

LC-MS/MS 测定富马酸伏诺拉生制剂中基因毒性杂质 N- 亚硝基伏诺拉生残留量

LCMSMS-1053

摘要： 本文使用岛津三重四极杆液质联用仪建立了富马酸伏诺拉生制剂中基因毒性杂质 N- 亚硝基伏诺拉生测定的方法。实验结果表明，在 0.03-0.2 ng/mL 浓度范围内，线性良好，相关系数 R 为 0.9995，曲线各浓度点准确度在 96.3%-101.4% 之间。0.05 ng/mL 浓度对照品溶液，连续进样 6 次，保留时间和峰面积的相对标准偏差 (RSD%) 分别是 0.16% 和 2.75%。25、50 和 100 ng/g 三个不同浓度加标回收率在 93.3%-96.7% 之间，平行三份样品的相对标准偏差 (RSD%) 在 2.3%-3.3% 之间。该方法简单，稳定，准确，可供相关从业人员参考。

关键词： 三重四极杆液质联用仪 富马酸伏诺拉生 N- 亚硝基伏诺拉生

技术特点：

- ❖ 本方法定量限小于 5 ng/g，灵敏度高，可用于微量检测。
- ❖ 样品溶解、过膜后直接进样，无需额外前处理，操作简单。

N- 亚硝基化合物是公认的强致癌物和致突变物。即使微量长期暴露，也可能通过损伤 DNA 增加患癌风险。药品的首要目标是治疗疾病，而非引入新的健康风险。严格控制此类高风险杂质是制药行业对患者健康负责的最基本要求和道德底线。

富马酸伏诺拉生是一种创新性的钾离子竞争性酸阻滞剂，主要用于治疗与胃酸分泌过多相关的疾病。N- 亚硝基伏诺拉生可能在生产过程中（如使用亚硝化试剂）或储存过程中（仲胺结构与亚硝酸盐杂

质反应）产生。伏诺拉生分子结构中含有仲胺基团，这是形成亚硝胺的风险结构。N- 亚硝基伏诺拉生属于强基因毒性致癌物，必须严格控制在极低水平（ ≤ 75 ppm，基于最大日剂量 20 mg 和 AI=1.5 $\mu\text{g}/\text{day}$ ）。

本文采用岛津三重四极杆液质联用仪，建立了一种富马酸伏诺拉生制剂中的 N- 亚硝基伏诺拉生测定的方法，该方法简单，稳定，灵敏度高，回收率高，供相关检测人员参考。

实验部分

1.1 仪器

系统控制器：	CBM-40lite	脱气机：	DGU-405
输液泵：	LC-40B XR	自动进样器：	SIL-40C XR
柱温箱：	CTO-40S	色谱工作站：	LabSolutions Ver. 5.118
质谱检测器：	LCMS-8045	PDA 检测器：	SPD-M30A

1.2 分析条件

液相色谱条件：

色谱柱：	Shim-pack FC-ODS (2.1 mm I.D. \times 150 mm L., 2 μm)	P/N:	228-40511-95, SGLC
流动相：	A 相 -0.1% 甲酸水; B 相 - 乙腈		
流速：	0.3 mL/min	进样体积：	10 μL
柱温：	40 $^{\circ}\text{C}$	进样器温度：	15 $^{\circ}\text{C}$
洗脱方式：	梯度洗脱，B 相初始浓度为 40%，时间程序见表 1。		

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
2.00	Pumps	Pump B Conc.	40
4.00	Column Oven	CTO.RVR	1
5.00	Pumps	Pump B Conc.	95
6.00	Pumps	Pump B Conc.	95
6.10	Pumps	Pump B Conc.	40
6.50	Column Oven	CTO.RVR	0
10.00	Controller	Stop	

注：* CTO.RVR 为色谱柱后流路切换阀指令，Value 值为“1”时流路与质谱相连，Value 值为“0”时流路与废液管相连。

质谱条件：

离子源：	ESI (+)	加热模块温度：	400℃
接口电压：	调谐文件	接口温度：	300℃
雾化气流速：	3.0 L/min	碰撞气：	氦气
加热气流速：	10.0 L/min	扫描模式：	多反应监测 (MRM)
干燥气流速：	10.0 L/min	MRM 参数：	见表 2
D L 温度：	250℃		

表 2 MRM 参数

No.	化合物名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bais (V)	CE(V)	Q3 Pre Bais (V)
1	N- 亚硝基伏诺拉生	375.0	315.0*	-12.0	-12.0	-21.0
			173.0	-26.0	-30.0	-30.0
			146.0	-26.0	-50.0	-26.0

注：* 表示定量离子

1.3 标准品及样品制备

储备液：精密称取 N- 亚硝基伏诺拉生对照品 10 mg，用 50% 乙腈溶液定容至 100 mL 容量瓶中，制得 N- 亚硝基二甲胺储备液。

校准工作曲线：准确移取储备液适量，用 50% 乙腈溶液稀释，配制成 0.03 ng/mL、0.05 ng/mL、0.1 ng/mL、0.15 ng/mL、0.18 ng/mL、0.2 ng/mL 的标准系列工作液。

