فصلنامه پژوهش در علوم، مهندسی و فناوری
دوره ۸، شماره ۱، بهار ۱۴۰۱
صفحات ۱-۱۱
ISSN: 2476-5082
www.uctjournals.com

ارزیابی کیفیت آب های تزریقی در صنایع داروسازی توسط استراتژی های کاربردی

پریسا بیگدلی۱ ، عزت نوری زاده۲*
۱ کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل؛ ایران
۲ استادیار دانشگاه محقق اردبیلی دانشکده علوم گروه زیست شناسی، اردبیل
*محل انجام پروژه :دانشگاه محقق اردبیلی و کارخانه داروسازی ارتا سرم اردبیل
منبع حمایت کننده طرح: دانشگاه محقق اردبیلی و کارخانه آرتا سرم اردبیل

چکیده

سابقه و هدف:مصرف داروهای تزریقی در طول زندگی هر انسانی چندین بار ممکن است اتفاق بیفتد،ترکیبات تزریقی ممکن است بمنظور درمان یا پیشگیری مورد استفاده قراربگیرند. محققان در سراسر جهان مطالعات گسترده‌ای انجام داده‌اند و سعی داشتند که از زوایای متفاوتی به مسئله حذف مواد پیروژنیک فرآورده‌های تزریقی بیاندیشند و به راه حل‌های کاربردی تری دست یابند.از اینرو هدف از این تحقیق بررسی کیفیت آب های تزریقی در صنایع داروسازی توسط استراتژی های کاربردی می باشد.

مواد و روش ها:در این مطالعه با استفاده از باکتری اشرشیاکلی و آبWFI ،۱۰ رقت مختلف تهیه شد و با استفاده از دستگاه TOC (total organic carbon)و تزریق به خرگوش ها میزان حساسیت ودقت این دو روش مقایسه شدند.

یافته ها :نتایج حاصل از این پژوهش نشان میدهد تمامی محلول های مورد آزمایش حاوی پیروژن بوده و برای تزریق مناسب نمیباشد علاوه براین هرچند تمامی خرگوش ها، پس از تزریق به علت ورود پیروژن به بدن دچار تب شدند اما به جز یک مورد افزایش دمای بدن خرگوش ،کمتر از ۰/۶ درجه سانتی گراد بود و اختلاف معنا داری بین آنها مشاهده نشد.ولی دستگاه TOC در هر۱۰ نمونه علاوه بر نمایان کردن وجود پیروژن با رسم نمودار مقدار آن را نیز گزارش میدهد.

نتیجه گیری :نتایج نشان میدهد تست پیروژن خرگوش توانایی نمایان کردن اندوتوکسین را در تمامی نمونه ها ندارد و دارای معایب زیادی میباشد اما استفاده از دستگاه TOCنتایج قابل قبول تری ارائه می دهد و می تواند جایگزین خوبی برای تست حیوانی باشد.

کلیدواژه: TOC،تست پیروژن خرگوش،داروهای تزریقی

مقدمه

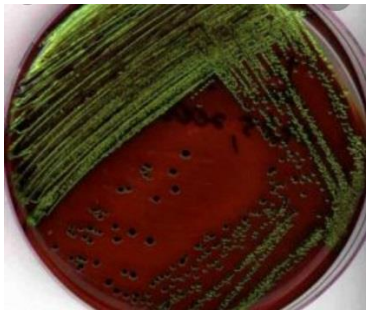
سرم‌های دارویی تزریقی، برای جبران آب و مایعات از دست رفته بدن یا صرفا به‌عنوان واسطه دارورسانی مورد استفاده قرار می‌گیرند فرآورده های تزریقی به علت تماس مستقیم با خون و بافت های داخلی بدن، می بایست از ویژگی هایی برخوردار باشند که یکی از مهم‌ترین این ویژگی‌ها، عاری از پیروژن بودن آن‌ها می‌باشد. اهمیت این موضوع در مورد فرآورده‌های تزریقی داخل وریدی به مراتب بیشتر از محلول‌های تزریقی داخل عضلانی و زیر جلدی است چرا که در مقام مقایسه نه‌تنها در مجاورت مستقیم با خون قرار می‌گیرند، بلکه معمولا با حجم‌های بیشتری نسبت به سایر روش‌های تزریق، تجویز می‌گردند. با توجه به اینکه وجود هرگونه آلودگی میکروبی در آب مصرفی در فرآیند تولید دارو می‌تواند عواقب گران‌باری را بر سلامت فرد مصرف کننده و جامعه داشته باشد، از این رو نیاز است تا با انجام پایش‌ها و آزمایش های مربوطه از وجود یا عدم وجود این آلودگی‌ها مطلع شد[۱]. علی‌رغم امکان کنترل تظاهرات پیروژنیک به وسیله داروهای ضد تب، توجه به این نکته ضروری است که تب یکی از علایم شایع اغلب بیماری‌ها بوده و تشدید آن می‌تواند بر مشکلات فرد تحت درمان بیافزاید. از سوی دیگر بروز واکنش‌های پیروژنیک به دنبال تزریق یک دارو نشان دهنده کیفیت نامطلوب و تکنیک ضعیف ساخت بوده و لذا کارخانجات داروسازی ضمن رعایت کامل اصول GMP[1]به‌وسیله کنترل‌های دقیق کیفی همواره در پی جلوگیری از بروز این گونه مسائل می‌باشند. تا کنون روش های جستجوی مواد پایروژنیک جهت بررسی و ارزیابی کیفیت آب قابل تزریق زیادی شناخته شده اند. از این رو سرعت و دقت روش جهت تمایز روش ها از یکدیگر اهمیت می باید. Janaina Spoladore و همکارانش در سال ۲۰۲۱ مقاله ای با عنوان آزمایش های پیروژنی استاندارد محصولات پزشکی با اندوتوکسین با کتریای ی به منظور جایگزین کردن آزمایش پیروژن خرگوش منتشر کردندکه بیان میکند چون تست خرگوش در محیط داخل بدن انجام میشود تداخل ها میتواند کاربرد عملی آن را برای آزمایشات مختلف پزشکی محدود کند و همچنین این تست طیف وسیعی از پیروژن های مرتبط بیولوژیکی را تشخیص نمی دهد [۲]. در سال ۲۰۱۹ مقاله ای تحت عنوان بهینه سازی انتقال مراقبت و نقش دارو ساز در جامعه توسط Karleen T Melody و همکارانش نوشته شد که در این پژوهش به بررسی چندین مدل TOC و موفقیت ها و چالش های آن پرداخته شده است و دستگاه TOCرا بعنوان یکی از منابع مورد نیاز برای داروسازی معرفی میکند[۳]. همچنین در پژوهش دیگری در سال ۲۰۲۱ توسط Hannah Balfour با عنوان یافتن جایگزین برای آزمایش پایروژن خرگوش به وسیله فارماکوپه ی اروپا منتشر شد که در آن بیان میشود که فارماکوپه آمریکا در پنج سال آینده به آزمایش پایروژن خرگوش خاتمه میدهد و صنعت را به یافتن تست های جایگزین تشویق میکند [۴]. در سال ۹۵ قراچه به ارزیابی کیفیت آب مصرفی در صنایع داروسازی از نظر ضوابط میزان کل مواد آلی پرداخت. وی گزارش نمود که به منظور سنجش سطح کل مواد آلی در غلظت‌های اندک پیشنهادی برای آب مورد استفاده در صنایع دارویی، آزمون کل کربن آلی (TOC) به دلیل دقت بالا و سرعت و هزینه مناسب یکی از پرکاربردترین گزینه‌ها به شمار می‌رود[۵]. در مقاله ی مقایسه ای دیگری Richter و همکارانش در یک مقاله منتشر شده در آلمان باعنوان "مقایسه تست LAL (Limulus amebocyte lysate) و تست پیروژن خرگوش " در سال ۱۹۸۰، از بین ۴۶ نمونه مورد آزمایش، دو نمونه در هر دو تست مثبت گزارش شده و پنج نمونه فقط در تست LAL مثبت بوده است. براساس نتایج به‌دست آمده در این مقاله، Richter و همکارانش عنوان کرده‌اند که تست LAL نمی‌تواند به‌عنوان تست جایگزین پیروژن خرگوش در کنترل کیفیت در صنایع پزشکی و داروسازی باشد و این مقاله تنها به حساسیت بالا و دقت زیاد این تست نسبت به تست پیروژن خرگوش پرداخته‌اند[۶]. در این مطالعه به مقایسه و بررسی دوروش رایج برای سنجش آب های تزریقی در صنایع داروسازی و به منظور یافتن جایگزینی مناسب برای تست پیرون خرگوش پرداخته شده است..

