

阿莫西林原料药目标杂质的结构鉴定

LCMS-IT-TOF-026

摘要：阿莫西林原料药在生产过程中可生成多种结构类似物或聚合物，具有潜在的危害，影响产品质量及用药安全性。本文制备分离阿莫西林原料药中的 4 个目标杂质组分，通过 LCMS-IT-TOF 获得目标杂质的多级质谱数据，根据碎片信息对目标杂质结构进行推测，鉴别了阿莫西林原料药中的 4 个杂质的化学结构并总结其裂解规律，为阿莫西林原料药质量控制提供可靠的依据。

关键词：阿莫西林原料药；目标杂质；LCMS-IT-TOF；化学结构；裂解规律

阿莫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 分钟。在高温、光照、酸、碱和氧化条件下会发生降解。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，液质联用技术为辅，此外还有胶束电动毛细管色谱法，高效毛细管电泳法，离子交换树脂法等。

欧洲药典与美国药典都收载了该品种，有关物质检查采用了高效液相色谱法（HPLC），由于流动相中有不挥发性磷酸盐，该方法不能直接用于液质联用技术（LC-MS），因此，我们用甲酸体系替代了磷酸盐，采用改良的色谱条件，通过 LCMS-IT-TOF 法分析阿莫西林原料药中的目标杂质，并根据质谱图初步推测其结构，为阿莫西林原料药进行质量控制提供了技术保证。

实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1200 型高效液相色谱系统，Shimadzu LCMS-IT-TOF 系统，包括 LC-20AD \times 2(输液泵)，SIL-20AC (自动进样器)，CTO-20AC(柱温箱)，CBM-20A(控制器)，DGU-20A₃(在线脱气机)，SPD-M20A (二极管阵列检测器)，LCMS-IT-TOF(电喷雾 - 离子阱 - 飞行时间质谱)

阿莫西林原料药 (某药厂提供，批号 100605)，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。

1.2 分析型液相制备阿莫西林原料药中的目标杂质

1.2.1 样品处理

取样品约 50 mg，精密称定于 25 mL 量瓶中，用流动相 A 超声溶解并稀释至刻度，摇匀，经微孔滤膜过滤，待用。（样品不稳定，每日实验需新鲜配制）

1.2.2 实验方法

1.2.2.1 HPLC 色谱条件：色谱柱 ZORBAX SB-C₁₈ 4.6 \times 250 mm 5 μ m，梯度洗脱（见表 1）；流速 1.0 mL/min，检测波长

254 nm, 柱温 30 , 进样量 100 μL; 流动相体系: 量取 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液 (用 2 mol/L 氢氧化钾溶液调节 pH 值至 5.0) 与乙腈按 99:1 的比例混匀, 经微孔滤膜过滤, 待用; 流动相体系 1-B: 量取 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液 (用 2 mol/L 氢氧化钾溶液调节 pH 值至 5.0) 与乙腈按 80:20 的比例混匀, 经微孔滤膜过滤, 待用。

表 1 梯度洗脱程序 1

| Time (min) | Mobile phase A(%) | Mobile phase B(%) |
|------------|-------------------|-------------------|
| 0 | 92 | 8 |
| 7 | 92 | 8 |
| 32 | 0 | 100 |
| 47 | 0 | 100 |

1.2.2.2 目标杂质的馏分收集

手动收集保留时间分别为 4.1 min(Fraction 1) , 24.8 min(Fraction 2) , 31.6 min(Fraction 3) , 35.7 min(Fraction 4) 的目标杂质峰, 用于 LCMS-IT-TOF 测定。见附图 1。

