

RP-HPLC 测定头孢克肟的含量

张慧文, 肖彦琨(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反相高效液相色谱法。方法 采用 Hypersil BDS C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 10 μm) 色谱柱, 流动相为 0.1 mol·L⁻¹ 醋酸铵缓冲液(用氨试液调 pH 为 7.0)-乙腈(96:4), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 254 nm, 柱温 35 °C。结果 头孢克肟浓度在 102.38 ~ 1 433.45 μg·mL⁻¹ 内, 峰面积与浓度呈良好线性关系($r = 0.999\ 9$); 头孢克肟的最低检测限为 0.18 ng, 最低定量限为 0.60 ng, 含量测定结果与按 BP 2008 年版法定标准方法测定结果没有显著性差异。结论 本法简便、专属性强, 可用于头孢克肟含量的测定。

关键词: 头孢克肟; 含量测定; 反相高效液相色谱法

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2009)12-1026-04

作者简介: 张慧文, 女, 硕士生, 副主任药师

Tel: (020)26283097

E-mail: zhwpxy@126.com

Determination of Cefixime by RP-HPLC

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

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for the determination of cefixime by RP-HPLC. **METHODS** Cefixime was separated on a Hypersil BDS C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 10 μm) with a mixture of 0.1 mol·L⁻¹ ammonium acetate (adjusted with ammonia solution to pH 7.0) and acetonitrile (96 : 4) as mobile phase. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 254 nm. The column temperature was 35 °C. **RESULTS** The calibration curve was linear within the range of 102.38-1 433.45 μg·mL⁻¹ for cefixime (*r*=0.999 9). The limit of detection and limit of quantitation were 0.18 ng and 0.60 ng respectively. Statistical analysis by *t*-test showed no significant differences between the results obtained by the method and by BP 2008. **CONCLUSION** This method is simple and selective for the determination of cefixime.

KEY WORDS: cefixime; content determination; RP-HPLC

头孢克肟(cefixime)是第一个口服有效的第三代头孢菌素,对 G⁺、G⁻菌均有较广泛的抗菌作用,具有较强的β-内酰胺酶稳定性。与多数β-内酰胺类抗生素抗菌原理类似,其作用机制主要是阻止细菌细胞壁的合成,为细菌繁殖期杀菌药^[1-3]。因其C₇位上结合有苯甘氨酸类的基团,对胃酸稳定,可口服给药,且患者依从性好,可以作为一个较好的抗感染治疗的转换用药^[4];由于其广谱、高效、血药浓度高而持久^[5],临床主要用于治疗呼吸道感染、耳鼻咽喉感染、胆道炎、胆囊炎及尿道感染等^[6-7]。

英国、美国和欧洲药典的2008年版^[8-10]均采用HPLC测定头孢克肟的含量,且均采用离子对试剂四丁基氢氧化铵与乙腈(75:25)为流动相。笔者在工作中发现,使用该流动相色谱柱需平衡较长时间(2 h以上),且头孢克肟与其反式异构体的分离度较差,柱效和峰形也不太理想。现有的文献报道也多采用四丁基氢氧化铵^[11-12]或磷酸盐^[13-14]与乙腈为流动相测定其含量。由于磷酸盐为不挥发性的缓冲盐,无法直接用于LC-MS分析^[15]。本试验改用易挥发的醋酸铵与乙腈为流动相,获得满意结果,头孢克肟与其反式异构体的分离度达到7.0,且此流动相体系可用于LC-MS联用,为更好地研究头孢克肟的杂质结构提供了条件,从而能更好地控制产品的质量。

1 仪器与试剂

Waters 1525 高效液相色谱仪(带柱恒温箱和自动进样器); Waters 2487 型紫外检测器; 岛津 LC-10ATVP 高效液相色谱仪; 岛津 SPD-M10AVP 二极管阵列检测器; Empower 色谱管理系统; UV2401-PC 型紫外分光光度计; 头孢克肟样品由印度 Orchid 公司、日本 Astellas 公司及韩国 Hammi 公司提供; 头孢克肟对照品(纯度: 85.2%, 批号:

