into two phases by centrifugation at 2300 rpm for 10 min.

**Keywords:** bacterial endotoxins, extraction, oil solutions, dispersing solvent.