

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

**Бактериальные
эндотоксины**

ОФС.1.2.4.0006.15

Взамен ГФ XII, ч.1 ОФС 42-0062-07

Настоящая статья описывает методы определения бактериальных эндотоксинов в лекарственных препаратах, предназначенных для парентерального применения и фармацевтических субстанциях, используемых для их изготовления.

Определение содержания бактериальных эндотоксинов проводят с помощью реактива, представляющего собой лизат клеток крови (амебоцитов) мечехвоста *Limulus polyphemus* (ЛАЛ-реактив) или *Tachypleus tridentatus* (ТАЛ-реактив). ЛАЛ-реактив специфически реагирует с бактериальными эндотоксинами. В результате ферментативной реакции происходит изменение реакционной смеси, пропорциональное концентрации эндотоксина.

Существуют три основных методологических подхода для проведения данного испытания: гель-тромб метод, основанный на образовании геля; турбидиметрический метод, основанный на помутнении реакционной смеси после расщепления субстрата, содержащегося в ЛАЛ-реактиве; и хромогенный метод, основанный на появлении окрашивания после расщепления синтетического пептид-хромогенного комплекса.

В данной статье описаны следующие шесть тестов, основанных на описанных выше принципах:

- Качественный гель-тромб тест (Метод А);
- Количественный гель-тромб тест (Метод В);
- Турбидиметрический кинетический тест (Метод С);
- Хромогенный кинетический тест (Метод D);
- Хромогенный тест по конечной точке (Метод E);
- Турбидиметрический тест по конечной точке (Метод F).

Испытание проводят любым из шести приведенных методов. В случае сомнений или разногласий окончательное заключение принимают на основании результатов, полученных при проведении испытания методом А.

Посуда и ее подготовка

Стеклянная и пластиковая посуда, используемая в ЛАЛ-тесте, не должна содержать бактериальные эндотоксины в количествах, определяемых в тесте, и не должна оказывать влияния на ход реакции.

Рекомендуемым режимом депирогенизации является нагревание при температуре 250 °С не менее 30 минут в соответствии с валидированной процедурой.

Стандарты эндотоксина

Содержание бактериальных эндотоксинов выражается в единицах эндотоксина (ЕЭ) Международного стандарта эндотоксина. Одна международная единица (МЕ) эндотоксина соответствует одной ЕЭ.

При проведении анализа может использоваться Контрольный стандарт эндотоксина (КСЭ), активность которого установлена по Международному стандарту эндотоксина. КСЭ должен быть предназначен для проведения анализа с данной партией ЛАЛ-реактива (или ТАЛ-реактива)¹. Растворение и хранение КСЭ осуществляют согласно инструкции фирмы-производителя.

ЛАЛ-реактив

Необходимо использовать ЛАЛ-реактив, предназначенный для выбранного метода определения бактериальных эндотоксинов.

¹ Примечание: Контрольный стандарт эндотоксина и ЛАЛ-реактив или ТАЛ-реактив должны быть зарегистрированы в МЗ РФ.

Чувствительность реактива (λ) выражена в единицах эндотоксина [ЕЭ/мл] и соответствует минимальной концентрации Международного стандарта эндотоксина, которая вызывает образование плотного геля при реакции с данным реактивом (Методы А и В), или соответствует точке с минимальным значением на стандартной кривой (Методы С, D, E и F).

Разведение лиофилизированного ЛАЛ-реактива и его хранение осуществляют согласно инструкции фирмы-производителя.

***Примечание:** ЛАЛ-реактив, кроме эндотоксинов, может реагировать и с некоторыми β -гликанами, поэтому возможно использование специфического ЛАЛ-реактива, у которого удален фактор G, реагирующий с гликанами. Также разрешается применение вспомогательных растворов, которые блокируют реакционную систему фактора G. Такие реактивы могут применяться для определения эндотоксинов в присутствии гликанов.*

Вода для ЛАЛ-теста

Для приготовления растворов реактивов и разведений испытуемого лекарственного средства используют воду для ЛАЛ-теста. Вода для ЛАЛ-теста должна соответствовать требованиям, предъявляемым к воде для инъекций, и при этом не должна содержать бактериальные эндотоксины в количествах, определяемых в тесте.

