

胶束电动毛细管色谱法测定头孢克肟的含量

张慧文 (广州市药品检验所, 广州 510160)

摘要:目的 建立测定头孢克肟含量的胶束电动毛细管色谱方法。方法 采用非涂渍石英毛细管 $51\text{ cm} \times 75\text{ }\mu\text{m}$; 运行缓冲液为含 $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 十二烷基硫酸钠的磷酸盐缓冲液 ($70\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.0); 压力进样 5 s, 分离电压 15 kV, 柱温 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 检测波长 254 nm, 选择乙酰苯胺为内标。结果 头孢克肟在 $6.08 \sim 777.98\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内, 线性关系良好 ($r=0.9993$)。头孢克肟的最低检测限为 $1.03\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 最低定量限为 $3.43\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 含量测定结果与 HPLC 所得结果没有显著性差异。结论 胶束电动毛细管色谱法分析头孢克肟的含量, 方法准确、简便、灵敏, 与 HPLC 具有互补性。

关键词: 胶束电动毛细管色谱; 头孢克肟; 乙酰苯胺; 含量测定

中图分类号: R917.101; R917.795

文献标识码: B

文章编号: 1007-7693 (2009) 05-0394-04

作者简介: 张慧文, 女, 硕士研究生, 副主任药师

Tel: (020)26283097

E-mail: zhwpxy@126.com

Determination of Cefixime by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography

ZHANG Huiwen(Guangzhou Institute for Drug Control, Guangzhou 510160,China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To develop a method of micellar electrokinetic capillary chromatography for determination of cefixime. **METHODS** The uncoated fused-silica capillary (51 cm×75 μm) was used.The running buffer composed of 70 mmol·L⁻¹ phosphate buffer containing 100 mmol·L⁻¹ sodium dodecylsulphate(pH 7.0).The sample was injected to the column by pressure (50mbar) for 5 s.The separation voltage was 15 kV and the capillary temperature was 25℃.The detection wavelength was set at 254 nm with acetanilide as internal standard. **RESULTS** The calibration curve was linear within the range of 6.08–777.98 μg·mL⁻¹ for cefixime ($r=0.999\ 3$).The limit of detection and limit of quantitation were 1.03 μg·mL⁻¹ and 3.43 μg·mL⁻¹ respectively.Statistical analysis by t-test showed no significant differences between the results obtained by micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC) and by high performance liquid chromatography (HPLC). **CONCLUSION** The MECC method developed was accurate ,simple and sensitive,and could be complement to HPLC.

KEY WORDS: micellar electrokinetic capillary chromatography; cefixime; acetanilide; content determination

头孢克肟(Cefixime)是第一个第三代口服头孢菌素类抗生素,对 G⁺、G⁻菌均有较广泛的抗菌作用,特别是对 G⁺菌中的链球菌属(包括肺炎链球菌),G⁻菌中的淋球菌、卡他莫拉菌、大肠埃希菌、沙雷菌属、克雷伯菌属、变形杆菌属、流感嗜血杆菌等较其他口服头孢类有较强的抗菌能力^[1]。由于其广谱、高效、血药浓度高而持久^[2],临床上主要用于呼吸道感染^[3],肾盂肾炎、膀胱炎、淋球菌性尿道炎、胆囊炎、胆管炎、猩红热、中耳炎、副鼻窦炎等^[4]。

现版药典中除了中国药典 2005 版没有收载头孢克肟外,其余药典^[5-7]均采用 HPLC 测定头孢克肟的含量。也有用紫外分光光度法^[8]测定其含量的文献报道。目前尚未见用胶束电动毛细管色谱法(MECC)测定头孢克肟含量的报道。

毛细管电泳(CE)技术,以其高柱效、低消耗、低污染、分离方式多样等特点^[9],正在越来越多的领域中得到广泛应用,是一种极有发展前途的分离分析技术。CE 中的 MECC 是在缓冲溶液中加入表面活性剂,当其浓度达到或超过临界胶束浓度时就会产生胶束(准固定相),利用溶质不同的疏水性,在水相和胶束相间的分配行为不同,从而使混合组分得以分离。本试验以 SDS 为表面活性剂,建立了测定头孢克肟含量的 MECC,并选用内标法定量,获得了满意的结果。

