

HPLC 法测定盐酸左布比卡因有关物质及对映体纯度

符义刚¹, 李莉娥², 李杰², 胡先明¹

(1. 武汉大学药学院, 湖北 武汉 430072; 2. 宜昌人福药业有限责任公司, 湖北 宜昌 443005)

摘要: 采用高效液相色谱法, 以 Dikma Platisil ODS 柱测定盐酸左布比卡因有关物质, 以研创 M CDP 手性柱测定盐酸左布比卡因对映体纯度。结果表明, 盐酸左布比卡因与其中间体及降解产物之间分离良好; 盐酸左布比卡因与其右旋对映体可完全分离($R_s > 1.5$)。该方法快速简便、准确可靠, 可用于盐酸左布比卡因的质量控制。

关键词: 高效液相色谱法; 盐酸左布比卡因; 有关物质; 对映体纯度

中图分类号: O 657.72 R 927.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-5425(2011)08-0091-04

手性药物由于其对映异构体之间可能具有不同的药效学和药动学性质, 近年来引起广泛的关注。如酰胺类局部麻醉药布比卡因, 其右旋异构体的心肌抑制作用强, 但其左旋异构体由于具有较低的神经和心血管毒性而应用于临床。因此, 为了保证盐酸左布比卡因(Levobupivacaine hydrochloride)临床应用中安全有效, 必须对有关物质及右旋异构体进行控制^[1,2]。为了有效地控制盐酸左布比卡因的含量, 作者参照文献[3], 对 HPLC 色谱条件和方法进行优化, 建立了盐酸左布比卡因有关物质测定以及对映体纯度测定的高效液相色谱方法。

1 实验

1.1 试药、试剂与仪器

盐酸左布比卡因样品(批号: 100601、100701、100801)、盐酸左布比卡因对照品(批号: 100601R), 宜昌人福药业有限责任公司; 盐酸布比卡因对照品(批号: H2H088), USP; 2, 6-二甲基苯胺(批号: S36420-224), Merck-Schuchardt 公司。实验用水为娃哈哈纯净水; 甲醇、乙腈, 色谱纯; 其它试剂均为分析纯。

Waters e2695 型高效液相色谱仪, Waters 2489 紫外检测器, Empower 2 色谱工作站(美国 Waters)。

1.2 方法

1.2.1 盐酸左布比卡因有关物质测定

1.2.1.1 色谱条件

Dikma Platisil ODS 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5

μm); 流动相为磷酸盐缓冲溶液(取 1 mol · L⁻¹ 磷酸二氢钠 1.3 mL、0.5 mol · L⁻¹ 磷酸氢二钠 32.5 mL, 加水至 1000 mL 使溶解, 调节 pH 值为 8.0) - 乙腈(40: 60, 体积比); 检测波长 240 nm; 流速 1.0 mL · min⁻¹; 柱温 30 °C; 进样量 20 μL。

1.2.1.2 溶液的制备

(1) 供试品溶液

取盐酸左布比卡因样品适量, 加流动相溶解并稀释, 得到 2 mg · mL⁻¹ 的供试品溶液。

(2) 对照溶液

取盐酸左布比卡因对照品适量, 加流动相溶解并稀释, 得到 0.02 mg · mL⁻¹ 的对照溶液。

(3) 2, 6-二甲基苯胺对照溶液

取 2, 6-二甲基苯胺适量, 加甲醇溶解并稀释, 得到 0.2 mg · mL⁻¹ 2, 6-二甲基苯胺贮备液; 取贮备液适量, 加流动相稀释, 得到 0.2 μg · mL⁻¹ 2, 6-二甲基苯胺对照溶液。

(4) 专属性考察溶液

高温破坏溶液: 取供试品溶液 1 mL 置于 10 mL 量瓶中, 加水适量, 水浴加热 9 h, 加水稀释至刻度, 摇匀, 即得。

光照破坏溶液: 取光照 10 d 的盐酸左布比卡因样品 20.2 mg 置于 10 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

1.2.1.3 方法学考察

在上述色谱条件下, 分别对盐酸左布比卡因有关

收稿日期: 2011-05-25

作者简介: 符义刚(1974-), 男, 湖北宜昌人, 在职硕士研究生, 研究方向: 药学, E-mail: fuyigang@163.net; 通讯作者: 胡先明, 教授。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

物质进行专属性、检测限、溶液稳定性考察,并对 3 批盐酸左布比卡因样品的相关物质进行测定。

1.2.2 对映体纯度测定

1.2.2.1 色谱条件

色谱柱为研创 MCDP 手性柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为三乙胺醋酸溶液(取三乙胺 7 mL、醋酸 7 mL,加水至 1000 mL)– 甲醇(70:30,体积比);检测波长 215 nm;流速 0.5 mL · min⁻¹;柱温 25 °C;进样量 10 μL。

