

# 双价人乳头瘤病毒疫苗（毕赤酵母） 细菌内毒素检查方法的建立



王 莉<sup>1,2</sup>, 杨崇仪<sup>1,2</sup>, 王红艳<sup>1,2</sup>, 卢建升<sup>1,2</sup>, 程 宾<sup>1,2</sup>

1. 云南省食品药品监督检验研究院（昆明 650106）
2. 工业和信息化部产业技术基础公共服务平台（昆明 650106）

**【摘要】目的** 建立双价人乳头瘤病毒疫苗（毕赤酵母）的细菌内毒素检查方法。**方法** 按《中国药典》2020 年版三部通则 1143 细菌内毒素检查法及四部指导原则 9251 “细菌内毒素检查法应用指导原则”中的相关规定进行凝胶法、光度法（动态浊度法和动态显色法）测定细菌内毒素方法学研究。**结果** 双价人乳头瘤病毒疫苗（毕赤酵母）经 40 倍及以上稀释，对凝胶法反应无干扰，同时动态浊度法及动态显色法回收率也可达到要求。**结论** 建立双价人乳头瘤病毒疫苗（毕赤酵母）的凝胶法、动态浊度法及动态显色法进行细菌内毒素检查可行。

**【关键词】** 双价人乳头瘤病毒疫苗（毕赤酵母）；细菌内毒素检查；凝胶法；光度法；动态浊度法；动态显色法

## Establish the method of bacterial endotoxins test for human papillomavirus bivalent (types 16,18) vaccine (pichia pastoris)

WANG Li<sup>1,2</sup>, YANG Chongyi<sup>1,2</sup>, WANG Hongyan<sup>1,2</sup>, LU Jiansheng<sup>1,2</sup>, CHENG Bin<sup>1,2</sup>

1. Yunnan Institute for Food And Drug Control, Kunming 650106, China
  2. MITT Public Province Platform for Industrial Technology Foundation, Kunming 650106, China
- Corresponding author: CHENG Bin, Email: 46049141@qq.com

**【Abstract】Objective** Establish the method of bacterial endotoxins test for human papillomavirus bivalent (types 16,18) vaccine (pichia pastoris). **Methods** The method of gel-clot technique and photometric technique (kinetic-turbidimetric assay and kinetic-chromogenic assay) for the determination of bacterial endotoxins was carried out according to the *Appendix of China Pharmacopoeia* in 2020 Vol III 1143 “bacterial endotoxins test” and Vol IV 9251 “guidelines for bacterial endotoxin test”. **Results** There is no interference after more than forty times dilution for gel-clot technique, the recovery rates of kinetic-turbidimetric assay and kinetic-chromogenic assay can also meet the requirements. **Conclusion** It is feasible to establish gel-clot technique, kinetic-turbidimetric assay and kinetic-chromogenic assay for bacterial endotoxin test of human papillomavirus bivalent (types 16,18) vaccine (pichia pastoris).

**【Keywords】** Human papillomavirus bivalent (types16,18) vaccine (pichia pastoris);

DOI: 10.12173/j.issn.1005-0698.202410105

基金项目：云南省科技厅重大科技专项计划（202002AA100008）  
通信作者：程宾，硕士，副主任药师，Email：46049141@qq.com

<https://ywlbx.whuzhmedj.com/>

Bacterial endotoxins test; Gel-clot technique; Photometric technique; Kinetic-turbidimetric assay; Kinetic-chromogenic assay

热原物质是一类可引起哺乳动物体温升高的物质,细菌内毒素是革兰阴性杆菌细胞壁的脂多糖成分,是《药品生产质量管理规范》要求的生产条件下污染注射剂的最主要的热原物质之一<sup>[1]</sup>,微量即可引起体温升高,严重者可导致内毒素休克,因此细菌内毒素检查是注射剂安全性检查的重要指标<sup>[2]</sup>。细菌内毒素检查法包括凝胶法和光度法,光度法又分为动态浊度法、终点浊度法、动态显色法和终点显色法<sup>[3]</sup>。

