

气相色谱法测定异环磷酰胺原料药中3种有关物质

李辉辉¹, 王洪森^{1,2}, 曹 蕾³, 刘钦伟¹, 王 辰³, 杨 春¹, 戚利强¹, 闫占宽^{1,2*}

1. 江苏原创药物研发有限公司, 江苏 连云港 222000

2. 江苏恒瑞医药股份有限公司, 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 建立气相色谱(GC)法测定异环磷酰胺原料药中3种有关物质(起始物料3-氨基丙醇、杂质D和杂质F)。方法 采用HP-55% Phenyl Methyl Siloxane 色谱柱(30 m×320 μm, 0.25 μm); 采用程序升温的方式, 起始柱温50℃, 保持2 min后以每分钟5℃的速率升温至180℃, 再以每分钟20℃的速率升温至260℃; 进样口温度为380℃; 检测器温度为380℃; 分流比5:1。结果 起始物料峰、杂质D、杂质F与周围峰分离度分别为2.6、3.0、1.6; 异环磷酰胺起始物料3-氨基丙醇在39.80~199.0 μg·mL⁻¹线性关系良好($r=0.999\ 1$), 杂质D在39.48~197.4 μg·mL⁻¹线性关系良好($r=0.999\ 1$), 杂质F在2.000~20.000 μg·mL⁻¹线性关系良好($r=0.999\ 9$); 3-氨基丙醇和杂质D的检测限分别为9.95、9.87 μg·mL⁻¹, 杂质F因色谱柱柱效降低且进样量过大未能进行检测限测定; 3-氨基丙醇、杂质D、杂质F的定量限分别为19.90、19.74、2.000 μg·mL⁻¹; 起始物料、杂质D和杂质F回收率均在90.09%~115.90%, 回收率RSD分别为4.8%、7.2%、2.3%。结论 该方法的专属性、精密度、线性关系良好, 准确可靠, 符合异环磷酰胺中3种有关物质的检测要求。

关键词: 异环磷酰胺; 有关物质; 起始物料; 气相色谱法; 方法学验证

中图分类号: R932 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2023)12-2540-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.12.007

Determination of three related substances in ifosfamide by gas chromatography

LI Huihui¹, WANG Hongsen^{1,2}, CAO Lei³, LIU Qinwei¹, WANG Chen³, YANG Chun¹, QI Liqiang¹, YAN Zhankuan^{1,2}

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

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

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

Abstract: **Objective** A gas chromatographic (GC) method was established for the determination of related substances (starting material 3-aminopropanol, impurity D and impurity F) in isocyclophosphamide API. **Methods** HP-5 5 % Phenyl Methyl Siloxane Column (30 m × 320 μm, 0.25 μm) was used. The column temperature was programmed to start at 50℃, held for 2 min and then ramped up to 180℃ at a rate of 5℃ per minute and then to 260℃ at a rate of 20℃ per minute; the inlet temperature was 380℃; the detector temperature was 380℃; and the split ratio was 5 : 1. **Results** Under the chromatographic conditions, three related substances in isocyclophosphamide API could be detected and the methodology was verified. The separation between the peak of the starting material and the surrounding peaks was 2.6, the separation between impurity D and the surrounding peaks was 3.0, and the separation between impurity F and the surrounding peaks was 1.6, with good separation effects all greater than 1.5. Starting materials, 3-aminopropanol, had a good linear relationship in the range of 39.80—199.0 μg·mL⁻¹ ($r = 0.999\ 1$). Impurity D had a good linear relationship in the range of 39.48—197.4 μg·mL⁻¹ ($r = 0.999\ 1$). Impurity F had a good linear relationship in the range of 2.000—20.00 μg·mL⁻¹ ($r = 0.999\ 9$). The limits of detection (LODs) for 3-aminopropanol and impurity D were 9.95 and 9.87 μg·mL⁻¹, respectively, while the LOD for impurity F was not determined due to the reduced column efficiency and the large injection volume;

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《药物仪器分析》建设项目; 连云港市政策引导产学研项目(CYX2202)

第一作者: 李辉辉(1984—), 工程师。E-mail: huihui.li@hengrui.com

*通信作者: 闫占宽(1975—), 男, 高级工程师, 主要研究方向为药物质量控制。E-mail: yzk0426@163.com

the limits of quantification (LOQs) for 3-aminopropanol, impurity D, and impurity F were 19.90, 19.74, and 2.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. The recovery rates of starting materials, impurity D and impurity F should be in the range of 80%-120%, and the recovery rate RSD should be less than 10%. **Conclusion** The method is characterised by good specificity, precision, linearity, accuracy and reliability, and is able to meet the requirements for the determination of the three substances of interest in isocyclophosphamide.

