

HPLC 法测定注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠 (2 : 1)的含量

黄 琦,季晓娟

(浙江科技学院 生物与化学工程学院,杭州 310023)

摘 要: 建立注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠(2 : 1)含量测定的 HPLC 分析方法。采用 ODS 色谱柱(150 mm×6.0 mm, 5 μm),流动相为乙腈-水相(23 : 77),水相为 pH5.0 的 0.005 mol/L 氢氧化四丁基铵和 0.05 mol/L KH₂PO₄ 水溶液;检测波长 220 nm。头孢哌酮和舒巴坦分离度及线性关系良好,回收率分别为 99.9% 和 100.4%,并可同时分离其中的头孢哌酮 S 异构体、头孢哌酮降解物 B 及其他相关物质。该方法准确、可靠,适用于注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠(2 : 1)的含量测定,相比于中国药典(2010 版)中注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠含量测定的流动相有所改进,提高了适用性。

关键词: 头孢哌酮钠;舒巴坦钠;高效液相色谱法

中图分类号: TQ460.72;O657.71

文献标志码: A

文章编号: 1671-8798(2012)01-0044-04

Determination of cefoperazone sodium and sulbactam sodium (2 : 1) for injection by HPLC

HUANG Qi, JI Xiao-juan

(School of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology,
Hangzhou 310023, China)

Abstract: ODS column (150 mm×6.0 mm, 5 μm) was used to assay cefoperazone and sulbactam simultaneously. Acetonitrile-water(23 : 77) was used as the mobile phase. Water phase contained 0.005 mol/L tetrabutylammonium hydroxide and 0.05 mol/L KH₂PO₄ (adjusted to pH 5.0), with UV detection at 220 nm. Experimental result showed that the components have a good linear relation and their average recoveries are 99.9% for CPZ and 100.4% for SBT. S-isomer in CPZ; alkaline degradation B and other related substances are separated well. The determination method is accurate and reliable. Comparing with ChP2010 method, it has better applicability.

Key words: cefoperazone sodium; sulbactam sodium; HPLC

头孢哌酮钠(cefopcazone sodium, CPZ)和舒巴坦钠(sulbactam sodium, SBT)(2:1)组成的复方制剂不但对阴性杆菌显示明显的协同抗菌活性,联合后的抗菌作用是单独用头孢哌酮的 4 倍。本品对金葡萄球菌, G⁻ 杆菌产生的 β -内酰胺酶有很强的抑制作用,临床上用于多种感染疾病的治疗^[1-2]。头孢哌酮钠产品中除药用形式 R 构型外,还有对革兰阴性杆菌几乎无效的 S 异构体、碱性降解产物 B、未知杂质等,严重影响着产品质量^[3-4]。该复方制剂含量测定方法需能同时测定头孢哌酮钠与舒巴坦钠,且主药与头孢哌酮 S 异构体、头孢哌酮碱性降解产物 B 及头孢哌酮未知杂质达到同时分离。该复方制剂按中国药典(2010 版)收录的注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠的含量测定方法^[5],色谱条件的适用性不能满足测定要求,不同的色谱柱头孢哌酮和其 S 异构体之间的分离度差异较大,有的难以达到规定要求。本研究探讨了头孢哌酮钠和舒巴坦钠(2:1)含量测定用流动相,所确定的色谱条件改善了头孢哌酮和 S 异构体的分离度,同时改善了舒巴坦和头孢哌酮未知杂质的分离度;该方法准确、可靠,具有较好的适用性。

1 仪器与试药

岛津 LC-10AT 液相色谱仪,岛津 SPD-10A 紫外检测器,岛津 ODS 色谱柱(150 mm×6.0 mm, 5 μ m),岛津 UV-2100 紫外可见扫描仪,pHS-25 型酸度计。

头孢哌酮对照品(质量分数 94.4%),舒巴坦对照品(质量分数 92.0%),头孢哌酮 S 异构体对照品,头孢哌酮降解物 B 对照品,均为中国药品生物制品检定所提供;注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠(深圳制药厂,批号 101201,101202,101203);乙腈(色谱纯),10%四丁基氢氧化铵水溶液(上海试剂一厂),磷酸二氢钾(化学纯)。

