

# LC-MS/MS测定缬沙坦胶囊中13种亚硝胺类杂质的含量

LCMSMS-915

**摘要：** 本文使用岛津三重四极杆液质联用仪测定缬沙坦胶囊中 13 种亚硝胺类杂质的含量。13 种亚硝胺类杂质在 0.5~20 ng/mL 浓度范围内线性关系良好，相关系数大于 0.999。1 ng/mL 的混标溶液连续进样 6 针，保留时间 RSD 在 0.0035%~0.182% 范围内，峰面积 RSD 在 0.37%~4.81% 范围内。三个浓度水平的加标回收率为 80.47~110.88%。该方法灵敏度高，重复性好，能够有效的测定缬沙坦胶囊中 13 种亚硝胺类杂质的含量。

**关键词：** 缬沙坦胶囊 亚硝胺类杂质 液质联用法

## 技术特点：

- ❖ 该方法将缬沙坦胶囊中亚硝胺类杂质的检测扩展到 13 种。
- ❖ 使用 ShimNex S-GTIs 色谱柱可以将 NDMA 与 DMF 完全分离。
- ❖ 采用 Peakintelligence™ 色谱峰智能算法进行色谱峰积分，快速便捷准确。

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 NDELA、NDMA、NMOR、NMBA、NDEA、NPIP、NEIPA、NMPHA、NDPA、NDIPA、NEPHA、NDBA、NDIBA 等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。

本实验使用岛津三重四极杆液质联用仪建立了测定缬沙坦胶囊中亚硝胺类杂质的方法。将方法检测亚硝胺类杂质扩展为 13 种，可为相关从业人员提供参考。

## 实验部分

### 1.1 仪器

本实验采用岛津 LCMS-8050 液质联用系统，配置信息如下：

系统控制器	: CBM-20A	脱气机	: DGU-20A <sub>SR</sub>
输液泵	: LC-30AD×2	柱温箱	: CTO-30A
自动进样器	: SIL-30AC	质谱仪	: LCMS-8050
色谱工作站	: Labsolutions Ver. 5.123	切换阀	: FCV-20AH2

### 1.2 分析条件

#### 液相色谱条件

- 色谱柱：ShimNex S-GTIs (150 mm x 4.6 mm I.D., 3 μm, 岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N:380-01247-31)
- 捕集柱：ShimNex Ghost Trap (30mm×7.6mm I.D, 岛津 (上海) 实验器材有限公司, 柱芯 P/N: 228-59921-91, 柱套 P/N: 380-01259-99)
- 流动相：A-0.1% 甲酸水；B-0.1% 甲酸甲醇；



8	N- 甲基 -N- 亚硝基苯胺 (NMPPhA)	614-00-6	137.10	107.10* 66.10	-22.0 -10.0	-14.0 -22.0	-16.0 -25.0
9	N- 亚硝基二丙胺 (NDPA)	210-698-0	131.20	43.20* 89.30	-22.0 -13.0	-13.0 -12.0	-20.0 -16.0
10	N- 硝基二异丙胺 (NDIPA)	601-77-4	131.20	43.20* 89.30	-22.0 -22.0	-12.0 -11.0	-16.0 -16.0
11	N- 亚硝基 -N- 乙基苯胺 (NEPhA)	612-64-6	151.00	77.10* 51.00	-29.0 -22.0	-23.0 -45.0	-18.0 -23.0
12	N- 亚硝基二丁胺 (NDBA)	924-16-3	159.20	103.20* 57.20	-15.0 -11.0	-10.0 -13.0	-20.0 -19.0
13	N- 亚硝基二异丁胺 (NDiBA)	997-95-5	159.20	103.20* 57.20	-15.0 -11.0	-10.0 -13.0	-20.0 -19.0

\* 代表定量离子对。

### 1.3 标准品溶液配制

称取 13 种亚硝胺对照品适量配制成 1000  $\mu\text{g/mL}$  标准储备液。取适量标准储备液，使用水配制成浓度为 0.5  $\text{ng/mL}$ 、1.00  $\text{ng/mL}$ 、2.00  $\text{ng/mL}$ 、5.00  $\text{ng/mL}$ 、10.00  $\text{ng/mL}$ 、20.00  $\text{ng/mL}$  的标准系列溶液。

