应用简报

制药

使用 Agilent Ultivo 三重四极杆液质联用系统对氯沙坦钾中的 NMBA 进行定量分析

作者

胡楠
安捷伦科技（中国）有限公司

摘要

本文介绍了采用 Agilent Ultivo 三重四极杆液质联用系统检测氯沙坦钾中的亚硝胺类杂质 N-亚硝基-N-甲基-4-氨基丁酸 (NMBA) 的方法。该方法采用常规 ESI 源，即可获得满足检测要求的分析结果，且方法简单、特异性高、灵敏度可达 0.005 ppm，大大优于 FDA 官网公布的限量要求，非常适用于对氯沙坦钾类产品中的 NMBA 进行快速、准确的定量分析。

前言

2019 年 3 月 1 日，美国食品药品监督管理局 (FDA) 在官网[1] 发布公告，对用于治疗高血压和心力衰竭的多种通用血管紧张素 II 受体阻滞剂 (ARB) 药品自愿召回。导致此次召回的主要原因是发现其中含有 NMBA 杂质，这是在 ARB 药物中检测到的第三种亚硝胺类遗传毒性杂质。

NMBA 全称 N-亚硝基-N-甲基-4-氨基丁酸 (N-nitroso-N-methyl-4-aminobutyricacid，CAS 号 61445-55-4），结构如图 1 所示，属于亚硝胺类遗传毒性杂质。根据 FDA 初步评估，NMBA 暴露患者的癌症风险增加似乎与 N-亚硝基二甲胺 (NDMA) 暴露相同，但低于 N-亚硝基二乙胺 (NDEA) 暴露的风险。FDA 目前给出的 NMBA 可接受限量是 96 ng/天，在 ARB 药物中临时限度为 0.96 ppm[1]。

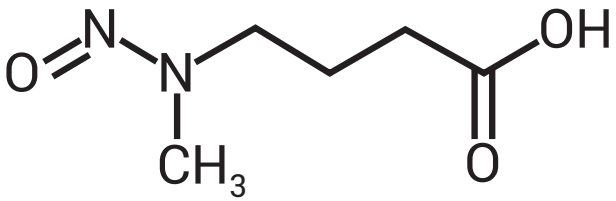


图 1. N-亚硝基-N-甲基-4-氨基丁酸 (NMBA) 结构

关于氯沙坦钾中 NMBA 的检测，欧洲 OMCL 实验室 2019 年 4 月公布了 LC-MS/MS（APCI 源）方法[2]，FDA 于同年六月份公布了 LC-HRMS 方法和 RapidFire-MS/MS 方法[3,4]，而 FDA 这两种方法都不是实验室常规的定量分析平台。

本文采用配置了 ESI 源的 Agilent Ultivo 三重四极杆液质联用系统进行 NMBA 检测。该方法操作简单、灵敏度高、特异性高且重现性好，可有效地应用于氯沙坦钾中 NMBA 的定量分析。

实验部分

试剂和样品

甲醇为质谱级，甲酸为色谱级，购于 Merck；所用实验用水为 Millipore Milli-Q 超纯水系统现制备的高纯去离子水；NMBA 标准品和样品由合作用户提供。

仪器和设备

采用 Agilent 1290 Infinity II 超高效液相色谱系统与 Ultivo 三重四极杆液质联用系统。液相色谱系统配备如下：二元泵（部件号 G7120A）、自动进样器（部件号 G7167B）、柱温箱（部件号 G7116B）。

色谱柱选用 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18（2.1 × 100 mm, 2.7 µm，部件号 695775-902）。另据用户验证，Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C8（2.1 × 100 mm, 2.7 µm，部件号 695775-906）也可以达到相似的效果。

标准溶液制备

精确称取 NMBA 标准品，加水超声溶解，并定量稀释制成每 1 mL 中含 1 mg 目标化合物的高浓度标准品溶液。用水逐级稀释成每 1 mL 中分别包含 0.05、0.1、0.5、1、5、10、50、100 ng 目标化合物的溶液，作为标准品线性系列溶液。线性范围和相关浓度点可根据检测需要自行调整。

