

HPLC 法测定左卡尼汀注射液的含量及有关物质*

宋青青^{1,2} 张倩¹ 赵云芳¹ 李军¹ 曲昌海^{1**} 屠鹏飞^{1**}

(1. 北京中医药大学中药现代研究中心, 北京 100029; 2. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

摘要 目的: 建立简便快捷的左卡尼汀注射液含量及有关物质测定方法。方法: 采用 Alltech® Brava Amino 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 柱温 40 °C, 以 0.01 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液-乙腈(25:75) 为流动相, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 205 nm。结果: 左卡尼汀与各有关物质及降解产物色谱峰分离度良好, 各杂质峰互不干扰。左卡尼汀、杂质 A、杂质 B、杂质 C、杂质 D 质量浓度分别在 436.2 ~ 2 617、3.5 ~ 87.4、2.8 ~ 56、1.79 ~ 44.8、2.54 ~ 50.8 μg·mL⁻¹ 范围内线性关系良好, 平均回收率($n=9$) 分别为 100.0%、100.1%、101.6%、95.7% 和 102.5%, 其定量限($S/N=10$) 分别为 167.50、4.20、22.40、60.48 和 30.48 ng。结论: 方法学验证结果表明, 本法可用于左卡尼汀注射液的质量控制。

关键词: 氨基酸衍生物; 左卡尼汀; 有关物质; 高效液相色谱法

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2015)02-0301-05

HPLC determination of the content and related substances of levocarnitine injection*

SONG Qing-qing^{1,2} ZHANG Qian¹ ZHAO Yun-fang¹,
LI Jun¹ QU Chang-hai^{1**} TU Peng-fei^{1**}

(1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

Abstract Objective: To establish an HPLC method for the determination of the content and related substances of levocarnitine injection. **Methods:** The Alltech® Brava Amino column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used with a mobile phase consisting of 0.01 mol·L⁻¹ potassium dihydrogen phosphate buffer solution and acetonitrile (25:75) at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 205 nm and the column temperature was 40 °C. The injection volume was 10 μL. **Results:** The related substances and degraded products were completely separated from levocarnitine. And an excellent separation was achieved for the related substances. The calibration curves for levocarnitine, impurity A, impurity B, impurity C and impurity D revealed good linearities in the range of 436.2 ~ 2 617 μg·mL⁻¹, 3.5 ~ 87.4 μg·mL⁻¹, 2.8 ~ 56 μg·mL⁻¹, 1.79 ~ 44.8 μg·mL⁻¹, 2.54 ~ 50.8 μg·mL⁻¹, respectively. The average recoveries ($n=9$) of the above compounds were 100.0%, 100.1%, 101.6%, 95.7% and 102.5%, respectively. The limits of quantification ($S/N=10$) of these compounds were 167.50 ng, 4.20 ng, 22.40 ng, 60.48 ng and 30.48 ng respectively. **Conclusion:** The methodological validation results indicate that the established method can be applied to quality control of levocarnitine injection.

Key words: amino acid derivative; levocarnitine; related substances; HPLC

左卡尼汀(结构式见图 1)是一种氨基酸衍生物, 又称左旋肉碱, 是哺乳动物能量代谢必需的体内天然物质, 其作用主要为促进脂质代谢。左卡尼汀

注射液在临床上应用广泛, 效果良好, 是治疗心力衰竭的首选药物, 主要用于慢性肾衰竭及血液透析者肉碱缺乏性疾病, 目前已被美国药典^[1] 和我国国家

* 北京中医药大学自主选题项目(2014-JYBZZ-JS-023)

