

药物分析

LC-MS法测定左卡尼汀注射液含量的探讨

张越华¹, 杨晓莉², 庞菁华³

(¹西安市食品药品检验所化学室, 西安 710054; ²陕西省食品药品检验所微生物室, 西安 710065; ³西安力邦肇新生物科技有限公司, 实验研究中心, 西安 710077)

【摘要】目的: 探讨建立左卡尼汀注射液中左卡尼汀的液相色谱-质谱联用(LC-MS)测定方法。**方法:** 待测样品直接稀释后采用亲水作用色谱柱(HILIC)分离, 进行LC-MS检测。**结果:** 在100~1000ng/ml范围内左卡尼汀线性关系良好, 回归方程为 $y=137.86x-291.12$ ($r=0.9997$)。样品平均回收率为98.4% ($n=6$), RSD为1.9%。三批次样品中左卡尼汀的含量分别为102.1%、99.2%和101.0%。**结论:** LC-MS法简单准确, 灵敏度高, 可用于左卡尼汀注射液质量的控制。

【关键词】 左卡尼汀; 亲水作用色谱; LC-MS

【中图分类号】 R917 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1009-0959(2016)07-0714-02

Determination of the Content of Levocarnitine Injection by LC-MS Method

Zhang Yue-hua¹, Yang Xiao-li², Pang Jing-hua³

(¹Xi'an Institute for Food and Drug Control Chemical Laboratory, Xi'an 710054, China;

²Shaanxi Institute for Food and Drug Control Microbiological Laboratory, Xi'an 710065, China;

³Xi'an Libang Zhaoxin Biological Technology Co.LTD., Experimental Research Center, Xi'an 710077, China)

【ABSTRACT】Objective: To explore the establishment of levocarnitine in levocarnitine injection liquid chromatography-mass spectrometry(LC-MS) method for the determination. **Methods:** The samples were diluted with hydrophilic interaction chromatography column(HILIC), and LC-MS was detected. **Results:** Levocarnitine was a good linear relationship in the range of 100~1000ng/ml, the regression equation was $y=137.86x-291.12$ ($r=0.9997$). The average recovery of samples was 98.4% ($n=6$), RSD was 1.9%. The content of levocarnitine in three batches of samples were 102.1%, 99.2% and 101%. **Conclusion:** LC-MS method is simple and accurate, high sensitivity, can be used to control the quality of levocarnitine injection.

【KEY WORDS】 Levocarnitine; Hydrophilic interaction chromatography; LC-MS

卡尼汀又名肉毒碱、维生素BT, 化学名为 β -羟基- γ -三甲基氨基丁酸内盐, 高亲水性, pKa值为3.8, 在常规的反相色谱中几乎无保留($k \approx 0$)。卡尼汀分左旋和右旋两种构型。左旋体只存在哺乳动物体内, 可促进脂质代谢^[1]。左卡尼汀注射液临床上主要用于治疗继发性卡尼汀缺乏症。近年来亦有文献报道将左卡尼汀用于治疗心力衰竭并取得显著疗效^[2,3]。现行左卡尼汀注射液国家药品标准[WS1-(X-023)-2005Z]^[4]及美国药典(USP35-NF30)^[5]中均采用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)并用紫外检测器在末端吸收处(210nm)测定含量。方法中流动相都加入了高浓度的缓冲盐及离子对试剂(即离子对法)来增大左卡尼汀的保留因子(k), 或使用含高浓度盐的流动相在离子交换色谱上来进行洗脱。但离子对法操作复杂、易损坏色谱柱、重现性较差。针对类似大极性化合物, 亲水作用色谱被越来越广泛的运用在药物^[6]、食品^[7]等各个学科领域。亲水作用色谱(HILIC)模式中, 亲水性的键合相表面形成了水和相, 在流动相与水和相间发生样品的分配, 使亲水性高的极性化合物在水和相中被保留, 疏水性强的化合物则被快速溶出, 基本不被保留, 极适合分析亲水性较强的化合物^[8]。2015年2~10月, 我们使用HILIC色谱柱, 利用单四极杆质谱为检测器, 进行左卡尼汀的含量测定。

1 仪器与试剂

Agilent Infinity 1260 LC System (美国安捷伦科技有限公司), 包括真空脱气机(G1379B), 二元高压混合泵(G1312B 600Bar), 自动进样器(G1367E), 柱

