UPLC-MS/MS 法测定富马酸伏诺拉生片中 4 种潜在致突变杂质

吕　波[1,2]，王梓成[1,2]，马军霞[3]*，李　姮[1]*

（1. 连云港市食品药品检验检测中心，江苏连云港 222000；2. 江苏省食品药品监督检验研究院，国家药监局化学药品杂质谱研究重点实验室，江苏南京 210019；3. 正大天晴药业集团股份有限公司，江苏连云港 222062）

摘要：建立了 UPLC-MS/MS 法同时测定富马酸伏诺拉生片中的 4 种潜在致突变杂质，即 1-[5-(2- 氟苯基)-1-(吡啶 -3- 磺酰基)-1*H*- 吡咯 -3- 基]-*N*- 甲基亚硝酰胺、3-[[2-(2- 氟苯基)-4-[(甲胺基)甲基]-1*H*- 吡咯 -1- 基]磺酰基]吡啶 -1- 氧化物、*N*-[[5-(2- 氟苯基)-1-(吡啶 -3- 磺酰基)-1*H*- 吡咯 -3- 基]甲烯基]甲胺氧化物与 *N*-[[5-(2- 氟苯基)-1-(吡啶 -3- 磺酰基)-1*H*- 吡咯 -3- 基]甲基]-*N*- 甲基羟胺。采用 Waters ACQUITY UPLC Peptide BEH C_{18} 柱（2.1 mm×150 mm，1.7 μm），以 0.1% 甲酸溶液为流动相 A，乙腈为流动相 B，梯度洗脱。采用电喷雾电离源，正离子模式，多反应监测模式。结果显示，4 种杂质分别在 0.13 ～ 3.89、1.94 ～ 58.07、1.77 ～ 53.25、1.83 ～ 54.99 ng/mL 范围内线性关系良好，检测限分别为 0.08、0.08、0.04、0.37 ng/mL，平均回收率分别为 97.9%、96.2%、102.6%、96.6%。该法准确、灵敏、便捷，可为富马酸伏诺拉生原料药与片剂的制备工艺研究和质量控制提供参考。

关键词：富马酸伏诺拉生片；潜在致突变杂质；反流性食管炎；超高效液相色谱 - 串联质谱

中图分类号：R917；R975^{+}.2　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2026)03-0337-06

引用：吕　波, 王梓成, 马军霞, 等. UPLC-MS/MS法测定富马酸伏诺拉生片中4种潜在致突变杂质[J]. 中国医药工业杂志, 2026, **57**(3): 337-342. DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2026.03.011

Determination of Four Potential Mutagenic Impurities in Vonoprazan Fumarate Tablets by UPLC-MS/MS

LYU Bo[1,2], WANG Zicheng[1,2], MA Junxia[3]*, LI Heng[1]*

(*1. Lianyungang Food and Drug Inspection and Testing Center, Lianyungang 222000; 2. NMPA Key Lab. of Chemical Impurity Spectrum Research, Jiangsu Institute for Food and Drug Control, Nanjing 210019; 3. ChiaTai Tianqing Pharmaceutical Group Co., Ltd., Lianyungang 222062*)

