

# 比阿培南开环物杂质的确证及含量测定<sup>Δ</sup>

陈松杰\*,王德刚#,张莉,钟雅妮(珠海联邦制药股份有限公司,广东中山 528467)

中图分类号 R927;R978.1<sup>†</sup> 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)41-3915-04  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.41.27

**摘要** 目的:确证比阿培南中开环物杂质并建立其含量测定方法。方法:采用液相色谱-质谱(LC-MS)联用法确证比阿培南中开环物杂质,LC条件:色谱柱为GL Sciences C<sub>18</sub>,流动相A为0.01 mol/L醋酸铵溶液,流动相B为乙腈,梯度洗脱;质谱条件:电喷雾离子源,正离子模式采集数据。采用高效液相色谱(HPLC)法测定杂质含量,色谱柱为Kromasil 100-5 C<sub>18</sub>,流动相为0.01 mol/L四丁基溴化铵溶液-乙腈-三乙胺(980:20:2,pH 6.0),检测波长为254 nm。开环物A、B含量均采用自身对照法计算。结果:LC-MS法证明 *m/z* 为369、397的离子峰分别为比阿培南开环物A、B;在建立的HPLC色谱条件下,比阿培南、比阿培南开环物B检测质量浓度线性范围分别为0.077~1.546 mg/ml、0.765~22.95 μg/ml(*r*=0.995 5、0.999 9),比阿培南开环物B平均回收率为100.5%(RSD=0.7%,*n*=3)。结论:建立的方法操作简便、结果可靠,可用于比阿培南中杂质开环物的检查。

**关键词** 比阿培南;开环物杂质;结构确证;含量测定

## Identification of Biapenem Open-ring Impurities and Content Determination of Them

CHEN Song-jie, WANG De-gang, ZHANG Li, ZHONG Ya-ni (Zhuhai United Laboratories Co., Ltd., Guangdong Zhongshan 528467, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To confirm biapenem open-ring impurities and to establish the method for the content determination of them. METHODS: LC-MS was adopted to identify biapenem open-ring impurities. The chromatographic condition of LC: GL Sciences C<sub>18</sub> with 0.01 mol/L tetrabutyl ammonium bromide as mobile phase A and acetonitrile as mobile phase B (gradient elution). The chromatographic condition of MS: ESI, positive ion mode. HPLC was adopted to determine the content of impurities. The determination was performed on Kromasil 100-5 C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of 0.01 mol/L ammonium acetate-acetonitrile-triethylamine (980:20:2, pH 6.0) with detection wavelength at 254 nm. The content of open-ring impurities A and B were calculated by self-control method. RESULTS: Results of LC-MS analyses showed that the fragment ions at *m/z* 369 and 397 were open-ring impurities A and B, respectively. Under HPLC, the linear ranges of biapenem and open-ring impurity B were 0.077-1.546 mg/ml (*r*=0.995 5) and 0.765-22.95 μg/ml (*r*=0.999 9). Average recovery of biapenem open-ring impurity B was 100.5% (RSD=0.7%, *n*=3). CONCLUSIONS: The method is simple and reliable, and it is applicable for the determination of biapenem open-ring impurities.

**KEY WORDS** Biapenem; Open-ring impurities; Structural identification; Content determination

比阿培南(Biapenem)是一种新型1β-甲基碳青霉烯类抗生素,具有抗菌谱广、对肾脱氢肽酶稳定、药理学参数优良、临床治疗效果良好、耐受性好和不良反应少等特点<sup>[1]</sup>。目前各国药典均未收载比阿培南。经分析其主要降解产物为聚合物和开环物,文献<sup>[2-6]</sup>中多对其聚合物进行研究,对其开环物的研究鲜有报道。而从比阿培南聚合物的产生途径可知,其开环物可与比阿培南反应生成二聚物,故对开环物进行控制可在一定程度上降低聚合物产生的可能性。

