

丹皮酚磺酸钠注射液细菌内毒素检查方法的建立

杨玲*, 厉青, 曹蕾, 陈晓玲(武警浙江省总队医院, 浙江嘉兴 314000)

中图分类号 R927.12 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)13-1225-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.13.26

摘要 目的:建立丹皮酚磺酸钠注射液的细菌内毒素检查方法。方法:按2010年版《中国药典》(二部)附录中细菌内毒素凝胶检查法的要求,通过干扰试验确定样品最大无干扰浓度,并进行方法学验证。结果:丹皮酚磺酸钠注射液稀释至质量浓度 ≤ 0.83 mg/ml时对鲎试剂未见干扰作用。结论:细菌内毒素法可替代家兔法用于丹皮酚磺酸钠注射液的热原检查。

关键词 丹皮酚磺酸钠注射液;细菌内毒素;鲎试剂;干扰试验

Establishment of Bacterial Endotoxin Test for Paeonolsilatic Sodium Injection

YANG Ling, LI Qing, CAO Lei, CHEN Xiao-ling (Zhejiang People's Armed Police Corps Hospital, Zhejiang Jiaxing 314000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish bacterial endotoxin test for Paeonolsilatic sodium injection. METHODS: The maximum non-interference concentration of samples was determined by interference test according to the requirements of bacterial endotoxin test stated in appendix II of *Chinese Pharmacopoeia* (2010 edition). And then methodology validation was conducted. RESULTS: The interference of tachypleus amebocyte lysate (TAL) on bacterial endotoxin test can be excluded when Paeonolsilatic sodium injection was diluted to below 0.83 mg/ml. CONCLUSIONS: The bacterial endotoxins test can replace the rabbit method for pyrogen test of Paeonolsilatic sodium injection.

KEYWORDS Paeonolsilatic sodium injection; Bacterial endotoxin; Tachypleus amebocyte lysate; Interference test

丹皮酚又称牡丹酚,分离自中药牡丹、芍药的干燥根皮和徐长卿的根或全草,是一种具有广泛生物活性的物质^[1]。丹皮酚磺酸钠注射液是由丹皮酚提取精制磺化所得,具有与丹皮酚相同的祛风镇痛作用,但水溶性大大提高^[2],故可制成注射剂应用于临床。其临床主要用于风湿性关节炎、类风湿性关节炎等关节疼痛,以及颈椎腰椎增生、肌肉痛及神经痛等^[3]。由于注射剂均需要进行热原检查,而家兔法检查操作复杂且易受多种因素影响;用细菌内毒素法检查热原操作简便、灵敏度较高,故该法普遍应用于注射剂中热原检查。目前尚未见丹皮酚磺酸钠注射液细菌内毒素法的相关文献报道,故笔者通过本次试验,探讨用细菌内毒素法代替家兔法检查丹皮酚磺酸钠注射液中内毒素的可行性。

1 材料

1.1 仪器

BET-32细菌内毒素测定仪(天津市天大天发科技有限公司);ZH-2型自动漩涡混合器(天津药典标准仪器厂);BS-1300U型超净工作台(苏州净化设备有限公司);SC-101型鼓风电热恒温干燥箱(浙江嘉兴新腾电器设备有限公司);微量取液器(上海求精生化试剂仪器有限公司,规格:100~250 μ l)。

1.2 药品与试剂

丹皮酚磺酸钠注射液(金陵药业股份有限公司南京金陵制药厂,批号:120101、120901、130301,规格:2 ml:100 mg);细菌内毒素工作标准品(简称CSE,批号:1208280,效价:每支10 EU)、细菌内毒素检查用水(简称BET水,批号:1206130,规格:每支5 ml)均来源于湛江安度斯生物有限公司;鲎试剂[湛江安

度斯生物有限公司,批号:1212282、1301642,标示灵敏度(λ):0.25 EU/ml;批号:1212262、1301281, λ :0.125 EU/ml。福州新北生化工业有限公司,批号:11082712、12071212, λ :0.25 EU/ml;批号:12030711、12061312, λ :0.125 EU/ml]。

2 方法与结果

2.1 鲎试剂灵敏度复核

目前用于药品检验的市售的鲎试剂灵敏度一般是0.5~0.03 EU/ml^[4]。本试验选用灵敏度为0.125、0.25 EU/ml的鲎试剂进行灵敏度复核试验。根据鲎试剂灵敏度的标示值(使用2个厂家的鲎试剂,各选取2个批号),取CSE用BET水溶解,置于漩涡混合器混合15 min,然后各制成2 λ 、1 λ 、0.5 λ 、0.25 λ 4个浓度梯度的细菌内毒素标准溶液,各平行试验4管,按2010年版《中国药典》(二部)附录中细菌内毒素检查法^[5]复核试验用鲎试剂的灵敏度。结果2个厂家的8批鲎试剂的检测灵敏度(λ_c)均在0.5 λ ~2.0 λ 范围内,均符合2010年版《中国药典》规定,结果见表1(表中“+”表示凝胶形成,即反应为阳性;“-”表示凝胶未形成,即反应为阴性。以下各表同)。

