

· 研究报告 ·

UHPLC 法测定辐射后的酒石酸唑吡坦片含量

张 稳^{1,2}, 黄心慧², 杨星瑞², 周婷婷^{1,2}, 高建义³, 李勇枝³ (1. 安徽中医药大学药学院 安徽 合肥 230012; 2. 海军军医大学药学院, 上海 200433; 3. 中国航天员科研训练中心, 北京 100094)

【摘要】 目的 建立 UHPLC 法测定辐射后的酒石酸唑吡坦片含量, 考察不同辐射剂量对酒石酸唑吡坦片含量的影响。**方法** 采用超高效液相色谱法, 对 γ 射线辐射的酒石酸唑吡坦片进行含量测定。采用 C₁₈ 柱以乙腈-甲醇-0.05 mol/L 磷酸溶液(用三乙胺调节 pH 值至 5.5)(18 : 26 : 56)为流动相, 流速为 0.7 ml/min, 检测波长为 254 nm。**结果** 酒石酸唑吡坦浓度在 5 ~ 80 μ g/ml 范围内线性良好, $r=0.9996$; 平均加样回收率为 98.2%, RSD 为 1.72%, 重复性为 0.87%。0、8、25 和 80 kGy 辐射量下酒石酸唑吡坦含量分别为 105.1%、106.4%、102.7% 和 105.4%。**结论** 超高效液相色谱法分析周期短、结果准确, 适用于辐射后酒石酸唑吡坦片的含量测定, 辐射后酒石酸唑吡坦片含量基本保持不变。

【关键词】 酒石酸唑吡坦; 超高效液相色谱法; 含量测定; 辐射

【中图分类号】 R284.1

【文献标志码】 A

【文章编号】 1006-0111(2022)01-0062-04

【DOI】 10.12206/j.issn.1006-0111.202110019

Determination of zolpidem tartrate tablets after radiation by UHPLC

ZHANG Wen^{1,2}, HUANG Xinhui², YANG Xingrui², ZHOU Tingting^{1,2}, GAO Jianyi³, LI Yongzhi³ (1. School of Pharmacy, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 2. School of Pharmacy, Naval Military Medical University, Shanghai 200433, China; 3. Chinese Astronaut Research and Training Center, Beijing 100094, China)

【Abstract】 Objective To establish a UHPLC method for the determination of zolpidem tartrate tablets after radiation, and to investigate the effect of different radiation doses on the content of zolpidem tartrate tablets. **Methods** Ultra high performance liquid chromatography was used. The content of zolpidem tartrate tablets irradiated by γ -ray was determined. Using C₁₈ column, acetonitrile methanol-0.05 mol/L phosphoric acid solution (the pH value as 5.5 with triethylamine) (18 : 26 : 56) was used as the mobile phase. The flow rate was 0.7 ml/min, and the detection wavelength was 254 nm. **Results** The method validation showed good linearity in the concentration range of 5-80 μ g/ml ($r=0.9996$); The average recovery was 98.2%, RSD was 1.72%, and the repeatability was 0.87%. The contents of zolpidem tartrate were 105.1%, 106.4%, 102.7% and 105.4% under 0, 8, 25 and 80 kGy radiation. **Conclusion** UHPLC has accurate results with short analysis cycle in this study. It is suitable for the determination of zolpidem tartrate tablets after radiation. The content of zolpidem tartrate tablets remained basically unchanged after radiation.

