

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 - C₁₈ 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⁻¹ 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), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 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⁻¹ 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 - C₁₈ 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⁻¹ 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⁻¹; 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⁻¹ ($r^2 = 0.9996$, $n = 6$). 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^[1-3]。

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

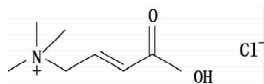


图1 杂质A的化学结构

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-C₁₈ 柱 (5 μ m, 4.6 mm \times 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 \cdot L⁻¹ 氢氧化钠

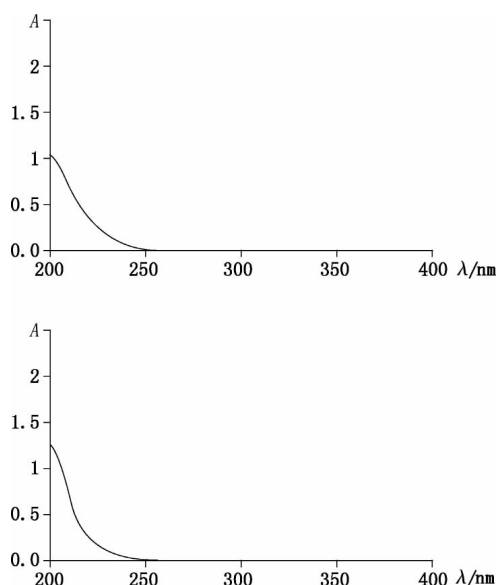


图2 2 mg \cdot mL⁻¹ 左卡尼汀溶液 (A) 和杂质 20 μ g \cdot mL⁻¹ A 溶液的紫外扫描图

Fig 2 UV spectra of 2 mg \cdot mL⁻¹ levocarnitine solution (A) and 20 μ g \cdot mL⁻¹ 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-C₁₈ 柱 (5 μ m, 4.6 mm \times 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 \cdot L⁻¹ 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 \cdot min⁻¹; 进样 20 μ L。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。

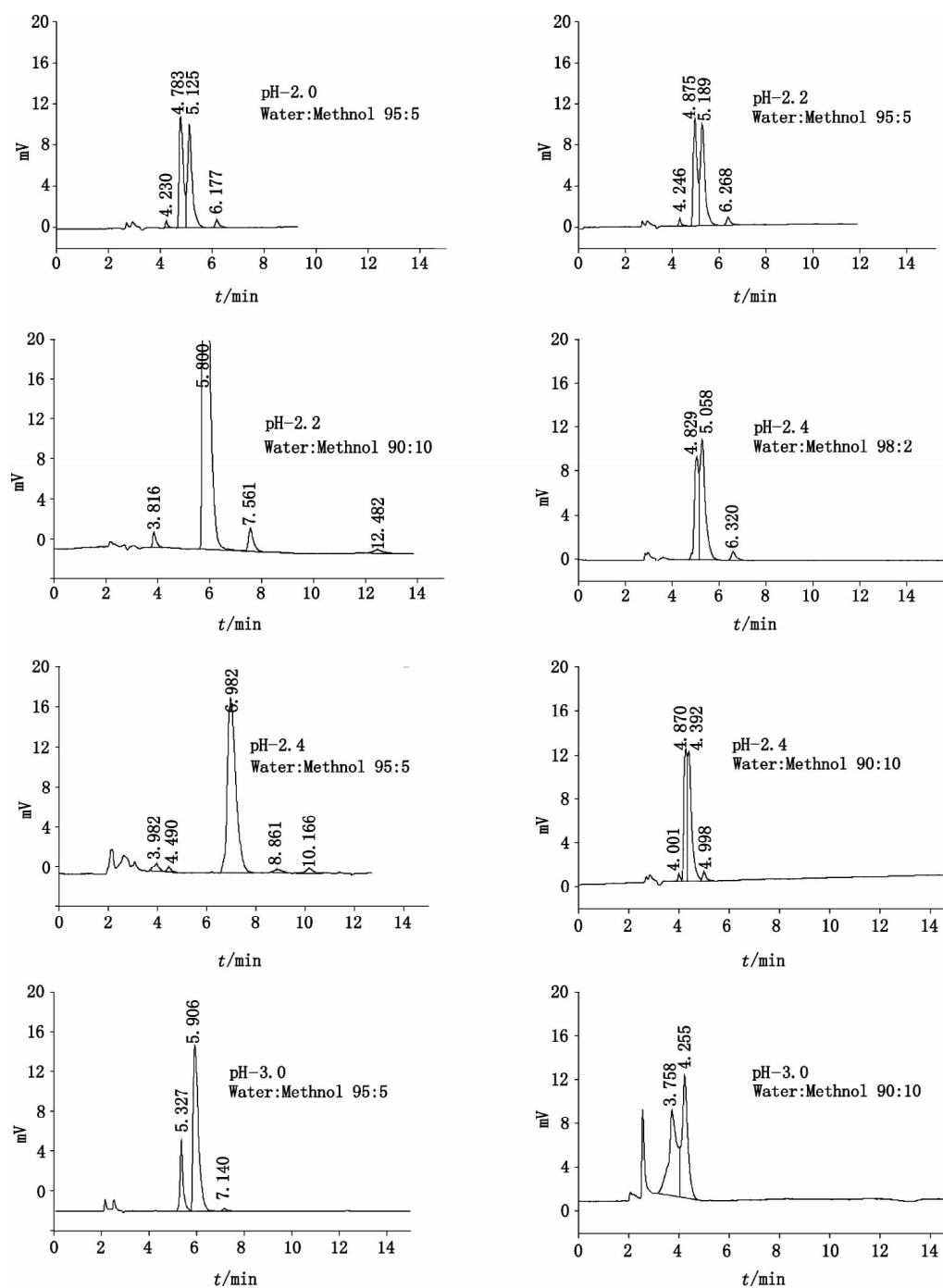


图3 流动相筛选结果

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($100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),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 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 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 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)连续进样 20 μL ,其 RSD 值为 0.418%。结果表明,方法的精密度良好。

