

# HPLC法测定奥拉西坦氯化钠注射液中奥拉西坦含量及其有关物质

湛建峰<sup>1,2,3</sup>, 黄海伟<sup>1</sup>, 刘朝霞<sup>1</sup>, 张启明<sup>1\*</sup>

(1. 中国药品生物制品检定所, 北京 100050 2. 中国药科大学, 南京 210009 3. 湖南省岳阳市药品检验所, 岳阳 414000)

**摘要** 目的: 建立用高效液相色谱法测定奥拉西坦氯化钠注射液中含量和有关物质的方法, 考察其热稳定性。方法: 色谱柱为资生堂 MGII C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 流动相为 0.05 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钾 (用磷酸调节 pH 至 3.0, 检测波长为 220 nm, 流速为 0.6 mL·min<sup>-1</sup>, 进样量为 20 μL, 温度为 30℃; 按厂家处方配制奥拉西坦氯化钠注射液, 考察在不同灭菌条件下药物有关物质的变化情况。结果: 主峰和相邻杂质峰能较好地分离, 精密度和理论塔板数良好, 奥拉西坦检测浓度在 5.98 ~ 35.88 μg·mL<sup>-1</sup> 范围内与峰面积呈良好线性关系,  $r = 0.9999$  ( $n = 5$ ); 检测限为 0.3 ng 对 115℃ 30 min 和 121℃ 20 min 2种灭菌条件下的溶液有关物质进行测定, 有关物质含量无明显变化。结论: 本方法准确、简便, 专属性强, 重现性好, 可用于奥拉西坦注射液的质量控制, 在 115℃ 30 min 和 121℃ 20 min 2种灭菌条件下, 注射液有关物质稳定。

**关键词:** 高效液相色谱; 奥拉西坦氯化钠注射液; 有关物质; 热稳定性

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009-12-2077-04)

## HPLC determination of oxiracetam and related substances in oxiracetam sodium chloride injection

ZHAN Jian-feng<sup>1,2,3</sup>, HUANG Hai-wei<sup>1</sup>, LIU Zhao-xia<sup>1</sup>, ZHANG Qi-ming<sup>1\*</sup>

(1. National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China

2. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China 3. Yueyang Institute for Drug Control, Yueyang 414000, China

**Abstract Objective** To establish an HPLC method for determination of oxiracetam and related substances in oxiracetam sodium chloride injection and investigate the stability of its injections **Methods** Capcell pak C<sub>18</sub> MG II (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with temperature at 30℃ was adopted with a mobile phase of 0.05 mol·L<sup>-1</sup> potassium dihydrogen phosphate (pH adjusted to 3.0 with phosphoric acid). The elution was performed at the flow rate of 0.6 mL·min<sup>-1</sup>. UV detection wavelength was set at 220 nm and the injection volume was 20 μL and oxiracetam sodium chloride injection was prepared by prescription, under different of sterilized temperature, investigate the difference of related substances in injections **Results** The prominent peak and the neighbor subsidiary peak could be successfully separated and had very good accuracy and the theoretical plate number. The standard curve was linear over the range of 5.98–35.88 μg·mL<sup>-1</sup>,  $r = 0.9999$  ( $n = 5$ ), with the detection limit of 0.3 ng and related substances were no difference between 115℃ 30 minutes and 121℃ 20 minutes in sterilization **Conclusion** The method is accurate, convenient, specific, reproducible, and suitable for the determination and quality control of Oxiracetam and the injection is stable between 115℃ 30 minutes and 121℃ 20 minutes in sterilization

**Key words** HPLC; oxiracetam sodium chloride injection; related substances; heat stability

奥拉西坦 (oxiracetam) 为吡拉西坦 (脑复康) 的 4-羟基衍生物, 是作用于中枢网状结构的拟胆碱能的促智药。最早由意大利 ISF SPA 公司开发, 于 1987 年在意大利首次上市, 临床上用于治疗思维记忆力减退和与年龄、早期痴呆有关的轻、中度思维障

