HPLC 法测定左乙拉西坦注射液中的右旋异构体

侯洪叶[1]，王松松[2]，苏　磊[2]，郑令娜[2]，高永吉[1]*
（1. 潍坊医学院，山东潍坊 261053；2. 华润双鹤利民药业（济南）有限公司，山东济南 250200）

摘要：建立了 HPLC 法测定左乙拉西坦（**1**）注射液中的右乙拉西坦（**2**）。色谱柱采用 CHIRALPAK IG 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），以直链淀粉 - 三（3- 氯 -5- 甲基苯基氨基甲酸酯）为填充剂。流动相为 10 mmol/L 乙酸铵溶液∶乙腈（70 ∶ 30），等度洗脱；检测波长为 190 nm，流速为 0.7 ml/min，柱温为 30 ℃，进样量为 100 μl。结果显示，在该色谱条件下 **2** 与 **1** 峰的分离度良好，**2** 和 **1** 分别在 0.4 ～ 8.0 和 0.8 ～ 8.0 μg/ml 内线性关系良好，检测限分为 10、20 ng。**2** 和 **1** 的平均回收率（*n*=9）分别为 103.84%、99.10%，RSD 分别为 0.81%、1.16%。精密度试验、稳定性试验和重复性试验的 RSD 均小于 2.0%，且耐用性良好。建立的方法简便、准确可靠、灵敏度高、重复性好，适用于 **1** 注射液中右旋体的质量控制。

关键词：高效液相色谱；左乙拉西坦注射液；质量控制；右旋异构体；右乙拉西坦
中图分类号：R917　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2022)12-1775-05
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.12.014

Determination of the Dextro-rotatory Stereoisomer in Levetiracetam Injection by HPLC

HOU Hongye[1], WANG Songsong[2], SU Lei[2], ZHENG Lingna[2], GAO Yongji[1]*
(*1. Weifang Medical University, Weifang 261053; 2. China Resources Double Crane Limin Pharmaceutical Co., Ltd., Jinan 250200*)

ABSTRACT: An HPLC method was established for the determination of *R*-isomer etiracetam (**2**) in levetiracetam (**1**) injection. A CHIRALPAK IG column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used with amylose *tri* (3-chloro-5-methylphenyl carbamate) as filler. The analysis was carried out in the isocratic elution mode with 10 mmol/L ammonium acetate∶acetonitrile (70∶30) as the mobile phase. The detection wavelength was 190 nm, the flow rate was 0.7 ml/min, the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 100 μl. The results showed that the separation between peaks of **2** and **1** was good under this chromatographic condition. It was linear for **2** and **1** in the ranges of 0.4 – 8.0 and 0.8 – 8.0 μg/ml, respectively, and the detection limits of **2** and **1** were 10 and 20 ng, respectively. The average recoveries (*n*=9) of **2** and **1** were 103.84% and 99.10%, with the RSDs of 0.81% and 1.16%, respectively. The RSDs of precision test, stability test and repeatability test were all less than 2.0%, and the durability was good. The established method was simple, accurate, reliable, sensitive and reproducible, which was suitable for the quality control of dextro-rotatory stereoisomer in **1** injection.

Key Words: HPLC; levetiracetam injection; quality control; dextro-rotatory stereoisomer; *R*-isomer etiracetam

左乙拉西坦（levetiracetam，**1**，结构式如图 1 所示）是广谱抗癫痫药[1]。美国 FDA 于 1999 年正式批准其用于 16 岁以上成人部分性癫痫发作的添加治疗，2005 年又将适应证扩大到 4 岁以上儿童[2]。此外，**1** 也可治疗急性癫痫[3]，包括单药治疗癫痫的部分性发作或继发性全面性发作，如肌阵挛癫痫、青少年肌阵挛癫痫以及其他全面发作性癫痫[4]。

由于 **1** 结构中含有 1 个手性中心，在合成过程中产生的右旋体即右乙拉西坦（*R*-isomer etiracetam，**2**，结构式如图 1 所示）可能在成品中残留，而 **2** 对于抑制癫痫发作无明显的药效作用[5]。为了控制 **1** 药品的质量，需要对其中的 **2** 含量进行检测。**1**

收稿日期：2022-04-18
作者简介：侯洪叶（1998—），女，硕士，专业方向：工业药剂学。
通信作者：高永吉（1960—），男，教授，硕士生导师，从事药品研发、生产和质量管理。
E-mail：chingary@126.com

