

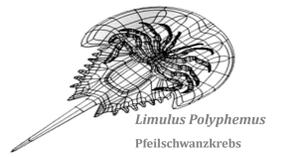


Untersuchungsverfahren zur Endotoxin-Bestimmung in sterilen Arzneimitteln gemäß Ph. Eur. 2.6.14 unter Nutzung der Gelbildungsmethode, sowie der Etablierung des kinetisch-turbidimetrischen Messverfahrens.

Zentrales Institut des Sanitätsdienstes der Bundeswehr München

Gina-Marie Meier, Hochschule Coburg

Die Prüfung auf Bakterien-Endotoxine dient dem Nachweis und der Bestimmung von Endotoxinen gramnegativer Bakterien mit Hilfe von Amöbozyten-Lysat vom Pfeilschwanzkrebs. Für diese Prüfung können unter anderem die Gelbildungsmethode oder die turbidimetrische Methode angewendet werden. Diese Verfahren beruhen auf der Bildung eines Gels, beziehungsweise der Entwicklung einer Trübung nach Aktivierung der Gerinnungskaskade durch Lipopolysaccharide.

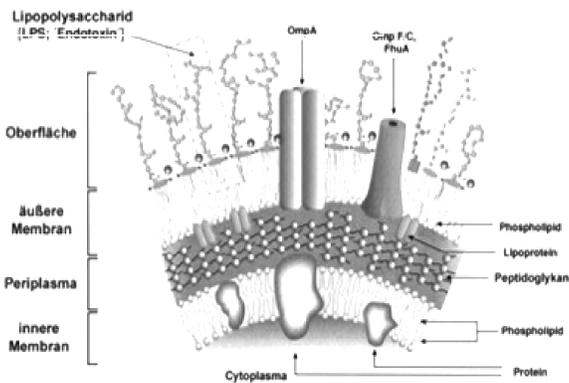


Notwendigkeit der pharmazeutischen Endotoxin-Bestimmung

Endotoxine gehören zu einer Klasse von fieberauslösenden Stoffen, die von gramnegativen Bakterien produziert werden. Chemisch entsprechen die Endotoxine Lipopolysacchariden (LPS), welche Strukturkomponenten der äußeren Zellmembran darstellen. Abgetötete oder lysierte Bakterien geben Endotoxine ab, die wiederum zu der Freisetzung einer großen Menge Mediatorstoffe führen können. Die Folgen sind unter anderem hohes Fieber, Blutdruckabfall, Kreislaufversagen und der letale Schock.

Lipopolysaccharide (LPS) sind Moleküle, die aus dem toxischen Lipid A und Polysacchariden bestehen. Sie sind an die Membranoberfläche gramnegativer Bakterien gebunden und wirken als Endotoxin.

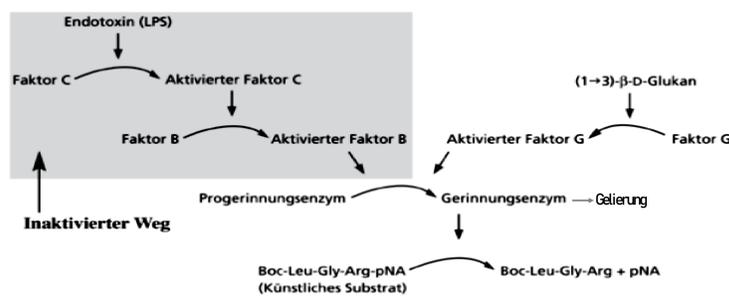
Die Quantifizierung von Endotoxin ist daher in diversen Produkten der Pharma- und der Lebensmittelindustrie essentiell.



Zellwandaufbau Gram negativer Bakterien. Im Gegensatz zu Exotoxinen, die von lebenden Bakterien aktiv ausgeschieden werden, sind Endotoxine Bestandteile der äußeren Zellmembran von gramnegativen Bakterien wie Escherichia coli, Salmonella, Shigella, und Cyanobakterien. Die Freigabe der Toxine erfolgt im Falle von bakteriellem Tod aufgrund eines wirksamen Abwehrmechanismus des Wirts oder der Wirkung bestimmter Antibiotika, beziehungsweise durch Bakterienwachstum.

Schwellenwerte — Maximale pharmazeutische Endotoxindosis für den Menschen

Intravenöse Anwendung von Parenteralia	5,0 EU/kg
Intravenöse Anwendung von Radiopharmaka	2,5 EU/kg
Intrathekale Anwendung	0,2 EU/kg
Parenterale Anwendung je Quadratmeter Körperoberfläche	100 I.U.*m ²



Gerinnungskaskade. Das LAL bildet eine Kaskade von Serinproteasen, die durch Spuren von Endotoxin ausgelöst werden und am Ende der Reaktion zu einem Gelrinnsel führen. Der Faktor C, der normalerweise als Zymogen vorliegt, ist die Initialzündung für diese Gerinnungskaskade.

Das **Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL)** ist ein lyophilisiertes Extrakt aus den hämocytenreichen Blutzellen des Pfeilschwanzkrebses. Die Gerinnungsbildung des Limulus-Blutes ist auf eine Kaskade enzymatischer Aktivierungsschritte zurückzuführen. Das Endotoxin aktiviert die Faktoren C und B, wodurch das Gerinnungsenzym die Spaltung des Koagulogens vorantreibt, was turbidimetrisch oder chromogen nachgewiesen und quantifiziert werden kann. Mit der Gelbildungsmethode resultiert die gelierte Probenmatrix aufgrund Ionenwechselwirkung unlöslicher Spaltprodukte.

