

# LCMS-8050 同时检测遗传毒性杂质 NDMA、NDEA 和 NMBA

## LCMSMS-416

**摘要：** 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-8050 联用同时检测遗传毒性杂质 NDMA、NDEA 和 NMBA 的方法。NDMA 和 NDEA 采用内标法定量，NMBA 采用外标法定量，相关系数大于 0.999。三个浓度下保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.08~0.27 % 和 1.30~3.86 % 之间。NDMA、NDEA 和 NMBA 方法定量限分别为 0.100、0.020 和 0.020 ppm。缬沙坦原料药三个不同浓度样品加标回收率在 88.3~106.8% 之间，平行处理三次的相对标准偏差在 1.04~7.12% 之间。残留实验结果为阴性。

**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

遗传毒性杂质 (Genotoxic Impurity, GTI) 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。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。2018 年以来，沙坦类药物中陆续被发现检出亚硝基类化合物 NDMA、NDEA 和 NMBA，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基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 规定沙坦类抗高血压药物中 NDMA、NDEA、NMBA 相对含量的限量标准分别为 0.3、0.083、0.3 ppm。

目前 FDA 和 EDQM 均已公布 NDMA 和 NDEA 单独测定的 LC-MS/MS 分析方法，EDQM 公布了 NMBA 单独测定的 LC-MS/MS 分析方法。本文参考以上分析方法，采用岛津三重四极杆液质联用仪 LCMS-8050，建立了同时测定缬沙坦原料药中 NDMA、NDEA 和 NMBA 三种亚硝基类化合物的方法，供相关检测人员参考。

## ■ 实验部分

### 1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A5 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-20A 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8050 三重四极杆质谱仪，LabSolutions (Version 5.97) 色谱工作站。

### 1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：Shimadzu Shim-pack Velox C18 2.1×100 mm, 1.8 μm

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：0.3 mL/min 柱温：40 °C

进样体积：20 μL 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 5 %，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.01	Oven	CTO.RVR	1*
1.00	Pumps	Pump B Conc.	5
1.25	Oven	CTO.RVR	0**
1.50	Pumps	Pump B Conc.	30
3.50	Pumps	Pump B Conc.	30
3.70	Oven	CTO.RVR	1*
4.00	Pumps	Pump B Conc.	95
6.00	Pumps	Pump B Conc.	95
6.01	Pumps	Pump B Conc.	5
8.50	Controller	Stop	

注：\* “1” 表示流路切换至废液；\*\* “0” 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：4.4 L/min

接口温度：300°C

DL 温度：150°C

碰撞气：氩气 270 kPa

加热模块温度：200°C

干燥气流速：3.0 L/min

扫描模式：多反应监测 (MRM)

接口电压：4.0 KV

MRM 参数：见表 2

表 2 MRM 参数

No.	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)
1	N-亚硝基二甲胺	N-Nitrosodimethylamine	NDMA	62-75-9	75.15	58.00*	-30.0	-16.0	-27.0
						42.95	-29.0	-18.0	-19.0
						44.05	-13.0	-10.0	-24.0
2	N-亚硝基二乙胺	N-Nitrosodiethylamine	NDEA	55-18-5	103.00	75.10*	-10.0	-13.0	-30.0
						47.00	-23.0	-18.0	-20.0
						29.20	-30.0	-13.0	-30.0
3	N-亚硝基-N-甲基-4-氨基丁酸	N-Nitroso-N-methyl-4-aminobutyric Acid	NMBA	61445-55-4	147.00	117.00*	-10.0	-11.0	-11.0
						43.95	-25.0	-16.0	-25.0
						87.30	-29.0	-12.0	-29.0
4	氘代 N-亚硝基二甲胺	N-Nitrosodimethyl-d6-amine	NDMA-d6	17829-05-9	81.20	64.30*	-30.0	-16.0	-30.0
						46.00	-15.0	-20.0	-20.0
5	氘代 N-亚硝基二乙胺	N-Nitrosodiethyl-d10-amine	NDEA-d10	1219794-54-3	113.15	34.20*	-10.0	-19.0	-10.0
						81.20	-21.0	-10.0	-22.0

