

使用高级电子电离源 (AEI) 三重四极杆 GC-MS/MS 快速测定二甲双胍中的 12 种亚硝胺

作者: David Lee¹、Aaron Lamb¹、Andrea Romano² 和 Giulia Riccardino²

¹Thermo Fisher Scientific, 朗科恩, 英国

²Thermo Fisher Scientific, 米兰, 意大利

关键词: 亚硝胺, 制药,
N-亚硝基二甲胺 (NDMA),
N-亚硝基二乙胺 (NDEA),
N-亚硝基二异丙胺 (NDIPA),
N-亚硝基乙基异丙胺 (NEIPA),
GC-MS/MS, TSQ 9610 质谱仪

目的

证明 Thermo Scientific™ TSQ™ 9000 三重四极杆质谱仪与 Thermo Scientific™ TRACE™ 1310 气相色谱仪联用技术适用于原料药中 12 种亚硝胺的分析。对配备 Thermo Scientific™ XLXR™ 检测器与 NeverVent AEI 源的新型 Thermo Scientific™ TSQ™ 9610 三重四极杆质谱仪分析亚硝胺的线性也进行了测试。



引言

自从2018年6月首次报道了缬沙坦中含有 N-亚硝基二甲胺 (NDMA) 后, 亚硝胺已成为药品中引起关注的化合物¹。随后, 在各种沙坦类药物以及含有雷尼替丁的产品中检测到了多种亚硝胺成分, 包括N-亚硝基二乙胺 (NDEA)、N-亚硝基二异丙胺 (NDIPA)、N-亚硝基乙基异丙胺 (NEIPA) 和N-亚硝基-N-甲基-4-氨基丁酸 (NMBA)。

这些药品中的亚硝胺使人担忧, 因为它们被 ICH M7 (R1) 指南² 列为 1 类杂质或诱变致癌物, 国际癌症研究机构 (IARC) 也将其列为可能致癌物³。

与单四极杆系统相比，三重四极杆质谱具备更高的选择性和更低的检出限。高选择性是通过利用母离子和产物离子之间形成的离子对来去除单四极杆只有母离子可能造成的基质干扰以及通过不同离子对之间的固定离子比来进一步去除基质干扰，防止得到假阳性结果。另外，通过降低背景噪声也提高了信噪比，从而降低了方法检出限。

本文建立了一种同时分析 12 种亚硝胺的方法，并对其线性、灵敏度、精密度和准确度进行了评估测试。

使用自动进样器实现液液萃取和 GC 进样的自动化，能够降低萃取体积，扩展无人值守运行操作。

试验

仪器和方法设置

使用 TRACE 1310 GC 与 TSQ 9000 MS 联用仪器，配套 Thermo Scientific™ TriPlus™ RSH 自动进样器。TriPlus RSH 自动进样器能在液体进样和顶空分析之间进行无人值

守切换，如果配备了专用的样品处理工具（如涡旋混合器和离心机），还可以实现样品制备自动化。本文所有试验数据都源于液体进样，附录 1 中列举了全部的仪器参数。另外，使用 TSQ 9610 NeverVent AEI 源和 XLXR 检测器进行了平行实验，以评估在相同仪器条件下线性动态范围的扩展性。

标准和样品制备

包含 12 种亚硝胺的校准标准品和 2 种附标记的内标品均购自 Fisher Scientific、Sigma-Aldrich 和 LGC。化合物名称、首字母缩略词与 CAS 编号见表 1。

为了计算方法检出限 (MDLs) 和方法 LOQs，用稀释法配制了基质加标的标准系列溶液，加标浓度为 0.25、0.5、1.0 和 2.0 ng/g。对于样品制备，将 100 mg 二甲双胍称量到琥珀色高回收率样品瓶 (P/N C4000-LV2W) 中，然后按图 1 所示流程进行萃取，样品制备时间合计为 6 分钟。

表 1. 12种亚硝胺化合物和2种内标的名称、缩略词和 CAS 编号列表

分析物名称	缩略词	CAS 编号
N-亚硝基二甲胺	NDMA	62-75-9
N-亚硝基甲基乙胺	NMEA	10595-95-6
N-亚硝基二乙胺	NDEA	55-18-5
N-亚硝基二异丙胺	NDIPA	601-77-4
N-亚硝基-N-甲基-N-苯胺	NMPA	614-00-6
N-亚硝基二丙胺	NDPA	621-64-7
N-亚硝基-N-乙基-N-苯胺	NEPhA	612-64-6
4-亚硝基吗啉	NMOR	59-89-2
N-亚硝基吡咯烷	NPYR	930-55-2
N-亚硝基哌啶	NPIP	100-75-4
N-亚硝基-二丁胺	NDBA	924-16-3
N-亚硝基二苯胺	NDPhA	86-30-6
N-亚硝基二甲胺 (¹³ C ₂ ;D ₆)	NDMA (¹³ C ₂ D ₆)	2483824-56-0
N-亚硝基二丙胺-D ₁₄	NDPA (D ₁₄)	93951-96-3

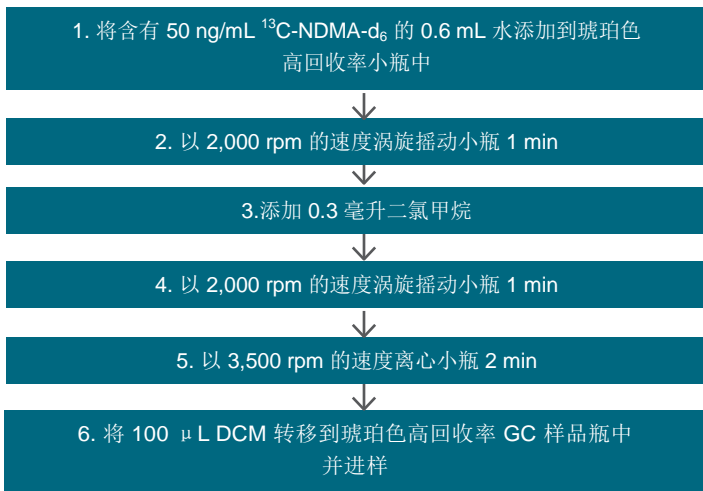


图 1. 样品制备流程

数据采集、处理和报告

使用 Thermo Scientific™ Chromeleon™ 7.3 色谱数据系统 (CDS) 采集、处理和出具报告。随着对数据完整性、安全性

和合规性的日益重视，CDS 提供全面的预防、检测控制程序，使分析实验室能够满足 FDA 21 CFR 第 11 部分和欧盟委员会（欧盟）附件 11 所提出的现代监管要求。

