

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法检测美罗培南中的遗传毒性杂质 NDMA

LCMSMS-540

摘要： 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱三重四极杆质谱联用仪检测美罗培南原料药中遗传毒性杂质 NDMA 的方法。本方法采用外标法定量，定量限为 0.02 ppm，线性相关系数大于 0.999。对 1 ng/mL 的标准溶液重复进样六针，保留时间和峰面积的相对标准偏差分别为 0.08 % 和 5.51 %。美罗培南原料药三个不同浓度样品加标回收率在 91.9~107.8% 之间，平行处理三次的相对标准偏差在 1.89~5.12% 之间。

关键词： 超高效液相色谱 三重四极杆质谱 亚硝胺类化合物 遗传毒性杂质

所谓遗传毒性杂质 (GTI) 是指能够引起 DNA 突变、染色体断裂或者 DNA 重组的物质，并且在很低的浓度下即可诱导基因突变并导致染色体的断裂和重排，具有潜在的致癌性。药物生产等过程中引入或产生的亚硝基化合物 (N-nitroso compounds) 是一类含有 N-NO 基的强致癌化合物，属于遗传毒性杂质。因此，近些年 FDA、EMA、ICH、USP、CFDA 等众多权威机构相继发布了相关的指导原则，明确规定了基因毒性杂质的限度，要求对原料药及制剂生产过程中所产生的基因毒性杂质进行分析和控制。目前 FDA 规定沙坦类抗高血压药物中 NDMA 相对含量的限量标准为 0.3

ppm (按每日服用 320 mg 沙坦类药物计算)。

美罗培南，或译美洛培南，是一种有非常广泛抗菌性及可供注射的抗生素，用于治疗多种不同的感染，包括脑膜炎及肺炎。它是一种 β 内酰胺类抗生素，属于碳青霉烯的分类下。由于其属于容易降解产生 NDMA 的药物，所以药物生产过程中须检测评估 NDMA。

目前 FDA 和 EDQM 均已公布 NDMA 单独测定的 LC-MS/MS 分析方法，本文参考以上分析方法，使用岛津三重四极杆液质联用仪 LCMS-8060，建立了测定美罗培南原料药中亚硝基类化合物 NDMA 的方法，供相关检测人员参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

系统控制器：CBM-20A

输液泵：LC-30AD×2

柱温箱：CTO-30A

质谱检测器：LCMS-8060

脱气机：DGU-20A_{SR}

自动进样器：SIL-30ACMP

色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.99

切换阀：FCV-12AH

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：ACE C18-AR, 100 mm×4.6 mm I.D., 3 μ m

流动相：A-0.1% 甲酸；B- 甲醇

洗针模式：进样前后洗针，External only (进样针外壁清洗)，Rinse Port

流速：0.8 mL/min

柱温：40 °C

进样体积：20 μ L

洗针液：甲醇 / 水 =1:1 (v:v)

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 1 %，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.00	Pumps	Pump B Conc.	1**
3.00	Pumps	Pump B Conc.	20
5.50	Oven	CTO.RVR	0*
7.00	Pumps	Pump B Conc.	90
9.00	Pumps	Pump B Conc.	90
9.10	Pumps	Pump B Conc.	1**
14.00	Controller	Stop	

注：* “0” 表示流路切换至废液；** “1” 表示流路切换至质谱。

质谱条件

离子化模式：APCI，正离子模式

雾化气流速：4.2 L/min

接口温度：300°C

DL 温度：180°C

碰撞气：氩气 270 kPa

加热模块温度：200°C

干燥气流速：15.0 L/min

扫描模式：多反应监测 (MRM)

接口电压：4.5 kV

MRM 参数：见表 2

表 2 MRM 参数

中文名称	英文名称	缩写	CAS 号	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
N-亚硝基二甲胺	N-Nitrosodimethylamine	NDMA	62-75-9	75.10	58.10*	-14.0	-17.0	-24.0
					42.95	-29.0	-18.0	-16.0

* 代表定量离子对。

1.3 标准溶液配制

取 NDMA 混合标准贮备液 (10 mg/L)，以 30% 甲醇逐级稀释为 0.3、0.4、0.5、1、2、5 和 10 ng/mL 的标准溶液，直接进样分析。

1.4 样品前处理

准确称取 150 mg 美罗培南粗品至塑料离心管中，先加入 3 mL 甲醇，超声至原料药完全溶解，再用超纯水定容至 10 mL，涡旋混匀经 0.22 μm 滤膜过滤，取滤液上机检测。

■ 结果与讨论

2.1 标准样品色谱图

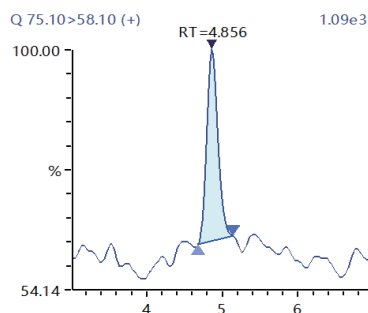


图 1 0.3 ng/mL 标准样品 MRM 色谱图 (S/N=10.73, ASTM)