\* 代表定量离子对。

### 1.3 标准溶液配制

取三种亚硝胺类化合物混合标准贮备液 (10 mg/L)，以超纯水逐级稀释为 0.2、0.5、1、2、5、10、20、50、100 ng/mL 的标准系列工作溶液，再各取 500 mL，加入 10 μL 内标使用液，混匀待测。

取内标贮备液 NDMA-d6 (50 mg/L) 和 NDEA-d10 (50 mg/L), 以甲醇稀释为内标使用液 (NDMA-d6: 1 mg/L, NDEA-d10: 0.5 mg/L)。

#### 1.4 样品前处理

准确称取 100 mg 原料药样品至塑料离心管中, 加入 200  $\mu$ L 内标使用液, 加入 300  $\mu$ L 甲醇, 摇匀, 超声提取 5 min, 加入 9.5 mL 水, 涡旋混匀, 超声提取 5 min, 4000 r/min 离心 5 min, 上清液经过 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤后, 上机分析。

## 结果与讨论

### 2.1 标准样品色谱图

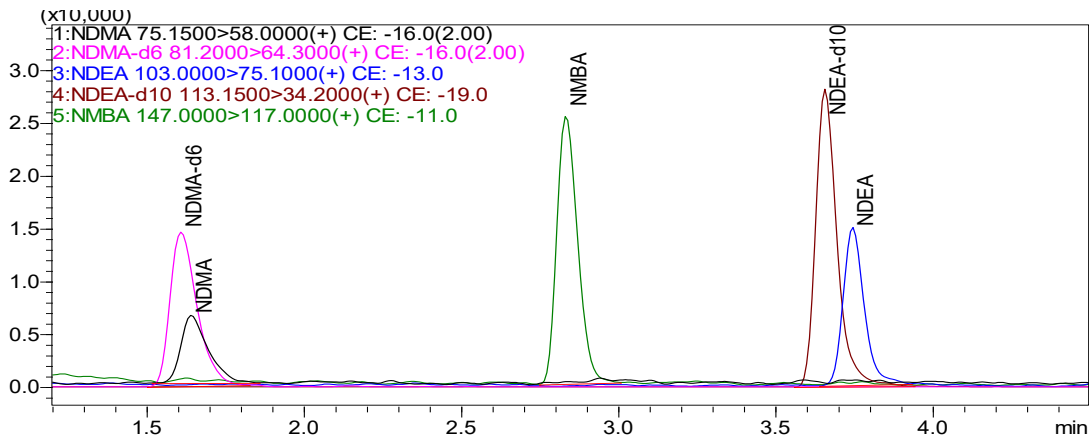


图 1 5.0 ng/mL 标准样品 MRM 色谱图

### 2.2 线性关系

按照 1.3 配制九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. 5.97) 可以实现在一个方法里同时使用内标法和外标法进行定量的功能。本方法中 NDMA 和 NDEA 用内标法绘制标准曲线, NMBA 用外标法绘制标准曲线。各化合物标准曲线见图 2, 线性方程、相关系数、方法检出限 (S/N=3, ASTM 方式) 和方法定量限 (S/N=10, ASTM 方式) 见表 3。

