

## HPLC 法测定头孢克肟分散片中有关物质

安明, 常珍, 吕宁, 郭彩强, 宝金歌

北京华睿鼎信科技有限公司, 北京 100023

**摘要:** 目的 建立 HPLC 法检测头孢克肟分散片中有关物质。方法 采用 Inertsil ODS-3 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 四丁基氢氧化铵溶液-乙腈 (75:25); 检测波长: 254 nm; 柱温: 40 °C; 体积流量: 调整流速使头孢克肟主峰保留时间在 15~20 min; 进样体积: 20 μL。结果 该法专属性良好, 干扰性符合相关要求, 头孢克肟与相邻杂质以及各已知杂质之间的分离均良好; 头孢克肟和各已知杂质的质量浓度与峰面积之间线性关系均良好 ( $r > 0.9995$ ); 精密度、准确度和耐用性均良好; 头孢克肟分散片 6 批自制品与 3 批参比制剂的杂质谱基本一致, 各批样品均符合制订质量标准的规定。结论 所建立的方法可用于简便、快速、准确地检测头孢克肟分散片中有关物质。

**关键词:** 头孢克肟分散片; 有关物质; 高效液相色谱

中图分类号: R914

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2021)10-2023-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2021.10.006

## Determination of related substances in Cefixime Dispersible Tablets by HPLC

AN Ming, CHANG Zhen, LÜ Ning, GUO Cai-qiang, BAO Jin-ge

Beijing Horicin Biotechnology Co., Ltd., Beijing 100023, China

**Abstract: Objective** To establish a method for the determination of related substances in Cefixime Dispersible Tablets by HPLC.

**Methods** The chromatographic separation of the related substances was performed on an Inertsil ODS-3 column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) with tetrabutylammonium hydroxide solution-acetonitrile (75:25) as mobile phase. The detection wavelength was 254 nm. The column temperature was 40 °C. Volume flow rate adjusted the flow rate so that the retention time of the main peak of cefixime was 15—20 min with injection volume of 20 μL. **Results** The established method had good specificity, satisfactory interference, and there was a good separation between cefixime and adjacent impurity and known impurity. The linear relationship between concentration and corresponding peak area of cefixime and all related substances were ideal ( $r > 0.9995$ ). The precision, accuracy, and durability of this method were fine. The impurity spectra of 6 batches of self-made preparations and 3 batches of reference preparations of cefixime dispersible tablets were basically consistent, complying with the established quality standards.

**Conclusion** The established method is simple, prompt, and accurate, which can be used to determine the related substances in Cefixime Dispersible Tablets.

**Key words:** Cefixime Dispersible Tablets; related substance; HPLC

头孢克肟为口服半合成第 3 代头孢菌素类抗生素, 具有广谱抗菌活性, 对链球菌、肺炎球菌、淋球菌、肠杆菌属等具有优良的抗菌活性, 临床主要用于治疗呼吸道感染、耳鼻喉部感染、泌尿道感染、妇科感染等<sup>[1-5]</sup>。由于其疗效高, 不良反应轻微, 因此在临床上被广泛应用。头孢克肟分散片是近年来国内上市的新剂型, 对于其临床应用已有多篇文献报道<sup>[6-8]</sup>, 也有关于其制备和质量研究的报道<sup>[9-10]</sup>, 但尚未见对其有关物质进行系统研究的文献。头孢

菌素类药物中杂质种类非常多, 且其杂质与临床不良反应密切相关, 故头孢菌素类药物中有关物质研究已经成为近年来国家药监和药检部门极为重视的质控重点之一。因此, 研究并控制头孢克肟分散片中有关物质对于保证药品质量和临床用药安全具有重要意义。

《中国药典》2020 年版中收录了头孢克肟原料药及其多种制剂, 包括头孢克肟片、头孢克肟胶囊、头孢克肟颗粒; 《美国药典》(USP 43)、《欧洲药典》

收稿日期: 2021-08-09

作者简介: 安明 (1966—), 男, 山东曹县人, 研究员, 硕士, 主要从事药品研发工作。E-mail: anminguv@126.com

(EP 10.0)、《英国药典》(BP 2019) 和《日本药典》(JP 17) 均收录了头孢克肟原料药; USP 43 收录了头孢克肟片剂、混悬剂, JP 17 收录了头孢克肟胶囊。现行各国药典对头孢克肟中有关物质检查项做了规定, 均为以主成分自身对照法计算单个杂质、总杂质<sup>[11-15]</sup>。本研究在参照上述药典标准和相关文献报道方法<sup>[16-17]</sup>的基础上, 建立了头孢克肟分散片中有关物质检测的高效液相色谱 (HPLC) 法, 并对方法学进行了全面系统的验证, 对多个批次的头孢克肟分散片自制品进行了有关物质检测, 与参比制剂进行了比较。

## 1 仪器与试药

### 1.1 仪器

LC-20A 型高效液相色谱仪, 包括 LC-20AT 型二元高压梯度泵、SIL-20AC 型自动进样器、CTO-20AC 型柱温箱、SPD-20A 型二极管阵列检测器、Labsolution 工作站 (日本岛津公司); MS105DU 型电子天平 (美国梅特勒托利多公司)。

