

# LCMS-9030 检测缬沙坦原料药中六种亚硝胺类杂质

## LCMS-QTOF-045

**摘要：** 本文利用岛津 LCMS-9030 四极杆飞行时间液质联用系统建立了缬沙坦原料药中六种亚硝胺类遗传毒性杂质 NDMA、NMBA、NDEA、NDIPA、NEIPA 和 NDBA 的分析方法。该方法采用外标法定量，六种亚硝胺类杂质线性相关系数均大于 0.999；六种亚硝胺类化合物定量限（LOQ）在 0.004~0.045 ppm 之间；低中高浓度混合标准工作溶液重复性保留时间 RSD% 为 0.05~0.57%，峰面积 RSD% 为 0.70~8.48%；方法回收率在 82.6~107.5% 之间。方法准确可靠，可用于实际样品的检测。实验结果表明，该方法能快速准确地测定缬沙坦原料药中六种亚硝胺类遗传毒性杂质。

**关键词：** LCMS-9030 四极杆飞行时间液质联用系统 缬沙坦 亚硝胺类化合物

遗传毒性杂质是指化合物本身直接或间接损伤细胞 DNA，产生基因突变或体内诱变，具有致癌可能。亚硝胺类化合物 NDMA、NMBA、NDEA、NEIPA、NDIPA 及 NDBA 是常见的遗传毒性杂质。缬沙坦是一款血管紧张素 II 受体拮抗剂抗高血压类药物，用于治疗高血压症、充血性心力衰竭、后心肌梗塞的药物。2018 年以来，沙坦类药物中陆续被发现检出亚硝胺类化合物，引起社会的广泛关注，其将产生致癌风险，并给相关企业造成巨大损失，故需要进行严格的检测

和管控。

U.S. FDA (Food & Drug Administration) 已公布沙坦类药物中亚硝胺类杂质的 LC-HRMS 分析方法及相关的限度要求：《高分辨质谱法测定 ARB（血管紧张素受体阻滞剂）原料药中六种亚硝胺类杂质》。本实验使用岛津 LCMS-9030 四极杆飞行时间液质联用系统，建立了缬沙坦原料药中六种亚硝胺类杂质 NDMA、NMBA、NDEA、NEIPA、NDIPA 和 NDBA 的分析方法，供制药药检相关从业人员参考。

## ■ 实验部分

### 1.1 仪器

本实验使用岛津 LCMS-9030 四极杆飞行时间液质联用系统。具体配置为：

系统控制器：CBM-20A	柱温箱：CTO-20AC
输液泵：LC-30AD×2	检测器：SPD-M20A
自动进样器：SIL-30AC	在线脱气机：DGU-20A5
质谱仪：LCMS-9030	色谱工作站：LabSolutions Ver 5.109, LabSolutions Insight Ver 3.8

### 1.2 分析条件

液相色谱条件：

色谱柱：ACE-C18-AR (4.6 mm I.D. × 150 mm L., 3 μm)

流动相：A 相 -0.1% 甲酸水；B 相 -0.1% 甲酸甲醇

流速：0.8 mL/min

柱温：40°C

进样体积：10 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 30%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

时间 (min)	单元	处理命令	值
1.50	泵	B.Conc	30
8.50	泵	B.Conc	70
13.00	泵	B.Conc	75
14.00	泵	B.Conc	98
16.00	泵	B.Conc	98
16.10	泵	B.Conc	30
20.00	控制器	Stop	

质谱条件:

离子源: APCI (+, -)      检测器电压: 2.1 kV (+, -)  
 雾化气流速: 3 L/min      扫描模式: MS Scan  
 干燥气流速: 5.0 L/min      事件时间: 0.1 s  
 DL 温度: 180°C      阈值: Low  
 接口温度: 300°C      电晕针电压: (±)3.5 kV  
 加热模块温度: 200°C      EIC 提取误差: 15 ppm  
 MS 参数: 见表 2

表 2 MS 参数

No.	化合物名称	CAS 号	质谱采集时间 (min)	MS Scan (+/-)	MS Scan 范围 (m/z)	EIC 提取 (m/z)
1	NDMA	62-75-9	2.0-4.0	+	65-85	75.0552
2	NMBA	61445-55-4	2.5-4.5	-	140-160	145.0623
3	NDEA	55-18-5	4.5-7.5	+	90-110	103.0859
4	NEIPA	16339-04-1	6.5-8.5	+	105-130	117.1017
5	NDIPA	601-77-4	8.0-10.0	+	120-140	131.1175
6	NDBA	924-16-3	12.0-14.0	+	150-170	159.1490

