2.1.6.8. БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЭНДОТОКСИНЫ

Общая фармакопейная статья соответствует аналогичному тексту, гармонизированному в рамках Фармакопейной дискуссионной группы (PDG). Негармонизированный текст обозначен символами «♦♦».

Испытание на бактериальные эндотоксины проводят для обнаружения или количественного определения эндотоксинов грамотрицательных бактерий с использованием лизата амёбоцитов мечехвоста (*Limulus polyphemus* или *Tachypleus tridentatus*). Существуют 3 способа выполнения данного испытания: гель-тромб метод, основанный на образовании геля; турбидиметрический метод, основанный на появлении помутнения в результате расщепления эндогенного субстрата; хромогенный метод, основанный на появлении окрашивания в результате расщепления синтетического пептид-хромогенного комплекса.

В данной статье описаны следующие 6 методов испытания:
– Метод A. Гель-тромб метод (предельное содержание);
– Метод B. Гель-тромб метод (количественное содержание);
– Метод C. Турбидиметрический кинетический метод;
– Метод D. Хромогенный кинетический метод;
– Метод E. Хромогенный метод по конечной точке;
– Метод F. Турбидиметрический метод по конечной точке.

Испытание проводят любым из этих шести методов. В случае сомнений или разногласий окончательное решение принимают на основании результатов, полученных при проведении испытания методом A, при отсутствии других указаний в частной фармакопейной статье.

Испытание проводят таким образом, чтобы избежать загрязнения бактериальными эндотоксинами.

1. ОБОРУДОВАНИЕ

Всю стеклянную посуду и другое термостойкое оборудование депирогенизируют методом сухожаровой стерилизации в соответствии с валидированной процедурой. Минимальные время и температура, обычно используемые для стерилизации, составляют 30 мин и 250 °C Обычно используют стерилизацию при температуре 250 °C в течение 30 мин. Используемые пластиковые расходные материалы, такие как микропланшеты и наконечники для автоматических пипеток-дозаторов, не должны содержать на своей поверхности бактериальные эндотоксины в обнаруживаемых количествах и не должны оказывать влияния на ход реакции.

Примечание: в данной общей фармакопейной статье термин «пробирка» включает все типы ёмкостей, например, лунки микропланшета.

2. РЕАКТИВЫ

2.1 ЛИЗАТ АМЁБОЦИТОВ

Лизат амёбоцитов представляет собой лиофильно высушенный лизат амёбоцитов мечехвоста *(Limulus polyphemus* или *Tachypleus tridentatus)*. Реактивом является только продукт, произведенный в соответствии с установленными требованиями.

Примечание: лизат амёбоцитов реагирует, помимо эндотоксинов, с некоторыми β-глюканами. Доступны реактивы лизата амёбоцитов, которые не реагируют с

глюканами; их получают путём удаления из лизата амёбоцитов G-фактора, реагирующего с глюканами, или путём ингибирования реакции с G-фактором лизата амёбоцитов. Такие реактивы могут быть использованы для определения эндотоксинов в присутствии глюканов.

2.2 ВОДА ДЛЯ ИСПЫТАНИЙ НА БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЭНДОТОКСИНЫ (ВОДА ДЛЯ БЭТ)

Вода для инъекций Р или вода, полученная другими методами, которая не реагирует с используемым лизатом на пределе его обнаружения.

2.3 РАСТВОР ЛИЗАТА

Раствор получают путём растворения при осторожном перемешивании лизата амёбоцитов в воде для БЭТ или в буферном растворе в соответствии с рекомендациями производителя. Восстановленный лизат хранят в охлаждённом или в замороженном виде в соответствии с указаниями производителя.

3. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ИСХОДНОГО РАСТВОРА СТАНДАРТНОГО ОБРАЗЦА ЭНДОТОКСИНА

Исходный раствор стандартного образца эндотоксина готовят из стандартного образца эндотоксина, например, *СО ФЕАЭС эндотоксина*, калиброванного по международному стандартному образцу.

