

Orbitrap Exploris 120高分辨质谱检测分析药物中6种亚硝胺类基因毒性杂质

刘国强, 徐牛生

赛默飞世尔科技(中国)有限公司色谱质谱部

关键词

Orbitrap Exploris 120, 亚硝胺, 基因毒性杂质, 氯沙坦

前言

亚硝胺的化学式是 NR_2NO (R代表H或烃基)。大量的动物实验已确认, 亚硝胺是强致癌物, 并能通过胎盘和乳汁引发后代肿瘤。同时, 亚硝胺还有致畸和致突变作用。人群中流行病学调查表明, 人类某些癌症, 如胃癌、食道癌、肝癌、结肠癌和膀胱癌等可能与亚硝胺有关。

自2018年7月在缬沙坦原料药中检出N-亚硝基二甲胺 (NDMA) 起, 陆续在其它沙坦类原料药中也检出了各类亚硝胺杂质, 如N-亚硝基二甲胺 (NDMA)、N-亚硝基二乙胺 (NDEA) 等。进一步的调查发现, 在个别供应商的非沙坦类的药物中 (如雷尼替丁、二甲双胍), 亦有亚硝胺类杂质的检出。因此为了保证药品的安全和质量可控, 有必要对化学药品中亚硝胺类杂质进行全面的检测和控制。

GCMS和LCMS是药物中亚硝胺类杂质的常用分析测试方法, 美国FDA先后发布了多版关于检测药物中亚硝胺类杂质的参考方法。在GCMS检测方法中因为使用较高温度会加热雷尼替丁样品可能会导致NDMA生成, LC-QQQ由于容易受到背景干扰难以完全排除检测过程中出现的假阳性, 因此LC-HR MS高分辨质谱已成为FDA推荐的亚硝胺类化合物检测的首选方法^[1-3]。

本文基于Orbitrap Exploris 120超高分辨质谱仪建立了氯沙坦中6种亚硝胺 (NDMA, NMBA, NDEA, NEIPA, NDIPA, 和NDBA) 分析的高灵敏度检测方法。本方法可实现亚硝胺和氯沙坦药物主成分的有效分离, 可以有效的去除NDMA检测过程中的二甲基甲酰胺 (DMF) 的同位素峰干扰, 有助于获得更准确的定性定量结果。定量下限低于目前的限度要求, 完全可以满足日常亚硝胺类基因毒性杂质的检测需求。

实验方法

1. 仪器与试剂

Thermo Fisher Vanquish Flex超高效液相色谱仪、Thermo Fisher Orbitrap Exploris 120超高分辨质谱仪、Thermo Scientific Hypersil GOLD Phenyl色谱柱 (P/N: 25903-104630), LCMS级甲醇 (Fisher A456-4)、LCMS级水 (Fisher W6-4)、LCMS级甲酸 (Fisher A117-50)、Titan3, 17 mm PVDF过滤器, 0.22 μm (P/N: 42213-PV)。

2. 样品前处理

2.1 亚硝胺标准品储备液

用纯甲醇配置标准品, 并用纯甲醇进行稀释, 最终得到混标中6种亚硝胺的浓度均为100ng/mL, 以此作为标准品储备液。

2.2 成品药样品制备

称取适量药片粉末至15mL离心管中, 加纯甲醇, 涡旋1 min, 震荡40mins, 得到API浓度约为10mg/mL的溶液。提取后, 4500rpm离心15mins, 取上清液过0.22 μm PVDF滤膜, 滤液取至进样小瓶中供LCMS分析。

3. 色谱方法

超高效液相UHPLC (Vanquish Flex, Thermo Fisher Scientific) 系统进行色谱分离, 该系统由真空脱气机, 自动进样器, 柱温箱, 和二元泵组成。采用Thermo Scientific Hypersil Gold Phenyl分析柱, 此柱基于高纯硅胶设计, 包含C4连接基团, 具备中等疏水性, 与芳香族化合物具有加强的pi-pi相