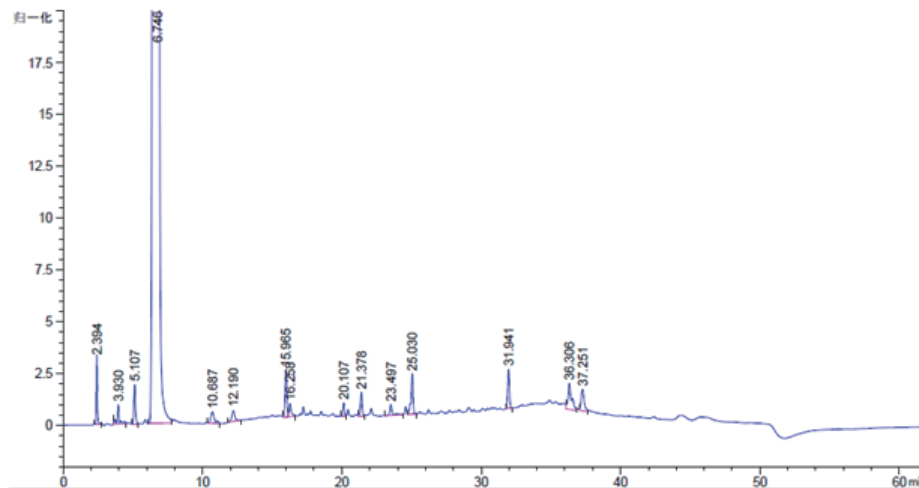


图 1 HPLC 测定阿莫西林原料药中的有关物质

1.3 LCMS-IT-TOF 自动分析模式对目标杂质进行分析测定

1.3.1 LC-MS 条件: 色谱柱 Shim-pack XR-ODS ,2.0 × 75 mm ,2.2 μm (岛津公司); 柱温 30 , 流动相为甲酸体系, 流速 0.2 mL/min, 检测波长 UV254 nm; 质谱条件: 电喷雾电离源, 正、负离子检测, 雾化气流速 1.50 L/min, CDL 温度 200 , 加热模块温度 200 , 检测器电压 1.70 kv, 碰撞能量 50%, 采集范围 m/z 100-1000, 自动调谐优化质谱条件, 外标法校正质量数, 母离子选择方式为自动模式。流动相体系: 流动相 A: 水 +0.1% 甲酸; 流动相 B: 乙腈。梯度洗脱条件见表 2 与表 3。

表 2 梯度洗脱程序 2

| 时间 | 单元 | 操作 | 值 |
|-------|------------|--------|----|
| 0.00 | Pumps | B.Conc | 2 |
| 2.00 | Pumps | B.Conc | 2 |
| 7.00 | Pumps | B.Conc | 95 |
| 7.20 | Pumps | B.Conc | 2 |
| 10.00 | Pumps | B.Conc | 2 |
| 10.00 | Controller | Stop | |

表 3 梯度洗脱程序 3

| 时间 | 单元 | 操作 | 值 |
|-------|------------|--------|----|
| 0.00 | Pumps | B.Conc | 2 |
| 3.00 | Pumps | B.Conc | 2 |
| 7.00 | Pumps | B.Conc | 80 |
| 13.00 | Pumps | B.Conc | 80 |
| 13.20 | Pumps | B.Conc | 2 |
| 17.00 | Controller | Stop | |

