

# 福多司坦有关物质的亲水作用色谱-质谱结构鉴定

顾 霄, 罗 英, 陈 悦\*

(浙江省食品药品检验研究院, 浙江 杭州 310000)

**摘要:** 为了研究福多司坦原料药中的有关物质, 本研究采用亲水作用色谱法, 分离出 6 个主要有关物质 (1 个工艺杂质、5 个强制降解产物), 并结合四级杆串联飞行时间质谱, 确定各有关物质的准确分子质量及二级碎片特征。根据质谱裂解分析, 结合合成工艺与强制降解实验, 对 5 个有关物质做了结构鉴定, 为福多司坦生产工艺控制和质量保障提供参考依据。

**关键词:** 福多司坦; 有关物质; 色谱-质谱联用; 亲水作用色谱; 裂解规律

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 08-1313-05

## Identification of fudosteine-related substances by HILIC-MS

GU Xiao, LUO Ying, CHEN Yue\*

(Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310000, China)

**Abstract:** To study the substances in fudosteine, one synthetic by-product and five forced degradation products were detected by hydrophilic interaction chromatography (HILIC). Quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (Q-TOF MS) was used for accurate mass determination and product ion scanning. Five related substances were identified in the products of mass spectra fragmentations elucidation, and verified further according to synthetic process and stress testing results. The results obtained are valuable for fudosteine manufacturing process control and quality assurance.

**Key words:** fudosteine; related substance; HPLC-MS; HILIC; fragmentation pathway

福多司坦 [S-(3-羟基丙基)-L-半胱氨酸, 图 1] 是一种祛痰药, 属于半胱氨酸衍生物, 基本作用是杯状细胞增生抑制作用及对呼吸道的黏液、黏膜正常状态的调节作用<sup>[1]</sup>。福多司坦原料药的合成方法有两种, 均以 L-半胱氨酸为起始原料, 分别与 3-卤代-1-丙醇 (方法 1)<sup>[2]</sup>或丙烯醇 (方法 2, 图 2)<sup>[3]</sup>反应制备。目前福多司坦及其制剂的质量标准仅收载于日本药典<sup>[4]</sup>中, 其中包括 L-胱氨酸和有关物质检查项, 有关物质项下并未列出特殊杂质。国内市售制剂包括片剂与胶囊剂, 国内文献<sup>[5-7]</sup>均采用传统 C18 色谱柱对福多司坦制剂进行有关物质检查, 但未见系统鉴定研究报

告。国外文献<sup>[8]</sup>采用特殊键合的 C18 柱, 对方法 1 制备的福多司坦原料药中 4 种工艺杂质和 2 种降解产物做了结构鉴定。由于福多司坦极性较大, 不利于在反相色谱上保留, 药典和文献报道的液相方法均采用 100% 纯水相<sup>[4, 5, 8]</sup>或 90% 以上离子对试剂<sup>[6, 7]</sup>作为流动相。亲水作用色谱法 (HILIC) 是一种适用于极性化合物分析的方法, 在高比例有机相的情况下可以对极性化合物有较好的保留, 并且可以直接与质谱检测器联用。由于福多司坦可能存在反相色谱法难以分离的极性杂质, 本研究采用亲水作用色谱-四级杆串联飞行时间质谱 (HILIC-Q-TOF) 法, 对方法 2 制备的福多司坦原料药的有关物质做了研究, 共分离出 6 个有关物质 (1 个工艺杂质与 5 个强制降解杂质), 并对其中 5 个做了鉴定, 有 3 个尚未见文献报道, 可为福多司坦的生产工艺和质量控制提供参考依据。

收稿日期: 2017-02-23; 修回日期: 2017-04-16.

