

人用药品注册技术要求国际协调会

一致性指导原则草案

关于 ICH 区域内药典附录的评价及建议

-细菌内毒素检查法

Q4B 附录 14

现行第二阶段版本

2010年6月10日

在ICH进程第二阶段，经ICH专家工作组同意，由ICH指导委员会将一致性指南文件草案递交给ICH三方（欧盟、日本和美国）药政管理局，根据所在国家或地区的程序征求内部和外部意见。

Q4B附录6(R1)

文件历史

现行第二阶段版本

Q4B 附录14	第二阶段，获得指导委员会批准并公开征求意见。	2010年6月10日
----------	------------------------	------------

关于ICH区域内药典附录的评价及建议
细菌内毒素检查法
Q4B 附录14

ICH一致性指导原则草案

2010年6月10日，进入ICH进程第二阶段，公开征求意见

目录

1. 前言	4
2. Q4B 成果	4
2.1 分析方法	4
2.2 判定标准	4
3. 附录的实施时间	4
4. 对实施附录的考虑	4
4.1 总体考虑	4
4.2 美国食品药品监督管理局（FDA）的考虑	5
4.3 欧盟（EU）的考虑	5
4.4 日本厚生劳动省（MHLW）的考虑	5
4.5 加拿大卫生部的考虑	5
5. 用于 Q4B 评价的参考文献	5

关于 ICH 区域内药典附录的评价及建议

-细菌内毒素检查法

Q4B 附录 14

1. 前言

本附录是Q4B对药典附录细菌内毒素检查法协调后的成果。

本文件由药典协调组（PDG）提出。

2. Q4B 成果

2.1 分析方法

经Q4B专家工作组（EWG）审核，ICH指导委员会建议，当符合下列条件时，欧洲药典附录2.6.14（细菌内毒素检查法）、日本药典附录4.01（细菌内毒素检查法）以及美国药典附录<85>（细菌内毒素检查法）中各自规定的分析方法，在ICH区域中具有同等效力：

2.1.1 细菌内毒素检查法中可以使用三种测定技术中的任意一种。当对测定结果有怀疑或争议时，以凝胶限度检查法结果为准。

2.1.2 细菌内毒素工作标准品应采用 WHO（世界卫生组织）细菌内毒素国际标准品进行标定。

2.2 判定标准

评价后的文本中未包括判定标准。除非在各论项下有规定外，应在申报资料中给出细菌内毒素限度。

3. 附录的实施时间

当本附录在某地区实施时（进入 ICH 第五阶段的管理进程），即可在该地区使用，各地区的实施时间可以不同。

4. 对实施附录的考虑

4.1 总体考虑

当申请者或生产企业将其现有方法变更为经Q4B审核并已实施的药典方法时（参见本附录

第2.1节)，应按照当地有关备案型变更的有关规定，处理相关的变更说明、变更和/或事先的审批程序。

4.2 美国食品药品监督管理局（FDA）的考虑

基于上述建议，并结合本附录的相关规定，可认为本附录第 2.1 节的中相关药典文本具有同等效力。但是，不论该方法源自何处，FDA 都可能会要求企业证明其所选方法的合理性并适用于某一特定的物料或产品的质量控制。

4.3 欧盟（EU）的考虑

基于上述互认声明，当符合本附录规定的条件时，在上市许可申请、再注册申请或变更申请中，欧盟药品管理当局允许申请者采用附录第2.1节所述其它药典的相应方法，认为同样满足欧洲药典附录2.6.14的要求。

4.4 日本厚生劳动省（MHLW）的考虑

当符合本附录规定的条件时，本附录第2.1节中各药典的文件具有同等效力。当本附录在日本实施时，MHLW将在通告中规定具体的实施要求。

4.5 加拿大卫生部的考虑

在加拿大，当符合本附录规定的条件时，本附录第2.1节所述的相关药典具有同等效力。

5. 用于 Q4B 评价的参考文献

5.1 PDG 5B阶段签发的文件(版本1-修订1): *Japanese Pharmacopoeial Forum*, Volume 18, number 4 (December 2009).

5.2 与本附录细菌内毒素检查法相关的药典参考文献有:

5.2.1 *European Pharmacopoeia* (Ph. Eur.): Supplement 6.6 (official January 1, 2010), Bacterial Endotoxins (reference 01/2010:20614);

5.2.2 *Japanese Pharmacopoeia* (JP): General Test 4.01 Bacterial Endotoxins Test as it will appear in the JP Sixteenth Edition (March 31, 2011). The draft English version of the JP text provided by MHLW is appended (see Appendix A);

5.2.3 *United States Pharmacopoeia* (USP): Text for <85> Bacterial Endotoxins Test, USP 33 Reissue (published April 2010 and official October 1, 2010).

