

# LCMS-8050 同时检测缬沙坦原料药中六种亚硝胺类杂质

LCMSMS-447

**摘要：** 本文利用岛津 LCMS-8050 三重四极杆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 同时分析的方法。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在 0.998 以上；六种亚硝胺类化合物定量限（LOQ）在 0.001~0.01 ppm 之间；3 ng/mL 标准溶液连续进样 8 次，其保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.02~0.27% 和 1.28~4.61% 之间；缬沙坦原料药三个不同浓度样品加标回收率在 95.1~108.7% 之间，平行处理三次的相对标准偏差在 0.81~7.40% 之间，方法准确可靠，可用于实际样品的检测。

**关键词：** LCMS-8050 三重四极杆液质联用系统 缬沙坦 亚硝胺类化合物

遗传毒性杂质（Genotoxic Impurities, GTI）又称基因毒性杂质，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，主要用于治疗高血压症、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，并给相关企业造成巨大损失。沙坦类药物作为高血压

用药，具有服药时间长的特点，因此其中可能含有的亚硝胺类遗传毒性杂质将产生致癌风险，故需要进行严格的检测和管控。

目前 FDA 已公布沙坦类药物中亚硝胺类杂质的 LC-HRMS 和 LC-MS/MS 分析方法及相关的限度要求。本文采用岛津三重四极杆液质联用仪 LCMS-8050，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，供相关检测人员参考。

## ■ 实验部分

### 1.1 仪器

岛津 LCMS-8050 三重四极杆液质谱联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A<sub>5</sub> 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-20AC 柱温箱，FCV-20AH 流路切换阀，CBM-20A 系统控制器，SPD-20A 紫外检测器，LCMS-8050 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.97 色谱工作站。

### 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

进样量：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

Time(min)	Module	Command	Value
1.50	泵	B.Conc	30
8.50	泵	B.Conc	70
13.00	泵	B.Conc	75
13.10	控制器	Event	1*
14.00	泵	B.Conc	98
16.00	泵	B.Conc	98
16.10	泵	B.Conc	30
18.50	控制器	Event	0*
20.00	控制器	Stop	

注：\* “0” 表示流路切换至质谱，“1” 表示流路切换至废液；

LCMS-8050 质谱条件：

离子源	: APCI (+)	接口电压	: 4.0 kV
雾化气流速	: 3 L/min	加热模块温度	: 200°C
DL 温度	: 180°C	扫描模式	: 多反应监测 (MRM)
接口温度	: 300°C	干燥气流速	: 5.0 L/min
MRM 参数	: 见表 2		

表 2 MRM 参数

No.	名称	CAS	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	NDMA	62-75-9	75.10	43.15*	-14	-14	-17
				58.15	-14	-16	-24
2	NMBA	61445-55-4	147.10	117.15*	-11	-12	-20
				44.05	-11	-14	-19
3	NDEA	55-18-5	103.10	75.10*	-20	-15	-27
				47.20	-20	-19	-19
4	NEIPA	16339-04-1	117.10	75.10*	-14	-13	-16
				47.00	-14	-18	-21
5	NDIPA	601-77-4	131.00	89.10*	-10	-12	-10
				47.00	-10	-15	-19
6	NDBA	924-16-3	159.30	57.15*	-12	-15	-24
				103.00	-12	-14	-11

注：\* 表示定量离子

### 1.3 标准溶液的配置

取六种亚硝胺类化合物混合标准贮备液 (50 mg/L)，用甲醇做溶剂逐级稀释为 1、2、5、10、50 ng/mL 的标准系列工作溶液，待上机分析。

## 1.4 样品前处理方法

准确称取缬沙坦原料药 400 mg 至 15 mL 的离心管中，先加 2 mL 甲醇超声涡旋至原料药完全溶解，再加甲醇定容至 4 mL，经 0.22 μm 滤膜过滤，取滤液上机分析。

## ■ 结果与讨论

### 2.1 标准品 MRM 色谱图与缬沙坦 UV 图

为避免高浓度的缬沙坦原料药进入仪器，污染质谱，实验中六种亚硝酸胺杂质全部出峰后将液相流路切入废液。由于不同色谱系统的延迟体积的差异，六种亚硝酸胺杂质和缬沙坦的保留时间会发生变化，建议配置紫外检测器进行色谱图的监控。

