

MEKC 与 HPLC 测定头孢菌素有关物质的互补性分析*

李萍^{1,2}, 李娅萍¹, 邸欣², 胡昌勤^{1**}

(1. 中国药品生物制品检定所, 北京 100050; 2. 沈阳药科大学, 沈阳 110016)

摘要 目的: 探索利用胶束毛细管电泳(MEKC) 与高效液相色谱法(HPLC) 分析原理的互补性, 评价 HPLC 系统有效性的方法。方法: 利用加速降解实验, 比较 HPLC 和 MEKC 分析头孢地嗪钠和头孢米诺钠降解杂质的能力。结果: 头孢地嗪钠和头孢米诺钠的 MEKC 和 HPLC 结果具有互补性。MEKC 具有较强的杂质分离能力, 但其检测限(LOD) 较高。实际应用中, 借助于加速实验, 将 MEKC 分离出的杂质峰数目与 HPLC 分离出的含量大于 MEKC LOD 的杂质峰数目进行比较, 当两者基本相对时, 可以认为 HPLC 方法具有较满意的分离能力。结论: MEKC 为评价 HPLC 方法的有效性提供了新的手段。

关键词: 胶束毛细管电泳; 高效液相色谱; 头孢地嗪钠; 头孢米诺钠; 有关物质

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254 - 1793(2011) 03 - 0428 - 05

Complementary MEKC and HPLC analysis for the related substances of cephalosporin*

LI Ping^{1,2}, LI Ya - ping¹, DI Xin², HU Chang - qin^{1**}

(1. National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China;

2. ShenYang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract **Objective:** To explore the principle complementarity of the MEKC and HPLC and the method in order to estimate the effectiveness of the HPLC system. **Method:** We analyze the degradative impurities produced by the cefodizime sodium and cefminox sodium and compare the procession in HPLC and MEKC. **Result:** We find that there is complementarity in the results of cefodizime sodium and cefminox sodium by the MEKC and HPLC. But we can isolate the impurities easily by the MEKC and the LOD is higher than by the HPLC. When the amount of impurities by the MEKC and HPLC is same, we think that HPLC is suitable to be applied. **Conclusion:** MEKC is a new means which can evaluate the effectiveness of the HPLC.

Key words: MEKC; HPLC; cefodizime sodium; cefminox sodium; related substance

头孢菌素类抗生素本身不稳定, 多种条件均可导致其降解, 形成一系列的降解物, 并失去抗菌活性甚至产生毒副反应^[1,2]。因此在生产和储存过程中对头孢菌素类抗生素有关物质的控制是其质量控制的关键。目前, 各国药典多采用 HPLC 法测定其有关物质。

毛细管电泳(CE) 具有分辨能力高、分析时间短、所用试剂多为对环境无害的水溶性缓冲液等特点^[3]。遵循不同的分离机理, CE 已发展出多种分离模式, 最常见的分离模式即毛细管区带电泳(CZE) 和胶束毛细管电动色谱(MECC 或 MEKC)。由于 CE 与 HPLC 具有完全不同的分离机理, 故在

进行药品纯度分析时与 HPLC 结果具有互补性。头孢菌素类抗生素具有较好的水溶性, 在不同的 pH 状态下可带有正电荷或负电荷, 且具有较强的紫外吸收, 故十分适宜 CE 分析。CE 分析 β -内酰胺抗生素所采用的分离模式包括 CZE^[4~8] 和 MEKC^[8~10] 等。我们最近的研究证明 MEKC 不仅可以有效地分离 β -内酰胺抗生素中常见的各类同分异构体, 且较 CEZ 模式可以分离出更多的杂质, 是 β -内酰胺抗生素杂质分析的最佳分离模式^[11]。本文通过对 MEKC 与 HPLC 分析头孢地嗪钠和头孢米诺钠有关物质的比较, 进一步说明 MEKC 与 HPLC 分析的互补性。

* “十一五”国家科技支撑计划重点项目“我国当前急需建立和高的药品监督检验技术研究”课题(2008BAI55B04)