* 样品 F1、F2 使用梯度 2 进行分析

样品 F3、F4 使用梯度 3 进行分析

1.3.2 样品测定

对制备分离得到的目标杂质 F1, F2, F3, F4 进行测定。

结果

2.1 实验结果分析：

2.1.1 目标杂质 F1 检测结果

2.1.1.1 RT=3.9min 谱峰的多级质谱数据分析

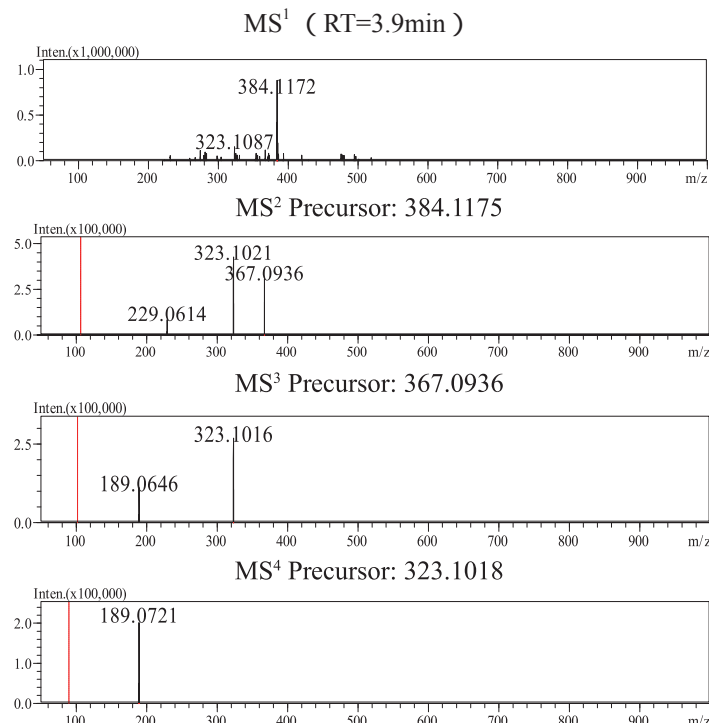


图 2 m/z 384.1172 离子 (RT=3.9min) 的多级质谱数据

根据分子式预测结果,目标杂质F1的分子式为 $C_{16}H_{21}N_3O_6S$ 。根据此分子式并对照参考文献^[1],推测F1为图3所示:

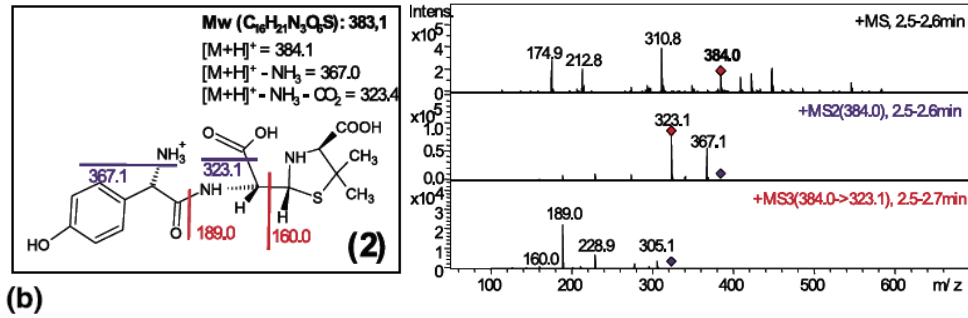


图3 文献报道的结构及裂解规律

2.1.1.2 RT=5.4min 谱峰的多级质谱数据分析

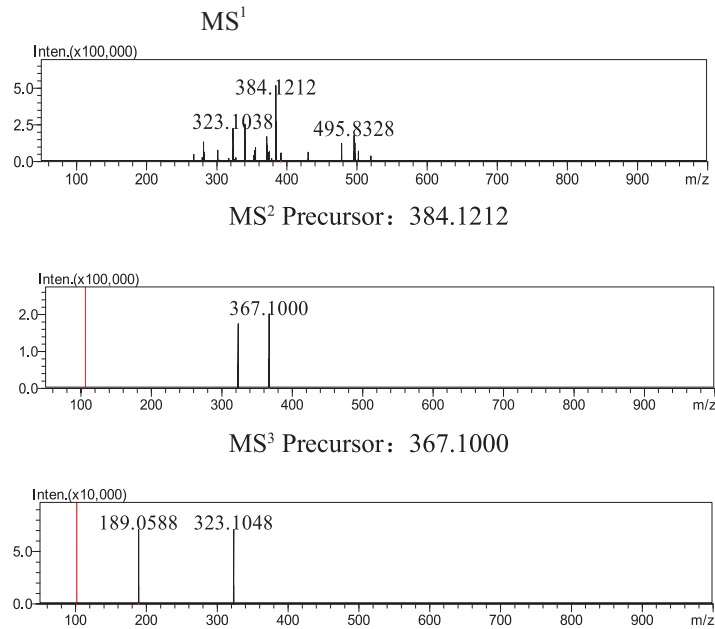


图4 m/z 384.1212 离子 (5.4 min) 的多级质谱数据

m/z 384(5.4 min) 与 m/z 384(3.9 min) 具有一致的多级质谱碎片结合分子式预测结果, m/z 384(5.4 min) 与 m/z 384(3.9 min) 互为异构体, 结合文献^[1], 推测该化合物为欧洲药典中的D杂质。