按照 1.3 配制 10 ng/mL 的混合标准溶液上机分析，所得色谱图如图 1 上图所示，缬沙坦原料药按照 1.4 处理上机分析，通过紫外检测器（检测波长 254nm）监测缬沙坦色谱图如图 1 下图所示，从图中可以看出六种亚硝酸胺杂质与缬沙坦间分离度良好，NDBA 出峰后 13.1 min 开始切入废液，为避免切阀造成下一针进样的基线波动，18.5 min 将流路切入质谱。

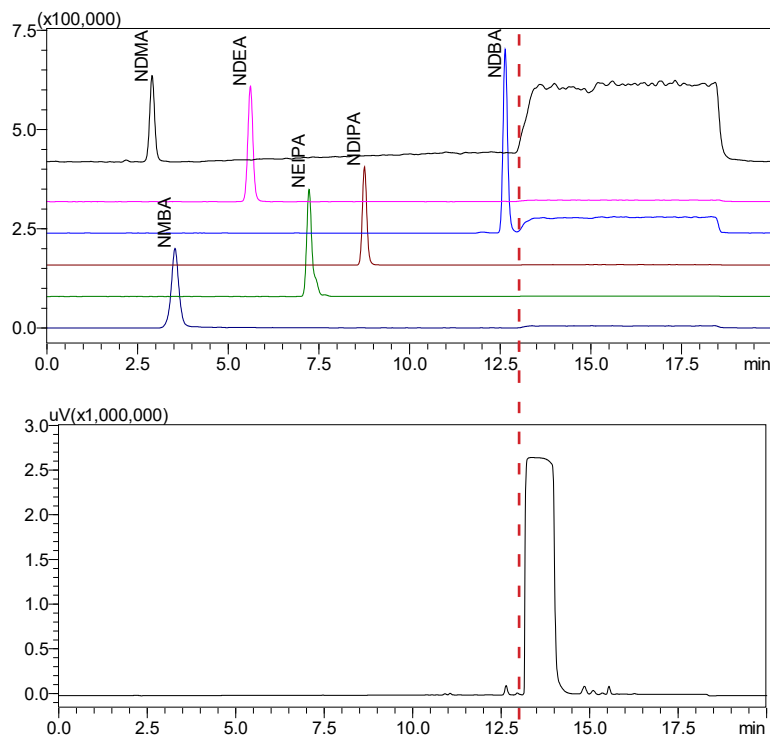


图 1 标准品 (10 ng/mL) MRM 色谱图 (上) 与缬沙坦原料药 UV 图 (下)

### 2.2 线性范围

按照 1.3 配制成各浓度标准溶液，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，所得校准曲线线性关系良好，线性相关系数均大于 0.998，准确度在 90.6%-104.8% 之间。曲线结果如下图 2 所示。

