

# 超临界流体色谱法分离测定布立西坦片中立体异构体杂质

朱丽萍, 张叶, 乐健, 金薇\* (上海市食品药品检验研究院, 国家药品监督管理局化学药品制剂质量分析重点实验室, 上海 201203)

**摘要:**目的 建立一种超临界流体色谱法分离和测定抗癫痫药布立西坦片中立体异构体杂质。方法 采用硅胶表面涂敷直链淀粉-三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)手性色谱柱(CHIRALPAK AD, 4.6 mm × 250 mm, 10 μm), 以超临界二氧化碳-甲醇(90:10)为流动相, 背压为18 MPa, 进样量为6 μL, 柱温为40 °C, 流速为2 mL · min<sup>-1</sup>, 于205 nm波长处分离布立西坦及其3种立体异构体。结果 布立西坦与其3种立体异构体在10 min内分别被洗脱, 相邻异构体之间的分离度均不小于2.8, 布立西坦在0.01 ~ 0.5 mg · mL<sup>-1</sup>内与峰面积呈良好线性关系, 相关系数为0.999 8 (n=8), 立体异构体杂质A、B、C在0.005 ~ 0.5 mg · mL<sup>-1</sup>内与峰面积呈良好线性关系, 相关系数均为0.999 9 (n=9)。布立西坦和3种异构体的检测限均为2 μg · mL<sup>-1</sup> [信噪比(S/N)=3], 定量限均为5 μg · mL<sup>-1</sup> (S/N=10)。3种异构体的3个不同浓度水平的平均回收率分别为102.1%, 105.8%和102.6% (n=9)。结论 与常规正相模式液相色谱方法相比, 采用超临界流体色谱分离布立西坦及其3种异构体, 可显著提高分离效率, 缩短分离时间, 绿色环保, 可有效用于布立西坦片中各异构体杂质的质量控制。

**关键词:**布立西坦; 对映异构体; 立体异构体; 超临界流体色谱

doi:10.11669/cpj.2024.21.012 中图分类号:R917 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)21-2084-07

## Separation and Detection of Brivaracetam and Its Stereoisomers in Brivaracetam Tablets by Supercritical Fluid Chromatography

ZHU Liping, ZHANG Ye, LE Jian, JIN Wei\* (NMPA Key Laboratory for Quality Analysis of Chemical Drug Preparations, Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To develop a supercritical fluid chromatography method for separation of brivaracetam and its three stereoisomers. **METHODS** Brivaracetam and its three isomers were separated on a silica gel column coated with amylose-tris (3,5-dimethyl phenylcarbamate) (CHIRALPAK AD, 4.6 mm × 250 mm, 10 μm) and maintained at 40 °C. The mobile phase consisted of a mixture of CO<sub>2</sub> and methanol (90:10). The flow rate was at 2.0 mL min<sup>-1</sup>, and the detection wavelength was set at 205 nm. The back pressure of SF-CO<sub>2</sub> was set at 18 MPa, and the injection volume was 6 μL. **RESULTS** Brivaracetam and its three isomers were separated successfully in 10 min with a resolution factor of 2.8, 2.8 and 4.0, respectively. Brivaracetam exhibited a good linear relationship with peak area within the concentration range of 0.01 - 0.5 mg · mL<sup>-1</sup> (r=0.999 8, n=8). Isomer A, B, and C also exhibited a good linear relationship with peak area within the concentration range of 0.005 - 0.5 mg · mL<sup>-1</sup> (r=0.999 9, n=9). The detection limits of brivaracetam and its three isomers (S/N=3) were all 2 μg · mL<sup>-1</sup>, and the quantitation limits (S/N=10) were all 5 μg · mL<sup>-1</sup>. The average spiked recoveries of three isomers at three different concentration levels were 102.1%, 105.8% and 102.6%, respectively (n=9). **CONCLUSION** Compared with conventional liquid chromatography, supercritical fluid chromatography can significantly improve the separation efficiency, shorten the separation time, and greatly reduce the amount of alkane organic solvents, which can be effectively used for the quality control of the isomer impurities in brivaracetam tablets.