\*通讯作者 Tel: 86-571-86459413, E-mail: zidccy@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0169

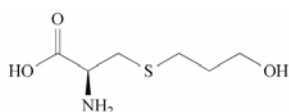


Figure 1 Chemical structure of fudosteine

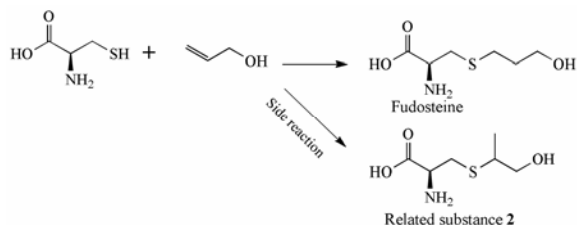


Figure 2 Fudosteine synthesis technology

## 材料与amp;方法

**仪器** LC-20AD 高效液相色谱仪 (日本岛津公司); 1290 Infinity 液相色谱-6538Q TOF 四级杆飞行时间质谱仪 (美国安捷伦公司)。

**试剂与试剂** 福多司坦原料药 (批号 140613-1) 由企业 A 提供, 乙腈为色谱纯, 乙酸铵、盐酸、氢氧化钠、30% 双氧水均为分析纯, 自制纯化水。

**色谱条件** 采用 Waters Xbridge HILIC 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-20 mmol·L<sup>-1</sup> 乙酸铵 (89:11) 为流动相等度洗脱, 流速 1.5 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 35 °C, 检测波长为 210 nm, 进样 20 μL。

**质谱条件** 电喷雾正离子化, 喷雾电压 4 kV, 雾化气压力 35 psi (1 psi ≈ 6.9 kPa), 干燥气流量 10 L·min<sup>-1</sup>, 去溶剂温度 350 °C, 碎片电压 75 V。质量数扫描范围 *m/z* 100~500。

**供试品溶液** 取福多司坦原料药约 10 mg, 精密称定, 置 20 mL 量瓶中, 加流动相适量溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。

**强制降解实验溶液** 取福多司坦原料药约 10 mg, 分别经 1 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸溶液 (或 1 mol·L<sup>-1</sup> 氢氧化钠溶液) 0.1 mL 80 °C 水浴 2 h, 酸碱中和后用流动相稀释至 20 mL, 作为酸碱破坏溶液。另取福多司坦原料药约 10 mg, 加 30% 双氧水 0.1 mL 溶解, 用流动相稀释至 20 mL, 室温下放置 12 h, 作为氧化破坏溶液。取福多司坦原料药粉末, 置 105 °C 烘箱 24 h 或置强光下照射 24 h 后, 加流动相溶解并稀释制成 0.5 mg·mL<sup>-1</sup> 的溶液, 作为高温破坏或光照破坏溶液。同时进行空白溶剂实验。

