GC-MS 法测定磷酸芦可替尼中的基因毒性杂质

赵星星[1]，卢红华[1*]，杜雨禾[2]，刘纪法[1]，李付庭[1]，郝贵周[1*]
（1. 鲁南制药集团股份有限公司，国家手性制药工程技术研究中心，山东临沂 273400；2. 济宁医学院，山东济宁 272000）

摘要：建立了 GC-MS 法测定磷酸芦可替尼（**1**）中潜在的遗传毒性杂质环戊基甲醛（**2**）、乙基磷酸二乙酯（**3**）、氰甲基磷酸二乙酯（**4**）。采用 ZB-624plus 毛细管柱（0.25 mm×30 m×1.4 μm），以多反应离子监测（MRM）模式进行测定。结果显示，**2**、**3** 和 **4** 质量浓度在 30 ～ 180 ng/mL 时线性关系良好，定量限分别为 14.67、14.95 和 14.75 ng/mL，平均回收率分别为 99.63%、103.73%和 102.60%，为 **1** 的质量控制研究提供了参考。

关键词：气相色谱 - 质谱；磷酸芦可替尼；抗肿瘤药；环戊基甲醛；乙基磷酸二乙酯；氰甲基磷酸二乙酯
中图分类号：R917；R979.1^{+}9　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2025)06-0803-03
引用：赵星星，卢红华，杜雨禾，等．GC-MS 法测定磷酸芦可替尼中的基因毒性杂质［J］．中国医药工业杂志，2025, 56(6)：803-805．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2025.06.014

Determination of the Genotoxic Impurities in Ruxolitinib Phosphate by GC-MS

ZHAO Xingxing[1], LU Honghua[1*], DU Yuhe[2], LIU Jifa[1], LI Futing[1], HAO Guizhou[1*]
(*1. National Chiral Pharmaceuticals Engineering and Technology Research Center, Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi 273400; 2. Jining Medical University, Jining 272000*)

ABSTRACT: A GC-MS method was established for the determination of the potential genotoxic substances such as cyclopentanecarbaldehyde(**2**), diethyl ethylphosphonate(**3**) and 2-diethoxyphosphorylacetonitrile(**4**) in ruxolitinib phosphate(**1**). The ZB-624plus capillary column(0.25 mm×30m×1.4 μm) was used, and the measurement was performed in multi reaction monitoring(MRM) mode. The results showed that it was linear for **2** – **4** in the range of 30 – 180 ng/mL. The limits of quantification for **2** – **4** were 14.67, 14.95 and 14.75 ng/mL, respectively, and the recoveries were 99.63%, 103.73% and 102.60%, respectively, which provided a reference for the quality control of **1**.

Key Words: GC-MS; ruxolitinib phosphate; antineoplastics; cyclopentanecarbaldehyde; diethyl ethylphosphonate; 2-diethoxyphosphorylacetonitrile

磷酸芦可替尼（ruxolitinib phosphate，**1**）是由美国 Incyte 公司研发，于 2011 年经 FDA 批准上市，2012 年和 2014 年先后获得 EMA 和日本药品和医疗器械综合管理局批准上市，2017 年在国内获批上市[1]。**1** 是一种针对骨髓纤维化发病机制的靶向治疗药，通过阻断 JAK-STAT 信号通路来达到控制疾病的目的[2]。

1 由（*R*）-3- 环戊基丙腈、7*H*- 吡咯并［2,3-*d*］-嘧啶、1*H*- 吡唑 3 个模块构成。其中，（*R*）-3- 环戊基丙腈含有 **1** 的唯一手性构型，是合成中的关键步骤。（*R*）-3- 环戊基丙腈以环戊基甲醛（**2**）和乙基磷酸二乙酯（**3**）为起始原料[3]，合成过程中还可能会产生副产物氰甲基磷酸二乙酯（**4**）。三者均具有遗传毒性杂质的警示结构[4]，且目前尚未有文献报道其检测方法。根据 ICH M7 指南规定，对于无毒理学研究数据的杂质，基于毒性学关注阈值（threshold of toxicological concern，TTC）计算的终生可接受

收稿日期：2024-08-15
作者简介：赵星星（1984—），女，副高级工程师，从事药物新剂型与质量研究工作。
通信作者：卢红华（1986—），女，工程师，从事药物质量分析工作。E-mail：landourlhh@163.com
郝贵周（1977—），男，高级工程师，从事药物新技术与新剂型研究。E-mail：haoguizhou@lunan.cn

