

附件：9251 细菌内毒素检查法应用指导原则草案公示稿（第一次）

1 9251 细菌内毒素检查法应用指导原则

2 本指导原则是对细菌内毒素检查法的内容及应用做进一步的说明。

3 1. 细菌内毒素限值的设定

4 产品的细菌内毒素限值一般是通过公式 $L=K/M$ 计算得到的。其中 M 为人
5 用每千克体重每小时最大供试品剂量，可参考药品说明书或具有权威性资料
6 的用法用量。

7 制定品种细菌内毒素限值时，应考虑以下情况。

8 (1) 联合用药应考虑其他制剂可能引入的细菌内毒素；儿科用药、营养
9 不良用药和恶病质用药等，应考虑细菌内毒素对体弱患者人群可能导致更严
10 重的影响。因此，制定上述品种细菌内毒素限值时，可在计算值的基础上适
11 当严格。

12 (2) 100ml 及以上装量的大输液类制剂，其细菌内毒素限值一般不得超
13 过 0.50EU/ml。

14 (3) 制定具有多种规格注射液的细菌内毒素限值时，限值的单位应与产
15 品临床用法用量 (M) 的标示单位一致，如 EU/mg、EU/U 或 EU/ml。

16 (4) 注射或植入眼内的药物产品，其细菌内毒素限值一般不得超过 2.0
17 EU/剂。眼科冲洗产品的内毒素限值一般不得超过 0.5 EU/ml。

18 ~~(4) 制定原料药的细菌内毒素限度值时，应参考其制剂的细菌内毒素限~~
19 ~~值。~~

20 (5) 制定原辅料和药包材的细菌内毒素限值时，应根据制剂内毒素控制
21 的要求，基于风险评估，采用具体问题具体分析的原则。应根据其在制剂中
22 的用量，结合生产工艺，评估各组分对制剂引入细菌内毒素污染的潜在风险，
23 合理分配每一种成分和药包材的内毒素限值。以确保即使每种成分和药包材
24 细菌内毒素污染达到其限值，按照批准的生产工艺生产的制剂细菌内毒素检
25 查仍符合规定。

26 2. 细菌内毒素检查方法的选择

27 细菌内毒素检查法（通则 1143）包括凝胶法检测和光度检测技术法共 6

28 种细菌内毒素检查方法。供试品检测时可以选用其中任何一种方法进行细菌
29 内毒素检查。

30 (1) **凝胶法检测技术** 凝胶法检测技术的优点是操作简便，供试品在排
31 除干扰作用后均可使用凝胶法检测技术进行检验。

32 凝胶法检测技术的干扰试验是确定供试品能否使用凝胶法检测技术的决
33 定因素。进行干扰实验时，应挑选与鲎试剂反应呈阴性的样品进行。

34 若样品稀释到 MVD 仍不能排除干扰作用，应进一步对供试品的前处理进
35 行研究，再用干扰试验验证能否使用凝胶法检测技术。

36 (2) **光度法检测技术** 光度法检测技术（包括浊度法和显色法）可定量
37 检测内毒素的含量，能较为准确评估产品在生产过程中污染的相对风险，定
38 量检测的数据不仅有利于追踪产品质量趋势，还能起到风险预警的作用，达
39 到数据完整性的要求。

40 供试品能否采用光度法检测技术进行检测，须通过干扰试验确定。光度
41 检测技术测定法可通过回收率判断出干扰的趋势，尤其对于研究性质的样品
42 （如新产品）更具有优势。

43 由于光度法检测技术的检测范围比凝胶法检测技术宽，使得有干扰的样品
44 可以有更大的稀释倍数，对于部分使用凝胶法检测技术无法排除干扰的样品，
45 可以尝试使用光度法检测技术建立细菌内毒素检测方法。

46 3. 供试品的前处理方法

47 除另有规定外，一般应使用内毒素检查用水（BET 水）溶解或稀释样品进
48 行细菌内毒素检查。[常见的干扰因素和排除干扰的前处理方法见表 1。](#)

49 **表 1. 常见的干扰和排除措施**

干扰因素	干扰机制	前处理方法
pH	影响鲎试剂的酶活性	用含盐酸，氢氧化钠的 BET 水稀释用或在 tris 缓冲液中稀释来调节产品的 pH。
渗透压	影响鲎试剂的酶活性	一般采用 BET 水稀释即可。
螯合剂	影响鲎试剂的酶活性、LPS 聚集	添加含镁离子的缓冲液的 BET 水中稀释。
葡聚糖	影响鲎试剂的酶活性	使用试剂生产商提供的葡聚糖阻滞剂。
非特异性蛋白质干扰（例	影响鲎试剂的酶活性	稀释并结合加热