## 结果

### 1 有关物质检查

采用上述方法对于福多司坦原料药 (图 3a) 进行

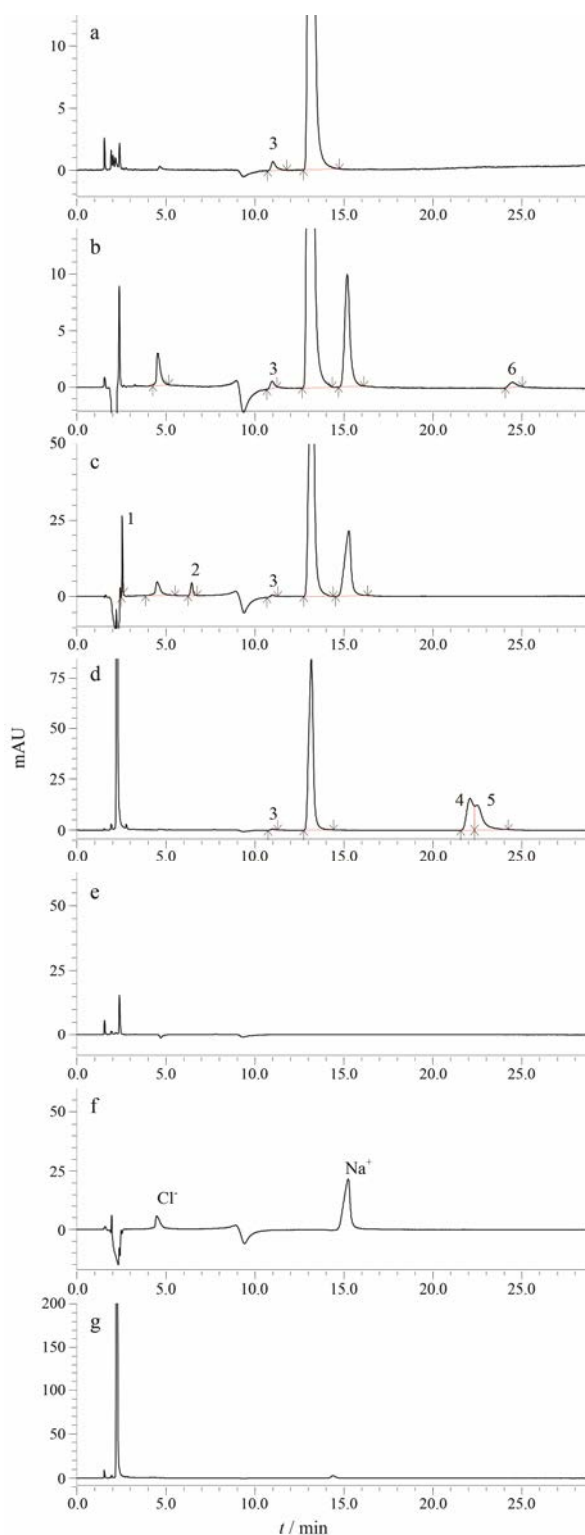


Figure 3 HPLC-UV chromatograms of the related substances in fudosteine from stress tests. a: Normal; b: Acid; c: Base; d: Oxidation; e: Blank solvent; f: NaCl + blank solvent; g: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + blank solvent

有关物质分析, 发现 1 个主要有关物质 (有关物质 3), 采用面积归一化法计算含量约为 0.7%。强制降解实验结果表明, 本品在强酸 (图 3b)、强碱 (图 3c) 和氧

化(图 3d) 条件下分别产生 1 个(有关物质 6)、2 个(有关物质 1 和 2) 和 2 个(有关物质 4 和 5) 强制降解产物, 对应空白实验结果见图 3e、3f 和 3g。在高温和光照破坏后未检测到杂质生成。

## 2 有关物质结构分析

采用 HPLC-Q/TOF 做一级与二级质谱分析, 测得各有关物质母离子与子离子的准确分子质量并推测离子组成, 通过与福多司坦裂解规律对照, 鉴定了除有关物质 2 外其他有关物质结构, 结果见表 1。有关物质 2 未扫描到  $[M+H]^+$  离子, 可能其结构不利于离子化。一级与二级质谱中推测离子式理论质量与测得质量偏差均分别小于 5 ppm 与 15 ppm。

**2.1 福多司坦** ESI<sup>+</sup>-TOF 测得福多司坦  $[M+H]^+$  的准确相对分子质量为 180.068 9, 与离子式  $C_6H_{14}NO_3S^+$  相应。其  $[M+H]^+$  离子主要碎片  $m/z$  163、91、73 和 59, 与福多司坦的结构相应。 $m/z$  163 为福多司坦中性丢失一个氨分子产生, 之后靠羧基侧碳硫键断裂形成  $m/z$  91 离子, 接着中性丢失一个水分子形成  $m/z$  73。 $m/z$  59 为正丙醇离子。福多司坦的二级质谱分析对于解析其有关物质具有参考意义。福多司坦二级质谱图与可能的裂解途径见图 4。

