

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭНДОТОКСИНОВ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВАХ: МЕШАЮЩИЕ ФАКТОРЫ И ИХ УСТРАНЕНИЕ

О.В. Шаповалова*, Н.П. Неугодова, кандидат биологических наук,
Г.А. Сапожникова, А.А. Агаширинова, О.В. Гунар, доктор фармацевтических наук

Научный центр экспертизы средств медицинского применения

Министерства здравоохранения Российской Федерации;

Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2

Введение. При производстве лекарственных препаратов для парентерального применения важно гарантировать отсутствие пирогенных примесей. Контроль фармацевтических субстанций на наличие бактериальных эндотоксинов – сложная проблема для субстанций, плохо растворимых в воде и/или имеющих факторы, препятствующие выполнению ЛАЛ-теста.

Цель исследования – изучение влияния факторов, препятствующих определению бактериальных эндотоксинов методом геле-тромб теста, поиск и выбор способа устранения мешающих факторов.

Материал и методы. Объекты исследования – фармацевтические субстанции «Аскорбиновая кислота» и «Терафтал», лекарственные препараты крови. Для проведения ЛАЛ-теста в модификации геле-тромб использовали трис-буфер (трис-гидроксиметиламинометана гидрохлорида), раствор магния хлорида, специфический буфер – блокатор β -гликанов.

Результаты. Предложены методики по устранению факторов, мешающих проведению ЛАЛ-теста. Рассматриваются наиболее распространенные причины возникновения «ложных» результатов: ингибирование реакции гелеобразования из-за некорректного значения рН или способность субстанций к комплексообразованию. Предложено решение для предотвращения ложноположительных результатов по показателю «Бактериальные эндотоксины» в опытах с препаратами крови.

Заключение. Разработаны подходы по предотвращению влияния мешающих факторов на результаты ЛАЛ-теста.

Ключевые слова: лекарственные средства, фармацевтические субстанции, качество, бактериальные эндотоксины, ЛАЛ-тест, ложные результаты, мешающие факторы, ингибирование, потенцирование.

*E-mail: shapovalova@expmed.ru

ВВЕДЕНИЕ

Одной из важных задач при производстве лекарственных препаратов для парентерального применения является гарантия отсутствия пирогенных примесей, в первую очередь, бактериальных эндотоксинов (БЭ). Контроль активных фармацевтических субстанций на наличие БЭ – сложная проблема для субстанций, плохо растворимых в воде и/или имеющих факторы, мешающие выполнению ЛАЛ-теста. Для анализа лекарственных средств (ЛС), не растворимых в воде, могут использоваться органические растворители, растительные и минеральные масла [1–3]. В то же время мониторинг отечественных нормативных материалов и научных статей показал, что исследованию мешающих факторов уделено недостаточно внимания.

В испытаниях при определении БЭ используют реактивы, имеющие квалификацию «свободны от эндотоксинов» и/или содержащие незначительное их количество, что способствует получению надежных

результатов анализа, исключая ложные данные. Источником мешающих факторов являются ЛС, при испытании которых может происходить замедление или усиление (далее – ингибирование или потенцирование) реакции гелеобразования ЛАЛ (лизат амёбозита люмулюс)-реактива с БЭ [4].

Наиболее распространенной причиной ингибирования реакции гелеобразования в ЛАЛ-тесте являются выходящие за пределы оптимального диапазона значения рН реакционной смеси (6,0–8,0). Производители учли эти особенности и выпустили забуференный ЛАЛ-реактив, позволяющий минимизировать процедуру подготовки испытуемого образца для анализа. В случае, если буферной емкости реактива недостаточно, необходима коррекция значений рН с помощью растворов кислот, оснований (например, кислоты хлористоводородной, гидроксида натрия) или дополнительных буферных растворов [5, 6].

Другая наиболее частая причина ингибирования реакции гелеобразования связана с недостаточной концентрацией катионов. Фармацевтические

субстанции с хелатирующими свойствами снижают агрегатные свойства эндотоксинов и связывают двухвалентные катионы, которые необходимы для поддержания оптимума ферментативной активности лизата амёбоцитов [7].

Результатом получения ложноположительных ответов является неспецифическое гелеобразование. Наиболее исследовано на примере β-гликана действие полисахаридов, усиливающее реакцию ЛАЛ-реактива. Также неспецифическую активацию ЛАЛ-реактива могут вызывать соединения, имитирующие эндотоксин, например сериновые протеазы. Процесс их устранения необходим для подтверждения того факта, что положительная реакция обусловлена не наличием эндотоксинов, а иных потенцирующих агентов [8–10].