ABSTRACT: A UPLC-MS/MS method was established for the simultaneous determination of four potential mutagenic impurities in vonoprazan fumarate tablets, namely 1-[5-(2-fluorophenyl)-1-(pyridine-3-sulfonyl)-1*H*-pyrrol-3-yl]-*N*-methylnitrosamine, 3-[[2-(2-fluorophenyl)-4-[(methylamino)methyl]-1*H*-pyrrol-1-yl]sulfonyl]pyridine-1-oxide, *N*-[[5-(2-fluorophenyl)-1-(pyridine-3-sulfonyl)-1*H*-pyrrol-3-yl]methylene]methylamine oxide, and *N*-[[5-(2-fluorophenyl)-1-(pyridine-3-sulfonyl)-1*H*-pyrrol-3-yl]methyl]-*N*-methylhydroxylamine. A Waters ACQUITY UPLC Peptide BEH C_{18} column (2.1 mm×150 mm, 1.7 μm) was used with 0.1% formic acid solution as mobile phase A and acetonitrile as mobile phase B for gradient elution. An electrospray ionization source was employed in the positive ion mode with multiple reaction monitoring. The results demonstrated that the four impurities showed good linearity in the concentration ranges of 0.13 – 3.89, 1.94 – 58.07, 1.77 – 53.25 and 1.83 – 54.99 ng/mL, respectively. The LODs were determined to be 0.08, 0.08, 0.04 and 0.37 ng/mL, and the average recoveries were 97.9%, 96.2%, 102.6% and 96.6%, respectively. The established method is accurate, sensitive and convenient, and can provide a reference for the preparation process development and quality control of vonoprazan fumarate raw material and tablets.

Key Words: vonoprazan fumarate tablet; potential mutagenic impurity; reflux esophagitis; UPLC-MS/MS

富马酸伏诺拉生（vonoprazan fumarate，**1**）片由日本武田制药研发，于2014年在日本上市，是新型钾离子竞争性酸阻滞剂的代表性药物，主要用于治疗反流性食管炎[1-2]，2024年国内销售额近10亿元。国家药品监督管理局药品审评中心官网显示：**1**申请文号（含补充申请）达240多个，涉及企业81家（其中过评企业仅9家）。潜在致突变杂质研究不足是药品申报过程中的常见发补问题之一[3]。

亚硝胺类杂质为公认的强致癌物，某些氮氧化物的结构被列为基因毒性警示结构。**1**结构含有仲胺、吡啶及吡咯结构，须重点关注与药物结构相关的亚硝胺杂质[4]（如*N*-亚硝胺-伏诺拉生，*N*-nitroso-vonoprazan，杂质A）、吡啶氮氧化物杂质、吡咯氮氧化物杂质（该类杂质产生概率低，且经LC-MS全扫描未检测到相应的*m*/*z*数据，故本文不做研究）。结合本品的氧化位点及反应机制，也须关注甲胺与羟胺的氮氧化物杂质。鉴于此，本文拟研究与**1**的结构相关亚硝胺杂质、吡啶氮氧化物、甲胺氮氧化物、羟胺氮氧化物，即1-[5-(2-氟苯基)-1-(吡啶-3-磺酰基)-1*H*-吡咯-3-基]-*N*-甲基亚硝酰胺（杂质A）、3-[[2-(2-氟苯基)-4-[(甲胺基)甲基]-1*H*-吡咯-1-基]磺酰基]吡啶-1-氧化物（杂质B）、*N*-[[5-(2-氟苯基)-1-(吡啶-3-磺酰基)-1*H*-吡咯-3-基]甲烯基]甲胺氧化物（杂质C）与*N*-[[5-(2-氟苯基)-1-(吡啶-3-磺酰基)-1*H*-吡咯-3-基]甲基]-*N*-甲基羟胺（杂质D）。上述4种潜在致突变杂质的化学结构如图1所示。目前，**1**的质量研究主要集中于有关物质[5-6]、含量[7]、元素杂质[8]及潜在致突变杂质[9-10]的测定。有专利[11]报道采用LC-MS/MS方法测定**1**中的杂质A，但尚未见检测杂质B～D的报道。

2024年9月，FDA官网公布杂质A的可接受摄入量为96 ng/d。杂质B～D均为3类潜在致突变杂质，限度可参照ICH M7《基因毒性杂质》指导原则中的毒理学关注阈值（threshold of toxicological concern，TTC）1.5 μg/d计算。**1**片的最大日剂量为40 mg（以伏诺拉生计），则杂质A的限度设为2.4×10^{-6}，杂质B、杂质C与杂质D限度均设为37.5×10^{-6}时，可满足质控要求。本研究建立了UPLC-MS/MS法同时检测**1**片中4种潜在致突变杂质，以期为**1**原料药与片剂的制备工艺研究和质量控制提供参考。

