

使用 Ultivo 三重四极杆液质联用系统 测定亚硝酸胺杂质

检测药物生产过程中受监管的遗传毒性杂质

作者

Chander Mani 和
Saikat Banerjee
安捷伦科技有限公司

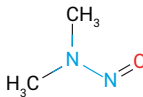
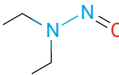
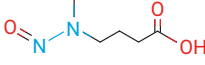
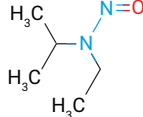
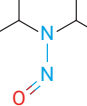
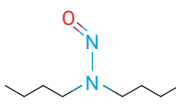
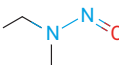
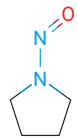
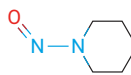
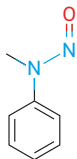
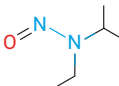
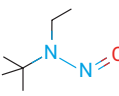
摘要

最新的研究结果表明，某些血管紧张素 II 受体阻滞剂 (ARB) 药物产品含有致癌性亚硝酸胺杂质^[1]。因此，这类产品有许多被召回，表明行业迫切需要一种常规分析方法，来检出高于目标浓度的致癌性亚硝酸胺杂质。本应用简报介绍了基于灵敏的 Agilent Ultivo LC/TQ 的方法工作原理，它不仅适用于美国食品药品监督管理局 (FDA) 列出的六种亚硝酸胺，还适用于同时检测六种其他可能致突变的亚硝酸胺杂质。

前言

召回缬沙坦、氯沙坦和厄贝沙坦等 ARB 药物的宣布使 N-亚硝基杂质成为 FDA 和欧洲药品管理局 (EMA) 等监管机构关注的重点。亚硝胺杂质是这些药品生产过程中产生的痕量副产品。这些杂质被归类为疑似致癌物 (即潜在遗传毒性杂质)。本应用简报介绍了使用 Ultivo 三重四极杆液质联用系统进行基于 LC/MS 的分析方法。在极低检测限下, 对 12 种亚硝胺化合物进行了全面分析。所有亚硝胺杂质的分子量都很小, 从 74 到 158 不等。杂质化合物包括:

- N-亚硝基二甲胺 (NDMA)
- N-亚硝基二乙胺 (NDEA)
- N-亚硝基-4-甲基-4-氨基丁酸 (NMBA)
- N-亚硝基异丙胺 (NEIPA)
- N-亚硝基二异丙胺 (NDIPA)
- N-亚硝基二丁胺 (NDBA)
- N-亚硝基甲乙胺 (NMEA)
- N-亚硝基吡咯烷 (NPyR)
- N-亚硝基哌啶 (NPIP)
- N-甲基-N-亚硝基苯 (NMPPhA)
- N-异丙基亚硝胺 (NMIPA)
- N-叔丁基-N-乙基亚硝胺

亚硝胺化合物	化学结构
NDMA	
NDEA	
NMBA	
NEIPA	
NDIPA	
NDBA	
NMEA	
NPyR	
NPIP	
NMPPhA	
NMIPA	
N-叔丁基-N-乙基亚硝胺	

实验部分

化学品与试剂

本研究使用的 12 种亚硝酸标准品均来自 PS3 Labs LLP, Hyderabad, TS, India。LC/MS 分析级溶剂（如甲醇、水）购自 Honeywell。分析中用到的甲酸购自 Fluka。

数据分析

用 Agilent MassHunter 软件 1.1 版对 Ultivo 采集的数据进行分析。利用 Agilent MassHunter Acquisition Optimizer 软件获得 MS/MS 离子对并对其进行优化，在进样分析各种化合物的纯溶液（浓度为 1000 ng/mL，在流动注射模式下进样量为 1 μ L）时确定最佳的母离子、子离子、碎裂电压和碰撞能量。

液相色谱配置和参数

表 1. UHPLC 配置和设置

参数	值												
仪器	Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A) Agilent 1290 Infinity II Multisampler (G7167B) Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱 (G7116B)												
进样针清洗	甲醇:水/80:20												
样品稀释剂	水												
Multisampler 温度	6 °C												
进样量	40 μ L												
分析柱	Agilent InfinityLab Poroshell HPH C18, 2.1 \times 100 mm, 1.9 μ m (部件号 695675-702)												
柱温	40 °C												
流动相 A	0.2% 甲酸水溶液												
流动相 B	甲醇												
流速	0.4 mL/min												
梯度	<table border="1"><thead><tr><th>时间 (min)</th><th>%B</th></tr></thead><tbody><tr><td>0</td><td>1</td></tr><tr><td>2</td><td>13</td></tr><tr><td>5.5</td><td>80</td></tr><tr><td>8</td><td>95</td></tr><tr><td>10</td><td>95</td></tr></tbody></table>	时间 (min)	%B	0	1	2	13	5.5	80	8	95	10	95
时间 (min)	%B												
0	1												
2	13												
5.5	80												
8	95												
10	95												
停止时间	10 min												
后运行时间	3 min												

三重四极杆质谱仪配置和参数

表 2. MS 配置和离子源设置

参数	值
仪器	Agilent Ultivo 三重四极杆质谱仪
离子源	大气压化学电离 (APCI)
MS/MS 模式	动态 MRM (dMRM)
离子模式	正
干燥气温度	300 °C
干燥气流速	6 L/min
雾化器压力	55 psi
APCI 加热器	350 °C
APCI 喷雾针, 正离子模式	4 μ A
正离子化的毛细管电压	3000 V
MS1/MS2 分辨率	0.7/0.7 (unit/unit)
驻留时间	可变

分析物的 MS/MS 化合物信息

表 3. Ultivo 中动态 MRM 模式下的详细 MRM 设置

化合物	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	保留时间 (min)	保留时间窗口 (min)	碎裂电压 (V)	碰撞能量 (V)	极性
NDEA	103.1	75.1	3.484	1.5	85	8	+
NDEA	103.1	47.1	3.484	1.5	85	16	+
NDMA	75.1	58	1.143	1.24	65	10	+
NDMA	75.1	43.1	1.143	1.24	65	17	+
NMBA	147.1	44.2	2.247	1.2	50	7	+
NMBA	147.1	87.2	2.247	1.2	50	7	+
NEIPA	117.1	75.1	4.325	1.0	70	7	+
NEIPA	117.1	47.1	4.325	1.0	70	15	+
NDIPA	131.1	89.1	4.916	1.0	50	5	+
NDIPA	131.1	43.1	4.916	1.0	50	7	+
NDBA	159.1	57.2	6.096	1.0	70	7	+
NDBA	159.1	41.1	6.096	1.0	70	24	+
NMEA	89.1	61.1	2.109	1.37	75	10	+
NMEA	89.1	43.1	2.109	1.37	75	10	+
NPyR	101.1	55.1	2.248	1.43	55	18	+
NPyR	101.1	41	2.248	1.43	55	26	+
NPIP	115.1	69.1	3.809	1.0	85	9	+
NPIP	115.1	41.2	3.809	1.0	85	26	+
NMPhA	137	66.1	5.029	1.32	45	18	+
NMPhA	137	107	5.029	1.32	45	10	+
NMIPA	103.1	61	3.358	1.0	60	8	+
NMIPA	103.1	43	3.358	1.0	60	8	+
N-叔丁基-N-乙基亚硝酸胺	131	75.1	4.897	1.0	40	4	+
N-叔丁基-N-乙基亚硝酸胺	131	57.1	4.897	1.0	40	6	+

结果与讨论

校准浓度范围为 0.05–100 ng/mL，详细信息汇总于表 4 中。所有分析物的 R^2 值均大于 0.996，在整个浓度范围内表现出线性响应。图 1 显示了 Ultivo TQ 的代表性叠加 dMRM 色谱图，展示了所有 12 种亚硝胺化合物在 10 ng/mL 下的洗脱。

表 4. Agilent Ultivo TQ 的结果汇总。数据包括信噪比 (S/N)、计算得到的 LOQ、回归系数和校准曲线拟合结果。所有标准品均采用 1/x 加权的校准曲线

化合物	Agilent Ultivo TQ					
	LOD (ng/mL)	LOD (S/N*)	LOQ (ng/mL)	LOQ (S/N)	R^2	线性范围 (ng/mL)
NDMA	0.05	9.74	0.1	13.49	0.997	0.05–100
NDEA	0.025	22.68	0.05	53.82	0.998	0.025–100
NMBA	0.05	23.88	0.1	31.18	0.998	0.05–100
NEIPA	0.025	57.37	0.05	69.67	0.999	0.025–100
NDIPA	0.025	15.72	0.05	45.18	0.998	0.025–100
NDBA	0.05	225.18	0.1	323.11	0.999	0.025–100
NMEA	0.075	7.84	0.1	12.10	0.999	0.1–100
NPyr	0.075	30.02	0.1	41.72	0.999	0.1–100
NPIP	0.1	11.60	0.15	14.11	0.998	0.15–100
NMPhA	0.075	29.58	0.1	45.34	0.994	0.075–100
NMIPA	0.025	42.17	0.05	208.86	0.996	0.025–100
N-叔丁基-N-乙基亚硝胺	0.075	54.92	0.1	81.62	0.999	0.075–100

* 采用自动均方根算法计算 S/N，使用 Agilent MassHunter 定量分析 10 软件选择噪音参比作为样品

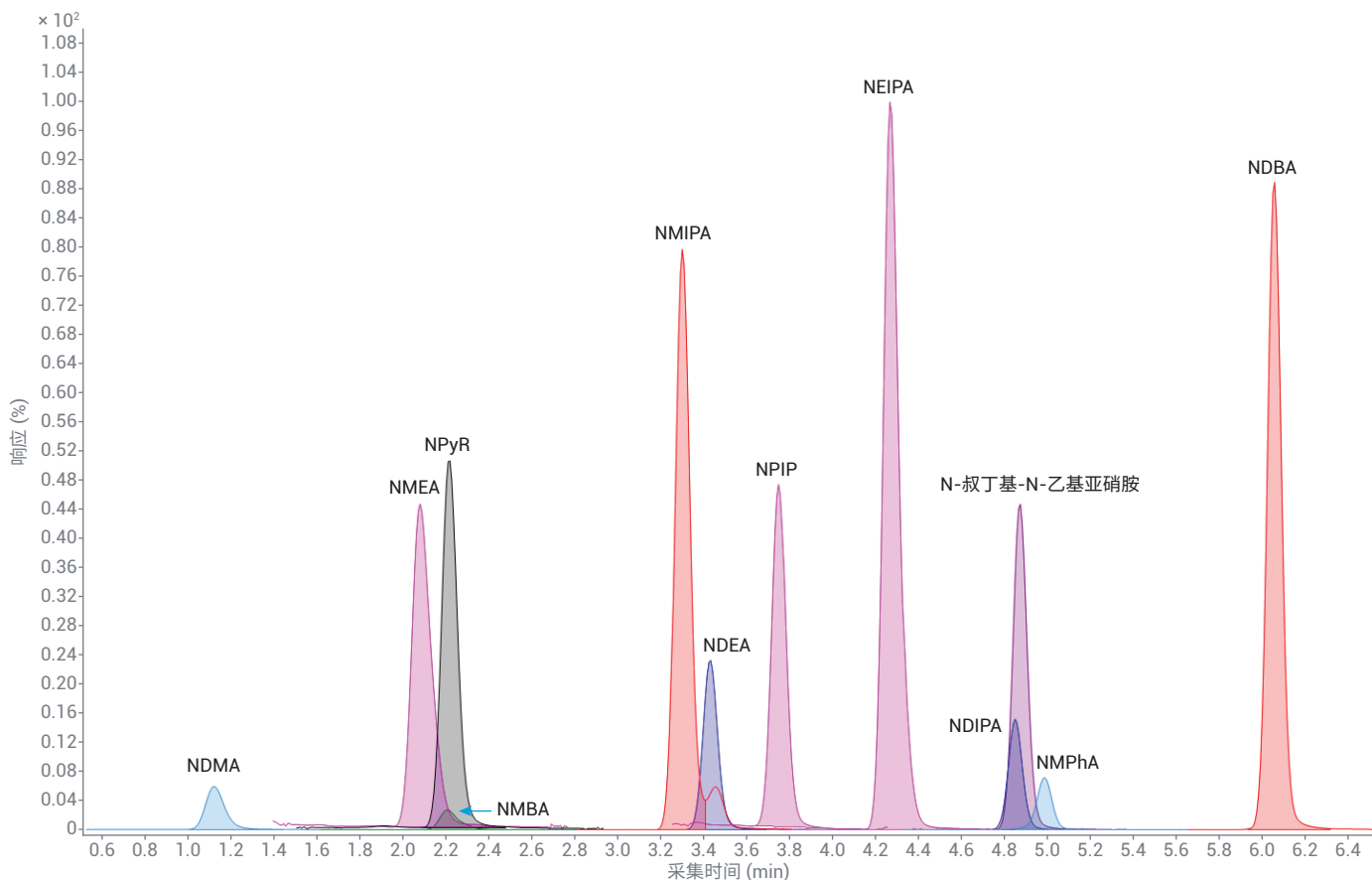


图 1. 显示 12 种亚硝胺化合物洗脱情况的 dMRM 叠加色谱图

准确度和重现性

12 种化合物的校准曲线表明，定量限 (LOQ) 下的准确率在预期浓度限的 $\pm 20\%$ 以内。表 4 给出了测量的线性校准范围的检测限、定量限和计算统计数据，表明

所有校准点的重现性 CV 小于 15%。表 5 详细总结了不同浓度下的结果准确性和重现性。图 2 显示了 Ultivo LC/TQ 系统生成的代表性校准曲线。

表 5. 利用 Agilent Ultivo LC/TQ 在不同浓度下得到的准确度和重现性 (n = 3)

浓度 (ng/mL)	NDMA		NDEA		NMBA		NEIPA		NDIPA		NDBA	
	平均值	CV	平均值	CV	平均值	CV	平均值	CV	平均值	CV	平均值	CV
0.1	95.53	5.63	96.23	5.78	84.73	0.00	96.37	5.82	107.9	9.01	99.63	6.47
0.25	102.47	2.79	98.53	4.77	95.53	4.31	101.43	5.16	101.6	3.59	105.53	3.60
0.5	100.00	2.68	98.53	2.15	105.67	1.15	95.30	3.15	95.30	1.06	95.77	2.07
1.0	104.27	4.70	99.47	1.22	105.67	1.80	98.47	4.59	97.63	3.88	95.77	2.39

浓度 (ng/mL)	NMEA		NPyR		NPIP*		NMPHA		NMIPA		N-叔丁基-N-乙基亚硝酸胺	
	平均值	CV	平均值	CV	平均值	CV	平均值	CV	平均值	CV	平均值	CV
0.1	110.97	7.27	97.7	6.56	112.27	4.52	100.6	8.81	105.23	2.58	105.27	4.56
0.25	105.1	5.64	103.63	6.66	101.43	4.79	106.43	6.59	107.5	7.97	106.47	5.27
0.5	91.87	6.20	96.20	3.19	93.07	5.83	84.40	3.35	90.50	5.61	96.77	0.26
1.0	93.80	5.39	99.97	2.36	102.67	0.79	108.03	2.25	100.23	2.94	94.83	1.10

* NPIP 的第一个浓度为 0.15 ng/mL 而非 0.1 ng/mL

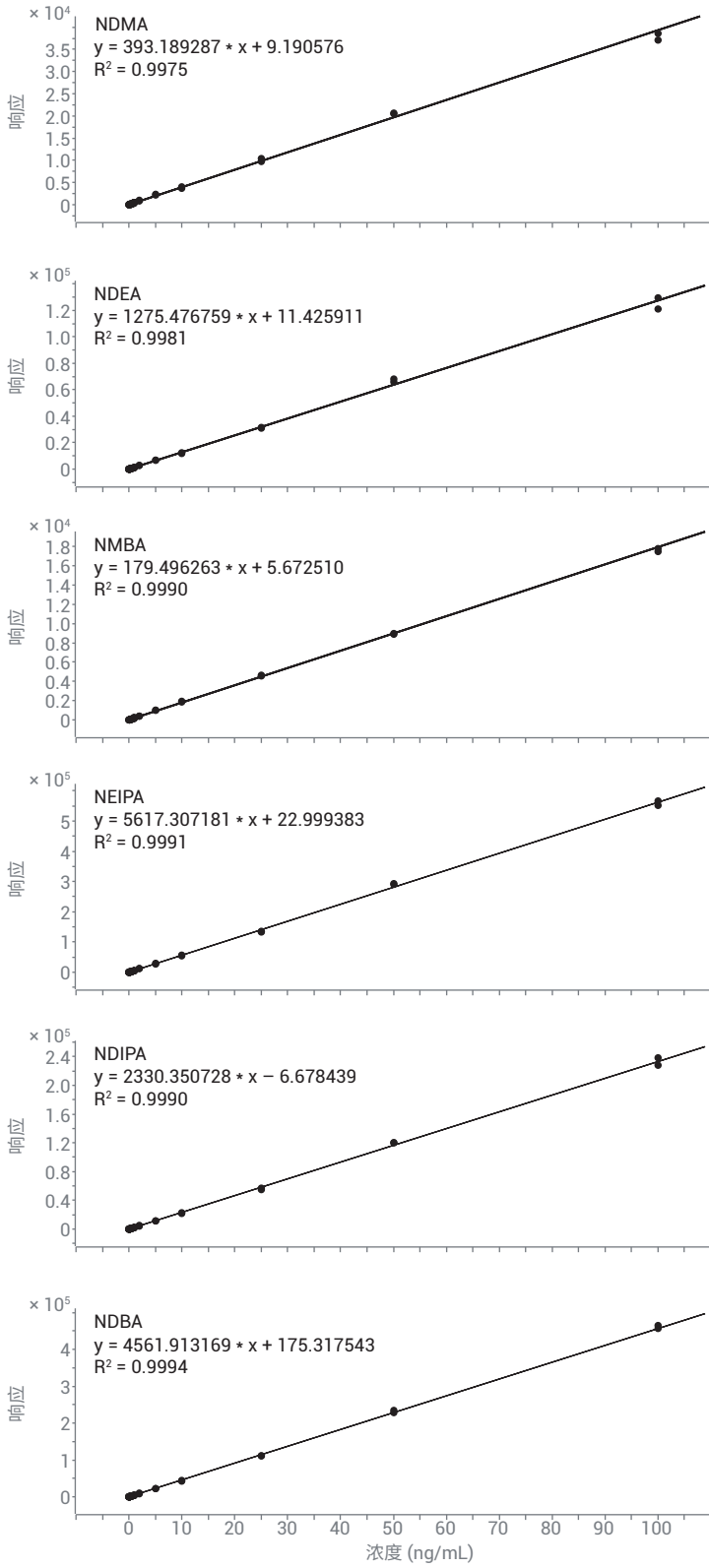


图 2. 使用 Agilent Ultivo LC/TQ 生成在色谱图中观察到的化合物的代表性校准曲线。所有校准曲线均采用 1/x 的加权因子

结论

Agilent Ultivo 三重四极杆 LC/MS 系统可以在监管要求的低浓度水平下分析亚硝酸胺杂质。本应用简报表明 Ultivo LC/TQ 在检测某些低浓度亚硝酸胺杂质方面的灵敏度。该方法可用于不同 ARB 药品中杂质的定量，并可根据药品的洗脱模式改变色谱条件。

参考文献

1. <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-updates-and-press-announcements-angiotensin-ii-receptor-blocker-arb-recalls-valsartan-losartan>
2. FDA guidance document: Development and validation of a RapidFire-MS/MS method for screening of nitrosamine impurities
3. FDA guidance document: Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) method for the determination of six nitrosamine impurities in ARB drugs

致谢

我们衷心感谢 PS3 Labs LLP, Hyderabad, TS, India 为我们提供亚硝酸胺标准品。

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

www.agilent.com

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。