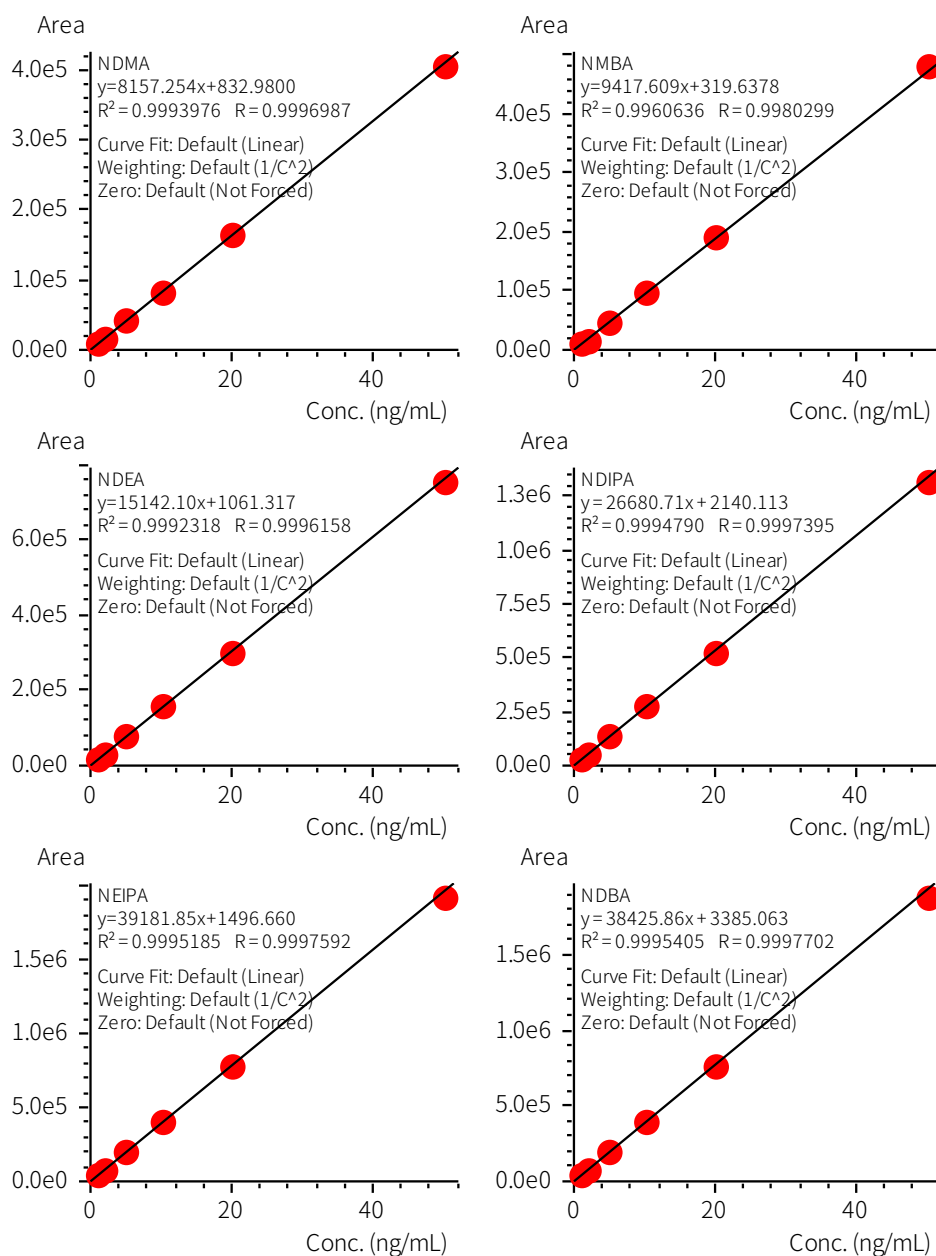


图 2 亚硝酸胺类化合物标准曲线

### 2.3 灵敏度实验

配制一定浓度的标准溶液进行灵敏度测试，使用 USP 法计算 S/N，各化合物 LOQ (S/N=10) 在 0.1~1 ng/mL (0.001~0.01 ppm) 之间，具体色谱图如图 3 所示。

