

二维液相色谱-质谱联用分析阿莫西林中杂质

前言

阿莫西林（Amoxicillin）又称羟氨苄青霉素，CAS No. 26787-78-0，是一种常用的青霉素类广谱β-内酰胺类抗生素，在高温、光照、酸、碱和氧化等条件下不稳定。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。在《中国药典》2020 版中分析阿莫西林有关物质时，采用高效液相色谱紫外检测器法，流动相为磷酸二氢钾溶液和乙腈。由于流动相中含有不挥发性磷酸盐，该方法不能直接进行质谱分析。因此，本方法采用在线柱切换二维液相色谱，将一维目标杂质峰通过阀切换转入二维色谱柱，并进行在线脱盐，然后采用质谱兼容的流动相，实现质谱定性分析。

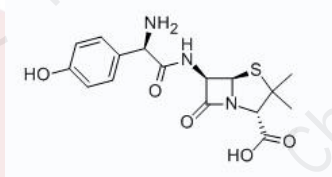


图 1 阿莫西林结构式 (MW 365.4)

仪器系统：

Chromai 二维液相色谱系统（双三元泵 P60、自动进样器 A10C、标配两个二位六通阀柱温箱 C10V2、紫外检测器 D10）

Chromai 三重四级杆质谱仪（TQ5000）



图 2 Chromai 液相色谱-质谱联用仪 (TQ5000)

液相色谱条件:

一维色谱柱: Lotus ACC4 4.6×250 mm, 5 μm

二维色谱柱: Lotus AQ-C18 4.6×250 mm, 5 μm

一维流动相 A: [0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液 (2 mol/L 氢氧化钾调节 pH 至 5.0)]: 乙腈=99:

1

一维流动相 B: [0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液 (2 mol/L 氢氧化钾调节 pH 至 5.0)]: 乙腈=80:

20

二维流动相 A: 0.1%甲酸水

二维流动相 B: 乙腈

柱温: 35 °C

流速: 1.0 mL/min

Loop 环体积: 1000 μL

进样体积: 50 μL

检测波长: 254 nm

质谱参数:

电离源: ESI 源



扫描模式：Q1 全扫描，正离子模式， m/z : 200-1200；负离子模式， m/z : 80-500

子离子扫描： m/z : 100-400，标准分辨率，CE 10 V，CAD 8

离子源温度：550 °C

辅助加热气：50 psi

雾化气：40 psi

气帘气：40 psi

样品前处理

称取阿莫西林 20.0 mg，加入一维流动相 A 超声溶解并定容至 10.0 mL，0.22 μ m 微孔滤膜过滤，待分析。

结果与讨论

阿莫西林杂质在一维及二维色谱的保留时间见表 1，分析时将一维色谱中目标峰收集到 Loop 环中，再次切阀把目标峰转移至二维色谱柱中，0-10min 切至废液实现在线脱盐，10.1min 开始切入质谱进行定性分析（见图 3）。