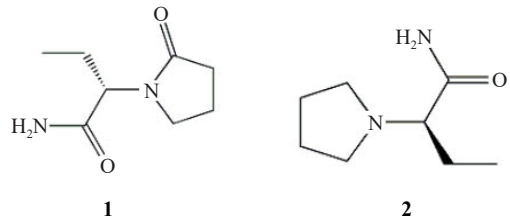
注射液进口注册标准 JX20150256 规定 **2** 含量不得超过 **1** 含量的 0.8%，**1** 含量为标示量的 95.0%～105.0%。

目前关于 **1** 中 **2** 的检测多采用正相色谱条件[6—9]。正相色谱检测需要严格控制无水条件，试验条件非常严苛。且正相色谱还需要消耗大量的有机溶剂，相较于以水为主要组成的反相色谱流动相，既不经济又不环保。有文献采用反相色谱，以直链淀粉 - 三（3,5- 二氯苯基氨基甲酸酯）键合色谱柱测定 **1** 氯化钠注射液中 **2** 的含量[10]，但结果显示其分离度并不理想，同时 **2** 的保留时间在 20 min 以上。本研究前期参考 **1** 注射液进口注册标准 JX20150256 进行试验，结果如图 2 所示，空白辅料与 **2** 的色谱峰不能有效分离，严重干扰 **2** 的检测。基于此，本研究拟采用反相色谱，联合外标法检测 **1** 注射液中 **2** 的含量，以达到理想的分离效果，为 **1** 及其制剂的质量控制提供参考。

1　仪器与试药

LC-20AT 型高效液相色谱仪（日本 Shimadzu 公司）；MS303TS 型电子天平（瑞士 Mettler Toledo 公司）。

1 注射液（华润双鹤利民药业有限公司，规格 5 ml∶500 mg，批号 021060501、21091701、21091702、21091703）；**1** 对照品（欧洲药典标准品，含量 100%，批号 3.0）、**2** 对照品（含量 98.97%，批号 3.0）和乙拉西坦对照品（含量 99.49%，批号 20-12-0901）均购于美国 Sinco Pharmachem 公司；乙酸铵、乙酸钠、氯化钠、乙酸均为分析纯，乙腈、正庚烷、无水乙醇均为色谱纯，水为纯化水。



1　　**2**

图 1　1 和 2 的化学结构式

Fig.1　Chemical Structures of **1** and **2**

2　方法与结果

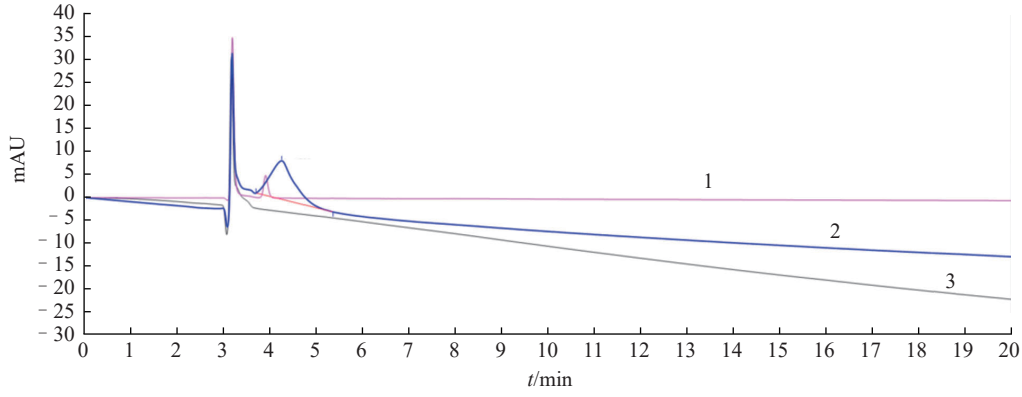
2.1　色谱条件

色谱柱 CHIRALPAK IG 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），以直链淀粉 - 三（3- 氯 -5- 甲基苯基氨基甲酸酯）为填充剂；流动相 10 mmol/L 乙酸铵溶液∶乙腈（70∶30），等度洗脱；检测波长 190 nm；流速 0.7 ml/min；柱温 30 ℃；进样量 100 μl；运行时间 8 min。

2.2　溶液配制

空白溶液：流动相。

空白辅料溶液：精密量取乙酸钠 82 mg、氯化钠 450 mg，溶于注射用水 35 ml 中，用乙酸调至 pH 5.5，补加注射用水至 50 ml；取上述溶液 1 ml，置 20 ml 量瓶中，用空白溶液定容，摇匀，精密量取上述溶液 2 ml，置 20 ml 量瓶中，用空白溶液定容，摇匀即得。



1—**2**；2—空白辅料；3—空白溶剂。

图 2　参考进口药品注册标准的 2 测定结果

Fig.2　Determination Results of **2** Refer to the Registration Standard for the Imported Drugs