温箱(G1316C)。Agilent 6120B SQ MS System (美国安捷伦科技有限公司), 配有电喷雾离子源(ESI)和Chemstation B 01.04 (sp2)工作站。乙腈(色谱纯, Merck); 超纯水(Millipore Advantage 5); 甲酸铵(分析纯, Merck); 甲酸(色谱纯, Merck)。左卡尼汀标准品由中检所提供(批号: 101041-201301); 待测左卡尼汀注射液(可益能, Sigma-Tau Industrie Farmaceutiche Riunite SPA, 批号: 1311121, 1312131, 1401261)。

2 实验方法

2.1 仪器条件

2.1.1 色谱条件 流动相: 10mmol/L甲酸铵水溶液(用甲酸调节pH为3.0): 乙腈(25:75); 色谱柱: Thermo Fisher AcclaimTM HILIC-10 LC Columns (3 μ m, 2.1mm i.d \times 150mm); 流速: 0.3ml/min; 柱温: 40 $^{\circ}$ C; 进样量: 2L。

2.1.2 质谱条件 离子检测方式: 选择性离子检测(SIM=162); 离子源: 电喷雾离子源(ESI); 电离模式: 正离子模式(ESI⁺); 碰撞诱导解离100; 干燥气体流速: 12L/min; 雾化器压力: 45psig; 干燥气体温度: 350 $^{\circ}$ C; 毛细管电压: 5000V。

2.2 标准储备液的配制

称取左卡尼汀标准品约10mg, 精密称定, 加超纯水溶解并定容至100ml, 再精密量取1ml至10ml量瓶中用超纯水定容, 配制浓度为0.01mg/ml的标准储备液, 备用。

2.3 供试品溶液的配制

精密量取左卡尼汀注射液1ml至100ml量瓶中, 加超

纯水稀释并定容。再精密量取该溶液适量,加流动相稀释至最终浓度为500ng/ml的供试品溶液。

3 实验结果

3.1 线性与线性范围

取上述标准储备液,用流动相稀释成最终浓度分别为100、200、500、800和1000ng/ml的标准溶液,用于绘制标准曲线。取上述不同浓度的标准溶液,各进样2 μ L,按照2.1所述条件进行测定,并记录EIC谱图(图1)。以峰面积Y对标准溶液浓度X进行线性回归,实验表明,左卡尼汀在100~1000ng/ml范围内有良好的线性关系,线性回归方程为 $y=137.86X-291.12$,相关系数 $R=0.9997$ 。

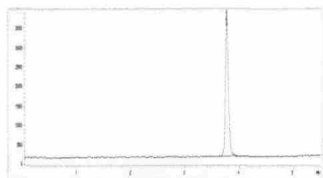


图1 对照品溶液EIC谱图

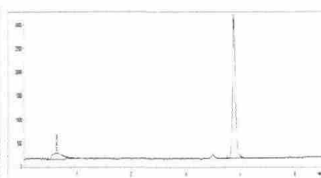


图2 样品溶液EIC谱图

3.2 回收率实验

精密量取6份已知含量的样品,再准确加入左卡尼汀标准品溶液使该6份溶液的最终浓度约为500ng/ml,按2.1所述条件测定左卡尼汀含量,如表1所示,平均回收率为98.4%,RSD为1.9%,准确度符合定量要求。

表1 回收率数据

样品中左卡尼汀 浓度/(ng/ml)	加入左卡尼汀 浓度/(ng/ml)	测得左卡尼汀 浓度/(ng/ml)	回收率 (%)	平均回收 率(%)	RSD %
249.576	250	496.280	98.68%	98.4%	1.9%
252.134	250	498.333	98.49%		
250.289	250	490.728	96.18%		
251.941	250	494.51	97.05%		
250.336	250	496.99	98.66%		
250.208	250	503.77	101.42%		

3.3 精密度实验

取浓度为500ng/ml的左卡尼汀标准溶液连续进样6次,峰面积RSD为1.1%,表明该方法精密度良好。

3.4 重现性试验

取6份待测样品,按照2.3所述方法配置溶液,测定其中左卡尼汀的含量,RSD为1.3%,证明重现性良好。

3.5 稳定性试验

取供试品溶液,分别在0、1、2、4和8h测定,峰面积RSD为1.7%,结果表明供试品溶液在8h内稳定。

3.6 供试品含量测定

按照2.3方法配置供试品溶液,测定供试品中左卡尼汀的含量,样品分析谱图如图2所示,1311121、1312131、1401261三批样品中左卡尼汀的含量分别为102.1%、99.2%和101.0%。

