

氨苄西林、阿莫西林中相关物质的 LC-MS 分析

牛长群*, 祝仕清

(华北制药集团新药研究开发中心, 河北 石家庄 050015)

摘要: 目的 分析确定氨苄西林、阿莫西林中相关物质。方法 用 LC-ESI-MS 对加速实验样品进行分析, 通过解析相关物质的质谱, 确定其结构。结果 确定了 13 种氨苄西林的相关物质及 9 种阿莫西林的相关物质, 并定量分析了实际样品中的相关物质。结论 为控制氨苄西林及阿莫西林中的相关物质提供了重要依据。

关键词: 氨苄西林; 阿莫西林; 相关物质; 电喷雾液质联用

中图分类号: R917; TQ460.72

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2001)10-0758-04

氨苄西林、阿莫西林为临床常用的半合成青霉素, 在生产和贮存过程中容易产生相关物质, 直接影响产品质量和临床用药的安全。为了控制相关物质, 提高产品质量, 必须建立有效的分析检测手段。文献报道的方法有 HPLC^[1] 和 HPCE^[2] 方法, 由于相关物质量少, 很难制备对照物质, 因此, 确定相关物质比较困难, 而采用 LC-MS 方法可定性定量分析相关物质。本文采用 LC-MS 方法对加速实验样品进行定性分析, 分别确定了氨苄西林和阿莫西林中的相关物质, 并对不同厂家的样品进行了定性、定量分析, 为氨苄西林、阿莫西林的生产、贮存中的质量控制以及合理的临床应用提供重要的依据。

材料与 方法

材料和仪器 氨苄西林和阿莫西林由河北省药检所提供, L-氨苄西林[6-(L(-)-2-氨基-苯乙酰氨基)青霉烷酸三水合物]和 L-阿莫西林[(2S,5R,6R)-3,3-二甲基-6-((S)-(+)-2-氨基-2-(4-氨基苯基)乙酰氨基)-7-氧代-4-硫杂-1-氮杂双环[3.2.0]庚烷-2-甲酸三水合物]由本中心合成室合成, 氨苄西林噻唑酸 (ampicilloic acid) 和阿莫西林噻唑酸 (amoxicilloic acid) 按文献^[3] 方法制得。甲醇、乙腈 (天津四友化学试剂公司) 均为色谱纯试剂。Waters 公司 Alliance 型高效液相色谱系统, Waters 公司 ZMD 质谱检测器, Masslynx 工作站。

实验方法 加速试验样品的制备: 分别称取氨苄西林和阿莫西林样品适量, 用甲醇-水配制成 1

mg·mL⁻¹ 溶液, 在 35℃ 水浴放置 72 h。液相色谱条件: 色谱柱为 Supelcosil LC-8 4.6 mm×250 mm, 5 μm; 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 进入质谱的分流比为 5:1; 流动相: A 液为 10 mmol·L⁻¹ 醋酸铵水溶液 (pH 7.0), B 液为乙腈, 梯度洗脱程序:

Time/min	A %	B %
0	90	10
2	90	10
15	80	20
35	80	20

质谱条件: 电喷雾电离源 (ESI), 正离子检测, 电离电压: 3.0 kV; 电喷雾接口干燥气 (N₂) 流速: 318 L·h⁻¹, 离子源温度: 150℃; 锥孔电压: 30 V; 脱溶剂气温度: 120℃。二极管矩阵检测器 (DAD) 与质谱串联, 两者之间的滞后时间约为 0.4 min。

结果与 讨论

1 氨苄西林中相关物质的确定

氨苄西林中的相关物质包括聚合物、异构体和降解产物, 结构见图 1。聚合物又分为开环聚合物和闭环聚合物。由于氨苄西林侧链苯甘氨酸的构型不同, 可分为 D-氨苄西林和 L-氨苄西林, D-氨苄西林的抗菌活性远远大于 L-氨苄西林, 因此, 在氨苄西林中检查 L-氨苄西林非常必要。作者曾用 HPCE 方法^[2] 对氨苄西林中聚合物进行了分析, 发现除聚合物外还有其他相关物质。为了确定这些相关物质, 本文采用电喷雾正离子、选择性离子检测方式 (selected ion recording, SIR), 分别设定聚合物、异构体以及可能降解产物的准分子离子 (M+H) 进行检测, 通过分析选择性离子流图提供的信息, 并结合解析总离子流 (TIC) 各峰的质谱 (文中省略), 对加速实

收稿日期: 2001-01-03.

