

## 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

高立军, 王涛, 全东琴\*

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

**摘要** 目的: 建立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。方法: 采用 Zorbax SB - C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为磷酸盐缓冲液 [取磷酸 11.5 mL, 加水约 1800 mL, 用 1 mol · L<sup>-1</sup> 氢氧化钠溶液调 pH 至 3.0, 加水至 2000 mL], 加庚烷磺酸钠 1.1 g, 振荡使溶解 - 甲醇(95:5), 流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, 检测波长为 215 nm。结果: 左卡尼汀杂质 A 与主药峰得到良好分离, 分离度达到 1.772, 在 1 ~ 100 μg · mL<sup>-1</sup> 的范围内, 杂质 A 浓度与峰面积之间呈现良好线性关系,  $r^2 = 0.9996$  ( $n = 6$ )。3 批左卡尼汀注射液中杂质 A 的平均含量为 0.0052%。结论: 该方法简便、准确、专属, 可用于该注射液的质量控制。

**关键词:** 左卡尼汀注射液; 杂质 A; 氯化 3-羧基-N,N,N-三甲基-2-丙烯-1-铵; 离子对高效液相色谱法; 有关物质控制

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2013)07-1151-06

## An ion pair reversed phase high performance liquid chromatography method for determination of impurity A in levocarnitine injection

GAO Li-jun, WANG Tao, QUAN Dong-qin\*

(Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

**Abstract Objective:** To establish a method to determine the impurity A content of levocarnitine injection by the ion pair high performance liquid chromatography. **Methods:** The Zorbax SB - C<sub>18</sub> column(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used with a mobile phase consisting of phosphate buffer solution [(11.5 mL phosphoric acid was dissolved in 1800 mL water, adjusted to pH = 3.0 using 1 mol · L<sup>-1</sup> sodium hydroxide solution, and then brought up to full volume 2000 mL with water), finally 1.1 g sodium heptanesulfonate was added and dissolved by shaking] and methanol (95:5) at a flow rate of 1.0 mL · min<sup>-1</sup>; the detection wavelength was 215 nm. **Results:** Levocarnitine and impurity A was completely separated by this method, and their resolution was 1.772. The linearity of peak area of impurity A was good in the range of 1 - 100 μg · mL<sup>-1</sup> ( $r^2 = 0.9996$ ,  $n = 6$ ). The average content of impurity A in levocarnitine injection was 0.0052%. **Conclusions:** The established method is specific, accurate and convenient, which can be used for quality control of levocarnitine injection.

**Key words:** levocarnitine injection; impurity A; ion pair high performance liquid chromatography; relative substances control

左卡尼汀(Levocarnitine)注射液首先由美国 Sigma-Tan 制药研制生产,并于 1999 年 12 月通过 FDA 批准上市,用于治疗尿毒症治疗期的患者。

杂质 A 的化学名为氯化 3-羧基-N,N,N-三甲基-2-丙烯-1-铵,结构中含有共轭结构,杂质 A 的响应值远远大于左卡尼汀(图 1),需要对其进行单独定量。美国药典(USP 31)、欧洲药典(EP 5.0)色谱条件中选用的色谱柱比较

特殊(如欧洲药典采用氨基丙基甲基硅胶柱,美国药典色谱柱填料为 L8),本研究立足于国内,参考国家药品标准对左卡尼汀原料有关物质的检查方法及进口药品(卡尔特)产品质量标准中含量测定 HPLC 条件,建立了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,该方法简便、准确、专属,可用于该注射液的质量控制<sup>[1-3]</sup>。

\* 通讯作者 Tel: (010) 66931636; Fax: (010) 68211656; E-mail: qdqwb@163.com

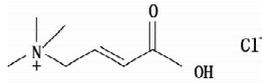


图1 杂质 A 的化学结构

Fig 1 Chemical structure of impurity A

## 1 仪器与试剂

仪器: 日立 L-7100 型高效液相色谱仪; 左卡尼汀对照品为美国药典标准品; 左卡尼汀杂质 A 对照品为美国药典标准品; Zorbax SB-C<sub>18</sub> 柱(5 μm A. 6 mm × 250 mm); 日本岛津 160A 分光光度计; Orion 710 型 pH 计; 德国 R200D Sartorius 电子天平;

