

## 基于UPLC-MS/MS技术同时测定异环磷酰胺原料药中主成分及有关物质

张燕<sup>1</sup>, 闫占宽<sup>1,2</sup>, 王辰<sup>3</sup>, 曹蕾<sup>3</sup>, 李辉辉<sup>2</sup>, 刘钦伟<sup>2</sup>, 杨春<sup>2</sup>, 戚利强<sup>2</sup>, 王洪森<sup>1,2\*</sup>

1. 江苏恒瑞医药股份有限公司, 江苏 连云港 222000

2. 江苏原创药物研发有限公司, 江苏 连云港 222000

3. 江苏海洋大学 药学院, 江苏 连云港 222005

**摘要:** 目的 采用超高效液相色谱质谱联用(UPLC-MS/MS)法同时测定异环磷酰胺原料药中主成分及2种有关物质。方法 采用ACQUITY UPLC® HSS T3 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) 色谱柱, 以甲醇(A)-5 mmol·L<sup>-1</sup>碳酸氢铵溶液(B)为流动相进行梯度洗脱, 对异环磷酰胺原料药中的异环磷酰胺、杂质G、杂质E进行分离, 体积流量为0.3 mL·min<sup>-1</sup>, 进样量为10 μL, 柱温为30 °C, 质子离子源ESI, 正离子模式下以多反应监测方式(MRM)进行定量分析。结果 异环磷酰胺、杂质E、杂质G的线性范围分别1.00~50.00、1.00~50.00、0.01~0.5 ng·mL<sup>-1</sup>, 线性关系良好, *r*均大于0.999 4; 且该方法的仪器精密度、重复性良好, 异环磷酰胺的回收率为98.1%~101.7%、RSD为0.40%~1.73%, 杂质E的回收率为96.1%~111.1%、RSD为0.67%~2.34%, 杂质G的回收率为93.7%~108.3%、RSD为2.2%~7.6%, 符合标准。原料药中的异环磷酰胺质量分数为97.1~98.5%, 杂质E均未检出, 杂质G在1501批次检出量最高, 为0.009 25%, 杂质E和G未超千分之一限度。结论 建立的UPLC-MS/MS法灵敏度较高、重复性好, 为异环磷酰胺原料药的质量控制提供了一种可行的分析方法, 适用于该产品的质量控制在。

**关键词:** 异环磷酰胺; 杂质E; 杂质G; 有关物质; UPLC-MS/MS; 原料药; 质量控制

中图分类号: R932 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2023)12-2535-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.12.006

## Simultaneous determination of principal components and related substances in isocyclophosphamide APIs based on UPLC-MS/MS technique

ZHANG Yan<sup>1</sup>, YAN Zhankuan<sup>1,2</sup>, WANG Chen<sup>3</sup>, CAO Lei<sup>3</sup>, LI Huihui<sup>2</sup>, LIU Qinwei<sup>2</sup>, YANG Chun<sup>2</sup>, QI Liqiang<sup>2</sup>, WANG Hongsen<sup>1,2</sup>

1. Jiangsu Hengrui Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222000, China

2. Jiangsu Original Drug R&D Co., Ltd., Lianyungang 222000, China

3. School of Pharmacy, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China

**Abstract: Objective** To use liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS/MS) to simultaneously determine the principal components and two related substances in ifosfamide API. **Methods** The ACQUITY UPLC® HSS T3 (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) column was used to perform gradient elution of methanol (A)-5 mmol·L<sup>-1</sup> ammonium bicarbonate (B) as the mobile phase, and ifosfamide, impurity G and impurity E in ifosfamide API were separated with a flow rate of 0.3 mL·min<sup>-1</sup>, an injection volume of 10 μL, a column temperature of 30 °C, and a proton ion source ESI. Quantification in positive ion mode in multi-reaction monitoring mode (MRM). **Results** The linear ranges of ifosfamide, impurity E and impurity G were 1.00—50.00, 1.00—50.00, 0.01—0.5 ng·mL<sup>-1</sup> respectively, with good linear relationships and correlation coefficients greater than 0.994, and the instrument precision and repeatability of the method were good. The recoveries of isocyclophosphamide were 98.1%—101.7% with RSD of 0.40%—1.73%. The recovery of impurity E was 96.1%—111.1% with RSD of 0.67%—2.34%. The recoveries of impurity G were 93.7%—108.3% with RSD of 2.2%—7.6%. The mass fraction of ifosfamide in the raw material was 97.1%—98.5%, and impurity E had not been