1　仪器与试药

LCMS-8050型三重四极杆液相色谱-质谱联用仪，配备SPD-40型紫外检测器（日本岛津公司）；XPR36DR型百万分之一电子分析天平（美国Mettler Toledo公司）；IQ 7000型超纯水仪（德国Milli-Q公司）。

1片［企业A，规格10 mg（批号221113401、221113501、221113601），规格20 mg（批号221203101、221203201、221203301）；企业B，规格10 mg（批号20231110、20231111、20231112），规格20 mg（批号20231034、20231035、20231036）；企业C，规格10 mg（批号20240201、20240202、20240203），规格20 mg（批号20240101、20240102、20240103）］；杂质A对照品（深圳市恒丰万达医药科技有限公司，含量99.9%，批号20230601）；杂质B、杂质C与杂质D的对照品（深圳菲斯生物科技有限公司，含量分别为98.26%、99.10%、94.78%，其中杂质B对照品实为吡啶氮氧化物富马酸盐，折算系数0.756 9，批号分别为23-07-1106、18-07-0651、24-05-2803）；片剂混合辅料（企业A，批号Z-FFN22505029）；乙腈、甲醇、甲酸为色谱纯，水为超纯水。

2　方法与结果

2.1　色谱及质谱条件

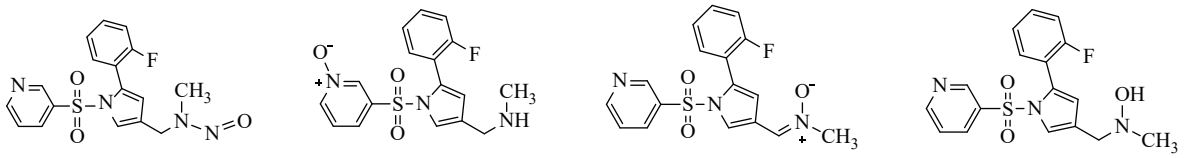
2.1.1　色谱条件

色谱柱　Waters ACQUITY UPLC Peptide BEH C_{18}柱（2.1 mm×150 mm，1.7 μm）；流动相A为0.1%甲酸溶液，B为乙腈，梯度洗脱（0—4 min，A 80%；4—9 min，A 80%—15%；9—11 min，A 15%；11—11.1 min，A 15%—80%；11.1—15 min，A 80%）；流速0.4 mL/min；柱温40 ℃；样品盘温度5 ℃；进样量1 μL。

2.1.2　质谱条件

离子源　电喷雾电离源，正离子模式，多反应监

收稿日期：2025-04-06
作者简介：吕　波，高级工程师，从事药物分析、药品检验检测工作。
通信作者：马军霞，工程师，从事药物质量保证工作。
李　姮，主任药师，从事药物分析、药品检验检测工作。



杂质A　杂质B　杂质C　杂质D

图 1　杂质 A ～ D 的化学结构

Fig.1 Chemical Structures of Impurities A－D

测；接口电压 4.0 kV。其他参数如表 1 所示。（注：0—2 和 4—6.4 min 阶段，六通阀切入废液，不进质谱，其余时间进质谱。）

表 1　UPLC-MS/MS 的 MRM 模式参数

Tab.1 MRM Parameters of UPLC-MS/MS

名称	母离子（*m*/*z*）	子离子（*m*/*z*）	碰撞能量 / eV
杂质 A	375.1	315.1	11
杂质 B	362.1	173.1	32
杂质 C	360.1	68.0	46
杂质 D	362.1	173.1	32

2.2　溶液配制

空白溶剂：50%乙腈溶液。

空白辅料溶液：取片剂混合辅料约 210 mg，精密称定，置 20 mL 量瓶中，加空白溶剂适量，边超声边振摇 10 min，放冷，用空白溶剂定容，摇匀，离心（11 840×*g*）10 min，取上清液，即得。