Für den sicheren Endotoxin-Nachweis ist die Bestimmung der maximal gültigen Verdünnung **MVD**, 'maximal valid dilution', für die Untersuchungslösung vorausgesetzt. Hierbei wird die größtmöglich erlaubte Verdünnung berechnet, bei der der spezifizierte Endotoxinwert des Arzneimittels noch bestimmt werden kann. Die spätere Messung von Proben in der Routine erfolgt bei weniger starken Verdünnungen.

$$MVD = \frac{\text{Endotoxin-Grenzwert} \cdot \text{Konzentration der Untersuchungslösung}}{\text{Lysatempfindlichkeit oder kleinste Konzentration für die Kalibrierkurve}}$$

$$\text{Endotoxin - Grenzwert} = \frac{\text{pyrogener Endotoxin-Grenzwert je kg}}{\text{empfohlene maximale Produktdosis}}$$

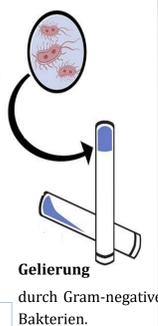
Gelbildungsmethode

Ph. Eur. 2.6.14 | Methode A

- LAL + LPS** -> Gelbildung
- LAL + Aktivatoren (keine Pyrogene)** -> Gelbildung
- Aktivatoren sind Stoffe, die keine Pyrogeneigenschaften besitzen, jedoch mit LAL-Enzymen reagieren.**
- LAL + LPS + Inhibitoren** -> keine Gelbildung
- Inhibitoren verursachen eine täuschende Pyrogenfreiheit.**

LAL... Limulus-Amöbozyten-Lysat LPS... Lipopolysaccharide

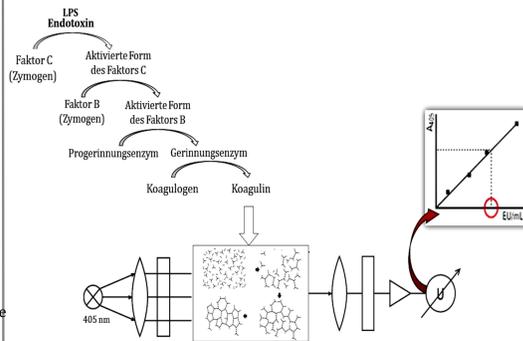
Qualitative bis halb-quantitative Methode
maximale Sensitivität 0.03 EU/ml
erhöhter Lysatverbrauch



Gelierung durch Gram-negative Bakterien.

kinetisch-turbidimetrisches Messverfahren

Ph. Eur. 2.6.14 | Methode C



Turbidimetrische Messung nach Aktivierung der Gerinnungskaskade durch Endotoxin. Detektion der Gelmatrix mit LED-angeregter Lichtabsorptionsmessung bei 405 Nanometer und digitaler, linearer oder logarithmischer Darstellung der Messergebnisse.

Zu evaluierende Parameter: +
Nachweisgrenze (LOD), Robustheit und Wiederholungspräzision.

Gültigkeitskriterien

Der Absolutwert des Korrelationskoeffizienten der mit der Positivkontrolle erstellten Kalibrierkurve muss mindestens 0,980 betragen.

Die zugesetzte Endotoxin-Konzentration der Untersuchungslösung muss im Bereich von 50-200 % zu der bekannten, zugesetzten Endotoxin-Konzentration sein.

Quantitative Methode
maximale Sensitivität: 0.001 EU/ml
geringer Lysatverbrauch

Pyros Kinetix® Flex

ACC

Methode C

Turbidimeter

Incubating Kinetic Tube Reader

Wellenlänge: 660 nm

Inkubatortemperatur: 37 °C ± 0,5 °C

Kapazität: 32 (64,96) 8mm-Wells

Software

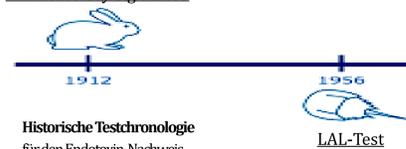
Pyros® eXpress



Quellenverzeichnis

- Literaturquellen:**
Arzneimittelbuch 2.6.14.
ACC—<https://www.accusa.com/>
Gel-Clot-Test - https://bioscience.lanza.com/tonza_bs/CH/en/document/30928
Bildquellen:
<https://www.americanpharmaceuticalreview.com/25257-Endotoxin-Detection-and-Testing-Equipment/5821235-Pyros-Kinetix-Flex-Incubating-Kinetic-Tube-Reader/>
<https://www.istockphoto.com/de/vektor/atlantisc-horseshoe-crab-limulus-polyphemus-gm184928161-18474955>
<http://www.chemgapedia.de/vsengine/glossary/de/lipopolysaccharide.glos.html>

Kaninchen-Pyrogen Test



Historische Testchronologie für den Endotoxin-Nachweis.

Monozyten-Aktivierungstest

1995 2001

Rekombinanter Faktor-C-(rFc)-Test

Alternative Verfahren

ohne Tierversuche und tierische Reagenzien