

UPLC 测定注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠

矫筱蔓 赵晓冬 王全一

(辽宁省食品药品检验所 沈阳 110023)

摘要 目的: 建立超高效液相色谱检测注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠含量及有关物质的方法。方法: 采用 ACQUITY UPLC HSS C₁₈ 色谱柱, 以 0.1% 磷酸水溶液和乙腈为流动相进行梯度洗脱, 流速 0.45 mL · min⁻¹, 检测波长为 220 nm, 柱温为 30 ℃。结果: 头孢哌酮与舒巴坦在 20 ~ 150 μg · mL⁻¹ 范围内 $r \geq 0.9998$, 各杂质均呈良好的线性关系; 头孢哌酮平均回收率为 99.9%, RSD 为 0.40%; 舒巴坦平均回收率为 99.5%, RSD 为 0.36%; 重复性、专属性、供试品溶液稳定性良好, 各组分之间互相无干扰。结论: 该方法专属性强、灵敏度高、准确性好, 可以作为注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠含量测定及有关物质检查的有效方法。

关键词: 头孢哌酮钠; 舒巴坦钠; 超高效液相色谱法; 含量; 有关物质

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254 - 1793 (2011) 03 - 0504 - 05

Study on UPLC determination of cefoperazone sodium and sulbactam sodium for injection

JIAO Xiao - man ZHAO Xiao - dong WANG Quan - yi ,

(The Institute for Food and Drug Control of Liaoning Province, Shenyang 110023, China)

Abstract Objective: To develop a UPLC method for determination the contents and related substances of cefoperazone sodium and sulbactam sodium for injection. **Methods:** Using ACQUITY UPLC HSS C₁₈ (2 mm × 100 mm, 1.8 μm), the mobile phase was 0.1% phosphoric acid and acetonitrile at a gradient with a flow rate of 0.45 mL · min⁻¹ and detection wavelength was 220 nm, column temperature was 30 ℃. **Results:** The linear ranges of cefoperazone and sulbactam were 20 - 150 μg · mL⁻¹ ($r \geq 0.9998$) respectively, and the related substances were good linear relationship. The average recovery of cefoperazone was 99.9% with RSD of 0.41%, and sulbactam was 99.5% with RSD of 0.37%; This method had fine repeatability, specificity, good stability of the test solution, no interference among the components was appearance. **Conclusion:** The HPLC method is good in the aspect of selectivity, sensitivity and veracity, can be used to detect the contents and impurities of cefoperazone sodium and sulbactam sodium for injection.

Key words: cefoperazone sodium; sulbactam sodium; UPLC; content; related Substances

注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠是药典^[1] 收载的具有普遍应用的抗生素品种, 但其检测方法存在平衡时间长、杂质分析效果不理想的问题。UPLC 分析较普通的液相色谱分析^[2] 具有快速、高效、高分辨的特点。参考文献中的 HPLC 测定头孢哌酮钠舒巴坦钠的改进方法^[3, 4] 结合 UPLC 技术, 本文尝试利用 UPLC 技术, 实现注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠含量测定与有关物质同时分析, 减少实验成本, 提高工作效率。同时, 随着现代仪器分析技术的不断提

高, 希望能够通过本文的研究, 开拓新技术在药物分析方面的应用。

1 仪器与试剂

仪器: Waters ACQUITY UPLC 色谱系统、Waters 2695 色谱系统、Agilent 1100 色谱系统

试剂: 舒巴坦对照品 (sulbactam, CP - 45899, 080345 - QCS - 2), 头孢哌酮对照品 (cefoperazone dihydrate, 050254 - QCS - 25, 050254 - QCS - 27), 杂质 T1551F 对照品 (CP - 52639 T1551F, E212 -

35QCS-23) 杂质 T1551B 对照品(03149-QCS-16) 杂质 T1551E Na 对照品(02273-QCS-9) 由辉瑞制药有限公司(中国-大连)提供;注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠(市售;规格:1.0 g;批号:85839749, 95839145, 95839153);乙腈(色谱纯,美国 TIDEA, 批号 811903);磷酸(分析纯,国药集团化学试剂有限公司,批号 20060813);四丁基氢氧化铵水溶液(10%)(分析纯,国药集团化学试剂有限公司,批号 20080715);双蒸水(自制)

