

药、美沙拉嗪缓释片和美沙拉嗪缓释胶囊标准中,均对上述 3 种杂质进行了有关物质控制,与本文中不同的是 BP 2013 采用的是两个液相系统分别对苯胺和 2-氨基苯酚、4-氨基苯酚进行检测^[7];《欧洲药典》(EP) 7.0 版只收录了美沙拉嗪原料药标准,方法与 BP 2013 美沙拉嗪原料药基本一致^[8];《美国药典》(USP) 35 版采用气相色谱法对该 3 种杂质进行检测^[9]。中国现行的美沙拉嗪原料药标准中有关物质检测方法为薄层色谱自身对照法^[10]。

3.2 杂质限度的拟定

表 3 结果可见 3 批美沙拉嗪原料药中均含有该 3 种杂质,因此有必要建立此方法以对该样品质量加以控制。BP 2013 和 EP 7.0 对该 3 种杂质的限量分别为 10 200 200 ppm,USP 35 更低一些,为 5, 200 200 ppm。苯胺在《有毒有害物质分类参考》中属高毒物质,必须将其含量控制在一个较低的安全的范围之内,因此本文建议采用限度较低的 5 200, 200 ppm 作为杂质限度标准。

3.3 色谱条件选择

本文比较了氦气和氮气两种载气,试验结果差别不大,而氮气更廉价易得,因此采用了氮气做载气。试验比较了无水乙醇和二氯甲烷两种溶剂,结果乙醇的供试品溶液稳定性较差,因此采用了二氯甲烷做溶剂。

3.4 小结

建立的气相色谱测定法经方法学考察,结果表明该方法准确、可靠,可用于美沙拉嗪原料药中苯胺、2-氨基苯酚、4-氨基苯酚的有关物质检查,且在 3 批样品中均检出了上述 3 种杂质,因此有必要对其进行控制。

参考文献

- [1] 李进,邓豫,李兆明,等. 美沙拉嗪缓释剂对 2,4,6-三硝基苯磺酸诱导大鼠溃疡性结肠炎的治疗作用[J]. 医药导报, 2011, 30(7): 839-842
 - [2] 郑小丹,高丽,王锦刚. 高效液相色谱法测定美沙拉嗪控释胶囊的有关物质[J]. 黑龙江医药, 2012, 25(3): 375-378
 - [3] 丁立新,韩宁,张羽男,等. 紫外光谱法测定美沙拉嗪肠溶片的含量[J]. 黑龙江医药科学, 2004, 27(4): 16
 - [4] 陈邦银,张汉萍,曹蕾,等. 抗结肠炎药美沙拉嗪的合成及结构鉴定[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2002, 31(2): 163-164
 - [5] 李伟,程传玲,徐桂清. 美沙拉嗪中有机杂质的探讨[J]. 中国医药工业杂志, 2002, 33(11): 554-557
 - [6] 温玉麟. 药物与化学物质毒性数据[M]. 天津科学技术出版社, 1987, 56, 240
 - [7] 英国药典[S]. 2013 年版. 2829-2831
 - [8] 欧洲药典[S]. 7.0 版. 2451-2453
 - [9] 美国药典[S]. 35 版. 3816-3817
 - [10] 国家药品标准·新药转正标准[S]. 第 59 册. 167-168
- (收稿日期: 2015-01-06)

HPLC 法测定左卡尼汀注射液中的有关物质

郭丽娟,于黎鑫,王爱凤,崔美兰(山东齐都药业有限公司 淄博 255400)

摘要 目的: 建立 HPLC 法测定左卡尼汀注射液中有有关物质的方法。方法: 采用 Alltima Amino 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.05 mol · L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液(用磷酸调节 pH 值至 4.3)(65:35); 检测波长为 205 nm; 柱温为 30 °C; 流量为 0.7 mL · min⁻¹。结果: 左卡尼汀杂质 A 在 0.001 ~ 0.500 mg · mL⁻¹ 范围内线性关系良好($r=0.9998$), 平均回收率为 100.08%, RSD 为 1.14% ($n=9$)。结论: 建立的方法灵敏度高, 测定结果准确, 可用于左卡尼汀注射液中有有关物质的测定。

