

托吡酯有关物质的 HPLC 测定方法的改进

韩建萍, 陈滔, 刘颖, 田青松*

天津泰普药品科技发展有限公司, 天津 300193

摘要: 目的 确定托吡酯有关物质检测条件及定量方法。方法 采用 C₁₈ 柱, 流动相为乙腈-水 (50:50), 柱温和检测器温度为 55 °C, 体积流量为 0.6 mL/min, 采用示差折光检测器。测定托吡酯有关物质检测质量浓度 4~40 mg/mL 与峰面积的线性关系; 并对检测方法进行验证。**结果** 托吡酯有关物质检测质量浓度在 4~40 mg/mL, 随着主成分质量浓度的提高, 逐渐不呈线性关系; 托吡酯在 0.008~0.800 mg/mL 与峰面积呈良好的线性关系, 其相关系数为 1.000 0; 最低检测限为 0.2 µg; 重复性良好。**结论** 采用自身对照法比面积归一化法更准确可靠, 更适宜于托吡酯的质量控制。

关键词: 托吡酯; 有关物质; 自身对照法; 面积归一化法

中图分类号: R927.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2012)05-0461-03

Improvement of HPLC method for determination of topiramate-related substances

HAN Jian-ping, CHEN Tao, LIU Ying, TIAN Qing-song

Tianjin Taipu Pharmaceutical Science & Technology Development Co., Ltd., Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To improve the HPLC method for the determination of topiramate-related substances. **Methods** The HPLC column was Kromasil C₁₈, the mobile phase was acetonitrile-water (50:50), column and detector temperature were 55 °C, the flow rate was 0.6 mL/min, and a differential refractive index detector was used. The linear relationship between topiramate-related substances in the range of 4—40 mg/mL and the peak area was detected and the detection methods were verified. **Results** With the content increasing, the linear relationship disappeared. As the linear range of topiramate was 0.008—0.800 mg/mL ($r=1.000\ 0$), there was a better linear relationship between them, for which the lowest detected limit of topiramate was 0.2 µg with a good repeatability. **Conclusion** It is more accurate and reliable using the self contrast method than the area normalization method in the quality control of topiramate.

Key words: topiramate; related substance; self contrast method; area normalization method

托吡酯 (topiramate) 化学名为 2,3:4,5-双-O-(1-甲基亚乙基)-β-D-吡喃果糖氨基磺酸酯, 是一个由氨基磺酸酯取代单糖的新型抗癫痫药物。《美国药典》第 34 版中有关物质检测有 Test1 和 Test2 两种方法^[1]。Test1 是采用 C₁₈ 色谱柱, 检测器和柱温为 55 °C, 流动相为乙腈-水 (50:50), 体积流量为 0.6 mL/min, 检测质量浓度为 40 mg/mL; Test2 是采用 C₆ 色谱柱, 柱温为 35 °C, 流动相为甲醇-水 (32:68), 体积流量为 1.5 mL/min, 检测质量浓度为 10 mg/mL。两种检测方法都采用面积归一化计算有关物质含量。本实验采用《美国药典》第 34 版有关物质检测的 Test1, 并且采用面积归一化法, 结果不能准确测定有关物质的含量, 而采用的自身对照法计算有关物质含量, 结果准确可靠。

1 仪器与试剂

LC—10A 型高效液相色谱仪、RID—10A 型示差折光检测器、SIL—10AV 型自动进样器、Class-vp 工作站 (日本 Shimadzu 公司); 电子天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司)。

托吡酯原料药 (天津泰普药品科技发展有限公司提供, 批号为 110601、110602、110603), D-吡喃果糖 (上海晶纯试剂有限公司, 质量分数 99%), 双丙酮-β-D-吡喃果糖 (天津泰普药品科技发展有限公司提供, 质量分数 98.5%), 乙腈 (色谱纯, TEDIA 公司), 水为屈臣氏纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

根据合成路线, 首先选用《美国药典》第 34

收稿日期: 2012-06-06

作者简介: 韩建萍 (1975—), 女, 助理研究员, 主要从事药物分析研究。Tel: (022)23003021 E-mail: hanjp@tjipr.com

*通讯作者 田青松, 副研究员, 从事药物分析工作。Tel: (022)23003021 E-mail: tianqs@tjipr.com

版有关物质方法 Test1。色谱柱为 Kromasil C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 - 水 (50 : 50); 体积流量: 0.6 mL/min; 检测器和柱温: 55 °C; 进样体积: 50 μL。

2.2 溶液的配制

精密称取托吡酯 400 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加流动相制成 40 mg/mL 的溶液, 作为供试品溶液。精密量取供试品溶液 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 作为 1% 自身对照溶液。