مواد و روش‌ها

این مقاله باحمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه محقق اردبیلی انجام شده است و دارای شناسه اخلاق IR.ZNU.REC.1400.002 میباشد.در این پژوهش برای تهیه محیط کشت EMB مطابق با دستورالعمل حدود ۱۰۰۰ml

[1] Good Manufacturing Practices

آب WFIو gr ۳۶ از ماده محیط کشت را داخل یک بالن ریخته و پس از مخلوط کردن در دستگاه اتوکلاو در دمای °C ۱۲۱ و زمان ۱۵ دقیقه قرار داده شد. پس از پایان اتوکلاو، حدود ml۲۰۰ ازمحیط کشت به هر پیلت انتقال داده شد .از باکتری اشریشا کلای سویه‌ی DH5α با استفاده از روش کشت خطی برای به دست آوردن تک کلنی استفاده شد، بدین صورت که با استفاده از لوپ استریل مقداری از باکتری به پیلت حاوی محیط کشت EMB منتقل شده و با حرکت لوپ به صورت زیگزاک جلو و عقب بر روی سطح محیط کشت، حدوداً ۳۰٪ پیلت اشغال شد. سپس لوپ را مجدداً استریل کرده و با چرخاندن پیلت به اندازه۹۰ درجه، از بخشی که کشت داده شده بود حرکت زیگزاگی به گونه‌ای که ۲ تا ۳ بار با بخش قبلی خورد داشته باشد، انجام شد . با کمک این تکنیک کلنی‌های منفرد جداسازی شدند. کشت باکتری E.Coli در شکل (۱) نشان داده شده است.



شکل۱- کشت باکتری E.Coli

اساس پژوهش انجام شده بر روی باکتری E.Coli می‌باشد به همین دلیل به خاطر اطمینان از خالص بودن باکتری از دو روش جلای سبز فلزی حاصل از رشد باکتری بر روی محیط کشت EMB و رنگ‌آمیزی گرم استفاده شد. در روش اول از محیط کشت باکتری، تک کلنی‌ها را توسط سوآپ در شرایط استریل شکار کرده و مجدداً در محیط EMB رشد داده شدند. با تکرار چندین باره این کار از صحت ماهیت باکتری اطمینان حاصل شد و جلای سبز فلزی ایجاد شده بر روی محیط کشت، وجود باکتری E.Coli را تائید می‌کند. در روش دوم ابتدا یک قطره آب مقطر روی لام ریخته و در شرایط استریل یک لوپ از باکتری را با آن مخلوط کرده و پس از فیکس شدن نمونه در مجاورت هوا، به مدت ۱ دقیقه کریستال ویوله به آن اضافه و سپس با آب شستشو داده شد. پس از آن به مدت ۱ دقیقه محلول لوگول به آن اضافه شده و پس از شستشو در معرض هوا خشک شد. در مرحله بعد الکل به مدت ۲۰ دقیقه به آن اضافه و مجدداً با آب شستشو داده شد. در انتها رنگ سافرانین را به مدت ۱۰ ثانیه روی لام ریخته و بعد از شستشو با آب با استفاده از میکروسکوپ مجهز به عدسی ۶۰ [۷] مشاهده شد کل باکتری‌ها به رنگ صورتی هستند که نشان دهنده‌ی خالص بودن باکتری E.Coli در محیط کشت است. اگر باکتری گرم مثبت در محیط کشت بود، به رنگ آبی مشاهده می‌شد.

در میکروبیولوژی معمولاً از استاندارد نیم مک فارلند به عنوان مرجعی برای مطابقت دادن کدورت ناشی از سوسپانسیون باکتری استفاده می‌شود[۸] اما در این مطالعه مقدارکدورت سوسپانسیون ایجاد شده کمتر از نیم مک فارلند در نظر گرفته شد تا مقدار باکتری کمتر باشد و روش‌های مورد بررسی با دقت بالاتری مقایسه شوند. برای تهیه سوسپانسیون میکروبی از کشت تازه و جوان باکتری به وسیله سوآپ استریل چند کلنی به لوله‌ی حاوی آب WFI و لوله‌ی حاوی سرم فیزیولوژیک استریل منتقل شد و پس از مخلوط شدن سوسپانسون در دستگاه وورتکس کدورت حاصله در مقابل چراغ مقایسه شد به طوری که کدورت هر دو محلول یکی شود و کمتر از کدورت نیم مک فارلند باشد. پس از استریل کردن و نامگذاری ۱۰ عدد لوله آزمایش در بسته حاوی ۹ml آب WFI و ۱۰ عدد لوله حاوی سرم فیزیولوژیک، با استفاده از سمپلر، از نمونه اولیه ۱ml مایع برداشته و به لوله شماره ۱ منتقل شد. لوله‌ی شماره ۱ حدود ۱ دقیقه در وورتکس قرار داده شد تا محتوای لوله به خوبی مخلوط شوند به طوریکه تا کاملاً یکنواخت شد سپس ۱ml از آن در شرایط استریل به لوله‌ی بعدی انتقال داده شد. مرحله‌ی قبل به ترتیب برای لوله‌های بعدی نیز تکرار شد تا رقت10^{-10} بدست آید. همین مراحل با سرم فیزیولوژیک نیز تکرار شد تا ۱۰ رقت متفاوت از باکتری E.Coli بدست آید.ابتدایی‌ترین روش شمارش باکتری‌ها کشت دادن حجم خاصی از سوسپانسیون آن‌ها روی محیط کشت می‌باشد. در این مطالعه حدود ۳ لوپ از سوسپانسیون حاوی سرم فیزیولوژیک باکتری در شرایط استریل بر روی محیط

کشت EMB کشت داده شدند.بعد از رشد باکتری‌ها، با استفاده از دستگاه کلنی کانتر، کلنی‌های موجود در ۱۰ پیلت شمارش شدند.