关键词: 左卡尼汀注射液; 高效液相色谱法; 有关物质

中图分类号: R921.2

文献标识码: A

文章编号: 1009-3656(2015)-4-263-5

HPLC Determination of Related Substances in Levocarnitine Injection

Guo Lijuan, Yu Lixin, Wang Aifeng, Cui Meilan(Shandong Qidu Pharmaceutical Co., Ltd. Zibo 255400)

Abstract Objective: To develop an HPLC method for the determination of related substances in Levocarnitine Injection. **Method:**

作者简介: 郭丽娟, 工程师; 研究方向: 药物分析。Tel: 15966977279; E-mail: qdrdguolijuan@163.com

The assay was performed on an Alltima Amino column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with 0.05 mol · L⁻¹ potassium dihydrogen phosphate solution (adjusted pH to 4.3 with phosphoric acid) - acetonitrile (65:35) as mobile phase at a flow rate of 0.7 mL · min⁻¹; The column temperature was 30 °C and detected with UV 205 nm. **Results:** A good linearity was obtained in 0.001 - 0.500 mg · mL⁻¹ for Levocarnitine impurity A ($r = 0.9998$), the average recovery was 100.08% and RSD was 1.14% ($n = 9$). **Conclusion:** The method can be used for the assay of related substances in Levocarnitine Injection with high sensitivity, accurate and reliable results.

Key words: Levocarnitine Injection; HPLC; related substance

左卡尼汀化学名称为(*R*)-3-羧基-2-羟基-*N,N,N*-三甲基-1-丙胺氢氧化物内盐,又称左旋肉碱,是一种重要的药食兼用的营养和食物补充剂,是哺乳动物能量代谢中需要的体内天然物质,其主要功能是促进脂类代谢。适用于慢性肾衰长期血透病人因继发性肉碱缺乏产生的一系列并发症,临床表现如心肌病、骨骼肌病、心律失常、高脂血症,以及低血压和透析中肌痉挛等。左卡尼汀注射液现行质量标准^[1]中未控制有关物质,左卡尼汀中可能产生的杂质主要为 E-4-(三甲基铵基)丁-2-烯酸乙酯(简称杂质 A),我公司参照《欧洲药典》的左卡尼汀质量标准^[2],建立了高效液相色谱法测定左卡尼汀注射液中已知杂质(杂质 A)和未知杂质的方法,并进行了方法学验证,结果表明该方法灵敏度高,测定结果准确,可用于左卡尼汀注射液的有关物质控制,为左卡尼汀注射液质量标准的提高提供了参考。

1 仪器与试剂

Agilent1200 高效液相色谱仪(二极管阵列检测器);pHS-3C 型精密 pH 计(上海精科雷磁仪器厂);BS110S 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

左卡尼汀对照品(山东齐都药业有限公司自制,批号 J090101);Levocarnitine Impurity A CRS (European Pharmacopeia Reference Standard,货号 L0399905,购于北京绿百草科技发展有限公司);左卡尼汀注射液(进口产品,A 厂生产,规格 5 mL:1 g,批号 100215;进口产品,B 厂生产,规格 5 mL:1 g,批号 0703404;国产仿制产品,C 厂生产,规格 5 mL:1 g,批号 0901061;山东齐都药业有限公司生产,规格 5 mL:1 g,批号 090201,090202,090203,090801,090802,090803);乙腈为色谱纯,其他试剂为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Alltima Amino (4.6 mm × 250 mm,

5 μm);以乙腈-0.05 mol · L⁻¹磷酸二氢钾溶液(用磷酸调节 pH 值至 4.3)(65:35)为流动相;柱温 30 °C;检测波长 205 nm;流量 0.7 mL · min⁻¹;进样量 25 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 系统适用性试验溶液 取左卡尼汀对照品和左卡尼汀杂质 A 对照品适量,用流动相溶解并制成每 1 mL 约含左卡尼汀 5 mg 和左卡尼汀杂质 A 0.025 mg 的混合溶液,即得。