2.3 系统适用性

称取 *D*-吡喃果糖 3 mg 和双丙酮-β-*D*-吡喃果糖 3 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加 40 mg/mL 托吡酯溶液溶解, 并稀释至刻度, 摇匀。取 50 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图。结果 *D*-吡喃果糖、双丙酮-β-*D*-吡喃果糖与托吡酯都能达到基线分离, 见图 1。

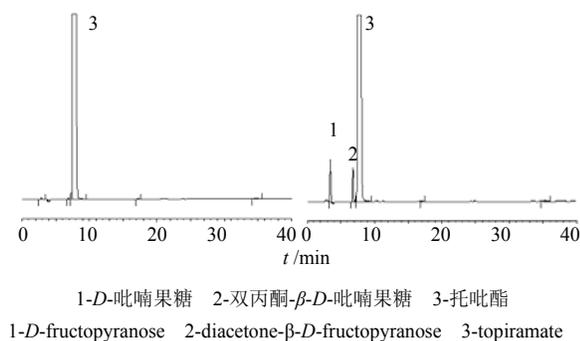


图 1 系统适用性的色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of system suitability

2.4 有关物质归属

分别向原料药溶液中添加硫酸盐、双丙酮-β-*D*-吡喃果糖、异丙醚, 说明相对托吡酯保留时间 0.4 的杂质为硫酸盐等无保留的无机离子, 相对托吡酯保留时间 0.9 的杂质为双丙酮-β-*D*-吡喃果糖, 相对托吡酯保留时间 2.2 的杂质为异丙醚。相对托吡酯保留时间 0.4、2.2 的杂质分别通过离子色谱和气相色谱控制其限度。相对托吡酯保留时间 4.5 的杂质归属采用液-质联用定性。

测定条件: 色谱柱为 Kromasil C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 - 水 (50 : 50); 体积流量为 0.4 mL/min; 柱温为 55 °C。质谱图见图 2。

由 581.85 [M]、598.80 [M+NH₃] 推测相对托吡酯保留时间 4.5 的杂质为托吡酯和双丙酮-β-*D*-吡喃果糖脱去一个水分子形成的缩合物, 结构见图 3。

由于合成路线中会产生相对托吡酯保留时间 4.5 的杂质, 该杂质极性较小, 不容易洗脱, 需要强

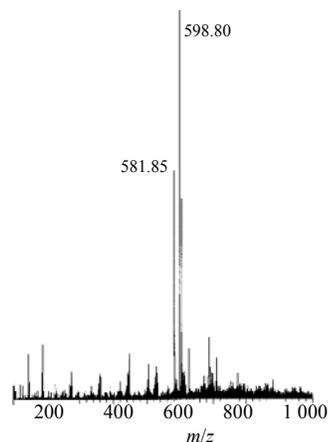


图 2 相对托吡酯保留时间 4.5 的杂质的液质联用谱图

Fig. 2 LC-MS chromatogram of relative retention time 4.5 for topiramate

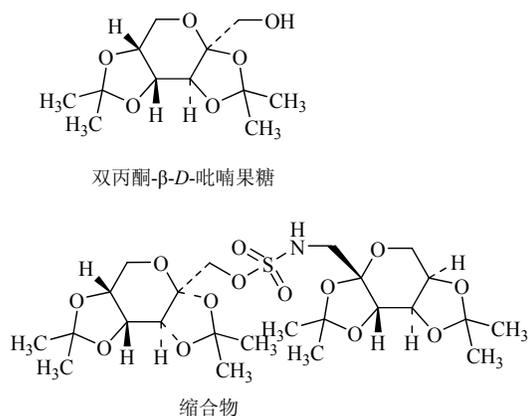


图 3 杂质的结构式

Fig. 3 Chemical structures of impurities

洗脱能力的乙腈配制流动相, 因此选用《美国药典》第 34 版中 Test1 作为有关物质液相检测条件。

2.5 有关物质的检测浓度

精密称取托吡酯 4.000 g 置 100 mL 量瓶中, 配成 40 mg/mL 储备液。精密移取 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 mL 置 10 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 即得质量浓度为 4、8、12、16、20、24、28、32、36、40 mg/mL 溶液 (相当于检测浓度的 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%), 作为供试品溶液。取 50 μL 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图, 结果见表 1。

托吡酯有关物质检测质量浓度在 4~40 mg/mL, 随着主成分质量浓度的提高, 逐渐不呈线性关系, 回归方程为 $Y=408\ 884 X+2 \times 10^6$ ($r=0.985\ 8$)。而检测质量浓度对应的 1% 自身对照 (质量浓度 0.04~0.40 mg/mL) 与峰面积呈线性关系, 回归方程为

