

# 采用AEI源配置的TSQ 9000气质联用液体进样法分析十二种亚硝胺

王仁萍 赛默飞世尔科技(中国)有限公司

## 关键词:

AEI, GC/MS/MS, 基因毒性杂质, 亚硝胺, 缬沙坦

## 摘要

本文采用赛默飞AEI源配置的TSQ 9000三重四极杆质谱仪建立了一种选择性强, 灵敏度高的检测十二种亚硝胺的方法。验证结果表明该方法线性良好, 重复性好, 灵敏度高, 可将其应用于制药领域中痕量亚硝胺的检测。

## 引言

亚硝胺类化合物指含有亚硝基上氮原子与氨基上氮原子直接相连的化合物, 目前已知的不同烷基取代的亚硝胺类化合物有300多种, 约90%具有不同肿瘤诱导作用。近两年在制药领域亚硝胺事件层出不穷, 亚硝胺的分析检测成为制药人关注热点之一。但鉴于亚硝胺限度低, 种类多的现状<sup>[1][2]</sup>, 故方法开发过程中灵敏度是首要考虑要素, 其次是在灵敏度的基础上尽可能提高制药分析人员的分析效率。

赛默飞AEI源具有独特的结构设计, 是一种新型的, 具备超高稳定性与灵敏度的离子源。AEI源灯丝位置不同于普通EI源, 其灯丝采用与离子传输路径同向设计, 此外专利RF透镜, 全新电子束聚焦设计均保证了更聚焦的离子束, 同时提高了离子化效率, 从而大幅度提高仪器长久稳定性与灵敏度, 长期稳定的实现痕量物质的检出。

基于上述亚硝胺类化合物在制药领域的检测方法需求, 结合赛默飞AEI源的技术特点, 参考前期在EI源仪器配置下缬沙坦中十二种亚硝胺的检测方法, 本文即采用AEI源配置的TSQ 9000分析了十二种亚硝胺, 进行了系统进样精密度、线性、灵敏度考

察, 结果表明方法重复性好, 灵敏度高, 可将其应用于制药领域缬沙坦中亚硝胺的检测。

## 实验部分

### 1. 仪器与试剂

Thermo Fisher Scientific™ AS1310液体自动进样器; Thermo Fisher Scientific™ TRACE 1310气相色谱仪; Thermo Fisher Scientific™ TSQ 9000三重四极杆质谱仪; Chromeleon 7.2数据处理系统。

试剂: 二氯甲烷(DCM)色谱纯。

### 2. 溶液配制

#### 2.1 标准曲线工作溶液、灵敏度溶液配制

标准曲线工作溶液: 准确称取十二种亚硝胺类化合物适量, 用DCM配制到一定浓度作为标准品储备液。取以上标准品储备液适量, 用DCM逐级稀释得系列标准曲线工作溶液, 浓度分别为: 5.0、10.0、25.0、50.0、100.0、200.0ng/mL (NPyr标准曲线工作溶液的浓度分别为10.0、20.0、50.0、100.0、200.0、400.0ng/ml)。

灵敏度溶液: 取上述标准曲线工作溶液中5ng/ml溶液作为灵敏度溶液。

#### 2.2 样品溶液与加标溶液配制

样品溶液: 精密称取缬沙坦样品0.5g, 加DCM溶液5ml, 涡旋

1min, 超声15min, 4000rpm离心5min, 取上清液适量, 过0.45 μm滤膜后溶液作为样品溶液;

加标溶液: 精密称取缬沙坦样品0.5g, 加25ng/ml的标准品溶液5ml, 涡旋1min, 超声15min, 4000rpm离心5min, 取上清液适量, 过0.45 μm滤膜后溶液作为加标溶液。

### 3. 仪器方法

本次实验的色谱与质谱相关参数见表1, 2。

表 1 气相与质谱参数

TRACE 1310 GC气相参数	
进样体积 (μL)	1.0
衬管	超惰性不分流 PN:453A1925-UI
进样口温度 (°C)	230
进样模式	不分流进样 不分流时间 1min 分流流量 10mL/min, 恒压模式: 18.5psi
色谱柱	TG-WaxMS 30m*0.25mm*0.25μm P/N: 26088-1420
程序升温	50°C (保持3.0min), 15°C/min升温至 130°C (保持5.0min), 20°C/min升温至 250°C (保持11min)