2.2.2 供试品溶液 精密量取供试品适量,加流动相稀释制成每 1 mL 约含左卡尼汀 5 mg 的溶液,即得。

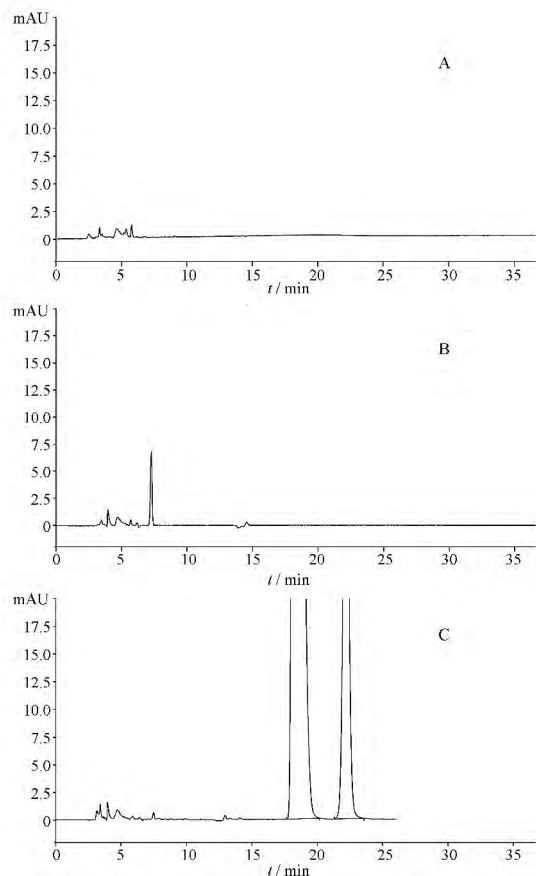
2.2.3 对照溶液 精密量取“2.2.2”项下供试品溶液 1 mL,置 100 mL 量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,再精密量取 1 mL,置 10 mL 量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3 系统适用性试验

分别取系统适用性试验溶液、空白溶剂和空白辅料(pH 调节剂盐酸)溶液,依法进样测定,记录色谱图,结果左卡尼汀和杂质 A 分离度良好(>2.0),见图 1。

2.4 专属性试验

精密量取供试品 25 mL,置 100 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液,进行如下试验:①精密量取 2 mL,置 20 mL 量瓶中,加入 1 mol · L⁻¹盐酸溶液 1 mL,置水浴中加热 30 min,放冷,用 1 mol · L⁻¹氢氧化钠溶液 1 mL 中和后,加流动相稀释至刻度,摇匀,滤过,作为酸破坏溶液;②精密量取 2 mL,置 20 mL 量瓶中,加入 1 mol · L⁻¹氢氧化钠溶液 0.5 mL,置水浴中加热 30 min,放冷,用 1 mol · L⁻¹盐酸溶液 0.5 mL 中和后,加流动相稀释至刻度,摇匀,滤过,作为碱破坏溶液;③精密量取 2 mL,置 20 mL 量瓶中,加入 30% 过氧化氢溶液 1 mL,置水浴中加热 10 min,放冷,加流动相稀释至刻度,摇匀,滤过,作为氧化破坏溶液;④精密量取 2 mL,置 20 mL 量瓶中,水浴中加热 5 h,放冷,加流动相稀释至刻度,摇匀,滤过,作为高温破坏溶液;



A. 空白溶剂; B. 空白辅料溶液; C. 系统适用性试验溶液
图 1 系统适用性试验 HPLC 色谱图

⑤精密量取 2 mL, 置 20 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 置 4 500 Lx 光照强度下放置 24 h 滤过, 作为光破坏溶液。取各溶液进样 25 μ L, 记录色谱图, 见图 2。结果表明: 本品在酸性条件下较稳定, 经碱、氧化破坏后, 有不同程度的降解, 左卡尼汀、左卡尼汀杂质 A 及其他降解产物峰之间分离度良好, 且降解前主成分色谱峰与降解后主成分色谱峰其降解产物峰面积之和能达到物料平衡, 表明该方法专属性良好。

2.5 线性关系考察

取左卡尼汀杂质 A 对照品 12.5 mg, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 加水溶解并用流动相稀释至刻度, 摇匀, 分别精密量取适量, 用流动相稀释制成 0.5, 0.25, 0.1, 0.025, 0.001 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 分别吸取 25 μ L, 注入液相色谱仪, 记录色谱图。以浓度作为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程为 $A = 98\,911.43C + 273.72$ ($r = 0.999\,8$)。表明左卡尼汀杂质 A 在 0.001 ~ 0.500 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内, 峰面积与浓度呈良好的线性关系。