在女性恶性肿瘤中,宫颈癌的发病率仅次于乳腺癌,大多数宫颈癌是由人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)感染所致;现已分离出的HPV达200多型,被分为3组:高危型、中危型和低危型,高危组中至少有14型可导致宫颈癌或其他恶性肿瘤;在这些类型中,70%的宫颈癌由16型和18型感染引起<sup>[4]</sup>。目前全球获得上市许可的HPV疫苗根据价型不同,分为二价、四价和九价HPV疫苗,我国目前获得上市许可的有二价和四价两种。双价人乳头瘤病毒疫苗(毕赤酵母)是毕赤酵母表达系统表达16和18两个型别病毒样颗粒(virus-like particles, VLP)的重组蛋白疫苗。《中国药典》2020年版目前尚未收载该品种,为配合企业合理制定该疫苗质量标准,本研究按《中国药典》2020年版三部1143“细菌内毒素检查法”<sup>[5]</sup>及《中国药典》2020年四部9251“细菌内毒素检查法应用指导原则”<sup>[6]</sup>中的相关规定,对建立该品种细菌内毒素检查方法进行全面研究,对不同方法和限值设定进行了全面探讨,验证了3种目前使用最多的细菌内毒素检查方法,并对3种方法的优缺点进行了深入的比较分析,为该品种上市提供相关检验研究资料。

## 1 材料与仪器

### 1.1 试药

1.1.1 鲎试剂(tachypleus amebocyte lysate, TAL)

批号:22091034,  $\lambda=0.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 规格:  $0.1 \text{ mL} \cdot \text{Amp}^{-1}$ , 厦门鲎试剂生物科技股份有限公司;批号:2209131,  $\lambda=0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 规格:  $0.1 \text{ mL} \cdot \text{Amp}^{-1}$ ,

湛江博康海洋生物有限公司;批号:2208053,  $\lambda=0.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 规格:  $0.1 \text{ mL} \cdot \text{Amp}^{-1}$ , 湛江博康海洋生物有限公司;动态浊度鲎试剂批号:2206290, 检测范围:  $10 \sim 0.01 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 规格:  $1.25 \text{ mL} \cdot \text{Amp}^{-1}$ , 湛江安度斯生物有限公司;动态显色鲎试剂批号:2207200, 检测范围:  $10 \sim 0.01 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 规格:  $0.35 \text{ mL} \cdot \text{Amp}^{-1}$ , 湛江安度斯生物有限公司。

### 1.1.2 细菌内毒素检查用水

批号:20086108, 规格:每瓶50 mL, 厦门鲎试剂生物科技股份有限公司;批号:2106290, 规格:每瓶50 mL, 湛江博康海洋生物有限公司;批号:2103260, 规格:每瓶50 mL, 湛江安度斯生物有限公司。

### 1.1.3 细菌内毒素工作标准品

批号:150601-202088, 规格:  $60 \text{ EU} \cdot \text{Amp}^{-1}$ , 中国食品药品检定研究院。

### 1.1.4 双价人乳头瘤病毒疫苗(毕赤酵母)

批号:2P202207014、2P202207015、2P202207016、2P202207017、2P202207018、2P202207019、2P202207022、2P202207023, 规格:每剂0.5 mL, 均为玉溪泽润生物技术有限公司生产。

## 1.2 仪器

FD115 电热鼓风干燥箱(德国 Binder); ZH-2 BLENDER 旋涡混合器(天津药典标准仪器厂); SUB28 恒温水浴, (Grant Instrument Ltd. England); 单道移液器(10~100  $\mu\text{L}$ , 艾本德); BET-72 细菌内毒素测定仪(动态浊度法, 天大天发科技有限公司); Multiskan FC/ET 全自动细菌内毒素检测系统(动态显色法, 湛江安度斯生物有限公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 鲎试剂灵敏度复核及标准曲线可靠性试验