Подготовка испытуемого образца

Каждый отобранный образец испытывается индивидуально.

Для растворения и/или разведения испытуемого лекарственного средства используют воду для ЛАЛ-теста, если в фармакопейной статье не указан иной растворитель. Испытуемый раствор должен иметь рН в пределах, указанных производителем ЛАЛ-реактива, обычно 6,0 – 8,0. В случае необходимости рН доводят до нужного значения растворами кислоты, основания или с помощью буферного раствора. Используемые растворы не должны содержать бактериальные эндотоксины в количествах, определяемых в тесте, и не должны оказывать влияния на ход реакции.

Максимально допустимое разведение испытуемого лекарственного средства

Максимально допустимое разведение (МДР) представляет собой наибольшее разведение испытуемого лекарственного средства, в котором возможно определение концентрации эндотоксина, соответствующей значению предельного содержания бактериальных эндотоксинов, установленному для данного лекарственного средства.

Испытуемое лекарственное средство может быть проверено в одном разведении или в серии разведений при условии, что конечная степень разведения не превысит значения МДР, которое рассчитывается по формуле:

$$МДР = \frac{\text{Предельное содержание бактериальных эндотоксинов} \cdot \text{Концентрация испытуемого раствора}}{\lambda}$$

где: «предельное содержание бактериальных эндотоксинов» – допустимое содержание бактериальных эндотоксинов в испытуемом лекарственном средстве, указанное в фармакопейной статье;

«концентрация испытуемого раствора» – концентрация лекарственного средства или действующего вещества, для которого указано предельное содержание бактериальных эндотоксинов;

λ — чувствительность ЛАЛ-реактива, в ЕЭ/мл.

Для расчета предельного содержания бактериальных эндотоксинов используют следующую формулу:

$$\text{Предельное содержание бактериальных эндотоксинов} = \frac{K}{M}$$

где: К – пороговая пирогенная доза, равная 5 ЕЭ/кг в 1 час для испытуемого лекарственного препарата (если он вводится пациенту любым парентеральным путем, кроме интратекального). При интратекальном пути введения лекарственного препарата К составляет 0,2 ЕЭ/кг;

М – максимальная терапевтическая доза испытуемого лекарственного средства, вводимая в течение одного часа (выражается в мг, мл или ЕД на 1 кг массы тела).

Для радиофармацевтических лекарственных препаратов, вводимых внутривенно, предельное содержание бактериальных эндотоксинов

рассчитывают как $175/V$, где V – максимальная рекомендованная доза в мл. Для радиофармацевтических лекарственных препаратов, вводимых интратекально, предельное содержание бактериальных эндотоксинов равняется $14/V$.

Для лекарственных препаратов, доза которых рассчитывается на m^2 поверхности тела (например, противоопухолевые препараты), пороговая пирогенная доза (K) составляет $100 EЭ/m^2$.

Гель-тромб тест (Методы А и В)

Гель-тромб метод позволяет установить наличие или измерить количественно концентрацию эндотоксинов в пробе. В результате реакции ЛАЛ-реактива с эндотоксином увеличивается вязкость реакционной смеси вплоть до формирования плотного геля.

Для обеспечения точности и достоверности испытаний заявленную чувствительность ЛАЛ-реактива следует подтвердить, а также провести испытание на наличие мешающих факторов, как описано в разделе «Предварительные анализы».

Процедура испытания. В круглодонные пробирки диаметром 10 мм вносят равные объемы испытуемого раствора и ЛАЛ-реактива (по 0,1 мл). Реакционные смеси аккуратно перемешивают и инкубируют при температуре 37 ± 1 °С в течение 60 ± 2 минут. Во время инкубирования следует избегать вибрации и ударов. По истечении указанного срока визуально регистрируют результаты как положительные или отрицательные. Положительная реакция (+) характеризуется образованием плотного геля, который не разрушается при аккуратном однократном переворачивании пробирки на 180°. Отрицательная реакция (–) характеризуется отсутствием такого геля.

