



LABOR PRAXIS

Print Online Events Services

Mehr Effizienz für Labor und Analytik

www.laborpraxis.de ■ Mai 2012 ■ 36. Jhg. ■ LP 5

LABORTECHNIK

Quantitative Endotoxinbestimmung von Reinstwasser



 **sartorius**

 **Vogel Business Media**

Sonderdruck

Weniger ist mehr

Quantitative Endotoxinbestimmung von Reinstwasser

Für viele Reinstwasseranwendungen ist ein geringer Endotoxingehalt von grundlegender Bedeutung. Deshalb sind besonders zuverlässige Systeme gefragt, beispielsweise wenn es um hochreines Wasser für Applikationen im Bereich der Zellkultur geht.

KATRIN SCHMIDT* UND ELMAR HERBIG**



1 Das Arium pro VF-Reinstwassersystem ist für die Herstellung von Reinstwasser aus vorbehandeltem Trinkwasser konzipiert.

Gehalt an Endotoxinen nicht überschritten werden.

Test auf Endotoxine

Bei der Kultur von Säugetierzellen, die zur Herstellung biopharmazeutischer Produkte (z.B. Immunglobuline) eingesetzt werden, kann die Anwesenheit von Endotoxinen zum Zelltod führen. Daher müssen nachweislich unterhalb der Grenzwerte liegende, hochreine Medien bzw. hochreines Wasser zur Herstellung biopharmazeutischer Produkte oder zur Propagation von Zelllinien bzw. Zellkultur verwendet werden. Ziel dieser Untersuchung ist zu zeigen, dass das vom System Arium pro VF produzierte Reinstwasser einen Gehalt an Endotoxinen aufweist, der weit unterhalb vorgeschriebener Grenzwerte liegt und das erzeugte Reinstwasser für Anwendungen der oben genannten Art eingesetzt werden kann. Eine Methode zum Nachweis von Endotoxinen ist der so genannte LAL-Test (Limulus-Amebocyte-Lysate), der sich die Gerinnung eines Lysates von Amöbozyten, das aus dem Pfeilschwanzkrebs (*Limulus polyphemus*) isoliert wurde, zu Nutze macht. Dabei handelt es sich um eine evolutionär primitive Gerinnungskaskade, welche über die sequenzielle Aktivierung von Proteasen zu einem Gerinnungspfropf führt. Die Gerinnungskaskade [2, 3] kann durch Endotoxine oder alternativ durch β -Glukane (kurzkettige Polysaccharide aus der Zellwand von Hefen und Schimmelpilzen) ausgelöst

Als Endotoxine werden Zellwandbestandteile Gram-negativer Bakterien (z.B. *E.coli*, *Pseudomonaden*) bezeichnet. Sie besitzen einen hydrophilen Polysaccharid- und einen lipophilen Lipidteil und sind – im Gegensatz zu den Bakterien aus denen sie stammen – sehr

hitze- und pH-stabil. Endotoxine gehören zu den Pyrogenen, d.h. sie können bei Kontakt mit Schleimhäuten und bei einem Übertritt ins Blut Fieber erzeugen [1]. Laut gängiger Pharmakopöen dürfen im Herstellprozess pharmazeutischer Produkte die definierten Grenzwerte für den

* K. SCHMIDT:

Sartorius Stedim Biotech GmbH, 37079 Göttingen

** DR. E. HERBIG:

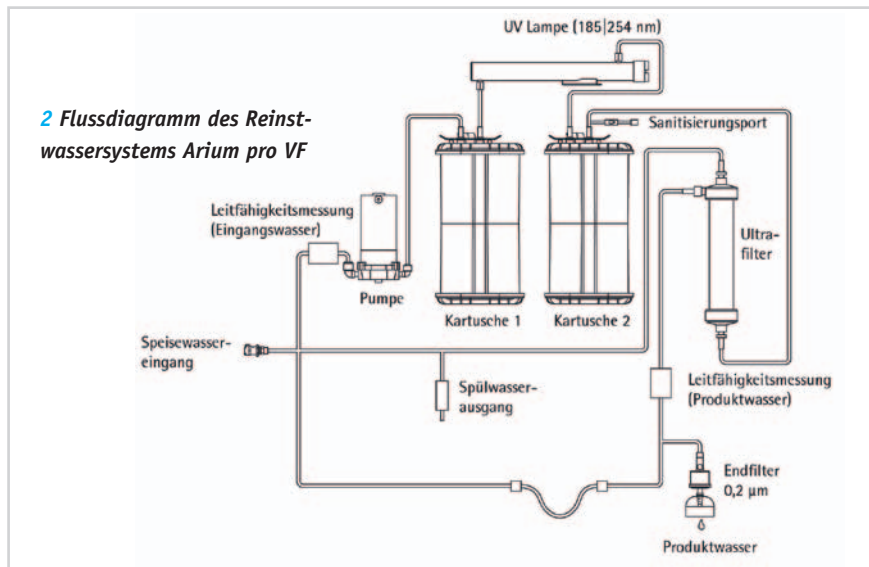
Sartorius Weighing Technology GmbH, 37075 Göttingen, Tel. +49 (0)551/308-3629

