

高效液相色谱法测定头孢泊肟酯含量的方法学研究

邓小煌¹, 林朝霞¹, 曾雪花¹, 廖月明², 陈学智² (1. 深圳市龙岗中心医院药剂科, 广东 深圳 518116; 2. 广东药学院药理学系, 广州 510006)

摘要:目的 对头孢泊肟酯及其制剂含量的高效液相色谱检测法进行改进, 并与紫外分光光度法作比较。方法 以 ODS- C_{18} 为固定相, 甲醇-水 (50:50) 为流动相, 流速为 $1.5\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温为 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, 检测波长 235 nm 。结果 头孢泊肟酯的浓度在 $25 \sim 150\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好, 回归方程为: $A = 7.457C - 1.1287$, $r = 0.9999$ ($n = 7$), 测定头孢泊肟酯胶囊含量重复性良好, RSD 为 1% ($n = 9$)。头孢泊肟酯胶囊的平均回收率为 98.56% , 平均含量为 101.54% 。结论 本法简便、快速、准确、灵敏, 可用于头孢泊肟酯及其制剂的含量测定。

关键词: 高效液相色谱法; 头孢泊肟酯; 含量测定

中图分类号: R917.101; R943.44

文献标识码: B

文章编号: 1007-7693(2007)04-0302-03

Study on Assay of Cefpodoxime Proxetil by Modified HPLC

DENG Xiao-huang¹, LIN Zhao-xia¹, ZENG Xue-hua¹, LIAO Yue-ming², CHEN Xue-zhi² (1. Department of Pharmacy, Longgang Central Hospital of Shenzhen, Shenzhen 518116, China; 2. Guangdong Pharmaceutical College, Guangzhou 510224, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop an modified HPLC method for the determination of cefpodoxime proxetil or cefpodoxime proxetil capsules suspension, comparing with UV-determination. **METHODS** Column: ODS- C_{18} ; mobile phase: methanol: water (50:50), flow rate: $1.5\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, column temperature: $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, detection wavelength: 235 nm . **RESULTS** The standard curve was rectilinear within the range of $25 \sim 150\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ cefpodoxime proxetil and $r = 0.9999$ ($n = 7$). The precision of cefpodoxime proxetil capsule was good and the RSD was 1% ($n = 9$). The average recovery rate of capsule was 98.56% , the average content was 101.54% . **CONCLUSION** The method is simple, rapid, accurate and sensitive for determination of cefpodoxime proxetil or cefpodoxime proxetil capsules suspension.

KEY WORDS: HPLC; cefpodoxime proxetil; determination

头孢泊肟酯 (cefpodoxime proxetil) 为第三代头孢菌素, 系头孢泊肟的前体药物, 口服后经肠管吸收, 由肠管壁酯酶迅速水解成具有生物活性的头孢泊肟而显示出抗菌活性。头孢泊肟酯实为 a, b 立体异构体的混合物。除《日抗基》1998 年版有收载外, 美国药典 24 版、英国药典 1998 年版和中国药典 2000 年版均未有收载。“日抗基”^[1,4] 推荐使用高效液相色谱方法, 用于头孢泊肟酯的含量测定。但如何进一步优化流动相等色谱条件, 国内多个实验室均有不同的建议^[1-3]。本试验试图建立一种高效液相色谱方法, 使之不但能准确测定头孢泊肟酯及其制剂的含量, 同时, 还能良好地分离头孢泊肟酯 a, b 异构体及相关物质, 并用于相关物质的考察。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

1100 型 HPLC 系统, 包括 G1322A 在线脱气机、G1311A

四元梯度高压泵、G1313A 自动进样器、G1316A 柱温箱、G1365B 紫外检测器、化学处理工作站 (美国 Agilent 公司); U-2000 型紫外-可见分光光度计 (日本 HITACHI 公司); HA-202M 电子分析天平 (日本 HITACHI 公司)。

1.2 试剂与材料

头孢泊肟酯对照品 (印度 Ranbaxy Laboratories Limited 含量: 94.0% , 批号: 1074448); 头孢泊肟酯胶囊 (浙江亚太药业股份有限公司, 含量与规格: $100\text{ mg} \times 6$, 批号: H20040493); 甲醇为分析纯。

2 方法与结果

2.1 高效液相色谱法

2.1.1 色谱条件 色谱柱: Agilent ZORBAX C_8 ($4.6\text{ mm} \times 150\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$), Agilent Hypersil ODS- C_{18} ($4.0\text{ mm} \times 250\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$); 流动相: 甲醇-水 (50:50); 流速: $1.5\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱

基金项目: 深圳市科技和信息局科研基金资助项目 (No: 2005163)

作者简介: 邓小煌, 男, 硕士, 副主任药师 Tel: (0755) 84806933-3203

E-mail: dxh2832@126.com

温:40℃;检测波长:235 nm;进样量:10 μL。溶剂同流动相,外标法检测。

2.1.2 方法与结果 对照品溶液:取头孢泊肟酯对照品约53.2 mg(相当于头孢泊肟酯50 mg),精密称定,置20 mL量瓶中,加甲醇10 mL,振摇使溶解,用水稀释至刻度,摇匀,制成浓度为 $2.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品储备液。供试品溶液:取头孢泊肟酯胶囊装量差异项下细粉约207.7 mg(相当于头孢泊肟100 mg),精密称定,置200 mL量瓶中,加甲醇100 mL,振摇使溶解,用水稀释至刻度,摇匀,制成浓度为 $0.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的样品储备液。

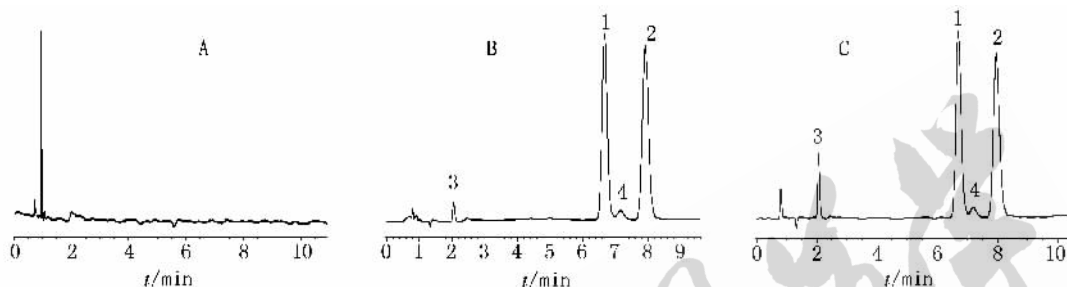


图1 头孢泊肟酯高效液相色谱图

A. 空白对照;B. 标准品;C. 样品;1. 异构体 a;2. 异构体 b;3. 相关物质 c;4. 相关物质 d

Fig 1 The chromatograms of cefpodoxime proxetil

A. blank control;B. standard substance;C. sample;1. isomers a;2. isomers b;3. related substances c;4. related substances d

2.1.3 线性与范围 取头孢泊肟酯对照品约53.2 mg(相当于头孢泊肟酯50 mg),精密称定,置20 mL量瓶中,加甲醇10 mL,振摇使溶解,用水稀释至刻度,摇匀,作为储备液,精密量取此液200,300,500,600,700,800,900 μL于20 mL量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,在上述色谱条件下分别进样10 μL分析,以浓度(C)为横坐标,以异构体a,b的合并峰面积(A)为纵坐标,作回归得直线方程: $A = 7.457C - 1.1287$, $r = 0.9999$ 。头孢泊肟酯在 $25 \sim 150\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内呈良好的线性关系。

2.1.4 稳定性试验 分别取对照品溶液300,600,900 μL于20 mL量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,在上述色谱条件下,于4 h内重复试验,分别进样10 μL,记录色谱结果并予以自动积分。以峰面积计算, $\text{RSD} = 0.89\%$,结果表明重复性较好。

2.1.5 加样回收率实验 精密称取头孢泊肟酯样品53.2 mg(相当于头孢泊肟酯50 mg),置200 mL量瓶中,加甲醇100 mL,振摇使溶解,用水稀释至刻度,摇匀,作为对照品溶液,取头孢泊肟酯胶囊装量差异项下细粉约207.7 mg(相当于头孢泊肟100 mg)三份,精密称定,分别置A,B,C三个200 mL量瓶中,加甲醇100 mL,振摇使溶解,用水稀释至刻度,摇匀,作为样品溶液。分别取A,B,C样品溶液2 mL各三份,置20 mL量瓶,再分别加入对照溶液2,3,5 mL,加流动相稀释至刻度,摇匀,依法测定,平均回收率为 98.56% , $\text{RSD} = 1.79\%$ ($n = 9$)。

