

RP-HPLC 法测定左卡尼汀片中左卡尼汀杂质 A

刘 欢¹, 杨宏丽², 丁 一¹, 王成港¹

1. 天津药物研究院 天津市药物制剂工程技术研究中心, 天津 300193

2. 沈阳协合生物制药股份有限公司, 辽宁 沈阳 110179

摘 要: **目的** 建立反相高效液相色谱法测定左卡尼汀片中已知杂质左卡尼汀杂质 A。**方法** 色谱柱为 Waters μ BondapakTM NH₂ (300 mm×3.9 mm, 10 μ m); 流动相为 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液(用稀磷酸调节 pH 值 4.0) - 乙腈 (35 : 65); 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长为 205 nm; 进样量 20 μ L; 柱温为 30 $^{\circ}$ C, 外标法计算。**结果** 片剂中左卡尼汀杂质 A 与左卡尼汀能够完全分离, 空白辅料不干扰测定, 左卡尼汀杂质 A 在 5.01~75.15 μ g/mL 线性关系良好 ($r=1.000$)。左卡尼汀杂质 A 平均回收率为 100.8% (RSD=1.16%, $n=9$)。**结论** 经方法学考察, 左卡尼汀片中已知杂质左卡尼汀杂质 A 测定方法的专属性强, 准确可靠, 易于操作。左卡尼汀片中已知杂质左卡尼汀杂质 A 的量较低并且稳定。

关键词: 左卡尼汀片; 左卡尼汀; 左卡尼汀杂质 A; 高效液相色谱; 外标法

中图分类号: R927.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674 - 5515(2013)03 - 0334 - 04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2013.03.018

Determination of levocarnitine impurity A in Levocarnitine Tablets by RP-HPLC

LIU Huan¹, YANG Hong-li², DING Yi¹, WANG Cheng-gang¹

1. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

2. Shenyang Xiehe Bio-pharmaceutical Co., Ltd. Shenyang 110179, China

Abstract: **Objective** To develop a RP-HPLC method to determine levocarnitine impurity A in Levocarnitine Tablets. **Methods** The chromatographic conditions included Water μ BondapakTM NH₂ column (300 mm $\times$ 3.9 mm, 10 μ m) and 0.05 mol/L KH₂PO₄ (adjusted to pH 4.0 with diluted phosphoric acid)-acetonitrile (35 : 65) as the mobile phase at a flow rate of 1.0 mL/min, detected at 205 nm, injection volume was 20 μ L, and the column temperature was 30 $^{\circ}$ C, using external standard method to calculate. **Results** Impurity A and levocarnitine could be completely separated, and blank recipients did not influence the determination. There was a good linearity in the range of 5.01 — 75.15 μ g/mL ($r = 1.000$). The average recovery of levocarnitine impurity A was 100.8% (RSD = 1.16%, $n = 9$). **Conclusion** The established method is high selective, simple, and accurate. Amount of levocarnitine impurity A is little and stable in Levocarnitine Tablets.

Key words: Levocarnitine Tablets; levocarnitine; levocarnitine impurity A; HPLC; external standard method

左卡尼汀又称左旋肉毒碱, 是一种广泛存在于动物和人体内的氨基酸衍生物, 是参与体内脂肪酸代谢的重要物质, 其主要功能是将长链脂肪酸转运至线粒体, 进行 β 氧化并产生能量。患者因各种原因摄入和内源性合成减少, 使肉碱缺乏, 导致一系列临床表现, 如虚弱、乏力、肌肉痉挛、透析低血压、心绞痛、心律失常和心衰等。左卡尼汀主要用于治疗原发和继发性的左卡尼汀缺乏症。

由于左卡尼汀和左卡尼汀杂质 A 结构类似, 不易分离, 在国家药品质量标准中未对左卡尼汀原料

和制剂中左卡尼汀杂质 A 进行检测^[1]。本文参考美国药典^[2]和欧洲药典^[3]中左卡尼汀杂质 A 的测定方法, 采用高效液相色谱法, 以外标法计算左卡尼汀片中左卡尼汀杂质 A 的量。