Key words: ifosfamide; related substances; starting materials; gas chromatography; methodological validation

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, 是环磷酰胺的结构类似物, 常作为各种癌症治疗的单一药物或联合化疗的一部分^[1-2], 于60年代中期首次在德国合成, 70年代发现异环磷酰胺与其他烷化剂有交叉耐药性, 1988年被FDA批准进入临床^[3-4]。异环磷酰胺经体内肝酶(细胞色素P450氧化酶系)的激活转化为有细胞毒性的代谢物, 由于这些高毒性代谢物的形成, 进行治疗药物监测非常必要^[5-7], 目前在异环磷酰胺血药浓度监测及药动学的研究中可采用高效液相色谱法(HPLC)实现^[8-10]血浆中异环磷酰胺的测定。另一方面, 在原料药生产中可能会带入一些有关物质, 如起始原料、中间体、副产物和异构体等, 这类物质可能降低药物疗效或影响药物的稳定性, 甚至威胁人体健康或引起其他不良反应。因此, 对异环磷酰胺有关物质进行检测, 以控制药物质量、提升产品的竞争力, 具有至关重要的意义。合理可靠的检测手段是有效控制药物有关物质的关键因素之一, 针对异环磷酰胺原料药中起始物料3-氨基丙醇、杂质D和杂质F, 本研究建立了一种气相色谱法同时检测异环磷酰胺原料药中3种有关物质。

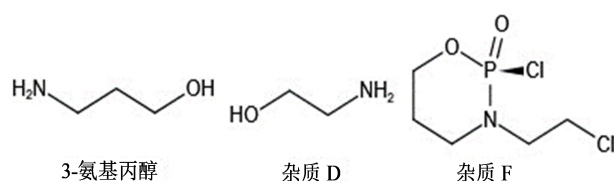


图1 3-氨基丙醇、杂质D、杂质F的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of 3-aminopropanol, impurity D, impurity F

1 仪器与试药

1.1 试验仪器

Agilent 气相色谱仪-FID检测器(Agilent Technologies); AL104型十万分之一电子天平(Mettler Toledo)。

1.2 试药用药及试剂

3-氨基丙醇对照品(麦克林试剂公司, 批号A106069, 质量分数99.5%); 杂质D对照品(加拿大TLC公司, 批号I-067011, 质量分数94.5%); 杂质F对照品(欧洲药品质量管理局, 批号I0060012, 质量分数100%); 异环磷酰胺原料药(江苏恒瑞医药有限公司, 批号为TRI282106-1501、TRI282106-1502、TRI282106-1503); 甲醇(HPLC级, 上海麦克林生化科技有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用HP-55%Phenyl Methyl Siloxane (30 m $\times$ 320 μm , 0.25 μm)色谱柱, 检测器:FID氢火焰离子化检测器; 体积流量2 mL $\cdot\text{min}^{-1}$; 进样体积1 μL ; 运行时间36 min; 起始柱温50 $^{\circ}\text{C}$, 保持2 min后以每分钟5 $^{\circ}\text{C}$ 的速率升温至180 $^{\circ}\text{C}$, 再以20 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速率升温至260 $^{\circ}\text{C}$; 进样口温度为380 $^{\circ}\text{C}$; 检测器温度为380 $^{\circ}\text{C}$; 分流比5:1。