按《中国药典》2020年版三部1143细菌内毒素检查法“鲎试剂灵敏度复核试验”及“标准曲线可靠性试验”要求<sup>[5]</sup>进行,结果见表1、表2,表明所用凝胶法鲎试剂灵敏度符合规定,按标示

表1 鲎试剂灵敏度复核结果

Table 1. Test for confirmation of TAL sensitivity

批号	$\lambda$ (EU · mL <sup>-1</sup> )	内毒素浓度 (EU · mL <sup>-1</sup> )				阴性	$\lambda_c$ (EU · mL <sup>-1</sup> )
		2 $\lambda$	$\lambda$	0.5 $\lambda$	0.25 $\lambda$		
22091034	0.25	++++	++++	----	----	--	0.25
2209131	0.50	++++	++++	----	----	--	0.50
2208053	0.25	++++	++++	+---	----	--	0.21

注：+，反应呈阳性；-，反应呈阴性。

表2 鲎试剂标准曲线可靠性试验结果 (n=3)

Table 2. Reliability test results of standard curve (n=3)

鲎试剂 批号	数据名称	内毒素浓度 (EU · mL <sup>-1</sup> )				阴性	标准曲线	r
		10	1	0.1	0.01			
2206290	变异系数 (%)	0.74	4.95	3.11	0.92	/	LgT=2.823 3+(-0.245 15 LgC)	0.992 0
	内毒素浓度实测值 (EU · mL <sup>-1</sup> )	7.059 8	1.494 4	0.127 2	0.007 4	<检测限		
2207200	变异系数 (%)	4.34	3.31	1.56	1.37	/	LgT=3.004 0+(-0.255 9 LgC)	0.996 1
	内毒素浓度实测值 (EU · mL <sup>-1</sup> )	7.915 0	1.596 2	0.203 9	0.015 0	<检测限		

灵敏度使用；光度法鲎试剂通过标准曲线可靠性试验，可用于试验。

## 2.2 细菌内毒素限值L的确立

生物制品的细菌内毒素限值确定有两种方式，一是按《中国药典》相关规定计算<sup>[7-9]</sup>；二是参考人用药品注册技术国际协调会、美国食品药品监督管理局研究文献等设定限值<sup>[10]</sup>。

按《中国药典》2020年版三部通则1143内毒素限值的确定中规定，计算公式为： $L=K/M$ ，注射剂  $K=5 \text{ EU}/(\text{kg} \cdot \text{h})$ ； $M$  为人用每千克体重每小时的最高供试品剂量，本品为9~30岁女性使用，9岁女童标准体重为24~35 kg（即  $M=0.5 \text{ mL} \cdot 24 \text{ kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}=0.021 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ），按公式计算  $L=5/0.021=238 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ （即每剂119 EU），按《中国药典》2020年版四部9301注射剂安全性检查法应用指导原则对细菌内毒素限值设定的规定：儿童用药可适当严格至计算值的1/3~1/2，即限值可收严至每剂40~60 EU。经查阅文献<sup>[11]</sup>，对疫苗类样品细菌内毒素限值的设定<sup>[12-13]</sup>，将细菌内毒素的限值定为应小于  $10 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ （即每剂5 EU）。

## 2.3 最大有效稀释倍数的计算

按公式最大有效稀释倍数  $=CL/\lambda$  计算， $L=$  每剂5 EU，即为  $L=10 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ， $\lambda$  为鲎试剂标示灵敏度，以  $\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$  表示，目前市售高灵敏度

鲎试剂（凝胶法）为  $0.031 25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，则试验时双价人乳头瘤病毒疫苗（毕赤酵母）的最大有效稀释倍数为320倍。

## 2.4 预干扰试验

用细菌内毒素检查用水对双价人乳头瘤病毒疫苗（毕赤酵母）进行稀释，使稀释倍数分别为10、20、40、80、160、320倍，将此系列溶液记为样品供试液，取样品的5、10、20、40、80、160倍稀释液与含细菌内毒素4  $\lambda$  和0.5  $\lambda$  的细菌内毒素溶液等体积混合，制成含细菌内毒素2  $\lambda$  和0.25  $\lambda$  的样品供试液，溶解鲎试剂与上述系列溶液进行反应，每一浓度重复2管，结果见表3。