** 通讯作者 Tel: (010) 67095308; E - mail: hucq@ nicpbp. org. cn

1 仪器与试剂

Agilent G1601A 型毛细管电泳仪及相应工作站; Quickenet 非涂渍石英毛细管柱 [$51\text{ cm} \times 75\text{ }\mu\text{m}$, 有效长度 42.5 cm (头孢米诺钠); $61\text{ cm} \times 75\text{ }\mu\text{m}$, 有效长度 53 cm (头孢地嗪钠)]; Beckman $\phi\ 660$ 酸度计; AKTA prime 电导检测器。Dionex HPLC 分析系统: 配有 P680 型双三元输液泵, ASI 100 型自动进样系统, PDA 100 型二极管阵列检测器, TCC - 100 型柱温箱, ChromLeon 色谱工作站软件。

磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、磷酸、冰醋酸和氢氧化钠为分析纯; 甲醇、乙腈和四氢呋喃为色谱纯; 十二烷基硫酸钠(SDS) 为 SIGMA 公司产品; 水为 Milli - Q 超纯水。

头孢米诺钠对照品和头孢地嗪钠对照品由中国药品生物制品检定所提供; 注射用头孢米诺钠和头孢地嗪钠为国内市场抽验样品, 由中国药品生物制品检定所提供。

2 CE 分析方法

2.1 运行条件

头孢米诺钠: 运行电压 15 kV , 温度 $27\text{ }^{\circ}\text{C}$, 压力进样 $5\text{ s} \times 5\text{ kPa}$; 运行缓冲液为含 $70\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 十二烷基硫酸钠及 5% 甲醇的磷酸盐缓冲液 ($100\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{pH}\ 7.5$); 采用柱上紫外检测, 检测波长 254 nm 。

头孢地嗪钠: 运行电压 20 kV , 温度 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 压力进样 $5\text{ s} \times 3.5\text{ kPa}$; 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 ($70\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{pH}\ 7.5$)。采用柱上紫外检测, 检测波长 254 nm 。

所用溶液在使用前均需经 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过并超声脱气。由于运行缓冲液的电导值显著影响 CE 电泳迁移时间的重现性^[3], 所有运行缓冲液的电导值控制为头孢地嗪钠 (10.42 ± 0.22) $\text{ms} \cdot \text{cm}^{-1}$; 头孢米诺钠 (12.21 ± 0.72) $\text{ms} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。

2.2 毛细管柱的平衡

新柱使用前先用 $1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液冲洗 60 min , 蒸馏水冲洗 30 min , 运行缓冲液冲洗 30 min 。柱使用完毕, 用 $0.1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液冲洗 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 $0.1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液冲洗 10 min , 蒸馏水冲洗 10 min , 运行缓冲液冲洗 10 min 。2 次进样间用水、 $0.1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液、水各冲洗 2 min , 运行缓冲液冲洗 5 min 。

2.3 样品溶液的制备

碱降解溶液的制备: 称取适量样品, 置于 10 mL 量瓶中, 加水 1 mL 溶解; 再加 $0.1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 1 mL , 放置 30 min 后, 加入 $0.1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液 1 mL 使溶液呈中性, 加水稀释至刻度。

酸降解溶液的制备: 称取适量样品, 置于 10 mL 量瓶中, 加 $0.1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液 1 mL , 放置 2 h 后, 加入 $0.1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 1 mL 使溶液呈中性, 加水稀释至刻度。

氧化降解溶液的制备: 称取适量样品, 置于 10 mL 量瓶中, 加水 1 mL 溶解; 再加入 30% 过氧化氢溶液 1 滴, 室温放置 2 h 后, 加水稀释至刻度。

紫外降解溶液的制备: 取样品适量至平皿中, 置紫外光下照射 10 d , 称取适量照射后的样品, 置于 10 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度。

固体降解溶液的制备: 取样品适量, 置 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、HR 为 60% 的环境中放置 10 d , 称取适量降解后的样品, 置于 10 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度。

