

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.10.02

超高效液相色谱法测定头孢噻呋晶体 注射液中头孢噻呋含量

魏秀丽¹, 常雪², 王艳芬¹, 杨志昆¹, 冯言言², 张传津^{1*}, 徐恩民^{1*}, 李有志¹

(1. 山东省兽药质量检验所, 山东省畜产品质量安全监测与风险评估重点实验室, 动物源细菌耐药性监测与精准化

用药山东省工程实验室, 济南 250022; 2. 齐鲁动物保健品有限公司, 济南 250100)

[收稿日期] 2020-03-13 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2020) 10-0010-05 [中图分类号] S859.795

[摘要] 建立超高效液相色谱-光电二极管阵列法(UPLC-PDA)测定头孢噻呋晶体注射液中主成分头孢噻呋的含量。采用反相超高效液相色谱法对头孢噻呋进行色谱分离和快速定量测定。以 ACQUITY UPLC™ C8 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm)为分离柱, 柱温: 35 ℃; 以乙腈-水(0.1% 甲酸)进行梯度洗脱; 流速: 0.35 mL/min; 进样量: 1 μL; 检测波长为 292 nm。通过光谱图、保留时间和峰面积参数对头孢噻呋进行定性、定量检测。头孢噻呋在 4~200 μg/mL 的范围内线性关系良好($R^2 > 0.9998$); 方法检测限为 2 μg/mL、定量限为 4 μg/mL, 完全满足检测需求。该方法色谱分离较好, 分析速度较快, 前处理简单, 适用于头孢噻呋晶体注射液中主成分头孢噻呋含量的检测。

[关键词] 超高效液相色谱法; 光电二极管阵列检测器; 头孢噻呋晶体注射液; 头孢噻呋

Determination of Ceftiofur in Ceftiofur Crystalline Free Acid Injection by UPLC

WEI Xiu-li¹, CHANG Xue², WANG Yan-fen¹, YANG Zhi-kun¹, FENG Yan-yan²,ZHANG Chuan-jin^{1*}, XU En-min^{1*}, LI You-zhi¹

(1. Institute of Veterinary Drug Quality Inspection of Shandong Province, Shandong Provincial Key Laboratory of Quality Safety Monitoring and

Risk Assessment for Animal Products, China Shandong Engineering Laboratory for Drug Resistance Monitoring and

Precise Drug Use of Animal Origin Bacteria, Jinan 250022, China; 2. Qilu Animal Health Products Co., Ltd, Jinan 250100, China)

Corresponding author: ZHANG Chuan-jin, E-mail: 1153702137@qq.com; XU En-min, E-mail: 306964900@qq.com

Abstract: This study aims to establish a high performance liquid chromatography (UPLC-PDA) test method for the determination of ceftiofur in ceftiofur crystalline free acid injection. UPLC was used to isolate and quantitatively determine ceftiofur. ACQUITY UPLC™ C8 chromatographic column (2.1 mm x 100 mm, 1.7 μm) was used as the separation column, Column temperature 35 ℃; Gradient elution was performed with acetonitrile-water (0.1% formic acid) solution as mobile phase; The flow rate is 0.35 mL/min, the injection volume is 1

基金项目: 2015 年国家科技支撑计划“兽药安全与质量评价技术研究与应用”(BAD11B03-01)

作者简介: 魏秀丽, 高级兽医师, 从事兽药和畜禽产品质量监督检验、标准制修订及新兽药研发工作。

通讯作者: 张传津, E-mail: 1153702137@qq.com; 徐恩民, E-mail: 306964900@qq.com

μL, and the wavelength is 292 nm. In this paper, the quantitative and qualitative determination of ceftiofur was carried out by spectrogram, retention time and peak area parameters. In the range of 4 ~ 200 μg/mL of ceftiofur, the linear relationship is good ($R^2 > 0.9998$); The limit of detection is 2 μg/mL ($S/N > 3$), and the limit of quantitation is 4 μg/mL ($S/N > 10$), which fully meet the requirements. The test method is suitable for the qualitative and quantitative determination of ceftiofur in ceftiofur crystalline free acid injection for its good separation, quick analysis and easy sample treatment performance.