TSQ 9000 质谱参数	
传输线温度 (°C)	240
离子源温度 (°C)	280
数据采集模式	Timed-SRM
采集离子	各化合物的采集离子见表2

表 2 亚硝胺类化合物Timed-SRM参数

化合物简称	中文全称	CAS	保留时间 (min)	定量离子对(eV)	定性离子对 (eV)
NDMA	N-亚硝基二甲胺	62-75-9	6.34	74.0>44.1 (6)	74.0>42.0 (14)
NMEA	N-亚硝基甲基乙基胺	10595-95-6	6.90	88.1>71.0 (4)	88.0>42.1 (14)
NDEA	N-亚硝基二乙胺	55-18-5	7.20	102.1>85.1 (4)	102.1>29.1 (6)
NEIPA	N-亚硝基乙基异丙胺	16339-04-1	7.56	116.0>99.0 (6)	116.0>44.0 (10)
NDIPA	N-亚硝基二异丙胺	601-77-4	7.85	130.0>88.0 (6)	130.0>42.0 (8)
NDPrA	N-亚硝基二丙胺	621-64-7	8.62	130.1>113.1 (4)	70.0>43.1 (6)
NDBuA	N-亚硝基二丁胺	924-16-3	11.09	116.1>99.1 (4)	116.1>74.1 (8)
NPiP	N-亚硝基哌啶	100-75-4	11.48	114.0>84.1 (6)	114.0>41.0 (10)
NPy	N-亚硝基-吡咯	930-55-2	12.19	100.0>55.0 (6)	100.0>43.1 (8)
NMorph	N-亚硝基吗啉	59-89-2	13.48	116.0>86.0 (4)	116.0>56.0 (10)
NDPhA	N-亚硝基二苯胺	86-30-6	19.97	168.1>167.1 (12)	168.1>166.1 (26)
NDBeA	N-亚硝基二苄胺	5336-53-8	22.64	91.0>65 (12)	91.0>39.0 (24)

### 4. 结果与讨论

目前FDA公布的直接进样GC/MS/MS方法<sup>[9]</sup>中同时检测了五种亚硝胺类化合物, 其对系统适用性要求如下:

- (1) 40ng/ml六次重复进样精密度RSD≤5%;
- (2) 5ng/ml灵敏度溶液信噪比≥10;
- (3) 线性相关系数≥0.9980。

#### 4.1 系统进样精密度、检测限与定量限

取25ng/ml的标准曲线工作溶液连续进样六次, 十二种亚硝胺的T-SRM谱图参见图1, 可以看出, 十二种亚硝胺峰型良好。按外标法以定量离子对峰面积计算六次连续进样的相对标准偏差RSD%均小于3% (表3), 远小于FDA要求。

取灵敏度测试溶液 (5ng/mL) 液体自动进样器进样, 各化合物信噪比如图1所示, 从实验数据可以看出, 在5ng/mL浓度下, 各亚硝胺类化合物的信噪比在62.7-3228之间, 远远优于FDA规定的系统适应性灵敏度测试溶液 (5ng/mL) 信噪比大于10的要求。按S/N=10为定量限, S/N=3为检测限线性外推计算得各亚硝胺类化合物的检测限与定量限浓度见表3。

