

HPLC 法测定奥卡西平及其制剂中有关物质

朱晓月, 高青, 朱莉娜, 王雪莉, 胡琴*, 张喆*

(北京市药品检验研究院, 国家药品监督管理局仿制药研究与评价重点实验室,
中药成分分析与生物评价北京市重点实验室, 北京 102206)

摘要 目的: 建立使用 C_{18} 色谱柱同时测定奥卡西平及其制剂中 8 个杂质的高效液相色谱法。**方法:** 采用 ACE Excel C_{18} (4.6 mm × 150 mm, 3 μ m) 色谱柱, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 以 6.8 g · L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液 (每 1 000 mL 加三乙胺 2 mL, 用磷酸调 pH 6.0) 为流动相 A, 乙腈-甲醇 (11:8) 为流动相 B, 梯度洗脱, 检测波长 240 nm, 柱温 45 °C。**结果:** 奥卡西平与 8 个杂质分离度良好, 奥卡西平和卡马西平分别在 0.05 ~ 4.0 μ g · mL⁻¹ 和 0.08 ~ 40 μ g · mL⁻¹ 浓度范围内呈现良好线性 ($r \geq 0.9999$), 奥卡西平和卡马西平的定量限为 1.03 ng、0.65 ng, 检测限为 0.34 ng、0.33 ng。共测定奥卡西平原料 2 个企业 5 批样品、奥卡西平片 2 个企业 6 批样品, 其中 1 批原料检出杂质 E, 含量为 0.004%; 3 批片剂检出卡马西平, 含量分别为 0.008%、0.005%、0.006%; 1 批片剂检出杂质 C 和杂质 D, 含量为 0.006%、0.005%; 单个最大未知杂质含量在 0.02% ~ 0.20% 范围内, 杂质总量在 0.02% ~ 0.32% 范围内。**结论:** 本法使用小粒径色谱柱节省检测时间, 为进一步完全奥卡西平及其制剂的质量评价提供依据。

关键词: 有关物质; 奥卡西平; 精神类药; 高效液相色谱; 梯度洗脱

中图分类号: R 921.2

文献标识码: A

文章编号: 1009-3656(2023)02-0000-00

doi: 10.19778/j.chp.2023.02.00

?是否应删除

Determination of the related substances in oxcarbazepine and its preparation by HPLC

ZHU Xiaoyue, GAO Qing, ZHU Lina, WANG Xueli, HU Qin*, ZHANG Zhe*

(Beijing Institute for Drug Control, NMPA Key Laboratory for Research and Evaluation of Generic Drugs,
Beijing Key Laboratory of Analysis and Evaluation on Chinese Medicine, Beijing 102206, China)

Abstract Objective: To establish an HPLC method for the determination of eight related substances in oxcarbazepine and its preparation by HPLC. **Methods:** The analyte was gradient eluted on the ACE Excel C_{18} (4.6 mm × 150 mm, 3 μ m) with mobile phase A [6.8 g · L⁻¹ potassium dihydrogen phosphate solution (containing 2 mL of triethylamine in 1 000 mL, and adjusted to pH 6.0 with phosphoric acid)] and mobile phase B [acetonitrile-methanol (11:8)] at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. The detection wavelength was 240 nm. The column temperature was 45 °C. **Results:** The resolution factor between the peaks complied with the related requirements. The method had good linear relationship ($r \geq 0.9999$) at the 0.05 – 4.0 μ g · mL⁻¹ of oxcarbazepine and 0.08 – 40 μ g · mL⁻¹ of carbamazepine. Limit of quantitation about oxcarbazepine and carbamazepine were 1.03 ng and 0.65 ng. Limit of detection about oxcarbazepine and carbamazepine were 0.34 ng and 0.33 ng. 5 batches of oxcarbazepine materials from 2 enterprises and 6 batches of oxcarbazepine tablets from 2 enterprises were determined. Impurity E was determined in 1 batch of oxcarbazepine materials, which content was 0.004%. Carbamazepine was determined