**2.2 有关物质 1** ESI<sup>+</sup>-TOF 测得有关物质 1 的  $[M+H]^+$  的准确相对分子质量为 183.050 1, 与离子式  $C_6H_{15}O_2S_2^+$  相应, 该离子式与福多司坦差异较大, 推断并非一步反应产物。在福多司坦二级质谱中  $m/z$  91 对应离子式为  $C_3H_7OS^+$ , 恰为有关物质 1 分子组成的一半, 推断其为福多司坦在碱性条件下碳硫键断裂后重新组合生成二硫键后的产物。其  $[M+H]^+$  离子主要碎片包括  $m/z$  165、147、107 和 73。 $m/z$  165 和 147 为  $[M+H]^+$  连续脱去水分子后的产物。 $m/z$  165 脱去一分子丙烯醇产生  $m/z$  107。 $m/z$  73 在福多司坦二级质谱中也存在。结合文献报道<sup>[9]</sup>, 推测有关物质 1 的生成机制为: 在碱性条件下氢氧根攻击羰基的  $\alpha$  氢, 引起碳硫键断

裂产生巯基负离子, 在氧气作用下巯基负离子氧化成自由基, 之后自由基对接生成二硫化物。有关物质 1 的二级质谱图与可能的裂解途径见图 5, 可能的生成机制见图 6。

**2.3 有关物质 3** ESI<sup>+</sup>-TOF 测得有关物质 3 的  $[M+H]^+$  的准确相对分子质量为 180.068 4, 与离子式

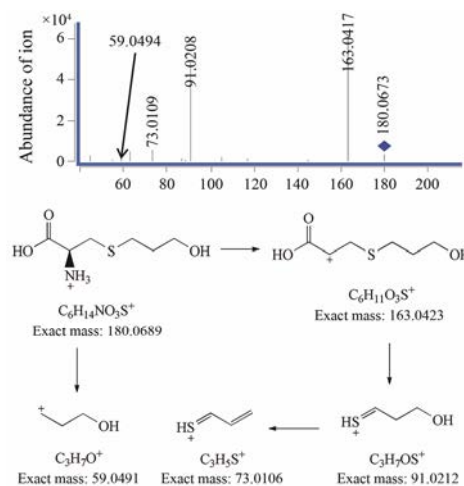


Figure 4 MS/MS spectra of fudosteine  $[M+H]^+$  ( $m/z$  180) ion and its fragmentation pathways

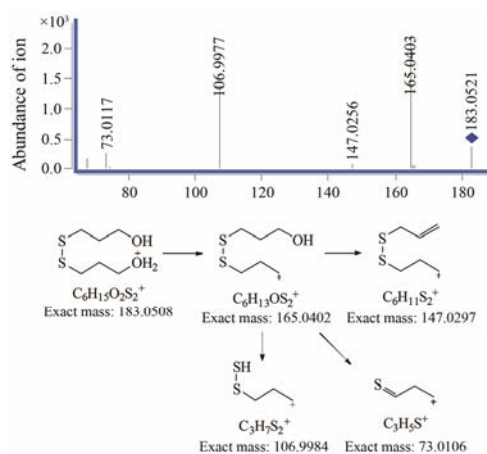


Figure 5 MS/MS spectra of related substance 1  $[M+H]^+$  ( $m/z$  183) ion and its fragmentation pathways

Table 1 Related substances identified in fudosteine by HPLC-Q/TOF

Impurity No.	$[M+H]^+$ $m/z$	Proposed ion formula	Deviation/ppm	Proposed chemical structure
1	183.050 1	$C_6H_{15}O_2S_2^+$	3.8	
3	180.068 4	$C_6H_{14}NO_3S^+$	2.7	
4	196.063 2	$C_6H_{14}NO_4S^+$	3.1	
5	196.063 1	$C_6H_{14}NO_4S^+$	3.6	
6	341.120 2	$C_{12}H_{25}N_2O_5S_2^+$	-0.8	