供试品溶液：取 **1** 注射液 2 支，混匀，精密量取 0.5 ml，置 100 ml 量瓶中，用空白溶液溶解并定容，摇匀即得。

2 对照品溶液：取 **2** 对照品适量，用空白溶液溶解并定量稀释成每 1 ml 中约含 **2** 4 μg 的溶液，摇匀即得。

1 贮备液：取 **1** 对照品适量，用空白溶液溶解并稀释成每 1 ml 中含 **1** 0.4 mg 的溶液，摇匀即得。

2 贮备液：取 **2** 对照品适量，用空白溶液溶解并稀释成每 1 ml 中含 **2** 0.2 mg 的溶液，摇匀即得。

混合溶液：精密量取 **1** 注射液 1 ml，置 20 ml 量瓶中，用空白溶液定容，摇匀；精密量取 2 ml，置 20 ml 量瓶中，再加入 **2** 贮备液 0.4 ml，用空白溶液定容，摇匀即得。

混合对照品溶液：分别精密称取 **2** 对照品和 **1** 对照品适量，用空白溶液溶解、稀释，制成 **1** 和 **2** 质量浓度均为 4 μg/ml 的混合溶液，摇匀即得。

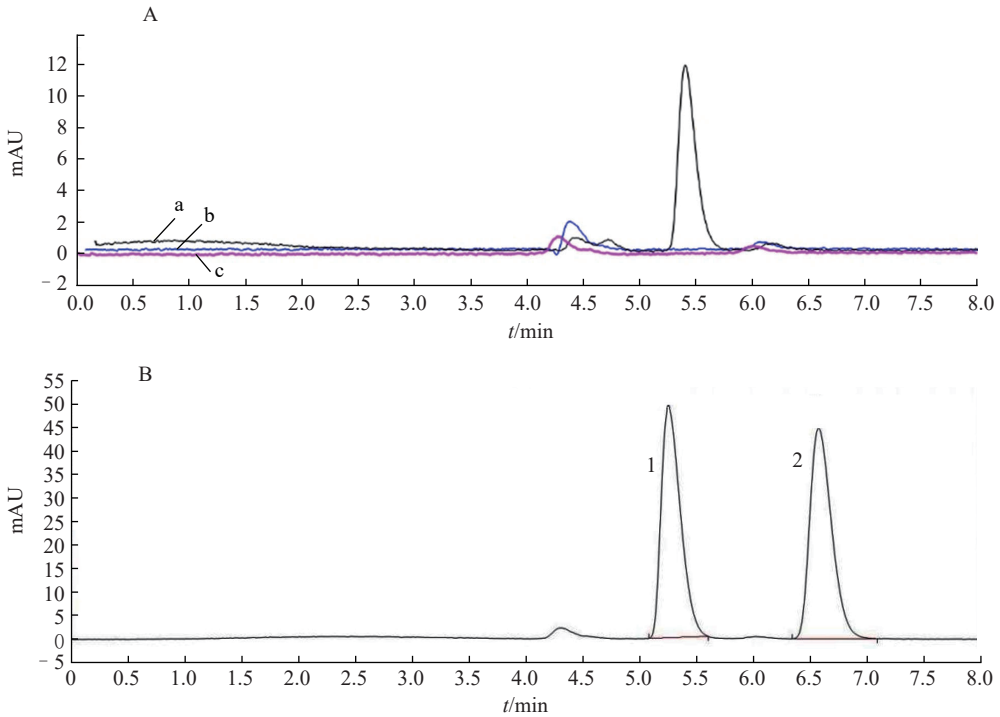
2.3 方法学考察

2.3.1 系统适用性试验

取“**2.2**”项下空白溶液、空白辅料溶液、**2** 对照品溶液、混合对照品溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，记录色谱图。结果如图 3 所示，空白溶液和空白辅料均不干扰杂质检出，**2** 峰与 **1** 峰分离度为 4.09，大于 1.5，分离度良好。

2.3.2 线性试验

分别精密称取 **2** 对照品和 **1** 对照品适量，用空白溶液溶解、稀释，制成 **1** 和 **2** 质量浓度均为 16 μg/ml 的线性试验贮备液，摇匀，分取 **1**、**2** 线性试验贮备液 0.5、1.5、3、5、10 ml，各置 20 ml 量瓶中，用空白溶液定容，摇匀，即得线性试验溶液。按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，并记录峰面积。以 **2** 和 **1** 峰面积（*A*）为纵坐标、相应质量浓度（*c*）为横坐标，进行线性回归。结果显示，**2** 和 **1** 分别在 0.4 ～ 8.0 和 0.8 ～ 8.0 μg/ml 内线性关系