### 1.2 试药

头孢克肟原料药 (批号 8152DJ81SK, 齐鲁安替制药有限公司); 头孢克肟对照品 (批号 130503-201706, 质量分数 89.2%, 中国食品药品检定研究院); 头孢克肟分散片自制品 (批号 170382、170688、170689、170690、170782、170983); 头孢克肟分散片参比制剂 (批号 BF081、CB011、CG121, 日本长生堂制药株式会社); 杂质 A (2-[[*(Z)*-2-(2-氨基-4-噻唑基)-2-[(羧基甲氧基)亚氨基]乙酰基]氨基]-2-[(2*R*)-5-甲基-7-氧代-1,2,5,7-四氢-4*H*-咪喃并[3,4-*d*][1,3]噻嗪-2-基]乙酸, 批号 17-11-0221, 质量分数 96.47%, Sinco 公司); 杂质 B (2-[[*(Z)*]-[1-(2-氨基-4-噻唑基)-2-[[[(2*R*,5*RS*)-5-甲基-7-氧代-1,2,5,7-四氢-4*H*-咪喃并[3,4-*d*][1,3]噻嗪-2-基]甲基]氨基]-2-氧代亚乙基]亚氨基]氧基]乙酸, 批号 1367-054A3, 质量分数 97.9%, TLC 公司); 杂质 C ((6*R*,7*S*)-7-[(*Z*)-2-(2-氨基-4-噻唑基)-2-[(羧甲氧基)亚氨基]乙酰胺基]-8-氧代-3-乙烯-5-硫杂-1-氮杂二环[4,2,0]辛-2-烯-2-羧酸, 批号 1575-091A1, 质量分数 94.8%, TLC 公司); 杂质 D ((6*R*,7*R*)-7-[[*(E)*]-2-(2-氨基-噻唑基)-2-[(羧甲氧基)亚氨基]乙酰基]氨基]-8-氧代-3-乙烯-5-硫杂-1-氮杂二环[4,2,0]辛-2-烯-2-羧酸, 批号 2235-089A6, 质量分数 96.8%, TLC 公司); 杂质 E ((6*R*,7*R*)-7-[[*(Z)*]-2-(2-氨基-4-噻唑基)-

2-[(羧基甲氧基)亚氨基]乙酰基]氨基]-3-甲基-8-氧代-5-硫杂-1-氮杂二环[4,2,0]辛-2-烯-2-羧酸, 批号 1370-058A5, 质量分数 97.0%, TLC 公司); 杂质 F ((6*R*,7*R*)-7-[[*(Z)*]-2-(2-氨基-4-噻唑基)-2-[(2-乙氧基-2-氧代乙氧基)亚氨基]乙酰基]氨基]-3-乙烯-8-氧代-5-硫杂-1-氮杂二环[4,2,0]辛-2-烯-2-羧酸, 批号 PHYS0603-F01, 质量分数 96.1%, 深圳菲斯生物科技有限公司); 头孢克肟甲酯 (批号 180621, 质量分数 97.63%, 北京华睿鼎信科技有限公司); 乙腈 (HPLC 级, Honeywell 公司); 10% 四丁基氢氧化铵水溶液、磷酸、磷酸二氢钾、无水磷酸氢二钠 (AR, 国药集团化学试剂有限公司); 水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

Inertsil ODS-3 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 四丁基氢氧化铵溶液 (取 10% 的四丁基氢氧化铵溶液 25 mL, 加水 1 000 mL, 用 1.5 mol/L 磷酸溶液调节 pH 值至 6.5) - 乙腈 (75 : 25); 溶剂: 磷酸盐缓冲液 (用 13.6 g/L 磷酸二氢钾调节 14.2 g/L 磷酸氢二钠溶液 pH 值至 7.0); 检测波长: 254 nm; 柱温: 40 °C; 体积流量: 调整流速使头孢克肟主峰保留时间在 15~20 min; 进样体积: 20 μL; 洗脱时间: 3 倍主峰保留时间。

### 2.2 系统适用性

取头孢克肟对照品适量, 加水溶解并稀释制成约含 1 mg/mL 的溶液, 于沸水浴上加热 45 min, 冷却。取 20 μL 注入液相色谱仪, 按杂质 D、头孢克肟的顺序出峰, 调整体积流量, 使头孢克肟峰保留时间为 15~20 min, 杂质 D 峰与头孢克肟峰间的分离度应符合要求。

### 2.3 溶液的配制

取头孢克肟分散片 10 片, 精密称定, 研细, 精密称取细粉适量 (约相当于头孢克肟 0.1 g), 置 100 mL 量瓶中, 加溶剂溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得供试品溶液 (质量浓度 1 mg/mL)。