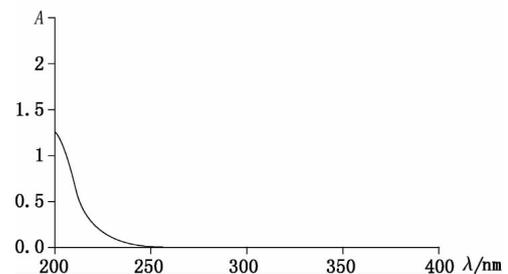
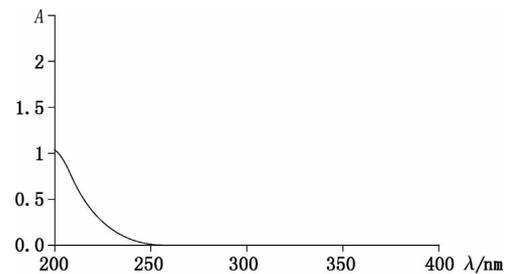
试剂: 甲醇为色谱纯; 氢氧化钠、磷酸、庚烷磺酸钠为分析纯; 水为双蒸馏水。左卡尼汀对照品(纯度 99.5%) 及注射液(规格 5 mL: 1 g) 由军事医学科学院毒物药物研究所研制。对照药品为: 左卡尼汀注射液(规格 5 mL: 1 g, 商品名雷卡); 常州兰陵制药有限公司。批号: 0802031。左卡尼汀注射液(规格 5 mL: 1 g, 商品名可益能); Sigma-tau Industrie Farmaceutiche Riunite s. p. a (Rome) Italy 公司。批号: 080052、060524。

## 2 方法与结果

**2.1 检测波长的选择** 精密吸取左卡尼汀注射液 1 mL, 加水制成每 1 mL 含 2 mg 的溶液作为供试品溶液, 在 200~400 nm 范围进行全波长扫描, 结果显示左卡尼汀无特征吸收峰, 在 200~230 nm 有末端吸收。同时将左卡尼汀杂质 A、强碱破坏降解后样品进行紫外扫描, 在 200~230 nm 有末端吸收(图 2), 同时将左卡尼汀杂质 A、强碱破坏降解后样品进行紫外扫描, 在 200~230 nm 有末端吸收。检测波长 205 nm、215 nm 处左卡尼汀杂质 A、强碱破坏降解后样品的吸光度分别为 0.648、0.231 和 1.781、1.840。结果可知, 杂质 A 在检测波长 205 nm 响应值大于 215 nm, 强碱破坏样品在检测波长 205 nm 响应值与 215 nm 相近。测定检测波长为 215 nm 甲醇系统左卡尼汀杂质 A 的检测限约为 2 ng, 灵敏度已完全满足测定要求(相当于主药 0.005%), 另外, 在试验中发现: 检测波长 205 nm 乙腈系统基线波动比较大, 结合杂质测定的稳定性及检测的灵敏度, 确定波长为 215 nm, 选用磷酸盐-甲醇系统。

### 2.2 流动相的选择

采用水相为磷酸盐缓冲液, 配制方法: 取磷酸 11.5 mL, 加水约 1800 mL, 用 1 mol·L<sup>-1</sup> 氢氧化钠

图2 2 mg·mL<sup>-1</sup> 左卡尼汀溶液(A) 和杂质 20 μg·mL<sup>-1</sup> A 溶液的紫外扫描图Fig 2 UV spectra of 2 mg·mL<sup>-1</sup> levocarnitine solution (A) and 20 μg·mL<sup>-1</sup> impurity A solution (B)

