

С.В. Генералов, М.Н. Киреев, Е.Г. Абрамова, О.А. Лобовикова

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ КОНТРОЛЯ ОСТАТОЧНОГО ЭТАНОЛА В ПРЕПАРАТЕ ГЕТЕРОЛОГИЧНОГО АНТИРАБИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора (Саратов)

Представлены результаты определения остаточного этилового спирта в препарате гетерологичного антирабического иммуноглобулина с использованием портативного фотоионизационного газового хроматографа ФГХ-1. К преимуществам метода следует отнести точность, чувствительность, экспрессность, отсутствие специальной пробоподготовки, возможность автоматизации при обработке результатов.

Ключевые слова: антирабический иммуноглобулин, остаточный этанол, газовая хроматография

GAS CHROMATOGRAPHY TECHNIQUE OPTIMIZATION FOR CHECKING RESIDUAL ETHANOL IN THE PREPARATION OF HETEROLOGOUS ANTI-RABIES IMMUNOGLOBULIN

S.V. Generalov, M.N. Kireyev, E.G. Abramova, O.A. Lobovikova

Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov

The article presents the results of determination of residual ethanol in the preparation of heterologous anti-rabies immunoglobulin, using portable photoionization gas chromatograph PGC-1. The advantages of the method are as follows: accuracy, sensitivity, promptness. It does not require sample preparation; the results can be processed automatically.

Key words: anti-rabies immunoglobulin, residual ethanol, gas chromatography

ВВЕДЕНИЕ

Антирабические сывороточные препараты для постэкспозиционной профилактики бешенства были внедрены в практику здравоохранения в середине 50-х годов прошлого столетия. Внедрению антирабических сывороточных препаратов способствовала разработка методов концентрирования и очистки специфических антител, обеспечивающая повышение активности и снижение реактогенности. Для удаления балластных белков и получения высокоактивных препаратов иммуноглобулина были предложены различные методы фракционирования: Диаферм и его модификации, спиртовой, сульфатный, риванольный, полиэтиленгликолевый, каприлатный [1]. Для извлечения антител могут быть использованы различные сочетания методов хроматографии, однако их высокая стоимость затрудняет широкое практическое применение.

Методы фракционирования специфических антител, основанные на использовании этанола, позволяют получить стандартный, однородный очищенный препарат антирабического иммуноглобулина (АИГ) [12].

Спиртовой метод для получения антирабического иммуноглобулина, предложенный М.А. Селимовым, изложен в руководстве ВОЗ [6]. Модификация спиртового метода сотрудниками Томского НИИ вакцин и сывороток позволила на 30–35 % повысить выход гамма-глобулина без снижения специфической активности [1]. Для производства коммерческого препарата АИГ из

сыворотки крови лошади на территории СНГ с успехом используют риванол-спиртовой метод, который на сегодняшний день представляется наиболее эффективным методом фракционирования специфических антител [9]. Для эффективного удаления спирта из растворов иммуноглобулина используют методы диализа, ультрафильтрации, лиофильного высушивания [9, 10].

Согласно нормативной документации на «Иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади жидкий, раствор для инъекций», концентрация остаточного этилового спирта не должна превышать 4,5 %. Данный показатель имеет немаловажное значение для сохранения стабильности свойств, поскольку наличие остаточного спирта в готовом препарате может вызывать агрегацию иммуноглобулина, а именно агрегаты в препаратах иммуноглобулина способствуют проявлению различных побочных анафилактических реакций [3, 8].

В настоящее время для определения этанола в фармацевтических препаратах рекомендованы методы дистилляции [2], газовой хроматографии [2], а также метод, основанный на окислении этилового спирта дихроматом калия [5]. Последний достаточно трудоемок, требует длительной пробоподготовки исследуемого материала. Метод дистилляции является достаточно простым в исполнении, однако, на наш взгляд, он не обладает высокой чувствительностью, его применение оправдано при определении достаточно больших концентраций этилового спирта. Для определения остаточного этанола в препарате гетерологичного

АИГ необходим точный, чувствительный и достаточно экспрессный метод. Таким методом является газовая хроматография (ГХ). В Государственной Фармакопее XII [2] описано проведение анализа остаточного этанола в жидких фармацевтических препаратах методом газовой хроматографии, предусматривающее непосредственное нанесение подготовленной пробы в испаритель хроматографа. Следует отметить, что иммуноглобулин представляет собой высококипящее органическое соединение, а, следовательно, его выведение из колонки затруднено. В связи с этим более удобным представляется хроматографический анализ паровой фазы гетерологичного антирабического иммуноглобулина [7], разработка подобной модификации данного метода явилась целью настоящего исследования.