در شمارش کلنی باکتری ها اگر هر ۱ml را معادل ۲۰ قطره از باکتری بدانیم و هر لوپ برابر $\frac{1}{3}$ قطره از باکتری باشد پس تعداد باکتری‌های موجود در ۱ml از سوسپانسیون باکتری استفاده شده قابل محاسبه می شود.

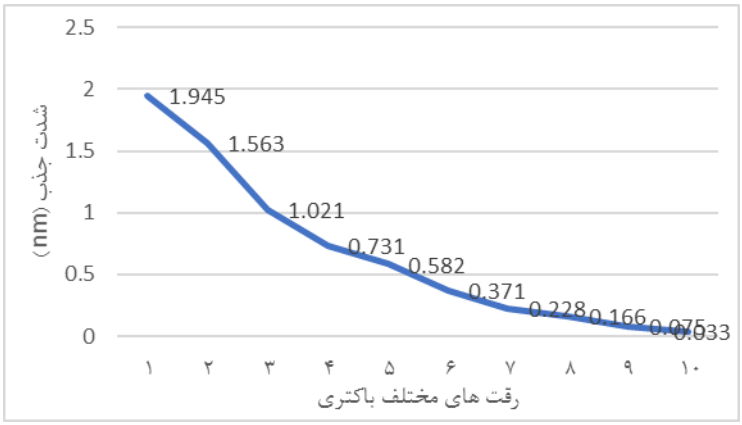
$$\text{تعداد باکتری ها } 1ml \text{ سوسپانسیون} = \frac{20 \times \text{تعداد کلنی}}{\frac{1}{3}} \quad (۱)$$

در این پژوهش از دو روش بن ماری و استفاده از دستگاه مافوق صوت برای از بین بردن باکتری و تهیه LPS استفاده شد. در روش بن ماری لوله‌های آزمایش حاوی سوسپانسیون (باکتری و آب WFI) در حمام آب با درجه ۸۰°C قرار داده شد تا بر اثر گرما زنده‌مانی باکتری از بین برود و LPS باقی بماند[۹]. در روش استفاده از دستگاه مافوق صوت لوله‌های آزمایش حاوی آب WFI و باکتری را به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد در حمام آب دستگاه اولتراسونیک در نقاطی که حفره‌های آب ایجاد شده بود نگه داشته شدند تا LPS از باکتری کشته شده در اثر گرما جدا شود. این کار برای هر ۱۰ لوله تکرار شد.

آزمایش دستگاه TOC، تحت شرایط فشار داخل در حدود ۱۳۰ بار و فشار خروجی ۲/۵ بار انجام شد. بر اساس کاتالوگ ml ۹۹ آب WFI را داخل بالن ریخته سپس با استفاده از سمپلر و سرسمپلر استریل ml ۱ از نمونه موجود در لوله $۱۰^{-۱}$ به بالن ژوژه اضافه شد. سپس ml ۱ اسید نیز به آن اضافه شد و پس از ترکیب انها با استفاده از محلول آب و اسید تیغه‌های دستگاه را شستشو داده و پس از خشک کردن داخل محلول قرار داده شد. اکسیژن از طریق یکی از تیغه‌ها از طریق کپسول اکسیژن با مشخصات z.Air 99.9922 mol که به دستگاه متصل است وارد محلول شده و پس ترکیب با اسید داخل محلول کربن‌های فرار که از مولکول‌های ریز و درشت ایجاد شده داخل دستگاه در کوره و در دمای ۸۰۰ °C سوزانده شد. دستگاه ۳ بار میزان کربن را اندازه‌گیری کرده و نمودار مربوطه را رسم می‌کند و یک مقدار میانگین تعیین می‌کند. در آب تزریقی WFI این مقدار باید کمتر از ۵۰۰µ g pet litr باشد. این کار برای هر ۱۰ رقت و یک بار نیز با آب WFI به عنوان شاهد تکرار شد. برای انجام آزمایش پایروژن حیوانی از خرگوش‌های سالم بالغ و نر از یک نژاد با وزن حدودی ۱۵۰۰-۲۰۰۰ گرم استفاده شد خرگوش ها در قفسه های جداگانه قرار داده شدند، سعی شد دمای اتاق در یک محدوده‌ی مشخصی حفظ شود حدود یک هفته در این شرایط قرار داده شدند تا خود را با شرایط تغییر یافته تطبیق دهند یک خرگوش به‌عنوان شاهد انتخاب شد و هیچ تزریقی به آن صورت نگرفت، سایر خرگوش‌ها با شماره‌های ۱ تا ۱۰ نشانه گذاری شدند سپس به مدت ۴ روز دمای آن‌ها اندازه‌گیری شد به طوری که دماسنج را در رکتوم آن‌ها قرار می‌دادیم تا دما ثابت شود. در تمام مدت اندازه‌گیری سعی شد که سکوت رعایت کردد و هرگونه عملی که موجب تحریک و اضطراب جانور می‌شود اجتناب گردد در روز پنجم کار تزریق جانور را آغاز شد . پس از پاک کردن گوش خرگوش با پنبه استریل به ازای هر کیلوگرم از وزن خرگوش۱ میلی لیتر از محلول را در شرایط استریل با سرنگ انسولین به داخل ورید ماژینال گوش خرگوش تزریق شد و بعد از یک ساعت از پایان آزمایش به مدت ۳ ساعت، در هر ساعت دمای خرگوش را اندازه‌گیری میشد[۱۰-۸].

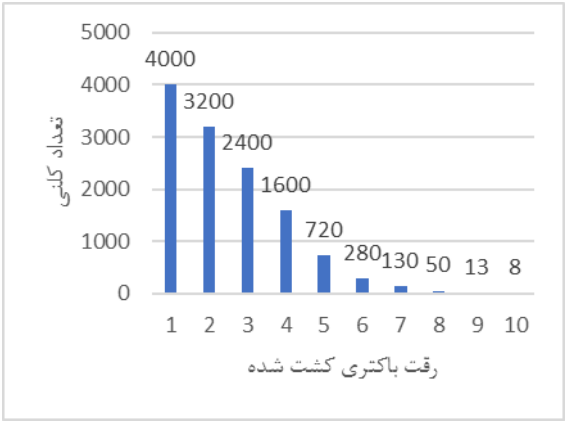
یافته‌ها

با تکرار آزمایش به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر از غلظت‌های هر یک از سوسپانسیون‌های مورد آزمایش در طول موج های مختلف مشخص شد که بیشترین مقدار جذب در طول موج ۴۸۰nm می‌باشد که نتایج آزمایش در شکل (۱) ارائه شده است.با توجه به این نمودار میتوان نتیجه گرفت رقت سازی سریالی از نمونه ها به درستی انجام شده است و بیشترین مقدار باکتری و در نتیجه بیشترین مقدار جذب در نمونه اول بوده و به تدریج سیر نزولی داشته تا به کمترین مقدار آن در نمونه ۱۰ میرسد.