2.1.6 头孢泊肟酯胶囊剂含量测定 取头孢泊肟酯胶囊装量差异项下细粉约207.7 mg(相当于头孢泊肟100 mg)三

在上述色谱条件下,对照品与供试品的色谱特征相似,可检出1,2,3,4四个峰。其中1峰的保留时间为6.694 min,理论塔板数为19902;2峰的保留时间为7.952 min,理论塔板数为19897;1,2峰的分度度为3.029;在1峰前、溶剂峰之后,还出现3峰,保留时间为2.051 min,理论塔板数为11501,与1峰的分度度为34.871。同时,在1,2峰之间还发现一相关物质4峰,其保留时间为7.196 min,理论塔板数为15980,与1峰的分度度为2.405,与2峰的分度度为3.336。基线平稳。异构体a,b及相关物质c,d可以得到良好的分离。详见图1。

份,精密称定,分别置A,B,C三个200 mL量瓶中,加甲醇100 mL溶解,用水稀释至刻度,摇匀。分别取2,3,5 mL各三份,置20 mL量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,依法测定,平均含量为 101.54% , $\text{RSD} = 1.65\%$ ($n = 9$),头孢泊肟酯胶囊剂含量符合规定。

2.1.7 头孢泊肟酯异构体与相关物质的考察 分别取样品溶液1.5,3.0,4.5 mL于20 mL量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,在上述色谱条件下,于24 h内重复试验,分别进样10 μL,记录色谱结果并予以自动积分。结果显示,样品溶液在室温下放置4~24 h后,异构体a,b的峰面积均平行下降($r = 0.9953$, $n = 6$),而相关物质c的峰面积增加,异构体a,b的合并峰面积与c峰的峰面积之间呈现负相关关系($r = -0.9956$, $n = 6$);头孢泊肟酯a,b异构体峰的保留时间分别为6.894,7.952 min,而c峰的保留时间为2.051 min(见图1),色谱特征不改变。说明此方法能较好地分离a,b异构体及其相关物质c,d。

2.2 紫外-可见分光光度法

2.2.1 测定波长的选择 精密测定头孢泊肟酯原料12.9 mg,置100 mL量瓶,加甲醇溶解、定容,摇匀得储备液。精密量取2 mL储备液到20 mL量瓶,用甲醇-水(60:40)的溶剂稀释、定容,摇匀。以溶剂为空白溶液,将上述溶液在200~400 nm波长范围内测定吸收光谱。结果表明,头孢泊肟酯在235 nm波长处有最大吸收,故选择235 nm作为头孢泊肟酯的检测波长。见图2。

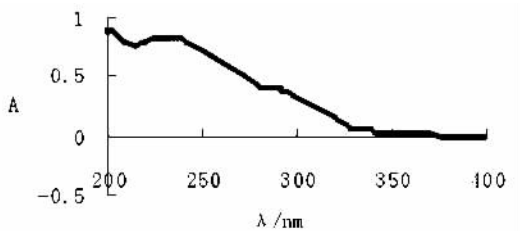


图2 头孢泊肟酯的紫外吸收图谱

Fig 2 The UV-spectrogram of cefpodoxime proxetil

2.2.2 溶媒的选择 精密量取3份2 mL上述储备液到20 mL量瓶,分别用甲醇-水(100:0,60:40,10:90)的溶剂稀释、定容,摇匀。以溶剂为空白溶液,分别将上述溶液在200~400 nm波长范围内扫描。结果表明,用甲醇-水(60:40)作溶媒时峰形较好,且可以节省甲醇的使用。

2.2.3 标准曲线的建立 精密吸取上述储备液0.5,1,1.5,2,3,4,5 mL置20 mL量瓶中,用甲醇-水(60:40)的溶剂稀释至刻度,摇匀配成不同浓度的系列溶液,以溶剂为空白,在235 nm处测定各溶液的吸光度,以浓度(C)对吸光度(A)得到头孢泊肟酯的线性回归方程: $A = 0.033C + 0.0059$, $r = 0.9999$ ($n=7$),头孢泊肟酯在3~30 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度范围内呈良好的线性关系。

2.2.4 稳定性试验 将上述头孢泊肟酯的系列溶液在室温、避光条件下同日内每隔一段时间测定1次,共测3次($n=3$),并于每天相同时间测定1次,共测5 d($n=5$)。头孢泊肟酯的日内差异为1.09%,日间差异为1.75%,数据表明本法重复性良好。