附件 A

日本厚生劳动省提供的 JP XVI 英文版草案

4. 生物测定法/生物化学测定法/微生物测定法

4.01 细菌内毒素检查法

本文件为与欧洲药典和美国药典协调后的版本。

细菌内毒素检查法系利用鲎(*Limulus polyphemus* 或 *Tachypleus tridentatus*) 血液提取物中制备得到的变形细胞溶解液, 检测或量化由革兰氏阴性菌产生的细菌内毒素。可采用两种技术进行细菌内毒素检查:

凝胶法, 系通过鲎试剂与内毒素产生的凝集反应进行测定;

光度法, 系通过内毒素与鲎试剂反应产生光学变化进行测定。

光度法中包括浊度法和显色法(显色基质法): 浊度法, 系利用鲎试剂与内毒素产生凝集反应发生浊度变化进行测定; 显色基质法, 系利用合成肽-呈色团聚合物的释放呈色团产生颜色变化进行测定。

可采用上述方法中的任意一种进行检测。当对测定结果有怀疑或争议时, 除另有规定外, 以凝胶法测定结果为准。

本法操作过程中应防止微生物的污染。

1. 器具

应按照经过验证的程序将所有玻璃器皿和其他热稳定材料置于干热烤箱中去除热原。通常使用的最低温度和最短时间为250℃加热30分钟。如果使用塑料器具, 例如多孔板和微量加样器的吸头, 只有证明其不含有可检出的内毒素并对试验无干扰方可使用。

2. 溶液制备

2.1 内毒素标准储备溶液的制备

取日本药典内毒素标准品, 用细菌内毒素检查用水(简称BET用水)溶解制备内毒素标准储备溶液。用内毒素单位(EU)表示细菌内毒素的量, 1EU与1个内毒素国际单位(IU)相当。

2.2 内毒素标准溶液的制备

将内毒素标准储备溶液充分混匀后, 用BET用水稀释制备一系列内毒素标准溶液。制备的标准溶液应尽快使用, 以免由于吸附造成活性损失。

2.3 供试品溶液的制备

除另有规定外, 采用BET用水溶解或稀释药物制备供试品溶液。必要时调节被测溶液的pH值, 使鲎试剂与供试品溶液的混合溶液的pH值落在鲎试剂指定的使用pH范围内。本法适用于制

备pH值在6.0~8.0范围内的供试品溶液。用于调节pH值的试液或溶液，可采用BET用水配制，并将溶液在未检出内毒素的容器中储存。必须对试液或溶液进行验证，证明不含可检出的内毒素并且无干扰因素。

3. 确定最大有效稀释倍数

最大有效稀释倍数（MVD）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度的检测。

用以下公式来确定MVD：

$$MVD = \frac{\text{内毒素限值} \times \text{供试品溶液的浓度}}{\lambda}$$

内毒素限值：

注射剂的内毒素限值是根据剂量确定的，即为K/M，其中K为每公斤体重最小内毒素剂量（EU/kg），M为每公斤体重最大供试品剂量。当注射剂按照一定间隔给药或持续滴注时，M为1小时内注射的最大剂量。

供试品溶液的浓度：

当内毒素限值以质量（EU/mg）表示时，浓度单位为mg/ml；

当内毒素限值以当量（EU/mEq）表示时，浓度单位为mEq/ml；

当内毒素限值以生物单位（EU/Unit）表示时，浓度单位为Units/ml；

当内毒素限值以体积（EU/ml）表示时，浓度单位为ml/ml；

λ ：凝胶法中鲎试剂的标示灵敏度（EU/ml）或浊度法或显色基质法中使用的标准回归曲线上最低的内毒素浓度（EU/ml）。

4. 凝胶法

凝胶法系通过鲎试剂与存在的内毒素产生凝集反应的原理来检测或定量内毒素的方法。为保证测定方法的精密度和有效性，应按预试验(4.1)项下方法进行鲎试剂灵敏度确认试验(4.1.1)及干扰试验（4.1.2）