МЕТОДИКА

В работе использовали портативный газовый хроматограф ФГХ-1 (Россия, НПП «Экан») с фотоионизационным детектором и капиллярной колонкой длиной 25 м, предназначенный для качественного и количественного определения примесей в воздухе и газовых смесях как в лабораторных, так и в полевых условиях. Газовое обеспечение хроматографа осуществляется от встроенного баллона. В качестве газа-носителя применяют особо чистый газообразный азот. Режим работы хроматографа — изотермический. Хроматографические колонки термостатируют при температуре от 50 до 80 °С. Отбор анализируемой пробы в колонку осуществляют у границы раздела фаз через кран-дозатор с помощью микрокомпрессора, встроенного в хроматограф. Разделенные компоненты проходят через ячейку детектора, где они ионизируются под действием ультрафиолетового излучения. По величине измеряемого ионизационного тока происходит определение количества вещества, проходящего через ячейку детектора.

Для определения значения концентрации проводили от 4 до 5 измерений, затем измеряли среднюю высоту пиков и определяли зависимость концентрации этанола в газовой фазе от его концентрации в жидкой фазе.

Управление прибором, сбор, обработку и хранение результатов осуществляли на ЭВМ с использованием программы FGH 4 (НПП «Экан»).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Водный раствор этанола представляет собой двухкомпонентную двухфазную систему, которая состоит из жидкой фазы и насыщенного пара, находящегося в равновесии с жидкостью. Согласно третьему закону Коновалова при постоянных температуре и давлении имеет место однонаправленное изменение состава раствора и пара [11]. Таким образом, количественное определение этанола в жидкости становится возможным при непосредственном измерении его содержания в насыщенном паре методом газовой хроматогра-

фии. Для бинарной смеси этанол — вода ранее установлены значения содержания компонентов для каждой фазы [4].

Раствор антирабического иммуноглобулина представляет собой сложную поликомпонентную систему, в которой протекают физико-химические взаимодействия между ее составляющими: водой, белком, хлоридом натрия, гликоколом, остаточным этанолом. По этой причине содержание последнего в насыщенном паре раствора АИГ может отличаться от его содержания в насыщенном паре бинарной смеси этанол-вода при одинаковом его содержании в жидкой фазе [11].

Таким образом, наиболее удобным вариантом определения концентрации этанола в растворе АИГ явилась предварительная градуировка прибора. Градуировочные смеси готовили из раствора антирабического иммуноглобулина, восстановленного из лиофилизированной формы, к которому добавляли этанол до конечной объемной концентрации 0,5 %; 1 %; 3 %; 5 %; 10 %; 20 %. Использование лиофилизированной формы антирабического иммуноглобулина обосновано тем, что она является наиболее свободной от остаточных количеств этанола [10].

Для установления оптимальных условий градуировку прибора выполняли при следующих значениях температур исследуемых образцов (4 ± 2); (22 ± 3) и (35 ± 2) °С.

На рисунке 1 представлены калибровочные графики, на которых отображена зависимость содержания этанола в насыщенном паре в зависимости от его содержания в белковом растворе при заданном температурном значении.

Из рисунка 1 следует, что на результат эксперимента определенное влияние оказывает температура исследуемых образцов, от которой зависит состав насыщенного пара. Так, при температуре образцов (4 ± 2) °С уменьшение содержания этанола в насыщенном паре приводит к снижению угла наклона калибровочной кривой, что делает проведение анализа затруднительным. При значениях температур исследуемых образцов (22 ± 3) °С имеет место подъем угла наклона калибровочной кривой, однако при дальнейшем повышении температуры образцов до (35 ± 2) °С имело место смещение кривой практически параллельно ее положению при температуре (22 ± 3) °С, при этом заметного изменения угла наклона калибровочной кривой не происходило. Таким образом, на наш взгляд, оптимальным является проведение эксперимента при температуре анализируемых образцов (22 ± 3) °С.

После градуировки прибора выполняли измерения концентрации остаточного этанола в образцах производственных серий антирабического иммуноглобулина. Измерение проводили при температуре проб (22 ± 3) °С. Исследовали содержание этанола как в готовом препарате антирабического иммуноглобулина, так и в его растворе на различных стадиях производства. Результаты экспериментов представлены в таблице 1.