1.2.2.2 溶液的制备

(1) 供试品溶液

取盐酸左布比卡因样品适量,加水溶解并稀释,得到 0.5 mg · mL⁻¹ 的供试品溶液。

(2) 系统适用性溶液

取盐酸布比卡因对照品适量,加水溶解并稀释,得到 0.2 mg · mL⁻¹ 的盐酸布比卡因溶液,即系统适用性溶液。

(3) 专属性考察溶液

高温破坏溶液:取盐酸左布比卡因样品 200 mg

置于 10 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,作为贮备液;取贮备液 1 mL 置于 10 mL 量瓶中,加水适量,水浴加热 9 h,加水稀释至刻度,摇匀,滤过;取续滤液 1 mL 置于 10 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,即得。

光照破坏溶液:取光照 10 d 的盐酸左布比卡因样品 20.2 mg 置于 10 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀;取 1 mL 置于 10 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

1.2.2.3 方法学考察

在上述色谱条件下,分别对盐酸左布比卡因对映体纯度进行专属性、峰归属、检测限、重复性考察,并对 3 批盐酸左布比卡因样品的对映体纯度进行测定。

2 结果与讨论

2.1 盐酸左布比卡因有关物质测定

2.1.1 专属性

取各专属性考察溶液,按 1.2.1.1 色谱条件进样测定,计算理论塔板数和分离度,结果见图 1。

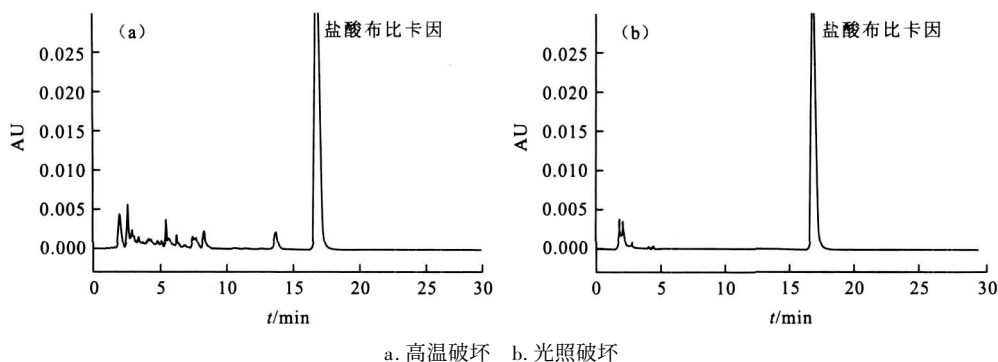


图 1 盐酸左布比卡因有关物质专属性 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of the exclusion inspection of related substances for levobupivacaine hydrochloride

由图 1 可知,盐酸左布比卡因峰与相邻降解产物峰能达到有效分离,分离度大于 1.5;理论塔板数(以盐酸左布比卡因计)大于 10 000。

2.1.2 检测限

取盐酸左布比卡因对照品适量,加流动相溶解并稀释得到 0.02 μg · mL⁻¹ 盐酸左布比卡因溶液,取 20 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图。结果表明,盐酸左布比卡因峰信噪比为 3.3,即盐酸左布比卡因检测限浓度为 0.02 μg · mL⁻¹。

取 2,6-二甲基苯胺适量,加流动相稀释得到 0.7 ng · mL⁻¹ 2,6-二甲基苯胺溶液,取 20 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图。结果表明,2,6-二甲基苯胺峰信噪比为 2.5,即 2,6-二甲基苯胺检测限浓度为 0.7 ng ·

mL⁻¹。

2.1.3 溶液稳定性

取供试品溶液于室温分别放置 0 h、1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h、7 h、8 h、9 h、10 h、11 h、12 h,进样测定。结果表明,溶液在 12 h 内稳定,RSD 为 0.6%。

2.1.4 样品有关物质测定

取 3 批盐酸左布比卡因样品分别制备的供试品溶液及对照溶液、2,6-二甲基苯胺对照溶液,各进样 20 μL,记录色谱图,如图 2 所示。以不加校正因子的主成分对照法计算最大单个杂质和总杂质,以外标法计算 2,6-二甲基苯胺含量。结果表明,3 批盐酸左布比卡因样品中均未检出有关物质。

