

采用ISQ 7000和TSQ 9000气质联用液体进样法分析缬沙坦中十二种亚硝胺

王仁萍 赛默飞世尔科技(中国)有限公司

关键词:

GC/MS, GC/MS/MS, 基因毒性杂质, 亚硝胺, 缬沙坦

摘要

本文采用赛默飞ISQ 7000单四极杆质谱仪与TSQ 9000三重四极杆质谱仪建立了两种选择性强, 灵敏度高的检测缬沙坦中十二种亚硝胺的方法。实验结果证明两种方法线性良好, 准确可靠, 灵敏度高, 可将其应用于缬沙坦药物中痕量亚硝胺的检测。

引言

自2018年全球临床一线抗高血压药物缬沙坦中检测出基因毒性杂质N-亚硝基二甲胺 (NDMA) 事件后, 引起各国药品监管机构以及全球制药企业对沙坦类药物中亚硝胺的关注。紧接着陆续在消化性溃疡病的替丁类药物盐酸雷尼替丁、治疗糖尿病的盐酸二甲双胍中检测出了NDMA, 自此亚硝胺类基因毒性杂质在药品中的分析检测成为近两年的研究热点。

亚硝胺类化合物是指含有亚硝基基团及氨基基团, 且亚硝基上氮原子与氨基上氮原子直接相连的化合物, 如右图1所示, 属于三大强烈致癌物质之一, 研究表明氨基上取代基越复杂其致癌性与致突变性就越强。

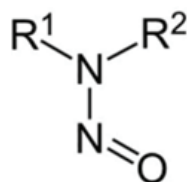


图1 亚硝胺结构式

根据世界卫生组织国际癌症研究机构致癌物清单, 亚硝胺类化合物属于2A类致癌物质, 即对人类致癌性证据有限, 但对实验动物致癌性证据充分的物质。ICH (人用药品注册技术要求国际协调会议) M7指南中也明确提出亚硝胺类化合物是具有较高致癌性 (“关注队列”) 的一类化合物, 应在药品中予以严格

控制。关于药物中亚硝胺的来源, 欧洲药品管理局 (EMA) 在2019年12月20日更新的文件 “Questions and answers on “Information on nitrosamines for marketing authorisation holders” [1]中主要从原料药合成工艺角度解答了这一点, 如胺类化合物, 尤其是仲胺类化合物与亚硝酸盐在酸性环境中可生成亚硝胺类化合物; 其次, 起始物料、中间体、药物有效成分 (API) 的降解产物也可能产生亚硝胺; 起始物料的污染、药物包装材料等都可能是药物中亚硝胺的来源。

目前欧洲药品管理局(EMA)已公布NDBA、NDIPA、NEIPA的日最大暴露量均为26.5ng/day^{[1][2]}, NDMA和NDEA的日最大暴露量与美国食品药品监督管理局 (FDA) 公布结果一致均为96ng/day和26.5ng/day^[3], 但大部分的亚硝胺目前还没有明确的毒理学数据。鉴于其极低的暴露量, 控制限度远低于一般杂质, 故应选择高灵敏度、高选择性的检测方法对其进行控制分析, 并采用标准品进行方法学验证, 从而保证亚硝胺类化合物可以准确有效的检出。

对于亚硝胺的检测方法, 目前各国药品监管机构已公布的主要是LC/MS和GC/MS方法^[4], 其中GC/MS最早应用于亚硝胺的检测。当前 FDA公布的直接进样GC/MS/MS检测缬沙坦中亚硝胺的方法是采用内标法定量, 以NDMA:C13-d6为内标物, 同时检测五种亚硝胺类化合物^[5]。随着NDMA和NDEA在越来越多药物中被检出, 其他亚硝胺类化合物同样受到了整个制药行业的关注, 故亟待开发新方法以更方便快速的同时检测更多种类的痕量亚硝胺。本文采用赛默飞ISQ 7000 T-SIM模式(GC/MS) 与

TSQ 9000 T-SRM模式(GC/MS/MS), 液体自动进样方式, 以内标法定量, 建立了同时检测十二种亚硝胺的两种专属性强、灵敏度高的方法。

1 GC/MS法检测缬沙坦中的亚硝胺

1.1 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™ ISQ 7000单四极杆质谱仪; Chromeleon 7.2数据处理系统。

