

GC 测定丙戊酸钠缓释片的有关物质

陈爽, 楼永军(浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310052)

摘要: 目的 建立毛细管气相色谱法检测丙戊酸钠缓释片有关物质的方法。方法 采用聚乙二醇为固定液的 HP-FFAP 色谱柱(30 m×0.53 mm, 1 μm), 柱温为程序升温; 氮气为载气, 流速为 10 mL·min⁻¹; 直接进样 1.0 μL, 进样口温度 200 ℃; 采用氢火焰离子化检测器, 检测器温度 250 ℃。结果 建立的方法专属性强, 能有效分离丙戊酸钠缓释片中的 10 个杂质; 丙戊酸在 1.01~8.06 μg·mL⁻¹ 内线性关系良好($r=0.998\ 2$, $n=5$), 最低检出限为 0.403 μg·mL⁻¹。方法重复性良好, 各杂质加样回收率均>90%, 且 RSD 均<5%。结论 该方法可用于丙戊酸钠缓释片的有关物质检测。

关键词: 丙戊酸钠缓释片; 有关物质检测; 气相色谱法

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2018)07-0998-03

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.07.011

引用本文: 陈爽, 楼永军. GC 测定丙戊酸钠缓释片的有关物质[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(7): 998-1000.

Determination of Related Substances in Compound Sodium Valproate and Valproic Acid SR Tablets by GC

CHEN Shuang, LOU Yongjun(Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a capillary gas chromatography(GC) method for determination of related substances in Compound Sodium Valproate and Valproic Acid SR tablets. **METHODS** The CGC column was PEG-20M(HP-FFAP, 30 m×0.53 mm, 1 μm), temperature programming. N₂ as carrier gas (flow rate: 10 mL·min⁻¹). The temperature of the injection port was maintained at 200 ℃, and that of the flame-ionization detector(FID) was 250 ℃. The injection volume was 1.0 μL. **RESULTS** The method was specific. Valproic acid had a good linear relationship in the range of 1.01–8.06 μg·mL⁻¹ ($r=0.998\ 2$, $n=5$) and the lowest limit of detection was 0.403 μg·mL⁻¹. The relative recovery was >90%, and the RSD was <5%. **CONCLUSION** The method can be used for the determination of related substances in Compound Sodium Valproate and Valproic Acid SR tablets.

KEY WORDS: Compound Sodium Valproate and Valproic Acid SR tablets; detection of related substances; GC

丙戊酸钠为一线广谱抗癫痫药, 丙戊酸钠缓释片为丙戊酸钠(333 mg)和丙戊酸(145 mg, 相当于丙戊酸钠 167 mg)组成的缓释片, 现行质量标准有进口注册标准 JX20020200 及国家药品标准 WS1-(X-224)-2004Z。丙戊酸钠分子结构中没有能产生紫外光谱吸收的结构, 因而用一般的 HPLC 难以直接测定。现行标准均未进行丙戊酸钠有关物质控制, 也未见有关物质相关的分析文献。本研究旨在建立一种能有效分离并检出丙戊酸钠缓释片相关的 10 个有关物质的方法, 以满足丙戊酸钠缓释片的有关物质控制要求。

1 仪器与试剂

Agilent 6890N 气相色谱仪(美国 Agilent); CP 225D 十万分之一天平(德国赛多利斯)。

丙戊酸(赛诺菲制药, 批号: M00038; 含量: 100.7%); 丙戊酸钠缓释片(批号分别为 R001, R002, R003)、丙戊酸钠空白辅料均来自赛诺菲(杭州)制药有限公司有限公司; 4-庚酮(Sigma-Aldrich