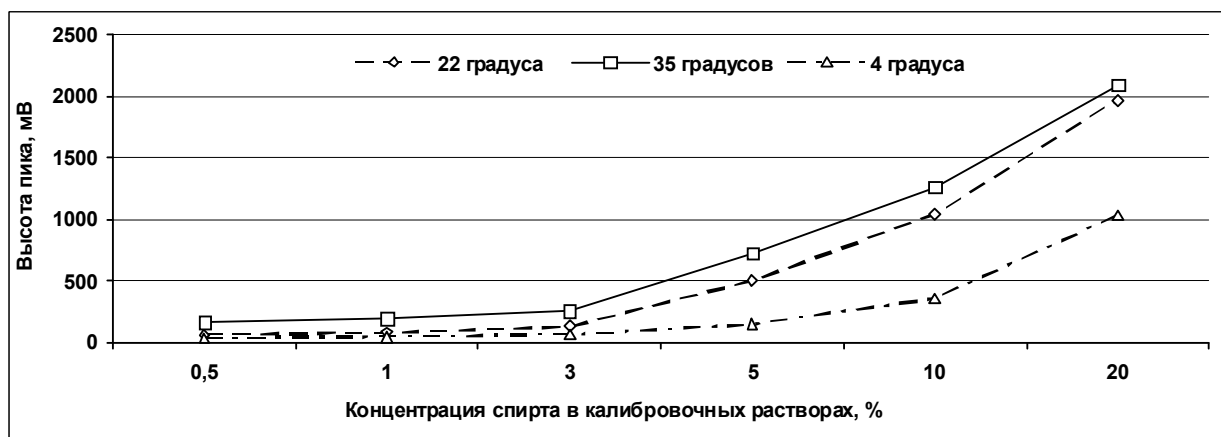


Рис. 1. Определение концентрации спирта в жидкости в калибровочных растворах. 1 – измерение при температуре образцов $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$, 2 – измерение при температуре образцов $(22 \pm 3)^\circ\text{C}$, 3 – измерение при температуре образцов $(35 \pm 2)^\circ\text{C}$.

Таблица 1

Исследование остаточного этанола в производственных сериях антирабического иммуноглобулина методом газовой хроматографии

Наименование образца	Высота пика, мВ	Содержание этанола, %
АИГ, серия 76, готовый препарат	97 ± 3	$1,0 \pm 0,3$
АИГ, серия 77, готовый препарат	398 ± 3	$3,6 \pm 0,1$
АИГ, серия 124, полуфабрикат	920 ± 44	$9,0 \pm 0,5$
АИГ, серия 124, готовый препарат	63 ± 6	$0,5 \pm 0,1$
АИГ, серия 125, полуфабрикат	570 ± 49	$5,5 \pm 0,5$
АИГ, серия 125, готовый препарат	134 ± 23	$3,0 \pm 0,5$

Результаты исследований, представленные в таблице 1, согласуются с результатами определения остаточного этанола методом дистилляции, применяемым в настоящее время в соответствии с нормативной документацией на препарат гетерологичного антирабического иммуноглобулина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, рассматриваемый метод, обеспечивающий измерение количества остаточного этанола в диапазоне объемных концентраций от 0,5 до 20 %, является возможной альтернативой другим способам определения остаточного этанола в препарате гетерологичного АИГ. К достоинствам метода следует отнести точность и воспроизводимость результатов, экспрессность, позволяющую быстро оценить эффективность проведения процесса ультрафильтрации, отсутствие этапа специальной пробоподготовки, сравнительную простоту аппаратного оформления, возможность автоматизации при обработке результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гипериммунные сыворотки / С.П. Карпов. — Томск, 1976. — 380 с.
2. Государственная фармакопея Российской Федерации, издание XII, ч. 1. — М.: Научный центр

экспертизы средств медицинского применения, 2008. — С. 49–51.

3. Змачинская Т.Б., Анастасиев В.В. Оптимизация технологической схемы получения препаратов иммуноглобулинов для внутримышечного введения // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского — 2001. — № 1. — С. 70–73.

4. Людмирская Г.С., Барсукова Т.А., Богомольный А.М. Равновесие жидкость — пар. — Л.: Химия, 1987. — 468 с.

5. Методические указания МУК 4.1/4.2.588-96. — М.: Информационно-издательский центр Минздрава России, 1998. — С. 107–108.

6. Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям: Методы лабораторных исследований по бешенству / Под ред. Каплан М.М., Копровски Н. Пер. с англ. — 3-е изд. — Женева: ВОЗ, 1975. — 360 с.

7. Митрука Б.М. Применение газовой хроматографии в микробиологии и медицине. — М.: Медицина, 1978. — 600 с.

8. Пилявская Е.А. Определение фрагментации и агрегации белка в гетерогенном антирабическом иммуноглобулине // Научные основы производства гипериммунных сывороток. — Томск, 1979. — С. 60–61.

9. Производство гетерологичного антирабического иммуноглобулина — итоги первых пяти лет

/ Е.Г. Абрамова [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. — 2010. — № 3 (105) — С. 58—62.

10. Разработка сухой формы получения глобулина противосибиреязвенного / А.В. Комиссаров // Биотехнология. — 2003. — № 3. — С. 74—79.

11. Физическая химия. Теоретическое и практическое руководство / Под ред. Б.П. Никольского. — Л.: Химия, 1987. — 880 с.

12. WHO Expert Consultation on Rabies: first report. WHO technical report series 931. — Geneva, 2004. — 121 p.

Сведения об авторах

Генералов Сергей Вячеславович — кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории профилактических иммуноглобулинов Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора (e-mail: svgeneraloff@gmail.com)

Киреев Михаил Николаевич — кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией биохимии и протеомики Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора

Абрамова Елена Геннадьевна — кандидат биологических наук, заведующий лабораторией профилактических иммуноглобулинов Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора

Лобовикова Оксана Анатольевна — кандидат биологических наук, заведующий отделом биологического и технического контроля