**KEY WORDS:** brivaracetam; enantiomer; stereoisomer; supercritical fluid chromatography

布立西坦(又名布瓦西坦, brivaracetam)是抗癫痫药品左乙拉西坦(levetiracetam)吡咯烷烃的4位碳原子连接正丙基的类似物, 化学名为(S)-2-[(R)-2-氧代-4-丙基吡咯烷-1-基]丁酰胺, 由比利时优时比制药公司(UCB Pharma)研制。布立西坦

为第二代抗癫痫药, 与左乙拉西坦相比, 布立西坦对突触囊泡蛋白2A(SV2A)有更高的亲和力和抑制突触传递和囊泡释放能力、更高的亲脂性, 脑部渗透速度更快<sup>[1-2]</sup>。2016年分别被欧洲医药管理局和美国食品药品监督管理局批准上市。布立西

基金项目:上海市科委项目资助(22142201800)

作者简介:朱丽萍,女,硕士,主管药师 研究方向:药物分析及药品质量控制 \*通讯作者:金薇,女,博士,主任药师 研究方向:药物分析及药品质量控制 Tel:(021)50798189

坦有两个手性中心,3个立体异构体杂质,分别为异构体 A,化学名为(*R*)-2-[(*R*)-2-氧代-4-丙基吡咯烷-1-基]丁酰胺;异构体 B,化学名为(*S*)-2-[(*S*)-2-氧代-4-丙基吡咯烷-1-基]丁酰胺;异构体 C,化学名为(*R*)-2-[(*S*)-2-氧代-4-丙基吡咯烷-1-基]丁酰胺。结构式见图 1。布立西坦及其 3 个异构体分别构成了两对旋光异构体。在国家药监局网站上查询国内尚无布立西坦及布立西坦制剂注册,但是已有企业在开展生物等效性试验,《中国药典》2020 年版、《美国药典》2024 年版、《欧洲药典》11 版、《日本药局方》18 版目前均未收录原料及制剂。布立西坦立体异构体的分离和测定仅有极少数液相色谱方法报道。在两份专利<sup>[4-5]</sup>中,涉及布立西坦及其 3 种异构体的高效液相色谱分离检测方法均为正相色谱法。正相色谱系统通常流动相较难平衡,实验中使用的烷烃类试剂对人体和环境危害较大,不符合绿色环保理

念,且分离时间在 20 min 以上。此外,文献[6]则采用超高效液相色谱法,以亚二微米 Chiral PAK IG-U 手性色谱柱,含 10 mmol · L<sup>-1</sup>碳酸铵的乙腈为流动相分离布立西坦及其异构体。

超临界流体色谱(SFC)是一种以超临界流体为流动相的色谱方法,利用其溶剂化作用来实现分离物质的目的。因其流体黏度低、扩散速度快、表面张力小,容易取得较好的峰形,在手性拆分和异构体分离等方面具有较强的优势<sup>[7-12]</sup>。同时 SFC 整个分析过程,有机试剂的使用量很小,更加环保。包括对映异构体在内的布立西坦立体异构体的拆分除专利外仅见 1 篇采用反相色谱的文献报道<sup>[6]</sup>。本研究首次采用 SFC 结合手性固定相对布立西坦及其立体异构体(两对旋光异构体)进行拆分,并对布立西坦片中异构体杂质的含量进行测定,为其质量控制提供准确高效的检测方法。

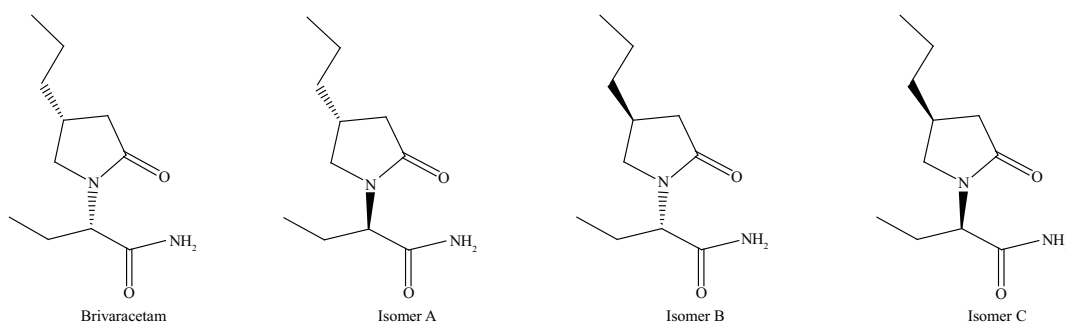


图 1 布立西坦与 3 个立体异构体杂质的结构

Fig. 1 Chemical structures of brivaracetam and its three stereoisomers

## 1 仪器和试剂

安捷伦 1260 型超临界流液相色谱仪(美国安捷伦公司);二极管阵列检测器(DAD);CP225D 型精密天平(Sartorius 公司);XS204 型精密天平(METTLER TOLEDO 公司);手性色谱柱 CHIRAL-PAK AD 色谱柱(0.46 cm × 25 cm, 10 μm);甲醇、乙醇、正己烷均为色谱纯;二氧化碳(上海 Air liquide 公司,纯度 99.99%)。