4.1 预试验

4.1.1 鲎试剂灵敏度确认试验

鲎试剂的标示灵敏度是指在鲎试剂使用的指定条件下导致鲎试剂发生凝集所需内毒素的最低浓度。

当使用新批号的鲎试剂或试验条件发生任何可能影响检验结果的改变时，应进行本试验，以确认鲎试剂的标示灵敏度。采用BET用水稀释内毒素标准储备溶液制备浓度分别为 2λ ， λ ， 0.5λ

和0.25λ的四个标准溶液。在每个试管中加入一定体积的鲎试剂与相同体积的内毒素标准溶液（通常为0.1ml），混匀。当试验中使用含有冻干鲎试剂的小瓶和安瓿时，可直接在小瓶和安瓿中加入上述溶液。

通常将含有反应混合物的试管（或小瓶、安瓿等容器）在37±1℃条件下放置60±2分钟，避免振动。为测试保温后形成的凝胶的完整性，缓缓倒转每支试管或容器180°。若倒转后凝胶不从管壁脱落，记录试验结果为阳性。若未形成坚实的凝胶，或形成易碎的凝胶在翻转中脱落者记为阴性。

制备四个浓度的标准溶液组，每组浓度平行4份试验。

当0.25λ的标准溶液管均显示为阴性结果时，试验有效。若试验无效，在确认试验条件后重复试验。

反应终点浓度为系列递减浓度中最后一个呈阳性结果的浓度。按下式计算4个重复系列的几何平均终点浓度值：

$$\text{几何平均终点浓度} = \lg^{-1} (\sum e/f)$$

$\sum e$ = 稀释系列的终点浓度的对数值和

f = 重复支数

若几何平均终点浓度不低于0.5λ并不高于2λ，表明标示灵敏度有效，该鲎试剂可用于内毒素检查。

4.1.2 干扰试验

本试验用于确认供试品溶液中是否存在放大或抑制反应的因素。

按表4.01-1制备溶液A，B，C和D；溶液A，B平行制备4管；溶液C和D平行制备2管。按4.1.1项下规定的孵育温度、孵育时间及凝胶形成的确认程序进行试验。

当发生任何可能影响试验结果的试验条件的变更时，必须重新进行本试验。

表4.01-1

溶液	内毒素浓度 / 被加入内毒素的溶液	稀释用液	稀释倍数	内毒素浓度	平行管数
A ^{*1}	0 / 供试品溶液	-	-	-	4
B ^{*2}	2λ / 供试品溶液	供试品溶液	1	2λ	4
			2	1λ	
			4	0.5λ	

			8	0.25λ	
C* ³	2λ / BET用水	BET用水	1	2λ	2
			2	1λ	
			4	0.5λ	
			8	0.25λ	
D* ⁴	0 / BET用水	-	-	-	2

*1 阴性对照，只含供试品溶液。

*2 加入了标准内毒素的供试品溶液（用于测定干扰因素）。

*3 用于确认标示鲎试剂灵敏度的标准内毒素溶液

*4 阴性对照，只含BET用水。

当溶液A和D的所有平行管均为阴性，且溶液C的结果与标示的鲎试剂灵敏度一致时，本试验方为有效。

若溶液B的几何平均终点浓度不低于0.5λ，并不高于2λ时，供试品溶液在该浓度下无干扰作用，且符合干扰试验的规定。其他情况均认为供试品溶液干扰内毒素的检测。

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。使用更灵敏的鲎试剂时，可允许对供试品溶液进行更大倍数的稀释。此外，可以通过过滤、中和、透析或加热处理等手段，排除供试品溶液或稀释后的供试品溶液对测定的干扰。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，应使用预先添加了标准内毒素并经过处理的供试品溶液进行干扰试验。