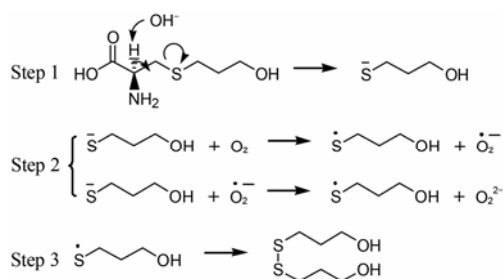


Figure 6 Proposed formation mechanism of related substance 1

$C_6H_{14}NO_3S^+$ 相应, 元素组成与福多司坦相同。有关物质 2 在未破坏的原料药中即存在, 其含量在强制降解实验中没有增加, 故推断是福多司坦合成过程中的副反应产物。其  $[M+H]^+$  离子主要碎片包括  $m/z$  163、105、87 和 59, 与福多司坦碎片差异较大。 $m/z$  59 在福多司坦二级质谱中也存在, 对应正丙醇基团, 但离子强度极弱, 而在有关物质 3 二级质谱图中,  $m/z$  59 为主要碎片之一, 说明在有关物质 3 结构中更容易丢失该基团。结合合成工艺<sup>[3]</sup>与文献<sup>[10]</sup>报道, 推断有关物质 3 是福多司坦合成过程中半胱氨酸巯基与丙烯醇 2 位碳对接的产物, 与福多司坦结构中的正丙醇部分相比, 异丙醇结构更易在质谱中形成较稳定的仲碳正离子。 $m/z$  163 为有关物质 3 中性丢失一个氨分子产生, 之后连续丢失异丙醇基团和水分子, 形成  $m/z$  105 和 87。有关物质 3 二级质谱图与可能的裂解途径见图 7, 可能的反应式见图 2。

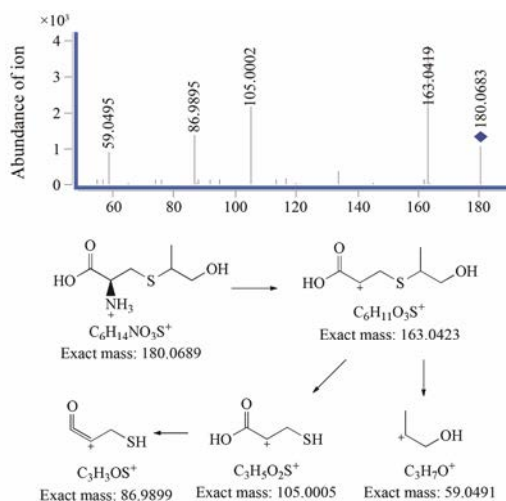


Figure 7 MS/MS spectra of related substance 3  $[M+H]^+$  ( $m/z$  180) ion and its fragmentation pathways

2.4 有关物质 4 和 5 ESI<sup>+</sup>-TOF 测得  $[M+H]^+$  离子的准确相对分子质量分别为 196.063 2 和 196.063 1, 均与离子式  $C_6H_{14}NO_4S^+$  相应, 元素组成比福多司坦多一个氧原子, 与文献<sup>[7]</sup>报道的氧化产物相同, 为福多司

坦结构中的硫醚氧化为亚砷后的产物。有关物质 4 和 5 的二级质谱也相同, 主要碎片离子均为  $m/z$  109、91 和 88。 $[M+H]^+$  离子靠羧基侧碳硫键断裂产生  $m/z$  109 和 88,  $m/z$  91 为  $m/z$  109 的脱水产物。推测有关物质 4 和 5 为氧硫键方向不同产生的非对映异构体, 相似的非对映异构氧化产物在羧甲司坦中也有发现<sup>[11]</sup>。有关物质 4 和 5 二级质谱图与可能的裂解途径见图 8。

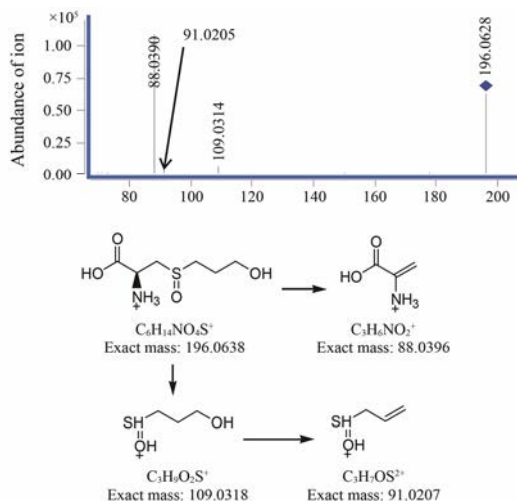


Figure 8 MS/MS spectra of related substance 4 and 5  $[M+H]^+$  ( $m/z$  196) ion and its fragmentation pathways

