(3~5 min)、试剂轻便易携,不需要特殊仪器设备,适合于药害事件的快速应急检验。

在反应介质的选取方面,试验了几种不同滤 纸,结果亲水性和疏水性滤纸效果基本一样,考 虑到有酸碱参与反应,最终选择 PTFE 滤纸作为反 应介质。研究结果表明,先加对氨基苯磺酸的显 色效果要优于先加酸化的亚硝酸盐的显色效果。 本法直接采用安全的氨基苯磺酸钠进行重氮化反 应,相对于具有致癌性的对硝基苯胺重氮化显色 法等方法具有明显的优势^[3-5],由于实践中缺乏常 规检验呈阳性的样品,目前只能以阴性样品添加组 胺对照品进行回收试验和验证,事实证明添加组胺 不会干扰样品的降压物质检查和显色检查。

本实验所建立的方法为降压物质药害事件的

快速应急检验提供了一种新的思路。目前国内外未 见该方法用于降压物质快速鉴别的公开文献报道。

REFERENCES

- LIU H. Study on the depressor substance test of Clindamycin Phosphate injection [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应 用药学), 2013, 30(3): 306-308.
- [2] 中国药典. 二部[S]. 2010: 附录 103, 214-215.
- [3] HAO H L. Study on method for determination of histamine in aquatic products [J]. Food Sci(食品科学), 2000, 21(8): 46-48.
- [4] ZHU W H, ZHOU D Q. An improved method for determination of histamine in canned fish by spectrophotometry [J]. Food Sci Tech(食品科技), 2008, 34(1): 223-225.
- [5] LIU C Q, WANG X C, DING Z P. Determination of biogenic amines in aquatic products [J]. J Shanghai Fisheries University(上海水产大学学报), 2007, 16(4): 357-361.

收稿日期: 2014-04-25

替加氟有关物质的色谱-质谱结构鉴定

王敏,金婵,卢萍,丁娅,杭太俊*(中国药科大学药物分析教研室,南京 210009)

摘要:目的 采用色谱-质谱联用技术鉴定替加氟有关物质,为其工艺和质量控制提供参考依据。方法 采用十八烷基硅 烷键合硅胶的填充剂,流动相为乙腈-甲醇-10 mmol·L⁻¹ 醋酸铵缓冲溶液,对替加氟有关物质进行分离;采用电喷雾正离 子化-飞行时间质谱法测定各有关物质的准确质量,三重四极杆质谱测定子离子特征,并经解析鉴定各杂质结构。结果与 结论 替加氟与其有关物质分离良好,检测出4个主要有关物质均为替加氟合成的起始原料,是母核基本未发生变化, 仅5 位被不同基团取代的衍生物。

关键词: 替加氟; 有关物质; 色谱-质谱联用

中图分类号: 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2015)01-0062-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.01.016

Identification of the Related Substances in Tegafur with Hyphenated Techniques

WANG Min, JIN Chan, LU Ping, DING Ya, HANG Taijun^{*} (Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To identify the related substances in tegafur by hyphenated techniques for its manufacturing process and quality control. **METHODS** A column packed with the octadecyl silane chemically bonded silica was used for the separation of the related substances with a mixture of acetonitrile-methanol and 10 mmol·L⁻¹ ammonium acetate buffer solution as the mobile phase by isocratic elution. The structures of the related substances were speculated and identified by electrospray positive ionization LC-TOF/MS accurate ion mass and MS/MS determination and elucidation. **RESULTS & CONCLUSION** Tegafur and the related substances are separated under the established HPLC condition. Four related substances in tegafur are characterized by hyphenated techniques. Their structures are elucidated as the different substituents having the same frame structure as tegafur and starting material.