2.2 溶液的配制

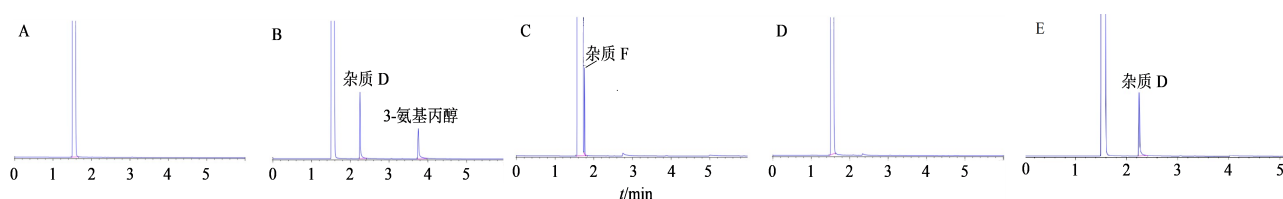
2.2.1 对照品溶液 取3-氨基丙醇对照品、杂质D对照品各约0.1 g, 精密称定, 分别置于10 mL量瓶中, 加甲醇溶解定容至刻度, 摇匀, 制得3-氨基丙醇约10 mg $\cdot\text{mL}^{-1}$ 、杂质D约10 mg $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品储备液; 取杂质F对照品约10 mg, 精密称定, 置于10 mL量瓶中, 加甲醇溶解定容至刻度, 摇匀, 制得杂质F约1 mg $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品储备液。

精密量取0.1 mL 3-氨基丙醇对照品储备液、杂质D对照品储备液、杂质F对照品储备液, 分别置于10 mL量瓶中, 加甲醇稀释定容至刻度, 摇匀, 制得3-氨基丙醇0.1 mg $\cdot\text{mL}^{-1}$ 、杂质D约0.1 mg $\cdot\text{mL}^{-1}$ 、杂质F约0.01 mg $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。

2.2.2 混合对照品溶液 精密量取0.1 mL 3-氨基丙醇对照品储备液、杂质D对照品储备液、杂质F对照品储备液, 置于同一10 mL量瓶中, 加甲醇稀释定容至刻度, 摇匀, 制得3-氨基丙醇0.1 mg $\cdot\text{mL}^{-1}$ 、杂质D约0.1 mg $\cdot\text{mL}^{-1}$ 、杂质F约0.01 mg $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液 取异环磷酰胺(批号为TRI282106-1501)约1.0 g,精密称定,置于10 mL量瓶中,加甲醇溶解定容至刻度,摇匀,制得异环磷酰胺约 $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的供试品溶液。

2.2.4 加标供试品溶液 取异环磷酰胺样品(批号TRI282106-1502)约1.0 g,精密称定,置于10 mL量瓶中,加甲醇溶解定容至刻度;再精密量取杂质D对照品储备液0.1 mL,用甲醇稀释定容至刻度,混匀,制得杂质D约 $100 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的加标供试品溶液(杂质D质量分数约为主成分标示量的0.1%)。



A: 空白溶液; B: 3-氨基丙醇(3.754 min)和杂质D(2.249 min)对照品溶液; C: 杂质F(1.761 min)对照品溶液; D: 供试品溶液; E: 杂质D加标供试品

A: blank solution; B: 3-aminopropanol (3.754 min) and impurity D (2.249 min) reference solution; C: impurity F (1.761 min) reference solution; D: test solution; E: impurity D added to the test sample

图2 系统适用性图谱

Fig. 2 System applicability map

2.3.2 检测限及定量限 用含3-氨基丙醇、杂质D、杂质F的适当浓度的对照品溶液,取信噪比分别为 $S/N \geq 3$ 和 $S/N \geq 10$ 时的进样量作为检测限和定量限。3-氨基丙醇和杂质D的检测限分别为 9.95 、 $9.87 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,杂质F因色谱柱柱效降低且进样量过大未能进行检测限测定;3-氨基丙醇、杂质D、杂质F的定量限分别为 19.90 、 19.74 、 $2.000 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.3.3 线性关系及范围 结合原料药样品的杂质限度为0.1%,3-氨基丙醇、杂质D、杂质F对照品储备液逐级稀释配制成线性溶液,精密量取以上线性溶液 $1 \text{ } \mu\text{L}$,分别注入气相色谱仪,色谱条件如“2.2”项,记录峰面积,以峰面积为Y轴,各组分质量浓度为X轴绘制线性曲线,结果表明3-氨基丙醇线性范围为 $39.80 \sim 199.0 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (相当于供试品溶液的 $0.04\% \sim 0.2\%$),杂质D线性范围为 $39.48 \sim 197.4 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (相当于供试品溶液的 $0.04\% \sim 0.2\%$),杂质F线性范围为 $2.000 \sim 20.000 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (相当于供试品溶液的 $0.002\% \sim 0.02\%$),呈现良好的线性关系,结果见表1。