作者简介: 牛长群 (1964-), 男, 高级工程师.

* Tel: (0311) 5051133 - 2607, Fax: (0311) 6676509,

E-mail: niuchangqun@ycael.net

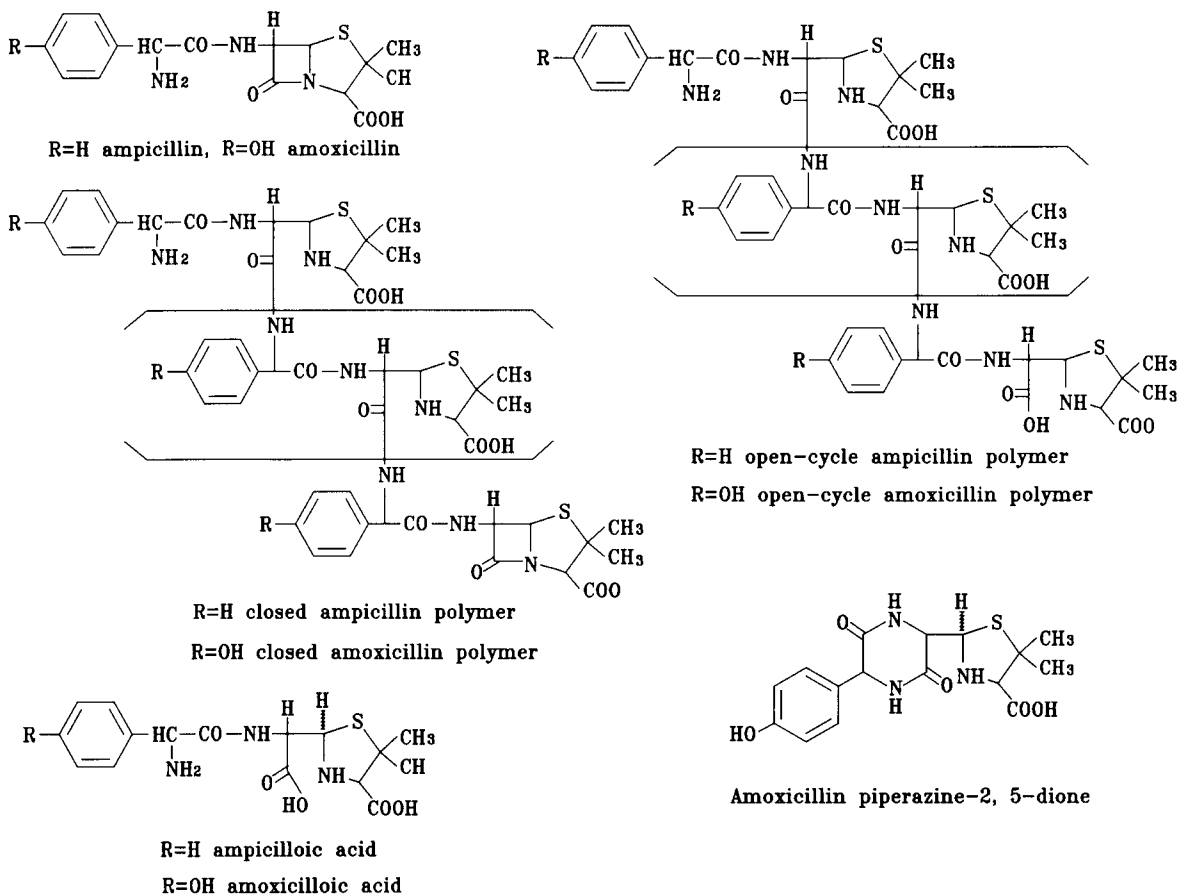


Figure 1 Structure of ampicillin, amoxicillin and their related substances

验样品中出现的 14 个色谱峰进行了归属,特异性地检测出氨苄西林的 13 个相关物质。结果见图 2。表 1。

Table 1 Related substances of ampicillin

Peak No.	Retention time/min	[M + H] ⁺	Identification
1	4.46	368	Ampicilloic acid
2	5.26	368	Ampicilloic acid
3	6.46	350	Isomer of ampicillin
4	11.95	717	Open cycle dimer
5	12.95	350	Ampicillin
6	16.41	1066	Open cycle trimer
7	17.68	699	Closed cycle dimer
8	18.28	1415	Open cycle tetramer
9	18.80	1048	Closed cycle trimer
10	19.88	699	Closed cycle dimer