2.6 定量限与检测限

精密量取“2.5”项下 0.001 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 杂质 A

对照品溶液 2 mL, 置 20 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 25 μ L, 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 得左卡尼汀杂质 A 的定量限 ($S/N \approx 10$) 为 2.5 ng。精密量取定量限溶液 3 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 25 μ L, 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 得左卡尼汀杂质 A 的检测限 ($S/N \approx 3$) 为 0.75 ng。

2.7 进样精密密度

取“2.5”项下 0.025 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 杂质 A 对照品溶液, 依法进样, 重复测定 5 次, 结果 5 次测定峰面积的平均值为 2 618.809, 其 RSD 为 0.08%, 表明仪器进样精密密度良好。

2.8 重复性试验

精密量取供试品(批号 090201) 适量, 共 6 份, 分别加流动相稀释制成每 1 mL 中约含左卡尼汀 5 mg 的溶液, 摇匀, 精密量取 25 μ L, 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 计算左卡尼汀杂质 A 的含量, 6 次测定左卡尼汀杂质 A 的平均含量为 0.007 5%, RSD 为 1.86%, 结果表明本方法重复性良好。

2.9 稳定性试验

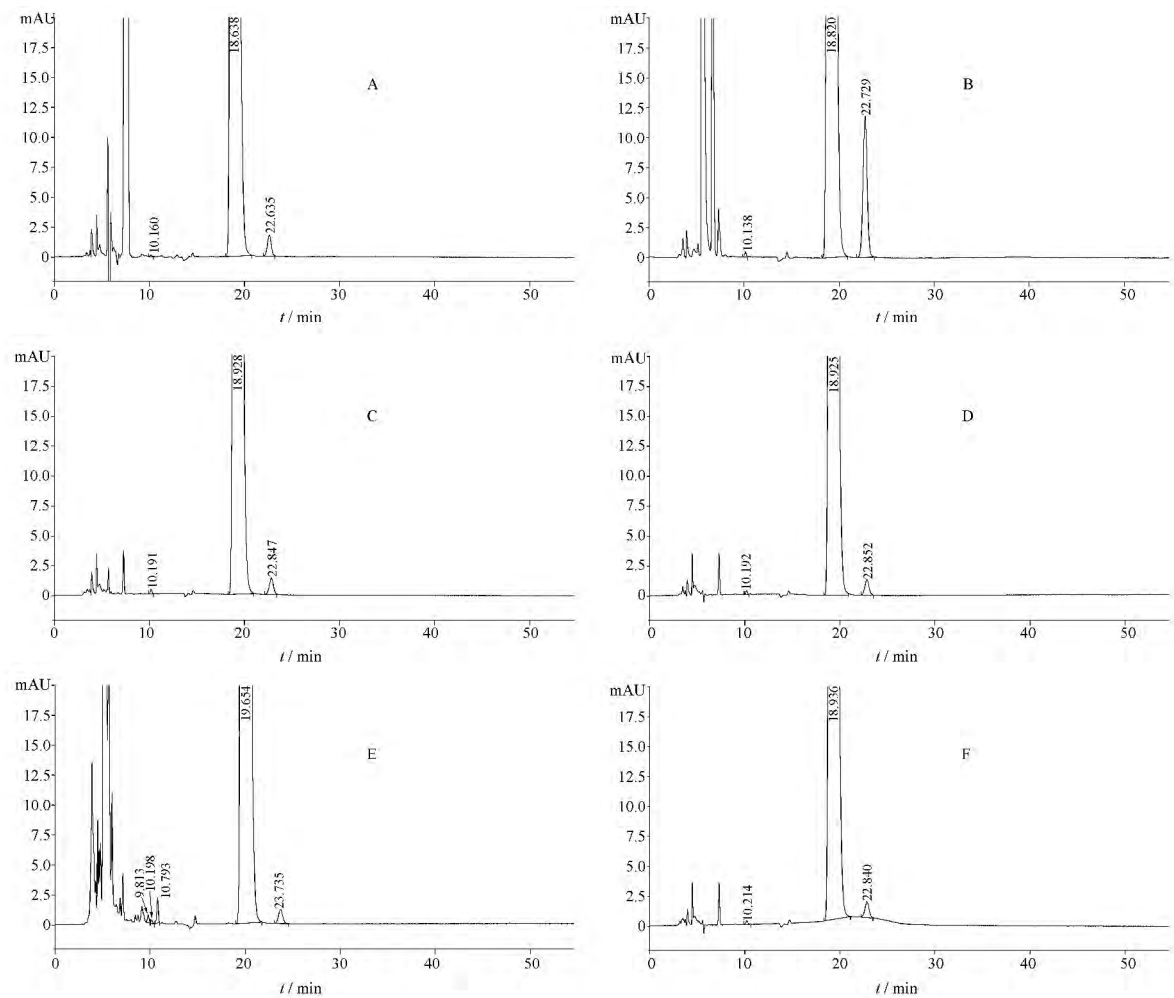
取“2.8”项下的供试品溶液, 于室温暗处放置, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 依法测定左卡尼汀杂质 A 的峰面积, 结果峰面积的平均值为 40.351, RSD 为 1.72%, 可见供试品溶液于室温暗处放置 10 h, 溶液中左卡尼汀杂质 A 的稳定性良好。