2.3.4 精密度 因色谱柱柱效因素,将3-氨基丙醇、杂质F的100%加标空白溶液和杂质D 100%加标供试品溶液分别注入气相色谱仪进行检测,重复进样6次,结果显示3-氨基丙醇的峰面积RSD

2.3 方法学考察

2.3.1 系统适用性 取上述混合对照品溶液、供试品溶液及空白溶液(甲醇)各 $1 \text{ } \mu\text{L}$,注入气相色谱仪,记录色谱图,见图2。空白溶液不干扰3-氨基丙醇、杂质D、杂质F的出峰时间。在该色谱条件下,杂质D的保留时间为 2.249 min ,3-氨基丙醇的保留时间为 3.754 min ,杂质F的保留时间为 1.761 min ,起始物料峰与周围峰分离度为 2.6 ,杂质D与周围峰分离度为 3.0 ,杂质F与周围峰分离度为 1.6 ,与溶剂峰无干扰,且与周围峰的分离度良好。

表1 3-氨基丙醇、杂质D、杂质F线性数据

Table 1 Linear data of 3-aminopropanol, impurity D, and impurity F

成分	线性范围/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	线性回归方程	r
3-氨基丙醇	$39.80 \sim 199.00$	$Y = 3.1581X - 108.55$	0.999 1
杂质D	$39.48 \sim 197.40$	$Y = 3.5951X - 45.912$	0.999 1
杂质F	$2 \sim 20$	$Y = 18.7620X + 5.4378$	0.999 9

为 7.4% ,杂质D峰面积的RSD为 7.0% ,杂质F峰面积的RSD为 7.9% ,表明该方法的精密度良好。

2.3.5 准确度 考虑色谱柱柱效,将3-氨基丙醇、杂质F的100%加标空白溶液和杂质D 100%加标供试品溶液分别注入气相色谱仪进行准确度试验,平行重复6次,测定每份溶液中3种有关物质的浓度,计算回收率及RSD。结果显示3-氨基丙醇、杂质D、杂质F的回收率均在 $90.09\% \sim 115.90\%$ 内,回收率RSD分别为 4.8% 、 7.2% 、 2.3% 。

2.3.6 溶液稳定性 取3-氨基丙醇、杂质D对照品溶液在室温下放置 0 、 1 、 3 、 4 、 9 h ,杂质F对照品溶液放置 0 、 1 、 3 、 4 、 8 h 的溶液进样分析,3-氨基丙醇、杂质D、杂质F的RSD为 8.8% 、 11.1% 、 6.3% ,氨基丙醇、杂质D溶液在 9 h 内、杂质F溶液在 8 h 内保持稳定。

2.4 样品测定结果

取3批异环磷酰胺原料药进行测定,结果详见表2。

表2 3批样品中3-氨基丙醇、杂质D、杂质F含量测定结果
Table 2 Results of determination of 3-aminopropanol, impurity D and impurity F in 3 batches of samples

批次	峰面积			质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		
	杂质D	3-氨基丙醇	杂质F	杂质D	3-氨基丙醇	杂质F
TRI2821	7.15	/	/	14.76	/	/
06-1501	5.54	/	/	14.31	/	/
	6.03	/	/	14.45	/	/
均值	6.24	/	/	14.51		
TRI2821	8.32	/	/	15.08	/	/
06-1502	7.53	/	/	14.87	/	/
	3.80	/	/	13.83	/	/
均值	6.55	/	/	14.59	/	/
TRI2821	8.35	/	/	15.09	/	/
06-1503	6.68	/	/	14.63	/	/
	7.34	/	/	14.81	/	/
均值	7.46	/	/	14.84	/	/