精密量取供试品溶液适量, 用溶剂定量稀释制成 0.01 mg/mL 的溶液, 即得对照溶液 (质量浓度 0.01 mg/mL)。

### 2.4 有关物质相对保留时间和校正因子

杂质 A、B、C、D、E、F 和头孢克肟甲酯的结构式见图 1, 杂质 A、B、C、D、E 的相对保留时间和相对校正因子见表 1。

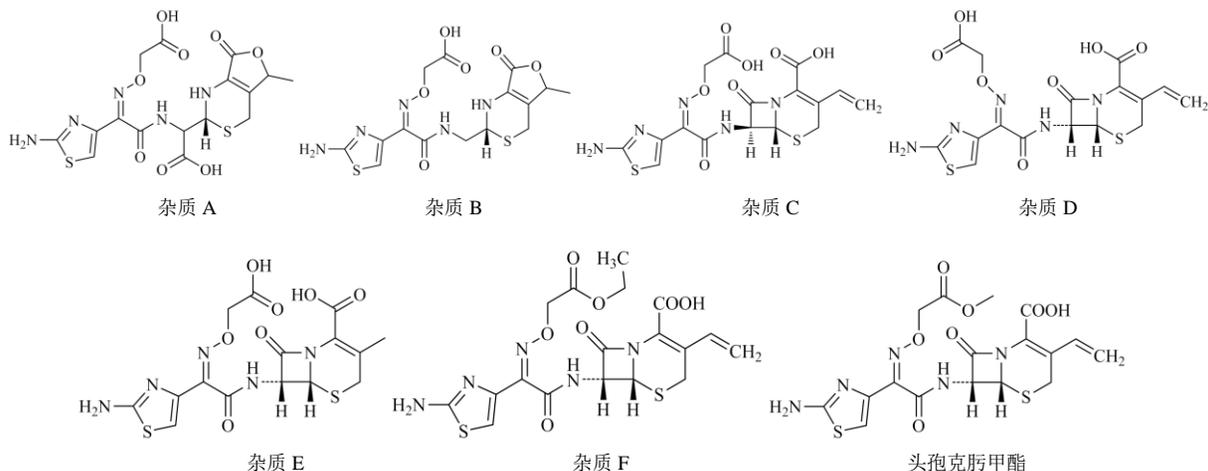


图 1 各有关物质结构式

Fig. 1 Structural formula of various related substances

表 1 各有关物质相对校正因子和相对保留时间

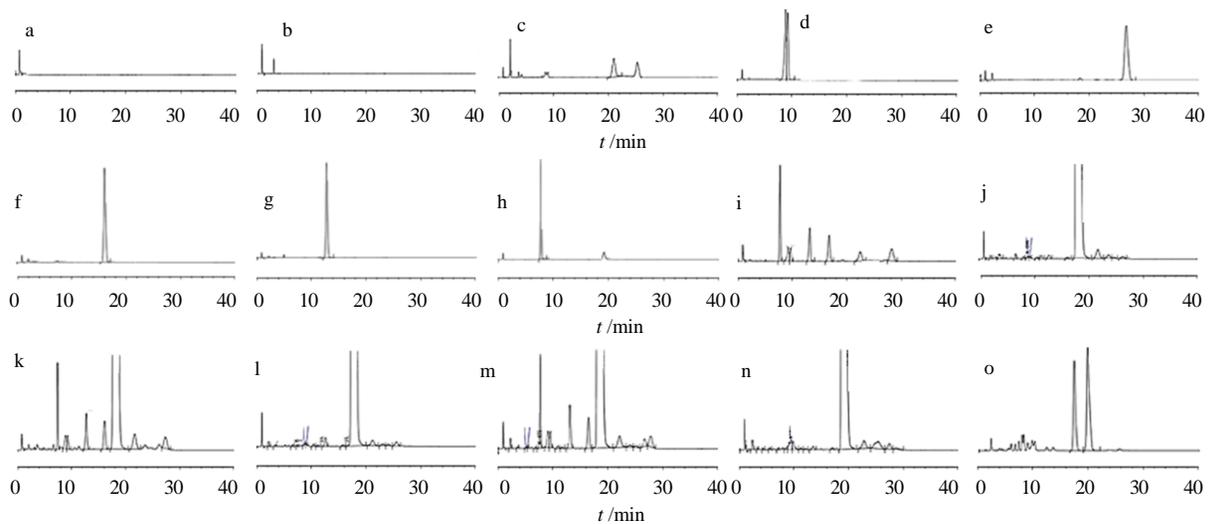
Table 1 Relative correction factor and relative retention time of various related substances

杂质名称	相对校正因子	相对保留时间
A	1.6	1.19~1.22
B	1.3	0.49~0.55, 0.51~0.57
C	1.7	1.46~1.62
D	1.0	0.90~0.93
E	1.0	0.68~0.77

## 2.5 专属性试验

精密称取头孢克肟甲酯及杂质 A、B、C、D、E 对照品 9.85、5.00、5.08、5.62、5.21、5.29 mg，分别置 10 mL 量瓶中，加流动相溶解并稀释至刻度，摇匀，作为各杂质对照品贮备液。精密量取各杂质对照品贮备液 2.0 mL，分别置 10 mL 量瓶中，以溶剂稀释至刻度，摇匀，滤过，即得各杂质对照品溶液。精密量取头孢克肟甲酯及杂质 A、B、C、D、E 对照品贮备液各 1.0 mL，置同一 10 mL 量瓶中，以溶剂稀释至刻度，摇匀，即得混合杂质对照品贮备液（5 倍限度）。精密称取头孢克肟对照品约 10 mg，置 10 mL 量瓶中，以水稀释至刻度，水浴加热 45 min，放冷，滤过，即得系统适用性溶液。精密量取混合杂质对照品贮备液（5 倍限度）2.0 mL，置 10 mL 量瓶中，以溶剂稀释至刻度，摇匀，滤过，即得混合杂质溶液。精密称取处方比例的空白辅料 120 mg，置 50 mL 量瓶中，加溶剂溶解并稀

释至刻度，摇匀，滤过，即得空白辅料溶液。精密称取头孢克肟分散片自制品（批号 170382）细粉约 170 mg，置 50 mL 量瓶中，加溶剂溶解并稀释至刻度，摇匀，滤过，即得自制品溶液。精密称取头孢克肟分散片自制品细粉约 34 mg，置 10 mL 量瓶中，加溶剂适量溶解，精密加入 5 倍混合杂质对照品限度贮备液 2.0 mL，以溶剂稀释至刻度，摇匀，滤过，即得自制品+混合杂质溶液。精密称取头孢克肟分散片参比制剂（批号 BF081）颗粒约 1 000 mg，置 50 mL 量瓶中，加溶剂溶解并稀释至刻度，摇匀，滤过，即得参比制剂溶液。精密称取参比制剂颗粒约 200 mg，置 10 mL 量瓶中，加溶剂溶解，精密加入 5 倍混合杂质对照品限度贮备液 2.0 mL，以溶剂稀释至刻度，摇匀，滤过，即得参比制剂+混合杂质溶液。精密称取头孢克肟原料药约 10 mg，置 10 mL 量瓶中，加溶剂溶解并稀释至刻度，摇匀，滤过，即得原料药溶液。精密量取上述溶液各 20  $\mu$ L，分别注入液相色谱仪，记录色谱图，见图 2。可知空白溶剂、空白辅料溶液对测定无干扰；主峰与相邻杂质峰之间以及各已知杂质峰之间均能很好分离；自制品、原料药中均检出杂质 A、B、D、E，未检出杂质 C 和头孢克肟甲酯；参比制剂中检出头孢克肟甲酯、杂质 A、B、D、E，未检出杂质 C；原料药、自制品中最大未知杂质均位于约 23.4 min 处，参比制剂在 23.4 min 处亦有杂质。结果表明，头孢克肟原料药、头孢克肟分散片自制品与参比制剂的杂质谱基本一致，说明本方法专属性良好。



a-空白溶剂 b-空白辅料溶液 c-杂质 A d-杂质 B e-杂质 C f-杂质 D g-杂质 E h-头孢克肟甲酯 i-混合杂质 j-自制品 k-自制品+混合杂质 l-参比制剂 m-参比制剂+混合杂质 n-原料药 o-系统适用性溶液  
 a-blank solvent b-blank excipient solution c-impurity A d-impurity B e-impurity C f-impurity D g-impurity E h-cefixime methyl ester i-mixed impurities j-self-made preparation k-self-made preparation + mixed impurities l-reference preparation m-reference preparation + mixed impurities n-drug substance o-system suitability solution