## 2.5 正式干扰试验

### 2.5.1 凝胶法

按《中国药典》2020年版三部1143细菌内毒素检查法“供试品干扰试验”项下规定进行，将三批双价人乳头瘤病毒疫苗（毕赤酵母）用细菌内毒素检查用水分别制成20倍稀释液及40倍稀释液（A溶液）。分别用含细菌内毒素1.0、0.5、0.25、0.125  $\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液与样品20倍稀释液等体积混合，配成含细菌内毒素0.5、0.25、0.125、0.062 5  $\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$  的40倍稀释液（B溶液），用两批不同厂家  $\lambda$  为  $0.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$  的鲎试剂进行正式干扰试验，结果见表4、表5。

表3 预干扰试验测定结果

Table 3. Results of the preparatory testing

批号	系列	双价人乳头瘤病毒疫苗（毕赤酵母）稀释倍数					
		10倍	20倍	40倍	80倍	160倍	320倍
2P202207019	样品供试液（2λ）	--	++	++	++	++	++
	样品供试液	--	--	--	--	--	--
	样品供试液（0.25λ）	--	--	--	--	--	--

注：鲎试剂批号为2209131，λ为0.5 EU·mL<sup>-1</sup>，规格为0.1 mL·Amp<sup>-1</sup>，湛江博康海洋生物有限公司；+，反应呈阳性；-，反应呈阴性。

表4 正式干扰试验结果（批号：22091034）

Table 4. Test for interfering factors (NO. 22091034)

溶液	内毒素浓度 (EU·mL <sup>-1</sup> )	样品批号			Es (EU·mL <sup>-1</sup> )	Et (EU·mL <sup>-1</sup> )
		2P202207017	2P202207018	2P202207019		
A	/	- -	- -	- -	/	/
B	0.5	++++	++++	++++	/	0.25
	0.25	++++	++++	++++		
	0.125	----	----	----		
	0.062 5	----	----	----		
C	0.5		+ +		0.25	/
	0.25		+ +			
	0.125		- -			
	0.062 5		- -			
D	/	- -	- -	- -	/	/

注：鲎试剂批号为22091034，λ为0.25 EU·mL<sup>-1</sup>，规格为0.1 mL·Amp<sup>-1</sup>，厦门鲎试剂生物科技股份有限公司；C溶液，鲎试剂标示灵敏度对照系列；D溶液，阴性对照；+，反应呈阳性；-，反应呈阴性。

表5 正式干扰试验结果（批号：2208053）

Table 5. Test for interfering factors (NO. 2208053)

编号	内毒素浓度 (EU·mL <sup>-1</sup> )	样品批号			Es (EU·mL <sup>-1</sup> )	Et (EU·mL <sup>-1</sup> )
		2P202207017	2P202207018	2P202207019		
A	/	- -	- -	- -	/	/
B	0.50	++++	++++	++++	/	0.25
	0.25	++++	++++	++++		
	0.125	----	----	----		
	0.062 5	----	----	----		
C	0.50		+ +		0.25	/
	0.25		+ +			
	0.125		- -			
	0.062 5		- -			
D	/	- -	- -	- -	/	/

注：鲎试剂批号为2208053，λ为0.25 EU·mL<sup>-1</sup>，规格为0.1 mL·Amp<sup>-1</sup>，湛江博康海洋生物有限公司。C溶液，鲎试剂标示灵敏度对照系列；D溶液，阴性对照；+，反应呈阳性；-，反应呈阴性。

