

- of theampulla of vater[J]. *Gastrointest Endosc*, 1974, 20(4): 148 – 151
- 2 张启瑜. 钱礼腹部外科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 877 – 931
- 3 吴孟超. 重视消化内镜技术在胆道疾病中的诊疗作用[J]. *中国微创外杂*, 2007, 7(2): 81 – 82
- 4 NIH state – of – the – science statement on endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP) for diagnosis and therapy [J]. *NIH Consens State Sci Statements*, 2002, 19(1): 1 – 26
- 5 张建, 黄耀, 吴孟超. 腹腔镜术中联合内镜在治疗胆囊结石和并肝外胆管结石的应用前景[J]. *中华肝胆外科杂志*, 2011, 8(17): 685 – 687
- 6 潘步建, 周蒙滔, 徐迈宇. 腹腔镜胆总管探查术治疗胆总管结石合并胆囊结石[J]. *中华肝胆外科杂志*, 2011, 10(17): 816 – 819
- 7 Berci G, Morgenstern L. Laparoscopic management of common bile duct stones. A multi – institutional SAGES study. *Society of American Gastrointestinal Endoscopic Surgeons*[J]. *Surg Endosc*, 1994, 8(10): 1168 – 1174
- 8 Yasutoshi K, Tadahiro T, Yoshifumi K, *et al.* JPN Guidelines for the management of acute pancreatitis; treatment of gallstone induced acute pancreatitis[J]. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 2006, 1(13): 56 – 60
- 9 密切关注内镜下乳头括约肌切开术并发症[J]. *中华肝胆外科杂志*, 2011, 10(17): 793 – 796
- 10 Hanif F, Ahmed Z, Samie MA, *et al.* Laparoscopic transcystic bile duct exploration: the treatment of first choice for common bile duct stones [J]. *Surg Endosc*, 2010, 24(7): 1552 – 1556
- 11 金景鹏, 张斌, 李长锋, 等. 治疗性经内镜逆行胰胆管造影在高龄人群胆总管结石中的应用(附91例临床分析)[J]. *临床肝胆病杂志*, 2012, 28(2): 105 – 107
- 12 阎波, 侯坤, 俞士勇, 等. 完全腹腔镜联合胆道镜治疗胆总管结石[J]. *中华腔镜外科杂志: 电子版*, 2010, 4(3): 357 – 359
- 13 Tan KK, Shelat VG, Liau KH, *et al.* laparoscopic common bile duct exploration: Our first 50 cases [j]. *Annals Academy of Medicine*, 2010, 2(39): 137 – 142
- 14 Martin IJ, Bailey IS, Rhodes M, *et al.* Towards T – tube free laparoscopic bile duct exploration: a methodologic evolution during 300 consecutive procedures[J]. *Ann Surg*, 1998, 1(228): 29 – 34
- 15 Tai CK, Ha JP, Tsui KK, *et al.* Antegrade biliary stenting versus T – tube drainage after laparoscopic choledochotomy a comparative cohort study[J]. *Hepatogastroenterology*, 2006, 69(53): 330 – 334
- 16 索运生, 张明哲. 腹腔镜胆总管探查、一期缝合和T管引流后胆道压力变化的比较[J]. *中国微创外科杂志*, 2006, 6(1): 21 – 23
- (收稿日期: 2012 – 07 – 20)
- (修回日期: 2012 – 09 – 26)

恩曲他滨原料药挥发性杂质的研究

吕亚光 吕昭云 安信生 王 威 潘显道

摘 要 目的 建立恩曲他滨原料药中挥发性杂质, 包括9种残留溶剂和工艺杂质 – 薄荷醇限度检查的气相色谱测定方法。**方法** 残留溶剂检查以顶空气相色谱法, 氢火焰离子检测器, 色谱柱为石英毛细管色谱柱: DB – 1 (60m × 0.32mm × 1.00μm), 外标法定量; 薄荷醇的检测以直接进样气相色谱法, 氢火焰离子检测器, 色谱柱为石英毛细管色谱柱: DB – 1 (60m × 0.32mm × 1.00μm), 内标法定量(以乙酸乙酯为内标)。**结果** 9种溶剂在对照溶液浓度的20% ~ 150%的范围内, 峰面积与浓度线性关系良好, 9种溶剂的平均加样回收率均在80%以上; 薄荷醇在25.0 ~ 187.5μg/ml浓度范围内呈良好的线性关系, 平均加样回收率为103.2% (RSD = 1.67%)。**结论** 两种气相色谱方法简单、准确、可靠, 可用于恩曲他滨原料药残留溶剂和薄荷醇杂质的限度控制。