收稿日期: 2023-07-21

基金项目: 江苏省产教融合一流课程《药物分析》建设项目; 江苏海洋大学专业学位研究生课程案例库建设项目(YJSZY202102); 江苏海洋大学2023年一流课程立项; 连云港市政策引导产学研项目(CYX2202)

第一作者: 张燕(1980—), 女, 硕士研究生, 主要从事药品质量研究。E-mail: zhangyan\_tg@163.com

\*通信作者: 王洪森, 男, 本科, 主要从事化学药合成及质量标准研究, 江苏省产业教授。E-mail: wanghongsen163163@163.com

detected. The detection amount of impurity G in batch 1501 is 0.009 25%, and impurities E and G do not exceed the limit of one thousandth. **Conclusion** The proposed method has high sensitivity and good repeatability, which provides a feasible analysis method for the quality control of ifosfamide API, which is suitable for the quality control of this product.

**Key words:** ifosfamide; impurity E; impurity G; related substances; UPLC-MS/MS; active pharmaceutical ingredients; quality control

异环磷酰胺, 化学名为3-(2-氯乙基)-2-[(2-氯乙基)氨基]四氢-2H-1,3,2-氧氮杂磷杂环己烷-2-氧化物, 是美国Baxter International公司研制的一种烷化剂类抗肿瘤药物, 临床上主要用于治疗恶性淋巴瘤、肺癌、乳腺癌、卵巢癌及白血病等<sup>[1-3]</sup>。在原料药生产过程中常会带入一些起始原料、残留溶剂、中间体、副产物等有关物质, 这类物质可能对产品的疗效、稳定性甚至人体健康造成一定的不良影响<sup>[4]</sup>。宋更申等<sup>[5]</sup>建立了一种异环磷酰胺原料药中残留有机溶剂的气相色谱方法, 采用顶空进样法, 通过程序升温的方式使得有机溶剂气化, 提高了残留溶剂的分离效率, 该方法快速、灵敏, 适用于异环磷酰胺中多种有机溶剂的残留量的测定。在《欧洲药典》<sup>[6]</sup>和《美国药典》<sup>[7]</sup>中采用薄层色谱法对异环磷酰胺的有关物质进行检测, 在《中国药典》(2020年版)<sup>[8]</sup>中也规定了异环磷酰胺杂质I和杂质II的测定方法, 但仍然缺乏一种简便、快速、灵敏度高检测异环磷酰胺原料药中活性医药成分(API)及其他有关物质的定量分析方法。本研究建立高灵敏度、快速地检测异环磷酰胺原料药中API及杂质E、杂质G(结构式见图1)的超高效液相色谱质谱联用(UPLC-MS/MS)法, 对比《欧洲药典》异环磷酰胺有关物质的检测方法具有可行性。

