

中图分类号: R917; R927.1 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)02-0071-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.02.017



高效液相色谱 - 电雾式检测器法测定托吡酯片中 主要成分及杂质含量

黄小琴¹, 季大伟¹, 仇雅静¹, 孙枫涛^{2△}

(1. 江苏省泰州市药品检验院, 江苏 泰州 225300; 2. 江苏省泰州市中医院, 江苏 泰州 225300)

摘要:目的 建立测定托吡酯片中主要成分及杂质含量的高效液相色谱 - 电雾式检测器(HPLC - CAD)法。方法 色谱柱为 Waters SunFire C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈 - 0.2% 甲酸水溶液(35:65, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 35 °C, 雾化温度为 35 °C, 过滤常数为 3.6 s, 幂率为 1.0, 采样频率为 10 Hz, 进样量为 10 μL。结果 托吡酯质量浓度在 0.05~1.0 mg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($r=0.9956$), 检测限和定量限分别为 1 μg/mL 和 3 μg/mL; 精密度、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 2.0%; 平均加样回收率为 100.19%, RSD 为 1.19% ($n=9$)。3 批样品中托吡酯含量为 97.98%~98.96%, 杂质总量为 0.25%~0.31%。结论 所建立的方法操作简便, 结果准确可靠, 可用于托吡酯片中主要成分及杂质的含量测定。

关键词: 高效液相色谱 - 电雾式检测器法; 托吡酯; 杂质; 含量测定; 质量控制

Determination of Main Component and Impurities in Topiramate Tablets by HPLC - CAD

HUANG Xiaoqin¹, JI Dawei¹, QIU Yajing¹, SUN Fengtao²

(1. Taizhou Institute for Drug Control, Taizhou, Jiangsu, China 225300; 2. Taizhou Hospital of Chinese Medicine, Taizhou, Jiangsu, China 225300)

Abstract: Objective To establish a high - performance liquid chromatography - charged aerosol detection (HPLC - CAD) method for the determination of main component and impurities in Topiramate Tablets. **Methods** The chromatographic column was Waters SunFire C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile - 0.2% formic acid aqueous solution (35:65, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 35 °C, the atomization temperature was 35 °C, the filtration constant was 3.6 s, the power function value was 1.0, the collection frequency was 10 Hz, and the injection volume was 10 μL. **Results** The linear range of topiramate was 0.05 - 1.0 mg/mL ($r=0.9956$). The limit of detection and limit of

第一作者: 黄小琴, 女, 硕士, 副主任药师, 研究方向为药品检验和药品质量控制, (电子信箱)760692650@qq.com。

△通信作者: 孙枫涛, 女, 大学本科, 副主任药师, 研究方向为药品检验和药品质量控制, (电子信箱)157688612@qq.com。

±4%, ±8%。本次能力验证有23家实验室提交了照度计的校准证书, 其中20家的校准证书在有效期内, 3家在有效期外; 提交的校准证书显示的相对示值误差, 有1家超过了±8%, 根据校准结果, 该实验室拟合了照度计示值修正公式, 并对结果进行了修正。

为尽可能降低人员操作对测定结果的影响, 本次能力验证项目制订了详尽的作业指导书, 统一规范了现场测试的具体操作, 可保证照度计的受光面与测试点水平面一致, 测试人员均在确认读数稳定后开始测试; 照度测试应在光源输出趋于稳定, 并尽量避开自然采光的情况; 在能力验证实施时, 有专人维护操作环境的稳定性, 保障了能力验证样品照度的稳定性。

综上所述, 本次能力验证结果显示各参测实验室检测能力维持良好。笔试部分反映了部分实验室对标准的理解和掌握仍有欠缺, 建议检测人员加深对洁净环境检测标准的理解, 在实际检测过程中认真核查依据标准检验的执行情况; 现场实操部分反映了部分实验室未按校准周期对照度计进行计量, 建议相应机构重视仪器的校准, 持续提高技术能力。

参考文献

- [1] GB 50073—2013, 洁净厂房设计规范[S].
- [2] 曹冠朋, 曹国庆, 张彦国, 等. 国内外生物安全实验室标准体系检测要求对比[J]. 暖通空调, 2022, 52(2): 16-22.
- [3] 田霖, 杨会英, 孙会敏. 药包材洁净环境相关法规和标准的对比研究[J]. 中国药事, 2020, 34(1): 22-32.
- [4] YBB00412004-2015, 药品包装材料生产厂房洁净室(区)的测试方法[S].
- [5] JJG 245—2005, 光照度计检定规程[S].
- [6] CNAS-RL01, 实验室认可规则[S].
- [7] CNAS-RL02, 能力验证规则[S].
- [8] CNAS-GL03, 能力验证样品均匀性和稳定性评价指南[S].
- [9] GB/T 36066—2018, 洁净室及相关受控环境 检测技术分析与应用[S].
- [10] CNAS-GL02, 能力验证结果的统计处理和评价指南[S].
- [11] GB/T 28043—2019, 利用实验室间比对进行能力验证的统计方法[S].
- [12] GB 50591—2010, 洁净室施工及验收规范[S].