werden. Wobei es bei dem Weg über β -Glukane zu falsch positiven Aussagen kommen kann [1]. Das flüssige, farblose Lysat reagiert durch Koagulation zu einem festen milchigen Gel (sog. Gel clot-Methode). Da die Empfindlichkeit des Lysates extrem hoch ist, ist es zwingend notwendig, eine falsch positive Reaktion durch eine Kontamination mit Endotoxinen oder β -Glukane auszuschließen. Daher müssen an das Reinstwasser extrem hohe Reinheitsanforderungen gestellt werden. Neben der Gel clot-Methode, kann der Endotoxin-Gehalt auch über eine quantitative chromogene Methode bestimmt werden. Das Lysat der chromogenen Methode enthält zusätzlich ein synthetisches chromogenes Peptid (chromogenes Substrat). Während bei der Gel clot-Methode durch das Clotting-Enzym ein Gel clot entsteht, wird bei der chromogenen Methode durch das Clotting-Enzym das synthetische chromogene Substrat gespalten und führt zu einer Gelbfärbung. Die Stärke der Gelbfärbung steht in direkter Relation zum Endotoxingehalt der Probe (chromogener Test). Der Ansatz des Lysates (Gel clot- oder Chromogene Methode) muss in hochreinem Wasser erfolgen.

Reinstwasser herstellen

Das System Arium pro VF (s. Abb. 1) wurde für die Herstellung von Reinstwasser aus vorbehandeltem Trinkwasser konzipiert und entfernt aus diesem noch vorhandene Verunreinigungen. Die Reinstwasserproduktion erfordert kontinuierliche Rezirkulation und einen konstanten Wasserfluss, was durch ein Pumpensystem mit Druckregelung erreicht wird. Die Leitfähigkeit des Wassers wird am Speisewasser-Einlass und beim Produktwasser (Wasser-Auslass) gemessen. Das bei den hier dargestellten Untersuchungen verwendete System Arium pro VF arbeitet mit zwei unterschiedlichen Kartuschen. Diese sind mit einem speziellen Aktivkohle-Adsorber und Mischbett-Ionenaustauscherharzen gefüllt, um hochreines Wasser mit einem geringen TOC- Gehalt zu liefern. Weiterhin verfügt das Gerät über eine integrierte UV-Lampe, die bei den Wellenlängen 185 nm und 254 nm keimtötend und oxidierend wirkt.

Bei dem Arium-Reinstwassersystem ist außerdem ein Ultrafilter-Modul eingebaut, das als Crossflow-Filter eingesetzt wird. Die verwendete Ultrafiltermembran hält Kolloide, Mikroorganismen, Endoto-