笔者另查阅注射用Omevacin的说明书<sup>[7]</sup>知,原研品中可能存在的杂质包括2个开环物,现暂命名为比阿培南开环物A和开环物B,且开环物A为比阿培南体内代谢产物。本文通过试验建立了测定比阿培南开环物杂质的反相高效液相色谱(RP-HPLC)法,并采用色谱-质谱(LC-MS)方法对其结构进行确证,同时考察了自制样品及原研品中开环物杂质的含量水平。

Δ 基金项目:2009年粤港关键领域重点突破招标项目资助(No.20090104-3)

\* 博士。研究方向:药物研发。E-mail: jerrychen810@126.com

# 通信作者:高级工程师。研究方向:药物研发。电话:0760-87133228

## 1 材料

LC-20AT型HPLC仪、SPD-M20A二极管阵列检测器(日本Shimadzu公司);AE240型电子天平(瑞士Mettler toledo公司);6120型单四级杆液质联用仪(美国Agilent公司)。

比阿培南原料药(自制,批号:4031204001、4031204002、4031204003,纯度:99.96%、99.96%、99.95%);注射用比阿培南(原研品,日本明治制药株式会社,批号:4004,测定时已近效期,规格:每支0.3 g);比阿培南开环物B杂质对照品(自制,经质谱、元素分析及核磁共振氢谱确证其结构,批号:120703,纯度:99.8%);由于比阿培南开环物A杂质对照品获得较为困难,因此拟取其HPLC洗脱成分采用LC-MS方法确证其结构;乙腈为色谱纯,水为自制超纯水,其他各试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

HPLC色谱条件:色谱柱为Kromasil 100-5 C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为0.01 mol/L四丁基溴化铵溶液-乙腈-三乙胺(980:20:2,用磷酸调节pH值至6.0),流速为1.0 ml/min,检测波长为254 nm,柱温为30 ℃。

LC-MS 色谱条件: 色谱柱为 GL Sciences C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相 A 为 0.01 mol/L 醋酸铵溶液, 流动相 B 为乙腈, 梯度洗脱, 流速为 1.0 ml/min, 柱温为 30 ℃。按表 1 进行线性梯度洗脱。

表 1 线性梯度洗脱表  
Tab 1 Linear gradient elution

时间, min	流动相 A, %	流动相 B, %
0	99	1
27	70	30
30	70	30

质谱条件: 电喷雾离子源 (ESI); 正离子模式采集数据; 选择一定质荷比 ( $m/z$ ) 范围内的全扫描,  $m/z$  为 100~800; 氮气流速为 10 L/min, 雾化器压力为 35 psig, 干燥气体温度为 300 ℃, 毛细管电压为 4.0 kV。

## 2.2 溶液的制备

2.2.1 系统适用性试验溶液制备。取比阿培南原料药 (批号: 4031204001) 约 15 mg, 置于 10 ml 量瓶中, 加适量流动相溶解后, 于 80 ℃ 水浴破坏 15 min, 放冷至室温, 加 5% 甲酸溶液 0.5 ml, 再加流动相稀释至刻度, 摇匀, 即得含有比阿培南 2 个开环物杂质的溶液, 作为系统适用性试验溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备。取供试样品适量, 精密称定, 加流动相溶解并定量稀释制成每 1 ml 中含 1.5 mg 的溶液, 作为供试品溶液 (临用新制)。

2.2.3 对照溶液的制备。精密量取供试品溶液适量, 加流动相定量稀释制成 15 μg/ml 的溶液, 即得。

2.2.4 比阿培南开环物 A 定位溶液的制备。取系统适用性试验溶液继续水浴破坏, 同时增加进样体积, 在检测器出口处收集第 1 个峰面积显著增大的杂质的洗脱成分, 即得。