布立西坦对照品(批号:318A2201)、异构体 A 对照品(批号:20211101)、异构体 B 对照品(批号:20200901)、异构体 C 对照品(批号:20211201)(江苏诚康药业有限公司);布立西坦片(50 mg 规格,批号:CHJ22001、CHJ22002、CHJ22003;100mg 规格,批号:CGJ21001、CGJ21002、CGJ21003,上海迪赛诺生物医药有限公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液的配制

布立西坦对照品溶液:精密称取布立西坦对照品 5 mg 至 25 mL 量瓶中,加乙醇适量,超声使溶解,用乙醇稀释至刻度,摇匀,精密量取 1 mL 溶液至 50 mL 量瓶中,用溶剂稀释至刻度,制成含布立西坦 0.004 mg · mL<sup>-1</sup>的对照品溶液。

异构体杂质对照品溶液:精密称取异构体对照品 A、B 和 C 各约 5 mg 分别至不同的 25 mL 量瓶中,加乙醇适量超声使溶解,用乙醇分别稀释至刻度,摇匀。各精密量取 1 ~ 10 mL 量瓶中,用乙醇稀释至刻度,制成含异构体 A、B 和 C 为 0.02 mg · mL<sup>-1</sup>的异构体杂质对照品溶液。

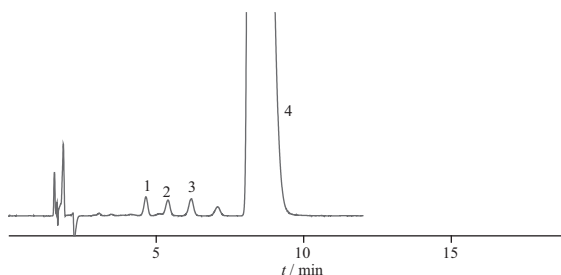
系统适用性溶液:精密称取布立西坦对照品 20 mg,加含异构体 A、B 和 C 均为 0.02 mg · mL<sup>-1</sup>的

异构体杂质对照品溶液溶解并摇匀。

供试品溶液:精密称取研细的布立西坦片细粉(约相当于布立西坦 50 mg)分别至 5 mL 量瓶中,加乙醇适量超声使溶解,用乙醇稀释至刻度,摇匀,经  $8\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心后,取上清液,作为供试品溶液。

## 2.2 色谱条件及系统适用性

色谱柱筛选初始色谱条件:流动相  $\text{CO}_2$ -甲醇(90:10),流速  $1.5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,背压 150 MPa,柱温  $40\text{ }^\circ\text{C}$ ,检测波长 205 nm。优化色谱条件:流动相  $\text{CO}_2$ -甲醇(90:10),流速  $2\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,背压 18 MPa,柱温  $40\text{ }^\circ\text{C}$ ,检测波长 205 nm,进样量  $6\text{ }\mu\text{L}$ 。在上述优化色谱条件下,取系统适用性溶液,色谱图见图 2。异构体 C 与 A、异构体 A 与 B、异构体 B 与布立西坦的分离度分别为 2.85、2.79、3.96,理论塔板数按异构体 C、异构体 A、异构体 B、布立西坦计分别为 6 870、6 908、6 992 和 1 842。



1 - 异构体 C ( $0.02\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ); 2 - 异构体 A ( $0.02\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ); 3 - 异构体 B ( $0.02\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ); 4 - 布立西坦 ( $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ); 图 4~5 中 1~4 同图 2。

1 - Isomer C ( $0.02\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ); 2 - Isomer A ( $0.02\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ); 3 - Isomer B ( $0.02\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ); 4 - Brivaracetam ( $0.02\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ); 1-4 in Fig. 4-5 are the same as Fig. 2.

图 2 布立西坦系统适用性溶液的超临界流体色谱(SFC)图  
Fig. 2 SFC chromatogram of the system suitability solution of brivaracetam and its three isomers

## 2.3 检测限与定量限

分别精密量取“2.1”项下布立西坦对照品溶液和异构体杂质对照品溶液,进行逐级定量稀释,进样量  $6\text{ }\mu\text{L}$ ,记录色谱图,以信噪比(S/N)分别为 3 和 10 计算,布立西坦和 3 种异构体杂质检测限均为  $2\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,定量限均为  $5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,相当于供试品溶液浓度的 0.02% 和 0.05%。