2.2 线性关系

按照 1.3 配制七个不同浓度的标准系列溶液,按照 1.2 中的分析条件进行测定。使用 Labsolutions 软件 (Ver. 5.99)选择外标法进行定量。NDMA 标准曲线见图 2,线性方程、相关系数和方法定量限(S/N=10,以 ASTM 方式计算)见表 3。

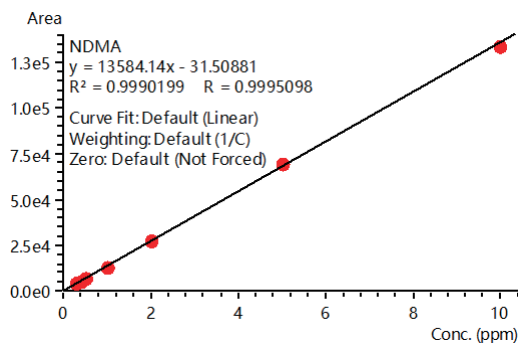


图 2 NDMA 标准曲线

表 3 线性关系和定量限

名称	定量方法	校准曲线	线性范围 (ng/mL)	准确度 (%)	相关系数 r	定量限 *(ppm)
NDMA	外标法	Y=13584.14X-31.50881	0.3~10.0	92.6~106.6	0.9990	0.02

注: * 按照样品 15 mg/mL 的配制浓度计算转换。

2.3 精密度实验

对 1 ng/mL 的混合标准溶液连续 6 次进样,考察仪器的精密度,保留时间和峰面积的精密度结果如表 4 所示。该浓度下标准品的保留时间和峰面积的相对标准偏差为 0.087% 和 5.511%, 仪器精密度良好。

2.4 加标回收实验

在美罗培南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,加标回收结果见表 5。三个不同浓度加标回收率在 91.9~107.8% 之间,平行处理三次的相对标准偏差在 1.89~5.86% 之间,方法准确可靠。

表 5 样品加标回收率 (n=3)

化合物名称	0.3 ng/mL		1.0 ng/mL		5.0 ng/mL	
	回收率 %	RSD%	回收率 %	RSD%	回收率 %	RSD%
NDMA	91.9	5.31	98.2	5.86	107.8	1.89

2.5 专属性实验

高浓度标准样品 (10 ng/mL) 分析完成后,进样空白溶剂,考察残留及专属性情况。结果表明,如图 3 所示,目标保留时间处,NDMA 检测通道中无明显干扰。

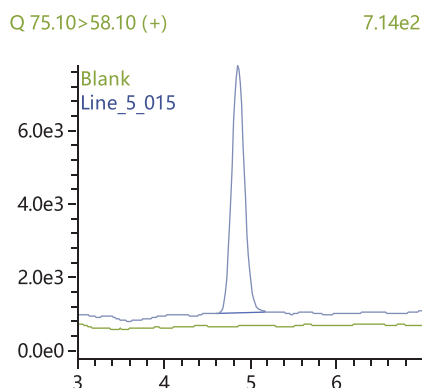


图3 标准样品 (5 ng/ml) 和空白样品叠加色谱图 (蓝线: 标准样品; 绿线: 空白样品)

2.6 实际样品测试

将原料药按 1.4 步骤平行处理三份, 上机分析, 样品中均未检出 NDMA, 实际样品色谱图见图 4。

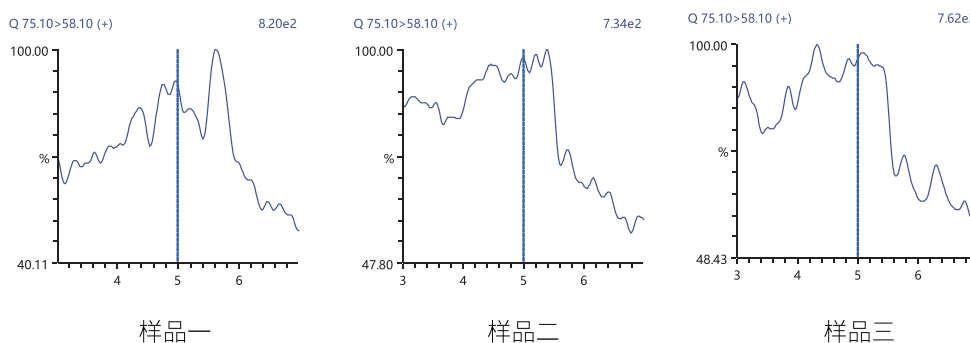


图4 实际样品检测 MRM 色谱图

■ 结论

本文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-8060 联用测定美罗培南原料药中遗传毒性杂质 NDMA 的方法。使用 Labsolutions 软件 (Ver.5.99) 实现外标法定量, 定量限分别为 0.02 ppm, 线性相关系数不低于 0.999, 满足限量标准要求, 1 ng/mL 基质混合标准品平行测试 6 次, 保留时间和峰面积的相对标准偏差为 0.087% 和 5.511%。本方法线性范围宽、重复性好、准确度高、前处理简单, 适用于遗传毒性杂质 NDMA 的定量检测。

岛津应用云