关键词 恩曲他滨 残留溶剂 薄荷醇 气相色谱法

GC Determination of Residual Solvents and Impurity of Menthol in the Drug Substance of Emtricitabine. Lü Yaguang, Lü Zhaoyun, An Xinsheng, Wang Wei, Pan Xiandao. *Beijing Union Pharmaceutical Factory, Beijing 102600, China*

Abstract Objective To establish GC method for the determination of residual organic solvents and menthol in Emtricitabine. **Methods** The determination of residual solvents was carried out by headspace gas chromatography equipped with a DB – 1 capillary column (60m × 0.32mm × 1.00μm) and FID detector. The quantification of residual solvents was calculated by external standard method; The determination of menthol was carried out by direct injection gas chromatography equipped with a DB – 1 capillary column (60m × 0.32mm × 1.00μm) and FID detector. The quantification of residual solvents was calculated by internal standard method using ethyl acetate as the internal standard substance. **Results** It indicates that the linear correlation of each solvent was fine in the specified range of 20% ~ 150% of the target concentration. The average recoveries were all over 80%. The linear range of menthol was 25.0 ~ 187.5μg/ml and the average recovery rate was 103.2% (RSD = 1.67%). **Conclusion** The two methods are simple, accurate and reliable and can be

used for the quality control of residual solvents and menthol in Emtricitabine.

Key words Emtricitabine; Residual solvents; Menthol; GC

恩曲他滨是一种最新的核苷类反转录酶抑制剂。恩曲他滨用于与其他抗反转录病毒药联用治疗成人艾滋病病毒(HIV)感染,对抑制人体内的艾滋病病毒、延长患者的生命有很好的疗效。

恩曲他滨在生产工艺中用到的有机溶剂有:甲醇、乙醇、乙醚、二氯甲烷、叔丁基甲基醚、正己烷、乙酸乙酯、环己烷、甲苯共 9 种溶剂。根据中国药典的要求限制这些残留溶剂的量。本文采用顶空气相色谱方法,建立了上述 9 种溶剂的限度检查方法,同时对方法进行了验证^[1~4]。

同时,在恩曲他滨合成过程中,薄荷醇是重要的反应物之一,而且也可能发生不良反应(酯水解)产生薄荷醇而带入终产品中。因此,对恩曲他滨进行薄荷醇的检测是完全有必要的。薄荷醇结构中无共轭结构,在紫外线区无吸收,因此不能采用常规的高效液相色谱紫外检测器进行检测。中成药中的薄荷醇气相色谱测定方法已有报道^[5]。因此,本文还摸索并建立了薄荷醇的直接进样气相色谱检查方法,以控制恩曲他滨原料药中的薄荷醇杂质^[1]。

材料与方法

1. 仪器与试剂:(1)仪器:气相色谱仪:Agilent 6890N, FID 检测器;Agilent chemstation 色谱工作站;METTLER XS205 十万分之一电子天平;(2)试剂:恩曲他滨(北京协和药厂,批号:080501、080502、080503),薄荷醇(北京凤礼精求有限公司,080407),试剂均为分析纯。

2. 残留溶剂检查方法:(1)色谱条件:色谱柱:DB-1(100%聚二甲基硅氧烷)(60m×0.32mm×1.00μm);柱温:初始柱温 40℃,保持 10min,后以 20℃/min 升至 180℃,保持 3min;进样口温度:190℃;检测器温度:250℃;载气:高纯氮,流速 2.0ml/min,分流比 10:1,进样量:1ml。(2)供试品溶液的制备:精密称取本品约 0.2g,置 20ml 顶空瓶中,加二甲亚砜(DMSO):水(70:30)的混合溶液 1ml,密封。(3)对照品溶液的制备:精密称取正己烷 14.5mg,置 10ml 量瓶中,用 DMSO:水(70:30)的混合溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,得正己烷储备液;精密称取甲醇 60mg、乙醇 100mg、乙醚 100mg、二氯甲烷 12mg、叔丁基甲基醚 100mg、乙酸乙酯 100mg、环己烷 77.6mg、甲苯 17.8mg,精密量取正己烷储备液 4.0ml 置 100ml 量瓶中,用 DMSO:水(7:3)的混合溶液稀释至刻度,摇匀。(4)系统适用性试验:取对照品溶液在上述色谱条件下进样测定,结果各峰之间的分离度均>2.0,且峰对称性良好,说明该方法的适用性良好(图 1)。

