

HS-GC-MS 检测原料药厄贝沙坦中 N-亚硝基二甲胺和 N-亚硝基二乙胺

GCMS-311

摘要： 本文利用岛津公司 GCMS-QP2020 NX 气相色谱 - 质谱联用仪结合 HS-20 顶空进样器，建立了原料药厄贝沙坦中 N-亚硝基二甲胺和 N-亚硝基二乙胺的同时测定方法。在 10~500ng/mL 浓度范围内各组分线性关系良好，相关系数均达到 0.999 以上，100ng/mL 标准品溶液连续进样 6 针，各组分峰面积 RSD 均小于 2.40%。阴性空白样品在 40, 80, 160ng/mL 加标浓度时，回收率为 100.6%-104.6%，阳性空白样品回收率为 101.8%-108.7%。该方法简单方便，顶空进样不污染气化室，能够有效的检测原料药厄贝沙坦中 N-亚硝基二甲胺和 N-亚硝基二乙胺的含量。

关键词： 顶空进样 气相色谱 - 质谱联用仪 沙坦类药物 亚硝胺 NDMA NDEA

根据世界卫生组织国际癌症研究机构致癌物清单^[1]，N-亚硝基二甲胺 (N-Nitrosodimethylamine, NDMA) 和 N-亚硝基二乙胺 (N-Nitrosodiethylamine, NDEA) 均属于 2A 类致癌物质，在 ICH M7 指南中明确该类化合物具有较高致癌性，对实验动物致癌性证据充分。

2018 年 7 月，欧盟药品管理局报道在其对浙江某企业含有缬沙坦原料药的药物抽查汇总发现了杂质 NDMA，其平均含量达 66.5ppm，超过欧盟标准 0.3ppm。^[2] 随后全球已有包括美国，加拿大，挪威，德国等 22 个国家召回共 2300 批该企业的含有沙坦类原料药的降压药。

相关药企沙坦原料药中的 NDMA 经推断疑似来源于药物合成过程中使用的溶剂 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 与亚硝酸钠在酸性条件下反应产生的微量副产物，即 NDMA。由于通用工艺原因，厄贝沙坦和氯沙坦等沙坦类药物中也相继发现了 NDMA 和 NDEA 杂质的存在。

为确保药物产品质量，控制潜在风险，很多制药公司已经将 NDMA 和 NDEA 纳入沙坦类原料药内控质量标准中。

本文参考现行《中国药典》缬沙坦国家标准修订稿公示（第二次）中 N-亚硝基二甲胺和 N-亚硝基二乙胺检查法和美国 FDA 直接进样方法 (Combined direct injection N-Nitrosodimethylamine (NDMA) and N-Nitrosodiethylamine (NDEA) impurity assay by GC/MS) 和顶空进样方法 (Combined N-Nitrosodimethylamine (NDMA) and N-Nitrosodiethylamine (NDEA) impurity assay by GC/MS-Headspace)，建立了厄贝沙坦中 N-亚硝基二甲胺和 N-亚硝基二乙胺的检测方法。本方法检出限低，重现性好，顶空进样可明显降低高浓度样品直接进样对色谱气化室的污染，可以为沙坦类原料药中基因毒性杂质的检测提供参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

GCMS-QP2020 NX 气相色谱 - 质谱联用仪

HS-20 顶空进样系统

AP135W 高性能电子天平

1.2 试剂

NDMA 和 NDEA 对照品 (中国食品药品检定研究院)

NMP 溶剂 (Headspace GC Grade, K50085197815, Merck, Germany)

1.3 分析条件

HS-20 条件:

平衡温度: 130°C

定量环温度: 150°C

传输线温度: 160°C

平衡时间: 15 min

进样时间: 2 min

GC-MS 条件:

色谱柱: SH-Rtx-Wax (30m×0.25mm×0.5μm)

柱温程序: 60°C (0.5 min)_15°C /min_150°C _

20°C /min_240°C (2 min)

进样方式: 不分流

流速控制方式: 线速度

线速度: 51.6 cm/sec

离子化方式: EI

离子源温度: 230°C

接口温度: 230°C

检测器电压: 调谐电压 +0.2kV

采集模式: SIM, 离子信息见表 1

■ 样品前处理

空白溶液 N- 甲基吡咯烷酮 (NMP)。

标准溶液 采用天平精密称取适量对照品, 以 NMP 为溶剂, 制备浓度约为 700μg/ml 的贮备液。移取适量体积 NDMA 和 NDEA 标准品贮备溶液, 加 NMP 定量稀释制成浓度为对照品 1000ng/mL 溶液。

线性溶液 准确移取适量体积标准溶液至容量瓶中, 用 NMP 逐级定量稀释制成浓度为 10, 30, 50, 100, 250, 500ng/mL 的溶液。

供试品溶液 精密称取厄贝沙坦原料药 1.0g 于 10mL 容量瓶中, 加 NMP 溶解并定量稀释制成 100mg/mL 的溶液。

取 2mL 以上样品至 20mL 顶空瓶中, 迅速密封, 上机待测。

■ 结果与讨论

3.1 NDMA 和 NDEA 标准溶液谱图

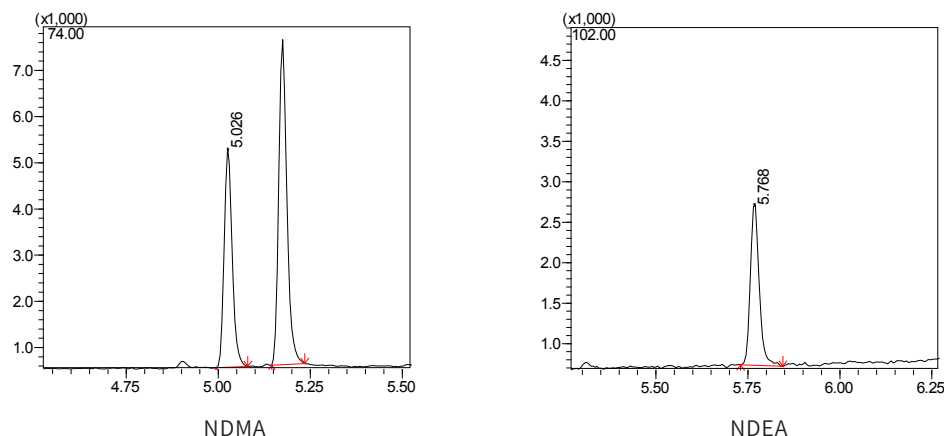


图 1. NDMA 和 NDEA 色谱图 (100ng/mL)

表 1. NDMA 和 NDEA 组分信息

No.	中文名称	英文名称	CAS 号	保留时间	特征离子
1	N- 二甲基亚硝胺	N-Nitrosodimethylamine	62-75-9	5.025	74.00
2	N- 二乙基亚硝胺	N-Nitrosodiethylamine	55-18-5	5.770	102.00

3.2 标准曲线和检出限

向 6 个 20mL 顶空瓶中各加入 2mL 浓度分别为 10、30、50、100、250、500ng/mL 的 NDMA 和 NDEA 混标，顶空进样，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标做标准曲线，标准曲线如图 2 所示。参照 ICH Q2 (R1) 方法学验证指南^[3]，使用标准曲线 y 轴截距标准偏差与斜率计算检出限 (LOD) 和定量限 (LOQ)，得到 NDMA 的 LOD 和 LOQ 分别为 1.71 ng/mL 和 5.18 ng/mL，NDEA 的 LOD 和 LOQ 分别为 4.53 ng/mL 和 13.74 ng/mL。结合供试品溶液的配制比例计算得 NDMA 的 LOD 和 LOQ 分别为 0.0171 $\mu\text{g/g}$ 和 0.0518 $\mu\text{g/g}$ ，NDEA 的 LOD 和 LOQ 分别为 0.0453 $\mu\text{g/g}$ 和 0.1374 $\mu\text{g/g}$ 。

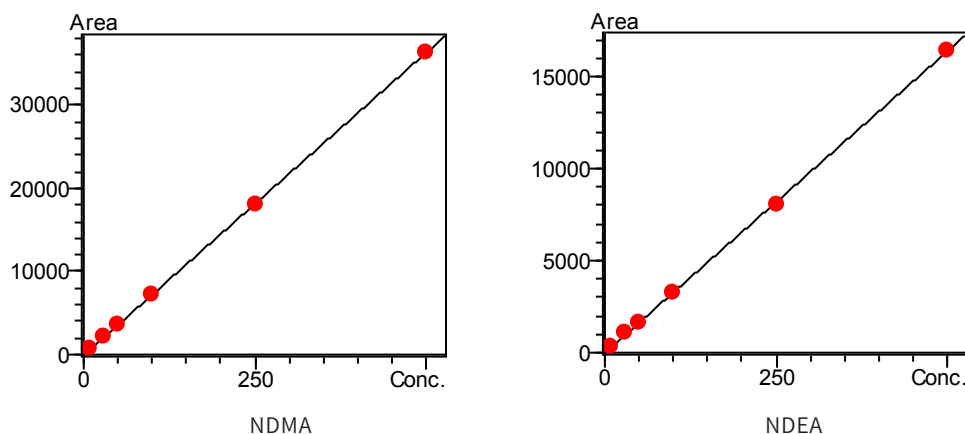


图 2. NDMA 和 NDEA 标准曲线

表 2. NDMA 和 NDEA 线性相关系数及检出限定量限

ID	组分名称	相关系数 (R^2)	定量限 ($\mu\text{g/g}$)	检出限 ($\mu\text{g/g}$)
1	NDMA	0.9999	0.0518	0.0171
2	NDEA	0.9998	0.1374	0.0453

3.3 重复性和回收率实验

取 100 ng/mL 标准品溶液，连续进样 6 次，考察仪器的重复性，测定结果见表 3。

表 3. NDMA 和 NDEA 重复性结果

ID	组分名称	峰面积 1	峰面积 2	峰面积 3	峰面积 4	峰面积 5	峰面积 6	RSD(%)
1	NDMA	7154	7060	7201	7313	7425	7387	1.96
2	NDEA	3140	3186	3175	3235	3338	3303	2.40

3.4 加标回收率

平行精密称取 1.0g 厄贝沙坦供试品粉末 9 份至 9 个 10mL 容量瓶中，分别加含对照品 400ng，800ng，1600ng 的标准溶液，每个浓度各 3 份，用 N- 甲基吡咯烷酮稀释至刻度，得到含对照品浓度 40ng/mL，80ng/mL，160ng/mL 的供试品溶液各 3 份。阴性样品添加回收率结果如表 4 和表 5 所示。

表 4. 阴性样品 NDMA 添加回收率结果

ID	加标浓度 (ng/mL)	平均加标检测浓度 (ng/mL)	平均回收率 (%)	RSD(%)
1	40	41.73	104.3	2.59
2	80	82.78	103.5	1.53
3	160	167.41	104.6	1.27

表 5. 阴性样品 NDEA 添加回收率结果

ID	加标浓度 (ng/mL)	平均加标检测浓度 (ng/mL)	平均回收率 (%)	RSD(%)
1	40	40.24	100.6	1.81
2	80	81.92	102.4	1.52
3	160	165.05	103.2	1.96

3.5 样品测试结果

取 3 种厄贝沙坦原料药供试品，按照上述前处理方法进行样品前处理，测定结果如表 6 所示，样品 1 和样品 2 均无杂质检出，样品 3 中检出 NDEA。随后将样品 3 作为阳性样品进行加标回收实验，阳性样品 NDEA 添加回收率结果如表 7 所示。

表 6. 样品中 NDMA 和 NDEA 测定结果

No.	中文名称	样品 1	样品 2	样品 3
1	NDMA	N.D	N.D	N.D
2	NDEA	N.D	N.D	0.3588 μg/g

注：N.D 为未检出

表 7. 阳性样品 NDEA 添加回收率结果

ID	加标浓度 (ng/mL)	平均加标检测浓度 (ng/mL)	平均回收率 (%)	RSD(%)
1	40	79.85	108.7	2.68
2	80	117.84	101.8	1.13
3	160	205.93	106.2	2.13

■ 结论

本方法采用岛津 GCMS-QP2020 NX 结合 HS-20 顶空进样器建立了厄贝沙坦原料药中 NDMA 和 NDEA 的检测方法。该方法在 10~500ng/mL 范围内标准曲线线性良好, 相关系数大于 0.999, NDMA 的检出限和定量限分别为 0.0171 $\mu\text{g/g}$ 和 0.0518 $\mu\text{g/g}$, NDEA 的检出限和定量限分别为 0.0453 $\mu\text{g/g}$ 和 0.1374 $\mu\text{g/g}$ 。采用阳性样品厄贝沙坦原料药 NDEA 的低中高加标回收率分别为 108.7%, 101.8%, 106.2%。该方法采用直接顶空检测, 简单方便, 不污染色谱气化室, 能有效应用于检测厄贝沙坦原料药中 NDMA 和 NDEA 的含量。

参考文献

1. 世界卫生组织国际癌症研究机构致癌物清单, <https://monographs.iarc.fr>
2. CHMP list of outstanding issues, European Medicines Agency, EMA/CHMP/668548/2018
3. ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)