(收稿日期: 2023-03-30; 修回日期: 2023-09-27)

quantification were 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. The *RSDs* of precision, stability and repeatability tests were all lower than 2.0%. The average recovery rate of topiramate was 100.19% with an *RSD* of 1.19% ($n = 9$). The contents of topiramate and total impurities in three batches of samples were in the range of 97.98% to 98.96% and 0.25% to 0.31% respectively.

Conclusion The established method is simple, accurate and reliable, which can be used for the content determination of main component and impurities in Topiramate Tablets.

Key words: high - performance liquid chromatography - charged aerosol detection; topiramate; impurity; content determination; quality control

托吡酯为抗癫痫药,属 γ -氨基丁酸再摄取抑制剂^[1]。临床常用于治疗单纯部分性、复杂部分性发作和全身强直-阵挛性发作及婴儿痉挛症,也可用于预防偏头痛^[2-5]。目前,多采用高效液相色谱-示差检测器(HPLC-RID)法测定托吡酯片中主要成分的含量,但该方法存在灵敏度低,仪器平衡时间长,进样量大等缺点^[6-9]。电雾式检测器(CAD)响应值取决于进样时被检测物的绝对质量,灵敏度较好,广泛用于皂苷类、生物碱类、糖类、脂类化合物等无(或弱)紫外吸收组分的测定^[10-16]。基于此,本研究中建立了测定托吡酯片中主要成分及杂质含量的HPLC-CAD法,并与现行标准方法测定结果比较,为托吡酯片的质量控制提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

UltiMate 3000型高效液相色谱仪、Corona Veo RS型电喷雾检测器(美国Thermo Fisher Scientific公司);KH-400KDE型高功率数控超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司);XSE205DU型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司,精度为0.01 mg)。

1.2 试剂

托吡酯片(西安杨森制药有限公司,批号分别为20200826, 20200927, 20210612);托吡酯对照品(中国食品药品检定研究院,批号为101061-201902,含量99.9%);乙腈为色谱纯,盐酸(HCl)、甲酸、氢氧化钠(NaOH)、30%过氧化氢(H_2O_2)溶液均为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Waters SunFire C_{18} 柱(150 mm \times 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.2%甲酸水溶液(35:65, V/V);流速:1.0 mL/min;柱温:35 $^\circ\text{C}$;雾化温度:35 $^\circ\text{C}$;过滤常数:3.6 s;幂率:1.0;采样频率:10 Hz;进样量:10 μL 。

2.2 溶液制备

取托吡酯对照品约10 mg,精密称定,置20 mL容量瓶中,加流动相适量,超声(功率400 W、频率40 kHz,下同)使溶解,定容,摇匀,即得对照品溶液。取样品20片,精密称定,研细,称取细粉适量(约相当于托吡酯25 mg),精密称定,置50 mL容量瓶中,加流动相适量,超声使溶

解,定容,摇匀,即得供试品溶液。称取上述样品细粉适量(约相当于托吡酯250 mg),精密称定,置25 mL容量瓶中,加流动相,超声使溶解,定容,摇匀,作为杂质供试品溶液;精密量取1 mL,置500 mL容量瓶中,用流动相稀释,定容,摇匀,作为杂质自身对照溶液。以流动相作为空白对照溶液。

2.3 方法学考察

系统适用性及专属性试验:精密量取2.2项下溶液各10 μL ,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相应位置有吸收峰,杂质自身对照溶液相应吸收峰可较好反映有关物质供试品溶液中的检测成分。理论板数以托吡酯峰计大于3 500,分离度均大于1.5,拖尾因子小于1.2,且阴性对照无干扰。详见图1。

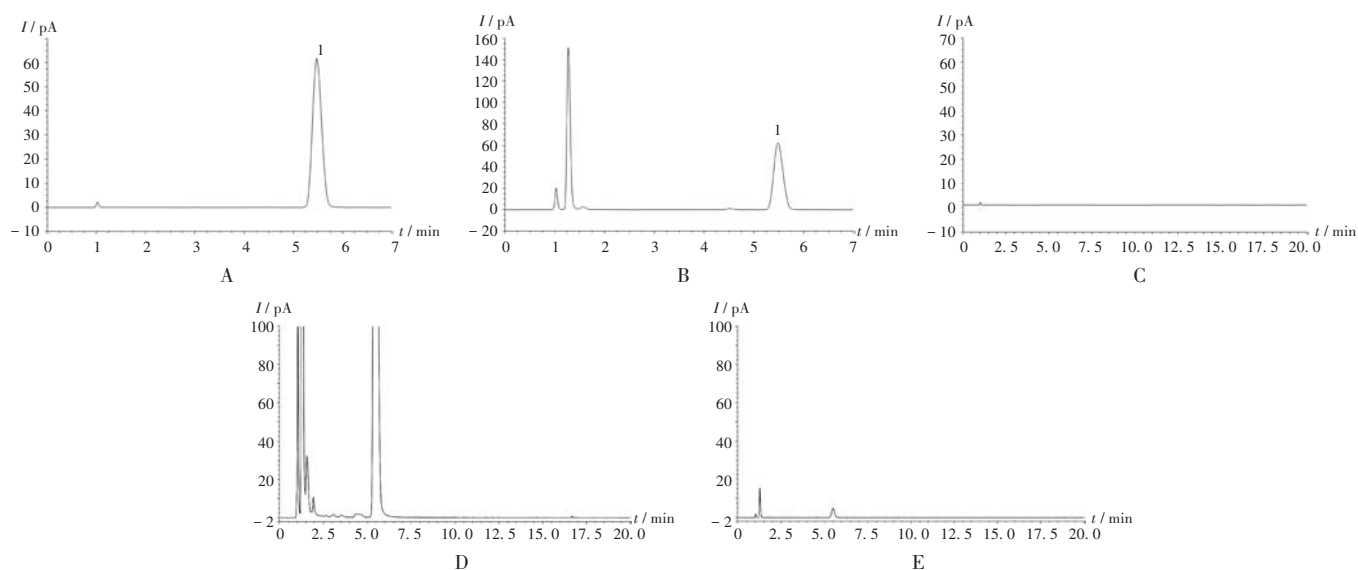
线性关系考察:称取托吡酯对照品适量,精密称定,用流动相溶解并制成含托吡酯1 mg/mL的溶液。精密量取适量,分别用流动相稀释成约含托吡酯1.0, 0.5, 0.2, 0.1, 0.05 mg/mL的系列对照品溶液。精密量取适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,以待测成分质量浓度(X , mg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 1\,247.514\,4X + 114.499\,8$ ($r = 0.995\,6$, $n = 5$)。结果表明,托吡酯质量浓度在0.05~1.0 mg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

检测限和定量限考察:取质量浓度为0.05 mg/mL的对照品溶液适量,倍比稀释,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以信噪比(S/N)约为10和3时的待测成分质量浓度为定量限和检测限,结果分别为3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

精密度试验:取2.2项下对照品溶液适量,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果的*RSD*为0.51% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取2.2项下供试品溶液适量,分别于室温下放置0, 4, 8, 12 h时按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果的*RSD*为1.01% ($n = 4$),表明供试品溶液室温放置12 h内基本稳定。

破坏性试验:取托吡酯对照品约10 mg,精密称定,共5份,分别置20 mL容量瓶中,加流动相适量,超声使溶解,分别进行以下操作。1)碱破坏,加入0.1 mol/mL



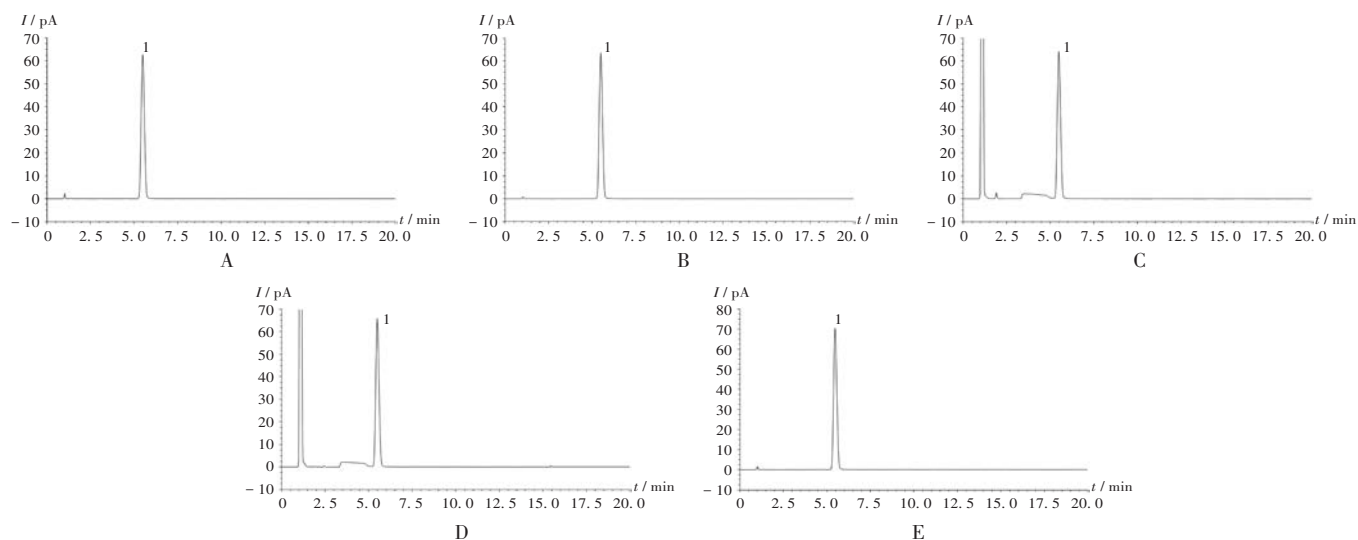
1. 托吡酯
A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 空白对照溶液 D. 杂质供试品溶液 E. 杂质自身对照溶液

图1 高效液相色谱图

1. Topiramate

A. Reference solution B. Test solution C. Blank reference solution D. Test solution of impurities E. Self - reference solution of impurities

Fig. 1 HPLC chromatograms



1. 托吡酯
A. 氧化破坏 B. 高温破坏 C. 酸破坏 D. 碱破坏 E. 光照破坏

图2 破坏性试验高效液相色谱图

1. Topiramate

A. Oxidative damage B. High - temperature damage C. Acid damage D. Alkali damage E. Light damage

Fig. 2 HPLC chromatograms of damage test

NaOH 1 mL, 室温放置 4 h, 用 0.1 mol / mL HCl 1 mL 中和, 用流动相稀释, 定容, 摇匀。2) 酸破坏, 加入 0.1 mol / mL HCl 1 mL, 室温放置 4 h, 用 0.1 mol / mL NaOH 1 mL 中和, 用流动相稀释, 定容, 摇匀。3) 氧化破坏, 加入 30% H₂O₂ 溶液 1 mL, 室温放置 4 h, 用流动相定容, 摇匀。4) 光照破坏, 4 500 lx 照度下光照 4 h, 用流动相定容, 摇匀。5) 高温破坏, 取托吡酯对照品置烘箱中 105 °C 加热 4 h 后, 加流动相适量使溶解, 定容, 摇匀。精密量取各

破坏试验溶液 10 μL, 分别按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。各破坏试验下产生的杂质峰均能与待测成分色谱峰达到有效分离, 对测定无影响。详见图 2。

重复性试验: 取样品 (批号为 20200826) 细粉适量, 共 6 份, 精密称定, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果托吡酯的平均含量为 98.42%, RSD 为 0.85% (n = 6)。

加样回收试验:取已知含量的样品(批号为20200826)细粉适量(约相当于托吡酯12.5 mg),共9份,分别置50 mL容量瓶中,再分别按比例精密加入相当于托吡酯含量80%,100%,120%的托吡酯对照品,再分别按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收试验结果(n=9)

Tab.1 Results of the recovery test (n=9)

样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	\bar{X} (%)	RSD(%)
12.52	10.05	22.56	99.90		
11.86	10.12	22.06	100.79		
12.89	10.03	22.75	98.31		
12.43	12.62	25.06	100.08		
12.39	12.35	24.93	101.54	100.19	1.19
13.05	12.87	26.02	100.78		
12.86	15.13	27.85	99.07		
12.88	15.09	27.86	99.27		
12.57	14.92	27.78	101.94		

2.4 样品及杂质含量测定

取3批样品各适量,按2.2项下方法制备供试品溶液和有关物质供试品溶液,各2份,按2.1项下色谱条件进样测定,按外标法计算托吡酯含量,同时将测定结果与原国家食品药品监督管理局国家药品标准收载的HPLC-RID法进行比较,结果见表2。按自身对照法计算杂质供试品溶液含量,结果见表3。

表2 样品含量测定结果(% , n = 2)

Tab.2 Results of content determination of topiramate in samples (% , n = 2)

批号	HPLC-CAD法	HPLC-RID法	P
20200826	98.42	97.58	> 0.05
20200927	97.98	97.26	> 0.05
20210612	98.96	98.29	> 0.05

表3 杂质含量测定结果(% , n = 2)

Tab.3 Results of content determination of impurities (% , n = 2)

批号	单个最大杂质	杂质总量
20200826	0.16	0.25
20200927	0.15	0.27
20210612	0.17	0.31

3 讨论

3.1 流动相选择

预试验中考察了乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸水溶液、乙腈-0.2%甲酸水溶液和乙腈-0.1%三乙胺水溶液4个流动相系统,发现托吡酯在酸性系统中响应值最大,在水中其次,在碱性系统中最小,故选择乙腈-甲酸水溶液系统,根据响应值、基线等情况,最终选择乙腈-0.2%甲酸水溶液作为流动相。

3.2 CAD参数的选择

预试验中分别考察了雾化温度为55℃和35℃对检测响应值的影响,结果表明,检测灵敏度会随着雾化温度的提高而降低,故最终选择35℃。幂率是CAD所特有的线性校正参数,不同的化合物具有不同的最优幂率。分别考察了不同幂率(0.9,1.0,1.1)对线性的影响,结果发现,随着幂率的增大,r也不断增大,但响应值不断降低,综合考虑线性和响应值的影响,最终选择幂率为1.0。

3.3 方法评价

本研究中建立的HPLC-CAD法操作简便,灵敏度高,结果准确可靠,适用性强,可用于托吡酯片的质量控制。

参考文献

- [1] 郑亚丽,张鹏,傅正闯,等.托吡酯治疗儿童青少年躁狂症的疗效和安全性[J].医药导报,2019,38(5):580-583.
- [2] 金杰.托吡酯片在人体内的药物动力学及生物等效性研究[J].中南药学,2013,11(3):166-169.
- [3] 孙小龙.探究小儿智力糖浆治疗儿童短暂性抽动障碍的临床效果[J].中国实用医药,2023,18(6):114-116.
- [4] 李思燃,武晓昱,黄昊,等.微栓子及托吡酯对偏头痛患者运动皮层兴奋性及头痛严重程度的影响[J].癫痫与神经电生理学杂志,2023,32(1):19-24.
- [5] 刘柳芳,蔡卓毅.关于托吡酯治疗癫痫的安全性评价分析[J].黑龙江医药,2022,35(4):872-874.
- [6] 孙伟,丛晓丽,李一鸣,等.托吡酯片降解产物的HPLC法测定研究[J].亚太传统医药,2012,8(9):53-54.
- [7] 王俊秋,余立,王成刚.托吡酯片质量标准的研究[J].中国药品标准,2005,6(5):51-53.
- [8] 冯金元.间接紫外检测离子色谱法测定托吡酯片的无机降解产物[J].中国药业,2012,21(14):53-55.
- [9] 马英华,赵宜乐,秦亚彬,等.HPLC-ESI-MS/MS同时测定癫痫患儿血浆中丙戊酸、苯巴比妥和托吡酯的药物浓度[J].中国现代应用药学,2023,40(2):232-237.
- [10] 刘立洋,刘肖.一种新型的通用型检测器:电喷雾检测器[J].现代科学仪器,2011,6(5):141-145.
- [11] 李心怡,将运斌,马愉英.电喷雾检测器在药物HPLC分析中的优势及应用进展[J].中国药房,2017,28(15):2152-2156.
- [12] 施磊,马宇佳,金燕.电雾式检测器的应用进展[J].国际药学研究杂志,2020,47(7):514-521.
- [13] 刘沅汐,王莹,金红宇,等.中药分析中电雾式检测器应用现状[J].中国药业,2022,31(6):128-132.
- [14] 赵慧.HPLC-CAD法测定阿卡波糖胶囊含量[J].药物分析杂志,2020,40(5):910-915.
- [15] 赵慧,王董云,吴珺.甘露醇及其制剂中甘露醇的高效液相色谱-电雾式检测器分析研究[J].中国药业,2022,31(11):79-82.
- [16] 白钢钢,袁斐,叶慧,等.HPLC-CAD法测定4种银杏叶制剂中萜类内酯类成分的含量[J].药物分析杂志,2019,39(6):1102-1107.

(收稿日期:2023-03-23;修回日期:2023-06-07)