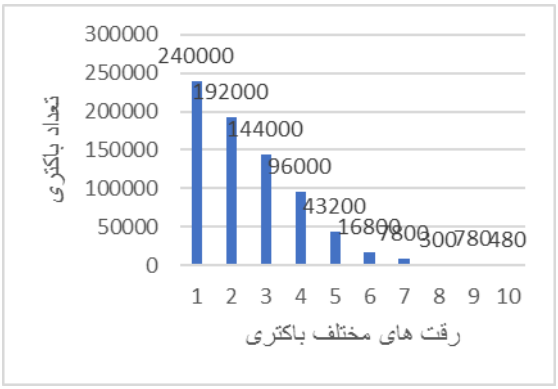


شکل ۱-نمودار پاسخ دستگاه اسپکتروفتومتر در برابر غلظت های مختلف باکتری

شکل (۲) و شکل (۳) به ترتیب تعداد کلنی‌های رشد کرده در رقت‌های مختلف باکتری و تعداد باکتری‌ها در ۱ml از رقت‌های مختلف را نمایش میدهد. میتوان استنباط کردکه چون در نمونه اول، میزان غلظت سوسپانسیون بیشتر است در نتیجه تعداد کلنی های رشد کرده حاصل از آن در محیط کشت EMB بیشتر است و به حدود ۴۰۰۰ کلنی میرسد به خاطر رقیق سازی سریالی تعداد کلنی های حاصل از رشد سایر نمونه ها به تدریج کاهش پیدا میکند تا به مقدار نا چیز ۸ کلنی در نمونه آخر میرسد اما با توجه به شکل (۳) میتوان بیان کرد که تعدا باکتری ها در نمونه ۱۰ کاهش یافته اما به صفر نرسیده است .



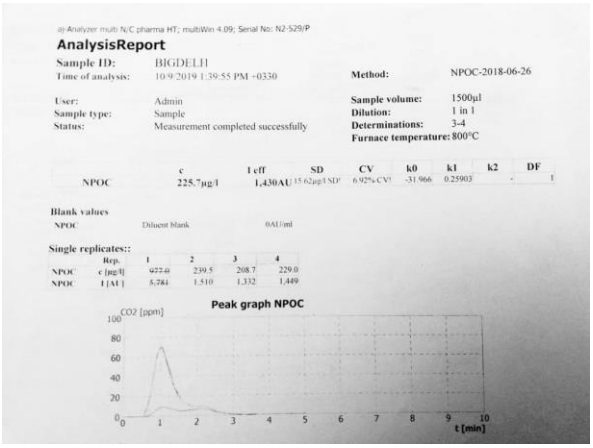
شکل۲- تعداد کلنی باکتری‌های رشد کرده در نمونه های مختلف



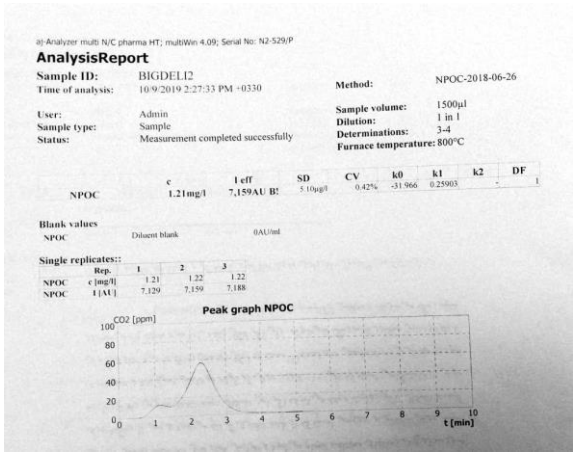
شکل۳- تعداد باکتری‌ها در ۱ml از اسپانسیون

منحنی مقدار کربن آلی در نمونه شاهد و نمونه های با رقت 10^{-1} الی 10^{-10} به ترتیب در اشکال (۴) الی (۱۴) نشان داده شده اند. تمامی آزمایشات TOC برای اطمینان بیشتر دو بار تکرار شدند. به دلیل آنکه مقدار ۰/۰۱ از سوسپانسیون در

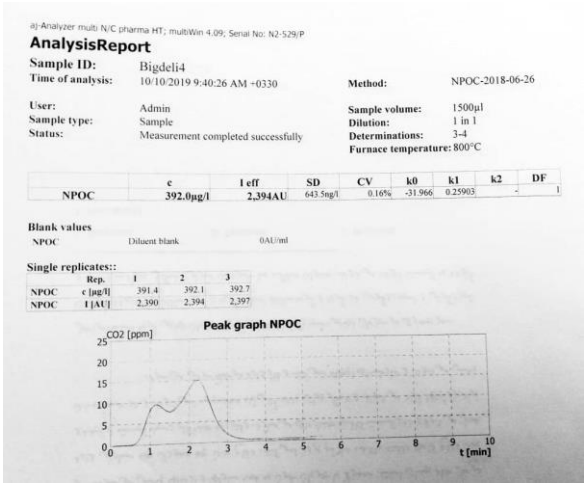
آزمایش TOCاستفاده شد، بنابراین مقدار کربن آلی به دست آمده نیز ۰/۰۱ مقدار واقعی می‌باشد که مقدار واقعی در جدول (۱) ارائه شده است. همچنین نمودار مقایسه مقدار کربن آلی موجود در رقت های مختلف از باکتری در شکل (۱۴) ارائه شده است. برای اینکه آبی برای استفاده در داروسازی مناسب باشد باید مقدار کربن آلی در آن حداکثر $\frac{\mu g}{l}$ ۵۰۰ باشد، اما از نمودار مشاهده می‌شود در کمترین رقت مورد استفاده شده تعداد کربن در هر لیتر $\frac{\mu g}{l}$ ۲۲۷۲۰ است، پس قابل استفاده نمی‌باشد و دستگاه توانایی اندازه‌گیری کمترین مقدار باکتری موجود در محلول مورد آزمایش را دارد.