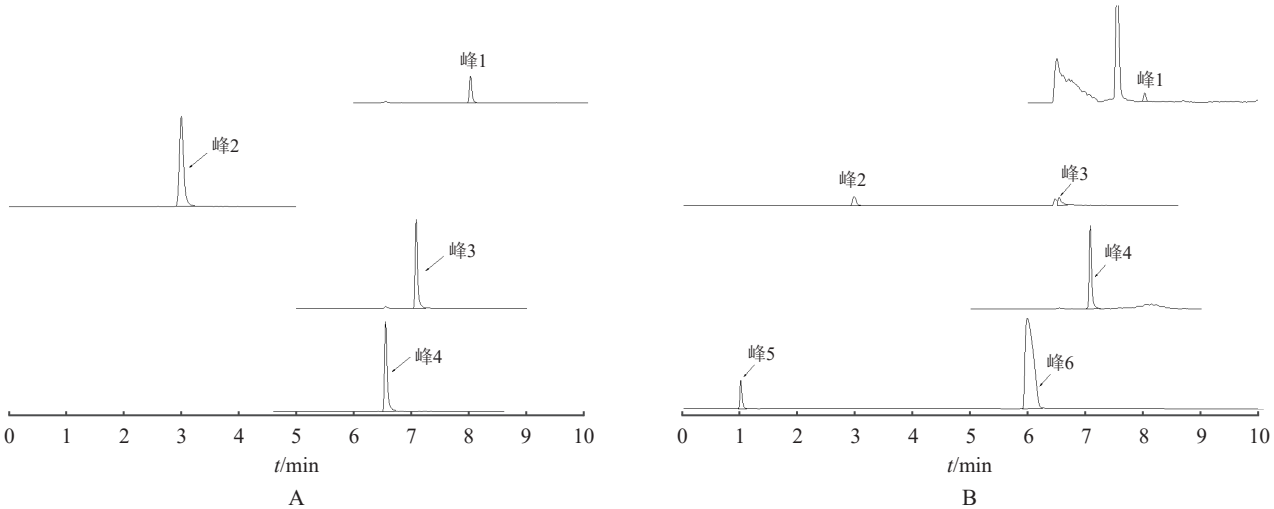
对照品溶液：分别取杂质 A、杂质 B、杂质 C 与杂质 D 对照品适量，精密称定，加空白溶剂溶解并定量稀释制成每 1 mL 中约含杂质 A 2.4 ng、杂质 B 37.5 ng、杂质 C 37.5 ng 与杂质 D 37.5 ng 的混合溶液。

供试品溶液：取本品 1 片（20 mg 规格）或 2 片（10 mg 规格），置 20 mL 量瓶中，加空白溶剂适量，自“边超声边振摇 10 min”步骤起，照上述“空白辅料溶液”配制方法操作，即得。

2.3　方法学验证

2.3.1　专属性试验

取“**2.2**”项下空白溶剂、空白辅料溶液、对照品溶液和供试品溶液，分别按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样测定，结果如图 2 所示。空白溶剂与空白



A—对照品溶液（峰 1—杂质 A；峰 2—杂质 B；峰 3—杂质 C；峰 4—杂质 D）；

B—供试品溶液（峰 1—杂质 A；峰 2—杂质 B；峰 3—杂质 D；峰 4—杂质 C；峰 5—溶剂 + 富马酸；峰 6—伏诺拉生）。

图 2　典型色谱图

Fig.2 Typical Chromatograms

辅料均不干扰样品测定（色谱图留存编辑部）。在对照品溶液色谱图中，杂质 B 与杂质 D 依次出峰，分离良好，其余杂质分离良好。检测供试品溶液时，在检测波长 254 nm 条件下的结果显示，溶剂与伏诺拉生分别在 1.0 与 6.0 min 出峰；通过紫外检测器后，六通阀在 0—2 和 4—6.4 min 阶段切入废液，不进质谱，其余时间进质谱，可避免溶剂、辅料以及主成分对杂质测定的影响。