第一作者简介: 朱晓月, 主管药师; 研究方向: 药物分析。Tel: 010-52779698; E-mail: zhuxiaoyue@bidc@163.com

* 通讯作者简介: 胡琴, 主任药师; 研究方向: 药物分析与质量评价。Tel: 010-52779698; E-mail: huqin@bidc.org.cn

张喆, 副主任药师; 研究方向: 药物分析与质量评价。Tel: 010-52779698; E-mail: zhangzhe@bidc@yj.j.beijing.gov.cn

in 3 batches of oxcarbazepine tablets, which contents were 0.008%, 0.005% and 0.006%, respectively. Impurity C and Impurity D were determined in 1 batch of oxcarbazepine tablets, which contents were 0.006% and 0.005%. The content of any individual unspecified impurity was 0.02% - 0.20%. The content of total impurities was 0.02% - 0.32%. **Conclusion:** The method adopted small particle size column is used to save time. It provides the basis for improving the quality evaluation of oxcarbazepine and its preparation.

Key words: related substances; oxcarbazepine; psychotropic drugs; HPLC; gradient elution

奥卡西平 (Oxcarbazepine, OXC) 是卡马西平的 10-酮基衍生物, 目前已成为儿科抗癫痫一线药物, 与卡马西平相比, 具有不良反应少、自身诱导作用小等优点^[1]。《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》) 2020 年版^[2]、EP10.0^[3]、BP2020^[4]、USP43^[5] 均收录了奥卡西平或其片剂的相关标准。此外, 诺华公司作为原研企业, 将奥卡西平片引进中国, 其企业标准经过审核后形成了进口注册标准^[6]。在前期调研中发现, 《中国药典》奥卡西平及其片剂有关物质测定方法, 由于采用 pH 为 3.0 的磷酸钾缓冲液作为流动相和稀释溶剂, 导致奥卡西平发生酮式-烯醇式互变, 产生的烯醇式互变异构体计入未知杂质, 会造成有关物质不合格。因此, 《中国药典》奥卡西平有关物质测定方法亟待修订。

经检索, 涉及奥卡西平及其片剂杂质和含量检测的相关文章不多^[7-14], 其中一篇有关物质测定方法与《中国药典》完全一致^[7], 其他多为检测血液中奥卡西平及其代谢产物的方法。本文通过采用 C₁₈ 色谱柱、梯度洗脱的方法, 可快速准确地检测奥卡西平及其片剂中 8 个相关杂质。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪 (工作站: 岛津 LabSolution, 检测器: 岛津 SPD-M20AT; 日本岛津公司); XA205 型电子天平 (Mettler Toledo 公司)。

1.2 试剂

奥卡西平原料药、奥卡西平片均为国内相关企业提供; 卡马西平对照品 (批号 100142-199503, 含量 99.93%) 来源于中国食品药品检定研究院, 其他对照品均来源于北京诺华制药有限公司; 各杂质分子式和结构式见表 1; 乙腈、甲醇为色谱纯 (Merck 公司), 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

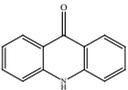
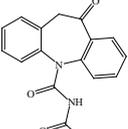
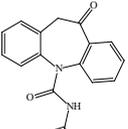
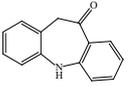
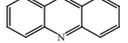
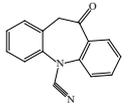
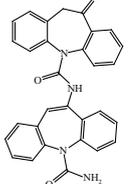
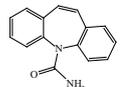
2.1 色谱条件

采用 ACE Excel C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm,

3 μm), 流动相 A 为 6.8 g · L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液 (每 1 000 mL 加三乙胺 2 mL, 用磷酸调 pH 6.0), 流动相 B 为乙腈-甲醇 (11:8), 梯度洗脱程序见表 2, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长: 240 nm, 柱温 45 °C, 进样量 15 μL。