## 2.4 线性与范围

按照“2.1”项下布立西坦对照品溶液配制方法,精密称取布立西坦对照品,用乙醇溶解并定量稀释,制成约含布立西坦 10、20、40、50、60、100、200、

$500\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的布立西坦线性溶液,按“2.2”项下优化色谱条件测定,以布立西坦峰面积为纵坐标,质量浓度( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )为横坐标进行线性回归,结果表明,布立西坦在  $10\sim 500\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  内与峰面积呈良好线性关系,回归方程为  $Y = 2.888\,9X + 7.374\,4$ ,  $r^2 = 0.999\,6$  ( $n = 8$ )。

精密称取异构体对照品 A、B 和 C 适量,用乙醇溶解,并定量稀释,制成含杂质 A、B、C 均分别为 5、10、20、40、50、60、100、200、500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的线性溶液,按“2.2”项下优化色谱条件测定,分别以杂质 A、B、C 峰面积为纵坐标,质量浓度( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )为横坐标进行线性回归,结果表明,杂质 A、B、C 在  $5\sim 500\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  内与峰面积呈良好线性关系,回归方程为杂质 A:  $Y = 2.782\,6X + 5.287\,0$ ,  $r^2 = 0.999\,9$  ( $n = 9$ ),杂质 B:  $Y = 2.498\,5X + 6.027\,5$ ,  $r^2 = 0.999\,9$  ( $n = 9$ ),杂质 C:  $Y = 2.658\,5X + 5.633\,5$ ,  $r^2 = 0.999\,8$  ( $n = 9$ )。

## 2.5 日内精密度

按“2.2”项下优化色谱条件,对含 3 个异构体分别为 0.04、0.05、0.06  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的低、中、高 3 个质量浓度的标准溶液进行日内精密度考察,异构体 A 峰面积的相对标准偏差(RSD)分别为 0.36%、1.30%、1.13%;异构体 B 峰面积的 RSD 分别为 1.75%、1.32%、0.25%;异构体 C 峰面积的 RSD 分别为 1.15%、2.00%、1.27% ( $n = 5$ )。对含布立西坦为  $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的样品溶液进行日内精密度( $n = 8$ )考察,峰面积的 RSD 为 0.88%。

## 2.6 稳定性实验

取系统适用性溶液分别于配制后 0、2、4、6、10、18 h 测定,结果显示,布立西坦峰面积 RSD 为 1.43%,异构体 A、B、C 峰面积 RSD 分别为 3.36%、3.04%、4.41%,表明系统溶液在 18 h 内稳定。

## 2.7 回收率实验

精密称取布立西坦片 2 个规格各 1 个批号样品各 9 份,每份 55~57 mg (约相当于布立西坦 10 mg),分别置于 5 mL 量瓶中,分为 3 组,精密加入“2.2”项下异构体 C、A、B 质量浓度为 0.06、0.05、0.04  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的线性溶液各 1 mL,超声使主药溶解,离心取上清液。按“2.2”项下方法进行测定,计算低、中、高 3 个不同浓度平均回收率。异构体 C 低、中、高 3 个浓度的回收率为 100.1%、102.4%、105%,RSD% 分别为 1.4%、4.0%、2.8%,总的平均回收率为 102.6% ( $n = 9$ );异构体 A 为 99.0%、102.6%、104.7%,RSD% 分别为 1.2%、3.9%、

2.7%, 总的平均回收率为 102.1% ( $n=9$ ); 异构体 B 为 105.0%、105.8%、106.4%, RSD% 分别为

0.4%、3.7%、3.0%, 总的平均回收率为 105.8% ( $n=9$ )。见表 1~3。

表 1 布立西坦片中杂质 C 的回收率测定结果

Tab. 1 Recovery of isomer C in brivaracetam tablets

$\rho(\text{Original})/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$\rho(\text{Spiked})/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$\rho(\text{Detected})/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Recovery/%	Average recovery/%	RSD/%
40	43.91	44.21	100.7	100.1	1.4
	43.91	43.27	98.5		
	43.91	44.42	101.2		
50	54.89	55.53	101.2	102.4	4.0
	54.89	58.68	106.9		
	54.89	54.37	99.1		
60	65.86	68.81	104.5	105.3	2.8
	65.86	67.66	102.7		
	65.86	71.48	108.5		

表 2 布立西坦片中异构体 A 的回收率测定结果

Tab. 2 Recovery of isomer A in brivaracetam tablets

$\rho(\text{Original})/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$\rho(\text{Spiked})/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$\rho(\text{Detected})/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Recovery/%	Average recovery/%	RSD/%
40	42.53	42.34	99.6	99.0	1.2
	42.53	41.50	97.6		
	42.53	42.42	99.7		
50	53.17	53.77	101.1	102.6	3.9
	53.17	56.93	107.1		
	53.17	52.88	99.5		
60	63.80	66.76	104.6	104.7	2.7
	63.80	65.00	101.9		
	63.80	68.65	107.6		