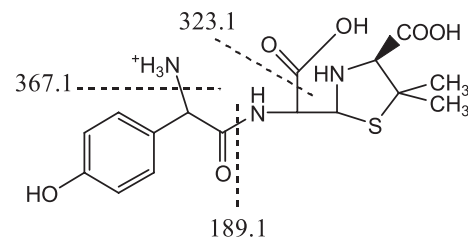


图5 F1的多级质谱裂解方式

2.1.2 目标杂质 F2 的检测结果

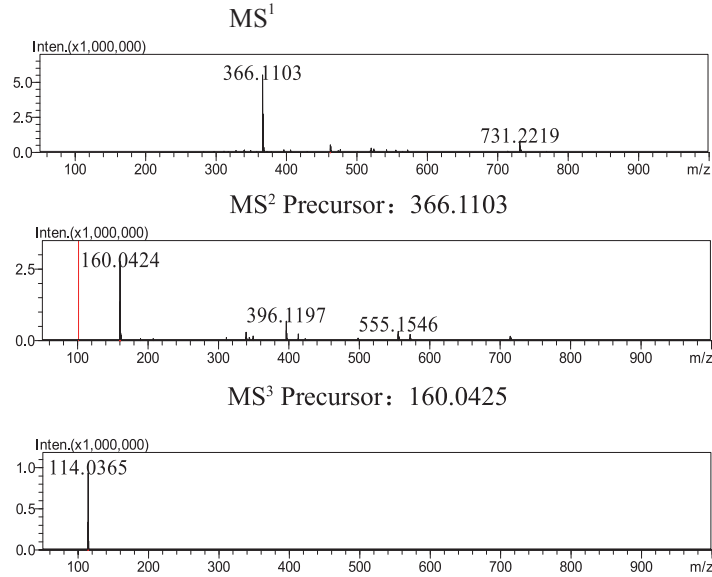


图 6 m/z 366 离子的多级质谱图

m/z 366 离子为双电荷离子，如下图 7 所示，且二级碎片中具有较多大于 366 的碎片离子，因此，推测目标杂质 F2 为二聚体。

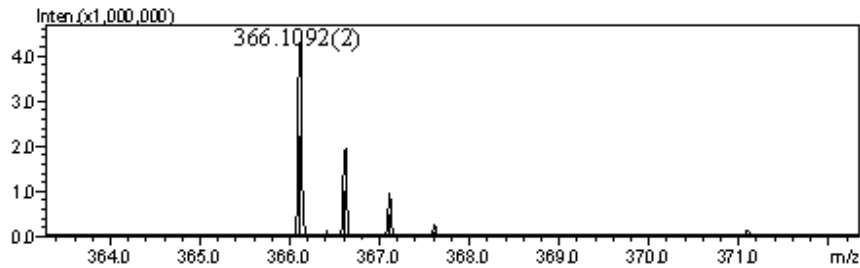


图 7 m/z 366 离子放大后的一级质谱图

m/z 366 (2+) 离子的预测分子式可能为 C₃₂H₃₈N₆O₁₀S₂，其二聚体的分子量为 731，其单体多级碎片与下图一致，推测 m/z 366 具有下图 8 所示的结构。

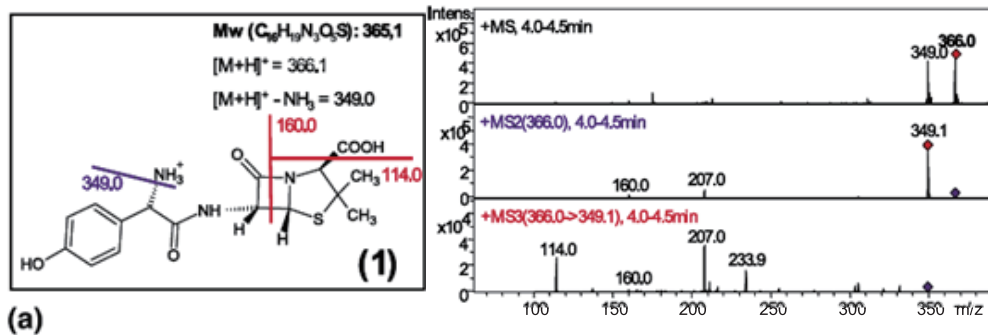


图 8 文献报道的结构及质谱裂解规律

多级质谱图中 MS² 质谱图除 m/z 160 离子外，显示多个质量数较大碎片，我们进行了推测（见下图 9、10、11），结合文献^[1,2] 确定该目标杂质为欧洲药典中的 J 杂质 (n=1) 即为 F2。