2 实验方法及结果

2.1 检测波长的选择

取头孢哌酮对照品、舒巴坦对照品、头孢哌酮 S 异构体、头孢哌酮降解物 B 各 10 mg,精密称定。头孢哌酮对照品和 S 异构体先用少量 pH7.0 磷酸盐缓冲液溶解,再用流动相稀释至刻度;头孢哌酮 B 降解物先用少量乙腈溶解,再用流动相稀释至刻度;舒巴坦用流动相溶解并稀释至刻度。配成质量浓度为 20 μ g/mL 的溶液,在 UV-2100 紫外可见扫描仪扫描得紫外光谱(图 1)。由于舒巴坦的吸收偏低且含量较小,其他 3 个成分在吸收峰的平坦处,故选择 220 nm 作为检测波长。

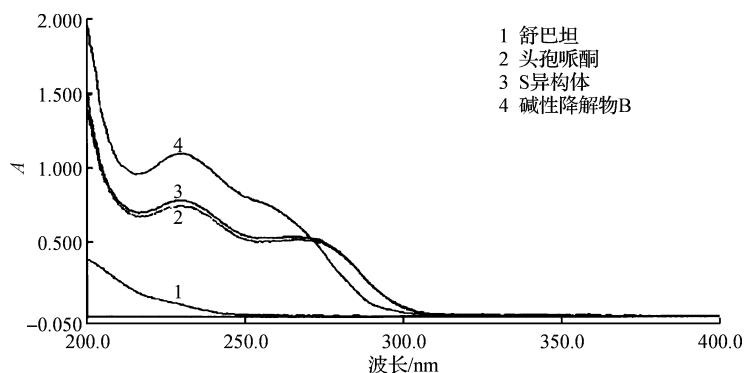


图 1 4 种化合物的紫外扫描谱图

Fig. 1 UV spectrum of 4 kinds of chemicals

2.2 色谱条件与系统适用性试验

十八烷基硅烷键合相为固定相;流动相为乙腈-水相(23:77),水相为浓度 0.005 mol/L 氢氧化四丁基铵和 0.05 mol/L KH₂PO₄ 溶液;pH5.0;流速 1.0 mL/min;检测波长 220 nm;进样量 20 μ L;室温。同时精密称取头孢哌酮对照品、舒巴坦对照品、头孢哌酮 S 异构体对照品及头孢哌酮降解物 B 对照品适量,头孢哌酮对照品和头孢哌酮 S 异构体对照品先用少量 pH7.0 磷酸钠缓冲液溶解,降解物 B 对照品先以乙腈溶解,再加流动相稀释成头孢哌酮、头孢哌酮降解物 B、头孢哌酮 S 异构体质量浓度为 0.3 mg/mL,舒巴坦质量浓度为 0.15 mg/mL 的混合溶液,进样测试。头孢哌酮峰与头孢哌酮 S 异构体峰的分离度,舒巴坦峰与未知杂质峰的分离度应不小于 1.0。

结果表明,色谱图中相邻两峰的分离度良好(图 2),理论塔板数按头孢哌酮峰计算大于 3 000,系统适用性试验符合规定。

2.3 标准曲线

2.3.1 头孢哌酮和舒巴坦标准储备液的制备

精密称取头孢哌酮对照品 25.0 mg, 舒巴坦对照品 12.5 mg, 置 25 mL 容量瓶中, 先用少量 pH7.0 磷酸盐缓冲液溶解, 再用流动相稀释至刻度, 混匀, 配成头孢哌酮 1.0 mg/mL、舒巴坦 0.5 mg/mL 标准储备液。

2.3.2 标准曲线

精密吸取上述标准储备液 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL, 置 6 个 10 mL 容量瓶中, 加流动相至刻度, 摇匀, 即配成含头孢哌酮 0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/mL, 舒巴坦 0.025、0.05、0.1、0.15、0.2、0.25 mg/mL 的系列标准溶液。照上述色谱条件测定。经回归计算, 色谱峰面积(A)与质量浓度(C)在头孢哌酮 0.049~0.49 mg/mL, 舒巴坦 0.024~0.24 mg/mL 范围内呈良好的线性关系, 回归方程:

头孢哌酮 $A=1.87\times10^7C+4.10\times10^4$, $r=0.999\ 4$

舒巴坦 $A=3.69\times10^6C+4.11\times10^3$, $r=0.999\ 1$

2.4 进样精密度

取头孢哌酮质量浓度为 0.2 mg/mL, 舒巴坦质量浓度为 0.1 mg/mL 的标准溶液 20 μ L 进样, 连续测定 6 次, 计算其相对标准偏差(RSD), 分别为 0.73%, 0.70%, 见表 1。

表 1 精密度测定结果(n=6)

Table 1 Determination results of precision (n=6)

组分	峰面积($\times 10^4$)						平均值	RSD/%
	1	2	3	4	5	6		
头孢哌酮	349.5	352.5	346.8	353.1	352.5	353.1	351.3	0.73
舒巴坦	33.28	33.48	33.01	33.62	33.48	33.62	33.41	0.70

2.5 检测限

取上述制备标准曲线用最低质量浓度的头孢哌酮和舒巴坦标准溶液, 采用逐步稀释法, 检测限以信噪比 S/N=3 确定。结果表明, 头孢哌酮的检测限为 1.0 ng, 舒巴坦的检测限为 2.0 ng。

2.6 回收率试验

精密称取 20 倍处方量已知含量的舒巴坦原料 9 份, 各加入精密称取已知含量的头孢哌酮原料, 称样量为 20 倍处方量的 80%、100%、120% 各 3 份, 混合均匀制成模拟样, 精密称取模拟样适量(约相当于头孢哌酮 12、15、18 mg), 分别置于 50 mL 容量瓶中; 同样精密称取 20 倍处方量已知含量的头孢哌酮原料 9 份, 各加入精密称取已知含量的舒巴坦原料, 称样量为 20 倍处方量的 80%、100%、120% 各 3 份, 混合均匀制成模拟样, 精密称取模拟样适量(约相当于舒巴坦 6.0、7.5、9.0 mg), 分别置于 50 mL 容量瓶中; 用流动相稀释至刻度。

另精密称取头孢哌酮、舒巴坦对照品, 先用少量 pH7.0 磷酸盐缓冲液溶解, 再用流动相稀释至刻度, 混匀, 配成头孢哌酮 0.3 mg/mL、舒巴坦 0.15 mg/mL 标准储备液, 按上述色谱条件进样测定, 计算回收率, 结果见表 2。结果表明, 本方法回收率较好, 两成分互不干扰。

2.7 样品含量测定

取厂家 3 个批号注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠(2:1)适量, 分别精密称定, 制成含头孢哌酮 3.0 mg/mL,

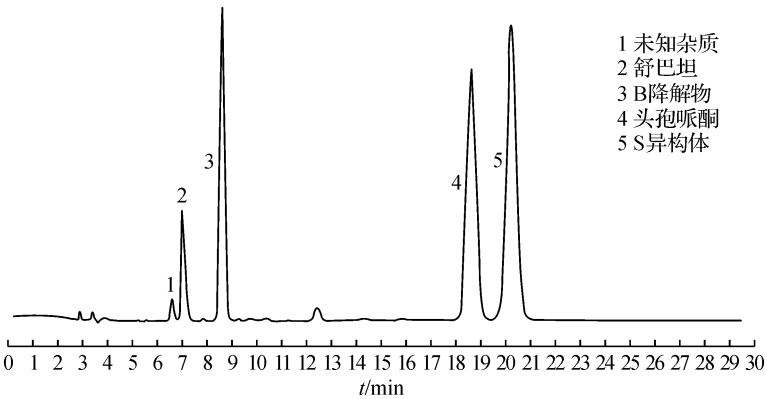


图 2 系统适用性试验色谱图

Fig. 2 Chromatogram of system suitability test

舒巴坦 1.5 mg/mL 的溶液,按照上述色谱条件进样测定,记录色谱图。3 批样品测定结果见表 3。

表 2 回收率试验($n=9$)