互作用，出众的保留能力和独特的选择性特别适合苯环和芳环化合物的分析。本实验中此柱对亚硝酸胺有较好的保留以及和氯沙坦可以做到有效分离。

表1. 6种亚硝酸胺的色谱分离方法

色谱条件			
色谱柱	Hypersil Gold Phenyl (4.6*100mm, 3µm)		
柱温	40°C		
流速	0.6 mL/min		
洗脱相 A	0.1%甲酸-水		
洗脱相 B	0.1%甲酸-甲醇		
梯度条件	时间(min)	A%	B%
	0	90	10
	1.5	90	10
	7	45	55
	17	45	55
	17.1	10	90
	21	10	90
	21.1	90	10
	25	90	10
进样体积	5 µL		
样品盘温度	6°C		
洗针液	甲醇: 水 = 80:20 (含0.1%甲酸)		

4. 质谱条件

仪器：Thermo Scientific™ Orbitrap Exploris 120™ 四极杆-静电场轨道阱高分辨液质平台；

HESI离子源参数：Spray Voltage +4.0KV/-3.5KV; Sheath Gas Pressure: 55 Arb; Aux Gas Pressure: 15 Arb; Capillary Temp: 200°C; Heater Temp: 450°C; S-Lens:70;

正负离子切换及t-SIM和Product Ion Scan扫描方式采集数据，对于不同的化合物采用不同的扫描方式以降低背景干扰，获得最佳的检测及定量效果。

表2. 6种亚硝酸胺的质谱扫描方法

Impurity	NDMA	NMBA	NDEA	NEIPA	NDIPA	NDBA
Scan Type	Product Ion Scan	t-SIM	Product Ion Scan	Product Ion Scan	t-SIM	Product Ion Scan
Polarity	Positive	Negative	Positive	Positive	Positive	Positive
Scan Start - End (min)	2.4 - 4.4	4.3 - 6.3	6.4 - 7.5	7.8 - 8.9	9.5 - 10.0	14.0 - 16.0
m/z Isolated for Product Ion Scan/SIM	75.0553	145.0619	103.0866	117.1022	131.1179	159.1492
NCE	80	N/A	30	20	N/A	30
Isolation Window	4.0 m/z					
Resolution	120000					
Maximum Injection Time Mode	Auto					

实验结果和讨论

1. 灵敏度测试

Orbitrap静电场轨道阱质量分析器具有超高分辨率及质量精度，已广泛应用于药物中亚硝酸胺杂质的定量检测^[4-5]。Orbitrap Exploris 120 配备高场Orbitrap技术，具有绝佳的灵敏度，图1和2分别为6种亚硝酸胺的（NDMA, NMBA, NDEA, NEIPA, NDIPA, 和NDBA）的检测限（LOD）及定量限（LOQ）的检测结果。