2 实验方法

2.1 超高效液相色谱系统 泵: Binary Solvent Manager; 自动进样器: Sample Manager; 检测器: TUV Detector; 检测波长: 220 nm; 检测方式: 吸光度-MBF; 柱温: 30 °C; 色谱柱: ACQUITY UPLC HSS C₁₈ (2 mm × 100 mm, 1.8 μm); 流动相: A-0.1% 磷酸水溶液, B-乙腈, 梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序表

Tab 1 Gradient program table

时间(time)	流量(flow)	A - B	曲线(curve)
/mL · min ⁻¹			
初始(begin)	0.450	96.0:4.0	初始(begin)
3.00	0.450	88.5:11.5	6
5.00	0.450	87.0:13.0	6
7.00	0.450	78.0:22.0	6
10.00	0.450	96.0:4.0	11

2.2 高效液相系统 参见中国药典 2005 年版二部 786 页。

2.3 溶液的制备

含量测定对照品溶液: 称取头孢哌酮对照品约 55 mg 和舒巴坦对照品约 51 mg 置 100 mL 量瓶中, 加乙腈 5 mL 混匀, 加水适量使溶解, 加水稀释至刻度, 摇匀。精取 5 mL 置 25 mL 量瓶中, 加 5% 乙腈水溶液稀释至刻度, 摇匀。

杂质 T1551F 溶液: 称取杂质 T1551F 对照品约 10 mg 置 100 mL 量瓶中, 加乙腈 5 mL 溶解后, 加水稀释至刻度, 摇匀。

杂质 T1551B 溶液: 称取杂质 T1551B 对照品约 12 mg 置 100 mL 量瓶中, 加乙腈 5 mL 溶解后, 加水稀释至刻度, 摇匀。

杂质 T1551E Na 溶液: 称取杂质 T1551E Na 对照品约 12 mg 置 100 mL 量瓶中, 加乙腈 5 mL 溶解后, 加水稀释至刻度, 摇匀。

系统适用性对照品溶液: 称取头孢哌酮对照品约 55 mg 和舒巴坦对照品约 51 mg 置 100 mL 量瓶中, 加乙腈 5 mL 混匀, 加水适量使溶解, 加杂质 T1551F、T1551B 和 T1551E Na 溶液 5, 10, 5 mL, 加水稀释至刻度, 摇匀。精取 5 mL 置 25 mL 量瓶中, 加 5% 乙腈水溶液稀释至刻度, 摇匀。

供试品溶液: 称取装量差异项下的内容物适量, 相当于含头孢哌酮和舒巴坦各 50 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加乙腈 5 mL 混匀后, 加水适量溶解并稀释至刻度, 摇匀。精取 5 mL 置 25 mL 量瓶中加 5% 乙腈水溶液稀释至刻度, 摇匀。

3 实验结果

3.1 干扰实验 空白溶剂测定: 采用 5% 乙腈水溶液 5 μL 进样, 记色谱图, 在 0.3 min 出现溶剂峰, 在 7.5 min、9.6 min 和 10.8 min 出现梯度切换峰。分别对舒巴坦钠、头孢哌酮钠以及 3 种杂质对照分别进样, 相互之间无干扰。均能与溶剂峰和梯度切换峰分离, 混合对照中各组分均能得到较好的分离, 见图 1。

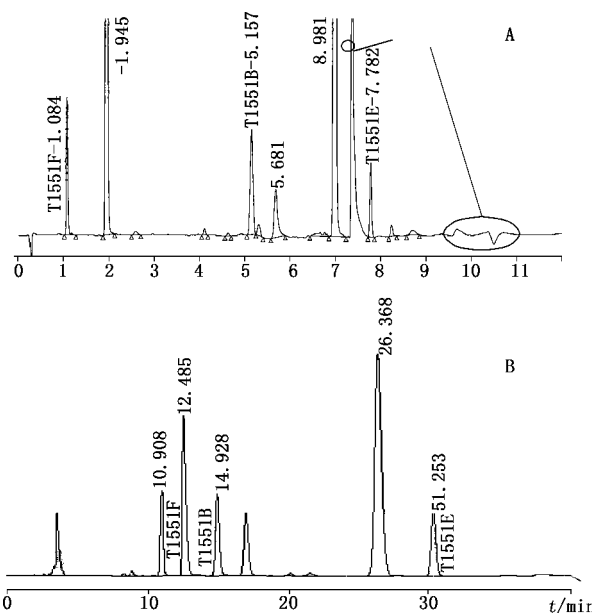


图 1 系统适用性混合对照品 UPLC 色谱图 (A) 与 HPLC 色谱图 (B)
Fig 1 System suitability mixed reference standard chromatograms on UPLC (A) and HPLC (B)