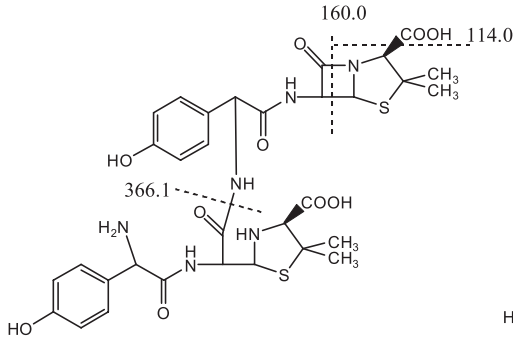


图9 质量较小碎片的多级质谱分析

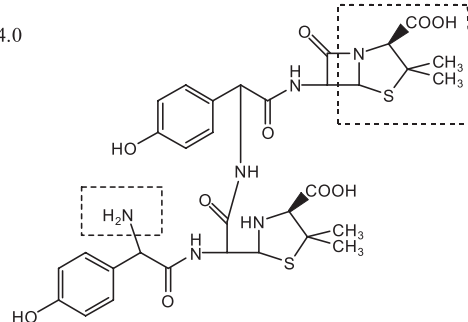


图10 MS 555 碎片形成时丢失的部分

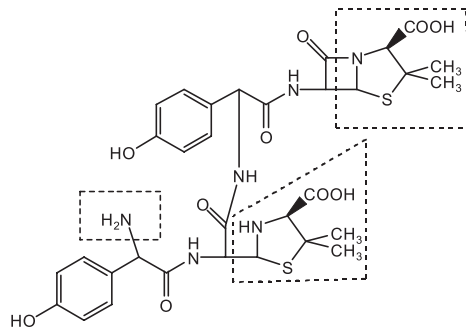
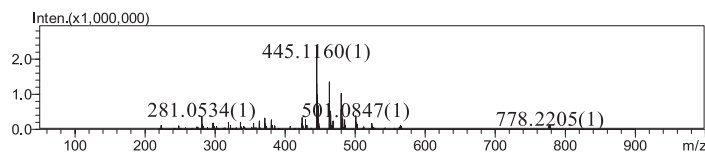


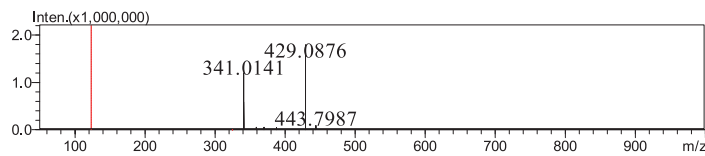
图11 MS 396 碎片形成时丢失的部分

2.1.3 目标杂质 F3 检测结果

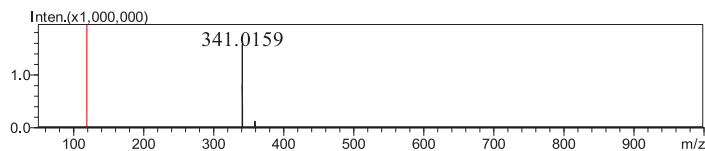
MS¹



MS² Precursor : 445.1155



MS³ Precursor : 429.0873



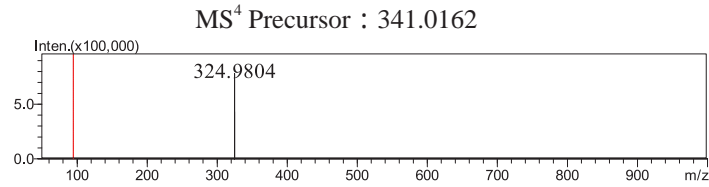


图 12 m/z 445 离子的多级质谱图

结论：m/z 445 离子的分子式，为 C₂₂H₂₈N₄O₄S，结合多级质谱图，推测结构如下图 13，未见报道。同时我们推测了 F3 的生成途径，如图 14 所示。