4 讨论

4.1 流动相和色谱柱的选择

左卡尼汀注射液国家药品标准[WS1-(X-023)-2005Z]中使用十八烷基硅烷键和硅胶为固定相的色谱柱,以磷酸盐缓冲液(取磷酸11.5ml,加水1900ml,用1mol/L氢氧化钠溶液约100ml调节pH至2.4,加庚烷磺酸钠盐1.1

g,振摇使溶解)-甲醇(90:10)为流动相,检测波长为225nm。美国药典(USP35-NF30)中使用全多孔硅胶微粒键合非交联NH₂为固定相的色谱柱(简称NH₂柱),以0.05mol/L磷酸盐缓冲液(用磷酸调节pH至4.7)-乙腈(35:65)为流动相,检测波长为205nm。

以上两种方法中流动相都加入了高浓度的缓冲盐或离子对试剂来增加左卡尼汀在色谱柱上的保留,并使用紫外检测器在末端吸收处测定含量。而由于磷酸盐缓冲液不易挥发,故不能与质谱检测器联用。

在本方法中,使用0.01mol/L甲酸铵水溶液(用甲酸调节pH=3.0)-乙腈(25:75)为流动相,其中只使用低浓度、易挥发缓冲盐来满足质谱检测的需求。并使用为衍生化硅胶基质的HILIC色谱柱来增强左卡尼汀的保留。HILIC色谱的保留机制一般认为是溶质的一部分分布在柱填料表面形成的水膜里^[9]。极性化合物的保留时间与流动相中有机溶剂比例成正比。当使用含75%乙腈流动相来洗脱时,左卡尼汀有合适的保留因子k。由于左卡尼汀溶解和稀释使用的高纯水在HILIC色谱柱中极性过大,会影响峰型和灵敏度,所以使用流动相做最后一步稀释来克服溶剂效应带来的影响。

4.2 质谱条件的选择

由于样品基质简单,故本研究中使用单四极杆质谱为检测器,以SIM模式检测左卡尼汀有较高的专属性,且无基质效应等问题^[10]。通过方法学验证单四极杆质谱检测器能够满足定量需求,相比三重四级杆质谱有高的检测效率和更低的检测成本。

4.3 结论

本研究使用HILIC色谱柱建立了左卡尼汀的LC-MS分析方法,不但克服了现有方法高盐、不稳定、易损伤色谱柱和仪器的问题,还克服了左卡尼汀检测波长为末端吸收的问题。操作简单,重现性好,可以用于测定左卡尼汀注射液中左卡尼汀的含量。

参考文献

- [1] 王大为,武洁,黄厚才,等. LC-MS/MS法测定犬血浆中左卡尼汀[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(2): 207-210.
- [2] 邹艳惠,张亮,王鑫,等. 左卡尼汀注射液治疗舒张性心力衰竭的临床疗效观察[J]. 中国医药导刊, 2013, 15(6): 1015-1016.
- [3] 古思嘉,徐广,魏晓,等. 左卡尼汀在治疗慢性心力衰竭中血尿酸浓度临床观察[J]. 中国医药导刊, 2015, 17(7): 697-698.
- [4] 国家药品标准. 左卡尼汀注射液[S]. 国家食品药品监督管理局, WS1-(X-023)-2005Z.
- [5] 美国药典. Levocarnitine Injection [S]. FDA, USP35-NF30:3666-3667.
- [6] Kahsay G, Song H, Schepdael A V, et al. Hydrophilic interaction chromatography (HILIC) in the analysis of Antibiotics[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2014, 87: 142-154.
- [7] 刘正才,张琼,杨方,等. 亲水作用色谱-电喷雾串联质谱法测定水产品中的氟苯尼考胺的残留量[J]. 食品科学, 2015, 36(4): 198-201.
- [8] 沈爱金,郭志谋,刘鑫森. 亲水作用色谱固定相的发展及应用[J]. 化学进展, 2014, 26(1): 10-18.
- [9] Lloyd R Snyder, Joseph J Kirkland, John W Dolan原著;陈小明,唐雅研译. 现代液相色谱技术导论[M]. 北京: 人民卫生出版社. 2012, 192.
- [10] 程刚,朱荣华,赵瑞科,等. HPLC-MS/ESI同时测定人血浆中米屈肼和左卡尼汀[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(4): 609-614.