

附录XIII D 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。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，以凝胶法结果为准。

细菌内毒素的量用内毒素单位（EU）表示。

细菌内毒素国家标准品系自大肠埃希菌提取精制而成，用于标定、复核、仲裁鲎试剂灵敏度和标定细菌内毒素工作标准品的效价。

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，用于试验中的鲎试剂灵敏度复核、干扰试验及各种阳性对照。

细菌内毒素检查用水系指内毒素含量小于 0.015EU/ml（用于凝胶法）或 0.005EU/ml（用于光度测定法）且对内毒素试验无干扰作用的灭菌注射用水。

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。常用干热灭菌法（250℃、30 分钟以上）去除，也可采用其他确证不干扰细菌内毒素检查的适宜方法。若使用塑料器械，如微孔板和与微量加样器配套的吸头等，应选用标明无内毒素并且对试验无干扰的器械。试验操作过程应防止微生物的污染。

供试品溶液的制备 某些供试品需进行复溶、稀释或在水性溶液中浸提制成供试品溶液。一般要求供试品溶液的 pH 值在 6.0~8.0 的范围内。对于过酸、过碱或本身有缓冲能力的供试品，需调节被测溶液（或其稀释液）的 pH 值，可使用酸、碱溶液或适宜的缓冲液调节 pH 值。酸或碱溶液须用细菌内毒素检查用水在已去除内毒素的容器中配制。缓冲液必须经过验证不含内毒素和干扰因子。

内毒素限值的确定 药品、生物制品的细菌内毒素限值（L）一般按以下公式确定：

$$L=K/M$$

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

K 为人每公斤体重每小时最大可接受的内毒素剂量。以 EU/（kg·h）表示，

注射剂 $K=5\text{EU}/(\text{kg}\cdot\text{h})$ ，放射性药品注射剂 $K=2.5\text{EU}/(\text{kg}\cdot\text{h})$ ，鞘内用注射剂 $K=0.2\text{EU}/(\text{kg}\cdot\text{h})$ 。

M 为人用每公斤体重每小时的最大供试品剂量，以 $\text{ml}/(\text{kg}\cdot\text{h})$ 、 $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{h})$ 或 $\text{U}/(\text{kg}\cdot\text{h})$ 表示，人均体重按 60kg 计算，注射时间若不足 1 小时，按 1 小时计算。若供试品按体表面积给药， $M=(\text{最大给药剂量}/\text{m}^2/\text{h}\times 1.62\text{m}^2)/60\text{kg}$ 。

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必要调整，但需说明理由。

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液被允许稀释的最大倍数，在不超过此稀释倍数的浓度下进行内毒素限值的检测。用以下公式来确定 MVD：

$$\text{MVD}=\text{cL}/\lambda$$

式中 L 为供试品的细菌内毒素限值；

c 为供试品溶液的浓度，当 L 以 EU/ml 表示时，则 c 等于 $1.0\text{ml}/\text{ml}$ ，当 L 以 EU/mg 或 EU/U 表示时， c 的单位需为 mg/ml 或 U/ml 。如供试品为注射用无菌粉末或原料药，则 MVD 取 1，可计算供试品的最小有效稀释浓度 $c=\lambda/L$ ；

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用的标准曲线上最低的内毒素浓度。

方法 1 凝胶法

凝胶法系通过鲎试剂与内毒素产生凝集反应的原理来检测或半定量内毒素的方法。

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试验。

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，然后制成 2λ 、 λ 、 0.5λ 和 0.25λ 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 秒钟。取分装有 0.1ml 鲎试剂溶液的 10mm×75mm 试管或复溶后的 0.1ml/支规格的鲎试剂原安瓿 18 支，其中 16 管分别加入 0.1ml 不同浓度的内毒素标准溶液，每一个内毒素浓度平行做 4 管；另外 2 管加入 0.1ml 细菌内毒素检查用水作为阴性对照。将试管中溶液轻轻混匀后，封闭管口，垂直放入 37℃±1℃的恒温器中，保温 60 分钟±2 分钟。