2.2.5 比阿培南开环物 B 对照品溶液的制备。取比阿培南开环物 B 杂质对照品适量, 加流动相溶解, 摇匀, 即得。

## 2.3 系统适用性试验溶液破坏条件的确定

比阿培南结构中的内酰胺环不稳定, 在高温、酸或碱条件下易开环, 降解为比阿培南开环物 A; 且开环后产生的 -COOH 基不稳定易脱去生成甲酸, 甲酸使比阿培南开环, 并与五元环上的一 NH 结合产生开环物 B。因此选择一定量的甲酸为破坏溶剂进行试验。取系统适用性试验溶液 20 μl 注入色谱仪, 记录色谱图, 主峰后峰面积显著增大的 2 个杂质峰依次为比阿培南开环物 A、B。主峰与比阿培南开环物 A 色谱峰的分离度应大于 1.5。

比阿培南可能降解的途径如图 1 所示:

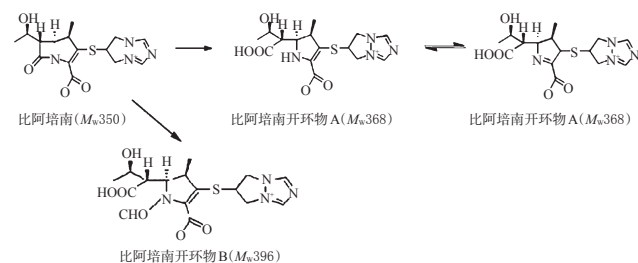


图 1 比阿培南开环物可能的降解途径

## Fig 1 Potential degradation pathway of biapenem open-ring impurities

### 2.4 比阿培南开环物的结构确证

取系统适用性试验溶液, 进行 LC-MS 联用分析, 结果检出 2 个较大的降解杂质峰, 保留时间约为 3.8 min 的杂质准分子离

子峰的  $m/z$  分别为 369、325, 与  $[M+H]^+$ 、 $[M-COOH+H]^+$  对应, 即  $m/z$  为 369 的峰分子质量为 368, 与比阿培南开环物 A 的分子质量 368 一致;  $m/z$  为 325 的峰为比阿培南开环物 A 的碎片离子, 因比阿培南开环后 -COOH 基易脱去, 形成该碎片离子; 保留时间约为 5.4 min 处的杂质准分子离子峰  $[M+H]^+$  的  $m/z$  为 397, 即  $m/z$  为 397 的峰分子质量为 396, 与比阿培南开环物 B 分子质量 396 一致, 且其保留时间及  $m/z$  均与比阿培南开环物 B 对照品一致。表明系统适用性试验溶液中降解产生的 2 个较大杂质分别为比阿培南开环物 A、B, 详见图 2。

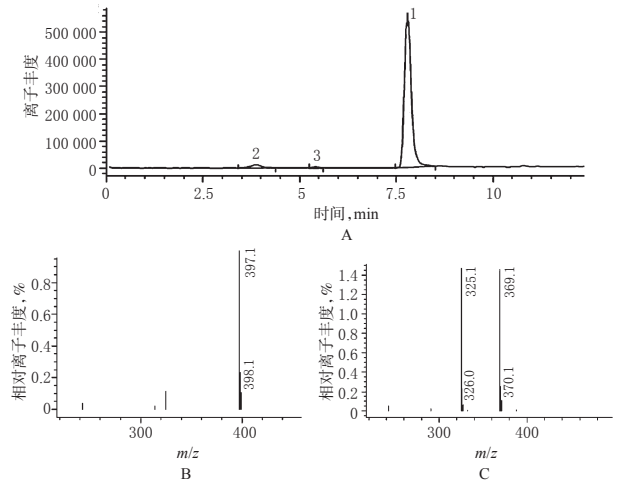


图 2 降解杂质经 LC-MS 结构确证分析结果

A. 总离子流图; B. 开环物 B 的 MS 图; C. 开环物 A 的 MS 图; 1. 比阿培南; 2. 开环物 A; 3. 开环物 B

## Fig 2 LC-MS analysis results of structural identification of impurity by degradation

A. TIC; B. MS chromatograms of open-ring impurity B; C. MS chromatograms of open-ring impurity A; 1. biapenem; 2. open-ring impurity A; 3. open-ring impurity B

### 2.5 比阿培南开环物在 2 种色谱系统中的相互识别

通过对比 2 种色谱系统中杂质含量, 结果系统适用性试验溶液在 HPLC 色谱系统中的 2 个峰面积显著增大的杂质, 分别与 LC-MS 系统下峰面积显著增大的杂质含量基本吻合, 两者存在对应关系; 另采用开环物 B 杂质对照品在 HPLC 色谱系统进行定位, 可证明第 2 个显著增大的杂质即为比阿培南开环物 B; 收集 HPLC 色谱系统系统适用性试验溶液中第 1 个显著增大杂质的洗脱成分, 再在 LC-MS 系统中进样测试, 其保留时间与比阿培南开环物 A 一致, 且其分子质量为 368, 与比阿培南开环物 A 分子质量亦一致, 可证明第 1 个显著增大的杂质即为比阿培南开环物 A。

由此说明, LC-MS 系统检出分子质量为 368 和 396 的杂质, 分别与 HPLC 色谱系统检出的 2 个杂质为同一物质, 即 HPLC 色谱系统中此 2 个杂质分别为比阿培南开环物 A、B。

### 2.6 比阿培南开环物 A、B 的含量测定

2.6.1 系统耐用性试验及开环物峰位的确定。照“2.1”项下 HPLC 色谱条件, 取系统适用性试验溶液, 分别采用 Thermo Hypersil ODS C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Kromasil 100-5 C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 和大连依利特 ODS C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 3 种不同厂家色谱柱, 在不同仪器上进行试验。结果系统适用性试验溶液中开环物 A 与比阿培南的分度均大于 1.5, 开环物 B 保留时间与开环物 B 对照品一致; 且比阿培南开环物 A 和 B 均增加明显, 便于对杂质进行定位, 方法可行, 耐

用性好。因此采用系统适用性试验溶液对开环物进行定位。

2.6.2 专属性试验及开环物降解途径考察。取比阿培南原料药(批号:4031204001)适量,分别经水浴和5%甲酸溶液(系统适用性试验溶液)、高温(80℃)、光照[(4 500±500)lx]、高湿(相对湿度92.5%)及原料药溶液经85℃水浴破坏后制成的溶液进样分析;同时取比阿培南开环物B对照品适量,加流动相制成一定质量浓度的溶液进样分析,记录色谱图,考察方法专属性。空白(流动相)、开环物B对照品及样品经高温、高湿、光照、水浴及强酸破坏后的色谱见图3。