** 通信作者 曲昌海 Tel: (010) 64286180; E-mail: 13911753617@139.com

屠鹏飞 Tel: (010) 82802750; E-mail: pengfeitu@163.com

第一作者 Tel: 15201505263; E-mail: song_qingq@163.com

药品标准目录^[2] 收载。但我国现有制剂标准中,并未设定其有关物质的检查项。目前的研究^[3-10] 中,也多以左卡尼汀及杂质 A 为主,未见其他杂质的相关报道。我国的新药研究领域,有关物质逐步引起人们的重视,为提高用药安全性,在研发过程中通常需对原料和制剂中的有关物质进行详细的研究。欧洲药典^[11] 和英国药典^[12] 收载的左卡尼汀原料药质量标准中,列出了其中常见的 4 种杂质,即杂质 A、杂质 B、杂质 C 和杂质 D(结构式见图 1),但仅对杂质 A 的量进行了限定(不超过 0.5%)。两部药典中所用色谱柱为丙胺基甲基硅烷基键合硅胶柱,柱子填料和规格在国内并不常见。经本课题组验证,使用该两部药典中的色谱条件无法使主峰与杂质 A 峰完全分离,且无法有效区分杂质 B、C 和 D。故本研究建立一种可同时用于左卡尼汀含量和各有关物质的测定方法,使左卡尼汀主峰、杂质 A、杂质 B、杂质 C 和杂质 D 5 个色谱峰均能完全分开,以提高药品的质量标准 and 安全性,为该品种的研发及质量标准的建立和提高提供保证。

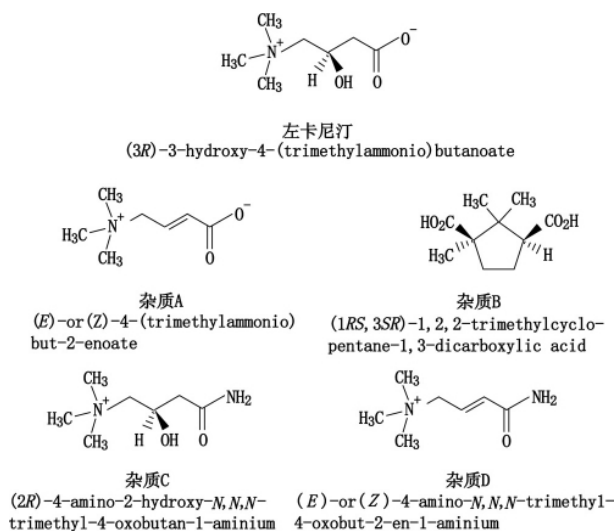


图 1 左卡尼汀、杂质 A、杂质 B、杂质 C、杂质 D 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of levcarnitine, impurity A, impurity B, impurity C and impurity D

1 仪器与试剂

岛津分析型高效液相色谱仪(二极管阵列检测器、二元高压梯度泵、真空脱气机、柱温箱、自动进样器;色谱工作站);超声波清洗器(南京垒君达超声设备有限公司);METTLER 实验室 pH 计(梅特勒-托利多仪器有限公司);METTLER XS105 型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)。

对照品左卡尼汀(批号 L0399900)、杂质 A(批

号 L0399905)、杂质 B(批号 1418-064A1)、杂质 C(批号 1394-016A2) 购于欧洲药品质量管理局,杂质 D(批号 MS200705-05A) 购于深圳德博瑞生物科技有限公司,纯度均大于 98%;左卡尼汀原料药(批号 0171302002) 购于东北制药集团股份有限公司;左卡尼汀注射液(3 批中试放大注射液由悦康药业集团有限公司生产,其他由北京中医药大学中药现代研究中心研制)。乙腈为色谱级,水为超纯水,其他为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 供试品溶液 I 精密吸取左卡尼汀注射液 0.5 mL 于 50 mL 量瓶中,用流动相稀释并定容至刻度,摇匀,即得。

2.1.2 供试品溶液 II 精密吸取左卡尼汀注射液 0.5 mL 于 10 mL 量瓶中,用流动相稀释并定容至刻度,摇匀,即得。

2.1.3 对照品储备液 分别称取左卡尼汀、杂质 A、杂质 B、杂质 C 和杂质 D 的对照品适量,精密称定,加流动相制成质量浓度分别为 2.62、87.40、56.00、44.80 和 50.80 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,摇匀,即得。

2.1.4 对照溶液 精密吸取供试品溶液 II 10 μL 于 10 mL 量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2 色谱条件

采用 Alltech® Brava Amino 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm 5 μm),流动相为 0.01 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液-乙腈(25:75),流速 1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温为 40 $^{\circ}\text{C}$,检测波长 205 nm,进样量 10 μL 。