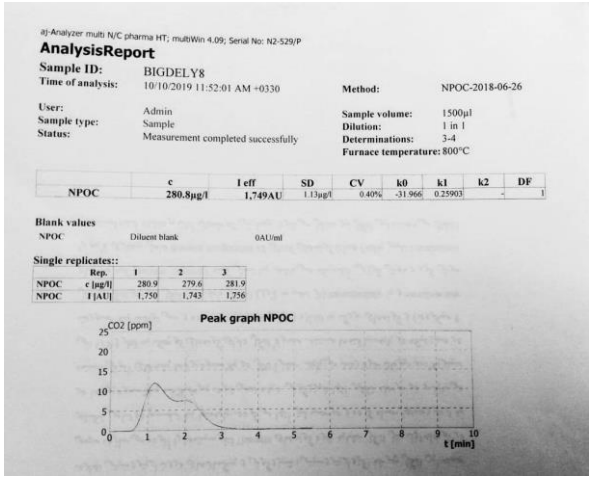
شکل ۴- منحنی مقدار کربن آلی در آب WFI(شاهد)



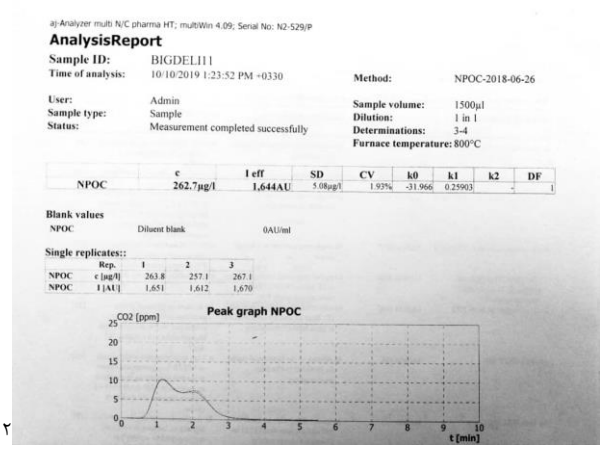
شکل۴- منحنی مقدار کربن آلی در نمونه رقت$^{-1}$۱۰



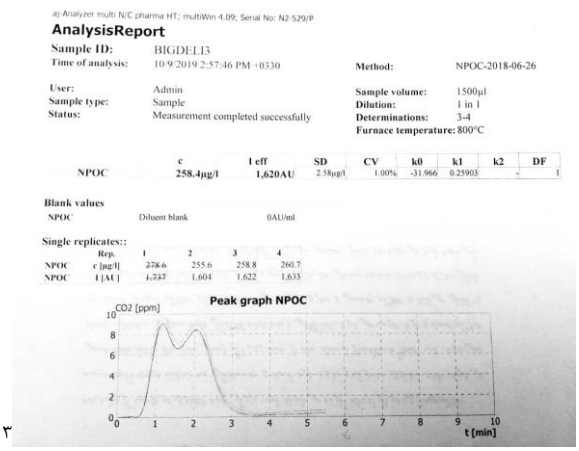
شکل ۶- منحنی مقدار کربن آلی در نمونه رقت$^{-}$۱۰



شکل ۷- منحنی مقدار کربن آلی در نمونه رقت$^{-}$۱۰

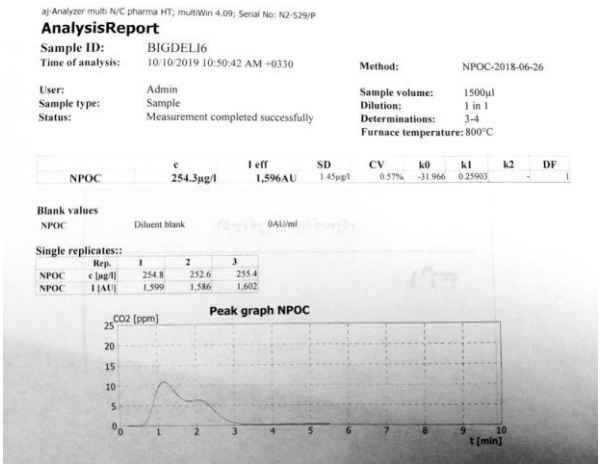


۲



۳

شکل ۸- منحنی مقدار کربن آلی در نمونه رقت$^{-۴}$۱۰


aj-Analyzer multi N/C pharma HT; multiWin 4.09; Serial No: N2-529/P

AnalysisReport

Sample ID: BIGDELI6
Time of analysis: 10/10/2019 10:50:42 AM +0330
Method: NPOC-2018-06-26
User: Admin
Sample type: Sample
Status: Measurement completed successfully
Sample volume: 1500µl
Dilution: 1 in 1
Determinations: 3-4
Furnace temperature: 800°C

	c	I eff	SD	CV	k0	k1	k2	DF
NPOC	254.3µg/l	1,596AU	1.45µg/l	0.57%	-31.966	0.25903	-	1

Blank values

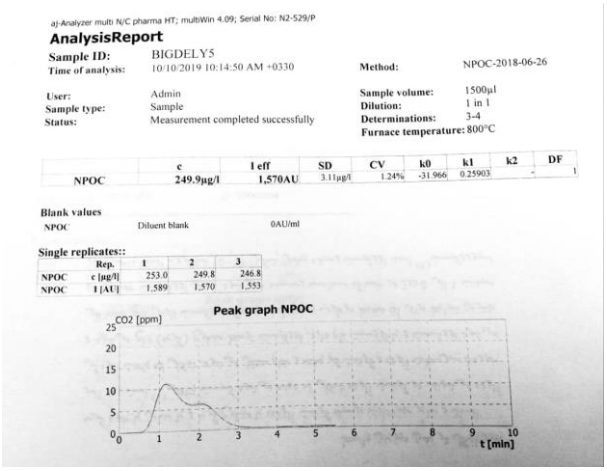
NPOC	Diluent blank	0AU/ml

Single replicates::

	Rep.	1	2	3
NPOC	c [µg/l]	254.8	252.6	255.4
NPOC	I [AU]	1,599	1,586	1,602

Peak graph NPOC

شکل۹- منحنی مقدار کربن آلی در نمونه رقت$^{-۵}$۱۰


aj-Analyzer multi N/C pharma HT; multiWin 4.09; Serial No: N2-529/P

AnalysisReport

Sample ID: BIGDELY5
Time of analysis: 10/10/2019 10:14:50 AM +0330
Method: NPOC-2018-06-26
User: Admin
Sample type: Sample
Status: Measurement completed successfully
Sample volume: 1500µl
Dilution: 1 in 1
Determinations: 3-4
Furnace temperature: 800°C

	c	I eff	SD	CV	k0	k1	k2	DF
NPOC	249.9µg/l	1,570AU	3.11µg/l	1.24%	-31.966	0.25903	-	1

Blank values

NPOC	Diluent blank	0AU/ml

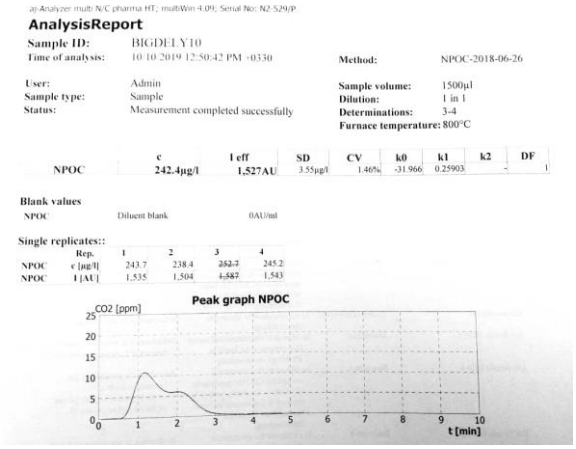
Single replicates::