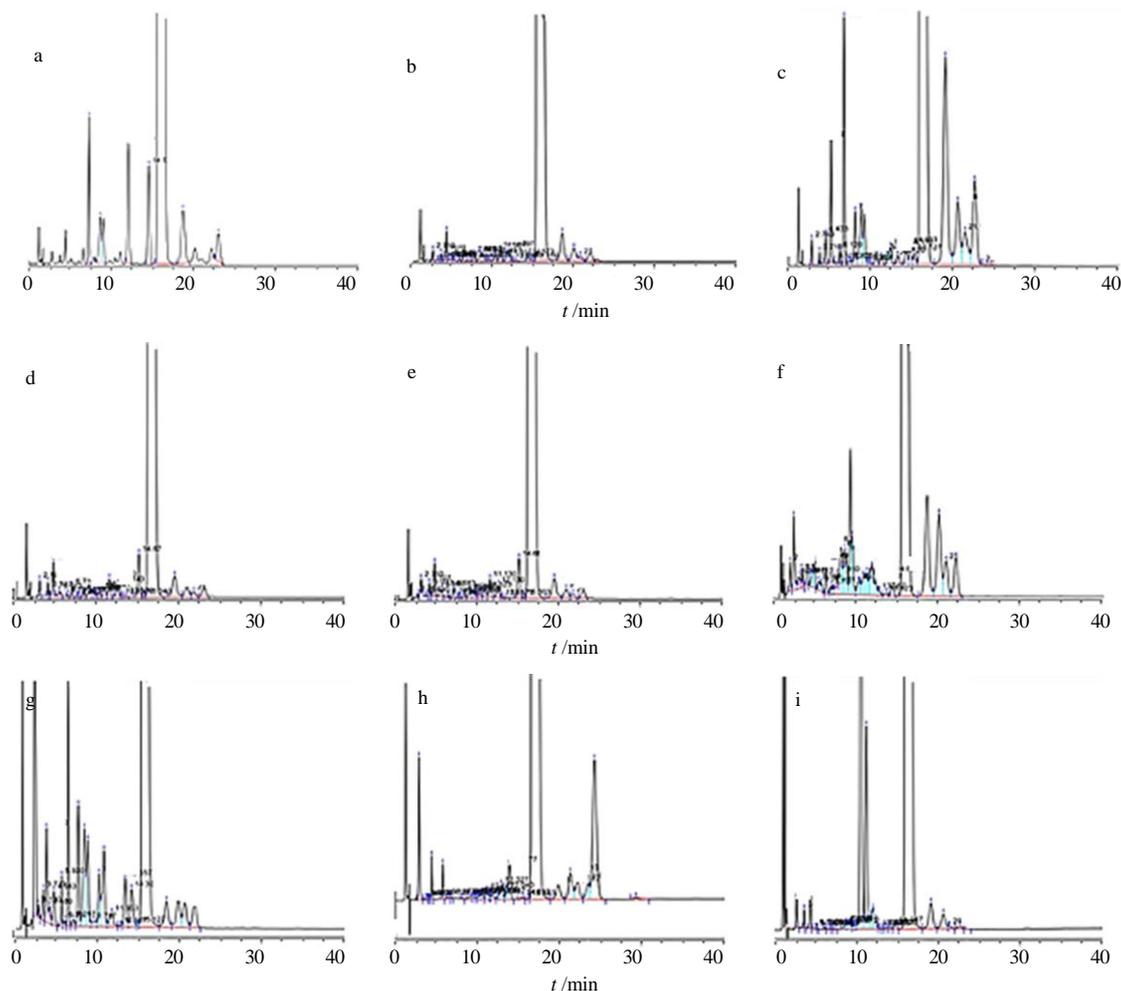
图 2 专属性试验色谱图

Fig. 2 Chromatograms of specificity test

## 2.6 干扰性试验

精密称取头孢克肟分散片自制品（批号 170382）细粉约 170 mg，置 50 mL 量瓶中，加溶剂溶解并稀释至刻度，摇匀，滤过，即得自制品溶液。精密称取头孢克肟分散片参比制剂（批号 BF081）颗粒约 1 000 mg，置 50 mL 量瓶中，加溶剂溶解并稀释至刻度，摇匀，滤过，即得参比制剂溶液。精密称取头孢克肟分散片自制品细粉约 34 mg，置 10 mL 量瓶中，加溶剂适量溶解，精密加入 5 倍限度混合杂质对照品贮备液 2.0 mL，以溶剂稀释至刻度，摇匀，滤过，即得自制品+混合杂质溶液。精密称取空白辅料约 60 mg、自制品约 85 mg、参比制剂约 500 mg，分别置 25 mL 量瓶中，加溶剂溶解并稀释至刻度，摇匀，滤过，即得未破坏溶液。精密称取空白辅料约 60 mg、自制品约 85 mg、参比制剂约 500 mg，分别于 80 °C 干燥箱中破坏 24 h（高温破坏）；5 000 lx 破坏 7 d（光照破坏）；白光 5 000 lx、紫外光 200 W/m<sup>2</sup> 破坏 7 d（紫外光照破坏）；温度 50 °C、湿度 92.5% 破坏 4 d（湿热破坏）。取各样品溶液分别置 25 mL 量瓶中，加溶剂溶解并稀释至刻度，摇匀，滤过，作为相应破坏条件的供试品溶液。精密称取空白辅料约 60 mg、自制品约 85 mg、参比制剂约 500 mg，分别置于 25 mL 量瓶中，分别