摄入量为 1.5 μg/d[5]。根据 **1** 的最大日用量 50 mg，计算得 **2**、**3**、**4** 的限度均为 30×10^{-6}。本研究采用 GC-MS 法检测 **1** 中的 **2**、**3**、**4** 的含量，以期为 **1** 的质量控制研究提供参考。

1　仪器与试药

7890B-7000D 型气相色谱质谱仪（美国 Agilent 公司）；MS205DU 型电子分析天平（瑞士 Mettler 公司）。

2 对照品（上海迈瑞尔生化科技有限公司，含量 98.1%，批号 M10044631）；**3** 对照品（上海阿拉丁生化科技股份有限公司，含量 97.8%，批号 H2229704）；**4** 对照品（上海毕得医药科技股份有限公司，含量 98.8%，批号 EPU587）；**1**（山东新时代药业有限公司，含量 99.8%、100.1%、99.7%，批号 230301、230302、230303）；甲醇（德国 Merck 公司，含量 99.9%，批号 I1246107247）。

2　方法与结果

2.1　色谱及质谱条件

色谱条件：色谱柱 ZB-624plus 毛细管柱（0.25 mm×30 m×1.4 μm），以 6%氰丙基苯基 -94% 二甲基硅氧烷为固定液；柱温 初始柱温 80 ℃，以 20 ℃ /min 升温至 280 ℃，保持 4 min；进样口温度 300 ℃；载气 氦气；柱流速 1.0 mL/min；分流比 1 ∶ 1；进样量 1 μL。

质谱条件：离子源 电子轰击（electron impact，EI）离子源；监测模式 多反应离子监测（multiple reaction monitoring，MRM）模式定量分析；离子源电压 －70 eV；离子源温度 230 ℃；四极杆温度 150 ℃；接口温度 270 ℃；监测离子对 *m*/*z* 69→*m*/*z* 41（**2**）；*m*/*z* 139→*m*/*z* 111（**3**）；*m*/*z* 109→*m*/*z* 91（**4**）。

2.2　溶液配制

空白溶剂：甲醇。

对照品贮备液：取 **2**、**3**、**4** 对照品各 30 mg，精密称定，置同一 20 mL 量瓶中，用甲醇溶解并定容，摇匀，即得对照品贮备液。

对照品溶液：取对照品贮备液适量，用甲醇稀释成含 **2**、**3**、**4** 各 0.15 μg/mL 的溶液。

供试品溶液：精密称取 **1**（批号 230301）50 mg，置 10 mL 量瓶中，用甲醇溶解并定容，摇匀，即得。

2.3　专属性试验

取“**2.2**”项下空白溶剂、对照品溶液和供试品溶液，按“**2.1**”项下条件进样测定，记录色谱图。结果如图 1 所示，**2**、**3**、**4** 的保留时间分别为 5.0、7.2、9.1 min，各组分间均能较好分离；空白溶剂对待测组分无干扰。

2.4　线性试验

取含 **2**、**3**、**4** 各 1.5 μg/mL 的对照品溶液，作为线性贮备液。精密量取线性贮备液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL，分别置 10 mL 量瓶中，用甲醇定容，摇匀，作为线性系列标准溶液。取上述线性系列标准溶液，按“**2.1**”项下条件进样测定，记录色谱图。以各组分的质量浓度 *c* 为横坐标、峰面积 *A* 为纵坐标进行线性回归，所得回归方程为 **2** 为 A=1 957.9c－7 387.2，R=0.999 5；**3** 为 A=126.54c－272.66，R=0.999 2；**4** 为 A=90.523c－122.81，R=0.998 8。结果表明，**2**、**3**、**4** 在质量浓度 30 ～ 180 ng/mL 时线性关系良好。