Key words: high performance liquid chromatography method; PDAD; ceftiofur crystalline free acid injection; ceftiofur

头孢噻呋晶体注射液是一种缓释制剂,活性成分 是 头 孢 噻 呋, 用 于 治 疗 和 预 防 溶 血 性 巴 氏 杆 菌、多杀性巴氏杆菌和睡眠嗜血杆菌感染引起的牛呼吸 系统 疾 病 (肺 炎, 运 输 热), 以 及 治 疗 胸 膜 肺 炎 放 线 杆 菌、多杀性巴氏杆菌、副猪嗜血杆菌和猪链球 菌 引 起 的 猪 呼 吸 系 统 疾 病^[1-2]。在 中 华 人 民 共 和 国 农 业 农 村 部 公 告 第 11 号 等 文 献 中 头 孢 噻 呋 晶 体 及 其 注 射 液 或 其 他 相 关 制 剂 对 头 孢 噻 呋 含 量 测 定 均 采 用 高 效 液 相 色 谱 方 法^[3-8], 检 测 所 用 流 动 相 配 制 比 较 复 杂, 有 机 试 剂 品 种 较 多, 对 实 验 室 人 员 操 作 性 要 求 较 高。本 实 验 开 发 了 超 高 效 液 相 色 谱 - 光 电 二 极 管 阵 列 检 测 法 (UPLC - PDA) 测 定 头 孢 噻 呋 晶 体 注 射 液 中 头 孢 噻 呋 的 含 量, 与 高 效 液 相 色 谱 法 相 比 建 立 的 方 法 流 动 相 组 成 简 单, 配 制 容 易, 毒 性 相 对 较 小, 简 单 快 速, 经 济 环 保。

1 材料与方法

1.1 药品及试剂 头孢噻呋对照品, 批号 K0331711, 含量 89.5%, 中国兽医药品监察所; 乙 腈、冰醋酸、甲醇、四氢呋喃等均为色谱纯; 醋酸铵、 正丁醇、二甲基甲酰胺、正己烷、氢氧化四丁基铵等 为分析纯; 超纯水。

头孢噻呋晶体注射液(猪用), 来自齐鲁动物保 健品有限公司产品, 规格, 50 mL:5 g, 100 mL:10 g; 头 孢 噻 呋 晶 体 注 射 液 (牛 用), 来 自 齐 鲁 动 物 保 健 品 有 限 公 司 产 品, 规 格, 50 mL:10 g, 100 mL:20 g。

1.2 仪器 Waters Acquity™ Ultra performance LC 超高效液相色谱仪, 配备二极管阵列检测器, 美 国 waters 公司; Agilent 1260 高效液相色谱仪, 配备 紫 外 检 测 器, 美 国 安 捷 伦 公 司。分 析 天 平, 感 量

0.00001 g, 瑞士梅特勒公司。

1.3 方法

1.3.1 供试品溶液制备 严格按照农业农村部公 告第 11 号头孢噻呋晶体注射液质量标准。

1.3.2 标准储备液的制备 精密称取头孢噻呋对 照品 44.7 mg, 按照农业农村部公告第 11 号头孢噻 呋晶体注射液质量标准配制成 400 μg/mL 储备液。

1.3.3 标准工作液的制备 取储备液适量, 配制 成标准工作液: 每 1 mL 含头孢噻呋 200、80、40、20、 8、4、2 μg 的溶液。

1.3.4 色谱操作条件及参数 色谱柱: C8 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm); 以乙腈为流动相 A, 0.1% 甲酸为流动相 B, 按表 1 规定进行梯度洗脱; 光 电 二 极 管 阵 列 检 测 器, 扫 描 范 围 190 ~ 400 nm, 检 测 波 长 为 292 nm, 柱 温 35 ℃, 进 样 室 温 度 10 ℃, 流 速 0.35 mL/min, 进样量 1 μL。

表 1 梯度洗脱条件表
Tab 1 Gradient elution condition

时间/min	流动相 A/% (乙腈)	流动相 B/% 水(0.1% 甲酸)	曲线
0	10	90	
0 ~ 3	10→25	90→75	6
3 ~ 5	25	75	6
5 ~ 7	25→50	75→50	6
7 ~ 8.5	50	50	6
8.5 ~ 9.5	50→10	50→90	6
9.5 ~ 10	10	90	6

1.3.5 重复性试验和精密度试验 精密吸取头孢 噻呋对照品储备溶液, 制成每 1 mL 含头孢噻呋 40

μg 的对照品溶液,重复配制 6 份,进样,计算其峰面积 RSD 。精密吸取上述对照品溶液,重复进样 6 次,计算其峰面积 RSD 。

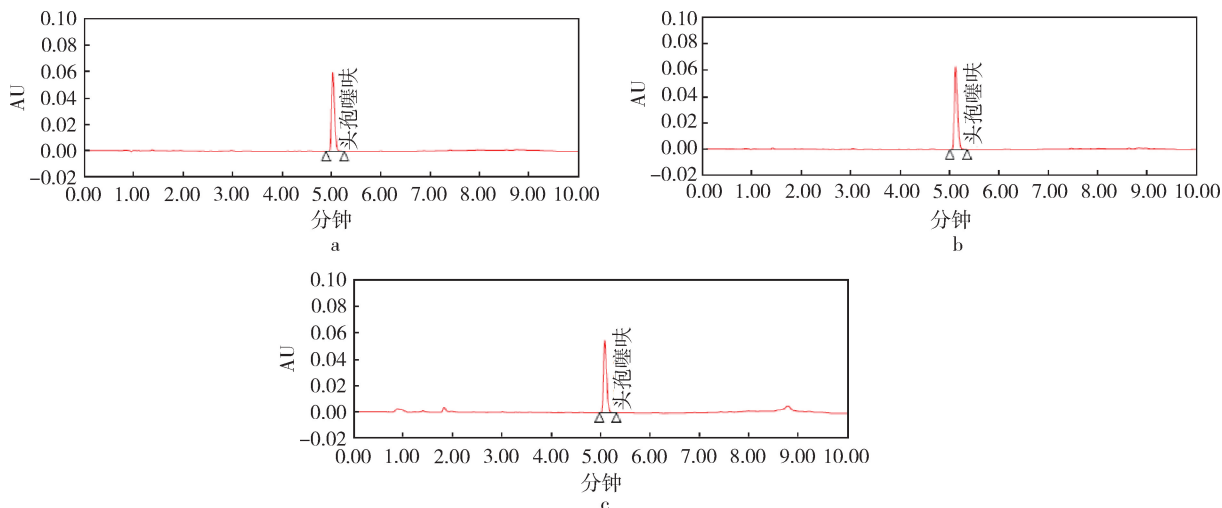
1.3.6 检测限和定量限的测定 对头孢噻呋的标准工作液,进行 UPLC 的分析,并逐级降低其浓度,以溶液检测时的信噪比 $S/N \geq 3$ 作为检测限、 $S/N \geq 10$ 作为定量限。

1.3.7 不同色谱条件样品检测比较 分别使用高效液相色谱仪(参照农业农村部公告第 11 号文^[1],紫外检测器,254 nm;流速:1.5 mL/min;进样量:20

μL)和超高效液相色谱仪(光电二极管阵列检测器,254、292 nm;流速:0.35 mL/min;进样量:1 μL)在不同的色谱条件下运行,对同一样品中头孢噻呋的含量和出峰时间分别进行比较。

2 结果与分析

2.1 色谱分离 在优化的色谱条件下,测得头孢噻呋色谱峰峰形良好,且均达到基线分离,在 1.3.4 项条件下,头孢噻呋对照品和头孢噻呋晶体注射液样品,色谱保留时间约为 5.05 min,分离度均满足要求。头孢噻呋 UPLC 色谱图见图 1。



(a. 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 头孢噻呋对照品;b. 10% 头孢噻呋晶体注射液;c. 20% 头孢噻呋晶体注射液)

图 1 UPLC 图(254 nm 1 μL)

Fig 1 (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ceftiofur reference,10% Ceftiofur Crystalline Free Acid Injection,20% Ceftiofur Crystalline Free Acid Injection) chromatogram UPLC 254 nm 1 μL

2.2 线性 在选定的色谱条件下,使用梯度洗脱的方法,可以有效地分离目的峰,头孢噻呋在 4 ~ 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内,线性回归方程为 $y = 6417.2x - 2328.8$, $R^2 > 0.9998$ 。其标准曲线见图 2。

2.3 重复性和精密度试验 在选定的色谱条件下,配制 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 头孢噻呋对照品溶液,重复配制 6 份,进样,测得头孢噻呋峰面积 RSD 为 0.33%;取 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 头孢噻呋对照品溶液,重复进样 6 次,测得头孢噻呋峰面积 RSD 为 0.21%,均满足实验要求。

2.4 检测限和定量限 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 头孢噻呋对照品溶液信噪比 ≥ 3 ,为检出限,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 头孢噻呋对照品溶液信噪比 ≥ 10 ,为定量限。