预干扰试验结果表明，双价人乳头瘤病毒疫苗（毕赤酵母）经 20 倍及以上稀释对鲎试剂与细菌内毒素的反应无干扰。为进一步确证有无干扰因素，用两个厂家的凝胶法鲎试剂对 3 批样品 40 倍稀释液进行正式干扰试验，结果 Et 符合鲎试剂灵敏度复核要求，说明双价人乳头瘤病毒疫苗（毕赤酵母）经 40 倍以上稀释对细菌内毒素检查法（凝胶法）无干扰，凝胶法可用于该样品的细菌内毒素检查。

### 2.5.2 光度法

以含 0.01、0.1、1 EU · mL<sup>-1</sup> 的细菌内毒素液制备标准曲线，选择将样品制成 5、10、20、40、80、160 倍稀释液，并用样品 5、10、20、40、80 倍稀释液与 0.2 EU · mL<sup>-1</sup> 细菌内毒素液等体积混合，制成含细菌内毒素 0.1 EU · mL<sup>-1</sup>

的 10、20、40、80、160 倍的样品回收液，按《中国药典》2020 年版三部 1143 细菌内毒素检查法“光度测定法”—动态浊度法<sup>[14-15]</sup>及动态显色法<sup>[16-18]</sup>对 3 批样品进行外加内毒素回收率试验，每个浓度平行 3 管，结果见表 6、表 7，回收率均在药典规定的 50%~200% 之间，且线性良好，表明该品种可建立细菌内毒素光度法（动态浊度法、动态显色法）测定样品中细菌内毒素的含量。

### 2.6 双价人乳头瘤病毒疫苗（毕赤酵母）细菌内毒素检查

按《中国药典》2020 年版三部 1143 细菌内毒素检查法分别使用 3 种方法对 8 批样品进行细菌内毒素检查。光度法检测对样品进行 40 倍稀释，结果见表 8。

表6 动态浊度法的回收率试验结果 (n=3, %)

Table 6. Recovery of kinetic-turbidimetric assay (n=3, %)

批号	不同稀释倍数结果									
	10倍CV	R	20倍CV	R	40倍CV	R	80倍CV	R	160倍CV	R
2P202207017	2.53	48	1.52	65	1.43	107	0.71	97	0.80	104
2P202207018	1.98	51	2.01	62	0.22	102	0.60	101	0.97	99
2P202207019	1.62	37	4.61	56	0.08	105	2.51	107	1.06	94
标准曲线范围 (EU · mL <sup>-1</sup> )	0.01~1.0									
外加内毒素浓度 (EU · mL <sup>-1</sup> )	0.1									
阴性对照	<检测限									

注：标准曲线：LgT=2.773 91+(-0.245 15 LgC)，r=0.999 2；鲎试剂批号为2206290，规格为1.25 mL · Amp<sup>-1</sup>，湛江安度斯生物有限公司。

表7 动态显色法的回收率试验结果 (n=3, %)

Table 7. Recovery of kinetic-chromogenic assay (n=3, %)

批号	不同稀释倍数结果									
	10倍CV	R	20倍CV	R	40倍CV	R	80倍CV	R	160倍CV	R
2P202207017	1.29	49.1	2.74	56.2	1.31	118.4	2.34	117.3	1.61	127.2
2P202207018	2.38	58.3	4.31	61.7	4.69	150.3	4.18	138.9	0.71	120.3
2P202207019	1.09	46.5	3.68	50.9	1.29	110.6	6.89	134.0	1.55	138.1
标准曲线范围 (EU · mL <sup>-1</sup> )	0.01~1.0									
外加内毒素浓度 (EU · mL <sup>-1</sup> )	0.1									
阴性对照	<3 600 min (有效)									

注：标准曲线：LgT=2.978 5-0.231 8 LgC；r=0.994 2；鲎试剂批号为2207200，规格为0.35 mL · Amp<sup>-1</sup>，湛江安度斯生物有限公司。

表8 双价人乳头瘤病毒疫苗(毕赤酵母)细菌内毒素检查结果(EU·mL<sup>-1</sup>)

Table 8. Bacterial endotoxin test for human papillomavirus bivalent (types 16,18) vaccine (pichia pastoris) (EU·mL<sup>-1</sup>)