结果和讨论

按照试验部分所述的制备流程，以溶剂标准品溶液来考察分离度与线性。以提取样品与加标样品来评估灵敏度、比如方法检出限、精密度和准确度等分析性能。

色谱分析

使用 Thermo Scientific™ TraceGOLD™ TG-1701 MS 色谱柱，所有化合物在 11 分钟内分离，化合物的峰不对称值 <1.5，满足欧洲和美国药典的要求，见图 2A 和 2B。

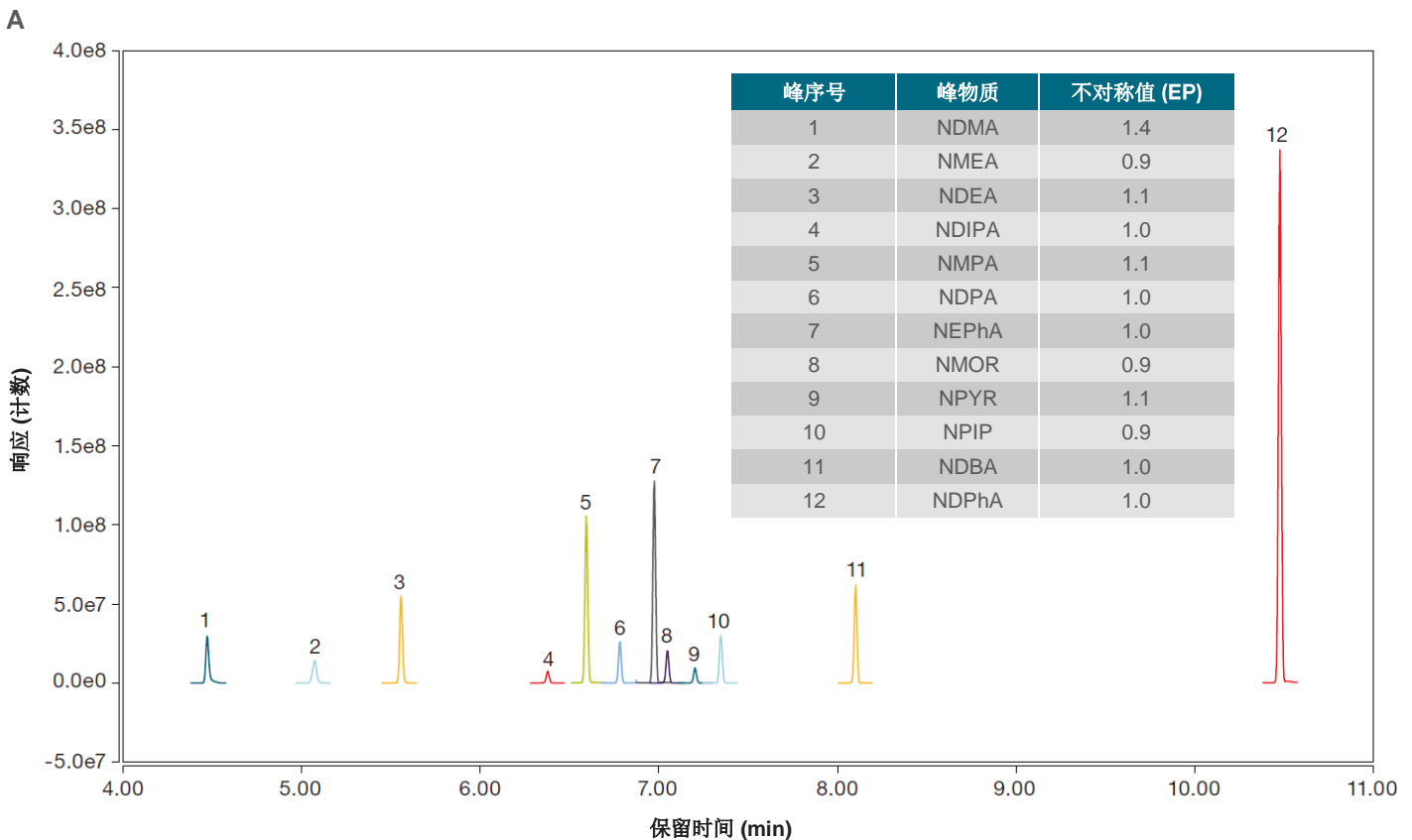


图 2A. 100 ng/mL 标准品中 12 种亚硝胺分析物定量离子对的提取离子色谱图 (EIC)，附表列举了峰不对称因子

B

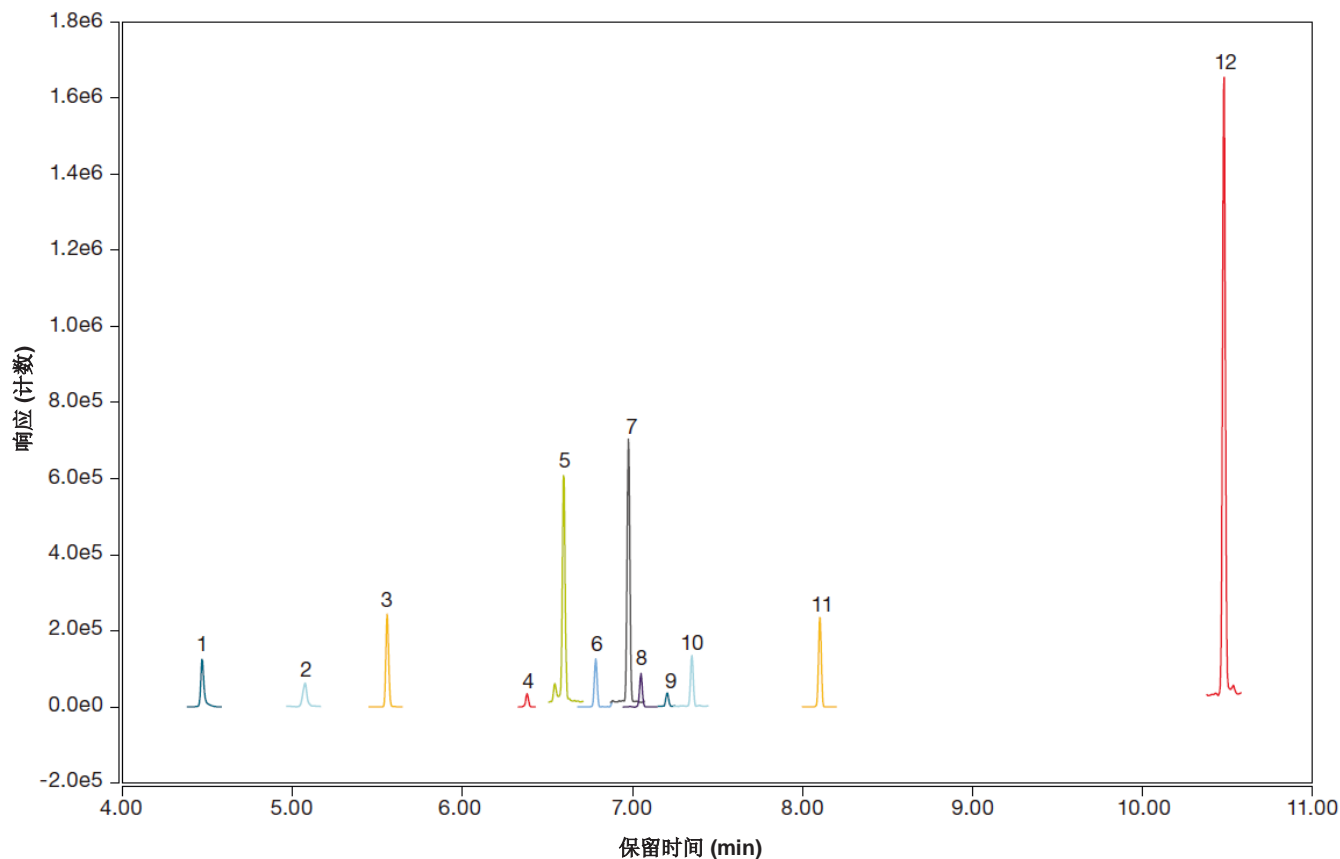


图 2B. 加标 2.5 ng/g 或 5 ng/g 亚硝胺的二甲双胍样品中 12 种亚硝胺分析物定量离子对的提取离子色谱图 (EIC)