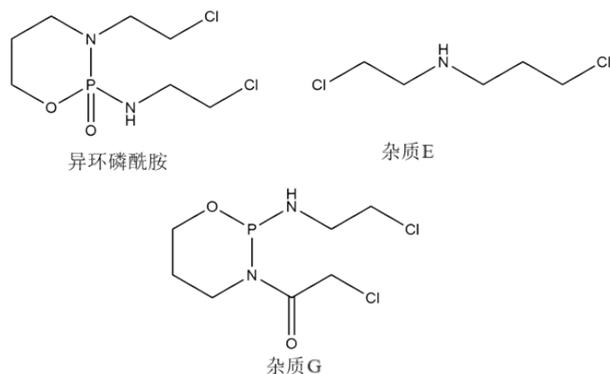


图1 异环磷酰胺、杂质E、杂质G化学结构

Fig. 1 Chemical structure of ifosfamide, impurity E, and impurity G

## 1 仪器与试剂

Agilent 超高效液相色谱仪(Agilent Technologies公司); Waters TQS 三重四极杆检测

器(Waters公司); AL104型十万分之一电子天平(Mettler Toledo公司)。

异环磷酰胺原料药(批号 TRI282106-1501、TRI282106-1502、TRI282106-1503, 江苏恒瑞医药有限公司); 异环磷酰胺对照品(质量分数99.5%, 批号100595-201302, 中国食品药品检定研究院); 杂质G对照品(质量分数99.5%, 批号282106, 江苏恒瑞医药有限公司); 杂质E对照品(质量分数99.5%, 批号10060004, 欧洲药品质量管理局); 甲醇(HPLC级, 康科德科技有限公司); 碳酸氢铵(HPLC级, 上海麦克林生化科技有限公司); 水(超纯水, 杭州娃哈哈集团有限公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱为ACQUITY UPLC® HSS T3(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 以甲醇(A)-5 mmol·L<sup>-1</sup>碳酸氢铵溶液(B)为流动相进行梯度洗脱, 梯度洗脱程序见表1; 体积流量为0.3 mL·min<sup>-1</sup>, 进样量为10 μL, 柱温为30 °C。

表1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution procedure

t/min	流动相A/%	流动相B/%
0	5	95
1.5	5	95
8.5	55	45
8.6	5	95
10.0	5	95

### 2.2 质谱条件

质谱采用电喷雾离子源(ESI), 正离子模式下以多反应监测方式(MRM)进行定量分析, 各物质的UPLC-MS/MS分析参数见表2。电喷雾电压(IS): 5 500 V; 毛细管电压: 3.0 kV; 脱溶剂气体积流量700 L·h<sup>-1</sup>; 锥孔气体积流量150 L·h<sup>-1</sup>; 碰撞气为氩气; 碰撞气体积流量0.13 mL·min<sup>-1</sup>; 离子源温度(TEM): 150 °C; 脱溶剂气温度: 350 °C。

### 2.3 溶液的配制

2.3.1 空白溶液(稀释剂) 精密量取0.5 mL甲醇, 置于10 mL量瓶中, 加入超纯水稀释定容至刻度, 摇

表2 各物质的UPLC-MS/MS分析参数

Table 2 UPLC-MS/MS analysis parameters for each substance

名称	定量离子对	锥孔电压/V	碰撞能/eV
异环磷酰胺	260.75→91.74	30	24
杂质E	155.48→62.72	30	16
杂质G	274.72→199.82	30	10

匀,制得甲醇约5%的空白溶液。

**2.3.2 混合对照品溶液** 取异环磷酰胺对照品、杂质E、杂质G对照品各约10 mg,精密称定,分别置于10 mL量瓶中,加稀释剂稀释溶解定容至刻度,摇匀,制得异环磷酰胺、杂质E、杂质G约1.0 mg·mL<sup>-1</sup>的对照品储备液;逐级稀释对照品储备液配制成异环磷酰胺约1 ng·mL<sup>-1</sup>、杂质E约1 ng·mL<sup>-1</sup>、杂质G约0.01 ng·mL<sup>-1</sup>的混合对照品溶液。

**2.3.3 供试品溶液** 取异环磷酰胺原料药约10 mg,精密称定,置于10 mL量瓶中,用稀释剂溶解并稀释至刻度,摇匀,制得异环磷酰胺约1 mg·mL<sup>-1</sup>的供试品储备液;逐级稀释供试品储备液,制成异环磷酰胺约40 ng·mL<sup>-1</sup>供试品溶液。