1 仪器与试剂

Agilent 3 D CE 高效毛细管电泳仪及相应工作站; Quickenet 非涂渍熔融石英毛细管柱(51 cm×75 μm,有效长度 42.5 cm); Beckman φ 660 酸度计; AKTA prime 电导检测器; Milli-Q 超纯水仪,

针头式微孔滤膜过滤器,规格 φ 13 mm,孔径: 0.45 μm,天津市双吉色谱仪器部。

丙酮、磷酸氢二钠、四硼酸钠、硼酸、磷酸、氢氧化钠均为分析纯;十二烷基硫酸钠(SDS, SIGMA 公司提供,纯度为 95%);甲醇为色谱纯;头孢克肟对照品,纯度为 85.2%,批号: 130503-200803(由中国药品生物制品检定所提供);乙酰苯胺对照品,纯度: 100%,批号: 130440-200202(由中国药品生物制品检定所提供);头孢克肟样品由印度 Orchid 公司提供;配制缓冲液和样品液所用水为 Milli-Q 超纯水。

2 方法与结果

2.1 CE 的运行条件

运行缓冲液为含 100 mmol·L⁻¹ 十二烷基硫酸钠的磷酸盐缓冲液(70 mmol·L⁻¹, pH 7.0),运行电压为 15 kV,分离温度为 25℃,压力进样 5 s×5 kPa;柱上紫外检测,检测波长 254 nm,选择乙酰苯胺为内标。所用溶液在使用前经 0.45 μm 微孔滤膜滤过并超声脱气。

2.2 毛细管柱平衡条件

新柱使用前先用 1 mol·L⁻¹ NaOH 于 38℃ 冲洗 60 min,蒸馏水冲洗 30 min,运行缓冲液冲洗 30 min。柱使用完毕,用 0.1 mol·L⁻¹ NaOH 冲洗 5 min,蒸馏水冲洗 5 min,再用空气吹干毛细管柱。

每次实验前,毛细管柱用 0.1 mol·L⁻¹ NaOH 冲洗 10 min,蒸馏水冲洗 10 min,运行缓冲液冲洗 10 min。两次进样间用水、0.1 mol·L⁻¹ NaOH、水各冲洗 2 min,运行缓冲液冲洗 5 min。

2.3 HPLC 条件

按美国药典 30 版方法^[6]测定。

2.4 溶液配制

2.4.1 头孢克肟对照品贮备液的制备 精密称取头孢克肟对照品适量,置 100 mL 量瓶中,加入适量的甲醇溶解,用水稀释到刻度,得到浓度约为 $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品贮备液。

2.4.2 内标贮备液的制备 精密称取乙酰苯胺对照品适量,置 100 mL 量瓶中,加入适量的甲醇溶解,用水溶解并稀释到刻度,得到浓度约为 $0.6 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的内标贮备液。

2.4.3 降解溶液的制备 ①酸降解溶液的制备:取供试品适量加入适量的甲醇溶解后,加 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的磷酸 1 mL,放置 1 h,加入适量的 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液使溶液呈中性,加水稀释至刻度,配成 $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液。②碱降解溶液的制备:取供试品适量至 10 mL 量瓶中,加入适量的甲醇溶解后,加 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 2 mL,放置 1 h,加入适量的 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的磷酸溶液使溶液呈中性,加水稀释至刻度,配成 $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液。③氧化降解溶液的制备:取供试品适量至 10 mL 量瓶中,加入适量的甲醇溶解后,加入 30% 双氧水 2 mL,加水稀释至刻度,配成 $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液。④热解溶液的制备:取供试品置于 105°C 放置 3 h,取加热后样品适量,加甲醇溶解并稀释,配成 $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 溶液。⑤水解溶液的制备:取供试品 10 mg,加水 10 mL,在 95°C 水浴中放置 45 min 后,放冷至室温。

2.5 内标的选择

应用毛细管电泳法进行定量分析时,常需加入一合适的内标物质以降低由于进样体积不一致引入的误差,并大大改善定性、定量的精密度和准确度^[10-11]。理想的内标物质应是一个稳定性较好、能得到纯样的已知化合物,并与被分析组分有基本相同或相似的物理化学性质(如化学结构、极性、挥发度及在溶剂中的溶解度等)、色谱行为和响应特征等,最好是待分析物的同系物。同时,在进行色谱分析时,内标物应能与待测组分充分分离。通过比较,发现乙酰苯胺与头孢克肟不仅分离较好,且迁移时间适中,不干扰头孢克肟常见有关物质的测定,故本文选择乙酰苯胺作为头孢克肟含量测定的内标。其电泳图谱见图 1。