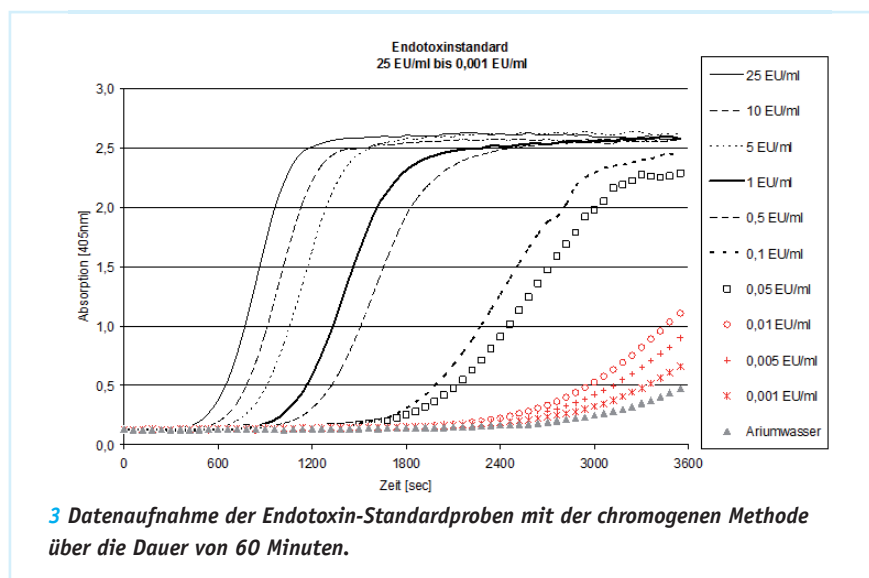


xine, RNA und DNA zurück. Ein am Wasserauslass installierter 0,2 μ m-Endfilter dient der Entfernung von Partikeln und Bakterien aus dem erzeugten Reinstwasser während der Dosierung. Der Prozess der gerätspezifischen Wasserreinigung, ist in Abbildung 2 (Flussdiagramm Arium pro VF) dargestellt. Bei den durchgeführten Versuchen zur Bestimmung von Endotoxinen in Arium pro VF-Reinstwasser wurde sowohl mit der Gel clot-Methode, als auch mit der chromogenen Methode gearbeitet.

- Gel clot-Methode: Das lyophilisierte Lysat (Charles River Endosafe R 15006) wurde in Reinstwasser des Systems Arium pro VF gelöst und portioniert in pyrogenfreien Röhrchen eingefroren. Eine Endotoxinstandardreihe aus LPS E. coli 055:B5

(Lonza N 185) wurde in Reinstwasser des Systems Arium pro VF in den Konzentrationen von 0,001 EU/ml bis 25 EU/ml angesetzt. Das gelöste Lysat wurde mittels des angesetzten Endotoxinstandards auf die angegebene Empfindlichkeit (0,06 EU/ml) überprüft. Zu 100 μ l Lysat wurden 100 μ l Probe zupipettiert und bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach einer Stunde wurde jedes Röhrchen einzeln aus dem Wasserbad entnommen, um 180° gedreht und die Gel clot-Bildung beurteilt.

- Chromogene Methode: Das chromogene Substrat (Charles River Endochrome K R1710K) wurde in Reinstwasser des Systems Arium pro VF gelöst. Dieses chromogene Substrat und Endotoxinstandardproben wurden in endotoxinfreien 96-well-Platten im Verhältnis 1:1 pipettiert. Über



3 Datenaufnahme der Endotoxin-Standardproben mit der chromogenen Methode über die Dauer von 60 Minuten.

Tabelle 1: Bestimmung des Endotoxingehalts in Arium pro VF-Reinstwasser und Endotoxinstandardproben mittels Gel clot- und chromogener Methode

Probe	Endotoxingehalt [EU/ml]*	Gel clot	Chromogene Methode [EU/ml]*
Arium pro VF-Reinstwasser	0	nein	0**
Endotoxinstandard	0,001	nein	0**
Endotoxinstandard	0,005	nein	0**
Endotoxinstandard	0,01	nein	0,009
Endotoxinstandard	0,05	nein	0,055
Endotoxinstandard	0,1	ja	0,083
Endotoxinstandard	0,5	ja	0,63
Endotoxinstandard	1	ja	1,2
Endotoxinstandard	5	ja	4,47
Endotoxinstandard	10	ja	8,4
Endotoxinstandard	25	ja	25

*EU/ml, Endotoxin unit, 1EU entspricht ungefähr 100 picogramm Endotoxin (Daumenregel)
 **unterhalb der quantifizierbaren Nachweisgrenze

die Dauer einer Stunde wurde im Minutentakt die Absorption jeder Probe bei 405 nm in einem Plattenreader Tecan Sa-fire bei 37 °C gemessen.

Ergebnisse

Die Gel clot-Methode zeigte im Bereich von 0,001 EU/ml bis 0,05 EU/ml ein negatives Ergebnis, also keine Gel clot-Bildung (d.h. kein Nachweis von Endotoxinen, siehe Tabelle 1). Eine Konzentration von $\geq 0,1$ EU/ml führte zu einer Gel clot-Bildung. Dieses Ergebnis zeigt, dass im Arium pro VF-Reinstwasser im Rahmen der Nachweisempfindlichkeit der Gel clot-Methode keine Endotoxine vorhanden waren. Bei der Aufnahme der 60 Absorptionsspektren bei 405 nm (s. Abb. 3) im Rahmen der chromogenen Methode ergeben sich je nach Endotoxingehalt der Standard-Proben unterschiedlich verlaufende Kurven. Die Zeiten, die bis zum Erreichen einer bestimmten Absorption be-