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ АНАЛИЗЫ

Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива

Анализ проводят для каждой новой серии используемого ЛАЛ-реактива, а также при изменении условий эксперимента, используемых материалов и реактивов, способных повлиять на результаты теста.

Процедура испытания. Для проведения анализа готовят растворы С и D по схеме, приведенной в Таблице 1.

Таблица 1 - Схема эксперимента «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива»

Раствор	Исходный раствор	Растворитель	Фактор разведения	Конечная концентрация КСЭ в испытуемом растворе	Количество повторностей
С	Раствор КСЭ в воде для ЛАЛ-теста с концентрацией 2λ	Вода для ЛАЛ-теста	1	2λ	4
			2	1λ	4
			4	0,5λ	4
			8	0,25λ	4
D	Вода для ЛАЛ-теста	—	—	—	2

Растворы С – серия разведений КСЭ в воде для ЛАЛ-теста (проверка чувствительности ЛАЛ-реактива);

Раствор D – вода для ЛАЛ-теста (отрицательный контроль).

Опыт проводят, как описано в разделе «Процедура анализа».

Результаты и интерпретация. Анализ считают достоверным, если:

– для *раствора D* (отрицательный контроль) во всех повторностях получены отрицательные результаты;

– для *раствора С* с концентрацией 2λ, получены положительные результаты;

– для *раствора С* с концентрацией 0,25λ, получены отрицательные результаты.

Конечной точкой реакции для каждой из повторностей *раствора С* является положительный результат, полученный для раствора с наименьшей концентрацией КСЭ. По этим результатам рассчитывается среднее геометрическое значение чувствительности ЛАЛ-реактива по следующей формуле:

$$\text{Среднее геометрическое значение концентраций КСЭ в конечной точке реакции} = \text{antilog} \left(\frac{\sum e}{f} \right),$$

где: $\sum e$ – сумма логарифмов концентраций КСЭ в конечной точке реакции в каждой из повторностей;

f – число повторностей.

Заявленная чувствительность ЛАЛ-реактива считается подтвержденной и используется в дальнейших расчетах в том случае, если полученное в эксперименте значение чувствительности ЛАЛ-реактива, не менее $0,5\lambda$ и не более 2λ .

Мешающие факторы

Испытуемое лекарственное средство может содержать мешающие факторы, усиливающие и/или ингибирующие реакцию ЛАЛ-реактива с бактериальными эндотоксинами. Обнаружить эти явления можно, сравнив способность используемого ЛАЛ-реактива реагировать с раствором КСЭ в воде для ЛАЛ-теста и в растворе испытуемого лекарственного средства в стандартных условиях проведения эксперимента.

Испытанию может быть подвергнуто лекарственное средство в любом разведении, не превышающем значения МДР. Используемые в данном анализе пробы испытуемого лекарственного средства (или его разведения) не должны содержать бактериальных эндотоксинов в определяемых в тесте количествах.

Процедура испытания. Для проведения анализа готовят растворы А – D по схеме, приведенной в Таблице 2.

Раствор А – испытуемое лекарственное средство в выбранном разведении (контроль отсутствия бактериальных эндотоксинов);

Растворы В – серия разведений КСЭ в растворе испытуемого лекарственного средства (выявление возможности ингибирования или усиления реакции);

Растворы С – серия разведений КСЭ в воде для ЛАЛ-теста (положительный контроль);

Раствор D – вода для ЛАЛ-теста (отрицательный контроль).

Таблица 2 - Схема эксперимента «Мешающие факторы»

Раствор	Исходный раствор	Растворитель	Фактор разведения	Конечная концентрация эндотоксина в испытуемом растворе	Количество повторностей
A	Испытуемое лекарственное средство	—	—	—	4
B	Испытуемое лекарственное средство, содержащее КСЭ в концентрации 2λ	Испытуемое лекарственное средство	1	2λ	4
			2	1λ	4
			4	0,5λ	4
			8	0,25λ	4
C	Раствор КСЭ в воде для ЛАЛ-теста с концентрацией 2λ	Вода для ЛАЛ-теста	1	2λ	2
			2	1λ	2
			4	0,5λ	2
			8	0,25λ	2
D	Вода для ЛАЛ-теста	—	—	—	2

Опыт проводят, как описано в разделе «Процедура анализа».

