

高效液相色谱法测定头孢克肟的含量

骆雨璇, 吴苏亚, 陈 醒, 王 楠

【摘要】 目的 建立测定头孢克肟含量的高效液相方法。方法 采用高效液相色谱法, 色谱条件: 色谱柱为 Waters Symmetry C18 柱 (150 mm×4.6, 3.5 μm), 流动相为磷酸盐缓冲液 (0.025 mol/L 磷酸二氢钾溶液用磷酸调 pH 至 3.6)-乙腈 (90:10); 流速为 1.0 mL/min; 柱温 35 ℃; 检测波长 254 nm。结果 头孢克肟在 25.19 ~ 503.80 μg/mL 浓度范围内, 峰面积与浓度呈良好的线性关系 ($r=1.0000$); 头孢克肟检测限为 6.64 μg, 定量限为 22.14 μg; 平均回收率为 99.22% ($n=9$), 相对标准偏差 (RSD) 为 0.5%。含量测定结果与按《中国药典》2015 年版法定标准方法测定结果比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。结论 高效液相色谱法简便、可靠, 专属性强, 可用于头孢克肟的含量测定。

【关键词】 高效液相色谱法; 头孢克肟; 含量测定

【中图分类号】 R927.11 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1672-271X(2019)06-0621-04

【DOI】 10.3969/j.issn.1672-271X.2019.06.015

Determination of cefixime by HPLC

LUO Yu-xuan, WU Su-ya, CHEN Xing, WANG Nan

(Department of Pharmacy, General Hospital of Eastern Theater Command, PLA, Nanjing 210002, Jiangsu, China)

【Abstract】 Objective To establish a method for the determination of cefixime by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** HPLC method was used to detect the cefixime. Cefixime was separated on a Waters Symmetry C18 column (150 mm×4.6, 3.5 μm) with Phosphate buffer (0.025 mol/L Potassium dihydrogen phosphate solution was adjusted with phosphoric acid to pH 3.6) and acetonitrile (90:10) as mobile phase. The flow rate was 1.0 mL/min. The detection wavelength was 254 nm. The column temperature was 35 ℃. **Results** The calibration curve was linear within the range of 25.19-503.80 μg/mL for cefixime ($r=1.0000$). The limit of detection and limit of quantitation were 6.64 μg and 22.14 μg, respectively. The average recovery was 99.22% ($n=9$), RSD=0.5%. Statistical analysis by t-test showed no significant differences between the results obtained by HPLC and by ChP 2015 ($P>0.05$). **Conclusion** This method is simple, reliable and selective for the determination of cefixime.

【Key words】 high performance liquid chromatography; cefixime; content determination

0 引 言

头孢克肟是口服用的头孢类抗菌药, 对细菌所产生的 β-内酰胺酶高度稳定, 对大多数革兰阳性、革兰阴性菌具有非常强的抗菌活性, 可以抑制多数革兰阴性菌如嗜血、奈瑟球菌属和肠杆菌科的大多

数菌种, 临床上主要用于治疗尿道、呼吸道感染, 胆道炎胆囊炎等^[1], 药物不良反应较少, 尤其适用于儿童, 用于治疗小儿感染性腹泻^[2]、急性上呼吸道感染^[3-4]、支气管肺炎^[5-6]细菌性肠炎等^[7]。《中国药典》2015 年版^[8]及文献资料^[9-11]中头孢克肟及其制剂含量测定项下均为采用四丁基氢氧化铵溶液作为流动相的反相离子对液相色谱法, 其方法的不足之处是色谱柱对四丁基氢氧化铵有较强的吸附性, 使用该流动相后柱效和峰形不理想, 且色谱柱使用数十次后, 柱压上升, 柱效下降, 造成色谱柱使用寿命

作者单位: 210002 南京, 东部战区总医院(原南京军区南京总医院)
药品科(骆雨璇、吴苏亚、陈 醒、王 楠)

通信作者: 王 楠, E-mail: njpilicew@163.com

缩短,从而提高了检验成本^[12-14]。笔者参考文献[15-17]改进了含量测定的色谱条件,并研究其条件下的方法学参数,以便更加有效、可靠地测定头孢克肟制剂中头孢克肟的含量。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试药 Waters2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);Waters2998 型紫外检测器(美国 Waters 公司);Empower 色谱管理系统(美国 Waters 公司);METTLER TOLEDO SevenEasy 型 pH 计;KQ-250DB 数控超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司);FA1604S 电子天平(上海天平仪器厂);AE240 电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)。