样品前处理

取氯沙坦钾样品约 10 mg，加 1 mL 水，摇匀，超声溶解。

液相色谱条件

色谱柱：Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 100 mm, 2.7 µm

流速：0.4 mL/min

柱温：35 °C

流动相：A) 含 0.1% 甲酸的水溶液
B) 甲醇

梯度程序：

时间 (min)	B (%)
0.00	5.00
0.50	5.00
2.50	20.00
3.00	98.00
6.00	98.00
6.10	5.00
7.00	5.00

后运行时间：1 min

质谱条件

离子源：AJS 源

雾化气、干燥气及碰撞气：氮气

雾化气压力：40.0 psi

干燥气温度：300 °C

干燥气流量：7 L/min

毛细管电压：3500 V

鞘气温度：325 °C

鞘气流量：12 L/min

溶剂延迟时间：4.5 min

检测模式：多反应监测 (MRM)

MRM 参数：如表 1 所列

表 1. NMBA 分析所用的 MRM 参数

化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	裂解电压 (V)	碰撞电压 (V)
NMBA	147.1	117.1*	75	2
		87.1		10
		44.2		14

* 定量离子

结果与讨论

色谱分离结果

氯沙坦钾原料药体系相对简单，可采用常规反相色谱体系（C18 或 C8 柱）进行分离。初始高比例水相主要用于洗脱钾盐，避免高浓度盐的离子抑制效应影响回收率。在本研究中所用的色谱条件下，NMBA 的保留时间约为 2.3 分钟。随后的高比例有机相用于洗脱氯沙坦。由于氯沙坦浓度很高，为避免污染质谱系统，建议将流路设置为“引入废液”。

因为受限制的 N-N 键存在顺反结构 (syn and anti conformers)[5]，NMBA 在色谱体系中表现为双峰，本研究中所用的色谱条件可以实现两种异构体的基线分离（图 2）。不过，在 NMBA 定量分析中，需要对两个峰积分并合并峰面积[3]。

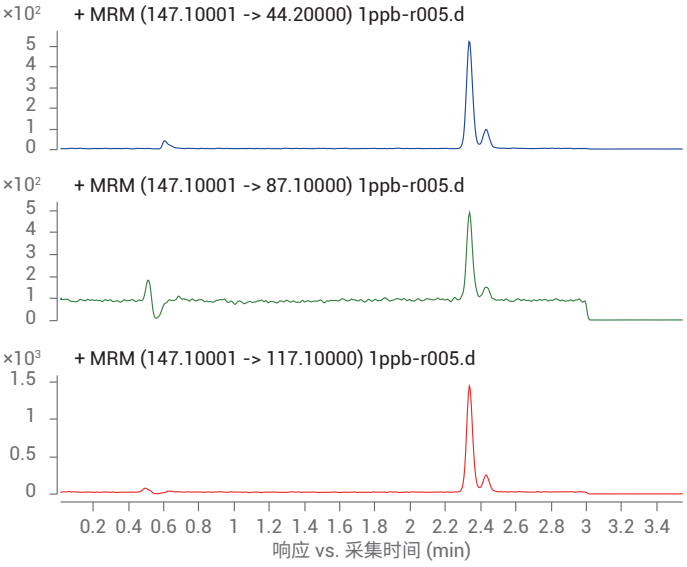


图 2. NMBA 的不同离子通道色谱图（浓度 1 ng/mL），3 分钟后，液相流路设置为“引入废液”

标准曲线与灵敏度

将 NMBA 标准溶液按浓度由低到高进样，在 0.05–100.0 ng/mL 的浓度范围内，NMBA 的线性相关性良好，相关系数 R^2 大于 0.998（图 3），每个浓度点的准确度均在 90%–110% 范围内。

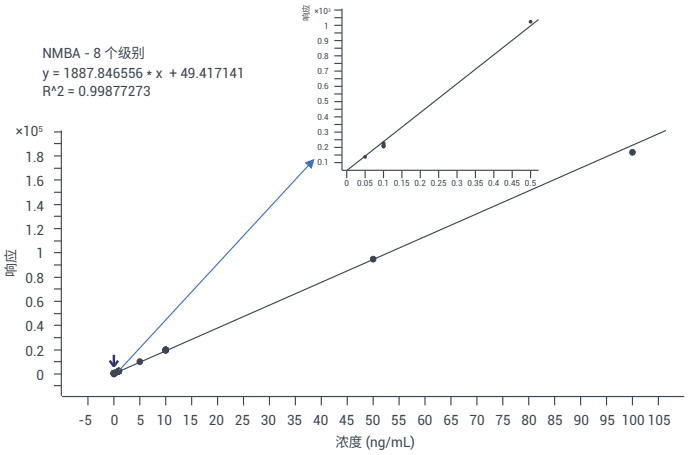


图 3. NMBA 的标准曲线以及低浓度区域放大图

本方法定量下限可达 0.05 ng/mL，信噪比 (peak to peak) 大于 10，如图 4 所示。按照样品 10 mg/mL 的配制浓度比例，本方法的灵敏度可达 0.005 ppm，轻松满足 0.96 ppm 的 FDA 法规限量标准。