2.3.2 定量限与检测限试验

取“**2.2**”项下对照品溶液，用空白溶剂逐步稀释，按“**2.1**”项下条件测定。以信噪比为 8 ～ 12 与 2 ～ 4 分别计算 LOQ 与 LOD。结果如表 2 所示。

2.3.3 线性试验

取“**2.2**”项下对照品溶液，用空白溶剂稀释制成系列质量浓度的混合线性溶液。按“**2.1**”项下色谱质谱条件测定。以各组分峰面积（*A*）为纵坐标、各杂质质量浓度（*c*）为横坐标进行线性回归。结果如表 2 所示，在考察范围内，各杂质的质量浓度与峰面积线性关系良好。

2.3.4 精密度试验

2.3.4.1 进样精密度试验

按“**2.2**”项下方法配制 1 份对照品溶液，连续进样 6 针，记录色谱图，以峰面积计算 RSD。结果表明，杂质 A、杂质 B、杂质 C 和杂质 D 的进样精密度分别为 2.4％、3.5％、1.6％和 1.8％（*n*=6）。

2.3.4.2 重复性试验

取同一批样品，按“**2.2**”项下方法配制 6 份供试品溶液，按“**2.1**”项下色谱质谱条件依次测定。结果表明，杂质 A、杂质 B、杂质 C 和杂质 D 的平均含量分别为 0.9×10^{-6}、1.0×10^{-6}、2.7×10^{-6} 和 3.8×10^{-6}，RSD 分别为 4.0％、3.8％、4.3％和 3.9％。

2.3.5 准确度试验

取同一批样品，按限度浓度的 10％、100％、150％，分别加入一定量对照品溶液，每个水平设置 3 份，按“**2.1**”项下色谱质谱条件测定，计算回收率。结果如表 3 所示。

2.3.6 待测溶液稳定性

按“**2.2**”项下方法分别配制对照品溶液与供试品溶液各 1 份，于 5 ℃放置，分别在 0、2、4、6、8、10 和 12 h 时取样，按“**2.1**”项下色谱质谱条件测定，计算各组分峰面积的 RSD。结果显示，对照品溶液中杂质 A、杂质 B、杂质 C 和杂质 D 的 RSD 分别为 5.0％、7.4％、4.5％和 4.7％；供试品溶液分别为 4.4％、2.5％、3.8％和 5.1％。

2.4 样品测定

对 3 个厂家 2 个规格 18 批 **1** 片样品进行检测，按“**2.2**”项下方法分别配制供试品溶液（平行配制 2 份，每份进 1 针），按“**2.1**”项下色谱质谱条件测定。结果如表 4 所示。

表 2　4 种杂质的线性试验、定量限与检测限结果

Tab.2　Results of Linearity Test, LOQ and LOD

名称	线性范围 /(ng·mL^{-1})	线性方程	相关系数	LOQ/(ng·mL^{-1})	LOD/(ng·mL^{-1})
杂质 A	0.13 ～ 3.89	A=4.656 4×10^6c+2.013 1×10^2	0.999 9	0.13	0.08
杂质 B	1.94 ～ 58.07	A=7.834 5×10^6c+3.061 1×10^3	0.999 9	0.19	0.08
杂质 C	1.77 ～ 53.25	A=7.534 5×10^6c+9.496 7×10^2	1.000 0	0.07	0.04
杂质 D	1.83 ～ 54.99	A=1.112 8×10^6c − 1.339 3×10^2	0.999 9	1.10	0.37

