

# GC-MS/MS 法测定沙坦类药物中 6 种 N-亚硝胺含量

GCMSMS-193

**摘要：**本文建立了三重四极杆气质联用仪测定沙坦类药物中 6 种 N-亚硝胺类基因毒性杂质含量的方法。结果表明：在 1~50 ng/mL 的浓度范围内，6 种 N-亚硝胺的线性相关系数  $r$  为 0.999 以上，线性关系良好。将对照品溶液重复进样 6 次，峰面积 RSD% 小于 10%，定量离子信噪比大于 30，定性离子信噪比 10，满足欧洲药典质量控制要求。实际样品在 30 ng/g 的加标水平下，加标回收率为 90%~105%。本方法参考欧洲药典 GC-MS/MS 法检测沙坦类药物中 6 种 N-亚硝胺相关标准，可为沙坦类药物中 N-亚硝胺类基因毒性杂质的测定提供参考。

**关键词：**三重四极杆气质联用仪 N-亚硝胺 沙坦类药物 基因毒性杂质

N-亚硝胺，是遗传毒性杂质的一种，属于 2A 类致癌物。

N-亚硝胺是一种常见的污染物，在水和食品中，包括熏肉和烤肉、奶制品中均有发现。最早在药品中被发现是 2018 年 7 月，EMA 发布公告称其在抗压药缬沙坦中检出 NDMA，引起社会的广泛关注，并给相关企业造成巨大损失。FDA、中国药典接连发布了相关检测标准，从最早采用顶空 +GCMS 法检测 2 种 N-

亚硝胺，之后使用 GC-MS/MS 法检测 5 种亚硝胺，岛津公司均及时发布了相应解决方案。

2020 年 4 月欧洲药典发布了三种不同仪器检测沙坦类药物中 N-亚硝胺的征求意见稿。本文参考该征求意见稿，开发了 GC-MS/MS 法测定沙坦类药物中 6 种 N-亚硝胺检测方法，使用本征求意见稿方法，前处理净化效果好，可检测的 N-亚硝胺种类更多。

## ■ 实验部分

### 1.1 仪器

三重四极杆气相色谱 - 质谱联用仪：GCMS-TQ 8050 NX

### 1.2 分析条件

色谱柱：Rtx 624Sil MS, (60 m × 0.32 mm × 1.8 μm)

柱温程序：40°C (1 min)\_40°C /min\_180°C \_20°C /min\_300°C (2 min)

进样量：2 μL

载气控制方式：恒线速度 (36.1 cm/sec)

进样方式：不分流进样

离子源温度：230°C

接口温度：300°C

检测器电压：调谐电压 +0.6kV

采集方式：MRM (采集参数见表 1)

### 1.3 样品前处理

准确称取 250 mg 沙坦类药物至 50 mL 离心管中，加入 10 mL 氢氧化钠溶液（称取 4 g NaOH，超纯水溶解，加入 5 mL 乙腈，并用超纯水定容至 100 mL），振摇 5 min，准确加入含内标 NEMA 的二氯甲烷溶液（内标含量为 10 ng/mL）2 mL，振摇 5 min 后，4000 r/min 离心 5min，取下层有机层用 GC-MS/MS 分析。

## ■ 结果讨论

### 2.1 对照品溶液 MRM 图谱

准确称取样品 250 mg, 添加混标, 加标浓度为 30 ng/g(欧洲药典定量限), 按照 1.3 的方法进行样品前处理, 得到的溶液作为对照品溶液 (Reference Solution), 上机浓度为 3.75 ng/mL, 其 MRM 图见图 1, MRM 采集参数见表 1。

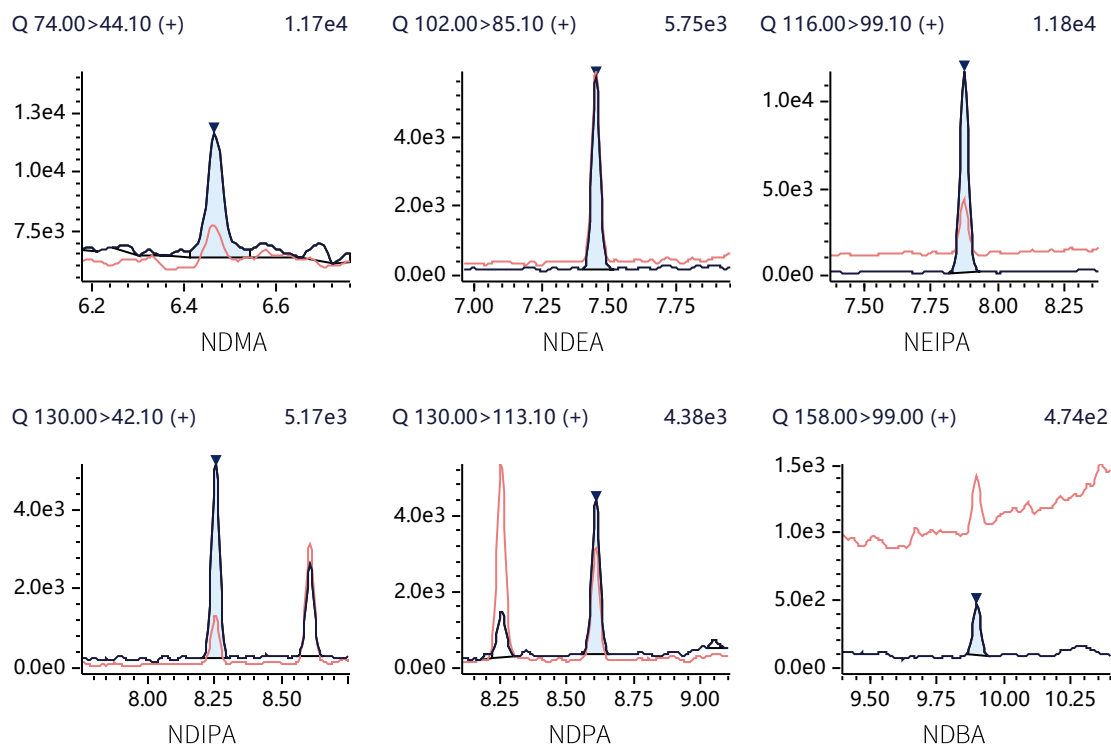


图 1 6 种 N-亚硝胺 MRM 图 (浓度为 3.75 ng/mL)

表 1 6 种 N-亚硝胺及内标 MRM 参数信息

No.	组分名称	保留时间 (min)	定量离子对 (m/z)	碰撞电压 CE	定性离子对 (m/z)	碰撞电压 CE
1	NDMA	6.455	74.00>44.10	6	74.00>42.10	24
2	NEMA (内标)	7.000	88.00>71.10	6	88.00>43.10	9
3	NDEA	7.460	102.00>85.10	10	102.00>56.10	18
4	NEIPA	7.885	116.00>99.10	6	116.00>44.00	15
5	NDIPA	8.270	130.00>42.10	9	130.00>113.00	3
6	NDPA	8.610	130.00>113.10	6	130.00>43.10	15
7	NDBA	9.905	158.00>99.00	9	158.00>141.20	6

## 2.2 标准曲线与检出限

按照对照品配制方法配制标准溶液，浓度分别为 1、2.5、5、10、20、50 ng/mL，内标浓度为 10 ng/mL。以目标组分与内标浓度比为横坐标，峰面积比为纵坐标，绘制标准曲线，见图 2。线性相关系数见表 2，以 1 ng/mL 浓度标准溶液的 3 倍信噪比计算检出限，见表 2。

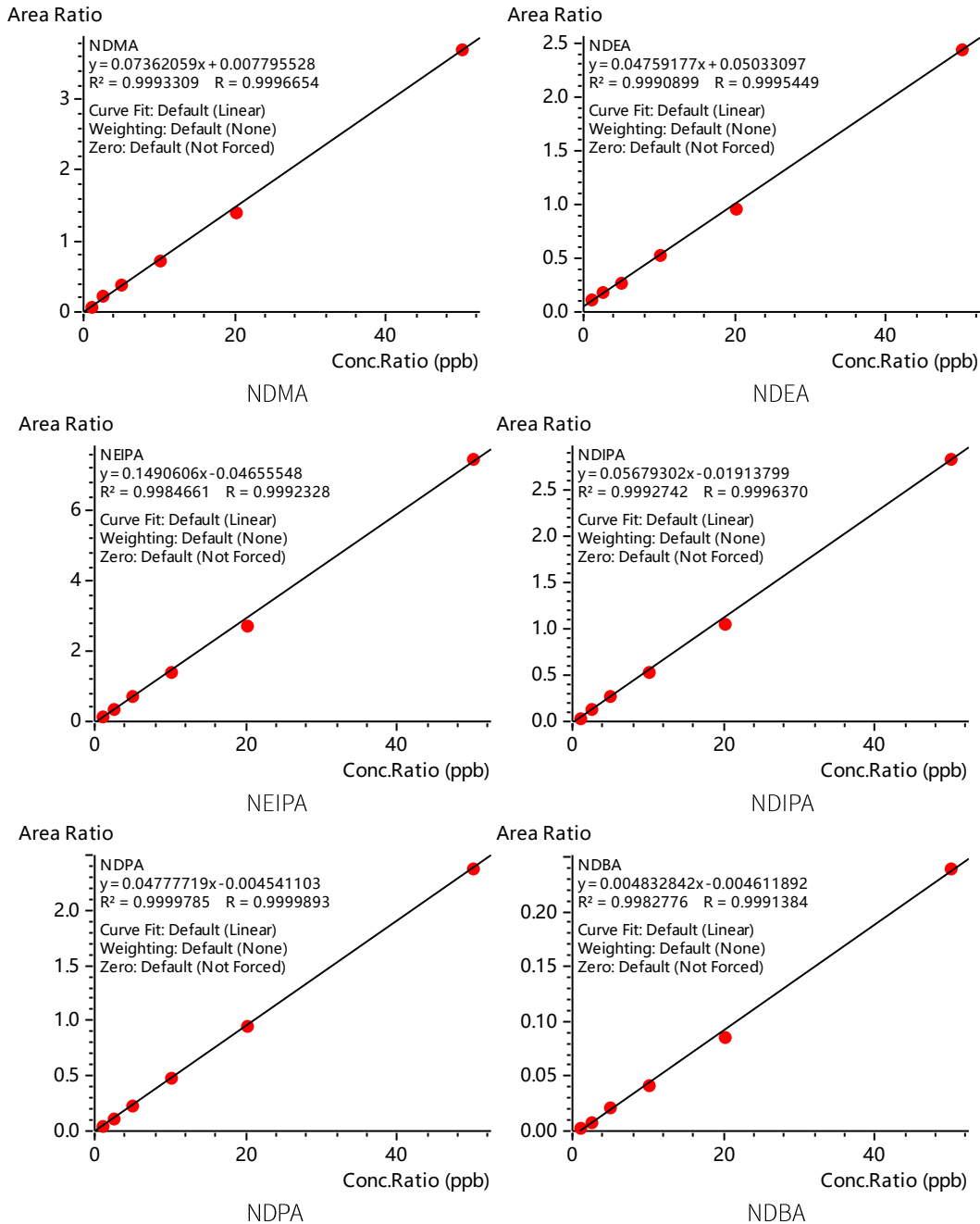


图 2 6 种 N-亚硝胺校准曲线

表 2 6 种 N-亚硝胺线性相关系数和检出限

No.	化合物名称	相关系数 r	S/N (1 ng/mL)	检出限 (ng/g)
1	NDMA	0.9996	12.06	0.249
2	NDEA	0.9995	129.94	0.023
3	NEIPA	0.9992	196.43	0.015
4	NDIPA	0.9996	80.51	0.037
5	NDPA	0.9999	33.28	0.090
6	NDBA	0.9991	16.81	0.178

### 2.3 欧洲药典质量控制要求

按照药典要求, 将对照品溶液重复测试 6 次, 要求定量离子峰面积 RSD%<20%, 定量离子 S/N>10, 定性离子 S/N>3。对浓度为 3.75 ng/mL 的对照品溶液进行测试, 结果为定量离子峰面积 RSD<7%, 定量离子 S/N>30, 定性离子 S/N>10, 满足药典要求, 具体结果见表 3。

表 3 峰面积相对标准偏差 (n=6) 及信噪比

No.	化合物	定量离子峰面积						RSD%	定量离子 S/N	定性离子 S/N
		1	2	3	4	5	6			
1	NDMA	14,662	12,462	13,774	12,794	14,027	14,076	5.61	38.6	14.04
2	NDEA	11,593	12,187	11,557	13,528	12,449	11,705	5.70	424.6	184.1
3	NEIPA	26,193	26,530	26,695	27,714	26,188	25,196	2.96	920.7	65.2
4	NDIPA	9,804	9,676	9,772	11,085	10,714	10,541	5.28	264.4	139.8
5	NDPA	8,503	9,207	8,930	9,282	8,868	8,728	3.09	171.9	132.1
6	NDBA	772	743	741	808	787	686	6.22	115.4	28.3

### 2.4 实际样品检测及加标回收

准确称取缬沙坦原料药样品 250 mg, 按照 1.3 的方法进行样品前处理, 得到实际样品上机溶液。准确称取样品 250 mg, 添加混合标准溶液, 加标浓度为 30 ng/g, 此浓度为欧洲药典定量限, 上机浓度为分别 3.75 ng/mL, 重复实验两次, 定量结果及回收率见表 4。

表 4 实际样品测试结果及加标回收率

No.	化合物	样品中浓度 (ng/g)	加标后浓度		平均回收率 (%)
			1	2	
1	NDMA	N.D	28.7	28.1	94.7
2	NDEA	N.D	32.1	28.8	101.5
3	NEIPA	N.D	29.7	28.1	96.4
4	NDIPA	N.D	31.9	30.8	104.6
5	NDPA	N.D	29.5	28.4	96.6
6	NDBA	N.D	32.9	29.1	103.4

## ■ 结论

本文建立了三重四极杆气质联用仪测定沙坦类药物中 6 种 N-亚硝胺类基因毒性杂质含量的方法。结果表明：在 1~50 ng/mL 的浓度范围内，6 种 N-亚硝胺的线性相关系数  $r$  为 0.999 以上，线性关系良好。将对照品溶液（3.75 ng/mL）重复进样 6 次，峰面积的相对标准偏差（RSD%）小于 10%，精密度良好，满足欧洲药典质量控制要求。实际样品在 30 ng/g 的加标水平下，加标回收率为 90%~105%。本方法参考欧洲药典 GC-MS/MS 法检测沙坦类药物中 6 种 N-亚硝胺相关标准，可为沙坦类药物中 N-亚硝胺类基因毒性杂质的测定提供参考。

岛津应用云

