

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2024.01.04

细菌内毒素检查法评审要点与注册资料常见问题分析

韩宁宁,赵富华,王 轩,彭文绣,汪 霞*

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2023-03-14 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2024) 01-0018-05 [中图分类号] S855.1

[摘 要] 通过梳理细菌内毒素检查法建立的关键步骤,对细菌内毒素限值制定、MVD 或 MVC 的计算、实验材料、实验过程和质量标准等涉及的评审要点进行了归纳总结,对评审过程中发现的常见问题进行了分析,以期为新兽药生产企业制定相应产品的细菌内毒素检查方法提供参考。

[关键词] 细菌内毒素检查法;评审要点;常见问题

The Key Points in the Review of the Bacterial Endotoxin Test and Analysis of the Common Problems in the Registration Data

HAN Ning-ning, ZHAO Fu-hua, WANG Xuan, PENG Wen-xiu, WANG Xia*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: WANG Xia, E-mail: wangxia-0909@126.com

Abstract: By sorting out the key steps for the establishment of bacterial endotoxin test, the review points involved in the establishment of bacterial endotoxin limit, the calculation of MVD or MVC, experimental materials, experimental process and quality standards are summarized, and the common problems found in the review process are analyzed, with a view to providing a reference for new veterinary drug manufacturers to develop the bacterial endotoxin test method for corresponding products.

Key words: bacterial endotoxin test; review points; common problems

细菌内毒素是兽药注射剂中最主要和最易导致热原反应的污染物,其为革兰氏阴性菌细胞壁上的脂多糖(LPS)成分,在细菌死亡或自溶后释放。细菌内毒素由三部分构成:O-特异性侧链、核心多糖和类脂A,其中类脂A是LPS的主要毒性^[1]。内毒素可能会在革兰氏阴性菌死亡后在细胞壁片段

中保持活性,因此,供试品可能是无菌的,但仍可能检测出内毒素。注射剂中存在细菌内毒素时,表明在产品生产过程中的某一个或几个节点存在革兰氏阴性菌的污染^[2]。为保证兽药注射剂的安全可控,《中国兽药典》附录0102规定,静脉用注射剂必须进行细菌内毒素的检查^[3]。

基金项目:国家重点研发计划项目(2022YFD1802105)

作者简介:韩宁宁,副研究员,从事兽药质量控制与标准研究工作。

通讯作者:汪霞。E-mail: wangxia-0909@126.com

新兽药细菌内毒素检查方法建立的过程,涉及到内毒素限值的制定、最大稀释倍数(MVD)或最小稀释浓度(MVC)的计算、药物前处理、干扰试验的设计与验证等多个关键步骤。产品申报方应按照《中国兽药典》附录 1143 细菌内毒素检查法的相关要求^[4],结合自身产品特点和国内外相关研究现状,制定适宜的内毒素检查方法。与此同时,申报方亦应关注该方法的技术评审要点,避免方法建立过程中的常见问题,保证方法的准确可靠。

1 细菌内毒素限值制定的相关评审要点与常见问题

细菌内毒素的限值是指动物对兽药中细菌内毒素所能耐受的不致引起热原反应的临界值(L)。其计算公式为: $L = K/M$ 。

式中,L 根据供试品给药方式的不同,一般以 EU/mL、EU/mg 或 EU/U 表示。

K 为每千克体重每小时最大可接受的内毒素剂量。目前,《中国兽药典》中的 K 值借鉴了人用药^[5]的相关指标,即注射剂 $K = 5 \text{ EU}/(\text{kg} \cdot \text{h})$,放射性注射剂 $K = 2.5 \text{ EU}/(\text{kg} \cdot \text{h})$,鞘内用注射剂 $K = 0.2 \text{ EU}/(\text{kg} \cdot \text{h})$ 。需要注意的是,由于动物与人体对内毒素耐受程度存在差异,不同动物品种之间对内毒素耐受程度亦存在差异,采用同一 K 值用于不同动物的内毒素限值计算存在一定的偏差。

M 为每千克体重每小时的最大供试品单次剂量。当供试品的用法用量为频繁间隔注射或连续输注时,M 为每小时给药的最大总剂量。M 的单位应与供试品给药方式相适应,例如,当供试品按体积给药时,M 以 mL/kg 表示;当供试品按重量给药时,M 以 mg/kg 表示;当供试品以生物活性单位给药时,M 以 U/kg 表示;当供试品可用于多个动物品种时,应使用最小动物品种使用的最大供试品剂量;当幼年动物的每千克体重剂量高于成年动物时,应使用幼年动物的每千克体重剂量。

