

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.07.015

醋酸氯己定冲洗剂细菌内毒素检查法研究*

黄婧, 白玲玲, 王婷, 苏华, 王银娟[△]

(中国人民解放军东部战区总医院药剂科, 江苏 南京 210002)

摘要:目的 建立醋酸氯己定冲洗剂细菌内毒素的检查方法。方法 按2015年版《中国药典(四部)》通则1143内毒素检查法,建立醋酸氯己定冲洗剂细菌内毒素的检查方法,并使用2个厂家的鲎试剂进行方法验证。结果 使用稀释剂I将醋酸氯己定冲洗剂稀释2倍后,再用细菌内毒素检查用水稀释至8倍,可消除其对鲎试剂凝集反应的干扰,细菌内毒素限值为0.5 EU/mL。结论 该方法可用于醋酸氯己定冲洗剂细菌内毒素的检查,为可能导致鲎试剂中单价和二价离子缺失样品的细菌内毒素检查方法的建立提供参考。

关键词:醋酸氯己定冲洗剂;细菌内毒素;凝胶法;干扰试验;稀释剂I;鲎试剂

中图分类号:R917

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)07-0055-03

Bacterial Endotoxins Test Method for Chlorhexidine Acetate Irrigation Solution

HUANG Jing, BAI Lingling, WANG Ting, SU Hua, WANG Yinjuan

(Department of Pharmacy, General Hospital of Eastern Theater Command, Nanjing, Jiangsu, China 210002)

Abstract: Objective To establish a bacterial endotoxins test method for Chlorhexidine Acetate Irrigation Solution. **Methods** The bacterial endotoxin test method for Chlorhexidine Acetate Irrigation Solution was established according to the bacterial endotoxin test method of the general rule 1143 of the *Chinese Pharmacopoeia* (Volume IV, 2015 Edition), and the method was verified by tachypleus amebocyte lysate (TAL) from two different manufacturers. **Results** The Chlorhexidine Acetate Irrigation Solution was diluted by dilution solution I to two times and then diluted by bacterial endotoxin test (BET) water to eight times, which could eliminate the interference to the agglutination reaction of TAL. The limit value of bacterial endotoxin was 0.5 EU/mL. **Conclusion** The method can be used for bacterial endotoxin test of Chlorhexidine Acetate Irrigation Solution, which can provide a reference for the establishment of the bacterial endotoxin test method for samples that may lead to the loss of monovalent and divalent ions when reacting with TAL.

Key words: Chlorhexidine Acetate Irrigation Solution; bacterial endotoxin; gel method; interference test; dilution solution I; tachypleus amebocyte lysate

醋酸氯己定冲洗剂为我院院内制剂[南制字(2016)B501008],具有消毒、防腐作用,用于创面消毒和冲洗伤口。主要成分为双胍类化合物醋酸氯己定,通过吸附在细菌胞浆膜使细胞内容物漏出而起到抑菌和杀菌作用,对革兰阴性菌和阳性菌均有很强的抑制作用^[1-2]。该品种收录于《中国人民解放军医疗机构制剂规范(2015年版)》^[3]中,曾用名为醋酸洗必泰溶液。根据2015年版《中国药典(四部)》通则0128^{[4]25-26}规定,冲洗剂需要进行细菌内毒素检查。醋酸氯己定冲洗剂在细菌内毒素检查中存在干扰,用稀释法无法消除^[5]。本研究中采用二价离子补充剂稀释剂I稀释样品以消除干扰,建立了醋酸氯己定冲洗剂的细菌内毒素检查方法。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

ET-96型内毒素注射用水(BET)细菌内毒素检测仪(天津药典标准仪器厂);HG71-A型恒温干燥箱(北京试验设备厂);使用的器具、玻璃量器等均按2015年版

《中国药典(四部)》规定除去可能存在的外源性内毒素。

1.2 试剂

细菌内毒素工作标准品(中国食品药品检定研究院,规格为每支80 EU,批号为150601-201681);鲎试剂1[标示灵敏度(λ)为0.25 EU/mL,批号为1803231],鲎试剂2(λ 为0.06 EU/mL,批号分别为1803052,1804180),细菌BET(规格为每支5 mL,批号为1606160),稀释剂I(规格为每支4 mL,批号为1803130),均购自安度斯生物有限公司;鲎试剂3(λ 为0.25 EU/mL,批号为1801230),鲎试剂4(λ 为0.06 EU/mL,批号分别为1806290,1807241),均购自博康海洋生物有限公司;醋酸氯己定冲洗剂(医院制剂,规格为每瓶500 mL,批号分别为180309,180529,180704)。