Результаты и интерпретация. Результаты эксперимента считаются достоверными, если:

– для растворов A и D получены отрицательные результаты во всех повторностях;

– для растворов C (положительный контроль) среднее геометрическое значение концентрации бактериальных эндотоксинов составляет не менее 0,5λ и не более 2λ.

По результатам, полученным для каждой из повторностей растворов B, рассчитывают среднее геометрическое значение чувствительности ЛАЛ-реактива. Расчет проводят, как описано в разделе «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива». Если полученное среднее значение оказалось не менее 0,5λ и не более 2λ, считают доказанным, что испытуемое лекарственное средство в выбранном разведении не содержит мешающих факторов, способных ингибировать и/или усиливать реакцию ЛАЛ-реактива с бактериальными эндотоксинами и оно может быть подвергнуто анализу на содержание бактериальных эндотоксинов.

Если обнаружено присутствие мешающих факторов для испытуемого лекарственного средства, которое проверялось в разведении, меньшем МДР, анализ повторяют в большем разведении, вплоть до разведения, равного МДР. В большинстве случаев дополнительное разведение испытуемого лекарственного средства способно устранить действие мешающих факторов. Использование ЛАЛ-реактива большей чувствительности позволяет увеличить степень разведения.

Действие мешающих факторов может быть преодолено соответствующей подготовкой образца, например, фильтрацией, нейтрализацией, диализом или температурной обработкой. Выбранный способ удаления мешающих факторов не должен изменять концентрацию бактериальных эндотоксинов в испытуемом лекарственном средстве, поэтому к раствору испытуемого лекарственного средства КСЭ известной концентрации добавляют перед проведением такой обработки, после чего проводят анализ «*Мешающие факторы*». Если после обработки выбранным способом результаты анализа окажутся удовлетворительными, то испытуемое лекарственное средство может быть подвергнуто анализу на содержание бактериальных эндотоксинов.

Если испытуемое лекарственное средство нельзя освободить от мешающих факторов, оно не может быть исследовано на предмет содержания бактериальных эндотоксинов с помощью ЛАЛ-теста.

КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ (Метод А)

Задачей этого анализа является подтверждение того, что содержание бактериальных эндотоксинов в испытуемом образце не превышает значения предельного содержания бактериальных эндотоксинов, указанного в фармакопейной статье.

Процедура испытания. Для проведения анализа готовят *Растворы А – D* по схеме, приведенной в Таблице 3.

Раствор А – испытуемое лекарственное средство в разведении, в котором отсутствуют мешающие факторы, или в большем разведении, не превышающем МДР;

Раствор В – испытуемое лекарственное средство в выбранном разведении, к которому добавлен КСЭ. Конечная концентрация эндотоксина в анализируемом растворе должна составлять 2λ (положительный контроль испытуемого образца).

Раствор С – раствор КСЭ в воде для ЛАЛ-теста с конечной концентрацией 2λ (положительный контроль).

Раствор D – вода для ЛАЛ-теста (отрицательный контроль).

Анализ проводят, как описано в разделе «Процедура анализа».

Таблица 3 - Схема эксперимента «Качественный анализ»

Раствор	Исходный раствор	Конечная концентрация эндотоксина (КСЭ) в испытуемом растворе	Количество повторностей
А	Испытуемое лекарственное средство	—	2
В	Испытуемое лекарственное средство, содержащее КСЭ в концентрации 2λ	2λ	2
С	Раствор КСЭ в воде для ЛАЛ-теста с концентрацией 2λ	2λ	2
D	Вода для ЛАЛ-теста	—	2

Результаты и интерпретация. Анализ считают достоверным, если:

– для *раствора D* (отрицательный контроль) получены отрицательные результаты в обеих повторностях,

– для *раствора С* (положительный контроль) во всех повторностях получены положительные результаты,

– для *раствора В* (положительный контроль испытуемого образца) в обеих повторностях получены положительные результаты.