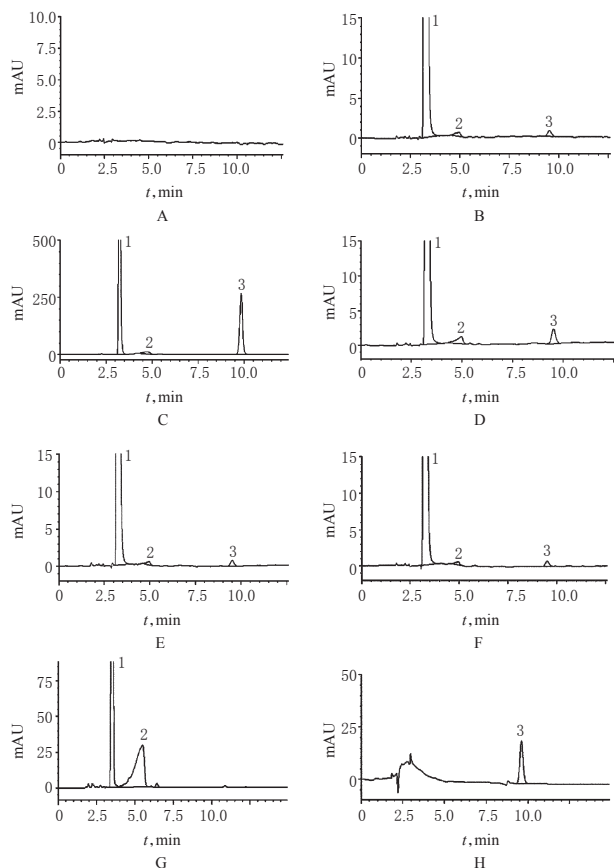


图3 方法专属性考察HPLC图谱

A.空白(流动相);B.样品;C.系统适用性试验溶液;D.高温破坏后样品;E.光照破坏后样品;F.高湿破坏后样品;G.水浴破坏后样品;H.开环物B对照品;1.比阿培南;2.开环物A;3.开环物B

Fig 3 HPLC chromatograms of method specificity

A. blank (mobile phase); B. sample; C. solution of system suitability test; D. sample destroyed by high temperature; E. sample destroyed by light; F. sample destroyed by humidity; G. sample destroyed by water bath; H. open-ring impurity B control; 1. biapenem; 2. open-ring impurity A; 3. open-ring impurity B

结果表明,样品水溶液在水浴破坏条件下,开环物A增加显著,但未降解产生开环物B;经水浴及强酸破坏(即系统适用性试验溶液)后,开环物A及开环物B均增加显著;高温、高湿及光照条件下开环物A、B均未显著增加,表明在此几种条件下开环物不易产生。降解产生的开环物B杂质与其对照品保留时间一致;空白溶剂不影响比阿培南及其开环物的检出;各降解杂质均能与开环物分离完全。本色谱系统专属性良好。因系统适用性试验即是在酸性环境下使比阿培南水解,试验结果表明水解产物对测定无干扰,故专属性试验不再考察

碱水解对测定的干扰。

2.6.3 线性关系试验。精密称取比阿培南原料药(批号:4031204001)和比阿培南开环物B对照品适量,加流动相溶解后,再加流动相定量稀释制成系列质量浓度分别为0.077、0.155、0.309、0.464、0.773、1.237、1.546 mg/ml和0.765、1.53、3.06、4.59、7.65、12.24、15.30、22.95 μg/ml的混合溶液,摇匀,即为线性试验溶液。进样测试,将测得的峰面积(y)与质量浓度(x)作线性回归。结果比阿培南的线性方程为: $y=758\ 510x-1\ 021\ 662$ ( $r=0.995\ 5$ );比阿培南开环物B的线性方程为: $y=1\ 172\ 380x-2\ 703$ ( $r=0.999\ 9$ )。表明比阿培南与比阿培南开环物B检测质量浓度线性范围分别为0.077~1.546 mg/ml、0.765~22.95 μg/ml。

2.6.4 定量限及检测限试验。取“2.6.3”项下线性试验溶液,逐步稀释制成一定质量浓度的溶液,进样测试。得比阿培南与比阿培南开环物B的定量限(信噪比约为10:1)分别为2.1、2.3 ng,检测限(信噪比约为3:1)分别为0.6、0.9 ng。

2.6.5 比阿培南开环物B回收率试验。精密称取比阿培南开环物B适量,加流动相溶解并制成0.15 mg/ml的溶液,作为杂质贮备液。再精密称取本品9份,各约30 mg,分别置于9个20 ml量瓶中,分3组,各3份,每组分别加入精密量取的杂质贮备液(0.15 mg/ml)1.6、2.0、2.4 ml,再加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,作为比阿培南开环物B回收率试验的供试品溶液(按比阿培南开环物B的限度为1.0%进行加样回收试验);另取杂质贮备液适量,加流动相制成0.015 mg/ml的溶液,作为比阿培南开环物B对照品溶液。精密量取上述供试品溶液及对照品溶液各20 μl,分别注入色谱仪,记录色谱图。结果,比阿培南开环物B的平均回收率为100.5%,RSD=0.7%( $n=3$ ),样品对此杂质的测定无干扰,本方法准确性良好。

