

HPLC 测定左乙拉西坦中的右旋异构体

崔蕊,李文莉,崔超,张丹*

(四川大学华西药学院,四川成都 610041)

摘要: 目的 采用 HPLC 法测定左乙拉西坦中的右旋体。方法 采用 Chiralcel OD-H 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为正己烷-异丙醇-三氟乙酸(90:10:0.1); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 218 nm。结果 左乙拉西坦与其右旋体得到了基线分离,其右旋体 0.4 ~ 3.6 × 10³ μg·mL⁻¹ 与峰面积的线性关系良好($r=0.9998$)。最低检测限为 4 ng, 定量限为 8 ng。
结论 所建方法准确、简便、灵敏,适用于左乙拉西坦的质量控制。

关键词: 左乙拉西坦; 光学异构体; 右旋体; 高效液相色谱法

中图分类号: R917

文献标志码: A

文章编号: 1006-0103(2010)05-0593-02

Determination of dextro isomer in Levetiracetam by HPLC

CUI Rui, LI Wen-li, CUI Chao, ZHANG Dan*

(West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041 P. R. China)

Abstract: **OBJECTIVE** To develop an HPLC method for determination of dextro isomer in Levetiracetam. **METHODS** A Chiralcel OD-H column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used with the mobile phase of N-hexane-isopropanol-trifluoroacetic acid (90:10:0.1) at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹ and the detective wavelength was at 218 nm. **RESULTS** The separation of both enantiomers of Levetiracetam could be achieved baseline resolution. The calibration curve for Levetiracetam dextro isomer exhibited an excellent linear relationship with a correlation coefficient of 0.9998 in concentration range of 0.4 ~ 3.6 × 10³ μg·mL⁻¹. The detection limit was 4 ng and the quantitation limit was 8 ng for levetiracetam dextroisomer. **CONCLUSION** The method is accurate, simple, sensitive and suitable for quality control of Levetiracetam.

Key words: Levetiracetam; Optical isomer; Dextro isomer; HPLC

CLC number: R917

Document code: A

Article ID: 1006-0103(2010)05-0593-02

左乙拉西坦(Levetiracetam, Lev)为吡咯烷乙酰胺的左旋异构体,属吡咯烷酮抗癫痫药物,1999年获准在欧洲和美国上市,2007年3月在中国上市^[1]。该药治疗指数高,口服吸收快且安全,特别适用于辅助治疗难治性癫痫发作^[2-3]。由于 Lev 结构中具有一个手性中心,在合成过程中可能残留少量右旋异构体(Rev),而 Rev 对于抑制癫痫发作只有轻微或不明显的药效作用^[4]。特参照相关文献^[5-6],采用 HPLC 法测定了 Lev 中的右旋异构体,方法准确、简便、灵敏,适用于左乙拉西坦的质量控制。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

LC-10Atp 型高效液相色谱仪(日本岛津)。乙拉西坦消旋体(含量 99.3%)、左乙拉西坦(Lev, 四川大学化工学院);水为重蒸水;正己烷、异丙醇、三氟乙酸为色谱纯;其余试剂为分析纯。

1.2 方法与结果

1.2.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱为 Chiralcel OD-H (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为正己烷-异丙醇-三氟乙酸(90:10:0.1), 检测波长为 218 nm。理论板数按左乙拉西坦峰计算应不低于 3 × 10³, 左乙拉西坦与其右旋体之间的分离度应不低于 2.0。

1.2.2 测定方法 取适量 Lev, 加流动相制成 1.5 mg·mL⁻¹ 的供试品溶液; 另取乙拉西坦消旋体适量, 加流动相制成 3 mg·mL⁻¹ 的溶液, 作为对照溶液(预试溶液)。分别取 20 μL 供试品溶液和对照溶液进样, 记录色谱图(图 1), 各组分出峰顺序为 Rev、Lev。供试品溶液的色谱图中在 Rev 相应位置处如有杂质峰, 其含量不得超过左、右旋体总峰面积的 0.3%。

1.2.3 线性关系及范围 精密称取适量乙拉西坦消旋体, 用流动相制成 4 × 10⁻⁴、0.1、0.5、1.0、2.0、3.0、3.6 mg·mL⁻¹ 的对照品溶液, 分别进样 20 μL, 记录色谱图。以 Rev 峰面积对浓度(μg·mL⁻¹) 进

作者简介: 崔蕊(1986—), 女, 正攻读药物分析专业的硕士学位。

* 通信作者(Correspondent author), Email: zdan321@126.com

行线性回归, 回归方程为: $Y = 4.797 \times 10^3 X - 1.138 \times 10^3$ ($r = 0.9998$)。Rev 的进样量 $4 \times 10^4 \sim 3.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与峰面积呈良好的线性关系。