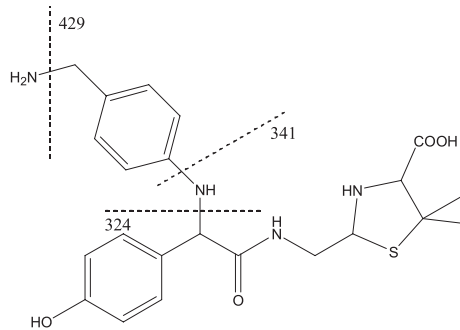


图 13 F3的质谱裂解方式

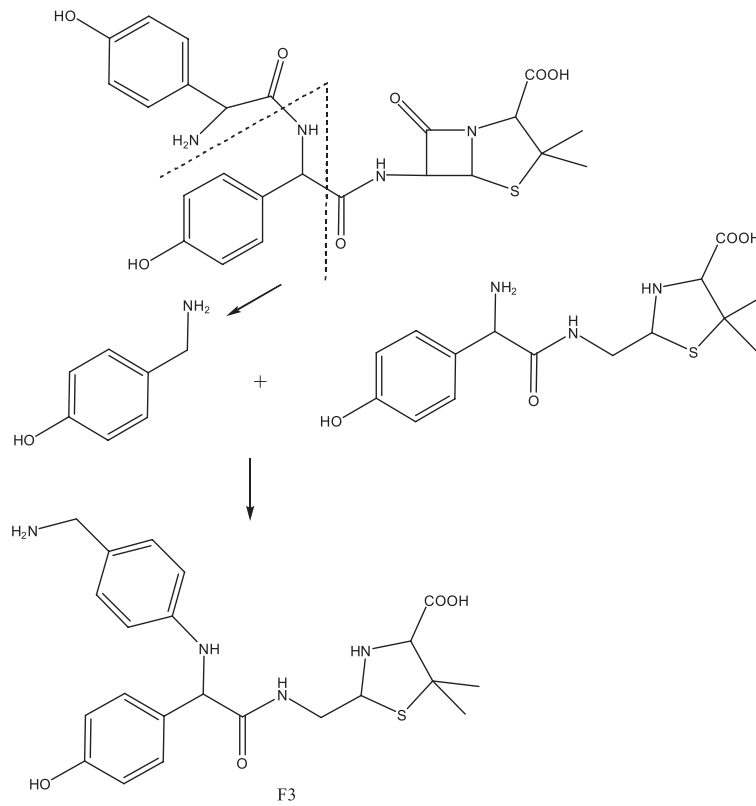


图 14 F3的生成途径

2.1.4 目标杂质 F4 检测结果

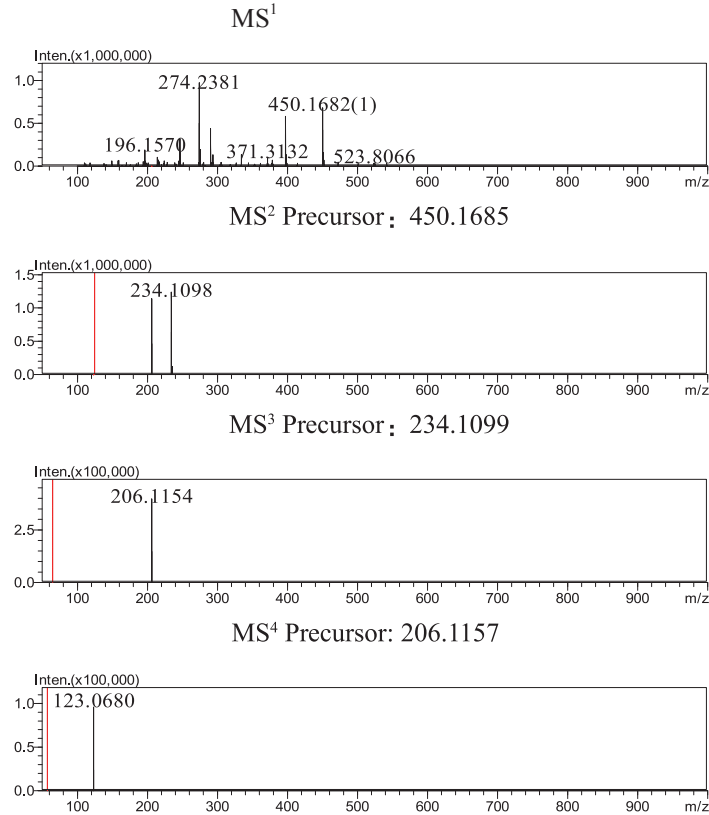


图 15 m/z 450 离子的多级质谱图

根据分子式预测软件的计算，推测 m/z 450 离子分子式为 C₂₁H₂₇N₃O₆S，结合多级质谱碎片及裂解方式（图 16、图 17、图 18），推测结构如下所示。同时我们推测了 F4 的生成途径：如图 19 所示。