表 1 奥卡西平 8 个杂质信息

Tab. 1 The information of eight related substances in oxcarbazepine

名称 (name)	分子式 (molecular formula)	结构式 (structure)
杂质 A (impurity A)	C ₁₃ H ₉ NO	
杂质 B (impurity B)	C ₁₆ H ₁₂ N ₂ O ₃	
杂质 C (impurity C)	C ₁₇ H ₁₄ N ₂ O ₃	
杂质 D (impurity D)	C ₁₄ H ₁₁ NO	
杂质 E (impurity E)	C ₁₃ H ₉ N	
杂质 F (impurity F)	C ₁₅ H ₁₀ N ₂ O	
杂质 G (impurity G)	C ₃₀ H ₂₂ N ₄ O ₃	
卡马西平 (carbamazepine)	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O	

2.2 溶液的制备

稀释溶剂为流动相 A-流动相 B (40:60)。杂质

对照品溶液:取卡马西平对照品,精密称定,用稀释溶剂稀释制成 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。供试品溶液:取奥卡西平原料,精密称定,用稀释溶剂稀释制成 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,作为原料供试品溶液;取奥卡西平片 20 片,研细,精密称取细粉适量,用稀释溶剂稀释制成含奥卡西平 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,滤过,取续滤液,作为片剂供试品溶液。

2.3 系统适用性试验

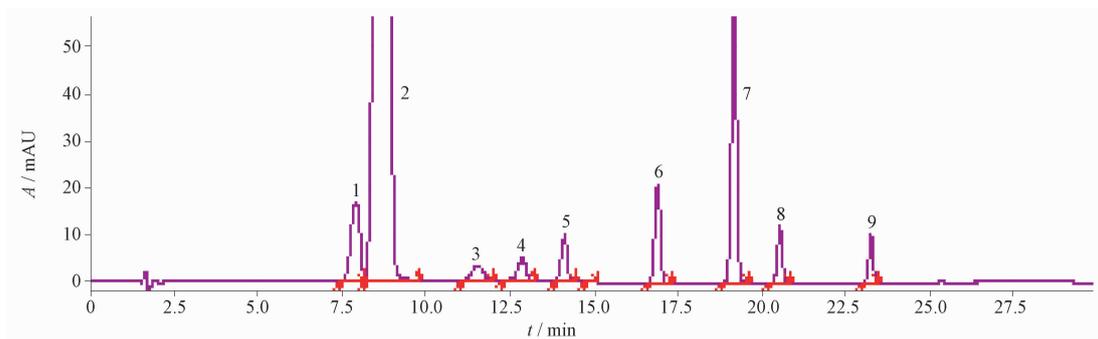
取奥卡西平和杂质 A、杂质 B、杂质 C、杂质 D、卡马西平、杂质 E、杂质 F、杂质 G 对照品适量,用稀释溶剂稀释成含奥卡西平 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、含各杂质

$0.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,作为系统适用性试验溶液,各杂质分离色谱图见图 1。

表 2 梯度洗脱程序

Tab. 2 Gradient elution program

时间(time)/min	A/%	B/%
0.0	67	33
8.0	67	33
8.1	60	40
38.0	20	80
38.1	67	33
43	67	33



1. 杂质 A (impurity A) 2. 奥卡西平 (oxcarbazepin) 3. 杂质 B (impurity B) 4. 杂质 C (impurity C) 5. 卡马西平 (carbamazepine) 6. 杂质 D (impurity D) 7. 杂质 E (impurity E) 8. 杂质 F (impurity F) 9. 杂质 G (impurity G)

图 1 系统适用性色谱图

Fig. 1 System suitability chromatograms by HPLC

2.4 耐用性试验

采用“2.1”项下色谱条件,测定系统适用性试验溶液,结果见表 3。色谱条件的改变对杂质 C 信噪比影响最大,因此除主峰保留时间及分离度外,将杂质 C 信噪比也列为考察耐用性试验结果的指标。由结果可见,本文最终采用的色谱条件最优。

2.5 专属性试验

取奥卡西平原料 9 份,进行如下试验:①酸破坏:加 $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液 2 mL, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴加热 5 h;②碱破坏(1)加 $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 1 mL, $45 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴加热 4 h;③碱破坏(2)加 $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 1 mL, $80 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴加热 1 h;④氧化破坏(1)加 30% 过氧化氢溶液 0.5 mL, $45 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴加热 1.5 h;⑤氧化破坏(2)加 30% 过氧化氢溶液 1 mL, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴加热 3 h;⑥高温破坏:置 $80 \text{ }^\circ\text{C}$ 烘箱 15 h;⑦光照破坏:置 254 nm 紫外灯下照射 24 h;⑧高湿破坏:置 92.5% RH 干燥器中放置 67 h;⑨未破坏。结果表明,本品在酸、光照和高湿下均比较稳定,基本无降解产物出现。在碱、氧化、高温条件下不稳定。以