试剂: 二氯甲烷 (DCM) 色谱纯。

1.2 溶液的配制

1.2.1 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和两种内标适量, 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、20.0、40.0、80.0、100.0、150.0、200.0ng/mL (NPyr 标准曲线工作溶液的浓度分别是10.0、20.0、40.0、80.0、160.0、200.0、300.0、400.0ng/ml), 内标物NDMA-d6的浓度为8ng/ml, NDPrA-d14的浓度为12ng/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。

1.2.2 样品溶液与加标溶液的配制

样品溶液: 精密称取缬沙坦样品0.5g, 加含有内标物的DCM溶液5ml, 涡旋1min, 超声15min, 4000rpm离心5min, 取上清液适量, 过0.45μm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40ng/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0.45μm滤膜后溶液作为加标溶液。

1.3 仪器方法

本次实验的色谱与质谱参数见表1.1, 1.2。

表 1.1 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 30 m*0.25 mm*0.5 μm PN: 26087-2230
程序升温	50°C (保持1.0min), 15°C/min升温至130°C (保持2.0min), 20°C/min升温至250°C (保持11 min)

ISQ 7000 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-SIM
采集离子	各化合物的采集离子见下表

表 1.2 亚硝胺类化合物Timed-SIM参数

化合物名称	中文全称	CAS	保留时间 (min)	定量离子	定性离子
NDMA-d6	N-亚硝基二甲胺-d6	17829-05-9	6.320	80	46
NDMA	N-亚硝基二甲胺	62-75-9	6.327	74	42
NMEA	N-亚硝基甲基乙基胺	10595-95-6	6.854	88	56
NDEA	N-亚硝基二乙胺	55-18-5	7.220	102	42
NEIPA	N-亚硝基乙基异丙胺	16339-04-1	7.670	116	56
NDIPA	N-亚硝基二异丙胺	601-77-4	8.050	130	58
NDPrA-d14	N-亚硝基二丙胺-d4	93951-96-3	9.043	144	78
NDPrA	N-亚硝基二丙胺	621-64-7	9.150	130	113
NDBuA	N-亚硝基二丁胺	924-16-3	11.156	84	116
NPiP	N-亚硝基哌啶	100-75-4	11.512	114	42
NPyr	N-亚硝基吡咯	930-55-2	11.797	100	42
NMorph	N-亚硝基吗啉	59-89-2	12.213	116	86
NDPhA	N-亚硝基二苯胺	86-30-6	17.670	168	51
NDBeA	N-亚硝基苄胺	5336-53-8	23.230	91	181

1.4 结果与讨论

1.4.1 系统进样精密度

取40ng/ml的标准曲线工作溶液连续进样六次, 十二种亚硝胺以及两种内标的T-SIM谱图如图1.1, 可以看出, 所有亚硝胺峰型良好。计算六次连续进样的相对标准偏差RSD%, 所有化合物RSD均小于3% (表1.3), 远优于FDA内标法小于5%的要求。

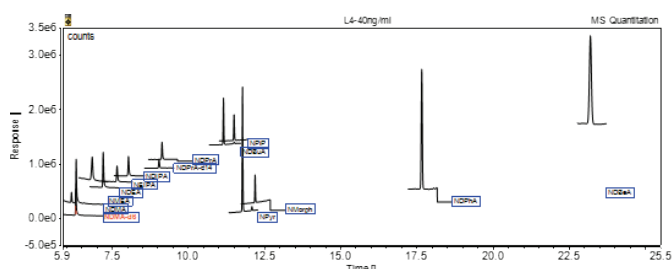


图 1.1 十二种亚硝胺标准品谱图 (T-SIM)

1.4.2线性、灵敏度考察

在系统进样精密度实验之后进行了方法线性，灵敏度考察。

按内标法计算各亚硝胺的线性，以NDMA和NMEA为例，线性曲线见图1.2。十二种亚硝胺类化合物的标准曲线方程及相关系数见表1.3。从实验数据可以看出，各亚硝胺类化合物在5-200ng/ml (NPyr浓度范围在10-400ng/ml) 浓度范围内，线性相关系数R²均大于0.999，远优于FDA规定大于0.998的要求。