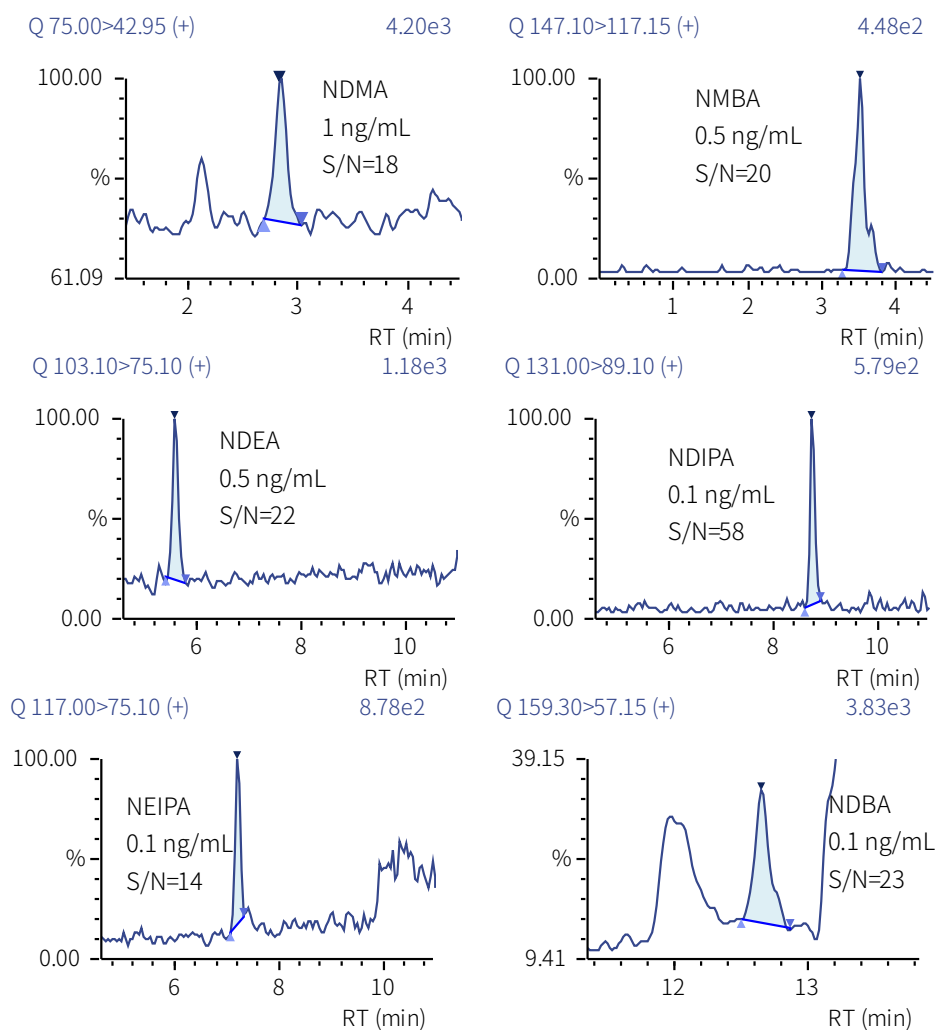


图3 六种亚硝胺类杂质的色谱图 (0.1~1 ng/mL)

#### 2.4 重复性考察

3 ng/mL 的标准溶液，连续进样 8 次，考察保留时间和峰面积的重复性，结果如下表 3 所示。保留时间和峰面积的相对标准偏差 (RSD%) 分别在 0.02~0.27% 和 1.28~4.61% 之间，仪器精密度高。

表 3 重复性测试 (n=8)

NO.	化合物名称	保留时间 RSD%	峰面积 RSD%
1	NDMA	0.04	2.88
2	NMBA	0.27	4.61
3	NDEA	0.04	2.03
4	NEIPA	0.02	1.76
5	NDIPA	0.02	1.39
6	NDBA	0.02	1.28

## 2.5 加标回收实验

缬沙坦原料药样品中添加三个不同浓度的标准溶液，每个浓度的加标样品平行处理三份，结果如表 4 所示，缬沙坦原料药中未检测出六种亚硝胺类化合物，三个不同浓度加标回收率在 95.1~108.7% 之间，平行处理三次的相对标准偏差在 0.81~7.40% 之间，方法准确可靠。

表 4 加标回收实验结果 (n=3)

NO	化合物	2 ng/mL (0.02 ppm)		5 ng/mL (0.05 ppm)		10 ng/mL (0.1 ppm)	
		回收率 %	RSD%	回收率 %	RSD%	回收率 %	RSD%
1	NDMA	106.0	2.08	99.8	3.96	100.5	1.68
2	NMBA	107.0	3.68	96.6	7.40	100.4	4.20
3	NDEA	108.7	2.00	98.1	2.47	97.2	0.81
4	NEIPA	101.5	1.56	95.1	2.54	95.2	4.04
5	NDIPA	106.0	2.30	98.4	2.77	95.8	1.70
6	NDBA	106.9	2.07	98.4	5.22	96.6	4.52

## ■ 结论

本实验建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定缬沙坦原料药中 NDMA、NMBA、NDEA、NEIPA、NDIPA 和 NDBA 六种亚硝胺类化合物的方法，用外标法定量，定量限在 0.1~1 ng/mL (0.001~0.01 ppm) 之间，3 ng/mL 标准溶液重复进样 8 针，其保留时间和峰面积的 RSD% 分别在 0.02~0.27% 和 1.28~4.61% 之间；缬沙坦原料药三个不同浓度样品加标回收率在 95.1~108.7% 之间，平行处理三次的相对标准偏差在 0.81~7.40% 之间。该方法适用于缬沙坦原料药中六种亚硝胺类遗传毒性杂质的测试，供相关人员参考。

岛津应用云