3 讨论

3.1 色谱条件优化

本实验对不同的色谱条件进行摸索,考察了4根不同极性色谱柱 DB-WAX (30 m $\times$ 0.53 mm, 0.25 μm)、DB-624 (30 m $\times$ 0.32 mm, 1.8 μm)、CP-Volamine (60 m $\times$ 0.25 mm, 0.45 μm)、HP-5 5% Phenyl Methyl Siloxane (30 m $\times$ 320 μm , 0.25 μm)对3-氨基丙醇、杂质D、杂质F的分离效果,最终选择HP-5色谱柱对3种物质进行分离。同时,通过不断调整升温程序,经过3种程序升温条件摸索,方法1:起始柱温80 $^{\circ}\text{C}$,保持1 min后以每分钟5 $^{\circ}\text{C}$ 的速率升温至160 $^{\circ}\text{C}$,保持2 min后以10 $^{\circ}\text{C}$ 升温至210 $^{\circ}\text{C}$,保持5 min。此方法异环磷酰胺保留时间在溶剂峰之后,3-氨基丙醇、杂质D、杂质F没有响应。方法2:起始柱温50 $^{\circ}\text{C}$,保持3 min后以每分钟5 $^{\circ}\text{C}$ 的速率升温至160 $^{\circ}\text{C}$,保持1 min后以20 $^{\circ}\text{C}$ 升温至250 $^{\circ}\text{C}$,保持5 min。此方法3-氨基丙醇、杂质D、杂质F响应低。最终确定了程序升温条件:起始柱温50 $^{\circ}\text{C}$,保持2 min后以每分钟5 $^{\circ}\text{C}$ 的速率升温至180 $^{\circ}\text{C}$,再以每分钟20 $^{\circ}\text{C}$ 的速率升温至260 $^{\circ}\text{C}$,使得3种有关物质在该色谱条件下,色谱峰分离良好,系统适用性良好。

3.2 注意事项

由于异环磷酰胺原料药中3-氨基丙醇、杂质D和杂质F在FID检测器下响应较小,故拟定方法中确定的供试品浓度较大,重复进样后易损伤色谱柱,导致柱效明显降低,出峰异常(峰高明显降低,无法实现待测物的准确积分)。因此,色谱柱使用前需充分老化。建议在实际生产检验工作中,增加异环磷酰胺原料药中3-氨基丙醇、杂质D和杂质F混合对照品溶液测定,确定出峰正常后再继续进行样品测定。

本研究成功地基于气相色谱法建立了一种同时检测异环磷酰胺原料药中3种有关物质的分析方法,该方法具有选择性好、灵敏度高、进样量少、分析速度快等特点,可为后续异环磷酰胺质量标准的提高、提升核心竞争力提供理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Kaijser G P, Beijnen J H, Bult A, et al. Gas chromatographic determination of ifosfamide in microvolumes of urine and plasma [J]. J Chromatogr B, 1991, 571(1/2): 121-131.
- [2] Stone J H, Merkel P A, Spiera R, et al. Rituximab versus cyclophosphamide for ANCA-associated vasculitis [J]. N Engl J Med, 2010, 363(3): 221-232.
- [3] Sr L P J. The history of ifosfamide [J]. Semin Oncol, 1992, 19(6 Suppl 12): 2-6.
- [4] 彭浩. 异环磷酰胺 [J]. 中国新药杂志, 1997, 6(1): 73.
Peng H. Ifosfamide [J]. Chin J New Drugs, 1997, 6(1): 73.
- [5] 施畅, 廖明阳. 环磷酰胺与异环磷酰胺在体内的代谢特点分析 [J]. 解放军药学学报, 2001, 17(2): 92-94.
Shi C, Liao M Y. Analysis of metabolic characteristics of cyclophosphamide and ifosfamide *in vivo* [J]. Pharm J Chin People's Liberation Army, 2001, 17(2): 92-94.
- [6] 杨凤艳. 环磷酰胺与异环磷酰胺在体内的代谢研究 [J]. 化学工程师, 2019, 33(12): 51-53.
Yang F Y. Study on the metabolism of cyclophosphamide and ifosfamide *in vivo* [J]. Chem Eng, 2019, 33(12): 51-53.
- [7] 施畅. 环磷酰胺与异环磷酰胺致肝毒作用机理探讨 [D]. 北京: 解放军军事医学科学院, 2000.
Shi C. Mechanism of hepatotoxicity caused by cyclophosphamide and ifosfamide [D]. Beijing: PLA Academy of Military Medical Sciences, 2000.
- [8] 王巨存, 冯亦颖, 朱铁梁. 高效液相色谱法测定人血清

- [责任编辑 兰新新]

.....

•公益广告•