上各种破坏条件下,降解产生的杂质可以达到基线分离,个别微小杂质分离度小于 1.5,但是均大于 1.4,可以满足有关物质测定要求。

2.6 线性范围

精密称取奥卡西平对照品,用稀释溶剂配制成为 0.05 、 0.1 、 0.2 、 0.4 、 0.8 、 1.6 、 $4.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液;精密称取卡马西平对照品,用稀释溶剂稀释成 0.08 、 0.16 、 0.4 、 4.0 、 8.0 、 20 、 $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,进样测定,按峰面积对浓度计算回归方程。奥卡西平、卡马西平的线性方程分别为:

$$Y = 32160X + 781.75 \quad r = 0.9999$$

$$Y = 51953X + 1438.7 \quad r = 1.0000$$

奥卡西平在 $0.05 \sim 4.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、卡马西平在 $0.08 \sim 40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度范围内,其浓度与峰面积呈良好的线性关系。

2.7 定量限和检测限

取奥卡西平对照品和卡马西平对照品适量,分别用稀释溶剂溶解稀释后进样测定。信噪比约为 10 比 1 时测得奥卡西平和卡马西平定量限为 1.03

ng 和 0.65 ng, 信噪比约为 3:1 时测得检测限为 0.34 ng 和 0.33 ng。

2.8 进样精密度试验

精密吸取同一对照品溶液, 连续进样 5 次, 计算卡马西平峰面积的 RSD 为 0.33%。

2.9 稳定性试验

取奥卡西平对照品、奥卡西平原料和奥卡西平

片细粉, 用稀释溶剂超声溶解并稀释成含奥卡西平 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 在 0、1、2、3、4、6、8、10、12 h 进样测定。奥卡西平对照品及原料溶液在 12h 内主峰面积、杂质峰数量及面积均无明显变化, 稳定性良好; 奥卡西平片溶液中, 保留时间 6.4 min 的未知杂质, 峰面积随时间增加而减小, 其他杂质无明显变化, 因此应及时进样分析、临用新制。

表 3 耐用性试验结果

Tab.3 The result of durability test

因素 (factor)	值 (value)	主峰保留时间 (retention time of oxcarbazepin)	主峰与杂质 A 分离度 (resolution of oxcarbazepine and impurity A)	杂质 C 信噪比 (S/N of impurity C)
柱温(column temperature)	40 °C	9.512	1.535	31.84
	45 °C	8.740	1.528	28.30
	50 °C	8.116	1.496	15.61
流速(flow rate)	0.8 mL · min ⁻¹	9.721	1.552	46.31
	0.9 mL · min ⁻¹	9.859	1.580	37.61
	1.0 mL · min ⁻¹	8.740	1.528	28.30
	1.1 mL · min ⁻¹	7.976	1.493	18.64
流动相初始比例 (initial ratio of mobile phase)	70:30	11.516	2.302	35.60
	67:33	8.740	1.528	28.30
	65:35	7.994	0.777	25.54
	64:36	7.391	杂质并入主峰(impurity into oxcarbazepine)	24.10
流动相 pH(pH of mobile phase)	5.5	8.713	1.385	25.44
	6.0	8.740	1.528	28.30
	6.5	8.709	1.418	17.38
色谱柱(column)	SHISEIDO MGII C ₁₈ ^a	10.610	杂质并入主峰(impurity into oxcarbazepine)	51.94
	SHISEIDO MGII C ₁₈ ^b	9.716	杂质并入主峰(impurity into oxcarbazepine)	51.36
	Phenomenex Luna C ₁₈ ^a	10.151	杂质并入主峰(impurity into oxcarbazepine)	44.52
	Phenomenex Luna C ₁₈ ^b	10.613	杂质并入主峰(impurity into oxcarbazepine)	64.30
	MN C ₁₈ ^a	8.753	杂质并入杂质 B(impurity into impurity B)	28.20
	ACE Excel C ₁₈ ^a	8.740	1.528	28.30