Содержание бактериальных эндотоксинов выражают в международных единицах стандарта эндотоксина. Эквивалентность международного стандартного образца в международных единицах устанавливается Всемирной организацией здравоохранения.

Примечание: одна международная единица (МЕ) эндотоксина соответствует одной единице эндотоксина (ЕЭ).

Исходный раствор стандартного образца эндотоксина готовят и хранят в соответствии с указаниями производителя.

4. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ СРАВНЕНИЯ ЭНДОТОКСИНА

Исходный раствор стандартного образца эндотоксина интенсивно перемешивают и готовят подходящую серию разведений, используя воду для БЭТ.

Во избежание потери активности из-за адсорбции растворы используют так быстро, как только возможно.

5. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ИСПЫТУЕМЫХ РАСТВОРОВ

Для растворения и (или) разведения испытуемого образца используют воду для БЭТ; в некоторых случаях может быть более целесообразным растворение или разведение в других водных растворах. При необходимости доводят pH испытуемого раствора (или его разведения) так, чтобы значение pH смеси испытуемого раствора с лизатом находилось в диапазоне, указанном производителем лизата, обычно от 6,0 до 8,0. При необходимости pH доводят до нужного значения растворами кислот, оснований или с помощью буферных растворов, в соответствии с рекомендациями производителя реактива. Кислоты и основания могут быть приготовлены из концентратов или твердых реактивов с использованием воды для БЭТ в ёмкостях, не загрязненных эндотоксинами. Также должно быть подтверждено отсутствие обнаруживаемых эндотоксинов и мешающих факторов в буферных растворах.

6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАКСИМАЛЬНО ДОПУСТИМОГО РАЗВЕДЕНИЯ

Максимально допустимое разведение (МДР) – это наибольшее разведение испытуемого раствора, при котором может быть определено предельное допустимое содержание бактериальных эндотоксинов. МДР рассчитывают по формулам:

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

Предельное содержание бактериальных эндотоксинов: максимально допустимое содержание бактериальных эндотоксинов в активных фармацевтических субстанциях, вводимых парентерально, определённое на основании дозы лекарственного препарата и равное:

$$\frac{\text{К}}{\text{М}},$$

где К – предельная пирогенная доза бактериальных эндотоксинов из расчёта на 1 килограмм массы тела;

М – максимальная рекомендуемая разовая доза испытуемого лекарственного средства на 1 килограмм массы тела.

В случае необходимости введения лекарственного средства через частые интервалы времени или непрерывно *инфузионно в течение продолжительного периода времени*, в качестве М используют общую максимальную дозу, вводимую в течение одного часа.

Предельное содержание бактериальных эндотоксинов в активных фармацевтических субстанциях, предназначенных для парентерального введения, указывают в фармакопейных статьях в таких единицах измерения, как: МЕ/мл; МЕ/мг; в МЕ/Ед.

Концентрацию испытуемого раствора выражают

– в миллиграммах на миллилитр (мг/мл), если предельное содержание эндотоксинов указано на массу (МЕ/мг);

– в единицах активности на миллилитр (Ед/мл), если предельное содержание эндотоксинов указано на единицу биологической активности (МЕ/Ед);

- в миллилитрах на миллилитр (мл/мл), если предельное содержание эндотоксинов указано на объем (МЕ/мл).

λ – чувствительность лизата амёбоцитов в гель-тромб методе (МЕ/мл) или наименьшая концентрация, заявленная производителем лизата амёбоцитов, используемая в калибровочной кривой турбидиметрических или хромогенных методов.

