

使用 Agilent 6470 三重四极杆液质联用系统对沙坦药物中的多种亚硝胺类基因毒性杂质进行定量分析

作者

胡楠
安捷伦科技（中国）有限公司

摘要

本文介绍了采用配置 APCI 源的 Agilent 6470 三重四极杆液质联用系统，同时检测沙坦药物中六种亚硝胺类基因毒性杂质 NDMA、NDEA、NMBA、NEIPA、NDIPA 和 NDBA 的方法。该方法涵盖了欧美药检系统截止到 2019 年 11 月提到的全部亚硝胺类基因毒性杂质，操作简单、特异性高，且灵敏度满足目前限量要求，适用于沙坦类原料药和部分制剂中 6 种亚硝胺类基因毒性杂质的快速筛查和准确定量。

前言

2018 年 7 月，缬沙坦原料药被曝出含有亚硝胺类基因毒性杂质 N-亚硝基二甲胺 (NDMA)，9 月份，该类药物又曝出含有另一种亚硝胺类杂质 N-亚硝基二乙胺 (NDEA)。2019 年 3 月，第三种亚硝胺类杂质 N-亚硝基-N-甲基-4-氨基丁酸 (NMBA) 在氯沙坦钾中检出超标^[1]。

沙坦类降压药的全名是“血管紧张素受体阻断剂”(ARB)。由于此类药物都带有“沙坦”二字，因此俗称“沙坦类降压药”，是目前治疗高血压的一线降压药，使用广泛。亚硝胺 (Nitrosamine) 是一类通式为 $R^1N(-R^2)-N=O$ 的胺化合物，结构如图 1 所示，其大部分成员都属于强致癌物。根据世界卫生组织国际癌症研究机构公布的致癌物清单，从沙坦类降压药中发现的 NDEA、NDMA 属于 2A 类致癌物，即“对人很可能致癌，此类致癌物对人致癌性证据有限，对实验动物致癌性证据充分”^[2]。另外，根据 FDA 的初步评估，NMBA 暴露风险与 NDMA 相同^[1]。

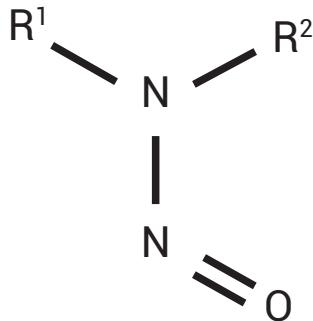


图 1. 亚硝胺类化合物结构通式

目前，关于沙坦类药物中亚硝胺的检测，可以在官网上查到欧洲 OMCL 实验室和 FDA 公布的 GC/MS、LC 和 LC/MS 方法。其中，FDA 在 2019 年 8 月公布了 LC-HRMS 方法和 RapidFire-MS/MS 方法^[3, 4]，对沙坦类药物中可能含有的 6 种亚硝胺类基因毒性杂质进行筛查和半定量分析。FDA 提出，除先前检出的 NDEA、NDMA 和 NMBA 以外，根据文献报道和工艺研究，还有三种亚硝胺类杂质可能存在于 ARB 药物中，分别是 N-亚硝基乙基异丙基胺 (N-nitrosoethylisopropylamine, NEIPA)、N-亚硝基二异丙基胺 (N-nitrosodiisopropylamine, NDIPA) 和 N-亚硝基二丁基胺 (N-nitrosodibutylamine, NDBA)。鉴于 LC-HRMS 和 RapidFire-MS/MS 配置比较特殊，且无法用于准确定量分析，我们参考 FDA 方法，开发出采用常规 LC-APCI-QQQ 配置同时检测沙坦药物中 6 种亚硝胺类基因毒性杂质的方法。所开发的方法操作简单、特异性高，且灵敏度满足目前限量要求。

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；6 种亚硝胺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 6470 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 PFP (2.1 × 100 mm, 2.7 μm, 部件号 695775-408)。如果沙坦类样品色谱保留较强（如缬沙坦和厄贝沙坦），也可以用 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 (2.1 × 100 mm, 2.7 μm, 部件号 695775-902) 进行分离。

标准溶液制备

精确称取 6 种亚硝胺标准品，加甲醇超声溶解，并定量稀释制成每 1 mL 约含 10 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 中分别包含约 0.1、0.5、1、5、10、50、100、500、1000 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

将 100 mg 沙坦类样品研磨后，溶于 10 mL 水中，用超声提取 10 分钟，过滤后分析。

对于水溶性欠佳的沙坦样品，先用大约 2 mL 甲醇溶解后，经超声提取后，用水稀释到 10 mL，再次超声提取 10 分钟，滤除沉淀后进行分析。最终浓度以 API 计为 10 mg/mL。

液相色谱条件

色谱柱： InfinityLab Poroshell PFP, 2.1 × 100 mm, 2.7 μm

流速： 0.4 mL/min

柱温： 40 °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	10.00
	1.50	10.00
	7.00	55.00
	10.00	55.00
	10.50	90.00
	13.50	90.00
	15.00	10.00

