ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р ИСО 29701— 2015

НАНОТЕХНОЛОГИИ

Наноматериалы для испытаний в тест-системах *in vitro* Метод определения содержания эндотоксинов с использованием лизата амебоцитов *Limulus* (ЛАЛ-тест)

(ISO 29701:2010, IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2016

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 ПОДГОТОВЛЕН Федеральным государственным учреждением «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН) на основе собственного аутентичного перевода на русский язык стандарта, указанного в пункте 4

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 441 «Нанотехнологии»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 23 ноября 2015 г. № 1941-ст

4 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 29701:2010 «Нанотехнологии. Испытания эндотоксинов на образцах наноматериалов для систем *in vitro*. Испытание *Limulus* amebocyte lysate (LAL)» (ISO 29701:2010 «Nanotechnologies — Endotoxin test on nanomaterial samples for *in vitro* systems — *Limulus* amebocyte lysate (LAL) test»).

Наименование настоящего стандарта изменено относительно наименования указанного международного стандарта для приведения в соответствие с ГОСТ Р 1.5—2012 (пункт 3.5)

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Правила применения настоящего стандарта установлены в ГОСТ Р 1.0—2012 (раздел 8). Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет (*gost.e-ecolog.ru

© Стандартинформ, 2016

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

НАНОТЕХНОЛОГИИ

Наноматериалы для испытаний в тест-системах *in vitro*. Метод определения содержания эндотоксинов с использованием лизата амебоцитов *Limulus* (ЛАЛ-тест)

Nanotechnologies. Nanomaterials for testing in assay systems *in vitro*. Method for determination of endotoxin using *Limulus* amebocyte lysate (LAL-test)

Дата введения — 2016—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на наноматериалы для испытаний в тест-системах *in vitro* и устанавливает метод определения содержания (количественной концентрации) эндотоксинов с использованием лизата амебоцитов (ЛАЛ-тест). ЛАЛ-тест применим для водных суспензий или экстрактов наноматериалов, пригодных для инкубирования при температуре 37 °С.

2 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

2.1 **коагулоген** (coagulogen): Способный свертываться белок, в результате реакции которого с эндотоксинами при проведении ЛАЛ-теста происходит увеличение вязкости испытуемого раствора и образование плотного геля.

Примечание — Коагулоген получают из клеток крови японского мечехвоста (*Tachypleus tridentatus*). Коагулоген состоит из 175 аминокислот. Молекулярная масса коагулогена — 19723 [7].

2.2 **коагулин** (coagulin): Фрагмент коагулогена, образующийся в результате протеолиза коагулогена и свертывающегося фермента при проведении ЛАЛ-теста.

Примечание — Коагулин получают из клеток крови японского мечехвоста (*Tachypleus tridentatus*). Коагулин состоит из N-концевых фрагментов пептидов (Ala 1 — Arg 18) и С-концевых фрагментов пептидов (Gly47 — Phe175) [7].

2.3 **эндотоксин** (endotoxin): Компонент наружной части клеточной мембраны грамотрицательных бактерий.

Примечание — Основным активным компонентом эндотоксинов являются липополисахариды (ЛПС).

2.4 **единица эндотоксина**; ЕЭ (endotoxin unit; EU): Стандартная единица активности эндотоксинов.

Примечания

1 Комитетом экспертов по стандартизации биологических препаратов (КЭСБП) Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в 1996 году установлено значение ЕА, соответствующее 0,1 нг или 10 ЕЭ/нг эндотоксинов кишечной палочки (*Escherichia coli*) Американского национального стандарта эндотоксина (АНСЭ) [8].

2 Одна ЕЭ соответствует одной международной единице (МЕ) эндотоксина.

2.5 **чувствительность ЛАЛ-реактива** λ (lambda, λ): Значение концентрации эндотоксинов, заявленное изготовителем и используемое при вычислениях в гель-тромб тесте, при построении стандартной кривой в турбидиметрических и хромогенных методах, выраженное в ЕЭ/мл.

Издание официальное

2.6 **лизат амебоцитов *Limulus***; ЛАЛ-реактив (*Limulus* amebocyte lysate; LAL): Водная вытяжка из клеток крови (амебоцитов) мечехвоста *Limulus polyphemus* (ЛАЛ-реактив) или *Tachypleus tridentatus* (ТАЛ-реактив).

2.7 **метод определения содержания эндотоксинов с использованием лизата амебоцитов *Limulus***; ЛАЛ-тест (*Limulus* amebocyte lysate test; LAL test): Способ определения количественной концентрации бактериальных эндотоксинов в испытуемом материале с применением ЛАЛ-реактива.

Примечание — ЛАЛ-тест имеет другое наименование «Испытание на бактериальные эндотоксины» (БЭТ).

2.8 **оптическая плотность**; ОП (optical density; OD): Величина, равная десятичному логарифму величины, обратной коэффициенту пропускания.

2.9 **испытуемая проба** (test sample): Водная суспензия или экстракт наноматериала, являющиеся объектом испытания.

3 Обозначения и сокращения

В настоящем стандарте применены следующие обозначения и сокращения:

АНСЭ (RSE) — Американский национальный стандарт эндотоксина;
БЭТ (BET) — испытание на бактериальные эндотоксины;
ВОЗ (WHO) — Всемирная организация здравоохранения;
ЕЭ (EU) — единица эндотоксина;
И/А (I/EC) — ингибирование или активация реакции ЛАЛ-реактива с эндотоксинами;
КСЭ (CSE) — контрольный стандарт эндотоксина;
КЭСБП (ECBS) — Комитет экспертов ВОЗ по стандартизации биологических препаратов;
ЛАЛ-реактив (LAL) — лизат амебоцитов *Limulus;*
ЛПС (LPS) — липополисахарид;
НСЭ (EF) — предметы или вещества, не содержащие эндотоксинов;
ОП (OD) — оптическая плотность.

4 Общие требования

4.1 Хранение наноматериалов

Наноматериалы, благодаря большой удельной площади поверхности, могут адсорбировать загрязняющие вещества, в том числе эндотоксины. До проведения испытаний наноматериалы следует хранить в герметичных контейнерах, не содержащих эндотоксинов (далее — НСЭ), например, в стерильных стеклянных контейнерах. Для проверки контейнеров на содержание эндотоксинов применяют порошки оксидов металлов или металлоидов, например двуокись титана, диоксид кремния НСЭ.

Примечания

1 Для хранения наноматериалов не допускается применять контейнеры из полипропилена. Полипропилен является мешающим фактором и оказывает влияние на результаты ЛАЛ-теста (см. приложение А).

2 Порошки оксидов металлов и металлоидов, не содержащие эндотоксины, получают путем термической обработки (см. 4.2).

4.2 Контейнеры для хранения наноматериалов

Хранение наноматериалов и испытуемых проб осуществляют в герметичных контейнерах НСЭ. Для удаления эндотоксинов контейнеры подвергают термической обработке при температуре не менее 250 °С в течение 30 мин. Допускается для хранения наноматериалов и испытуемых проб применять стерильные контейнеры из полистирола однократного применения.

4.3 Обращение с наноматериалами

Для испытаний применяют наноматериалы НСЭ. В процессе отбора, подготовки проб и проведения испытаний следует применять меры, предотвращающие загрязнение наноматериалов эндотоксинами, содержащимися в воздухе окружающей среды. Требования к условиям проведения отбора, подготовки проб и испытаний установлены в 6.5.

5 Испытуемая проба

5.1 Водная суспензия наноматериала

В качестве испытуемой пробы в ЛАЛ-тесте применяют водную суспензию, полученную путем диспергирования пробы наноматериала в воде для ЛАЛ-теста НСЭ.

5.2 Экстракт наноматериала

В качестве испытуемой пробы в ЛАЛ-тесте применяют экстракт наноматериала, полученный путем экстрагирования пробы наноматериала в экстрагирующем растворе (например, физиологическом растворе).

6 Приготовление испытуемой пробы

В программах и методиках испытаний должны быть установлены требования к приготовлению испытуемых проб. Сведения о применяемых методах отбора и подготовки пробы регистрируют в протоколе испытаний.

6.1 Метод диспергирования

Приготовление испытуемой пробы методом диспергирования выполняют с учетом цели испытаний и требований, установленных для испытаний с использованием конкретной тест-системы *in vitro*. Пробу наноматериала измельчают вручную, механизированным способом или ультразвуком, затем диспергируют в воде для ЛАЛ-теста НСЭ.

Примечание — Следует учитывать, что процесс диспергирования может быть затруднен вследствие наличия у наноматериалов таких характеристик, как большая удельная площадь поверхности, пористость, гидрофобность.

6.2 Метод экстрагирования

Приготовление испытуемой пробы методом экстрагирования выполняют с учетом требований, установленных для испытаний с использованием конкретной тест-системы *in vitro*. Экстрагирующие растворы, время и температура инкубирования, концентрация испытуемой пробы должны соответствовать требованиям, установленным для испытаний с использованием конкретной тест-системы *in vitro*. Для контроля значений pH не рекомендуется применять феноловый красный индикатор, влияющий на цвет раствора. Контроль значений pH следует выполнять с применением буферных растворов. Для подготовки испытуемой пробы допускается применять готовые сертифицированные или самостоятельно приготовленные из реактивов НСЭ экстрагирующие растворы НСЭ. Во избежание роста бактерий и плесневых грибов допускается в экстрагирующие растворы добавлять антибиотики и фунгициды. Следует учитывать, что применяемые антибиотики и фунгициды могут являться мешающими факторами и оказывать влияние на результаты ЛАЛ-теста (см. 7.3.3). После проведения экстрагирования полученную смесь центрифугируют с целью удаления частиц. Образовавшийся супернатант переносят с помощью пипеток в пробирки или контейнеры. Отобранный супернатант представляет собой экстракт наноматериала.

Примечания

1 Для удаления эндотоксинов со стекловолоконных фильтров, применяемых для фильтрации проб, можно использовать 0,05% полисорбат 20 [9].

2 Для удаления эндотоксинов из углеродных наноматериалов рекомендуется применять поверхностно-активные вещества, например раствор витамина Е массовой долей 0,1% (*d*-α-токоферол полиэтиленгликоль-1000 сукцината) [10].

3 При приготовлении испытуемой пробы методом экстрагирования допускается использовать дополнительные сведения [1].

6.3 Концентрация наноматериала в испытуемой пробе

Концентрация наноматериала в испытуемой пробе должна быть максимально высокой и соответствовать требованиям, установленным для испытаний с использованием конкретной тест-системы *in vitro*.

6.4 Хранение испытуемой пробы

Во избежание разрушения эндотоксинов и/или роста бактерий приготовление испытуемой пробы рекомендуется осуществлять непосредственно перед проведением ЛАЛ-теста.

В случае если сразу провести ЛАЛ-тест невозможно, то хранение испытуемой пробы осуществляют в стерильных герметичных контейнерах (см. 4.2) при температуре от 2 до 8 °С. В случае хранения испытуемой пробы более 24 ч выполняют проверку ее стабильности и однородности. Требования к хранению испытуемых проб должны быть установлены в программах и методиках испытаний.

6.5 Условия проведения отбора, подготовки проб и испытаний

6.5.1 Воздух окружающей среды

Требования к чистоте воздуха окружающей среды в рабочих зонах и помещениях в целом, предназначенных для проведения отбора, подготовки проб и испытаний, должны быть установлены в программах и методиках испытаний.

Отбор, подготовку проб и испытания следует проводить в вытяжном шкафу или помещениях, оснащенных оборудованием, обеспечивающим класс чистоты 5 ИСО [2] — [4].

6.5.2 Посуда, оборудование и материалы

Для отбора, подготовки проб и проведения испытаний используют посуду, оборудование и материалы НСЭ. Для удаления эндотоксинов посуду, оборудование и материалы подвергают термической обработке при температуре не менее 250 °С в течение 30 мин. Термическую обработку посуды, оборудования и материалов допускается выполнять при других значениях температуры, например проводить термическую обработку при температуре 180 °С в течение 3 ч или при температуре 650 °С в течение 1 мин. Требования к условиям термической обработки посуды, оборудования и материалов должны быть установлены в программах и методиках испытаний. Посуду, оборудование и материалы, непригодные для термической обработки, вымачивают в растворе щелочи или кислоты, затем промывают водой и проверяют на содержание эндотоксинов. Требования к обработке посуды, оборудования и материалов щелочью или кислотой должны быть установлены в программах и методиках испытаний. Допускается применять стерильные пластмассовые посуду и оборудование (например, контейнеры, пробирки, наконечники для микропипеток) однократного применения.

Примечание — Пластмассовые материалы, посуда и оборудование, применяемые для отбора, подготовки проб и проведения испытаний, должны быть изготовлены из полистирола.

6.5.3 Вода, используемая для промывки посуды, оборудования и материалов

Посуду, оборудование и материалы после обработки растворами щелочи или кислоты промывают дистиллированной водой НСЭ [11].

7 Методы испытаний

7.1 Сущность ЛАЛ-теста

Эндотоксины, активируя фактор в ЛАЛ-реактиве, запускают протеолитический каскад [12]. Свертывающий фермент, высвобождаемый из профермента одним из активных факторов, катализирует протеолиз коагулогена в ЛАЛ-реактиве. Образующиеся в результате протеолиза фрагменты коагулогена — коагулины — взаимодействуют друг с другом посредством дисульфидных связей, вызывая помутнение прозрачного испытуемого раствора и увеличение его вязкости вплоть до формирования плотного геля. Образование плотного геля служит индикатором наличия в испытуемой пробе эндотоксинов. Проводимый таким образом анализ называют гель-тромб тестом. Результат испытаний наноматериалов гель-тромб тестом (образование плотного геля, который не разрушается при аккуратном однократном переворачивании пробирки) определяют визуально.

Гель-тромб тест — наиболее простой и экономичный метод испытаний, при проведении которого не требуется применение спектрофотометра. Чувствительность гель-тромб теста с использованием готовых реактивов составляет 0,015 ЕЭ/мл. Гель-тромб тест является основным методом испытаний по выявлению наличия и определению количественной концентрации эндотоксинов в наноматериалах. Допускается проводить испытания наноматериалов альтернативными методами при условии, что результаты не противоречат результатам основного метода.

Примечание — Описание гель-тромб теста приведено в приложении В.

7.2 Альтернативные методы испытаний

7.2.1 Сущность фотометрических методов по конечной точке

В фотометрических методах по конечной точке измеряют оптическую плотность (ОП) испытуемых растворов к концу инкубационного периода. Фотометрические методы подразделяют на хромогенный метод по конечной точке и турбидиметрический метод по конечной точке. Хромогенный метод по конечной точке основан на количественной зависимости концентрации эндотоксинов от количества хромофора, п-нитроанилина (*p*-NA), высвободившегося из хромогенного субстрата Boc-Leu-Gly-Arg-*p*-NA или Boc-Thr-Gly-Arg-*p*-NA к концу инкубационного периода. Турбидиметрический метод по конечной точке основан на количественной зависимости концентрации эндотоксинов от степени мутности (поглощение или пропускание) испытуемого раствора в конце инкубационного периода. Недостатками турбидиметрического метода по конечной точке являются низкая чувствительность и сложность остановки реакции в заданный момент времени. Поэтому для определения концентрации эндотоксинов в наноматериалах целесообразнее использовать турбидиметрический кинетический метод (см. 7.2.2). Значение ОП *p*-NA в испытуемых растворах измеряют при длине волны 405 нм. Интенсивность окраски испытуемых растворов в пурпурный цвет диазотированным производным *p*-NA измеряют при длине волны от 540 до 550 нм.

Чувствительность фотометрических методов по конечной точке с использованием готовых реактивов при измерении значений ОП *p*-NA при длине волны 405 нм составляет 0,01 ЕЭ/мл, при измерении интенсивности окраски испытуемых растворов в пурпурный цвет диазотированным производным *p*-NA — 0,001 ЕЭ/мл.

Примечание — Описание фотометрического метода по конечной точке (хромогенного метода по конечной точке) приведено в приложении С.

7.2.2 Сущность кинетических методов

Кинетические методы подразделяют на турбидиметрический кинетический метод и хромогенный кинетический метод. В процессе испытаний кинетическими методами измеряют время, необходимое для достижения заданного значения ОП, или степени мутности, или скорость окрашивания испытуемых растворов. Измерения выполняют спектрофотометром или микропланшетным фотометром. Значения ОП *p*-NA, или скорость окрашивания, или степень мутности испытуемых растворов в ходе испытаний регистрируют несколько раз через заданные интервалы времени. Для определения концентрации эндотоксинов в наноматериале применяют измерительные системы, с помощью которых можно одновременно инкубировать испытуемые растворы, измерять ОП и выполнять обработку результатов. Чувствительность кинетических методов с применением измерительных систем составляет 0,001 ЕЭ/мл.

Примечание — Описание кинетических методов приведено в приложении D.

7.3 Выбор метода испытаний и факторы, влияющие на достоверность результатов испытаний

7.3.1 Минимальное значение чувствительности ЛАЛ-теста

В программах и методиках испытаний устанавливают минимальное значение чувствительности ЛАЛ-теста, которое должно быть на уровне или выше предельно допустимого значения концентрации эндотоксинов в наноматериале, установленного для испытаний с использованием конкретной тест-системы *in vitro*. Предельно допустимое значение концентрации эндотоксинов в наноматериале устанавливают с целью обеспечения при испытании в тест-системах *in vitro* протекания необходимых биологических реакций и в зависимости от требований, предъявляемых к испытаниям с использованием конкретной тест-системы *in vitro*. Например, эндотоксины концентрацией 0,01 нг/мл вызывают в макрофагах человека образование цитокинов IL-1β и TNF-α [13], а эндотоксины концентрацией 0,048 нг/мл вызывают только незначительные биологические реакции в дендритных или мононуклеарных клетках периферической крови человека [13].

Выбор метода для проведения ЛАЛ-теста осуществляют с учетом предельно допустимого значения концентрации эндотоксинов в наноматериале, установленного для испытаний с использованием конкретной тест-системы *in vitro*.

7.3.2 Мешающие факторы

7.3.2.1 В некоторых наноматериалах определить количественную концентрацию эндотоксинов ЛАЛ-тестом невозможно вследствие наличия мешающих факторов, оказывающих влияние на ингибирование (замедление) или активацию (усиление) реакции ЛАЛ-реактива с эндотоксинами (И/А).

Примечание — Примеры мешающих факторов, оказывающих влияние на результаты ЛАЛ-теста приведены в приложении А.

7.3.2.2 При проведении испытаний фотометрическими методами по конечной точке или кинетическими методами следует учитывать возможность влияния наноматериалов на цвет и мутность испытуемых растворов. Метод испытаний следует выбирать с учетом оптических характеристик наноматериала.

7.3.3 Выявление мешающих факторов

7.3.3.1 Для выявления мешающих факторов (контроль И/А) проводят испытания на серии растворов. Для испытаний применяют испытуемую пробу и растворы для контроля И/А, приготовленные путем разведения испытуемой пробы с контрольным стандартом эндотоксина (КСЭ). Сравнивая результаты реакции ЛАЛ-реактива с раствором КСЭ в воде для ЛАЛ-теста и растворами с испытуемой пробой, выявляют наличие мешающих факторов.

Примечания

1 Методы испытаний, применяемые для подтверждения наличия или отсутствия мешающих факторов, приведены в приложениях B, C и D.

2 Для подтверждения наличия или отсутствия мешающих факторов допускается применять дополнительные методы испытаний, приведенные в действующих фармакопеях [26] — [28].

7.3.3.2 Испытуемые растворы должны иметь pH в пределах, указанных изготовителем ЛАЛ-реактива, обычно 6,0-8,0. Измерение pH выполняют в растворах, содержащих испытуемую пробу и ЛАЛ-реактив. В случае необходимости pH доводят до заданного значения растворами кислоты, основания или буферным раствором.

Примечания

1 Для достижения заданного значения pH испытуемых растворов можно использовать буферный раствор на основе трис(гидроксиметил)аминометана, 0,1 н гидроксид натрия (NaOH) или 0,1 н соляную кислоту (HCl) НСЭ.

2 Следует учитывать, что соли, образующиеся в результате процесса доведения pH испытуемых растворов до заданных значений, могут являться мешающими факторами (см. приложение А).

7.4 Проведение испытаний

Испытания проводят по соответствующим программам и методикам. Испытания можно проводить любым из методов, приведенных в настоящем стандарте. Методы, приведенные в настоящем стандарте, описаны в действующих фармакопейных статьях и Европейской фармакопеи.

8 Требования к обработке результатов испытаний

8.1 Общие требования

Обработку результатов выполняют с учетом характеристик наноматериалов и факторов, влияющих на результаты испытаний. В процессе испытаний должны быть подтверждены достоверность и точность полученных результатов, в том числе заявленная изготовителем чувствительность ЛАЛ-реактива и отсутствие мешающих факторов, оказывающих влияние на результаты ЛАЛ-теста. Полученные результаты испытаний регистрируют в протоколе.

8.2 Рекомендации по устранению мешающих факторов

8.2.1 Если мешающие факторы нельзя устранить путем разведения или обработки испытуемой пробы, то испытание наноматериала по определению концентрации эндотоксинов ЛАЛ-тестом не проводят.

8.2.2 В случае если невозможно избежать загрязнения испытуемой пробы эндотоксинами, ее обрабатывают полимиксином B [15], [16].

8.2.3 Испытуемые растворы не должны содержать β-1,3-глюкан (β-1,3-глюкан встречается в дрожжах, грибах и других микроорганизмах). При испытаниях наноматериалов ЛАЛ-тестом β-1,3-глюкан является мешающим фактором, вступающим в реакцию с ЛАЛ-реактивом и активирующим реакцию ЛАЛ-реактива с эндотоксинами [12]. При подозрении на наличие β-1,3-глюкана в испытуемых растворах следует применять ЛАЛ-реактивы, не вступающие в реакцию с β-1,3-глюканом.

9 Требования к протоколу испытаний

9.1 В протоколе указывают сведения о применяемых методах, средствах и условиях проведения испытаний.

9.2 В протокол включают:

a) результаты испытаний;

b) описание метода или методов испытаний;

c) описание испытуемого наноматериала;

d) описание методов отбора и подготовки проб, условий хранения испытуемой пробы и сведения об условиях проведения испытаний;

e) описание ЛАЛ-реактива (торговое наименование, код изготовителя, номер партии и дата изготовления, чувствительность и т.д.);

f) описание КСЭ (торговое наименование, код изготовителя, номер партии и дата изготовления, активность и т.д.);

g) результаты подтверждения достоверности испытаний, включая описание влияния мешающих факторов на результаты испытаний.

Примечание — В протокол испытаний допускается включать дополнительные сведения [1].

Приложение А
(справочное)

Примеры мешающих факторов, оказывающих влияние на результаты ЛАЛ-теста

А.1 Ингибирование

Факторы, ингибирующие (замедляющие) реакцию ЛАЛ-реактива с эндотоксинами:

А.1.1 Соли: ацетат натрия (CH_3COONa), 0,3 моль; натрий углекислый кислый ($NaHCO_3$), 0,1 моль; хлористый калий (KCl), 50 ммоль; хлористый натрий (NaCl), 0,6 моль [17].

Примечание — Данный мешающий фактор устраним. Разведение испытуемой пробы устраняет ингибирование реакции.

А.1.2 Гепарин [18].

Примечание — Данный мешающий фактор устраним. Добавление в испытуемую пробу буферного раствора НСЭ, содержащего катионы натрия (Na^+) и кальция (Ca^{2+}) устраняет ингибирование реакции.

А.1.3 Ионы металлов: ионы железа (Fe^{2+} и Fe^{3+}), ионы хрома (Cr^{3+}), ионы алюминия (Al^{3+}) [19], [20].

Примечание — Данный мешающий фактор не устраним. Добавление в испытуемую пробу натриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (Na-ЭДТА) частично активирует реакцию.

А.1.4 Пластмассы (полипропилен) [21].

А.1.5 Вещества, модифицированные четвертичными соединениями аммония [22].

А 1.6 Фильтры из эфиров целлюлозы [23].

А 1.7 Ингибиторы протеаз [24].

А 1.8 Полисорбат 20 [25].

Примечание — Данный мешающий фактор устраним. Разведение испытуемой пробы устраняет ингибирование реакции.

А.2 Активация

Факторы, активирующие (усиливающие) реакцию ЛАЛ-реактива с эндотоксинами:

А.2.1 4Na-ЭДТА [19].

Примечания

1 Механизм действия полностью не изучен.

2 Ингибирование или активация реакции не наблюдается при содержании в испытуемой пробе 2Na-ЭДТА или 3Na-ЭДТА менее 0,5 ммоль. Наличие в испытуемой пробе высокой концентрации Na-ЭДТА вызывает ингибирование реакции в ЛАЛ-тесте [19].

Приложение В
(справочное)

Гель-тромб тест

В.1 Общие сведения

В настоящем приложении приведено описание гель-тромб теста с применением ЛАЛ-реактива.

В.2 Реактивы

В.2.1 ЛАЛ-реактив с заявленной чувствительностью λ, предназначенный для гель-тромб теста.
В.2.2 Вода для ЛАЛ-теста НСЭ.
В.2.3 Лиофилизированный КСЭ[1)].

Примечание — Допускается использовать лиофилизированные ЛАЛ-реактивы, приготовленные самостоятельно в соответствии с инструкцией изготовителя или приобретенные и готовые к применению.

В.3 Оборудование

В.3.1 Стеклянные пробирки НСЭ, посуда НСЭ, контейнеры из полистирола НСЭ для приготовления испытуемых растворов.

Примечания
1 Подготовку посуды, оборудования и материалов, применяемых в гель-тромб тесте, проводят в соответствии с 6.5.2.
2 Оборудование, материалы, контейнеры и флаконы с веществами НСЭ, применяемые в гель-тромб тесте, маркируют как апирогенные.

В.3.2 Штативы для пробирок.
В.3.3 Пипетки, автоматические пипетки, наконечники пипеток, шприцы однократного или многократного применения НСЭ.
В.3.4 Водяная баня с непроточной водой или термостат для инкубирования, обеспечивающие поддержание температуры (37±1) °С.
В.3.5 Вихревой миксер.
В.3.6 Хронометр или другое средство для измерения времени.

В.4 Приготовление испытуемых растворов

В.4.1 Приготовление базового раствора эндотоксинов

Для приготовления базового раствора эндотоксинов применяют лиофилизированный КСЭ. Содержимое флакона с КСЭ разбавляют водой для ЛАЛ-теста НСЭ. Разведение и хранение КСЭ осуществляют в соответствии с инструкцией изготовителя.

В.4.2 Приготовление стандартных растворов эндотоксинов

Стандартные растворы эндотоксинов получают путем разведения базового раствора эндотоксинов водой для ЛАЛ-теста НСЭ. Стандартные растворы эндотоксинов должны содержать КСЭ концентрацией 0,25λ, 0,5λ, 1λ и 2λ. С целью минимизации ошибок при аликвотировании следует учитывать, что получаемые стандартные растворы (при любом факторе разведения базового раствора) должны содержать КСЭ, разбавленный водой не более чем в 10 раз.

В.5 Приготовление растворов для контроля И/А

Растворы для контроля И/А готовят путем смешивания КСЭ с неразведенной испытуемой пробой. Растворы для контроля И/А должны содержать КСЭ концентрацией 0,25λ, 0,5λ, 1λ и 2λ. В растворе для контроля И/А содержание КСЭ не должно превышать 5 % общего объема раствора, то есть при общем объеме раствора для контроля И/А 1,0 мл содержание КСЭ не должно превышать 50 мкл.

В.6 Приготовление испытуемой пробы

Испытуемую пробу готовят путем разведения пробы наноматериала с водой для ЛАЛ-теста НСЭ. Для испытаний готовят серию растворов с фактором разведения 2, 4, 8 или более (при необходимости).

[1)] Активность КСЭ установлена по Международному стандарту эндотоксина ВОЗ, который соответствует АНСЭ, установленному Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств США.

В.7 Проведение испытаний

В.7.1 Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива

В.7.1.1 Воду для ЛАЛ-теста НСЭ (отрицательный контроль), стандартные растворы эндотоксинов (водные растворы, содержащие КСЭ концентрацией 0,25λ, 0,5λ, 1λ или 2λ) добавляют в пробирки с ЛАЛ-реактивом и перемешивают. Число повторностей для всех испытуемых растворов — четыре.

В.7.1.2 Пробирки с испытуемыми растворами инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (60 ± 2) мин. Во время инкубирования следует избегать вибрации и ударов.

В.7.1.3 По истечении указанного срока каждую пробирку проверяют визуально и регистрируют результаты как положительные, так и отрицательные. Результат считают положительным, если произошло образование плотного геля, который не разрушается при аккуратном однократном переворачивании пробирки на 180°. Результат считают отрицательным, если образование плотного геля не произошло или образован неплотный гель.

В.7.1.4 Результаты испытаний считают достоверными, если получены отрицательные результаты во всех повторностях для отрицательного контроля и стандартного раствора эндотоксинов, содержащего КСЭ концентрацией 0,25 λ.

В.7.1.5 Конечной точкой реакции для каждой из повторностей стандартных растворов эндотоксинов является положительный результат, полученный для раствора с наименьшей концентрацией КСЭ. Среднегеометрическое значение чувствительности ЛАЛ-реактива, *c*, в конечной точке реакции вычисляют по формуле

$$c = antilog\left(\frac{\Sigma e}{f}\right) \qquad (B.1)$$

где *c* — среднегеометрическое значение чувствительности ЛАЛ-реактива;

Σe — сумма логарифмов концентраций КСЭ в конечной точке реакции в каждой из повторностей;

f — число повторностей.

В.7.1.6 Заявленную чувствительность ЛАЛ-реактива считают подтвержденной и используют в дальнейших вычислениях в том случае, если полученное среднегеометрическое значение чувствительности ЛАЛ-реактива находится в пределах от 0,5 до 2λ.

Примечание — Рекомендуется проверять заявленную чувствительность ЛАЛ-реактива в каждой новой партии.

В.7.2 Подтверждение достоверности результатов испытаний

В.7.2.1 Воду для ЛАЛ-теста НСЭ (отрицательный контроль), стандартные растворы эндотоксинов (водные растворы, содержащие КСЭ концентрацией 0,25λ, 0,5λ, 1λ или 2λ), растворы для контроля И/А с содержанием КСЭ концентрацией 0,25λ, 0,5λ, 1λ и 2λ и испытуемую пробу добавляют в пробирки с ЛАЛ-реактивом и перемешивают. Число повторностей для отрицательного контроля и стандартных растворов эндотоксинов — две, растворов для контроля И/А и испытуемой пробы — четыре.

В.7.2.2 Испытания проводят в соответствии с В.7.1.2 и В.7.1.3.

В.7.2.3 Результаты испытаний считают достоверными, если получены отрицательные результаты во всех повторностях для отрицательного контроля и испытуемой пробы, среднегеометрическое значение чувствительности ЛАЛ-реактива находится в пределах от 0,5 до 2λ, подтвержденное результатами испытаний стандартных растворов эндотоксинов.

Примечание — При наличии эндотоксинов в испытуемой пробе ее разбавляют до получения раствора с содержанием эндотоксинов ниже уровня, определяемого ЛАЛ-тестом.

В.7.2.4 Среднегеометрическое значение концентрации эндотоксинов в конечной точке реакции в растворах для контроля И/А вычисляют по формуле (В.1), приведенной в В.7.1.5. Полученное среднегеометрическое значение должно находиться в пределах от 0,5 до 2λ.

В.7.2.5 В случае если среднегеометрическое значение концентрации эндотоксинов в конечной точке реакции в растворах для контроля И/А выходит за пределы вышеуказанного диапазона, то испытания проводят повторно, выполнив дополнительное разведение испытуемой пробы. Заявленную чувствительность ЛАЛ-реактива корректируют путем разбавления испытуемой пробы, устраняя, таким образом, факторы, мешающие проведению ЛАЛ-теста.

В.7.2.6 Мешающие факторы могут быть устранены при соответствующей обработке испытуемой пробы, например при фильтрации, нейтрализации, диализе или температурной обработке.

В.7.2.7 Если мешающие факторы нельзя устранить путем разведения или обработки испытуемой пробы, то испытание наноматериала по определению концентрации эндотоксинов гель-тромб тестом не проводят.

В.7.3 Анализ испытуемой пробы

В.7.3.1 Воду для ЛАЛ-теста НСЭ (отрицательный контроль), растворы для контроля И/А (например, испытуемая проба, содержащая КСЭ концентрацией 2λ), стандартные растворы эндотоксинов (растворы, содержащие КСЭ концентрацией 0,25λ, 0,5λ, 1λ и 2λ) и испытуемая проба (неразведенная испытуемая проба и растворы испы-

туемой пробы, разведенной с водой для ЛАЛ-теста НСЭ с фактором разведения 2, 4, 8) добавляют в пробирки с ЛАЛ-реактивом и перемешивают. Число повторностей для всех испытуемых растворов — две.

B.7.3.2 Испытания проводят в соответствии с B.7.1.2 и B.7.1.3.

B.7.3.3 Результаты испытаний считают достоверными, если:

a) получены отрицательные результаты во всех повторностях для отрицательного контроля;

b) получены положительные результаты во всех повторностях для растворов для контроля И/А;

c) среднегеометрическое значение концентрации эндотоксинов в конечной точке реакции в стандартных растворах находится в пределах от 0,5 до 2λ.

B.7.3.4 Конечной точкой реакции является положительный результат, полученный для испытуемой пробы с наибольшим фактором разведения. Значение концентрации эндотоксинов в неразведенной испытуемой пробе определяют путем умножения значения концентрации эндотоксинов в конечной точке на значение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива (или значение, полученное в результате корректировки чувствительности ЛАЛ-реактива).

B.7.3.5 Среднегеометрическим значением концентрации эндотоксинов считают значение концентрации эндотоксинов в конечной точке реакции в испытуемой пробе.

B.7.3.6 Если во всех повторностях для испытуемой пробы получены отрицательные результаты, то значение концентрации эндотоксинов в испытуемой пробе менее значения заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива (или значения, полученного в результате корректировки чувствительности ЛАЛ-реактива).

B.7.3.7 Если во всех повторностях для испытуемой пробы получены положительные результаты, то значение концентрации эндотоксинов в испытуемой пробе является равным или более произведения значения, полученного при испытании раствора с наибольшим фактором разведения, и значения заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива (или значения, полученного в результате корректировки чувствительности ЛАЛ-реактива).