2.6.6 样品测定结果。取自制的3批比阿培南原料药及原研品1批,照“2.1”项下色谱条件,取对照溶液20 μl,注入色谱仪,调节检测灵敏度,使主峰的峰高约为满量程的20%;再精密量取供试品溶液和对照溶液各20 μl,分别注入色谱仪,记录色谱图至主峰保留时间的5倍。开环物A、B含量均采用自身对照法计算,结果见表2。

表2 4批样品开环物杂质的含量测定结果

Tab 2 Content determination of open-ring impurities in 4 batches of samples

项目	批号			
	4031204001	4031204002	4031204003	4004
开环物A,%	0.04	0.03	0.04	0.05
开环物B,%	0.004	0.007	0.007	0.05

### 3 讨论

Nan Wang等<sup>[9]</sup>建立了比阿培南及杂质质控的HPLC分析方法,该方法利用HPLC-二极管阵列检测器(DAD)数据,采用二维色谱光谱相关分析技术及软件,在无杂质对照品的情况下,实现了质控分析HPLC-紫外(UV)色谱中的色谱峰与LC-MS色谱图中的色谱峰的相互识别。结果表明比阿培南水解产生的杂质主要为开环物及二聚物,暂命名为比阿培南开环物A及C、比阿培南二聚物A及B。

本文则采用系统适用性试验溶液,在HPLC系统下即可对比阿培南开环物A及B进行定位,不依赖于LC-MS,更适用于日常检验。本文方法与文献<sup>[9]</sup>方法的条件比较见表3。

综上,本文建立的方法可对比阿培南的2个开环物杂质进行有效分离,方法专属性强、灵敏度高,可满足杂质测定要求,因



# 超高效液相色谱法同时测定复方氟喹酸鼻喷剂中3种组分的含量

区洁雯<sup>1\*</sup>,周小圆<sup>2</sup>,邓红<sup>2</sup>(1.佛山市顺德区第一人民医院,广东佛山 528300;2.广东药学院药物研究所,广州 510006)

中图分类号 R927.2;R987 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)41-3918-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.41.28

**摘要** 目的:同时测定复方氟喹酸鼻喷剂中氧氟沙星、盐酸萘甲唑啉及马来酸氯苯那敏的含量。方法:采用超高效液相色谱法,色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC<sup>®</sup>BEH C<sub>18</sub>,流动相为乙腈-0.03 mol/L 磷酸二氢铵溶液(含 0.005 mol/L 的庚烷磺酸钠, pH=3.0)(30:70),流速为 0.2 ml/min,进样量为 2 μl;使用光电二极管阵列检测器,检测波长为 220 nm。结果:氧氟沙星、盐酸萘甲唑啉、马来酸氯苯那敏检测质量浓度线性范围分别为 29.76~208.3、2.153~15.068、4.064~28.45 μg/ml( $r \geq 0.9997$ ),平均回收率分别为 100.1%、100.3%、100.9%,RSD 分别为 1.25%、1.20%、0.99%( $n=3$ )。结论:所建立的方法快速、准确,可用于复方氟喹酸鼻喷剂的质量控制。