Цель настоящего исследования – изучение влияния мешающих факторов при определении БЭ методом гель-тромб тест, рассмотрение последствий интерференции реакции гелеобразования, поиск и выбор способа устранения вышеуказанных факторов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования были выбраны ЛС, имеющие мешающие факторы: фармацевтическая субстанция «Аскорбиновая кислота», норма предельного содержания БЭ не должна превышать 1,2 ЕЭ/мг [11], фармацевтическая субстанция «Терафтал» с расчетной нормой предельного содержания БЭ – не более 2,16 ЕЭ/мг, лекарственные препараты крови.

Метод исследования – ЛАЛ-тест в модификации гель-тромб [12].

Используемые реактивы: ЛАЛ-реактив с чувствительностью 0,03125 ЕЭ/мл (где ЕЭ – единицы эндотоксина), контрольный стандарт эндотоксина, вода для ЛАЛ-теста, трис-буфер (трис-гидроксиметиламинометана гидрохлорида), раствор магния хлорида, специфический буфер – блокатор β-гликанов. Все используемые реактивы и материалы соответствовали требованиям ОФС.1.2.4.0006.15 «Бактериальные эндотоксины» [12], т.е. не содержа-

ли определяемое количество БЭ и не оказывали влияния на реакцию гелеобразования, что подтверждалось сертификатами анализа.

В исследовании использовались: суховоздушный нагревательный прибор для инкубации при температуре 37°C, автоматические дозаторы с переменным объемом 20–200 и 100–1000 мкл, встряхиватель (вихревая мешалка), рН-метр, секундомер, штативы для пробирок, наконечники для автоматических дозаторов, круглодонные пробирки с диаметром 13 и 10 мм.

В ходе исследования были рассмотрены следующие ситуации: ингибирование реакции в случае некорректного значения рН или при недостаточной концентрации катионов реакционной смеси; потенцирование реакции гелеобразования в испытаниях препаратов крови методом гель-тромб тест.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ингибирование реакции в случае некорректного значения рН изучали в ходе анализа субстанции «Аскорбиновая кислота», для этого готовили исходные растворы образцов на воде для ЛАЛ-теста с концентрацией 50 мг/мл, что соответствует содержанию в лекарственной форме.

Так как значение рН раствора аскорбиновой кислоты составляло 2,1–2,6, осуществляли его коррекцию с помощью трис-буферного раствора 2 способами. В 1-м случае анализ образцов субстанции корректировали с использованием ЛАЛ-реактива, разведенного на буфере. Во 2-м случае коррекцию выполняли с помощью разбавления всех разведений основного раствора трис-буфером и анализировали с ЛАЛ-реактивом, разведенным водой для ЛАЛ-теста. В обоих случаях были получены идентичные результаты: значение рН реакционной смеси составляло 7,8–7,9 и, начиная с разведения 1:8, испытуемые растворы не ингибировали реакцию гелеобразования (табл. 1, 2).

Коррекция рН-реакционной смеси ЛАЛ-реактива с испытуемыми растворами субстанции и соответственно полученные результаты анализа последовательных разведений образцов на воде для ЛАЛ-теста

Таблица 1

СОДЕРЖАНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭНДОТОКСИНОВ ОБРАЗЦОВ СУБСТАНЦИИ «АСКОРБИНОВАЯ КИСЛОТА» С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛАЛ-РЕАКТИВА В БУФЕРНОМ РАСТВОРЕ

Наименование ЛС	Повторность	Фактор разведения							Контроль	
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	положительный	отрицательный
Аскорбиновая кислота	1	–	–	–	–	–	–	–		
	2	–	–	–	–	–	–	–		
Положительный контроль	1	–	–	+	+	+	+	+		
	2	–	–	+	+	+	+	+	++	--

Примечание. Здесь и в других таблицах обозначения конечного результата гель-тромб теста: плюс (+) – наличие геля; минус (–) – отсутствие геля.