3. 薄荷醇检查方法:(1)色谱条件:DB-1(100%聚二甲

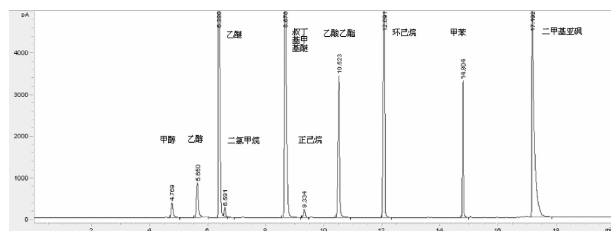


图 1 恩曲他滨残留溶剂系统适用性气相色谱图

基硅氧烷)毛细管柱;氢火焰离子检测器,载气为氮气;N₂流速 2.0ml/min;H₂流速 40ml/min;柱温 80℃,进样口温度 190℃,检测器温度 250℃。甲醇溶解样品,乙酸乙酯作为内标。进样方法:直接进样,进样量 1μl。程序升温:80℃保持 7min,后以 20℃/min 升至 180℃,保持 6min。(2)内标储备液的制备:精密称取乙酸乙酯 25mg,置 10ml 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度(2.5mg/ml)。对照品储备液的制备:精密称取薄荷醇 12.5mg,置 10ml 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度(1.25mg/ml)。(3)对照品溶液的制备(0.125mg/ml,杂质限度 0.5%):精密移取对照品储备液 1ml,内标储备液 1ml,置 10ml 量瓶中,加甲醇稀释至刻度。(4)样品溶液的制备(25.0mg/ml):精密称取恩曲他滨 250mg,置 10ml 量瓶中,加甲醇溶解,加内标储备液 1ml,并用甲醇稀释至刻度。

结 果

1. 残留溶剂检查结果:(1)定量限和检测限:精密称取各溶剂,分别以 DMSO:水(7:3)混合溶液逐步稀释。结果见表 1,在各溶剂限度水平内均能被有效检出并准确定量。(2)进样精密性:精密量取对照品溶液,平行进样 6 次,测定各溶剂峰面积,结果各溶剂峰面积的 RSD 均<3.0%。(3)回收率:精密称取同一批恩曲他滨样品 0.2g 6 份,分别加入对照溶液 0.5ml, DMSO:水(7:3)的混合溶液 0.5ml,密封。进样测定。结果甲醇、乙醇、乙醚、二氯甲烷、叔丁基甲基醚、正己烷、乙酸乙酯、环己烷、甲苯的回收率分别为 95.8%、102.4%、91.1%、84.1%、86.6%、97.4%、84.4%、93.8%、80.3%,各溶剂回收率均在 80% 以上,符合要求。(4)线性与范围:以对照溶液的浓度为 100%,考察各溶剂在 20%~150% 的浓度范围内,色谱峰面积与浓度的关系,见表 2。各溶剂回归曲线的相关系数(r^2)均在 0.995 以上。结果表明,各溶剂在对照溶液浓度的 20%~150% 的范围内,峰面积与浓度线性关系良好。(5)样品测定:取 3 个不同批号样品制备供试品溶液,在上述色谱条件下进样测定,详见表 3。

表 1 恩曲他滨残留溶剂检测限和定量限表(μg/ml)

溶剂名称	最低定量浓度	最低检测浓度
甲醇	0.54	0.16
乙醇	1.08	0.24
乙醚	0.11	0.02
二氯甲烷	0.78	0.16
叔丁基甲基醚	0.22	0.04
正己烷	0.65	0.13
乙酸乙酯	0.066	0.013
环己烷	2.1×10^{-7}	6.3×10^{-8}
甲苯	0.052	0.014

表 2 恩曲他滨残留溶剂线性与范围以及相关系数

溶剂	回归方程	r^2
甲醇	$y = 2019.2x - 7.0867$	0.9981
乙醇	$y = 2863.4x - 43.551$	0.9965
乙醚	$y = 26766x - 887.36$	0.9976
二氯甲烷	$y = 5476.5x - 30.51$	0.9968
叔丁基甲基醚	$y = 22752x - 542.11$	0.9981
正己烷	$y = 6666.7x + 6.3777$	0.9950
乙酸乙酯	$y = 9257x - 40.162$	0.9988
环己烷	$y = 30733x - 390.25$	0.9969
甲苯	$y = 22511x - 10.488$	0.9989

