

阿莫西林原料药中有关物质的 UPLC-TOF-MS/MS 鉴定

雷勇胜¹, 宋丽明¹, 郝英魁¹, 王 云², 李 瑜², 蒋庆峰^{1*}

1. 天津药物研究院有限公司, 天津 300193

2. 沃特世科技有限公司, 北京 100026

摘要: 目的 快速鉴定阿莫西林原料药中的有关物质。方法 采用 UPLC-TOF-MS/MS 法测定。Waters Acquity UPLC™ BEH 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为乙酸铵体系; 体积流量 0.5 mL/min; 检测波长 254 nm; 柱温 30 °C; 进样量 10 μL。电喷雾电离源; 正离子检测; 毛细管电压 3.0 kV; 离子源温度 120 °C; 雾化气温度 500 °C; 雾化气体积流量 700 L/h; 锥孔气体积流量 50 L/h。结果 推测了阿莫西林原料药中 6 个杂质的化学结构及其裂解规律, 同时与欧洲药典中的杂质进行了比对归属。结论 建立的 UPLC-TOF-MS/MS 的方法和实验数据可为阿莫西林原料药的质量控制提供了重要依据。

关键词: 阿莫西林; 有关物质; UPLC-TOF-MS/MS; 裂解规律

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2015)01-0024-04

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2015.01.005

Identification of related substances in amoxicillin active pharmaceutical ingredients by UPLC-TOF-MS/MS

LEI Yong-sheng¹, SONG Li-ming¹, HAO Ying-kui¹, WANG Yun², LI Yu², JIANG Qing-feng²

1. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research Co. Ltd, Tianjin 300193, China

2. Waters China Ltd, Beijing 100026, China

Abstract: Objective To establish a rapid identification method for related substances in amoxicillin active pharmaceutical ingredients. **Methods** UPLC-TOF-MS/MS method was used. HPLC was carried out on Waters Acquity UPLC™ BEH column (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) with ammonium acetate solution as mobile phase. The detection wavelength was 254 nm and injection volume was 10 μL at the flow rate of 0.5 mL/min. The column temperature was set for 30 °C. MS conditions were that a mass spectrometry equipped with electrospray ionization (ESI) (+) source for detection. Capillary voltage was 3.0 kV, and source temperature was 120 °C. The desolvation temperature and flow rate of desolvation gas were 500 °C and 700 L/h. The flow rate of cone gas was 50 L/h. **Results** The structures and fragmentation regularities of six related substances in amoxicillin were elucidated according to their MS characteristics. At the same time, related substances were compared to the impurities from *European Pharmacopoeia*. **Conclusion** UPLC-TOF-MS/MS method and results can establish a basis for quality control and stability study of amoxicillin active pharmaceutical ingredients.

Key words: amoxicillin; related substances; UPLC-TOF-MS/MS; fragmentation regularity

阿莫西林又名安莫西林、安默西林, 是一种常用的青霉素类广谱 β 内酰胺类抗生素, 为一种白色粉末, 半衰期约为 61.3 min。阿莫西林在高温、光照、酸、碱和氧化条件下会发生降解, 生成阿莫西林的相关产物。临床上证实阿莫西林的聚合物会引起过敏反应, 所以在生产和贮存过程中产生的有关

物质直接影响产品质量和临床用药的安全性。为了控制有关物质、提高产品质量, 必须建立有效的分析检测手段。对于阿莫西林中有关物质的研究主要以高效液相色谱法为主^[1-3], 液-质 (LC-MS) 联用技术为辅^[4-8]。欧洲药典^[9]和美国药典^[10]都收录了该品种, 有关物质检查采用高效液相色谱法, 由于流

收稿日期: 2014-10-21

基金项目: 国家重大新药创制项目 (2009ZX09313-026)

作者简介: 雷勇胜 (1982—), 男, 助理研究员, 研究方向: 药物质量研究。Tel: (022)23006878 E-mail: leiys@tjpr.com

