

THẨM ĐỊNH HIỆU LỰC PHƯƠNG PHÁP LAL VÀ ỨNG DỤNG ĐỂ THỬ NGHIỆM NỘI ĐỘC TỔ VI KHUẨN

*Trương Văn Đạt, Đỗ Quang Dương, Huỳnh Văn Hóa
Khoa Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh*

Tóm tắt:

Đặt vấn đề: Thuốc vô khuẩn phải đảm bảo không chứa chất gây sốt vì vậy cần phải có những thử nghiệm để đánh giá nội độc tố vi khuẩn. Hiện nay, LAL là phương pháp hiện đại để thử nghiệm nội độc tố, phương pháp này mang lại kết quả nhanh và chính xác. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Bài báo này nghiên cứu tìm hiểu, tổng hợp một số phương pháp đánh giá hiệu lực của thử nghiệm LAL đã được công bố cũng như xác định các yếu tố ảnh hưởng đến kết quả thử nghiệm. **Kết quả:** Bài báo đã xác định 3 phương pháp thử nghiệm LAL và 5 nhóm yếu tố ảnh hưởng đến kết quả thử nghiệm. **Kết luận:** Hiện nay có rất nhiều nguồn LAL khác nhau và nhiều nhà cung cấp khác nhau, hơn hết phản ứng giữa LAL – nội độc tố vi khuẩn có thể bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố làm cho kết quả bị sai lệch. Vì vậy cần phải thẩm định hiệu lực thử nghiệm LAL để đảm bảo chất lượng sản phẩm.

Từ khóa: Nội độc tố vi khuẩn, thử nghiệm LAL, thuốc vô khuẩn

Abstract:

THE EFFICIENCY OF LAL METHOD VALIDATION AND APPLYING FOR ENDOTOXIN TESTING

*Truong Van Dat, Do Quang Duong, Huynh Van Hoa
Faculty of Pharmacy, UMP HCMC*

Background: Sterile drug is required not contain pyrogen, so we must the method for endotoxin testing. Nowadays, LAL is a modern method for endotoxin testing, this method carries quick and accurate result. **Materials and methods:** This article has studied some methods to evaluate the efficiency of LAL testing as well as defined these factors that affect to the testing result. **Results:** This article has identified 3 methods of LAL testing and 5 groups of factors that affect testing results. **Conclusion:** There are many sources of LAL, many different providers and the reaction of LAL – endotoxin may be affected by other factors that yield misleading results. So, we need to validate the efficiency of LAL testing to ensure drug quality.

Keywords: Endotoxin, LAL testing, sterile drug.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chất gây sốt (pyrogen) là các thành phần của vi khuẩn, nấm hay virus được tạo ra khi chúng bị tiêu giải, nó làm cho mức quy định của cơ chế điều hòa thân nhiệt của vùng dưới đồi cao hơn bình thường, lúc đó quá trình sinh nhiệt của cơ thể sẽ tăng lên đồng thời với quá trình giữ nhiệt trong cơ thể để

làm tăng thân nhiệt. Khi các thành phần đó là lipopolysaccharid của vi khuẩn gram âm thì nó được gọi là nội độc tố vi khuẩn (bacteria endotoxin). Nội độc tố vi khuẩn có nhiều ý nghĩa hơn trong sản xuất thuốc [1].

Theo khuyến cáo của FDA và tiêu chuẩn của GMP-WHO, trước khi tiến hành sản xuất phải đánh giá nội độc tố trên nguyên vật liệu đầu

vào, chúng phải đáp ứng tiêu chuẩn cho phép mới được đưa vào quy trình sản xuất (QTSX). Bảng 1. nêu giới hạn nội độc tố cho nút cao su và các loại chai/lọ (vial) trước khi tiệt khuẩn [5].

Bảng 1. Giới hạn nội độc tố cho nguyên vật liệu

Thử nghiệm	Nút cao su	Chai/lọ
Nội độc tố	≤ 2.5 EUs/nút	≤ 10 EUs/chai/lọ

Việc đánh giá nội độc tố trên nguyên vật liệu là một phần quan trọng của thẩm định QTSX.