注: a: 4.6 mm × 150 mm, 3 μm; b: 4.6 mm × 250 mm, 5 μm

2.10 重复性试验

取奥卡西平原料及片剂各一批, 分别制备 6 份样品。测得 6 份原料供试品均检测出一个未知杂质, 结果均为 0.02%; 6 份片剂供试品均检测出卡马西平, 结果为 0.008 3%、0.008 2%、0.008 5%、0.008 2%、0.008 3%、0.008 7%, 单个最大未知杂质结果在 0.1% ~ 0.2% 范围内, 总杂质在 0.2% ~ 0.3% 范围内。

2.11 回收率试验

取卡马西平对照品、奥卡西平原料适量, 用稀释溶剂制备成每份含奥卡西平 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 含卡马西平分别为 0.4、0.8、1.2 μg · mL⁻¹ 的溶液, 每个浓度 3 份, 卡马西平的加样回收率结果在 100.0% ~ 105.0% 之间, 平均回收率为 102.3%。

2.12 样品测定及结果

共测定奥卡西平原料 2 个企业 5 批样品、奥卡西平片 2 个企业 6 批样品, 采用卡马西平作为对照品, 按外标法计算卡马西平及其他杂质含量。其中 1 批原料检出杂质 E, 含量为 0.004%; 3 批片剂检出卡马西平, 含量分别为 0.008%、0.005%、0.006%; 1 批片剂检出杂质 C 和杂质 D, 含量为 0.006%、0.005%; 单个最大未知杂质含量在 0.02% ~ 0.20% 范围内, 杂质总量在 0.02% ~ 0.32% 范围内, 均符合《中国药典》规定。

3 讨论

3.1 检测波长

各国药典及进口标准有关物质检测波长包括

215、230、240、254 nm。其中 215nm 近末端吸收,影响基线平稳,作为梯度洗脱不是最佳选择;254 nm 为奥卡西平的最大吸收,但卡马西平最大吸收在 236 nm,其他 7 个杂质除杂质 A 外,240 nm 波长处的吸光度均大于 254 nm 的吸光度,基线较平稳,最终确定 240 nm 为测定波长。

3.2 溶剂的选择和助溶方式

奥卡西平溶解性不好,在甲醇中微溶,在水或乙醇中几乎不溶。《中国药典》选择流动相作为溶剂[缓冲液-有机相(60:40)]。USP^[5]有关物质方法 1 溶剂为 60% 甲醇,方法 2 溶剂第一步为乙腈,稀释时采用 50% 乙腈。诺华公司片剂标准中,乙腈作为溶剂,供试品溶液制备时需要超声并同时振摇 40 min,再振摇 20 min,如不按此操作含量会偏低,耗时太长。鉴于片剂供试品溶液制备时,溶剂中加入一定水相有助于粉末湿润分散,可缩短超声时间,溶解充分,因此选择流动相 A-流动相 B(4:6),有机相的比例为 60%,仅需超声振摇 5 min,经重复性试验验证,原料和片剂均溶解良好。

3.3 定量限和检测限、有关物质计算方法

由于取得的杂质对照品无含量报告,因此除卡马西平采用中检院对照品测定定量限和检测限外,其他杂质均未测定。除卡马西平外,其他杂质对照品难以取得,因此参照进口注册标准和 USP 的方法,采用卡马西平作为对照品,按外标法计算杂质含量。

3.4 小结

本研究所建立的奥卡西平及其制剂有关物质的测定方法,使用小粒径色谱柱节省检测时间,分离效果好,重现性好,经方法学验证,方法准确、可靠,为进一步完善奥卡西平及其制剂的质量评价提供依据。