7. ГЕЛЬ-ТРОМБ МЕТОД (МЕТОДЫ А И В)

Гель-тромб метод позволяет определить наличие или количественное содержание эндотоксинов и основывается на свёртывании лизата в присутствии эндотоксинов. Минимальная концентрация эндотоксинов, необходимая для свёртывания лизата в стандартных условиях, представляет собой заявленную чувствительность лизата. Для обеспечения точности и валидности испытаний следует подтвердить заявленную чувствительность лизата амёбоцитов, а также провести испытание на мешающие факторы, как описано в разделе *7.1. Предварительные испытания.*

7.1. ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ИСПЫТАНИЯ

Подтверждение заявленной чувствительности лизата амёбоцитов

Перед использованием в испытаниях следует подтвердить в четырёх повторностях

чувствительность раствора лизата (λ), выраженную в МЕ/мл. Подтверждение чувствительности лизата выполняют при использовании новой серии лизата или при любом изменении экспериментальных условий, способном повлиять на результат испытания.

Готовят растворы сравнения не менее чем в четырех концентрациях, эквивалентных 2 λ, λ, 0,5 λ и 0,25 λ, путём разбавления исходного раствора стандартного образца эндотоксина водой для БЭТ.

Смешивают равные объёмы раствора лизата и одного из растворов сравнения (например, по 0,1 мл) в каждой пробирке. При использовании лизата амёбоцитов, расфасованного производителем в пробирки или ампулы, добавляют растворы сравнения непосредственно в данные ёмкости. Реакционные смеси инкубируют в течение одинакового периода времени согласно рекомендациям производителя (обычно при температуре от 36 °С до 38 °С в течение 58–62 мин), избегая вибрации. Проверка прочности геля: по истечении указанного периода инкубации каждую пробирку по очереди достают из инкубатора и переворачивают одним плавным движением на 180°. Положительным результатом считают образование плотного геля, который остаётся на месте после переворачивания. Если не образовался плотный гель результат считают отрицательным.

Испытания считают валидными, если раствор сравнения с минимальной концентрацией показывает отрицательные результаты во всех повторностях.

За конечную точку принимают минимальную концентрацию в ряду уменьшающихся концентраций эндотоксина растворов сравнения, приводящую к образованию геля.

Используя антилогарифм среднего значения логарифмов концентраций в конечных точках четырех повторностей определяют среднее геометрическое значение концентрации в конечной точке по формуле:

$$\text{Среднее геометрическое значение конечной точки } = antilog\left(\frac{\sum e}{f}\right),$$

где Σe – сумма lg концентраций в конечных точках в каждой из повторностей;

f – число повторностей.

Среднее геометрическое значение конечной точки представляет собой измеренную чувствительность раствора лизата амёбоцитов (МЕ/мл). Если это значение находится в диапазоне от не менее 0,5 λ до не более 2 λ, то заявленную чувствительность считают подтверждённой и используют в испытаниях с данным лизатом.

Испытание на мешающие факторы

Готовят растворы A, B, C и D по схеме, приведённой в таблице 2.1.6.8.-1, и используя испытуемые растворы в любом разведении, не превышающем МДР (контроль отсутствия бактериальных эндотоксинов), проводят испытание как описано в разделе *7.1. Предварительные испытания. Подтверждение заявленной чувствительности лизата амёбоцитов*.

Определяют среднее геометрическое значение концентрации в конечной точке для раствора B и для раствора C по формуле, описанной в разделе *7.1. Предварительные испытания. Подтверждение заявленной чувствительности лизата амёбоцитов*.

Испытание на мешающие факторы повторяют в случае каких-либо изменений в экспериментальных условиях, которые могут повлиять на результат испытания.

Таблица 2.1.6.8.-1.