Trước đây, người ta đánh giá dựa vào sự thay đổi nhiệt độ của động vật thử nghiệm (thường là thỏ) khi tiêm vào một liều chế phẩm nhất định trong một thời gian chính xác. Phương pháp này có độ chính xác không cao và phụ thuộc nhiều vào động vật thử nghiệm. Hiện nay, một phương pháp mới mang lại hiệu quả là thử nghiệm dựa vào phản ứng giữa nội độc tố và LAL (*Limulus Amebocyte Lysate*) [1,3].

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu cơ chế tác động của LAL trong thử nghiệm nội độc tố các sản phẩm vô khuẩn. Nghiên cứu các yếu tố cần thẩm định để chứng minh hiệu lực của phương pháp LAL.

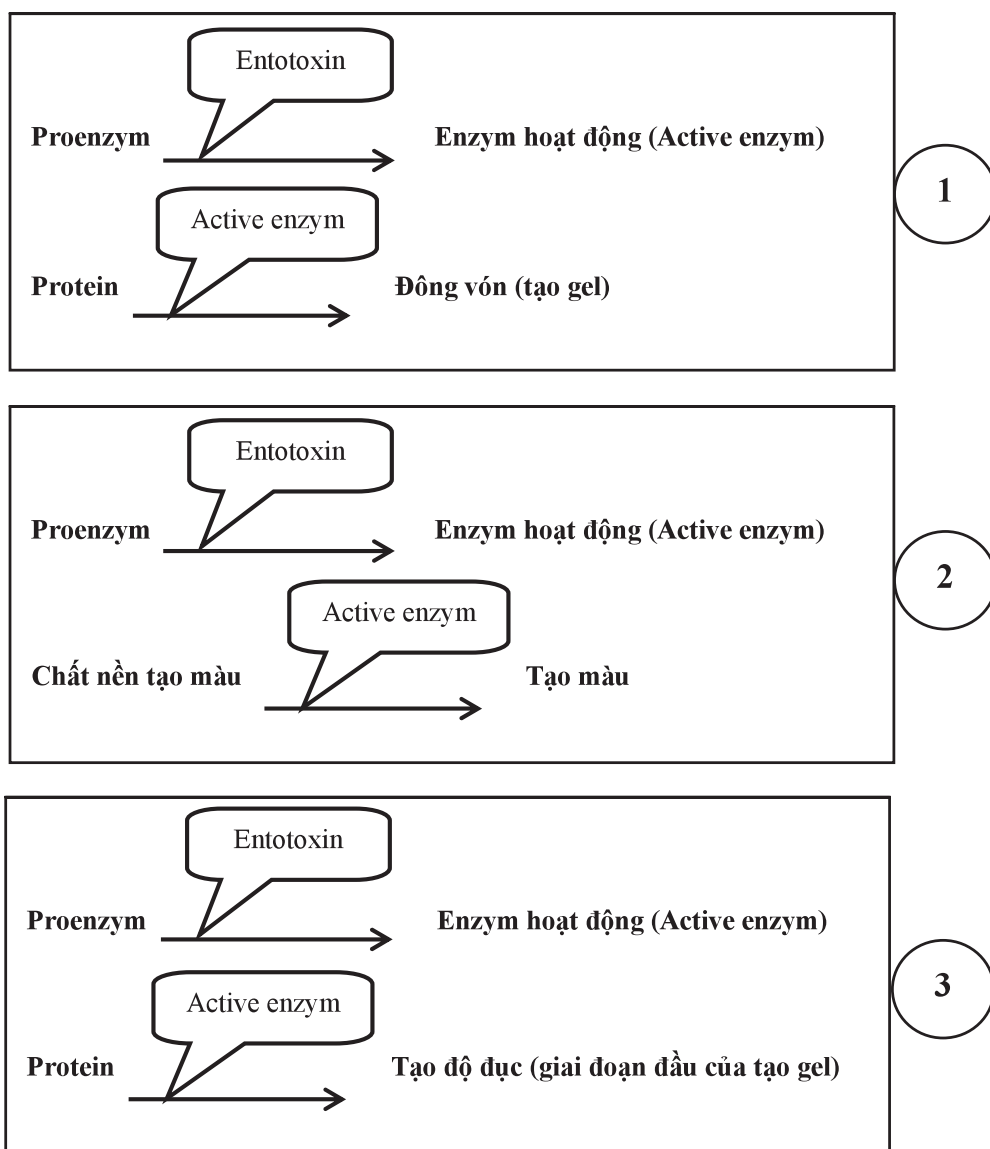
3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