表 3 布立西坦片中异构体 B 的回收率测定结果

Tab. 3 Recovery of isomer B in brivaracetam tablets

$\rho(\text{Original})/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$\rho(\text{Spiked})/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$\rho(\text{Detected})/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Recovery/%	Average recovery/%	RSD/%
40	45.53	47.71	104.8	105.3	0.4
	45.53	48.08	105.6		
	45.53	48.06	105.6		
50	56.91	59.29	104.2	105.8	3.7
	56.91	62.75	110.3		
	56.91	58.56	102.9		
60	68.30	72.46	106.1	106.4	3.0
	68.30	70.63	103.4		
	68.30	74.96	109.8		

## 2.8 重复性实验

分别取 1 批 50 mg 规格和 1 批 100 mg 规格的布立西坦片, 每个规格平行称取 6 份按“2.1”项下方法配制样品溶液, 按“2.2”项下优化色谱条件测定, 布立西坦的称量与峰面积的比值 RSD 分别为 0.56% 和 0.73% ( $n=6$ )。

## 2.9 样品测定

分别取 3 批 50 mg 规格和 3 批 100 mg 规格的布立西坦片, 按“2.1”项下样品溶液的配制方

法, 平行两份, 按照“2.2”项下优化色谱条件测定, 未检出异构体杂质 A 和 C, 检出异构体杂质 B, 以外标法和主成分外标法分别计算结果一致, 均不高于 0.1% ( $n=2$ ), 结果见表 4, 色谱图见图 3。

## 3 讨论

### 3.1 溶剂的选择

精密称取布立西坦对照品约 10 mg 分别加入

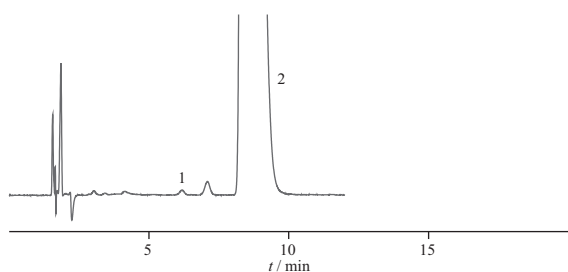
表4 布立西坦片中异构体B含量测定结果

Tab. 4 Contents of isomer B in brivaracetam tablets

Brivaracetam tablets	Batch No.	Content/% <sup>1)</sup>	Content/% <sup>2)</sup>
Strength 50 mg	CHJ22001	0.07	0.07
	CHJ22002	0.07	0.07
	CHJ22003	0.08	0.08
Strength 100 mg	CGJ21001	0.09	0.09
	CGJ21002	0.09	0.09
	CGJ21003	0.07	0.08

注: <sup>1)</sup>外标法; <sup>2)</sup>主成分外标法。

Note: <sup>1)</sup>External standard method; <sup>2)</sup>Principal component external standard method.



1 - 异构体 B (0.02 mg · mL<sup>-1</sup>); 2 - 布立西坦 (10 mg · mL<sup>-1</sup>).

1 - Isomer B (0.02 mg · mL<sup>-1</sup>); 2 - Brivaracetam (10 mg · mL<sup>-1</sup>).

图3 布立西坦片样品溶液的SFC色谱图(批号CHJ22001)

Fig. 3 SFC chromatogram of brivaracetam tablets (batch No. CHJ22001)

甲醇、正己烷、乙醇、体积分数0.1%甲酸甲醇1 mL, 超声使溶解, 作为对照品溶液。

精密称取研细的布立西坦片(约相当于50 mg) 分别至5 mL量瓶中, 分别用甲醇、正己烷、乙醇、体积分数0.1%甲酸甲醇适量, 超声使溶解, 用上述4种溶剂稀释至刻度, 摇匀, 8 000 r · min<sup>-1</sup>离心2 min后, 取上清液, 作为样品溶液。

研究发现, 布立西坦在正己烷中溶解度差, 样品溶液在甲醇、乙醇、体积分数0.1%甲酸甲醇溶液中在会有沉淀析出, 同时, 与同法配制的空白辅料溶液及对照品溶液对比, 样品上清液中杂质的检测不受干扰。

在相同实验条件下, 甲醇、乙醇、体积分数0.1%甲酸甲醇3种溶剂对检测结果的影响不大, 由于乙醇价格相对低廉, 对环境无污染, 且对人体基本无害, 故最终选择乙醇作为溶剂。