**2.3.4 100%异环磷酰胺、杂质G加标供试品溶液1** 分别精密量取供试品储备液1 mL、异环磷酰胺对照品储备液0.6 mL、杂质G对照品溶液(10 000 ng·mL<sup>-1</sup>) 1 mL,置于100 mL量瓶中,以稀释剂稀释至刻度,摇匀。再次取混合溶液0.1 mL,置于100 mL量瓶中,以稀释剂稀释至刻度。摇匀即得异环磷酰胺约为6 ng·mL<sup>-1</sup>、杂质G约0.1 ng·mL<sup>-1</sup>的加标供试品溶液1。

**2.3.5 100%加标供试品溶液2** 精密移取供试品储备液1 mL置于100 mL量瓶中,以稀释剂稀释至刻度,摇匀。再取稀释供试品0.1 mL、杂质E储备液0.2 mL,置于100 mL量瓶中,以稀释剂稀释至刻度。摇匀即得杂质E约2 000 ng·mL<sup>-1</sup>的加标供试品溶液2。

## 2.4 方法学考察

**2.4.1 专属性** 分别精密移取空白溶液、混合对照品溶液、加标供试品溶液各10 μL,分别注入液相色谱仪,记录色谱图。结果表明,空白溶液对异环磷酰胺、杂质E、杂质G色谱峰保留时间均无干扰,且色谱峰之间分离度良好,色谱图见图2。

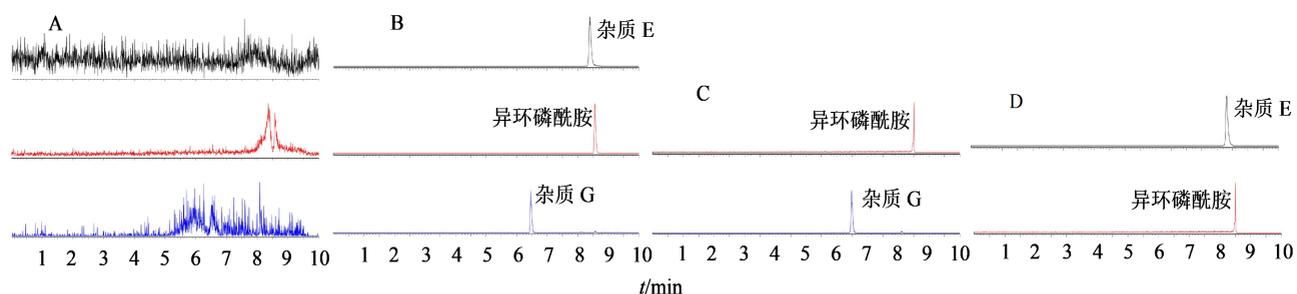


图2 空白溶液(A)、对照品(B)、加标供试品溶液1(C)、加标供试品溶液2(D)色谱图

Fig. 2 Chromatogram of blank solution (A), reference substance (B), test substance added reference substance 1 (C), and test substance added reference substance 2 (D)

**2.4.2 检测限及定量限** 用含异环磷酰胺、杂质E、杂质G的适当浓度的对照品溶液,取信噪比(S/N)分别为S/N≥3和S/N≥10时的进样量作为检测限和定量限,结果见表3。

**2.4.3 线性关系及范围** 精密量取上述对照品储

备液各适量,用稀释剂按不同比例稀释制成一系列浓度的线性溶液,各精密量取10 μL,分别注入液相色谱仪,记录色谱图,以进样浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线并进行线性回归求得回归方程,结果见表4。

**2.4.4 准确度** 采用高、中、低(120%、100%、80%) 3个水平的加标供试品溶液,每个水平溶液平行制备3份,3个水平的加标供试品溶液配制参照“2.3.4”“2.3.5”项方法,照“2.1”“2.2”项下的色谱及质谱条件测定,计算回收率。结果表明,异环磷酰胺的回收率为98.1%~101.7%,RSD为0.40%~1.73%;杂质E的回收率为96.1%~111.1%,RSD为0.67%~2.34%;杂质G的回收率为93.7%~108.3%,

表3 检测限及定量限试验结果

Table 3 Detection limit and quantitative limit test results

成分	检测限/ (ng·mL <sup>-1</sup> )	定量限/ (ng·mL <sup>-1</sup> )
异环磷酰胺	0.005	0.010
杂质E	0.125	0.500
杂质G	0.002	0.100