质谱条件

离子源：	APCI 源
雾化气、干燥气及碰撞气：	氮气
雾化气压力：	35.0 psi
干燥气温度：	250 °C
干燥气流量：	4 L/min
蒸发室温度：	350 °C
VCap 电压：	1500 V
电晕针电流：	6 μA
检测模式：	多反应监测 (MRM)
MRM 参数：	如表 1 所列

表 1. 6 种亚硝胺分析所用的 MRM 参数

化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碎裂电压 (V)	碰撞电压 (V)	极性
NDBA	159.2	41.1	80	21	正
NDBA	159.2	57.1*	80	12	正
NDBA	159.2	103.1	80	8	正
NDEA	103.1	47.1	70	13	正
NDEA	103.1	75.1*	70	7	正
NDIPA	131.1	47.1	70	12	正
NDIPA	131.1	89.1*	70	4	正
NDMA	75.1	43.1*	90	16	正
NDMA	75.1	58	90	10	正
NEIPA	117.1	47.1	70	14	正
NEIPA	117.1	75*	70	6	正
NMBA	147.1	44.2	75	14	正
NMBA	147.1	87.1	75	10	正
NMBA	147.1	117.1*	75	2	正

* 定量离子

结果与讨论

色谱分离结果

本文参考 FDA 方法，基于窄内径 Poroshell 系列色谱柱低柱压、高柱效的优势，适当降低了流速，缩短了梯度时间和平衡时间。不同沙坦类药物在反相色谱体系中保留能力不同。因此，本文分别对缬沙坦和厄贝沙坦进行了测试，两者在常规 C18 色谱柱上可以分离。而氯沙坦钾保留相对较弱，需要采用 PFP 色谱柱以改善 API 的保留特性，确保分子量较大的 NDBA 获得理想的回收率。

洗脱梯度起始采用高比例水相，需要注意复溶样品的有机相不宜过高，否则会影响分子量较小的 NDMA 的峰形和灵敏度。梯度后半段采用高比例有机相洗脱沙坦类 API。由于 API 浓度很高，为避免污染质谱系统，建议此时将流路设置为“引入废液”。

在本文中所用的色谱条件下，6 种亚硝胺之间及杂质与 API 之间分离度良好，典型的 TIC 色谱图如图 2 所示。因为受限制的 N-N 键存在顺反结构 (syn and anti conformers)^[5]，NMBA 和 NEIPA 在色谱体系中表现为双峰，在定量分析时，需要对两个峰积分并合并峰面积^[1]。

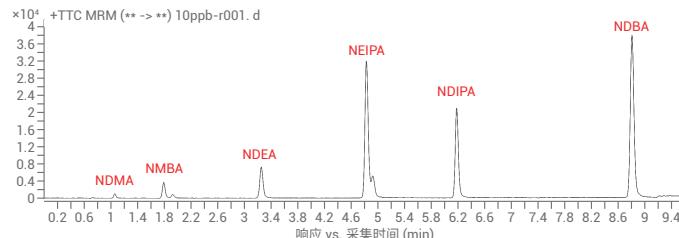


图 2. 10 ng/mL 的 6 种亚硝胺加标实验 TIC 色谱图，9.2 分钟后，质谱离子源“引入废液”

标准曲线与灵敏度

将 6 种亚硝胺标准溶液按浓度由低到高进样，在 0.1–1000.0 ng/mL 的浓度范围内，6 种亚硝胺的线性相关性良好，相关系数 R^2 均大于 0.99 (图 3)，每个浓度点的准确度均在 80%–120% 范围内。