碍, 特别对防治老年人痴呆症效果显著<sup>[1]</sup>。国家食品药品监督管理局试行标准中的奥拉西坦原料和制剂的含量及有关物质检查分别采用的是氰基柱和 C<sub>8</sub> 柱的高效液相色谱法进行测定, 另有文献报道采用多聚物柱<sup>[2]</sup>、氨基柱的高效液相色谱法进行测

\* 通讯作者 Tel: (010) 67095292 E-mail: zqm@nicbpb.org.cn

定。由于在合成过程中可能带进原料、中间体、副产物等杂质,因此为控制本品质量,笔者参考含量及有关物质检查方法<sup>[3,4]</sup>建立了采用 C<sub>18</sub>柱的高效液相色谱法测定奥拉西坦原料药及其制剂中的含量及有关物质的限量检查方法。

## 1 仪器与试药

高效液相色谱仪 SHIMADZU LC-10AT<sub>vp</sub> 包括四元泵、自动进样器、SPD-M10A<sub>vp</sub> DAD 检测器、CLASS-VP 处理软件;Mettler AE240 电子天平。

奥拉西坦对照品(批号 080923 中国药品生物制品检定所;原料药(A药厂提供;批号 2128080901, 2128080902;2%奥拉西坦氯化钠注射液(按A厂提供的处方自制;批号 090921, 090922, 090923;磷酸二氢钾、磷酸、盐酸、氢氧化钠、双氧水均为分析纯;蒸馏水为自制。

## 2 色谱条件

色谱柱: Capcell pak C<sub>18</sub> MG II (4.6 mm × 250 mm, 5 μm; 流动相: 0.05 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钾(用磷酸调节 pH 至 3.0; 检测波长为 220 nm; 流速为 0.6 mL·min<sup>-1</sup>; 进样量为 20 μL; 温度为 30 ℃。进样分析结果表明,理论塔板数按奥拉西坦峰计算应不低于 5000 主峰与相邻杂质峰的分离度应大于 1.5。色谱详见图 1。

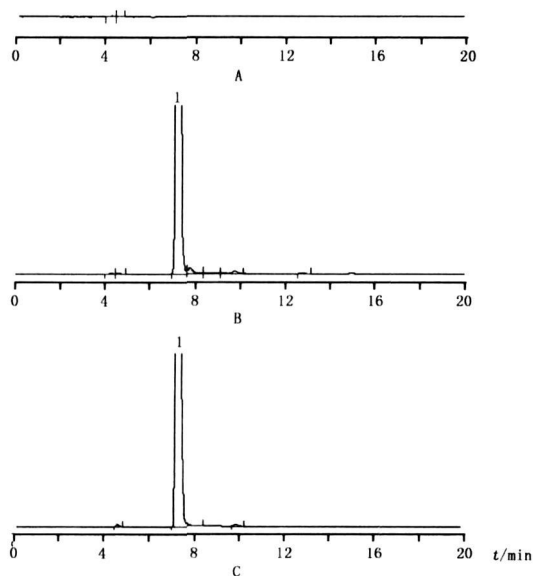


图 1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

A. 空白辅料 (blank excipient) B. 样品 (test sample) C. 对照品 (reference substance)

1. 奥拉西坦 (oxiracetam)

## 3 溶液的配制

3.1 对照品溶液 取奥拉西坦对照品适量,精密称

定,置于 10 mL 量瓶中,加流动相溶解并稀释到刻度,摇匀,制成浓度为 1 mg·mL<sup>-1</sup> 的溶液,即得。

3.2 供试品溶液和空白辅料溶液 精密量取样品 5 mL,置于 100 mL 量瓶中,加流动相溶解并稀释到刻度,摇匀,制成浓度为 1 mg·mL<sup>-1</sup> 的溶液,即得供试品溶液。另取本品处方制剂的空白辅料适量,按上述方法制备成空白辅料溶液。

3.3 对照溶液 精密量取“3.2”项下供试品溶液 1 mL,置于 100 mL 量瓶中,加流动相定量稀释成浓度为 10 μg·mL<sup>-1</sup> 的溶液,即得。