*通信作者 蒋庆峰 (1964—), 男, 研究员。Tel: (022)23006881 E-mail: jiangqf@tjpr.com

动相中有不挥发性磷酸盐,因此该方法不能直接用于 LC-MS 联用技术,因此,本实验用乙酸铵替代了磷酸盐,采用改良的色谱条件,通过 UPLC-TOF-MS/MS 法分析阿莫西林中的有关物质,并根据质谱图推测其结构,为阿莫西林进行质量控制提供了技术保证。

1 仪器与试剂

Agilent 1200型高效液相色谱系统(美国 Agilent 公司), Waters 液相色谱仪 (Acquity UPLC 体系) 和 Synapt G2 型质谱检测器 (美国 Waters 公司), MassLynx 4.1SCN 712 工作站。阿莫西林原料药由石药集团中润制药(内蒙古)有限公司提供,批号 120502; 甲醇、乙腈 (Finnigan 公司) 均为色谱纯试剂,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 样品处理

取阿莫西林样品约 50 mg, 精密称定后置于 25 mL 量瓶中,用流动相超声溶解并稀释至刻度,摇匀,经微孔滤膜滤过,待用。由于样品不稳定,每日实验需新鲜配制。

2.2 HPLC 分析

Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: A 相为 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液 (2 mol/L 氢氧化钾溶液调节 pH 值至 5.0) - 乙腈 (99:1), B 相为 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液 (2 mol/L 氢氧化钾溶液调节 pH 值至 5.0) - 乙腈 (80:20); 梯度洗脱, 程序为 0~7 min、8%B, 7~32 min、8%~100%B, 32~47 min、100%B, 47~48 min、100%~8%B, 48~62 min、8%B; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 254 nm; 柱温 30 °C; 进样量 50 μL。在 254 nm 波长处分析测定阿莫西林中的有关物质, 结果表明, 质量分数>0.1%的杂质有 8 个。色谱图见图 1。

2.3 LC-MS 分析

Waters Acquity UPLC™ BEH 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相: A 相为 0.005 mol/L 乙酸铵缓冲液 (乙酸调节 pH 值至 5.0) - 乙腈 (99:1), B 相为 0.005 mol/L 乙酸铵缓冲液 (乙酸调节 pH 值至 5.0) - 乙腈 (80:20); 梯度洗脱, 程序为 0~3.64 min、0%~60%B, 3.64~12.53 min、60%B, 12.53~13.09 min、60%~0%B, 13.09~17 min、0%B; 体积流量 0.5 mL/min; 检测波长 254 nm; 柱温 30 °C; 进样量 10 μL。

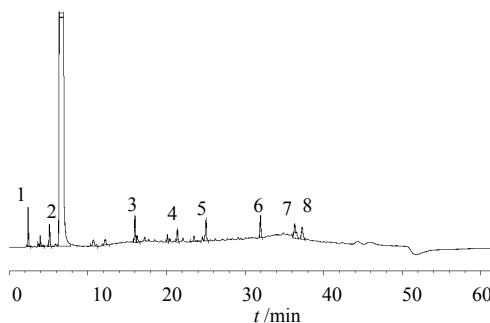


图1 阿莫西林原料药中的有关物质的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatogram of related substances in amoxicillin active pharmaceutical ingredients

电喷雾电离源; 正离子检测; 毛细管电压 3.0 kV; 离子源温度 120 °C; 雾化气温度 500 °C; 雾化气体流量 700 L/h; 锥孔气体流量 50 L/h。

2.4 阿莫西林中有关物质的 LC-MS 法快速测定

用紫外和正离子同时检测, 得 PDA (254 nm) 色谱图 (图 2) 和 TIC 图 (图 3)。由于杂质 1、8 在正负离子两种模式下均没有明显信号出现, 实验只对 PDA (254 nm) 图中的杂质 2~7 进行了进一步的分析, 即 TIC 图中保留时间分别为 0.67、0.94、1.20、2.35、3.24、4.19 min 的峰。

