

# 本土化SCIEX QTRAP®系统分析伏诺拉生制剂中亚硝胺类基因毒性杂质

## Analysis of Nitrosamines of Genotoxic Impurities in Vonoprazan Drug by Yellow River SCIEX 4500 QTRAP® Systems

江汉鹏, 龙志敏, 郭立海

Hanpeng Jiang, Zhimin Long, Lihai Guo

SCIEX应用支持中心, 中国

**Key word:** nitrosamines, Vonoprazan, SCIEX QTRAP®, Genotoxic Impurities, Yellow River SCIEX 4500

### 前言

基因毒性杂质 (genotoxic impurities, GTI) 又称遗传毒性杂质, 是指化合物本身能直接或间接损伤细胞DNA, 产生基因突变或体内诱变, 具有致癌可能或者倾向。亚硝胺类物质在体内中通过被代谢首先会变成重氮甲烷进而生成甲基正离子——一种活泼的烷基化试剂。该离子均可与DNA发生甲基化反应生成甲基化的DNA, 激活细胞癌变通路的表达, 导致癌变。目前的研究表面, 原料药工艺中若含有二甲基甲酰胺 (DMF) 或者二甲胺则可能生成亚硝胺类基因毒杂质。

伏诺拉生是一款质量反流性食管炎的处方药, 该药物结构如图1A, 该药物在做药品申报时发现了一种亚硝胺类基因毒性杂质 (NPV), NPV的结构如图1B所示, 该杂质为药物生产过程中副反应带来。对于该类杂质的含量限度, 法规有明确标准, 每日摄入量应不超过48 ng, 而伏诺拉生片每日摄入量为20 mg, 所以NPV杂质限度应为每毫克伏诺拉生中含量必须小于2.4 ng (2.4 ng/mg伏诺拉生)。

本文开发并验证了一种分析伏诺拉生片中基因毒杂质NPV的方法, 该方法灵敏度高、重复性好、基质干扰小, 前处理简单, 可准确的测定该药物中的NPV杂质含量。并且结合SCIEX QTRAP®系统, 利用离子阱功能, 同时定性定量分析, 发现新的可能杂质。使用SCIEX OS软件数据处理, 软件支持GxP和21 CFR Part 11合规, 安全设置的配置, 电子签名和审计追踪, 可定制化的安全管理和终端-终端的审计追踪。

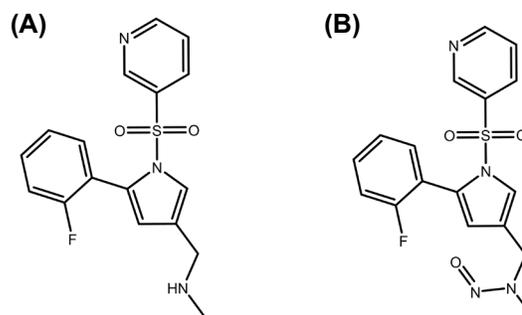


图1. 伏诺拉生 (A) 和基因毒杂质NPV (B) 的化学结构

### 方法特点

1. 通本文开发并验证了一种分析伏诺拉生片中基因毒杂质NPV的方法, 可准确的测定该药物中痕量的NPV杂质含量。
2. 使用SCIEX QTRAP®系统, 利用离子阱功能同时定性定量分析, 发现新的可能杂质。

### 样品及试剂

NPV标准品对照品和富马酸伏诺拉生原料药

### 样品前处理

实验所用稀释剂为50%乙腈水溶液 (ACN/H<sub>2</sub>O, 1/1, v/v)。NPV标准品对照品使用稀释剂配置和稀释后可直接进样分析。富

马酸伏诺拉生原料药也使用以上稀释剂溶解，每20 mg原料药加入20 mL稀释剂，完全溶解后使用0.22  $\mu\text{m}$ 滤膜过滤，收集滤液即可进样分析。并配置0.1 (0.1 ng/mg伏诺拉生)，1 (1 ng/mg伏诺拉生)和10 ng/mL (10 ng/mg伏诺拉生)的样本加标样品。

## 仪器设备

ExionLC™ 系统和Yellow River SCIEX 4500 系统



### 液相条件:

色谱柱: Waters HSS T3 (100 mm  $\times$  2.1 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ )

柱温: 40  $^{\circ}\text{C}$

进样体积: 2  $\mu\text{L}$

流动相: A为水 (含0.1%甲酸, v/v), B为甲醇

流速: 0.3 mL/min

梯度如下: 见表1

表1. 方法色谱分离梯度

Time [min]	A.Conc [%]	B.Conc [%]
0.00	20.0	20.0
7.00	50.0	50.0
11.00	5.0	95.0
12.50	5.0	95.0
12.60	80.0	20.0
15.00	80.0	20.0

### 质谱条件

离子源: ESI源; POS模式;

扫描方式: MRM和MRM-IDA-EPI

离子源参数:

IS电压: 5500 V;

雾化气GS1: 65 psi;