头孢克肟胶囊购于山东罗欣药业(批号:616042273)、湖南方盛制药(批号:160806)、天津医药集团(批号:115019)、齐鲁制药(批号:509079NG);头孢克肟对照品(纯度:89.2%,批号:130503-201205)由中国食品药品检定研究院提供;乙腈和甲醇为 HPLC 级;磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、盐酸为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件与系统适应性试验 色谱柱:Waters Symmetry C18 柱(150 mm×4.6, 3.5 μm),流动相:0.025 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH3.6)-乙腈(90:10);流速:1.0 mL/min;柱温 35 ℃;检测波长 254 nm;进样量 20 μL。分别取系统适用性溶液、对照品溶液、供试品溶液、阴性样品溶液适量,注入液相色谱仪,在上述色谱条件下测定,记录色谱图。

1.2.2 溶液的制备 系统适应性溶液的制备:精密称取供试品 50 mg 于 50 mL 容量瓶中,加入 5 mL 甲醇使溶解,再加入 30 mL 水,置沸水浴中 45 min 后,放冷至室温,再加入流动相稀释至刻度,摇匀即得。

对照品溶液的制备:精密称取头孢克肟对照品适量,置于 25 mL 的容量瓶中,加流动相溶解后稀释至刻度,制成每 1 mL 中约含 500 μg 的溶液,即作为对照品贮备液。精密称取对照品适量,置于 50 mL 的容量瓶中,加流动相溶解后稀释至刻度,制成浓度约为 200 μg/mL 的溶液,即为对照品溶液。

供试品溶液的制备:精密称取供试品适量,置于 250 mL 的容量瓶中,加流动相溶解并稀释制成浓度约为 200 μg/mL 的溶液,即为供试品溶液。

阴性样品溶液:按处方称取辅料,照供试品溶液的配制方法配置阴性样品溶液。

降解溶液:①酸破坏:取供试品 50 mg,置于 50 mL 容量瓶中,加入甲醇 5 mL 使溶解,并加入 5 mL 1 mol/L 的盐酸溶液,静置 1 h,用 1 mol/L NaOH 溶液中和,用流动相稀释至刻度,摇匀即得。②碱破坏:取供试品 50 mg,置于 50 mL 容量瓶中,加入甲醇 5 mL 使溶解,并加入 3 mL 0.1 mol/L NaOH 溶液,静置 10 min 后倒入 0.1 mol/L 的 HCl 溶液使中和,并用流动相稀释至刻度,摇匀即得。③氧化破坏:取供试品 50 mg,置于 50 mL 容量瓶中,加入甲醇 5 mL 使溶解,再加入 3% 过氧化氢溶液 5 mL,静置 1 h,用流动相稀释至刻度,摇匀即得。④水解破坏:取供试品 50 mg,置于 50 mL 量瓶中,加入甲醇 5 mL 使溶解,再加水 30 mL,并置于沸水浴中 45 min,放冷,用流动相稀释至刻度,摇匀即得。⑤加热破坏:取供试品 50 mg,置于 105 ℃ 加热 3 h,放冷,倒于 50 mL 容量瓶中,加甲醇 5 mL 使溶解,并用流动相稀释至刻度,摇匀即得。⑥光照破坏:取供试品 50 mg,在 254 nm 紫外光灯下照射 24 h 后置于 50 mL 容量瓶中,加入甲醇 5 mL 使溶解,并用流动相稀释至刻度,摇匀即得。

1.2.3 方法学考察 专属性试验:分别精密量取“1.2.2”项下的降解溶液 20 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图。

耐用性试验:分别选用 Waters Sunfire、资生堂 Capcell PAK MG II、Waters xBridge、GRACE Alltima、Waters Symmetry 5 种 C₁₈ 色谱柱,分别进行系统适用性试验。

线性关系考察:精密量取“1.2.2”项下的对照品贮备液适量,并用流动相稀释制成浓度分别为 25.19、50.38、100.76、125.95、201.52、251.90、503.80 μg/mL 的系列溶液,精密吸取上述各浓度的溶液 20 μL,注入液相色谱仪,按上述色谱条件进样,记录色谱图。以各对照品浓度为横坐标,以峰面积为纵坐标,计算回归方程。

检测限和定量限:精密量取“1.2.2”项下对照品溶液适量,用流动相依次稀释后注入液相色谱仪,记录色谱图。

精密度试验:取对照品溶液,连续进样 6 次,按“1.2.1”项下色谱条件进样,记录峰面积。

稳定性试验:取同一供试品溶液(批号:615042273)分别于 0、2、4、8、10 h 后按上述色谱条件进样。

重复性试验:取同一供试品(批号:

615042273),按“1.2.2”项下方法配置 6 份供试品溶液,按“1.2.1”项下色谱条件进样。

加样回收率:按以上色谱条件测量供试品溶液的浓度,精密量取已测浓度的供试品溶液 5 mL,共 9 份,置 20 mL 容量瓶中,分别精密加入对照品溶液 3、5、7 mL,分别加 3 份,分别加流动相稀释至刻度,按以上色谱条件进样,记录峰面积,计算加样回收率。

1.2.4 含量测定 按“1.2.2”项下方法配置对照品溶液和供试品溶液,分别量取 20 μ L 注入液相色谱仪,记录色谱图,按外标法计算头孢克肟的含量,并与用《中国药典》2015 版头孢克肟含量测定项下的方法测得的结果进行比较。

2 结 果

2.1 系统适用性试验 头孢克肟峰理论塔板数为 5161(≥ 3000),对照品溶液与供试品溶液中主峰保留时间一致,头孢克肟峰与热分解产物(E)异构体峰的分离度 >2.0 ,阴性样品溶液不干扰测定,见图 1。

2.2 含量测定 经方法专属性试验结果表明,头孢克肟经酸、碱、氧化、水解、加热、光照破坏,所生成的主峰与杂质峰均能有效分离,表明方法的专属性强。用 5 种色谱柱分析发现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。头孢克肟在 25.19 ~ 503.80 μ g/mL 范围内有良好的线性关系,回归方程为 $Y=38430X+55735$, $r=1.0000$ 。按信噪比为 3:1 测定检测限为 6.64 μ g,按信噪比为 10:1 测定定量限为 22.14 μ g。精密度试验表明头孢克肟峰面积的相对标准偏差(RSD)为 0.05%,精密度良好。稳定性试

验结果头孢克肟峰面积 RSD 为 0.15%,表明供试品溶液在 10 h 内稳定性良好。重复性试验测得头孢克肟含量平均值为 94.87%,RSD 为 0.82%,表明重复性良好。加样回收率试验显示头孢克肟平均回收率为 99.22%,RSD 为 0.5%,见表 1。

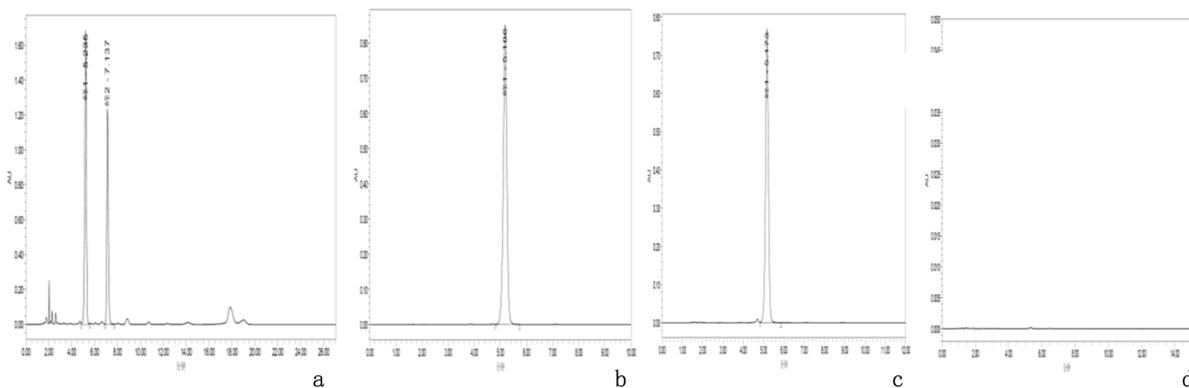
表 1 头孢克肟加样回收试验结果

已知量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
		1.5363	98.33		
	0.6219	1.5367	98.36		
		1.5527	99.38		
		1.9638	99.34		
0.9404	1.0365	1.9712	99.71	99.22	0.5
		1.9638	99.34		
		2.3786	99.46		
	1.4511	2.3840	99.69		
		2.3754	99.33		

2.3 样品的含量测定 经配对 t 检验,高效液相色谱法含量测定结果与按《中国药典》2015 年版头孢克肟含量测定方法测得的结果比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。2 种方法测得头孢克肟含量的最大偏差为 0.39%。

表 2 两种头孢克肟含量测定结果比较 (%)

批号	高效液相色谱法	中国药典 2015 年版方法
617042273	96.54	96.57
170806	100.41	100.02
509079NG	101.05	101.28
117019	102.04	102.19



a:系统适用性溶液;b:对照品溶液;c:供试品溶液;d:阴性样品溶液

图 1 头孢克肟高效液相色谱图

3 讨 论

3.1 流动相 pH 的确定 因头孢克肟的分子结构中含有弱酸性的基团羧基及弱碱性的基团氨基,所以可以通过调节溶液 pH 来改变其解离状态,从而调节其在反相色谱上的保留时间^[9]。

