

附件：

1143 细菌内毒素检查法

本法系利用鲎试剂来检测或量化由革兰阴性菌产生的细菌内毒素，以判断供试品中细菌内毒素的限量是否符合规定的一种方法。

细菌内毒素检查~~包括两种方法，即凝胶法和光度测定法，后者包括浊度法和显色基质法。~~可采用凝胶检测和光度检测技术，共包括以下六种方法：凝胶限度法（方法 1）、凝胶定量法（方法 2）、动态浊度法（方法 3）、终点浊度法（方法 4）、动态显色法（方法 5）、终点显色法（方法 6）。供试品检测时，可使用其中任何一种方法进行试验。当测定结果有争议时，除另有规定外，以凝胶限度法结果为准。

本试验操作过程应防止内毒素的污染。

细菌内毒素的量用内毒素单位（EU）表示，1EU 与 1 个内毒素国际单位（IU）相当。

细菌内毒素国家标准品系自大肠埃希菌提取精制，并以细菌内毒素国际标准品标定其效价，用于标定、复核、仲裁鲎试剂灵敏度、标定细菌内毒素工作标准品的效价，干扰试验及检查法中编号 B 和 C 溶液的制备、凝胶法中鲎试剂灵敏度复核试验、光度测定法中标准曲线可靠性试验。

细菌内毒素工作标准品系以细菌内毒素国家标准品为基准标定其效价，用于干扰试验及检查法中编号 B 和 C 溶液的制备、凝胶法中鲎试剂灵敏度复核试验、光度测定法中标准曲线可靠性试验。

细菌内毒素检查用水应符合灭菌注射用水标准，其内毒素含量小于 0.015EU/ml（用于凝胶法检测技术）或小于 0.005EU/ml（用于光度法检测技术），且对内毒素试验无干扰作用。

鲎试剂是从鲎的血液中提取出的冻干试剂，可以与细菌内毒素发生凝集反应。除了内毒素，鲎试剂还与某些 β -葡聚糖反应，产生假阳性结果。如遇含有 β -葡聚糖的样品，可使用去 G 因子鲎试剂或 G 因子反应抑制剂来排除鲎试剂与 β -葡聚糖的反应。

试验所用的器皿需经处理，以去除可能存在的外源性内毒素。耐热器皿常用干热灭菌法（250℃、至少 30 分钟）去除，也可采用其他确证不干扰细菌内毒素

29 检查的适宜方法。若使用塑料器具，如微孔板和与微量加样器配套的吸头等，应
30 选用标明无内毒素并且对试验无干扰的器具。

31 **供试品溶液的制备** ~~某些~~供试品一般采用溶解和（或）稀释等适宜方法或在
32 水性溶液中浸提制成供试品溶液。必要时，可调节被测溶液（或其稀释液）的
33 pH 值，一般供试品溶液和鲎试剂混合后溶液的 pH 值在 6.0~8.0 的范围内为宜，
34 可使用适宜的酸、碱溶液或缓冲液调节 pH 值。酸或碱溶液须用细菌内毒素检查
35 用水在已去除内毒素的容器中配制。所用溶剂、酸碱溶液及缓冲液应不含内毒素
36 和干扰因子。

37 **内毒素限值的确定** 药品、~~生物制品的~~细菌内毒素限值（L）一般按以下公
38 式确定：

$$L=K/M$$

39
40 式中 L 为供试品的细菌内毒素限值，一般以 EU/ml、EU/mg 或 EU/U(活性单位)
41 表示；

42 K 为人每千克体重或每平方米每小时最大可接受的内毒素剂量，以 EU/
43 (kg·h) 表示，注射剂 K=5EU/(kg·h)，放射性药品注射剂 K=2.5EU/
44 (kg·h)^{注1}，鞘内用注射剂 K=0.2EU/(kg·h)，按体表面积给药时 K=100EU/
45 (m²·h)；