2.3 系统适用性试验

按上述色谱条件,左卡尼汀峰与杂质峰分离度大于 1.5,理论塔板数按左卡尼汀计大于 3 000,结果见图 2。

2.4 专属性考察

分别精密称取 5 份左卡尼汀原料药适量,置于 25 mL 量瓶中。取 2 份分别加入 1.0 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸和 1.0 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液各 5 mL,室温放置 1 h 后中和并加流动相至刻度;取 1 份加入 30% 过氧化氢溶液 8 滴,室温放置 1 h 后加流动相至刻度;最后 2 份分别加入 1.0 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸和 1.0 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液各 5 mL,放置于烘箱(57 $^{\circ}\text{C}$) 0.5 h 后中和,加流动相至刻度。上述 5 份处理过的样品摇匀静置,滤过,取续滤液进样测定,结果见图 3。

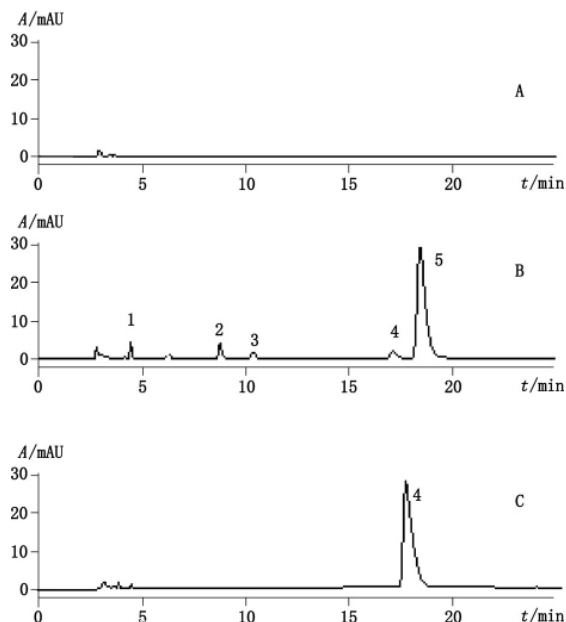


图2 空白溶剂(A)、混合对照品(B)及供试品溶液I(C)色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of blank solvent (A), mix standards (B) and test solution I (C)

1. 杂质 B (impurity B) 2. 杂质 D (impurity D) 3. 杂质 C (impurity C) 4. 左卡尼汀 (levocarnitine) 5. 杂质 A (impurity A)