Таблица 2

**СОДЕРЖАНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭНДОТОКСИНОВ ОБРАЗЦОВ
СУБСТАНЦИИ «АСКОРБИНОВАЯ КИСЛОТА» НА РАСТВОРЕ ТРИС-БУФЕРА**

Наименование ЛС	Повторность	Фактор разведения							Контроль	
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	положительный	отрицательный
Аскорбиновая кислота	1	–	–	–	–	–	–	–		
	2	–	–	–	–	–	–	–		
Положительный контроль	1	–	–	+	+	+	+	+		
	2	–	–	+	+	+	+	+	++	--

и на растворе контрольного стандарта эндотоксина позволили валидировать разведение 1:100 для использования его в качестве рабочего разведения. Полученные величины различаются между собой менее чем в 2 раза, следовательно, субстанция «Аскорбиновая кислота» в концентрации 50 мг/мл не оказывала влияния на реакцию гелеобразования (табл. 3). Валидированное разведение 1:100 было значительно меньше максимально допустимого разведения (МДР) 1:2000 и гарантировало более жесткие требования к субстанции, позволяя определить содержание БЭ – менее 0,06 ЕЭ/мл.

При испытании субстанции «Терафтал» рассматривали ингибирование реакции в случае недостаточной концентрации катионов реакционной смеси. Готовили исходные растворы образцов на воде для ЛАЛ-теста с концентрацией 10 мг/мл. Положительные результаты были зарегистрированы, начиная только с разведения 1: 640 (табл. 4). В образцах с меньшими разведениями гель не образовывался, при этом величина рН испытуемых растворов являлась оптимальной для ЛАЛ-теста и составляла 7,8–7,9. По-видимому, субстанция обладает способностью образовывать комплексы с двухвалентными иона-

Таблица 3

**СОДЕРЖАНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭНДОТОКСИНОВ В ОБРАЗЦАХ СУБСТАНЦИИ «АСКОРБИНОВАЯ КИСЛОТА»
В РАЗВЕДЕНИИ 1:100 С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛАЛ-РЕАКТИВА НА БУФЕРНОМ РАСТВОРЕ**

Повторность	Разведения контрольного стандартного образца эндотоксина				Концентрация эндотоксина в конечной точке реакции, ЕЭ/мл	Среднее геометрическое значение концентрации эндотоксина, ЕЭ/мл	Отрицательный контроль			
	2λ	λ	0,5λ	0,25λ						
<i>На воде для ЛАЛ-теста</i>										
1	+	+	–	–	0,03	0,03	вода для ЛАЛ-теста	раствор аскорбиновой кислоты		
2	+	+	–	–	0,03					
<i>На растворе субстанции</i>										
1	+	–	–	–	0,06	0,035			--	--
2	+	+	–	–	0,03					
3	+	+	–	–	0,03					
4	+	+	–	–	0,03					

Примечание. Здесь и в табл. 6: λ – чувствительность ЛАЛ-реактива, 0,03125 ЕЭ/мл.

Таблица 4

**СОДЕРЖАНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭНДОТОКСИНОВ В ОБРАЗЦАХ
СУБСТАНЦИИ «ТЕРАФТАЛ» НА ВОДЕ ДЛЯ ЛАЛ-ТЕСТА**

Терафтал	Повторность	Фактор разведения							Контроль	
		1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	положительный	отрицательный
Испытуемый препарат	1	–	–	–	–	–	–	–		
	2	–	–	–	–	–	–	–		
Положительный контроль	1	–	–	–	–	–	+	+		
	2	–	–	–	–	–	+	+	++	--

ми, что и явилось причиной ингибирования магний-зависимой ЛАЛ-реакции.

Так как разведение 1:640 близко к значению МДР (1:691), невозможно было оценить качество субстанции с требуемым двукратным запасом. Чтобы преодолеть ингибирование, решили использовать раствор магния хлорида. Исходный раствор с концентрацией 10 мг/мл и все дальнейшие разведения субстанции «Терафтал» готовили на растворе магния хлорида. Результаты, полученные при испытании методом гель-тромб тест в разведениях исходного раствора от 1:10 до 1:640, были отрицательные. В положительном контроле испытуемой субстанции реакцию гелеобразования отмечали, начиная с разведения 1:160 (табл. 5). На основании полученных данных установлено, что в образцах испытуемой субстанции содержание БЭ не превышает 0,48 ЕЭ/мл.

Для валидации выбрали разведение исходных растворов исследуемых образцов 1:320, что в 2 раза мень-

ше МДР. В ходе эксперимента подтвердили чувствительность ЛАЛ-реактива (табл. 6). Чувствительность лизата, определенная с контрольным стандартом эндотоксина (КСЭ) в разведении на воде для ЛАЛ-теста и на растворе магния хлорида, во всех опытах отличалась менее чем в 2 раза от величины чувствительности ЛАЛ-реактива, полученной с КСЭ в разведении на растворах испытуемой субстанции.

