

HPLC法检查左乙拉西坦缓释片的有关物质

张少桦^{1*},王锦刚^{1,2#},蒋海松²(1.陕西中医学院,西安 712046;2.北京科信必成医药科技发展有限公司哈尔滨分公司,哈尔滨 150000)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)13-1212-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.13.21

摘要 目的:建立检查左乙拉西坦缓释片有关物质的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Wondasil C₁₈,流动相为缓冲液(含磷酸二氢钾、庚烷磺酸钠,pH 2.8)-乙腈(950:50),流速为1.0 ml/min,检测波长为200 nm,进样量为10 μl。以外标法计算杂质质量。结果:左乙拉西坦酸检测质量浓度线性范围为0.168 7~6.714 μg/ml($r=1.000$);低、中、高质量浓度的回收率分别为90.3%、101.7%、103.3%,RSD分别为0.17%、1.08%、0.43%($n=3$);左乙拉西坦酸定量限为76.51 ng/ml。结论:建立的方法简便、准确、专属性好,可以用于左乙拉西坦缓释片中的有关物质检查。

关键词 左乙拉西坦缓释片;左乙拉西坦酸;高效液相色谱法;有关物质;检查

Determination of Related Substances in Levetiracetam Sustained-release Tablets by HPLC

ZHANG Shao-hua¹, WANG Jin-gang^{1,2}, JIANG Hai-song²(1. Shaanxi College of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 712046, China; 2. Harbin Branch, Beijing Kexinbicheng Pharmaceutical Technology Development Co., Ltd., Harbin 150000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of related substances in Levetiracetam sustained-release tablets. METHODS: HPLC method was adopted. The separation was performed on Wondasil C₁₈ column with mobile phase consisted of buffer (potassium dihydrogen phosphate, sodium heptanesulfonate, pH 2.8)-acetonitrile (950:50) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 200 nm, and injection volume was 10 μl. The content of related substances was calculated by external standard method. RESULTS: The linear range of levetiracetam were 0.168 7-6.714 μg/ml ($r=1.000$). The average recoveries were 90.3%, 101.7% and 103.3% at low, medium and high concentrations, and RSDs were 0.17%, 1.08% and 0.43% ($n=3$), respectively. The limit of quantification of levetiracetam acid was 76.51 ng/ml. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and specific for the determination of related substances in Levetiracetam sustained-release tablets.

KEYWORDS Levetiracetam sustained-release tablets; Levetiracetam acid; HPLC; Related substances; Determination

要由样品的复杂程度决定,既要保证待测物完全分离,又要保证所有组分全部流出,测定时间又不宜过长。本试验待测溶剂有6种,包括DMF在内共有7种组分,柱温大于40℃时,分离度达不到要求,因此柱温定为35℃。应先使低沸点的溶剂有效分离,然后以50℃/min的速率升温至200℃,保持10 min,使DMF加快出峰以改善峰形,缩短分析时间,提高工作效率,并保证DMF不残留于色谱柱中。

3.4 检测限度的确定

根据2010年版《中国药典》的相关要求^[10],将依诺昔酮中乙醇、丙酮、乙醚、二氯甲烷、乙酸乙酯和甲苯的限度定为0.5%、0.5%、0.5%、0.06%、0.5%和0.089%。

综上,本文建立的方法线性、精密度、回收率、定量限、检测限等试验结果均较好,能够准确、迅速地检测出依诺昔酮原料药中残留的乙醇、丙酮、乙醚、二氯甲烷、乙酸乙酯与甲苯,从而为保证药品质量提供依据。

参考文献

[1] 卓彩兰,戚敏.抗心衰药物:依诺昔酮[J].山东医药工业,

* 硕士研究生。研究方向:缓释制剂。E-mail: zsh907496653@aliyun.com

通信作者:高级工程师,硕士。研究方向:缓释制剂。E-mail: wangjg163@vip.163.com

1999,18(1):58.