4.2 限度检查法

本法系与内毒素浓度高于标示鲎试剂灵敏度所产生的凝胶相比，用于检测样品中含有的内毒素是否高于标准项下规定的内毒素限度。

4.2.1 测定法

按表4.01-2制备溶液A，B，C和D。制备4种溶液，每种溶液平行制备2管。

制备溶液A和B时，采用的供试品溶液应符合4.1.2中的规定。按4.1.1项下规定的孵育温度、孵育时间及凝胶形成的确认程序进行试验。

表4.01-2

溶液	内毒素浓度 / 被加入内毒素的溶液	平行管数
A* ¹	0 / 供试品溶液	2

B ^{*2}	2λ / 供试品溶液	2
C ^{*3}	2λ / BET用水	2
D ^{*4}	0 / BET用水	2

*1 限度检查用供试品溶液，溶液稀释倍数不得过MVD。

*2 阳性对照。与溶液A相同的稀释倍数，含标准内毒素的浓度为2λ。

*3 阳性对照。内毒素标准溶液含内毒素的浓度为2λ。

*4 阴性对照，只含BET用水。

4.2.2 说明

当溶液B和C的两个平行管均为阳性，且溶液D的两个平行管均为阴性时，试验方为有效。

当溶液A的两个平行管均为阴性时，供试品符合细菌内毒素检查法规定。

当溶液A的两个平行管均为阳性时，供试品不符合规定。

当溶液A的两个平行管中一管为阳性，另一管为阴性时，需进行复试。复试时，若溶液A的两个平行管均为阴性时，供试品符合规定。若溶液A的两个平行管或其中的一个为阳性时，供试品不符合规定。

但是，当供试品在小于MVD的稀释倍数下不符合规定时，可采用更高的稀释倍数进行复试，稀释倍数不得过MVD。

4.3 定量试验

本法系通过确定凝胶形成的反应终点来测定供试品中内毒素的含量。

4.3.1 测定法

按表4.01-3制备溶液A，B，C和D。制备4种溶液，每种溶液平行制备2管。当制备溶液A和B时，所用供试品溶液应符合4.1.2项下规定。试验条件应符合4.1.1项下的规定。

表4.01-3

溶液	内毒素浓度 / 被加入内毒素的溶液	稀释用液	稀释倍数	内毒素浓度	平行管数
A ^{*1}	0 / 供试品溶液	BET用水	1	-	2
			2	-	
			4	-	
			8	-	
B ^{*2}	2λ / 供试品溶液	-	1	2λ	2

C* ³	2λ / BET用水	BET用水	1	2λ	2
			2	1λ	
			4	0.5λ	
			8	0.25λ	
D* ⁴	0 / BET用水	-	-	-	2

*1 定量用供试品溶液，溶液稀释范围可适当改变，但不得过MVD。

*2 阳性对照。供试品溶液与溶液A中最浓溶液的稀释倍数相同，含标准内毒素的浓度为2λ。

*3 用于确认鲎试剂标示灵敏度的标准内毒素溶液。

*4 阴性对照，只含BET用水。

4.3.2 计算和说明

当满足下列三个条件时，试验有效：(a) 阴性对照溶液D的两个平行管均为阴性，(b) 阳性对照溶液B的两个平行管均为阳性，(c) 溶液C的几何平均终点浓度在0.5λ~2λ范围内。

反应终点系指系列溶液A中呈阳性反应的最稀溶液的稀释倍数，供试品溶液的内毒素浓度就是反应终点稀释倍数与λ的乘积。

若试验中溶液A的所有平行管均为阴性，供试品溶液的内毒素浓度应记为小于λ与供试品溶液的最低稀释倍数的乘积。

若所有稀释溶液均为阳性，供试品溶液的内毒素浓度记为等于或大于溶液A的最大稀释倍数与λ的乘积。

根据供试品溶液中的内毒素浓度计算供试品中的内毒素含量（单位为EU/ml、EU/mg、mEq或EU/单位）。若供试品溶液的两个平行管的内毒素浓度符合各论项下规定的内毒素限度（单位为EU/ml、EU/mg、mEq或EU/单位），供试品符合细菌内毒素检查法的规定。

5. 定量光度测定法

5.1 浊度法

浊度法系利用鲎试剂与内毒素反应过程中的浊度变化，测定供试品中内毒素浓度的检测技术。本法可分为终点浊度法和动态浊度法。

终点浊度法是在规定反应时间条件下，根据反应混合物中的内毒素浓度与其浊度之间的量化关系，测定内毒素含量的一种检测技术。

动态浊度法是根据反应混合物的浊度到达预先设定值所需的时间或浊度变化速度与其内毒素浓度之间的量化关系，测定内毒素含量的一种检测技术。

光度测定法通常在 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 条件下进行，浊度通常用吸光度或透光率表示。