表 3 3 批产品残留溶剂的测定结果(%)

批号	甲醇	乙醇	乙醚	二氯甲烷	叔丁基甲基醚	正己烷	乙酸乙酯	环己烷	甲苯
080601	未检出	0.35	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
080602	未检出	0.40	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
080603	未检出	0.35	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
药典限度	0.3	0.5	0.5	0.06	0.5	0.029	0.5	0.388	0.089

2. 薄荷醇检查结果:(1)系统适用性:在上述色谱条件下,甲醇、乙酸乙酯、薄荷醇依次出峰,薄荷醇理论板数为 745645,乙酸乙酯与薄荷醇分离度为 100,且峰对称性良好,说明该方法的适用性良好(图 2)。(2)进样精密性:取 3 项下对照品溶液,在上述气相色谱条件下,连续进样 6 次,分别取乙酸乙酯、薄荷醇峰面积计算精密性,RSD% 分别为 0.98%、0.34%,表明该方法精密性良好。(3)线性与范围:薄荷醇回归曲线为 $y = 0.0097x - 3E-05, r^2 = 0.9998$ 。结果表明,薄荷醇在对照溶液浓度的 20% ~ 150% 的范围内,峰面积与浓度线性关系良好。(4)回收率:精密称取恩曲他滨 250mg 6 份,分别置 10ml 量瓶中,加甲醇溶解,再加内标储备液 1ml,对照品储备液 0.5ml,并用甲醇稀释至刻度。回收率结果见表 4。(5)检测限和定量限:取对照品储备液,用甲醇逐步稀释。结果显示,薄荷醇检测限为 0.51μg/ml,定量限为 1.53μg/ml。可见样品中残留的微量薄荷醇均能被检出。(6)恩曲他滨中薄荷醇的检测:采用经过方法学验证的薄荷醇气相色谱方法,对上述 3 批样品进行薄荷醇检测,结果在恩曲他滨样品中均未检出薄荷醇。

表 4 薄荷醇加样回收率结果

加对照储备液(ml)	加入浓度	测定浓度	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
0.5	0.06364	0.0672	105.6	103.2	1.67
0.5	0.06364	0.0655	102.9		
0.5	0.06364	0.0659	103.6		
0.5	0.06364	0.0665	104.5		
0.5	0.06364	0.0648	101.9		
0.5	0.06364	0.0642	100.9		

讨 论

原料药与辅料中有机溶剂主要来源于合成过程中的引入,包括:①作为合成原料或反应溶剂引入;②作为反应副产物引入;③由其他合成原料或其他溶剂带入。因此,本文除对恩曲他滨原料药生产工艺中用到的 9 种有机溶剂进行考察外,还对其重要的反应物及可能的副产物薄荷醇进行了考察。

残留溶剂样品配制溶剂及进样方式的选择:由于考察的溶剂多,极性相差大,因此对样品配制溶剂提出了要求。实验中发现,采用 DMSO - 水不同配比,随着水相比比例的增大,甲醇、乙醇、乙酸乙酯等极性较大的溶剂溶解较好。随着 DMSO 比例的增大,正己烷、环己烷等极性较小的溶剂溶解较好。经实验摸索,最终确定用 DMSO - 水(7:3)的混合溶液进行对照品的配制,解决了各类溶剂的溶解问题,提高了检测结果的准确性。恩曲他滨供试品浓度 0.2g/ml,直接进样对色谱柱的损害较大,同时在顶空预热 95℃ 的条件下更易于溶于 DMSO - 水(7:3)的混合溶剂中,因此残留溶剂检测采用顶空进样。

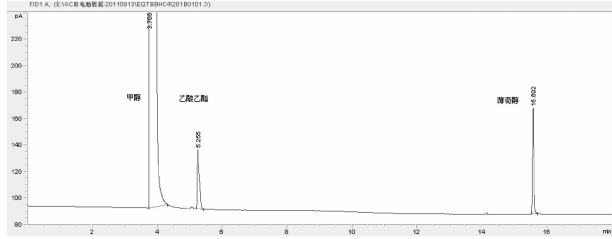


图 2 溶解溶剂、内标与薄荷醇分离气相色谱图

薄荷醇进样方法的选择:薄荷醇沸点较高,为 216.4℃,故采用气相色谱中的直接进样而不宜顶空进样。基于上述原因,残留溶剂检查与薄荷醇检查分开进行。薄荷醇检测采用内标法进行,内标乙酸乙酯和薄荷醇对照品峰面积相当,以确保测定结果的准确。