Если для *раствора А* в двух повторностях получены отрицательные результаты, лекарственное средство считают выдержавшим испытания.

Если для испытуемого лекарственного средства в разведении, меньшем МДР, в двух повторностях получены положительные результаты, анализ следует повторить в большем разведении или в разведении, равном МДР.

Если для испытуемого лекарственного средства в разведении, равном МДР, в двух повторностях получены положительные результаты, то лекарственное средство не соответствует требованиям раздела «Бактериальные эндотоксины» фармакопейной статьи.

Если положительный результат получен в одной из повторностей для *раствора А*, то проводят повторный анализ. Лекарственное средство считается выдержавшим испытания, если в повторном анализе для двух повторностей получены отрицательные результаты.

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ (Метод В)

Этим методом определяют содержание бактериальных эндотоксинов с помощью ряда последовательных разведений испытуемого лекарственного средства.

Процедура испытания. Для проведения анализа готовят *Растворы А – D* по схеме, приведенной в Таблице 4.

Растворы А – разведения испытуемого лекарственного средства, начиная с того разведения, в котором отсутствуют мешающие факторы, до наибольшего разведения, не превышающего МДР.

Раствор В – наименьшее разведение из серии разведений раствора *А*, к которому добавлен раствор КСЭ. Конечная концентрация эндотоксина в анализируемом растворе должна составлять 2λ (положительный контроль испытуемого образца).

Растворы С – серия разведений КСЭ в воде для ЛАЛ-теста (положительный контроль).

Раствор D – вода для ЛАЛ-теста (отрицательный контроль).

Анализ проводят, как описано в разделе «Процедура анализа».

Таблица 4 - Схема эксперимента «Количественный анализ»

Раствор	Исходный раствор	Растворитель	Фактор разведения	Конечная концентрация КСЭ в испытуемом растворе	Количество повторностей
А	Испытуемое лекарственное средство	Вода для ЛАЛ-теста	1	—	2
			2	—	2
			4	—	2
			8	—	2
			и т.д. до МДР		
В	Испытуемое лекарственное средство, содержащее КСЭ в концентрации 2λ	Испытуемое лекарственное средство	1	2λ	2
С	Раствор КСЭ в воде для ЛАЛ-теста с концентрацией 2λ	Вода для ЛАЛ-теста	1	2λ	2
			2	1λ	2
			4	0,5λ	2
			8	0,25λ	2
Д	Вода для ЛАЛ-теста	—	—	—	2

Результаты и интерпретация. Анализ считают достоверным, если:

– для *раствора D* (отрицательный контроль) получены отрицательные результаты в двух повторностях,

– для *растворов C* (положительный контроль) среднее геометрическое значение концентрации бактериальных эндотоксинов составляет не менее 0,5λ и не более 2λ.

– для *раствора B* (положительный контроль испытуемого образца) получены положительные результаты в двух повторностях,

Для *растворов A* конечной точкой реакции является положительный результат, полученный для наибольшего разведения испытуемого лекарственного средства.

Значение произведения фактора этого разведения на величину чувствительности ЛАЛ-реактива (λ) равно концентрации эндотоксина в *растворе A*, полученной для данной повторности. Среднее геометрическое значение концентрации эндотоксина рассчитывают, как описано в разделе «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива».

Если во всех повторностях серии *растворов А* получены отрицательные результаты, то концентрация бактериальных эндотоксинов в испытуемом лекарственном средстве меньше величины произведения чувствительности ЛАЛ-реактива и наименьшего фактора разведения. Если во всех повторностях серии *растворов А* получены положительные результаты, то концентрация бактериальных эндотоксинов в испытуемом лекарственном средстве больше величины произведения чувствительности ЛАЛ-реактива и наибольшего фактора разведения.

Лекарственное средство считают выдержавшим испытание, если определенное в эксперименте среднее значение содержания бактериальных эндотоксинов менее значения предельного содержания бактериальных эндотоксинов, указанного в фармакопейной статье.

ФОТОМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ (Методы С, D, E и F)

ТУРБИДИМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ (С и F)

Турбидиметрические методы относятся к фотометрическим методам, основанным на измерении степени мутности реакционной смеси. В зависимости от принципа, положенного в основу проведения испытания, указанный метод может быть проведен как турбидиметрический тест по конечной точке, либо как турбидиметрический кинетический анализ.

Турбидиметрический тест по конечной точке (Метод F) основан на измерении степени мутности реакционной смеси в конце инкубационного периода, которая зависит от концентрации эндотоксина.

Турбидиметрический кинетический тест (Метод С) основан на определении скорости развития мутности реакционной смеси, измеряемой по времени, необходимому для достижения заданной величины оптической плотности.

Испытание проводят при температуре инкубирования, рекомендованной производителем ЛАЛ-реактива (обычно $37 \pm 1^\circ\text{C}$).

ХРОМОГЕННЫЕ МЕТОДЫ (D и E)

Хромогенные методы используют для измерения количества хромофора, высвободившегося из хромогенного субстрата в результате реакции эндотоксинов с ЛАЛ-реактивом. В зависимости от принципа, положенного в основу испытания, этот метод может быть проведен как хромогенный тест по конечной точке или как хромогенный кинетический анализ.

Хромогенный тест по конечной точке (Метод Е) основан на измерении интенсивности окраски реакционной смеси, зависящей от количества хромофора, высвободившегося в конце инкубационного периода. Количество, выделившегося хромофора, зависит от концентрации эндотоксина.

В процессе испытания хромогенным кинетическим методом (метод D) определяют скорость развития окраски реакционной смеси, измеряемой по времени, необходимому для достижения заданной величины оптической плотности реакционной смеси.

Испытание проводят при температуре инкубирования, рекомендованной производителем ЛАЛ-реактива (обычно $37 \pm 1^\circ\text{C}$).

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ АНАЛИЗЫ

Для подтверждения достоверности и точности испытания турбидиметрическим или хромогенным методом проводят предварительные анализы, позволяющие убедиться в достоверности критериев для стандартной кривой и в том, что испытуемый раствор не содержит факторов, мешающих проведению реакции.

При внесении любых изменений, способных повлиять на результаты эксперимента, требуется дополнительное подтверждение достоверности и точности испытания.

Проверка достоверности критериев стандартной кривой

Анализ проводят для каждой новой серии ЛАЛ-реактива.

Для построения стандартной кривой из исходного раствора КСЭ готовят не менее трех различных концентраций эндотоксина в соответствии с рекомендациями производителя ЛАЛ-реактива. Анализ проводят, как минимум, в трех повторностях в условиях, предусмотренных производителем ЛАЛ-реактива (объемные соотношения, время инкубирования, температура, рН и т.д.).

Если в кинетических методах необходимо построить стандартную кривую с диапазоном КСЭ, превышающим $2 \lg$ величины концентрации эндотоксина для каждого изменения диапазона измерения на \lg величины концентраций эндотоксина, в схему опыта необходимо включить раствор КСЭ соответствующей концентрации.

Для проверяемого диапазона концентраций эндотоксина абсолютное значение коэффициента корреляции $|r|$ должно быть равно или более 0,980.

Мешающие факторы

Испытанию может быть подвергнуто лекарственное средство в любом разведении, не превышающем значения МДР.

Процедура испытания. Готовят растворы А – D, как указано в Таблице 5. Испытание растворов А, В, С и D проводят по меньшей мере в двух повторностях, в соответствии с рекомендациями производителя ЛАЛ-реактива (объемы и объемные соотношения испытуемого препарата и ЛАЛ-реактива, время инкубирования, температура, рН и т.д.).