新兽药产品,可以根据上述公式结合产品给药方式进行计算以制定内毒素限值。另外,对于仿制药品种,可以参考原研产品的限值;当国际药典等法定标准收载相应产品时,亦可参考法定标准的

限值。

评审过程中最常见问题是注册资料中缺少限值的制定依据或计算过程,仅提供了干扰试验的验证过程和产品的检测结果。而限值的制定是评价该检查项是否可良好反映产品安全性的重要依据,更是后续稀释倍数计算和干扰试验设计的前提。因此,申报方应充分阐述相应产品内毒素限值的制定过程。

第二个常见问题是混淆了原料限值与制剂限值的推导逻辑关系。内毒素限值是根据注射剂的给药方式和动物耐受程度计算出的结果。当制剂限值确定时,可根据产品含量规格,推导出原料的限值^[6]。例如,某注射液限值是 10 EU/mL,规格是 2 mg/mL,则对应原料限值是 $10 \div 2 = 5 \text{ EU/mg}$ 。但是,根据原料限值推导制剂限值则是不合逻辑的推导过程。

第三个常见问题是,当同时申报无菌原料与制剂时,二者的内毒素限值存在较大差异又缺乏合理解释。例如,某企业申报注册的布舍瑞林注射液限值为 50 EU/mL;同时申报的布舍瑞林原料内毒素限值参考了 EP 标准,为 55.5 EU/mg。该注射液规格为 4.2 μg/mL,推算原料限值应为 $50 \div 0.0042 = 11905 \text{ EU/mg}$,与 55.5 EU/mg 差异巨大。申报方并未提供注射液除主药外其他成分的内毒素测定情况,无法合理解释制剂中内毒素来源,评审员则有理质疑注射液限值计算过程的合理性。

2 MVD 或 MVC 计算的相关评审要点与常见问题

MVD 指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的检测。其计算公式为 $MVD = cL/\lambda$,其中 L 为供试品的内毒素限值;c 为供试品溶液的浓度;λ 在凝胶法中为鲎试剂的标示灵敏度(EU/mL),在光度测定法中为所使用的标准曲线上最低的内毒素浓度。如供试品为注射用无菌粉末或原料药, $MVD = 1$,计算 $MVC = \lambda/L$ 。以下三个实例演示 MVD 或 MVC 的计算过程:

某注射液规格为 20 mL:5 g,内毒素限值 L =

0.50 EU/mL, 鲎试剂 $\lambda = 0.125 \text{ EU/mL}$, 则 $\text{MVD} = cL/\lambda = 1 \times 0.50/0.125 = 4$ 。

某注射液规格为 20 mL:5 g (250 mg/mL), 内毒素限值 $L = 0.50 \text{ EU/mg}$, 鲎试剂 $\lambda = 0.125 \text{ EU/mL}$, 则 $\text{MVD} = cL/\lambda = 250 \times 0.50/0.125 = 1000$ 。

某注射用粉针内毒素限值 $L = 0.50 \text{ EU/mg}$, 鲎试剂 $\lambda = 0.125 \text{ EU/mL}$, 则 $\text{MVC} = \lambda/L = 0.125/0.50 = 0.25 \text{ mg/mL}$ 。

评审过程中最常见问题是 MVD 与 MVC 混淆。例如, 某企业申报注册泰拉霉素原料, 材料中说明了 MVD 的计算过程, 并根据 MVD 进行了稀释。但无论稀释过程正确与否, 原料均应计算 MVC 而非 MVD。

第二个常见问题是未根据限值 L 的单位进行合理的 MVD 计算。例如, 某企业申报某注射液规格为 20 mL:5 g (250 mg/mL), 内毒素限值为 $L = 0.50 \text{ EU/mL}$, 鲎试剂 $\lambda = 0.125 \text{ EU/mL}$ 。申报材料将 L 的单位 EU/mL 转化为了 EU/mg, 即 $L = 0.50/250 = 0.002 \text{ EU/mg}$, 又进而计算 $\text{MVC} = \lambda/L = 0.125/0.002 = 62.5 \text{ mg/mL}$, 再反过来推算 $\text{MVD} = 250/62.5 = 4$ 。但如前所述, 仅供试品为注射用无菌粉末或原料药时才进行 MVC 的计算。当 L 以 EU/mL 表示时, c 取 1 mg/mL, 可直接计算 $\text{MVD} = 1 \times 0.50/0.125 = 4$ 。虽然两种计算方法的稀释倍数结果是一致的, 但前者反映了申报方对 MVD、MVC 存在概念的理解差异和应用错误。