溶液调 pH, 加水至 2000 mL, 加庚烷磺酸钠 1.1 g, 振摇使溶解。有机相为甲醇。

选择流动相, 对不同 pH、有机相、水相不同比例进行优化筛选, 结果表明: 按照左卡尼汀注射液(卡尔特) 进口产品质量标准中含量测定的 HPLC 条件(序号 4) 及左卡尼汀原料药国家质量标准杂质检查的 HPLC 条件(序号 6), 主药与强碱降解产物没有分离开, 只有当 pH 调至 3.0, 有机相、水相比例为 95:5 时, 主药与杂质 A 及强酸、强碱降解产物的分离度良好, 符合规定。结果见图 3、图 4 与表 1。

**2.3 系统适用性试验** 色谱柱为 Zorbax SB-C<sub>18</sub> 柱(5 μm A. 6 mm × 250 mm); 流动相为磷酸盐缓冲液[取磷酸 11.5 mL, 加水约 1800 mL, 用 1 mol·L<sup>-1</sup> 氢氧化钠溶液调 pH 至 3.0, 加水至 2000 mL], 加庚烷磺酸钠 1.1 g, 振摇使溶解]-甲醇(95:5); 检测波长 225 nm; 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 进样 20 μL。在该色谱条件下, 对照品与杂质 A 的色谱图, 见图 5。杂质 A 的理论塔板数为 7832, 左卡尼汀与杂质 A 分离度为 1.788。空白辅料及流动相在规定的时间内无杂质峰出现, 对测定无干扰。