表1 鲎试剂灵敏度复核结果

Tab 1 Results of TAL sensitivity recheck

鲎试剂批号	内毒素浓度, EU/ml					λ_c , EU/ml	λ_s , EU/ml
	0.50	0.25	0.125	0.0625	0.03		
1212282(湛江)	++++	++++	----	----		0.25	0.25
1301642(湛江)	++++	++++	----	----		0.25	0.25
11082712(福州)	++++	++++	----	----		0.25	0.25
12071212(福州)	++++	++++	----	----		0.25	0.25
1212262(湛江)		++++	++++	----	----	0.125	0.125
1301281(湛江)		++++	++++	----	----	0.125	0.125
12030711(福州)		++++	++++	----	----	0.125	0.125
12061312(福州)		++++	++++	----	----	0.125	0.15

*药师。研究方向:医院药学。电话:0573-82851464。E-mail: phyangling@163.com

2.2 丹皮酚磺酸钠注射液细菌内毒素限值(L)的确定

丹皮酚磺酸钠注射液的临床用法用量是每次0.1~0.2 g,每日1~2次^[6],故临床使用最大剂量为每日0.4 g。根据2010年版《中国药典》(二部)附录收录的L^[9]的确定可知: $L=K/M$ 。K为人每千克体质量每小时可接受的最大内毒素剂量,注射剂的K值为5 EU/(kg·h);M为人每千克体质量每小时的最大供试品剂量,人均体质量按60 kg、滴注时间按1 h计算,则 $M=400/60=6.67 \text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{h})$ 。所以 $L=0.75 \text{ EU}/\text{mg}$ 。

2.3 确定供试品最大有效稀释倍数(MVD)

根据公式 $MVD=cL/\lambda$,c为供试品溶液的质量浓度,L为供试品细菌内毒素的限值, λ 为在凝胶法中鲎试剂的标示灵敏度(选取灵敏度为0.25 EU/ml的鲎试剂)。根据药品说明书^[7],丹皮酚磺酸钠注射液的c为50 mg/ml,则本品的 $MVD=50\times 0.75/0.25=150$ 。由此可知,供试品可在稀释倍数小于150的情况下进行内毒素的检查。

2.4 供试品干扰预试验

取3个批次丹皮酚磺酸钠注射液用BET水将供试品分别稀释10、30、60、90、120、150倍后得质量浓度为5.00、1.67、0.83、0.56、0.42、0.33 mg/ml的溶液,将此系列溶液标记为NPC;同法另配制一组含2 λ 即0.50 EU/ml内毒素的上述质量浓度溶液,作为供试品阳性对照溶液,记为PPC;每个质量浓度平行试验2管。再用2 λ 即0.50 EU/ml的内毒素溶液配制1个阳性对照,记为PC;用BET水配制1个阴性对照,记为NC;用2个厂家的灵敏度为0.25 EU/ml鲎试剂进行干扰预试验,结果见表2。

表2 供试品干扰预试验结果

Tab 2 Results of preliminary interference test of samples

批号	系列	供试品质量浓度,mg/ml						PC	NC	
		5.00	1.67	0.83	0.56	0.42	0.33			
1212282 (湛江)	120101	NPC	--	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	--	++	++	++	++		
	120901	NPC	--	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	--	++	++	++	++		
	130301	NPC	--	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	--	++	++	++	++		
1301642 (湛江)	120101	NPC	--	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	--	++	++	++	++		
	120901	NPC	--	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	--	++	++	++	++		
	130301	NPC	--	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	--	++	++	++	++		
11082712 (福州)	120101	NPC	--	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	--	++	++	++	++		
	120901	NPC	--	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	--	++	++	++	++		
	130301	NPC	--	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	--	++	++	++	++		
12071212 (福州)	120101	NPC	--	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	--	++	++	++	++		
	120901	NPC	--	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	--	++	++	++	++		
	130301	NPC	--	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	--	++	++	++	++		

