

[参考文献]

- [1] 卢圣栋. 现代分子生物学试验技术[M]. 第2版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2001. 382-386.
- [2] Shimokawa N, Yamaguchi M. Molecular cloning and sequencing of the cDNA coding for a calcium-binding protein regucalcin from rat liver[J]. *FEBS Lett*, 1993, 327(3): 251-255.
- [3] Hamano T, Hanahisa Y, Yamaguchi M. Inhibitory effect of regucalcin on Ca^{2+} -dependent protein kinase activity in rat brain cytosol: involvement of endogenous regucalcin[J]. *Brain Res Bull*, 1999, 50(3): 187-192.
- [4] Shinya N, Kurota H. Calcium-binding protein regucalcin mRNA expression in the kidney cortex is suppressed by saline ingestion in rats[J]. *Mol Cell Biochem*, 1996, 162(2): 139-144.
- [5] Yamaguchi M, Ueoka S. Inhibitory effect of calcium-binding protein regucalcin on ribonucleic acid synthesis in isolated rat liver nuclei[J]. *Mol Cell Biochem*, 1997, 173(1-2): 169-175.
- [6] Fujita T, Shirasawa T, Maruyama N. Expression and structure of senescence marker protein-30 (SMP30) and its biological significance[J]. *Mech Ageing Dev*, 1999, 107(3): 271-280.
- [7] Li C, Liu J, Waalkes MP, et al. Gene array analysis of the hepatic response to endotoxin in glutathione peroxidase-deficient mice[J]. *Toxicol Lett*, 2003, 144(3): 397-406.
- [8] Linard A, Macaire J, Christon R. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase activity and vitamin E level in the liver microsomal membrane: effects of age and dietary α -linolenic acid deficiency[J]. *J Nutr Biochem*, 2001, 12(8): 481-491.

[收稿日期] 2003-11-24

[修回日期] 2004-02-27

[本文编辑] 尹 茶

· 实验研究 ·

顶空气相色谱法测定利扎曲普坦中有机溶剂残留量

Determination of solvent residues in rizatriptan by headspace gas chromatography

王 青¹, 朱 梅², 陈 斌², 邢旺兴²

(1. 解放军第85医院药剂科, 上海 200052; 2. 第二军医大学药学院有机化学教研室, 上海 200433)

[摘要] 目的: 测定利扎曲普坦中有机溶剂残留量。方法: 毛细管气相色谱柱顶空进样法, 氢火焰离子化检测器。以 Carbowax 20 M (25 m \times 0.32 mm \times 0.3 μ m) 聚硅氧烷为固定相, 载气为氮气, 柱前压 120 kPa, 柱温 33 $^{\circ}$ C, 顶空瓶区域温度 90 $^{\circ}$ C, 样品进样阀 100 $^{\circ}$ C, 传输管温度 100 $^{\circ}$ C, 样品瓶加热平衡时间 10 min, 瓶压 71 kPa, 进样量 100 μ l。结果: 正己烷、四氢呋喃、二氯甲烷、乙酸乙酯和乙醇质量与峰面积线性范围为 6.60~99.00、8.88~133.20、133.30~199.50、9.00~135.00、7.90~118.50 μ g, r 均大于 0.998; 平均回收率分别为 98.3%、103.3%、101.5%、96.2%、92.8%, RSD 分别为 3.57%、4.69%、7.42%、4.84%、3.26% ($n=5$)。结论: 本方法柱效高、灵敏、准确, 适用于利扎曲普坦中有机溶剂残留量测定。

[关键词] 利扎曲普坦; 顶空气相色谱法; 有机溶剂; 残留**[中图分类号]** R 917**[文献标识码]** B**[文章编号]** 0258-879X(2004)08-0898-02

药物中残留的有机溶剂是指在原料药或赋形剂的生产中, 以及在制剂制备过程中产生或使用的有机挥发性化合物。残留溶剂会增加药物的不良反应, 并且影响药物的稳定性, 在药物制备生产过程中要求尽可能除去所有的有机残留溶剂。利扎曲普坦 (rizatriptan) 是新一代治疗偏头痛的药物, 是继 sumatriptan、zolmitriptan、naratriptan 后上市的第 4 个曲坦类的抗偏头痛新药, 具有口服吸收快、起效快、不良反应小等优点^[1], 在其生产过程中使用了正己烷、二氯甲烷、四氢呋喃、乙酸乙酯和乙醇等 5 种有机溶剂^[2]。本文以《中华人民共和国药典(2000 版)》附录 VIII P^[3]为依据, 采用顶空气相色谱法对上述溶剂进行了定量分析的研究。