批号	凝胶法	动态浊度法	动态显色法
2P202207014	阴性	<0.4	<0.4
2P202207015	阴性	<0.4	<0.4
2P202207016	阴性	<0.4	<0.4
2P202207017	阴性	<0.4	<0.4
2P202207018	阴性	<0.4	<0.4
2P202207019	阴性	<0.4	<0.4
2P202207022	阴性	<0.4	<0.4
2P202207023	阴性	<0.4	<0.4

注:凝胶法试剂批号为2208053,规格0.1 mL·Amp<sup>-1</sup>,湛江博康海洋生物有限公司;动态浊度试剂批号为2206290,规格为1.25 mL·Amp<sup>-1</sup>,湛江安度斯生物有限公司;动态显色试剂批号为2207200,规格为0.35 mL·Amp<sup>-1</sup>,湛江安度斯生物有限公司。

### 3 讨论

本研究对该品种细菌内毒素检查不同方法进行了全面的方法学验证,结果表明凝胶法、动态浊度法、动态显色法用于人乳头瘤病毒疫苗(毕赤酵母)细菌内毒素检查均可行,在检验工作中可根据实验室条件选择任意方法进行检验。

凝胶法为限度检查,不能检测出样品中细菌内毒素的具体含量,试验使用仪器设备较普及,试剂、耗材等成本都较低;但试验需人工完成,结果的判断为目测观察判断,检验人员操作的规范性和结果判断主观性对试验结果存在一定的影响;试验的反应时间固定,为37℃孵育1h;同时当检查出现异议时,凝胶法也是我国药典规定的仲裁方法;方法建立后,对8批次样品进行检验,结果表明样品中细菌内毒素的量均小于限值每剂5EU,样品合格。已有企业研制并生产出用于凝胶法试验结果判断的仪器设备,可自动完成凝胶法孵育、结果的影像记录及判断,实现凝胶法结果的审计追踪,大大提高了凝胶法结果判断的客观性和自动化程度,希望可以尽快普及。凝胶法更适用于最终产品的批量检验。

光度法为细菌内毒素的定量测定方法,可检

测样品中细菌内毒素的具体含量,但试验方法相对复杂,需要使用专用仪器设备,试验成本较凝胶法高,试验数据由仪器检测、计算得出,结果的判断较凝胶法更客观。光度法具有精密度高、重复性、稳定性好等优点,但光度法一次的检验数量受仪器设备和样品平行管数多少的限制。动态浊度法只要浊度达到预设终点、吸光度值即可终止试验,从而缩短试验时间,达到快速检验的目的;使用全自动细菌内毒素检测系统(Multiskan FC/ET动态显色法)进行试验自动化程度较动态浊度法更高,可有效解放试验人员,试剂使用量最少,试验结果受人为因素影响最小。光度法更适用于需要测定样品中细菌内毒素具体含量的工作及研究。

由于大多数生物制品的给药剂量都较小,使用药典规定的计算公式计算生物制品细菌内毒素检查限值,可能不尽合理,但由于一些生物制品在生产制备中使用到菌株,所以其中含有细菌内毒素也是不可避免的,因此,不同品种的生物制品其细菌内毒素限值设定有一定的差异。用光度法检验8批样品结果不但表明样品中细菌内毒素的量小于每剂5EU,而且低于标准曲线最低检测限,即8批样品中细菌内毒素的量均小于0.4EU·mL<sup>-1</sup>(即小于每剂0.2EU),8批样品细菌内毒素含量远低于制定的标准限值,表明样品在生产过程中细菌内毒素控制良好,这给提高该品种质量标准,降低样品细菌内毒素检查的限值提供了一定的参考依据,在后续工作中可对该品种细菌内毒素含量持续考察研究,以达到不断优化检验标准,进而制定更为科学合理的质控标准;同时也为其他品种的生物制品建立细菌内毒素检查项目的合理性提供参考。