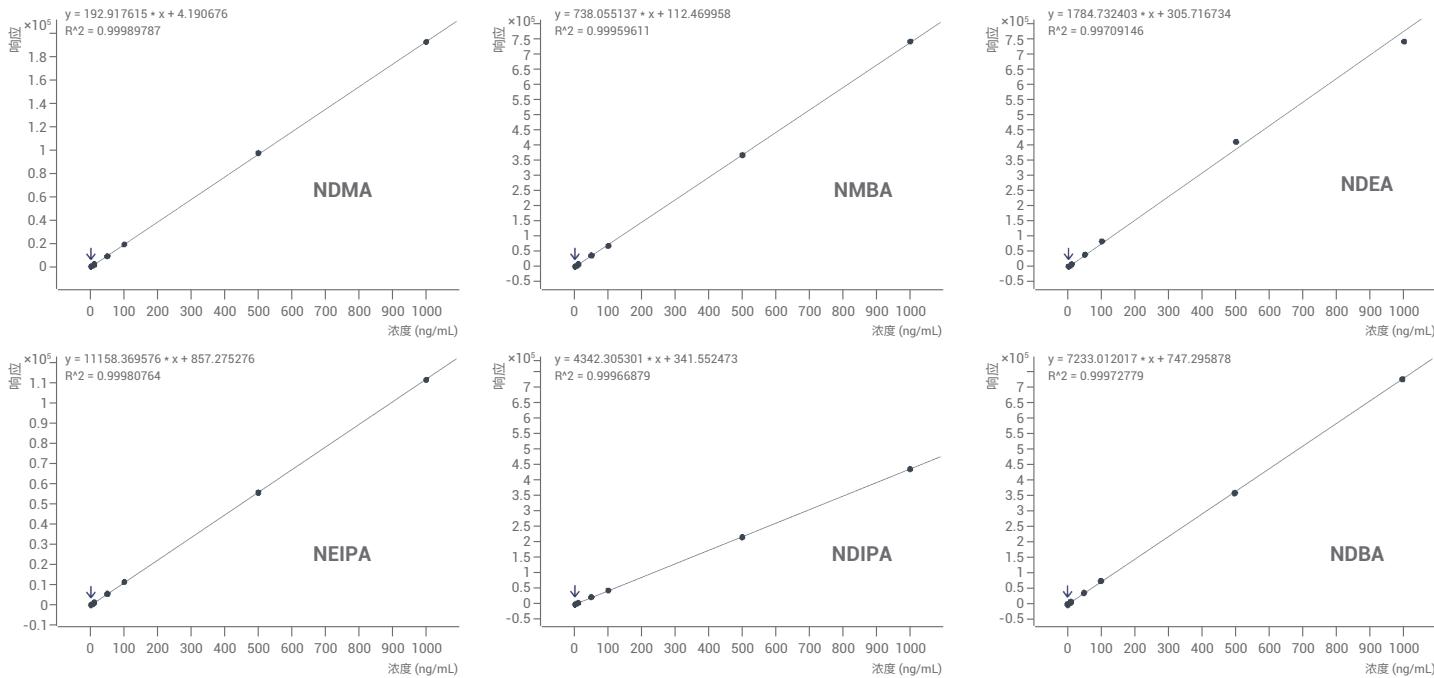


图 3. 6 种亚硝胺的标准曲线

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。

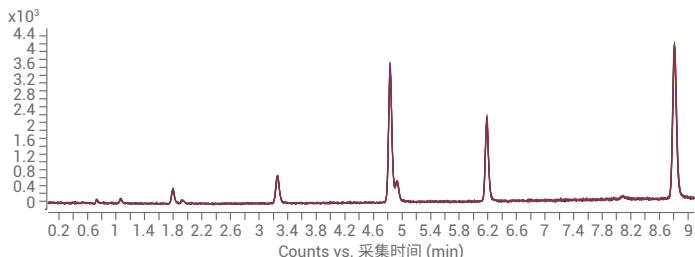


图 4. 1 ng/mL 的 6 种亚硝胺标准品溶液重复进样 6 次所得到的叠加 TIC 图

加标回收率

以用户提供的氯沙坦钾和厄贝沙坦原料药做基质添加实验，分别加标以 API 计 0.1 $\mu\text{g/g}$ 和 1 $\mu\text{g/g}$ 的 6 种亚硝胺杂质，计算得到的回收率在 90%–110% 之间。

表 2. 不同沙坦原料药的加标回收结果

	加标浓度	NDMA	NMBA	NDEA	NEIPA	NDIPA	NDDBA
氯沙坦钾	基质 (ng/mL)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	0.1 $\mu\text{g/g}$ (%)	94.7	100.9	90.3	96.1	97.9	95.9
	1 $\mu\text{g/g}$ (%)	96.0	107.8	97.7	98.4	99.9	97.6
厄贝沙坦	基质 (ng/mL)	3.50	N.D.	3.58	N.D.	N.D.	N.D.
	0.1 $\mu\text{g/g}$ (%)	103.3	97.5	94.3	100.7	92.4	95.1
	1 $\mu\text{g/g}$ (%)	96.8	104.8	103.3	100.3	101.9	98.9

结论

根据 FDA 的报告，沙坦类药物中含有或可能含有 6 种亚硝胺类基因毒性杂质，即 NDMA、NDEA、NMBA、NEIPA、NDIPA 和 NDBA。本文采用配备 APCI 源的 6470 三重四极杆液质联用系统，同时检测上述 6 种亚硝胺类化合物，方法简单、特异性高、重现性好，灵敏度满足目前 FDA 规定的限量要求。实验中测试了不同的沙坦基质，采用适合的色谱柱和色谱方法，可以很好地满足灵敏度和回收率要求。另外，通过将方法设置为将高浓度药品基质引入废液而不引入离子源，可减少对质谱系统的污染。该方法适用于对沙坦类原料药和部分制剂中的 6 种亚硝胺类基因毒性杂质进行快速筛查和准确的定量分析。

参考文献

1. 美国 FDA 官网：<https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-updates-and-press-announcements-angiotensin-ii-receptor-blocker-arb-recalls-valsartan-losartan>
2. 世界卫生组织国际癌症研究机构致癌物清单：
<http://samr.cfda.gov.cn/WS01/CL1991/215896.html>
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

Q 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
5994-1793ZHCN