1 方法和结果

1.1 仪器和试剂 惠普 HP5890 气相色谱仪; Agilent 7694E 顶空进样器; 氢火焰离子化检测器; HP3365 数据处理仪。利扎曲普坦原料药 3 批(批号为 000605、000610、000616, 由本校药学院有机化学教研室合成); 正己烷、二氯甲烷、四氢呋喃、乙酸乙酯和乙醇均为分析纯(上海试剂一厂)。

1.2 色谱条件 色谱柱: HP-20 (Carbowax 20 M) 25 m \times

0.32 mm \times 0.3 μ m; 载气为氮气; 柱前压 120 kPa; 分流比为 5:1; 柱温为 33 $^{\circ}$ C, 进样口温度为 180 $^{\circ}$ C, 检测器温度为 250 $^{\circ}$ C; 顶空进样, 进样量: 100 μ l。

1.3 顶空进样器分析条件 顶空瓶区域温度: 90 $^{\circ}$ C; 样品进样阀: 100 $^{\circ}$ C, 传输管温度: 100 $^{\circ}$ C; 样品瓶加热平衡时间: 10 min; 瓶压: 71 kPa, 载气压: 11.5 kPa, 进样量 100 μ l。

1.4 线性范围及标准曲线测定 于 25 $^{\circ}$ C 温度下, 分别取正己烷、四氢呋喃、二氯甲烷、乙酸乙酯和乙醇适量, 精密称定, 用二次重蒸水分别配成浓度为 66.0、88.8、133.0、90.0 及 79.0 μ g/ml 的水溶液作为贮备液, 精密量取贮备液 0.1、0.5、0.75、1.00、1.25、1.50 ml, 再分别依次精密加入重蒸水 7.90、7.50、7.25、7.00、6.75、6.50 ml 封装于顶空样品瓶中配制成 1~6 号标准样品, 将上述标准溶液按浓度从低到高放置于顶空进样器中, 在 1.2 色谱条件下进行检测。以峰面积(Y)对每管中溶剂的质量(X, μ g)进行回归(表 1)。

[作者简介] 王 青(1967-), 男(汉族), 主管药师。

E-mail: imnpl@mailchina.com

表1 待测组分的线性范围及标准曲线

组分	线性范围(m/ μ g)	回归公式	r
正己烷	6.60-99.00	$Y=8.3151 \times 10^{-4}X+0.5994$	0.9983
四氢呋喃	8.88-133.20	$Y=7.1956 \times 10^{-4}X+1.3110$	0.9991
二氯甲烷	13.30-199.50	$Y=8.3669 \times 10^{-4}X+0.8141$	0.9989
乙酸乙酯	9.00-135.00	$Y=3.9870 \times 10^{-4}X+0.2480$	0.9992
乙醇	7.90-118.50	$Y=1.5471 \times 10^{-2}X+1.7411$	0.9995

1.5 精密度试验 以3号标准溶液连续重复进样5次,计算正己烷、四氢呋喃、二氯甲烷、乙酸乙酯和乙醇的RSD,分别为3.57%、4.69%、7.42%、4.84%和3.26% ($n=5$)。

1.6 最低检测限试验 按制药行业的要求取3倍噪声与灵敏度的比计算。正己烷、四氢呋喃、二氯甲烷、乙酸乙酯和乙醇的最低检测限分别为0.66、0.89、0.79、1.33和0.79 μ g。

1.7 样品测定 精密称取3批样品约200 mg,置于顶空瓶中,加双蒸水至总体积为8.0 ml,超声震荡3 min,封瓶后放置于顶空进样器中,按1.2色谱条件以外标法进行测试。样品色谱图见图1。结果见表2。

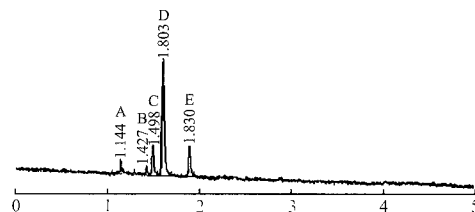


图1 样品(批号000610)色谱图

A:正己烷;B:四氢呋喃;C:二氯甲烷;
D:乙酸乙酯;E:乙醇

表2 样品测定结果

批号	$(n=3, \bar{x} \pm s, \times 10^{-6})$				
	正己烷	四氢呋喃	二氯甲烷	乙酸乙酯	乙醇
000605	14.10 \pm 0.53	20.22 \pm 0.79	29.68 \pm 1.25	13.76 \pm 0.43	32.42 \pm 1.17
000610	13.53 \pm 0.66	19.57 \pm 0.78	27.39 \pm 1.17	12.68 \pm 0.45	33.76 \pm 1.26
000616	15.49 \pm 0.61	19.33 \pm 0.81	28.56 \pm 1.26	12.73 \pm 0.42	31.85 \pm 1.12