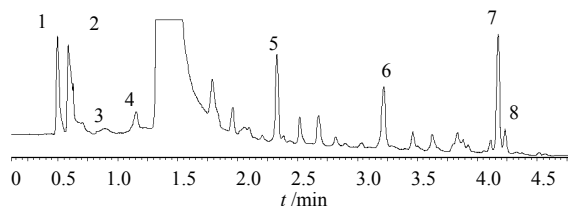


图2 阿莫西林原料药中的有关物质的 PDA 色谱图

Fig. 2 PDA of related substances in amoxicillin active pharmaceutical ingredients

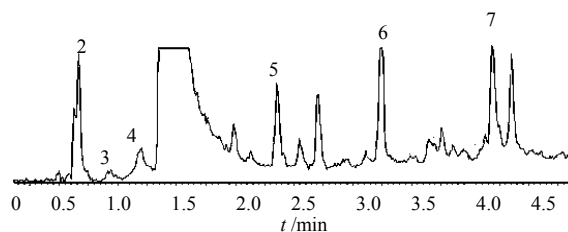


图3 阿莫西林原料药中的有关物质的 TIC 色谱图

Fig. 3 Total ion mass spectra of related substances in amoxicillin active pharmaceutical ingredients

2.5 有关物质的质谱解析

2.5.1 阿莫西林噻唑酸 (杂质 D) 及其异构体的鉴定 杂质 2 的一级质谱图中, 可得到 m/z 367.096 8、

384.122 5 的主要正离子峰,推断 m/z 384.122 5 的离子峰为该杂质的 $M+1$ 峰,而 m/z 367.1 为脱去 NH_3 碎片 ($384.1-17=367.1$),确定分子式为 $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$,进一步做二级质谱。在二级质谱图中,出现 m/z 367.1、323.1、189.1 的碎片离子,其中 m/z 323.1 为酰胺键断裂产生的碎片, m/z 189.1 为第 2 个酰胺键断裂产生的碎片,结合二级质谱,推导出该化合物为阿莫西林噻唑酸(杂质 D),其裂解途径见图 4。杂质 3、4 的分子离子峰与杂质 2 的一样,都为 m/z 384.1,二级质谱裂解规律也与杂质 2 一致,推测它们为阿莫西林噻唑酸的异构体,因为阿莫西林噻唑酸有多个手性中心。

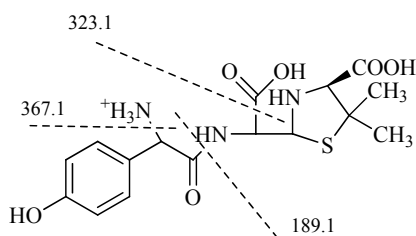


图 4 杂质 2、3、4 的可能的裂解途径

Fig. 4 Possible fragmentation pathways of impurity 2, 3, and 4

2.5.2 4-羟基苯甘氨酸阿莫西林(杂质 G)的鉴定 杂质 5 的一级质谱图中,可得到 m/z 515.160 3 的主要正离子峰,推断 m/z 515.160 3 的离子峰为该杂质的 $M+1$ 峰,确定分子式为 $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_7\text{S}$,二级质谱图中,出现 m/z 498.1、339.1、311.1、160.0、122.1 的碎片离子,其中 m/z 498.1 为脱去 NH_3 的碎片离子, m/z 339.1、60.0 为 β 内酰胺的四元环断裂产生的碎片离子, m/z 311.1 为脱去羰基的碎片离子,根据一级、二级质谱的数据,推导出该化合物为 4-羟基苯甘氨酸阿莫西林。其裂解途径见图 5。

