

# UFLC-MS/MS法测定替加氟制剂中替加氟含量\*

张娟红, 王荣\*\*, 贾正平, 谢华, 张强, 王娟, 张军莉

(兰州军区兰州总医院临床药理基地, 兰州 730050)

**摘要** 目的: 建立超快速液相色谱-质谱/质谱联用法(UFLC-MS/MS)测定替加氟制剂中替加氟(FT)的含量。方法: 样品以甲醇-水(80:20)提取, 采用 Shim-pack XR-ODS柱分离, 以甲醇-水(80:20)为流动相, 流速为 0.40 mL·min<sup>-1</sup>, 通过电喷雾离子化(ESI), 采用多反应检测(MRM)方式进行负离子检测, 进样量 10 μL, 用于定量分析的检测离子为 *m/z* 198.9<sup>+</sup> 42.0 (FT)和 *m/z* 128.8<sup>+</sup> 42.1(5-FU), 在 3 min内完成 FT定量分析。结果: 线性范围为 5~3000 ng·mL<sup>-1</sup>, 最低检测限为 5 ng·mL<sup>-1</sup>。FT 3个浓度(550 700 1000 ng·mL<sup>-1</sup>)的加标回收率分别为 100.4%, 100.9%, 101.2%。结论: 本方法灵敏度高, 分析速度快, 操作简单, 可作为替加氟制剂中 FT质量控制方法。

**关键词:** 超快速液相色谱-质谱/质谱联用法; 替加氟; 制剂

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2010)02-0213-04

# UFLC-MSMS determination of tegafur in tegafur preparation\*

ZHANG Juan-hong WANG Rong\*\*, JIA Zheng-ping

XIE Hua, ZHANG Qiang, WANG Juan, ZHANG Jun-li

(Department of Pharmacy, Lanzhou General Hospital of PIA, Lanzhou 730050, China)

**Abstract Objective** To develop an UFLC-MSMS method for determination of tegafur in tegafur preparation.

**Method** The samples was extracted with methanol-water (80:20 *v/v*). The UFLC separation was performed on an Shim-pack XR-ODS column. The mobile phase consisted of methanol-water (80:20 *v/v*) at a flow rate of 0.40 mL·min<sup>-1</sup>. ESI<sup>+</sup> was performed in multiple reaction monitoring mode(MRM), using the transitions of *m/z* 198.9<sup>+</sup> 42.0 (tegafur) and *m/z* 128.8<sup>+</sup> 42.1 (5-fluorouracil). **Results** The method was linear in the concentration range of 5-3000 ng·mL<sup>-1</sup>. The lower limit of quantification (LLOQ) was 5 ng·mL<sup>-1</sup>. The recoveries at the addition of three levels (550 700 1000 ng·mL<sup>-1</sup>) were 100.4%, 100.9% and 101.2%. **Conclusion** The method has good repeatability, high sensitivity and more convenient, and can be successfully applied for the determination of tegafur in tegafur preparation.

**Key words** UFLC-MSMS; tegafur; preparation

替加氟注射液主要用于治疗消化道肿瘤, 如胃癌、直肠癌、胰岛癌、肝癌, 亦可用于乳腺癌。本品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。能干扰和阻断 DNA、RNA 及蛋白质合成, 主要作用于 S 期, 是抗嘧啶类的细胞周期特异性药物, 其作用机理、疗效及抗癌谱与氟尿嘧啶相似, 但作用持久, 吸收良好, 毒性较低。化疗指数为氟尿嘧啶的 2 倍, 毒性仅为氟尿嘧啶的 1/4~1/7。慢性毒性试验中未见到严重的骨髓抑制, 对免疫的影响较轻微。替吉奥胶囊是类似于优

福定(UFT)的抗代谢类抗肿瘤药, 由日本大鹏药品工业株式会社首先成功研制的, 它以替加氟 (tegafur, FT) 为主体, 每粒胶囊含 FT 20 mg 加入吉美拉西 (CDHP) 阻止活化物氟尿嘧啶降解, 增强抗癌作用。由于 CDHP 加入导致的 5-氟尿嘧啶 (5-FU) 浓度的升高, 相应的副作用亦随之上升, 主要表现为消化道毒性, 故再加入奥替拉西 (Oxo) 保护胃肠粘膜, 减少消化道反应<sup>[1]</sup>, 临床不同剂型应用较为广泛。

目前, 测定 FT 含量的方法主要有 HPLC<sup>[1]</sup>、紫

\* 国家科技部重大项目 (2008ZX1-09014-010)