5.2 显色法

鲎试剂与内毒素反应后会合成制备的显色底物释放出呈色团，显色法就是通过对呈色团的测定，度量供试品溶液中内毒素浓度的一种检测技术。本法分为终点显色法或动态显色法。终点显色法是跟据内毒素浓度与孵育终止时呈色团释放量之间的量化关系，测定内毒素含量的一种检测技术。

动态显色法是跟据内毒素浓度与反应混合物的吸光度（或透光率）达到预先设定数值所需的时间（或吸光度变化率）之间的量化关系，测定内毒素含量的一种检测技术。

试验温度通常为 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

5.3 预试验

为确保浊度法和显色法的准确性和有效性，应按下文方法进行标准曲线的可靠性试验（5.3.1）以及供试品的干扰试验（5.3.2）。

5.3.1 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。

用标准内毒素溶液制备至少3个浓度的稀释液，得到标准曲线应在所用鲎试剂说明书规定的内毒素浓度范围内。根据所用鲎试剂的最佳条件（体积比、孵育时间、温度、pH等），每个浓度的标准内毒素溶液应至少做3支平行管。如果测定范围大于两个对数值范围，在增加的标准曲线范围内应该额外测定相应的标准溶液。根据设定的内毒素浓度范围，若相关系数 $|r|$ 的绝对值大于或等于0.980，标准曲线方为有效，曲线符合规定。

若标准曲线不符合规定，确认试验条件后重新试验。

5.3.2 干扰试验

按表4.01-4制备溶液A，B，C和D。按所用鲎试剂的最佳条件（供试品溶液和鲎试剂的体积、供试品溶液与鲎试剂的体积比、孵育时间等）使用这些溶液进行试验。

当发生任何有可能影响试验结果的变化时，须重新进行干扰试验。

表4.01-4

溶液	内毒素浓度	被加入内毒素的溶液	平行管数
A ^{*1}	0	供试品溶液	不少于2个
B ^{*2}	标准曲线的中间浓度	供试品溶液	不少于2个

C ^{*3}	至少3个浓度	BET用水	每一浓度不少于 2个
D ^{*4}	0	BET用水	不少于2个

*1 只含供试品溶液（用于内毒素测定的供试品溶液）。供试品溶液稀释倍数不得过MVD。

*2 与溶液A相同稀释倍数的供试品溶液，溶液A中加入等于或接近于标准曲线中点浓度的标准内毒素。

*3 使用5.3.1项下不同浓度的标准内毒素溶液（用于标准曲线）。

*4 阴性对照，只含BET用水。

试验必须符合以下条件方为有效。

1：系列溶液C得到的标准曲线的相关系数绝对值大于或等于0.980。

2：溶液D的结果不得过所用鲎试剂标注的空白限度值，或不低于所用鲎试剂的内毒素检出限。

计算溶液B中加入的内毒素浓度减去溶液A中的内毒素浓度后的回收率。

当溶液B中加入的内毒素回收率应在50%~200%的范围内，在此试验条件下供试品溶液不存在干扰作用，且溶液符合规定。

当内毒素回收率超出规定范围，在此试验条件下供试品溶液存在干扰因素。若在此试验条件下供试品不符合规定，使用更大地稀释倍数重复试验，不得过MVD。此外，供试品溶液或稀释倍数不大于MVD的供试品溶液的干扰可采用过滤、中和、透析或热处理等适宜的方法排除。为了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上述试验。

5.4 定量试验

5.4.1 测定法

按表4.01-4制备溶液A，B，C和D，按5.3.2项下方法进行测定。

5.4.2 内毒素浓度的计算

使用系列溶液C生成的标准曲线计算溶液A中的平均内毒素浓度。试验必须符合下列条件方为有效：

1：系列溶液C生成的标准曲线的相关系数绝对值大于或等于0.980。

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，计算出的内毒素回收率要在50%~200%的范围内。

3: 溶液D的结果不得过所用鲎试剂标注的空白限度值, 或不低于所用鲎试剂的内毒素检出限。

5.4.3 说明

若溶液A的平均内毒素浓度计算得到供试品内毒素浓度符合各论项下规定的内毒素限度(单位为EU/ml, EU/mg或mEq或EU/单位), 供试品符合细菌内毒素检查法的规定。