- [2] 李树政.小儿充血性心力衰竭的治疗进展[J].小儿急救医学杂志,1994,1(2):49.
- [3] 陈练.磷酸二酯酶抑制剂治疗充血性心衰的现状[J].国外医学药学分册,1993,20(5):286.
- [4] 马淑涛.依诺昔酮的合成[J].中国医药工业杂志,1999,30(2):529.
- [5] 洪中立,曲静伟.抗心衰新药依诺昔酮的临床应用[J].新药与临床杂志,1990,9(1):22.
- [6] 郭晓玲,钱蔚,杨昌金,等.毛细管气相色谱法测定速效伤风胶囊中对乙酰氨基酚、咖啡因、马来酸氯苯那敏的含量[J].色谱,1998,16(2):164.
- [7] 栾成章,祝波,王尊文,等.顶空气相色谱法测定夫西地酸中有机溶剂残留量[J].中国药房,2006,17(7):535.
- [8] 吕志华,王远红,赵峡.顶空气相色谱法测定几丁糖酯中溶剂残留[J].药物分析杂志,2001,21(4):276.
- [9] 秦立,胡昌勤,刘文英.顶空气相色谱法测定头孢泊肟酯中有机溶剂残留量[J].药物分析杂志,2003,23(6):452.
- [10] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:附录63.

(收稿日期:2013-05-16 修回日期:2013-05-28)

癫痫是一种常见的慢性神经性疾病,在我国平均患病率为7%,且每年新增患者达50万人左右^[1]。左乙拉西坦(Levetiracetam, LEV)是一种新型的口服抗癫痫药物^[2],由于其独特的抗癫痫机制^[3]、良好的药动学特点^[4]、安全有效的临床效果,使其成为最有市场前景的新型抗癫痫药物之一^[5-6]。比利时优时比(UCB)公司研制的左乙拉西坦缓释片(Keppra XRTM)于2008年获准在美国上市。2012年版《英国药典》和《欧洲药典》7.0版收载了左乙拉西坦原料药,《美国药典》34版收载了左乙拉西坦原料药及左乙拉西坦片。2010年版《中国药典》尚未收载左乙拉西坦原料药及其相关剂型,国内关于左乙拉西坦缓释片质量标准的文献较少。为有效控制药品质量,笔者建立了左乙拉西坦缓释片有关物质检查的高效液相色谱(HPLC)法,以为建立本品的质量标准提供一定依据。

1 材料

1.1 仪器

e2695-2998 HPLC仪,含二极管阵列检测器(美国Waters公司);LC-20AT液相色谱仪、SPD-20A紫外检测器(日本岛津公司);AB265-S型电子天平(瑞士Mettler-toledo公司)。

1.2 药品与试剂

左乙拉西坦原料药(美国TAPI Puerto Rico Inc.,批号:2527LV120712,含量:98.5%);左乙拉西坦酸对照品(上海迈瑞尔化学技术有限公司,批号:2.0,纯度:100%);左乙拉西坦缓释片(北京科信必成医药科技发展有限公司哈尔滨分公司,批号:20130701、20130702、20130703,规格:每片750 mg);乙腈、庚烷磺酸钠均为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为娃哈哈纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Wondasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:缓冲液(取磷酸二氢钾6.8 g、庚烷磺酸钠0.85 g,加水溶解并稀释至1 000 ml,用磷酸调节pH 2.8)-乙腈(950:50, V/V),流速:1.0 ml/min;检测波长:200 nm;进样量:10 μl。

2.2 溶液的制备

取左乙拉西坦原料药约11 mg,置于100 ml量瓶中,加入1 mol/L氢氧化钠溶液1 ml,置室温下反应10 min,再加入1 mol/L盐酸1 ml,最后用流动相稀释至刻度,作为系统适用性溶液。

取缓释片研细,取细粉适量(约相当于左乙拉西坦120 mg)置于100 ml量瓶中,先加5 ml乙腈使其分散,再加缓冲液适量,超声溶解,用缓冲液稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液作为供试品溶液。

精密量取供试品溶液1 ml,置于250 ml量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,作为对照溶液。

另取左乙拉西坦酸对照品,精密称定,用流动相溶解并稀释制成3.6 μg/ml的溶液,摇匀,作为对照品溶液。

2.3 强制降解试验

取缓释片(批号:20130702)研细,取细粉7份(各约相当于左乙拉西坦120 mg)分别进行以下破坏试验:(1)酸破坏:取细粉置于100 ml量瓶中,先加5 ml乙腈使其分散,再加1 mol/L盐酸5 ml,室温放置4 h。(2)碱破坏:取细粉置于100 ml量瓶中,先加5 ml乙腈使其分散,再加1 mol/L氢氧化钠5 ml,室温