表 3　4 种杂质的回收率结果

Tab.3　Recovery Results of Four Impurities

名称	回收率 /%			平均回收率 /%（*n*=9）	RSD/%（*n*=9）
	10%限度	100%限度	150%限度		
杂质 A	97.4 ～ 105.7	89.6 ～ 94.7	97.1 ～ 103.8	97.9	4.8
杂质 B	95.5 ～ 99.8	95.9 ～ 101.0	91.3 ～ 94.7	96.2	3.2
杂质 C	100.6 ～ 109.0	104.3 ～ 105.5	95.2 ～ 99.9	102.6	4.5
杂质 D	98.6 ～ 107.3	90.7 ～ 96.4	90.5 ～ 94.3	96.6	6.1

表 4 样品测定结果

Tab.4 Sample test results

厂家	规格 /mg	批号	杂质 A/×10^{-6}	杂质 B/×10^{-6}	杂质 C/×10^{-6}	杂质 D/×10^{-6}
企业 A	10	221113401	0.6	0.8	2.8	4.9
		221113501	0.6	1.1	3.1	5.4
		221113601	0.6	0.9	3.0	6.8
	20	221203101	1.1	0.9	3.0	5.4
		221203201	0.9	1.0	2.7	3.8
		221203301	0.9	1.0	3.1	4.3
企业 B	10	20231110	2.2	1.4	3.1	5.5
		20231111	1.9	1.4	2.6	5.0
		20231112	1.6	1.4	2.9	5.6
	20	20231034	2.7	1.5	2.6	6.7
		20231035	2.9	1.5	2.7	5.8
		20231036	3.1	1.4	2.7	5.4
企业 C	10	20240201	0.8	0.7	3.0	4.1
		20240202	0.9	0.9	5.5	4.9
		20240203	0.8	0.7	3.9	3.2
	20	20240101	1.1	1.0	5.2	5.7
		20240102	1.2	0.9	4.9	4.5
		20240103	0.7	0.9	4.7	5.4

3 讨论

3.1 测定条件的优化与确定

流动相 B 若采用甲醇，基线噪声与采用乙腈时基本一致，但各杂质的响应降低，且伏诺拉生与杂质 D 会同时出峰，干扰测定。因此，流动相 B 选择乙腈。优化流动相梯度洗脱程序时考察了流动相 A 和 B 初始体积比为 50 ∶ 50 和 75 ∶ 25 的方案，但观察到溶剂峰或辅料峰与杂质 B 同时出峰的现象，而采用 80 ∶ 20 的初始比例，溶剂或辅料峰不干扰杂质 B 的测定。

曾考察 4 种溶剂（20%乙腈溶液、50%甲醇溶液、75%乙腈溶液和 50%乙腈溶液）对溶剂效应的影响。结果显示：采用 20%乙腈溶液和 50%甲醇溶液时无溶剂效应（各杂质峰形良好），但基质效应明显（杂质 A 的回收率分别约为 25%和 36%）；采用 75%乙腈溶液，进样 1 μL，杂质 B 出现峰分叉；采用 50%乙腈溶液，进样 2 μL，杂质 B 也出现峰分叉，但进样 1 μL 时无溶剂效应，且供试品溶液质量浓度为 2 mg/mL 时杂质 A 的回收率约 90%。因此，在确保灵敏度的前提下，将供试品质量浓度降至 1 mg/mL，可减弱基质效应，有利于提高回收率。

考察了 3 种色谱柱：色谱柱 1，Waters XSelect Peptide CSH C_{18} 柱（4.6 mm×150 mm，3.5 μm）；色谱柱 2，Thermol Hypersil GOLD VANQUISH C_{18} 柱（2.1 mm×100 mm，1.9 μm）；色谱柱 3，Waters ACQUITY UPLC Peptide BEH C_{18} 柱（2.1 mm×150 mm，1.7 μm）。结果显示，采用色谱柱 1 时各组分分离良好，但杂质 B 峰分叉；此外，同一份供试品溶液，连续进样 6 次，杂质 C 峰面积的 RSD 为 16.6%。色谱柱 1 使用的色谱填料为带电杂化颗粒，推测其富含 Fe^{3+} 等金属离子，分析 **1** 时，会催化生成杂质 C，导致其峰面积不稳定。采用色谱柱 2 时，杂质 B 峰分叉，杂质 A、杂质 C 与杂质 D 同时出峰，且峰形差。最终选择柱长 / 填料粒径比值更大的高纯硅胶型色谱柱 3，各杂质峰形、分离度及保留时间等情况均良好。

3.2 结果分析

在 3 家企业生产的各 2 个规格样品（共 18 批）中，4 个杂质均有检出。杂质 B、杂质 C 与杂质 D 检测结果均在限度范围内，最高值约为限度的 20%。企业 B 的样品中杂质 A 检出结果均较高，其中 20 mg 规格的 3 批产品均超限；这些样品均为注册检验批，目前未被发补增加潜在致突变杂质的研究。由上述检测结果可知，有必要对上述 4 种杂质，尤其是杂质 A 进行研究。

本文经过方法优化，建立了一种能同时测定 **1** 片中 4 种潜在致突变杂质含量的 UPLC-MS/MS 法，

制定了限度并测定了多批样品。结果显示该法专属性强、便捷、准确、灵敏度高，能满足质量控制的需要，可快速监控 **1** 片中的潜在致突变杂质，为其质量控制提供技术保障，更好地保障药品安全。

参考文献：

[1] 刘光辉, 孙俊锋. 伏诺拉生对胃食管返流病效果及对胃黏膜屏障功能影响[J]. 世界临床药物, 2025, **46**(9): 939-944.

[2] 翟晓晓. 富马酸伏诺拉生辅助治疗胃食管反流病的效果[J]. 实用中西医结合临床, 2024, **24**(14): 13-15.

[3] 万君玥, 陈　华, 尹　婕. 化学药品中杂质的基因毒性评估策略以及相关分析方法研究进展[J]. 药物分析杂志, 2022, **42**(4): 557-571.

[4] 张玉英, 李　薇, 潘卫松. 药品杂质遗传毒性评价的概述[J]. 药品评价, 2021, **18**(4): 203-207.

[5] 赵静芝, 宿　亮, 朱　婧, 等. 超高效液相色谱法测定富马酸伏诺拉生原料有关物质[J]. 中国药事, 2022, **36**(7): 800-809.

[6] 解元元, 崔祥祯, 杨　永, 等. HPLC法测定富马酸伏诺拉生注射液中有关物质的含量[J]. 中南药学, 2024, **22**(8): 2182-2186.

[7] 王玲兰, 龚翠云, 朱跃芳, 等. 高效液相色谱法同时测定富马酸伏诺拉生中活性成分含量及成盐率研究[J]. 中国药业, 2023, **32**(11): 63-67.

[8] 龚翠云, 朱　婧, 王玲兰, 等. 电感耦合等离子体质谱法测定富马酸伏诺拉生片及其原料药中7种元素杂质含量[J]. 中国药业, 2024, **33**(14): 91-94.

[9] 刘　杰, 孙艳阁, 孙继国, 等. 富马酸伏诺拉生中基因毒性杂质吡啶-3-磺酸甲酯含量的测定[J]. 山东化工, 2022, **51**(12): 130-132.

[10] 张象娜, 成彩华, 金　鑫, 等. HPLC法测定富马酸伏诺拉生片中三种潜在基因毒性杂质的含量[J]. 中国处方药, 2025, **23**(2): 47-50.

[11] 闫　敏, 苏浩然, 郑文凤, 等. 富马酸伏诺拉生中基因毒性杂质*N*-亚硝基-伏诺拉生的检测方法: 中国, 118566356A[P]. 2024-08-30.

广告索引

封二：《中国医药工业杂志》征订信息

封底：中国医药工业信息中心

封三：鲁南厚普制药有限公司

267、364 页：公益广告