## ■ 样品前处理

对照品溶液的制备: 取六种亚硝胺类化合物混合标准贮备液 (10 mg/L), 用甲醇作为溶剂逐级稀释为 1、2、5、10、20、50、75、100 ng/mL 的标准系列工作溶液。

供试品溶液的制备: 精密称取 100 mg 缬沙坦原料药至 15 mL 的离心管中, 加入 5.0 mL 甲醇超声涡旋至原料药完全溶解, 即得。

## ■ 结果与讨论

### 3.1 标准工作溶液 EIC 色谱图与供试品溶液 UV 色谱图

为避免高浓度的缬沙坦原料药进入仪器, 污染质谱, 待六种亚硝胺化合物全部出峰后将液相流路切至废液。由于不同色谱系统的延迟体积的差异, 六种亚硝胺杂质和缬沙坦的保留时间会发生变化, 建议配置紫外或二极管阵列检测器进行色谱图的监控。

取 2 中配制得到的 50 ng/mL 标准工作溶液上机分析, 所得色谱图如图 1 (上) 所示。取 2 中制备得到的供试品溶液上机分析, 通过二极管阵列检测器 (检测波长 254 nm) 采集到的色谱图如图 1 (下) 所示, 从图中可以看出六种亚硝胺杂质与缬沙坦分离度良好。自 13.5 min 开始, 设置分流阀流路切换至排液侧 (接废液), 为避免切阀造成下一针进样的基线波动, 18.0 min 将分流阀流路切换至进样侧 (接入质谱)。