放置1 h;(3)氧化破坏:取细粉置于100 ml量瓶中,先加5 ml乙腈使其分散,再加5 ml 30%双氧水,室温放置3 h;(4)固态高温破坏:取细粉置于60℃电热干燥箱中破坏12 d;(5)溶液高温破坏:取细粉置于100 ml量瓶中,先加5 ml乙腈使其分散,再加10 ml水,于80℃水浴中加热2.5 h;(6)固态光照破坏:取细粉置于低温光照仪中,4 500 lx下照射12 d;(7)溶液光照破坏:取细粉置于100 ml量瓶中,先加5 ml乙腈使其分散,再加10 ml水,置于低温光照仪中,4 500 lx下照射12 d。各破坏条件下平行进行空白辅料(除主成分外的其他辅料,按左乙拉西坦120 mg相应比例的用量)的强制降解试验。分别将降解后的样品、空白辅料用缓冲液溶解稀释至刻度,摇匀,滤过;分别取续滤液10 μl注入色谱仪,记录色谱图,计算各峰的分离度、物料平衡、峰纯度等。系统适用性溶液(见“2.2”项下)、流动相、未破坏的样品及各破坏后样品的色谱图见图1[因本品在光照(固态、液态)、高温(固态)条件下几乎不发生降解,故未列出图谱;另空白辅料图略],计算结果见表1(表中的分离度指色谱图中按出峰顺序各峰之间的分离度)。

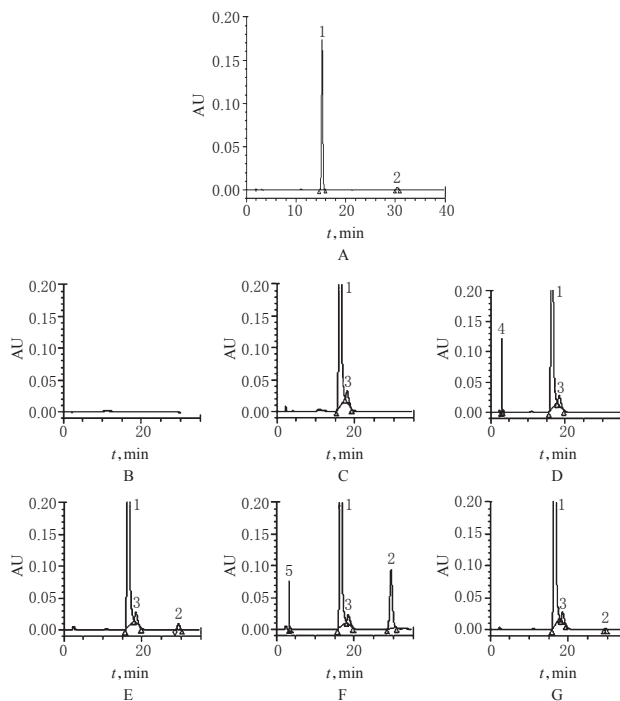


图1 高效液相色谱图

A.系统适用性溶液;B.流动相;C.未破坏样品;D.溶液高温破坏后样品;E.酸破坏后样品;F.碱破坏后样品;G.氧化破坏后样品;1.左乙拉西坦;2.左乙拉西坦酸;3.杂质I;4.杂质II;5.杂质III

Fig 1 HPLC chromatograms

A. system suitability solution; B. mobile phase; C. un-destroyed samples; D. samples solution destroyed by high temperature; E. samples destroyed by acid; F. samples destroyed by alkali; G. samples destroyed by oxidation; 1. levetiracetam; 2. levetiracetam acid; 3. impurity I; 4. impurity II; 5. impurity III

图1及表1结果表明,在建立的色谱条件下,流动相对检测结果未见干扰;所产生的降解产物(包括辅料降解产生的杂质)与主峰均能获得良好分离;二极管阵列检测器显示色谱峰的纯度1角度小于纯度1阈值,可初步判断杂质峰及主峰是纯