LAL là dịch phân giải tế bào dạng amip có trong máu một loài sam biển *Limulus polyphemus* hoặc *Tachypleus tridentatus*, được FDA chấp thuận sử dụng năm 1970. Máu được lấy ra từ màng ngoài tim của con sam. Các tế bào máu được tách ra từ huyết thanh bằng cách sử dụng ly tâm và để vào trong nước cất, chúng sẽ vỡ ra, giải phóng các lysate sau đó được tinh chế và đông khô. Khi tiến hành thử nghiệm nội độc tố nó được pha trộn với lysate và nước. Thử nghiệm này ngoài việc cho phép phát hiện nhanh nội độc tố nó còn giúp định lượng nội độc tố có trong sản phẩm. Hình 1 mô tả quá trình chiết xuất LAL từ sam biển [1, 6].



Hình 1. Sam biển và quá trình chiết xuất LAL

Theo USP32-NF27, chuyên luận “<85> Thử nghiệm nội độc tố vi khuẩn”, có 3 phương pháp để thực hiện thử nghiệm LAL: phương pháp tạo gel dựa trên sự tạo thành gel khi cho thuốc thử vào dung dịch có chứa nội độc tố; phương pháp đo độ đục (*turbidimetric*) dựa vào sự thay đổi độ đục của thuốc thử LAL khi tạo gel; phương pháp đo màu (*chromogenic*) dựa trên sự thay đổi màu của phức hợp màu – peptid (Hình 2) [6,7]. Tùy theo điều kiện và tính chất của mẫu thử, có thể áp dụng một trong các kỹ thuật thích hợp để thực hiện thử nghiệm.



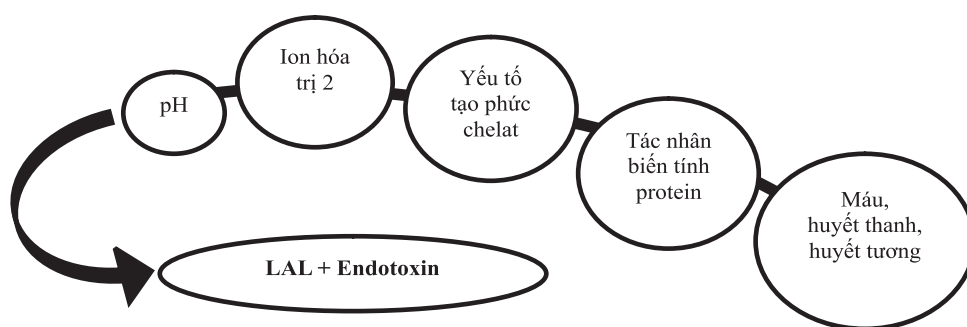
Hình 2. Các cơ chế của thử nghiệm LAL [3, 4]

(1 – phản ứng tạo gel; 2 – phản ứng đo màu; 3 – phản ứng đo độ đục)