46 M 为人用每千克体重或每平方米每小时的最高供试品剂量，以 ml/(kg·h)、
47 mg/(kg·h)、~~或~~U/(kg·h)、ml/(m²·h) 等表示，人均体重按 60kg
48 计算，~~人体表面积按 1.62m²计算。~~注射时间若不足 1 小时，按 1 小时计
49 算。~~供试品每平方米体表面积剂量乘以 0.027 即可转换为每千克体重剂~~
50 ~~量(M)。~~

51 按人用剂量计算限值时，如遇特殊情况，可根据生产和临床用药实际情况做
52 必要调整，但需说明理由。

53 **确定最大有效稀释倍数（MVD）** 最大有效稀释倍数是指在试验中供试品溶
54 液被允许达到稀释的最大倍数，在不超过此稀释倍数的浓度下进行内毒素限值的
55 检测。用以下公式来确定 MVD：

$$MVD=cL/\lambda$$

56
57 式中 L 为供试品的细菌内毒素限值；

58 c 为供试品溶液的浓度,当 L 以 EU/mg 或 EU/U 表示时,c 的单位需为 mg/ml
59 或 U/ml,当 L 以 EU/ml 表示时,则 c 等于 1.0ml/ml。如需计算在 MVD
60 时的供试品浓度,即最小有效稀释浓度,可使用公式 $c = \lambda / L$;
61 λ 为在凝胶法中鲎试剂的标示灵敏度 (EU/ml),或是在光度测定法中所使
62 用的标准曲线上最低的内毒素浓度。

63 **方法1 凝胶法检测技术 (包括方法 1 和方法 2)**

64 凝胶法系通过鲎试剂与内毒素产生凝集反应的原理进行限度检测或半定量
65 检测内毒素的方法。

66 1. 预备试验

67 为保证凝胶法的准确性和有效性,按以下步骤开展鲎试剂灵敏度复核试验和
68 供试品的干扰试验。

69 **鲎试剂灵敏度复核试验** 在本检查法规定的条件下,使鲎试剂产生凝集的内
70 毒素的最低浓度即为鲎试剂的标示灵敏度,用 EU/ml 表示。当使用新批号的鲎试
71 剂或试验条件发生了任何可能影响检验结果的改变时,应进行鲎试剂灵敏度复核
72 试验。

73 根据鲎试剂灵敏度的标示值 (λ),将细菌内毒素国家标准品或细菌内毒素
74 工作标准品用细菌内毒素检查用水溶解,在旋涡混合器上混匀 15 分钟或参照标
75 准品说明书要求的混匀时间进行操作,然后至少制成包含 2λ 、 λ 、 0.5λ 和 0.25
76 λ 四个浓度的内毒素标准溶液,每稀释一步均应在旋涡混合器上混匀 30 秒或
77 参照标准品说明书中要求的混匀时间进行操作。取不同浓度的内毒素标准溶液,
78 分别与等体积(如 0.1ml)的鲎试剂溶液混合,每一个内毒素浓度平行做 4 管^{注2};
79 另外取 2 管加入等体积的细菌内毒素检查用水作为阴性对照。将试管中溶液轻轻
80 混匀后,封闭管口,垂直放入 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 的恒温器中,保温 60 分钟 ± 2 分钟。

81 将试管从恒温器中轻轻取出,缓缓倒转 180° ,若管内形成凝胶,并且凝胶
82 不变形、不从管壁滑脱者为阳性;未形成凝胶或形成的凝胶不坚实、变形并从管
83 壁滑脱者为阴性。保温和拿取试管过程应避免受到振动,造成假阴性结果。

