

LCMS-8045 测定缬沙坦中 5 种亚硝胺类基因毒性杂质

LCMSMS-541

摘要: 本文参考 EP 征求意见稿《2.4.36. N-NITROSAMINES IN ACTIVE SUBSTANCES(活性物质中的 N-亚硝胺)》，使用岛津三重四极杆液质联用仪 LCMS-8045 检测了缬沙坦中的 NDMA、NMBA、NDEA、NDiPA 和 NEiPA 这 5 种亚硝胺类基因毒性杂质。该方法采用内标法定量，五种亚硝胺类杂质线性相关系数均在 0.9981 以上；0.9 ng/mL 五种亚硝胺类化合物定量离子对 S/N 在 11.2-48.5 之间，定性离子对 S/N 均在 6.7 以上；不同浓度标准溶液连续进样 6 次，其保留时间和峰面积的相对标准偏差分别不超过 0.19% 和 12.66%；缬沙坦原料药三个不同浓度样品加标回收率在 73.1~113.1% 之间。

关键词: LCMS-8045 缬沙坦 亚硝胺 基因毒性杂质 EP

亚硝胺类物质属于最近较受大家关注的基因毒性杂质之一，包括 NDMA、NMBA、NDEA、NDiPA、NEiPA、NDPA、NDBA 等。国家药品监督管理局药品评审中心 2020 年 5 月发布的《化学药物中亚硝胺类杂质研究技术指导原则（试行）》中指出：“亚硝胺类杂质属于 ICH M7(R1)(《评估和控制药物中 DNA 反应性(致突变)杂质以限制潜在致癌风险》)指南中提及的“关注队列”物质。因此药物中由原料、制药工艺、包装

材料等引入和产生的氮亚硝胺类杂质的检测对于药物安全性控制具有重要意义。

本文参照 EP 征求意见稿《2.4.36. N-NITROSAMINES IN ACTIVE SUBSTANCES(活性物质中的 N-亚硝胺)》，使用岛津三重四极杆液质联用仪 LCMS-8045 检测了缬沙坦中的 NDMA、NMBA、NDEA、NDiPA 和 NEiPA 这 5 种亚硝胺类基因毒性杂质。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津 Nexera LC-40B X3 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用系统。具体配置为：

系统控制器：CBM-40

自动进样器：SIL-40C X3

输液泵：LC-40B X3

质谱仪：LCMS-8045

柱温箱：CTO-40S

PDA 检测器：SPD-M40

色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.99 SP2

1.2 分析条件

液相色谱条件：

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

流动相：A-0.1% 甲酸水溶液；B- 甲醇

流速：0.50 mL/min

柱温：40 °C

进样量：20 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 20%

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.00	Pumps	Pump B Conc.	20
6.00	Pumps	Pump B Conc.	45
14.00	Pumps	Pump B Conc.	45
16.00	Pumps	Pump B Conc.	95
35.00	Pumps	Pump B Conc.	95
35.01	Pumps	Pump B Conc.	20
43.00	Controller	Stop	

注：17-35 min 洗脱液切入废液

质谱条件：

分析仪器：LCMS-8045

接口电压：4.5 kV

加热模块温度：200°C

雾化气流速：4.4 L/min

扫描模式：多反应监测 (MRM)

 离子源：APCI⁺

接口温度：350°C

DL 温度：180°C

干燥气流速：10.0 L/min

MRM 参数：见表 2

表 2 MRM 参数

No.	化合物名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE	Q3 Pre Bias (V)	QA Bias (V)	QA RF (V)
1	NDMA	75.00	57.80*	-13.0	-18.0	-21.0	50	100
			43.00	-29.0	-18.0	-15.0	50	100
2	NMBA	147.20	117.10*	-11.0	-9.0	-22.0	0	50
			87.10	-11.0	-13.0	-16.0	0	50
3	NDEA	103.10	75.00*	-16.0	-13.0	-26.0	0	50
			47.00	-11.0	-18.0	-16.0	0	50
4	NEiPA	117.10	75.10*	-25.0	-12.0	-29.0	0	50
			46.90	-14.0	-18.0	-17.0	0	50
5	NDiPA	131.10	88.90*	-10.0	-12.0	-15.0	0	50
			47.10	-10.0	-15.0	-17.0	0	50
6	NDPA	131.10	89.10*	-10.0	-10.0	-17.0	0	50
			47.00	-10.0	-14.0	-16.0	0	50
7	NDBA	159.30	57.10*	-12.0	-14.0	-20.0	0	50
			103.10	-12.0	-12.0	-20.0	0	50
8	NDEA-d10	113.10	81.10*	-12.0	-15.0	-15.0	0	50
			34.10	-12.0	-16.0	-30.0	0	50