3.2 精密度试验 取系统适用性对照品溶液, 按上述色谱条件试验, 连续进样 6 次, T1551F、舒巴坦、T1551B、头孢哌酮、T1551E Na 的 RSD 分别为: 1.0% 0.71% 0.86% 0.87% 1.5%。

3.3 头孢哌酮回收率与舒巴坦回收率 以 100 μg · mL⁻¹ 浓度为 100%, 称取头孢哌酮对照品适量, 相当于 80%, 100%, 120%, 置量瓶中, 加入舒

巴坦原料溶液适量,加5%乙腈水溶液溶解稀释至刻度摇匀,作为供试溶液。按上述色谱条件试验,计算头孢哌酮回收率。由于该产品由2种原料药直接混合而成,以头孢哌酮原料溶液为辅料,称取舒巴坦

对照品适量,相当于80%、100%、120%,同上操作,计算舒巴坦的回收率。头孢哌酮的平均回收率为99.9%,RSD为0.40%;舒巴坦平均回收率为99.5%,RSD为0.36%(表2)

表2 头孢哌酮和舒巴坦回收率试验结果

Tab 2 The recovery results of cefoperazone and sulbactam

头孢哌酮(cefoperazone)					舒巴坦(sulbatam)			
测试点 (test point)	取样量 (sample weight) /mg	平均峰面积 (average peak area)	测得量 (test weight) /mg	回收率 (recovery) /%	取样量 (sample weight) /mg	平均峰面积 (average peak area)	测得量 (test weight) /mg	回收率 (recovery) /%
80%	8.38	1517554	8.38	100.0	8.28	251241	8.29	100.1
	8.78	1594395	8.80	100.2	8.17	247260	8.16	99.9
	8.11	1471152	8.12	100.1	8.21	247752	8.18	99.6
100%	11.21	2039071	11.26	100.4	10.03	301916	9.96	99.3
	11.18	2027140	11.19	100.1	10.14	304269	10.04	99.0
	11.04	2002131	11.06	100.2	10.27	310425	10.24	99.7
120%	13.13	2365508	13.06	99.5	11.99	359866	11.88	99.1
	12.95	2331221	12.87	99.4	11.92	359587	11.87	99.6
	12.82	2306310	12.74	99.4	11.83	356965	11.78	99.6

3.4 线性 取系统适用性对照品溶液,分别进样1, 2, 3, 4, 5, 6, 17.5 μL ,做系列标准曲线,结果:杂质T1551F、T1551B、T1551E Na、舒巴坦、头孢哌酮的线性方程分别为:

$$Y = 3.245 \times 10^4 - 214.5 \quad r = 0.99993$$

$$Y = 1.729 \times 10^4 - 781.9 \quad r = 0.9998$$

$$Y = 1.538 \times 10^4 - 70.91 \quad r = 0.9999$$

$$Y = 1.933 \times 10^4 - 9.631 \times 10^3 \quad r = 0.9998$$

$$Y = 1.933 \times 10^4 - 9.631 \times 10^3 \quad r = 0.9998$$

杂质T1551F、T1551B、T1551E Na、舒巴坦、头孢哌酮的线性分别在0.1996 ~ 1.497 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、0.44 ~ 3.3 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、0.26 ~ 1.95 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、20.29 ~ 152.18 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、20.66 ~ 154.95 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内。

3.5 专属性试验 取供试品适量,经酸、碱、氧化、光照和加热破坏后,按上述色谱条件试验,记录保留时间至主峰保留时间的3倍,各杂质峰均能够与主峰较好分离,在10 min之后无杂质峰出现。

3.6 检出限

杂质T1551F: 称取杂质T1551F对照品0.00998 g,置100 mL量瓶中,加乙腈5 mL混匀后,加水适量溶解并稀释至刻度,摇匀。用5%乙腈水溶

液逐步进行稀释,至杂质T1551F色谱峰为基线噪音的3倍,计算检出限为0.2994 ng。

杂质T1551E Na: 称取杂质T1551E Na对照品0.01300 g,置100 mL量瓶中,加乙腈5 mL混匀后,加水适量溶解并稀释至刻度,摇匀。用5%乙腈水溶液逐步进行稀释,至杂质T1551E Na色谱峰为基线噪音的3倍,计算检出限为1.3 ng。

杂质T1551B: 称取杂质T1551B对照品0.01160 g,置100 mL量瓶中,加乙腈5 mL混匀后,加水适量溶解并稀释至刻度,摇匀。用5%乙腈水溶液逐步进行稀释,至杂质T1551B色谱峰为基线噪音的3倍,计算检出限为1.10 ng。

舒巴坦: 称取舒巴坦对照品0.00998 g,置100 mL量瓶中,加乙腈5 mL混匀后,加水适量溶解并稀释至刻度,摇匀。用5%乙腈水溶液逐步进行稀释,至舒巴坦色谱峰为基线噪音的3倍,计算检出限为1.99 ng。

头孢哌酮: 称取头孢哌酮对照品0.00991 g,置100 mL量瓶中,加乙腈5 mL混匀后,加水适量溶解并稀释至刻度,摇匀。用5%乙腈水溶液逐步进行稀释,至头孢哌酮色谱峰为基线噪音的3倍,计算检出

限为 0.695 ng。

3.7 定量限 按照检出限计算所得结果对杂质对照品溶液、舒巴坦和头孢哌酮对照品溶液进行适当稀释,记录色谱图,使各色谱峰为基线噪音的 10 倍,计算定量限分别为:杂质 T1551F 0.998 ng; 杂质 T1551E Na 2.6 ng; 杂质 T1551B 2.32 ng; 舒巴坦 6.22 ng; 头孢哌酮 2.31 ng。

3.8 重复性 取批号为 95839145 的供试品,称取 6 份,按上述色谱条件进行试验,测得头孢哌酮的 6 次平均含量为 102.6%, RSD = 0.32%; 舒巴坦 6 次平均含

量为 100.7%, RSD = 0.64%。该方法重复性良好。

3.9 供试品溶液稳定性 取批号为 85839749 的供试品 1 份,分别在 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 测定,随放置时间延长头孢哌酮含量呈下降趋势,杂质总和增加。建议供试品应临用新制,在 6 h 内使用。

4 供试品测定

取供试品 3 批,分别按照上述色谱条件及药典色谱条件进行检测,分别计算含量和有关物质,结果见表 3、表 4。

表 3 3 批供试品含量测定结果(%)

Tab 3 The content results of samples

批号(lot No.)	UPLC 法(UPLC method)		药典法(ChP method)	
	舒巴坦(sulbatam)	头孢哌酮(cefoperazone)	舒巴坦(sulbatam)	头孢哌酮(cefoperazone)
95839145	101.5	100.4	101.2	100.3
95839143	100.9	102.0	100.6	102.1
85839749	106.3	101.2	106.5	101.4

表 4 3 批供试品有关物质检查结果(%)

Tab 4 The related substance results of samples

批号 (lot No.)	UPLC 方法(UPLC method)				药典方法(ChP method)			
	T1551 F	T1551 B	T1551 E Na	总杂质(total impurities)	T1551 F	T1551 B	T1551 E Na	总杂质(total impurities)
95839145	0.31	0.38	0.08	2.85	0.39	0.36	0.09	1.45
95839143	0.36	0.46	0.10	3.00	0.36	0.43	0.11	1.66
85839749	0.41	0.38	0.07	3.04	0.4	0.37	0.08	1.71

3 批供试品结果均在限度范围内。由数据可见,采用 UPLC 法可以分离出更多的未知杂质。

5 讨论

5.1 流动相的选择 药典中头孢哌酮钠舒巴坦钠的测定方法使用了离子对试剂配制流动相,考虑到离子对色谱法对于色谱柱的平衡及对色谱柱的影响等因素,我们尝试通过调整流动相来建立新的快速分析方法。新色谱条件建立在乙腈-水体系上,曾尝试加入少量甲酸调节 pH,可以快速完成已知杂质的分离,但由于含量测定及未知杂质检查和已知杂质检查分别使用不同波长(220 nm 和 254 nm),而甲酸在 220 nm 有较强背景吸收,以甲酸流动相作为溶剂有较大的溶剂峰,并考虑到实际使用时的方法简化易行,故最后选择加入磷酸的流动相用于含量测定和未知杂质检查。

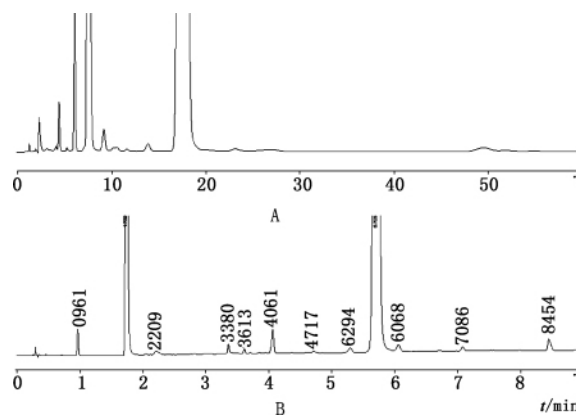


图 2 UPLC 法(A)与药典法(B)比较

Fig 2 Compare between UPLC method(A) and HPLC method(B) on ChP

5.2 2 种方法的比较 针对供试品,采用 UPLC 法较原药典法在有关物质分析上有更好的效果。见图 2

5.3 采用 UPLC 法测定关物质时,曾考察了各种破坏条件下产生的杂质情况,并记录色谱图至 60 min,发现在 10 min 前,所有色谱峰都出完,因此该方法相对于药典方法省时,省流动相。由于省时,也能够避免多批次检测过程中样品降解造成的杂质含量偏高。

致谢:感谢辉瑞制药有限公司(中国-大连)、沃特斯科技术有限公司(中国)、安捷伦科技有限公司(中国)对本项目给予的帮助。

参考文献

- 1 ChP(中国药典):2005. Vol II(二部):786
- 2 CHEN Jia(陈佳),WANG Gang-li(王钢力),YAO Ling-wen(姚令文) *et al.* Recent applications of ultra performance liquid chroma-

tography(UPLC) in pharmaceutical anlysis[超高效液相色谱(UPLC)在药物分析领域中的应用]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志) 2008 28(11):1976

- 3 XIE Gen-ying(谢庚颖),JI Cheng-hong(季成红),HUANG Hui-li(黄慧丽) *et al.* Determination of cefoperazone sodium in cefoperazone sodium/sulbactam sodium in bile by HPLC. (HPLC 法测定头孢哌酮钠/舒巴坦钠中头孢哌酮钠的胆药浓度). *China Pharm* (中国药房) 2007 18(20):1552
- 4 HUANG Li(黄莉),WANG Jiang-ling(万江陵). Determination of contents and impurities in cefoperazone sodium and sulbactam sodium by HPLC(HPLC 法测定注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠中两组分的含量和有关物质). *Chem Bioeng* (化学与生物工程) 2006 23(01):60

(本文于 2010 年 11 月 8 日收到)

关于举办第二届全国药品质量分析论坛的通知(第二轮)

为了不断提高药品质量,交流药物分析技术及方法,促进药品生产工艺改进,保障公众用药安全有效。中国药学会药物分析杂志编辑部定于 2011 年上半年召开"第二届全国药品质量分析论坛"。欢迎广大从事药品检验、药物分析、药品生产质量控制及相关领域人员参会交流和投稿。现将论坛有关事宜通知如下。

一、会议地址:江苏泰州

二、会议时间:2011 年 4 月 18~22 日

三、征文截止时间:2011 年 3 月 15 日

四、参会回执截止时间:2011 年 3 月 28 日

五、会议征文与要求

(一) 征文内容:未在国内外公开发表的专项成果、研究论文、专题报告、综述评论等,内容包括:化学药物、抗生素药品;中药、天然药物及制剂;生物技术药品、生化药品;药用辅料与药包材;药物有关物质与药品;其他有关药品质量控制研究论文。

(二) 征文投稿联系人

中国食品药品检定研究院 药物分析杂志编辑部(邮编 100050) 刘小帅 于宝珠

电话:010-67058427/010-67012819 转 8 或 3

传真:010-67058427/010-67012819 转 4 或 3

E-mail: ywfx@nicpbp.org.cn

参会请登陆 www.nicpbp.org.cn 或 www.ywfxzz.cn 下载并填写回执后发传真或邮件至本编辑部。

中国药学会药物分析杂志编辑部

2011 年 2 月 9 日