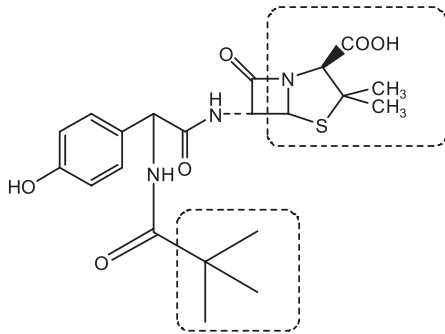


图 16 m/z 234 的碎片的形成时丢失的部分

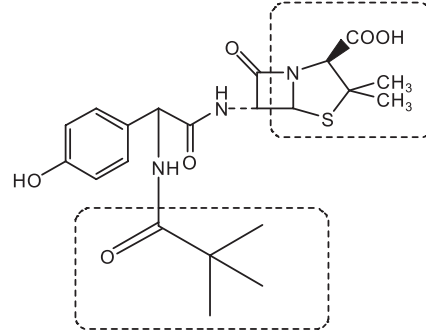


图 17 m/z 206 的碎片的形成时丢失的部分

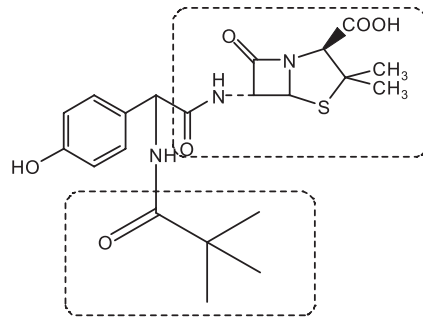
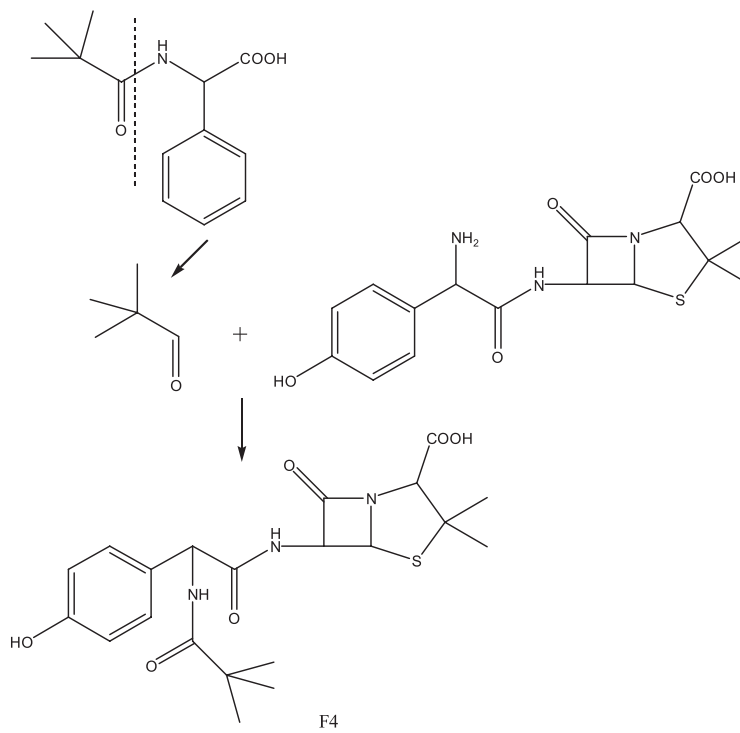


