

GCMSMS 法结合顶空进样测定原料药厄贝沙坦中 NDMA 与 NDEA 含量

GCMSMS-175

摘要： 本文使用岛津公司三重四极杆气质联用仪 GCMS-TQ8050 结合顶空进样建立了一种快速检测原料药厄贝沙坦中 N-亚硝基二甲胺 (NDMA) 与 N-亚硝基二乙胺 (NDEA) 的方法。在两个浓度范围 0.025~0.5 μg 与 0.025~100 μg 两种物质均表现出良好线性，相关系数达到 0.999 以上，方法检出限 (LOD) NDMA 为 0.013 μg ，NDEA 为 0.0024 μg 。标准品连续进样 6 针，0.1 μg 与 5 μg 峰面积 RSD 分别小于 3% 与 2%。0.1 μg 、0.2 μg 与 5 μg 的加标平均回收率在 96.2%~106.4% 之间。该方法简单方便，可以较好的应用于厄贝沙坦原料药中 NDMA 和 NDEA 的含量的测定。

关键词： 三重四极杆气相色谱质谱联用仪 NDMA NDEA 厄贝沙坦

N-亚硝基二甲胺 (NDMA) 和 N-亚硝基二乙胺 (NDEA) 是两种亚硝胺类物质，根据 2017 年世界卫生组织国际癌症研究机构公布的致癌物清单这两种物质均属于 2A 类致癌物，而在 ICH M7 指南中明确这两种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 月中国浙江某制药企业爆发“缙沙坦事件”在业内引起震动，其出口的缙沙坦原料药被欧洲药品管理局查出含有杂质 NDMA。此事造成大量含有缙沙坦原料药的药品被召回。随着事态的发酵，厄贝

沙坦和氯沙坦等沙坦类药物中也相继发现了 NDMA 与 NDEA 杂质的存在，这可能是沙坦类原料的通用工艺造成的。目前已有不少制药企业将 NDMA 与 NDEA 纳入沙坦类药物的质量控制中。

目前 NDMA 与 NDEA 的检测方法有气质法与顶空+气质法。参考美国 FDA 顶空进样方法本文采用顶空+三重四极杆气质建立了厄贝沙坦中 NDMA 与 NDEA 的检测方法。本方法灵敏度高，重现性好，顶空进样可避免直接注入药品溶液对仪器造成污染，使用三重四极杆检测可提高检测的灵敏度。

实验部分

1.1 仪器

GCMS-TQ8050 三重四极杆气相色谱质谱联用仪
HS-20 顶空进样系统

1.2 分析条件

顶空条件

平衡温度：130 $^{\circ}\text{C}$

平衡时间：15min

样品流路温度：150 $^{\circ}\text{C}$

GC-MS/MS 条件

色谱柱：SH-Rtx-Wax, 30m \times 0.25mmID \times
0.5 μm

柱温程序：60 $^{\circ}\text{C}$ (0.5min)_15 $^{\circ}\text{C}$ /min_ 150 $^{\circ}\text{C}$
20 $^{\circ}\text{C}$ /min 240 $^{\circ}\text{C}$ (2min)