**关键词** 复方氟喹酸鼻喷剂;氧氟沙星;盐酸萘甲唑啉;马来酸氯苯那敏;超高效液相色谱法;含量测定

**Simultaneous Determination of the Contents of 3 Components in Compound Ofloxacin Nasal Spray by UPLC**  
OU Jie-wen<sup>1</sup>, ZHOU Xiao-yuan<sup>2</sup>, DENG Hong<sup>2</sup>(1.Foshan Shunde District First People's Hospital, Guangdong Foshan 528300, China; 2.Institute of Materia Medica, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To determine the contents of ofloxacin, naphazoline hydrochloride and chlorphenamine maleate in Compound ofloxacin nasal spray simultaneously. METHODS: UPLC method was established. The Waters ACQUITY UPLC<sup>®</sup>BEH C<sub>18</sub> column was used with mobile phase consisted of acetonitrile-0.03 mol/L ammonium dihydrogen phosphate solution (containing 0.005 mol/L sodium heptanesulfonate, pH=3.0, 30:70) at the flow rate of 0.2 ml/min. The sample size was 2 μl. Photodiode array detector was adopted, and the detection wavelength was set at 220 nm. RESULTS: The linear range were 29.76-208.3 μg/ml for ofloxacin, 2.153-15.068 μg/ml for naphazoline hydrochloride and 4.064-28.45 μg/ml for chlorphenamine maleate ( $r \geq 0.9997$ ), respectively. The average recoveries were 100.1% (RSD=1.25%,  $n=3$ ), 100.3% (RSD=1.20%,  $n=3$ ) and 100.9% (RSD=0.99%,  $n=3$ ), respectively. CONCLUSIONS: The method is rapid and accurate, and can be used for quality control of Compound ofloxacin nasal spray.

**KEY WORDS** Compound ofloxacin nasal spray; Ofloxacin; Naphazoline hydrochloride; Chlorphenamine maleate; UPLC; Content determination

表3 2种分析方法的比较

Tab 3 Comparison of 2 kinds of analysis methods

参数	本法	文献法
色谱柱	Kromasil 100-5 C <sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)	Dikma Diamonsil C <sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)
流动相	0.01 mol/L 四丁基溴化铵溶液-乙腈-三乙胺(980:20:2,用磷酸调节 pH 值至 6.0)	0.1% 三乙胺溶液(用磷酸调节 pH 至 5.0)-乙腈(99:1)
波长	254 nm	220 nm
杂质定位方式	HPLC	LC-MS 及 HPLC-DAD
控制杂质	开环物 A、B	开环物 A 及 C, 二聚物 A 及 B

此本法可作为比阿培南中开环物的质控方法。同时,通过系统适用性试验,对特定杂质开环物 A 和 B 进行定位,不需要提供杂质对照品,操作方法简便,并可有效保证产品质量安全。

## 参考文献

[1] 赵敏,赵国君,张勇.新碳青霉烯类抗生素比阿培南[J].中国临床药理学杂志,2005,21(5):390.

- [2] 张菁,邢亮彬.HPLC法测定注射用比阿培南的含量及有关物质[J].中国抗生素杂志,2006,31(9):565.
- [3] 傅小雅.反相高效液相色谱法测定注射用比阿培南的含量及有关物质[J].海南医学院学报,2005,11(5):388.
- [4] 马杰,赵玉新,王广慧,等.凝胶色谱法测定比阿培南聚合物的含量[J].中国当代医药,2010,17(8):116.
- [5] 王蓓,张菁,马卫红.注射用比阿培南的有关物质测定方法研究[J].现代中西医结合杂志,2010,19(10):1247.
- [6] 刘俊华,张莉,程玉宝,等.HPLC法测定比阿培南二聚物方法研究及其降解途径考察[J].药物分析杂志,2012,32(3):468.
- [7] 明治制果制药株式会社.注射用 Omegacin 0.3g[EB/OL].(2013-02)[2013-04-15].<http://www.info.pmda.go.jp/>.
- [8] Nan Wang, Chun-Feng Li, Dou-Sheng Zhang, et al. Establishment of an HPLC method for the analysis of biapenem an its impurities[J]. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 2011, 20(2):171.

\* 副主任药师。研究方向:医院药学。电话:0757-22318955。E-mail:sdyyzj@126.com

(收稿日期:2013-03-06 修回日期:2013-05-28)