Таким образом, согласно опытным данным, мешающий фактор можно устранить с помощью раствора магния хлорида, который можно также использовать в качестве необходимого компонента для контроля качества субстанции «Терафтал». Добавление в испытуемый раствор ионов магния Mg^{2+} позволило определить содержание БЭ в разведении, которое в 4 раза меньше максимально допустимого, и установить истинный уровень пирогенных примесей.

Неспецифическое гелеобразование наблюдали в опытах с препаратами иммуноглобулина и образца-

Таблица 5

СОДЕРЖАНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭНДОТОКСИНОВ ОБРАЗЦОВ СУБСТАНЦИИ «ТЕРАФТАЛ» НА РАСТВОРЕ МАГНИЯ ХЛОРИДА

Терафтал	Повторность	Фактор разведения							Контроль	
		1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	положительный	отрицательный
Испытуемый препарат	1	–	–	–	–	–	–	–		
	2	–	–	–	–	–	–	–		
Положительный контроль испытуемого препарата	1	–	–	–	–	+	+	+		
	2	–	–	–	–	+	+	+	++	--

Таблица 6

СОДЕРЖАНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭНДОТОКСИНОВ В ОБРАЗЦАХ СУБСТАНЦИИ «ТЕРАФТАЛ» НА РАСТВОРЕ МАГНИЯ ХЛОРИДА В РАЗВЕДЕНИИ 1:320

Повторность	Разведение КСЭ				Концентрация эндотоксина в конечной точке реакции, ЕЭ/мл	Среднее геометрическое значение концентрации эндотоксина, ЕЭ/мл	Отрицательный контроль					
	2λ	λ	0,5λ	0,25λ								
<i>На воде для ЛАЛ-теста</i>												
1	+	+	+	–	0,015	0,021	вода для ЛАЛ-теста	раствор магния хлорида	раствор препарата			
2	+	+	–	–	0,03							
<i>На растворе магния хлорида</i>												
1	+	+	–	–	0,03	0,03						
2	+	+	–	–	0,03							
<i>На растворе магния хлорида и субстанции «Терафтал»</i>												
1	+	+	–	–	0,03	0,035						
2	+	+	–	–	0,03							
3	+	+	–	–	0,03							
4	+	–	–	–	0,06							
							--	--	--			

Таблица 7

СОДЕРЖАНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭНДОТОКСИНОВ В ПРЕПАРАТАХ КРОВИ

Наименование препарата	Содержание белка, %	Содержание бактериальных эндотоксинов, ЕЭ/мл (гель-тромб тест)	
		фактическое	допустимое
Иммуноглобулин человека нормальный	10,2	Более 5 (не удовлетворяет)	Не более 5
Иммуноглобулин человека противостолбнячный, раствор для внутримышечного введения	12,3	Более 5 (не удовлетворяет)	Не более 5
Иммуноглобулин человека антистафилококковый, раствор для внутримышечного введения	10,3	Более 5 (не удовлетворяет)	Не более 5
Антиген, раствор для внутримышечного введения	12,6	Более 5 (не удовлетворяет)	Не более 5
Иммуноглобулин человека нормальный, для инфузий	4,86	Более 0,5 (не удовлетворяет)	Не более 0,5
Альбумин, раствор для инфузий 10%	10	Более 1,3 (не удовлетворяет)	Не более 1,3

Таблица 8

СОДЕРЖАНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭНДОТОКСИНОВ В ОБРАЗЦАХ ПРЕПАРАТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА, ОБРАБОТАННЫХ БЛОКАТОРОМ β-ГЛИКАНОВ

Наименование препарата	Содержание белка, %	Содержание бактериальных эндотоксинов, ЕЭ/мл (гель-тромб тест)	
		фактическое	допустимое
Иммуноглобулин человека нормальный	10,2	Менее 5	Не более 5
Иммуноглобулин человека противостолбнячный, раствор для внутримышечного введения	12,3	Менее 5	Не более 5
Иммуноглобулин человека антистафилококковый, раствор для внутримышечного введения	10,3	Менее 5	Не более 5
Антиген, раствор для внутримышечного введения	12,6	Менее 5	Не более 5
Иммуноглобулин человека нормальный, для инфузий	4,86	Менее 0,5	Не более 0,5
Альбумин, раствор для инфузий 10%	10	Менее 1,3	Не более 1,3

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, при анализе лекарственных средств для исключения факторов (ингибирования или потенцирования), влияющих на результаты ЛАЛ-теста, после установления причины их возникновения важно осуществить подбор правильных корректирующих действий. Правильно выбранный подход при определении бактериальных эндотоксинов позволяет исключить влияние мешающих факторов на реакцию гелеобразования.