表1 破坏样品检测结果

Tab 1 Result of destroyed sample

样品	杂质个数	分离度	杂质含量, %	物料平衡, %	峰纯度		
					峰归属	纯度1角度, °	纯度1 阈值, °
未破坏	1	2	2.29		主峰	1.286	1.570
酸破坏	2	2;9	4.05	95.6	主峰	3.360	5.293
					左乙拉西坦酸峰	5.805	7.730
碱破坏	3	26;2;9	16.05	92.6	主峰	0.828	1.887
					左乙拉西坦酸峰	0.604	2.414
氧化破坏	2	2;12	2.46	91.6	主峰	3.341	5.357
					左乙拉西坦酸峰	42.994	62.704
固态高温破坏	1	2	2.25	102.4	主峰	1.541	1.864
溶液高温破坏	2	29;2	4.53	96.7	主峰	1.262	1.871
固态光照破坏	1	2	2.14	97.8	主峰	1.337	1.871
溶液光照破坏	1	2	2.07	103.8	主峰	1.673	1.860

的,没有包含其他杂质峰;各破坏条件下物料平衡均在90%~110%之间;空白辅料降解产生的杂质I、II保留时间在3~4 min,杂质峰与其相邻峰能够达到基线分离。

本品在光照(固态、液态)、高温(固态)条件下几乎不发生降解,但在碱破坏后检出的杂质最多,酸、氧化、高温(液态)条件下降解较轻,降解产物主要为左乙拉西坦酸,表明本品对酸、碱、氧化剂及水较敏感。

2.4 耐用性试验

分别精密量取“2.2”项下系统适用性溶液、对照品溶液、供试品溶液(批号:20130702)、对照溶液10 μl,对色谱条件进行如下调整:流速1.0 ml/min的(±20)%、流动相中乙腈5%的(±10)%、流动相pH在2.8±0.2、柱温在25~30℃、流动相中庚烷磺酸钠质量浓度在0.85 g/L的(±10)%、3根相同规格不同品牌色谱柱。记录色谱图,相关结果详见表2。

表2 耐用性试验检测结果

Tab 2 Result of durability tests

色谱条件	参数变化	左乙拉西坦		左乙拉西坦酸		分离度	左乙拉西坦酸含量的RSD, %	其他杂质峰面积之和的RSD, %
		理论板数	拖尾因子	理论板数	拖尾因子			
流速, ml/min	0.8	16 088	1.1	16 854	1.0	19	7.39	0
	1	14 334	1.1	15 134	1.0	18		
	1.2	13 233	1.1	14 033	1.0	17		
流动相比	955:45	14 408	1.1	15 323	1.0	19	7.11	1.96
	950:50	14 334	1.1	15 134	1.0	18		
	945:55	13 969	1.1	14 901	1.0	18		
流动相pH	2.6	14 754	1.1	14 626	1.0	20	8.02	2.86
	2.8	14 334	1.1	15 134	1.0	18		
	3.0	14 766	1.1	15 413	1.0	16		
柱温, °C	25	14 334	1.1	15 134	1.0	18	6.49	1.92
	28	14 676	1.1	15 630	1.0	18		
	30	14 871	1.1	15 747	1.0	18		
庚烷磺酸钠质量浓度, g/L	0.765	14 500	1.1	15 356	1.0	18	7.87	1.89
	0.85	14 334	1.1	15 134	1.0	18		
	0.935	14 485	1.1	15 372	1.0	18		
色谱柱	Thermo	12 052	1.2	18 423	1.2	20	5.4	2.25
	Wondasil	14 334	1.1	15 134	1.0	18		
	Waters	16 610	1.1	17 512	1.2	23		