84 当最大浓度 2λ 管均为阳性,最低浓度 0.25λ 管均为阴性,阴性对照管为阴
85 性,试验方为有效。按下式计算反应终点浓度的几何平均值,即为鲎试剂灵敏度
86 的测定值 (λc)。

$$\lambda_c = \text{antilg} (\sum X/n)$$

88 式中 X 为反应终点浓度的对数值 (lg)。反应终点浓度是指系列递减的内毒素
89 浓度中最后一个呈阳性结果的浓度；

90 n 为每个浓度的平行管数。

91 当 λ_c 在 $0.5 \sim 2 \lambda$ (包括 0.5λ 和 2λ) 时, 方可用于细菌内毒素检查, 并
92 以标示灵敏度 λ 为该批鲎试剂的灵敏度。

93 **干扰试验** 按表 1 制备溶液 A、B、C 和 D, 使用的供试品溶液应为未检验出
94 内毒素且不超过最大有效稀释倍数 (MVD) 的溶液, 按鲎试剂灵敏度复核试验项
95 下操作, [并计算溶液 C 和溶液 B 的反应终点浓度的几何平均值。](#)

96 **表 1 凝胶法干扰试验溶液的制备**

编号	内毒素浓度/被加入内毒素的溶液	稀释用液	稀释倍数	所含内毒素的浓度	平行管数
A	无/供试品溶液	-	-	-	2
B	2 λ /供试品溶液	供试品溶液	1	2 λ	4
			2	1 λ	4
			4	0.5 λ	4
			8	0.25 λ	4
C	2 λ /检查用水	检查用水	1	2 λ	2
			2	1 λ	2
			4	0.5 λ	2
			8	0.25 λ	2
D	无/检查用水	-	-	-	2

97 注: A 为供试品溶液; B 为干扰试验系列; C 为鲎试剂标示灵敏度的对照系列; D 为阴性对照。

98 只有当溶液 A 和阴性对照溶液 D 的所有平行管都为阴性, 并且系列溶液 C 的
99 结果符合鲎试剂灵敏度复核试验要求时, 试验方为有效。当系列溶液 B 的结果符
100 [合鲎试剂灵敏度复核试验要求时在 0.5~2 \$\lambda\$ 之间 \(包括 0.5 \$\lambda\$ 和 2 \$\lambda\$ \)](#) 时, 认为
101 供试品在该浓度下无干扰作用。其他情况则认为供试品在该浓度下存在干扰作用。
102 若供试品溶液在小于 MVD 的稀释倍数下对试验有干扰, 应将供试品溶液进行不超
103 过 MVD 的进一步稀释, 再重复干扰试验。

104 可通过对供试品进行更大倍数的稀释或通过其他适宜的方法(如过滤、中和、
105 透析或加热处理等)排除干扰。为确保所选择的处理方法能有效地排除干扰且不
106 会使内毒素失去活性,要使用预先添加了标准内毒素再经过处理的供试品溶液进
107 行干扰试验。

108 当进行新药的内毒素检查试验前,或无内毒素检查项的品种建立内毒素检查
109 法时,须进行干扰试验。

110 当鲎试剂、供试品的处方、生产工艺改变或试验环境中发生了任何有可能影
111 响试验结果的变化时,须重新进行干扰试验。

112 **检查法**

113 ~~(1) 凝胶限度试验~~ 2. 凝胶限度法(方法 1)

114 **步骤** 按表 2 制备溶液 A、B、C 和 D。使用稀释倍数不超过 MVD 并且已经排
115 除干扰的供试品溶液来制备溶液 A 和 B。按鲎试剂灵敏度复核试验项下操作。

116 **表 2 凝胶限度试验溶液的制备**

编号	内毒素浓度/配制内毒素的溶液	平行管数
A	无/供试品溶液	2
B	2 λ /供试品溶液	2
C	2 λ /检查用水	2
D	无/检查用水	2

117 注: A 为供试品溶液; B 供试品阳性对照; C 为阳性对照; D 为阴性对照。

118 **结果判断** 保温 60 分钟±2 分钟后观察结果。若阴性对照溶液 D 的平行管
119 均为阴性,供试品阳性对照溶液 B 的平行管均为阳性,阳性对照溶液 C 的平行管
120 均为阳性,试验有效。