KEY WORDS: tegafur; related substances; LC-MS/MS

作者简介:王敏,女,硕士生 Tel: 15365079719 E-mail: wangmin100166@ 163.com ^{*}通信作者: 杭太俊,男,博士,教授,博导 Tel: (025)83271090 E-mail: hangtj@cpu.edu.cn

替加氟[5-氟-1-(四氢-2-呋喃基)-2,4(1*H*,3*H*)-嘧啶二酮]为氟尿嘧啶的衍生物,在体内经肝脏活 化逐渐转变为氟尿嘧啶而起抗肿瘤作用,干扰、 阻断 DNA、RNA 及蛋白质合成,属于抗嘧啶类药 物,结构式见图 1^[1-2]。替加氟原料药的质量与其 临床的安全和有效性密切相关,国内外文献^[3-7]未 见对其有关物质进行系统测定和鉴定的研究报 道。本研究建立了适用于替加氟有关物质检查的 HPLC 及液质联用分析方法,检测出了 4 个主要有 关物质,并结合合成工艺,通过光谱综合分析鉴 定了它们的结构,为替加氟的生产工艺和质量控 制提供参考依据。

$F \longrightarrow O$



Fig. 1 Chemical structure of tegafur

1 仪器与试药

Agilent 1290 Infinity 液相色谱-6224 飞行时间 质谱仪(美国 Agilent 公司, 含四元泵、DAD 检测 器、自动进样器、柱温箱、电喷雾离子源,飞行 时间质谱仪和 Agilent Mass Hunter Qualitative Analysis B.04.00 数据处理系统); TSQ Quantum Ultra AM 型 LC-MS/MS 联用仪(美国 Thermo Finnigan, Xcalibur 1.2 数据处理系统); Vario EL III 元素分析仪(美国 Elementa); UV-2500PC 紫外-可 见吸收光谱仪(日本 Shimadzu); FT/IR-4100 傅里 叶变换红外光谱仪(日本 Jasco); AV500 核磁共振 仪(美国 Bruker)。

替加氟(齐鲁天和惠世制药有限公司, 批号: 100301120);氟尿嘧啶对照品(中国药品生物制品 检定所,批号: 100187-200602,纯度: 100.0%), 5-氯-1-(四氢-2-呋喃基)-2,4(1*H*,3*H*)-嘧啶二 酮)(Cl-FT,批号: 20130711-2,自制,纯度: 99.78%); 乙腈和甲醇 HPLC 级(美国 TEDIA),甲酸和醋酸 铵等其他试剂均为分析纯(南京化学试剂公司),自 制纯化水。

2 方法

2.1 色谱条件

Diamonsil C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 µm)

色谱柱,以10 mmol·L⁻¹ 醋酸铵缓冲液(甲酸调 pH 至 6.0)-甲醇-乙腈(85:10:5)为流动相,流速 1 mL·min⁻¹,柱温 35 ℃,检测波长为 271 nm,进 样量 10 μL。

2.2 质谱条件

采用电喷雾正离子化方法检测。TOF/MS 测定 的喷雾电压 4 kV,雾化氮气压力 275 kPa、流量 8 L·min⁻¹和温度 365 ℃,碎片电压 200 V,参比离 子 *m/z* 121.050 8 和 922.009 8,质量扫描范围 *m/z* 100~1 200。MS/MS 测定的喷雾电压 5 kV,雾化氮 气压 310 kPa、辅助气压力 35 kPa 和毛细管温度 350 ℃,二级质谱扫描碰撞气氩压力 0.20 Pa 和碰 撞能量 15~35 eV。

2.3 供试品溶液制备

精密称取替加氟供试品适量,加流动相溶解 并定量稀释制成每1 mL中约含1.0 mg的溶液作为 供试品溶液;另取氟尿嘧啶和 Cl-FT 各适量,精密 称定,均以流动相为溶剂,分别溶解并定量稀释 制成浓度约为 5.0 μg·mL⁻¹和 2.0 μg·mL⁻¹的溶液作 为对照品溶液。

3 结果

3.1 有关物质的色谱特征

替加氟供试液的 HPLC 色谱中显示 4 个主要 有关物质峰(根据保留时间顺次编号为 I、II、III 和IV),见图 2。测得替加氟及其有关物质的 PDA 图谱见图 3。



图 2 替加氟及其有关物质的 HPLC 色谱图

A-空白溶剂: B-5-氯-1-(四氢-2-呋喃基)-2,4(1*H*,3*H*)-嘧啶二酮); C-替加氟 1%自身对照溶液; D-5-氟尿嘧啶对照品溶液; E-供试品溶液。 **Fig. 2** HPLC chromatograms of tegafur and its related substances

A-blank solvent; B-Cl-FT; C-tegafur 1% reference solution; D-5-fluorouracil control; E-sample.