## 4 方法学考察

4.1 检测限与定量限 取奥拉西坦对照品适量,加流动相使其溶解,并逐级稀释,按“2”项下色谱条件取 20 μL 进样测定,计算其信噪比  $SN = 3$  检测限为 0.3 ng  $SN = 10$  时,定量限为 1 ng

4.2 线性关系考察 精密称取奥拉西坦对照品 3.0 mg 置于 50 mL 量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,既得对照品储备液。精密量取储备液 1, 2, 3, 5, 6 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀。分别量取上述溶液各 20 μL 进样,记录色谱。以奥拉西坦峰面积(A)对浓度(C)进行线性回归,得回归方程为:

$A = 8.714 \times 10^3 C + 7.576 \times 10^2$   $r = 0.9999$  ( $n = 5$ )  
结果表明,奥拉西坦测定浓度在 5.98~35.88 μg·mL<sup>-1</sup> 范围内与峰面积线性关系良好。

4.3 重复性试验 按“3.2”项下的方法,取批号 090921 的样品制备供试品溶液 6 份,分别按“2”项下的色谱条件测定。结果奥拉西坦 6 次测定的含量平均值为 99.86%, RSD 为 0.58%。表明重复性良好。

4.4 精密度试验 精密量取“3.1”项下对照品溶液,按“2”项下的色谱条件连续进样 6 针,测得奥拉西坦的平均峰面积为 7642183, RSD 为 0.46%

4.5 溶液的稳定性 取批号 090921 样品的供试品溶液于室温下放置 0, 2, 4, 6, 8 h 后各按“2”项下的色谱条件测定,奥拉西坦平均含量为 99.76%, RSD 为 0.59%,表明供试品溶液在 8 h 内稳定性良好。

4.6 加样回收率试验 精密量取批号 090921 的样品 6 份,每份 2.5 mL,置于 100 mL 量瓶中,分别加入奥拉西坦对照品约 50 mg 加流动相溶解并稀释到刻度,摇匀。按“2”项下的色谱条件测定奥拉西坦平均回收率为 98.7%, RSD 为 0.31%。

## 4.7 破坏试验

光照破坏溶液:取本品 5 mL,置于 (4500 ± 500

1 mg $\cdot$  mL $^{-1}$ 的溶液进样。高温破坏溶液: 取本品 5 mL, 置于 100 $^{\circ}$ C 水浴加热 6 h, 按“3. 2”项下的方法制备成 1 mg $\cdot$  mL $^{-1}$ 的溶液进样。

酸破坏溶液: 取本品 0. 5 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 加入 5 mol $\cdot$  L $^{-1}$ 的盐酸溶液 0. 2 mL, 室温放置 120 min 后, 用 5 mol $\cdot$  L $^{-1}$ 氢氧化钠溶液中和至中性, 再用流动相稀释至刻度。碱破坏溶液: 取本品 0. 5 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 加入 5 mol $\cdot$  L $^{-1}$ 的氢氧化钠溶液 0. 2 mL, 室温放置 60 min 后, 用 5 mol $\cdot$

L $^{-1}$ 盐酸溶液中和至中性, 再用流动相稀释至刻度。氧化破坏溶液: 取本品 0. 5 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 加入 0. 3% 过氧化氢溶液 0. 5 mL, 室温放置 60 min 后, 用流动相稀释至刻度。

取上述溶液各 20  $\mu$ L, 进样测定, 记录色谱, 结果见图 2。本方法能有效检测出各破坏试验中产生的降解产物, 且降解产物峰均能与主成分峰达到基线分离, 表明本方法对相关降解产物检查的专属性较好。

