

- Pharm(中国现代应用药理学), 2014, 31(12): 1427-1431.
- [6] PONTRELLO C G, SUN M Y, LIN A, et al. Cofilin under control of  $\beta$ -arrestin-2 in NMDA-dependent dendritic spine plasticity, long-term depression (LTD) and learning [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(7): E442-E451.
- [7] LU J, GOULA D, SOUSA N, et al. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor mediation of glucocorticoid-induced apoptosis in hippocampal cells and the neuroprotective role of synaptic *N*-methyl-*D*-aspartate receptors [J]. Neuroscience, 2003, 121(1): 123-131.
- [8] WANG X P, HUANG Y J, WANG F, et al. Association of NMDAR, NR2A, and NR2B with cognitive impairment in diabetic patients [J]. J South Med Univ(南方医科大学学报), 2013, 33(12): 1848-1851.
- [9] DING J D, KENNEDY M B, WEINBERG R J. Subcellular organization of camkii in rat hippocampal pyramidal neurons [J]. J Comp Neurol, 2013, 521(15): 3570-3583.
- [10] ARAKI Y, ZENG M, ZHANG M, et al. Rapid dispersion of SynGAP from synaptic spines triggers AMPA receptor insertion and spine enlargement during LTP [J]. Neuron, 2015, 85(1): 173-189.
- [11] LISMAN J, YASUDA R, RAGHAVACHARI S. Mechanisms of CaMK II action in long-term potentiation [J]. Nat Rev Neurosci, 2012, 13(3): 169-182.
- [12] SCHMITT J M, GUIRE E S, SANEYOSHI T, et al. Calmodulin-dependent kinase/calmodulin kinase I activity gates extracellular-regulated kinase-dependent long-term potentiation [J]. J Neurosci, 2005, 25(5): 1281-1290.

收稿日期: 2015-12-28

## GC 同时测定利伐沙班原料药中 7 种有机溶剂残留

张悦, 李佩, 胡莉华, 许华容, 毕开顺, 李清\* (沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016)

**摘要:** 目的 建立以毛细管气相色谱法测定利伐沙班原料药中乙醇、二氯甲烷、四氢呋喃、三乙胺、吡啶、乙酸、*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF) 7 种有机溶剂残留量的方法。方法 采用 Agilent DB-624(30.0 m×0.32 mm, 1.8  $\mu$ m)毛细管柱, 载气为氮气, 采用氢火焰离子化检测器(FID), 进样口温度为 200  $^{\circ}$ C, 检测器温度为 240  $^{\circ}$ C, 柱温采用程序升温, 流速为 2.0 mL·min<sup>-1</sup>, 进样量 1  $\mu$ L。结果 无水乙醇、二氯甲烷、四氢呋喃、三乙胺、吡啶、乙酸、DMF 均能得到较好的分离, 呈现良好的线性关系, 平均回收率分别为 102.4%, 100.1%, 96.5%, 91.6%, 103.6%, 106.6%, 102.5%, RSD 均 <5.0%。结论 本方法简便、快速、准确性好、灵敏度高, 可用于利伐沙班原料药中残留溶剂的测定。

**关键词:** 毛细管气相色谱法; 利伐沙班; 乙酸; 三乙胺; 有机溶剂残留量

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2016)05-0525-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.05.002

### Simultaneously Determination of Residual Organic Solvents in Rivaroxaban Drug Substance by GC

ZHANG Yue, LI Pei, HU Lihua, XU Huarong, BI Kaishun, LI Qing\* (School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish a capillary GC method for the determination of residual organic solvents including alcohol, dichloromethane, tetrahydrofuran, triethylamine, pyridine, acetic acid, *N,N*-dimethylformamide (DMF) in rivaroxaban drug substance. **METHODS** This method utilized an Agilent DB-624 column(30 m×0.32 mm, 1.8  $\mu$ m), N<sub>2</sub> as carrier gas. FID was used as detector with the temperature of 240  $^{\circ}$ C, and the inlet temperature was 200  $^{\circ}$ C. This method used temperature program and the flow rate was 2.0 mL·min<sup>-1</sup>. The injection volume was 1  $\mu$ L. **RESULTS** The 7 residual organic solvents alcohol, dichloromethane, tetrahydrofuran, trimethylamine, pyridine, acetic acid, DMF were completely separated, the linear relationship was good, and the average recoveries were 102.4%, 100.1%, 96.5%, 91.6%, 103.6%, 106.6%, 102.5%, respectively, and the RSD were all <5.0%. **CONCLUSION** This method is simple, rapid, accurate and highly sensitive, which can be used for the determination of the residual organic solvents in rivaroxaban drug substance.