Tuy nhiên trên thị trường có rất nhiều nhà cung cấp thuốc thử LAL với nhiều tiêu chuẩn khác nhau, thách thức đặt ra cho nhà sản xuất là phải chọn lựa nguồn LAL thích hợp và đảm bảo độ tin cậy cao. Để thực hiện được điều này phải tiến hành thẩm định hiệu lực thử nghiệm phương pháp LAL trong đánh giá nội độc tố. Ngoài việc thẩm định yêu cầu phải tìm và thử nghiệm tính ức chế hoặc tăng cường phản ứng của sản phẩm (chứa nội độc tố) đối với LAL chứ không thể tin tưởng tuyệt đối vào nhà cung cấp thuốc thử LAL. Theo đó “mức độ ức chế hoặc tăng cường phản ứng LAL của sản

phẩm nên được xác định cho mỗi công thức thuốc trước khi thử nghiệm để đánh giá lượng nội độc tố. Tất cả các thử nghiệm thẩm định phải được thực hiện trên sản phẩm thuốc pha loãng. Dung dịch pha loãng không nên vượt quá độ pha loãng tối đa (MVD). Ít nhất ba lô sản phẩm phải được thử nghiệm tính ức chế hoặc tăng cường”.

Hình 3. trình bày các yếu tố ảnh hưởng đến thử nghiệm LAL, những yếu tố này gây ra tính ức chế hoặc tăng cường phản ứng nên cần phải được xác định [1].



Hình 3. Các yếu tố ảnh hưởng đến thử nghiệm LAL [1, 2]

3.1. Các phương pháp thực hiện thử nghiệm LAL

3.1.1. Kỹ thuật đông vón gel

Phương pháp tạo gel cho phép phát hiện hoặc xác định lượng nội độc tố trong thuốc dựa trên sự tạo gel của thuốc thử LAL với nội độc tố. Nồng độ nội độc tố yêu cầu để tạo gel với thuốc thử LAL trong điều kiện chuẩn là nồng độ tương ứng với độ nhạy ghi trên nhãn của thuốc thử. Để đảm bảo độ chính xác và giá trị của phép thử, phải tiến hành phép thử kiểm tra để khẳng định độ nhạy ghi trên nhãn của thuốc thử LAL. Độ nhạy của LAL ghi trên nhãn là nồng độ nội độc tố chuẩn (CSE) thấp nhất cần thiết để tạo gel với LAL trong điều kiện xác định. Phép thử kiểm tra độ nhạy được thực hiện mỗi khi có lô thuốc thử LAL mới hoặc khi có sự thay đổi điều kiện thí nghiệm có thể ảnh hưởng tới kết quả của phép thử [5,6].

3.1.2. Kỹ thuật đo độ đục

Phương pháp đo độ đục xác định lượng nội độc tố có trong dung dịch CSE thử dựa trên đo mức độ thay đổi độ đục trong quá trình tạo gel của thuốc thử LAL. Hiện nay có 2 kỹ thuật được áp dụng: đo độ đục tại điểm dừng hoặc đo độ đục động học [5,6].

Đo độ đục tại điểm dừng dựa trên sự tương quan giữa nồng độ nội độc tố và độ đục của hỗn hợp phản ứng ở thời điểm xác định vào cuối của giai đoạn ủ.

Đo độ đục động học dựa trên sự tương quan giữa nồng độ nội độc tố và thời gian cần thiết để đạt tới độ đục định trước của hỗn

hợp phản ứng hoặc tốc độ tăng độ đục của hỗn hợp.

Phép thử thường thực hiện ở 37 ± 1 °C, độ đục biểu thị bằng độ hấp thụ hay độ truyền qua.

3.1.3. Kỹ thuật đo màu

Phương pháp đo màu xác định nồng độ nội độc tố của các dung dịch CSE dựa trên đo chất màu được giải phóng ra từ một cơ chất mang màu do phản ứng của nội độc tố với thuốc thử LAL. Có 2 kỹ thuật đo: đo màu tại điểm dừng hoặc đo màu động học [5,6].

Đo màu tại điểm dừng dựa trên tương quan giữa nồng độ nội độc tố và đậm độ chất màu tạo thành của hỗn hợp phản ứng ở điểm cuối của giai đoạn ủ.