如丝氨酸蛋白酶)

重金属	影响鲎试剂的酶活性、LPS 聚集	含有 1mM 螯合剂乙二胺四乙酸 (EDTA) 的稀释
蛋白质	影响鲎试剂的酶活性、LPS 聚集	BET 水稀释或生理盐水 BET 加热用水稀释
去污剂 (表面活性剂)	影响鲎试剂的酶活性、LPS 聚集	BET 水稀释
钙阳离子	影响鲎试剂的酶活性	含 1mM 螯合剂 EDTA 的水稀释

50 ~~在水中溶解度低的样品可以采取超声波、加热助溶、添加助溶剂、调节~~
 51 ~~pH 等方法提高其溶解度。当采用适宜的有机溶剂 (乙醇、DMSO 等) 进行溶解~~
 52 ~~时, 必须进行干扰试验验证内毒素的回收。~~

53 难溶性或溶解度较低的样品可依据样品特性, 选择适宜的方法进行前处
 54 理, 前处理包括样品的溶解和干扰的排除。样品的溶解方法可采用调节 pH、
 55 加热、超声、添加助溶剂等方式溶解, 也可采用有机溶剂溶解; 溶解后干扰
 56 的排除方法可采用内毒素检查用水稀释、酸碱缓冲液稀释、超滤、萃取等方
 57 式。当采用上述方法进行供试品前处理时, 应在供试品或供试品溶液中预先
 58 添加内毒素标准品, 再与供试品同步处理后进行干扰试验来验证前处理方法
 59 不会对内毒素产生破坏或干扰作用。供试品前处理所用试剂的内毒素含量应
 60 对试验无影响。采用包合技术的新型制剂如微球、脂质体等供试品, 应采取
 61 适宜方法将包合体破坏, 使包裹在内部的细菌内毒素完全释放, 再进行检测。

62 对于容器类药包材一般采用加入标示容量的内毒素检查用水浸泡容器内
 63 腔的方法进行供试液制备; 对于非容器类的药包材, 应将药包材置于无热原
 64 玻璃器皿内, 一般加入不超过 40mL 的细菌内毒素检查用水进行供试液制备,
 65 其中针对体积较大或者较小的药包材, 可以相应的增加或者减少提取液的体
 66 积, 同时在内毒素限量值方面做出相应的调整。对于无菌供应的药包材, 应
 67 采用 37°C ± 1°C, 提取不少于 1h 的条件制备供试液; 对于非无菌供应的包装
 68 无菌药品的药包材, 应按照所包装制剂推荐的灭菌条件进行供试液制备。

69 4. 产品细菌内毒素检查法的建立

70 建立品种的细菌内毒素检查法时, 为验证样品和不同生产厂家鲎试剂反
 71 应的一致性, 应使用两个生产厂家的鲎试剂对至少三批样品进行干扰试验。

72 建立产品细菌内毒素检查法时, 若无法排除供试品对细菌内毒素检查的

73 干扰作用，或只能使用最高灵敏度鲎试剂（凝胶法检测技术为 0.03EU/ml，光
74 度法检测技术为 0.001EU/ml）才能排除干扰，则该品种不宜建立细菌内毒素
75 检查项。

76 5. 其他

77 5.1 实验时，~~当使用规格大于 0.1ml/支装量的鲎试剂时~~，为避免鲎试剂
78 支间活性差异带来的影响，可将鲎试剂复溶后混合，再分装到反应容器中使用。
79 凝胶法检测技术常用的反应容器为适宜的玻璃小试管或空安瓿等，光度
80 法检测技术常用的反应容器为测定仪专用试管或酶标板。塑料材质可能会引
81 起干扰，使用前应进行验证。

82 5.2 采用凝胶法检测技术检验时，如果计算出的 MVD 值不是整数，可以使
83 用小于 MVD 的整数进行实验。当出现阳性结果时，为判断产品是否合格，需
84 采用计算的 MVD 重新测试。当遇到不合格结果时，应进行全面的回顾调查，
85 确定试验的有效性。为了获得不合格供试品的细菌内毒素含量值，凝胶检测
86 和光度检测中均可以采用超过 MVD 的稀释倍数进行检验。