2.5 有关物质 6 ESI<sup>+</sup>-TOF 测得  $[M+H]^+$  离子的准确相对分子质量为 341.120 2, 与离子式  $C_{12}H_{25}N_2O_5S_2^+$  相应, 元素组成比两个福多司坦分子之和少一个水分子。推测酸破坏杂质是福多司坦分子间脱水缩合产物, 由于福多司坦同时含有羧基、羟基和氨基, 可能的缩合产物有酯、酰胺和酸酐。二级质谱主要有  $m/z$  324、307、296、234、192、163、117 和 88 的碎片离子。 $m/z$  324 和 307 与母离子连续脱去两个氨分子相应, 表明两个氨基未发生酰胺化反应。 $m/z$  88 离子强度很高, 在氧化产物中同样存在, 为 2-氨基丙烯酸结构, 表明至少有 1 个羧基未参与脱水缩合, 因此不太可能是酸酐结构。所以, 有关物质 5 最有可能为福多司坦分子间的酯化产物, 在酸性条件下羟基与羧基发生酯化反应是一种常见的化学反应。 $m/z$  296 和 234 分别为  $m/z$  324 重排丢失 CO 和碳硫键断裂产物。 $m/z$  192 为  $m/z$  341 碳氧键断裂产物。 $m/z$  163 和 117 为福多司坦基本结构单元。有关物质 6 二级质谱图与可能的裂解途径见图 9。

### 讨论

本研究采用 HILIC 色谱柱, 建立了一个亲水作

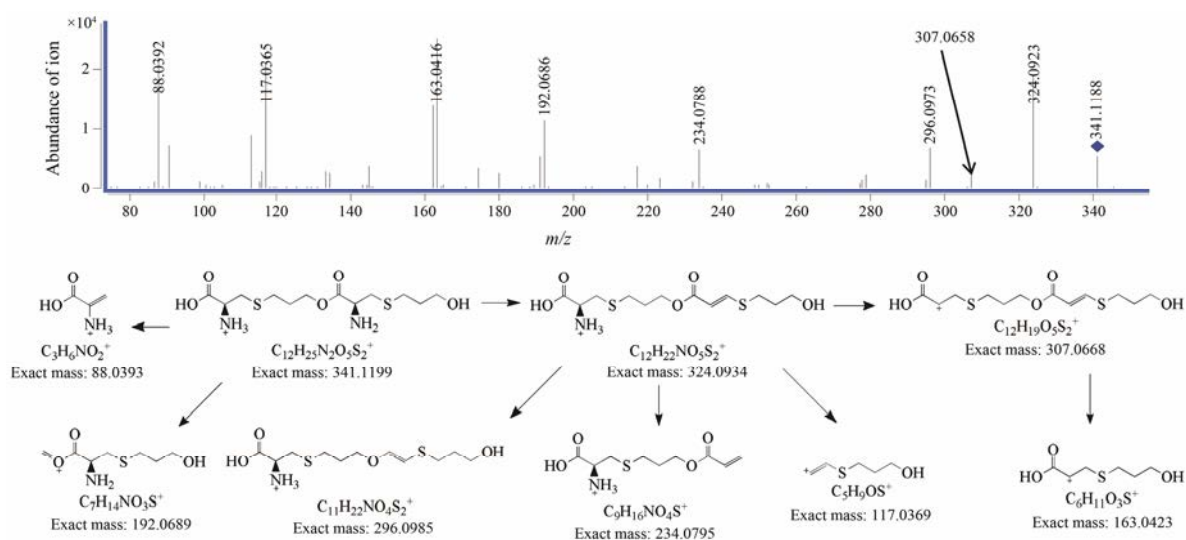


Figure 9 MS/MS spectra of related substance **6**  $[M+H]^+$  ( $m/z$  341) ion and its fragmentation pathways