头孢地嗪钠诸降解样品的浓度均约为 $5\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 头孢米诺钠诸降解样品的浓度均约为 $1.2\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

样品溶液的制备: 精密称取注射用头孢地嗪钠适量及对照品适量, 加水溶解制成约 $5\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液(CE 分析) 或约 $1\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液(HPLC 分析); 精密称取注射用头孢米诺钠适量及对照品适量, 加水溶解制成约 $1.2\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液。

2.4 定量方法 采用峰面积归一化法进行相关物质的测定。

3 HPLC 分析方法

3.1 头孢地嗪钠^[2,13] 色谱柱: SinoChrom ODS - BP ($4.6\text{ mm} \times 150\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$); 流动相 1: 磷酸盐缓冲液(称取磷酸二氢钾 1.74 g 与磷酸氢二钠 1.1 g , 加水至 2000 mL , $\text{pH}\ 6.4$) - 乙腈 ($92:8$); 流动相 2: $0.02\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 正辛胺溶液 ($\text{pH}\ 6.5$) - 乙腈 ($73:27$); 流速: $1\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长: 254 nm ; 柱温: 室温; 进样量: $10\text{ }\mu\text{L}$ 。

3.2 头孢米诺钠^[4] 色谱柱: Capcell PAK C18 MG II ($4.6\text{ mm} \times 150\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$); 流动相: 醋酸缓冲液 (10 mL 冰醋酸加水至 1000 mL) - 四氢呋喃 - 甲醇 ($990:5:5$); 流速: $1\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长: 254 nm ; 柱温: 室温; 进样量: $20\text{ }\mu\text{L}$ 。

4 结果

4.1 MEKC 分析方法 MEKC 是头孢菌素类抗生

素杂质控制的最佳分离模式,不仅可以有效地分离头孢菌素类抗生素中常见 *R,S* 异构体, $\Delta-2$ 、 $\Delta-3$ 异构体和 *Z,E* 顺反异构体,且较 CEZ 模式可以分离出更多的杂质^[1]。通过对运行缓冲液 pH、缓冲盐浓度、胶束浓度和有机改性剂(甲醇)浓度的优化,分别建立了分析头孢地嗪钠和头孢米诺钠有关物质分析的最佳分离方法。各种降解产物与主峰可完全分离(图1)。分别对酸、碱、氧化和 UV 降解溶液的分析表明,对头孢地嗪钠,MEKC 可以检测出 23 个杂质(表1);对头孢米诺钠,MEKC 可以检测出 16 个杂质(表2)。分别以信噪比 $S/N=3$ 和 $S/N=10$ 计算最低检测限(LOD)和最低定量限(LOQ),头

孢地嗪的 LOD 为 $1.22 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, LOQ 为 $4.06 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 头孢米诺钠的 LOD 为 $2.44 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, LOQ 为 $6.09 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。方法的精密度(连续进样 6 针),头孢地嗪钠溶液($46.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)和头孢米诺钠溶液($1.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)峰面积的 RSD% 均小于 1%,迁移时间的 RSD 也均小于 1%。头孢地嗪钠溶液、头孢米诺钠溶液分别在 $4.6 \sim 829 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $6 \sim 1219 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度范围内呈线性,回归方程分别为:

$$Y = 1.057X + 23.13 \quad r = 0.9978$$

$$Y = 1.430X - 10.80 \quad r = 0.9996$$

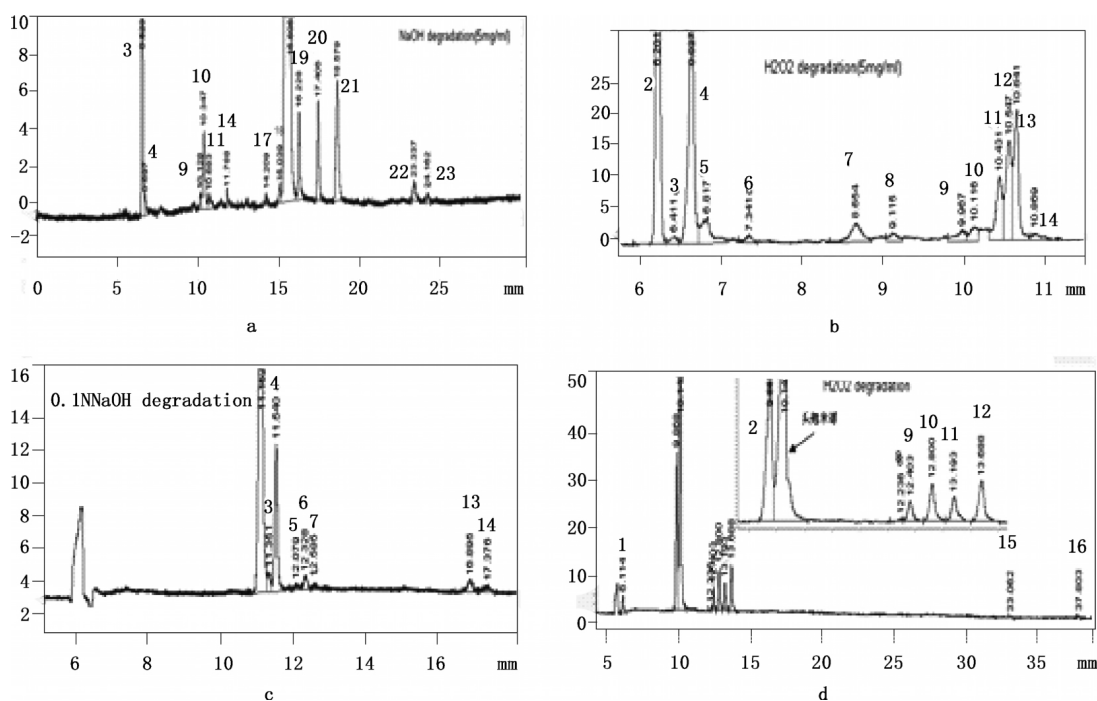


图1 MEKC 分析电泳图

Fig 1 MEKC electrophoretograms

a. 头孢地嗪钠碱降解溶液(alkaline degradation of cefodizime sodium)

b. 头孢地嗪钠氧化降解溶液(oxidative degradation of cefodizime sodium)

c. 头孢米诺钠碱降解溶液(alkaline degradation of cefminox sodium)

d. 头孢米诺钠氧化降解溶液(oxidative degradation of cefminox sodium)

4.2 MEKC 与 HPLC 的比较

4.2.1 头孢地嗪钠 HPLC 分析头孢地嗪钠的典型色谱图见图2, HPLC 系统1可检测到20个降解杂质,流动相系统2可检测到29个降解杂质。对头孢地嗪钠酸、碱、氧化和 UV 降解溶液进行分析,不同的样品在 HPLC 与 MEKC 中分离出的杂质数目不同:对酸降解溶液, HPLC 分离出的杂质多于 MEKC;但对氧化降解溶液, MEKC 分离出的杂质多于

HPLC,体现出2个方法的互补性。由于 MEKC 的 LOD 较 HPLC 低,如果将 MEKC 分离出的杂质数目(23个杂质)与 HPLC 中含量大于 MEKC LOD 的杂质数目进行比较,流动相1系统中有17个杂质峰,流动相2系统中有21个杂质峰的含量大于 MEKC 的 LOD。提示 HPLC 流动相2系统对头孢地嗪钠杂质的分离能力与 MEKC 相当。

表1 HPLC 与 MEKC 分析头孢地嗪钠降解溶液

Tab 1 Degradative solution of the cefodizime sodium by MEKC & HPLC

		检出杂质数(impurity No.)				
		碱降解 (alkaline hydrolysis)	酸降解 (acid hydrolysis)	氧化 (oxidation)	紫外降解 (UV degradation)	杂质总数 (total)
HPLC1	HPLC1	11	10	5	12	20
	MEKC - LOD	9	8	5	12	17
HPLC2	HPLC2	14	13	13	15	29
	MEKC - LOD	10	7	13	15	21
	MEKC	13	6	17	6	23