* 定量离子对

1.3 样品前处理

精确称取 150 mg 缬沙坦于 10 mL 离心管中，加入 0.5 mL 甲醇和 0.5 mL 内标溶液 (9 ng/mL 于甲醇中)，涡旋 5 min 后超声提取 15 min；加入 4.0 mL 水，再次涡旋 5 min 后超声提取 15 min，10000 r/min 离心 5 min。以 0.2 μm GHP 滤膜过滤后，滤液上机检测。

■ 结果讨论

2.1 标准品 TIC 图和缬沙坦 PDA 色谱图 (254 nm)

为避免高浓度的缬沙坦原料药进入仪器污染质谱, EP 征求意见稿 2.4.36 建议在 NDiPA 出峰后将洗脱液切入废液流路, 本实验最终确定 17.5-35 min 之间洗脱液切入废液流路。由图 1 可知, NDMA、NMBA、NDEA、NEiPA 和 NDiPA 与缬沙坦分离良好。NDPA、NDBA 与缬沙坦保留时间接近, 意见稿建议使用 GC-MS/MS 方法检测。

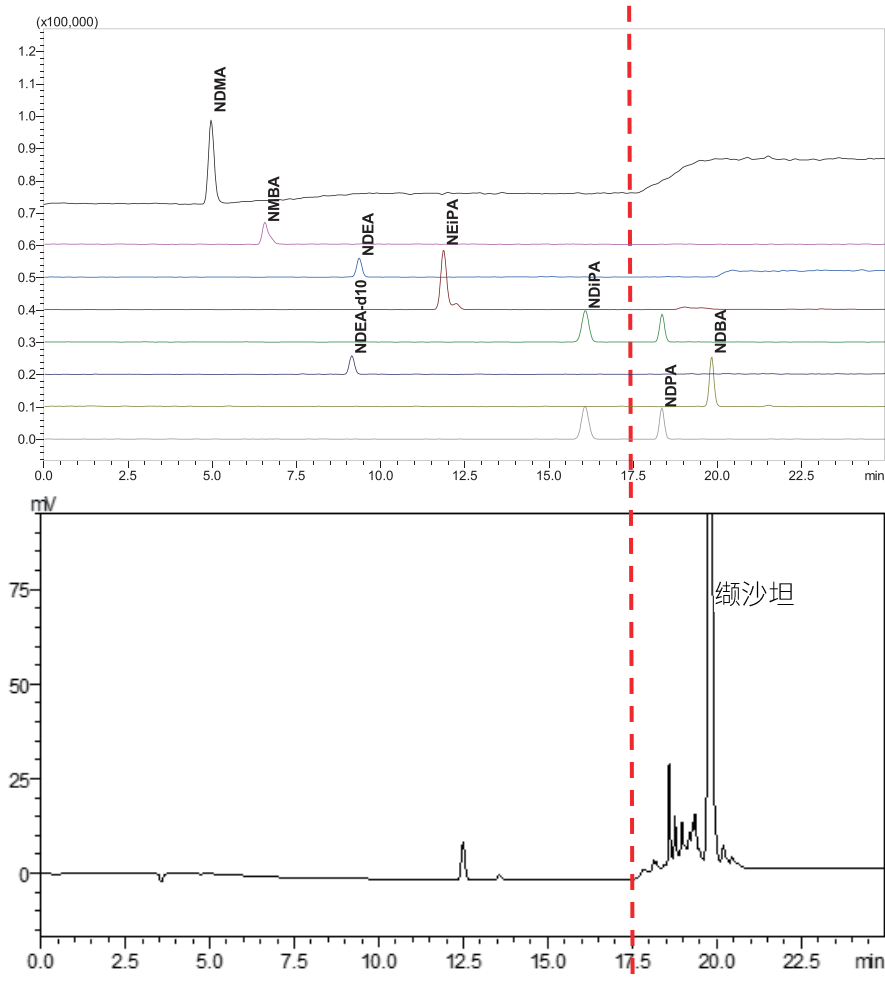
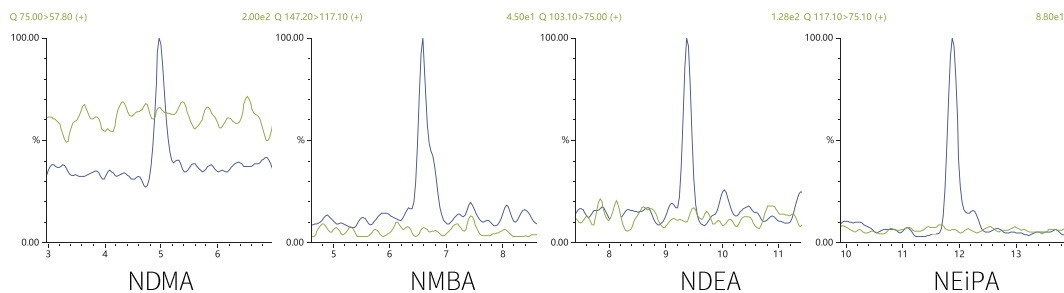