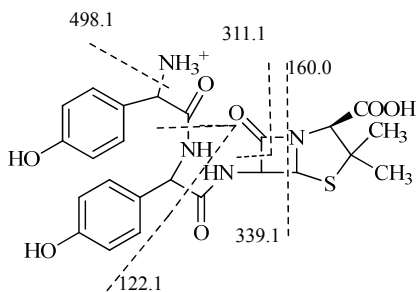


图 5 杂质 5 的可能的裂解途径

Fig. 5 Possible fragmentation pathways of impurity 5

2.5.3 脱羧阿莫西林噻唑酸(杂质 E)的鉴定 杂质 6 的一级质谱图中,可得到 m/z 279.093 5、323.105 7、

340.134 4 的主要正离子峰,推断 m/z 340.134 4 的离子峰为该杂质的 $M+1$ 峰,而 m/z 323.1 为脱去 NH_3 的碎片 ($340.1-17=323.1$), m/z 279.093 5 为脱去 NH_3 、 CO_2 的碎片 ($340.1-17-44=279.1$),确定分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$,进一步做二级质谱,出现 m/z 323.1、189.1、160.0、122.1 的碎片离子,其中酰胺键断裂产生 m/z 189.1 的碎片离子,推导出该化合物为脱羧阿莫西林噻唑酸。其裂解途径见图 6。

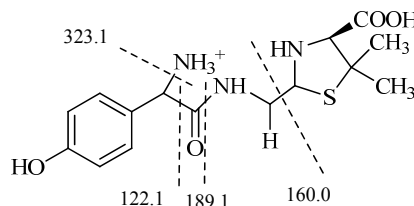


图 6 杂质 6 的可能的裂解途径

Fig. 6 Possible fragmentation pathways of impurity 6

2.5.4 阿莫西林噻唑酸和阿莫西林的二聚体(杂质 J)的鉴定 杂质 7 的一级质谱图中,可得到 m/z 713.215 9 的主要正离子峰,推断 m/z 713.215 9 的离子峰为该杂质的 $M+1$ 峰,确定分子式为 $\text{C}_{32}\text{H}_{39}\text{N}_6\text{O}_{10}\text{S}_2$,进一步做二级质谱,二级质谱图中的碎片离子 m/z 572.2、160.0 是由于 β 内酰胺的四元环断裂产生的, m/z 555.2 为脱去 NH_3 的碎片离子,酰胺键断裂产生 m/z 366.1 的碎片离子, C-N 键断裂产生 m/z 349.1 的碎片离子,通过质谱分析,推导出该化合物为阿莫西林噻唑酸和阿莫西林的二聚体。其裂解途径见图 7。

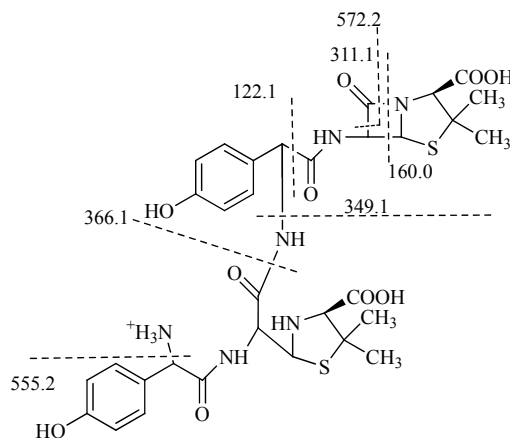


图 7 杂质 7 的可能的裂解途径

Fig. 7 Possible fragmentation pathways of impurity 7

2.5.5 阿莫西林原料药中有关物质的归属 杂质 2~7 都为阿莫西林原料药的降解或聚合产物,具有相似的质谱裂解规律,都很容易脱去 NH₃、CO、CO₂,酰胺键断裂,这些规律对快速鉴定阿莫西林中有关物质的化学结构很有帮助。同时对杂质 2~7 与欧洲药典中列举的阿莫西林中的杂质进行了对比,根据质谱结果进行了归属,UPLC-MS 检测到的杂质的欧洲药典归属、质谱裂解碎片见表 1。