121 若溶液 A 的两个平行管均为阴性,判定供试品符合规定。若溶液 A 的两个平
122 行管均为阳性,判定供试品不符合规定。若溶液 A 的两个平行管中的一管为阳性,
123 另一管为阴性,需进行复试。复试时溶液 A 需做 4 支平行管,若所有平行管均为
124 阴性,判定供试品符合规定,否则判定供试品不符合规定。

125 若供试品的稀释倍数小于 MVD 而溶液 A 结果出现不符合规定时,可将供试品
126 稀释至 MVD 重新实验,再对结果进行判断。

127 ~~(2) 凝胶半定量试验~~ 3. 凝胶定量法(方法 2)

128 **步骤** 本方法系通过确定反应终点浓度来量化供试品中内毒素的含量。按表
129 3 制备溶液 A、B、C 和 D。按鲎试剂灵敏度复核试验项下操作。

130 **计算及结果判断** 若阴性对照溶液 D 的平行管均为阴性，供试品阳性对照溶
131 液 B 的平行管均为阳性，系列溶液 C 的反应终点浓度的几何平均值在 $0.5 \sim 2 \lambda$ ，
132 试验有效。

133 系列溶液 A 中每一系列平行管的终点稀释倍数乘以 λ ，为每个系列的反应终
134 点浓度。如果检验的是经稀释的供试品，则将终点浓度乘以供试品进行半定量试
135 验的初始稀释倍数，即得到每一系列内毒素浓度 c 。

136 若每一系列内毒素浓度均小于规定的限值，判定供试品符合规定。每一系列
137 内毒素浓度的几何平均值即为供试品溶液的内毒素浓度 [按公式 $c_t = \text{antilg} (\Sigma$
138 $\lg c / 2)$]。若试验中供试品溶液的所有平行管均为阴性，应记为内毒素浓度小于
139 λ (如果检验的是稀释过的供试品，则记为小于 λ 乘以供试品进行半定量试验的
140 初始稀释倍数)。

141 若任何系列内毒素浓度不小于规定的限值时，则判定供试品不符合规定。当
142 供试品溶液的所有平行管均为阳性，可记为内毒素的浓度大于或等于最大的稀释
143 倍数乘以 λ 。

144 **表 3 凝胶半定量试验溶液的制备**

编号	内毒素浓度/被加入 内毒素的溶液	稀释用液	稀释倍 数	所含内毒素的浓 度	平行管数
A	无/供试品溶液	检查用水	1	—	2
			2	—	2
			4	—	2
			8	—	2
B	2λ / 供试品溶液	—	1	2λ	2
C	2λ / 检查用水	检查用水	1	2λ	2
			2	1λ	2
			4	0.5λ	2
			8	0.25λ	2
D	无/检查用水	—	—	—	2

145 注：A 为不超过 MVD 并且通过干扰试验的供试品溶液。从通过干扰试验的稀释倍数开始用检查用水稀释
146 如 1 倍、2 倍、4 倍和 8 倍，最后的稀释倍数不得超过 MVD。