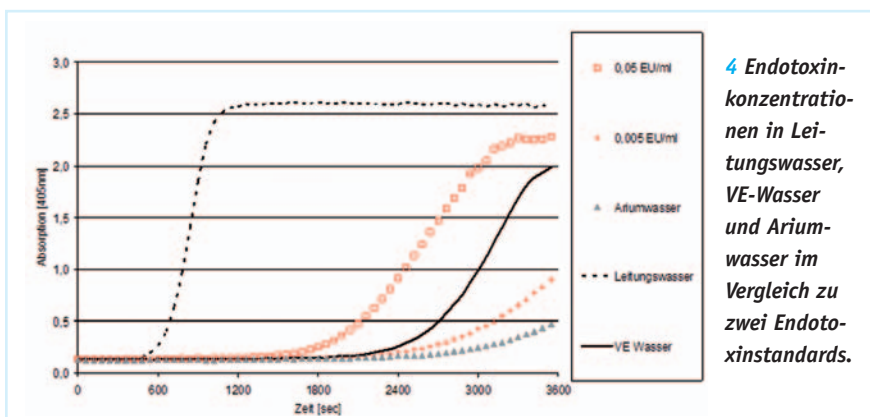
nötigt werden, werden mit einem speziellen Computerprogramm ermittelt und für die Berechnung der Proben mit unbekanntem Endotoxingehalt zu Grunde gelegt. Da die Standardproben mit den geringsten Konzentrationen (0,005 und 0,001 EU/ml), sowie das Ariumwasser den für die Berechnung zugrunde liegenden Extinktionswert von 1 nicht erreichten, wurden sie als unterhalb der Nachweisgrenze liegend bewertet. Die aufgenommenen Messwerte für Arium pro VF-Reinstwasser lagen deutlich unter der Kurve von 0,001 EU/ml. Der Gehalt an Endotoxinen verschiedener Wasserproben (s. Abb. 4) wurde aus den Messwerten der Endotoxinstandards errechnet. In der VE-Wasserprobe wurden Endotoxine von 0,02 EU/ml nachgewiesen, was unterhalb des z.B. gültigen Grenzwertes für WFI (water for injections) ist. Im Leitungswasser wurde mit 25 EU/ml eine sehr hohe Endotoxinbelastung festgestellt. Dieser Befund wurde nicht weiter analysiert.

Dagegen wurde im Reinstwasser aus dem System Arium pro VF ein mit $<0,001$ EU/ml sehr niedriger Wert gemessen, der weit unterhalb gängiger Grenzwerte liegt.

Diskussion

Die Ergebnisse zeigen, dass das vom Arium pro VF produzierte Reinstwasser problemlos und als preiswerte Alternative für die Probenvorbereitung im Rahmen des Endotoxintests verwendet werden kann, da die im produzierten Reinstwasser nachweisbaren Konzentrationen an Endotoxinen sehr gering sind ($<0,001$ EU/ml). Die erzielten Ergebnisse bestätigen frühere Versuche, in denen im Arium-Reinstwasser eine Endotoxinbelastung von $<0,001$ EU/ml gefunden wurde [4]. Die Endotoxinkonzentration im Arium-Reinstwasser liegt weit unterhalb der geforderten Grenzen gemäß United States Pharmacopoeia und es eignet sich daher theoretisch für die Herstellung und Endotoxin-Überwachung pharmazeutischer Produkte. Beispiele sind Produktformulierungen, Diafiltrationslösungen, Chromatographiepuffer, Wasser für Extraktions-, Sanitisierungsschritte oder Zellkulturlösungen. Um die Effekte sowie die Sensibilität von Zellen gegenüber Endotoxinen unter Kontrolle zu halten, sollten daher die Medien zum Anwachsen der Zellen frei von nachweisbaren Endotoxinen sein [5].

Danksagung: Ein besonderer Dank der Autoren gilt Frau Dr. Stephanie Steck von der Firma Rentschler Biotechnologie für die Durchsicht des Manuskriptes sowie für die konstruktive Diskussion zum Thema.



4 Endotoxin-konzentrationen in Leitungswasser, VE-Wasser und Ariumwasser im Vergleich zu zwei Endotoxinstandards.

Literatur

- [1] Steck, S.: Endotoxine und ihre Bedeutung bei R & D Applikationen. Bioforum 6/2006
- [2] Endosafe-PTS Glucan Assay, Charles River Laboratories International, Inc, 2009
- [3] Endotoxin Compendium, V 2.11, Hyglos GmbH, Bernried, Deutschland
- [4] Untersuchungsbericht Fresenius Medical Care, Deutschland GmbH, Werk St. Wendel, 2007
- [5] Dawson, M.E.: LAL Update von Associates of Cape Cod Incorporated, March 1998, Vol. 16, No. 1