图 1 9 ng/mL 混标 TIC 图 (上) 和缬沙坦 PDA 色谱图 (254 nm)

2.2 专属性

20% 甲醇水溶液和 0.9 ng/mL 的标准溶液 MRM 色谱图如图 2 所示, 空白样品无干扰。



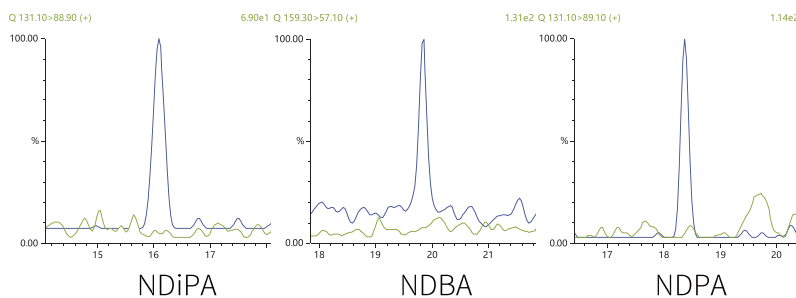


图2 20% 甲醇 (绿) 和 0.9 ng/mL 标准溶液 (蓝) MRM 色谱图

2.3 灵敏度

EP 征求意见稿 2.4.36 中规定: 浓度为 0.9 ng/mL 的各目标物定量离子对和定性离子对 S/N 应分别大于 10 和 3。其 MRM 色谱图及 S/N 分别如图 3 和表 3 所示, 灵敏度满足相关要求。

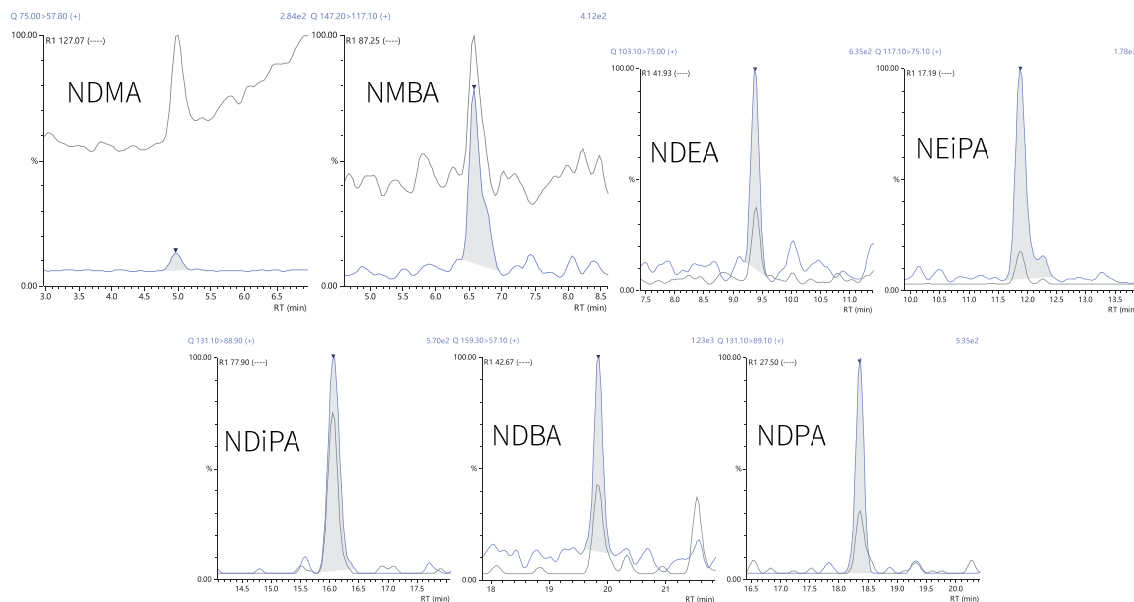


图3 0.9 ng/mL 标准溶液定量离子对 (蓝) 和定性离子对 (黑) MRM 色谱图

表3 定量离子对和定性离子对 S/N(0.9 ng/mL)

No.	化合物	前体离子	产物离子	S/N(ASTM 法)
1	NDMA	75.00	57.80*	11.2
			43.00	17.5
2	NMBA	147.20	117.10*	26.6
			87.10	6.7
3	NDEA	103.10	75.00*	13.5
			47.00	8.3
4	NEiPA	117.10	75.10*	47.5
			46.90	28.3
5	NDiPA	131.10	88.90*	22.0
			47.10	20.7

6	NDPA	131.10	89.10*	28.4
			47.00	18.1
7	NDBA	159.30	57.10*	21.2
			103.10	27.5

2.4 校准曲线

以 20% 甲醇水溶液为溶剂, 逐级稀释配制浓度分别为 0.9、1.8、4.5、9、18、45 ng/mL 的混合标准溶液, 内标法建立校准曲线如图 4 所示, 线性方程、相关系数及准确度如表 4 所示。

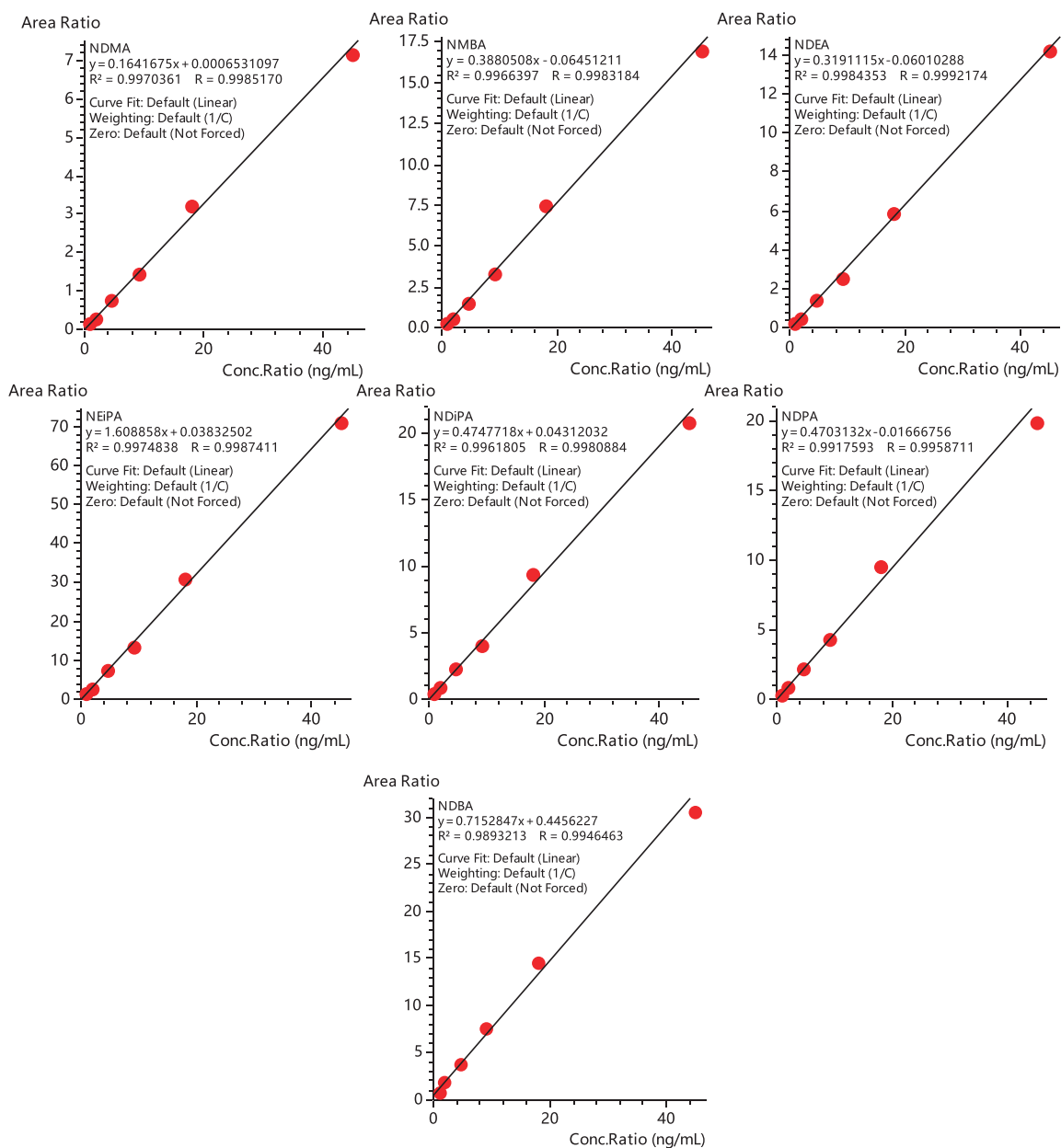


图 4 校准曲线

表 4 较准曲线参数

目标物	线性范围 (ng/mL)	线性方程	相关系数 r	准确度 (%)
NDMA	0.9-45	$Y = (0.1642)X + (0.0007)$	0.9985	90.2-108.5%
NMBA	0.9-45	$Y = (5078.02)X - (0.0645)$	0.9983	88.3-112.2%
NDEA	0.9-45	$Y = (0.3191)X - (0.0601)$	0.9992	89.5-110.4%
NEiPA	0.9-45	$Y = (1.6089)X + (0.0383)$	0.9987	89.2-110.6%
NDiPA	0.9-45	$Y = (0.4748)X + (0.0431)$	0.9981	89.1-110.5%
NDBA	0.9-45	$Y = (0.7153)X + (0.4456)$	0.9959	89.8-110.7%
NDPA	0.9-45	$Y = (0.4703)X - (0.0167)$	0.9946	93.6-106.6%

2.5 重复性考察

