

# 改进HPLC法同时测定注射用替卡西林钠克拉维酸钾中两种主成分的含量

王茉莉<sup>1,2\*</sup>, 张菁<sup>1</sup>, 张少萌<sup>1</sup>, 张兰桐<sup>2#</sup>(1.河北省药品检验研究院, 石家庄 050011; 2.河北医科大学药学院, 石家庄 050017)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)06-0835-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.06.31

**摘要** 目的:改进测定注射用替卡西林钠克拉维酸钾中两种主成分含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为 Waters XBridge™ C<sub>18</sub>, 流动相为 0.01 mol/L 磷酸氢二铵溶液(用磷酸调节 pH 至 7.0)-甲醇(80:20, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 220 nm, 柱温为 30 ℃, 进样量为 20 μL。结果:替卡西林和克拉维酸的检测质量浓度线性范围分别为 1.95~195.22、0.12~12.18 μg/mL( $r=0.999\ 9$ ); 精密度、稳定性(4 ℃下放置)、重复性试验的 RSD<1.0%; 替卡西林和克拉维酸的加样回收率分别为 99.3%~100.5%、99.2%~101.0%, RSD 分别为 0.4%、0.7%( $n=9$ )。结论:该方法简便快速、准确可靠,可用于注射用替卡西林钠克拉维酸钾中两种主成分含量的同时测定。

**关键词** 高效液相色谱法; 替卡西林; 克拉维酸; 注射用替卡西林钠克拉维酸钾; 含量测定

## Simultaneous Determination of 2 Main Components in Ticarcillin Disodium and Potassium Clavulanate for Injection by Improved HPLC

WANG Moli<sup>1,2</sup>, ZHANG Jing<sup>1</sup>, ZHANG Shaomeng<sup>1</sup>, ZHANG Lantong<sup>2</sup>(1.Hebei Institute for Drug Control, Shijiazhuang 050011, China; 2.School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To improve the method for the determination of 2 main components in Ticarcillin disodium and potassium clavulanate for injection. METHODS: HPLC was performed on the column of Waters XBridge™ C<sub>18</sub> with mobile phase of 0.01 mol/L ammonium dibasic phosphate solution (pH 7.0)-menthol (80:20, V/V) at a flow rate of 1.0 mL/min, the detection wavelength was 220 nm, column temperature was 30 ℃, and injection volume was 20 μL. RESULTS: The linear range was 1.95-195.22 μg/mL for ticarcillin ( $r=0.999\ 9$ ) and 0.12-12.18 μg/mL for clavulanate ( $r=0.999\ 9$ ); RSDs of precision, stability (under 4 ℃) and reproducibility tests were lower than 1.0%; recoveries were 99.3%-100.5% (RSD=0.4%,  $n=9$ ) and 99.2%-101.0% (RSD=0.7%,  $n=9$ ). CONCLUSIONS: The method is rapid, accurate and reliable, and can be used for the determination of 2 main components in Ticarcillin disodium and potassium clavulanate for injection.

**KEYWORDS** HPLC; Ticarcillin; Clavulanate; Ticarcillin disodium and potassium clavulanate for injection; Content determination

注射用替卡西林钠克拉维酸钾为复方制剂,替卡西林钠与克拉维酸钾之比为 15:1。该制剂是由葛兰素史克公司最早研制成功(商品名:泰门汀),于 1986 年在美国首次上市。该制剂中的替卡西林是一种 β-内酰胺类抗生素,克拉维酸是一种不可逆性强力 β-内酰胺酶抑制剂,后者能与 β-内酰胺酶结合,发挥竞争性抑制作用,从而保护了前者不被酶水解灭活,得以充分发挥其抗菌活性。该制剂具有广谱抗菌作用,适合于治疗各种类型的细菌感染性疾病。为了有效控制注射用替卡西林钠克拉维酸钾的质量,笔者前期参考相关国内文献<sup>[1-8]</sup>及 2011 年版《英国药典》<sup>[9]</sup>、《欧洲药典》(7.0 版)<sup>[10]</sup>中替卡西林钠的测定方法,优化色谱系统,建立了以高效液相色谱法(HPLC)测定该制剂中有关物质的方法<sup>[11]</sup>;本研究中笔