灵敏度测试溶液 (5ng/mL) 结果如图1.3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峰型良好，信噪在19.1-283之间，完全满足FDA的要求。根据灵敏度测试溶液中各亚硝胺的信噪比计算得到的检测限与定量限浓度列于表1.3。

表 1.3 N-亚硝胺类化合物T-SIM模式的标准曲线、检测限与定量限、进样精密度

化合物名称	线性范围ng/ml	线性方程	相关系数R ²	检测限(ng/ml)	定量限 (ng/ml)	RSD(%) (n=6)
NDMA	5-200	Y=4.1979*X-1.5680	0.9998	0.19	0.62	2.60
NMEA	5-200	Y=3.1993*X-0.8732	0.9999	0.79	2.62	2.87
NDEA	5-200	Y=10.7850*X+0.9990	0.9999	0.22	0.75	0.99
NEIPA	5-200	Y=5.9258*X+0.1960	0.9999	0.51	1.69	2.06
NDIPA	5-200	Y=6.6925*X+2.2833	0.9998	0.17	0.55	2.17
NDPrA	5-200	Y=4.4592*X-0.8074	0.9999	0.22	0.75	1.91
NDBuA	5-200	Y=3.2357*X-0.2472	0.9999	0.25	0.84	1.06
NPIP	5-200	Y=1.7249*X+1.1123	0.9999	0.26	0.85	2.02
NPyr	10-400	Y=4.2630*X+3.2791	0.9999	0.15	0.48	1.34
NMorph	5-200	Y=1.8779*X+1.0334	0.9999	0.34	1.12	1.65
NDPhA	5-200	Y=11.7368*X+6.9044	1.0000	0.07	0.23	1.69
NDBeA	5-200	Y=18.8165*X+6.2504	0.9995	0.24	0.81	1.50

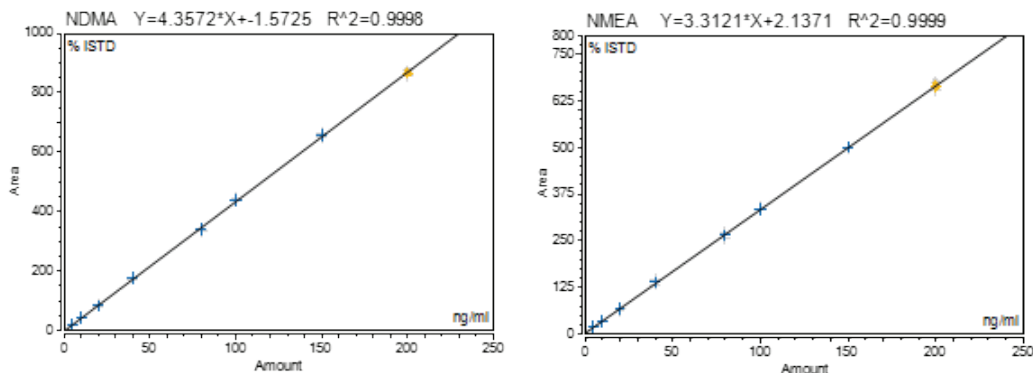


图 1.2 NDMA和NMEA的线性曲线 (5-200 ng/mL范围)