A—**2** 定位溶液（a）、空白辅料溶液（b）、空白溶液（c）；B—混合对照品溶液。

1—**2**；2—**1**。

图 3 典型色谱图

Fig.3 Typical Chromatograms

良好，回归方程分别为 A=28 826c+2 915（r=0.999 7）和 A=30 297c+3 715（r=0.999 9）。

2.3.3 定量限与检测限

取“**2.2**”项下 **1** 贮备液和 **2** 贮备液，逐级稀释，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，以信噪比（S/N）不小于 10 和 3 分别计算 **1** 和 **2** 的定量限和检测限。结果显示，**2** 的定量限为 40 ng，检测限为 10 ng，**1** 的定量限为 80 ng，检测限为 20 ng。

2.3.4 准确度试验

取 **1** 注射液 2 支，混匀，精密量取 0.25 ml，置 50 ml 量瓶中，再分别加入“**2.2**”项下 **2** 贮备液 0.3、1、2 ml，用空白溶液定容，摇匀，得 **2** 准确度试验溶液；精密量取“**2.2**”项下 **1** 贮备液 0.4、0.5、0.6 ml，置 50 ml 量瓶中，用空白溶液定容，摇匀，得 **1** 准确度试验溶液；各平行配制 3 份，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，记录峰面积并计算平均回收率。结果显示，在 30%～200%限度浓度下，**2** 的平均回收率（n=9）为 103.84%，RSD 为 0.81%；在 80%～120%限度浓度下，**1** 的平均回收率（n=9）为 99.10%，RSD 为 1.16%，表明方法准确度良好。

2.3.5 精密度试验

精密量取“**2.2**”项下混合对照品溶液 100 μl，按“**2.1**”项下色谱条件连续进样测定 6 次，记录峰面积和保留时间。结果显示，**2** 峰面积的 RSD（n=6）为 0.40%，保留时间的 RSD（n=6）为 0.02%；**1** 峰面积的 RSD（n=6）为 0.47%，保留时间的 RSD（n=6）为 0.06%，两者的峰面积及保留时间的 RSD 均小于 2.0%，表明系统稳定、仪器精密度良好。

2.3.6 重复性试验

按“**2.2**”项下方法制备混合溶液，分别平行制备 6 份，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，同时进样“**2.2**”项下 **2** 对照品溶液，记录峰面积，按外标法计算 **2** 的含量。结果显示，**2** 的平均检出量（n=6）为 0.767%，RSD 为 0.55%，小于 2.0%。另按“**2.2**”项下方法制备供试品溶液，再用空白溶剂稀释至 4 μg/ml，分别平行制备 6 份，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，同时进样“**2.2**”项下混合对照品溶液，记录峰面积，按外标法计算 **1** 含量。结果显示，**1** 的平均检出量（n=6）为 97.43%，RSD 为 0.05%，小于 2.0%，表明本方法重复性良好。

2.3.7 稳定性试验

取“**2.2**”项下供试品溶液、混合对照品溶液于室温（25 ℃）条件下放置，并分别于 0、2、4、6、8、12 h 取样，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，记录峰面积并计算 RSD。结果显示，供试品溶液中 **1** 峰面积 RSD（n=6）为 0.39%，**2** 未检出；对照品溶液中 **2** 峰面积的 RSD（n=6）为 0.86%，**1** 峰面积的 RSD（n=6）为 0.98%，均小于 2.0%，表明供试品溶液和对照品溶液在 12 h 内稳定。

2.3.8 耐用性试验

取乙拉西坦对照品适量，用空白溶液溶解并稀释成每 1 ml 中含乙拉西坦 0.04 mg 的溶液，作为耐用性试验溶液，取上述溶液进样 1 次，在“**2.1**”项下色谱条件的基础上，调整柱温（28、30、32 ℃）、流速（0.6、0.7、0.8 ml/min）、流动相中乙腈的比例（27%、30%、33%），分别进样测定。结果显示，柱温、流速及流动相中乙腈的比例发生微小变化时，耐用性试验溶液中 **1** 与 **2** 峰的分离度均达到 4.0 以上，表明此检测方法的耐用性较好。

2.4 样品测定

取自制样品 3 批，批号分别为 21091701、21091702、21091703，按“**2.2**”项下供试品溶液配制方法配制，并进样检测。结果显示，**2** 的含量分别为 0.05%、0.07%、0.06%，**1** 的含量分别为 99.76%、99.38%、99.48%，符合规定。