者进一步改进了以 HPLC 法同时测定该制剂中两种主成分含量的方法。

### 1 材料

#### 1.1 仪器

戴安 UltiMate3000 型 HPLC 仪,包括紫外检测器和二极管阵列检测器(美国 Thermo 公司);XS205 型电子天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司)。

#### 1.2 药品及试剂

替卡西林、克拉维酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:130569-200902、130429-201307,纯度分别为 84.0%、95.0%);注射用替卡西林钠克拉维酸钾(A 厂,批号:110401、110501,规格:含替卡西林 1.5 g 和克拉维酸 0.1 g、含替卡西林 3.0 g 和克拉维酸 0.2 g;B 厂,批号:20090301、20090601、20110402,规格:含替卡西林 3.0 g 和克拉维酸 0.2 g;C 厂,批号:1104001、1104002、1006002,规格:含替卡西林 3.0 g 和克拉维酸 0.2 g;D 厂,

\* 副主任药师,博士研究生。研究方向:药品质量控制及体内药物分析。电话:0311-85212008-8029。E-mail:moliwang\_003@163.com

# 通信作者:教授,博士生导师。研究方向:药品质量标准及体内药物分析。电话:0311-86266419。E-mail:zhanglantong@263.net

批号:110401、110402,规格:含替卡西林1.5 g和克拉维酸0.1 g);甲醇为色谱纯,磷酸氢二铵、磷酸为分析纯,水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Waters XBridge™ C<sub>18</sub>柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:0.01 mol/L磷酸氢二铵溶液(用磷酸调节pH至7.0)-甲醇(80:20, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:220 nm;柱温:30 ℃;进样量:20 μL。

### 2.2 溶液的制备

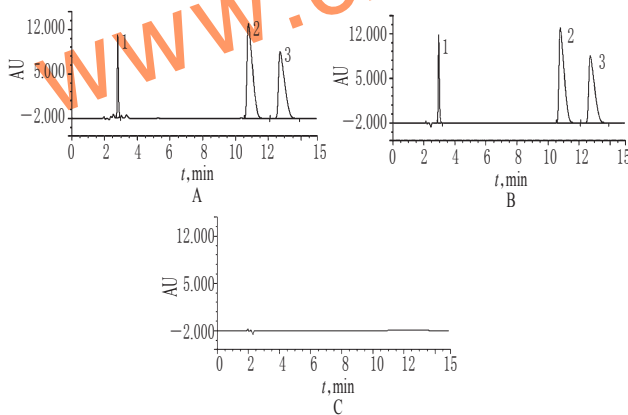
2.2.1 混合对照品溶液 精密称取替卡西林对照品和克拉维酸对照品各适量,加水溶解并稀释制成每1 mL中含替卡西林1.95 mg、克拉维酸0.12 mg的混合溶液,作为混合对照品贮备液。精密吸取混合对照品贮备液5 mL,置于100 mL量瓶中,加水定容,制成每1 mL中含替卡西林0.097 5 mg、克拉维酸0.006 mg的混合溶液,作为混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取“装量差异”项下的本品内容物适量,混合均匀,精密称定,加水溶解并稀释制成每1 mL中含替卡西林0.097 5 mg、克拉维酸0.006 mg的溶液,作为供试品溶液。

2.2.3 阴性对照溶液 以溶剂水作为阴性对照溶液。

### 2.3 系统适用性试验

取“2.2”项下3种溶液各适量,分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可见,在该色谱条件下,替卡西林两异构体峰之间的分离度符合要求,替卡西林、克拉维酸与相邻杂质峰之间的分离度均符合要求(均>1.5),理论板数以替卡西林和克拉维酸峰计均不低于3 000,阴性对照对主成分测定无干扰。



A. 供试品溶液; B. 混合对照品溶液; C. 阴性对照溶液; 1. 克拉维酸; 2、3. 替卡西林

A. test sample solution; B. mixed reference substance solution; C. negative control solution; 1. clavulanate; 2, 3. ticarcillin

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

### 2.4 线性关系考察

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品贮备液0.1、0.5、1、5、10 mL,分别置于100 mL量瓶中,加水稀释并定容,制

成替卡西林质量浓度分别为1.95、9.76、19.52、97.61、195.22 μg/mL和克拉维酸质量浓度分别为0.12、0.61、1.21、6.09、12.18 μg/mL的系列对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样,记录峰面积。以待测成分质量浓度(x, μg/mL)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得替卡西林回归方程为 $y=15\ 139x+0.696$ ( $r=0.999\ 9$ ),克拉维酸回归方程为 $y=22.206x-1.197$ ( $r=0.999\ 9$ )。结果表明,替卡西林和克拉维酸的检测质量浓度线性范围分别为1.95~195.22、0.12~12.18 μg/mL。

### 2.5 精密度试验

精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,替卡西林峰面积的RSD=0.13%( $n=6$ ),克拉维酸峰面积的RSD=0.46%( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。

### 2.6 稳定性试验

取同一供试品溶液(批号:110401, A厂)适量,分为2份,一份在4 ℃冰箱中保存,一份在室温(20 ℃)下放置,分别于0、1、2、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,在4 ℃冰箱中保存的供试品溶液在12 h内替卡西林、克拉维酸峰面积的RSD分别为0.4%、0.6%( $n=6$ );在室温下放置的供试品溶液在2 h内替卡西林、克拉维酸峰面积基本无变化,而在12 h内替卡西林、克拉维酸峰面积的RSD分别为2.0%、1.8%( $n=6$ )。可见,供试品溶液室温放置的稳定性稍差,故建议测定时应临用新制并于配制后2 h内进样测定,或将HPLC仪的样品室温度调至4 ℃进行检测。

### 2.7 重复性试验

精密称取同一批样品(批号:110401, A厂)适量,共6份,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算含量。结果,替卡西林平均含量为85.7%,RSD=0.20%( $n=6$ ),克拉维酸平均含量为5.4%,RSD=0.58%( $n=6$ ),表明本方法重复性较好。

### 2.8 加样回收率试验

精密称取已知含量的样品(批号:110401, A厂,替卡西林含量为85.67%,克拉维酸含量为5.40%)约0.1 g,共9份,每份约相当于含替卡西林90 mg、克拉维酸6 mg,每3份分别精密加入低、中、高不同质量的替卡西林和克拉维酸对照品各适量,分别置于100 mL量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取5.0 mL,置于50 mL量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液按“2.1”项下色谱条件进样测定并计算加样回收率,结果见表1。

### 2.9 样品含量测定

取10批样品和对照品各适量,分别按“2.2”项下方法制备供试品溶液和对照品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,依外标法以峰面积计算样品中两种主成分的含量,结果见表2。

表1 加样回收率试验结果( $n=9$ )Tab 1 Results of recovery tests( $n=9$ )

待测成分	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
替卡西林	90.64	72.35	162.49	99.3	99.8	0.4
	90.38	72.35	162.66	99.9		
	90.12	72.35	162.18	99.6		
	90.81	90.44	180.69	99.4		
	90.98	90.44	181.24	99.8		
	91.07	90.44	181.58	100.1		
	90.38	108.53	198.88	100.0		
	90.72	108.53	199.76	100.5		
	90.64	108.53	198.98	99.8		
克拉维酸	5.71	4.71	10.39	99.3	99.8	0.7
	5.70	4.71	10.37	99.2		
	5.68	4.71	10.44	101.0		
	5.72	5.89	11.57	99.3		
	5.73	5.89	11.60	99.6		
	5.74	5.89	11.66	100.5		
	5.70	7.07	12.72	99.3		
	5.72	7.07	12.76	99.6		
	5.71	7.07	12.82	100.5		

表2 样品含量测定结果( $n=3$ , %)Tab 2 Determination results of samples( $n=3$ , %)

生产厂家	批号	含量	
		替卡西林	克拉维酸
A1	110501	85.7	5.3
A2	110401	85.5	5.4
B1	20090301	89.0	5.4
B2	20090601	88.7	5.3
B3	20110402	89.4	5.4
C1	1104001	88.0	5.1
C2	1104002	87.6	5.3
C3	1006002	87.7	5.2
D1	110401	86.0	5.8
D2	110402	86.3	5.6

### 3 讨论

#### 3.1 色谱条件的优化

笔者曾尝试磷酸盐缓冲液-乙腈的色谱系统,发现替卡西林两异构体峰之间的分离效果不及磷酸盐缓冲液-甲醇色谱系统。同时,替卡西林在碱性条件下易发生聚合,克拉维酸在碱性条件下稳定性差,故将流动相的pH控制在8.0以下;考虑到色谱柱的耐受性,本试验将其流动相中缓冲液的pH值定为7.0。经试验发现,在此色谱条件下,替卡西林和克拉维酸的色谱峰峰形对称,替卡西林两异构体峰的分离效果良好,并可以使两主成分在20 min之内全部洗脱完毕,且系统适用性好,准确度高。

#### 3.2 检测波长的选择

利用二极管阵列检测器在190~400 nm波长范围内进行全波长扫描,替卡西林两异构体的峰纯度均>980,说明主峰峰纯度高,主峰与相邻杂质峰完全分离;并且,替卡西林与克拉维酸均在220 nm波长处有较强吸收,故最终确定检测波长为220 nm。

#### 3.3 含量测定结果的比较

通过本方法检测出替卡西林为双峰,分别为替卡西林的R、S异构体,且分离度符合要求。采用外标法以两个异构体峰面积之和来计算替卡西林的含量,测定结果发现,4个厂家样品的色谱图中替卡西林的双峰高低并不相同,也就是说替卡西林中的R、S异构体比例各不相同。厂家A与D的色谱图基本一致,替卡西林R与S比例为1:1;厂家B与C的色谱图基本一致,替卡西林R与S比例为85:15。虽然4个厂家的样品替卡西林含量接近,但是替卡西林R、S异构体的生物活性和药理毒性的差异仍有待进一步探究。

#### 3.4 本研究的价值

目前,国内注射用替卡西林钠克拉维酸钾尚无统一质量标准,各厂家质量标准中含量测定方法各不相同,其产品质量也参差不齐。而本研究所建立的方法简便快速、准确可靠、灵敏度高、重复性好,可作为一种注射用替卡西林钠克拉维酸钾中两种主成分含量同时测定的有效方法,用于该制剂的质量控制。

#### 参考文献

- [1] 欧贝丽,姜立群,章宇,等. $\beta$ -内酰胺类抗生素药物的杂质分析及其质量研究[J].分析实验室,2007,26(10):166-167.
- [2] 蒋煜,张哲峰,王虹. $\beta$ -内酰胺类抗生素异构体杂质研究和质控进展[J].中国抗生素杂志,2010,35(8):561-566.
- [3] 代丽萍,胡林.HPLC法测定磺苄西林钠中的有关物质[J].中国抗生素杂志,2008,33(4):212-222.
- [4] 陈汝红.梯度洗脱HPLC法测定苄星青霉素中的有关物质[J].中国抗生素杂志,2012,37(3):223-226.
- [5] 王明娟,王晨,王立新,等.青霉素V钾及其有关物质分析方法的比较[J].药物分析杂志,2008,28(9):1515-1520.
- [6] 刘艳辉,苑华,高燕霞.高效液相色谱法同时测定替卡西林钠的含量及其有关物质[J].中国药业,2006,15(10):22-23.
- [7] 张冠柱,李京喜.HPLC法测定替卡西林钠的含量及有关物质[J].齐鲁药事,2005,24(2):95-96.
- [8] 周晓溪,郭景文,郑台,等.国产注射用氨苄西林钠杂质谱与其生产工艺的相关性研究[J].药物分析杂志,2013,33(3):486-489.
- [9] British Pharmacopoeia Commission. *British Pharmacopoeia*:2011[S],2010:2095-2097.
- [10] European Pharmacopoeia Commission. *European Pharmacopoeia*:7.0[S],2010:3091-3092.
- [11] 王茉莉,张兰桐,张菁,等.HPLC测定替卡西林钠及注射用替卡西林钠克拉维酸钾中的有关物质[J].中国现代应用药学,2016,33(12):1553-1557.

(收稿日期:2016-03-01 修回日期:2017-01-12)

(编辑:周 箐)