线性

平行配制六个浓度点，每个浓度点溶剂标准品溶液进样三次，评估方法的线性范围。

图 3 选取了四种亚硝胺化合物的校准曲线，图 4 是其中 NDMA 从 0.05 ng/mL 到 2 ng/mL 范围的放大图。

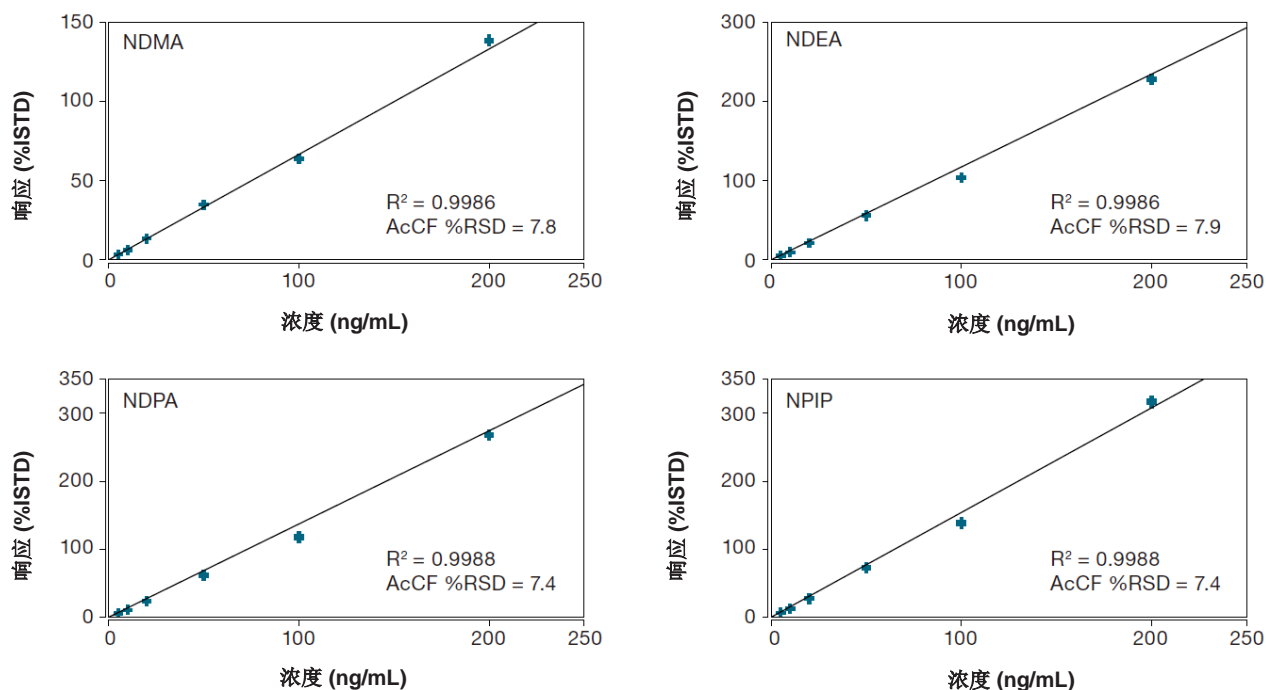


图3. 四种亚硝胺化合物（NDMA、NDEA、NDPA 和 NPIP）的校准曲线，标注 R^2 和 AvCF %RSD 残差值

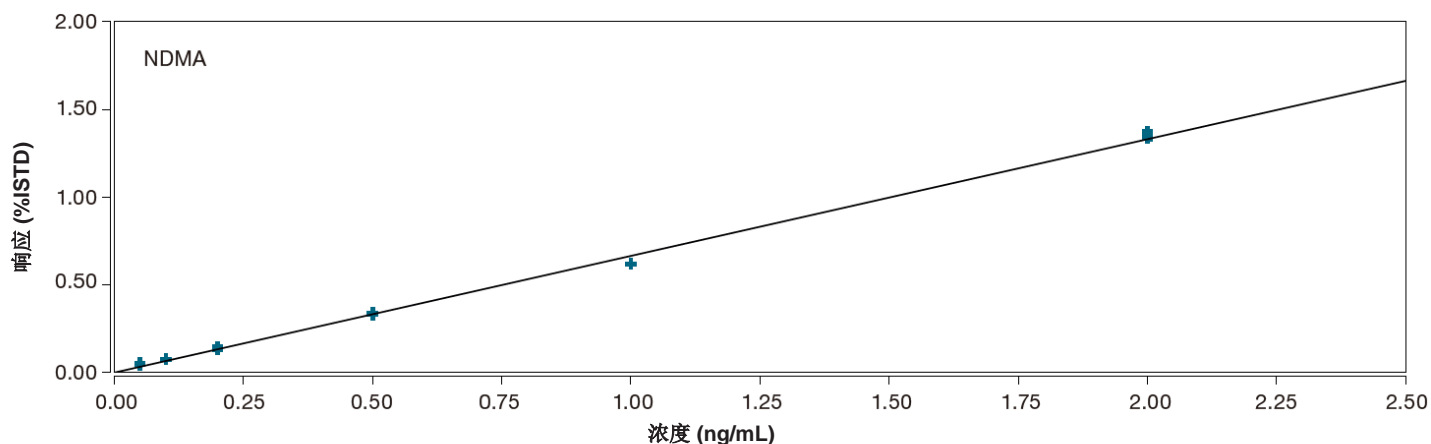


图4. 0.05 ng/mL~ 2 ng/mL NDMA校准曲线放大图

在上述浓度范围内，所有化合物线性响应良好，判定系数 (R^2) > 0.995，平均校准因子 (AvCF) %RSD < 14。12种亚硝胺的结果见表2。

表2. 12种亚硝胺分析物的线性范围、保留时间、AvCF %RSD和 R^2 值

峰名称	线性范围 (ng/mL)	保留时间 (min)	平均校准因子 %RSD	R^2
NDMA	0.05–2,000	4.47	7.8	0.9986
NMEA	0.025–1,000	5.07	9.7	0.9979
NDEA	0.05–2,000	5.56	7.9	0.9986
NDIPA	0.05–1,000	6.38	9.1	0.9981
NMPA	0.025–1,000	6.59	13.6	0.9955
NDPA	0.05–2,000	6.78	7.4	0.9988
NEPhA	0.025–1,000	6.98	10.5	0.9974
NMOR	0.025–1,000	7.05	8.9	0.9983
NPYR	0.1–2,000	7.20	7.2	0.9987
NPIP	0.05–2,000	7.35	7.4	0.9988
NDBA	0.05–2,000	8.10	8.3	0.9985
NDPhA	0.05–250	10.47	4.2	0.9996

灵敏度

为了评估方法检出限 MDLs，对加入最低浓度的标液重复进样 12 次，且满足峰面积 %RSD < 15。然后通过代入进样量、峰面积 %RSD 和 $t = 2.718$ （对应于 99% 置信区间的自由度为 11 (n-1)）进行计算，得到每种化合物的 MDL。结果如图 5 所示，柱上(o.c.) MDL 范围为 35 ~ 184 fg，平均为 94 fg，（对应的浓度 MDL 范围为 0.05 ~ 0.28 ng/g，平均为 0.14 ng/g），MDL 结果显著低于 FDA 规定的 30 ng/g。

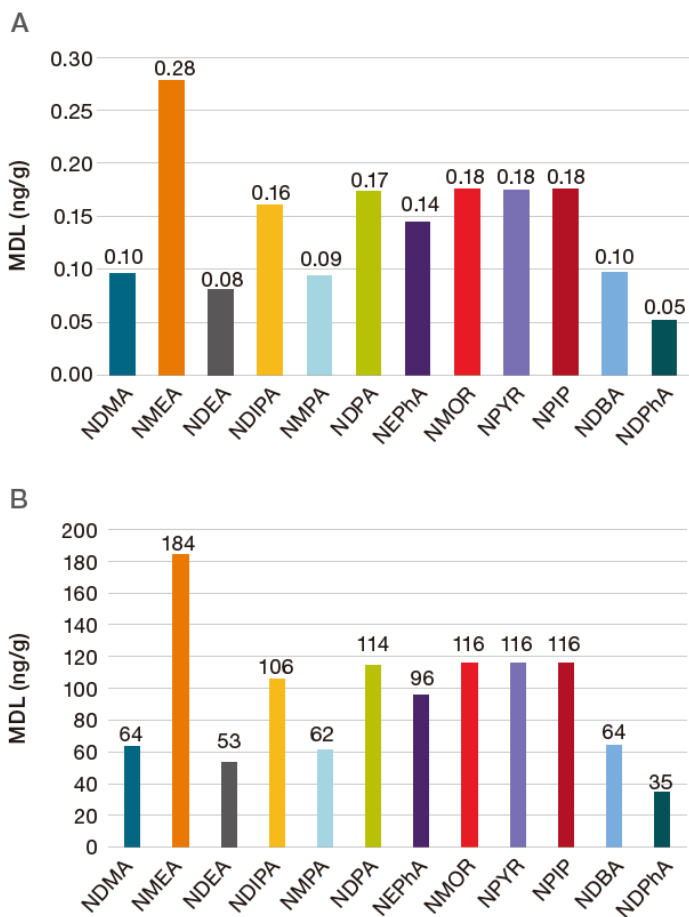


图 5. 12 种亚硝胺分析物的计算 MDL，单位分别为 ng/g (A) 和 fg oc (B)

图 6 显示了加标 MDL 浓度水平三种亚硝胺的提取离子色谱图 (EIC)。离子对比率均在目标离子对比率的 80% ~ 120% 范围内。

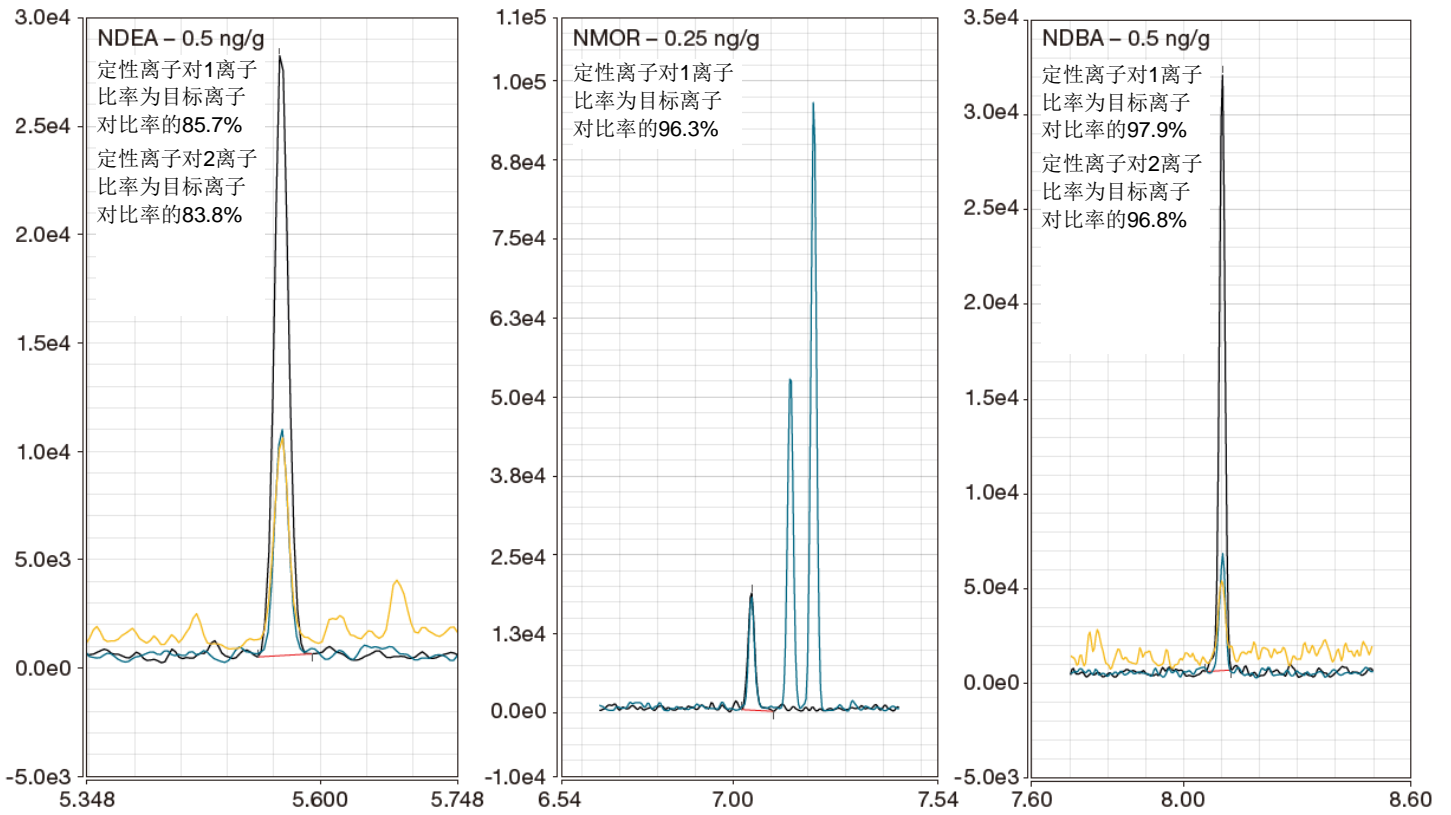


图 6. 二甲双胍样品中 NDEA、NMOR 和 NDBA 的 EIC 图，加标浓度在 MQL 水平，定性离子对比率为目标离子对比率的百分比在图上注释%

精密度和准确度

为了测定精密度和准确度，根据分析物，制备三份在 2.5 ng/g 或 5 ng/g 浓度下的萃取液，萃取前，加入 100 mg 二甲双胍样品，然后按照图 1 的萃取流程进行。

结果如图 7 所示，所有分析物的平均回收率为 70-130%，RSD < 20%，符合 ICH 指南 Q2 (R1) 性能标准。

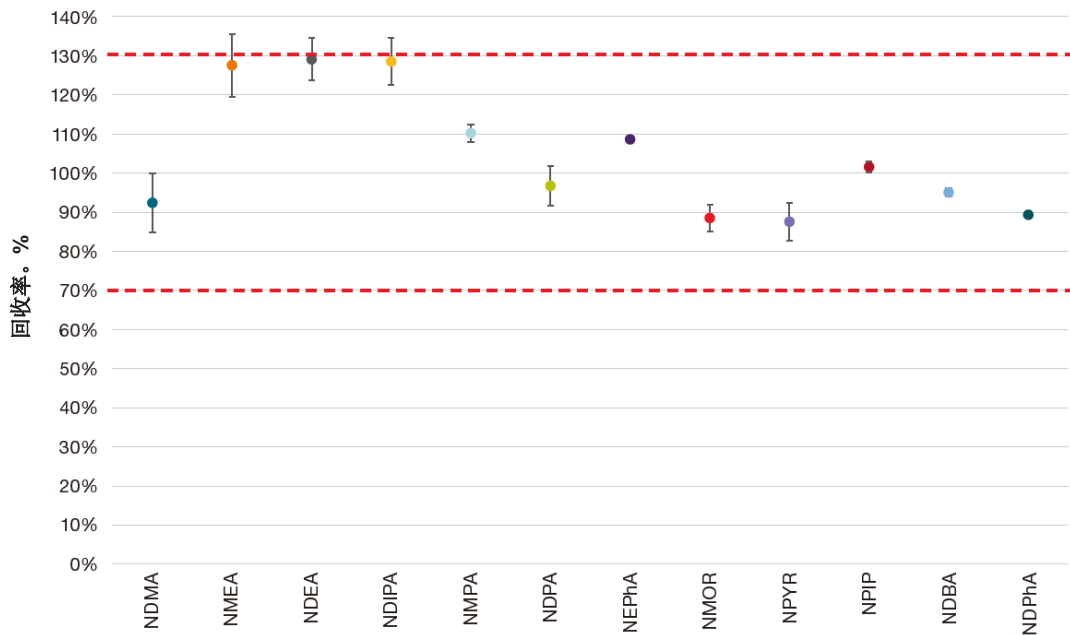


图7. 在一定浓度 (NDMA、NDEA、NDPA、NPYR、NPYP 和 NDBA 的浓度为 5.0 ng/g, NMEA、NDIPA、NMPA、NEPhA、NMOR 和 NDPhA 的浓度为 2.5 ng/g) 下加标的二甲双胍三份样品分析的平均准确度 (以回收率%表示)，图上标注了标准误差线和允许范围 (以虚线表示)

使用 TSQ 9610 NeverVent AEI 离子源扩展线性范围

TSQ 9610 NeverVent AEI 离子源的优势是易拆卸，可在不卸仪器真空的情况下进行离子源维护、灯丝拆卸和 GC 色谱柱更换，能提高实验室工作效率。TSQ 9610 NeverVent AEI 配备的 XLXR 检测器是一种电子倍增检测器，可提供更宽的线性动态范围和更长的使用寿命。

为了测试 XLXR 检测器的性能，将线性最高浓度提高到原先的两倍，来扩展线性范围。每个浓度点平行进样分析三次（以二氯甲烷为溶剂），表 3 列举了计算的判定系数 (R^2) 和残差值（以平均响应因子的 % 相对标准偏差 -AvCF %RSD 表示），平均值分别为 0.9991 和 6.5%，确认使用新电子倍增器可以轻松获得更宽的线性范围。

以 NDMA 和 NDPA 为例，线性范围的整体 (0.05–4,000 ng/mL) 和部分放大图 (B: 0.05–80 ng/mL 和 C: 0.05–2 ng/mL) 如图 8 所示。

可根据低浓度溶剂标液的精密度来评估 IDL⁴。为了评估目标亚硝胺的仪器检出限 IDL，将溶剂标液 (0.01 和 0.025 ng/mL) 重复进样 12 次，乘以 99% 置信度下单侧分布的 t 检验值 ($n=12$, $t=2.718$)，计算柱上(o.c.)检出量和响应的相对标准偏差。结果列举在表 3 中，计算的 IDL 范围为 11 ~ 56 fg o.c.，平均值为 27 fg o.c.。

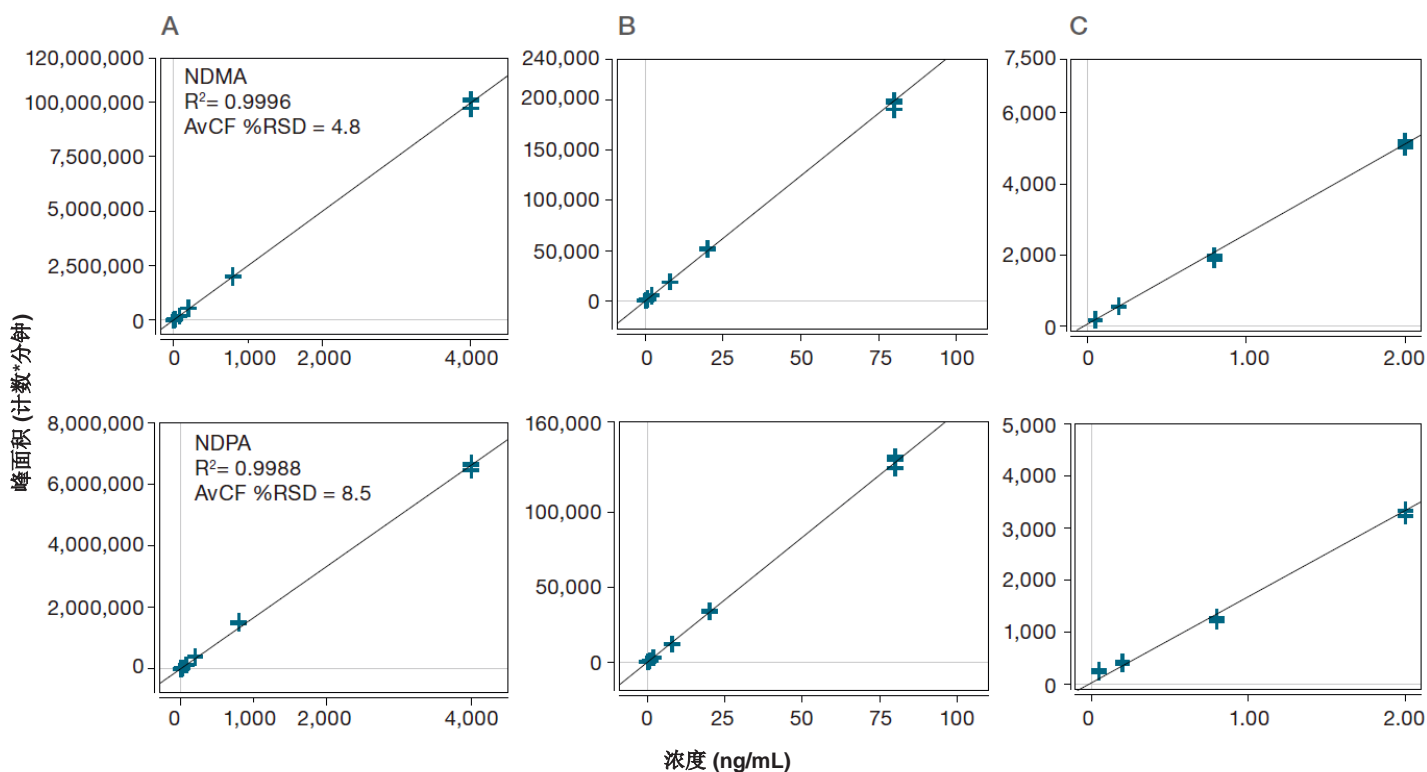


图8. NDMA 和 NDPA 的全范围 (0.05–4,000 ng/mL, 10个浓度点) 标准曲线和部分范围标准曲线放大图 (B: 0.05–80 ng/mL 和 C: 0.05–2 ng/mL)。 R^2 和响应因子的相对标准偏差 (AvCF %RSD) 标注在图中，每个浓度点三次平行分析。

表3.标准曲线范围、判定系数 (R²)、平均校正因子 (AvCF) %RSD 和仪器检出限 (IDL)

峰名称	线性范围 (ng/mL)	保留时间 (min)	平均校正因子 %RSD	R ²	计算 IDL (fg 柱上)
NDMA	0.05–4,000	4.65	4.6	0.9996	40
NMEA	0.05–2,000	5.28	3.7	0.9997	13
NDEA	0.05–4,000	5.78	3.5	0.9998	17
NEIPA	0.025–2,000	6.24	7.2	0.9990	32
NDIPA	0.025–2,000	6.64	11.3	0.9976	56
NMPA	0.025–2,000	6.86	4.6	0.9996	17
NDPA	0.05–4,000	7.05	8.1	0.9988	53
NPYR	0.1–4,000	7.48	9.1	0.9985	15
NIPI	0.05–4,000	7.64	5.7	0.9995	16
NDBA	0.05–4,000	8.41	7.2	0.9991	11

结论

试验结果证明了 Thermo Scientific TRACE 1310 GC 和 Thermo Scientific TSQ 9000 和 TSQ 9610 质谱仪与 Thermo Scientific TraceGOLD TG-1701MS 色谱柱适用于原料药中亚硝胺类化合物的快速分离和分析，其优点如下：

- 11 分钟内快速分离 12 种亚硝胺化合物。
- 灵敏度达亚 ppb 级，MDLs 范围为 35 ~ 184 fg oc (浓度对应为 0.05 ~ 0.18 ng/g)，MQLs 范围为 0.25 ~ 2 ng/g，远低于 FDA 规定的 30 ng/g。

附录 1 – 仪器参数

TRACE 1310 GC 参数

进样体积	2 µL
衬管	一端渐细，带石英棉的 Thermo Scientific™ LinerGOLD™ (P/N 453A1925-UI) 衬管
进样口温度	240 °C
进样模块和进样模式	分流/不分流 SSL, 脉冲不分流
不分流时间 (min)	1
分流流速 (mL/min)	80
脉冲压力 (psi)	25
载气和流速 (mL/min)	He, 1.3
程序升温	40 °C (保持 1 min), 以 25 °C/min 升温到 130 °C, 再以 20 °C/min 升温到 270 °C (保持 2 min)
色谱柱	TraceGOLD TG-1701MS 柱, 30 m × 0.25 mm i.d. × 0.50 µm (P/N 26090-2230)

- 对 2.5 ng/g 或 5 ng/g 的标液平行萃取三次，定量回收率在 70%~130% 范围，RSD <20%，证明方法具备出色的准确度和精密度。
- 此外，TSQ 9610 三重四极杆质谱仪的 XLXR 电子倍增器检测器将亚硝胺检测的线性范围扩展到 4,000 ng/mL，对应柱上进样量从 100 ppb 至 8 ppm。超过 5.5 个数量级的线性范围可确保对低浓度到高浓度杂质的准确定量。
- 变色龙软件可应用于各种实验室，确保实验方法的快速运行。下载 包含运行分析所需一切文件的 eWorkflows 方法包 即可快速运行序列。SmartTune 确保仪器为每个用户提供最佳调谐结果。变色龙软件遵循 CFR GMP 的规范，以满足监管需求。

参考文献

1. World Health Organization (WHO), Information Note Nitrosamine impurities, Update on nitrosamine impurities, https://www.who.int/medicines/publications/drugalerts/InformationNote_Nitrosamine-impurities/en.
2. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use; "ICH Harmonised Guideline– Assessment And Control Of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk, M7(R1)"; March 31, 2017, <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m7-assessment-control-dna-reactive-mutagenic-impurities-pharmaceuticals-limit-potential>
3. International Agency for Research on Cancer; IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Smokeless Tobacco and Some Tobacco-specific N-Nitrosamines, volume 89, pp 200.
4. Thermo Fisher Scientific, Technical Note 10499: Practical Determination and Validation of Instrument Detection Limit of Thermo Scientific™ ISQ™ LT Single Quadrupole GC-MS. <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/TN-10494-GC-MS-ISQ-LT-Single-Quadrupole-TN10494-EN.pdf>

附录 1—仪器参数 (续)

TSQ 9000 MS参数	
传输线温度	270 °C
电离源	高级电子电离源 (AEI)
离子源温度	340 °C
电子能量	50 eV
发射电流	50 μ A
采集模式	Time-SRM

附录 2

名称	保留时间 (min)	峰窗 (min)	母离子 (<i>m/z</i>)	产物离子 (<i>m/z</i>)	碰撞能 (eV)	驻留时间优先级
NDMA- ¹³ CD ₆	4.44	1	82.1	32.1	15	Normal
NDMA- ¹³ CD ₆	4.44	1	82.1	48.1	15	Normal
NDMA- ¹³ CD ₆	4.44	1	82.1	52.2	5	Normal
NDMA	4.46	1	74.1	42.1	15	High
NDMA	4.46	1	74.1	43.1	10	High
NDMA	4.46	1	74.1	44.1	5	High
NMEA	5.06	1	88.1	42.1	15	High
NMEA	5.06	1	88.1	43.1	5	High
NMEA	5.06	1	88.1	71.1	5	High
NDEA	5.55	1	102.1	44.1	10	High
NDEA	5.55	1	102.1	56.1	15	High
NDEA	5.55	1	102.1	85.1	5	High
<i>N</i> -亚硝基二异丙胺(NDIPA)	6.38	1	130.1	41.1	10	High
<i>N</i> -亚硝基二异丙胺 (NDIPA)	6.38	1	130.1	42.1	10	High
<i>N</i> -亚硝基- <i>N</i> -甲基- <i>N</i> -苯胺(NMPA)	6.61	1	77	50.1	30	High
<i>N</i> -亚硝基- <i>N</i> -甲基- <i>N</i> -苯胺 (NMPA)	6.61	1	77	51.1	10	High
<i>N</i> -亚硝基- <i>N</i> -甲基- <i>N</i> -苯胺 (NMPA)	6.61	1	106	51.1	30	High
<i>N</i> -亚硝基- <i>N</i> -甲基- <i>N</i> -苯胺 (NMPA)	6.61	1	106	77.1	10	High
NDPA-D ₁₄	6.73	1	78.1	46.1	10	Normal
NDPA-D ₁₄	6.73	1	110.1	78.2	5	Normal
NDPA-D ₁₄	6.73	1	144.2	126.3	5	Normal
NDPA	6.78	1	70.1	41.1	10	High
NDPA	6.78	1	130.1	43.1	10	High
NDPA	6.78	1	130.1	113.2	5	High
<i>N</i> -亚硝基- <i>N</i> -乙基- <i>N</i> -苯胺(NEPhA)	6.97	1	77	51.1	10	High
<i>N</i> -亚硝基- <i>N</i> -乙基- <i>N</i> -苯胺 (NEPhA)	6.97	1	106	77.1	10	High
<i>N</i> -亚硝基- <i>N</i> -乙基- <i>N</i> -苯胺 (NEPhA)	6.97	1	120	51.1	30	High
<i>N</i> -亚硝基- <i>N</i> -乙基- <i>N</i> -苯胺 (NEPhA)	6.97	1	120	77.1	20	High

附录 2 – (续)

名称	保留时间 (min)	峰窗 (min)	母离子 (m/z)	产物离子 (m/z)	碰撞能 (eV)	驻留时间优先级
NMOR	7.04	1	116.1	56.1	10	High
NMOR	7.04	1	116.1	86.1	5	High
NPYR	7.20	1	100.1	43.1	5	High
NPYR	7.20	1	100.1	55.1	5	High
NPYR	7.20	1	100.1	70.1	5	High
NPYR-D ₈	7.21	1	122.1	49.1	10	Normal
NPYR-D ₈	7.21	1	122.1	92.2	5	Normal
NPYR-D ₈	7.21	1	122.1	105.1	5	Normal
NPIP	7.34	1	114.1	41.1	10	High
NPIP	7.34	1	114.1	84.2	5	High
NPIP	7.34	1	114.1	97.1	5	High
NDBA	8.10	1	116.1	99.2	5	High
NDBA	8.10	1	158.2	99.2	5	High
NDBA	8.10	1	158.2	141	5	High
<i>m</i> -亚硝基二苯胺 (NDPhA)	10.48	1	167	166.1	10	High
<i>m</i> -亚硝基二苯胺 (NDPhA)	10.48	1	168	167.1	10	High
<i>m</i> -亚硝基二苯胺 (NDPhA)	10.48	1	169	168.1	10	High

如需了解更多信息，请访问 thermofisher.com

仅供研究使用，不用于诊断过程。© 2021 Thermo Fisher Scientific Inc. 保留所有权利。所有商标均为 Thermo Fisher Scientific 及其子公司所有。此信息作为 Thermo Fisher Scientific 产品功能的示例提供。不鼓励以任何可能侵犯他人知识产权的方式使用这些产品。规格、条款和价格可能会发生变化。并非所有产品都在所有国家/地区有货，详情请咨询当地的销售代表。AN000173-EN 0921S