**KEY WORDS:** GC; rivaroxaban; acetic acid; triethylamine; residual organic solvents

利伐沙班, 化学名为 5-氯-氮-[(5*S*)-2-氧-3-[4-(3-氧-4-吗啉基)苯基]-1,3-唑烷-5-基]-2-噁吩-羧酰胺, 商品名为拜瑞妥, 是由拜耳医药保健

有限公司和强生公司联合研制的全球第 1 个口服直接 Xa 因子抑制剂。利伐沙班适用于预防老年患者髋关节置换术后深静脉血栓(deep vein

基金项目: “重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09301-012)

作者简介: 张悦, 女, 硕士生 Tel: 13889817029 E-mail: 1196250541@qq.com \*通信作者: 李清, 女, 博士, 教授, 博导 Tel: (024)23986296 E-mail: lqyxm@hotmail.com

thrombosis, DVT)和腰椎术后静脉血栓的形成<sup>[1-2]</sup>,对急性肺栓塞也有较好的治疗作用,不良反应少<sup>[3]</sup>。利伐沙班为口服制剂,不需像肝素定期去监测凝血指标或像低分子肝素去监测 Xa 因子,不花费额外的检查费用<sup>[4]</sup>;并且其药动学和药效学参数较少受性别、体质量或年龄的影响,较少发生与其他药物的相互作用,是一种比较理想的抗凝新药,让更多有适应症的患者得到方便、安全而有效的抗凝治疗<sup>[5]</sup>。但是关于利伐沙班残留溶剂的研究,目前未见国内外文献报道。利伐沙班的合成过程中使用了乙醇、二氯甲烷、四氢呋喃、三乙胺、吡啶、乙酸和 *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF),因此可能有上述 7 种有机溶剂残留,这 7 种溶剂会影响药物的稳定性并增加药物的毒性,对人体造成危害并污染环境,因而控制这 7 种溶剂残留量对保证利伐沙班的质量和用药安全具有重要意义。本实验根据中国药典 2015 年版四部通则<sup>[6]</sup>的相关规定,参照有关文献<sup>[7-11]</sup>,采用毛细管气相色谱法,以二甲基亚砜为溶解介质,同时测定利伐沙班中乙醇、二氯甲烷、四氢呋喃、三乙胺、吡啶、乙酸和 DMF 7 种残留溶剂的含量。

## 1 仪器与试剂

GC-6890 N 型气相色谱仪(美国 Agilent 公司);氢火焰离子化(FID)检测器,安捷伦色谱工作站(美国 Agilent 公司);BP210S 万分之一天平(德国 Sartorius)。

无水乙醇、三乙胺、乙酸和 DMF 均为色谱纯,均购自山东禹王实业有限公司;二氯甲烷(分析纯,天津市富宇精细化工有限公司);四氢呋喃、二甲基亚砜均为色谱纯,均购自天津市科密欧化学试剂有限公司;吡啶为分析纯,购自天津市博迪化工股份有限公司;利伐沙班原料药(某公司,批号:140401,140402,140501)。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

Agilent DB-624 色谱柱(30.0 m×0.32 mm, 1.8 μm);高纯氮载气;流速为 2.0 mL·min<sup>-1</sup>;分流比为 10:1;起始柱温为 60 °C,维持 1 min,再以 40 °C·min<sup>-1</sup>升温至 100 °C,再以 10 °C·min<sup>-1</sup>升温至 140 °C,再以 40 °C·min<sup>-1</sup>升温至 180 °C,维持 1 min;进样口温度为 200 °C,检测器温度为 240 °C;进样量为 1 μL。

### 2.2 溶液的制备

**2.2.1 内标溶液的制备** 取正庚烷约 0.1 g,精密称定,置 100 mL 量瓶中,加二甲基亚砜稀释至刻度,摇匀,作为内标储备溶液。

**2.2.2 对照品溶液的制备** 分别取无水乙醇、二氯甲烷、四氢呋喃、三乙胺、吡啶、乙酸、DMF, 500, 60, 72, 29, 20, 500, 88 mg, 精密称定,置于同一 100 mL 量瓶中,用二甲基亚砜溶解并稀释至刻度,得混合对照品储备液。