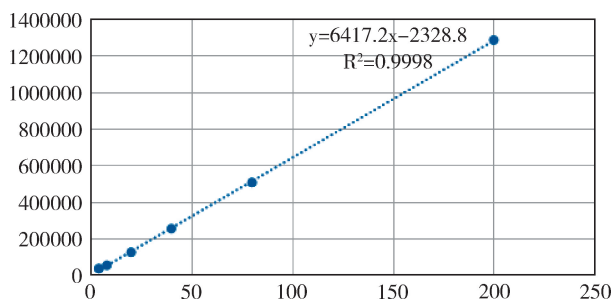


图 2 头孢噻呋标准曲线

Fig 2 Standard curve of Ceftiofur

2.5 不同色谱条件样品检测结果的比较 不同色谱条件下的主成分理论塔板数、保留时间等参数的比较见表 2。

表 2 不同色谱条件下的主成分不同色谱参数的比较

Tab 2 Comparison of principal components and chromatographic parameters under different chromatographic conditions

主成分	平均理论塔板数		保留时间		对称因子	
	UPLC	HPLC(农业部公告 进口质量标准)	UPLC	HPLC(农业部公告 进口质量标准)	UPLC	HPLC(农业部公告 方法)
头孢噻呋	约 33000	6700 ~ 7500	约 5.05 min	约 6.40 min	约 1.3	约 0.77

由表 2 可见,使用的 Waters 的 C8 色谱柱理论塔板数非常高,性能是完全满足要求的。通过响应值比较及光谱图各成分的最大吸收波长为 254 nm 和 292 nm,两波长结果偏差极小,小于 1%,都能满足检测需求;农业农村部质量标准选择的 254 nm,但 292 nm 的响应值较高,所以选择 292 nm。光谱图见图 3;色谱图见图 1、图 4。保留时间为约 5.05 min,满足检测需求。

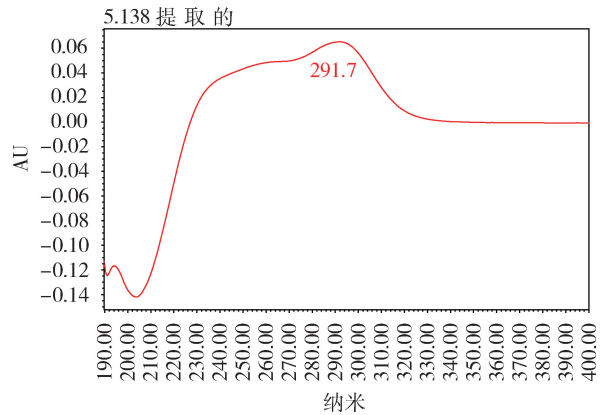


图 3 头孢噻呋对照品光谱图

Fig 3 Ceftiofur control spectrum

使用 Waters 超高效液相色谱仪(本实验色谱条件 1.3.4 项)和高效液相色谱仪(1.3.7 项),对同一样品中头孢噻呋的含量分别进行了比较,无显著差异,相对偏差均小于 1%,表明本实验方法简单可行,结果精确可靠。结果如表 3 所示。

由于两种色谱方法均已通过其方法学验证,均可以准确控制其指标成分。从检测效率上看,优选超高效液相色谱法(UPLC),各色谱图见图 1、图 4、图 5。从样品噪音和峰形分离度等方面来看,优选超高效液相色谱仪条件,背景更干净,与杂质峰的分离度更好。

表 3 不同色谱条件检测结果表 (n=4)

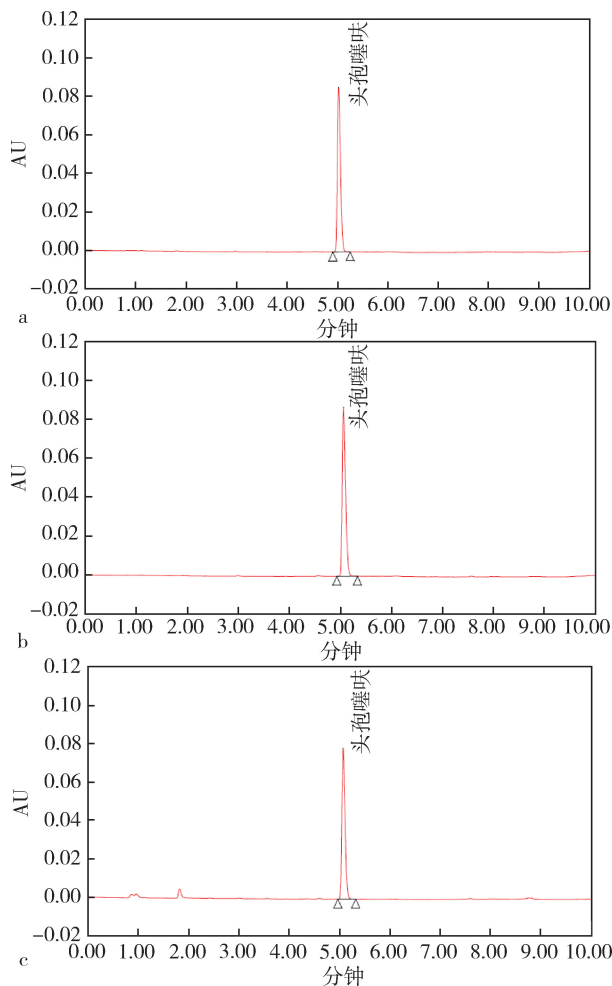
Tab 3 Test results using different chromatographic