参考文献

- [1] 刘彬,王刚,何翠瑶,等. 奥卡西平的代谢物 10, 11-二氢-10-羟基卡马西平在癫痫儿童中的群体药动学[J]. 中国医院药学杂志, 2014, 34(7):526
LIU B, WANG G, HE CY, *et al.* Population pharmacokinetics of monohydroxycarbamazepine in Chinese Han children with epilepsy [J]. *Chin Hosp Pharm J*, 2014, 34(7):526
- [2] 中华人民共和国药典 2020 年版. 二部[S]. 2020:1668
ChP 2020. Vol II [S]. 2020:1668
- [3] EP 10.0[S]. 2019:3448
- [4] BP 2020[S]. 2020:495
- [5] USP43-NF38[S]. 2019
- [6] 进口注册标准 JX20170076. 奥卡西平片[S]. 2017:1
Imported Drug Standards JX20170076. Oxcarbazepine tablets [S]. 2017:1

- [7] 赵亚平. 高效液相色谱法测定奥卡西平及片剂的含量和有关物质[J]. 中国现代应用药学杂志, 2002, 19(5):396
ZHAO YP. Determination of Oxcarbazepine and its Tablets and Related Substances by HPLC [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2002, 19(5):396
- [8] 林奕汎,黄成珂,王哲,等. HPLC 法同时检测人血浆中奥卡西平及其代谢产物浓度[J]. 中国临床药理学杂志, 2017, 26(2):115
LIN YF, HUANG CK, WANG Z, *et al.* Simultaneous determination of oxcarbazepine and its metabolite in human plasma by HPLC[J]. *Chin J Clin Pharm*, 2017, 26(2):115
- [9] 于超,王志强,张梅君,等. 反向高效液相色谱法测定人血浆中奥卡西平的浓度[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(11):2495
YU C, WANG ZQ, ZHANG MJ, *et al.* Determination of concentration of Oxcarbazepine in human plasma by RP-HPLC [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2013, 23(11):2495
- [10] 杨娟娟,王陈翔,周子晔,等. LC-MS/MS 测定人血清中奥卡西平及其活性代谢产物 10-羟基卡马西平的浓度及其临床应用[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(22):2823
YANG JJ, WANG CX, ZHOU ZY, *et al.* Determination of oxcarbazepine and its active metabolite 10-hydroxycarbamazepine in human serum by LC-MS/MS and Its Clinical Application [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2019, 36(22):2823
- [11] 沈芊,王彦改,曾红,等. RP-HPLC 法同时测定人血清中拉莫三嗪、苯巴比妥、奥卡西平及其活性代谢物单羟基卡马西平的浓度[J]. 中国药房, 2016, 27(11):1493
SHEN Q, WANG YG, ZENG H, *et al.* Determination of lamotrigine, phenobarbital, oxcarbazepine and its active metabolite monohydroxycarbamazepine concentration in human serum by RP-HPLC [J]. *China Pharm*, 2016, 27(11):1493
- [12] 陈婷婷,刘富岗. RP-HPLC 法同时测定人血浆中左乙拉西坦、奥卡西平及其活性代谢产物的浓度[J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(20):2133
CHEN TT, LIU FG. Determination of the concentrations of levetiracetam, oxcarbazepine and its active metabolite in human plasma by RP-HPLC [J]. *Chin Hosp Pharm J*, 2018, 38(20):2133
- [13] 高雅莉,庄奕筠,许秋霞,等. 反相高效液相色谱法测定人血浆中奥卡西平活性代谢产物的浓度[J]. 中国现代医生, 2018, 56(12):42
GAO YL, ZHUANG YY, XU QX, *et al.* Determination of active metabolites of oxcarbazepine in human serum by reversed-phase high performance liquid chromatography [J]. *China Mod Doctor*, 2018, 56(12):42
- [14] 徐毅超,楼洪刚,阮邹荣,等. 高效液相色谱法同时测定人血浆中拉莫三嗪和奥卡西平活性代谢物血药浓度及其临床应用分析[J]. 中国医院药学杂志, 2019, 39(2):165
XU YC, LOU HG, RUAN ZR, *et al.* Simultaneous determination of lamotrigine and monohydroxy carbamazepine in human plasma by HPLC and its clinical application [J]. *Chin J Hosp Pharm*, 2019, 39(2):165

(收稿日期:2022-03-20)