**2.4 检测限与定量限** 按照 S/N=3 计算左卡尼汀杂质 A 检测限为 4 ng; 按照 S/N=10 计算左卡尼汀杂质 A 定量限为 10 ng。

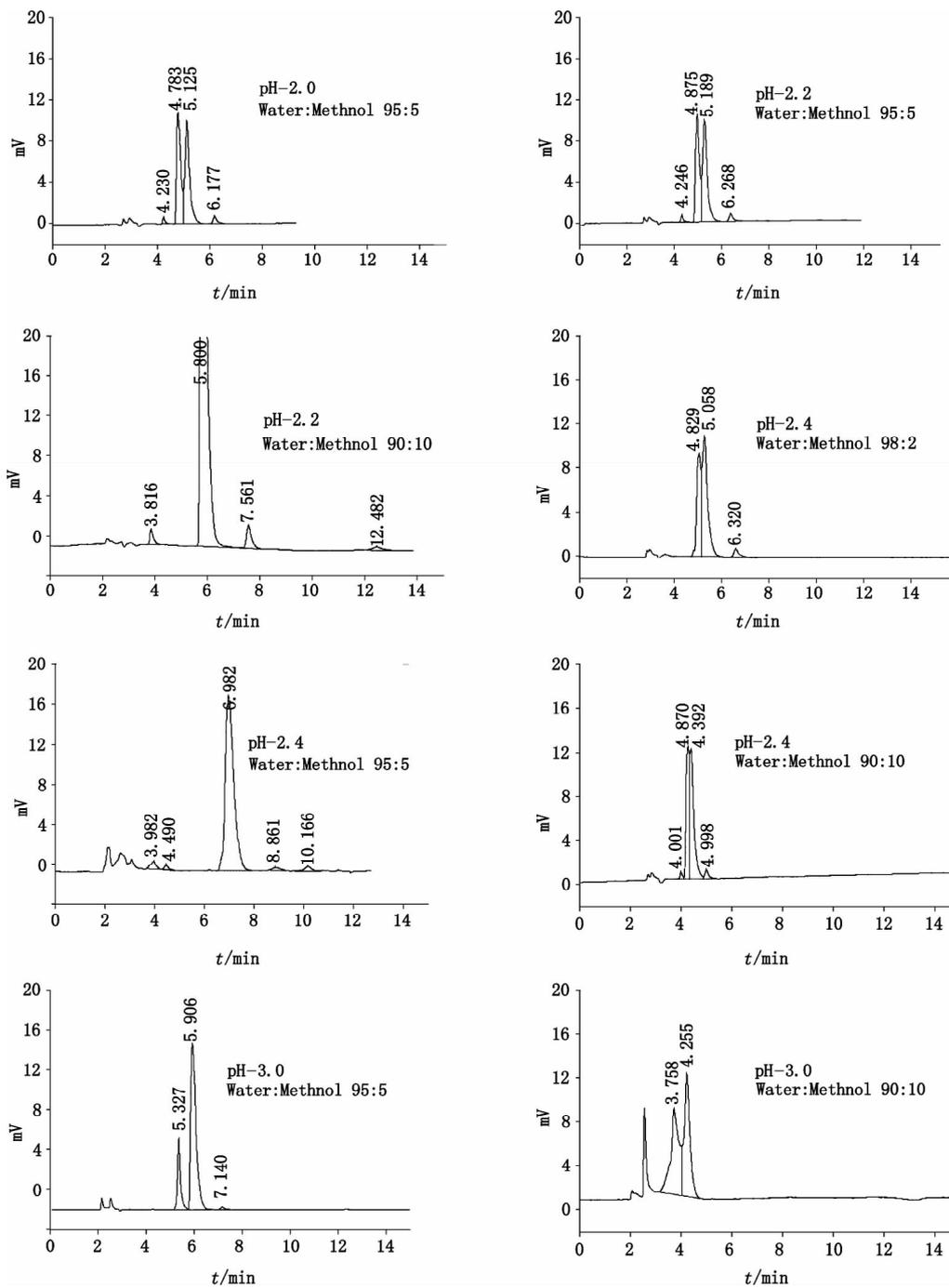


图3 流动相筛选结果

Fig 3 Result of mobile phase scanning

**2.5 标准曲线** 取左卡尼汀杂质 A 对照品约 5 mg,精密称定,置于 50 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度(100 μg · mL<sup>-1</sup>),摇匀,精密吸取 0.1、0.5、1.0、2.5、5.0、10 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,加水至刻度,摇匀,分别取 20 μL 注入液相色谱仪,以外标法测定,计算峰面积,左卡尼汀杂质 A 色谱峰面积 A 与浓度 C 作图,经统计得回

归方程:

$$Y = 1.052 \times 10^4 X + 5.049 \times 10^3 \quad r^2 = 0.9996 (n = 6)$$

表明左卡尼汀杂质 A 对照品在浓度 1 ~ 100 μg · mL<sup>-1</sup> 范围内,线性关系良好。

**2.6 精密度试验** 取左卡尼汀杂质 A 对照品溶液(浓度 12.5 μg · mL<sup>-1</sup>)连续进样 20 μL,其 RSD 值为 0.418%。结果表明,方法的精密度良好。

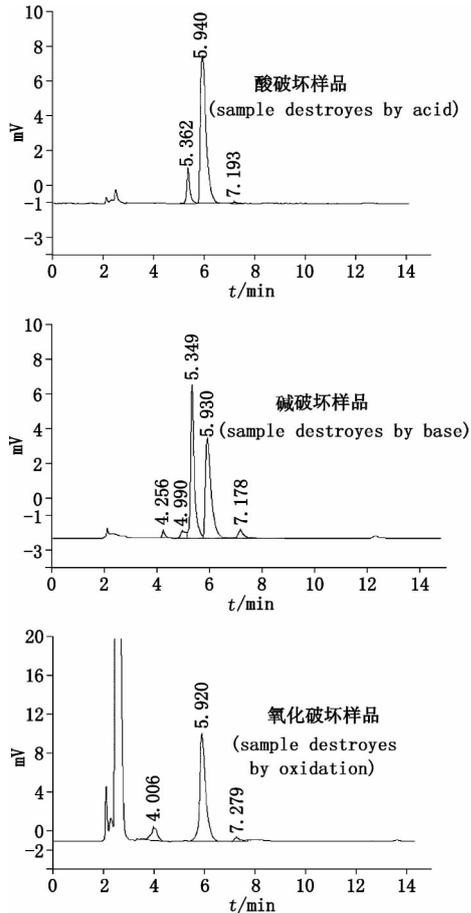


图4 加速破坏试验

Fig 4 Accelerated destruction test

表1 左卡尼汀与杂质A 分离度测定结果

Tab 1 Result of resolution in different situations

序号 (No.)	pH	水相/ 有机相 (water/organic phase)	出峰时间( retained time) /min		分离度 ( resolution)
			主峰 ( main peak)	强碱降解产物 ( degradation products made by exposing material to base)	
1	2.0	95/05	5.1	4.7	1.08
2	2.2	95/05	5.1	4.8	0.96
3	2.2	90/10	5.8	5.8	0.00
4 <sup>a</sup>	2.4	98/02	5.0	4.8	0.63
5	2.4	95/05	6.9	6.9	0.00
6 <sup>b</sup>	2.4	90/10	4.3	4.2	0.45
7	3.0	95/05	5.9	5.3	1.77
8	3.0	90/10	4.2	3.7	0.96

注( note) : 4<sup>a</sup>: 左卡尼汀注射液( 卡尔特) 进口产品质量标准中含量测定 HPLC 条件[The HPLC method used in the general properties of imported levocarnitine injection( Cartar) ]

6<sup>b</sup>: 左卡尼汀原料药国家质量标准杂质检查 HPLC 条件( The HPLC method used in the national standard of levocarnitine drug substance)

### 2.7 杂质 A 与主成分校正因子的计算

分别取左卡尼汀对照品、杂质 A 对照品 精密称定 加水溶解并稀释至浓度分别为  $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  (左卡尼汀)、 $12.5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  (杂质 A) 的溶液 精密量取  $20 \text{ } \mu\text{L}$  进样 记录色谱图 按下式计算校正因子:

$$f = (A_s / C_s) / (A_R / C_R)$$

$A_s$  为左卡尼汀对照品的峰面积,  $C_s$  为左卡尼汀对照品的浓度,  $A_R$  为杂质 A 的峰面积,  $C_R$  为杂质 A 的浓度。结果显示(表 2): 杂质 A 相对于主成分保留时间为 0.915 校正因子为 0.0113。因为左卡尼汀杂质 A 结构中含有共轭结构 杂质 A 的响应值远远大于左卡尼汀。

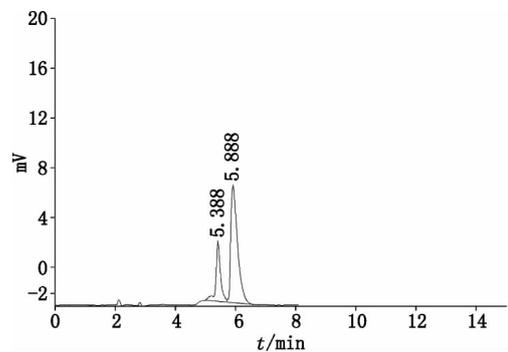


图5 左卡尼汀对照品与杂质 A 对照品的色谱图

Fig 5 HPLC of levocarnitine and impurity A

### 2.8 杂质 A 的检查方法

精密吸取左卡尼汀注射液  $1 \text{ mL}$ , 加水制成每  $1 \text{ mL}$  含  $2 \text{ mg}$  的溶液作为供试品溶液, 另精密称取左卡尼汀杂质 A 对照品适量, 用水配制成含杂质 A 约  $0.5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液, 作为杂质对照品溶液, 精密量取供试品溶液, 加水稀释成每  $1 \text{ mL}$  含  $20 \text{ } \mu\text{g}$  的溶液作为对照溶液, 精密量取对照溶液  $20 \text{ } \mu\text{L}$  注入液相色谱仪, 调节检测灵敏度, 使主成分色谱峰的峰高为满量程的  $10\% \sim 20\%$ ; 精密量取供试品溶液与杂质对照品溶液各  $20 \text{ } \mu\text{L}$ , 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图至主成分峰保留时间的 2 倍。若相对于主峰保留时间 0.91 处出现杂质峰(杂质 A), 其限度不超过  $0.5\%$ 。

分别采用 2 种方法(1、外标法; 2、加校正因子的主成分自身对照法) 对影响因素及加速试验样品进行测定, 结果表明在影响因素 10 d、加速试验 3 个月及 6 个月试验时间点, 按对照品法(杂质 A 对照品浓度为  $0.2 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 计算杂质 A 的量, 与按加校正因子的主成分自身对照法计算的杂质 A 的量相近, 结果见表 3。