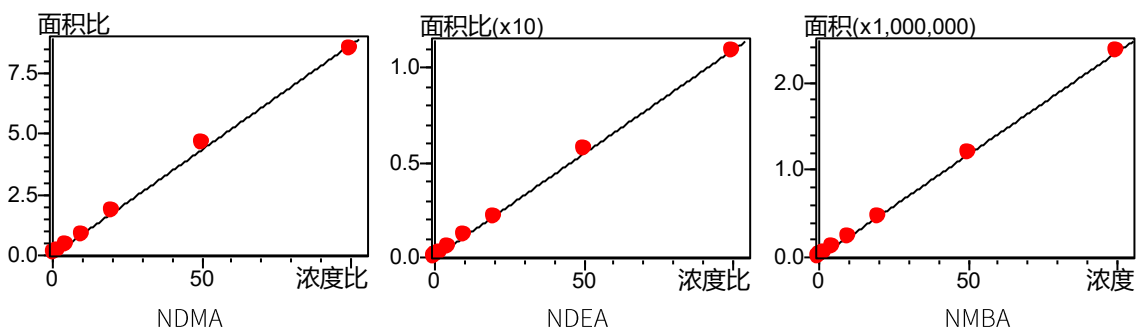


图 2 亚硝胺类化合物标准曲线

表 3 线性关系、检出限和定量限

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	内标法	Y=0.0868X+0.0116	1.0~100.0	94.2~111.3	0.9991	0.1
NDEA	内标法	Y=0.1096X+0.0035	0.2~100.0	88.1~110.0	0.9993	0.02
NMBA	外标法	Y=23505X+65.0798	0.2~100.0	89.5~110.3	0.9999	0.02

### 2.3. 精密度实验

对三个浓度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。三个浓度标准品的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.08~0.27% 和 1.30~3.86% 之间，仪器精密度良好。

表 4 精密度结果 (n=6)

名称	RSD% (2.0 ng/mL)		RSD% (10.0 ng/mL)		RSD% (50.0 ng/mL)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
NDMA	0.25	3.86	0.23	3.86	0.20	2.18
NDEA	0.27	3.63	0.23	2.39	0.08	1.30
NMBA	0.19	2.90	0.17	2.31	0.08	1.78

### 2.4. 加标回收实验

在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，加标回收结果见表 5。缬沙坦原料药中未检测出三种亚硝胺类化合物。三个不同浓度加标回收率在 88.3~106.8% 之间，平行处理三次的相对标准偏差在 1.04~7.12% 之间，方法准确可靠。

表 5 样品加标回收率 (n=3)

化合物名称	样品测定结果 (ng/mL)	2.0 ng/mL		10.0 ng/mL		50.0 ng/mL	
		回收率 %	RSD%	回收率 %	RSD%	回收率 %	RSD%
NDMA	未检出	105.5	5.14	106.8	5.05	97.6	5.44
NDEA	未检出	104.8	4.64	98.8	1.04	88.3	7.12
NMBA	未检出	93.9	6.09	96.1	5.60	91.1	5.09

### 2.5. 残留实验

高浓度标准样品 (100 ng/mL) 分析完成后，进样分析空白，考察残留情况。结果表明，亚硝胺类化合物检测通道中无明显目标化合物干扰。

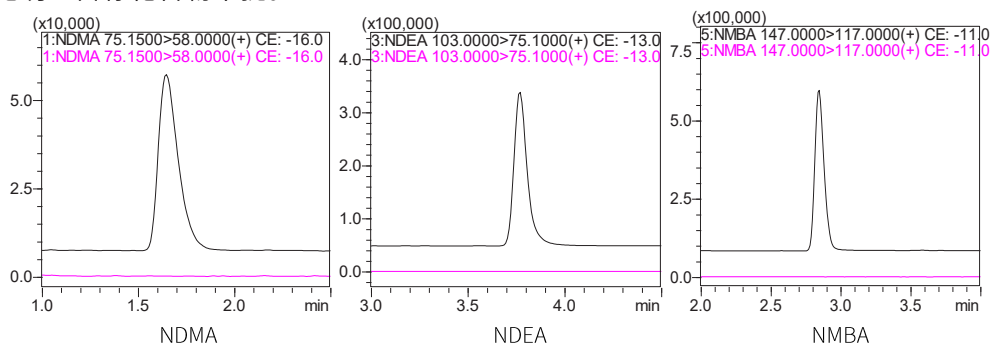


图 3. 标准样品 (100 ng/ml) 和残留考察空白样品叠加色谱图 (黑线: 标准样品; 红线: 空白样品)

## ■ 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-8050 联用同时测定缬沙坦原料药中 NDMA、NDEA 和 NMBA 三种亚硝胺类遗传毒性杂质的方法。使用 Labsolutions 软件 (Ver.5.97) 实现内标法和外标法同时定量, NDMA 和 NDEA 用内标法定量, NMBA 用外标法定量, 定量限分别为 0.100、0.020 和 0.020 ppm, 满足限量标准要求。本方法线性范围宽、重复性好、准确度高、前处理简单, 适合用于三种亚硝胺类遗传毒性杂质的定量检测。