	Rep.	1	2	3
NPOC	c [µg/l]	253.0	249.8	246.8
NPOC	I [AU]	1,589	1,570	1,553

Peak graph NPOC

شکل۱۰- منحنی مقدار کربن آلی در نمونه رقت$^{-۶}$۱۰

شکل۱۱- منحنی مقدار کربن آلی در نمونه رقت$^{-۷}$۱۰


aj-Analyzer multi N/C pharma HT; multiWin 4.09; Serial No: N2-529/P

AnalysisReport

Sample ID: BIGDELY10
Time of analysis: 10/10/2019 12:50:42 PM +0330
Method: NPOC-2018-06-26
User: Admin
Sample type: Sample
Status: Measurement completed successfully
Sample volume: 1500µl
Dilution: 1 in 1
Determinations: 3-4
Furnace temperature: 800°C

	c	I eff	SD	CV	k0	k1	k2	DF
NPOC	242.4µg/l	1,527AU	3.55µg/l	1.46%	-31.966	0.25903	-	1

Blank values

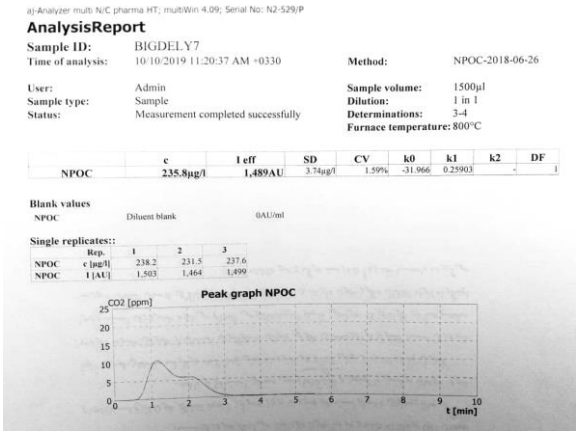
NPOC	Diluent blank	0AU/ml

Single replicates::

	Rep.	1	2	3	4
NPOC	c [µg/l]	243.7	238.4	~~252.7~~	245.2
NPOC	I [AU]	1,535	1,504	~~1,587~~	1,543

Peak graph NPOC

شکل ۱۲- منحنی مقدار کربن آلی در نمونه رقت$^{-۸}$۱۰


aj-Analyzer multi N/C pharma HT; multiWin 4.09; Serial No: N2-529/P

AnalysisReport

Sample ID: BIGDELY7
Time of analysis: 10/10/2019 11:20:37 AM +0330
Method: NPOC-2018-06-26
User: Admin
Sample type: Sample
Status: Measurement completed successfully
Sample volume: 1500µl
Dilution: 1 in 1
Determinations: 3-4
Furnace temperature: 800°C

	c	I eff	SD	CV	k0	k1	k2	DF
NPOC	235.8µg/l	1,489AU	3.74µg/l	1.59%	-31.966	0.25903	-	1

Blank values

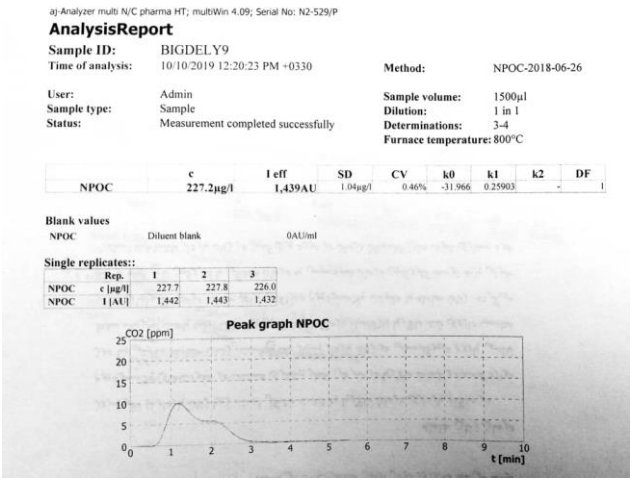
NPOC	Diluent blank	0AU/ml

Single replicates::

	Rep.	1	2	3
NPOC	c [µg/l]	238.2	231.5	237.6
NPOC	I [AU]	1,503	1,464	1,499

Peak graph NPOC

شکل ۱۳- منحنی مقدار کربن آلی در نمونه رقت$^{-۹}$۱۰


aj-Analyzer multi N/C pharma HT; multiWin 4.09; Serial No: N2-529/P

AnalysisReport

Sample ID: BIGDELY9
Time of analysis: 10/10/2019 12:20:23 PM +0330
Method: NPOC-2018-06-26
User: Admin
Sample type: Sample
Status: Measurement completed successfully
Sample volume: 1500µl
Dilution: 1 in 1
Determinations: 3-4
Furnace temperature: 800°C

	c	I eff	SD	CV	k0	k1	k2	DF
NPOC	227.2µg/l	1,439AU	1.04µg/l	0.46%	-31.966	0.25903	-	1

Blank values

NPOC	Diluent blank	0AU/ml

Single replicates::

	Rep.	1	2	3
NPOC	c [µg/l]	227.7	227.8	226.0
NPOC	I [AU]	1,442	1,443	1,432

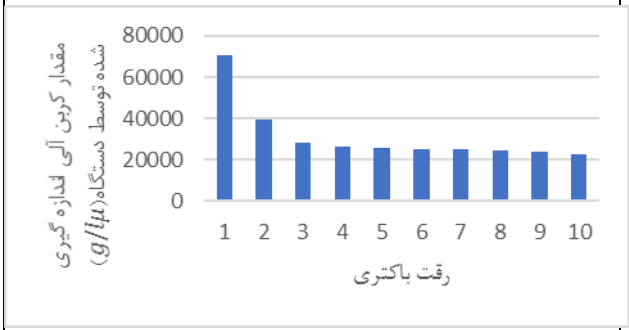
Peak graph NPOC

شکل۱۴- منحنی مقدار کربن آلی در نمونه رقت $^{-۱۰}$۱۰

جدول ۱- مقدار کربن آلی موجود در رقت‌های مختلف باکتری

شماره	رقت‌های مختلف باکتری	مقدار کربن آلی اندازه گیری شده توسط دستگاه $(\frac{\mu g}{l})$
۱	$۱۰^{-۱}$	۷۰۳۲۰
۲	$۱۰^{-۲}$	۳۹۳۰۰
۳	$۱۰^{-۳}$	۲۸۰۸۰
۴	$۱۰^{-۴}$	۲۶۲۷۰
۵	$۱۰^{-۵}$	۲۵۸۴۰
۶	$۱۰^{-۶}$	۲۵۴۳۰
۷	$۱۰^{-۷}$	۲۴۹۹۰
۸	$۱۰^{-۸}$	۲۴۲۴۰
۹	$۱۰^{-۹}$	۲۳۵۸۰
۱۰	$۱۰^{-۱۰}$	۲۲۷۲۰

