

HPLC法测定替卡西林钠克拉维酸钾 (15:1)中的高分子杂质*

钟雅妮, 刘俊华, 林小洁, 李小婵

(珠海联邦制药股份有限公司中山分公司, 中山 528467)

摘要 目的: 建立测定替卡西林钠克拉维酸钾 (15:1) 中高分子杂质的 HPLC 分析方法。方法: 采用高效液相色谱法, 以 TSK G2500 PW_{XL} (7.8 mm × 300 mm, 7 μm) 为色谱柱, 以 pH 8.0 磷酸盐缓冲液 [0.15 mol/L 磷酸氢二钠溶液 - 0.15 mol/L 磷酸二氢钠溶液 (95:5)] 为流动相, 流速 0.8 mL · min⁻¹, 检测波长 230 nm, 柱温 30 °C。结果: 高分子杂质与替卡西林及克拉维酸能较好分离; 替卡西林的检测限为 4.0 ng, 克拉维酸的检测限为 3.7 ng, 替卡西林线性范围为 0.052~0.32 μg ($r=0.9999$), 高分子杂质在进样量以替卡西林计为 11.2~30.3 μg 范围内时, 与峰面积线性关系良好 ($r=0.9992$); 重复性较好 (RSD = 0.52%, $n=5$)。结论: 该方法简单、快速、准确, 重复性好, 可用于替卡西林钠克拉维酸钾 (15:1) 中的高分子杂质检测。

关键词: 替卡西林钠; 克拉维酸钾; 高分子杂质; 高效液相色谱法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)05-0871-04

HPLC determination of high molecular mass impurities in ticarcillin disodium and clavulanate potassium (15:1)*

ZHONG Ya-ni, LIU Jun-hua, LIN Xiao-jie, LI Xiao-chen

(Zhongshan Dosage of The United Laboratories Co. Ltd., Zhongshan 528467, China)

Abstract Objective To establish an HPLC method for the determination of high molecular mass impurities in ticarcillin disodium and clavulanate potassium (15:1). **Methods** The separation was performed on a TSK G2500 PW_{XL} (7.8 mm × 300 mm, 7 μm) column. The mobile phase was composed of phosphate buffer [0.15 mol/L disodium hydrogen phosphate solution - 0.15 mol/L sodium dihydrogen phosphate solution (95:5), pH 8.0] at a flow rate of 0.8 mL · min⁻¹; The detection wavelength was 230 nm, and the column temperature was 30 °C. **Results** High molecular mass impurities in ticarcillin disodium and clavulanate potassium (15:1) was separated completely between ticarcillin and clavulanate. The detection limit of ticarcillin was 4.0 ng. The detection limit of clavulanate was 3.7 ng. The linearity of ticarcillin was 0.052~0.32 μg ($r=0.9999$); The peak area of high molecular mass impurities showed good linearity in the range of ticarcillin between 11.2~30.3 μg ($r=0.9992$). RSD was 0.52% ($n=5$). **Conclusion** The method is simple, rapid, accurate and reproducible, and it can be used for quality control of ticarcillin disodium and clavulanate potassium (15:1).

Key words ticarcillin disodium; clavulanate potassium; high molecular mass impurities; HPLC

β-内酰胺类抗生素在临床应用中的过敏性休克反应严重危害到病人的生命安全, β-内酰胺类抗生素本身为半抗原, 通常不能直接引起过敏反应, 而药物中存在的高分子杂质才是过敏原。因此, 控制该类药物中的高分子杂质的含量, 是减少由抗生素引起的过敏反应的关键^[1]。β-内酰胺类抗生素易被 β-内酰胺酶破坏而失活, 与 β-内酰胺酶抑制剂

(克拉维酸钾和舒巴坦钠)联合使用, 可保护 β-内酰胺类抗生素不受 β-内酰胺酶的破坏, 使其最低抑菌浓度明显下降, 而且可使产酶菌株对药物的敏感性恢复。目前国内主要采用 Sephadex G10 凝胶色谱系统测定 β-内酰胺类抗生素中高分子杂质, 但在该系统下, β-内酰胺酶抑制剂的出峰位置与高分子杂质相同, 干扰 β-内酰胺类抗生素复方制剂

* 2009年粤港关键领域重点突破项目 (TC09B863-4)

第一作者: Tel: 13538096400; E-mail: zhongyan@126.com

中高分子杂质的测定。本试验利用 TSK G2500 PW_{XL} 凝胶系统实现了对替卡西林钠克拉维酸钾 (15:1) 中高分子杂质的分离测定。

1 仪器与试剂

日本岛津 LC-10A_{vp} 型高效液相色谱仪 (SP-DA-M10A_{vp} 型光电二极管阵列检测器), Class-VP 色谱工作站。

替卡西林钠克拉维酸钾 (15:1) 样品, 由珠海联邦制药股份有限公司生产, 批号为 393904001, 060201, 060202, 060203, 替卡西林钠原料, 珠海联邦制药股份有限公司生产, 批号 352708004, 克拉维酸钾原料, 珠海联邦制药股份有限公司生产, 批号 356903015, 注射用替卡西林钠克拉维酸钾市售品 (特美汀), 由葛兰素史克必成公司生产, 批号 166746, 对照品替卡西林 (批号 130569-200601, 含量 76.8%) 和克拉维酸 (批号 130429-200704, 含量 94.4%) 购自中国药品生物制品检定所。

2 试验方法

2.1 色谱条件与系统适用性试验 采用 TSK G2500 PW_{XL} (7.8 mm × 300 mm, 7 μm) 色谱柱, 以 pH 8.0 磷酸盐缓冲液 [0.15 mol·L⁻¹ 磷酸氢二钠溶液 - 0.15 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钠溶液 (95:5)] 为流动相, 流速 0.8 mL·min⁻¹, 检测波长 230 nm, 柱温 30 °C。供试品溶液的色谱图中, 主峰前的杂质峰与主峰之间的分离度应符合要求。

2.2 测定法 取本品适量, 精密称定, 加流动相溶解并稀释制成每 1 mL 中含替卡西林 1 mg 的溶液, 作为供试品溶液 (临用新制); 另取替卡西林对照品适量, 精密称定, 加流动相溶解并稀释制成每 1 mL 中含 10 μg 的溶液, 作为对照品溶液。精密量取供试品溶液与对照品溶液各 20 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图。按外标法以峰面积计算主峰前的高分子杂质总量。

2.3 检测波长及溶媒的选择 通过紫外扫描, 本品中高分子杂质及主成分均在 230 nm 波长处有较大的吸收, 故采用 230 nm 为检测波长。以水为溶媒时, 溶剂峰干扰样品测定, 选择流动相作为溶媒时, 对样品测定无干扰。

3 方法学验证

3.1 专属性试验 分别采用 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸、0.1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液、1% 双氧水溶液、60 °C 高温及照度为 (4500 ± 500) lx 强光下放置 10 d 等强制破坏试验考察本品高分子杂质与主峰的分离情况, 结果供试品经破坏后, 高分子杂质均有增加, 其

中经碱破坏及氧化破坏后高分子杂质增加尤为明显。结果表明, 高分子杂质峰与主峰有效分离, 本色谱系统专属性良好。见图 1 图 2。

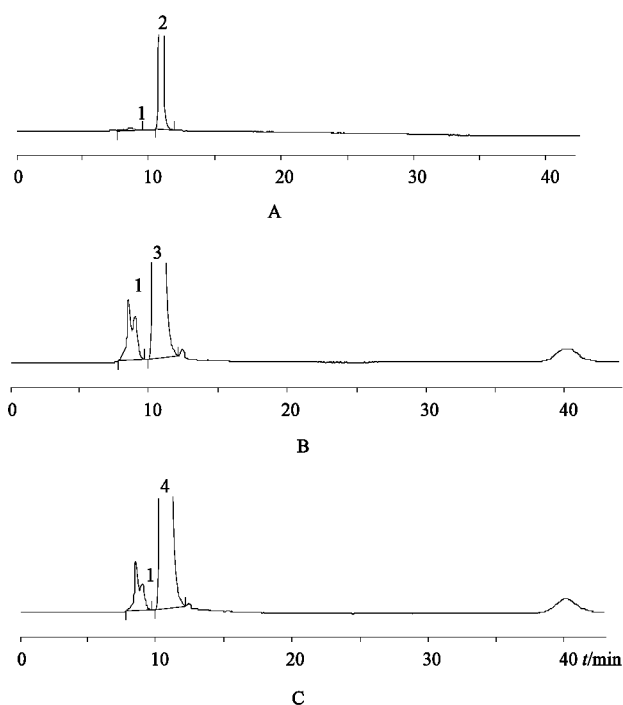


图 1 TSK G2500 PW_{XL} 凝胶系统对克拉维酸钾 (A)、替卡西林钠 (B) 及替卡西林钠克拉维酸钾 (15:1) (C) 中高分子杂质的分离

Fig 1 Separation of high molecular mass impurities in clavulanate potassium (A), ticarcillin disodium (B), ticarcillin disodium and clavulanate potassium (15:1) (C) on TSK G2500 PW_{XL} gel filtration chromatography

1. 高分子杂质 (high molecular mass impurities) 2. 克拉维酸 (clavulanate) 3. 替卡西林 (ticarcillin) 4. 替卡西林克拉维酸 (ticarcillin and clavulanate)

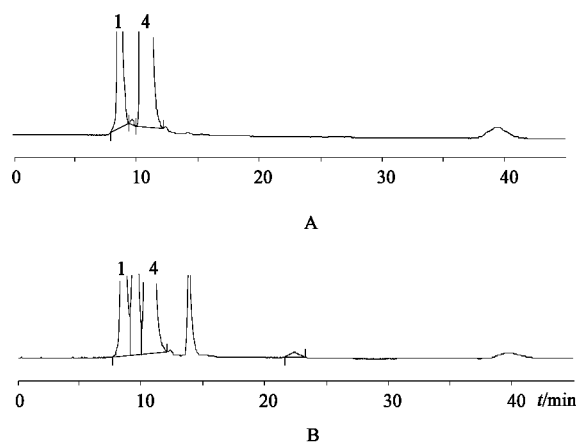


图 2 碱及氧化破坏后替卡西林钠克拉维酸钾 (15:1) 中高分子杂质的分离

Fig 2 Separation of high molecular mass impurities in ticarcillin disodium and clavulanate potassium (15:1) destroyed by alkali and oxidation

A. 碱破坏 (destroyed by alkali) B. 氧化破坏 (destroyed by oxidation) 1. 高分子杂质 (high molecular mass impurities) 4. 替卡西林克拉维酸 (ticarcillin and clavulanate)

3.2 供试品溶液浓度与杂质测定结果相关性试验 取供试品 (批号 393904001) 适量, 分别制成每 1 mL 约含替卡西林 0.5、1.0、1.5 mg 的溶液, 精密量取 20 μ L 注入液相色谱仪, 结果供试品进样量 (以替卡西林计) 在 11.2~30.3 mg 范围内, 与相应的高分子杂质峰面积呈良好的相关性, 线性方程为: $Y = 1.706 \times 10^7 X + 8.182 \times 10^3$ $r = 0.9992$

3.3 进样精密度试验 取替卡西林对照品溶液 (10 μ g $\cdot$ mL⁻¹) 连续进样 5 次, 计算主峰面积的 RSD 为 0.52%, 结果表明进样精密度良好。

3.4 线性试验 取替卡西林对照品溶液 (10 μ g $\cdot$ mL⁻¹), 分别精密量取 5、10、16、20、24、30 μ L 注入液相色谱仪, 将测得峰面积与进样量作线性回归, 结果线性方程为:

$$Y = 1.214 \times 10^6 X - 2.710 \times 10^3 \quad r = 0.9999$$

3.5 检测限测定 取替卡西林对照品溶液, 逐步稀释, 至色谱图中主峰的峰高约为基线噪音的 3 倍, 计算得替卡西林检测限为 4.0 ng 另取克拉维酸对照品, 同法测得克拉维酸的检测限为 3.7 ng

3.6 重复性试验 取供试品 (批号 393904001) 适量, 依法平行测定 5 次并计算测定结果的 RSD, 结果高分子杂质含量分别为 1.10%、1.06%、1.07%、1.10%、1.07%, 均值为 1.08%, RSD 为 1.7%, 表明测定方法的重复性良好。

3.7 溶液稳定性试验 取供试品溶液, 在室温条件下放置, 并分别于 0、1、2、4、6、8 h 取样测定, 结果表明, 在室温条件下, 供试品溶液中高分子杂质随放置时间延长增加幅度明显, 1 h 后高分子杂质峰面积增加了 23.21%, 故供试品溶液应临用新制。

4 样品测定

取本公司生产的 4 批替卡西林钠克拉维酸钾 (15:1) 及 1 批市售品 (特美汀), 分别采用 TSK G2500 PW_{XL} 及 Sephadex G10 凝胶色谱系统测定, 结果见表 1。

表 1 2 种方法高分子杂质测定结果比较

Tab 1 Comparison of two high molecular mass in purities determination

批号 (Lot No.)	高分子杂质 (high molecular mass impurities) %		长期留样 (月) [study of long term (month)]
	TSK G2500 PW _{XL}	Sephadex G10	
393904001	1.08	0.20	4
060201	3.22	0.98	42
060202	3.14	0.60	42
060203	3.28	0.99	42
166746	4.41	1.14	54

5 讨论

5.1 流动相的选择 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 9.0 以下。以不同浓度的磷酸盐缓冲液 (pH 8.0) 作为流动相: A. 磷酸盐缓冲液 (pH 8.0) [0.1 mol $\cdot$ L⁻¹ 磷酸氢二钠溶液 - 0.1 mol $\cdot$ L⁻¹ 磷酸二氢钠溶液 (95:5)]; B. 磷酸盐缓冲液 (pH 8.0) [0.15 mol $\cdot$ L⁻¹ 磷酸氢二钠溶液 - 0.15 mol $\cdot$ L⁻¹ 磷酸二氢钠溶液 (95:5)]; C. 磷酸盐缓冲液 (pH 8.0) [0.2 mol $\cdot$ L⁻¹ 磷酸氢二钠溶液 - 0.2 mol $\cdot$ L⁻¹ 磷酸二氢钠溶液 (95:5)]。考察高分子杂质峰与主峰的分离情况, 结果见表 2、图 3。结果表明, 在一定范围内, 流动相的离子强度越高, 则主峰出峰时间越晚, 高分子杂质峰与主峰的分离越好。在保证有效分离的前提下, 选择离子强度相对较低的磷酸盐缓冲液体系 B 作为流动相。

表 2 不同浓度流动相对测定结果的影响

Tab 2 Results of measurement in the mobile phase with different concentrations

流动相 (mobile phase)	主峰保留时间 (retention time of main peak) /min	分离度 (separation)	理论板数 (theoretical plates)	拖尾因子 (tailing factor)
A	9.87	1.85	3119	1.63
B	10.57	3.12	3450	1.34
C	11.35	3.31	3620	1.31

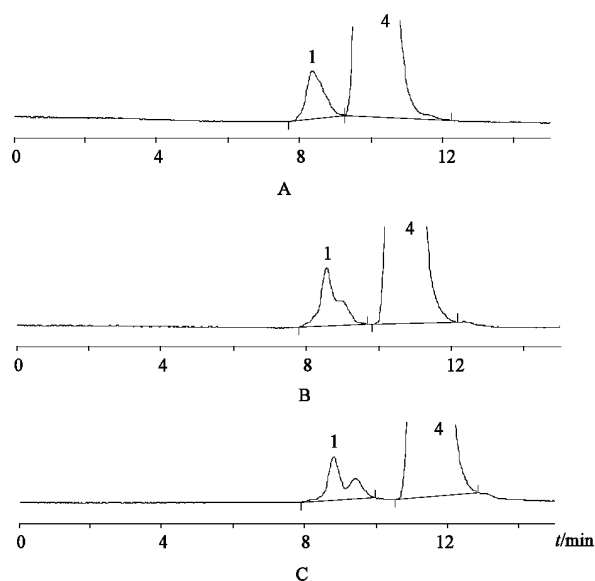


图 3 替卡西林钠克拉维酸钾 (15:1) 中高分子杂质在 A、B、C 3 种流动相体系下的分离

Fig 3 Separation of high molecular mass impurities in ticarcillin disodium and clavulanate potassium (15:1) in different mobile phase (A, B, C). 1. 高分子杂质 (high molecular mass impurities) 4 替卡西林克拉维酸 (ticarcillin and clavulanate)

5.2 2种凝胶色谱系统的比较 采用 Sephadex G10凝胶色谱系统, 检测波长 254 nm, 以 pH 8.0 磷酸盐缓冲液为流动相 A, 以水为流动相 B 测定替卡西林钠、克拉维酸钾和替卡西林钠克拉维酸钾 (15:1) 的高分子杂质。结果替卡西林高分子杂质与克拉维酸出峰时间重合 (均为 14~16 min), 干扰高分子杂质的测定, 见图 4。β-内酰胺类抗生素高分子

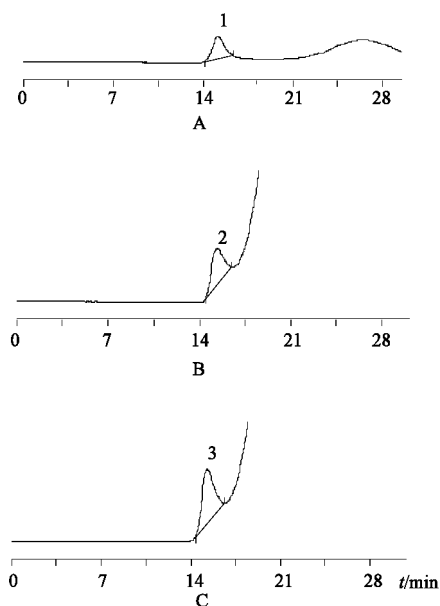


图 4 Sephadex G10凝胶色谱系统对克拉维酸钾 (A)、替卡西林钠 (B) 及替卡西林钠克拉维酸钾 (15:1) (C) 中高分子杂质的分离

Fig 4 Separation of high molecular mass impurities in clavulanate potassium (A), ticarcillin disodium (B), ticarcillin disodium and clavulanate potassium (15:1) (C) on Sephadex G10 gel filtration chromatography
1 克拉维酸 (clavulanate) 2 高分子杂质 (high molecular mass impurities) 3 克拉维酸及高分子杂质 (clavulanate and high molecular mass impurities)

杂质具有高度不均一性和不确定性, 高分子杂质本身不稳定, 对照品不易制得, 故采用自身对照外标法对其定量。因自身对照与高分子杂质之间的校正因子无法测得, 故不同测定法的测定值有所差异。同时由于高分子杂质在 230 nm 波长处的吸收值强于 254 nm, TSK G2500 PW_{XL}凝胶系统采用 230 nm 为检测波长, 故高分子杂质的检出量高于 Sephadex G10凝胶色谱系统。从表 1 可见, 同批次样品在 2 种凝胶色谱系统下高分子杂质测得量虽然不同, 但趋势一致。试验结果表明, Sephadex G10凝胶色谱系统在柱效、专属性、分离效果、重现性等方面不如 TSK G2500 PW_{XL}凝胶系统。

5.3 结论 采用 TSK G2500 PW_{XL}凝胶系统测定替卡西林钠克拉维酸钾 (15:1) 中的高分子杂质, 可排除克拉维酸钾的干扰。经方法学验证表明, 本法专属性、相关性、重现性良好, 操作简单、快速, 测定结果准确, 可用于替卡西林钠克拉维酸钾 (15:1) 中的高分子杂质检测。

参考文献

- 1 HU Chang-qin (胡昌勤). Developments on analysis of polymers of β-lactam antibiotics (β-内酰胺抗生素聚合物分析技术展望). *Chin J New Drugs* (中国新药杂志), 2008, 17(24): 2098
- 2 ChP (中国药典). 2005. Vol III (二部): Appendix (附录) 35
- 3 XIA Ming (夏鸣), HANG Tai-jun (杭太俊), LIXiao-min (李小明), *et al* A review on the test methods for high-molecular weight polymer impurities in β-lactam antibiotics (β-内酰胺类抗生素中高分子聚合物杂质检查方法的研究综述). *Prog Pharm Sci* (药学进展), 2007, 31(11): 501

(本文于 2010 年 6 月 7 日收到)