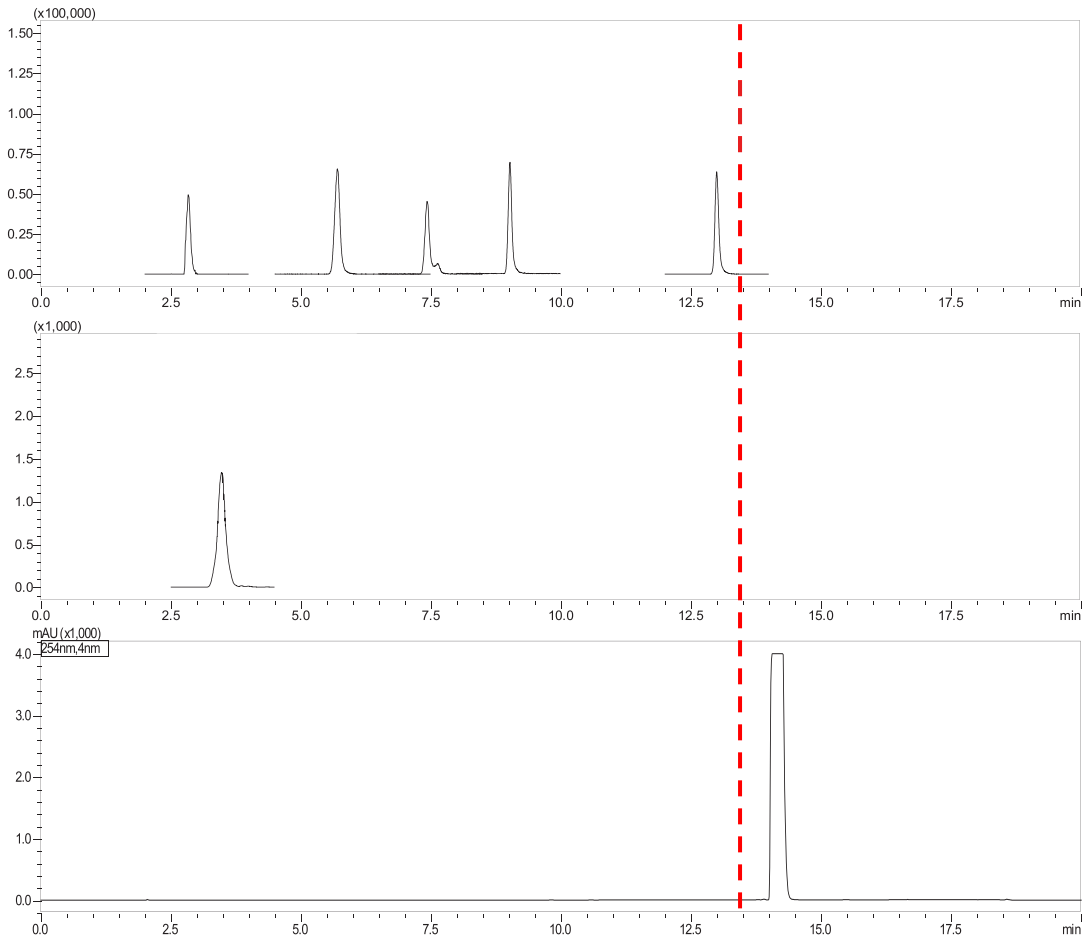


图1 标准工作溶液 (50 ng/mL) EIC 色谱图 (上, 中) 与供试品溶液 UV 色谱图 (下)

### 3.2 线性范围

分别取 2 中配制得到的系列标准工作溶液，按照 1.2 的分析条件进样分析。以各目标物浓度为横坐标，目标物峰面积为纵坐标，以外标法绘制标准曲线，结果见表 3。

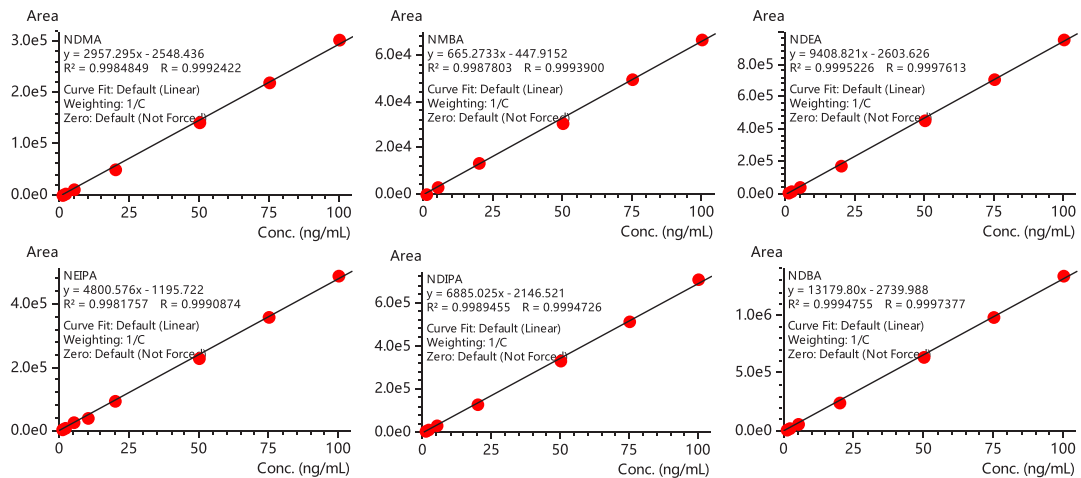


图2 亚硝胺类化合物标准曲线

表 3 标准曲线结果

No.	化合物名称	线性范围 (ng/mL)	标准曲线	相关系数 (r)	准确度 (%)
1	NDMA	1.0-100.0	$Y = 2957.304X + (-2548.44)$	0.9992	84.0-113.5
2	NMBA		$Y = 665.273X + (-447.915)$	0.9994	88.7-111.8
3	NDEA		$Y = 9408.82X + (-2603.63)$	0.9998	96.7-105.2
4	NEIPA		$Y = 4800.58X + (-1195.72)$	0.9991	84.1-110.0
5	NDIPA		$Y = 6885.02X + (-2146.52)$	0.9995	94.7-109.2
6	NDBA		$Y = 13179.8X + (-2739.99)$	0.9997	95.1-106.8

### 3.3 灵敏度实验

按照 1.2 分析条件测定,取混合标准工作溶液中最低点 1.0 ng/mL (0.05 ppm) 计算仪器灵敏度,色谱图见图 3。通过 LabSolutions 软件计算仪器检测限及定量限,结果见表 4。