【Key words】 zolpidem tartrate; ultra high performance liquid chromatography; content determination; radiation

在长期空间飞行特殊环境中, 保持航天员的健康是航天任务成功的首要目标。因此, 安全有效的药物治疗和药品保障对航天员的健康至关重要。然而用于长期太空飞行的药物的稳定性变化, 不能用陆地环境稳定性评价结果来判断^[1], 在陆地上药物稳定性主要受处方、温度、光线、湿度和水分及包装材料等因素影响。而航天环境受微重力、硬真空、湿度变化、温差和辐射影响^[2], 这些都可能

导致药物的不稳定, 其主要影响因素为空间辐射。空间辐射主要包括空间天然产生的非电离辐射和由人工产生的电离辐射。当药物暴露于任何电离辐射时, 辐射导致药物分子发生价层电子跃迁, 与赋形剂发生相互作用, 导致药物的结构发生一定变化, 从而丧失药理活性。

酒石酸唑吡坦 (zolpidem tartrate) 主要通过作用于中枢神经系统的苯二氮卓受体, 增强 γ -氨基丁酸 (GABA) 系统的抑制机制, 具有较强的镇静、催眠作用^[3-4]。在载人航天特殊作业环境中, 酒石酸唑吡坦可以用于治疗睡眠障碍, 缓解由其导致的焦虑等情绪, 是“太空药箱”的常用药品之一^[2]。

为了考察酒石酸唑吡坦片在太空环境中的稳

【基金项目】 军队后勤科研项目(BWS17J028)

【作者简介】 张 稳, 硕士研究生, Email: 2246077068@qq.com

【通信作者】 周婷婷, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中药药效物质基础与体内代谢研究, Email: tingting_zoo@163.com

定性,以 ^{60}Co 辐射为辐射源模拟太空的射线环境。辐射技术是 20 世纪兴起的一种灭菌及保鲜技术,是以 X 射线、 γ 射线等电离辐射产生的高能射线抑制病原生物的生长而达到杀虫、杀菌等目的^[5-6]。根据原中华人民共和国卫生部发布的《 ^{60}Co 辐射中药灭菌剂量标准》^[7]和《美国药典》42^[8] (USP42) 对辐射灭菌的规定,选定了 8、25、80 kGy 这 3 个剂量,建立 UHPLC 法测定不同剂量辐射下的酒石酸唑吡坦片的含量变化。实验通过 ^{60}Co 辐射因素对航天药物稳定性的影响,从而预测太空环境中药品的有效期,为今后航天药品的制剂工艺、包装储存等提供必要的研究资料。

1 仪器与试剂

LC-2030 PLUS 高效液相色谱仪(日本岛津公司)包括 LC-20ADXR 溶剂输送泵,SPD-20A 紫外检测器,SIL-20AXR 自动进样器和 CTO-20A 柱温箱; ^{60}Co 辐照装置(海军军医大学辐照中心)。

酒石酸唑吡坦片(思诺思,杭州赛诺菲制药有限公司,批号 ET098),酒石酸唑吡坦对照品(纯度 99.8%,武汉赛维尔生物科技有限公司,批号 201921);甲醇(Merck 公司),磷酸(上海安谱实验科技股份有限公司),三乙胺(上海安谱实验科技股份有限公司),均为色谱纯;水为自制纯化水(上海和泰仪器有限公司)。

2 实验方法与结果

2.1 辐射样品制备

将酒石酸唑吡坦片(含包装)置于辐照环境中,设定辐射剂量,按照接收剂量为 0、8、25、80 kGy 进行 ^{60}Co 辐射,每天受辐照一次,于 1 个月后取样。

2.2 对照品溶液的制备

精密称定酒石酸唑吡坦对照品约 10 mg,置 10 ml

容量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,得酒石酸唑吡坦对照品储备液;再精密量取 1 ml,置 100 ml 容量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,得浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取 0、8、25、80 kGy 辐射后的酒石酸唑吡坦片各 10 片,精密称定并研细成药粉。精密称取细粉适量(约相当于酒石酸唑吡坦 10 mg)置于 10 ml 量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,过滤,精密量取续滤液 1 ml,置 100 ml 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得。