Table 2 Recovery test ($n=9$)					%
组分	80%	100%	120%	平均回收率	RSD
头孢哌酮	98.3	101.4	98.5	99.9	1.48
	100.6	99.5	101.3		
	97.9	100.0	101.9		
舒巴坦	101.4	102.8	98.2	100.4	1.85
	99.8	98.7	102.5		
	99.4	102.5	98.7		

表 3 样品测定结果($n=3$)

Table 3 Determination results of samples in different batches ($n=3$)				%
批号	101201	101202	101203	
头孢哌酮标示量	102.3	102.1	99.4	
舒巴坦标示量	100.9	100.5	101.6	

3 讨 论

3.1 中国药典(2010 版)收载方法的流动相分离情况考察

中国药典(2010 版)收载的注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠含量测定的流动相:0.005 mol/L 氢氧化铵四丁基溶液(取 40% 氢氧化四丁基铵溶液 6.6 mL,加水 1 800 mL 后,用 1 mol/L 磷酸溶液调节 pH 值至 4.0,再用水稀释至 2 000 mL,摇匀)—乙腈(750 : 250)检测波长 220 nm^[5]。在该色谱条件下,头孢哌酮峰和 S 异构体峰的分离度较好,但是两者峰形不尖锐,有些拖尾,并且保留时间较长(大于 30 min);舒巴坦色谱峰前有一未知杂质,和舒巴坦峰的分离度小于 1.0。

3.2 流动相组成对被测组分色谱分离的影响

流动相有乙腈比例、pH 值、KH₂PO₄ 溶液质量浓度、氢氧化四丁基铵溶液质量浓度 4 个可变因素,用正交试验优选色谱条件发现:氢氧化四丁基铵溶液质量浓度可以增加舒巴坦的保留;磷酸盐缓冲液可改善头孢哌酮和 S 异构体的峰形和分离度及改变 B 降解物的峰位;pH 值对各峰的保留时间均有影响;流动相中乙腈比例影响最大,尤其对头孢哌酮的保留时间影响较大。当水相与乙腈的比为 77 : 23 时,可使相邻峰的分离度达到要求,各峰峰宽较合适,且保留时间较为适宜(未知杂质 6.665 min,舒巴坦 7.068 min,B 降解物 8.715 min,头孢哌酮 18.665 min,头孢哌酮 S 异构体 20.265 min);流动相中水相的 pH 值在 4~6 范围内,对舒巴坦和头孢哌酮未知杂质的分离度影响较大,当 pH5.0 时,可使舒巴坦和头孢哌酮未知杂质的分离度符合要求($R>1.0$);用 KH₂PO₄ 缓冲液保持流动相的离子强度和 pH 值一定,当 KH₂PO₄ 的质量浓度为 0.05 mol/L 时,有利于获得对称的色谱峰和重现的分离结果。

4 结 语

本研究探讨了注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠(2 : 1)含量测定用流动相,改进后的流动相改善了头孢哌酮和 S 异构体、舒巴坦和头孢哌酮未知杂质的分离度,相邻两组分的分离度均不小于 1.0,且保留时间较为适宜,优于中国药典(2010 版)收载的流动相。所确定的色谱条件能准确、快速地测定该复方制剂中头孢哌酮钠和舒巴坦钠的含量。

参考文献:

[1] 王婷,孙渊. 头孢哌酮舒巴坦钠临床应用研究进展[J]. 海峡药学,2010,22(7):173-176.
[2] 王连水,刘永利,高燕霞. 注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠的质量评价[J]. 中国药事,2010,24(4):403-404,413.
[3] 张慧文,胡昌勤,许明哲,等. 胶束电动毛细管色谱法分析头孢哌酮与其 S-异构体等杂质[J]. 色谱,2007,25(5):699-704.
[4] 陈兆坤,胡昌勤. 头孢菌素类抗生素的降解机制[J]. 国外医药:抗生素分册,2004,25(6):249-252,265.
[5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:二部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:796.