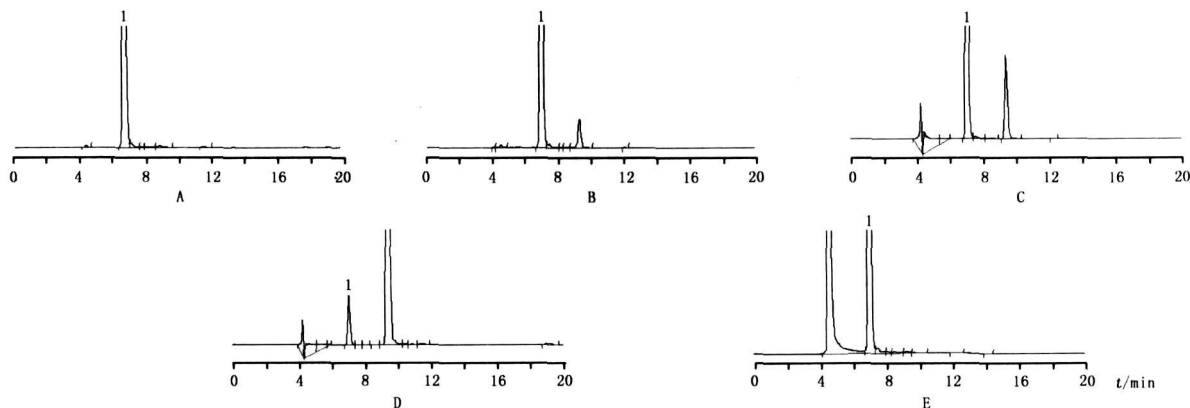


图 2 奥拉西坦专属性图谱

Fig 2 Chromatograms of specificity test of oxiracetam

A. 强光破坏 (light degradation) B. 热破坏 (heat degradation) C. 强酸破坏 (acid degradation) D. 强碱破坏 (base degradation) E. 氧化破坏 (oxidation degradation)

1. 奥拉西坦 (oxiracetam)

**4. 8 样品的测定** 取对照品及样品, 按“3. 1”及“3. 2”项下的方法制备成溶液, 按“2”项下的色谱条件进样测定。结果: 2 批原料药 (批号 21280901, 2128080902 奥拉西坦的平均含量分别为 99. 23%, 99. 34% ( $n = 3$ ); 3 批制剂 (批号 090921, 090922, 090923 中奥拉西坦的平均含量分别为 99. 13%, 99. 12%, 99. 22% ( $n = 3$ 。

## 5 有关物质检查

**5. 1 有关物质测定** 取“3. 3”项下对照溶液 20  $\mu$ L 进样, 调节检测灵敏度, 使主成分峰高约为记录仪满量程的 10% ~ 20%; 再精密量取“3. 2”项下供试品溶液 20  $\mu$ L 进样, 记录色谱至主成分保留时间的 3 倍。供试品溶液色谱中如有杂质峰, 各杂质峰面积的和不得大于对照溶液的主峰面积的 1. 0%。

**5. 2** 取本品, 按“3. 2”及“3. 3”项下的方法制备溶液, 按“5. 1”项下的方法操作, 对原料药及其制剂按归一化法进行有关物质检查。结果: 2 批原料药 (批号 21280901, 2128080902 有关物质的平均含量为 0. 75% 和 0. 78% ( $n = 3$ ); 3 批制剂 (批号 090921, 090922, 090923 中有关物质的平均含量 0. 83%, 0. 88%, 0. 84% ( $n = 3$ 。

## 6 奥拉西坦热稳定性考察

**6. 1 奥拉西坦原料** 取批号为 2128080901 的原料药在 120 $^{\circ}$ C 干燥不同的时间后, 取样品配制成浓度为 1 mg $\cdot$  mL $^{-1}$  的溶液, 另取 120 $^{\circ}$ C 干燥 1 h 后的原料, 按“3. 2”项下的方法配制成浓度为 1 mg $\cdot$  mL $^{-1}$  的溶液, 置水浴中加热 2~4 h, 按“5. 1”项下的有关物质测定方法操作, 结果见表 2。

表 2 热破坏后的有关物质测定结果 (  $\bar{x} \pm S, n = 3$  )  
Tab 2 Contents of impurity after heat degradation

| 120 ℃干燥时间<br>( heat time /h         | 主峰面积<br>( principal peak area | 单个最大杂质峰面积<br>( max peak area of another impurity | 总杂质峰面积<br>( total area of impurity | 杂质含量<br>( contents of impurity /% |
|-------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| 0                                   | 7700470                       | 25587                                            | 59294                              | 0.77±0.021                        |
| 1                                   | 7478919                       | 18137                                            | 49361                              | 0.66±0.034                        |
| 4                                   | 7078341                       | 16092                                            | 48840                              | 0.69±0.016                        |
| 1. 再水浴 2 h( continue water bath 2 h | 7397883                       | 194224                                           | 225635                             | 3.05±0.014                        |
| 1. 再水浴 4 h( continue water bath 4 h | 7439549                       | 336069                                           | 360818                             | 4.85±0.019                        |