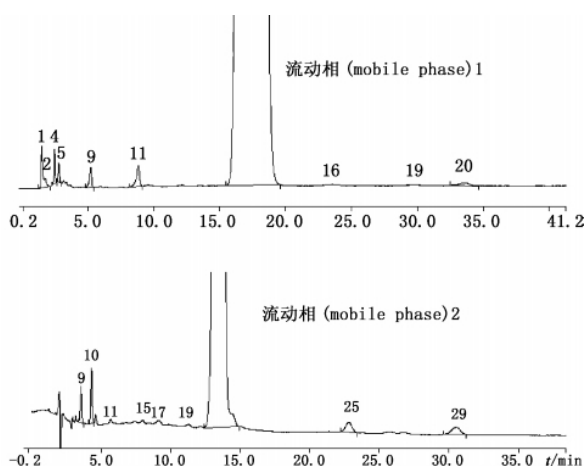


图2 HPLC 分析头孢地嗪钠正常样品的典型色谱图

Fig 2 HPLC typical chromatograms of cefodizime sodium

4.2.2 头孢米诺钠 HPLC 分析头孢米诺钠的典型色谱图见图3, HPLC 系统可检测到26个降解杂质。对头孢米诺钠降解溶液进行分析, 由于头孢米诺钠降解溶液中的多数杂质的含量小于 MEKC 的 LOD, 且 MEKC 的 LOD 较 HPLC 低, 使得 HPLC 检出的杂质数目多于 MEKC, 但如果将 MEKC 分离出的杂质数目(16个杂质)与 HPLC 中含量大于 MEKC LOD 的杂质数目进行比较, HPLC 中有15个杂质峰的含量大于 MEKC 的 LOD, 提示 HPLC 系统对头孢米诺钠杂质的分离能力与 MEKC 相当。

表2 HPLC 与 MEKC 检测头孢米诺钠降解溶液

Tab2 Degradative solution of the cefminox sodium by HPLC & MEKC

		检出杂质数(impurity No.)				
		碱降解 (alkaline hydrolysis)	酸降解 (acid hydrolysis)	紫外降解 (UV degradation)	氧化 (oxidation)	杂质总数 (total)
HPLC	HPLC	12	13	18	18	26
	MEKC - LOD	5	3	9	9	15
	MEKC	7	2	9	9	16

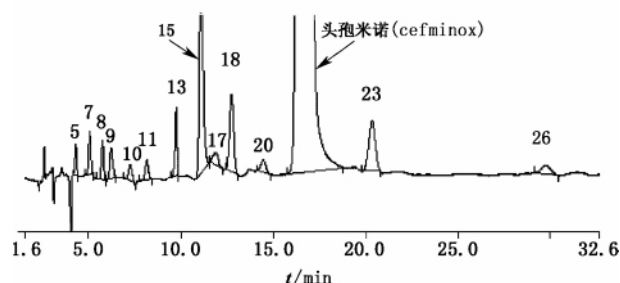


图3 HPLC 分析头孢米诺钠固体降解溶液的典型色谱图

Fig 3 HPLC typical chromatogram of cefminox sodium

5 讨论

HPLC 分析是借助溶质在两相间的分配系数、亲和力、吸附力、静电作用力或分子位阻等作用的差别使不同的溶质得以分离; CE 则是以高压电场为驱动力, 依据样品中各组分的分子大小、所带电荷数、等电点等性质的不同, 使得不同物质间在淌度和分配行为方面出现差异, 造成迁移速率不同而实现分离; 而 MEKC 是在含有胶束的背景电解质中进行的毛细管电泳, 其主要机理一般包括疏水相互作用和组分电泳行为的差异, 胶束作为固定相, 被测组分在

胶束、电解质之间分配,是色谱与电泳的结合。由其分离原理的差异,推测两者在分析结果上具有互补性。本文通过对头孢地嗪钠和头孢米诺钠 2 种 β -内酰胺抗生素 MEKC 和 HPLC 结果的比较,验证了两者的互补性。