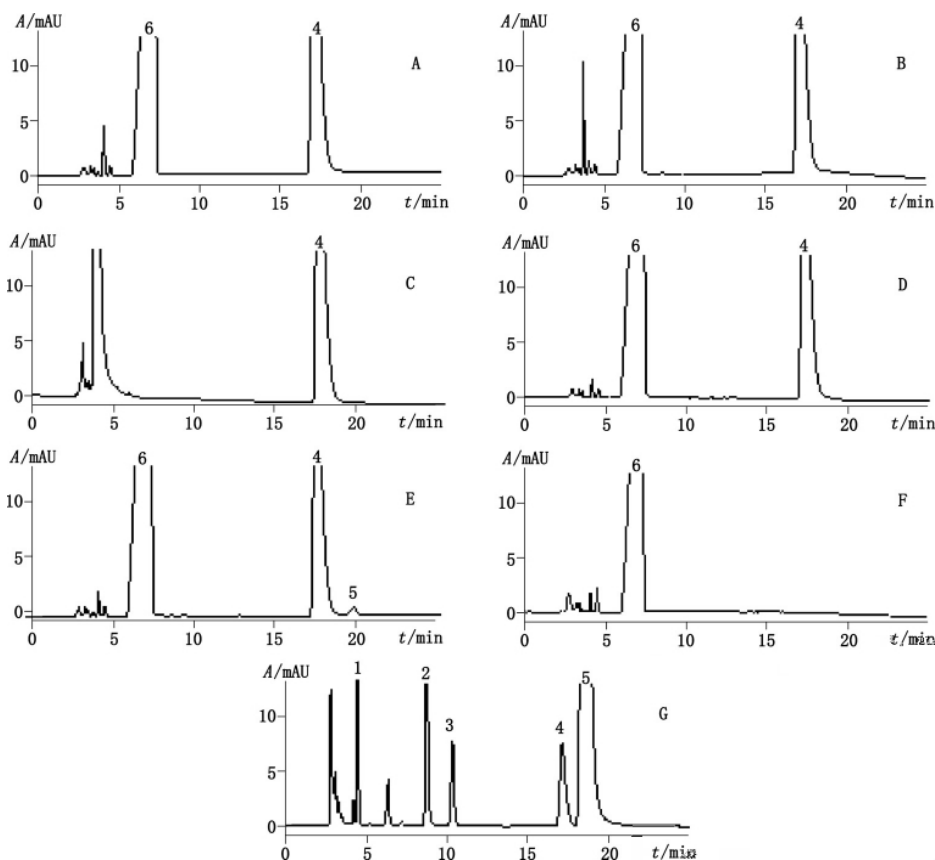


图3 专属性试验色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of the specificity test

A. 酸破坏 (sample treated by acid) B. 碱破坏 (sample treated by base) C. 氧化破坏 (sample treated by oxidation) D. 酸高温破坏 (sample treated by acid and high temperature) E. 碱高温破坏 (sample treated by base and high temperature) F. 流动相 + 盐酸 (mobile phase and hydrochloric acid) G. 混合对照品 (mix standards)

1. 杂质 B (impurity B) 2. 杂质 D (impurity D) 3. 杂质 C (impurity C) 4. 左卡尼汀 (levocarnitine) 5. 杂质 A (impurity A) 6. 盐酸 (hydrochloric acid)

由图3可知,左卡尼汀原料药在碱加热破坏情况下可产生杂质A,在其他条件下并无明显杂质出现。各杂质峰与左卡尼汀峰分离良好,表明该色谱条件适用于有关物质的测定。

2.5 检测限和定量限

将“2.1.3”项下对照品储备液用流动相逐步稀释成不同浓度,注入液相色谱仪,分别以信噪比3:1和10:1为标准测定各成分的检测限和定量限,结果见表1。

2.6 线性关系考察

分别精密吸取左卡尼汀及各杂质的对照品储备液,加流动相制成不同浓度的系列对照品溶液,精密吸取10 μ L注入高效液相色谱仪,以各自的峰面积A对其浓度C进行线性回归,结果见表1。结果表明左卡尼汀及各杂质在其各自浓度范围内线性关系良好。

2.7 精密度试验

2.7.1 日内精密度 按“2.1.1”项下方法配制供试品溶液I 6份,按“2.2”项下色谱条件连续进样6次,计算左卡尼汀峰面积的RSD ($n=6$) 为1.1%。精密

表 1 5 种成分的标准曲线、定量限和检测限

Tab. 1 The results of linear regression LOQ and LOD

成分 (component)	标准曲线 (regression equation)	线性范围 (linear range) / (μg · mL ⁻¹)	<i>r</i>	定量限 (LOQ) / ng	检测限 (LOD) / ng
左卡尼汀(levocarnitine)	$Y = 4.700 \times 10^5 X - 1.758 \times 10^4$	436.2 ~ 2 617	0.999 8	167.50	43.62
杂质(levocarnitine impurity) A	$Y = 2.855 \times 10^4 X - 1.020 \times 10^4$	3.5 ~ 87.4	1.000 0	4.20	1.05
杂质(levocarnitine impurity) B	$Y = 563.5X + 323.1$	2.8 ~ 56	0.999 4	22.40	10.08
杂质(levocarnitine impurity) C	$Y = 868.8X - 858.2$	1.79 ~ 44.8	0.999 6	60.48	17.92
杂质(levocarnitine impurity) D	$Y = 1.527 \times 10^3 X - 1.504 \times 10^3$	2.54 ~ 50.8	0.999 7	30.48	11.18

量取“2.1.3”项下各杂质对照品储备液,分别按“2.2”项下色谱条件连续进样6次,结果左卡尼汀、杂质A、杂质B、杂质C、杂质D峰面积的RSD($n=6$)依次为1.1%、0.42%、0.98%、1.5%、1.5%。结果表明仪器的精密度良好。

2.7.2 日间精密度 分别精密量取供试品溶液I和各杂质对照品储备液,按“2.2”项下色谱条件连续3d进样,每日进样2次,结果左卡尼汀、杂质A、杂质B、杂质C、杂质D峰面积的RSD($n=6$)依次为0.72%、0.30%、12.3%、2.7%、2.1%,结果表明仪器的精密度良好。