### 3.2 固定相的选择

直链淀粉和纤维素衍生物属于多糖衍生物, 具有高度有序的螺旋结构使其具有优异的手性识别能力, 是应用最广的一类手性固定相。故研究中取系统适用性溶液, 按“2.2”项下优化色谱条件对各种不同多糖衍生物填料 [YMC CHIRAL ART Cellu-

lose-SB: 硅胶表面共价键合有纤维素-三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯); CHIRALPAK OD: 硅胶表面涂敷纤维素-三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯); CHIRALPAK AD: 硅胶表面涂敷直链淀粉-三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)] 的手性色谱柱进行考察。结果显示, 在3种色谱柱上布立西坦与其3个异构体杂质在10 min内均出峰。在YMC CHIRAL ART Cellulose-SB和CHIRALPAK OD色谱柱上布立西坦与其3个异构体杂质均无法分离, 在CHIRALPAK AD色谱柱上分离良好, 见图4。直链淀粉衍生物手性固定相与布立西坦及其立体异构体之间, 形成了稳定性不同的非对映异构体分子络合物而达到手性分离的目的, 故选择CHIRALPAK AD色谱柱进行进一步条件优化。

### 3.3 流动相比比例的优化

由于超临界二氧化碳类极性和洗脱强度类似于正己烷或正庚烷, 为非极性溶剂。而改变醇的种类和比例, 可以改变选择性。选择最常用的甲醇作为极性改性剂, 分别考察流动相CO<sub>2</sub>-甲醇的不同体积比: 85:15、90:10、95:5, 结果发现, 流动相中改性剂甲醇比例升高, 极性增强, 会使待测物分离度下降; 甲醇比例太低会使主峰峰形变差, 峰展宽, 甲醇改性剂比例为5%时杂质峰高下降, 灵敏度下降, 见图5。选择CO<sub>2</sub>-甲醇(90:10)为优化流动相, 保留时间、分离度适宜, 无须添加少量酸碱改善峰形和分离度。

### 3.4 背压、柱温与流速的优化

背压决定CO<sub>2</sub>在系统中的超临界状态和密度, 柱温影响CO<sub>2</sub>的密度, 密度则影响流动相的洗脱能力。流速优化可以获得较高的柱效。

分别考察15、16、18、20 MPa的背压, 5、40、45 °C的柱温, 1.0、2.0、2.5 mL · min<sup>-1</sup>的流速对分离效果的影响。结果显示, 随着背压的升高, 流动相的洗脱能力增强, 理论塔板数无显著区别, S/N明显增加, 但是当背压达到20 MPa时, 各个组分之间的分离度开始下降; 柱温的升高会使待测物保留时间缩短, 但是分离度下降, 理论塔板数会增加; 流速的增加使待测物保留时间明显缩短, 理论塔板数下降, 流速1.0 mL · min<sup>-1</sup>比2 mL · min<sup>-1</sup>时的S/N明显降低。综合考虑以上因素, 保证基线分离前提下尽可能缩短保留时间, 降低系统压力, 提高分离效率。最终选用流动相为CO<sub>2</sub>-甲醇(90:10), 流速2 mL · min<sup>-1</sup>, 背压18 MPa, 柱温40 °C, 检测波长205 nm作为最优分离条件。