1 仪器与材料

高效液相色谱仪包括: 201 型检测器、AS1000 型工作站、III 系二元洗脱泵(美国 Lablliance 公司), 梅特勒 MS105 型十万分之一电子天平(瑞士)。

左卡尼汀对照品(USP reference standard, 批号 G0B197, 质量分数 99.9%), 左卡尼汀杂质 A

收稿日期: 2013-01-028

作者简介: 刘 欢(1976—), 女, 湖南人, 理学硕士, 副研究员, 研究方向为药物新剂型与新技术。Tel: (022)23006879 E-mail: liuh@tjpr.com

(European Pharmacopoeia, 批号 907-F67029, 质量分数 99.9%), 左卡尼汀原料 (东北制药总厂, 批号 0171011001), 左卡尼汀片 (批号 2011001、2011002、2011003, 规格 330 mg/片), 上市品 Levocaritine Tablets (Corepharma LLC 公司, 批号 102021, 规格 330 mg/片), 磷酸二氢钾为分析纯 (天津市光复科技发展有限公司)、氢氧化钠为分析纯 (天津市天河化学试剂厂)、乙腈为色谱纯 (天津康科德科技有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Waters μ BondapakTM NH₂ 色谱柱 (300 mm $\times$ 3.9 mm, 10 μ m), 流动相为 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液 (用稀磷酸调节 pH 4.0) - 乙腈 (35:65), 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长为 205 nm, 进样量 20 μ L, 柱温为 30 $^{\circ}$ C。

2.2 溶液的制备

2.2.1 空白辅料的配制 精密称取空白辅料 47 mg 置 10 mL 量瓶中, 加流动相溶解并加至刻度, 摇匀, 用 0.45 μ m 滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

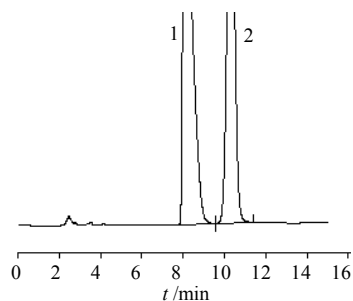
2.2.2 左卡尼汀原料溶液的配制 精密称取左卡尼汀原料 50 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加流动相溶解并加至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.3 左卡尼汀片粉溶液的配制 精密称取片粉 97 mg (含左卡尼汀约 50 mg), 置 10 mL 量瓶中, 加流动相溶解并加至刻度, 摇匀, 用 0.45 μ m 滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.4 左卡尼汀杂质 A 对照品溶液的配制 精密称取左卡尼汀杂质 A 对照品 12.5 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加水溶解并定容至刻度, 摇匀, 作为左卡尼汀杂质 A 对照品溶液储备液。精密量取左卡尼汀杂质 A 对照品溶液储备液 1 mL 置 10 mL 量瓶中, 加流动相至刻度, 摇匀, 作为左卡尼汀杂质 A 对照品溶液。

2.3 系统适应性

精密量取 1 mg/mL 左卡尼汀杂质 A 对照品溶液 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 另精密称取左卡尼汀对照品 100 mg 置同一量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 进样 20 μ L, 记录色谱图。左卡尼汀与左卡尼汀杂质 A 的分离度为 3.118, 不低于 0.9。结果见图 1。



1-左卡尼汀 2-左卡尼汀杂质 A

1-levocarnitine 2-levocarnitine impurity A

图 1 左卡尼汀和左卡尼汀杂质 A 分离度的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of resolution between levocarnitine and levocarnitine impurity A

2.4 专属性考察

分别将溶剂、流动相、空白辅料、左卡尼汀原料、左卡尼汀片粉、左卡尼汀杂质 A 对照品溶液进行专属性检查, 结果见图 2。可见溶剂和空白辅料不干扰左卡尼汀片中左卡尼汀杂质 A 的测定, 各个峰均有明确的归属, 且互相不干扰。原料和片剂中左卡尼汀和左卡尼汀杂质 A 分离度均大于 0.9, 符合欧洲药典的要求。