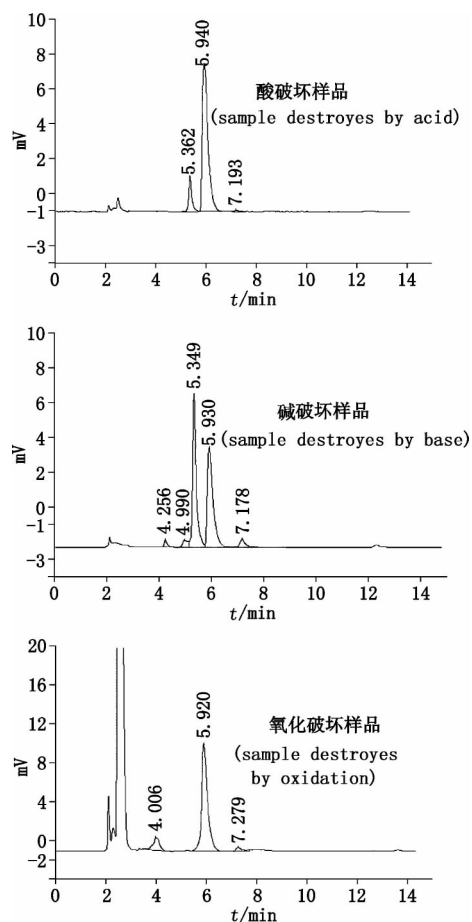


图4 加速破坏试验

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 ^a	2.4	98/02	5.0	4.8	0.63
5	2.4	95/05	6.9	6.9	0.00
6 ^b	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^a: 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^b: 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。

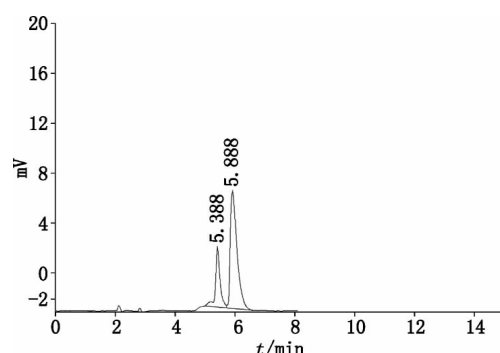


图5 左卡尼汀对照品与杂质A对照品的色谱图

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 mL ,加水制成每 1 mL 含 2 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 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 ⁻¹ 左卡尼汀 (levocarnitine)	0.0125 mg • mL ⁻¹ 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 ℃ 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(C₁₈ 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。

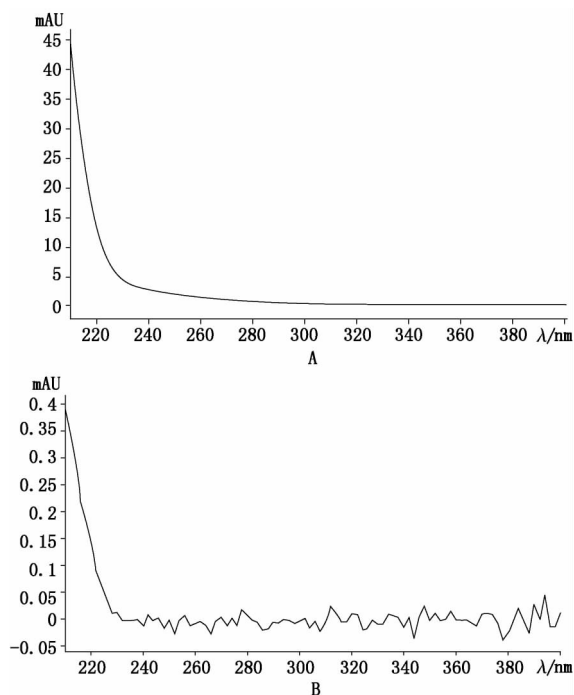


图6 杂质 A(A) 和杂质 RRT 0.91(B) 的 DAD 扫描图

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

参考文献

- 1 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
- 2 EP 6. 0. 2008. 2257
- 3 USP32 - NF27. 2009. 2766
- 4 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
- 5 De Witt P ,Deias R ,Muck S , *et al.* High - performance liquid chromatography and capillary electrophoresis of L - and D - carnitine by precolumn diastereomerie defivatization. *J Chromatogr B Biomed Appl* ,1994 657(1): 67
- 6 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
- 7 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(中国药理学杂志)* ,2007 42(18): 1425
- 8 Mardones C ,Ríos A ,Valcárcel M , *et al.* Separation of D/L - carnitine enantiomers by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* ,1999 ,849(2): 609
- 9 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
- 10 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
- 11 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
- 12 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
- 13 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)