参考文献

1 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:二部[M]. 北京:化学工业出版社,2010:附录 29-31

2 刘杰. 顶空气相色谱法测定盐酸表柔比星中九种残留溶剂的含量[J]. 分析仪器, 2010, (3):21-24
3 周海钧. 药品注册的国际技术要求[M]. 北京:人民卫生出版社, 2006: 129-144
4 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:二部[M]. 北京:化学工业出版社,2010:附录 194-195
5 曾常青. 毛细管气相色谱法测定复方硼酸散中薄荷醇和苯酚的含量[J]. 现代食品与药品杂志, 2007, 17(3):36-38

(收稿日期:2012-05-02)

(修回日期:2012-12-01)

鼓膜外伤性穿孔愈合的上皮移行模式

陈华英

摘要 目的 观察鼓膜外伤性穿孔愈合过程上皮移行模式及其疗效。**方法** 耳内镜下动态观察 183 例 183 耳鼓膜外伤性穿孔的自然愈合过程中上皮移行模式,基于与穿孔中心的位置,将其分为向心性移行、向外移行和向内移行模式。**结果** 183 例中,131 例(71.6%)穿孔缘上皮向心性移行,52 例(39.4%)向外移行,未见向内移行。两组鼓膜穿孔闭合率分别为 96.9% 和 94.2%,差异无显著性($P>0.05$);平均闭合时间分别 19.3 ± 2.8 天和 38.1 ± 7.2 天($P<0.05$)。**结论** 耳内镜下可见鼓膜上皮两种移行模式:向心性移行和向外移行。上皮向外移行并没有影响愈合率,但延长穿孔闭合时间。

关键词 鼓膜穿孔 创伤 上皮移行

Epithelium Migration Pattern of Traumatic Tympanic Membrane Perforation Healing. Chen Huaying. Department of Otorhinolaryngology, Wenzhou Medical College-Affiliated Yiwu Hospital, Zhejiang 322000, China

Abstract Objective To observe the epithelium migration pattern during the spontaneous healing process and to evaluate the outcome. **Methods** The clinical records of traumatic TMP patients who met the case selection criteria were retrieved and categorized based on the documented migration pathways of the proliferating epithelial cells at the perforation margins into two groups: centripetal migration and outward migration. The demographic data and spontaneous healing outcomes (i.e., healing rate and time) of these two types of TMP were analyzed using the chi-square test or t -test. The otoendoscopic features were characterized. **Results** In all, 183 cases were analyzed. During the spontaneous healing process, perforations were associated with centripetal epithelial cell migration in 131 cases (71.3%) and with outward epithelial cell migration in 52 cases (28.4%). The overall perforation closure rates at the end of 6 months were 96.9% and 94.2% for the centripetal and outward migration groups, respectively ($P>0.05$). The average perforation closure times were 19.3 ± 2.8 and 38.1 ± 7.2 days, respectively ($P<0.05$). **Conclusion** Two patterns of epithelium migration were found by endoscopy. The outward epithelial migration did not affect the perforation spontaneous healing rate, however, it prolonged substantially the time to traumatic eardrum perforation closure.

Key words Tympanic membrane perforation; Traumatic; Epithelial migration

鼓膜外伤性穿孔是耳科常见疾病,大多数穿孔自然愈合^[1,2]。临床医生已经意识到鼓膜上皮移行对鼓膜愈合的重要性。许多动物实验研究了上皮移行模式^[3,4]。主要集中于两种鼓膜上皮移行模式^[3,4]。第 1 种模式为:向心性移行,上皮沿穿孔中心与鼓膜同一平面移行。第 2 种模式为:非向心性移行(离心性),上皮移行方向与闭合方向不在同一平面。许多

动物实验组织学证实了两种离心性移行模式^[3,4]。一种涉及鳞状上皮越过穿孔缘向内移行与鼓膜上皮结合(向内移行)^[3-5]。尽管该模式已经被组织学证实,内镜下很难识别其形态学,尤其对于小的穿孔。相反,楼正才等^[1]通过系列患者的动态观察提出另一种移行模式,向外移行模式,鼓膜穿孔缘上皮越过穿孔中心向外移行^[2,6]。实验和临床研究已经证实上皮向内移行可以导致慢性鼓膜穿孔^[3-5]。笔者目前的研究主要通过 122 例创伤性鼓膜穿孔自然愈合