2.10 回收率试验

精密量取已知含量(杂质 A 含量为 0.007 5%) 的供试品(批号 090201) 10 mL, 置 20 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品贮备溶液。精密量取供试品溶液贮备液 1 mL, 共 9 份, 分别置 20 mL 量瓶中, 按 80%、100%、120% 浓度水平分别精密加入 0.500 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 杂质 A 对照品溶液 0.8, 1, 1.2 mL 各三份, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。取“2.5”项下 0.025 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 杂质 A 对照品溶液, 作为对照品溶液。精密吸取供试品溶液和对照品溶液各 25 μ L 进样测定, 按外标法以峰面积计算, 结果平均回收率为 100.08%, 其 RSD 为 1.14%, 说明该方法准确度良好。

2.11 耐用性试验

试验分别采用 Waters μ Bondapak NH_2 柱 (3.9 mm \times 300 mm, 10 μ m)、Phenomenex Luna NH_2 柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m) 和 YMC-pack NH_2 (4.6 mm \times 300 mm, 5 μ m) 色谱柱, 取系统适用性试验溶液, 依法进样测定, 结果三根色谱柱均不能使



A. 酸破坏; B. 碱破坏; C. 高温破坏; D. 光照破坏; E. 氧化破坏; F. 未破坏
图 2 专属性试验 HPLC 色谱图

左卡尼汀和杂质 A 达到有效分离 ,显示该方法对色谱柱具有一定依赖性 ,因此本方法规定采用 Alltima Amino 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm ,5 μm) 色谱柱进行有关物质检查。

试验用同一台 Agilent1200 高效液相色谱仪 ,同一根 Alltima Amino 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm ,5 μm) ,分别在不同流量 (0.7 ,1.0 mL · min⁻¹) 、柱温 (30 ℃ ,20 ℃) 、缓冲盐 pH 值 (4.3 ,4.5) 色谱条件下进样测定 ,供试品各杂质与主峰均能获得良好分离。

2.12 样品测定

按上述检测方法 ,对本公司用于工艺验证的 3 批样品 (090801 ,090802 ,090803) 长期试验 18 个月及用于稳定性试验的 3 批样品 (090201 ,090202 ,090203) 长期试验 24 个月进行了检验 ,并与进口产品 A 厂 (原研厂家) 、进口产品 B 厂、国产仿制产品 C 厂的产品进行了有关物质对比 ,按“2.2.2”项下方法制备供试

品溶液并依法测定 ,以外标法计算杂质 A 含量 ,以自身对照法计算未知杂质的含量 ,结果见表 1。

表 1 样品中有关物质测定结果

批号	杂质 A / %	其他单个杂质 / %	其他总杂质 / %
090201	0.007	0.058	0.058
090202	0.007	0.058	0.058
090203	0.007	0.054	0.054
090801	0.007	0.053	0.053
090802	0.007	0.048	0.048
090803	0.007	0.051	0.051
100215	0.185	0	0
0703404	0.212	0	0
0901061	0.010	0.149	0.149