由表2可知,色谱条件在较小范围内变动时,检测结果几乎不受影响,表明该方法耐用性良好,可用于左乙拉西坦缓释片有关物质的常规检查。

2.5 系统适用性试验

取“2.2”项下的左乙拉西坦酸对照品溶液,连续进样6次,记录色谱图。结果,保留时间的RSD为0.05%($n=6$),峰面积的RSD为0.47%($n=6$)。

取“2.2”项下系统适用性溶液,注入色谱仪,理论板数、拖尾因子、分离度结果见表3。

表3 系统适用性试验结果

Tab 3 Result of system suitability

成分	保留时间, min	理论板数	拖尾因子	分离度
左乙拉西坦	16.589	14 051	1.1	18
左乙拉西坦酸	30.922	15 043	1.0	

由表3可见,左乙拉西坦峰与左乙拉西坦酸峰的理论板数、拖尾因子、分离度均符合标准。

2.6 线性关系试验

取左乙拉西坦酸对照品适量,分别加流动相制成0.167 8、0.335 7、1.119、2.238、3.357、4.476、6.714 μg/ml的溶液,分别精密量取10 μl进样,记录色谱图,以峰面积(y)对质量浓度(c)进行线性回归,得回归方程: $y=25\ 969c-825.16$ ($r=1.000$, $n=7$),表明左乙拉西坦酸检测质量浓度线性范围为0.168 7~6.714 μg/ml。质量浓度/峰面积的响应因子的RSD为3.89%($n=7$), y 轴截距在100%响应值的0.89%以内,表明溶解左乙拉西坦酸的溶剂(流动相)对检测结果无干扰。

2.7 定量限试验

取“2.6”项下左乙拉西坦酸对照品溶液依次稀释后进行测定,按信噪比为10测得左乙拉西坦酸的定量限为76.51 ng/ml,相当于供试品质量浓度(即1.2 mg/ml)的0.006%。结果表明,该方法能够准确检查左乙拉西坦缓释片中的降解杂质(左乙拉西坦酸)。

2.8 回收率试验

称取9份缓释片(批号:20130702)细粉(约相当于左乙拉西坦120 mg),每3份中分别精密加入10%、100%(3.6 μg/ml)、167%的左乙拉西坦酸对照品溶液,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,分别进样测定并计算。结果,低、中、高质量浓度的回收率分别为90.3%、101.7%、103.3%;RSD分别为0.17%、1.08%、0.43%($n=3$);9份样品的平均回收率为98.4%,RSD为6.26%($n=9$)。各浓度样品回收率以及9份样品平均回收率均在90%~110%,RSD均小于10%。结果表明,本品中辅料对有关物质测定无干扰,回收完全。

2.9 重复性试验

按“2.2”项下方法制备供试品溶液(批号:20130702)6份,分别精密量取10 μl,注入液相色谱仪,记录色谱图。结果,6份样品中左乙拉西坦酸含量的RSD为1.71%($n=6$)。表明该方法重复性良好。

2.10 溶液稳定性试验

按“2.2”项下方法制备左乙拉西坦酸对照品溶液、供试品溶液(批号:20130702)、对照溶液,在室温下分别于0、5、10、15、20 h进样测定,结果左乙拉西坦酸对照品溶液峰面积RSD为0.63%($n=5$),供试品溶液中左乙拉西坦酸含量的RSD为2.43%($n=5$),对照溶液中主峰面积的RSD为0.34%($n=5$)。结果表明,左乙拉西坦酸对照品溶液、供试品溶液、对照溶液

室温放置20 h内稳定。

2.11 有关物质检查

取“2.2”项下系统适用性溶液进样分析,左乙拉西坦与左乙拉西坦酸的分离度不小于2.0。取对照溶液10 μ l注入色谱仪,调节检测灵敏度,使主成分色谱峰的峰高约为满量程的20%。精密量取对照溶液和供试品溶液各10 μ l,分别注入色谱仪,记录色谱图至少至左乙拉西坦峰保留时间的3倍。供试品溶液色谱图中如有与对照品溶液色谱图中左乙拉西坦酸保留时间一致的峰,按外标法以峰面积计算,不得过0.3%;其他单个杂质峰面积不得大于对照溶液主峰面积的0.25倍(0.1%);总杂质峰面积的和不得大于对照溶液主峰面积的1.5倍(0.6%)。3批缓释片有关物质检查结果见表4。

表4 3批样品有关物质检查结果

Tab 4 Determination of related substance in 3 batches of samples

批号	左乙拉西坦含量, %	其他单个最大杂质, %	总杂质, %
20130701	0.007	0.018	0.056
20130702	0.008	0.019	0.058
20130703	0.010	0.019	0.059