表 2 左卡尼汀与杂质 A 校正因子的计算结果

Tab 2 Results of correction factor

序列 (No.)	保留时间( retained time) /min		相对保留时间 ( related retained time)	峰面积( peak area)		校正因子 ( correction factor)
	左卡尼汀 ( levocarnitine)	杂质 A ( impurity A)		2 mg · mL <sup>-1</sup> 左卡尼汀 ( levocarnitine)	0.0125 mg · mL <sup>-1</sup> 杂质 A ( impurity A)	
1	5.888	5.392	0.916	247738	136759	0.0113
2	5.891	5.390	0.915	249705	136438	0.0114
3	5.891	5.393	0.915	248197	137100	0.0113
4	5.893	5.393	0.915	249953	137633	0.0114
5	5.888	5.388	0.915	249077	137138	0.0113
平均( average)	5.890	5.3912	0.915	248934	137013.6	0.0113
RSD /%	0.037	0.040	0.049	0.38	0.33	0.48

表 3 不同方法计算杂质 A 的量结果比较

Tab 3 Content of impurity A calculated by two different methods

条件 ( experiments condition)	杂质 A 的量( impurity A content) /%					
	加校正因子的主成分自身对照法( method using correction factor)			对照品法( external standard one - point method)		
	20090901 批 ( Lot. 20090901)	20090902 批 ( Lot. 20090902)	20090903 批 ( Lot. 20090903)	20090901 批 ( Lot. 20090901)	20090902 批 ( Lot. 20090902)	20090903 批 ( Lot. 20090903)
0 d	0.0063	0.0064	0.0058	0.0059	0.0046	0.0052
60 °C 10 d	—	—	0.0071	—	—	0.0066
光照 10 d( the shines on 4500 lx for 10 d)	—	—	0.0084	—	—	0.0073
加速试验 3 个月 ( accelerated test 3 months)	0.0056	0.0055	0.0061	0.0078	0.0081	0.0076
室温留样 3 个月 ( long - term test 3 months)	0.0055	0.0069	0.0077	0.0058	0.0046	0.0057
加速试验 6 个月 ( accelerated test 6 months)	0.0117	0.0113	0.0095	0.0113	0.0093	0.0097
室温留样 6 个月 ( long - term test 6 months)	0.0088	0.0069	0.0082	0.0087	0.0061	0.0084

### 3 讨论和结论

在主药强酸、强碱破坏试验及强光光照试验以及高温试验过程中发现,在本实验 HPLC 色谱条件下,在相对于主峰保留时间 0.91 处能检出有关物质,经二极管矩阵波长扫描及与左卡尼汀杂质 A 对照品对比可知本杂质即为杂质 A(图 6),而且随本品加速试验时间的延长,其含量有增加的趋势,如 20090101 批样品 0、6 个月加速试验的杂质 A 含量分别为 0.0059%、0.0113%(外标法)。因此,杂质 A 是注射液今后可能的降解产物,有必要对杂质 A 进行限定和控制,以保证产

品质量。

采用反相离子对(C<sub>18</sub>柱)高效液相色谱法测定杂质 A 的含量,分别以外标法(杂质 A)和主成分自身对照法(其他未知杂质)限定了杂质 A 的限度。以此为基础,制订了杂质 A(左卡尼汀注射液 5 mL:1 g)的检查方法并进行了系统的方法学研究,经检查,3 批样品加速前后的杂质 A 均能被有效控制。