加入 2 mol/L 盐酸溶液 1 mL 破坏 24 h 后，加入 2 mol/L 氢氧化钠溶液 1 mL 中和（强酸破坏）；加入 1 mol/L 氢氧化钠溶液 1 mL 破坏 1 min，立即加入 1 mol/L 盐酸溶液 1 mL 中和（强碱破坏）；加入 30% 过氧化氢溶液 1 mL 避光破坏 1 min（氧化破坏）。分别加溶剂溶解并稀释至刻度，摇匀，滤过，分别作为相应破坏条件的供试品溶液。量取 1 mol/L 氢氧化钠溶液和 1 mol/L 盐酸溶液各 1 mL，置 25 mL 量瓶中，加溶剂溶解并稀释至刻度，摇匀，滤过，即得酸碱破坏空白溶液。取 30% 过氧化氢溶液 1 mL，置 25 mL 量瓶中，加溶剂溶解并稀释至刻度，摇匀，滤过，即得氧化破坏空白溶液。精密量取上述溶液各 20 μL，分别注入液相色谱仪，记录色谱图，见图 3。由结果可知，空白辅料在各条件下破坏后，对测定无干扰。各破坏条件下的自制品和参比制剂经二极管阵列（PDA）检测器测定主峰纯度，均为单一峰。自制品和参比制剂在强酸、强碱、氧化、湿热、高温条件下不稳定，在光照和紫外光照射下相对稳定。具体如下：强碱破坏条件下，自制品和参比制剂中杂质 C、其他单个最大杂质、总杂质均有明显增加。氧化破坏条件下，自制品和参比制剂中单个最大杂质、总杂质有明显增加。强酸破坏条件下，自制品和参比制剂中杂质 C、D 略有增



a-自制品+混合杂质溶液（未破坏） b-自制品溶液（未破坏） c-自制品溶液（高温破坏） d-自制品溶液（光照破坏） e-自制品溶液（紫外光照破坏） f-自制品溶液（湿热破坏） g-自制品溶液（强酸破坏） h-自制品溶液（强碱破坏） i-自制品溶液（氧化破坏）  
 a-self-made preparation + mixed impurities solution (undamaged) b-self-made preparation solution (undamaged) c-self-made preparation solution (high temperature damaged) d-self-made preparation solution (light damaged) e-self-made preparation solution (ultraviolet light damaged) f-self-made preparation solution (high temperature and dense moisture damaged) g-self-made preparation solution (strong acid damaged) h-self-made preparation solution (strong alkali damaged) i-self-made preparation solution (strong oxidants damaged)

图 3 干扰性试验色谱图

Fig. 3 Chromatograms of interference test

加, 杂质 B、其他单个最大杂质、总杂质明显增加。湿热破坏条件下, 自制品中杂质 B、E 略有增加, 杂质 A、其他单个最大杂质、总杂质明显增加; 参比制剂中杂质 A、B、D、其他单个最大杂质、总杂质均明显增加。高温破坏条件下, 自制品中杂质 B、D、其他单个最大杂质略有增加, 杂质 A、总杂质明显增加; 参比制剂中杂质 B 略有增加, 杂质 A、其他单个最大杂质、总杂质明显增加。光照破坏条件下和紫外光加白光破坏条件下, 自制品和参比制剂中杂质 D、总杂质均略有增加, 其他杂质无明显变化。破坏前后物料平衡率计算结果表明: 除湿热

破坏条件下可能由于样品吸湿增重导致物料守恒结果偏低(物料平衡率: 自制品 80.8%, 参比制剂 80.2%) 之外, 其他破坏条件下破坏前后物料守恒(物料平衡率在 89.4%~117.1%)。可见, 本方法干扰性符合相关要求。

## 2.7 线性范围

分别精密称取头孢克肟对照品 9.44、10.08、11.60、12.26、13.67 mg, 置于不同的 10 mL 量瓶中, 分别加溶剂溶解并稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 制得头孢克肟(主成分)高浓度线性溶液(对应表 2 中质量浓度范围 842.048~1 219.364  $\mu\text{g/mL}$ )。分别取

头孢克肟和各杂质对照品适量，制备头孢克肟、头孢克肟甲酯、杂质 A、B、C、D、E 的质量浓度分别为 1、1、0.1、0.5、0.5、0.5、0.5 mg/mL 的溶液，作为各自的贮备液。分别取头孢克肟贮备液 1 mL、头孢克肟甲酯贮备液 1 mL，杂质 B、C、D、E 贮备液各 2 mL，置同一 20 mL 量瓶中，用溶剂稀释至刻度，摇匀，作为 5 倍贮备溶液。分别量取 5 倍贮备溶液 0.1、0.25、0.5、1、2、3 mL，置不同 10 mL 量瓶中，用溶剂稀释至刻度，将该系列溶液和定量限浓度溶液，作为头孢克肟（主成分）低浓度（对

应表 2 中质量浓度范围 0.146~14.611 μg/mL）、头孢克肟甲酯、杂质 B、C、D、E 的线性溶液。分别取杂质 A 贮备液 0.1、0.25、0.5、1、2、3 mL，置不同 10 mL 量瓶中，用溶剂稀释至刻度，作为杂质 A 的线性溶液。取上述各线性溶液 20 μL，进样测定，记录色谱图。以质量浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，进行线性回归，计算线性方程，结果见表 2。头孢克肟有 2 个线性方程，其中方程 1 对应限度质量浓度范围的线性，方程 2 对应有物质检测时供试品质量浓度的线性。