Đo màu động học dựa trên mối tương quan định lượng giữa nồng độ nội độc tố và thời gian cần thiết để hỗn hợp phản ứng đạt tới độ hấp thụ (hoặc độ truyền qua) định trước hoặc tốc độ tăng màu của hỗn hợp.

Phép thử thường thực hiện ở 37 ± 1 °C.

3.2. Các yếu tố cản trở phản ứng của LAL và nội độc tố

3.2.1. pH

pH tối ưu cho thử nghiệm là từ 6,0-8,0. Nếu pH vượt qua khoảng này có thể khắc phục bằng biện pháp pha loãng, thêm vào dung dịch đệm hoặc dùng HCl, NaOH [2,3,4].

3.2.2. Ion hóa trị 2

Ion hóa trị 2 ở một mức giới hạn tối ưu giúp cho phản ứng xảy ra, tuy nhiên ở nồng độ cao nó trung hòa các điện tích âm của nội độc tố từ đó làm giảm hiệu lực phản

ứng. Pha loãng là biện pháp khắc phục hiện tượng này [2,3,4].

3.2.3. Yếu tố tạo phức chelat

EDTA hay heparin tạo phức chelat với các ion hóa trị 2, làm giảm liên kết của nó với nội độc tố từ đó có thể làm tăng cường phản ứng. Tuy nhiên, cô lập hết các ion hóa trị 2 có thể làm hạn chế phản ứng do ức chế hoạt động của các enzym. Khắc phục hiện tượng này là sử dụng các gel tinh khiết hoặc pha loãng mẫu thử [2,3,4].

3.2.4. Máu, huyết thanh, huyết tương và protein

Protein và các sản phẩm của máu có thể kết hợp với nội độc tố. Ngoài ra, một số protease cũng góp phần phân hủy protein và làm ảnh hưởng đến phản ứng. Khắc phục hiện tượng này có thể làm biến tính protein bằng nhiệt với điều kiện nội độc tố chịu được nhiệt độ làm

biến tính protein [2,3,4].

3.2.5. Tác nhân làm biến tính protein

Alcol và phenol là 2 tác nhân làm biến tính protein, khắc phục bằng cách pha loãng mẫu thử [2, 3, 4].

4. KẾT LUẬN

Phương pháp LAL là phương pháp hiện đại để thử nghiệm nội độc tố trong các sản phẩm vô khuẩn cho kết quả nhanh và chính xác. Tuy nhiên, hiện nay có nhiều nguồn LAL và nhiều nhà cung cấp khác nhau và phản ứng giữa LAL và nội độc tố có thể bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố khác làm cho kết quả bị sai lệch.

Bài báo đã tổng hợp một số phương pháp đánh giá kết quả thử nghiệm LAL cũng như xác định những yếu tố ảnh hưởng đến kết quả thử.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Center for Drug Evaluation and Research (1987), *Guideline on validation of the limulus amebocyte lysate test as an end-product endotoxin test for human and animal parenteral drugs, biological products and medical devices*, FDA, USA, pp. 1-54.
2. Michael E. Dawson (2005), "Interference with the LAL Test and How to Address It", *LAL update*, **23**(3), 1-6.
3. Rosimar L. Silveira et al. (2004), "Comparative evaluation of pyrogens tests in pharmaceutical products", *Brazilian Journal of Microbiology*, **35**, 48-53.
4. S. Zijlstra, P. Gerken, C. Rechin, R. Wortmann, G. Notohamiprodjo (1997), "Validation of the limulus amebocyte lysate (LAL) test for routine PET radiopharmaceuticals", *Appl. Radiat. Isot.*, **48**(1), 51-54.
5. Syed Imtiaz Haider (2006), *Validation Standard Operating Procedures: A Step by Step Guide for Achieving Compliance in the Pharmaceutical, Medical Device, and Biotech Industries*, Taylor & Francis Group, USA, pp. 957-977.
6. USP32-NF27 (2009), <85> *Bacterial Endotoxins Test*.
7. USP32-NF27 (2009), <151> *Pyrogen test*.