离子源温度为400  $^{\circ}\text{C}$ ;

气帘气CUR: 35 psi;

辅助气GS2: 55 psi;

碰撞气: Medium (使用MRM-IDA-EPI时为HIGH)

MRM参数如表2所示 (\*: 定量离子对, NPV为基毒杂质, Vonoprazan为原料药)

MRM参数如表2所示 (\*: 定量离子对, NPV为基毒杂质, Vonoprazan为原料药)

表2. NPV的MRM参数

ID	Q1	Q3	DP	CE
NPV-1*	375.2	315.1	52	16
NPV-2	375.2	173.1	52	36
Vonoprazan-1	346.0	315.1	140	20
Vonoprazan-2	346.0	173.1	140	40

### 数据处理及数据分析

使用Analyst软件采集数据, SCIEX OS软件对采集的数据进行分析。

## 实验结果与讨论

### 1. 富马酸伏诺拉生原料药NPV杂质的分析及方法验证

以NPV标准对照品建立分析方法。NPV在0.01 ng/mL至100 ng/mL的浓度区间内, 线性良好,  $r^2 > 0.999$ 。标曲点数据如表3所示准确度在95%至104%之间, 准确度好。各浓度色谱图, 标曲和线性及标曲最低浓度0.01ng/mL 6次提取离子色谱图如图2所示。

如表4所示, 三个低浓度0.01ng/mL, 0.025 ng/mL和0.05 ng/mL下重复6次RSD均小于2.6%。

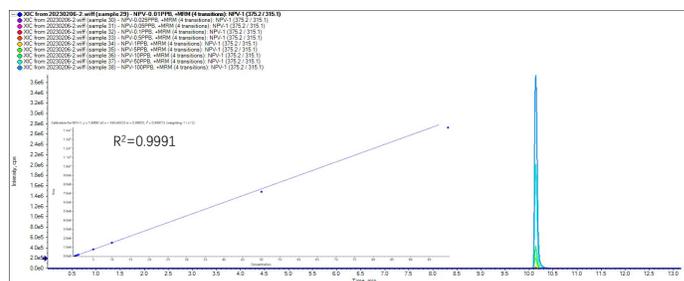


图2. NPV的色谱图和标准曲线

表3. 标曲点准确度

	Actual Concentration	Area	Calculated Concentration	Accuracy
NPV-0.01ng/mL	0.01	2.06E+03	0.01	99.59
NPV-0.025ng/mL	0.025	4.27E+03	0.0247	98.86
NPV-0.05ng/mL	0.05	8.29E+03	0.0515	103
NPV-0.1ng/mL	0.1	1.59E+04	0.102	102.02
NPV-0.5ng/mL	0.5	7.64E+04	0.506	101.19
NPV-1ng/mL	1	1.56E+05	1.0361	103.61
NPV-5ng/mL	5	7.52E+05	5.0113	100.23
NPV-10ng/mL	10	1.50E+06	10.0245	100.25
NPV-50ng/mL	50	7.18E+06	47.8447	95.69
NPV-100ng/mL	100	1.43E+07	95.564	95.56

表4. 低浓度点重复性和准确度

Standard Concentration (ng/mL)	Measured Concentration (n=6)	Accuracy (%)	RSD (% Peak area, n=6)
0.01	0.0105 ± 0.0004	105.0	2.6
0.025	0.0266 ± 0.0006	106.4	2.0
0.05	0.0484 ± 0.0013	96.8	2.5

之后，将所建立的方法应用于富马酸伏诺拉生原料药的检测。0.1 (0.1 ng/mg伏诺拉生), 1 (1 ng/mg伏诺拉生) 和10ng/mL (10 ng/mg伏诺拉生) 的样本加标样品的基质效应在91.8%至98.9%之间，回收率在91.6%至97.1%之间，重复性RSD在0.4%至2.8%之间，表明基质干扰小，重复性好，可以应用于实际样本的检测。最后发现该原料药中含有该基因毒杂质，遂对该浓度做了定量分析，其浓度为 $0.5928 \pm 0.0097$  ng/mL，既1.19ng/mg伏诺拉生，并未超标。相关色谱图如图3所示。

表4. 加标样本回收率

Spiked Concentration(ng/mL)	Peak Area (Standard)	Peak Areas (Sample)	Peak Areas (Spiked sample)	Matrix effects (%)	Recovery (%)	RSD (% n=3)
0.1 (0.1 ng/mg Vonoprazan)	15870	88160	104200	98.9	97.1	2.8
1 (1 ng/mg Vonoprazan)	152800	88230	230000	92.8	95.2	1.2
10 (10 ng/mg Vonoprazan)	1504000	89130	1470000	91.8	91.6	0.4