3 讨论

左卡尼汀注射液在《中国药典》及国外药典 (USP ,BP ,EP) 中均未收载。国内目前有关左卡尼汀注射液有关物质测定方法的报道不多见 ,且有些

文献报道的方法重现性差。《欧洲药典》左卡尼汀质量标准中,色谱柱填料为 aminopropylmethylsilyl silica gel,我们咨询了多家色谱柱代理商,结果没有购买到此种填料的色谱柱,我们参考相关文献^[3-4],选择填料类似的氨基柱进行试验,结果分离度达不到 1.5,最终筛选出 Alltima Amino 色谱柱(4.6 mm×250 mm 5 μm),并用 DAD 检测器进行了峰纯度试验,结果显示流动相中用 0.05 mol·L⁻¹磷酸二氢钾溶液的 pH 值为 4.7 时,左卡尼汀峰不纯。在保持《欧洲药典》流动相比比例不变的前提下,我们通过对不同 pH 值的 0.05 mol·L⁻¹磷酸盐溶液-乙腈(35:65)为流动相进行峰纯度试验,结果显示 0.05 mol·L⁻¹磷酸盐溶液 pH 值在 4.3~4.5 之

间左卡尼汀和杂质 A 的分离度最佳,峰纯度最高。本文建立的 HPLC 法,经对色谱柱及流动相的优化,能使左卡尼汀与杂质 A 及其他未知杂质均达到基线分离。在标准中增加对已知杂质 A 的控制,可更加有效的控制药品质量。

参考文献

- [1] 国家药品标准·新药转正标准[S]. 第 61 册. 221
- [2] 欧洲药典[S]. 6. 0 版. 2257-2258
- [3] 闵翠娥, 陆媛, 江少仪, 等. HPLC 法测定左卡尼汀注射液含量及有关物质[J]. 广东药学院学报, 2009, 25(6): 588-591
- [4] 李玺, 李薇, 佟爱东. 注射用乙酰左卡尼汀含量及有关物质的测定[J]. 今日药学, 2008, 18(5): 24-25

(收稿日期: 2015-03-18)

(上接第 249 页)

2.8 可信限范围

中国药典的可信限范围($FL \leq 25$)显著低于其他国家药典,原因主要是每组的样本量大。我们经过大量实验得出,使用小鼠实验与使用大鼠结果没有较大差别。进一步再考虑到实验成本和动物福利因素,建议在中国药典现行方法的基础上优化 HCG 生物测定新的方法。

3 讨论

各国药典在附录中没有像热原检查法那样详细说明对实验环境的要求,而且我们在实际工作中发现,实验动物所处的环境对 HCG 生物测定的结果会产生较大影响,甚至要考虑到同一实验室每组动物放置的位置。故确定实验室在 20~25℃ 下进行为最佳,同时实验期间的温差波动应该明确规定小于 3℃;对于湿度,我们认为与温度同样重要。由于动物体内激素的分泌会受多方面因素影响,我们要把能控制好的因素规定好。建议药典中应该对测定时的环境湿度进行相对明确的规定,如“符合动物实验设施的国标要求”或直接说明“湿度范围应在 30%~70% 的范围”等。

近年来各国药典生物测定方法有逐渐被理化测

定方法所取代的趋势,如胰岛素、降钙素等已改用 HPLC 方法来检测。但以绒毛膜促性腺激素为代表的激素类产品各国药典一直沿用生物测定方法作为控制其质量的重要项目。原因是生物测定方法可以评价产品批与批之间的稳定性和一致性,发现不易预料变化的综合效应^[8]。因此在现行药典方法的基础上改进生物测定的方法,把先进的检测仪器和经典的动物实验相结合,并且考虑国际间广泛关注的动物福利问题,将是建立 HCG 生物测定新方法的发展趋势。

参考文献

- [1] Laurence A Cole. New discoveries on the biology and detection of human chorionic gonadotropin[J]. Reproductive Biology and Endocrinology, 2009, 7(7): 8
- [2] 王秀萍, 焦琳, 郭红燕. 人绒毛膜促性腺激素的临床应用进展[J]. 药学服务与研究, 2010, 10(3): 185-189
- [3] USP[S]. 33 版. 3366
- [4] JP[S]. 15 版. 707-708
- [5] BP[S]. 2010 年版. 492
- [6] EP[S]. 7. 0 版. 2120-2121
- [7] 中国药典[S]. 2010 年版. 二部. 622
- [8] 李湛军, 徐康森. 生化药物质量控制中生物测定的作用与局限[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(02): 297-301

(收稿日期: 2015-04-14)