130503-200803)由中国药品生物制品检定所提供; 乙腈和甲醇为色谱纯; 醋酸铵和过氧化氢(H₂O₂)为分析纯; 水为去离子水。

2 色谱条件

色谱柱: Hypersil BDS C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 10 μm); 流动相: 0.1 mol·L⁻¹ 醋酸铵缓冲液(用氨试液调 pH 为 7.0)-乙腈(96:4); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 254 nm; 柱温 35 °C; 进样量 10 μL。分别精密量取“3.1”项下的系统适用性溶液、对照品溶液及供试品溶液 10 μL 进样, 记录色谱图, 结果见图 1。

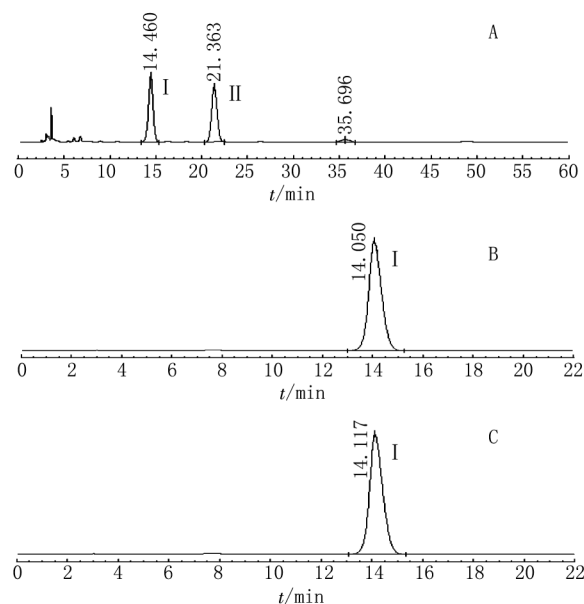


图1 头孢克肟含量测定的高效液相图谱

A-系统适用性溶液; B-供试品溶液; C-对照品溶液; I-头孢克肟; II-头孢克肟 E-异构体

Fig 1 HPLC chromatograms of determination of cefixime

A-system suitability solution; B-test solution; C-reference solution; I-cefixime; II-cefixime E-isomer

3 方法与结果

3.1 系统适用性溶液的配制

精密称取头孢克肟供试品 50 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇 5 mL 溶解后加入 30 mL 水, 置沸水浴中加热 1 h, 放冷至室温, 用流动相稀释至刻度, 摇匀。

3.2 头孢克肟对照品贮备液的配制

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, 用流动相稀释到刻度, 得到浓度约为 $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品贮备液。

3.3 头孢克肟对照品溶液的配制

精密量取头孢克肟对照品贮备液适量, 置 100 mL 量瓶中, 用流动相稀释到刻度, 得到浓度约为 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。

3.4 供试品溶液的配制

精密称取供试品适量, 置 100 mL 量瓶中, 加入适量的甲醇溶解, 用流动相稀释到刻度, 得到浓度约为 $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的供试品溶液。

3.5 降解溶液的配制

3.5.1 酸破坏 取头孢克肟供试品 50 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇 5 mL 溶解, 加入 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶液 5 mL, 静置 1 h 后用 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 溶液中和, 用流动相稀释至刻度, 摇匀。

3.5.2 碱破坏 取头孢克肟对照品 50 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇 5 mL 溶解, 加入 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 溶液 3 mL, 静置 10 min 后用 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶液中和, 用流动相稀释至刻度, 摇匀。

3.5.3 水解破坏 取头孢克肟供试品 50 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇 5 mL 溶解后加入 30 mL 水, 置沸水浴中加热 1 h, 放冷至室温, 用流动相稀释至刻度, 摇匀。

3.5.4 加热破坏 取头孢克肟供试品适量, 置 105 °C 加热 3 h, 放冷至室温, 取样品 50 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇 5 mL 溶解, 用流动相稀释至刻度, 摇匀。