1.8 回收率测定 采用标准加入法,精密称取000610号样品约200.00 mg,再精密加入贮备液1.0 ml,加重蒸水至8.0 ml,封装于顶空样品瓶中,超声振荡3 min,使样品充分混匀,按1.7样品测定项下分析。正己烷、四氢呋喃、二氯甲烷、乙酸乙酯和乙醇的回收率分别为98.3%、103.3%、101.5%、96.2%和92.8%。

2 讨论

在这5种有机溶剂中,四氢呋喃和二氯甲烷较难分离,试验了HP-1(100%甲基聚硅氧烷)柱25 m \times 0.32 mm \times 0.3 μ m和HP-5(5%苯基聚硅氧烷+95%甲基聚硅氧烷)柱25 m \times 0.32 mm \times 0.3 μ m都不能达到基线分离,最后选用HP-20(Carbowax 20 M)25 m \times 0.32 mm \times 0.3 μ m柱可以达到基线分离。

HP-20色谱柱使用说明书建议使用温度高于60 $^{\circ}$ C,在此温度下四氢呋喃和二氯甲烷不能达到基线分离,而在33 $^{\circ}$ C条件下,两者之间的分离度可以达到2.1,完全达到基线分离,因此采用33 $^{\circ}$ C。

采用顶空气相色谱法^[4]测定,使得样品前处理简便易行,并可防止在以样品溶液直接进样后样品对色谱系统带来的干扰和样品对进样口和色谱柱造成严重的污染^[5]。顶空进样进入色谱柱的样品实际上是顶空瓶中液上的气相部分,升高瓶温可使挥发性组分的蒸汽压增高,实际上顶空进样法并不要求瓶温达到被分析组分的沸腾温度以上,只要在工作温度下组分有一定的蒸汽压则该组分就能被检测。顶空瓶压一般应高于载气压力,此时瓶内的挥发性组分可通过高压驱动很迅速进入进样阀,同时高的瓶压还能抑制高沸点的大量溶

剂进入色谱柱。进样阀和样品传输管的温度只要略高于瓶温即可,可以防止来自于顶空瓶中的样品冷凝。根据药品注册的国际技术(ICH)^[6]的要求,正己烷、四氢呋喃、二氯甲烷、乙酸乙酯和乙醇的限量分别为 2.9×10^{-4} 、 5×10^{-3} 、 6×10^{-4} 、 5×10^{-3} 和 5×10^{-3} ,而本文采用的方法的最低检测限分别为 3.3×10^{-6} 、 4.45×10^{-6} 、 3.95×10^{-6} 、 6.65×10^{-6} 和 3.9×10^{-6} ,完全满足ICH的要求。

[参考文献]

- [1] Wellington K, Plosker GL. Rizatriptan: an update of its use in the management of migraine[J]. *Drugs*, 2002, 62(10): 1539-1574.
- [2] Street LJ, Baker R, Davey WB, et al. Synthesis and serotonergic activity of N, N-dimethyl-2-[5-(1, 2, 4-triazol-1-ylmethyl)-1H-indol-3-yl]ethylamine and analogues: potent agonists for 5-HT1D receptors[J]. *J Med Chem*, 1995, 38(10): 1799-1810.
- [3] 中华人民共和国药典委员会编. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京:化学工业出版社、北京人民卫生出版社, 2000. 附录VIII P(有机溶剂残留量的测定).
- [4] 朱梅, 万丽, 陈斌, 等. 顶空气相色谱法测定小鼠血液中乙醇的浓度[J]. *第二军医大学学报*, 2001, 22(11): 1047-1048.
- [5] 彭茗, 沈林妹, 方玮, 等. 枸橼酸托烷司琼中有机溶剂残留量的气相色谱法测定[J]. *中国医药工业杂志*, 2002, 33(8): 401-402.
- [6] ICH Topic Q3C Impurities: Residual solvents [EB/OL]. <http://www.emea.eu.int/pdfs/human/ich/028395en.pdf>, 2004-04-10

[收稿日期] 2004-04-26

[修回日期] 2004-06-02

[本文编辑] 尹茶