Таблица 5 - Схема эксперимента «Мешающие факторы»

Раствор	Концентрация эндотоксина	Раствор, к которому добавлен эндотоксин	Количество повторностей
А	—	Испытуемый раствор	Не менее 2
В	Средняя концентрация стандартной кривой	Испытуемый раствор	Не менее 2
С	Не менее 3-х концентраций (наименьшая концентрация обозначается λ)	Вода для ЛАЛ-теста	Не менее 2 для каждой из концентраций
D	—	Вода для ЛАЛ-теста	Не менее 2

Раствор А — раствор испытуемого лекарственного средства в разведении, не превышающем значение МДР;

Раствор В — испытуемое лекарственное средство в выбранном разведении, к которому добавлен КСЭ. Конечная концентрация эндотоксина в анализируемом растворе должна соответствовать или быть близкой среднему значению концентраций КСЭ, использованных для построения стандартной кривой (положительный контроль испытуемого образца);

Растворы С — растворы КСЭ, используемые для построения стандартной кривой в тех же концентрациях, которые использовались при проведении анализа «Проверка достоверности критериев стандартной кривой» (положительный контроль);

Раствор D — вода для ЛАЛ-теста (отрицательный контроль).

Испытание считают достоверным, если соблюдены следующие условия:

– результаты, полученные для стандартной кривой (Раствор С) соответствуют требованиям достоверности, установленным в разделе «Проверка достоверности критериев для стандартной кривой»;

– результат, полученный для раствора D (отрицательный контроль) не превышает значения величины, указанной в инструкции к используемому ЛАЛ-реактиву или менее концентрации эндотоксина, определяемой используемым методом.

Полученное в опыте среднее значение концентрации добавленного эндотоксина рассчитывают, вычитая из среднего значения концентрации эндотоксина в *растворе В* (содержащего добавленный эндотоксин) среднее значение концентрации эндотоксина в *растворе А* (при его наличии).

Считают доказанным, что испытуемый раствор не содержит мешающих факторов, если в условиях испытания измеренная концентрация эндотоксина, добавленного в испытуемый раствор, составляет 50–200% от известной концентрации добавленного эндотоксина.

Если определенная в опыте концентрация эндотоксина не укладывается в заданные рамки, делают заключение, что испытуемый препарат содержит факторы, мешающие реакции. В этом случае опыт может быть повторен в большем разведении, вплоть до разведения, равного МДР. Помимо большего разведения испытуемого препарата, влияние мешающих факторов может быть преодолено соответствующей обработкой, например, фильтрацией, нейтрализацией, диализом или температурным воздействием. Выбранный способ удаления мешающих факторов не должен приводить к уменьшению концентрации бактериальных эндотоксинов в испытуемом лекарственном средстве, поэтому перед проведением такой обработки к испытуемому раствору следует сначала добавить раствор КСЭ известной концентрации, после чего повторить анализ «Мешающие факторы». Если после обработки выбранным способом результаты анализа окажутся удовлетворительными, то испытуемое лекарственное средство может быть подвергнуто анализу на содержание бактериальных эндотоксинов.

Проведение испытания

Процедура испытания. Испытание проводят в соответствии с методикой, приведенной в разделе «Мешающие факторы».

Результаты. Для *раствора А* в каждой повторности определяют концентрацию эндотоксинов, используя стандартную кривую, полученную на основании серий разведений КСЭ (*Раствор С*).

Испытание считают достоверным, если соблюдены следующие условия:

1. результаты, полученные для стандартной кривой (*Растворы С*), соответствуют требованиям достоверности, установленным в разделе «Проверка достоверности критериев для стандартной кривой»;
2. определенная в опыте концентрация эндотоксина, добавленного к *раствору В* после вычитания значения концентрации эндотоксина, определённого в *растворе А*, находится в пределах от 50 до 200% от известной величины;

3. результат, полученный для *раствора D* (отрицательный контроль), не превышает значения величины, указанной в инструкции к используемому ЛАЛ-реактиву или менее концентрации эндотоксина, определяемой используемым методом.

Интерпретация результатов. Лекарственное средство считают выдержавшим испытание, если определенное в эксперименте среднее значение содержания бактериальных эндотоксинов в повторностях *раствора A* (с учетом разведения и концентрации испытуемого лекарственного средства) менее значения предельного содержания бактериальных эндотоксинов, указанного в фармакопейной статье.