表 1 不同浓度有关物质的测定结果

Table 1 Determination of topiramate-related substances at different concentration

质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	主峰峰面积	1%自身对照	相对保留时间 0.9 杂质的质量分数		相对保留时间 4.5 杂质的质量分数	
			自身对照法	面积归一化法	自身对照法	面积归一化法
4.001 72	2 463 006	26 176.0	0.06	0.06	0.10	0.11
8.003 44	4 898 684.5	51 046.2	0.06	0.07	0.09	0.09
12.005 16	7 303 166.5	76 592.8	0.08	0.08	0.10	0.11
16.006 88	9 620 882	101 759.1	0.08	0.08	0.10	0.11
20.008 60	11 268 138	128 188.7	0.07	0.08	0.09	0.11
24.010 32	12 890 629	154 768.8	0.06	0.08	0.10	0.12
28.012 04	14 155 384	178 421.0	0.07	0.09	0.10	0.12
32.013 76	15 277 010	204 688.7	0.07	0.09	0.10	0.13
36.015 48	16 339 357	230 139.3	0.07	0.10	0.10	0.14
40.017 20	17 440 740	256 680.9	0.07	0.10	0.10	0.14

$Y=639\ 913\ X+4.78$ ($r=0.999\ 9$)。以相对托吡酯保留时间 4.5 的杂质为例,随着主成分检测质量浓度的提高,按照面积归一化法计算相对托吡酯保留时间 4.5 的杂质的含量越来越高,当检测质量浓度为 40 mg/mL 时,杂质质量分数达到 0.14%,而按照自身对照法计算,该杂质质量分数只有 0.10%。

2.6 线性关系试验

取 *D*-吡喃果糖、双丙酮-β-*D*-吡喃果糖、托吡酯各 20 mg,置 25 mL 量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取不同体积,分别加流动相稀释配成 0.008、0.02、0.04、0.08、0.2、0.4、0.8 mg/mL 系列溶液。分别精密量取上述各溶液 50 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图。以质量浓度对峰面积计算回归方程,结果表明,*D*-吡喃果糖、双丙酮-β-*D*-吡喃果糖、托吡酯在 0.008~0.800 mg/mL 与峰面积呈良好的线性关系,回归方程分别为 $Y=690\ 080.17\ X+689.19$ ($r=1.000\ 0$)、 $Y=533\ 804.57\ X+211.68$ ($r=1.000\ 0$)、 $Y=509\ 955.17\ X+410.36$ ($r=1.000\ 0$),并计算出 *D*-吡喃果糖、双丙酮-β-*D*-吡喃果糖相对于托吡酯的响应因子分别为 1.35、1.05。

2.7 最低检出限

当质量浓度为 0.004 mg/mL 时,其信噪比为 3:1,即最低检测限为 0.2 μg。

2.8 稳定性试验

取供试品溶液,分别在室温放置 2、4、6、8、24 h 后进样,结果托吡酯在 24 h 内保持稳定。

2.9 重复性试验

取同批供试品及 1%自身对照溶液,连续测定 6 次,结果杂质平均质量分数为 0.16%,RSD 值为

4.33%。

2.10 有关物质测定结果

取 3 批样品(批号 110601、110602、110603),制备供试品溶液和对照溶液,依法测定,结果见表 2。

表 2 托吡酯有关物质测定结果

Table 2 Determination of topiramate-related substances

批号	单一最大杂质	有关物质
110601	0.10	0.16
110602	0.09	0.20
110603	0.06	0.17

3 讨论

药物中有关物质的测定一般采用外标法、主成分自身对照法和面积归一化法。《美国药典》第 34 版中测定托吡酯有关物质采用的是面积归一化法。采用面积归一化法测定药物杂质的前提是假设所有成分均出峰、所有杂质和主成分都呈线性关系、所有杂质均与主成分响应因子相同。托吡酯的氨基磺酸酯结构没有紫外及可见光吸收,不能用常规的紫外检测器进行检测,而是采用了灵敏度较差的示差折光检测器,这就需要增加进样量来提高杂质的检测精准度。此时主成分可能超出仪器检测范围,或虽在仪器检测范围内,但与主成分不在同一线性范围内,而导致面积归一化法测得的杂质含量偏高。本实验采用主成分自身对照法来代替面积归一化法,达到了准确控制本品药物杂质含量的目的。

参考文献

- [1] US Pharmacopeia [S]. 34th: 4470.
- [2] 张启明,李慧义. 色谱分析中面积归一化法测定有关物质的弊与利 [J]. 中国药品标准, 2005, 6(4):45-46.