表 1 二维液相保留时间和柱温箱六通阀切阀时间

一维色谱峰峰号	2	5	6	7	8	9
一维保留时间 /min	7.742	25.842	28.905	30.946	33.545	34.259



二维保留时间	12.345	12.427	12.544	14.043	13.662	13.767
/min						

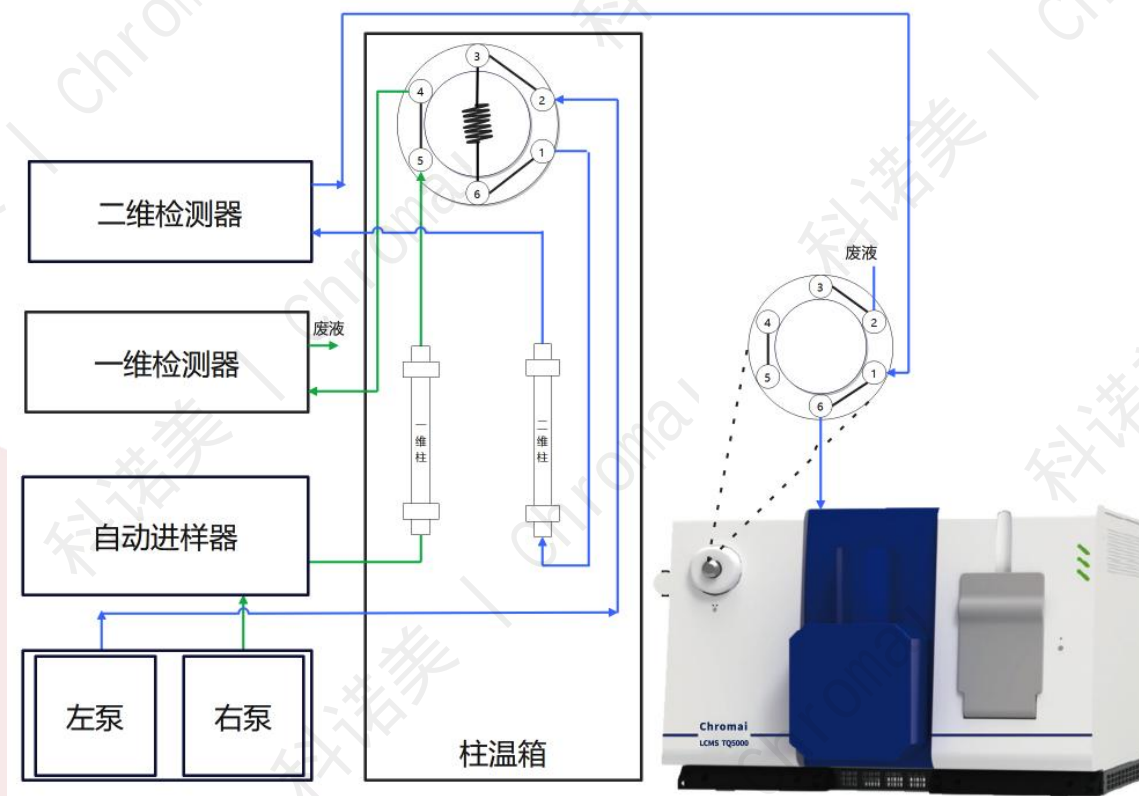


图 3 二维液相色谱质谱联用示意图

色谱图

如图 4 所示，一维色谱图中 1、2、4、5、6、7、8、9、10、11、12 号峰为杂质峰，3 号峰为阿莫西林主成分。



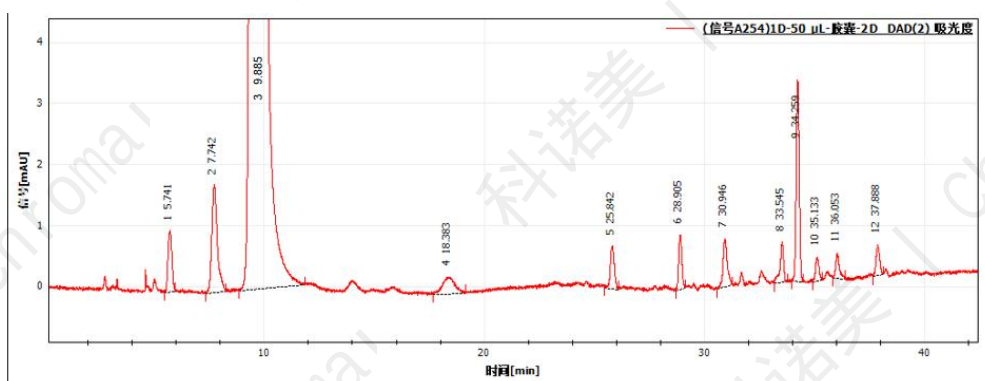


图 4 二维液相色谱中一维色谱图

质谱图

杂质在质谱上的母离子与特征碎片离子分别如下图所示，根据碎片离子与参考文献，可初步推测鉴定阿莫西林中各杂质成分。

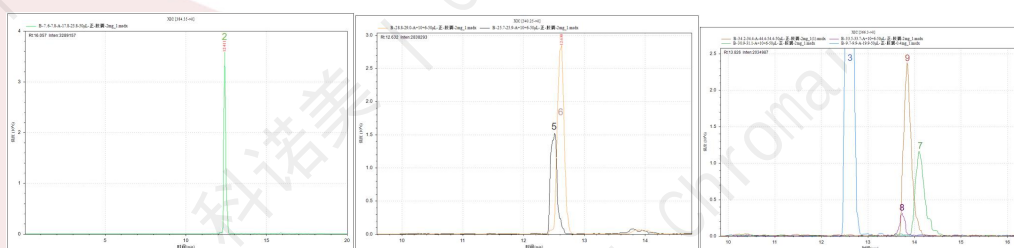


图 5 各编号杂质峰提取离子流图（提取偏差 0.5）

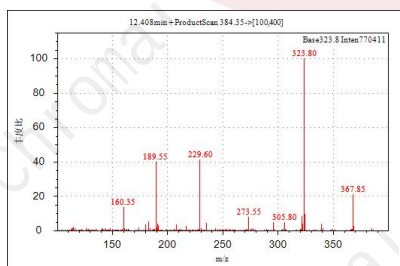


图 6 2号峰子离子扫描特征离子谱图

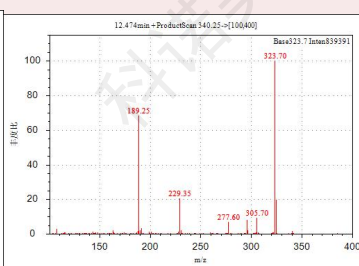


图 7 5号峰子离子扫描特征离子谱图

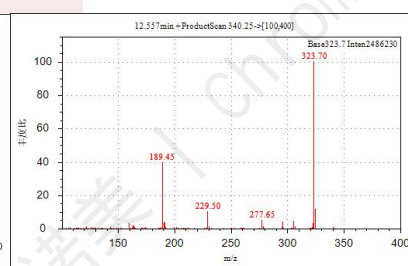


图 8 6号峰子离子扫描特征离子谱图

征离子谱图



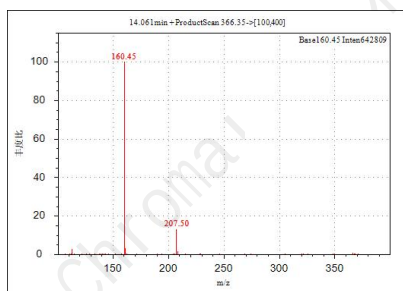


图 9 7号峰子离子扫描特征离子谱图

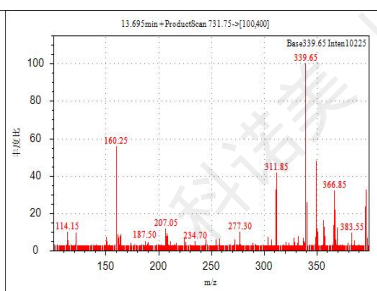


图 10 8号峰子离子扫描特征离子谱图

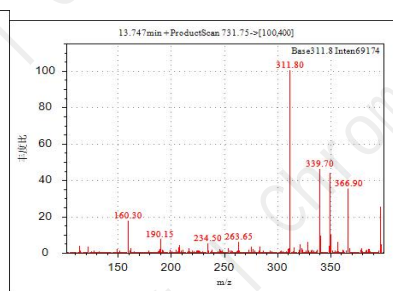


图 11 9号峰子离子扫描特征离子谱图

描特征离子谱图

表 2 各编号杂质峰全扫描与子离子扫描结果汇总

色谱峰编号	正离子全扫描 m/z	子离子碎片 m/z	负离子全扫描 m/z
2	384.35	367.85、323.80、229.60、189.55	382.25、338.20
5	340.25	323.70、229.35、189.25	338.20