3.5.5 氧化破坏 取头孢克肟供试品 50 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇 5 mL 溶解, 加入 30% H_2O_2 溶液 5 mL, 静置 1 h, 用流动相稀释至刻度, 摇匀。

3.5.6 光照破坏 取头孢克肟供试品适量, 置 254 nm 紫外光灯下照射 24 h, 取样品 50 mg 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇 5 mL 溶解, 用流动相稀释至刻度, 摇匀。

3.6 专属性考察

分别精密量取“3.5”项下的降解溶液 10 μL 进样, 记录色谱图, 结果头孢克肟经酸、碱、水解、加热、氧化、光照等破坏, 所产生的杂质峰与主成分峰均能达到有效分离, 表明方法的专属性强。

3.7 耐用性考察

选用大连依利特 Hypersil BDS、资生堂 Capcell PaKMG II、Phenomenex Gemini、Lichrospher 和 Agilent Zorbax Extend 色谱柱等 5 种不同品牌、不同填料的 C_{18} 色谱柱, 取系统适用性溶液分别进样, 结果 5 种色谱柱头孢克肟峰与其相邻杂质峰均能达到有效分离, 表明该方法对色谱柱的选择性无特殊要求。

3.8 线性考察

精密量取“3.2”项下的头孢克肟对照品贮备液适量, 用流动相稀释制成浓度分别为 102.38, 204.77, 409.55, 614.33, 819.11, 1 023.89, 1 228.67, 1 433.45 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液, 分别进样, 记录色谱图。以峰面积(A)对浓度(C)进行线性回归, 得回归方程为: $A=18\,291\,C+48\,636$, $r=0.999\,9$, 头孢克肟浓度在 102.38~1 433.45 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内与峰面积呈良好的线性关系。

3.9 检测限和定量限

精密量取“3.3”项下的头孢克肟对照品溶液适量, 用流动相依次稀释后进样(进样量为 10 μL), 直至所得的色谱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 0.18 ng。根据 $S/N=10$, 计算出头孢克肟的定量限为 0.60 ng。

3.10 仪器精密度试验

取含量测定项下的同一份供试品溶液, 在上述色谱条件下, 连续进样 6 次, 测定头孢克肟的含量, 结果头孢克肟的平均含量为 88.69%, RSD 为 0.1%。

3.11 供试品溶液的稳定性试验

取含量测定项下的同一份供试品溶液, 室温放置 0, 2, 4, 8, 10 h, 头孢克肟主峰面积无明显变化。头孢克肟峰面积的 RSD 为 1.1%, 表明供试品溶液在室温放置 10 h 内稳定性良好。

3.12 重复性试验

取同一批号样品, 按“3.4”项下的方法, 分别配制 6 份供试品溶液。取上述溶液 10 μL 进样, 测得样品中头孢克肟含量的平均值为 88.37%, RSD 为 0.8%。

3.13 含量测定

按“3.3”和“3.4”项下的方法, 配制头孢克肟

对照品溶液和供试品溶液。取对照品溶液和供试品溶液分别进样，记录色谱图。按外标法以峰面积计算头孢克肟的含量，并与采用 BP 2008 版头孢克肟含量测定项下的方法测得的结果相比较，结果见表 1。两法测得的首孢克肟含量的最大偏差为 0.76%，经配对 *t* 检验，*P*>0.05，两法测定的结果无显著性差异。

表 1 头孢克肟含量测定结果

Tab 1 The determination results of cefixime

批 号	试验方法/%	BP 2008/%
XMEP080119	89.21	88.69
XMEP080120	87.90	88.17
XMEP080121	88.71	88.32
XMEP080122	87.80	88.00
XMEP080123	88.42	87.95
XMEP080124	87.63	88.05
XMEM080049	88.25	88.43
XMEM080050	87.92	87.62
XMEM080059	88.37	88.14
XMEM080060	88.00	88.16
6580	88.47	87.71
7560	87.89	87.60