表 4 异环磷酰胺、杂质 E、杂质 G 线性关系

Table 4 Linear of ifosfamide, impurity E and impurity G

名称	线性范围/(ng·mL <sup>-1</sup> )	线性方程	r
异环磷酰胺	1~50	$Y=4\ 880\ 048.82 X+153\ 324.88$	1.000 0
杂质 E	1~50	$Y=297\ 470 X-26\ 877$	1.000 0
杂质 G	0.01~0.50	$Y=4\ 754\ 438.85 X-21\ 946.26$	0.999 4

RSD 为 2.2%~7.6%; 均符合标准。表明该方法具有良好的准确度, 可满足相关定量分析要求。

**2.4.5 仪器精密度与重复性** 将异环磷酰胺、杂质 E、杂质 G 对照品溶液连续进样 6 次, 照“2.1”“2.2”项下的色谱及质谱条件测定, 记录色谱图。异环磷酰胺、杂质 E、杂质 G 的峰面积的 RSD 分别为 2.7%、3.4%、4.3%, 表明仪器的精密度良好。

由于原料药中杂质 E 无法检出, 重复性试验测定 6 份加样杂质 E 的供试品溶液中异环磷酰胺、杂质 E、杂质 G 峰面积的 RSD。参照“2.3”项下平行制备 6 份加标供试品溶液(供试品 100 ng·mL<sup>-1</sup>、杂质 E 10 ng·mL<sup>-1</sup>、杂质 G 10 ng·mL<sup>-1</sup>), 进样分析, 记录色谱图, 计算溶液中的异环磷酰胺、杂质 E 和杂质 G 的峰面积, 并计算 RSD。异环磷酰胺、杂质 E、杂质 G 重复性峰面积 RSD 分别为 1.7%、2.1% 和 3.5%, 表明本方法重复性良好。

**2.4.6 溶液稳定性** 将“2.3”项的加标供试品溶液

在 2~8 °C 下放置 0、2、4、6、8、12、24 h 后进样分析。测得主成分异环磷酰胺在 24 h 内峰面积的 RSD 为 8.3%; 杂质 E 在 24 h 未检出, 在 8 h 内的峰面积 RSD 为 5.9%; 杂质 G 在 24 h 内峰面积的 RSD 为 28%, 在 8 h 内的峰面积 RSD 为 5.6%, RSD 均不大于 10%, 符合标准。表明异环磷酰胺在 24 h 内稳定, 杂质 E、G 在 8 h 内稳定。

## 2.5 样品测定

精密称取 3 批异环磷酰胺原料药样品, 每批次称 2 份, 同“2.3”项下供试品溶液的配制, 制备 40 ng·mL<sup>-1</sup> 不同批次的供试品样品, 每份样品分别进样 2 针, 采用标准曲线法计算异环磷酰胺及杂质 E 和 G 的质量分数。原料药中的异环磷酰胺质量分数为 97.1%~98.5%, 杂质 E 均未检出, 杂质 G 在 TRI 282106-1501 批次检出量为 0.009 25%, 杂质 E 和 G 未超千分之一限度。结果见表 5。

表 5 3 批次原料药中异环磷酰胺、杂质 E、杂质 G 的含量测定结果

Table 5 Determination results of ifosfamide, impurity E and impurity G in three batches of APIs

批号	异环磷酰胺		杂质 G		杂质 E	
	质量浓度/ (ng·mL <sup>-1</sup> )	质量分数/%	质量浓度/ (ng·mL <sup>-1</sup> )	质量分数/%	质量浓度/ (ng·mL <sup>-1</sup> )	质量分数/%
TRI282106-1501	39.32	98.31	0.003 7	0.009 25	ND	ND
TRI282106-1502	39.38	98.45	ND	ND	ND	ND
TRI282106-1503	38.82	97.06	ND	ND	ND	ND