87 ~~目前新的细菌内毒素检测方法不断出现，以适应特殊品种细菌内毒素检查的~~
88 ~~需要，或减少鲎试剂的使用量。如~~

89 5.3 供试品和鲎试剂的加样量一般为 0.1ml，也可采用其他加样量进行内
90 毒素检测，如采用小于 0.1ml 加样量开展凝胶试验，或采用其他加样量进行
91 动态显色法。动态显色法加样体积、预设 OD 值、所用微孔板等，应参照试
92 剂生产商的相关说明使用。如采用的加样量较小时，实验的准确性更容易受
93 试验操作、环境污染、试管孔径（如凝胶试验因所用的试管孔径较小而受表
94 面张力影响，使鲎试剂与样品的反应混物流动较慢，易被误判为凝胶形成，
95 应注意观察）等外界条件的影响，因此对试验人员的操作水平和环境的清洁
96 度有较高的要求。结果如有争议时，可采用加样量为 0.1ml 的凝胶限度实验
97 进行仲裁。

98 5.4 低内毒素回收，也称为内毒素掩蔽，是指无法使用细菌内毒素检查法
99 正常检测到无菌制剂（特别是蛋白类生物制剂）中的加标内毒素的现象。判
100 断低内毒素回收的方法是将已知浓度的标准内毒素添加到未稀释的样品中，
101 随着时间的推移，标准内毒素的回收率无法达到 $\geq 50\%$ 。低内毒素回收会导

102 致样品中的内毒素污染水平可能被低估或未被检测出。该现象无法通过稀释
103 来排除，需要在建立样品内毒素检测方法时进行研究。

104 对于存在低内毒素回收现象的产品，可通过调整样品处理或试验方法来
105 恢复对细菌内毒素的检测能力。缓解低内毒素回收的措施应结合产品本身特
106 性，采用在样品中添加分散剂、添加过量的二价金属离子、使用有机溶剂增
107 加样品的疏水性等方式。如无法缓解低内毒素回收现象，应采用热原检查法
108 或其他替代方法。

109 5.5 重组 C 因子法（见本通则附：重组 C 因子法） ~~微量凝胶法等为细菌~~
110 ~~内毒素检查法的补充方法。~~当采用重组 C 因子法~~细菌内毒素检查法(通则 1143)~~
111 ~~中未收载的方法~~检测产品的细菌内毒素时，应符合“凡例”的相关规定。

112 附

113 重组 C 因子法

114 C 因子是鲎试剂中对细菌内毒素敏感的蛋白，能够选择性识别内毒素。重
115 组 C 因子是一种人工合成的 C 因子，它被细菌内毒素活化后，可与荧光底物
116 作用产生与内毒素浓度成比例的荧光信号。

117 本法系依据反应混合物中的内毒素浓度和其孵育终止时的荧光值之间存
118 在量化关系来测定细菌内毒素的含量。本法为终点荧光法。依据检测原理，
119 本法不存在 G 因子旁路干扰，具有较高的专属性，因此适合于含有 β 葡聚糖
120 干扰的样品检测；本法所用试剂不含有 B 因子和凝固酶原、凝固蛋白原等，
121 因此含有对上述物质抑制或增强作用的样品适合使用重组 C 因子法。

122 重组 C 因子法试验需采用荧光酶标仪，其激发和发射波长等参数参照试
123 剂的使用说明书，激发/发射波长一般为：380nm/440nm，检测温度一般为 37℃
124 $\pm 1^\circ\text{C}$ 。

125 仪器灵敏度（增益值）调节、重组 C 因子试剂的配制方法、保温时间等，
126 参照所用仪器和试剂的有关说明进行。

127 **标准曲线的可靠性试验、干扰试验、检查法以及结果判断** 参照细菌内毒
128 素检查法（通则 1143）中的~~方法 2~~ 光度法检测技术。

9251 细菌内毒素检查法应用指导原则修订说明

本次修订的主要内容说明如下：

1. 在“细菌内毒素限值的设定”项下，参考 USP 1085，新增了眼科用药的内毒素限值制定；将原料、辅料、包材限度制定综合考虑制定要求。

2. 在“供试品的前处理方法”项下，参考 USP 1085，增加了常见的干扰和排除措施；对难溶性样品的前处理方法和要求，进行详细描述；增订药包材样品的前处理方法。

3. 在“其他”项下，提出使用塑料材质试管需先进行验证的要求；参考 USP 1085，增加当遇到不合格结果时的相关建议；增加当采用小于 0.1ml 加样量开展内毒素试验时应注意的问题；增加对低内毒素回收现象的描述，以及处理方法的介绍；明确重组 C 因子法为细菌内毒素检查法补充方法。

4. 全文依据 1143 细菌内毒素检查法 的修订，对本文中凝胶试验和光度试验的方法名称进行相应的修改。