method (n=4)			
头孢噻呋晶体注射液	头孢噻呋		
不同规格产品	进口质量标准 HPLC 254 nm	本实验方法 UPLC 254 nm	本实验方法 UPLC 292 nm
头孢噻呋晶体注射液制剂 1 猪用(10%) 50 mL	98.1	98.2	98.2
头孢噻呋晶体注射液制剂 2 猪用(10%) 100 mL	101.4	101.5	101.6
头孢噻呋晶体注射液制剂 3 牛用(20%) 50 mL	95.8	95.7	95.7
头孢噻呋晶体注射液制剂 4 牛用(20%) 100 mL	97.5	97.4	97.5

3 讨论与结论

3.1 UPLC 方法色谱柱耐用性实验 本研究将头孢噻呋的对照溶液利用 PDA 检测器采集其光谱图,在波长 190 ~ 400 nm 范围内进行扫描,头孢噻呋在 254/292 nm 处有最大吸收,根据光谱图可以判断含有主成分;改变流速 0.34、0.36 mL/min,柱温 35 ℃ 不变,保留时间上下浮动 0.3 min 以内。改变柱温 33、38 ℃,流速 0.35 mL/min 不变,保留时间上下浮动 0.3 min 以内,均能达到良好的分离度和精确的含量测定结果。色谱柱性能稳定,适合本项目头孢噻呋含量的测定。最终选择 292 nm 作为检测波长,35 ℃ 柱温,保留时间约为 5.05 min。

3.2 本方法与农业农村部颁布的进口质量标准^[3]方法的对比 本实验分别采用建立的超高效液相色谱方法和标准规定的高效液相色谱方法,对兽药



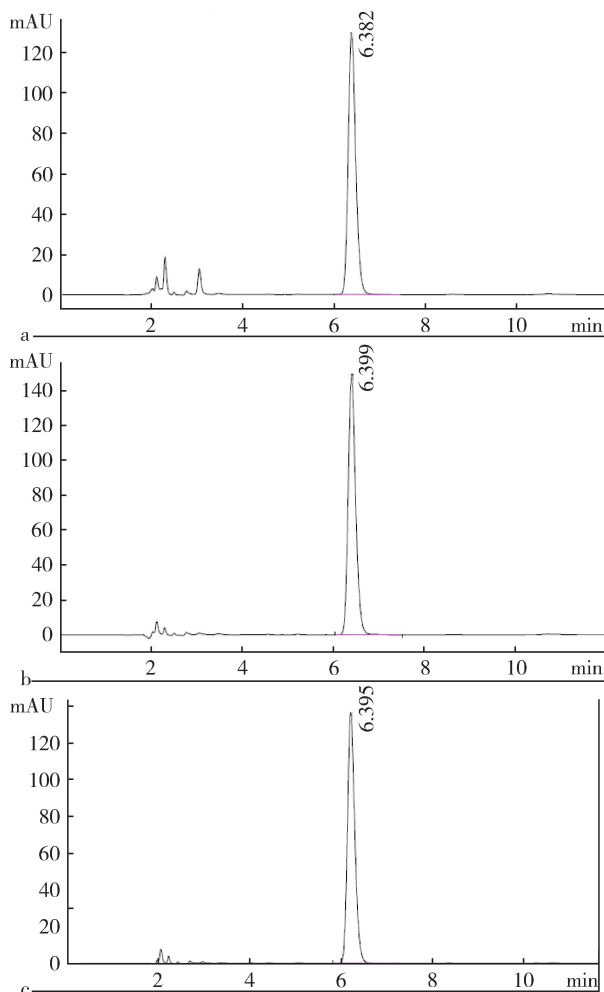
(a. 40 $\mu\text{g/mL}$ 头孢噻吩对照品; b. 10% 头孢噻吩晶体注射液;
c. 20% 头孢噻吩晶体注射液)