用色谱液质联用方法。流动相采用亲水作用色谱法常用的乙腈-乙酸铵体系。乙腈比例为影响分离的关键因素,比例越高,保留越强,越有利于改善分离。在水相中加入适量的乙酸铵有助于改善峰形,提高分离度。通过一系列条件摸索,确定了流动相采用乙腈-20 mmol·L<sup>-1</sup> 乙酸铵溶液 (89:11) 等度洗脱,除氧化产物未能完全分离外,福多司坦与其他杂质均能有效分离。与反相色谱相比,化合物在亲水作用色谱条件下出峰顺序,分离效果均有较大不同。如福多司坦氧化产物在反相色谱中保留极弱,只有一个色谱峰<sup>[8]</sup>,而在亲水作用色谱条件下保留较强,且可以检测到两个色谱峰。因此,在强极性药物研究中,亲水作用色谱法可以与反相色谱法相配合,对杂质谱做更全面的解析。

本研究检出福多司坦原料药中 6 个主要杂质 (1 个工艺杂质和 5 个强制降解产物),并对其中 5 个做了结构鉴定。根据杂质来源可分为 2 类,即工艺杂质和降解产物。有关物质 **3** 为合成过程中加成反应副产物。有关物质 **1** 和 **2** 为碱破坏产物,有关物质 **1** 为碱水解后二聚重排产物;有关物质 **4** 和 **5** 为硫醚氧化为亚砷的产物,互为非对映异构体;有关物质 **6** 为酸性条件下酯化反应形成的福多司坦二聚物。有关物质 **1**、**3** 和 **6** 尚未见文献报道。

## References

[1] Takahashi K, Kai H, Mizuno H, et al. Effect of fudosteine, a new cysteine derivative, on mucociliary transport [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2001, 53: 911-914.

[2] Itoh Y, Mizuno H, Kiyohara C, et al. Expectorant comprising

hydroxyalkylcysteine derivative: US, 5047428 A [P]. 1991.

- [3] Itoh Y, Kuriyama T, Ogawa M. Production of *S*-hydroxypropyl-L-cysteine: JP, 8119932 [P]. 1996.
- [4] Japanese Pharmacopoeia Commission. The Japanese Pharmacopoeia [S]. 17ed. Tokyo: Ministry of Health and Welfare Press, 2016: 968-969.
- [5] Xu Q, Liu J, Wang Y, et al. Study on development and validation of an HPLC method for determination of content and related substances of fudosteine oral solution and its stability [J]. *Chin J Pharm Anal (药物分析杂志)*, 2006, 26: 1457-1460.
- [6] Hu SG. Determination of related substance in fudosteine capsules by HPLC [J]. *China Pract Med (中国实用医药)*, 2007, 2: 26-27.
- [7] Su P. Determination of fudosteine oral liquid and related substances by HPLC [J]. *China Pharm (中国药师)*, 2010, 13: 824-826.
- [8] Gupta PB, Rao BV, Sanasi PD, et al. Identification, isolation and characterization of process and degradation impurities of fudosteine and its stability indicating HPLC method validation [J]. *Int J Adv Res*, 2016, 4: 453-461.
- [9] Wallace TJ, Schriesheim A, Bartok W. The base-catalyzed oxidation of mercaptans. III. Role of the solvent and effect of mercaptan structure on the rate determining step 1, 2 [J]. *J Org Chem*, 1963, 28: 1311-1314.
- [10] Ware T, Jennings AR, Bassampour ZS, et al. Degradable, silyl ether thiol-ene networks [J]. *RSC Adv*, 2014, 4: 39991-40002.
- [11] Wahl O, Holzgrabe U. Impurity profiling of carbocysteine by HPLC-CAD, qNMR and UV/vis spectroscopy [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 95: 1-10.