Раствор	Концентрация эндотоксина/ Раствор, к которому добавляют эндотоксин	Разбавитель	Фактор разведения	Концентрация эндотоксина	Количество повторностей
A	Нет/ Испытуемый раствор	–	–	–	4
B	2 λ/ Испытуемый раствор	Испытуемый раствор	1 2 4 8	2 λ 1 λ 0,5 λ 0,25 λ	4 4 4 4
C	2 λ/ Вода для БЭТ	Вода для БЭТ	1 2 4 8	2 λ 1 λ 5 λ 0,25 λ	2 2 2 2
D	Нет/Вода для БЭТ	–	–	–	2

Раствор A – испытуемый раствор *(испытуемый образец или испытуемый образец, растворённый, при необходимости, в подходящем растворителе)*, не содержащий обнаруживаемых бактериальных эндотоксинов.
Растворы B – испытание на мешающие факторы.
Растворы C – контроль чувствительности лизата (заявленного производителем).
Раствор D – вода для БЭТ (отрицательный контроль).

Испытание считают валидными, если для растворов A и D получены отрицательные результаты во всех повторностях и результат, полученный для раствора C (положительный контроль), подтверждает заявленную чувствительность лизата.

Если чувствительность лизата амёбоцитов, определённая в растворе B, находится в диапазоне от не менее 0,5 λ до не более 2 λ, то испытуемый раствор не содержит мешающих факторов в используемых экспериментальных условиях. В ином случае испытуемый раствор оказывает влияние на испытание.

Если испытуемый образец оказывает влияние на результат испытания в разведении менее МДР, испытание на мешающие факторы повторяют с использованием большего разведения, но не превышающего МДР. Использование более чувствительного лизата позволяет увеличить разведение испытуемого образца, что может способствовать устранению влияния мешающих факторов.

Мешающие факторы могут быть удалены соответствующей валидированной обработкой, например, фильтрацией, нейтрализацией, диализом или термической обработкой. Чтобы убедиться, что выбранный способ удаления мешающих факторов эффективно устраняет мешающее действие, не уменьшая концентрацию бактериальных эндотоксинов в испытуемом образце, испытание на мешающие факторы повторяют с испытуемым раствором, к которому добавили раствор стандартного образца эндотоксина известной концентрации и подвергли выбранному методу обработки.

7.2. МЕТОД А (ПРЕДЕЛЬНОЕ СОДЕРЖАНИЕ)

Процедура

Готовят растворы A, B, C, D, как указано в таблице 2.1.6.8.-2, и проводят испытание как описано в разделе *7.1. Предварительные испытания. Подтверждение заявленной чувствительности лизата амёбоцитов*.

Таблица 2.1.6.8.-2.

Раствор	**Концентрация эндотоксина/ Раствор, к которому добавляют эндотоксин**	**Количество повторностей**
A	Нет/Разбавленный испытуемый раствор	2
B	2 λ/ Разбавленный испытуемый раствор	2
C	2 λ/Вода для БЭТ	2
D	Нет/ Вода для БЭТ	2

Готовят раствор A и раствор B (положительный контроль продукта), *(испытуемый образец или испытуемый образец, растворённый, при необходимости, в подходящем растворителе)* используя разведение, не превышающее МДР, и обработку, как описано в разделе *7.1. Предварительные испытания. Испытания на мешающие факторы*. Растворы B и C (положительные контроли) содержат стандартный образец эндотоксина в концентрации, соответствующей удвоенной чувствительности лизата. Раствор D (отрицательный контроль) – вода для БЭТ.

Интерпретация *результатов*

Испытание считают валидным, если для растворов B и C в обеих повторностях получены положительные результаты, а для раствора D в обеих повторностях получены отрицательные результаты.

Если для раствора A в обеих повторностях получены отрицательные результаты, испытуемый образец выдерживает испытание.

Если для раствора A в обеих повторностях получен положительный результат, испытуемый образец не выдерживает испытание.

Если для раствора A в одной повторности получен положительный результат, а в другой отрицательный, то проводят повторное испытание. В повторном испытании испытуемый образец считают выдержавшим испытание, если для обеих повторностей раствора A получены отрицательные результаты. Испытуемый образец не выдерживает испытание, если положительный результат получен для одной или двух повторностей раствора A.