2 方法与结果

2.1 鲎试剂灵敏度复核试验

按2015年版《中国药典(四部)》通则1143^{[4]154-157}细菌内毒素检查法复核鲎试剂标示灵敏度,结果鲎试剂灵敏度均在 $[0.5\lambda, 2\lambda]$ 范围内,符合要求。详见表1。

*基金项目:全军医疗机构制剂标准提高科研专项课题重点项目[14ZJZ08]。

第一作者:黄婧,女,硕士,药师,研究方向为医院制剂,(电话)025-80860166(电子信箱)hjsky2010@hotmail.com。

[△]通信作者:王银娟,女,大学本科,主管药师,研究方向为医院制剂,(电话)025-80860166(电子信箱)79746636@qq.com。

表 1 鲎试剂灵敏度复核试验结果
Tab. 1 The results of TAL sensitivity test

厂家	批号	λ (EU/mL)	细菌内毒素浓度					λc (EU/mL)
			2 λ	1 λ	0.5 λ	0.25 λ	NC	
安度斯	1803231	0.25	++++	++++	----	----	--	0.25
	1803052	0.06	++++	++++	----	----	--	0.06
	1804180		++++	++++	----	----	--	0.06
博康海洋	1801230	0.25	++++	++++	----	----	--	0.25
	1806290	0.06	++++	++++	+-	----	--	0.04
	1807241		++++	++++	++++	----	--	0.03

注: - 为阴性,代表未形成凝胶; + 为阳性,代表形成凝胶且倒转 180° 不变形。下表同。

Note: The negative is marked "-", which represents no gel forming; the positive is marked "+", which represents the formation of gel and reverses 180 degrees without deformation; as well as the following tables.

2.2 细菌内毒素限值(L)和最大有效稀释倍数(MVD)的确定

L: 参照 2015 年版《中国药典(四部)》通则 0128 冲洗剂项下规定,每 1 mL 中含细菌内毒素的量应小于 0.50 EU^{[4]25-26}。因此,将醋酸氯己定冲洗剂的 L 控制在 0.5 EU/mL 内。

MVD: 目前市售鲎试剂的 λ 范围为 0.03~0.5 EU/mL,按公式 $MVD = cL/\lambda$ (式中, c 为供试品溶液的浓度, λ 为鲎试剂灵敏度的标示值)计算,对应的有效稀释倍数为 0 倍、2 倍、4 倍、8 倍、16 倍。结果显示,0 倍、2 倍、4 倍稀释液对鲎试剂凝集反应有干扰,故选择在 16 倍有效稀释范围内对其进行细菌内毒素检测的干扰预试验。

2.3 干扰预试验

预试验 1(BET 稀释): 取样品(批号为 180309),分别用 BET 稀释 2 倍、4 倍和 8 倍,作为供试品阴性对照(NPC);各稀释倍数溶液中分别加入 2 λ 内毒素(0.5 EU/mL),作为供试品阳性对照(PPC)。取 2 个厂家的鲎试剂(λ 为 0.25 EU/mL)分别与 NPC、PPC 溶液反应;将鲎试剂设为阳性对照(PC),BET 设为阴性对照(NC)分别进行试验。结果见表 2。可见,稀释的醋酸氯己定冲洗剂对鲎试剂凝集反应均有抑制作用,即供试品均存在干扰。

表 2 干扰预试验 1 结果

Tab. 2 The results of preliminary interference test 1

鲎试剂 批号		供试品稀释倍数				
		2	4	8	PC	NC
1803231	NPC	--	--	--	++	--
	PPC	--	--	--		
1801230	NPC	--	--	--	++	--
	PPC	--	--	--		