2.2 对映体纯度测定

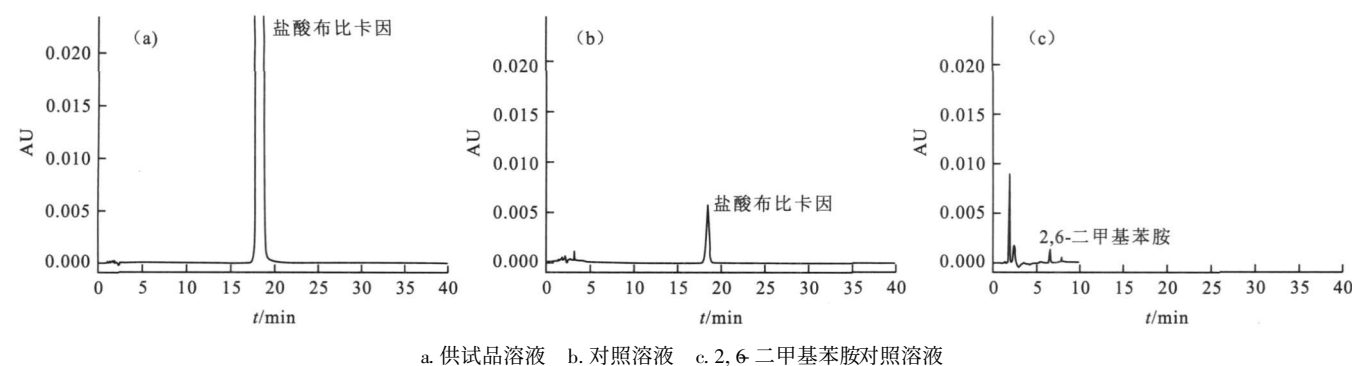


图2 有关物质测定 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC Chromatograms for determination of related substances

2.2.1 专属性

取各专属性考察溶液,按 1.2.2.1 色谱条件进样

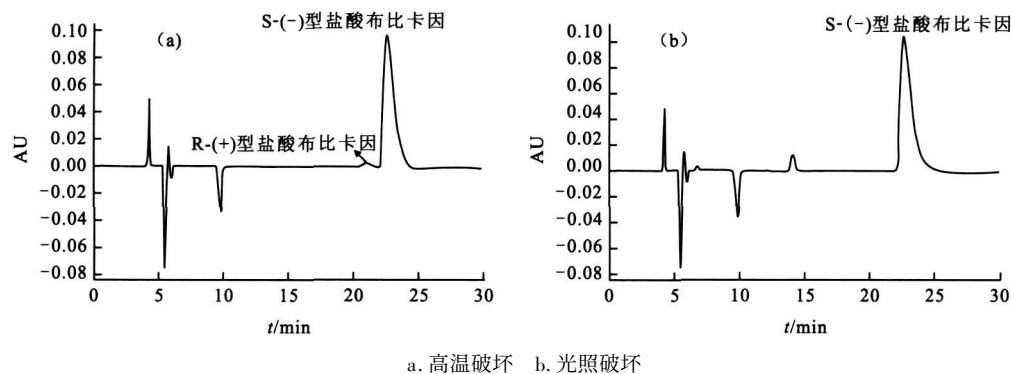


图3 盐酸左布比卡因对映体纯度专属性考察 HPLC 图谱

Fig. 3 HPLC Chromatograms of the exclusion inspection of enantiomer purity for levobupivacaine hydrochloride

由图3可知,盐酸左布比卡因峰与相邻降解产物及其对映体峰能达到有效分离,分离度大于1.5;理论塔板数(以盐酸左布比卡因计)大于2000。

2.2.2 峰归属

取系统适用性溶液 10 μL 注入液相色谱仪,出现2个主峰,分别为 R-(+) 型与 S(-) 型盐酸布比卡因。

取供试品溶液 10 μL 注入液相色谱仪,出现1个主峰,应为 R-(+) 型或 S(-) 型盐酸布比卡因。取2%的水溶液测定比旋度为 -12.5° ,说明供试品为左旋体。因此可确定该色谱条件下对映体出峰顺序为:先 R-(+) 型盐酸布比卡因峰,后 S(-) 型盐酸布比卡因峰。

2.2.3 检测限

取盐酸布比卡因对照品适量,加水溶解并稀释得到 $0.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 盐酸布比卡因溶液,取 10 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图。结果表明, R-(+) 型与 S(-) 型盐酸布比卡因峰信噪比分别为 3.3 和 3.2,则该方法 R-(+) 型与 S(-) 型盐酸布比卡因检测限浓

测定,计算理论塔板数和分离度,结果见图3。

度均为 $0.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.2.4 重复性

取系统适用性溶液 10 μL 注入液相色谱仪,连续进样6次,记录色谱图。结果表明, R-(+) 型盐酸布比卡因峰与 S(-) 型盐酸布比卡因峰分离度均大于1.5;计算 $A_R/(A_S + A_R)$ 的值 [A_R 、 A_S 分别表示 R-(+) 型盐酸布比卡因与 S(-) 型盐酸布比卡因峰面积],平均为 52.0%。表明该方法重复性良好。

2.2.5 对映体纯度测定

取3批盐酸左布比卡因样品分别制备的供试品溶液及系统适用性溶液,各进样 10 μL ,记录色谱图。计算 $A_R/(A_S + A_R)$,结果表明,3批盐酸左布比卡因样品中均未检出盐酸右布比卡因,色谱图见图4。

2.3 讨论

(1) pH 值对盐酸左布比卡因有关物质测定影响较为明显。盐酸左布比卡因峰的保留时间随 pH 值的减小而缩短。盐酸左布比卡因为碱性药物,在偏碱性的条件下有利于在色谱柱上保留。因此,最终选择 pH 值 8.0 的磷酸盐缓冲溶液作为流动相,相应地需

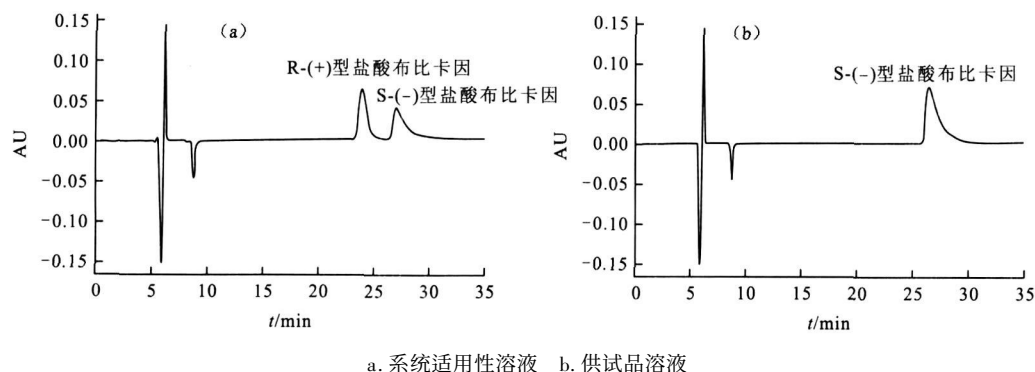


图4 对映体纯度测定 HPLC 图谱

Fig.4 HPLC Chromatograms for determination of enantiomer purity

选择耐碱性的色谱柱。

(2) 三乙胺醋酸缓冲溶液是手性分离中常用的缓冲溶液。研究发现, 缓冲溶液浓度越大对映体分离效果越好。最终确定以 7 mL 三乙胺与 7 mL 醋酸加水至 1000 mL 的缓冲溶液为最佳。

(3) 本研究所讨论的盐酸左布比卡因的质量控制方法中, 其有关物质测定所采用的 HPLC 方法无立体选择性, 测定的实际是盐酸左布比卡因及其右旋对映体的总量, 因此评价原料药质量时应当综合对映体纯度的测定结果。

3 结论

采用高效液相色谱法, 以 Dikma Platisil ODS 柱测定盐酸左布比卡因有关物质; 以研创 MCDP 手性柱

测定盐酸左布比卡因对映体纯度。结果表明, 盐酸左布比卡因与其中间体及降解产物之间分离良好; 盐酸左布比卡因与其右旋对映体可完全分离 ($R > 1.5$)。该方法快速简便、准确可靠, 可用于盐酸左布比卡因的质量控制。

参考文献:

- [1] Rifai N, Hsin O, Hope T, et al. Simultaneous measurement of plasma ropivacaine and bupivacaine concentrations by HPLC with UV detection[J]. The Drug Monit, 2001, 23(2): 182-186.
- [2] Peutrell J M, Holder K, Gregory M. Plasma bupivacaine concentrations associated with continuous extradural infusions in babies [J]. British Journal of Anaesthesia, 1997, 78(2): 160-162.
- [3] 董真秀, 汪芸, 徐燕, 等. HPLC 测定盐酸左布比卡因右旋异构体含量[J]. 安徽中医学院学报, 2006, 25(1): 37-38.

Determination of Related Substances and Enantiomer Purity of Levobupivacaine Hydrochloride by HPLC

FU Yi-gang¹, LI Li-e², LI Jie², HU Xian-ming¹

(1. College of Pharmacy, Wuhan University, Wuhan 430072, China;
2. Yichang Humanwell Pharmaceutical Co. Ltd., Yichang 443005, China)

Abstract: An assay method for the determination of related substances and enantiomer purity of levobupivacaine hydrochloride was established. HPLC Method was used to determine related substances of levobupivacaine hydrochloride on a Dikma Platisil ODS column, while enantiomer purity was inspected on a MCDP chiral column. The results showed that perfect resolution had been achieved among bupivacaine hydrochloride, its related substances and degraded products. The resolution of the two enantiomers was greater than 1.5. The method is simple, fast, accurate and reliable to control the quality of levobupivacaine hydrochloride.

Keywords: HPLC; levobupivacaine hydrochloride; related substance; enantiomer purity

发展低碳经济

实现绿色合成