Однако если испытуемый образец не выдерживает испытание при разведении меньшем, чем МДР, то испытание может быть повторено при большем разведении, но не превышающем МДР.

3.МЕТОД В (КОЛИЧЕСТВЕННОЕ СОДЕРЖАНИЕ)

Испытание количественно определяет содержание бактериальных эндотоксинов в испытуемом растворе титрованием до конечной точки. Готовят растворы A, B, C, D как указано в таблице 2.1.6.8.-3, и проводят испытание как описано в разделе *7.1. Предварительные испытания. Подтверждение заявленной чувствительности лизата амёбоцитов.*

Расчеты и интерпретация результатов

Испытание считают валидным, если выполняются следующие три условия:

а) для раствора D получены отрицательные результаты в обеих повторностях;

б) для раствора B получены положительные результаты в обеих повторностях;

в) для раствора С средняя геометрическая концентрация в конечной точке находится в диапазоне от 0,5 λ до 2 λ.

Таблица 2.1.6.8-3.

Раствор	Концентрация эндотоксина/ Раствор, к которому добавляют эндотоксин	Разбавитель	Фактор разведения	Концентрация эндотоксина	Количество повторностей
A	Нет/ Испытуемый раствор	Вода для БЭТ	1 2 4 8	– – – –	2 2 2 2
B	2 λ/ Испытуемый раствор	–	1	2 λ	2
C	2 λ/Вода для БЭТ	Вода для БЭТ	1 2 4 8	2 λ 1 λ 0,5 λ 0,25 λ	2 2 2 2
D	Нет/Вода для БЭТ	–	–	–	2

Раствор А – испытуемый раствор *(испытуемый образец или испытуемый образец, растворённый, при необходимости, в подходящем растворителе)* в разведении, в котором отсутствуют мешающие факторы, или в большем разведении, не превышающем МДР *(начальный фактор разведения)*. Готовят серию разведений в воде для БЭТ с концентрациями 1; 1/2; 1/4; 1/8 по отношению к разведению, использованному в испытании на мешающие факторы. При необходимости используют другие последовательные разведения, не превышающие МДР.

Раствор В – раствор А, содержащий стандартный образец эндотоксина в концентрации 2 λ (положительный контроль продукта).

Растворы С – серия разведений стандартного образца эндотоксина в воде для БЭТ в концентрациях 2 λ, λ, 0,5 λ и 0,25 λ.

Раствор D – вода для БЭТ (отрицательный контроль).

Для определения концентрации эндотоксинов в растворе А рассчитывают концентрацию в конечной точке для каждой из повторностей умножая фактор разведения в каждой конечной точке на λ.

Концентрация эндотоксина в испытуемом растворе является концентрацией в конечной точке для всех повторностей. Если испытание проводят с разведённым испытуемым раствором, рассчитывают концентрацию эндотоксина в испытуемом растворе, умножив результат на фактор разведения.

Если ни для одного из разведений испытуемого раствора не получены положительные результаты в испытании, признанном валидным, концентрацию эндотоксина в испытуемом растворе регистрируют как менее λ (или, если испытывался разведённый образец, регистрируют как меньшую, чем наименьший фактор разведения испытуемого образца × λ).

Если для всех разведений получен положительный результат, то концентрацию эндотоксинов регистрируют как равную или большую, чем наибольший фактор разведения, умноженный на λ (например, в таблице 2.1.6.8-3: начальный фактор разведения ×8 × λ).

Испытуемый образец соответствует требованиям испытания, если концентрация эндотоксина в обеих повторностях меньше значения, указанного в частной фармакопейной статье

8. ФОТОМЕТРИЧЕСКИЕ КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ МЕТОДЫ (МЕТОДЫ C, D, E, F)

8.1. ТУРБИДИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД (МЕТОДЫ C И F)

Турбидиметрия относится к фотометрическим методам, основанным на измерении увеличения степени мутности. В зависимости от принципа проведения испытания, указанный метод может быть проведён как турбидиметрический метод по конечной точке, либо как турбидиметрический кинетический метод.