### 参考文献

- 郭萌,李冠民,黄清泉.细菌内毒素研究进展[J].中国实验动物学报,2009,17(5):397-401.[Guo M, Li GM, Huang QQ. Advances in research of bacterial endotoxin[J]. Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica, 2009, 17(5): 397-401.] DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2009.05.018.
- 张虞婷,丁苏苏,李倚云.细菌内毒素的研究进展及其检查法的应用[J].天津药学,2015,27(5):66-69.[Zhang YT, Ding SS, Li YY. Research progress on

- bacterial endotoxins and application of their detection methods[J]. *Tianjin Pharmacy*, 2015, 27(5): 66–69.] DOI: CNKI:SUN:TJYA.0.2015–05–029.
- 3 张媛, 孙述学. 细菌内毒素检测方法的研究进展[J]. *中国生物制品学杂志*, 2023, 36(3): 368–372, 378. [Zhang Y, Sun SX. Research progress of bacterial endotoxin detection methods[J]. *Chinese Journal of Biologicals*, 2023, 36(3): 368–372, 378.] DOI: 10.13200/j.cnki.cjb.003846.
  - 4 Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer[J]. *N Engl J Med*, 2003, 348(6): 518–527. DOI: 10.1056/NEJMoa021641.
  - 5 中国药典 2020 年版. 三部 [S]. 2020: 通则 1143.
  - 6 中国药典 2020 年版. 四部 [S]. 2020: 指导原则 9215.
  - 7 郑晓丽, 曾艳, 兰燕, 等. 乙型脑炎灭活疫苗细菌内毒素检查方法的研究[J]. *微生物学杂志*, 2001, 21(4): 43–45. [Zhen XY, Zen Y, Lan Y, et al. Study on the method of bacterial endotoxin test for inactivated Japanese encephalitis vaccine[J]. *Journal of Microbiology*, 2001, 21(4): 43–45.] DOI: 10.3969/j.issn.1005–7021.2001.04.018.
  - 8 李红芳, 陈继军, 王建军, 等. 乙型脑炎减毒活疫苗细菌内毒素检查方法及质量标准的建立[J]. *兰州大学学报: 医学版*, 2009, 35(2): 47–50. [Li HF, Chen JJ, Wang JJ, et al. Establishment of the inspection methods and quality criteria for bacterial endotoxin of live-attenuated vaccine of encephalitis B virus[J]. *Journal of Lanzhou University (Medical Sciences)*, 2009, 35(2): 47–50.] DOI: 10.3969/j.issn.1000–2812.2009.02.013.
  - 9 梁昊宇, 蔡彤, 裴宇盛, 等. 伤寒 Vi 多糖疫苗细菌内毒素检测[J]. *中国药事*, 2017, 31(7): 780–784. [Liang HY, Cai T, Pei SY, et al. Determination of bacterial endotoxin in typhoid Vi polysaccharide vaccine[J]. *Chinese Pharmaceutical Affairs*, 2017, 31(7): 780–784.] DOI: 10.16153/j.1002–7777.2017.07.012.
  - 10 苏雯, 吴凡. 凝胶法在肠道病毒 71 型灭活疫苗检定中的验证及应用[J]. *中国卫生检验杂志*, 2023, 33(16): 1928–1930. [Su W, Wu F. Verification and application of gel method in the detection of enterovirus 71 inactivated vaccine[J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2023, 33(16): 1928–1930.] <https://qikan.cqvip.com/Qikan/Article/Detail?id=7110511710>.
  - 11 李婷, 邱家新, 杨丽菲, 等. 艾滋病 DNA 疫苗细菌内毒素检查法的方法建立[J]. *海峡药学*, 2022, 34(9): 38–41. [Li T, Qiu JX, Yang LF, et al. Validation of bacterial endotoxin test in human immunodeficiency virus DNA Vaccine[J]. *Strait Pharmaceutical Journal*, 2022, 34(9): 38–41.] DOI: 10.3969/j.issn.1006–3765.2022.09.010.
  - 12 袁晶, 孙也婷, 许馨月, 等. 新型冠状病毒灭活疫苗 (Vero 细胞) 内毒素检查方法比较[J]. *中国药业*, 2024, 33(4): 63–67. [Yuan J, Sun YT, Xun XY, et al. Comparison of endotoxin test methods for SARS-CoV-2 vaccine (Vero cell)[J]. *China Pharmaceuticals*, 2024, 33(4): 63–67.] DOI: 10.3969/j.issn.1006–4931.2024.04.015.
  - 13 曾艳, 孙阳, 蓝燕, 等. 动态浊度法检测冻干甲型肝炎减毒活疫苗细菌内毒素含量的研究[J]. *微生物学杂志*, 2016, 36(4): 62–66. [Zeng Y, Sun Y, Lan Y, et al. Detection of bacterial endotoxin content in freeze-dried attenuated hepatitis a live vaccine by dynamic turbidity method[J]. *Journal of Microbiology*, 2016, 36(4): 62–66.] DOI: 10.3969/j.issn.1005–7021.2016.04.011.
  - 14 朱佳丽, 段鹏, 曹慧, 等. 动态浊度法测定碘克沙醇中细菌内毒素的含量[J]. *中国药师*, 2016, 19(2): 384–387. [Zhu JL, Duan P, Cao H, et al. Determination of bacterial endotoxin in iodixanol by kinetic turbidimetric method[J]. *China Pharmacist*, 2016, 19(2): 384–387.] DOI: 10.3969/j.issn.1008–049X.2016.02.059.
  - 15 刘骅, 李刚, 黄丽娟, 等. 动态浊度法定量检测磺达肝癸钠注射液细菌内毒素含量的研究[J]. *中国药品标准*, 2022, 23(1): 70–74. [Liu Y, Li G, Huang LJ, et al. Quantification of bacterial endotoxin in fondaparinux sodium injection by kinetic turbidimetric assay[J]. *Drug Standards of China*, 2022, 23(1): 70–74.] DOI: 10.19778/j.chp.2022.01.015.
  - 16 常亚军, 赵王丽, 葛绕玲, 等. 微量动态显色法定量检测 EV71 灭活疫苗内毒素含量的可行性[J]. *国际生物制品学杂志*, 2023, 46(5): 268–272. [Chang YJ, Zhao WL, Ge RL, et al. Feasibility on micro-dynamic chromogenic assay for quantitative detection of bacterial endotoxin in inactivated EV71 vaccine[J]. *International Journal of Biologicals*, 2023, 46(5): 268–272.] DOI: 10.3760/cma.j.cn311962–20221013–00071.