6	340.25	323.70、229.50、189.45	338.30
7	366.30	207.50、160.45	364.25、410.25
8	366.25、731.50	396.95、366.85、339.65、311.85、 160.25	729.35
9	366.45、731.60	396.95、366.90、339.70、311.80、 160.30	729.55

根据表 2 结果，通过与文献对比，推测如下：2 号峰杂质可能为 amoxicilloic acid (5S,6R)

或 amoxicilloic acid (5R,6R)^[1, 2]；5 号峰与 6 号峰具有一致的质谱碎片，应互为同分异构体，

可能为 amoxilloic acid (5S)或 amoxilloic acid (5R)^[1, 2]；7 号峰与阿莫西林主成分具有一致的



质荷比，应互为同分异构体，可能为 L-amoxicillin, amoxicillin (5R) piperazine-2',5'-dione 或 amoxicillin (5S) piperazine-2',5'-dione^[1,2]；8 号峰与 9 号峰具有一致的质荷比，且质谱碎片基本一致，推测该杂质为阿莫西林二聚体^[2]。

结论

本方案使用科诺美特色的双三元泵，采用在线柱切换二维液相与质谱联用的方式，可以对一维色谱分析洗脱出来的目标化合物，通过阀切换转移至 Loop 环，然后通过另一个泵把 Loop 环中的洗脱液转移至二维色谱柱上，实现在线脱盐后，立即进行质谱分析。该方法可以快速地对阿莫西林中 6 个微量目标杂质进行定性分析，并通过二级质谱的裂解分析，实现相关的结构鉴定，为阿莫西林原料药进行质量控制提供参考。

参考文献

- [1] NÄGELE E, MORITZ R. Structure elucidation of degradation products of the antibiotic amoxicillin with ion trap MS and accurate mass determination by ESI TOF [J]. J Am Soc Mass Spectr, 2005, 16(10): 1670-6.
- [2] 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): 311-6.