公司, 批号: STBD3506V; 含量: 98%); 3-庚酮(Sigma, 批号: MKBB7956; 含量: 98.3%); 3-乙基-2 庚酮(Chempartners, 批号: SP-0012225-004; 含量: 100.0%); 杂质 A(正戊酸, Chempartners, 批号: 419-45A; 含量: 99.2%); 杂质 G(2,2-dipropylpentanamide, LGC, 批号: 790; 含量: 99.96%); 杂质 J(2,2-dipropylpentanenitrile, LGC, 批号: 751.10.09.03; 含量: 96.9%); 杂质 I(2-propylpentanenitrile, LGC, 批号: 751.09.09.01; 含量: 99.7%); 杂质 B[(2RS)-2-ethylpentanoic Acid, LGC, 批号: 751.02.09.02; 含量: 99.8%]; 杂质 F(2-propyltanamide, LGC, 批号: 787; 含量: 99.9%); 杂质 K[(2RS)-2-ethyl-2-methylpentanoic acid, EP, 批号: V50001-KM-03; 含量: 99.8%]; 乙腈为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 HP-FFAP 毛细管柱(30 m×0.53 mm,

作者简介: 陈爽, 女, 硕士, 主管药师 Tel: 13777839947 E-mail: 43773768@qq.com

1 μm), PEG-20M 为固定液, 柱温采用程序升温, 起始温度为 60 $^{\circ}\text{C}$, 维持 5 min, 以 5 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速率升温至 160 $^{\circ}\text{C}$, 再以 2 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速率升温至 200 $^{\circ}\text{C}$, 维持 15 min; 载气为氮气, 流速为 10 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 氢火焰离子化检测器, 检测器温度为 250 $^{\circ}\text{C}$; 直接进样 1 μL , 进样口温度为 200 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.2 溶液配制

2.2.1 混标溶液 用乙腈制成每 1 mL 含 4-庚酮、3-庚酮、3-乙基-2 庚酮、杂质 A、杂质 G、杂质 J、杂质 I、杂质 B、杂质 F、杂质 K 各 5 μg 和丙戊酸 1.5 mg 的溶液, 作为系统适用性试验溶液。

2.2.2 供试品溶液 取本品细粉约 0.76 g, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加乙腈适量, 超声振摇 15 min, 放冷, 用乙腈稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.2.3 对照品溶液 精密称取 4-庚酮、3-庚酮、3-乙基-2 庚酮与丙戊酸适量, 用乙腈定量稀释制成每 1 mL 中各含 5 μg 的混合溶液, 作为对照品溶液。

2.2.4 加标供试品溶液 取本品细粉约 0.76 g, 精密称定, 置于 100 mL 量瓶中, 加对照品溶液适量, 超声振摇 15 min, 放冷, 用对照品溶液稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为加标供试品溶液。

2.3 方法专属性试验

2.3.1 空白溶剂及空白辅料考察 取空白辅料 0.27 g, 置 100 mL 量瓶, 加乙腈适量超声, 放冷, 加乙腈定容, 摇匀, 过滤, 取续滤液作为空白辅料溶液; 取乙腈作为空白溶剂, 精密量取上述 2 种溶液各 1 μL , 分别注入气相色谱仪, 记录色谱图, 见图 1。

2.3.2 分离度试验 取混标溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定, 丙戊酸与相邻杂质峰及各杂质峰之间的分离度均应符合规定。实测结果显示, 丙戊酸及其 10 个有关杂质分离度良好, 系统适用性色谱图见表 1 和图 1。

2.4 线性关系考察

以对照品溶液浓度为 100%, 精密称取丙戊酸及各杂质, 用乙腈溶解并稀释制成 25%, 50%, 100%, 150%, 200% 线性系列溶液, 依法检测, 记录色谱图。以峰面积为纵坐标(y), 质量浓度为横坐标(x, $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 得线性方程, 丙戊酸、4-庚酮、3-庚酮、3-乙基-2 庚酮在上述范围内线性关系良好。结果见表 2。

表 1 各杂质峰之间分离度结果

Tab. 1 The resolution of each impurity peak

峰号	色谱峰	分离度	峰号	色谱峰	分离度
2	4-庚酮	/	8	杂质 B	16.12
3	3-庚酮	5.02	9	杂质 K	8.19
4	3-乙基-2 庚酮	19.77	1	丙戊酸	3.38
5	杂质 I	10.74	10	杂质 F	27.08
6	杂质 J	26.41	11	杂质 G	11.86
7	杂质 A	36.04			