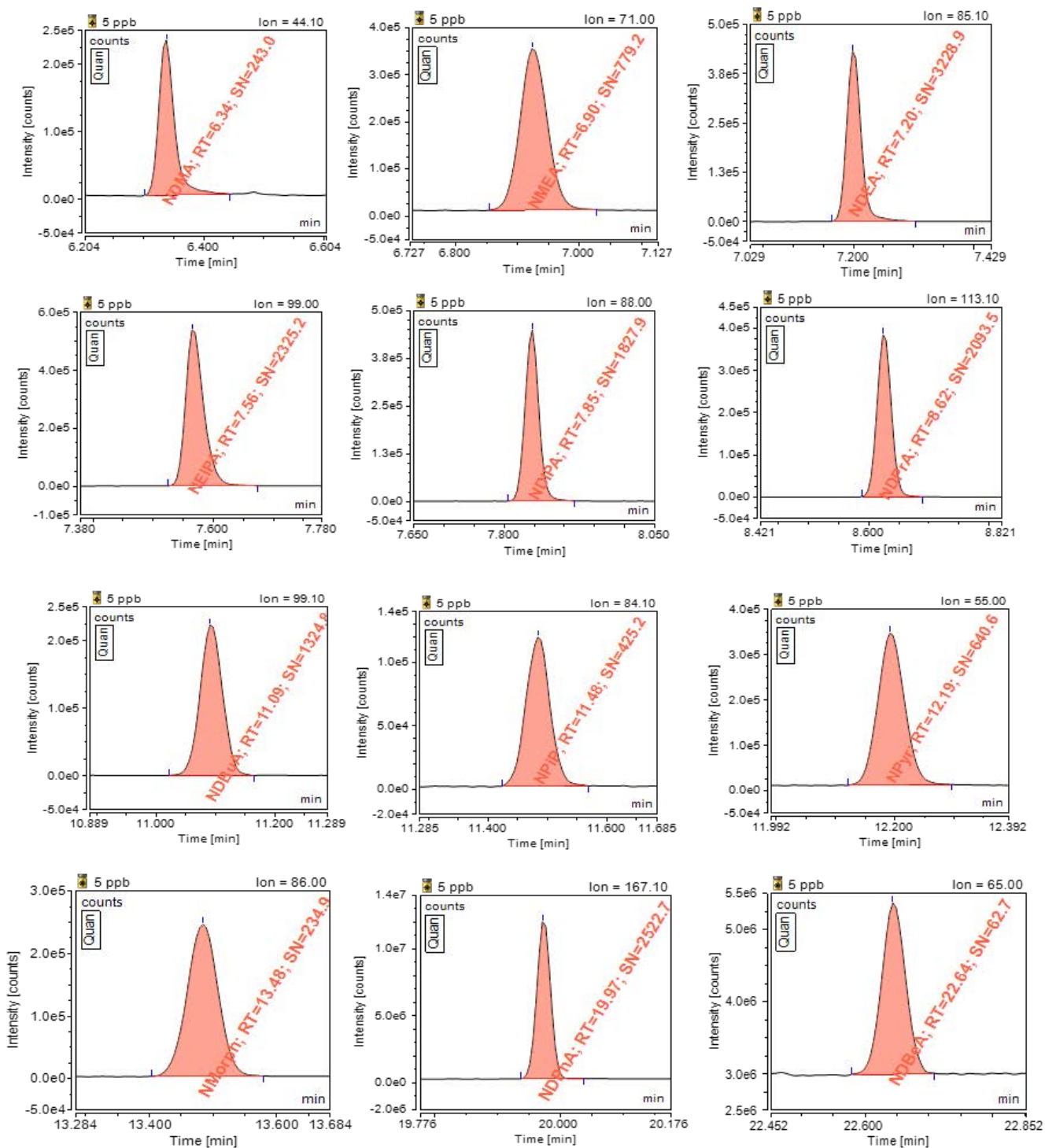


图 1 T-SRM模式下5ng/mL十二种亚硝胺谱图

#### 4.2 线性

取“2溶液配制”项下标准曲线工作溶液进样，每个浓度点平行进样两次，以外标法计算亚硝胺线性，部分亚硝胺的线性曲线见图2。十二种亚硝胺类化合物的标准曲线方程及相关系数见

表3。从实验数据可以看出，各亚硝胺在5-200ng/ml（NPyA浓度范围在10-400ng/ml）浓度范围内，线性相关系数 $R^2$ 均大于0.9980，满足FDA要求。