\*\* 通讯作者 Tel (0931) 8994675; E-mail wangrong-69@163.com

外分光光度法 (UV)<sup>[2]</sup> 和 GC-MS<sup>[3]</sup>, 随着液相色谱质谱联用技术的逐步推广, 建立 LC-MS/MS 方法有着重要的意义。本试验通过优化色谱和质谱条件建立测定控制替加氟制剂的 UFLC-MS/MS 方法, 以缩短分析时间, 大大提高分析工作效率。

### 1 仪器与试剂

UFLC-20A 高效液相色谱仪 (日本岛津公司); API 3200 三重四极杆串联质谱仪 (美国 AB 公司); 高速离心机 (上海安亭科学仪器厂); 超声波清洗器 (奥特赛恩斯仪器有限公司), 涡旋混匀器 (金坛市金城教学仪器厂) 等。

替加氟注射液 (批号: 8060032EU, 8060591DE) 购自齐鲁制药有限公司; 替吉奥胶囊 (批号: 20080923 20080727) 购自上海旭东海普药业有限公司; 替加氟片 (批号: 20081218 20090110) 购自山东齐鲁光华制药有限公司; 对照品 FT、5-FU 均购自中国药品生物制品检定所, 纯度 99%; 甲醇为色谱纯; 灭菌注射用水。

### 2 色谱质谱条件

色谱柱: Shim-pack XR-ODS 柱 (3.0 mm × 75 mm, 2.0 μm); 流动相: 甲醇-水 (80:20 v/v); 流速: 0.40 mL·min<sup>-1</sup>; 柱温: 25 °C; 进样量: 10 μL; 整个分析流程用时 3 min。

质谱采用 ESI 负离子多反应 (MRM) 方式检测; ESI 源电压: 4.2 kV, 温度: 400 °C; DP: 7Q EP: 5 CE: 10Q CXP: 9 CUR: 1Q CAD: 1, GS1: 5Q GS2: 6Q FT 及 5-FU 采集离子分别为  $m/z$  198.9<sup>+</sup> 42.0,  $m/z$  128.8<sup>+</sup> 42.1 (图 1 和图 2)。

### 3 溶液的制备

**3.1 系列对照品溶液** 精密称取 FT 对照品 0.0050 g 置 25 mL 量瓶中, 用甲醇溶解<sup>[3]</sup> 并定容至刻度, 振荡混匀, 即得浓度为 200 μg·mL<sup>-1</sup> 的 FT 储备液, 置 4 °C 冰箱中保存。将储备液用甲醇-水 (80:20 v/v) 按梯度稀释成 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000, 3000 ng·mL<sup>-1</sup> 对照品溶液, 置于 4 °C 冰箱中保存备用。

**3.2 内标溶液** 精密称取 5-FU 对照品 0.0020 g 置 10 mL 量瓶中, 用水溶解<sup>[3]</sup> 并定容至刻度, 振荡混匀, 即得 200 μg·mL<sup>-1</sup> 5-FU 储备液, 置 4 °C 冰箱中保存。将储备液用水稀释成 1 μg·mL<sup>-1</sup>, 即得。

### 3.3 样品处理

精密吸取替加氟注射液 (50 mg·mL<sup>-1</sup>) 20 μL, 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇-水 (80:20 v/v) 稀释并定

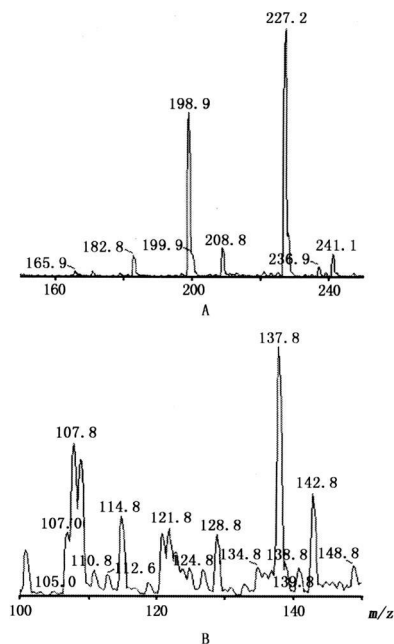


图 1 FT (A) 及内标 5-FU (B) 全离子扫描质谱图

Fig 1 MS/MS spectra of FT (A) and 5-FU (B) showing prominent precursor to product ion transitions

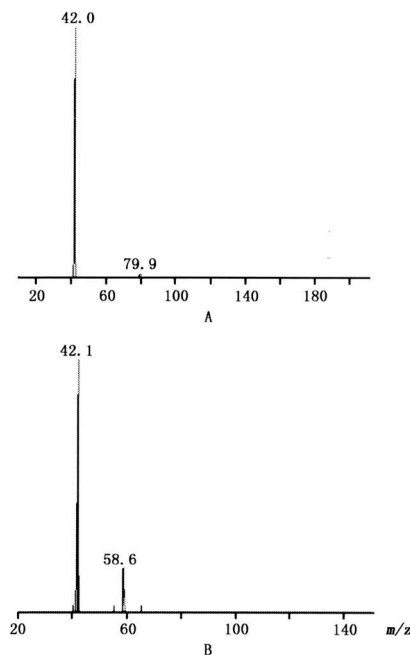


图 2 FT (A) 及内标 5-FU (B) 的二级质谱碎裂图

Fig 2 Product ion mass spectra of deprotonated ions obtained from FT (A) and the internal standard 5-FU (B)

容至刻度, 即得 100 μg·mL<sup>-1</sup> 溶液。取该溶液 50 μL 置 5 mL 量瓶中, 以甲醇-水 (80:20 v/v) 稀释定容即得注射剂稀释液。

精密称取替加氟胶囊剂或片剂粉末 0.0020 g 于 5 mL 量瓶中, 以甲醇-水 (50:50 v/v) 溶解并定

容, 超声处理 30 min 使其完全溶解, 精密吸取 100  $\mu\text{L}$  于另一 5 mL 量瓶中, 以甲醇-水 (80:20  $v/v$ ) 定容, 过 0.45  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜即得氟胶囊剂或片剂稀释液。

#### 4 测定法

取“3.3”项下的稀释液 500  $\mu\text{L}$  于 1.5 mL 离心管中, 加内标溶液 ( $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 20  $\mu\text{L}$ , 涡旋混匀 1 min, 1200  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min, 吸取上清液于进样瓶, 以待 UFLC-MS/MS 分析。色谱图见图 3。

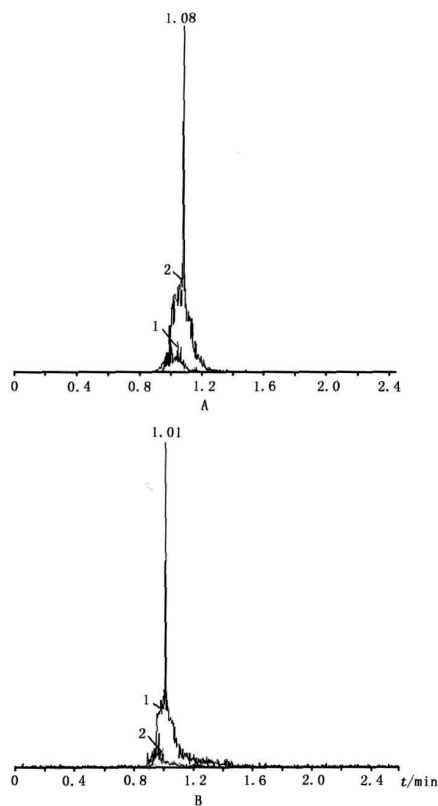


图 3 FT 的 UFLC-MS/MS 色谱图

Fig 3 Representative UFLC-MS/MS chromatograms for FT

A 对照品 (reference substance) B 注射液样品 (injection sample)

1. FT 2 内标 (internal standard)

#### 5 线性关系考察

将“3.1”项下系列对照品溶液按“4”项下方法处理后, 进行 UFLC-MS/MS 分析, 以 FT 浓度为横坐标, 以 FT 和内标的峰面积比为纵坐标, 权重为  $1/X^2$ , 绘制标准曲线, 得直线回归方程为:

$$Y = 0.00509X + 0.0883 \quad r = 0.9997$$

最低检测限为  $5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。结果见表 1。

表 1 标准曲线的准确度和精密度 ( $n = 6$ )

Tab 1 Precision and accuracy of calibration samples

浓度 (concentration) / $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	平均值 $\pm$ 标准偏差 (mean $\pm$ SD) / $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	RSD /%	准确度 (accuracy) /%
5	5.01 $\pm$ 0.10	2.0	100.4
10	9.91 $\pm$ 0.91	1.9	99.12
25	25.48 $\pm$ 0.59	2.3	102.0
50	49.02 $\pm$ 1.22	2.5	98.14
100	99.22 $\pm$ 1.66	1.7	99.22
250	252.40 $\pm$ 5.03	2.0	101.0
500	496.40 $\pm$ 5.59	1.1	99.18
1000	1004.80 $\pm$ 33.18	3.3	100.5
2000	2020.00 $\pm$ 33.91	1.7	101.0
3000	2998.00 $\pm$ 60.17	2.0	99.96

#### 6 稳定性试验

吸取“3.3”项下的注射剂稀释液, 按“4”项下处理后, 分别于配制后 0, 2, 5, 10, 20 h 下依法测定。结果表明, 供试品溶液在 20 h 内基本稳定, RSD 分别为 1.3%, 1.2%, 0.96%, 0.64%, 0.30%。