3 细菌内毒素检查实验材料的相关评审要点与常见问题

细菌内毒素检查法涉及的实验材料包括细菌内毒素标准品、细菌内毒素检查用水、鲎试剂、溶剂、缓冲液或酸碱调节剂等。其中, 细菌内毒素标准品又分为国家标准品 (RSE) 和工作标准品 (CSE)。我国法定的国家标准品和工作标准品均由中国食品药品检定研究院生产和组织协作标定赋值^[7]。需要注意的是, 我国与其他国家对内毒素工作标准品的管理和使用有较大差别。例如, 美国 RSE 由美国食品药品监督管理局 (US Food and Drug

Administration, FDA) 生产并组织协作标定赋值, CSE 由鲎试剂生产厂家生产并根据 RSE 来标定^[8]。在进行细菌内毒素检查时, 如果使用的是我国的鲎试剂, 则应选择使用中国的标准物质。如果使用的是进口鲎试剂, 则应按其要求使用对应的内毒素标准物质, 不宜交叉使用。

评审中最常见的问题是使用了非法定来源的工作标准品, 例如我国国内某些鲎试剂生产厂家亦可提供工作标准品, 但申报材料中未对该工作标准品的赋值进行相应标定或确认。

第二个常见问题是选择的鲎试剂灵敏度与内毒素限值不匹配。例如, 某注射液内毒素限值 L 为 0.2 EU/mL, 则相应鲎试剂灵敏度应至少不低于对应限值, 可选择 $\lambda = 0.125 \text{ EU/mL}$ 甚至更高灵敏度的鲎试剂。但需要注意的是, 鲎试剂的灵敏度并非越高越好, 因为灵敏度越高意味着稀释倍数的增加, 也就意味着操作步骤和实验用品消耗的增加, 除了增加实验成本外, 还使得引入外源性内毒素的风险加大。

4 细菌内毒素检查实验过程的相关评审要点与常见问题

新兽药细菌内毒素检查方法的建立, 应包括细菌内毒素限值的确定、适宜灵敏度鲎试剂的选择、MVD 或 MVC 的计算、鲎试剂的灵敏度复核、供试品干扰试验、产品的细菌内毒素检查等关键步骤。当没有相关研究资料可参考时, 在进行干扰试验之前, 还需要设计干扰试验预实验, 以预测供试品不产生干扰的浓度范围^[9]。按照《中国兽药典》的相关要求, 应选择至少两个厂家的鲎试剂对至少三批产品进行干扰试验。另外, 需要注意的是, 若无法排除供试品对细菌内毒素检查的干扰作用或只能使用最高灵敏度鲎试剂 (凝胶法 0.03 EU/mL, 光度法 0.001 EU/mL), 则表明该产品不适宜采用常规方法进行细菌内毒素检查^[10]。

评审中最常见的问题是缺少鲎试剂灵敏度复核资料, 或干扰试验的鲎试剂厂家数或产品批数不符合法规最低要求。

第二个常见问题是仅使用了最高灵敏度的鲎

试剂,而未加以其他灵敏度鲎试剂实验数据来佐证,尤其是在产品中存在 β - 葡聚糖等辅料干扰^[11],或产品因 pH 值偏酸或偏碱等因素可能引起干扰时,评审员则有理由质疑产品采用常规方法是否可充分排除干扰。

5 细菌内毒素检查质量标准的相关评审要点与常见问题

当采用常规试剂和常规配制方法即可完成细菌内毒素检查时,相应质量标准按照《中国兽药典》格式表述,即“取本品,依法检查(附录 1143),每 1 mL(mg) * * 中含内毒素的量不得过 * * ”。但如果使用了特殊的溶剂、缓冲液或酸碱调节剂,或采用了特殊的供试品前处理方法,如萃取、离心等,则应在质量标准中注明。

评审中最常见的问题是方法验证中所用试剂或前处理方法与质量标准不一致。例如,某企业申报泰拉霉素注射液,方法验证资料表明采用了特定配方的碱性调节剂方可消除干扰,但最终的质量标准仅按《中国兽药典》常规格式表述。这种情况极易导致产品的注册检验无法复现申报企业的检验结果,进而导致产品的退审。

第二个常见问题是在标准中仅注明所用试剂的厂家来源,但未注明试剂配制方法。这种情况在进口兽药产品中最为常见。产品首次申报时,由申报企业提供相应试剂,并不影响注册检验。但在后续的监督检验中,限制了试剂的采购来源,尤其是有些进口试剂难以采购,又没有相应配制方法,不利于对产品的质量控制和监督。

6 小结

新兽药细菌内毒素检查方法的建立,应从限值制定、试验设计、试验过程、质量标准制订等多个环节进行规范。注册资料中,限值制定应详细阐述计算过程或参考的标准;MVD 或 MVC 的计算,应注意根据品种及限值的单位选择适宜的计算公式;干扰试验应注意选择法定的工作标准品和适宜灵敏度的鲎试剂,并排除样品本身对测定的干扰;质量标准的制订应与验证试验内容一致,涉及特殊试剂或处理方法应在标准中加以说明。细菌内毒素检

查全过程的规范与控制,为兽药注射剂的安全可控奠定了基础。

参考文献:

[1] 张吉鹏. 细菌内毒素的检测方法及其研究进展[J]. 畜牧产业, 2020, 9: 61 – 64.

Zhang JK. Detection methods and research progress of bacterial endotoxin [J]. *Animal Agriculture*, 2020, 9: 61 – 64.

[2] 陈星, 贺利民, 刘戎, 等. 细菌内毒素及分析检测方法研究进展[J/OL]. 分析实验室. <https://doi.org/10.13595/j.cnki.issn1000-0720.2022.072002>.

Chen X, He LM, Liu R, *et al.* Progress on detection of bacterial endotoxin[J/OL]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, <https://doi.org/10.13595/j.cnki.issn1000-0720.2022.072002>.

[3] 中国兽药典委员会. 注射剂[S]. 中华人民共和国兽药典, 一部附录 0102, 2020 年版.

Chinese Veterinary Pharmacopoeia Commission. Injection [S]. *Chinese Veterinary Pharmacopoeia*, volume I, appendix 0102, 2020.

[4] 中国兽药典委员会. 细菌内毒素检查法[S]. 中华人民共和国兽药典, 一部附录 1143, 2020 年版.

Chinese Veterinary Pharmacopoeia Commission. Bacterial endotoxin test [S]. *Chinese Veterinary Pharmacopoeia*, volume I, appendix 1143, 2020.

[5] 中国药典委员会. 细菌内毒素检查法[S]. 中华人民共和国药典, 一部附录 1143, 2020 年版.

Chinese Pharmacopoeia Commission. Bacterial endotoxin test [S]. *Chinese Pharmacopoeia*, volume I, appendix 1143, 2020.

[6] 裴宇盛, 陈晨, 蔡彤, 等. 中、美药典细菌内毒素检查法应用指导原则的比较和解读[J/OL]. 中国药物警戒. <https://doi.org/10.19803/j.1672-8629.20211190>.

Pei YS, Chen C, Cai T, *et al.* Comparison and interpretation of guidance for the application of bacterial endotoxin test in Chinese and American Pharmacopoeia [J/OL]. *Chinese Journal of Pharmacovigilance*. <https://doi.org/10.19803/j.1672-8629.20211190>.

[7] 蔡彤, 裴宇盛, 张国来, 等. 第八批细菌内毒素国家标准品的建立[J]. 药物科学杂志, 2017, 26(10): 771 – 774.

Cai T, Pei YS, Zhang GL, *et al.* Establishment of the 8th National Standard of Endotoxin [J]. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 2017, 26(10): 771 – 774.

[8] 刘彤. 内毒素工作标准品的效价测定及标示方法[J]. 药物分析, 2006, 26(12): 1859 – 1862.

Liu T. Methods of potency determination and labeling of endotoxin reference standard [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2006, 26 (12): 1859 – 1862.

[9] 张昇昉, 卢海霞, 王 钧, 等. 注射用伏立康唑细菌内毒素检查研究[J]. 中国药品标准, 2023, 24(1): 57 – 60.

Zhang HF, Lu HX, Wang J, *et al.* Investigation on bacterial endotoxins test of voriconazole for injection [J]. *Drug Standards of China*, 2023, 24(1): 57 – 60.

[10] 中国药典委员会. 细菌内毒素检查法应用指导原则[S]. 中华人民共和国药典, 一部附录 9251, 2020 年版.

Chinese Pharmacopoeia Commission. Guidelines for the application of bacterial endotoxin test [S]. Chinese Pharmacopoeia, volume I, appendix 9251, 2020.

[11] 裴宇盛, 蔡 彤, 陈 晨, 等. 细菌内毒素重组 C 因子检测方法的验证[J]. 中国生物制品学杂志, 2020, 33(1): 76 – 79.

Pei YS, Cai T, Chen C, *et al.* Validation of a determination method for recombinant factor C of bacterial endotoxin [J]. *Chin J Biologicals January*, 2020, 33(1): 76 – 79.

(编 辑: 侯向辉)