4 讨论

4.1 色谱条件的确定

本试验经单因素轮换法考察了醋酸铵浓度、流动相 pH 及乙腈含量等变化对头孢克肟峰与其 E 异构体峰的保留时间及两者间分离度的影响。结果表明，醋酸铵浓度越大、流动相 pH 越高、乙腈含量越小，则头孢克肟与其 E 异构体峰的保留时间越大，两者间的分离度也越大。综合考虑，选用醋酸铵的浓度为 0.1 mol·L⁻¹，流动相的 pH 为 7.0，乙腈的含量为 4%，此时，头孢克肟既有合适的保留时间，又有较高的理论板数，峰形也较对称，头孢克肟与其 E 异构体的分离度可达到 7.0。

4.2 系统适用性溶液的确定

方法的专属性考察显示，头孢克肟对酸和光较稳定，在氧化、碱性和加热水解条件下非常不稳定，有较多的杂质产生，主峰面积也明显下降，但在加热水解条件下可产生恒定的降解产物头孢克肟 E-异构体，故选择加热水解破坏溶液作为方法的系统适用性溶液。

4.3 色谱峰纯度的测定

分别取效期内头孢克肟样品(印度 Orchid 生

产，批号：XMEP080121 及日本 Astellas 生产，批号：7560)及已过有效期约 5 年的头孢克肟样品(韩国 Hammi 生产，批号：04CFX-OSO2009)，按“3.4”项下的方法配制供试品溶液，在上述色谱条件下，检测头孢克肟主峰的纯度。结果 3 份样品主峰的峰纯度值均为 0.999 99，均大于其单点阈值(分别为 0.999 74，0.999 75，0.999 85)，表明主峰前后相邻杂质均能与主峰达到较好的分离，主峰的纯度较高。

REFERENCES

- [1] LVDWIG E. Cefixime in the treatment of respiratory and urinary tract infections [J]. *Chemotherapy*, 1998, 44(1): 31-34.
- [2] DADAM. Overview of the clinical features of cefixime [J]. *Chemotherapy*, 1998, 44(1): 1-5.
- [3] YOSHIMI M. Combination cefixime/Amoxicillin against penicillin-resistant streptococcus pneumoniae infection [J]. *Chemotherapy*, 1998, 44(1): 6-9.
- [4] HAMILTON M. Cefixime for switch therapy [J]. *Chemotherapy*, 1998, 44(1): 24-27.
- [5] 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.
- [6] HUO B F, ZHAO L M, QIU F, et al. Study on the content determination of cefixime and its pharmacokinetics in human plasma [J]. *West China J Pharm Sci* (华西药理学杂志), 2005, 20(4): 312-313.
- [7] WEI M J, LÜ Y, KANG Z S, et al. Pharmacokinetics and bioequivalence study of cefixime tablet in healthy volunteers [J]. *China J Clin Pharmacol* (中国临床药理学杂志), 2004, 20(1): 41-44.
- [8] BP2008[S]. 2008: 431-432.
- [9] USP31 [S]. 2008: 1671-1672.
- [10] EP 6th ed [S]. 2008: 1450-1451.
- [11] ZHOU Q Q, KUANG R H, LIU L S. Determination of cefixime and its related substances in capsules by RP-HPLC [J]. *Acta Acad Med Jiangxi* (江西医学院学报), 2004, 44(6): 21-23.
- [12] ZHOU Q L, ZHAN L, GAO F X, et al. Determination the content of cefixime in cefixime buccal tablets by RP-HPLC [J]. *China Pharm* (中国药师), 2006, 9(9): 800-801.
- [13] LI W H, ZHANG Y D, LI M Y. Determination of cefixim by RP-HPLC and its bioavailability in human serum [J]. *J Hunan Univ Sci Eng* (湖南科技学院学报), 2006, 27(8): 344-347.
- [14] XIE Q. Study on the quality standards of raw materials and capsules of cefixime [J]. *Jiangsu Pharm Clin Res* (江苏药学与临床研究), 2002, 10(1): 20-22.
- [15] HU M, HU C Q. Identification of the degradation compounds of cefathiamidine by liquid chromatography-tandam mass spectrometry [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2006, 41(10): 1015-1019.

收稿日期：2009-04-08