表 1 UPLC-MS 检测到的杂质及欧洲药典归属
Table 1 Impurities of detected and corresponding to European Pharmacopoeia

峰号	保留时间/min	一级质谱 <i>m/z</i>	二级质谱 <i>m/z</i>	对应欧洲药典 7.0 中的杂质
2	0.67	384.1	367.1、323.1、189.1	阿莫西林噻唑酸异构体 (杂质 D)
3	0.94	384.1	367.1、323.1、189.1	阿莫西林噻唑酸异构体 (杂质 D)
4	1.20	384.1	367.1、323.1、189.1	阿莫西林噻唑酸异构体 (杂质 D)
5	2.35	515.1	498.1、339.1、311.1、160.0、122.1	4-羟基苯甘氨酸阿莫西林 (杂质 G)
6	3.24	340.1	323.1、189.1、160.0、122.1	脱羧阿莫西林噻唑酸 (杂质 E)
7	4.19	731.2	572.2、555.2、366.1、349.1、311.1、160.0、122.1	阿莫西林噻唑酸与阿莫西林的二聚体 (杂质 J, <i>n</i> =1)

3 讨论

为了促进化合物的离子化,提高质谱检测的灵敏度,尝试在流动相中加入适量的甲酸或乙酸。结果表明,加入甲酸或乙酸后,正离子模式下的质谱响应都明显增强,但加入甲酸后,部分化合物的峰形较差,而在乙酸条件下都能保持较好的峰形。经反复试验,以 0.005 mol/L 乙酸铵缓冲液(用乙酸调节 pH 值至 5.0)的水溶液作为流动相,可以获得较好的质谱灵敏度和优异的峰形。

本实验建立的对阿莫西林中有关物质的 UPLC-MS/MS 测定方法,使杂质与主成分获得了良好的分离的同时大大缩短了检测时间,使阿莫西林原料药中的杂质准确、快速地得到鉴定。通过质谱解析,可以快速确定杂质的结构,为阿莫西林的质量控制提供了依据。

参考文献

[1] 李哲媛,李玉凤,范 兵,等. 高效液相凝胶色谱法测定阿莫西林中的高分子杂质 [J]. 华西药学杂志, 2005, 20(1): 52-54.
[2] 李哲媛,李玉凤,范 兵,等. 阿莫西林中高分子杂质的测定与质量分析 [J]. 中国现代应用药学, 2006,

23(4): 326-327.
[3] Cai S Y, Hu C Q, Xu M Z. Chromatographic determination of high-molecular weight impurities in amoxicillin [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2003, 31 (3): 589-596.
[4] Valvo L, Ciranni E, Alimenti R, *et al.* Development of a simple liquid chromatographic method with UV and mass spectrometric detection for the separation of substances related to amoxicillin sodium [J]. *J Chromatogr A*, 1998, 797(1-2): 311-316.
[5] Valvo L, Alimonti S, Alimenti R, *et al.* Investigation of a new amoxicillin sodium impurity unstable in solution [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 1997, 15(4): 487-493.
[6] Lu C Y, Feng C H. Identification of dimer impurities in ampicillin and amoxicillin by capillary LC and tandem mass spectrometry [J]. *J Separation Sci*, 2007, 30: 329-332.
[7] 牛长群,祝仕清. 氨苄西林、阿莫西林中相关物质的 LC-MS 分析 [J]. 药学学报, 2001, 36(10): 758-761.
[8] Roets E, De P P, Toppet S, *et al.* Isolation and structure elucidation of ampicillin and amoxicillin oligomers [J]. *J Chromatogr A*, 1984, 303: 117.
[9] *European Pharmacopoeia* 7.0 [S]. 2011: 1389.
[10] *USP 32-NF27* [S]. 2012: 1540.