表 2 头孢克肟和各有关物质的线性方程

Table 2 Linear equation of cefixime and various related substances

样品名称	线性方程	r	范围/(μg·mL <sup>-1</sup> )
头孢克肟（主成分）	A <sub>1</sub> =16 093.153 9 C+270.676 3	0.999 9	0.146~14.611
	A <sub>2</sub> =15 526.437 3 C+46 4161.220 3	0.999 9	842.048~1 219.364
头孢克肟甲酯	A=13 751.037 7 C+672.863 5	0.999 9	0.084~14.425
杂质 A	A=9 123.376 1 C+1 718.545 5	0.999 8	0.452~13.573
杂质 B	A=13 105.463 5 C-616.775 8	0.999 9	0.252~15.118
杂质 C	A=9 201.991 9 C+294.617 3	0.999 9	0.235~14.078
杂质 D	A=15 540.102 5 C+563.381 9	0.999 8	0.126~15.130
杂质 E	A=16 226.718 6 C+552.060 2	0.999 9	0.103~15.394

结果表明：主成分头孢克肟与各已知杂质（头孢克肟甲酯及杂质 A、B、C、D、E）在上述质量浓度范围内，质量浓度与峰面积的线性相关系数均达到 0.999 5 以上，各杂质和主峰的截距/限度质量浓度峰面积均小于 10%，各峰响应因子的 RSD 值均 ≤ 10%。因此各杂质质量浓度与峰面积线性关系均良好。

### 2.8 定量限与检测限

取 2.7 项下各溶液，以溶剂逐步稀释，精密量取 20 μL，注入液相色谱仪，记录色谱图，按峰高约为基线噪音 10、3 倍分别作为定量限 (S/N ≥ 10) 和检测限 (S/N ≥ 3)。主成分头孢克肟和各有关物质的定量限和检测限结果见表 3。

由上述结果可见，0.002% 的头孢克肟甲酯、0.006% 的杂质 A、B、C，0.003% 的杂质 D、E 均能被有效检出；头孢克肟的检测限相当于供试品溶液主成分浓度的 0.004%，表明 0.004% 的未知杂质能被有效检出。可见头孢克肟和各杂质的检测限完全满足头孢克肟分散片中有关物质检查标准限度的要求。

表 3 头孢克肟和各有关物质的定量限和检测限

Table 3 Limit of quantitation and detection of cefixime and various related substances

样品名称	定量限/ng	质量分数/%	检测限/ng	质量分数/%
头孢克肟	2.922	0.015	0.731	0.004
头孢克肟甲酯	1.683	0.008	0.421	0.002
杂质 A	4.824	0.024	1.206	0.006
杂质 B	5.039	0.025	1.260	0.006
杂质 C	4.693	0.023	1.173	0.006
杂质 D	2.522	0.013	0.630	0.003
杂质 E	2.053	0.010	0.513	0.003

### 2.9 精密度试验

**2.9.1 进样精密度** 采用定量限质量浓度溶液连续进样 6 针，记录色谱图，结果主峰、各已知杂质峰的保留时间 RSD 值 ≤ 1.0%，峰面积 RSD 值 ≤ 5.0%。

**2.9.2 重复性试验** 取 2.5 项下各杂质对照品混合溶液、自制品溶液和自制品自身对照溶液，分别精密量取 20 μL，注入色谱仪，记录色谱图。以 6 份

自制品中杂质含量(采用加校正因子的自身对照法计算)的 RSD 值考察方法的重复性。结果表明:6 份自制品中均未检出头孢克肟甲酯和杂质 C,均在相对保留时间约 1.31 处检出最大单杂,检出的杂质 A、B、D、E、最大单杂、总杂质量分数的 RSD 值分别为 3.12%、2.11%、5.07%、1.35%、3.63%、1.84%。

**2.9.3 中间精密度试验** 不同操作人员采用不同仪器于不同日期按 2.5 项下方法进行对照品溶液、自制品溶液(6 份)、自身对照溶液的配制。精密量取上述溶液各 20  $\mu\text{L}$ ,分别注入液相色谱仪,记录色谱图。以 12 份自制品中杂质含量(采用加校正因子的自身对照法计算)的 RSD 值考察方法的中间精密度。结果表明:12 份自制品中均未检出头孢克肟甲酯和杂质 C,均在相对保留时间约 1.31 处检出最大单杂,检出的杂质 A、B、D、E、最大单杂、总杂质量分数的 RSD 值分别为 2.35%、7.96%、11.41%、6.19%、4.00%、1.41%。

### 2.10 准确度试验

精密称取自制品(批号 170382)细粉适量,加入各已知杂质对照品贮备液(头孢克肟甲酯对照品贮备液质量浓度为 1 mg/mL,杂质 A、B、C、D、E 对照品贮备液质量浓度为 0.5 mg/mL)适量,分别制备含各已知杂质限度量的 50%、100%、150% 质量浓度的溶液,作为回收率供试品溶液。分别精密量取该回收率供试品溶液各 1 mL,置 100 mL 量瓶中,加溶剂稀释至刻度,摇匀,作为回收率自身对照溶液。精密量取上述溶液各 20  $\mu\text{L}$ ,分别注入色谱仪,记录色谱图。按加校正因子的自身对照法计算回收率。结果表明:在 50%、100%、150% 限度质量浓度下,制剂中各杂质的回收率均在 92%~105%(头孢克肟甲酯、杂质 A~E 在限度质量浓度 50% 的平均回收率依次为 103.9%、92.8%、93.8%、100.8%、103.3%、100.6%;头孢克肟甲酯、杂质 A~E 在限度质量浓度 100% 的平均回收率依次为 100.3%、98.3%、93.4%、104.0%、103.3%、99.9%;头孢克肟甲酯、杂质 A~E 在限度质量浓度 150% 的平均回收率分别为 100.7%、92.0%、95.1%、105.0%、103.2%、98.3%;各质量浓度下各杂质回收率的 RSD 值在 0.14%~4.48%。

### 2.11 稳定性试验

照 2.5 项下方法分别配制自制品、杂质对照品溶液(自制品批号和杂质对照品质量浓度同 2.5 项下),分别于室温、低温(4  $^{\circ}\text{C}$ )条件下放置,在 0、