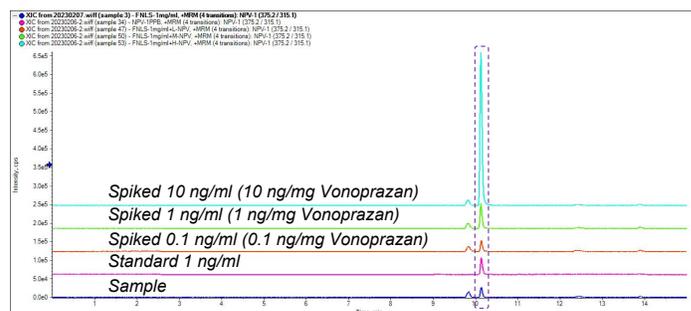


图3. 标准品，富马酸伏诺拉生原料药，各浓度加标样本提取离子色谱图

## 2. MRM-IDA-EPI分析

如图3所示，在实际样本中除了NPV的峰之外，相同的离子通道下，还出现了另外一个杂质峰，由于其检测参数和NPV相同，则怀疑该样本中还存在一种亚硝胺类基因毒杂质，于是使用MRM-IDA-EPI方法分析了另外一个峰，结果如图4所示。红色为标准对照品，蓝色为富马酸伏诺拉生原料药实际样本。检测MRM离子对为375.2>315.1，通过对比MS/MS普通发现10.1分钟的峰即为NPV的峰，而9.8min的图谱与NPV标准对照不一致，但是图谱相似，可能是NPV的结构相似化合物，于是对其二级普通进行了分析，并推导出了可能的杂质结构。

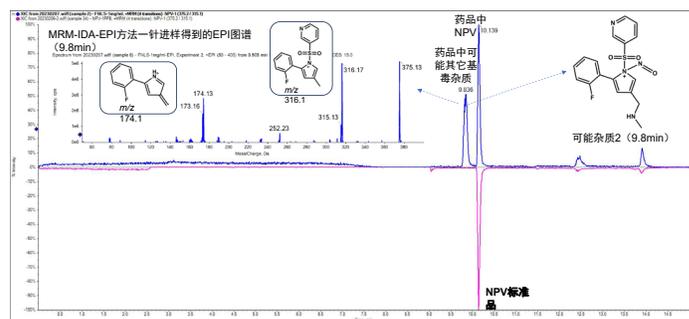


图4. MRM-IDA-EPI分析结果解析

## 符合法规要求的SCIEX OS软件

SCIEX OS软件是一个封闭系统，记录和签名以电子方式存储，符合21 CFR Part 11中列出的法规要求。SCIEX OS软件可以通过指定的处理工作站，从封闭网络内的任何可见存储位置打开原始数据文件。图5展示了SCIEX OS软件的特点，用于监控审计跟踪、执行采集、处理数据和配置用户访问。审计跟踪功能使用户能够监控高风险事件并评估数据完整性。中央管理员控制台(CAC)功能允许用户将采集和处理集中在一个平台上，以提高实验室的效率。使用配置模块，用户可以分配角色和访问管理员、方法开发人员、分析师和审核员。

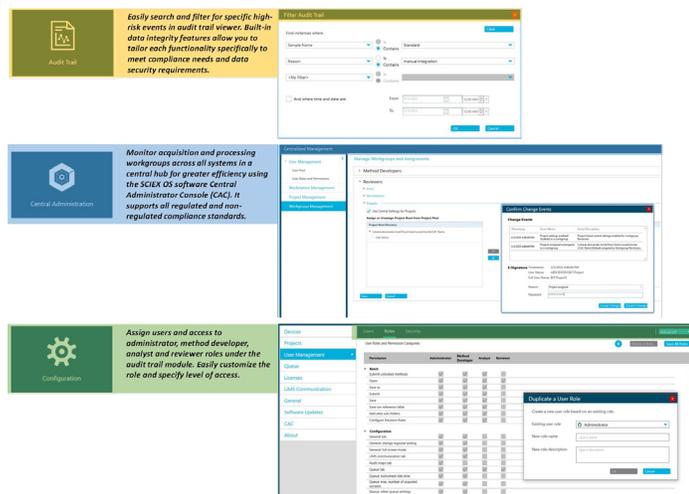


图5. SCIEX OS软件可用于监控审计跟踪、执行采集、处理数据和配置用户访问

## 结论

本文开发并验证了一种分析伏诺拉生片中基因毒杂志NPV的方法，可准确的测定该药物中的NPV杂质含量。并且结合SCIEX QTRAP®系统，利用离子阱功能，发现新的可能杂质。

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2024 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. MKT-32051-A



### SCIEX中国

北京分公司  
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院  
1号楼5层  
电话: 010-5808-1388  
传真: 010-5808-1390  
全国咨询电话: 800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心  
上海市长宁区福泉北路518号  
1座502室  
电话: 021-2419-7201  
传真: 021-2419-7333  
官网: [sciex.com.cn](http://sciex.com.cn)

广州办公室  
广州国际生物岛星岛环北路1号  
B2栋501、502单元  
电话: 020-8842-4017

官方微信: [SCIEX-China](https://www.sciex.com.cn)