

左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症模型大鼠海马神经元突触功能可塑性相关蛋白的影响

杜青¹, 赵洪庆¹, 王宇红^{1,2*}, 徐雅岚¹, 杨蕙², 孟盼¹ (1.湖南省中药粉体与创新药物省部共建国家重点实验室培育基地, 长沙 410007; 2.湖南中医药大学第一附属医院, 长沙 410007)

摘要: 目的 针对 NR 受体亚型及其下游分子 CaMKII、SynGAP 的表达情况, 探索左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症模型大鼠海马神经元突触功能可塑性的影响。方法 复制糖尿病并发抑郁症大鼠模型并随机分为 4 组: 模型组, 阳性药组(二甲双胍 0.18 g·kg⁻¹+盐酸氟西汀 1.8 mg·kg⁻¹), 左归降糖解郁方高、低剂量组(32.82, 8.20 g·kg⁻¹), 以正常大鼠为空白对照组。采用 Morris 水迷宫检测大鼠的空间学习记忆能力, Western-blotting 实验检测大鼠海马 NR2A、NR2B、CaMKII、SynGAP 的表达情况。结果 与空白对照组比较, 模型组大鼠逃避潜伏期延长, 空间探索时间减少($P<0.05$), NR 受体亚型 NR2A、NR2B 及 CaMKII、SynGAP 的表达明显减少($P<0.01$); 与模型组比较, 阳性药组和左归降糖解郁方高剂量组逃避潜伏期显著缩短($P<0.05$), 空间探索时间显著增加($P<0.05$), NR2A、NR2B、CaMKII、SynGAP 的表达明显增多($P<0.05$ 或 0.01)。结论 左归降糖解郁方可以明显增强糖尿病并发抑郁症大鼠的学习记忆能力, 改善认知功能障碍, 缓解抑郁症状, 该作用可能与调节海马 NR 受体亚型 NR2A、NR2B 及其下游分子 CaMKII、SynGAP 的表达, 保护海马神经元突触功能可塑性有关。

关键词: 糖尿病并发抑郁症; 左归降糖解郁方; NR2A; NR2B; CaMKII; SynGAP

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2016)05-0521-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.05.001

Effects of Zuogui Jiangtang Jieyu Fang on Synaptic Function Plasticity in Hippocampal Neurons of Diabetes Mellitus with Depression Model Rats

DU Qing¹, ZHAO Hongqing¹, WANG Yuhong^{1,2*}, XU Yalan¹, YANG Hui², MENG Pan¹ (1. Training Bases, Hunan Key Laboratory of Chinese Materia Medica Powder and Innovative Drugs Established by Provincial and Ministry, Changsha, 410007, China; 2. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, 410007, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the effects of Zuogui Jiangtang Jieyu Fang on diabetes mellitus plasticity of synaptic function in hippocampal neurons of diabetes mellitus model rats with depression according to the expression of NR receptor subtype and its downstream molecular CaMKII, SynGAP. **METHODS** The diabetes mellitus with depression rat model was established, and the rats were randomly divided into 4 groups: model group, positive drug group (metformin 0.18 g·kg⁻¹+ fluoxetine hydrochloride 1.8 mg·kg⁻¹), Zuogui Jiangtang Jieyu Fang high and low dose group (32.82, 8.20 g·kg⁻¹), normal rats were in blank control group. Morris test was used to detect the behavior of the rats. The expression of NR2A, NR2B, SynGAP and CaMKII was detected by Western-blotting. **RESULTS** Compared with blank control group, the escape latencies were longer, the space exploration times were significantly shortened($P<0.05$), and the expression of NR2A, NR2B, SynGAP and CaMKII were significantly increased($P<0.01$) in model group. Compared with the model group, the escape latencies were significantly longer($P<0.05$), the space exploration times were significantly shortened($P<0.05$) and the expression of NR2A, NR2B, SynGAP and CaMKII were significantly decreased($P<0.05$ or 0.01) in Zuogui Jiangtang Jieyu Fang group. **CONCLUSION** Zuogui Jiangtang Jieyu Fang can significantly enhance the learning and memory ability, improving cognitive dysfunction, and relieve the depressive symptoms in diabetes mellitus with depression model rats. The effect may be related with the protection of synaptic function in hippocampal neurons through regulating the expression of NR receptor subtype and its downstream molecules SynGAP and CaMKII.

KEY WORDS: diabetes mellitus with depression; Zuogui Jiangtang Jieyu Fang; NR2A; NR2B; CaMKII; SynGAP

基金项目: 国家自然科学基金(81373578, 81573965, 81403379)

作者简介: 杜青, 女, 硕士生 Tel: 18711172550 E-mail: 791166938@qq.com *通信作者: 王宇红, 女, 博士, 研究员 Tel: (0731)85369061 E-mail: wyh107@126.com

糖尿病作为一种内分泌障碍性慢性疾病正严重影响着人类的生活、健康和生存。全世界约有3.47亿糖尿病患者,而糖尿病并发抑郁症(diabetes mellitus with depression, DD)的发生率为8.5%~71.4%^[1],抑郁症的并发大大增加了糖尿病的致残率和致死率。目前,针对DD的研究多集中于临床试验,极少数涉及其分子机制,极大地限制了治疗DD特效药的研究及开发。本课题组前期研究发现,DD模型大鼠脑内谷氨酸异常活化,海马出现明显病理结构损伤,海马神经元树突、轴突复杂性降低^[2],广泛分布于海马的NR受体活化异常,学习记忆功能减弱。有文献报道,离子型谷氨酸受体NR异常活化可调节CaMK II、SynGAP,影响长时程增强(long-term potentiation, LTP)和长时程减弱(long-term decline, LTD),改变海马神经元突触功能可塑性^[3]。而大脑的学习记忆功能与海马神经元突触可塑性密切相关。因此,本实验通过检测NR受体亚型及其下游分子CaMKII、SynGAP的表达情况,探索左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症模型大鼠海马神经元突触功能可塑性的保护作用机制。

1 材料

1.1 仪器与试药

OneTouch II型血糖仪及血糖试纸(美国强生公司); HI1210型水浴锅(Leica公司); Mini protean 3 cell型电泳仪(BIO—RAD公司); PS-9型电转仪(大连竞迈科技有限公司); MK3型酶标仪(芬兰雷勃公司); 吉尔森P型移液器(Pipetman); DB001Morris水迷宫(北京智鼠多宝生物科技有限责任公司)。

左归降糖解郁方^[4]原材料由湖南中医药大学第一附属医院制剂科按比例水煎浓缩后制成口服液100 mL,建立了一测多评的质量控制方法,其主要药效成分分别为黄芪甲苷 $\geq 30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、贯叶金丝桃素 $\geq 18 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、姜黄素 $\geq 0.4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、丹酚酸B $\geq 1.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、丹皮酚 $\geq 0.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。盐酸二甲双胍片(湖南湘雅制药有限公司,批号:1402115,规格:0.25 g); 盐酸氟西汀胶囊(法国Patheon,批号:2087A,规格:20 mg); 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)(美国Sigma公司,批号:126A038,规格:100 mg), Western blotting免疫印迹法蛋白抗体NR2A(批号:Ab14596)、NR2B(批号:Ab65783)、CaMK II(批号:Ab134041)和

SynGAP(批号:Ab3344)均购于Abcam公司; BCA蛋白定量试剂盒(Thermo公司,批号:PICPI23223), RIPA组织细胞快速裂解液(上海基尔顿生物,批号:BYL40825)。

1.2 动物

SPF级,♂,SD大鼠50只,体质量180~220 g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,生产许可证号:SCXK(湘)2013-0004,合格证号:43004700004535。

2 方法

2.1 糖尿病并发抑郁症动物模型的制备^[5]

SD大鼠连续14 d每天定时灌胃高脂乳剂($10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)后,大鼠禁食不禁水24 h,尾静脉一次性注射溶于新鲜配制、4℃保存的枸橼酸缓冲液($0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、pH4.5)的STZ溶液($38 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),造模3 d后,大鼠禁食不禁水12 h,测定空腹血糖,选取空腹血糖 $\geq 16.00 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的大鼠进行28 d慢性不可预测性应激。刺激因素包括昼夜颠倒24 h、45°倾笼24 h、4℃冰水浴5 min、45℃热刺激5 min、噪音8 h、潮湿垫料(每笼200 mL,24 h)、夹尾1 min。每天进行1种,同种刺激不连续出现。

2.2 分组与给药

将筛选出来的糖尿病模型大鼠按体质量随机分为4组:模型组、阳性药组(二甲双胍 $0.18 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ +盐酸氟西汀 $1.8 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)和左归降糖解郁方高、低剂量($32.82, 8.20 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组,各组大鼠慢性不可预测应激造模的同时灌胃给药28 d。另取正常大鼠10只作为空白对照组,空白对照组和模型组给予等体积的生理盐水。

2.3 Morris水迷宫实验

将平台置于D象限, Morris水迷宫内注入刚好没过平台2 cm的清水(水温23~25℃),撒入适量脱脂奶粉减少光反射。第1~4天定位航行实验检测大鼠学习能力,从不同的方位将大鼠面向池壁放入,观察60 s内大鼠爬上平台的逃避潜伏期(escape latency, EL),若60 s内还未爬上,将大鼠引导至台上,并记录EL为60 s。第5天空间探索实验检测大鼠记忆能力,撤走平台,大鼠自对立象限放入,记录60 s内大鼠在D象限游泳的时间,即为空间探索时间(space exploration time, SET)。实验均在上午8:00~12:00内完成,并保持室内其他物体位置不变。

2.4 手术

24 h禁食不禁水的动物用10%的水合氯醛

(4 mL·kg⁻¹)麻醉后,固定于手术台上,腹腔取血,断头取脑,冷冻台上快速分离双侧海马于冻存管中,液氮速冻,-80℃冰箱保存。

2.4.1 Western blotting 检测 于EP管中加入裂解液(每20 mg组织加0.15~0.25 mL裂解液),快速放入剪成细小碎片的海马组织,匀浆,离心12 000 r·min⁻¹、4℃、15 min),取上清液进行蛋白质定量后-80℃保存。BCA试剂盒中测定上述提取样品的实际蛋白浓度。根据目的蛋白的相对分子质量选择配置15%浓缩胶与10%分离胶,上样(每孔80 μg),浓缩胶80 V、20 min,分离胶120 V、60 min,电泳至标记物溴酚蓝到达凝胶底部即可。采用半干式转膜法将凝胶中的蛋白分子转移到NC膜上,用去离子水冲洗NC膜,再用丽春红预染后,将目的条带和内参条带裁剪下标记后用TBST洗去丽春红。放入装有5%的脱脂奶粉液的原位杂交袋中封闭,4℃下过夜。用TBST洗涤3次后加入相应的一抗封闭缓冲液,4℃孵育过夜。再用TBST洗涤3次后加入二抗封闭缓冲液(1:1 000),孵育1 h(37℃)。显色:滤纸吸干膜上液体,放入ECL中进行化学发光检测。Image2X软件扫描图片得出能反映蛋白表达强度的灰度值。

表1 各组大鼠学习记忆情况结果($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Tab. 1 The ability of learning and memory in different groups ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	剂量	EL/s				SET/s
		第1天	第2天	第3天	第4天	
空白对照组	—	49.63±1.88	38.03±0.98	21.10±2.44	6.38±0.87	28.55±0.86
模型组	—	60.00±2.47	58.30±4.67 ¹⁾	53.67±3.46 ²⁾	48.11±3.21 ²⁾	17.47±0.94 ¹⁾
阳性药组	二甲双胍 0.18 g·kg ⁻¹ +盐酸氟西汀 1.8 mg·kg ⁻¹	55.87±2.34	54.23±4.75	48.23±2.05	33.88±0.35 ³⁾	21.55±0.92 ³⁾
高剂量组	32.82 g·kg ⁻¹	57.66±5.78	55.29±4.21	47.63±3.92	37.32±2.81 ³⁾	19.56±0.78 ³⁾
低剂量组	8.20 g·kg ⁻¹	60.00±3.25	56.71±4.21	51.56±2.07	46.59±3.22	17.77±0.18

注:与空白对照组比较,¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较,³⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with blank control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; compared with model group, ³⁾ $P<0.05$.

表2 各组大鼠海马NR2A、NR2B及海马神经元突触CaMKII、SynGAP蛋白灰度值($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Tab. 2 The gray value of NR2A, NR2B protein in hippocampal and CaMKII, SynGAP protein in hippocampal synapses in different groups ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	剂量	NR2A	NR2B	CaMKII	SynGAP
空白对照组	—	0.056±0.008	0.045±0.010	0.047±0.008	0.102±0.023
模型组	—	0.852±0.042 ¹⁾	0.750±0.154 ¹⁾	1.008±0.256 ¹⁾	1.013±0.133 ¹⁾
阳性药组	二甲双胍 0.18 g·kg ⁻¹ +盐酸氟西汀 1.8 mg·kg ⁻¹	0.565±0.108 ²⁾	0.365±0.152 ²⁾	0.065±0.016 ³⁾	0.192±0.113 ³⁾
高剂量组	32.82 g·kg ⁻¹	0.572±0.110 ²⁾	0.410±0.069 ²⁾	0.114±0.044 ³⁾	0.235±0.131 ³⁾
低剂量组	8.20 g·kg ⁻¹	0.653±0.155	0.507±0.085	0.528±0.127 ²⁾	0.561±0.107 ²⁾

注:与空白对照组比较,¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较,²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with blank control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

2.5 统计学处理

数据分析采用统计软件SPSS 16.0,所有计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析, t 检验,双侧检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 Morris水迷宫实验

与空白对照组比较,模型组大鼠EL逐渐增加,且后3 d差异有显著性($P<0.01$ 或 0.05),SET显著减少($P<0.05$)。与模型组比较,阳性药组和左归降糖解郁方高剂量组大鼠第4天的EL显著缩短($P<0.05$),SET显著延长($P<0.05$)。结果表明,左归降糖解郁方高剂量能显著改善糖尿病并发抑郁症大鼠的学习记忆能力,缓解抑郁。结果见表1。

3.2 Western blotting检测结果

与空白对照组比较,模型组NR受体亚型NR2A、NR2B及其下游分子CaMKII、SynGAP的灰度比值显著增加($P<0.01$)。与模型组比较,左归降糖解郁方高剂量组和阳性药组NR2A、NR2B、CaMKII、SynGAP的灰度比值显著减少($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。结果提示,左归降糖解郁方可有效调控NR2A、NR2B、CaMKII、SynGAP蛋白的表达量。见表2、图1。

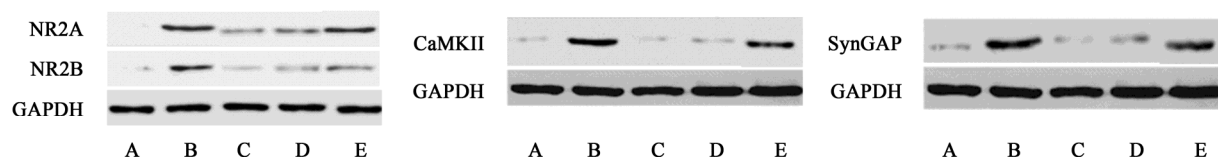


图1 各组大鼠海马 NR2A、NR2B、CaMKII、SynGAP 灰度值

注: A-空白对照组; B-模型组; C-阳性药组; D-左归降糖解郁方高剂量组; E-左归降糖解郁方低剂量组。

Fig. 1 The gray value of NR2A, NR2B, CaMKII and SynGAP protein in hippocampal synapses in different groups

Note: A-blank control group; B-model group; C-positive group; D-Zuogui Jiangtang Jieyu Fang high dose group; E- Zuogui Jiangtang Jieyu Fang low dose group.

4 讨论

本研究发现,与空白对照组比较,模型组大鼠 EL 以及 SET 有显著性差异,表明模型大鼠抑郁症状明显;而左归降糖解郁方高剂量可显著减少 DD 模型大鼠的 EL,延长 SET,可改善糖尿病并发抑郁症模型大鼠的空间学习记忆能力,缓解抑郁。Western blotting 结果显示,左归降糖解郁方高剂量组 NR 受体亚型 NR2A、NR2B 及其下游分子 CaMKII、SynGAP 灰度值显著减少,提示蛋白表达量显著减少,其结果与阳性药组一致,推测左归降糖解郁方可能是通过调控 NR 受体及其下游分子 CaMKII、SynGAP 的表达,调节海马神经元突触功能可塑性,缓解 DD 模型大鼠的抑郁症状。

海马是 DD 发生的关键靶部位,其中,海马神经元突触可塑性是学习记忆形成的神经生物学基础。海马神经元之间通过突触相互联系,兴奋性突触通过神经元突触前膜释放谷氨酸,与突触后膜的谷氨酸受体 NR 结合,传递信号,从而启动一系列反应,导致突触的可塑性变化。NR 受体在树突棘和突触的重塑中发挥着重要的作用^[6]。NR2 是 NR 受体质量要的调节亚基,其亚单位 NR2A 主要在海马神经元突触处表达, NR2B 主要在胞浆、轴突膜和树突膜等处表达^[7]。糖尿病与抑郁症发生都会导致 NR2A、NR2B 表达上调,促使 Ca^{2+} 通道开放,细胞内 Ca^{2+} 超载,产生大量氧自由基,导致神经元损伤,从而降低表征学习记忆的 LTP^[8],而 LTP 的诱导与海马神经元突触可塑性密切相关。

海马神经元功能可塑性主要表现在 LTP 和 LTD。CaMKII 与 SynGAP 蛋白均存在于突触后致密物中, CaMKII 和突触后致密物 PSD-95 动态地与 NR2A 蛋白质 C 末端结合,从而调节海马的突触可塑性, CaMKII 在 NR 受体依赖的 LTP 突触可塑性起到关键的作用^[9],是突触底层记忆形成必不可少的分子。SynGAP 是一个高度富集在大脑兴奋

性突触的突触 Ras-GTP 酶激活蛋白,调节脊柱的形成和神经元中谷氨酸受体的转运,在 LTP 诱导期间, CaMKII 磷酸化 SynGAP 使之在海马神经元树突棘中迅速分散^[10]。糖尿病发生时,经过血液循环入脑的谷氨酸增多,导致 NR2A 异常活化, Ca^{2+} 内流,激活与通道结合的激酶 CaMKII。CaMKII 被激活后,从胞浆转位到突触后膜^[11],过度与 NR2A 受体结合,导致 NR2A 发生磷酸化, CaMKII 自身 Thr286 位点与 SynGAP 也发生磷酸化而失活, RasGTP 酶活性受到抑制,从而影响表征突触功能可塑性的 LTP^[12]。笔者推测,糖尿病状态下, NR 的亚型 NR2A、NR2B 的异常活化,通过影响突触可塑性功能蛋白 CaMKII、SynGAP 的表达,导致海马神经元突触可塑性发生变化,从而导致神经元损伤,学习记忆功能障碍,抑郁发生。

本研究结果显示,左归降糖解郁方能够明显改善糖尿病并发抑郁症大鼠的海马神经元功能可塑性。本课题组将进一步深入研究左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症模型大鼠海马神经血管单元的调控作用。

REFERENCES

- [1] EGEDE L E, ELLIS C. Diabetes and depression: global perspectives [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2010, 87(3): 302-312.
- [2] WANG Y H, YIN L T, YANG H, et al. Hypoglycemic and anti depressant effects of Zuogui Jiangtang Jieyu Formulation in a model of unpredictable chronic mild stress in rats with diabetes mellitus [J]. Exp Ther Med, 2014, 8(1): 281-285.
- [3] SAJIKUMAR S, NAVAKKODE S, FREY J U. Identification of compartment- and process-specific molecules required for "synaptic tagging" during long-term potentiation and long-term depression in hippocampal CA1 [J]. J Neurosci, 2007, 27(19): 5068-5080.
- [4] WANG Y H, YANG H, YIN L T, et al. Effects of Zuogui Jiangtang Jieyu Fang on blood glucose and lipids in diabetes mellitus rats with depression [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2014, 45(11): 1602-1606
- [5] WANG Y H, YANG H, MENG P, et al. Effect of Zuogui Jiangtang Jieyu Fang on behaviors and cognitive function in diabetes mellitus rats with depression [J]. Chin J Mod Appl

- 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 β -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 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 μ 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⁻¹, 进样量 1 μ 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 μ m), N₂ 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⁻¹. The injection volume was 1 μ 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-噻吩-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