2.5　回收率试验

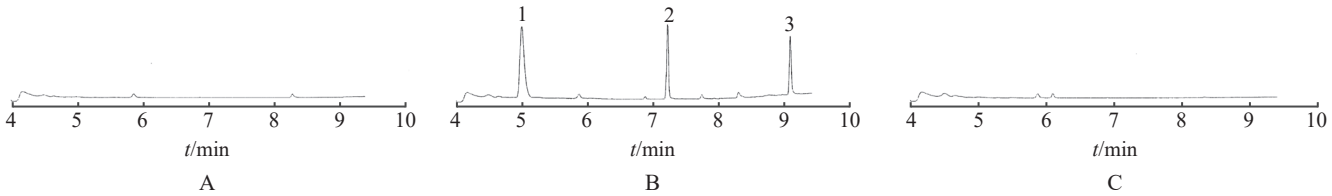
精密称取 **1**（批号 230301）50 mg，共 3 份，各置 10 mL 量瓶中，分别加入线性贮备液 0.8、1.0、1.2 mL，用甲醇溶解并定容，摇匀，每个浓度制备 3 份，作为 80%～ 120%回收率试验溶液。取上述回收率试验溶液和“**2.2**”项下的对照品溶液、供试品溶液，按“**2.1**”项下条件进样测定，记录各组分的峰面积。结果显示，**2**、**3**、**4** 的平均回收率（n=9）分别为 99.63%、103.73%、102.60%，RSD 分别为 3.58%、3.20%、3.02%，方法准确度高。

2.6　定量限与检测限

取对照品溶液逐级稀释，分别以信噪比 *S*/*N* 为 10 和 3 时的溶液作为定量限溶液与检测限溶液。取上述定量限溶液，按“**2.1**”项下条件进样测定，重复测定 6 次，**2**、**3**、**4** 峰面积的 RSD（n=6）分别为 1.52%、2.32%、2.51%，表明本法灵敏度高。计算得定量限浓度分别为 14.67、14.95、14.75 ng/mL；检测限浓度分别为 4.40、3.74、3.69 ng/mL。

2.7　稳定性试验

取“**2.2**”项下的对照品溶液与供试品溶液，分



A—空白溶剂；B—对照品溶液（1—**2**；2—**3**；3—**4**。）；C—供试品溶液。

图 1 典型色谱图

Fig.1 Typical Chromatograms

别于室温放置 0、2、4、6、8、10、12 h 时取样，按“**2.1**”项下条件进样测定。结果显示，12 h 内 **2**、**3**、**4** 峰面积的 RSD（n=6）均小于 10%，保留时间的 RSD（n=6）均小于 2%，表明对照品溶液与供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.8 样品测定

取 3 批 **1** 样品，按“**2.2**”项下方法配制对照品溶液与供试品溶液，按“**2.1**”项下条件进样测定，按外标法以峰面积计算。结果显示，3 批样品中均未检出 **2**、**3**、**4**。

3 讨论

本研究曾尝试采用气相色谱法测定 **1** 中的 **2**、**3**、**4**，但响应值太低，无法满足检测要求。采用气相色谱 - 质谱联用法，以 MRM 模式测定，选择各待测组分响应值最大的碎片离子对进行定量分析。因 **3**、**4** 的沸点较高，不宜采用顶空进样方式，因此选用直接进样方式测定。对线性浓度范围、精密度、回收率、定量限与检测限、溶液稳定性的验证结果显示，本法的准确性好、灵敏度高，溶液稳定性好，可用于 **1** 中 **2**、**3**、**4** 的检测。受试的 3 批样品中均未检出 **2**、**3**、**4**，表明生产工艺过程中对以上组分清除较彻底。实际生产中，应根据样品中杂质的检测情况评估是否需要将其订入质量标准。

参考文献：

[1] 孙光祥，朱怡君，金生华，等．一种 JAK 抑制剂关键中间体及其制备方法：中国，113264936B［P］．2021-05-25.

[2] ALMURAIKHI N, ALI D, ALSHANWANI A, *et al*. Stem cell library screen identified ruxolitinib as regulator of osteoblastic differentiation of human skeletal stem cells［J］. *Stem Cell Res Ther*, 2018, **9**(1): 319.

[3] 姚 凯，杨朝福，杨晓宇，等．磷酸芦可替尼合成路线图解［J］．中国药物化学杂志，2023, **33**(1): 74-78.

[4] 马 磊，马玉楠，陈 震，等．遗传毒性杂质的警示结构［J］．中国新药杂志，2014, **23**(18): 6.

[5] International Conference on Harmonization．Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk［EB/OL］．(2020-03-23)［2024-06-01］．https://www．ema．europa．eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use_en-0．pdf.