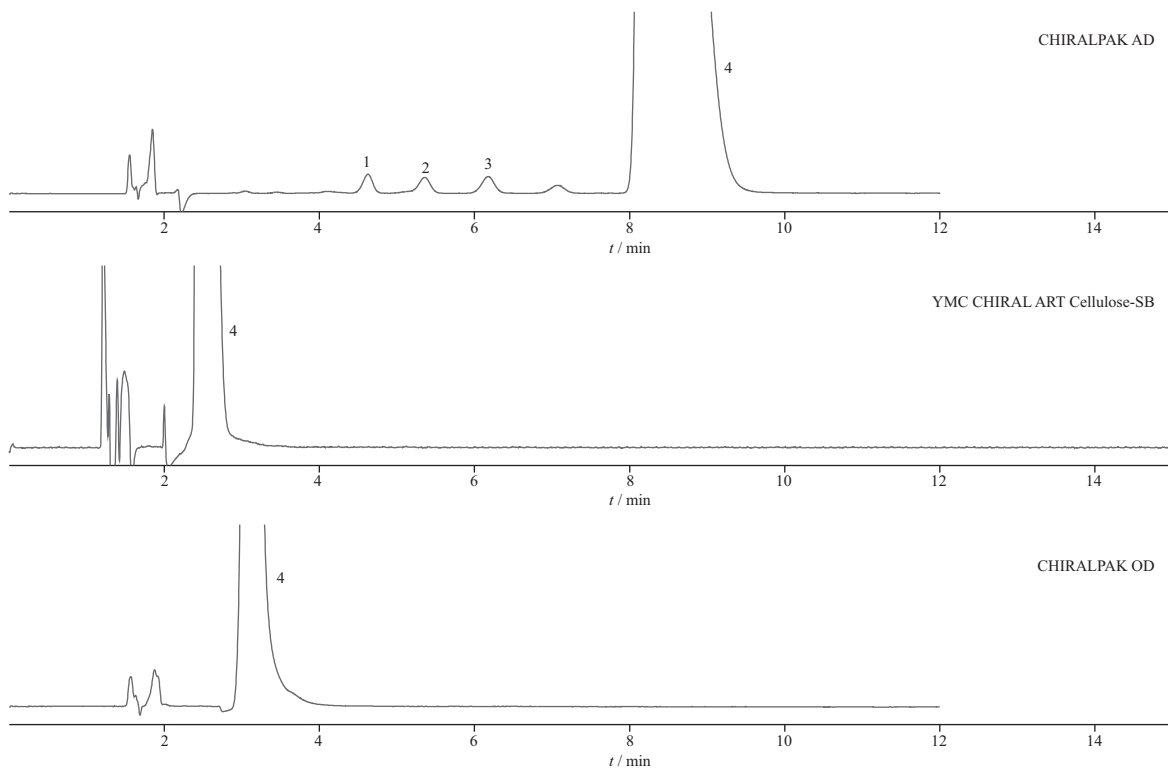


图4 布立西坦和3种异构体在不同种手性柱上的分离色谱图

Fig. 4 Effects of different columns on the separation of brivaracetam and its three isomers

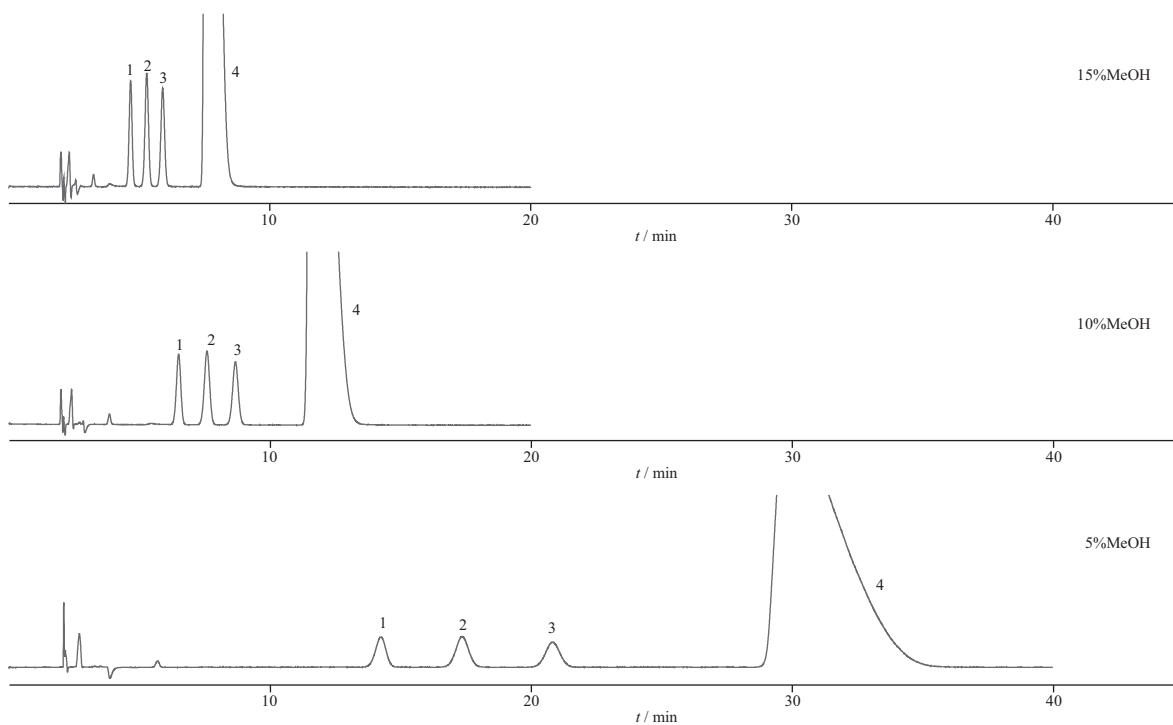


图5 布立西坦和3种异构体在手性柱上采用不同比例流动相的分离色谱图

Fig. 5 Effects of different proportion of flow phase on the separation of brivaracetam and its three isomers