2.4 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱为 Inertsil C_{18} 柱 (3.0 mm $\times$ 150 mm, 3.0 μm),流动相为乙腈-甲醇-0.05 mol/L 磷酸溶液(用三乙胺调节 pH 值至 5.5) (18 : 26 : 56),检测波长为 254 nm,流速为 0.7 ml/min,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,进样量为 10 μl ,色谱图中酒石酸唑吡坦的保留时间为 3.92 min,理论塔板数按酒石酸唑吡坦峰计算大于 5 000。精密称取标准品配制浓度约为 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的对照品溶液,在上述色谱条件下重复进样 6 次,测定峰面积,计算峰面积 RSD 为 0.06%,表明仪器精密度良好。每个辐射强度取 1 批供试品,按照“2.3”项下配制供试品溶液,在上述色谱条件下进样分析,对照品溶液及供试品溶液的色谱结果见图 1。

2.5 线性关系考察

精密量取对酒石酸唑吡坦对照品储备液适量置 100 ml 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,得浓度分别为 5、10、20、40、80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的工作曲线溶液。按“2.4”项下色谱条件分别进样 10 μl 进行测定,记录色谱图。以酒石酸唑吡坦对照品浓度 (X , $\mu\text{g}/\text{ml}$) 为横坐标,相应峰面积 (Y) 为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程为 $Y=1.03\times 10^5 X+1.5\times 10^4$, $r=0.9996$,结果表明酒石酸唑吡坦在 5~80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度范围内,线性关系良好。

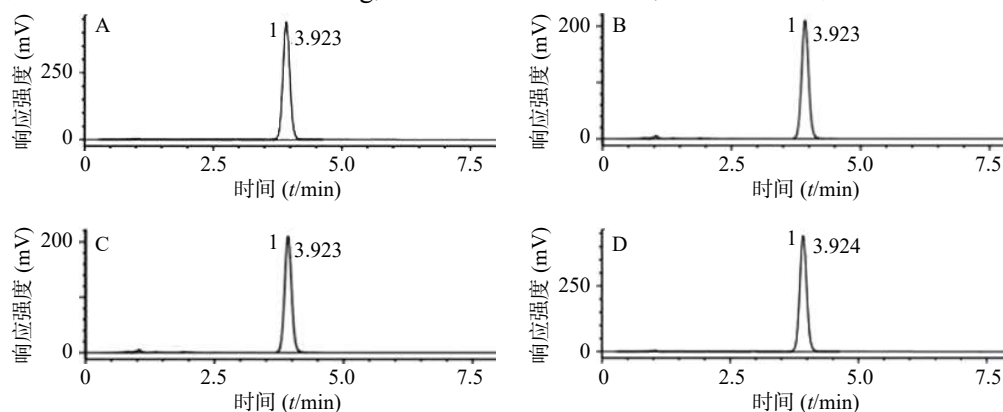


图 1 酒石酸唑吡坦超高效液相色谱图 (254 nm)

A. 对照品; B. 8 kGy 辐射量供试品; C. 25 kGy 辐射量供试品; D. 80 kGy 辐射量供试品; 1. 酒石酸唑吡坦。

2.6 重复性试验

精密称取同一批未受辐射的酒石酸唑吡坦片样品粉末(约相当于酒石酸唑吡坦 10 mg)6 份,照“2.3”项下制成供试品溶液,按“2.4”项下色谱条件分别进样 10 μ l 测定,记录峰面积,计算含量,其平均含量 104.2%, RSD 为 0.87%,表明该方法重复性良好。

2.7 稳定性试验

取辐射强度为 8 kGy 的供试品溶液,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,按含量测定方法测定,在 0、1、2、5、8、12 h 分别进样 10 μ l,记录峰面积,峰面积 RSD 为 0.06%,表明溶液在 12 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验

精密称取同一批未辐射酒石酸唑吡坦片样品粉末(约相当于酒石酸唑吡坦 10 mg)3 份,分别置于 10 ml 量瓶中,再精密称取酒石酸唑吡坦对照品约 8、10、12 mg 各 3 份,分别置于上述 3 个 10 ml 量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,过滤,精密量取续滤液 1 ml,置 100 ml 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,每个浓度制备 3 份。按“2.4”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算平均加样回收率,结果见表 1。