2.8 稳定性试验

精密量取供试品溶液I,室温放置,分别按“2.2”项下色谱条件于0、2、4、6、8、12h进样测定,结果左卡尼汀峰面积的RSD为0.22%。表明供试品溶液在12h内稳定。

2.9 回收率试验

2.9.1 左卡尼汀加样回收率 取供试品溶液I 3份,分别加入左卡尼汀低、中、高3种质量浓度(相当于供试品溶液I中左卡尼汀量的80%、100%、120%)的对照品溶液,摇匀,即得供试溶液。按“2.2”项下色谱条件每种质量浓度的供试溶液连续进样3次,记录色谱峰面积,结果见表2。低、中、高3种质量浓度的平均回收率($n=9$)为100.0%(RSD=0.93%)。

表 2 左卡尼汀回收率试验

Tab. 2 The results of the levocarnitine recovery

样品量 (sample amount) /mg	加入量 (amount added) /mg	回收率 (recovery) /% ($n=3$)	RSD/%
1.099	0.785	100.2	1.3
	1.005	100.7	0.33
	1.203	99.3	0.56

2.9.2 杂质A、杂质B、杂质C、杂质D的回收率 分别精密称取杂质A、B、C、D对照品1.10、1.38、1.94、1.58mg于50mL量瓶中,用流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,制得各供试溶液(视为浓度100%)。并以此配制80%、120%浓度的供试溶液。每个浓度的供试溶液分别按“2.2”项下色谱条件连续进样3次,记录色谱峰峰面积并计算其回收率。结果杂质A、杂质B、杂质C、杂质D的平均回收率($n=9$)分别为100.1%(RSD=0.53%)、101.6%(RSD=6.0%)、95.7%(RSD=3.6%)、102.5%(RSD=2.1%)。

3 含量测定及其有关物质测定

取中试放大的3批左卡尼汀注射液,分别按“2.1.1”、“2.1.2”及“2.1.4”项下方法制备供试品溶液I、供试品溶液II及对照溶液,按“2.2”项下色谱条件进样分析,以外标法计算左卡尼汀和杂质A含量,以自身对照法计算其他杂质含量,测定结果见表3。

表 3 3 批左卡尼汀注射液的含量及有关物质测定结果(%)

Tab. 3 Determination results of levocarnitine injection content and its related substances in three batches of samples

批号 (batch number)	含量 (content)	杂质 A (impurity C)	杂质 B (impurity B)	杂质 C (impurity C)	杂质 D (impurity C)	其他杂质 (other impurity)
20140601Y	100.48	0.002 5	未检出 (not detected)	未检出 (not detected)	未检出 (not detected)	未检出 (not detected)
20140602Y	97.94	0.002 0	未检出 (not detected)	未检出 (not detected)	未检出 (not detected)	0.023
20140603Y	99.22	0.002 3	未检出 (not detected)	未检出 (not detected)	未检出 (not detected)	未检出 (not detected)

4 讨论

4.1 氨基柱的使用及色谱峰的分离

在本研究所建立的色谱方法中,用前充分平衡色谱柱以及柱温的选择是有效分离的关键。将氨基柱作为反相色谱柱使用,存在表面键合基团易流失的问题,故对于新的色谱柱,需使用不含盐的流动相进行 24 h 以上的平衡,否则会出现保留时间偏移等问题;另外,柱温对左卡尼汀和杂质 A 的分离度有明显的影响,在柱温 40 °C 时,两者的分离度可达到 1.5 以上,实现完全分离。而在美国药典中,两者所规定的分离度为 1.2。

4.2 缓冲盐浓度的选择

文献^[3,8-9]报道左卡尼汀分析方法对流动相的 pH 要求严格,需调节至 4.70 使用,故流动相宜采用缓冲盐系统。在本研究中,对比了不同浓度的磷酸盐缓冲液(0.01 ~ 0.05 mol · L⁻¹),结果发现,在未调节 pH 的情况下,缓冲盐浓度对出峰情况没有明显的影响。从节约色谱柱和仪器寿命角度考虑,本实验选择了 0.01 mol · L⁻¹ 的磷酸盐缓冲液。这是目前已有报道的左卡尼汀分析方法中磷酸盐浓度的最低值。