### 3.5 进样量的考察

分别取“2.1”项下系统适用性溶液、供试品溶液和按“2.1”项下对照品溶液的配制方法配制的含

布立西坦  $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的对照溶液, 色谱条件为: 流动相  $\text{CO}_2$ -甲醇(90:10), 流速  $1.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 背压 15 MPa, 柱温  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ , 检测波长 205 nm, 分别进样 4、

5、6 和 10  $\mu\text{L}$ 。结果发现,随着进样量的增加,系统溶液中的 3 个异构体杂质的理论塔板数随之增加,各异构体之间的分离度无明显变化,考虑可满足检测灵敏度要求,选择进样量为 6  $\mu\text{L}$ 。如需满足更高灵敏度要求,可选择进样量为 10  $\mu\text{L}$ 。

#### 4 结 论

采用 SFC 方法对 6 批次两种规格的布立西坦片中的 3 种立体异构体杂质进行分离测定,结果表明,样品中的 3 种异构体杂质含量均未超过主药的 0.1%;方法能在 10 min 内完成布立西坦与 3 种立体异构体杂质的分析,分离度均能达到 2.8 以上,与两专利文献正相色谱检测方法相比,使用经济易得的  $\text{CO}_2$  气体、有机试剂使用少、不使用烷烃类试剂、系统平衡快、重现性好、分析时间短、分离效率高。与使用超高效液相色谱的文献检测方法相比,无需使用亚二微米的手性色谱柱,常规的 5  $\mu\text{m}$  和 10  $\mu\text{m}$  直链淀粉-三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)手性色谱柱即可满足要求。虽然绝对灵敏度低于超高效液相色谱法,但是完全能满足检测限度要求。超临界流体色谱仪可以单独选择,也可以通过在常规液相色谱仪上增加  $\text{CO}_2$  泵和适量管线的方式实现。本方法为布立西坦原料和制剂中的异构体杂质的质量控制和制剂的一致性评价提供了更快、更多的选择。

#### REFERENCES

[ 1 ] SONG Y L, SUN H, LIN B N, Research development on racetam-family drugs[J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2015,

50(1):4-6.

- [ 2 ] YAN S, ZHANG G L. Research of antiepileptic drug brivaracetam preparation[J]. *J Guangdong Pharm Univ* (广东药科大学学报), 2022, 8(2):146-150.
- [ 3 ] WANG C Y, CHEN Z Y, WANG C. The invention discloses a preparation method of brivaracetam and its intermediate; China, 201710025130. 4. [P]. 20170113.
- [ 4 ] WANG J Y, CHEN R Y, JI Y Y, *et al.* A detection method for brivaracetam and its isomers; China, 201910161224. [P]. 2019-06-25.
- [ 5 ] NI S, XIA J Q, YE Y R, *et al.* A detection method for brivaracetam and its isomers; China, 202011591728. 8 [P]. 2021-05-25.
- [ 6 ] BAKSAM V, N S, POCHA V *et al.* Development of an effective novel validated stability indicating HPLC method for the resolution of brivaracetam stereoisomeric impurities [J]. *Chirality*, 2020, 2(9): 1208-1219.
- [ 7 ] YU L J, HUANG H W, LI X M, *et al.* Determination of stereoisomers in landiolol hydrochloride by ultraperformance convergence chromatography [J]. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 2016, 44(9): 148-153.
- [ 8 ] JIN W, LIN H, CHEN Y, *et al.* Chiral separation of ezetimibe and R-enantiomer by supercritical fluid chromatography [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2015, 50(1): 68-71.
- [ 9 ] JIN W, ZHANG S M, LE J, *et al.* Separation and determination of cis-isomer in glimepiride by supercritical fluid chromatography[J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2021, 56(5):411-416.
- [ 10 ] JIN W, YANG X L, LU D, *et al.* Chiral separation of levetiracetam and R-enantiomer by supercritical fluid chromatography [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2013, 33(5): 111-115.
- [ 11 ] ZHANG S M, JIN W, YANG Y J. Simultaneous identification and determination of eleven tyrosine kinase inhibitors by supercritical fluid chromatography-mass spectrometry [J]. *Anal Methods*, 2019, 11: 2211-2222.
- [ 12 ] LI D Y, WU X, HAO F L, *et al.* Separation of enantiomers by supercritical fluid chromatography on polysaccharide derivative-based chiral stationary phases [J]. *Chin J Chromatogr* (色谱), 2016, 4(1), 80-84.

(收稿日期:2024-02-07)