147 B 为含 2λ 浓度标准内毒素的溶液 A（供试品阳性对照）。

148 C 为鲎试剂标示灵敏度的对照系列。

149 D 为阴性对照。

150 方法 2—光度测定法光度检测技术（包括方法 3、4、5、6）

151 ~~光度测定法分为浊度法和显色基质法。~~

152 浊度法检测法系利用检测鲎试剂与内毒素反应过程中的浊度变化而测定内
153 毒素含量的方法。~~根据检测原理，可分为终点浊度法和动态浊度法。终点浊度法~~
154 ~~是依据反应混合物中的内毒素浓度和其在孵育终止时的浊度（吸光度或透光率）~~
155 ~~之间存在的量化关系来测定内毒素含量的方法。动态浊度法是检测反应混合物的~~
156 ~~浊度到达某一预先设定的吸光度或透光率所需要的反应时间，或是检测浊度增加~~
157 ~~速度的方法。~~根据检测原理，可分为动态浊度法（方法 3）和终点浊度法（方法
158 4）。动态浊度法是检测反应混合物的浊度到达某一预先设定的吸光度或透光率所
159 需要的反应时间，或是检测浊度增加速度的方法。终点浊度法是依据反应混合物
160 中的内毒素浓度和其在孵育终止时的浊度（吸光度或透光率）之间存在的量化关
161 系来测定内毒素含量的方法。

162 显色基质法检测法系利用检测鲎试剂与内毒素反应过程中产生的凝固酶使
163 特定底物释放出呈色团的多少而测定内毒素含量的方法。~~根据检测原理，分为终~~
164 ~~点显色法和动态显色法。终点显色法是依据反应混合物中内毒素浓度和其在孵育~~
165 ~~终止时释放出的呈色团的量之间存在的量化关系来测定内毒素含量的方法。动态~~
166 ~~显色法是检测反应混合物的吸光度或透光率达到某一预先设定的检测值所需要~~
167 ~~的反应时间，或检测色度增长速度的方法。~~根据检测原理，分为动态显色法（方
168 法 5）和终点显色法（方法 6）。动态显色法是检测反应混合物的吸光度或透光率
169 达到某一预先设定的检测值所需要的反应时间，或检测色度增长速度的方法。终
170 点显色法是依据反应混合物中内毒素浓度和其在孵育终止时释放出的呈色团的
171 量之间存在的量化关系来测定内毒素含量的方法。

172 光度测定试验需在特定的仪器中进行，温度一般为 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

173 供试品和鲎试剂的加样量、供试品和鲎试剂的比例以及保温时间等，参照所

174 用仪器和试剂的有关说明进行。

175 方法 3、4、5、6 均采用以下步骤进行。

176 1. 预备试验

177 为保证浊度和显色基质检测法试验的准确性和有效性，应预先进行标准曲线
178 的可靠性试验以及供试品的干扰试验。

179 **标准曲线的可靠性试验** 当使用新批号的鲎试剂或试验条件有任何可能会
180 影响检验结果的改变时，需进行标准曲线的可靠性试验。

181 用标准内毒素制成溶液，制成至少 3 个浓度的稀释液（相邻浓度间稀释倍数
182 不得大于 10），最低浓度不得低于所用鲎试剂的标示检测限。每一稀释步骤的混
183 匀时间同凝胶法，每一浓度至少做 3 支平行管。同时要求做 2 支阴性对照，当阴
184 性对照的吸光度小于或透光率大于标准曲线最低点的检测值，或反应时间大于标
185 准曲线最低点的反应时间，将全部数据进行线性回归分析。

186 根据线性回归分析，标准曲线的相关系数(r)的绝对值应大于或等于 0.980，
187 试验方为有效。否则须重新试验。

188 **干扰试验** 选择标准曲线中点或一个靠近中点的内毒素浓度（设为 λ_m ），作
189 为供试品干扰试验中添加的内毒素浓度。按表 4 制备溶液 A、B、C 和 D。

190 **表 4 光度测定法干扰试验溶液的制备**

编号	内毒素浓度	被加入内毒素的溶液	平行管数
A	无	供试品溶液	至少 2
B	标准曲线的中点（或附近点）的浓度 （设为 λ_m ）	供试品溶液	至少 2
C	至少 3 个浓度（最低一点设定为 λ ）	检查用水	每一浓度 至少 2
D	无	检查用水	至少 2