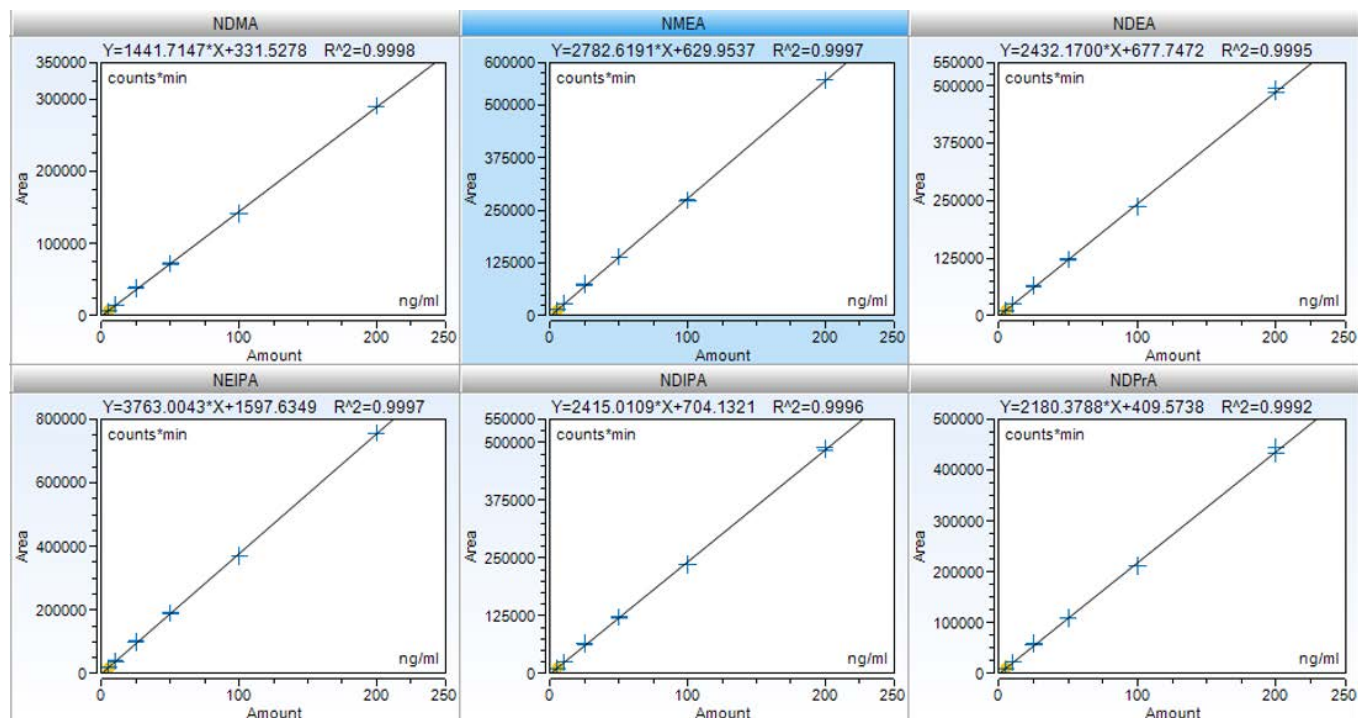


图2 部分亚硝胺的线性曲线（5-200 ng/mL范围）

表 3 亚硝胺类化合物的标准曲线、检测限与定量限、系统进样精密度结果

化合物名称	线性范围ng/ml	线性方程	相关系数R <sup>2</sup>	5ng/ml信噪比	检测限(ng/ml)	定量限(ng/ml)	RSD(%)(n=6)
NDMA	5-200	Y=1441.71478*X+331.5278	0.9998	243.0	0.062	0.206	2.15
NMEA	5-200	Y=2782.6191*X+629.9537	0.9997	779.2	0.019	0.064	2.90
NDEA	5-200	Y=2432.1700*X+677.7472	0.9995	3228.9	0.005	0.015	0.93
NEIPA	5-200	Y=3763.0043*X+1597.6349	0.9997	2325.2	0.006	0.022	2.67
NDIPA	5-200	Y=2415.0109*X+704.1321	0.9996	1827.9	0.008	0.027	2.57
NDPrA	5-200	Y=2180.3788*X+409.5738	0.9992	2093.5	0.007	0.024	1.11
NDBuA	5-200	Y=2011.8489*X-409.1082	0.9983	1324.8	0.011	0.038	1.02
NPIP	5-200	Y=1160.9156*X-11.0078	0.9990	425.2	0.035	0.118	2.10
NPyr	10-400	Y=3812.12938*X+2381.0806	0.9989	640.6	0.023	0.078	2.02
NMorph	5-200	Y=2860.4133*X-479.8868	0.9989	234.9	0.064	0.213	1.98
NDPhA	5-200	Y=58222.3492*X-46246.5293	0.9981	2522.7	0.006	0.020	2.97
NDBeA	5-200	Y=19326.5701*X+3894.2971	0.9986	62.7	0.239	0.797	2.10

#### 4.3 AEI源在亚硝胺检测灵敏度提升上的优势

本文中采用赛默飞AEI源大幅度提高了亚硝胺的灵敏度。灵敏度提升在药物基因毒性杂质亚硝胺分析中的优势：

(1) 首先对于溶解性差或对进样口有污染的原料药及制剂，在亚硝胺限度一定的条件下，可以大幅度降低样品浓度或简化样品前处理过程，从而一方面节约样品使用量，减少样品对于仪器进样口以及色谱柱的污染；另一方面降低的标准品浓度依然能够满足方法学验证要求；

(2) 其次灵敏度的提升能够保证原料药或制剂中亚硝胺更低的检出量，从而保证药物质量安全。

(3) 亚硝胺致癌风险较高，法规对其控制的关注也持续增长。灵敏度提升可以应对法规中其限度降低的风险。

#### 总结

本文采用赛默飞AEI源三重四极杆质谱仪TSQ 9000建立了重复性好，灵敏度高的检测十二种亚硝胺的方法，可将其应用于缬沙坦中亚硝胺的检测，同时为其他药物品种中亚硝胺的检测提供参考。

## 参考文献

- [1] [https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/nitrosamines-emea-h-a53-1490-questions-answers-information-nitrosamines-marketing-authorisation\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/nitrosamines-emea-h-a53-1490-questions-answers-information-nitrosamines-marketing-authorisation_en.pdf)
- [2] [https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/temporary-interim-limits-nmba-dipna-eipna-impurities-sartan-blood-pressure-medicines\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/temporary-interim-limits-nmba-dipna-eipna-impurities-sartan-blood-pressure-medicines_en.pdf)
- [3] <https://www.fda.gov/media/123409/download>



赛默飞  
官方微信

热线 800 810 5118  
电话 400 650 5118  
[www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)

**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC