

使用高分辨率 Agilent 6546 LC/Q-TOF 测定亚硝酸胺杂质



作者

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

摘要

血管紧张素 II 受体阻滞剂 (ARB) 药物通常用于治疗高血压和心脏衰竭。最近的研究表明，一些 ARB 药物产品含有致癌性亚硝酸胺杂质，导致许多这类药物被召回。因此，行业迫切需要一种常规分析方法，来检测这些致癌性亚硝酸胺杂质。本应用简报介绍了一种灵敏的高分辨率 LC/MS/MS 方法，其中使用 Agilent 6546 LC/Q-TOF 来检测和定量 USFDA 列出的 6 种亚硝酸胺，并展示了同时检测 11 种亚硝酸胺杂质。

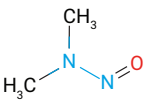
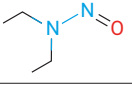
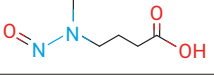
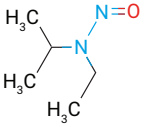
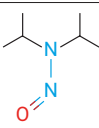
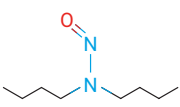
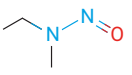
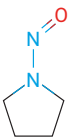
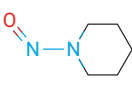
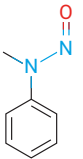
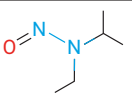
前言

最近，FDA 宣布召回缬沙坦、氯沙坦和厄贝沙坦等 ARB 药物，因为这些药物中可能含有亚硝胺杂质，这也使得 N-亚硝基杂质成为了 FDA 和 EMA 等监管机构关注的重点。这些亚硝基化合物被列为可能的人类致癌物，它们是生产过程中的痕量副产物，并由此被引入药物成品中。

本应用简报全面介绍了使用 6546 LC/Q-TOF 在低检测限下分析 11 种亚硝胺杂质。这些杂质的分子量较小，从 74 到 158 不等。其中包括：

- 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 (NMPHA)
- N-异丙基亚硝胺 (NMIPA)

基于液相色谱-质谱 (LC/MS) 的方法通常具有高灵敏度和高特异性，是开发用于检测和定量所有这些杂质的单一方法的基础。本应用简报展示了高分辨率 6546 LC/Q-TOF 的高灵敏度。

亚硝胺化合物	化学结构
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 (NMPHA)	
N-异丙基亚硝胺 (NMIPA)	

实验部分

化学品与试剂

本研究使用的 11 种亚硝胺标准品均来自 PS3 Labs LLP, Hyderabad, TS, India。其他 LC/MS 分析级溶剂（如甲醇、水）购自 Honeywell。甲酸购自 Fluka。

数据分析

采集数据，使用 Agilent MassHunter 软件套装 10 对 6546 LC/Q-TOF 采集的数据进行分析。对个人化合物数据库与谱库 (PCDL) 进行定制，并将其用于通过分子式查找算法进行化合物鉴定，然后定量化合物。

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 v/v)												
样品稀释剂	水												
Multisampler 温度	6 °C												
进样量	40 µL												
分析柱	Agilent InfinityLab Poroshell HPH C18, 2.1 × 100 mm, 1.9 µm (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												

Q-TOF 质谱仪配置和参数

表 2. MS 配置和离子源设置

仪器	Agilent 6546 LC/Q-TOF
离子源	大气压化学电离 (APCI)
MS 模式	MS
电离模式	正离子
干燥气温度	300 °C
干燥气流速	6 L/min
雾化器压力	45 psi
APCI 加热器	350 °C
APCI 喷雾针, 正离子模式	4 µA
正离子化的毛细管电压	3000 V
质量数范围	70–170 m/z

分析物的 MS 化合物信息

表 3. Agilent 6546 LC/Q-TOF 的详细 MS 设置

时间段	开始时间 (min)	质量数范围 (m/z)	采集速率 (质谱图/秒)	碎裂电压 (V)
1	0	70–170	1.5	120
2	1.6	70–170	1.5	90
3	2.8	70–170	2	120

结果与讨论

校准浓度范围为 0.05–100 ng/mL (表 4)。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 显示了所有测试的亚硝胺化合物在 10 ng/mL 下的代表性叠加提取离子色谱图。

表 4. Agilent 6546 LC/Q-TOF 的结果汇总。数据包括信噪比 (S/N)、计算得到的 LOQ、回归系数、校准曲线拟合结果和线性范围。所有标准品均采用线性函数和 $1/x$ 加权的校准曲线

化合物	检测限 (ng/mL)	检测限 (S/N)	LOQ (ng/mL)	LOQ (S/N)	R^2	校准曲线	线性范围 (ng/mL)
NDMA	0.1	16.54	0.25	35.72	0.999	线性	0.1–100
NDEA	0.05	29.56	0.1	79.2	0.999	线性	0.1–100
NMBA	0.25	12.16	0.5	27.88	0.996	线性	0.5–100
NEIPA	0.1	11.22	0.25	80.6	0.998	线性	0.1–100
NDIPA	0.075	16.65	0.15	21.99	0.999	线性	0.075–100
NDBA	0.1	44.60	0.25	61.56	0.997	线性	0.1–100
NMEA	0.05	18.42	0.1	23	0.998	线性	0.05–100
NPYR	0.1	29.73	0.15	50.39	0.999	线性	0.1–100
NPIP	0.075	12.18	0.1	25.30	0.998	线性	0.075–100
NMPhA	0.25	24.22	0.5	32.30	0.997	线性	0.5–100
NMIPA	0.075	29.79	0.1	47.46	0.997	线性	0.075–100

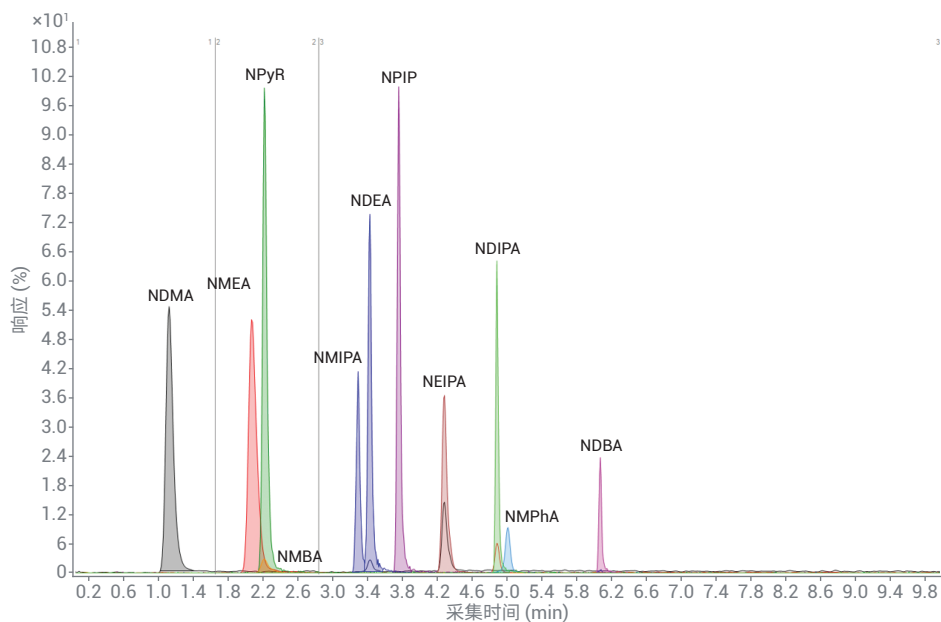


图 1. 代表性叠加提取离子色谱图, 展示了 11 种亚硝胺化合物的洗脱情况

准确度和重现性

11 种化合物中，每种化合物的校准曲线在各个校准浓度下均表现出预期浓度 $\pm 20\%$ 以内的准确度，并且所有浓度下均表现出 CV 小于 15% 的重现性（图 4）。表 5 详细比较了不同浓度下的准确度和重现性。

Compound Name	Formula	Mass	Anion	Cation	RT (min)	CAS
N-Nitrosodimethylamine(NDMA)	C2H6N2O	74.04801	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	1.131	62-72-9
N-Nitrosoethylmethylamine(NMEA)	C3H8N2O	88.06366	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	2.075	10595-95-6
N-Nitrosopyrrolidine(NPyR)	C4H8N2O	100.06366	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	2.222	930-55-2
N-Nitrosodiethylamine(NDEA)	C4H10N2O	102.07931	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	3.426	55-18-5
N-Isopropylmethyl nitrosamine(NMIPA)	C4H10N2O	102.07931	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	3.297	30553-08-5
N-Nitrosopiperidine(NPIP)	C5H10N2O	114.07931	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	3.766	100-75-4
N-Ethyl-N-Nitroso-2-propanamine(NEIPA)	C5H12N2O	116.09496	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	4.289	16339-04-1
N-Nitrosodiisopropylamine(NDIPA)	C6H14N2O	130.11061	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	4.886	601-77-4
N-methyl-n-nitrosoaniline(NMPhA)	C7H8N2O	136.06366	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	5.009	614-00-6
N-Nitroso-N-methyl-4-aminobutyricacid(NMBA)	C5H10N2O3	146.06914	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	2.219	61445-55-4
N-Nitrosodibutylamine(NDBA)	C8H18N2O	158.14191	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	6.059	924-16-3

图 2. 使用 PCDL 通过分子式查找算法进行鉴定和定量

Name	Transition
N-Nitrosodimethylamine(NDMA)	75.0552
N-Nitrosoethylmethylamine(NMEA)	89.0709
N-Nitrosopyrrolidine(NPyR)	101.0710
N-Nitrosodiethylamine(NDEA)	103.0866
N-Isopropylmethyl nitrosamine(NMIPA)	103.0866
N-Nitrosopiperidine(NPIP)	115.0866
N-Ethyl-N-Nitroso-2-propanamine(NEIPA)	117.1022
N-Nitrosodiisopropylamine(NDIPA)	131.1179
N-methyl-n-nitrosoaniline(NMPhA)	137.0709
N-Nitroso-N-methyl-4-aminobutyricacid(NMBA)	147.0766
N-Nitrosodibutylamine(NDBA)	159.1492

图 3. 用于定量不同亚硝酸杂质所提取的 m/z

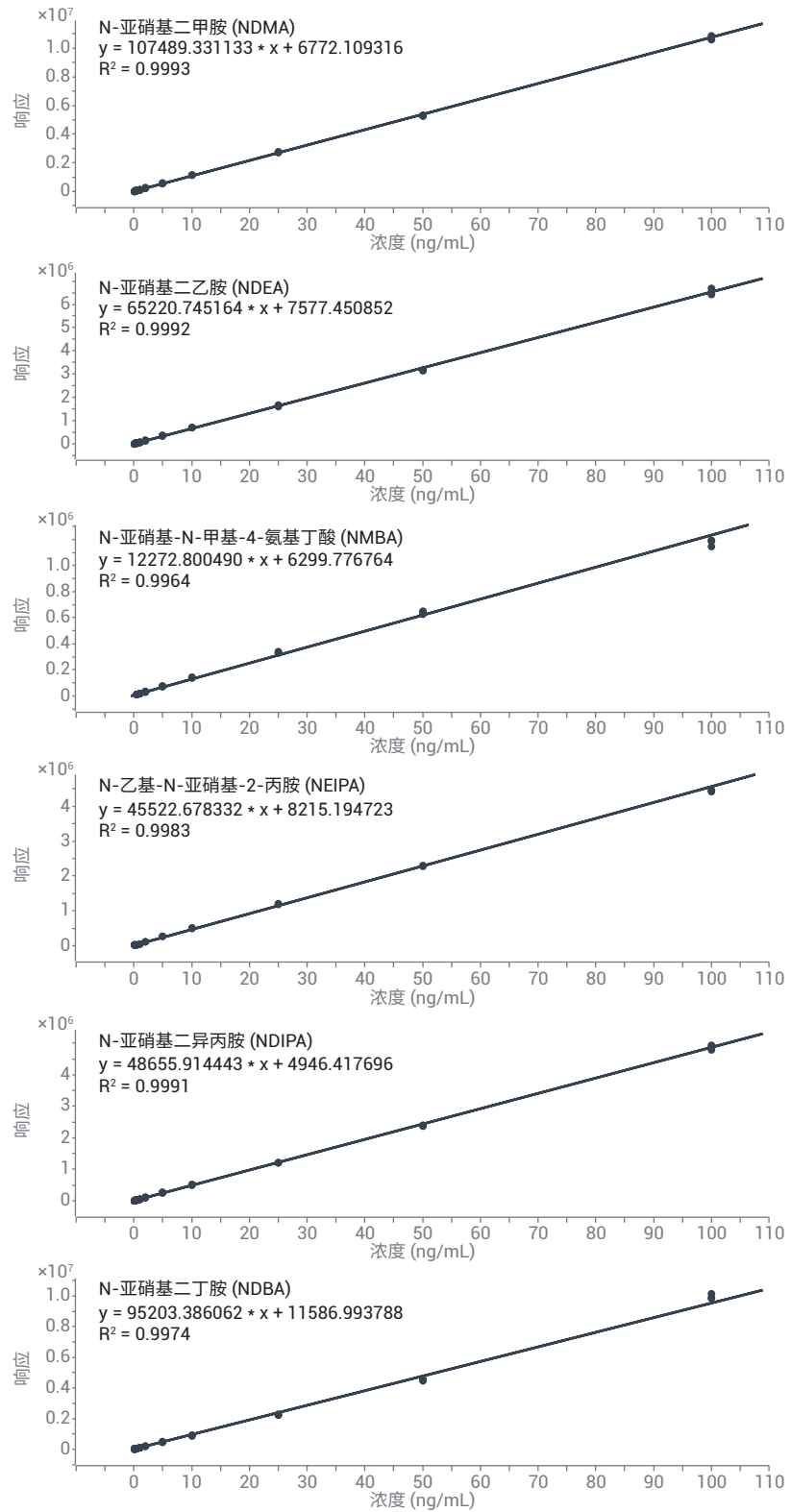


图 4. 分散在整个色谱图中的代表性化合物校准曲线。所有校准曲线均采用线性函数和 1/x 的加权因子

表 5. 利用 Agilent 6546 LC/Q-TOF 在不同浓度下得到的代表性准确度和重现性 (n = 3)

浓度 (ng/mL)	NDMA		NDEA		NMBA		NDIPA		NDBA		NMEA	
	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	86.67	5.57	83.53	1.59	不适用	不适用	91.30	0.55	101.03	6.19	93.93	1.67
0.25	87.00	3.96	88.33	2.58	不适用	不适用	91.33	4.67	95.13	5.69	89.40	4.55
0.5	97.23	4.51	101.17	3.62	92.40	1.96	94.6	2.27	102.30	3.38	102.53	3.28
1.0	104.93	2.44	110.80	2.47	98.37	5.80	109.83	2.13	101.80	1.15	103.23	0.78

结论

Agilent 6546 LC/Q-TOF 高分辨率 LC/MS/MS 可以在低浓度水平下分析亚硝胺杂质，高分辨率质谱能够可靠地检测药品中存在的亚硝胺化合物。本应用简报证明了 6546 LC/Q-TOF 仪器在检测这些低浓度亚硝胺杂质方面的灵敏度。此方法可用于定量分析不同 ARB 药品中的这些杂质，并能根据药品的洗脱模式改变色谱条件，确保可以将药物峰转移到废液中，以避免质谱仪污染。

参考文献

1. USFDA guidance document: Development and validation of a RapidFire-MS/MS method for screening of nitrosamine impurities
2. USFDA 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。