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。

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，即为鲎试剂灵敏度的测定值（λ_c）。

$$\lambda_c = \lg^{-1} (\sum X/4)$$

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浓度中最后一个呈阳性结果的浓度。

当 λ_c 在 0.5λ～2λ（包括 0.5λ 和 2λ）时，方可用于细菌内毒素检查，并以标示灵敏度 λ 为该批鲎试剂的灵敏度。

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下操作。

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 的结果在鲎试剂灵敏度复核范围内时，试验方为有效。按下式计算系列溶液 C 和 B 的反应终点浓度的几何平均值（E_s 和 E_t）。

$$E_s = \lg^{-1} (\sum X_s/4)$$

$$E_t = \lg^{-1} (\sum X_t/4)$$

式中 X_s、X_t 分别为系列溶液 C 和溶液 B 的反应终点浓度的对数值（lg）。

当 E_s 在 0.5λ～2λ（包括 0.λ 和 2λ）及 E_t 在 0.5E_s～2E_s（包括 0.5E_s 和 2E_s）时，认为供试品在该浓度下无干扰作用。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过 MVD 的进一步稀释，再重复干扰试验。

表 1 凝胶法干扰试验溶液的制备

编号	内毒素浓度/配制内毒素的溶液	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	4
			2	1 λ	4
			4	0.5 λ	4
			8	0.25 λ	4
D	无/检查用水	—	—	—	2

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。

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、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行干扰试验。

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法时，须进行干扰试验。

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

检查法

（1）凝胶限量试验

按表 2 制备溶液 A、B、C 和 D。使用稀释倍数为 MVD 并且已经排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。

表 2 凝胶限量试验溶液的制备

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

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

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 的平行管均为阳性，试验有效。

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

(2) 凝胶半定量试验

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 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。

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 λ ~2 λ 之间，试验有效。

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点浓度，所有平行管反应终点浓度的几何平均值即为供试品溶液的内毒素浓度（按公式 $c_E = 1g-1(\sum X/2)$ ）。如果检验时采用的是供试品的稀释液，则计算原始溶液内毒素浓度时要将结果乘以稀释倍数。

如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 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初始稀释倍数）。如果供试品溶液的所有平行管均为阳性，应记为内毒素的浓度大于或等于最大的稀释倍数乘以 λ。

表 3 凝胶半定量试验溶液的制备

编号	内毒素浓度/配制内毒素的溶液	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	2 λ /供试品溶液		1	2 λ	2
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

注：A 为超过 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至 1 倍、2 倍、4 倍和 8 倍，最后的稀释倍数不得超过 MVD。

B 为含 2 λ 浓度标准内毒素的溶液 A（供试品阳性对照）。

C 为含 2 λ、1 λ、0.5 λ 和 0.25 λ 浓度标准内毒素的检查用水系列。

D 为阴性对照。

若内毒素浓度小于规定的限值，判供试品符合规定。若内毒素浓度大于或等于规定的限值，判供试品不符合规定。

方法 2 光度测定法

光度测定法分为浊度法和显色基质法。

浊度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）之间存在着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浊度到达某一预先设定的吸光度所需要的反应时间，或是检测浊度增加速度的方法。

显色基质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。动态显色法是检测反应混合物的色度达到某一预先设定的吸光度所需要的反应时间，或检测

色度增长速度的方法。

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

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，参照所用仪器和试剂的有关说明进行。

为保证浊度和显色试验的有效性，应预先进行标准曲线的可靠性试验以及供试品的干扰试验。

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发生了任何可能会影响检验结果的改变时，需进行标准曲线的可靠性试验。

用标准内毒素配成溶液，制成至少 3 个浓度的稀释液（相邻浓度间稀释倍数不得大于 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。当阴性对照的反应时间大于标准曲线最低浓度的反应时间，将全部数据进行线性回归分析。

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，试验方为有效。否则须重新试验。

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。

表 4 光度测定法干扰试验溶液的制备

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	不少于 2 个
B	标准曲线的中点（或附近点）的浓度 （设为 λ_m ）	供试品溶液	不少于 2 个
C	至少 3 个浓度（最低一点设定为 λ ）	检查用水	每一浓度 不少于 2 个
D	无	检查用水	不少于 2 个

注：A 为稀释倍数不超过 MVD 的供试品溶液。

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溶液。

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。

D 为阴性对照。

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的内毒素含量 c_s 和 c_t ，再按下式计算该试验条件下的回收率（R）。

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

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

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”中的方法去除干扰因素。并重复干扰试验来验证处理的有效性。

当试剂、供试品的来源、配方、生产工艺改变或试验环境中发生了任何有可能影响试验结果的变化时，须重新进行干扰试验。

检查法

按“光度测定法的干扰试验”中的操作步骤进行检测。

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素浓度。

试验必须符合以下三个条件方为有效：

- （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；
- （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，计算出的内毒素的回收率要在 50%~200%的范围内；
- （3）溶液 D 的反应时间应大于标准曲线最低浓度的反应时间。

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，小于规定的内毒素限值，判供试品符合规定。若大于或等于规定的内毒素限值，判供试品不符合规定。

注：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。