·63 ·



图3 替加氟及其有关物质的 PDA 扫描图

Fig. 3 PDA chromatograms of tegafur and its related substances

 $\times 10^4$ $[M+H]^+$ A ×10⁵ $\times 10^{5}$ [M+H] В 146.001 3 S 3.0 131.0275 3.5 1.2 $[M+H]^{\dagger}$ 2.5 3.0 201.068 8 部 1.0 0.8 0.6 1.0 [M+Na] cps Sc 2.5 2.0 223.0507 强度/ 》 到 型 1.5 [M+NH₄] 1.5 [M+2+H] 218.0951 1.0 0.4 147.9987 [M+Na]⁺ 1.0 0.5 0.2 153.0094 0.5 0 0 125 130 135 140 145 150 155 160 165 200 205 210 215 220 225 230 146 148 150 m/zm/zm/z $[M+H]^+$ $\times 10^4$ $\times 10^{4}$ $[M+NH_4]^+$ С D 213.0876 8 234.0653 [M+H]+ 3 6 217.0389 /cps cps/ 2 强度/ [M+Na]⁺ 强度 $[M+2+NH_4]^+$ 4 [M+2 - 1 - 2 236.062 4 [M+Na]⁺ [M+NH₄] $[M+K]^+$ [M+2+H] 235.0689 251.0431 1 219.035 9 2. 230.1149 239.0211 0 0 215 220 230 235 240 210 225 245 250 255 216 218 220 222 224 226 228 230 232 234 236 238 240 m/zm/z

有关物质 II 的色谱保留时间和 PDA 与氟尿嘧

啶的分别一致,推测为氟尿嘧啶。有关物质IV的 色谱保留时间和 PDA 与 Cl-FT 的分别一致,推测 为 Cl-FT。有关物质III的色谱保留约为主峰保留时 间的 1.1 倍,比替加氟的色谱保留稍强,其 PDA 也与替加氟基本相同,推测与替加氟具有相似的 化学结构与共轭特征。而有关物质 I 的色谱保留 较弱,表明其极性相对较强,并且 PDA 与氟尿嘧 啶的差异也较大,推测其具有与氟尿嘧啶明显不 同的化学结构与共轭特征。

3.2 有关物质的质谱特征

采用电喷雾正离子化 HPLC-TOF/MS 全扫描 质谱测定各有关物质加合离子的准确质量,通过 Mass Hunter 软件确定离子组成,各有关物质的准 确质量和离子式分别见图 4 和表 1。



S-替加氟: A-有关物质 I; B-有关物质 II; C-有关物质II; D-有关物质Ⅳ。 Fig. 4 LC-TOF/MS spectra of tegafur and its related substances S-tegafur; A-impurity II; B-impurity II; C-impurity III; D-impurity Ⅳ.

表1 LC-TOF/MS 检测的替加氟及其有关物质的离子组成 Tab. 1 The ion composition of tegafur and its related

	1	0	
substances by LC-7	TOF/MS		

No. —	m/z		离子式	Dif
	实侧值	理论值		(ppm)
S	201.068 8	201.067 0	$C_8H_{10}FN_2O_3^{+}$	-4.39
Ι	146.001 3	146.000 3	$C_5H_5CINO_2^+$	-7.50
II	131.027 5	131.025 1	$C_4H_4FN_2O_2^{+}$	-8.44
III	213.087 6	213.087 0	$C_9H_{13}N_2O_4^{+}$	-3.24
IV	217.038 9	217.037 4	$C_8H_{10}ClN_2O_3^+$	-7.50

对替加氟有关物质进行 LC-MS/MS 检测,测 定各有关物质[M+H]⁺母离子的二级质谱。

替加氟: ESI⁺-TOF/MS 测得替加氟[M+H]⁺的 准确质量为 201.068 8,与离子式 C₈H₁₀FN₂O₃⁺相 应。结合其二级质谱,特征碎片离子 *m/z* 131 和 71 分别与氟尿嘧啶和四氢呋喃的结构特征相符,而 114 和 88 分别对应于氟尿嘧啶脱去中性分子 NH₃、 异氰酸,见图 5。替加氟二级质谱分析对于解析确 证其有关物质具有参考意义。