图18 m/z 123的碎片的形成时丢失的部分



2.2 实验结论

采用 LCMS-IT-TOF 系统对 4 个目标杂质进行质谱分析，获得其多级质谱图，结合文献推测分子式如下表 4：

表 4 四个杂质的分子式

| | |
|----|----------------------------|
| F1 | $C_{16}H_{21}N_3O_6S$ |
| F2 | $C_{32}H_{38}N_6O_{10}S_2$ |
| F3 | $C_{22}H_{28}N_4O_4S$ |
| F4 | $C_{21}H_{27}N_3O_6S$ |

其中，F1 与 F2 为已知杂质，F1 多级质谱裂解特征与文献^[1]报道一致；F2 为二聚体，其单体裂解规律与文献^[1]报道一致，二聚体的裂解的碎片我们也进行了简单的推导；F3 与 F4 为未知杂质，结合阿莫西林有关物质的质谱裂解规律文献^[1,2]报道，推导出了结构，而且推测了它们的生成途径。虽然利用 LCMS-IT-TOF 液质联用仪提供的准确质量数、多级质谱碎片对它们的结构进行了推测，但是它们的结构还需要其它手段去进一步确证。结构如下图 20：

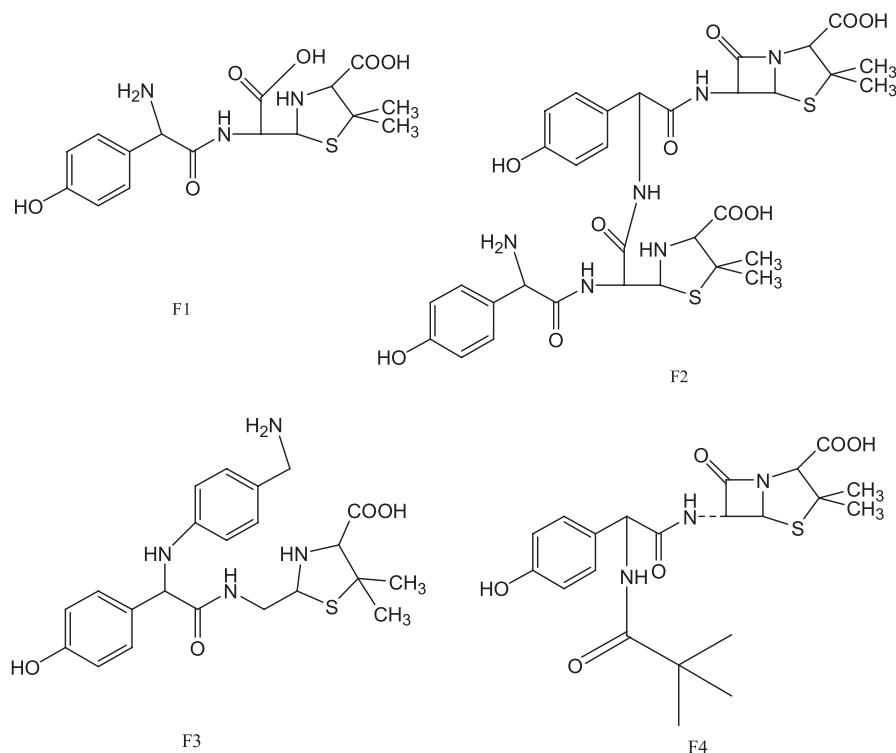


图 20 F1, F2, F3, F4 的化学结构

讨论

LCMS-IT-TOF 技术将离子阱和飞行时间质谱串联起来，同时实现了多级质谱功能和精确质量测定，非常有利于未知化合物的结构推测与鉴定。在本实验中，对阿莫西林原料药中的 4 个微量目标杂质进行了检测与鉴定，为阿莫西林原料药进行质量控制提供了保证。

参考文献：

- [1] Edgar Nägele, Ralf Moritz. Structure Elucidation of Degradation Products of the Antibiotic Amoxicillin with Ion Trap MSn and Accurate Mass Determination by ESI TOF [J]. J Am Soc Mass Spectrom, 2005, 16:1670-1676.
- [2] Lu Chi-Yu, Feng Chia-Hsien. Identification of dimer impurities in ampicillin and amoxicillin by capillary LC and tandem mass spectrometry [J]. J. Sep. Sci. 2007, 30:329-332.