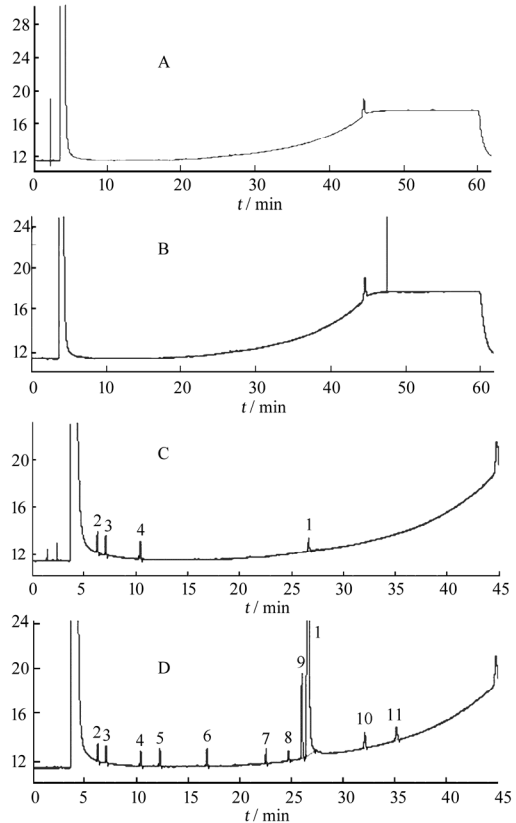


图 1 专属性色谱图

A-空白溶剂; B-空白辅料溶液; C-对照品溶液; D-混标溶液; 1-丙戊酸; 2-4-庚酮; 3-3-庚酮; 4-3-乙基-2 庚酮; 5-杂质 I; 6-杂质 J; 7-杂质 A; 8-杂质 B; 9-杂质 K; 10-杂质 F; 11-杂质 G。

Fig. 1 Chromatogram of system suitability test

A-blank; B-excipients solution; C-standard solution; D-mixture standards solution; 1-valproic acid; 2-4-heptanone; 3-3-heptanone; 4-3-ethylheptan-2-one; 5-impurity I; 6-impurity J; 7-impurity A; 8-impurity B; 9-impurity K; 10-impurity F; 11-impurity G.

表 2 回归方程与线性范围的考察

Tab. 2 Regression equations and calibration range

名称	线性方程	r	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
丙戊酸	$y=2.033\ 9x+0.317\ 3$	0.998 2	1.01~8.06
4-庚酮	$y=2.664\ 5x-0.032\ 7$	0.999 6	0.99~7.92
3-庚酮	$y=2.655\ 7x-0.020\ 6$	0.999 5	1.00~7.90
3-乙基-2 庚酮	$y=2.429\ 1x+0.040\ 7$	0.999 5	1.03~8.26

2.5 定量限与检出限试验

取对照品溶液, 逐步稀释后进样测试, 以信噪比约为 3:1 时相应质量浓度为检测限浓度计算, 丙戊酸、4-庚酮、3-庚酮、3-乙基-2 庚酮的检出限分别为 0.403, 0.396, 0.395, 0.413 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;

以信噪比约为 10:1 时相应质量浓度为定量限浓度计算, 上述 4 个化合物定量限分别为 1.001, 0.990, 0.988, 1.032 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.6 精密度、重复性试验

取“2.2”项下对照品溶液连续进样 6 次, 记录峰面积, 各 RSD 为 3.65%~5.44%, 表明仪器精密度良好。按“2.2.4”项下方法配制 6 份加标供试品溶液, 进样测定, 各杂质加样回收率 RSD 为 1.28%~3.47%, 表明方法重复性良好。

2.7 回收率试验

分别称取辅料约 0.26 g, 9 份, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 分别加 4-庚酮、3-庚酮、3-乙基-2 庚酮与丙戊酸钠各适量, 精密称定, 分别用乙腈定量稀释制成每 1 mL 中各含 2.5, 5, 7.5 μg 的混合溶液各 3 份, 依法测定, 记录色谱图。按外标法以峰面积计算回收率, 结果表明本方法回收率良好。结果见表 3。

表 3 已知杂质回收率结果

Tab. 3 Results of recovery of impurities	%			
	最大	最小	平均回收率	RSD
丙戊酸	99.97	93.83	96.5	4.88
4-庚酮	97.71	91.84	95.7	1.82
3-庚酮	98.02	94.57	96.0	1.15
3-乙基-2 庚酮	98.92	94.35	96.5	1.62

2.8 稳定性试验

取“2.2”项下加标供试品溶液在室温下放置, 于室温放置 0, 4, 8, 16, 20 h 进样测定, 记录峰面积。结果表明, 在室温条件下, 20 h 内各杂质峰面积基本一致, 未新增其他未知杂质, 说明丙戊酸钠有关物质在室温条件下 20 h 内稳定。

2.9 样品检测

取 3 批丙戊酸钠缓释片, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 进样测定; 另制备对照品溶液, 进样测定。批号分别为 R001, R002, R003 的 3 批样品中均未检出 4-庚酮、3-庚酮及 3-乙基-2 庚酮, 杂质总量均 $<0.03\%$, 其中最大单杂均为 0.01%。

3 讨论

3.1 杂质谱分析

丙戊酸钠缓释片中可能存在的已知杂质有合成丙戊酸钠的起始原料、中间体、副产物正戊酸、(2RS)-2-ethylpentanoic acid、2-propyltanamide、2,2-dipropylpentanamide、2-propylpentanenitrile、2,2-dipropylpentanenitrile、(2RS)-2-ethyl-2-methylpentanoic acid 以及降解杂质 4-庚酮、3-庚酮、3-乙基-2 庚酮。丙戊酸及丙戊酸钠为非常稳定的化学物质, 主要

降解杂质有 4-庚酮、3-庚酮及 3-乙基-2 庚酮, 因此本品的有关物质控制主要关注降解杂质, 分析方法的建立同时考虑潜在杂质的检出率。由于丙戊酸钠分子结构中没有能产生紫外光谱吸收的结构, 其相关杂质也没有特征的紫外吸收官能团, 因此用一般的 HPLC 难于直接测定。综合分析丙戊酸及其相关杂质的理化性质, 发现均为可挥发物质, 因此本研究选用气相色谱法尝试建立一种能有效分离上述所有潜在杂质的分析方法。

3.2 色谱条件的选择及优化

本方法以丙戊酸及其 10 个有关杂质为检测对象建立色谱条件, 研究筛选了 4 种不同色谱柱, 考察了氦气、氮气等不同载气, 并优化了程序升温条件, 最终确定了适用于丙戊酸钠缓释片有关物质检测的分析方法。由于有关物质的检测灵敏度要求, 选用直接进样方式。

3.3 系统适用性试验要求的确定

在试验的过程中, 发现杂质 K 与丙戊酸分离情况不太理想, 尝试了调整升温程序最终实现有效分离。由于在日常检测中, 丙戊酸的有关杂质对照品获取不易, 故配制杂质 K 和丙戊酸的混合对照品溶液作为系统适用性试验溶液, 规定两者之间的分离度应符合规定。

本研究采用毛细管气相色谱法检测丙戊酸钠缓释片有关物质, 实现丙戊酸钠缓释片潜在 10 个杂质的有效分离及检出, 经方法学验证, 该方法适用于丙戊酸钠缓释片的有关物质测定。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 二部[S]. 2015: 132-133.
- [2] WS1-(X-224)-2004Z, Drug Standards Promulgated by the SFDA. (国家药品标准)[S]. 2004.
- [3] JX20020200(进口注册标准)[S]. 2002.
- [4] TANG F P, WANG W J, LI Y F. Simultaneous determination of the concentrations of valproate and topiramate in human plasma by GC method [J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2010, 30(8): 674-675.
- [5] JIN Z Z, LIN C H, CHEN S. Determination of sodium valproate in serum by gas chromatography [J]. J Cent South Univ(Med Sci)(中南大学学报: 医学版), 2004, 29(5): 614-616.
- [6] YANG L L, YIN X H, et al. Pre-column derivatization and RP-HPLC determination of sodium valproate in plasma and analysis of monitoring results [J]. J Pediatric Pharm(儿科学杂志), 2012, 18(1): 27-30.
- [7] CUI Y M, SUN P H, LIU Y W, et al. Concentration determination of sodium valproate in human serum by HPLC-fluorescence detection method [J]. China Pharm(中国药房), 2005, 16(4): 286-287.

收稿日期: 2017-10-16

(本文责编: 曹粤锋)