6.2 奥拉西坦氯化钠注射液 取批号为 090921 的样品, 按“3. 2”项下的方法制成浓度为 1 mg• mL<sup>-1</sup> 的溶液, 分别采用在 115 ℃ 30 min 和 121 ℃ 20 min 2 种湿热灭菌条件, 按“5. 1”项下的有关物质测定方法操作, 结果见表 3。

表 3 灭菌后的有关物质测定结果 (  $\bar{x} \pm S, n = 3$  )  
Tab 3 Contents of impurity after sterilization

| 灭菌方式<br>( sterilization type | 主峰面积<br>( principal peak area | 单个最大杂质峰面积<br>( max peak area of another impurity | 总杂质峰面积<br>( total area of impurity | 杂质含量<br>( contents of impurity /% |
|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| 灭菌前 ( before sterilization   | 7697189                       | 24505                                            | 66196                              | 0.86±0.01                         |
| 121 ℃, 20 min                | 7657505                       | 29050                                            | 65089                              | 0.85±0.02                         |
| 115 ℃, 30 min                | 7603747                       | 28017                                            | 64632                              | 0.85±0.01                         |

7 讨论

7.1 奥拉西坦氯化钠注射液无紫外特征吸收峰, 仅有末端吸收。通过色谱图的三维图谱及各峰的紫外光谱, 在 220 nm 波长下未漏检其他杂质且响应值适中, 因此选用该波长作为本品有关物质的检查波长。

7.2 笔者曾采用 5 个品牌的 C<sub>18</sub> 柱和 3 个品牌的氨基柱进行试验。实验先后选择了不同比例的甲醇-水、乙腈-水、磷酸盐缓冲体系, 从分离情况和出峰时间等综合分析选择磷酸盐缓冲体系为佳。在相同的色谱条件下, 比较了 C<sub>18</sub> 和氨基柱对奥拉西坦的保留时间和有关物质分离效果, 氨基柱的基线不稳而且基线噪音比较大, 推荐选用 Capcell pak C<sub>18</sub> MG II 色谱柱。

7.3 本品在碱性溶液中容易降解, 主要降解产物与酸中的降解产物保留时间一致, 与主峰的分离良好。不同强度的破坏条件下 (破坏程度分别为 2% 和 99% 所得的降解产物的增加量与主峰的降解量具有相关性。

7.4 奥拉西坦氯化钠注射液在 115 ℃湿热灭菌 30 min、121 ℃湿热灭菌 20 min 的对比试验表明, 两者有关物质基本没有变化。奥拉西坦固体对强热比较稳定, 而奥拉西坦水溶液对强热不稳定。

参考文献

1 YAN Xiao-yan(闫小燕, HU Xin(胡欣, CAO Guo-ying(曹国颖, et al Determination of principal agent in oxiracetan sodium chloride injection by HPLC(高效液相色谱法测定奥拉西坦氯化钠注射液中主药的含量. China Pharm(中国药房, 2006, 17( 8 : 618  
2 Lecaillon JB Souppart C, Leducqou F, et al Determination of oxiracetan in plasma and urine by column switching high-performance liquid chromatography. J Chromatogr, 1989, 497: 223  
3 ChP(中国药典. 2005. Vol II (二部: Appendix(附录 172  
4 ZHONG Ming-kang (钟明康, ZHANG Jing-hua (张静华, LU Cong-xiao(陆丛笑. Determination of glipizide in plasma by HPLC (高效液相色谱法测定血浆中格列吡嗪的浓度. Chin J Clin Pharm(中国临床药理学杂志, 1999, 8(3 : 172

(本文于 2009 年 8 月 13 日修改回