供试品溶液：取富马酸伏诺拉生制剂 100 mg，置 50 mL 容量瓶中，加 50% 乙腈溶液溶解并稀释至刻度，摇匀，0.22 μm 滤膜过滤后待测。

■ 结果讨论

2.1 色谱图

串联 PDA 检测器和质谱检测器，观察富马酸伏诺拉生主成分的出峰时间，发现其出峰在 3.5 min 之前。为降低主成分对质谱检测器的污染，将 4 min 之前流路切废液，4 min 后进质谱，具体切阀命令见表 1。

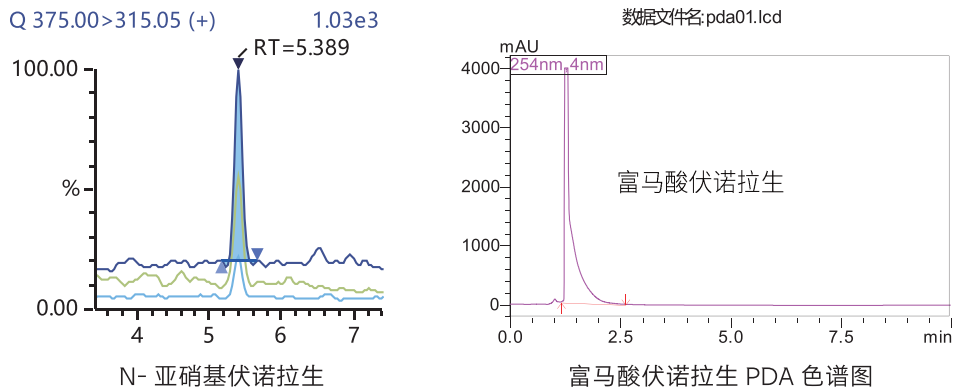


图1 标准品溶液 MRM 色谱图 (0.05 ng/mL, 左图), 富马酸伏诺拉生 PDA 色谱图 (右图)

2.2 校准曲线、重复性结果

按照 1.3 制备标准系列工作溶液, 使用外标法拟合工作曲线, 校准曲线见图 2。0.05 ng/mL 浓度对照品溶液, 连续进样 6 次, 考察保留时间和峰面积的重复性。线性范围、各浓度点线性回归的准确度、相关系数、重复性等结果见表 3。曲线各标点准确度在 96.3%-101.4%, 线性相关系数 R 为 0.9995。保留时间和峰面积的相对标准偏差 (RSD%) 分别是 0.16% 和 2.75%, 方法精密度良好。

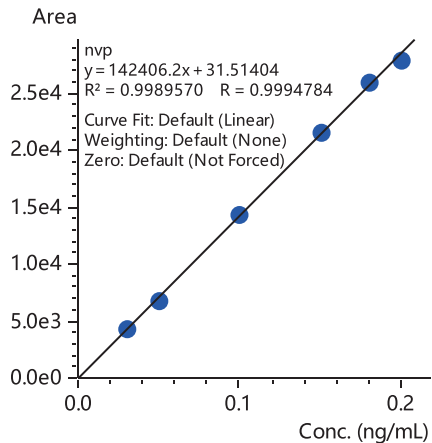


图2 校准曲线

表3 校准曲线、重复性结果

No.	化合物名称	线性范围 (ng/mL)	准确度 (%)	相关系数 R	RSD% (0.05 ng/mL)	
					R.T.	Area
1	N- 亚硝基伏诺拉生	0.03-0.2	96.3-101.4	0.9995	0.16	2.75

2.3 加标回收率及重复性考察

取富马酸伏诺拉生制剂, 对样品进行低、中、高三个浓度水平加标回收率考察。每个浓度平行制备三份样品, 进行重复性考察。低、中、高三个加标浓度分别为 25、50 和 100 ng/g。三水平加标回收率及重复性结果见表 4。

表 4 回收率结果 (n=3)

No.	名称	25 ng/g		50 ng/g		100 ng/g	
		回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)
1	N-亚硝基伏诺拉生	93.3	2.6	95.1	2.3	96.7	3.3

■ 结论

本文使用岛津三重四极杆液质联用仪 LCMS-8045 建立了富马酸伏诺拉生制剂中基因毒性杂质 N-亚硝基伏诺拉生测定的方法。在 0.03-0.2 ng/mL 浓度范围内, 线性良好, 线性相关系数 R 为 0.9995。对样品进行 25、50 和 100 ng/g 三个浓度加标回收实验, 回收率在 93.3%-96.7% 之间。该方法灵敏度高, 定量准确度高, 前处理简便, 适用于富马酸伏诺拉生制剂中基因毒性杂质 N-亚硝基伏诺拉生的检测。

岛津应用云