表 1 酒石酸唑吡坦片加样回收率试验结果 (n=9)

称取量 (m/mg)	原有量 (m/mg)	加入量 (m/mg)	测得量 (m/mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
140.27	10.99	12.81	23.82	100.2	98.2	1.72
140.24	10.99	12.80	23.81	100.2		
140.24	10.99	12.81	23.81	100.1		
140.28	10.99	10.84	21.42	96.2		
140.30	10.99	10.82	21.42	96.4		
140.27	10.99	10.83	21.41	96.2		
140.32	10.99	8.78	19.62	98.3		
140.21	10.98	8.79	19.61	98.1		
140.22	10.98	8.78	19.60	98.1		

2.9 含量测定

每个辐射强度取 1 批供试品,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,平行 3 份,在“2.4”项的色谱条件下进样分析,记录色谱峰面积,按照外标法计算酒石酸唑吡坦含量,其 0、8、25 和 80 kGy 辐射量下酒石酸唑吡坦平均含量分别为 105.1%、106.4%、102.7% 和 105.4%(表 2)。

3 讨论

3.1 含量测定方法及流动相确定

研究表明测定酒石酸唑吡坦原料药和片剂含量的方法主要有分光光度法^[9]、高效液相色谱法^[10]

表 2 酒石酸唑吡坦片含量测定结果

辐射剂量(kGy)	含量(%)	平均含量(%)
0	103.1	105.1
	103.2	
	109.2	
8	107.1	106.4
	109.1	
	103.2	
25	107.2	102.7
	105.0	
	96.1	
80	100.1	105.4
	107.2	
	109.0	

和毛细管区带电泳法^[11]等。本实验采用超高效液相色谱法,相比于传统的高效液相色谱法,其色谱柱粒径更小,柱效更高,出峰较快,大大提高了灵敏度和检测效率。

在建立超高效液相色谱法方法过程中,曾选用乙腈-0.05 mol/L 磷酸溶液和甲醇-0.05 mol/L 磷酸溶液,但是色谱峰不能完全分离,干扰性大。最终选用乙腈-甲醇-0.05mol/L 磷酸溶液(用三乙胺调节 pH 值至 5.5)(18 : 26 : 56),试验结果表明,流动相中加入适量三乙胺调节其 pH 值,在 pH4.0 ~ 6.5 的范围内,分离度随 pH 值增大而增大^[12],pH 值<4.5 时,酒石酸唑吡坦峰形较差,pH 值>6.0 时,酒石酸唑吡坦峰拖尾严重。经优化,选择 pH5.5,其唑吡坦峰的对称性好,理论塔板数高,柱效更高。

3.2 辐射对药物稳定性影响

实验选定了 8、25、80 kGy 不同辐射剂量下对酒石酸唑吡坦片稳定性影响进行考察,结果显示随着辐射剂量逐步增大,在其他条件相同的情况下,酒石酸唑吡坦片的主药含量并没有明显变化,酒石酸唑吡坦片能保持相对稳定。药物含量指在制剂中药物量是否符合要求,在药物含量不变的情况下,药物的有效性还与剂型的相关特性有关,如溶出度等。有研究表明,药物受到一定剂量的辐射后,药物的溶出度会发生改变^[13]。后续将从不同辐射剂量的酒石酸唑吡坦片的溶出度、水分等做进一步研究。

【参考文献】

- [1] 赵磊,尚钰轩,袁爽,等.载人深空探索中空间辐射防护技术的研究进展[J].科学通报,2019,64(20):2087-2103.