由表2可知,丹皮酚磺酸钠注射液质量浓度在 $\leq 0.83 \text{ mg}/\text{ml}$ 时对2个厂家的鲎试剂均未见干扰作用。

2.5 供试品干扰试验

根据预试验结果,为了进一步确认供试品在0.83 mg/ml质量浓度下对鲎试剂无干扰作用,取CSE用BET水将其稀释成2 λ 、1 λ 、0.5 λ 、0.25 λ ,即0.50、0.25、0.125、0.0625 EU/ml的内毒素溶液;取3个批次的供试品原液用BET水将其稀释至0.83 mg/ml(60倍),再用此稀释液将内毒素标准品稀释成2 λ 、1 λ 、0.5 λ 、0.25 λ 4个浓度的含供试品溶液,每一质量浓度均平行做4管。BET水作阴性对照(NC),平行做2管。用2个厂家灵敏度为0.25 EU/ml的鲎试剂按2010年版《中国药典》(二部)附录中细菌内毒素检查法^[9]进行干扰试验。通过试验结果计算 E_s 和 E_t : $E_s=\lg^{-1}(\sum X_s/4)$ 、 $E_t=\lg^{-1}(\sum X_t/4)$ (E_s 为用BET水制成的细菌内毒素标准溶液反应终点浓度的几何平均值; E_t 为用供试品溶液制成的内毒素标准溶液反应终点浓度的几何平均值),结果见表3。

表3 供试品干扰试验结果

Tab 3 Results of interference test of samples

批号	供试品	内毒素浓度,EU/ml				NC	E_s, E_t , EU/ml	E_t/E_s
		0.50	0.25	0.125	0.0625			
1212282 (湛江)	BET水	++++	++++	----	----	--	$E_s=0.25$	
	120101	++++	++++	----	----	--	$E_t=0.21$	1.2
	120901	++++	++++	----	----	--	$E_s=0.25$	1.0
	130301	++++	++++	----	----	--	$E_t=0.25$	1.0
1301642 (湛江)	BET水	++++	++++	----	----	--	$E_s=0.25$	
	120101	++++	++++	----	----	--	$E_t=0.21$	1.2
	120901	++++	++++	----	----	--	$E_s=0.25$	1.0
	130301	++++	++++	----	----	--	$E_t=0.25$	1.0
11082712 (福州)	BET水	++++	++++	----	----	--	$E_s=0.25$	
	120101	++++	++++	----	----	--	$E_t=0.21$	1.2
	120901	++++	++++	----	----	--	$E_s=0.25$	1.0
	130301	++++	++++	----	----	--	$E_t=0.25$	1.0
12071212 (福州)	BET水	++++	++++	----	----	--	$E_s=0.25$	
	120101	++++	++++	----	----	--	$E_t=0.25$	1.0
	120901	++++	++++	----	----	--	$E_s=0.25$	1.0
	130301	++++	++++	----	----	--	$E_t=0.25$	1.0

表3结果表明, E_s 在2 $\lambda \sim 0.5 \lambda$ 之间,且 E_t 在0.5 $E_s \sim 2 E_s$ 之间,表明0.83 mg/ml的供试品溶液对2个厂家的鲎试剂均未见干扰作用,可用于细菌内毒素检查。

2.6 供试品细菌内毒素检测结果

取3个批次的丹皮酚磺酸钠注射液制成供试品溶液(质量浓度为50 mg/ml),用BET水稀释到0.83 mg/ml(60倍),使用2个不同厂家灵敏度为0.25 EU/ml的鲎试剂,根据细菌内毒素检查法,按照要求做阳性对照(PPC,PC)、阴性对照(NPC,NC),各做2个平行对照管,结果见表4。

由表4可知,阳性对照管(PPC,PC)均为阳性,阴性对照管(NPC,NC)均为阴性,表明试验有效,由此表明3个批次的丹皮酚磺酸钠注射液细菌内毒素均符合规定。

3 讨论

细菌内毒素检查法是通过鲎试剂与细菌内毒素间产生凝聚反应以判断供试品中细菌内毒素是否符合规定的一种方法,其具有操作简单、检测周期短、灵敏度高、结果准确等优点^[8]。其中,进行供试品预干扰试验目的是评价供试品浓度对鲎试剂与内毒素凝集的反应的干扰程度及干扰性质,由试验结果可得出对检查无干扰的供试品浓度,以减少后续试验的盲目性^[9]。由于不同厂家的鲎试剂生产工艺不同,其质量参

抗抑郁药物作用靶点的研究进展^Δ

曹莉莎^{1*}, 叶云¹, 罗文², 王继生^{2#} (1. 泸州医学院药学院, 四川 泸州 646000; 2. 绵阳市第三人民医院, 四川 绵阳 621000)

中图分类号 R964; R971⁺.43 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)13-1227-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.13.27

摘要 目的: 介绍抗抑郁药物作用靶点的研究进展, 为新型抗抑郁药物的研发方向提供借鉴。方法: 以“抑郁症”“抗抑郁药物”“抗抑郁药物作用靶点”“抗抑郁药物研究进展”等为关键词, 在PubMed、中国期刊全文数据库等检索源中检索相关文献, 筛选2003—2013年有效文献对抗抑郁药物作用靶点进行综述。结果与结论: 抗抑郁药物目前主要的作用靶点有单胺类受体、非单胺类受体、神经肽受体和激素系统等。其中单胺类受体中包括多重摄取抑制剂、5-羟色胺受体; 非单胺类受体中包括乙酰胆碱受体、 γ -氨基丁酸受体、谷氨酸受体、组胺受体; 神经肽受体中包括孤啡肽受体、神经激肽受体、 σ 受体; 激素系统中包括下丘脑-垂体-肾上腺轴、雌激素、褪黑素; 另外还包括新发现的脑源性神经营养因子、细胞因子等。针对上述靶点研制新型抗抑郁药物将是研发的新方向。
关键词 抗抑郁药物; 作用靶点; 研究进展

抑郁症是临床常见的精神障碍性疾病, 全球范围内复发率、自杀率和致残率较高, 2020年将可能成为全球范围内重要的致死因素之一^[1]。目前对于抑郁症发病机制尚不完全清楚, 仅仅知道其与大脑某些区域及其神经递质有关^[2]。因此, 深入阐明抑郁症发病机制, 寻找有效治疗抑郁的药物具有十分重

要的意义。近年来, 随着对抑郁症研究的深入, 研究者发现了大量的抗抑郁治疗的新靶点, 包括单胺类受体、非单胺类受体、神经肽受体和激素系统。为了使抗抑郁治疗更安全、有效、经济, 本文从抗抑郁药物治疗靶点的角度, 介绍了目前新型抗抑郁药物的研发方向。

表4 供试品细菌内毒素检查结果

Tab 4 Results of bacterial endotoxins test of samples

批号		供试品质量浓度, mg/ml	NPC	PPC	PC	NC
鲎试剂	供试品					
1212282 (湛江)	120101	0.83	--	++	++	--
	120901	0.83	--	++	++	--
	130301	0.83	--	++	++	--
1301642 (湛江)	120101	0.83	--	++	++	--
	120901	0.83	--	++	++	--
	130301	0.83	--	++	++	--
11082712 (福州)	120101	0.83	--	++	++	--
	120901	0.83	--	++	++	--
	130301	0.83	--	++	++	--
12071212 (福州)	120101	0.83	--	++	++	--
	120901	0.83	--	++	++	--
	130301	0.83	--	++	++	--

数、抗干扰能力等方面也会有一定的差异, 故本试验选择不同厂家相同灵敏度的鲎试剂进行反应, 可对试验结果进行对比^[10]。

综上所述, 笔者通过使用2个不同厂家的鲎试剂, 取3个批次的丹皮酚磺酸钠注射液, 按照2010年版《中国药典》(二部)附录中细菌内毒素检查法进行试验研究, 得出结论为丹皮酚磺酸钠注射液稀释至质量浓度0.83 mg/ml及以下时不干扰细菌内毒素检查。由此表明丹皮酚磺酸钠注射液采用细菌内毒

素检查法中凝胶法进行内毒素检查是切实可行的, 细菌内毒素法可替代家兔法用于丹皮酚磺酸钠注射液的热原检查。

参考文献

- [1] 杨正生, 彭振辉, 姚青海, 等. 丹皮酚的药理作用研究进展[J]. 中国药物与临床, 2011, 11(5): 545.
- [2] 湛曦, 黄传兵, 张皖东, 等. 四妙散加减合丹皮酚磺酸钠治疗急性痛风性关节炎临床研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2011, 18(4): 67.
- [3] 冯旌, 潘爱梅, 沈飞, 等. 丹皮酚磺酸钠注射液的含量测定[J]. 中国医药指南, 2011, 9(6): 194.
- [4] 厉青, 陈娟红, 陆金花. 注射用丁二磺酸腺苷蛋氨酸内毒素检查方法的建立[J]. 中国药房, 2013, 24(25): 2 376.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 二部[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录XIE、XIXM.
- [6] 丁选胜. 中药注射剂安全应用手册[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 500.
- [7] 金陵药业股份有限公司南京金陵制药厂. 丹皮酚磺酸钠注射液说明书[S]. 2007-03-22.
- [8] 周梅, 武谷. 注射用盐酸吉西他滨细菌内毒素检查方法的研究[J]. 中国药房, 2013, 24(1): 77.
- [9] 陈琪, 许姿敏. 注射用盐酸胺碘酮细菌内毒素检查法研究[J]. 中国当代医药, 2013, 20(8): 73.
- [10] 汪伟. 注射用丹参多酚酸盐细菌内毒素检查[J]. 中国药师, 2012, 15(5): 687.

(收稿日期: 2013-06-24 修回日期: 2013-09-25)

^Δ 基金项目: 四川省卫生厅2012年科研课题(No.120320)

* 药师, 硕士。研究方向: 神经药理学和蛋白质组学。E-mail: 28571439@qq.com

通信作者: 副主任药师, 博士。研究方向: 神经药理学和蛋白质组学。电话: 0816-2992950。E-mail: 24475434@qq.com