本试验采用固定磷酸盐缓冲液的浓度为 0.025 mol/L,乙腈含量为 10%,改变流动相的 pH 值为 3.0、3.2、3.4、3.6、3.8、4.0、4.2,从而考察系统适用性溶液中不同 pH 流动相对头孢克肟峰及头孢克肟 E 异构体峰的保留时间、分离度以及头孢克肟峰与其前后相邻杂质峰分离度的影响。实验结果表明,随着 pH 的增加,头孢克肟峰与头孢克肟 E 异构体峰的分度、理论塔板数逐渐减小,另考虑酸性过大时, C₁₈ 基团可能会断裂,综合各因素,本试验方法采用 pH 为 3.6 的磷酸盐缓冲液作为流动相,此时头孢克肟有较为合适的保留时间,理论板数、峰形也较为理想,头孢克肟与头孢克肟 E 异构体的分离度大于 2.0。

3.2 磷酸盐缓冲液与乙腈比例的优化 固定流动相 pH 为 3.6,改变乙腈含量为 5%、10%、15%,观察乙腈含量的变化对头孢克肟峰及头孢克肟 E 异构体峰的保留时间、头孢克肟峰与其前后相邻杂质峰分离度的影响,实验结果表明,乙腈含量为 5% 时,头孢克肟峰的保留时间较长,乙腈含量为 15% 时,头孢克肟峰与头孢克肟 E 异构体峰无法分离,当乙腈含量为 10% 时,头孢克肟峰及头孢克肟 E 异构体峰保留时间适中,分离度也较好,所以本实验选用乙腈的含量为 10%。

本试验经过一系列方法学验证结果得出,文中所建立的含量测定方法操作简便、专属性好,不仅能准确、可靠地测定头孢克肟的含量,还有效地改善了《中国药典》中所使用的四丁基氢氧化铵流动相对色谱柱的损害问题。

[参考文献]

[1] 何礼贤.第3代口服头孢菌素的临床应用[J].中国新药与临

床杂志,2004,23(11):744-746.

- [2] 吴维实,陈金妮.小儿感染性腹泻的影响因素分析及头孢克肟干预的临床疗效观察[J].贵州医药,2018,42(12):1455-1457.
- [3] 罗迪.小儿宝泰康颗粒联合头孢克肟治疗儿童急性上呼吸道感染研究[J].智慧健康,2019,5(1):118-119.
- [4] 戴海燕,张渊博,黄丽密.头孢菌素治疗小儿上呼吸道感染效果分析[J].中国妇幼健康研究,2018,29(12):1617-1619.
- [5] 高胜.支气管肺炎患儿的抗生素治疗效果分析[J].首都食品与医药,2018(24):49.
- [6] 张文婷.甲泼尼龙治疗小儿难治性肺炎支原体肺炎的效果研究[J].当代医药论丛,2018,16(24):77-78.
- [7] 崔树举.双歧杆菌四联活菌联合头孢克肟治疗37例细菌性肠炎患儿的临床研究[J].北方药学,2019,16(1):44-45.
- [8] 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,2015:255-256.
- [9] 张媚,金乐红,唐婷.高效液相色谱法测定头孢克肟咀嚼片的含量[J].健康研究,2011,31(1):9-11.
- [10] 方韵,田杰.头孢克肟分散片溶出度 HPLC 法与 UV 分光光度法测定结果的比较[J].抗感染药学,2013,10(3):200-202.
- [11] 王玮.HPLC法测定头孢克肟胶囊含量的不确定度的评价[J].安徽医药,2010,14(11):1284-1286.
- [12] 张慧文,关倩明,林玲,等.RP-HPLC测定头孢克肟的有关物质[J].中国抗生素杂志,2010(3):209-213.
- [13] 任海洋,陈翠.反相高效液相梯度洗脱法测定脑络口服液中阿魏酸的含量[J].东南国防医药,2010,12(2):125-127.
- [14] 汤溟,崔恩忠,唐安福,等.高效液相色谱-蒸发光散射法测定气血双补口服液中黄芪甲苷的含量[J].医学研究生学报,2013,26(3):287-289.
- [15] 张慧文,肖彦琨.RP-HPLC测定头孢克肟的含量[J].中国现代应用药学,2009,26(12):1026-1029.
- [16] 秦黎明,周月霞.HPLC法测定头孢克肟颗粒的含量[J].中国伤残医学,2013,21(8):294-295.
- [17] 刘正芳,陈芳芳.头孢克肟及其片剂 RP-HPLC 流动相优化与定量分析[J].中国现代药物应用,2009,3(19):78-79.

(收稿日期:2019-02-25; 修回日期:2019-08-15)

(责任编辑:叶华珍; 英文编辑:朱一起)