目前 HPLC 分析是药物有关物质分析的主要方法。虽然在建立 HPLC 分析方法中需要对色谱系统的分离能力进行验证,但仅借助于自身的数据,有时无法准确评价出 HPLC 方法的有效性,而需要通过与原理不同的其他分析方法的比较,才能说明方法的有效性。MEKC 为评价 HPLC 方法的有效性提供了有效的手段。虽然 MEKC 具有较强的杂质分离能力,但其 LOD 较高。实际应用中,借助于加速实验,将 MEKC 分离出的杂质峰数目与 HPLC 分离出的含量大于 MEKC LOD 的杂质峰数目进行比较,当两者基本相对时,可以认为 HPLC 方法具有较满意的分离能力。

参考文献

- 1 CHEN Zhao-kun(陈兆坤),HU Chang-qin(胡昌勤). Study of degradation mechanisms of cephalosporin(头孢菌素类抗生素的降解机制). *Word Notes Antibiot*(国外医药抗生素分册),2004,25(6):249
- 2 HU Min(胡敏),HU Chang-qin(胡昌勤),LIU Wen-ying(刘文英). Identification of degradation compounds of cephalosporins by LC/MS(LC/MS 鉴定头孢菌素降解物结构). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志),2005,25(3):369
- 3 Issaq HJ. A decde of capillary electrophoresis. *Electrophoresis*,2000,21(10):1921
- 4 LONG Hong(龙虹),DING Qiang(丁强),WANG Tian-song(王天松),et al. Purity analysis of cephalosporins with capillary zone electrophoresis(毛细管区带电泳法分析头孢菌素类药物的纯度). *Chin J Chromatogr*(色谱),1999,17(6):570
- 5 Lin CE,Chen HW,Lin EC,et al. Optimization of separation and migration behavior of cephalosporins in capillary zone electrophoresis. *J Chromatogr A*,2000,879(2):197
- 6 Attila Gáspár,Melinda Andrúsi,Szilvia Kardos Mrestani Y,et al. Application of capillary zone electrophoresis to the analysis and to a stability study of cephalosporins. *J Chromatogr B*,2002,775(2):239
- 7 Wang R,Jia ZP,Fan JJ,et al. Separation of cefoperazone enantiomers using beta-cyclodextrin as chiral additive by capillary zone electrophoresis. *Chirality*,2004,16(1):45
- 8 Penalvo GC,Kelly M,Maillois H,et al. Evaluation of capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic capillary chromatography with direct injection of plasma for the determination of cefotaxime and its metabolite. *Anal Chem*,1997,69:1364
- 9 Li YM,Zhu Y,Vanderghinste D. Micellar electrokinetic capillary chromatography for the separation of cefalexin and its related substances. *Electrophoresis*,1999,20(1):127
- 10 ZHANG Hui-wen(张慧文),HU Chang-qin(胡昌勤),XU Ming-zhe(许明哲),et al. Separation of cefoperazone and its S-isomer and other related substances by micellar electrokinetic capillary chromatography(胶束电动毛细管色谱法分析头孢哌酮与其 S-异构体等杂质). *Chin J Chromatogr*(色谱),2007,25(4):699
- 11 Zhu Jian-ping,Zhang Hu-wen,Hu Chang-qin. The optimal mode of capillary electrophoresis for the impurity analysis of β -lactam antibiotics. *JCP*,2010,19(4):285
- 12 State Food and Drug Administration Registration Standard of Import Drug(国家食品药品监督管理局进口药品注册标准). JX20040109
- 13 ChP(中国药典). 2005. Vol II(二部):138
- 14 State Food and Drug Administration Registration Standard of Import Drug(国家食品药品监督管理局进口药品注册标准). JX20080053
- 15 ZHU Jian-ping(朱健萍),HU Chang-qin(胡昌勤),LIU Wen-ying(刘文英). Study on factors affecting reproducibility of migration time in capillary electrophoresis(毛细管电泳迁移时间重现性影响因素的探讨). *Chin J Chromatogr*(色谱),2006,24(4):396

(本文于 2010 年 3 月 29 日收到)