شکل ۱۵- نمودار مقایسه مقدار کربن آلی موجود در رقابت‌های مختلف از باکتری



جدول ۲- نتایج حاصل از تزریق آندوتوکسین به خرگوش

شماره خرگوش	وزن پیش از تزریق (g)	مقدار محلول تزریق شده (میلی لیتر)	میانگین درجه حرارت قبل از تزریق(°C)	میانگین درجه حرارت بعد از تزریق(°C)	اختلاف درجه پیش و پس از تزریق(°C)
۱	۱۸۰۰	۱۸	۳۷/۹	۳۸/۷	۰/۸
۲	۱۷۰۰	۱۷	۳۷/۵	۳۸	۰/۵
۳	۱۵۰۰	۱۵	۳۷/۷	۳۷/۸	۰/۱
۴	۱۸۵۰	۱۸/۵	۳۷/۹	۳۸/۴	۰/۵
۵	۱۶۰۰	۱۶	۳۸/۲	۳۸/۵	۰/۳
۶	۱۵۰۰	۱۵	۳۷/۸	۳۸	۰/۲
۷	۱۷۰۰	۱۷	۳۸	۳۸/۴	۰/۴
۸	۲۰۰۰	۲۰	۳۷/۵	۳۸/۱	۰/۶
۹	۱۵۰۰	۱۵	۳۷/۵	۳۷/۹	۰/۴
۱۰	۱۹۰۰	۱۹	۳۷/۹	۳۸/۱	۰/۵

جدول ۲ مقدار محلول تزریق شده به هر خرگوش بر حسب وزن خرگوش و میانگین دماهای اندازه گیری شده قبل و بعد از تزریق را نشان میدهد.

طبق دستور العمل مندرج در usp اگر خرگوش بتواند به وجود پیروژن پاسخ دهد باید اختلاف دمای قبل و بعد از تزریق از ۰/۶ درجه سانتی‌گراد بیشتر باشد با توجه به جدول ۲ فقط خرگوش شماره ۱ به تست پیروژن پاسخ مثبت داده است هر چند سایر خرگوش ها نیز افزایش دما داشته اند اما این مقدار کمتر از استاندارد میباشد.

بحث و نتیجه گیری

از نتایج حاصله از دستگاه اسپکتروفتومتر و میزان رشد باکتری در محیط کشت این اطمینان حاصل شدکه تمام محلول ها آلوده به پیروژن هستند پس این انتظار میرفت که پس از تزریق بدن خرگوش به وجود آندوتوکسین واکنش نشان دهد هرچند که در تست‌های خرگوش انجام شده تمامی خرگوش ها پس از تزریق دچار افزایش دما شدند اما فقط در یک مورد (خرگوش اول که از آندوتوکسین محلول رقت 10^{-1} به آن تزریق شده بود) میزان تفاوت افزایش دمای قبل و بعد تزریق بیشتر از ۰/۶ درجه سانتی گراد بود در سایر خرگوش ها افزایش دمای قابل توجهی مشاهده نشد. در واقع اختلاف معناداری بین دمای بدن سایر خرگوش‌های نبوده و تنها خرگوش شماره ۱ دارای اختلاف معنا دار با سایر خرگوش‌ها می‌باشد بنابراین تست خرگوش توانایی نشان دادن آندوتوکسین فقط در یک مورد را نشان داده و این تست برای سنجش مقدار آندوتوکسین در آب WFI مناسب نمی‌باشد. هر چند که تست حیوانی هزینه زیادی برای محققان ندارد اما از لحاظ اخلاقی نیز مورد آزار جانور میشود و همینطور چون آزمایش در شرایط داخلی بدن انجام میشود ،واکنش های تداخلی روی آن تاثیر میگذارند و احتمال ایجاد پاسخ کاذب بالا است .علاوه بر این مشکلاتی اعماز تغییرات شرایط فیزیولوژیی بدن خرگوش‌ها و تغییر شرایط آزمایشگاهی بر نتایج آزمایش تاثیر می‌گذارد، احتمال خطا را افزایش می‌دهد

با توجه به نتایج دریافتی از دستگاه TOC میتوان بیان کرد که این روش توانست وجود آندوتوکسین را در تمامی نمونه ها نشان دهد علاوه بر این حتی مقدار آندوتوکسین را نیز در محلول های مورد آزمایش بیان میکند .از مزایای این روش رسم نمودار توسط خود سیستم می‌باشد که احتمال خطا را کاهش میکند، در این روش قابلیت تکرار آزمایش‌ها در سطح بالا وجود دارد. اما باید توجه کرد که هزینه انجام این آزمایش نسبت به تست حیوانی بسیار زیاد میباشد .علاوه بر این برای پرهیز از تاثیر آلودگی‌های کربنی موجود در هوا و همینطور آلودگی های موجود در محیط آزمایشگاه و ظروف استفاده شده در نتایج آزمایش ، حتما باید این تست در شرایط استریل انجام شود.

کمیسیون فارماکوپه آمریکا در در اواخر ژوئن ۲۰۲۱ اعلام کرد تصمیم به حذف کامل تست پایروزن و استفاده از جایگزین های مناسب گرفته است.اولین آزمایش پایروژن خرگوش درسال ۱۹۸۶ منتشر شد که شامل اندازه گیری تغییرات در دمای بدن خرگوش ها پس از تزریق وریدی بود.اگر چه اکثر پایرون ها اندوتوکسین های باکتریایی هستند اما این تست قادر به تشخیص برخی از پایروژن های غیراندوتوکسینی نیست در نتیجه توصیه میشود از تستی استفاده شود که تایید وجود یا عدم وجود همه ی انواع پایروژن ها را پوشش دهد.اما تنها در صورتی میتوان تست پایروژن خرگوش را حذف کرد که بتوان روشی پیدا کرد که بتواند جایگزین مناسبی برای in vitro باشد. [۴]

تحقیقات مشابه متعددی در این زمینه انجام شده است برای مثال در سال ۲۰۱۶ توسط Carolin Vipond و همکارانش انجام شد که محدودیت های آزمایش پایروژن خرگوش را برای ارزیابی مواد دارویی از جمله واکسن ها مورد پژوهش قرار داده اند و بیان میکنند که این تست اگر چه یک روش دارویی فعلی برای ارزیابی محتوای برخی واکسن ها وسرم ها است اما دارای محدودیت ها مشکلات برای اندازه گیری میزان پیروژیک بودن محلولها میباشدو حتی استفاده از آن بعنوان یک ازمون سازگاری نیز مبهم است زیرا این آزمون به جای پاسخ کمی پاسخ کیفی میدهد و مدلهای خرگوش نیز بسیار متنوع است علاوه به این شواهدی وجود دارد که اندازه گیری افزایش دمای حیوانات در طول سه ساعت حداکثر واکنش تب را نشان نمیدهد در نهایت مقاله استفاده از روش های جایگزین و اعتبار مدلهای حیوانی را پیشنهاد میکند. [۱۱]

در پژوهش مشابه دیگری که توسط آقای جمشیدی در سال ۱۳۶۲ در دانشگاه تهران به منظور بررسی حساسیت LAL و آزمایش پیروژن خرگوش USP انجام شد در این پژوهش ، روش انجام روش تست خرگوش مشابه آنچه ما انجام دادیم می-باشد، بدین صورت که ازمایش های انجام شده مشخص نمود که آستانه بروز تظاهرات پیروژنیک یا Threshold Pyrogenic