流速控制方式：恒线速度方式

线速度：44.7mL/min

传输线温度：160 $^{\circ}\text{C}$

样品瓶加压气压：50kPa

GC 循环时间：25min

分流比：22.5

离子化方式：EI

离子源温度：230 $^{\circ}\text{C}$

色谱质谱接口温度：230 $^{\circ}\text{C}$

检测器电压：调谐电压 +0.6kV

采集模式：MRM，离子信息见表 1

■ 样品前处理

精密称取厄贝沙坦原料药 500mg 于 20mL 顶空瓶中，加 N- 甲基吡咯烷酮（NMP）5mL 溶解，迅速密封，上机待测。

■ 结果讨论

3.1 NDMA 与 NDEA 标准谱图

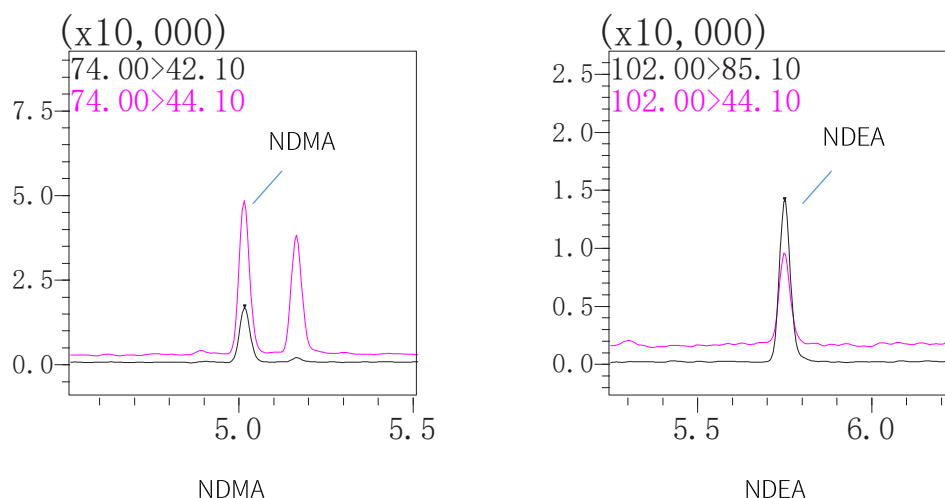


图 1 NDMA 与 NDEA 质量色谱图 (0.1 μ g)

表 1 NDMA 与 NDEA 组分信息

No.	中文名称	CAS 号	保留时间	定量离子对	定性离子对
1	NDMA	62-75-9	5.016	74.00>42.10	74.00>44.10
2	NDEA	55-18-5	5.750	102.00>85.10	102.00>44.10

3.2 标准曲线和检出限

配制 7 个梯度浓度的混标，使各顶空瓶内的目标物含量分别为 0.025、0.05、0.1、0.5、5、10、100 μ g，立即压盖密封，顶空进样。由于样品中的检出量可能较低也可能很高，参照 FDA 方法《Combined N-Nitrosodimethylamine (NDMA) and N-Nitrosodiethylamine (NDEA) Impurity Assay by GC/MS-Headspace》制作 0.025~0.5 μ g 与 0.025~100 μ g 两条标线，检测峰面积小于 0.5 μ g 标液则采用 0.025~0.5 μ g 标线，否则采用另一条标线，各标线如图 2 与图 3 所示。参照 ICH Q2 (R1) 方法学验证指南，使用标准曲线 y 轴截距标准偏差 (δ) 与斜率 (S) 计算检出限 (LOD) 和定量限 (LOQ) (计算公式 $LOD=3.3\delta/S$, $LOQ=10\delta/S$)。各化合物线性相关系数、LOD、LOQ 如表 2 所示。

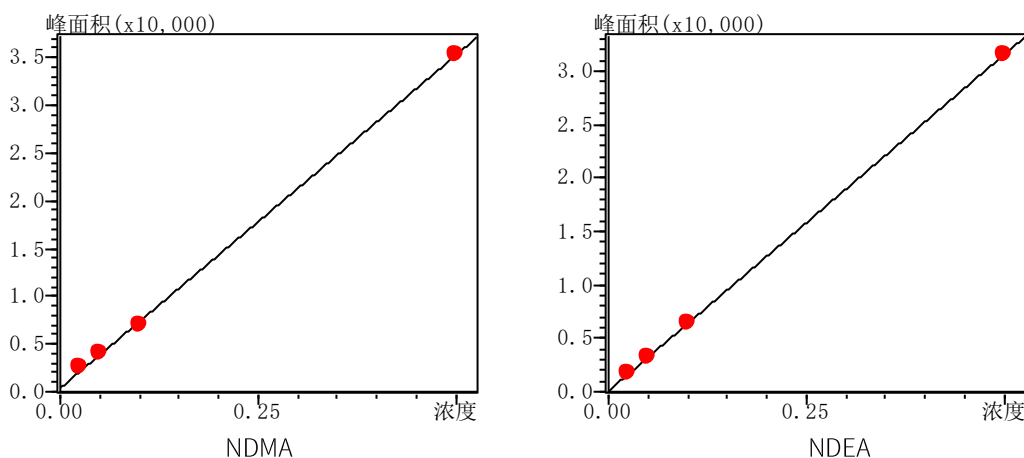


图2 NDMA 与 NDEA 标准曲线 (0.025~0.5 μ g)

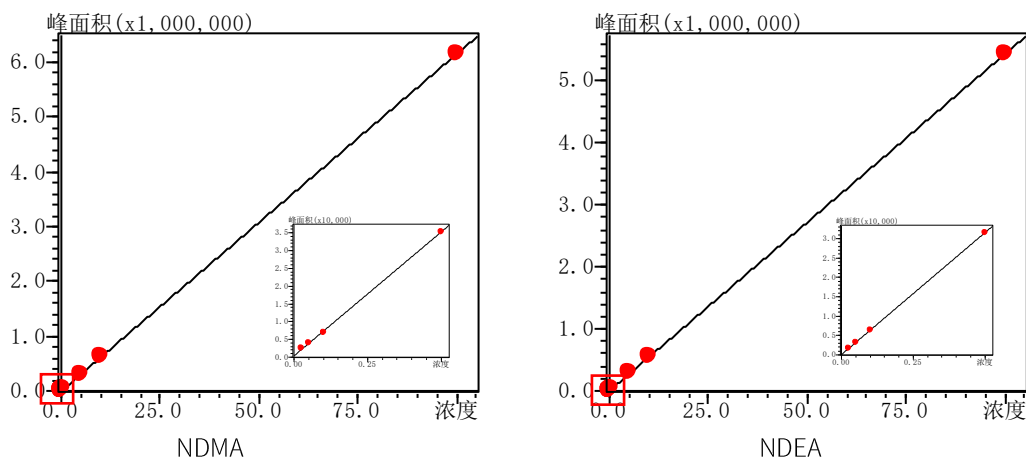


图2 NDMA 与 NDEA 标准曲线 (0.025~100 μ g)

表2 NDMA 和 NDEA 线性相关系数及检出限量限

ID	组分名称	相关系数 (R2) (0.025~0.5 μ g)	相关系数 (R2) (0.025~100 μ g)	定量限 (μ g)	检出限 (μ g)
1	NDMA	0.9995	0.9999	0.040	0.013
2	NDEA	0.9999	0.9999	0.0071	0.0024

3.3 重复性实验

取 0.1 μ g 与 5 μ g 标准品溶液, 分别连续进样 6 次, 考察仪器的重复性, 测定结果见表 3 与表 4。

表3 NDMA 和 NDEA 重复性结果 (0.1 μ g)

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	6,542	6,836	6,414	6,591	6,764	6,697	2.33
2	NDEA	6,219	6,320	6,282	6,188	6,304	5,997	1.92

表 4 NDMA 和 NDEA 重复性结果 (5 μ g)

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	314181	312202	312531	316668	312629	305904	1.14
2	NDEA	293383	291324	290896	292,698	295224	280771	1.76

3.4 加标回收率

检测厄贝沙坦样品未检出目标物，平行精密称取 500mg 厄贝沙坦样品 9 份至 9 个 20mL 顶空瓶中，分别加含目标物 0.1 μ g, 0.2 μ g, 5 μ g 的标准溶液，每个浓度各 3 份，再加入 N- 甲基吡咯烷酮使溶液总体积为 5mL，密封，检测。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 (μ g)	平均加标检测浓度 (μ g)	平均回收率 (%)	RSD(%)
1	0.1	0.1024	102.4	1.97
2	0.2	0.1924	96.2	2.58
3	5	5.161	103.2	2.19

表 5 阴性样品 NDEA 添加回收率结果

ID	加标浓度 (μ g)	平均加标检测浓度 (μ g)	平均回收率 (%)	RSD(%)
1	0.1	0.1036	103.6	4.99
2	0.2	0.2010	100.5	1.61
3	5	5.318	106.4	1.25

结论

本方法采用岛津 GCMS-TQ8050 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 0.025~0.5 μ g 与 0.025~100 μ g 范围内标准曲线均线性良好，相关系数大于 0.999，NDMA 的检出限和定量限分别为 0.013 μ g 和 0.040 μ g，NDEA 的检出限和定量限分别为 0.0024 μ g 和 0.0071 μ g。空白样品中以 0.1 μ g, 0.2 μ g, 5 μ g 三个浓度水平加标，平均回收率在 96.2%~106.4 之间。该方法灵敏度高、重复性好，采用顶空进样，前处理简便同时避免了直接注入药品溶液对仪器造成污染，可以较好的应用于厄贝沙坦原料药中 NDMA 和 NDEA 的含量的测定。