ми «Альбумина 10% раствор». Полученные результаты указывают на несоответствие требованиям нормативной документации по показателю «Бактериальные эндотоксины» 5 образцов иммуноглобулинов отечественного производства и 1 альбумина (табл. 7). Учитывая вероятность получения ложноположительных результатов за счет взаимодействия ЛАЛ-реактива с β-гликаном, те же образцы были повторно испытаны методом гель-тромб тест, но с предварительной обработкой блокатором β-гликанов. Согласно данным эксперимента, препараты крови после обработки раствором блокатора β-гликанов не вызывают ложноположительную реакцию с ЛАЛ-реактивом (табл. 8).

Таким образом, удалось устранить реакцию потенцирования при анализе 5 серий препаратов иммуноглобулина и 1 серии препарата альбумина, которые ранее не выдержали испытание в стандартных условиях. Следовательно, применение специфического буфера – блокатора β-гликанов – позволяет проводить адекватное испытание препаратов крови на наличие БЭ.

Для устранения мешающих факторов необходимо установить причину их возникновения. Алгоритм дальнейших действий включает следующие варианты: в большинстве случаев (наиболее простое решение) проводят разведения испытуемой пробы вплоть до максимально допустимого; если устранить мешающие факторы не удалось, используют другие растворители для коррекции pH (буферные растворы или растворы кислот/щелочей); при испытании ЛС с хелатирующими свойствами рекомендуется в качестве растворителя применять растворы двухвалентных металлов; при ложноположительных реакциях следует проводить денатурацию белков, ультрафильтрацию или использовать блокатор β-гликанов (последний вариант – наиболее распространенный).

ЛИТЕРАТУРА

1. Шаповалова О.В., Долгова Г.В., Неугодова Н.П., Сапожникова Г.А. Использование органических растворителей для определения показателя «Бактериальные эндотоксины» в фармацевтических субстанциях, не растворимых в воде. Антибиотики и химиотерапия, 2013; 58: 41–4.
2. Шаповалова О.В., Неугодова Н.П., Долгова Г.В., Сапожникова Г.А. Особенности проведения разработки раздела «Бактериальные эндотоксины» для субстанций антибиотиков. Антибиотики и химиотерапия, 2008; 53: 34–8.
3. Меркулова Ю.В., Долгова Г.В., Чайка Л.А., Гомон О.Н., Неугодова Н.П., Шаповалова О.В. Особенности проведения испытания на бактериальные эндотоксины лекарственных средств в виде масляных растворов. Фармаком, 2008; 1: 67–73.
4. Шаповалова О.В., Неугодова Н.П., Долгова Г.В., Сапожникова Г.А. Методические подходы к разработке показателя «Бактериальные эндотоксины» в фармацевтических субстанциях. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. 2012; 3: 47–50.
5. Меркулова Ю.В., Чайка Л.А., Гомон О.Н. Использование буферных растворов в испытании «Бактериальные эндотоксины». Фармаком, 2009; 3: 40–8.
6. Nagarajan K., Chakraborty Shibu, Chitnis P. K. Inhibition and Enhancement. BET Newsletter A Charles River Private Limited Communication, 2010; 1 (4): 5.
7. Low Endotoxin Recovery (LER): A Review. LALUpdate, 2014; 30 (2): 8.
8. Ситников А.Г., Травина Л.А., Багирова В.Л. ЛАА-тест. Современные подходы к определению пирогенности. М., 1997; 27–8.
9. Hurley, J.C., F.A. Tosolini, W.J. Louis. Quantitative *Limulus* lysate assay for endotoxin and the effect of plasma. Clin. Pathol, 1991; 44(10): 849–54.
10. Nagarajan K., Chitnis P. K. Part II: Enhancement». BET Newsletter A Charles River Private Limited Communication, 2010; 1 (5): 5.
11. Государственная фармакопея Российской Федерации XII изд. ч. I. ФС 42-0218-07 «Аскорбиновая кислота». М: Научный центр экспертизы средств медицинского применения, 2007.
12. Государственная фармакопея Российской Федерации XIII изд. (Электронный ресурс). Режим доступа: <http://pharmacopoeia.ru/ofs-1-2-4-0006-15-bakterialnye-endotoksiny>

Поступила 13 апреля 2017 г.