该法简便、准确、专属,可用于左卡尼汀注射液中的杂质 A 的限度,为左卡尼汀注射液的质量控制提供了依据。

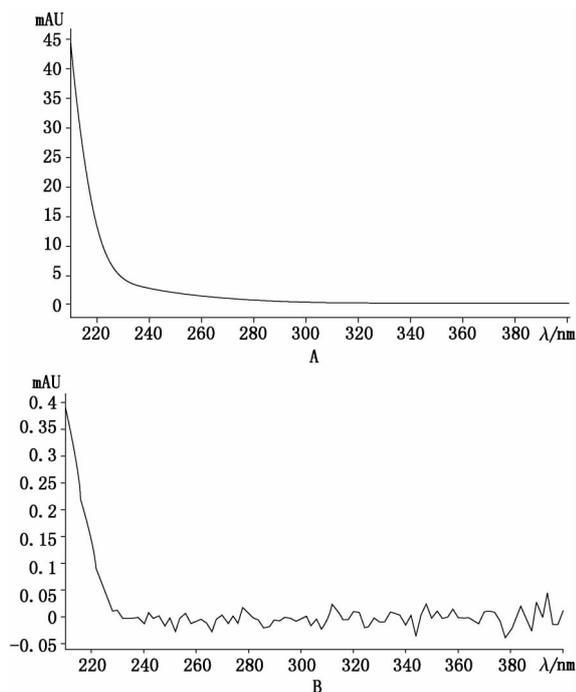


图6 杂质 A (A) 和杂质 RRT 0.91 (B) 的 DAD 扫描图

Fig 6 DAD spectra of impurity A (A) and RRT 0.91 impurity (B)

## 参考文献

- The National Drug Standard, New Drug Positive Standard(国家药品标准·新药转正标准). 64(第64册): 128
- EP 6.0. 2008. 2257
- USP32 - NF27. 2009. 2766
- Matsumoto K, Ichitani Y, Ogasawara N, et al. Precolumn fluorescence derivatization of carnitine and acylcarnitines with 4-(2-aminoethylamino)-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole. *J Chromatogr A* 1994 678: 241
- De Witt P, Deias R, Muck S, et al. High-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis of L- and D-carnitine by precolumn diastereomeric derivatization. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1994 657(1): 67
- GAO Li-jun(高立军), WANG Tao(王涛), QUAN Dong-qin(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). *Sci Technol Eng(科学技术与工程)* 2011, 11(30): 7494
- SUN Yong-xu(孙永旭), LU Cong-xiao(陆丛笑), TANG Qi-ling(唐启令), et al. Simultaneous analysis of L-carnitine, acetyl-L-carnitine and propionyl-L-carnitine in human plasma by HPLC(高效液相色谱法同时测定人血浆中左卡尼汀、乙酰左卡尼汀和丙酰左卡尼汀的浓度). *Chin Pharm J(中国药学杂志)*, 2007 42(18): 1425
- Mardones C, Ríos A, Valcárcel M, et al. Separation of D/L-carnitine enantiomers by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* 1999, 849(2): 609
- ZHAO Ya-ming(赵亚明), LI Ren(李任), WANG De-xin(王得新), et al. Establishment of the method for determination of plasma L-carnitine by high performance liquid chromatography(高效液相色谱法检测血浆左旋肉碱方法的建立). *Chin J Clin Neurosci(中国临床神经科学)* 2006, 14(5): 528
- Li K, Li W, Huang YF. Determination of free L-carnitine in human seminal plasma by high performance liquid chromatography with pre-column ultraviolet derivatization and its clinical application in male infertility. *Clin Chim Acta* 2007 378(5): 159
- XU Juan-juan(徐娟娟), LI Jie-mei(李杰梅), LIANG Shu-ming(梁淑明), et al. Analysis of the optical isomer of L-carnitine by chiral liquid chromatography(手性液相色谱法测定左旋肉碱中光学异构体的含量). *Mod Food Sci Technol(现代食品科技)*, 2010 26(3): 311
- ZHAO Rong(赵榕), SUN Kai-qi(孙开奇), LUO Ren-cai(罗仁才). An ion pair reversed phase high performance liquid chromatography method for determination of carnitine in health product(离子对反相高效液相色谱测定保健品中的肉碱). *Chin J Food Hyg(中国食品卫生杂志)* 2002 14(4): 25
- Freimüller S, Altörfer H. A chiral HPLC method for the determination of low amounts of D-carnitine in L-carnitine after derivatization with (+)-FLEC. *J Pharm Biomed Anal* 2002 30(2): 209

(本文于2012年5月9日收到)