预试验 2(稀释剂 I 结合 BET 稀释): 用稀释剂 I 将样品(批号为 180309)稀释 2 倍后,再用 BET 分别稀释 4 倍和 8 倍,作为 NPC 溶液;各稀释倍数溶液中分别加

入 2 λ 内毒素(0.5 EU/mL),作为 PPC 溶液。取 2 个厂家的鲎试剂(λ 为 0.25 EU/mL)分别与 NPC、PPC 溶液反应,并按常规设 PC 和 NC。结果见表 3。可见,稀释 2 倍的样品对鲎试剂凝集反应均无抑制作用,即样品 2 倍稀释液中不存在鲎试剂干扰。

表 3 干扰预试验 2 结果

Tab. 3 The results of preliminary interference test II

鲎试剂 批号		供试品稀释倍数				
		2	4	8	PC	NC
1803231	NPC	--	--	--	++	--
	PPC	++	++	++		
1801230	NPC	--	--	--	++	--
	PPC	++	++	++		

2.4 干扰试验

根据预试验结果,对样品分别稀释 2 倍、4 倍、8 倍,进行鲎试剂干扰试验。结果显示,2 倍、4 倍稀释液中均存在干扰,故选取 8 倍稀释液进行试验。取样品 3 批,分别用稀释剂 I 稀释 2 倍后,再用 BET 稀释,最终为 8 倍稀释液,作为 NPC 溶液,用 8 倍稀释的供试品溶液及 BET 分别稀释细菌内毒素工作标准品,制成 2 λ , 1 λ , 0.5 λ , 0.25 λ 的溶液。同时使用 2 个不同厂家的鲎试剂(λ 为 0.06 EU/mL),按 2015 年版《中国药典(四部)》通则 1143 细菌内毒素检查法凝胶法^{[4]154-157}进行干扰试验,结果见表 4。可见,将样品使用稀释剂 I、BET 稀释 8 倍时,对不同批号的鲎试剂与细胞内毒素工作标准品反应均无干扰作用。

2.5 标准建立

取本品,使用稀释剂 I 对样品稀释 2 倍,再用 BET 对上述溶液进行稀释,最终得到稀释 8 倍的供试品溶液;取上述供试品溶液及 BET 分别将细菌内毒素工作标准品制成 2 λ , 1 λ , 0.5 λ , 0.25 λ 的溶液,使用 λ 为 0.06 EU/mL 的鲎试剂,根据 2015 年版《中国药典(四部)》通则 1143 检测供试品溶液中细菌内毒素的含量,每 1 mL 供试品溶液中细菌内毒素含量应小于 0.5 EU^{[4]154-157}。

表 4 样品细菌内毒素干扰试验结果

Tab. 4 Results of bacterial endotoxin interference test of the samples

鲎试剂 批号	样品 批号	细菌内毒素浓度				供试品 溶液	NC
		2 λ	1 λ	0.5 λ	0.25 λ		
1803052	BET	++	++	--	--		
	180309	++++	++++	----	----	--	--
	180529	++++	----	----	----	--	--
	180704	++++	+-	----	----	--	--
1804180	BET	++	++	--	--		
	180309	++++	----	----	----	--	--
	180529	++++	----	----	----	--	--
	180704	++++	+-	----	----	--	--
1806290	BET	++	++	+-	--		
	180309	++++	----	----	----	--	--
	180529	++++	----	----	----	--	--
	180704	++++	----	----	----	--	--
1807241	BET	++	++	++	--		
	180309	++++	++++	+-	----	--	--
	180529	++++	++++	----	----	--	--
	180704	++++	+-	----	----	--	--

2.6 样品检测

取 λ 为 0.06 EU/mL 的鲎试剂,按本研究中拟建立的细菌内毒素检查方法对 3 批样品进行常规检查,结果均呈阳性反应。详见表 5。

表 5 样品细菌内毒素检查结果

Tab. 5 The results of bacterial endotoxin test for the samples

鲎试剂批号	样品批号	供试品溶液	PC	PPC	NC
1803052	180309	--	++	++	--
	180529	--	++	++	--
	180704	--	++	++	--
1804180	180309	--	++	++	--
	180529	--	++	++	--
	180704	--	++	++	--