- 17 刘骅, 王花花, 王珺, 等. 微量鲎试剂动态显色法定量检测重组新型冠状病毒疫苗(CHO细胞)细菌内毒素的研究[J]. 中国药理学通报, 2022, 38(7): 1110-1113. [Liu H, Wang HH, Wang J, et al. Study on quantitative detection of bacterial endotoxin in recombinant novel coronavirus vaccine (CHO cell) by micro-dynamic chromogenic[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2022, 38(7): 1110-1113.] DOI: [10.12360/CPB202112121](https://doi.org/10.12360/CPB202112121).
- 18 赵明, 刘婷, 马昱, 等. 组分百日咳抗原中间品中内

毒素含量动态显色定量检测方法的建立及验证[J]. 中国生物制品学杂志, 2024, 37(2): 209-214. [Zhao M, Liu T, Ma Y, et al. Development and verification of kinetic chromogenic quantitative detection method for endotoxin content in intermediate of component pertussis antigen[J]. Chinese Journal of Biologicals, 2024, 37(2): 209-214.] DOI: [10.13200/j.cnki.cjb.004164](https://doi.org/10.13200/j.cnki.cjb.004164).

收稿日期: 2024年03月21日 修回日期: 2024年11月03日  
本文编辑: 周璐敏 沈静怡