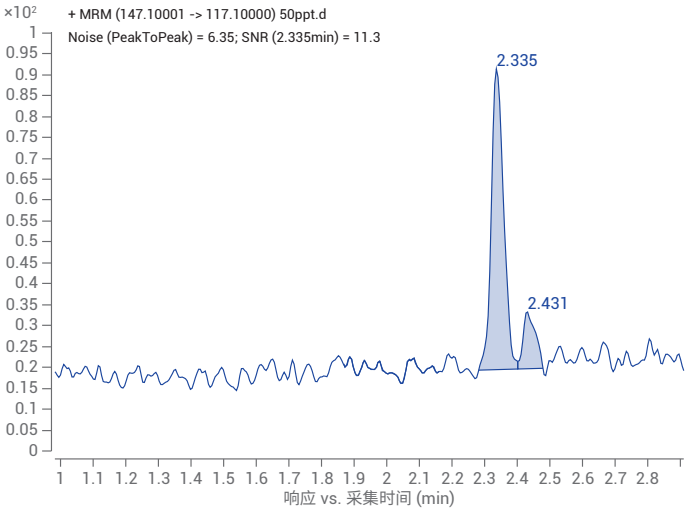


图 4. 0.05 ng/mL NMBA 定量离子色谱图

重现性

分别采用 0.1、1 和 10 ng/mL 标准品溶液代表低、中、高浓度，分别进样 6 次以考察峰面积重复性。所得到的相对标准偏差 (RSD) 分别为 4.54%、1.70% 和 0.49%，表明本方法重现性良好。

加标回收率

本文考察了多批国产氯沙坦钾原料药，NMBA 均低于检测下限，远低于限量要求。分别加标以 API 计 0.01 μg/g、0.1 μg/g 和 1 μg/g 的 NMBA，计算得到的回收率在 80%–110% 之间。

结论

本文采用配备常规 ESI 源的 Ultivo 系统，检测氯沙坦钾中的亚硝胺类杂质 NMBA，方法简单、特异性高、重现性好，且灵敏度大大优于目前 FDA 规定的限量要求。实际检测了多批氯沙坦钾基质，均与 NMBA 杂质得到很好的分离。该方法可准确定量分析低浓度 NMBA 杂质。另外，通过将方法设置为将高浓度药品基质引入废液，可减少对质谱系统的污染。因此，该方法非常适合对大量氯沙坦钾样品中的 NMBA 进行常规定量分析。

参考文献

1. 美国 FDA 官网：www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-updates-and-press-announcements-angiotensin-ii-receptor-blocker-arb-recalls-valsartan-losartan，2019 年 2 月 28 日更新

2. 德国 LGL 方法：LC-MS/MS Method ´190321_NMBA_APCI_POS_waste

3. 美国 FDA LC-HRMS 方法：Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS) Method for the Determination of Six Nitrosamine Impurities in ARB Drugs

4. 美国 FDA RapidFire-MS/MS 方法：Development and validation of a RapidFire-MS/MS method for screening of nitrosamine carcinogen impurities N-Nitrosodimethylamine (NDMA), N-Nitrosodiethylamine (NDEA), N-Nitrosoethylisopropylamine (NEIPA), N-Nitrosodiisopropylamine (NDIPA), N-Nitrosodibutylamine (NDBA) and N-Nitroso-N-methyl-4-aminobutyric acid (NMBA) in ARB drugs

5. U.P. Senthilkumar and R. Jeyaraman, J. Org. Chem., 1992, 57 (22), 6006-6014

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278，400-820-3278（手机用户）

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn



微信搜一搜

安捷伦视界

www.agilent.com

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2020

2020 年 2 月 13 日，中国出版

5994-1792ZHCN

Agilent

Trusted Answers