TPD (Dose) درمورد محلولهای تزریقی معادل ۱۱/۲۵ واحد آندوتوکسین به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن خرگوش (۲/۲۵ نانوگرم) بود که با یک جهش ناگهانی در درجه حرارت حاصل می‌گردد. با گذاشتن از مرز TPD و ایجاد جهش ناگهانی در دمای بدن خرگوش‌ها، دیگر هیچ گونه افزایش قابل ملاحظه‌ای در درجه حرارت مشاهده نمی‌شد. به‌طوری که حتی افزایش دمای خرگوش‌ها در حضور غلظت آندوتوکسی ۵۰ واحد به ازای هر کیلوگرم وزن خرگوش نیز در همان حد TPD بود بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که پس از رسیدن به حد TPD، افزایش غلظت آندوتوکسین در محلول تزریقی هیچ‌گونه اثری در افزایش دمای بدن خرگوش ها نخواهد داشت. جواب تست در مورد کلیه نمونه های مورد آزمایش، در حضور غلظت‌های آندوتوکسینی ۰/۰۰۵، ۰/۰۵، ۰/۵، ۵ واحد به ازای هر کیلوگرم وزن خرگوش منفی و در حضور غلظت آندوتوکسین ۵۰ واحد به ازای کیلوگرم مثبت بوده و افزایش دما در حد TPD صورت می‌گرفت.

پس میتوان نتیجه گرفت که حساسیت تست خرگوش نسبت به اندوتوکسین اندک است.بهتر است تست های جایگزین دیگری که از حساسیت سرعت و دقت عمل بیشتری نسبت به تست خرگوش برخوردار هستند استفاده شود [۸].

در پژوهش دیگری با عنوان آشنایی با دستگاه اندازه گیری کربن آلی توسط سیدمهری هشترودی و علی مهدی نیا در دانشگاه تهران انجام شد که نتایج حاصله از این پژوهش نشان میدهد که اندازه گیری دستگاهی کربن آلی ، روشی سریع برای بیان میزان کربن آلی موجود در نمونه به صورت اندازه گیری غلظت دی اکسید کربن میباشد . این روش ، یک روش غیر اختصاصی است، چرا که قادر به تشخیص بین گونه ها ی آلی مختلف در نمونه ها نمی باشد وصرفا نمایشگر کل ترکیبات کربنی حاضر در نمونه میباشد . به دلیل اهمیت TOC ، به کارگیری دستگاهی که این اندازه گیری را با دقت بالا ، در زمان کوتاه انجام دهد بسیار مهم است . کربن آلی توسط دو پارامتر توسط دستگاه مورد سنجش قرار میگیرد که به طور معمول دو روش اکسیداسیون حرارتی و نوری مورد استفاده قرار میگیرد و از مزایای این دستگاه مناسب،راحتی کار با دستگاه ، دقت بالای اندازه گیری ، محدودهوسیع غلظت های مورد اندازه گیری زمان کوتاه آنالیز و نیز هزینه مناسب میباشد[۱۲].

با توجه به مقایسه پژوهش‌های مختلف می‌توان نتیجه گرفت که نتیجه حاصل شده از پژوهش ما با سایر پژوهش‌های دیگر هم-خوانی دارد .درنتیجه تست TOC میتواند جایگزین مناسبی برای تست پایروژن خرگوش برای سنجش آب WFIباشد.

نتیجه گیری

این مطالعه با هدف معرفی استراتژی های کاربردی تر برای سنجش کیفیت آب های تزریقی تزریقی و همچنین معرفی تست TOCبعنوان جایگزینی مناسب برای تست حیوانی پیروژن برای ارزیابی کیفیت آب WFI در صنایع داروسازی پرداخته شد . یافته‌های تحقیق و تحلیل‌ها و مقایسه‌های صورت گرفته نشان داد که هر چند دستگاه TOC نیز یک تست غیر اختصاصی برای سنجش پیروژن موجود در مواد تزریقی است اما نسبت به روش دیگر بسیار دقیق تر میباشد و میتواندجایگزین مناسبی برای آن باشد.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه محقق اردبیلی که در تامین مالی این تحقیق کمک کردند همچنین از مسئولین آزمایشگاه های گروه زیست شناسی دانشکده علوم و کارخانه آرتاسرم که همکاری لازم را با ما داشتند کمال تشکر را دارم.

منابع

[1] Miao P, Han K, Jing Q, Zhang CH, Liu T. Electrochemical investigation of endotoxin induced limulus amebocyte lysate gel-clot process. Electrochemistry Communications. January 2013; 26 : 29-32. [abstract]

[2]. Spoladore J, Gimenes I, Bachinski R, Negherbon JP, Hartung T, Granjeiro JM, et al. Standard pyrogen testing of medical product with the bacterial endotoxin test as a substitute for rabbit pyrogen testing,Toxical in vitro. 2021 Aug; 74:105160.

[3]. Melody KT, McCarentney E, Sen S, Duenas G. Optimising care transitions: the role of community pharamacist. Integr pharm Res Pract. 2016 Apr 22; 5: 43-51. Doi:10.2147/IPRP.S87947

[4]. Bulfour H. Rabbite pyrogen test to be replaced by European pharmscopoeia. European Pharmaceutical animal testing Review. July 2021
[5]. Gharacheh S. Evalution of water quality in pharmaceutical industries in terms of total organic matter criteria [dissertation] : Islamic Azad univ; 2016.(Full Text in Persian)
[6]. Richter .K, Grahlow .W.D, Wigert .R., Comparison of the Limulus test with the pyrogen test in rabbits. Acta Biologica et Medica Germanica. 1980; 39(2-3):277-280. [abstract]
[7]. Ghasemian- Safaii H, Yazdani R, Navid Akbar F, Vazirzadeh GH. Maesurement of endotoxin levels in blood of hemodialysis potients by 'LaL' test and comparision of its efficacy with blood culture. Journal of shahid sadoughi. University of medical sciences . 2006; 13(5): 9-14. (Full Text in Persian)
[8]. Jamshidi MH. Campovison of sensitivity of LAL test and rabbit pyrogen test and investigatron of the mechanism of inhibitory effect of electrolytes on LAL test [dissertation]. Favulty of pharmacy: Tehran univ; 1987:page 303. (Full Text in Persian)
[9]. Ghanbari .M. R, Changes in interleukin 6 in miss serum after experimental in flammation of chorio amnion using non-pathogenic Escherichia coil bacterial carcasses [dissertation],Faculty of veterinary medicine: sharekard univ; November 2016:page 50. (Full Text in Persian)
[10]. Moser CP. Understanding the limulus amebocyte lysate and rabbit pyrogen test for low endotoxin recovery studies. American pharmaceutical review. Jan 2015; 18 (6). [abstract]
[11]. Vipond C, Findly L , Feavers I. Care R. Limitations of the rabbit pyrogen test for assessing meningococcal OMV based vaccines.ALTEX .2016;33(1);47-53
Doi:10.14573/altex.1509291 PMID: 26626274
[12]. Seyed Hashtroudi M, Mehdinia A. Journal of Iranian Laboratory Research Society.An introduction to total organic carbon analyser. 2017:1(1);47-51