3 讨论

3.1 色谱条件的选择

色谱条件的确定通常以最难分离的两个降解产物或降解产物与主成分之间的分离度符合要求作为重要依据。左乙拉西坦主要的降解产物为左乙拉西坦酸,二者化学结构类似,不易分离。试验中,结合液相色谱仪的使用系统压力、乙腈的末端吸收情况对比考察了左乙拉西坦的酸、碱、氧化破坏溶液在3种色谱条件(参见《美国药典》^[7]收录的左乙拉西坦原料药和左乙拉西坦片、文献^[9])下的杂质检出个数、分离度。试验结果表明,选择本文建立的色谱条件,各破坏样品检出的杂质个数最多,主峰与杂质峰及各杂质峰之间均能完全分离;该色谱条件下左乙拉西坦与左乙拉西坦酸的分离度明显高于其他条件下的分离度;并可以避免乙腈的强末端吸收对检测结果的干扰;低流速对仪器产生压力低,可以延长仪器的使用寿命。

3.2 系统适用性溶液的配制

有关物质检查时系统适用性溶液中主要包括最难分离的两个杂质或主成分与杂质,本品将主成分与降解产物(左乙拉西坦酸)用于系统适用性的控制。由于左乙拉西坦碱降解主要生成左乙拉西坦酸,故试验中没有加杂质对照品,而采用左乙拉西坦原料药碱水解的方法来获得左乙拉西坦酸,从而大大节省购买杂质对照品的成本。采用左乙拉西坦原料药碱降解的方法还可以排除缓释片中大量辅料的干扰。

3.3 供试品溶液的配制

缓释片中起缓释作用的主要是一些不溶于水、分子质量高、黏度大的辅料,辅料用量一般较普通片多。试验时发现供试品溶液配制过程中常遇到的问题有:样品加入溶剂后立即

结团,辅料将主药包裹起来,超声溶解仍不能将其分散;样品加入溶剂后虽然不结团,但超声一段时间后,发现有样品粘在量瓶瓶底,超声不能将其溶解;样品加入溶剂既不结团也不粘底,但是需要超声溶解的时间较长,给试验操作带来不便。故对样品选择合适的处理方法,不仅有利于试验结果的测定,而且可以大大提高工作效率。本试验中将流动相中的缓冲液与有机相(乙腈)分开加入,先加有机相分散样品,这样既避免了样品的结团、黏度大等情况,也使溶解样品溶剂与流动相成分相同,从而减少溶剂效应对检测结果的干扰。

3.4 强制降解试验

从左乙拉西坦的化学结构可初步判断,其对酸、碱、氧化条件敏感,对高温、光照稳定。为了充分考察、验证左乙拉西坦的稳定性,笔者结合相关文献^[9]资料,确定了强制降解试验的条件。平行进行的空白辅料强制降解结果表明,辅料及其降解产物对检查无干扰。

由于各种试验条件的限制,尚不能逐一确定破坏条件下的降解产物,仍有待进一步探索研究。

综上所述,经专属性、耐用性、线性、准确度、精密性、定量限、系统适用性试验的验证,本文建立的有关物质检查方法专属性好、灵敏度高,可以准确定量杂质,能够用于左乙拉西坦缓释片中有关物质的检查。

参考文献

- [1] 陈艳坤,刘诗翔.干细胞移植治疗癫痫的最新研究进展[J].卒中与神经疾病,2011,18(6):383.
- [2] 王学禹,李明霞.左乙拉西坦在癫痫治疗中的应用进展[J].山东医药,2008,48(11):110.
- [3] 田国红,赵忠新.左乙拉西坦:一种具有全新作用机制的抗癫痫新药[J].中国新药与临床杂志,2006,25(10):782.
- [4] 刘俊杰.左乙拉西坦临床应用研究进展[J].首都医药,2011(6):12.
- [5] 江正祥.抗癫痫药物市场发展态势[J].世界临床药物,2010,31(8):510.
- [6] 李惠芬,张玉琴,刘彦.HPLC法测定人血清中左乙拉西坦的浓度[J].中国药房,2013,24(14):1272.
- [7] The United States Pharmacopeial Convention. USP 34-NF 29[S]. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention,2011:3287-3288.
- [8] The United States Pharmacopeial Convention. Levetiracetam extended-release tablet[EB/OL]. (2012-09-30) [2012-12-27]. <http://login.usp.org/cas/login>.
- [9] 马小波,江德元.美国仿制药申报最新要求和案例分析[M].北京:世界图书出版公司,2011:250.

(收稿日期:2013-10-15 修回日期:2013-12-31)

《中国药房》杂志——RCCSE 中国核心学术期刊,欢迎投稿、订阅