#### 7 重复性试验

吸取“3.3”项下的注射剂稀释液, 按“4”项下处理后, 进行 5 次平行测定, 其 RSD 为 0.85%。

#### 8 加标回收率试验

精密吸取 3 份已知含量的同一批号的样品 ( $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  注射液) 500  $\mu\text{L}$ , 置 1.5 mL 离心管中, 分别精密加入  $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  FT 对照品溶液 50, 200, 500  $\mu\text{L}$ , 按“4”项下处理后进行测定, 结果见表 2。

表 2 加标回收率结果 ( $n = 5$ )

Tab 2 Recoveries and precisions of samples with standards

样品量 (sample volume) / $\mu\text{L}$	加入量 (spiked) / $\mu\text{L}$	平均值 $\pm$ 标准偏差 (mean $\pm$ SD) / $\mu\text{L}$	回收率 (recovery) /%	RSD /%
500	50	552.20 $\pm$ 3.03	100.4	0.65
500	200	706.40 $\pm$ 3.58	100.9	0.71
500	500	1012.00 $\pm$ 21.36	101.2	2.1

#### 9 样品测定结果

选取含有 FT 的 3 种制剂 6 批次, 分别为注射液、胶囊和片剂, 按照正文所建立的方法进行测定, 计算 FT 含量, 结果见表 3。

表 3 样品中 FT 测定结果 ( $n=6$ )

Tab 3 Test data of FT sample

剂型 (dosage of form)	批号 (Lot No)	浓度 (concentration) /ng·mL <sup>-1</sup>	平均值 ± 标准偏差 (mean ± SD)	RSD /%	准确度 (accuracy) %
注射液 (injection)	8060032EU	1000	1002.6 ± 7.33	0.73	100.3
	8060591DE	1000	1001.9 ± 6.33	0.63	101.1
胶囊 (capsule)	20080923	1000	1012 ± 4.47	0.44	101.2
	20080227	1000	1006.6 ± 4.98	0.64	99.87
片剂 (tablets)	20081218	1000	1001.1 ± 6.78	0.84	100.7
	20090110	1000	1004.2 ± 5.55	0.91	100.3

## 10 讨论

**10.1 色谱条件的优化** 流动相的选择对 FT 的离子化效率具有非常显著的影响。比较了不同流动相如甲醇-水 (体积比为 10:90 50:50 65:35 80:20 90:10), 甲醇-2 mmol·L<sup>-1</sup> 醋酸铵 (体积比为 3:1)、乙腈-水 (体积比为 70:30) 条件下目标物的离子化效率, 结果显示选用甲醇-水 (80:20) 作为流动相离子化效率最佳。

**10.2 质谱条件的优化** 选用 1 μg·mL<sup>-1</sup> FT 对照品溶液进行条件优化, 选择 ESI 和 ESI<sup>+</sup> 作为电离模式, 分别对 DR、ER、TEM、CE 等进行了优化。通过全扫描方式观察总离子流图, 得到母离子峰, 通过碰撞反应进行子粒子扫描确定其定量和辅助定性离子, 然后分别对各离子对进行检测, 经反复试用离子对, 最后确定 ESI<sup>+</sup> 作为电离模式,  $m/z$  198.9<sup>+</sup> 42.0 为检测离子对, 仪器检测响应值达到最佳。

**10.3 方法的适用性** 文中所述方法灵敏度高, 前

处理简单, 分析速度快, 重复性好, 可作为 FT 制剂中 FT 质量控制方法。从样品测定结果可以看出, 待测药品中 FT 含量合格, 成分也比较稳定。

## 参考文献

- 1 SUN Ling(孙玲), WANG Yuan(王原), ZHAI Guang-xi(翟光喜), *et al* Simultaneous RP-HPLC determination of tegafur, gincostat and potassium oxonate in compound tegafur capsules (RP-HPLC 同时测定复方替加氟胶囊中替加氟、吉莫斯特和氧嗪酸钾的含量). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2006 26(8): 1115
- 2 ChP(中国药典). 2005 Vol II (二部): 680
- 3 Matsushita E, Iji Yoshida K, Ozaki K, Itanura Ryukichi *et al* Determination of S-1 (combined drug of tegafur, 5-chloro-2,4-dihydroxypyridine and potassium oxonate) and 5-fluorouracil in human plasma and urine using high-performance liquid chromatography and gas chromatography-negative ion chemical ionization mass spectrometry. *J Chromatogr B*, 1997, 691: 95

(本文于 2009 年 3 月 19 日收到)