2.5 最小检出限和最小定量限

将左卡尼汀杂质 A 对照品溶液 (25 μ g/mL) 倍倍稀释成不同质量浓度, 注入液相色谱仪, 直至信噪比为 1:3 为止, 得到左卡尼汀杂质 A 的最小检出限为 1.8 ng。当信噪比为 1:10 时可以得到左卡尼汀杂质 A 的最小定量限为 6.0 ng。

2.6 线性关系考察

精密量取 1 mg/mL 左卡尼汀杂质 A 对照溶液 2.5 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 得到左卡尼汀杂质 A 贮备溶液 (250 μ g/mL)。分别精密量取上述贮备溶液 0.2、0.4、1.0、2.0、3.0 mL 置 10 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 进样 20 μ L, 记录色谱图, 以峰面积对质量浓度进行线性回归, 得回归方程为 $A=42\ 745\ C+7\ 862.4$ ($r=1.000$), 结果表明左卡尼汀杂质 A 在 5.01~75.15 μ g/mL 与峰面积线性关系良好。

2.7 精密度试验

左卡尼汀片 (批号 2011001) 制备样品溶液 (含左卡尼汀 5 mg/mL), 将该样品溶液在上述色谱条件下连续进样 6 次, 测定峰面积, 以外标法计算得左

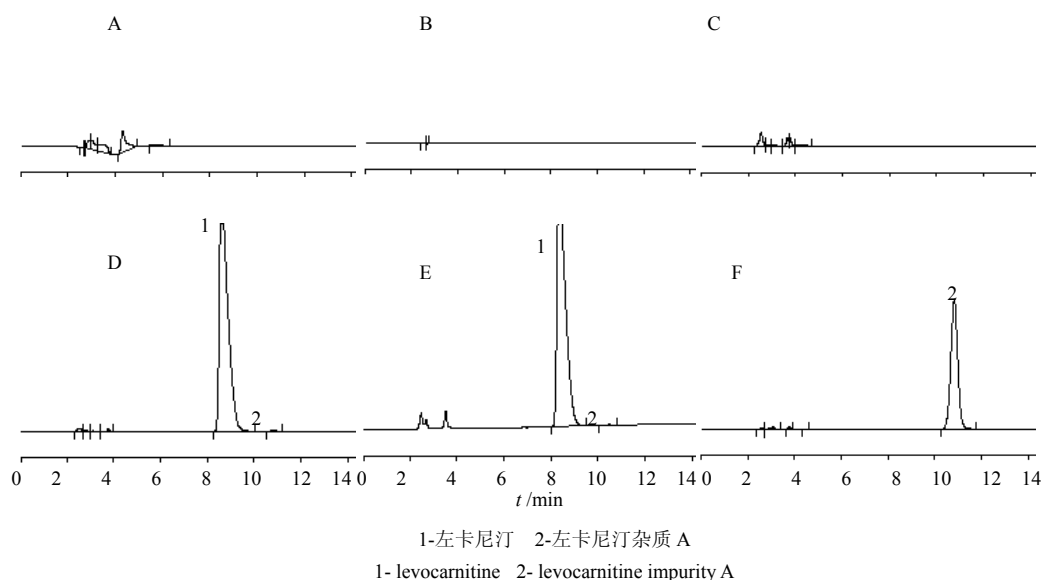


图 2 蒸馏水 (A)、流动相 (B)、空白辅料 (C)、左卡尼汀原料 (D)、左卡尼汀片中左卡尼汀杂质 (E) 和左卡尼汀杂质 A 对照品 (F) 的色谱图

Fig. 2 Chromatograms of distilled water (A), mobile phase (B), blank recipients (C), levocarnitine bulk drug (D), levocarnitine impurity A in Levocarnitine Tablets (E), and levocarnitine impurity A reference substance (F)

卡尼汀杂质 A 的平均质量分数为 0.003 2%, RSD 值为 1.45%。

2.8 稳定性试验

左卡尼汀片 (批号 2011001) 制备的样品溶液 (含左卡尼汀 5 mg/mL) 于室温放置, 分别于 0、2、4、6、8、12 h 进样, 记录色谱图, 以外标法测定左卡尼汀杂质 A 的量并计算 RSD 值。结果左卡尼汀杂质 A 的平均值为 0.002 9%, RSD 值为 1.63%。