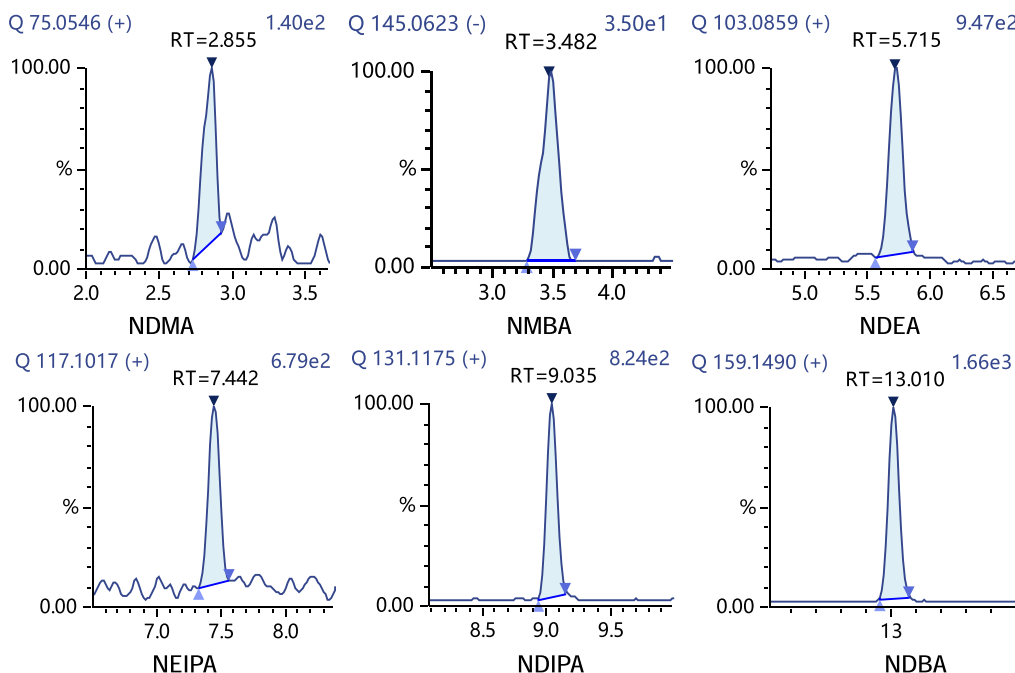


图 3 六种亚硝胺化合物 EIC 色谱图 (1.0 ng/mL)

表 4 六种亚硝胺化合物灵敏度测定结果

No.	化合物名称	检测限 LOD		定量限 LOQ	
		ng/mL	ppm	ng/mL	ppm
1	NDMA	0.025	0.001	0.082	0.004
2	NMBA	0.201	0.010	0.662	0.033
3	NDEA	0.033	0.002	0.109	0.005
4	NEIPA	0.170	0.009	0.568	0.028
5	NDIPA	0.059	0.003	0.196	0.010
6	NDBA	0.039	0.002	0.129	0.006

### 3.4 精密度

取标准工作溶液三组（浓度分别为 2.0 ng/mL、10.0 ng/mL、50.0 ng/mL）按照 1.2 分析条件连续进样 6 次，考察仪器精密度，结果如表 5，六种亚硝胺化合物保留时间 RSD% 为 0.05~0.57%，峰面积 RSD% 为 0.70~8.48%，仪器精密度良好。

参照 U.S. FDA (Food & Drug Administration) 《高分辨质谱法测定 ARB（血管紧张素受体阻滞剂）原料药中六种亚硝胺类杂质》中系统适用性的规定：重复进样 6 次的对照品溶液亚硝胺类杂质目标峰峰面积 RSD% 应不大于 10%。

表 5 精密度试验结果 (n=6)

No.	化合物名称	2.0 ng/mL		10.0 ng/mL		50.0 ng/mL	
		保留时间 RSD(%)	峰面积 RSD(%)	保留时间 RSD(%)	峰面积 RSD(%)	保留时间 RSD(%)	峰面积 RSD(%)
1	NDMA	0.24	6.16	0.17	4.90	0.07	1.18
2	NMBA	0.57	8.48	0.48	3.25	0.15	2.01
3	NDEA	0.07	1.26	0.10	3.41	0.09	0.88
4	NEIPA	0.10	5.08	0.09	2.46	0.08	0.70
5	NDIPA	0.07	1.18	0.09	2.37	0.07	1.11
6	NDBA	0.05	0.74	0.08	1.02	0.05	0.98