3 讨论

3.1 色谱条件的筛选

经查询，国内外药典中均无 **1** 注射液中右旋异构体的检测方法。本研究前期参考 **1** 注射液进口注册标准 JX20150256 的色谱条件，但试验结果显示此方法的专属性不理想，空白辅料会干扰 **1** 中右旋异构体的检测，同时由于该条件所用的色谱柱为典型的正相色谱柱，整个色谱系统须严格保证无水操作，影响因素较多，严重影响检测结果的准确性。

以硅胶表面共价键合有直链淀粉 - 三（3- 氯 -5- 甲基苯基氨基甲酸酯）键合固定相为填充剂的色谱柱具有良好的分离能力和耐受性，大部分适用于

HPLC 的溶剂均可作为流动相或者样品溶媒使用，包括正相流动相和反相流动相，因此不必担心因溶剂使用不当而造成色谱柱的劣化或者损坏[11]。本研究选用以直链淀粉 - 三 (3- 氯 -5- 甲基苯基氨基甲酸酯) 为填充剂的色谱柱，建立了新的色谱系统，研究结果表明，建立的分析方法不受辅料干扰，在拟定的检测条件下 **1** 与 **2** 峰形良好，分离度达到 4.09 (>1.5)。

3.2 稀释剂的选择

为了减少样品稀释剂与流动相差异引起的基线波动，本研究色谱条件中选用流动相作为稀释剂 (空白溶剂)，峰形良好。

3.3 检测波长的选择

1 的紫外光谱图显示其曲线非常陡峭，仅在 220 nm 附近稍有缓和，但注射剂辅料在此也有明显吸收，且吸收峰与 **2** 不能有效分离。以流动相溶液作为溶剂，**1** 的紫外光谱图在 190 nm 波长附近有吸收平台，吸光度稳定，各样品溶液的 HPLC 图显示，该波长附近无干扰，因此选择 190 nm 作为 **1** 注射液中右旋异构体的检测波长。虽然该波长低于流动相中乙酸铵的截止波长，违反波长选择的常规做法，但由于作为检测对象的 **2** 在药品质量标准中规定其含量不能超过主成分含量的 0.8%，因此，因流动相本底吸收导致响应范围被压缩，对于含量范围非常小的杂质来说是足够用的。方法学验证结果也表明本研究建立的方法能够满足杂质 **2** 的检测要求。

综上所述，本研究建立的 HPLC 法经济、环保、简便且结果可靠，可为今后 **1** 及其相关制剂产品中右旋异构体杂质控制方法的建立提供参考。

参考文献：

[1] ITO S, YANO I, HASHI S, *et al*. Population pharmacokinetic modeling of levetiracetam in pediatric and adult patients with epilepsy by using routinely monitored data [J]. *Ther Drug Monit*, 2016, **38**(3): 371-378.

[2] 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): 782-786.

[3] WRIGHT C, DOWNING J, MUNGALL D, *et al*. Clinical pharmacology and pharmacokinetics of levetiracetam [J]. *Front Neurol*, 2013, **4**: 192.

[4] LYSENG-WILLIAMSON K A. Levetiracetam: a review of its use in epilepsy [J]. *Drugs*, 2011, **71**(4): 489-514.

[5] FRENCH J, EDRICH P, CRAMER J A. A systematic review of the safety profile of levetiracetam: a new antiepileptic drug [J]. *Epilepsy Res*, 2001, **47**(1/2): 77-90.

[6] 付 建, 苏贵勇, 赵海桥. HPLC法测定左乙拉西坦片的右旋异构体[J]. 山东化工, 2014, **43**(4): 87-91.

[7] 孙启泉, 施介华, 刘 燕. 左乙拉西坦右旋对映异构体的HPLC测定[J]. 中国医药工业杂志, 2008, **39**(8): 613-614.

[8] 石璐燕, 于燕燕, 李 兴, 等. HPLC法测定左乙拉西坦右旋异构体及其原料药含量[J]. 上海应用技术学院学报(自然科学版), 2012, **12**(4): 282-287.

[9] 崔 蕊, 李文莉, 崔 超, 等. HPLC测定左乙拉西坦中的右旋异构体[J]. 华西药学杂志, 2010, **25**(5): 593-594.

[10] 段 云. HPLC测定左乙拉西坦氯化钠注射液中异构体的含量[J]. 质量安全与检验检测, 2020, **30**(5): 81-84.

[11] 陈小明. 大赛璐色谱分析技术进展与应用[C]// 中国化学会第22届全国色谱学术报告会及仪器展览会论文集(第一卷). 中国化学会第22届全国色谱学术报告会及仪器展览会. 上海: 中国化学会, 2019.