对不同浓度的样品分别连续分析 6 次, 计算保留时间和峰面积的 RSD. 结果见表 5, 保留时间 RSD 均不高于 0.19%, 峰面积 RSD 均不高于 12.66%.

表 5 保留时间和面积 RSD

名称	浓度 (ng/mL)	保留时间 RSD(%)	峰面积 RSD (%)
NDMA	0.9	0.12	10.08
	1.8	0.07	4.28
	4.5	0.09	4.53
NMBA	0.9	0.19	10.19
	1.8	0.11	9.50
	4.5	0.12	6.10
NDEA	0.9	0.16	12.66
	1.8	0.04	7.70
	4.5	0.08	10.27
NEiPA	0.9	0.17	6.41
	1.8	0.04	4.09
	4.5	0.10	4.20
NDiPA	0.9	0.19	5.18
	1.8	0.09	5.62
	4.5	0.16	5.65

2.5 实际样品分析及回收率考察

缬沙坦中加标不同浓度, 考察回收率, 结果如表 6 所示。

表 6 实际样品分析及加标回收率考察

名称	缬沙坦进样 溶液浓度	加标回收率 (%)		
		0.9 ng/mL	1.8 ng/mL	4.5 ng/mL
NDMA	<0.9 ng/mL	101.7	100.8	96.2
NMBA	N.D.	111.8	100.8	109.9
NDEA	N.D.	113.1	112.4	106.6
NEiPA	N.D.	86.0	81.4	84.1
NDiPA	N.D.	73.1	77.2	74.9

注：N.D. 表示未检出

■ 结论

本文参考 EP 征求意见稿《2.4.36. N-NITROSAMINES IN ACTIVE SUBSTANCES(活性物质中的 N- 亚硝胺)》，使用岛津三重四极杆液质联用仪 LCMS-8045 检测了缬沙坦中的 NDMA、NMBA、NDEA、NDiPA 和 NEiPA 这 5 种亚硝胺类基因毒性杂质。该方法采用内标法定量，五种亚硝胺类杂质线性相关系数均在 0.9981 以上；0.9 ng/mL 五种亚硝胺类化合物定量离子对 S/N 在 11.2-48.5 之间，定性离子对 S/N 均在 6.7 以上；不同浓度标准溶液连续进样 6 次，其保留时间和峰面积的相对标准偏差分别不超过 0.19% 和 12.66%；缬沙坦原料药三个不同浓度样品加标回收率在 73.1~113.1% 之间。

岛津应用云