4.3 色谱条件的确定

研究过程中曾采用国家药品标准左卡尼汀注射液含量测定方法,常规 C₁₈ 色谱柱,使用离子对试剂作为流动相,将混合对照品溶液注入高效液相色谱仪,结果发现左卡尼汀与杂质 A 分离度较差,杂质 B、杂质 C 和杂质 D 与溶剂峰混在一起,无法分离,且流动相的配制较烦琐。故在本研究中,最终采用常规氨基柱,在对柱温(30、35、40 °C)、流速(0.8、1.0、1.2 mL · min⁻¹)、水相比(20%、25%、30%、35%)进行对比研究的基础上,确定了“2.2”项下色谱条件。

5 结论

本文建立了优化的左卡尼汀注射液含量测定和有关物质检测的 HPLC 法,并对该方法进行了完整的方法学验证。通过以上试验结果表明,所建方法专属性、精密度、线性与范围、准确度均符合要求,能够准确地对左卡尼汀注射液进行含量测定及有关物质的分析。该方法克服了国外药典中色谱柱不易得、国家药品标准中流动相配制烦琐、杂质 B、C、D

分离度不好等多个问题,可使左卡尼汀及 4 个相关杂质峰得到较好分离和定量测定,可为左卡尼汀注射液质量控制和质量标准的建立提供可靠手段。

参考文献

- [1] USP 32 - NF 27 [S]. 2009: 2769
- [2] SFDA(国家食品药品监督管理局). WS1 - (X - 023) - 2005Z [S]. 2005
- [3] MIN CE(闵翠娥), LU Y(陆媛), JIANG SY(江少仪), et al. HPLC determination of levocarnitine injection and its related substances(HPLC 法测定左卡尼汀注射液含量及有关物质) [J]. J Guangdong Pharm Univ(广东药学院学报), 2009, 25(6): 588
- [4] SHAO XF(邵秀芬), YAN L(严琳), WANG JS(汪江山), et al. Study on the determination of the L - carnitine tablets by ion - pair RP - HPLC(离子对 RP - HPLC 法测定左卡尼汀片剂的含量) [J]. Prog Pharm Sci(药学进展), 2004, 28(3): 131
- [5] GAO LJ(高立军), WANG T(王涛), QUAN DQ(全东琴). A HPLC - method of determination of content of levocarnitine injection(高效液相色谱法测定左卡尼汀注射液的含量) [J]. Sci Technol Eng(科学技术与工程), 2011, 11(30): 7494
- [6] ZHAO G(赵刚), LING L(凌林). HPLC measurement of levocarnitine content and related substances in levocarnitine and sodium chloride injection(HPLC 法测定左旋卡尼汀氯化钠注射液含量及有关物质) [J]. Anhui Med Pharm J(安徽医药), 2005, 9(12): 908
- [7] CAO QR, REN S, PARK MJ, et al. Determination of highly soluble L - carnitine in biological samples by reverse phase high performance liquid chromatography with fluorescent derivatization [J]. Arch Pharm Res, 2007, 30(8): 1041
- [8] GAO LJ(高立军), WANG T(王涛), QUAN DQ(全东琴). An ion pair reversed phase high performance liquid chromatography method for determination of impurity A in levocarnitine injection (反相离子对高效液相色谱法测定左卡尼汀注射液中杂质 A 的含量) [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2013, 33(7): 1151
- [9] LIU H(刘欢), YANG HL(杨宏丽), DING Y(丁一), et al. Determination of levocarnitine impurity A in levocarnitine tablets by RP - HPLC(RP - HPLC 法测定左卡尼汀片中左卡尼汀杂质 A) [J]. Drugs Clin(现代药物与临床), 2013, 28(3): 334
- [10] DĄBROWSKA M, STAREK M. Analytical approaches to determination of carnitine in biological materials, foods and dietary supplements [J]. Food Chem, 2014, 142: 220
- [11] EP 7.0 [S]. 2011: 2355
- [12] BP 2009 [S]. 2009: 1339

(本文于 2014 年 7 月 17 日收到)