Приложение С
(справочное)

Фотометрический метод по конечной точке (хромогенный метод по конечной точке)

С.1 Общие сведения

В настоящем приложении приведено описание фотометрического метода по конечной точке с использованием ЛАЛ-реактива с хромогенным субстратом Boc-Leu-Gly-Arg-*p*-NA или Boc-Thr-Gly-Arg-*p*-NA (хромогенный метод по конечной точке). Количественное содержание *p*-NA в растворе определяют по значению ОП *p*-NA при длине волны 405 нм.

С.2 Реактивы

С.2.1 Лиофилизированный ЛАЛ-реактив с заявленной чувствительностью λ, предназначенный для хромогенного метода.

С.2.2 Буферный раствор для ЛАЛ-реактива.

С.2.3 Лиофилизированный КСЭ.

С.2.4 Вода для ЛАЛ-теста НСЭ.

С.2.5 Раствор, замедляющий или останавливающий реакцию (информация должна быть приведена изготовителем в инструкции к ЛАЛ-реактиву).

Примечание — Все реактивы можно приобрести в наборах для проведения ЛАЛ-теста, имеющихся в продаже.

С.3 Оборудование

С.3.1 Стеклянные пробирки НСЭ или микропланшеты НСЭ из полистирола.

Примечания

1 Подготовку посуды, оборудования и материалов, применяемых в фотометрическом методе по конечной точке, проводят в соответствии с 6.5.2.

2 Оборудование, материалы, контейнеры и флаконы с веществами НСЭ, применяемые в фотометрическом методе по конечной точке, маркируют как апирогенные.

С.3.2 Стеклянные пробирки НСЭ или пробирки и контейнеры НСЭ из полистирола для приготовления испытуемых растворов.

Примечания

1 Подготовку посуды, оборудования и материалов, применяемых в фотометрическом методе по конечной точке, проводят в соответствии с 6.5.2.

2 Оборудование, материалы, контейнеры и флаконы с веществами НСЭ, применяемые в фотометрическом методе по конечной точке, маркируют как апирогенные.

С.3.3 Штативы для пробирок.

С.3.4 Пипетки, автоматические пипетки, наконечники пипеток, шприцы однократного или многократного применения НСЭ.

С.3.5 Водяная баня или термостат для инкубирования, обеспечивающие поддержание температуры (37±1) °С.

С.3.6 Вихревой миксер.

С.3.7 Спектрофотометр или микропланшетный фотометр для измерений ОП при длине волны 405 нм.

С.3.8 Хронометр или другое средство для измерения времени.

С.4 Приготовление испытуемых растворов для построения стандартной кривой

С.4.1 Приготовление базового раствора эндотоксинов

Для приготовления базового раствора эндотоксинов применяют лиофилизированный КСЭ. Содержимое флакона с КСЭ разбавляют водой НСЭ. Разведение и хранение КСЭ осуществляют в соответствии с инструкцией изготовителя.

С.4.2 Приготовление стандартных растворов эндотоксинов

Стандартные растворы эндотоксинов получают путем разведения базового раствора эндотоксинов водой НСЭ. Следует приготовить не менее трех стандартных растворов эндотоксинов, содержащих КСЭ различной концентрации, включая раствор с содержанием КСЭ концентрацией, соответствующей заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива. С целью минимизации ошибок при аликвотировании следует учитывать, что получаемые стандартные растворы (при любом факторе разведения базового раствора) должны содержать КСЭ, разбавленный водой не более чем в 10 раз.

С.5 Приготовление растворов для контроля И/А

Растворы для контроля И/А готовят путем смешивания КСЭ с неразведенной испытуемой пробой. Для испытаний готовят серию растворов для контроля И/А, содержащих КСЭ различной концентрации (например, конечная концентрация КСЭ в испытуемом растворе должна быть 2λ, 4λ или соответствовать среднему значению концентраций КСЭ, использованных для построения стандартной кривой). В растворе для контроля И/А содержание КСЭ не должно превышать 5 % общего объема раствора, то есть при общем объеме раствора для контроля И/А 1,0 мл содержание КСЭ не должно превышать 50 мкл.

С.6 Проведение испытаний

С.6.1 Для приготовления испытуемых растворов лиофилизированный ЛАЛ-реактив, содержащий хромогенный субстрат, разводят в воде для ЛАЛ-теста НСЭ или буферном растворе в соответствии с инструкцией изготовителя.

С.6.2 Воду для ЛАЛ-теста НСЭ (отрицательный контроль), стандартные растворы эндотоксинов, растворы для контроля И/А и испытуемую пробу смешивают с ЛАЛ-реактивом в соответствии с инструкцией изготовителя в пробирках или микропланшете.

С.6.3 Пробирки или микропланшет с испытуемыми растворами инкубируют при температуре (37±1) °С в течение времени, указанного в инструкции.

С.6.4 В испытуемые растворы добавляют раствор, замедляющий или останавливающий реакцию, в объеме, указанном изготовителем ЛАЛ-реактива. ОП испытуемых растворов измеряют спектрофотометром или микропланшетным фотометром при длине волны 405 нм.

С.6.5 В случае применения измерительной системы, позволяющей одновременно инкубировать испытуемые растворы, измерять ОП и выполнять обработку результатов, испытания проводят в соответствии с инструкцией к измерительной системе.

С.7 Критерии приемлемости результатов испытаний

С.7.1 При построении стандартной кривой должна быть отражена зависимость значений ОП от значений, полученных при испытании стандартных растворов эндотоксинов.

С.7.2 Результаты отрицательного контроля не должны превышать значений, соответствующих точке с минимальным значением на стандартной кривой.

С.7.3 Стандартная кривая должна быть построена на основе алгоритма линейной регрессии.

С.7.4 Абсолютное значение коэффициента корреляции стандартной кривой должно быть выше или равно 0,980. В случае если абсолютное значение коэффициента корреляции стандартной кривой не соответствует данному значению, то испытания проводят повторно.

С.7.5 Погрешность результатов испытаний не должна превышать 25 %.

С.8 Обработка результатов испытаний

С.8.1 Результаты испытаний должны удовлетворять всем критериям, указанным в С.7.

С.8.2 Для каждой из повторностей определяют среднее арифметическое значение ОП на стандартной кривой.

С.8.3 Вычисляют значение концентрации эндотоксинов для каждой из повторностей путем умножения значения концентрации эндотоксинов, полученное при испытании, на соответствующее значение фактора разведения. Далее вычисляют среднее арифметическое значение концентрации эндотоксинов.

С.8.4 Полученное среднее арифметическое значение является значением концентрации эндотоксинов в неразведенной испытуемой пробе.

С.9 Подтверждение достоверности результатов испытаний

С.9.1 Содержание эндотоксинов в растворе для контроля И/А вычисляют путем деления значения концентрации эндотоксинов в испытуемой пробе, в которую не добавлен КСЭ, на значение концентрации эндотоксинов в испытуемой пробе после добавления КСЭ. Содержание эндотоксинов в испытуемых растворах выражают в процентах, %.

С.9.2 Раствор для контроля И/А не содержит мешающих факторов, если при проведении испытаний значение концентрации эндотоксинов, добавленных в испытуемый раствор, находится в пределах от 50 % до 200 % значения концентрации эндотоксинов после вычитания значения концентрации эндотоксинов в растворе, в который не добавлен КСЭ. При наличии мешающих факторов значение концентрации эндотоксинов в растворе для контроля И/А будет находиться вне пределов данного диапазона. Для устранения мешающих факторов осуществляют разбавление испытуемой пробы или подвергают ее фильтрации, нейтрализации, диализу или температурной обработке. Эффективность обработки испытуемой пробы контролируют посредством проведения повторного испытания на наличие мешающих факторов. Раствор для контроля И/А следует готовить с использованием наноматериала, не являющегося мешающим фактором для проведения испытаний.

Приложение D
(справочное)

Кинетические методы

D.1 Общие сведения

В настоящем приложении приведено описание кинетических методов (турбидиметрического кинетического метода и хромогенного кинетического метода) с использованием спектрофотометра или микропланшетного фотометра с термостатом для инкубирования[1)].

D.2 Реактивы

D.2.1 Лиофилизированный ЛАЛ-реактив с заявленной чувствительностью λ, для турбидиметрического кинетического метода или хромогенного кинетического метода.

D.2.2 Буферный раствор для ЛАЛ-реактива.

D.2.3 Вода для ЛАЛ-теста НСЭ.

D.2.4 Лиофилизированный КСЭ.

Примечание — Все реактивы можно приобрести в наборах для проведения ЛАЛ-теста, имеющихся в продаже.

D.3 Оборудование

D.3.1 Стеклянные пробирки НСЭ или микропланшеты НСЭ из полистирола.

Примечания

1 Подготовку посуды, оборудования и материалов, применяемых в кинетических методах, проводят в соответствии с 6.5.2.

2 Оборудование, материалы, контейнеры и флаконы с веществами НСЭ, применяемые в кинетических методах, маркируют как апирогенные.

D.3.2 Стеклянные пробирки НСЭ или пробирки и контейнеры НСЭ из полистирола для приготовления испытуемых растворов.

Примечания

1 Подготовку посуды, оборудования и материалов, применяемых в кинетических методах, проводят в соответствии с 6.5.2.

2 Оборудование, материалы, контейнеры и флаконы с веществами НСЭ, применяемые в кинетических методах, маркируют как апирогенные.

D.3.3 Пипетки, автоматические пипетки, наконечники пипеток, шприцы однократного или многократного применения НСЭ.

D.3.4 Спектрофотометр или микропланшетный фотометр с термостатом для инкубирования.

D.4 Приготовление испытуемых растворов для построения стандартной кривой

D.4.1 Приготовление базового раствора эндотоксинов

Для приготовления базового раствора эндотоксинов применяют лиофилизированный КСЭ. Содержимое флакона с КСЭ разбавляют водой НСЭ. Разведение и хранение КСЭ осуществляют в соответствии с инструкцией изготовителя.

D.4.2 Приготовление стандартных растворов эндотоксинов

Стандартные растворы эндотоксинов получают путем разведения базового раствора эндотоксинов водой НСЭ. Следует приготовить не менее трех стандартных растворов эндотоксинов, содержащих КСЭ различной концентрации, включая раствор с содержанием КСЭ концентрацией, соответствующей заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива. С целью минимизации ошибок при аликвотировании следует учитывать, что получаемые стандартные растворы (при любом факторе разведения базового раствора) должны содержать КСЭ, разбавленный водой не более чем в 10 раз.

D.5 Приготовление растворов для контроля И/А

Растворы для контроля И/А готовят путем смешивания КСЭ с неразведенной испытуемой пробой. Для испытаний готовят серию растворов для контроля И/А, содержащих КСЭ различной концентрации (например, конечная концентрация КСЭ в испытуемом растворе должна быть 2λ, 4λ или соответствовать среднему значению концен-

---

[1)] Измерительные системы, с помощью которых одновременно проводят инкубирование испытуемых растворов при заданной температуре, выполняют измерения ОП через заданные интервалы времени и обработку результатов испытаний.

траций КСЭ, использованных для построения стандартной кривой). В растворе для контроля И/А содержание КСЭ не должно превышать 5 % общего объема раствора, то есть при общем объеме раствора для контроля И/А 1,0 мл содержание КСЭ не должно превышать 50 мкл.

D.6 Проведение испытаний

D.6.1 Для приготовления испытуемых растворов лиофилизированный ЛАЛ-реактив разводят в воде для ЛАЛ-теста НСЭ или буферном растворе в соответствии с инструкцией изготовителя.

D.6.2 Воду для ЛАЛ-теста НСЭ (отрицательный контроль), стандартные растворы эндотоксинов, растворы для контроля И/А и испытуемую пробу смешивают с ЛАЛ-реактивом в пробирках или микропланшете в соответствии с инструкцией изготовителя.

D.6.3 Пробирки или микропланшет с испытуемыми растворами инкубируют при температуре (37±1) °С в течение времени, указанного в инструкции.

D.6.4 ОП испытуемых растворов измеряют спектрофотометром или микропланшетным фотометром при заданной длине волны и через заданные интервалы времени.

D.6.5 Измеряют время, необходимое для достижения заданного (порогового) значения ОП испытуемых растворов (при значении ОП, равном 0,2, или значения ОП, указанного изготовителем). Время, необходимое для достижения заданного значения ОП, называют начальным временем реакции.

Примечание — Измерительные системы, с помощью которых можно одновременно инкубировать испытуемые растворы, измерять ОП и выполнять обработку результатов, коммерчески доступны.

D.7 Критерии приемлемости результатов испытаний

D.7.1 При построении стандартной кривой должна быть отражена зависимость значений начального времени реакции от значений, полученных при испытании стандартных растворов эндотоксинов. Для построения стандартной кривой используют значения концентрации эндотоксинов в стандартных растворах, преобразованные (например, в форме десятичного логарифма) в соответствии с алгоритмом регрессии, рекомендуемым изготовителем ЛАЛ-реактива.

D.7.2 Результаты отрицательного контроля не должны превышать значений, соответствующих точке с минимальным значением на стандартной кривой.

D.7.3 Абсолютное значение коэффициента корреляции стандартной кривой должно быть выше или равно 0,980. В случае если абсолютное значение коэффициента корреляции стандартной кривой не соответствует данному значению, то испытания проводят повторно.

D.7.4 Погрешность результатов испытаний не должна превышать 25 %.

D.8 Обработка результатов испытаний

D.8.1 Результаты испытаний должны удовлетворять всем критериям, указанным в D.7.

D.8.2 Для каждой из повторностей определяют среднее арифметическое значение начального времени реакции на стандартной кривой.

D.8.3 Значение концентрации эндотоксинов для каждой из повторностей вычисляют путем умножения значения концентрации эндотоксинов, полученное при испытании, на соответствующее значение фактора разведения. Далее вычисляют среднее арифметическое значение концентрации эндотоксинов.

D.8.4 Полученное среднее арифметическое значение является значением концентрации эндотоксинов в неразведенной испытуемой пробе.

D.9 Подтверждение достоверности результатов испытаний

D.9.1 Содержание эндотоксинов в растворе для контроля И/А вычисляют путем деления значения концентрации эндотоксинов в испытуемой пробе, в которую не добавлен КСЭ, на значение концентрации эндотоксинов в испытуемой пробе после добавления КСЭ. Содержание эндотоксинов в испытуемых растворах выражают в процентах, %.

D.9.2 Раствор для контроля И/А не содержит мешающих факторов, если при проведении испытаний значение концентрации эндотоксинов, добавленных в испытуемый раствор, находится в пределах от 50 % до 200 % значения концентрации эндотоксинов после вычитания значения концентрации эндотоксинов в растворе, в который не добавлен КСЭ. При наличии мешающих факторов значение концентрации эндотоксинов в растворе для контроля И/А будет находиться вне пределов данного диапазона. Для устранения мешающих факторов осуществляют разбавление испытуемой пробы или подвергают ее фильтрации, нейтрализации, диализу или температурной обработке. Эффективность обработки испытуемой пробы контролируют посредством проведения повторного испытания на наличие мешающих факторов. Раствор для контроля И/А следует готовить с использованием наноматериала, не являющегося мешающим фактором для проведения испытаний.

Библиография

[1] ISO 10993-12:2007 Biological evaluation of medical devices — Part 12: Sample preparation and reference materials (Биологическая оценка медицинских изделий. Часть 12. Приготовление проб и стандартные образцы)

[2] ISO 14644-1 Cleanrooms and associated controlled environments — Part 1: Classification of air cleanliness (Помещения чистые и связанные с ними контролируемые среды. Часть 1. Классификация чистоты воздуха)

[3] ISO 14644-2 Cleanrooms and associated controlled environments — Part 2: Specifications for testing and monitoring to prove continued compliance with ISO 14644-1 (Помещения чистые и связанные с ними контролируемые среды. Часть 2. Технические требования к испытанию и мониторингу для проверки постоянного соответствия стандарту ИСО 14644-1)

[4] ISO 14644-7 Cleanrooms and associated controlled environments — Part 7: Separative devices (clean air hoods, gloveboxes, isolators and mini-environments) [Помещения чистые и связанные с ними контролируемые среды. Часть 7. Разделительные устройства (навесы, перчаточные камеры, разъединители и миниокружение)]

[5] ISO/TS 80004-1 Nanotechnologies — Vocabulary — Part 1: Core terms (Нанотехнологии. Часть 1. Основные термины и определения)

[6] Nanotechnology Characterization Lab., National Cancer Institute. NCL Method STE-1 Version 1.0 Detection of Endotoxin Contamination by End Point Chromogenic LAL Assay. 2005

[7] Takagi, T. et al. Amino acid sequence of Japanese horseshoe crab (Tachypleus tridentatus) coagulogen B Chain: Completion of the coagulogen sequence 12. The Journal of Biochemistry (Tokyo), 95, 1984, pp. 1445—1457

[8] Poole, S. et al. Second international standard for endotoxin: calibration in an international collaborative study. Journal of Endotoxin Research, 4, 1997, pp. 221—231

[9] Spaan, S. et al. Effect of extraction and assay media on analysis of airborne endotoxin. Applied and Environmental Microbiology, 74, 2008, pp. 3804—3811

[10] Esch, R.K. et al. Endotoxin contamination of engineered nanomaterials. Nanotoxicology, 4, 2010, pp. 73—83

[11] US FDA, Inspection Technical Guide (ITG) No.40 dated 3/20/85. For a discussion of Bacterial endotoxins/ pyrogens

[12] Iwanaga, S. The Limulus clotting reaction. Current Opinion in Immunology, 5, 1993, pp. 74—82

[13] Zhong, W.W. et al. Regulation of cytokine mRNA expression in lipopolysaccharide-stimulated human macrophages. Archives of Surgery, 28, 1993, pp.158—163; discussion, pp. 163—164

[14] Vallhov, H. et al. The importance of an endotoxin-free environment during the production of nanoparticles used in medical applications. Nano Letters, 6, 2006, pp. 1682—1686

[15] Cooperstock, M.S. Inactivation of endotoxin by polymyxin B. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 6, 1974, pp. 422—425

[16] CARDOSO, L.S. et al. Polymyxin B as inhibitor of LPS contamination of Schistosoma mansoni recombinant proteins in human cytokine analysis. Microbial Cell Factories, 6, 2007, pp. 1—6

[17] Bohrer, D. et al. Interference in the Limulus amebocyte lysate assay for endotoxin determination in peritoneal dialysis fluids and concentrates for hemodialysis. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 26, 2001, pp. 811—818

[18] Sullivan, J.D. and Watson, S.W. Inhibitory effect of heparin on the Limulus test for endotoxin. Journal of Clinical Microbiology, 2, 1975, p. 151

[19] Hosobuchi, K. et al. Recovery of Bacterial Endotoxin from Medical Devices. Bulletin of Tokyo Metropolitan Industrial Technology Research Institute. 2007. No. 1. (In Japanese)

[20] Tsuchiya, M. Current status of the application of Limulus test. Journal of Antibacterial and Antifungal Agents, 18, 1990, pp. 281—291 (In Japanese)

[21] Novitsky, T.J. et al. Factors affecting recovery of endotoxin adsorbed to container surfaces. Journal of Parenteral Science and Technology, 40, 1986, pp. 284—286

[22] Darkow, R. et al. Functionalized nanoparticles for endotoxin binding in aqueous solutions. Biomaterials, 20, 1999, pp. 1277—1283

[23] Douwes, J. et al. Influence of various dust sampling and extraction methods on the measurement of airborne endotoxin. Applied and Environmental Microbiology, 61, 1995, pp. 1763—1769

[24] Roth, R.I. and Levin, J. Purification of Limulus polyphemus proclotting enzyme. J. Biol. Chem., 267, 1992, pp. 24097—24102

[25] Spaan, S. et al. Effect of extraction and assay media on analysis of airborne endotoxin. Appl. Environ. Microbiol., 74, 2008, pp. 3804—3811

[26] European Pharmacopoeia

[27] Japanese Pharmacopoeia

[28] United States Pharmacopoeia

УДК 57.08:006.354 ОКС 07.030 11.100.10 Т58

Ключевые слова: нанотехнологии, наноматериалы, испытания в тест-системах *in vitro*, метод определения содержания эндотоксинов, лизат амебоцитов, ЛАЛ-тест

Редактор *Е.В. Щиголева*
Корректор *М.В. Бучная*
Компьютерная верстка *Л.А. Круговой*

Подписано в печать 08.02.2016. Формат 60 ×84 1/8.
Усл. печ. л. 2,32. Тираж 31 экз. Зак. 98.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru