doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2021.03.013

二氯甲烷萃取法检测帕莫酸多奈哌齐中细菌内毒素

赵武群[1],赵云蓝[1,2],付 强[1△],张家艾[1],孙建国[2]

(1. 浙江华海药业股份有限公司,浙江 台州 317000; 2. 中国药科大学药物科学研究院,江苏 南京 210009)

摘要:目的 建立测定帕莫酸多奈哌齐难溶性长效注射用粉末中细菌内毒素的二氯甲烷萃取法。**方法** 采用凝胶法,用二氯甲烷完全溶解帕莫酸多奈哌齐粉末,再用细菌内毒素检查用水萃取细菌内毒素。**结果** 细菌内毒素检查用水可有效提取二氯甲烷中的细菌内毒素,方法验证结果符合 2015 年版《中国药典(四部)》相关要求。**结论** 以二氯甲烷为溶剂,可通过细菌内毒素检查法对帕莫酸多奈哌齐注射剂进行质量控制,操作简便,抗干扰能力强。

关键词:难溶性粉末;细菌内毒素;二氯甲烷;萃取法;干扰试验;分配系数

中图分类号:R971;R917 **文献标志码:**A **文章编号:**1006－4931(2021)03－0045－05

Detection of Bacterial Endotoxin in Donepezil Pamoate by Dichloromethane Extraction

ZHAO Wuqun[1], ZHAO Yunlan[1,2], FU Qiang[1], ZHANG Jia'ai[1], SUN Jianguo[2]

(1. Zhejiang Huahai Pharmaceutical Co., Ltd., Taizhou, Zhejiang, China 317000; 2. School of Pharmaceutical Sciences, Pharmaceutical University, Nanjing, Jiangsu, China 210009)

Abstract: Objective To establish a dichloromethane extraction method for the detection of bacterial endotoxin in Donepezil Pamoate Insoluble Long－Acting Powder for Injection. **Methods** The donepezil palmate powder was dissolved with saturated dichloromethane, the bacterial endotoxin was extracted by bacterial endotoxin test water(WBET) and was determined by gel－clot method. **Results** The bacterial endotoxin in dichloromethane was well extracted with WBET, the method validation results complied with the requirements of *Chinese Pharmacopoeia*(2015 edition, volume Ⅳ). **Conclusion** The quality control of Pamoate Donepezil Injection can be carried out by bacterial endotoxin test with dichloromethane as solvent. The method is simple and its anti－interference ability is strong.

Key words: insoluble powder; bacterial endotoxin; dichloromethane; extraction method; interference test; distribution coefficient

多奈哌齐片是一种可逆性中枢乙酰胆碱酯酶抑制药物,一般日服 1 次,每个疗程为 3～6 个月[1－2],主要用于阿尔茨海默病的长期治疗[3]。将多奈哌齐与帕莫酸成盐,开发成难溶性长效注射剂,可有效解决服药频率高、服药困难等问题[4]。细菌内毒素是革兰阴性菌细胞壁的产物,若大量进入血液会引发热原反应,严重者可导致休克甚至死亡[5],故应严格控制注射剂产品中的细菌内毒素。帕莫酸多奈哌齐粉末难溶于水,细菌内毒素检查用水(BET 用水)不能完全释放药物粉末中包裹的细菌内毒素。曾有报道,采用二甲基亚砜(DMSO)[6]、无水乙醇[7－8]、甘露醇[9]等与水互溶的溶剂溶解难溶性药物并提取其中的细菌内毒素。用 BET 用水进一步稀释 DMSO 等溶剂时,已溶解的难溶性粉末会再次析出,存在包裹细菌内毒素的风险,造成假阴性干扰。本研究中以二氯甲烷为溶剂,通过细菌内毒素检查法对帕莫酸多奈哌齐注射剂进行质量控制,操作简便,抗干扰能力强。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

TAL－40 D 型试管恒温仪(湛江安度斯生物有限公司);XS 105 DU 型电子天平(梅特勒－托利多国际有限公司,精度为十万分之一);Research plus 型移液枪(艾本德<中国>有限公司);H1850R 型台式高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);试验所用玻璃器皿均采用无菌注射用水清洗,250 ℃烘烤 1 h,除去外源性内毒素和其他干扰物质。

1.2 试药

帕莫酸多奈哌齐粉末(实验室自制,批号分别为 17001,17002,18001,规格为每瓶 255.4 mg);细菌内毒素工作标准品－2(中国食品药品检定研究院,批号为 150601－201987,效价为 80 EU/支);细菌内毒素工作标准品－1(批号为 EX 72123,效价为 20 EU/mL),鲎试剂－1(批号为 J 4811 X,灵敏度为 0.062 5 EU/mL,规格为每瓶 1.2 mL),均购自 Charles River Endosafe;鲎试剂－2(批号为 1908122,灵敏度为 0.062 5 EU/mL,规格为每支 0.1 mL),BET 用水(批号为 1909040,规格为每瓶 50 mL),均购自湛江安度斯生物有限公司;二氯甲烷(西陇科学股份有限公司,批号为 180321,规格为每瓶 500 mL)。

2 方法与结果

2.1 细菌内毒素限值(*L*)和稀释倍数的确定

根据 2015 年版《中国药典(四部)》通则 1143 细菌

第一作者:赵武群,男,硕士研究生,助理工程师,研究方向为无菌制剂质量控制,(电子信箱)2435304076@qq.com。

△**通信作者:**付强,男,博士研究生,中级工程师,研究方向为药物分析,(电子信箱)875038973@qq.com。

内毒素检查法[10]，按公式 $L = K/M$ 计算。式中，K 为人每千克体质量每小时最大可接受的细菌内毒素剂量，注射剂按 5 EU/(kg·h)计算；M 为人用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 计算。

帕莫酸多奈哌齐为长效肌肉注射剂，暂定每月注射1次，最大剂量为每次 446.2 mg，相当于每日服用 10 mg 盐酸多奈哌齐片[11]。假定每次注射后，所有细菌内毒素在 1 h 内可完全释放，其细菌内毒素限度值(L) = K/M。其中，K 为 5 EU/(kg·h)；M 为 446.2 mg；人均体质量以60 kg 计，注射时间不足 1 h，按 1 h 计。结果 L 为 0.67 EU/mg。综合考虑用药安全和临床剂量调整，研究过程中将 L 降至 0.19 EU/mg。

本研究中采用的鲎试剂灵敏度(λ)为 0.0625 EU/mL，当 L 为 0.19 EU/mg 时，根据公式 $C = \lambda/L$ 计算，帕莫酸多奈哌齐最小有效稀释质量浓度为 0.33 mg/mL；根据质量浓度为 21.12 mg/mL 的供试品母液计算最大有效稀释倍数为 64 倍。

2.2 鲎试剂灵敏度复核

根据 2015 年版《中国药典(四部)》通则 1143 细菌内毒素检查法复核鲎试剂标示灵敏度[10]。结果显示，鲎试剂－1 与鲎试剂－2 的灵敏度(λc)分别为 0.5λ 和 1λ，在[0.5λ，2λ]范围内，符合药典规定。因此，本试验中的鲎试剂灵敏度均符合要求。

2.3 溶剂筛选

细菌内毒素检查法测定细菌内毒素，通常需在水溶液中进行。开发粉末样品的凝胶法细菌内毒素测定方法时，优选 BET 用水溶解供试品。不能溶于 BET 用水的样品，需首先筛选适当的溶剂溶解粉末样品，以完全释放其中的细菌内毒素，再使用 BET 用水稀释，以消除有机溶剂的干扰[12]。

帕莫酸多奈哌齐粉末不溶于水，易溶于 DMSO 和二氯甲烷等有机溶剂。当选择 DMSO 溶解帕莫酸多奈哌齐粉末时，需使用 BET 用水稀释 16 倍以上才可消除 DMSO 的干扰。稀释过程中，帕莫酸多奈哌齐析出的同时可能包裹部分细菌内毒素，导致供试品阳性对照(PPC)组出现假阴性。

帕莫酸多奈哌齐在二氯甲烷中的饱和溶解度为 26 mg/mL，且二氯甲烷与水混合分层，可有效避免样品析出与内毒素包裹问题，故选择二氯甲烷作为溶剂，进一步优化。为确保帕莫酸多奈哌齐粉末能充分溶解，选择质量浓度为 21.12 mg/mL。

2.4 细菌内毒素分配系数测定

细菌内毒素的主要成分为脂多糖，是一类具有亲水性多聚糖链和疏水性脂肪酸尾部的两亲性物质。在互不相容的两相溶剂中，可能会有部分溶解于二氯甲烷，故需考察细菌内毒素在二氯甲烷与 BET 用水中的分配系数，确定细菌内毒素稀释体积的计算方式。

取二氯甲烷 1 mL，加入 1 mL 20 EU/mL(即 320λ)细菌内毒素工作标准溶液，涡旋后离心，取水相分别稀释成 160，320，640，1 280 倍系列浓度的溶液进行内毒素含量测定。结果见表 1。水相中检测出的 λt 值与 λs 值一致，均为 0.5λ，内毒素回收率为 100.00%，表明细菌内毒素几乎全部分布于水层。

表 1 细菌内毒素分配系数试验结果(鲎试剂－1，批号为 J4811X，n = 2)

Tab. 1 The distribution coefficient of bacterial endotoxin(limulus amebocyte lysate－1, batch number: J4811X, n = 2)

系列	稀释倍数(倍)				λs	λt
	160	320	640	1 280		
320λ细菌内毒素	＋＋	＋＋	＋＋	－－	0.5λ	
水相	＋＋	＋＋	＋＋	－－		0.5λ
二氯甲烷相	－－					

注：“－”为阴性，代表未形成凝胶或形成凝胶但倒置脱落；“＋”为阳性，代表形成凝胶且倒置不脱落。下表同。

Note: "－" means negative, which indicates that no gel formed or gel formed, but it is inverted; "＋" means positive, which indicates gel formed and does not fall off; as well as the following tables.

同时，取二氯甲烷相，加入相同体积的 BET 用水进行二次萃取，离心，取上层溶液直接进行检测。结果显示，二氯甲烷中未检出细菌内毒素。

分别取 2λ，1λ，0.5λ，0.25λ 细菌内毒素标准溶液 1 mL，各加入 1 mL 二氯甲烷，涡旋后离心，直接取水相进行检测，作为对照组。详见表 2。结果对照组的 λt 值为 1λ。可见，经二次萃取的二氯甲烷中细菌内毒素含量小于 1λ，即细菌内毒素在二氯甲烷与 BET 用水中的分配系数小于 1/320。因此，可采用二氯甲烷溶解难溶性粉末，BET 用水萃取的方法进行后续试验，细菌内毒素浓度仅计算水相体积。

表 2 对照组试验结果(鲎试剂－1，批号为 J4811X，n = 2)

Tab. 2 Results of the control group(limulus amebocyte lysate－1, batch number: J4811X, n = 2)

组别	稀释倍数				λs	λt
	2λ	1λ	0.5λ	0.25λ		
阴性对照(PC)组	＋＋	＋＋	＋＋	－－	0.5λ	
对照组	＋＋	＋＋	－－	－－		1λ

2.5 二氯甲烷干扰试验

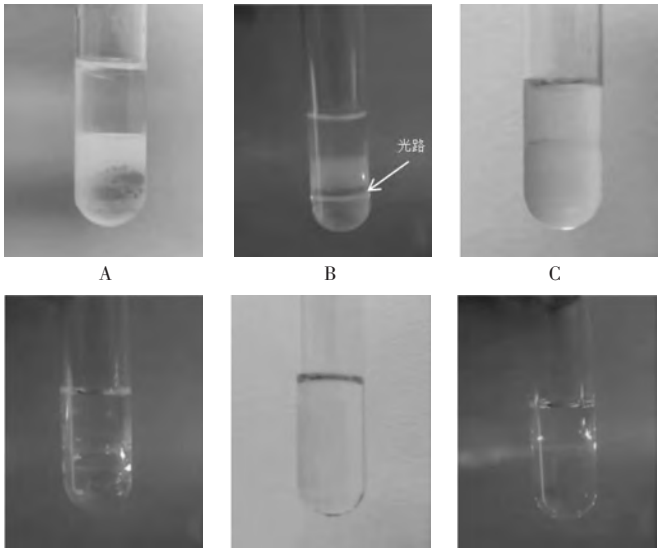
2.5.1 二氯甲烷的影响

二氯甲烷在水中微溶，取二氯甲烷适量，加入等体积 BET 用水，涡旋混匀后，静置取水相，分别与等体积 4λ，2λ，1λ，0.5λ 的细菌内毒素标准溶液混匀，作为试验组，进行细菌内毒素检测，评估水中溶解的二氯甲烷

对细菌内毒素凝集反应的干扰。结果显示，试验组与 PC 组结果完全一致，λt 和 λs 均为 0.5 λ，表明 BET 水中溶解的微量二氯甲烷对鲎试剂凝集无干扰。

2.5.2 两相分配的影响

取 1 mL 二氯甲烷和 1 mL 2 λ 细菌内毒素工作标准溶液混合，涡旋 30 s，使用红色激光照在暗处，观察涡旋混匀前后溶液现象。详见图 1。表明两亲性的细菌内毒素分子可能会导致二氯甲烷层形成胶束。



A. 涡旋后，二氯甲烷层变为乳白色 B. 激光照射时，二氯甲烷层显示有丁铎尔效应 C. 涡旋后，以 6 000 r/min 离心 5 min，二氯甲烷层变澄清 D. 二氯甲烷层丁铎尔效应减弱 E. 二氯甲烷作对照 F. 二氯甲烷溶液激光照射未出现丁铎尔效应

图 1 激光照射图像

A. After the vortex, the dichloromethane layer became milky white B. There was a Tyndall effect of dichloromethane when the laser irradiated C. The solution after vortex was centrifuged at 6 000 r/min for 5 min, and the dichloromethane layer became clear D. The Tyndall effect of dichloromethane was weakened E. Dichloromethane was taken as reference F. There was no Tyndall effect of dichloromethane when the laser irradiated

Fig. 1 Image of laser irradiation

为进一步评估分配过程对细菌内毒素效价的影响，通过对 BET 用水饱和的二氯甲烷进行干扰预试验，确定离心后二氯甲烷不干扰鲎试剂凝集反应的最小稀释倍数，再选择合适的稀释倍数进行内毒素检测。

分别取 4 λ，2 λ，1 λ，0.5 λ 细菌内毒素标准溶液适量，加入 1 倍体积二氯甲烷作为供试品贮备液，涡旋后离心，取水相稀释 2 倍制备供试液；按同样方法，分别取水相稀释 4，8，16，32，64 倍，作为二氯甲烷 PPC 组供试液。同时制备不含细菌内毒素标准品的供试液，作为二氯甲烷供试品阴性对照（NPC）组供试液，每个浓度平行 2 管，进行内毒素检测。结果见表 3。可见，离心后需将水相稀释至 8 倍以上才可完全消除二氯甲烷的干扰。为了进一步提升方法的可靠性，选择 32 倍稀释倍数。

表 3 二氯甲烷干扰试验结果（鲎试剂 -1，批号为 J4811X，n = 2）

Tab. 3 Interference test results of dichloromethane (limulus amebocyte lysate - 1, batch number: J4811X, n = 2)

终点稀释倍数	细菌内毒素浓度				NC	λs	λt
	2 λ	1 λ	0.5 λ	0.25 λ			
PC	+ +	+ +	+ +	- -		0.5 λ	
2	+ +	- -	- -	- -	- -		2 λ
4	+ +	+ +	- -	- -			1 λ
8	+ +	+ +	+ +	- -			0.5 λ
16	+ +	+ +	+ +	- -			0.5 λ
32	+ +	+ +	+ +	- -			0.5 λ
64	+ +	+ +	+ +	- -			0.5 λ

2.6 干扰预试验

取适量供试品母液，加入 1 倍体积的 BET 用水，涡旋后离心，取水相适量，分别用 BET 用水稀释 8，16，32，64 倍，即得 NPC 组溶液；同时用不同稀释倍数的供试品溶液将细菌内毒素稀释成含 2 λ 细菌内毒素标准品的 PPC 组溶液；并配制含 2 λ 细菌内毒素标准品的 PC 组溶液；BET 用水为阴性对照（NC）组溶液；按同样方法配制二氯甲烷 NPC 组溶液，含 2 λ 细菌内毒素标准品的二氯甲烷供试品阴性对照（PPC）组溶液。结果见表 4。

表 4 供试品干扰预试验结果（鲎试剂 -1，批号为 J4811X，n = 2）

Tab. 4 Pre-interference test results of test samples (limulus amebocyte lysate - 1, batch number: J4811X, n = 2)

供试品批号	系列	终点稀释倍数				PC	NC
		8 倍	16 倍	32 倍	64 倍		
17001	NPC	- -	- -	- -	- -	+ +	- -
	PPC	+ +	+ +	+ +	+ +		
	二氯甲烷 NPC	- -	- -	- -	- -		
	二氯甲烷 PPC	+ +	+ +	+ +	+ +		

由干扰预试验结果可知，PC 组均为阳性，NC 组均为阴性，表明鲎试剂灵敏度符合要求，试验有效。二氯甲烷 PPC 组均为阳性，二氯甲烷 NPC 组均为阴性，表明二氯甲烷不干扰鲎试剂凝集反应。PPC 组均为阳性，NPC 组均为阴性，表明采用二氯甲烷溶解供试品，BET 用水萃取后离心的方法，将分层后得到的水相稀释 8 倍以上对鲎试剂凝集反应无干扰作用。供试品干扰试验选择将水相稀释 32 倍进行试验，相当于 0.66 mg/mL 作为供试品溶液稀释质量浓度。

2.7 干扰试验

取 3 批供试品，按 2.6 项下方法，选择终点稀释倍数 32 倍配制各组供试液（详见表 5），供试品溶液最终稀释质量浓度相当于 0.66 mg/mL。根据 2015 年版《中国药典（四部）》通则细菌内毒素检查法使用 2 个厂家的鲎试剂对 3 批供试品进行干扰试验。试验结果见表 6。

干扰试验结果表明，NC 组均为阴性，PC 组与 3 批

表5 各组供试液配制方法

Tab. 5 Preparation method of test solution for each group

组别	贮备液	溶液稀释	供试液
NPC	1 mL供试品母液+1 mL BET用水,6 000 r/min离心5 min	取水相,BET用水稀释32倍	供试品溶液
PPC	1 mL供试品母液+1 mL 64 λ,32 λ,16 λ,8 λ细菌内毒素标准溶液,6 000 r/min离心5 min	取水相,BET用水稀释32倍	含2 λ,1 λ,0.5 λ,0.25 λ细菌内毒素标准溶液的供试品阳性对照溶液
PC	细菌内毒素标准溶液	BET用水稀释	含2 λ,1 λ,0.5 λ,0.25 λ的细菌内毒素标准溶液的阳性对照溶液
NC	BET用水		阴性对照溶液
二氯甲烷NPC	1 mL二氯甲烷+1 mL BET用水,6 000 r/min离心5 min	取水相,BET用水稀释32倍	二氯甲烷阴性对照溶液
二氯甲烷PPC	1 mL二氯甲烷+1 mL 64 λ,32 λ,16 λ,8 λ细菌内毒素标准溶液,6 000 r/min离心5 min	取水相,BET用水稀释32倍	含2 λ,1 λ,0.5 λ,0.25 λ细菌内毒素标准溶液的二氯甲烷阳性对照溶液

表6 供试品干扰试验结果

Tab. 6 Interference test results of test samples

鲎试剂批号	供试品	细菌内毒素浓度				NC	NPC	二氯甲烷NPC	终点浓度
		2 λ	1 λ	0.5 λ	0.25 λ				
J4811X	PC(n=2)	++	++	++	−−	−−			0.5 λ
	17001(n=4)	++++	++++	++++	−−−−		−−−−		0.5 λ
	17002(n=4)	++++	++++	++++	−−−−		−−−−		0.5 λ
	18001(n=4)	++++	++++	++++	−−−−		−−−−		0.5 λ
	二氯甲烷PPC(n=4)	++++	++++	+++−	−−−−				0.6 λ
1908122	PC(n=2)	++	++	−−	−−	−−		−−−−	1 λ
	17001(n=4)	++++	++++	−−−−	−−−−		−−−−		1 λ
	17002(n=4)	++++	++−−	−−−−	−−−−		−−−−		1.4 λ
	18001(n=4)	++++	++++	−−−−	−−−−		−−−−		1 λ
	二氯甲烷PPC(n=4)	++++	−−−−	−−−−	−−−−			−−−−	2 λ

供试品PPC组均为阳性,说明鲎试剂灵敏度合格,试验有效;二氯甲烷NPC组均为阴性,二氯甲烷PPC组均为阳性,说明二氯甲烷质量符合要求,不干扰鲎试剂凝集反应;NPC组均为阴性,说明帕莫酸多奈哌齐中细菌内毒素未超过规定限度,质量符合药用要求。

2.8 拟订的内毒素检测方法

称取帕莫酸多奈哌齐粉末适量,加入二氯甲烷溶解,制成21.12 mg/mL的供试品母液。按表5所述,取1 mL供试品母液或二氯甲烷,与1 mL BET用水混合得贮备液,涡旋30 s,充分萃取二氯甲烷中的细菌内毒素,6 000 r/min离心5 min,使水相与二氯甲烷相分层;取水相进一步稀释,制备供试液。

取鲎试剂加样,在(37±1)℃的试管恒温仪中培养(60±2)min。试验结果"+"为阳性,代表形成凝胶且倒置不脱落;"−"为阴性,代表未形成凝胶或形成凝胶但倒置脱落。

当NPC组和NP组的所有平行管均为阴性时,按公式 $\lambda = \text{antilg}(\sum X/n)$计算细菌内毒素反应终点浓度的几何平均值。其中,λs为PC组反应终点浓度的几何平均值,λt为除PC组外的供试液反应终点浓度的几何平均值,X代表反应终点浓度的对数值。

3 讨论

细菌内毒素与鲎试剂的反应是一系列酶促反应,需要在水溶液中进行。帕莫酸多奈哌齐是一种难溶性药物,在水中难溶,导致其中包裹的细菌内毒素不能全部检出而无法有效控制注射剂中的细菌内毒素限度。难溶性液体中的细菌内毒素可直接用BET用水进行萃取检测,而难溶性固体需先选择合适的溶剂将其全部溶解,进一步处理后再检测。晏成倩等[12]报道,采用DMSO溶解难溶性原料药进行细菌内毒素检测。当采用DMSO等与水互溶的有机溶剂溶解帕莫酸多奈哌齐粉末时,由于加入BET用水后有药物析出,析出部分可能包裹一定量的细菌内毒素而导致出现假阴性干扰,故选用二氯甲烷作为溶剂进行细菌内毒素检测。

本研究中采用凝胶法检测细菌内毒素,首先考察细菌内毒素在二氯甲烷与BET用水中的分配系数,证明细菌内毒素主要分布于水相;考察二氯甲烷对鲎试剂凝集反应的干扰,结果表明,将离心后的水相稀释至8倍以上可消除溶剂干扰;供试品干扰试验中,将二氯甲烷稀释32倍不干扰鲎试剂凝集反应,表明本方法适用于帕莫酸多奈哌齐中细菌内毒素的控制。