2.6 线性范围

精密量取头孢克肟对照品贮备液 62.5, 125 μL , 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0 mL 于 10 mL 量瓶中,分别加入内标贮备液 1.0 mL,用水稀释到刻度,

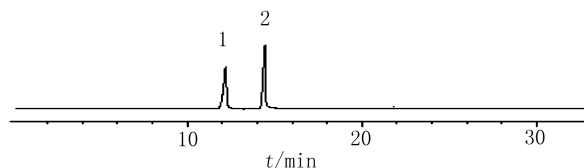


图 1 头孢克肟含量测定的电泳图谱

1-内标乙酰苯胺; 2-头孢克肟

Fig 1 Electrophoretogram of determination of cefixime

1-acetanilide, internal standard; 2-cefixime

配制成含头孢克肟分别为 6.08, 12.15, 24.31, 48.62, 97.24, 194.49, 291.74, 388.99, 583.48, 777.98 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液。摇匀,进样,以内标法计算。以对照品与内标峰面积之比为纵坐标,对照品浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程为: $Y = 0.0075X + 0.1274$, $r = 0.9992$ 。实验结果表明,头孢克肟在 $6.08 \sim 777.98 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好。

2.7 检测限和定量限

取对照品及内标贮备液,依次稀释,直至所得的电泳图中检测不到峰为止。根据 $S/N=3$,计算出头孢克肟的检测限为 $1.03 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。根据 $S/N=10$,计算出头孢克肟的定量限为 $3.43 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.8 精密度

2.8.1 仪器精密度 取浓度为 $194.49 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的头孢克肟对照品溶液(含内标 $60 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),连续进样 6 次,内标法求出校正因子,其 RSD 为 0.9%,头孢克肟与内标迁移时间比的日内 RSD 为 1.0%。

2.8.2 日间精密度 每天取头孢克肟与乙酰苯胺对照品适量,配制成含头孢克肟约 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、乙酰苯胺为 $60 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液,进样测定,内标法求出校正因子。连续 6 d。头孢克肟校正因子的日间 RSD 为 2.8%,头孢克肟与内标迁移时间比的日间 RSD 为 2.0%。

2.9 重复性试验

取同一批头孢克肟样品(批号为 070004)6 份,按含量测定方法试验,结果平均含量为 88.43%,RSD 为 0.8%。

2.10 稳定性试验

将放置于 4°C 的同一对照品溶液在相同电泳条件下,分别于 0, 2, 4, 6, 8 h 重复进样,测得头孢克肟峰面积与内标峰面积比的 RSD 值为 2.5%,表明头孢克肟溶液在 4°C 放置 8 h 内稳定。

2.11 专属性评价

头孢克肟分子结构中含有一个 β -内酰胺环,因此其化学性质很不稳定,极易与酸、碱、氧等发生

作用，导致内酰胺环的破坏而形成一系列的降解物和聚合物，本试验考察了头孢克肟的酸降解溶液、碱降解溶液和氧化降解溶液在此电泳条件下的分离情况。

取“2.4.3”项下的降解溶液，按“2.1”项下的电泳条件进行测定，结果见图2。结果表明酸降解、碱降解、氧化降解、热解及水解产生的杂质与头孢克肟主峰之间均可得到有效分离。