191 注：A 为稀释倍数不超过 MVD 的供试品溶液。

192 B 为加入了标准曲线中点或靠近中点的一个已知内毒素浓度的，且与溶液 A 有相同稀释倍数的供试品
193 溶液。

194 C 为如“标准曲线的可靠性试验”项下描述的，用于制备标准曲线的标准内毒素溶液。

195 D 为阴性对照。

196 按所得线性回归方程分别计算出供试品溶液和含标准内毒素的供试品溶液
197 的内毒素含量 c_t 和 c_s ，再按下式计算该试验条件下的回收率 (R)。

$$198 \quad R = (c_s - c_t) / \lambda_m \times 100\%$$

199 当内毒素的回收率在 50%~200%，则认为在此试验条件下供试品溶液不存在
200 干扰作用。

201 当内毒素的回收率不在指定的范围内，须按“凝胶法干扰试验”中的方法去
202 除干扰因素，并重复干扰试验来验证处理的有效性。

203 当鲎试剂、供试品的处方、生产工艺改变或试验环境等发生了任何有可能影
204 响试验结果的变化时，须重新进行干扰试验。

205 **2. 检查法**

206 **步骤** 按“光度测定法的干扰试验”中的操作步骤进行检测。

207 **计算** 使用系列溶液 C 生成的标准曲线来计算溶液 A 的每一个平行管的内毒
208 素浓度。

209 试验必须符合以下三个条件方为有效：

- 210 (1) 系列溶液 C 的结果要符合“标准曲线的可靠性试验”中的要求；
- 211 (2) 用溶液 B 中的内毒素浓度减去溶液 A 中的内毒素浓度后，计算出的内毒
212 素的回收率要在 50%~200% 的范围内；
- 213 (3) 阴性对照吸光度小于或透光率大于标准曲线最低点的检测值或反应时间
214 大于标准曲线最低点的反应时间。

215 **结果判断** 若供试品溶液所有平行管的平均内毒素浓度乘以稀释倍数后，小
216 于规定的内毒素限值，判定供试品符合规定。若大于或等于规定的内毒素限值，
217 判定供试品不符合规定。

218 **注 1:** 当放射性药品的用药途径为鞘内注射时，K 值按 0.2EU/(kg·h) 计。

219 **注 2:** 本检查法中，“管”的意思包括其他任何反应容器，如微孔板中的孔。

1143 细菌内毒素检查法修订说明

一、对 ICH 协调相关内容修订

1. 参考 EP10.0 和 JP XVII 调整体例。将凝胶法修改为凝胶检测技术，光度法修改为光度检测技术，包含的六种方法明确标示为：凝胶限度法（方法 1）、凝胶定量法（方法 2）、动态浊度法（方法 3）、终点浊度法（方法 4）、动态显色法（方法 5）、终点显色法（方法 6），同步修改相关的表述。

2. 增加按体表面积给药时的 K 值和 K 的定义，并调整 M 中相应的表述。明确当放射性药品的用药途径为鞘内注射时，“K 值按 $0.2\text{EU}/(\text{kg} \cdot \text{h})$ 计”。

3. 凝胶法鲎试剂灵敏度复核试验中，将试验内容修改为“至少制成包含 2λ 、 λ 、 0.5λ 和 0.25λ 4 个浓度的内毒素标准溶液”，判断试验是否有效的要求中删除了“最大浓度 2λ 管均为阳性，... 试验方为有效”的规定。

4. 凝胶法检测技术干扰试验项下，增加“并计算溶液 C 和溶液 B 的反应终点浓度的几何平均值”，并将“当系列溶液 B 的结果符合鲎试剂灵敏度复核试验要求时，认为供试品在该浓度下无干扰作用”修订为“当系列溶液 B 的结果在 $0.5\sim 2\lambda$ 之间（包括 0.5λ 和 2λ ）时，认为供试品在该浓度下无干扰作用”，与 ICH 协调案保持一致。

二、其他内容修订

1. 供试品溶液的制备中，为避免歧义，将“或在水性溶液中浸提”制备供试品溶液的描述删除。

2. 因“生物制品”属于药品的一类，故本次在内毒素限值的确定项下予以删除。