2、4、6、8、10、12 h 分别量取各溶液 20  $\mu\text{L}$ ,注入色谱仪,记录色谱图。以各已知杂质、单杂、总杂含量变化和杂质峰个数考察自制品溶液的稳定性,以各峰面积考察杂质对照品溶液稳定性。室温放置 12 h 的溶液结果表明自制品中杂质 A、B、C、D、E、最大单杂和总杂峰面积 RSD 值分别为 18.11%、2.22%、65.21%、7.71%、3.15%、13.93%、4.72%,杂质对照品中头孢克肟甲酯及杂质 A、B、C、D、E 峰面积 RSD 值分别为 3.85%、19.73%、17.80%、3.32%、0.53%、0.61%。结果表明:室温条件下放置 12 h,杂质 C 有增加趋势,杂质 A 有降低趋势,说明在室温条件下溶液的稳定性稍差;在低温条件下放置 12 h,自制品中各杂质均无明显变化,8 h 后杂质个数增加 1 个,但小于报告限,说明样品溶液在低温条件下放置 12 h 稳定。建议供试品溶液应临用现配或在低温条件下保存。

### 2.12 耐用性试验

**2.12.1 校正因子耐用性试验** 考察了更换不同色谱仪器(安捷伦、岛津)和色谱柱(色谱柱 1、2、3)以及微调流动相比比例(乙腈比例分别为 23%、25%、26%)、pH 值(6.4、6.5、6.7)、体积流量(2.3、2.5、2.7 mL/min)、柱温(35、40、45  $^{\circ}\text{C}$ )、检测波长(252、254、256 nm)对校正因子结果的影响。结果表明:更换色谱仪和色谱柱以及微调流动相比比例(乙腈比例 23%~26%)、pH 值(6.4~6.7)、体积流量(2.5 $\pm$ 0.2) mL/min、柱温(40 $\pm$ 5)  $^{\circ}\text{C}$ 、检测波长(254 $\pm$ 2) nm 等条件,各已知杂质质量浓度与峰面积均呈良好线性关系;各杂质校正因子 RSD 值均小于 5.0%。

**2.12.2 方法耐用性试验** 考察了更换不同色谱柱(色谱柱 1、2、3)以及微调流动相比比例(乙腈比例分别为 23%、25%、26%)、pH 值(6.4、6.5、6.7)、体积流量(2.3、2.5、2.7 mL/min)、柱温(35、40、45  $^{\circ}\text{C}$ )、检测波长(252、254、256 nm)对系统分离情况和杂质检测结果的影响。结果表明:更换不同色谱柱以及微调流动相比比例(乙腈比例 23%~26%)、pH 值(6.4~6.7)、体积流量(2.5 $\pm$ 0.2) mL/min、柱温(40 $\pm$ 5)  $^{\circ}\text{C}$ 、检测波长(254 $\pm$ 2) nm 等条件,系统适用性溶液中各已知杂质相对主峰相对保留时间的 RSD 值均小于 5.0%,各峰间分离度均大于 1.5;自制品中除在 pH 6.7 条件下检出极少量杂质 C 外,其他条件下均未检出,亦均未检出头孢克肟甲酯,均在相对保留时间约 1.31 处检出最大

单杂，检出的已知杂质 A、B、D、E 和最大单杂、总杂含量极差均小于限度的 20%。

### 2.13 样品中有关物质的测定

采用上述经过验证的有关物质检查方法对头孢克肟分散片 6 批自制品和 3 批参比制剂进行检测。有关物质的计算方法采用加校正因子自身对照法。有关物质标准限度：供试品溶液色谱图中如有杂质峰，扣除溶剂和辅料峰，按加校正因子的自身对照法（乘以各杂质相对校正因子）计算，杂质 A、

B（两峰面积之和）、C、D、E 峰面积均不得大于对照溶液主峰面积（1.0%）；其他单个最大杂质峰面积不得大于对照溶液主峰面积的 0.2 倍（0.2%），各杂质峰面积和不得大于对照溶液主峰面积的 2.5 倍（2.5%），供试品溶液色谱图中小于对照溶液主峰面积 0.1 倍的峰忽略不计。自制品和参比制剂中有关物质的测定结果见表 4。可知头孢克肟分散片 6 批自制品与 3 批参比制剂的杂质谱基本一致。各批次样品均符合所定质量标准的规定。

表 4 头孢克肟分散片中有关物质测定结果

Table 4 Result of the related substances in Cefixime Dispersible Tablets

成分	自制品中质量分数/%						参比制剂中质量分数/%		
	170382	170688	170689	170690	170782	170983	BF081	CB011	CG121
头孢克肟甲酯	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	0.048	0.035	0.043
杂质 A	0.717	0.851	0.842	0.848	0.886	0.693	0.742	0.953	0.350
杂质 B	0.073	0.075	0.067	0.068	0.064	0.133	0.083	0.082	0.110
杂质 C	0.043	未检出	0.037	0.039	0.043	0.050	未检出	未检出	未检出
杂质 D	0.050	0.050	0.050	0.051	0.054	0.048	0.050	0.069	0.064
杂质 E	0.105	0.160	0.156	0.152	0.151	0.123	0.090	0.058	0.119
最大单杂	0.185	0.185	0.175	0.175	0.179	0.156	0.140	0.156	0.113
总杂	1.587	1.550	1.570	1.593	1.582	1.393	1.195	1.316	0.953

### 3 讨论

本实验参阅了现行各药典中关于头孢克肟中有关物质检查的方法，根据各药典中的色谱条件和限度规定进行头孢克肟分散片中有关物质的分析方法开发。各药典中头孢克肟中有关物质检查项的色谱条件下，色谱柱均采用 C<sub>18</sub> 柱，检测波长均为 254 nm，柱温均为 40 °C；流动相均采用了四丁基氢氧化铵溶液 - 乙腈体系（水相组成及水相 - 有机相比比例略有差异）。经色谱条件筛选和优化，包括对不同品牌型号的 C<sub>18</sub> 色谱柱 [Inertsil ODS-HL (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Agilent 5 HC-C<sub>18</sub>(2) (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Inertsil ODS-3 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)]、不同的流动相条件、不同体积流量条件进行考察，最终建立了最佳的头孢克肟分散片中有关物质检查方法。