图 5 替加氟[M+H]⁺离子的二级质谱图及其裂解过程 Fig. 5 Product MS spectrum of tegafur [M+H]⁺ ion and its fragmentation pathway

有关物质 I: ESI⁺-TOF/MS 测得有关物质 I [M+H]⁺ 的 准 确 质 量 为 146.001 3 , 与 离 子 式 C₃H₅CINO₂⁺相应。与氟尿嘧啶[M+H]⁺离子相比质 量数多 15,而有关物质 I 离子式中含有一个氯原 子,氯原子的质量数比氟原子多 16,同时亚甲基 的质量数比仲氨基少 1。结合二级质谱,特征碎片 离子 *m*/*z* 128,100 和 73,分别对应于先失去一分 子水,再失去 CO 中性分子,随后失去中性分子氢 氰酸,结果图 6。结合氟尿嘧啶的合成工艺^[8-9], 推断有关物质 I 可能为替加氟合成起始原料氟尿 嘧啶合成的副产物残留,参与合成引入。



图 6 有关物质 I [M+H]⁺离子的二级质谱图及其裂解过程 Fig. 6 Product MS spectrum of impurity I [M+H]⁺ ion and its fragmentation pathway

有关物质 II: ESI⁺-TOF/MS 测得有关物质 II [M+H]⁺ 的 准 确 质 量 为 131.0275 , 与 离 子 式 C₄H₄FN₂O₂⁺相应,与起始原料氟尿嘧啶[M+H]⁺离 子的质量数一致。二级质谱见图 7,特征碎片离子 *m/z* 114 和 88 分别对应于脱去中性分子 NH₃和异 氰酸。

有关物质III: ESI⁺-TOF/MS 测得有关物质III [M+H]⁺ 的 准 确 质 量 为 213.0876 , 与 离 子 式 C₉H₁₃N₂O₄⁺相应,与替加氟[M+H]⁺离子的质量数



图 7 有关物质 II [M+H]⁺离子的二级质谱图及其裂解过程 Fig. 7 Product MS spectrum of impurity II [M+H]⁺ ion and its fragmentation pathway

相比多 12,而甲氧基质量数比氟原子多 12。结合 二级质谱见图 8,特征碎片离子 m/z143,128 和 71 分别与 5-甲氧基尿嘧啶、5-羟基尿嘧啶和四氢呋喃 结构特征相符,而 98 对应于 5-甲氧基尿嘧啶脱去 一分子甲酰胺,参考合成工艺,推断有关物质III 为替加氟 5 位氟原子被甲氧基取代的 5-甲氧基 -1-(四氢-2-呋喃基)-2,4(1*H*,3*H*)-嘧啶二酮。



图 8 有关物质Ⅲ[M+H]⁺离子的二级质谱图及其裂解过程 Fig. 8 Product MS spectrum of impurity Ⅲ [M+H]⁺ ion and its fragmentation pathway

有关物质IV: ESI⁺-TOF/MS 测得有关物质IV [M+H]⁺的准确质量为 217.0389,与离子式 C₈H₁₀CIN₂O₃⁺相应,与替加氟[M+H]⁺离子的质量 数相比多 16,而氯原子质量数比氟原子多 16,特 征的(M+2)同位素峰也与此相应。结合二级质谱见 图 9,其特征碎片离子 *m*/*z* 147,130,104 和 71 也比替加氟的相应碎片离子的质量数多 16。因此, 参考合成工艺,推断有关物质IV为替加氟 5 位氟 原子被氯原子取代的 5-氯-1-(四氢-2-呋喃 基)-2,4(1*H*,3*H*)-嘧啶二酮。



图 9 有关物质 IV [M+H]⁺离子的二级质谱图及其裂解过程 Fig. 9 Product MS spectrum of impurity IV [M+H]⁺ ion and its fragmentation pathway

3.3 有关物质IV的结构确证

有关物质IV: 类白色粉末,溶于水。元素分析分析结果 C 44.36%, H 4.19%, N 12.93%。ESI⁺-TOF/MS 测得[M+H]⁺离子组成 C₈H₁₀ClN₂O₃⁺。 UV(水, 15 μ g·min⁻¹) λ _{max}(nm): 279.0 和 214.0。 IR(KBr) ν _{max}(cm⁻¹)、¹H-NMR 和 ¹³C-NMR(DMSOd₆, 500 MHz) δ (ppm)见图 10~11,合成制备和光谱 分析确证有关物质IV 为 5-氯-1-(四氢-2-呋喃 基)-2,4(1*H*,3*H*)-嘧啶二酮。



图 10 有关物质 IV 的红外吸收图

Fig. 10 IR spectrum of impurity IV



¹H-NMR ¹³C-NMR

图 11 有关物质 IV 的 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 的峰归属

Fig. 11 ¹H-NMR and ¹³C-NMR peaks belonging of impurity IV

4 讨论

建立的液相色谱-质谱联用方法,能够检测出替加氟中的4个主要有关物质。通过对各有关物质峰的质谱测定与解析,结合替加氟的合成工艺^[10-12],直接鉴定或间接推断了所有有关物质的结构。推定的有关物质结构可分为3种类型,有关物质II 为合成起始原料;有关物质III和IV是生产过程中由于反应溶剂的存在,5位的氟原子被取代而形成的产物;有关物质 I则是起始原料氟尿嘧啶合成的副产物参与合成而引入。

综上所述,替加氟原料药有关物质的研究鉴定 对其生产工艺优化和质量控制提供了参考依据。

REFERENCES

- KOMATSU T, YAMAZAKI H, SHIMADA N, et al. Involvement of microsomal cytochrome P450 and cytosolic thymidine phosphorylase in 5-fluorouracil formation from tegafur in human liver [J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(3): 675 -681.
- [2] YAMAZAKI H, KOMATSU T, TAKEMOTO K,, et al. Decreases in phenytoin hydroxylation activities catalysed by liver microsomal cytochrome P450 enzymes in phenytoin treated rats [J]. Drug Metab Dispos, 2001, 29(4 Pt 1): 427-434.
- [3] 中国药典. 二部 [S]. 2010: 914-915.
- [4] LI Z H, ZHANG X L, TANG S F. Study on determination of related substances in tegafur [J]. Drug Standard China(中国药 品标准), 2010, 11(6): 428-430.
- [5] JIANG S. Determination of tegafur and its related substances by HPLC [J]. West China J Pharm Sci(华西药学杂志), 2010, 25(3): 336-338.
- [6] 日本药局方.16版 [S]. 2011: 1465-1466.
- [7] IRINEL B, DANA M, AUREL T, et al. Determination of the 5-fluorouracil and N1(2-furanidyl)uracil in the presence of tegafur by zero-crossing first derivative spectrometry [J]. J Pharm Biomed Anal, 2002, 30: 1371-1378.
- [8] LÜ Z S, ZHAO J L, HUANG J L, et al. Study on synthetic technique of 5-fluorouracil [J]. Chem Bioeng(化学与生物工 程), 2013, 30(1): 54-59.
- [9] ROBERT D, EDWARD P, CHARLES H. The synthesis of 5-fluoroadenosines [J]. J Am Chem Soc, 1957, 79(16): 4559-4560.
- [10] Shandong Newtime Pharmaceutical Co., LTD. An industrial synthesis method for adding fluorine: China, 103159746A [P]. 2013-06-19.
- [11] GILLER S A, ZHUK R A, LIDAK M. Analogs of pyrimidine nucleosides. I. N1-(alpha-furanidyl) derivatives of natural pyrimidine bases and their antimetabolities [J]. Dokl Akad Nauk SSSR, 1967, 176(2): 332-335.
- [12] MITSUGI Y, AKIRA M, NORIO U, et al. Studies of antitumor agents. 1. Resolution of racemic 1-(tetrahydro-2furanyl)-5-fluorouracil into the *R* and *S* isomers and examination of the biological activities of the isomers [J]. J Med Chem, 1977, 20(12): 1592-1594.

收稿日期: 2014-03-14