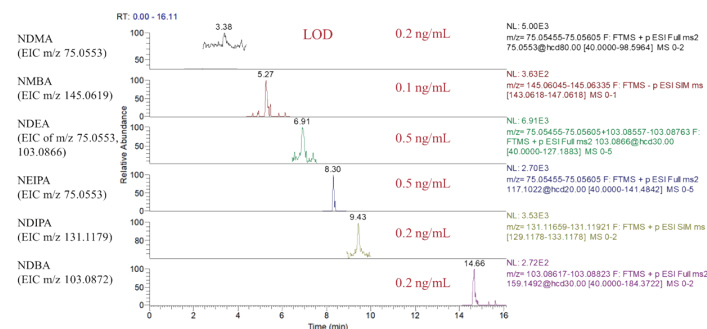


图1. NDMA, NMBA, NDEA, NEIPA, NDIPA, 和NDBA的检测限（LOD）示例色谱图

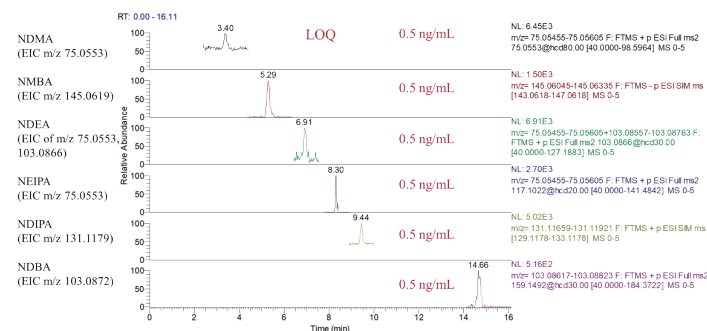


图2. NDMA, NMBA, NDEA, NEIPA, NDIPA, 和NDBA的定量限（LOQ）示例色谱图

2. 系统适应性及线性范围测试

根据FDA推荐方法进行进样顺序要求，序列中初始6针标准品溶液（2ng/ml）6个亚硝酸胺测试的相对标准偏差均小于2%，整个序列中标准品溶液相对标准偏差也小于2%。采用上述仪器方法，NDMA在0.5ng/mL-100ng/mL、NMBA在0.5 ng/mL-100ng/mL、NDEA在 0.5 ng/mL-100ng/mL、NEIPA在0.5ng/mL-100ng/mL、NDIPA在0.5ng/mL-100ng/mL、NDBA在0.5ng/mL-100ng/mL浓度范围内，线性相关系数R² 大于0.999，线性关系良好。

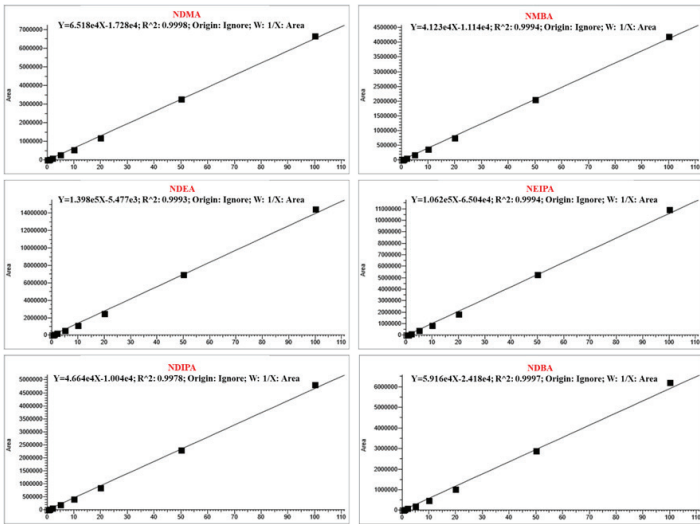


图3. NDMA, NMBA, NDEA, NEIPA, NDIPA, 和NDBA的标准曲线图

3. 氯沙坦药物中亚硝胺杂质的检测

通过对稀释的样品进行测定，可知API氯沙坦的出峰时间为20.3min，实际样品测定过程中色谱出峰16.5min以后的洗脱液均切入至废中。通过对某品牌氯沙坦片剂进行测定，检测到NDMA的浓度约为22.56ng/ml（相当于样品中NDMA的含量为1.13ppm，已超出目前已有的关于NDMA的限度要求）。

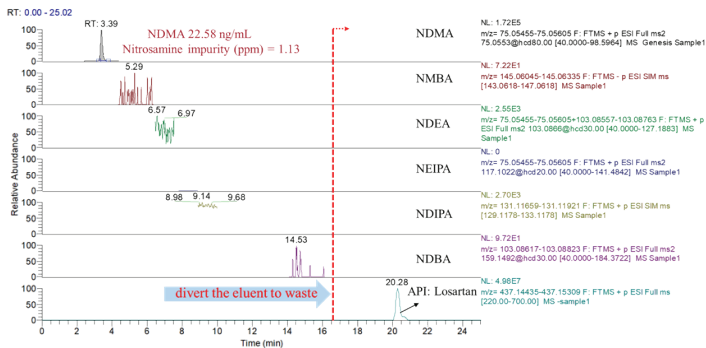


图4. 氯沙坦样品中亚硝胺测定的色谱图

4. Orbitrap超高分辨率杜绝NDMA检测过程中的DMF同位素干扰

近期有私人实验室利用Q-TOF检测发现38个二甲双胍样品中有16个样品的NDMA含量超标，FDA利用Q Exactive-Orbitrap进行复核时最终确认仅有8个二甲双胍样品中的NDMA含量超标。研究发现是由于共流出的二甲基甲酰胺（DMF）的¹⁵N同位素峰[C₃H₇¹⁵NO+H]⁺与NDMA[C₂H₆N₂O+H]⁺质量数非常接近，造成了私人实验室Q-TOF的检测结果偏高^[6]。Orbitrap Exploris 120配备高场Orbitrap技术，具有超高分辨率，可以有效的分离NDMA检测过程中的二甲基甲酰胺（DMF）的¹⁵N同位素峰[C₃H₇¹⁵NO+H]⁺，¹³C同位素峰[C₂¹³CH₇NO+H]⁺和²H同位素峰[C₃H₆²HNO+H]⁺的干扰，避免假阳性结果，可获得更准确的定性定量结果。

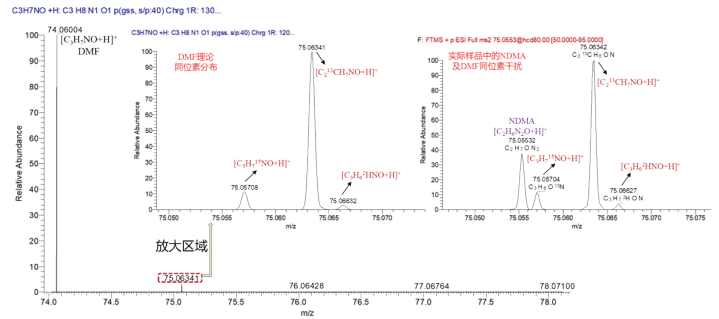


图5. 氯沙坦样品中的NDMA与二甲基甲酰胺（DMF）同位素干扰峰分离的结果

结论

本文建立了基于Orbitrap Exploris 120高分辨质谱分析氯沙坦样品中基因毒性杂质NDMA, NMBA, NDEA, NEIPA, NDIPA, 和NDBA的检测方法, 该方法的灵敏度及重现性完全可以满足FDA要求。同时, Orbitrap Exploris 120具有超高分辨率, 可以有效的分离NDMA检测过程中的二甲基甲酰胺 (DMF) 的同位素峰干扰, 避免假阳性结果, 有助于获得更准确的定性定量结果。

参考文献

- [1].FDA FY19-107-DPA-S_Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS) Method for the Determination of Six Nitrosamine Impurities in ARB Drugs (<https://www.fda.gov/media/125478/download>)
- [2].FDA FY19-177-DPA-S_ Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS) Method for the Determination of NDMA in Ranitidine Drug Substance and Drug Product (<https://www.fda.gov/media/130801/download>)
- [3].FDA FY20-058-DPA-S_ Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS) Method for the Determination of NDMA in Metformin Drug Substance and Drug Product (<https://www.fda.gov/media/134914/download>)
- [4].Application Note: 19045, Q Exactive超高分辨质谱检测分析雷尼替丁中的N-亚硝基二甲胺
- [5].Application Note: 20030, Q Exactive高分辨质谱检测分析药物中6种亚硝胺类基因毒性杂质
- [6].A Cautionary Tale: Quantitative LC-HRMS Analytical Procedures for the Analysis of N-Nitrosodimethylamine in Metformin, The AAPS Journal (2020) 22:89.



赛默飞
官方微信

热线 800 810 5118
电话 400 650 5118
www.thermofisher.com