- [2] MEHTA P, BHAYANI D. Impact of space environment on stability of medicines: challenges and prospects[J]. *J Pharm Bio-med Anal*, 2017, 136: 111-119.
- [3] HODKINSON P D, ANDERTON R A, POSSELT B N, et al. An overview of space medicine[J]. *Br J Anaesth*, 2017, 119(suppl_1): i143-i153.
- [4] SCATTON B, CLAUSTRE Y, CUDENNEC A, et al. Amisulpride: from animal pharmacology to therapeutic action[J]. *Int Clin Psychopharmacol*, 1997, 12(Suppl 2): S29-S36.
- [5] DEPOORTERE H, ZIVKOVIC B, LLOYD K G, et al. Zolpidem, a novel nonbenzodiazepine hypnotic. I. Neuropharmacological and behavioral effects[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1986, 237(2): 649-658.
- [6] CHANCELLOR J C, SCOTT G B I, SUTTON J P. Space radiation: the number one risk to astronaut health beyond low earth orbit[J]. *Life (Basel)*, 2014, 4(3): 491-510.
- [7] 中华人民共和国卫生部. ^{60}Co 辐照中药灭菌剂量标准(卫药发[1997]第38号文件)[S]. 1997.
- [8] United States Pharmacopeial Convention Inc[S] New York: The United States Pharmacopeial Convention Press, 2019: 292.
- [9] 王亚洁, 孟祥军, 李娜然, 等. 分光光度法测定酒石酸唑吡坦片剂含量[J]. *沈阳医学院学报*, 2001, 3(4): 225-227.
- [10] 韩忠丽, 方克忠, 朱姚亮. HPLC法测定酒石酸唑吡坦口腔崩解片的含量[J]. *齐鲁药事*, 2009, 28(2): 86-87.
- [11] 封宇飞, 雷静, 刘志鹤, 等. 毛细管区带电泳法测定酒石酸唑吡坦片的含量及降解产物[J]. *中国医院药学杂志*, 2003, 23(2): 75-77.
- [12] 王守箐. 内标HPLC法测定酒石酸唑吡坦及其片剂的含量[J]. *化学工程师*, 2005, 19(7): 19-20.
- [13] INABA K, OIE T, OTAKE H, et al. Evaluation of dissolution profile between original and generic products of zolpidem tartrate by microdialysis-HPLC[J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2019, 67(2): 120-124.
- [收稿日期] 2021-10-11 [修回日期] 2022-01-04
[本文编辑] 李睿旻

(上接第 47 页)

- [12] HNISZ D, SCHWARZMÜLLER T, KUCHLER K. Transcriptional loops meet chromatin: a dual-layer network controls white-opaque switching in *Candida albicans*[J]. *Mol Microbiol*, 2009, 74(1): 1-15.
- [13] ROBBINS N, LEACH M D, COWEN L E. Lysine deacetylases Hda1 and Rpd3 regulate Hsp90 function thereby governing fungal drug resistance[J]. *Cell Rep*, 2012, 2(4): 878-888.
- [14] LIU O W, CHUN C D, CHOW E D, et al. Systematic genetic analysis of virulence in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*[J]. *Cell*, 2008, 135(1): 174-188.
- [15] DUMESIC P A, HOMER C M, MORESCO J J, et al. Product binding enforces the genomic specificity of a yeast polycomb repressive complex[J]. *Cell*, 2015, 160(1-2): 204-218.
- [16] 黄海, 王彦, 李莹, 等. 白念珠菌的应激反应与耐药性[J]. *第二军医大学学报*, 2010, 31(11): 1239-1243.
- [17] KMETZSCH L. Histone deacetylases: Targets for antifungal drug development[J]. *Virulence*, 2015, 6(6): 535-536.
- [18] SU S, LI X Y, YANG X M, et al. Histone acetylation/deacetylation in *Candida albicans* and their potential as antifungal targets[J]. *Futur Microbiol*, 2020, 15(11): 1075-1090.
- [19] PFALLER M A, MESSER S A, GEORGOPAPADAKOU N, et al. Activity of MGCD290, a Hos2 histone deacetylase inhibitor, in combination with azole antifungals against opportunistic fungal pathogens[J]. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(12): 3797-3804.
- [收稿日期] 2021-03-09 [修回日期] 2021-05-31
[本文编辑] 李睿旻