Турбидиметрический метод по конечной точке (метод F) основан на количественном соотношении между концентрацией эндотоксина и степенью мутности (выражающейся в пропускании или поглощении света) реакционной смеси в конце инкубационного периода.

Турбидиметрический кинетический метод (метод C) основан на измерении либо времени, необходимого для достижения заданной величины оптической плотности реакционной смеси, либо скорости увеличения ее степени мутности.

Испытание проводят при температуре инкубации, рекомендованной производителем лизата амёбоцитов (обычно от 36 °C до 38 °C).

8.2. ХРОМОГЕННЫЙ МЕТОД (МЕТОДЫ D И E)

Хромогенные методы основаны на измерении количества хромофора, высвободившегося из подходящего хромогенного пептида в результате реакции эндотоксинов с лизатом амёбоцитов. В зависимости от принципа испытания, этот метод может быть проведён как хромогенный метод по конечной точке или как хромогенный кинетический метод.

Хромогенный метод по конечной точке (метод E) основан на количественном соотношении между концентрацией эндотоксина и количеством хромофора, высвободившегося в конце инкубационного периода.

Хромогенный кинетический метод (метод D) заключается в определении либо времени, требующегося для достижения заданного значения поглощения в реакционной смеси, либо скорости появления окраски.

Испытание проводят при температуре инкубации, рекомендованной производителем лизата амёбоцитов (обычно от 36 °C до 38 °C).

8.3. ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ИСПЫТАНИЯ

Для обеспечения точности и валидности турбидиметрического и хромогенного методов проводят предварительные испытания, позволяющие убедиться, что критерии калибровочной кривой удовлетворены и что испытуемый раствор не мешает проведению испытания.

Валидация метода испытания требуется при внесении любых изменений в экспериментальные условия, которые могут повлиять на результат испытания.

Обеспечение критериев для калибровочной кривой

Испытания проводят для каждой серии лизата.

Для построения калибровочной кривой из исходного раствора стандартного образца эндотоксина готовят не менее трёх растворов сравнения с концентрациями эндотоксина в диапазоне, указанном производителем лизата. Проводят испытание, используя не менее трех повторностей для каждого раствора сравнения эндотоксина в соответствии с рекомендациями производителя лизата амебоцитов (соотношение объемов, время инкубации, температура, pH и т.д.).

Если необходимый диапазон в кинетических методах превышает 2 lg, необходимо включить дополнительно растворы сравнения с концентрациями эндотоксина, которые будут охватывать каждое увеличение lg в диапазоне значений калибровочной кривой.

Абсолютное значение коэффициента корреляции |r| должно быть больше или равно 0,980 для установленного диапазона концентраций эндотоксина.

Испытание на мешающие факторы

Выбирают концентрацию эндотоксина на уровне середины калибровочной кривой или около неё.

Готовят растворы A, B, C и D, как указано в таблице 2.1.6.8.-4. Проводят испытание этих растворов не менее чем в двух повторностях в соответствии с рекомендациями производителя лизата (объём испытуемого раствора и раствора лизата, объёмные соотношения испытуемого раствора и лизата амёбоцитов, время инкубации и т.д.).

Таблица 2.1.6.8-4.

Раствор	**Концентрация эндотоксина**	**Раствор, к которому добавляют эндотоксин**	**Количество повторностей**
A	Отсутствует	Испытуемый раствор	Не менее 2
B	Средняя концентрация калибровочной кривой	Испытуемый раствор	Не менее 2
C	Не менее 3-х концентраций (наименьшая концентрация обозначается λ)	Вода для БЭТ	Не менее 2 для каждой из концентраций
D	Отсутствует	Вода для БЭТ	Не менее 2

Раствор A – испытуемый раствор *(испытуемый образец или испытуемый образец, растворённый, при необходимости, в подходящем растворителе)* в разведении, не превышающем МДР.

Раствор B – раствор испытуемого образца в том же разведении, что и раствор A раствор A, к которому добавлен стандарт эндотоксина. Конечная концентрация эндотоксина равна или близка значению середины калибровочной кривой.

Растворы C – растворы сравнения в концентрациях, используемых при валидации метода, проводимой согласно разделу *8.3. Предварительные испытания. Обеспечение критериев для калибровочной кривой* (положительные контроли).

Раствор D – вода для БЭТ (отрицательный контроль).

Испытания считают валидными, если соблюдены следующие условия:

– абсолютное значение коэффициента корреляции калибровочной кривой, построенной с использованием раствора C, больше или равно 0,980;

– результат, полученный для раствора D, не превышает значения, указанного в описании используемого лизата амёбоцитов, или менее предела обнаружения эндотоксинов для используемого лизата амёбоцитов.

Рассчитывают среднюю открываемость (извлечение) добавленного эндотоксина, вычитая среднюю концентрацию эндотоксина (при наличии) в растворе A (раствор A, таблица 2.1.6.8-4) из концентрации в растворе, содержащем добавленный эндотоксин (раствор B, таблица 2.1.6.8-4).

Испытуемый раствор считают не содержащим мешающих факторов, если в условиях испытания измеренная концентрация эндотоксина, добавленного в испытуемый раствор, находится в пределах от 50 % до 200 % от известной концентрации добавленного эндотоксина после вычитания любого количества эндотоксина, обнаруженного в растворе, не содержащем добавленный эндотоксин.

Если открываемость эндотоксина выходит за пределы указанного диапазона,

считают, что испытуемый раствор содержит мешающие факторы. Испытание повторяют, используя большее разведение, не превышающее МДР. Кроме того, влияние испытуемого раствора или разбавленного испытуемого раствора в разведении, не превышающем МДР, можно устранить подходящей валидированной обработкой, например, фильтрацией, нейтрализацией, диализом или термической обработкой. Чтобы убедиться, что выбранная обработка эффективно устраняет мешающее действие, не уменьшая концентрацию бактериальных эндотоксинов в испытуемом образце, испытание на мешающие факторы повторяют с испытуемым раствором, который подвергли выбранному методу обработки после добавления стандартного образца эндотоксина.

8.4. ИСПЫТАНИЯ

ПРОЦЕДУРА

Испытание проводят в соответствии с процедурой, указанной в разделе *8.3. Предварительные испытания. Испытания на мешающие факторы».*

РАСЧЁТЫ

Рассчитывают концентрацию бактериальных эндотоксинов для каждой повторности раствора А, используя калибровочную кривую, полученную с использованием положительных контролей.

Испытания считают валидными, если выполнены следующие три требования:

1. результаты, полученные с использованием раствора С, соответствуют требованиям к валидации, указанным в разделе *8.3. Предварительные испытания. Обеспечение критериев для калибровочной кривой*;

2. открываемость, рассчитанная по концентрации эндотоксина в растворе В после вычитания концентрации эндотоксина в растворе А, находится в диапазоне от 50 % до 200 %;

3. результат, полученный с использованием раствора D (отрицательный контроль), не превышает значения, указанного в описании используемого лизата амёбоцитов,, или он менее предела обнаружения эндотоксинов для используемого лизата.

*ИНТЕРПРЕТАЦИЯ *РЕЗУЛЬТАТОВ**

Испытуемый образец считают выдержавшим испытание, если среднее значение содержания бактериальных эндотоксинов в повторностях раствора А (с учётом разведения и исходной концентрации) менее установленного значения предельного содержания бактериальных эндотоксинов для конкретного продукта.

Рекомендации по проведению испытания на бактериальные эндотоксины приведены в общей фармакопейной статье 2.1.6.21. Применение испытания на бактериальные эндотоксины.