DETECTION OF BACTERIAL ENDOTOXINS IN DRUGS: DISTURBING FACTORS AND THEIR ELIMINATION

O.V. Shapovalova; N.P. Neugodova, PhD; G.A. Sapozhnikova; A.A. Agashirina; O.V. Gunar, PhD

Research Center for Examination of Medical Products, Ministry of Health of the Russian Federation; 8, Petrovsky Boulevard, Build. 2, Moscow 127051, Russian Federation

SUMMARY

Introduction. It is important to ensure the absence of pyrogenic impurities in the manufacture of parenteral drugs. Control of pharmaceutical substances for bacterial endotoxins is a complex problem with the substances that are poorly water-soluble and/or have obstacles in carrying out the LAL test.

Objective: to investigate the influence of the factors that may interfere with the detection of bacterial endotoxins via the gel-clot test, to search, and choose a method that eliminates the disturbing factors.

Material and methods. The investigation objects were pharmaceutical substances, such as ascorbic acid and Teraftal, and blood drugs. The LAL-test in the modification of the gel-clot used tris-buffer (Tris-hydroxyethylaminomethyl hydrochloride), magnesium chloride solution, and the specific buffer β -glycan blocker.

Results. Procedures were proposed to eliminate the factors interfering with the LAL-test. The most common causes of false results, such as inhibited gel formation due to a wrong pH value or the ability of substances to form complexes, were considered. A decision was proposed to prevent false-positive results in the index "Bacterial endotoxins" in experiments with blood preparations.

Conclusion. Approaches to eliminating the influence of disturbing factors on the results of the LAL-test were elaborated.

Key words: drugs, pharmaceutical substances, quality, bacterial endotoxins, LAL test, false results, disturbing factors, inhibition, potentiation.

REFERENCES

1. Shapovalova O.V., Dolgova G.V., Neugodova N.P., Sapozhnikova G.A. Use of organic solvents to determine Bacterial endotoxins in pharmaceutical substances, insoluble in water. Antibiotiki i himioterapiya, 2013; 58: 41–4 (in Russian).
2. Shapovalova O.V., Neugodova N.P., Dolgova G.V., Sapozhnikova G.A. Features of the development of the section «Bacterial endotoxins» for antibiotic substances. Antibiotics and chemotherapy, 2008; 53: 34–8 (in Russian).
3. Merkulova Yu.V., Dolgova G.V., Chaika L.A., Gomon O.N., Neugodova N.P., Shapovalova O.V. Features of the test for bacterial endotoxins of drugs in the form of oily solutions. Farmakom, 2008; 1: 67–73 (in Russian).
4. Shapovalova O.V., Neugodova N.P., Dolgova G.V., Sapozhnikova G.A. Methodical approaches to the development of the indicator «Bacterial endotoxins» in pharmaceutical substances. Vedomosti nauchnogo centra ehkspertizy sredstv medicinskogo primeneniya, 2012; 3: 47–50 (in Russian).
5. Merkulova Yu.V., Chaika L.A., Gomon O.N. Use of buffer solutions in the test «Bacterial endotoxins». Farmakom, 2009; 3: 40–8 (in Russian).
6. Nagarajan K., Chakraborty Shibu, Chitnis P. K. Inhibition and Enhancement. BET Newsletter A Charles River Private Limited Communication, 2010; 1 (4): 5.
7. Low Endotoxin Recovery (LER):A Review. LALUpdate, 2014;30(2):8.
8. Sitnikov A.G., Travina L.A., Bagirova V.L. LAL test. Modern approaches to the determination of pyrogenicity. M., 1997; 27–8 (in Russian).
9. Hurley, J.C., F.A. Tosolini, W.J. Louis. Quantitative *Limulus* lysate assay for endotoxin and the effect of plasma. Clin. Pathol, 1991; 44 (10): 849–54.
10. Nagarajan K., Chitnis P. K. Part II: Enhancement». BET Newsletter A Charles River Private Limited Communication, 2010; 1 (5): 5.
11. State Pharmacopoeia of the Russian Federation XII ed., part 1. FS 42-0218-07 Ascorbic acid. Moscow: Scientific Centre for Expertise of Medical Application Products, 2007; 506–9 (in Russian).
12. State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIII ed. (Electronic resource). Mode of access: <http://pharmacopoeia.ru/ofs-1-2-4-0006-15-bakterialnye-endotoksiny> (in Russian).