2.1.5 头孢泊肟酯胶囊剂含量测定 取头孢泊肟酯胶囊装量差异项下细粉约207.7 mg(相当于头孢泊100 mg)三份,精密称定,分别置A,B,C三个200 mL量瓶中,加甲醇120 mL溶解,用水稀释至刻度,摇匀。分别取2,3,5 mL各三份,置20 mL量瓶中,用甲醇-水(60:40)的溶剂稀释至刻度,摇匀,依法测定,平均含量为100.76%, $\text{RSD} = 1.52\%$ ($n=9$),头孢泊肟酯胶囊剂含量符合规定。

3 讨论

3.1 关于流动相的选择

本实验考察了不同比例的流动相(甲醇-水分别为50:50,48:52,46:54,45:55和40:60)对色谱特征的影响。在实验中发现,调整该流动相的比例,可以较好地控制各组分的出峰时间,柱压稳定。当流动相为甲醇-水(50:50)时,分离效果最好,保留时间较短,工作效率得到提高,且相关物质得到较好的分离,干扰小,便于对相关物质进行研究。

国内多家实验室^[1-3]建立的高效液相色谱法,流动相较为繁杂,出峰时间长,工作效率降低。“日抗基”^[1,4]方法的流动相为甲醇-水(45:55),供试品的溶解试剂为乙腈。由于该流动相与供试品溶剂存在黏度差异,导致溶质传质速率降低,柱效下降,亦使头孢泊肟酯峰展宽,头孢泊肟酯与有关物质的分离变差。为提高柱效,本实验的流动相和供试品的试

剂均采用甲醇-水(50:50)溶液,尽管黏度偏大,但柱压稳定 $[(164 \pm 1) \text{bar}]$,避免了因流动相与供试品溶剂之间的黏度差异而使色谱峰发生变形的现象,与曹晓云等^[2]建立的方法相似。

3.2 色谱柱的选择

分别以Aglient ZORBAX- C_8 (4.6 mm $\times$ 150 mm,5 μm),Aglient Hypersil ODS- C_{18} (4.0 mm $\times$ 250 mm,5 μm)两种色谱柱进行测定。实验中发现,Hypersil ODS- C_{18} 分析柱优于ZORBAX- C_8 检测柱,可以将异构体a,b及相关物质进行较好地分离,峰形优良,保留时间适中,分离效果好。

3.3 其他条件的选择

对其他色谱条件如流速、柱温、进样容量等进行了摸索,发现流速为1.5 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 、柱温为40 $^{\circ}\text{C}$ 、进样量为10 μL 时,头孢泊肟酯a,b异构体及相关物质峰的峰形最好,保留时间适中。

3.4 方法学比较与相关物质考察

在实验中发现,本室建立的高效液相色谱法和紫外分光光度法,均具有重复性好,日间差异和日内差异较小等特点。用于头孢泊肟酯胶囊的含量测定,在三个浓度供试品溶液的检测中,两种方法的平均回收率和RSD均符合规定。其中,高效液相色谱法还可以较好地分离头孢泊肟酯的a,b异构体及相关物质c和d,分离度理想,而紫外分光光度法不能分离异构体及相关物质,可以用于供试品的含量测定。实验中,发现a,b两个异构体之间有良好的伴随关系($r = 0.9953$, $n=6$)。供试品溶液在室温、避光下放置超过4 h后,随着时间的推移(4~24 h),头孢泊肟酯的峰面积将下降,而相关物质c的峰面积将增加,且a,b异构体峰面积的下降与相关物质c峰面积的增加关系密切($r = -0.9956$, $n=6$),可能与a,b异构体分解为物质c有关,而相关物质d未发现存在这些特征。

参考文献

- [1] LIU H, WANG H W, QIU S L. Determination of cefpodoxime proxetil by HPLC[J]. Chin J Antibiot(中国抗生素杂志), 2003,28(5):263-266.
- [2] CAO X Y, LIU H L, WEI X M. HPLC assay of cefpodoxime proxetil and its preparations[J]. Chin J Antibiot(中国抗生素杂志), 2002,27(5):277-279.
- [3] ZHANG H W, HE L M, LIN L. Determination of cefpodoxime proxetil in cefpodoxime proxetil suspension by RP-HPLC[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学杂志), 2003,20(6):495-497.
- [4] XUE J, HU C Q, JIN S H. Development and validation of an HPLC method for the determination of cefpodoxime proxetil and its related substances in dry syrups[J]. Chin J Antibiot(中国抗生素杂志), 2003,28(10):633-637.

收稿日期:2006-10-25