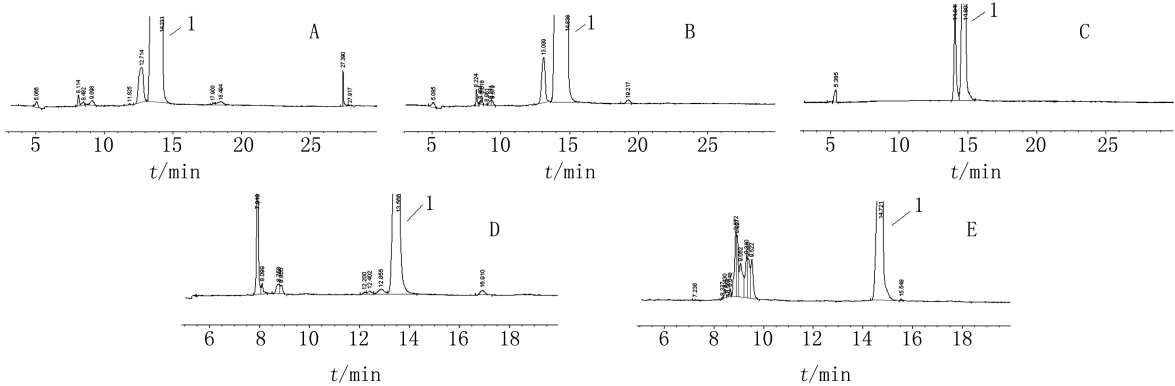


图2 头孢克肟酸降解样品(A)、碱降解样品(B)、氧化降解样品(C)、热解样品(D)及水解样品(E)的典型电泳图谱
1-头孢克肟

Fig 2 Typical electrophoretograms of impurities in cefixime acid degradation(A),base degradation(B),oxidative degradation(C), thermal degradation(D),and hydrolytic degradation(E)
1-cefixime

2.12 样品含量测定与准确度评价

7 批样品同时采用本法 (MECC) 和美国药典方法^[6] (HPLC) 测定其含量。精密称取头孢克肟样品约 25 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加入适量的甲醇溶解, 加 2 mL 内标贮备液, 用水稀释至刻度, 摇匀后进样, 用内标法计算样品的含量并与 HPLC 法测定的结果相比较。结果见表 1。两法的最大偏差为 1.78%, 经 *t* 检验, 两者无显著性差异。

表1 胶束电动毛细管色谱法与高效液相色谱法测定头孢克肟含量的比较

Tab 1 Comparison of the content of cefixime by MECC and HPLC

样品	MECC/%	HPLC/%
1	88.08	88.75
2	87.09	88.87
3	89.27	88.66
4	84.62	84.20
5	87.57	87.54
6	89.85	88.73
7	88.43	87.78

3 讨论

本试验通过对缓冲盐种类、缓冲液 pH 值、磷酸盐浓度、SDS 浓度、有机改性剂甲醇的含量、运行电压及分离温度等分离条件的优化, 得到最佳电泳条件。在此条件下, 头孢克肟的峰形较尖锐, 柱效较高, 出峰时间合适, 且样品中的降解杂质均能与头孢克肟主峰有较好的分离。本试验所建立的方法具有较好的专属性和灵敏度, 可用于头孢克肟的

含量测定。

本试验建立的MECC与HPLC含量测定的结果无显著性差异,但HPLC具有消耗成本高、分析时间长、有机溶剂用量大等缺点; 而MECC成本低、简便、准确、快速, 与HPLC具有互补性, 可为头孢克肟的质量控制提供一种便利的方法。

REFERENCES

[1] XU Y L,WANG D T,WANG T.HPLC determination of the content of cefixime[J].Acta Laser Biol Sin(激光生物学报),2002,11(3):224-229.
[2] TAN Z G,BAI S H,CHEN Z Y,et al.Advances of cefixime in the infection disease[J].Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志), 2001,17(2):150-153.
[3] HE B B,CHEN F.Clinical efficacy of cefixime in the treatment of children with respiratory tract infection[J].Chin J Antibiot(中国抗生素杂志),2006,31(9): 571-572.
[4] PDR (Physicianis Desk Reference) [M].50th ed.1996:1399-1401.
[5] BP2007 [S].2007: 411-413.
[6] USP30 [S].2007: 1654-1655.
[7] EP06 [S].2008: 1450-1451.
[8] LI J, ZHOU Y W, YANG Y H. Determination of cefixime in capsules by UV [J]. Guangxi Med J (广西医学), 2002, 24 (9): 1409-1410.
[9] ISSAQ H J. A decde of capillary electrophoresis [J]. Electrophoresis, 2000, 21(10):1921.
[10] HAQUE A,STEWAT J T.Simultaneous determination of codeine, caffeine, butalbital and aspirin by free solution capillary electrophoresis [J]. J Liq Chromatogr Relat Technol, 1999, 22 (8): 1193-1204.
[11] COORS C,SCHULZ H G,STACHE F.Development and validation of a bioanalytical method for the quantification of diltiazem and desacetyldiltiazem in plasma by capillary zone electrophoresis[J].J Chromatogr A ,1995, 717(1/2):235-243.

收稿日期:2008-03-24