### 3.5 加标回收率

取缬沙坦原料药样品，按 2 中供试品溶液的制备进行样品前处理，制备低（80%）、中（100%）、高（120%）3 种浓度的溶液，每个浓度平行制备三份，上机分析，回收率测定结果见表 6。三个不同浓度加标回收率在 82.6~107.5% 之间。

表 6 加标回收实验结果 (n=3)

No.	化合物名称	低浓度 (80%)	中浓度 (100%)	高浓度 (120%)
1	NDMA	92.8	101.9	86.6
2	NMBA	95.4	90.1	93.7
3	NDEA	93.8	95.8	95.8
4	NEIPA	90.3	92.6	106.2
5	NDIPA	82.6	92.3	103.6
6	NDBA	107.5	96.0	95.8

### 3.6 样品测定

取 2 中配制得到的供试品溶液，按 1.2 中的分析条件进行测定，EIC 色谱图如图 4 所示，六种亚硝胺类杂质测定结果见表 7。

参照 U.S. FDA (Food & Drug Administration) 《高分辨质谱法测定 ARB（血管紧张素受体阻滞剂）原料药中六种亚硝胺类杂质》中报告的规定：供试品中测得亚硝胺类杂质浓度 (ppm)  $\geq$  LOD 时，报“检出”；供试品中测得亚硝胺类杂质浓度 (ppm)  $<$  LOD 时，报“未检出”。

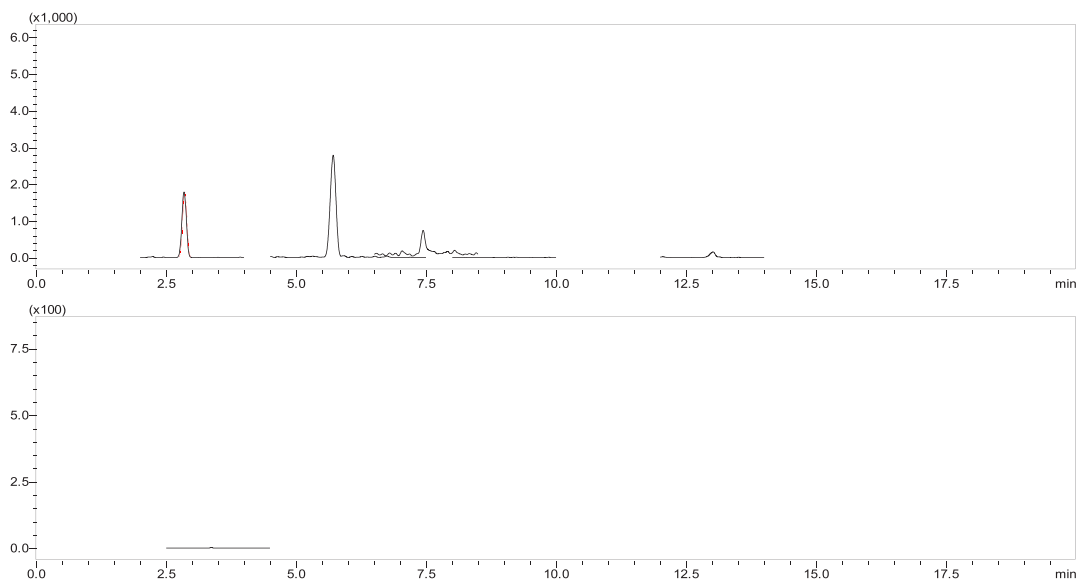


图 4 供试品溶液 EIC 色谱图

表 7 供试品溶液测试结果

No.	化合物名称	含量 (ppm)
1	NDMA	0.289
2	NMBA	N.D.
3	NDEA	0.147
4	NEIPA	0.042
5	NDIPA	N.D.
6	NDBA	0.005

N.D. = Not Detected

## ■ 结论

本文使用岛津 LCMS-9030 四极杆飞行时间液质联用系统建立了缬沙坦原料药中六种亚硝胺类遗传毒性杂质 NDMA、NMBA、NDEA、NDIPA、NEIPA 和 NDBA 的分析方法。实验结果表明，线性、灵敏度、精密度、回收率结果均符合 U.S. FDA (Food & Drug Administration) 《高分辨质谱法测定 ARB (血管紧张素受体阻滞剂) 原料药中六种亚硝胺类杂质》的规定。该方法能快速准确地测定缬沙坦原料药中六种亚硝胺类杂质，为制药药检相关行业的从业人员提供了参考。

岛津应用云