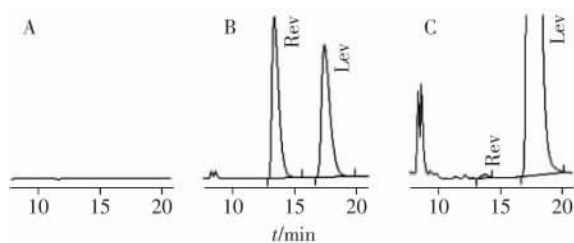


图 1 空白 (A)、消旋体 (B) 和供试品 (C) 溶液的色谱图

Fig 1 Chromatograms of blank solution (A), control solution (B) and sample solution (C)

1.2.4 检测限与定量限 取消旋体溶液按倍数稀释后, 在“1.2.1”项色谱条件下, 进样 $20 \mu\text{L}$, 记录色谱图, 以 Rev 峰高计, 其检测限为 4 ng ($S/N = 3$), 定量限为 8 ng ($S/N = 10$)。

1.2.5 中间精密度 按“1.2.1”“1.2.2”项下方法, 在第 1、2、3、5、7 天制得供试品溶液, 进样测定, 以右旋体含量考察中间精密度, $RSD = 2.36\%$ 。

1.2.6 重复性试验 按“1.2.1”“1.2.2”项下方法制备 6 份供试品溶液, 分别吸取 $20 \mu\text{L}$ 进样测定。右旋体含量的 $RSD = 3.22\%$, 表明方法重复性良好。

1.2.7 稳定性试验 将供试品溶液在室温下放置 0、1、3、5、7、9 h 后分别进样 $20 \mu\text{L}$ 测定, 峰面积的 $RSD = 0.85\%$, 说明供试品溶液在室温下放置 9 h 稳定。

1.2.8 样品的测定 取 4 批供试品, 按“1.2.1”“1.2.2”项下方法测定, 计算右旋体的含量分别为 0.136% 、 0.009% 、 0.085% 、 0.111% , 均控制在 0.3% 以内, 符合规定。

2 讨论

试验采用纤维素-三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)手性固定相, 考查流速对分离的影响, 流速从 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 增至 $1.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 分离度降低、

柱效下降, 故确定流速为常规流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。当以正己烷-异丙醇(90:10)为流动相时, 峰稍有拖尾, 考虑到左乙拉西坦具有弱酸性, 故加入 0.1% 的三氟乙酸作扫尾剂, 峰形得到改善且对映体有良好分离。还考察了浓度的影响, 综合考虑理论板数、分离度、拖尾因子等参数, 确定测试浓度为 $1.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

由于未得到右乙拉西坦纯品, 在乙拉西坦消旋体中, 左、右旋异构体的比例约为 1:1, 且两者在此色谱条件下达到基线分离, 故以乙拉西坦消旋体作为对照品进行线性关系及范围、最低检测限及精密度试验等项目的方法学验证。同时, 用乙拉西坦消旋体初步测定了校正因子 $f = 1.02$, 说明左、右异构体在该色谱条件下的紫外响应因子接近, 可采用峰面积归一化法测定左乙拉西坦中右旋体的含量。

参考文献:

- [1] 丁庆明, 任连坤. 抗癫痫药物左乙拉西坦的临床应用和安全性[J]. 药物不良反应杂志, 2007, 9(4): 295.
- [2] Joachim OPP, Ingrid T, Theodor M, et al. Levetiracetam in children with refractory epilepsy: A multicenter open label study in Germany [J]. Seizure, 2005, 14: 476-484.
- [3] Marianna M, Annalisa M, Marta S, et al. Effect of levetiracetam on depression and anxiety in adult epileptic patients[J]. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry, 2008, 32: 539-543.
- [4] Nina I, Michael R, Stefan S, et al. Enantioselective analysis of levetiracetam and its enantiomer R- α -ethyl-2-oxo-pyrrolidine acetamide using gas chromatography and ion trap mass spectrometric detection[J]. J Chromato B, 2000, 745(2): 325-332.
- [5] BM Rao, R Ravi, Shyam Sundar Reddy B, et al. A validated chiral LC method for the enantioselective analysis of Levetiracetam and its enantiomer R- α -ethyl-2-oxo-pyrrolidine acetamide on amylose-based stationary phase[J]. J Pharmac Biomed Anal, 2004, 35: 1017-1026.
- [6] 李丹, 李晓宁, 李春红. 手性拆分左乙拉西坦片中的右旋体[J]. 中国药事, 2009, 23(7): 643-646.

收稿日期: 2010-01-16