11	20.68	1764	Open cycle pentamer
12	25.66	1048	Closed cycle trimer
13	28.23	1397	Closed cycle tetramer
14	32.31	1746	Closed cycle pentamer

分析实验结果,发现样品通过 37℃放置后,大部分变为聚合产物,这与以前实验结果^[2]相一致,但除上述聚合物外,还检出了氨苄西林的异构体峰(t_R

= 6.46 min),经与对照品比较,发现保留时间为 6.46 min 的色谱峰并非是 L-氨苄西林异构体,而是另一种异构体,其结构有待于进一步探讨。在色谱图(图 2)中,闭环聚合物的量大于开环聚合物,由此推断生成闭环聚合物的速度大于开环聚合物生成的速度。在两类聚合物之间,都存在聚合程度越大,其含量越少,呈现明显的递减现象,最小为五聚体,甚至有时不能检出,说明形成聚合体的过程是一个逐级聚合反应过程。另外还发现氨苄西林噻唑酸出现两个色谱峰,其他开环聚合物也成对出现,特别是含量较大的低聚合物比较明显,其分子量相同互为同分异构体,可能为 5 位构型不同而形成的一对异构体,有待于进一步证实。其他降解产物未能检出。

2 氨苄西林样品分析

通过对不同厂家的产品分析(表 2),发现不同厂家的氨苄西林质量相差较大(表 2),其生产工艺是影响产品质量的主要因素,氨苄西林中的相关物质主要为氨苄西林噻唑酸、闭环二聚物和开环二聚物,基本与以前结果^[2]一致。未能检出其他相关物质。