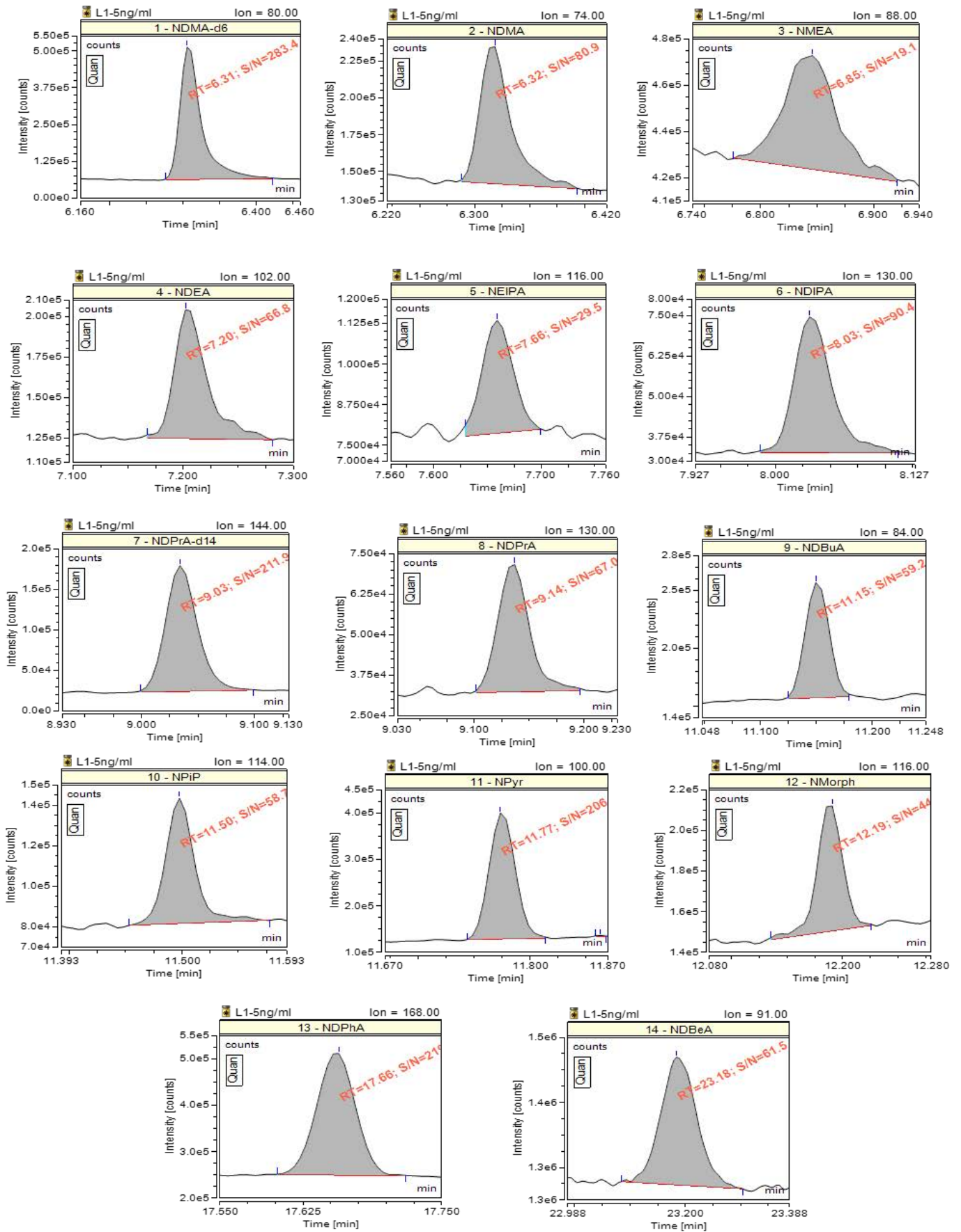


图 1.3 亚硝胺类化合物T-SIM谱图（浓度5ng/mL，其中Nypr浓度10ng/mL）

2 GC/MS/MS法检测缬沙坦中的亚硝胺

2.1 仪器与试剂

Thermo Fisher Scientific™ AS1310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。

2.2 溶液的配制

2.2.1 标准曲线工作溶液的配制

标准曲线工作溶液的配制过程同1.2.1。

2.2.2 灵敏度溶液、检测限与定量限溶液的配制

灵敏度溶液（5ng/ml）配制过程同1.2.1。

检测限与定量限溶液：根据灵敏度溶液中各化合物的信噪比，逐级稀释各标准品的储备液得到检测限与定量限溶液。

2.2.3 样品溶液与加标溶液的配制

样品溶液与加标溶液配制过程同1.2.2。

2.3 仪器方法

本次实验的色谱与质谱相关参数见表2.1，2.2。

表 2.1 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*0.25 mm*0.5 μm PN: 26087-2230
程序升温	50°C (保持1.0min), 15°C/min升温至 130°C (保持2.0min), 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2.2

表 2.2 亚硝胺类化合物Timed-SRM参数

化合物简称	保留时间 (min)	定量离子对(eV)	定性离子对 (eV)
NDMA-d6	6.320	80.1>50.1 (5)	80.1>46.1 (20)
NDMA	6.327	74.1>44.1 (10)	74.1>42.1 (30)
NMEA	6.854	88.1>71.1 (5)	88.1>42.1 (20)
NDEA	7.220	102.1>85.1 (5)	102.1>29.1 (5)
NEIPA	7.670	116.1>99.1 (0)	116.1>44.1 (10)
NDIPA	8.050	130.1>88.1 (0)	130.1>42.1 (5)
NDPrA-d14	9.043	144>126 (0)	144>50 (10)
NDPrA	9.150	70.1>43.1 (5)	130.1>113.1 (0)
NDBuA	11.156	116>99.1 (5)	116>74.1 (15)
NPIP	11.512	114.1>84.1 (10)	114.1>41.1 (15)
NPyr	11.797	100.1>55.1 (20)	100.1>43.1 (30)
NMorph	12.213	116.1>86.1 (0)	116.1>56.1 (10)
NDPhA	17.670	168.1>167.1 (5)	168.1>166.1 (30)
NDBeA	23.230	91.1>65 (15)	91.1>39.1 (30)

2.4 结果与讨论

2.4.1 系统进样精密度

取40ng/ml的标准曲线工作溶液连续进样六次，十二种亚硝胺以及两种内标的T-SRM谱图如图2.1，可以看出，亚硝胺峰型良好。计算六次连续进样的相对标准偏差RSD%均小于5%（表2.3），满足FDA^[5]要求。

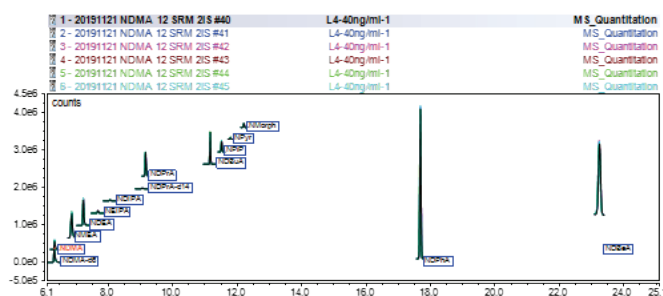


图 2.1 T-SRM模式下40ng/mL十二种亚硝胺标准品溶液连续进样重叠谱图

2.4.2 线性、灵敏度、回收率考察

在系统进样精密度实验之后进行了方法学验证以及样品检测。

取2.2.1项下的系列标准曲线工作溶液，每个浓度点平行进样两次，以内标法计算亚硝胺线性，以NDMA和NMEA为例，线性曲线见图2.2。十二种亚硝胺类化合物的标准曲线方程及相关系数见表2.3。从实验数据可以看出，各亚硝胺在5-200ng/ml（NPyr浓度范围在10-400ng/ml）浓度范围内，线性相关系数R²均大于0.998，满足FDA^[5]规定的系统适用性要求。

取2.2.2项下灵敏度测试溶液（5ng/mL）进样，结果如图 2.3所示，从实验数据可以看出，在5ng/mL浓度下，除Nypr的信噪比为7.2外，其他各亚硝胺类化合物的信噪比均远大于10，已涵盖FDA[®]中五种亚硝胺规定的系统适用性信噪比大于10的要求。取定量限溶液和检测限溶液进样分析，各亚硝胺类化合物的检测限与定量限浓度见表2.3。

在40ng/ml浓度下，考察样品的加标回收率。结果表明，各亚硝胺的加标回收率均在75~125%，表明该方法能对缬沙坦中的亚硝胺准确定量。对十二批缬沙坦进行检测，NDMA在六批样品中均有检出，其中三批样品的检出量分别为16.36 μ g/g，0.41 μ g/g，8.86 μ g/g，远远超过0.3 μ g/g的限度要求；NDPhA在七批样品中有检出，其他亚硝胺类化合物未检出。

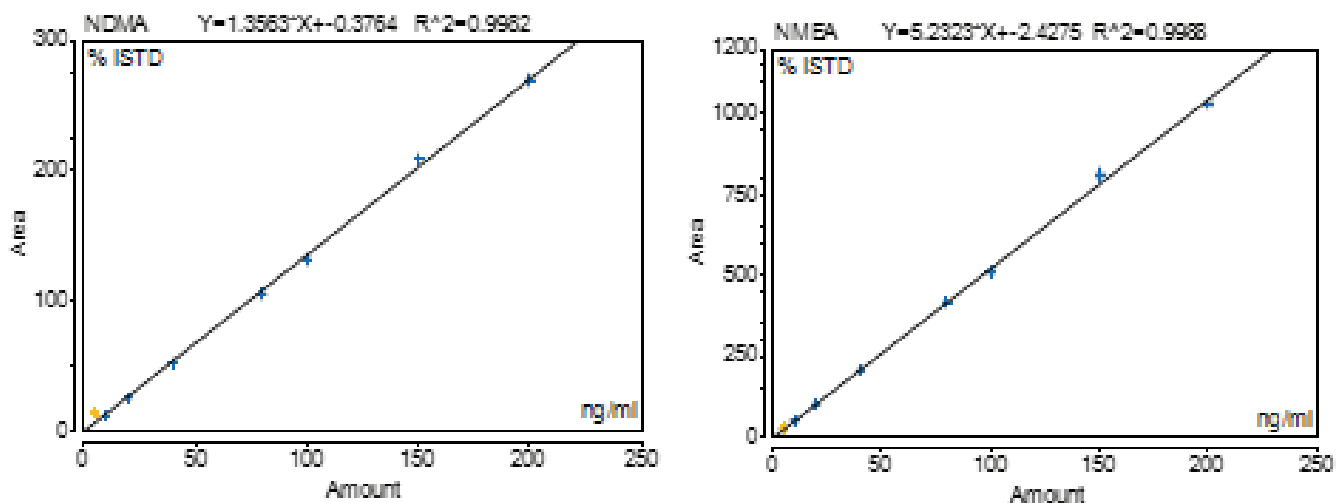


图 2.2 NDMA和NMEA的线性曲线（5-200 ng/mL范围）

表 2.3 亚硝胺类化合物的标准曲线、检测限与定量限、系统进样精密度以及回收率结果

化合物名称	线性范围ng/ml	线性方程	相关系数R ²	检测限(ng/ml)	定量限(ng/ml)	RSD(%) (n=6)	回收率 (%)
NDMA	5-200	Y=1.3563*X-0.3764	0.9982	0.50	1.00	3.05	120.2
NMEA	5-200	Y=5.2323*X-2.4275	0.9988	0.02	0.05	1.25	111.9
NDEA	5-200	Y=90.2895*X+249.7998	0.9986	0.02	0.15	2.90	104.6
NEIPA	5-200	Y=10.3043*X+18.9538	0.9983	0.15	0.50	2.98	100.3
NDIPA	5-200	Y=6.3192*X+10.7352	0.9991	0.15	0.50	3.24	102.1
NDPrA	5-200	Y=58.9094*X+217.3084	0.9980	0.15	0.50	2.83	105.1
NDBuA	5-200	Y=69.6156*X+209.4516	0.9983	0.05	0.15	2.72	109.2
NPiP	5-200	Y=22.2694*X+77.2557	0.9981	0.15	0.50	2.65	109.4
NPyR	10-400	Y=2.1213*X+17.0360	0.9985	10.00	20.00	4.46	105.8
NMorph	5-200	Y=9.4029*X+20.5704	0.9982	0.15	0.50	4.18	103.9
NDPhA	5-200	Y=521.5358*X+1682.9163	0.9984	0.05	0.15	2.59	109.8
NDBeA	5-200	Y=568.2798*X+1987.1972	0.9987	1.00	5.00	2.74	106.5

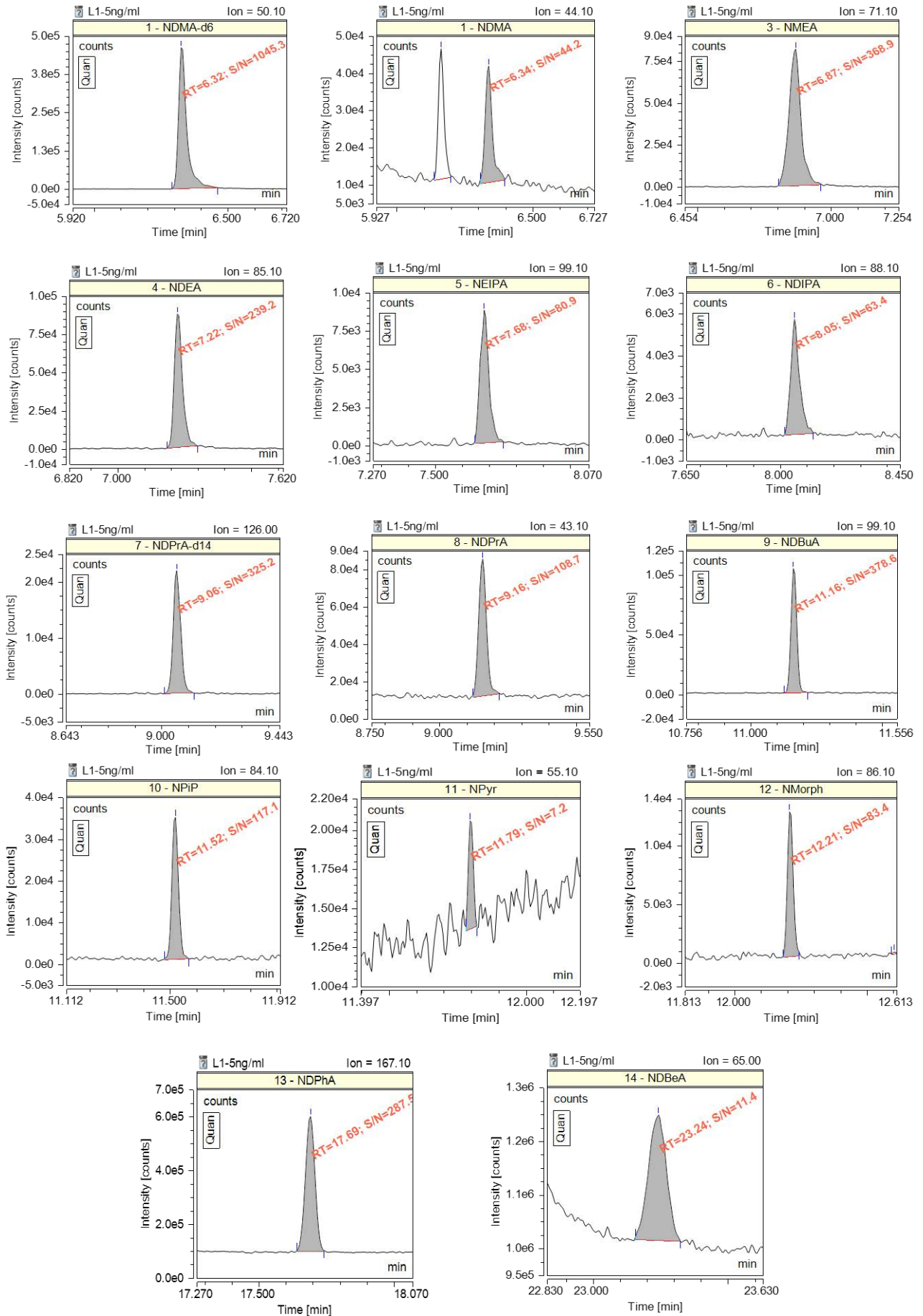


图 2.3 各亚硝胺T-SRM谱图 (浓度5ng/mL, 其中Nyr浓度10ng/mL)

总结

本文采用赛默飞ISQ 7000单四极杆质谱仪与TSQ 9000三重四极杆质谱仪建立了两种选择性强，灵敏度高的检测缬沙坦中十二种亚硝胺的方法，满足FDA相关要求，为制药行业检测缬沙坦中的亚硝胺提供了完美的解决方案，同时为亚硝胺在其他药物品种中的检测提供了参考。此外赛默飞的Chromleon7.2数据处理系统具有超强的数据审计追踪功能，能够保证数据的完整性、安全性，确保满足制药行业合规性的要求。

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
- [2] 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/drugs/drug-safety-and-availability/fda-updates-and-press-announcements-angiotensin-ii-recep-tor-blocker-arb-recalls-valsartan-losartan>
- [4] <https://www.edqm.eu/en/ad-hoc-projects-omcl-network>
- [5] <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

ThermoFisher
SCIENTIFIC