精密量取混合对照品储备液 1 mL,置 10 mL 量瓶中,精密加入内标储备液 1.0 mL,加二甲基亚砜定容,摇匀,作为对照品溶液。

**2.2.3 供试品溶液的制备** 取利伐沙班样品约 1.0 g,精密称定,置 10 mL 量瓶中,精密加入内标储备液 1.0 mL,加二甲基亚砜溶解并稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。

### 2.3 系统适用性试验

精确量取对照品溶液和供试品溶液各 1 μL,注入气相色谱中,记录色谱图,测定各有机溶剂的分离度及柱效。结果表明,以上各有机溶剂计算的理论板数均>5 000,相邻溶剂的分离度均符合要求,色谱图见图 1。

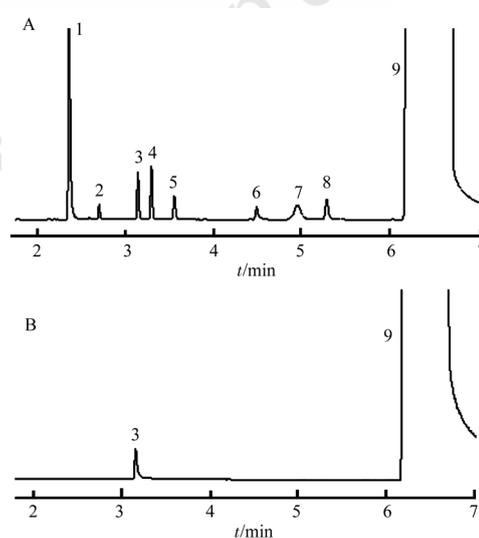


图 1 有机溶剂残留气相色谱图

A-对照品; B-样品; 1-无水乙醇; 2-二氯甲烷; 3-正庚烷(内标); 4-四氢呋喃; 5-三乙胺; 6-吡啶; 7-乙酸; 8-*N,N*-二甲基甲酰胺; 9-溶剂(二甲基亚砜)。

Fig. 1 GC chromatograms of residual organic solvents

A-control; B-sample; 1-alcohol; 2-dichloromethane; 3-*n*-heptane; 4-tetrahydrofuran; 5-triethylamine; 6-pyridine; 7-acetic acid; 8-*N,N*-dimethylformamide; 9-solvent (dimethyl sulfoxide).

### 2.4 专属性试验

取二甲基亚砜、内标溶液、对照品溶液和供

试品溶液,各进样 1  $\mu\text{L}$ ,由色谱图可知二甲基亚砜及内标溶液对无水乙醇、二氯甲烷、四氢呋喃、三乙胺、吡啶、乙酸和 DMF 的测定无干扰。无水乙醇、二氯甲烷、四氢呋喃、三乙胺、吡啶、乙酸和 DMF 的对照品溶液及溶剂二甲基亚砜在供试品溶液色谱图中,与内标溶液色谱峰相应位置处无干扰。结果表明方法专属性良好。

## 2.5 线性关系考察

精密量取对照品储备液 0.4, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中,再分别加入内标储备液 1.0 mL,加二甲基亚砜定容,摇匀,各配制 2 份。分别进样 1  $\mu\text{L}$ ,记录色谱图,以浓度( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )为横坐标,被测组分峰面积与内标峰面积的比值为纵坐标,计算待测组分的线性回归方程,结果见表 1。

表 1 线性范围及回归方程( $n=5$ )

Tab. 1 Linear ranges and regression equations of the organic solvents( $n=5$ )

溶剂种类	回归方程	$r$	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
无水乙醇	$y=10.49x+1.548$	$r=0.9917$	200.0~700.0
二氯甲烷	$y=3.459x+0.1083$	$r=0.9906$	24.08~84.30
四氢呋喃	$y=11.51x+0.4714$	$r=0.9901$	28.88~101.1
三乙胺	$y=14.54x+0.1895$	$r=0.9913$	11.76~41.20
吡啶	$y=17.16x+0.1225$	$r=0.9948$	8.160~28.60
乙酸	$y=3.345x-0.2404$	$r=0.9932$	200.0~700.0
DMF	$y=6.641x+0.2069$	$r=0.9902$	35.28~123.5

## 2.6 仪器精密性试验

精密量取对照品储备液 0.8, 1.0, 1.2 mL 各 3 份,作为 80%, 100%和 120%浓度溶液,再分别精密加入 1.0 mL 内标溶液,用二甲基亚砜稀释至刻度,摇匀,按“2.1”项下色谱条件进行分析,9 针中无水乙醇、二氯甲烷、四氢呋喃、三乙胺、吡啶、乙酸和 DMF 与内标峰面积比值的 RSD 分别为 4.2%, 3.9%, 4.3%, 4.7%, 3.8%, 4.2%, 4.8%, 均 $<5\%$ 。

## 2.7 回收率试验

取待测利伐沙班原料样品约 1.0 g,共 9 份,精密称定,置 10 mL 量瓶中,精密量取对照品储备液 0.8, 1.0, 1.2 mL 各 3 份,作为 80%, 100%和 120%供试品溶液,再分别精密加入 1.0 mL 内标溶液,用二甲基亚砜稀释至刻度,摇匀,按“2.1”项下色谱条件进行分析,按内标法计算各组分的回收率,无水乙醇、二氯甲烷、四氢呋喃、三乙胺、吡啶、乙酸和 DMF 的平均回收率分别为

102.4%, 100.1%, 96.5%, 91.6%, 103.6%, 106.6%, 102.5%, RSD 均 $<5.0\%$ 。

## 2.8 检测限和定量限

取对照品溶液,以逐级稀释法测定各对照品溶剂的检测限( $S/N=3$ )和定量限( $S/N=10$ ),实验结果表明,无水乙醇、二氯甲烷、四氢呋喃、三乙胺、吡啶、乙酸和 DMF 对照品溶剂的检测限分别为 0.416 7, 0.160 5, 0.024 1, 0.217 8, 0.108 8, 3.300, 0.089 1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。定量限分别为 1.250, 0.481 6, 0.072 2, 0.653 3, 0.326 4, 10.00, 0.267 3  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , RSD 分别为 3.3%, 4.1%, 3.0%, 4.3%, 3.1%, 4.5%, 3.7%( $n=6$ )。

## 2.9 耐用性考察

取待测利伐沙班原料样品约 1.0 g,精密称定,置 10 mL 量瓶中,精密量取混合对照品储备液 1.0 mL,再精密加入内标溶液 1.0 mL,加二甲基亚砜溶解并稀释至刻度,摇匀,作为利伐沙班的溶剂残留耐用性样品溶液。另取对照品溶液和空白溶液,进样量为 1  $\mu\text{L}$ 。分别考察不同厂家及批号的色谱柱,载气流速(1.8, 2.0, 2.2  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ),进样口温度(195, 200, 205  $^{\circ}\text{C}$ )和检测器温度(235, 240, 245  $^{\circ}\text{C}$ )对耐用性的影响。各条件下溶剂测定结果( $n=6$ )RSD 均 $<5.0\%$ ,表明耐用性良好。

## 2.10 样品的测定

取各个批号的供试品,按“2.2.3”项下的供试品溶液的配制方法制备供试品溶液,分别进样 1  $\mu\text{L}$ ,按内标法计算各有机溶剂的残留量。试验结果表明,批号分别为 20140401、20140402、20140501 的 3 批样品中均未检出无水乙醇、二氯甲烷、四氢呋喃、三乙胺、吡啶、乙酸和 DMF 的残留,符合中国药典 2015 年版四部通则中对原料药溶剂限度的要求。

## 3 讨论

### 3.1 溶剂的选择

考虑到样品的溶解度和 7 种待测溶剂的溶解度,本实验分别考察了水、二甲基亚砜和乙腈,结果表明,以二甲基亚砜为溶剂时,样品和待测溶剂溶解度好,且溶剂不干扰样品测定,故选用二甲基亚砜为溶剂。

### 3.2 色谱柱的选择

考虑到乙酸不易出峰,以及出峰保留时间不定,本实验分别考察了 DB-1、DB-WAX 和 DB-624 3 种不同极性的色谱柱,其中中等极性色谱柱

DB-624 可使 7 种残留溶剂达到基线分离、乙酸峰形较好,且分析时间适宜,故选用 DB-624 色谱柱。

本试验所确定的分析方法检测利伐沙班原料药中的乙酸,可确保乙酸的色谱峰和其他组分的色谱峰的分度满足气相色谱测定的要求,采用直接进样法测定乙酸的定量限可达到  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,具有柱效高、分离度高、准确度好、色谱峰形好、分析时间短等优点,其检测限、定量限、精密密度、准确度等指标都符合气相色谱分析的常规要求和药典对残留溶剂检验的要求,适用于利伐沙班中的乙酸、三乙胺等 7 种残留溶剂的测定,可满足分析要求。

## REFERENCES

- [1] 孟宪丽. 利伐沙班预防老年患者髋关节置换术后深静脉血栓效果观察[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2014, 28(8): 824-825.
- [2] ZHAO W G, LIU Z W, LIU L, et al. Efficacy of rivaroxaban prevention of postoperative lumbar vein thrombosis [J]. J Cervicodynia Lumbodynia(颈腰痛杂志), 2014, 35(5):

- 382-384.
- [3] TANG L P, ZHAO W G. Curative effect of rivaroxaban in the treatment of acute pulmonary embolism [J]. J Clin Pulm Med(临床肺科杂志), 2014, 19(10): 1780-1781.
- [4] 刘炜. 利伐沙班治疗非 ST 段抬高急性冠脉综合征的疗效观察[J]. 中国民康医学, 2014, 26(5): 33-35.
- [5] CHEN Y L, SHI Z W. Clinical research on rivaroxaban, a new oral anticoagulant [J]. Adv Cardiovasc Dis(心血管病学进展), 2009, 30(5): 810-813.
- [6] 中国药典. 四部[S]. 2015: 通则 105-109.
- [7] 张京伟. 阿莫西林中残留溶剂的测定[J]. 河北化工, 2009, 32(10): 67-68.
- [8] NIU H Y, LIU K L. Analysis method validation of residual solvent of ganciclovir [J]. Coal Chem Indust(煤炭与化工), 2014, 37(10): 79-83.
- [9] SHEN Y L, LIU J P. Determination of residual solvents in argatroban by headspace capillary GC [J]. Food Drug(食品与药品), 2014, 16(4): 282-283.
- [10] WANG Y Q, LIU L, LIN C. Determination of acetic acid in sulfadiazine by gas chromatography [J]. Guangdong Chem Ind(广东化工), 2010, 37(10): 121-122.
- [11] FANG Q R, DIAO X L, WAN Q H, et al. Determination of residual solvents in retigabine active substances by headspace gas chromatographic method [J]. J Instrum Anal(分析测试学报), 2013, 32(3): 308-313.

收稿日期: 2015-09-08

## 虫草多糖对荷瘤小鼠 T 淋巴细胞及其亚群数量与功能的影响

诸葛定娟, 程敏, 董文彬, 陈爱瑛, 缪云萍, 郑高利, 叶小弟<sup>\*</sup>(浙江省医学科学院, 杭州 310013)

**摘要:** 目的 研究虫草多糖对荷瘤小鼠 T 淋巴细胞功能的影响。方法 除正常对照组外, 其余小鼠右前肢腋窝皮下注射 S180 肉瘤细胞悬液建立小鼠荷瘤模型。荷瘤小鼠随机分为荷瘤对照(等容生理盐水)组、香菇多糖( $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )组、虫草多糖高、中、低剂量( $200, 100, 50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )组, 腹腔注射, 每天 1 次, 连续 13 d 后, 检测虫草多糖对荷瘤小鼠的抑瘤作用以及荷瘤小鼠外周血 T 淋巴细胞及其亚群数量、Th1/Th2 类细胞因子水平和脾淋巴细胞转化功能。结果 虫草多糖高、中剂量组可明显抑制 S180 肉瘤生长, 提高荷瘤小鼠脾脏重量和脾脏系数; 提高外周血  $\text{CD3}^+$  细胞(总 T 淋巴细胞)、 $\text{CD4}^+\text{CD8}^-$  亚群数量及  $\text{CD4}^+\text{CD8}^-/\text{CD4}^+\text{CD8}^+$  比值, 提高 Th1 淋巴细胞分泌的细胞因子  $\text{TNF-}\alpha$  和  $\text{IL-2}$  水平, 并显著促进脾脏 T 淋巴细胞增殖转化能力。结论 虫草多糖具有明显的抗肿瘤活性, 其机制可能与调节机体 T 淋巴细胞及其亚群的数量与分泌功能有关。

**关键词:** 冬虫夏草菌丝体; 虫草多糖; T 淋巴细胞亚群; S180 肉瘤

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2016)05-0528-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.05.003

## Effects of Polysaccharides of *Cordyceps Sinensis* Mycelium on the Number and Function of T Lymphocytes in Tumor-bearing Mice

ZHUGE Dingjuan, CHENG min, DONG Wenbin, CHEN Aiyong, MIAO Yunping, ZHENG Gaoli, YE Xiaodi<sup>\*</sup>  
(Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China)

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(Y2090286)

作者简介: 诸葛定娟, 女, 硕士生 Tel: (0571) 88215620  
Tel: (0571)88215620 E-mail: ye\_xiaodi@hotmail.com

E-mail: 770692046@qq.com

<sup>\*</sup>通信作者: 叶小弟, 女, 硕士, 副研究员