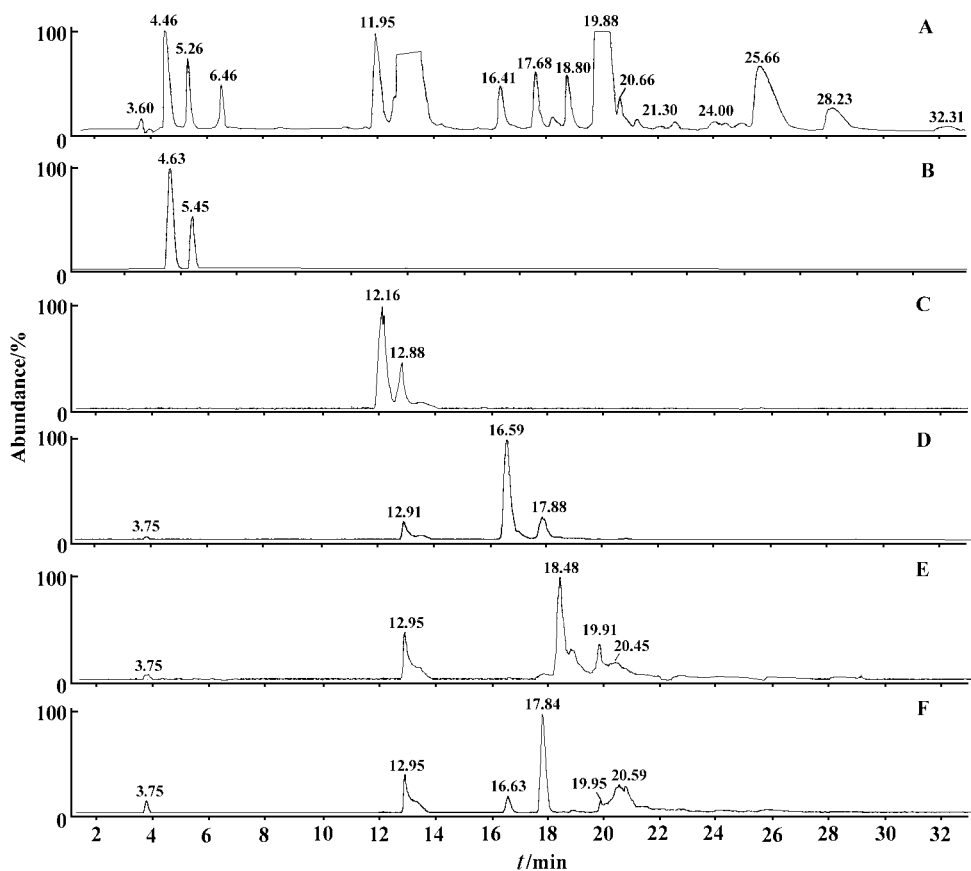


Figure 2 LC-ESI-MS chromatogram of relative substances in ampicillin
 A: Diode array detect (DAD) of ampicilloic acid (m/z 368); B: Selected ion recording (SIR) of ampicilloic acid (m/z 368); C: SIR of related substances in ampicillin; D: SIR of open-cycle trimer (m/z 1066); E: SIR of open-cycle tetramer (m/z 1415); F: SIR of open-cycle pentamer (m/z 1764)

Table 2 Results of relative substances in ampicillin products

Producer	Batch No.	Ampicillin/ %	Ampicilloic acid/ %	Closed cycle dimer/ %	Open-cycle dimer/ %
1	981206	80.5	8.2	7.6	3.7
2	990320	75.4	9.1	10.0	5.5
3	000806	98.9	0.4	0.7	0
4	001104	98.6	1.0	0.4	0

闭环聚合物,结果见图3.表3。

Table 3 Relative substances of amoxicillin

Peak No.	Retention time / min	[M+H] ⁺	Identification
1	10.04	384	Amoxicilloic acid
2	10.80	384	Amoxicilloic acid
3	16.32	366	L-amoxicillin
4	17.67	366	D-amoxicillin
5	21.19	749	Open cycle dimer
6	22.64	366	Amoxicillin piperazine-2',5'-dime
7	24.77	1096	Closed cycle trimer
8	25.17	731	Closed cycle dimer
9	26.57	1096	Closed cycle trimer
10	26.80	1461	Closed cycle tetramer

3 阿莫西林相关物质的确定

采用选择性离子检测方式(SIR),对加速实验样品进行LC-MS分析,实验结果表明,有3个色谱峰的准分子离子都为366。根据文献^[4]报道及与阿莫西林及L-阿莫西林对照品比较发现,主峰($t_R = 17.67$ min)前的小峰为L-阿莫西林,其后面的色谱峰为阿莫西林的 β -内酰胺环开环后与苄基上的氨基缩合生成的异构体(图1)。阿莫西林噻唑酸与上述的氨基苄西林噻唑酸一样,出现一对色谱峰,两峰分子量相同,互为同分异构体,其保留时间分别为10.04和10.80 min。检出的其他相关物质均为开环聚合物和