在有关物质限度标准制定过程中，充分参考了各药典的规定，采纳相对严格的标准，并结合自制头孢克肟分散片制备工艺和所用头孢克肟原料药的制备工艺，确定了本实验中头孢克肟分散片的有关物质标准限度。实验中规定了 5 种已知杂质（杂

质 A、B、C、D、E）。杂质 A 为头孢克肟的开环内酯，属于降解杂质；杂质 B 为头孢克肟开环脱羧基内酯，属于降解杂质；杂质 C 为头孢克肟差向异构体，为反应副产物，属于降解杂质；杂质 D 为头孢克肟的 E 异构体，为反应副产物，属于降解杂质；杂质 E 为反应副产物，是起始原料中所含杂质 7-ADCA 随后续反应生成的副产物。实验对单个未知杂质和总杂质限度也进行了规定。对头孢克肟分散片 6 批自制品进行了检测，结果均符合上述标准规定。

EP 10.0 中头孢克肟中有关物质项下已知杂质中列了杂质 F，由其结构式可知，杂质 F 为头孢克肟乙酯，是头孢克肟制备过程中的中间体。头孢克肟分散片所用原料药头孢克肟的制备工艺中的中间体为头孢克肟甲酯。因此，在有关物质研究过程中，对头孢克肟甲酯进行了研究。但由于多批次头孢克肟分散片中头孢克肟甲酯含量均很低，因此未将其制订入质量标准中。考虑到头孢克肟分散片采用乙醇制粒，在制剂工艺过程或稳定性放置过程中，原料药中若残留少量头孢克肟甲酯也可能发生

酯交换反应而形成头孢克肟乙酯(杂质 F)。由于头孢克肟分散片中有关物质检查条件下杂质 F 与杂质 E 完全重合,为确认本品中杂质 F 的存在情况,建立了杂质 F 的检测方法,并对随机抽取的多批次样品和长期稳定性留样的多批次样品进行了检测,结果表明各批次样品中杂质 F 的含量均极低(质量分数 $<0.05\%$ ),说明本品中存在杂质 F 的可能性极小,因此不再将杂质 F 作为特定杂质进行控制。

采用该法对头孢克肟分散片 6 批自制品和 3 批参比制剂进行了有关物质检查,结果表明,自制品和参比制剂中杂质谱基本一致,自制品中各已知杂质、单个未知杂质和总杂质均低于质量标准规定的限度。

综上所述,本实验建立了头孢克肟分散片中有有关物质检查的 HPLC 法,并进行了方法学验证。结果表明,该法专属性良好,干扰性符合相关要求,杂质 A、B、C、D、E 峰质量浓度与峰面积之间线性关系均良好,精密度、准确度和耐用性均良好,可用于简便、快速、准确地检测头孢克肟分散片中有关物质。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Tanvir S B, Qasim S S B, Shariq A, *et al.* Systematic review and meta-analysis on efficacy of cefixime for treating gonococcal infections [J]. *Int J Health Sci (Qassim)*, 2018, 12(5): 90-100.
- [2] Mehta S N, Stafylis C, Tellalian D M, *et al.* Clinical trial protocol to evaluate the efficacy of cefixime in the treatment of early syphilis [J]. *Trials*, 2020, 21(1): 1009.
- [3] Dreshaj S, Doda-Ejupi T, Tolaj I Q, *et al.* Clinical role of Cefixime in community-acquired infections [J]. *Prilozi*, 2011, 32(2): 143-155.
- [4] Dukić S, Matijević S, Daković D, *et al.* Comparison of cefixime and amoxicillin plus metronidazole in the treatment of chronic periodontitis [J]. *Vojnosanit Pregl*, 2016, 73(6): 526-530.
- [5] Tiwaskar M. Cefixime-ofloxacin combination in the management of uncomplicated typhoid fever in the Indian Community Setting [J]. *J Assoc Physicians India*, 2019, 67(3): 75-80.
- [6] 卢勇, 罗昭强, 苟双梅, 等. 为肾内科住院患者使用头孢克肟分散片进行治疗的效果分析 [J]. *当代医药论丛*, 2019, 17(8): 154-155.
- [7] 张雪亚. 头孢克肟分散片治疗上呼吸道感染的临床疗效观察 [J]. *数理医药学杂志*, 2016, 29(1): 88-89.
- [8] 袁峰. 头孢克肟分散片联合罗红霉素治疗慢性鼻窦炎的效果探析 [J]. *当代医药论丛*, 2017, 15(17): 130-131.
- [9] 王东凯, 杨坤. 头孢克肟分散片的研制 [J]. *化工管理*, 2017, 23(8): 148-150.
- [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] 中国药典 [S]. 二部. 2020: 310-313.
- [12] Cefixime. European Directorate for the Quality of Medicines. European Pharmacopoeia (EP) 10.0 [S]. 2019: 2119-2120.
- [13] Cefixime; Cefixime Tablets; Cefixime for oral suspension. United States Pharmacopial Convention, The United States pharmacopoeia (USP) 43[S]. 2020.
- [14] Cefixime. The British Pharmacopoeia Commission. The British Pharmacopoeia 2019 [S]. British: The Stationery Office, 2019.
- [15] Cefixime Hydrate; Cefixime Capsules. The Japanese Pharmacopoeia (JP) 17 [S]. The Ministry of Health, Labour and Welfare, 2016: 623-625.
- [16] Maheshwari M L, Memon A A, Memon S, *et al.* Optimization of HPLC method for determination of cefixime using 2-thiophenecarboxaldehyde as derivatizing reagent: A new approach [J]. *Saudi Pharm J*, 2015, 23(4): 444-452.
- [17] Patel N S, Tandel F B, Patel Y D, *et al.* Development and validation of stability-indicating HPLC method for simultaneous estimation of cefixime and linezolid [J]. *Indian J Pharm Sci*, 2014, 76(6): 535-540.

[责任编辑 解学星]