3 讨论

3.1 细菌内毒素检查方法

细菌内毒素检查方法具有试验条件要求低、检测速度快、重复性佳、结果精准等优点^[6-7]。在 2015 年版《中国药典(四部)》附录中收录的细菌内毒素检查方法有凝胶法和光度测定法^{[4]154-157}。其中,凝胶法操作简便,是限量试验,主要为检验机构判定供试品 L 是否合格的检验手段;光度测定法是定量试验,主要用于药品生产企业定量测定供试品中含有的 L,以提高生产质量^[8-9]。故本研究中选用凝胶法。

3.2 稀释溶剂

醋酸氯己定冲洗剂对鲎试剂细菌内毒素凝集反应有抑制作用^[5],使用 BET 稀释无法消除干扰,而使用稀

释剂 I 作为辅助稀释,可消除干扰^[10]。醋酸氯己定冲洗剂主要成分醋酸氯己定含有醋酸根离子,可能与鲎试剂中的单价和二价离子发生反应,而鲎试剂中的单价和二价离子是保持灵敏度的必需成分,故直接使用 BET 稀释会抑制鲎试剂与内毒素的反应能力。本研究中选用的稀释剂 I 为含有一定浓度的二价离子,可饱和醋酸根离子,维持鲎试剂的正常灵敏度^[11]。

为了节省检验成本,本研究中考察了最佳稀释方法。结果表明,只要在第一步稀释样品时加入稀释剂 I 稀释,以后步骤用 BET 稀释即可排除干扰。

3.3 稀释倍数

预试验中 2 倍稀释即无干扰,但正式干扰试验中,2 倍稀释及 4 倍稀释液中分别加入细菌内毒素工作标准品制成 1 λ,0.5 λ,0.25 λ 的 PPC 溶液时,与鲎试剂反应均为阴性,故最终选取稀释倍数为 8 倍。

3.4 方法评价

本研究中建立的方法可用于醋酸氯己定冲洗剂细菌内毒素的检查,为可能导致鲎试剂中单价和二价离子缺失样品的细菌内毒素检查方法的建立提供参考。

参考文献

- [1] 方 李,李 思,苏 华,等.3 种含醋酸氯己定制剂的微生物限度检查方法研究[J]. 中国药师,2017,20(11): 2071-2073.
- [2] 杨艳伟,朱 英.消毒剂氯己定及其检测方法研究进展[J]. 中国消毒学杂志,2015,32(10):1023-1026.
- [3] 中央军委后勤保障部卫生局.中国人民解放军医疗机构制剂规范(第一册)[M]. 北京:人民军医出版社,2015:360.
- [4] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015.
- [5] 肖 敏,唐跃年,张 蕾.醋酸氯己定灭菌溶液细菌内毒素检查方法验证[J]. 中国药师,2012,15(7):1050-1051.
- [6] 杨 玲,厉 青.氟比洛芬酯注射液细菌内毒素检查方法的建立[J]. 海峡药学,2016,28(10):68-71.
- [7] 罗 洁,张德波,邓 莎,等.细辛脑注射剂细菌内毒素检查方法研究[J]. 中国现代应用药学,2016,33(2):203-208.
- [8] 王婷婷,李 豆,周 瑞.盐酸伊立替康注射液的细菌内毒素检查方法研究[J]. 中国药业,2016,25(22):69-71.
- [9] 方 韵,郝 刚,陈 卫,等.动态显色法定量检测卡前列素氨丁三醇注射液中的细菌内毒素[J]. 安徽医药,2017,21(12): 2169-2172.
- [10] 陈青连,姚 振,冯 雅.苯磺顺阿曲库铵注射液细菌内毒素检查法研究[J]. 中国药业,2019,28(9):42-46.
- [11] 李数徐.注射用顺苯磺顺阿曲库铵细菌内毒素检测动态浊度法的研究[J]. 药物分析杂志,2014,34(2):340-344.

(收稿日期:2020-07-03;修回日期:2020-10-07)