4 阿莫西林样品的分析

对不同厂家的产品进行了分析,分析结果表明:阿莫西林中的相关物质较少,其质量优于氨基苄西林,阿莫西林噻唑酸为其主要杂质,未能检出其他相关物质。

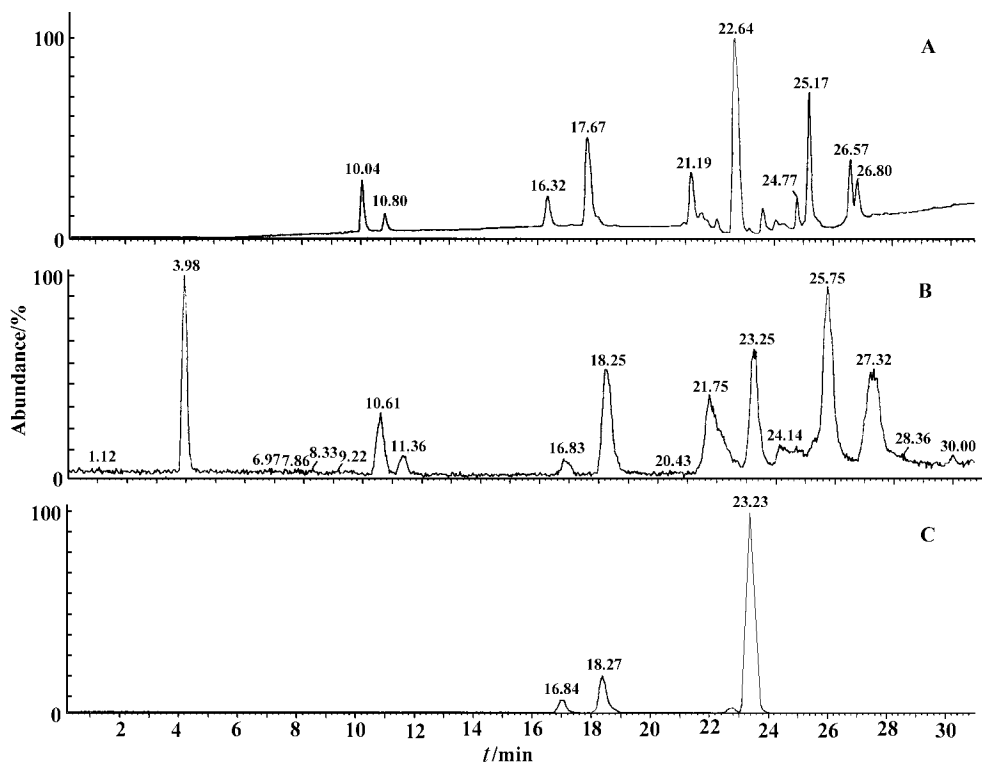


Figure 3 LC-ESI-MS chromatogram of related substances in amoxicillin

A: Diode array detection (DAD) of related substances in amoxicillin; B: Total ion current (TIC) of related substances in amoxicillin; C: Selected ion recording (SIR) of m/z 366

REFERENCES:

- [1] Larsen C, Bundgaard H. Polymerization of penicillins [J]. *J Chromatogr*, 1978, **147**(1): 143 - 150.
- [2] Niu CQ, Zhu SQ. Separation and determination of ampicillin polymers by high performance capillary electrophoresis [J]. *Acta Pharm Sin* (in Chinese), 1997, **32**(3): 207 - 209.
- [3] Munro AC, Chainey MG, Woroniecki SR. Preparation and

immunological cross-reactions of penicilloic and penilloic acids [J]. *J Pharm Sci*, 1978, **67**(9): 1197 - 1204.

- [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*, 1998, **797**(1): 311 - 316.

LC-MS ANALYSIS OF RELATED SUBSTANCES IN AMPICILLIN AND AMOXICILLIN

NU Chang-qun, ZHU Shi-qing

(Research and Development Drug Center, North China Pharmaceutical Corporation, Shijiazhuang 050015, China)

ABSTRACT: AIM To analyze the related substances in ampicillin and amoxicillin and determine the related substances in products. **METHODS** By using HPLC, electrospray ionization and selective ion monitoring mass spectrum method, accelerated samples were analyzed for determination the related substances in ampicillin and amoxicillin. **RESULTS** Thirteen related substances in ampicillin and 9 related substances in amoxicillin were determined. **CONCLUSION** The results are useful to quality control and stability study for ampicillin and amoxicillin.

KEY WORDS: ampicillin; amoxicillin; related substances; LC-ESI-MS