(40 $\mu\text{g/mL}$ Ceftriaxone reference, 10% Ceftriaxone

Crystalline Free Acid Injection, 20% Ceftriaxone Crystalline
Free Acid Injection)

图 4 UPLC 图 (292 nm, 1 μL)

Fig 4 chromatogram UPLC 292 nm 1 μL



(a. 40 $\mu\text{g/mL}$ 头孢噻吩对照品; b. 10% 头孢噻吩晶体注射液;
c. 20% 头孢噻吩晶体注射液)

(40 $\mu\text{g/mL}$ Ceftriaxone reference, 10% Ceftriaxone

Crystalline Free Acid Injection, 20% Ceftriaxone Crystalline
Free Acid Injection)

图 5 HPLC 图 (254 nm 1 μL)

Fig 5 chromatogram HPLC 254 nm 1 μL

企业生产的头孢噻吩晶体注射液进行含量测定,测得头孢噻吩晶体注射液中头孢噻吩含量相对偏差均小于 1%,说明本试验建立的超高效液相色谱方法满足该产品质控检测要求。此外,超高效液相色谱法流速为 0.35 mL/min,运行 10 min,每个样品需要消耗 3.5 mL 流动相;高效液相色谱法流速为 1.5 mL/min,运行时间 14 min,每个样品需要消耗 21 mL 流动相。通过比较,超高效液相色谱法更节约实验溶剂等,每个样品节省流动相 16.5 mL、缩短

4 min 分析时间,提高了工作效率。

本实验建立的超高效液相色谱法,对头孢噻吩晶体注射液中头孢噻吩进行定性和定量测定,方法快速,可以作为企业内控标准方法,具备精准快捷、经济环保的特点,能有效控制头孢噻吩晶体注射液的质量。

参考文献:

[1] 冯言言,孔梅,郑莉,等. 头孢噻吩晶体注射液在治疗牛呼吸

系统疾病上的研究进展[J]. 中国奶牛,2019,(7):37-39.

Feng Y Y, Kong M, Zheng L, *et al.* Advances in the treatment of bovine respiratory diseases with cefotaxime crystal injection [J]. Chinese cows,2019,(7):37-39.

[2] 冯言言,孔梅,郑莉,等. 头孢噻呋晶体注射液在治疗猪呼吸系统疾病上的研究进展[J]. 中国猪业,2019,14(7):60-66.

Feng Y Y, Kong M, Zheng L, *et al.* Advances in the treatment of respiratory diseases in pigs with cefotaxime crystal injection [J]. China Pig Industry,2019,14(7):60-66.

[3] 中华人民共和国农业农村部公告第 11 号. 头孢噻呋晶体注射液质量标准[S].

Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China Proclamation No. 11. the quality standard of ceftiofur crystal injection[S].

[4] 中华人民共和国农业农村部公告第 47 号. 头孢噻呋晶体原料质量标准[S].

Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China Proclamation No. 47. the quality standard of ceftiofur crystal raw materials[S].

[5] 兽药质量标准 2017 年版化药卷. 头孢噻呋质量标准[S].

Veterinary Drug Quality Standard 2017 Edition Chemical Volume. Cefotaxime Quality Standard [S].

[6] 昌莉丽,张春辉,肖传斌,等. RP-HPLC 法测定头孢噻呋混悬注射液含量[J]. 西北农业学报,2010,19(6):44-47.

Chang L L, Zhang C H, Xiao C B, *et al.* RP-HPLC Determination of Cefotaxime Suspension Injection [J]. Journal of Northwest Agricultural Sciences,2010,19(6):44-47.

[7] 常恩慧,宋瑞芝,周桂云,等. 高效液相色谱法测定头孢噻呋钠含量[J]. 中国兽药杂志,2007,(9):22-37.

Chang E Hi, Song R Z, Zhou G Y, *et al.* Determination of ceftiofuroxime sodium by HPLC [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine,2007,(9):22-37.

[8] 蔡金华,顾欣,刘雅妮,等. HPLC 法测定头孢噻呋钠原料含量[J]. 中国兽药杂志,2007,(8):12-14.

Cai J H, Gu X, Liu Y N, *et al.* HPLC Determination of the Raw Material Content of ceftiofuroxime Sodium [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine,2007,(8):12-14.

(编辑:侯向辉)