2.9 回收率试验

由于原料和片剂中左卡尼汀杂质 A 的量较小, 测定左卡尼汀杂质 A 的回收率试验采用加样方式进行, 回收率试验采用 50%、100%、150% 3 个浓度梯度进行。

精密称取左卡尼汀杂质 A 对照品 10 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加水溶解并加至刻度, 摇匀。精密量取上述溶液 2.5 mL 置 100 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 作为 25 μ g/mL 左卡尼汀杂质 A 贮备液。

分别精密称取 9 份片粉 (内含左卡尼汀 50 mg, 批号 2011001) 置 10 mL 量瓶中, 加流动相溶解, 分别向量瓶中加入 0.5、1.0、1.5 mL 左卡尼汀杂质 A 贮备液, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 滤过。分别取供试品溶液和对照品溶液 20 μ L 注入高效液相

色谱仪中, 记录对照液中左卡尼汀杂质 A 峰面积和样品液中卡尼汀杂质 A 峰面积, 以外标法计算卡尼汀杂质 A 的回收率, 结果左卡尼汀杂质 A 的平均回收率为 100.8%, RSD 值为 1.16% ($n=9$)。

2.10 样品测定

精密称取左卡尼汀片粉适量, 加流动相制成 5 mg/mL 溶液, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。精密量取左卡尼汀杂质 A 对照品 12.5 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加水溶解并加至刻度, 摇匀, 作为左卡尼汀杂质 A 对照品溶液储备液。精密量取左卡尼汀杂质 A 对照品溶液储备液 1 mL 置 10 mL 量瓶中, 加流动相至刻度, 摇匀, 作为左卡尼汀杂质 A 对照品溶液。精密量取供试溶液和左卡尼汀杂质 A 对照品溶液注入液相色谱仪。按外标法计算左卡尼汀杂质 A 的量, 每批样品测定两份, 结果见表 1。

表 1 左卡尼汀片中左卡尼汀杂质 A 的测定结果

Table 1 Determination of levocarnitine impurity A in Levocarnitine Tablets

批 号	左卡尼汀杂质 A/%
2011001	0.003 5
2011002	0.003 2
2011003	0.003 6
102021	0.011 9

3 讨论

左卡尼汀紫外吸收较差,并且结构与左卡尼汀杂质 A 类似,左卡尼汀杂质 A 结构式中具有共轭双键,因此与左卡尼汀相比具有较强的紫外吸收。经试验证明,采用常规的 C₁₈ 柱、氨基柱或苯基柱均不能将两者有效分离。

现有国家药品标准中左卡尼汀有关物质测定方法也不能将左卡尼汀和左卡尼汀杂质 A 分开。参考《美国药典》和《欧洲药典》的相关方法,本实验采用丙氨基甲基硅烷键合硅胶柱在 205 nm 处使左卡尼汀和左卡尼汀杂质 A 完全分离,经方法学验证,该方法专属性强、灵敏度高、准确可靠、易于操作。

经耐用性考察发现:随着水相 pH 值增大,左卡尼汀和左卡尼汀杂质 A 的出峰时间也增加,水相 pH 值在 3.7~4.0 左卡尼汀杂质 A 出峰时间比较接

近,当水相 pH 值大于 4.0 时,如水相 pH 值为 4.3 时左卡尼汀杂质 A 保留时间比水相 pH 为 4.0 时增加了 2 倍,综合考虑分离度和保留时间,选择水相 pH 值为 4.0。

在方法学验证中进行了强降解试验的考察,经 1mol/L HCl 强酸、1mol/L NaOH 强碱、(4 500±500) lx 光照、水浴 80 ℃加热/5%双氧水氧化破坏,左卡尼汀杂质 A 在强降解条件下比较稳定,未见明显增加。新增杂质峰能够与左卡尼汀杂质 A 峰完全分离,不干扰左卡尼汀杂质 A 峰的测定。

参考文献

- [1] 国家食品药品监督管理局. 国家药品标准 [S]. WS1-(X-085)-2005Z& WS1-(X-427)-2004Z.
- [2] 美国药典 [S]. 27 版. 2004: 1077-1079.
- [3] 欧洲药典 [S]. 2000: 889-890.