ND-未检出

ND-not detected

## 3 讨论

### 3.1 色谱柱筛选

分别考察了 C<sub>18</sub> 柱、HILIC 柱、Amide 柱和 T3 柱。参考《欧洲药典》异环磷酰胺项下收载的杂质的薄层鉴别方法和化合物的结构特点, 推断可能是因为待测物极性较大, 在 C<sub>18</sub> 柱上不保留。采用 Amide 柱时, 无论对照品浓度如何变化, 发现在 SIR 和 MRM 检测模式下, 每个通道都会有一个保留时间相同的峰出现, 在调整流动相的比例后, 峰的位置也同步

变化, 并且, 通道内无其他峰出现。采用 T3 柱时, 在 MRM 检测模式下, 异环磷酰胺响应较好, 杂质 E 和 G 虽响应较低但也能实现准确检测。因而, 最终选择 T3 柱进行分析研究。

### 3.2 流动相种类及比例

反相色谱中流动相极性大于固定相极性, 所以流动相极性增大, 洗脱能力减小, 因为留在固定相上的物质是极性小的物质, 用极性溶剂来洗保留时间就会增大。分别考察了甲醇-水和乙腈-水的流动

相系统。实验结果表明,以甲醇-水为流动相时,色谱峰峰型较好。在确定了色谱柱和流动相的种类后,考察了流动相中添加剂种类,通过向流动相中分别添加0.1%甲酸、2 mmol·L<sup>-1</sup>碳酸氢铵、5 mmol·L<sup>-1</sup>碳酸氢铵和10 mmol·L<sup>-1</sup>碳酸氢铵,发现添加5 mmol·L<sup>-1</sup>碳酸氢铵时,色谱峰峰形较好。因而,最终确定向流动相中添加5 mmol·L<sup>-1</sup>碳酸氢铵。在确定了色谱柱类型、流动相种类、添加剂种类的基础上,对洗脱梯度进行优化,以期使各物质在色谱条件下实现更好的分离。

本研究为异环磷酰胺原料药提供一种高效、简便的异环磷酰胺主成分及有关物质的测定方法,可有效实现主成分与杂质G、杂质E的定量分析,为企业提高产品质量、提升产品的综合竞争力、改进生产提供参考。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 路海滨,米浩宇,祁昕欣,等. 异环磷酰胺的合成[J]. 中国医药工业杂志, 2009, 40(7): 483-485.  
Lu H B, Mi H Y, Qi X X, et al. Synthesis of ifosfamide [J]. Chin J Pharm, 2009, 40(7): 483-485.
- [2] 衣淑珍. 异环磷酰胺林临床研究进展 [A]//2006 第六届中国药学会学术年会论文集 [C]. 广州: 中国药学会, 2006: 494-496.
- [3] Yi S Z. Clinical research progress of ifosfamide forest [A]// Proceedings of the 6th Annual Conference of Chinese Pharmaceutical Association in 2006 [C]. Guangzhou: Chinese Pharmaceutical Association, 2006.
- [3] 孙燕. 异环磷酰胺临床研究进展 [J]. 癌症, 1992, 11(3): 181-183, 191.  
Sun Y. Progress in clinical research of ifosfamide [J]. Chin J Cancer, 1992, 11(3): 181-183, 191.
- [4] 雷锦璟. 药物中有关物质检测方法的研究进展及应用 [J]. 中国化工贸易, 2017, 9(32): 134.  
Lei J J. Research progress and application of detection methods for related substances in drugs [J]. China Chem Trade, 2017, 9(32): 134.
- [5] 宋更申, 韩学静, 刘红莉. 顶空气相色谱法测定异环磷酰胺中多种有机溶剂残留量 [J]. 中国药业, 2009, 18(23): 21-22.  
Song G S, Han X J, Liu H L. Determination of residual organic solvents in ifosfamide by headspace gas chromatography [J]. China Pharm, 2009, 18(23): 21-22.
- [6] European Pharmacopoeia 10.5 [S]. 2022.
- [7] USP [S]. 2016.
- [8] 中国药典 [S]. 二部. 2020.  
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume II. 2020.

[责任编辑 兰新新]