### 1.4 样品前处理

精密称取适量样品，置入离心管中，加入 1.6 mL 甲醇，涡旋使溶解，超声 10 min，加 6.4 mL 水，涡旋混匀，超声 10 min，6000 r/min 离心 5 min，取上清过滤，作为供试品溶液。最终浓度以 API 计为 10  $\text{mg/mL}$ 。

## ■ 结果与讨论

### 2.1 13 种亚硝胺杂质的标准溶液谱图及缬沙坦胶囊的 UV 图

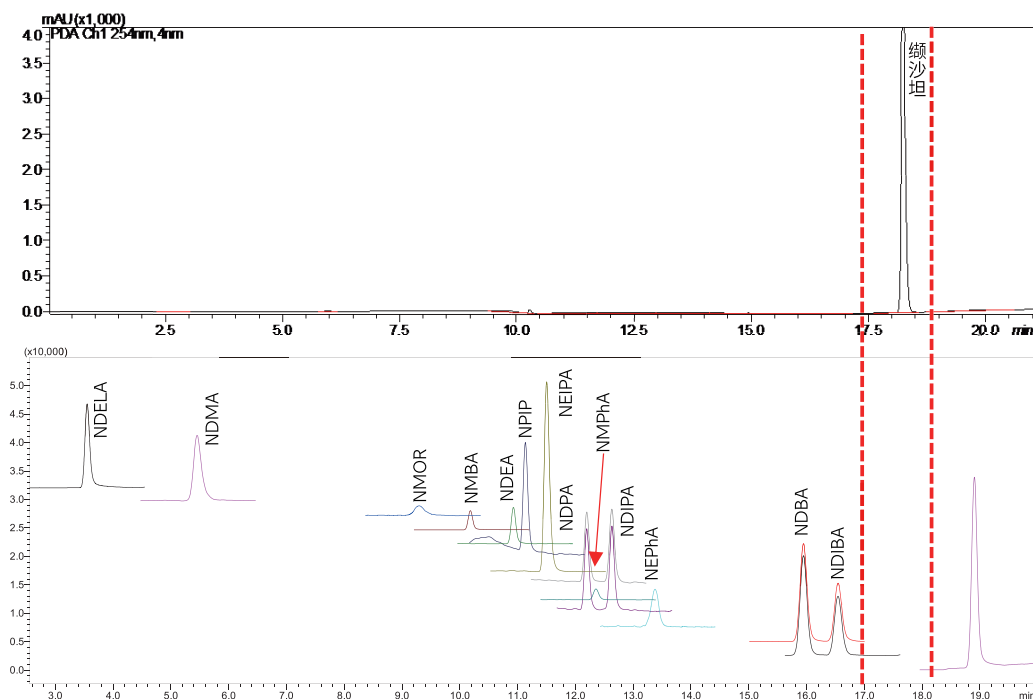


图 1 缬沙坦胶囊的 UV 色谱图（上）和 10  $\text{ng/mL}$  的 13 种亚硝胺杂质的 MRM 图（下）

为了避免高浓度的缬沙坦成品药物进入质谱，造成污染，实验中通过调整液相洗脱程序，实现 13 种亚硝酸胺杂质与缬沙坦药物进行分离，如图 1 所示，通过二位流通阀，17.50~18.60 min 缬沙坦出峰时间内切入废液，18.60~28.00 min 切回质谱，进行质谱监控，由于不同色谱系统的延迟体积的差异，13 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。

## 2.2 亚硝酸胺类杂质 N,N- 二甲基亚硝酸胺 NDMA 与试剂 N,N- 二甲基甲酰胺 DMF 的分离讨论

N,N- 二甲基甲酰胺 (DMF) 在药物合成过程中作为一种极性溶剂，具有良好的溶解性能，它常被用作溶剂和催化剂，在药物的合成、配方和制剂过程中起到重要的作用。因此，药物中常含有一定量的 DMF。

亚硝酸胺类杂质 N,N- 二甲基亚硝酸胺 (NDMA) 与 N,N- 二甲基甲酰胺 (DMF) 的结构式极为相似，仅在 N-N 和 C-N 位置存在区别，如图 2 所示。通过对 DMF 进行 MS1 以及 MS2 扫描如图 3 所示，DMF 的  $[M+H]^+$  的  $m/z$  为 74.06，同位素的  $m/z$  为 75.06，与 NDMA 的 MS1 的  $m/z$  75.10 很接近；通过，DMF 的 MS2 扫描图可以看出，与 NDMA 有接近的碎片。由于 DMF 与 NDMA 极性比较接近，普通的 C18 色谱柱不能很好分离，造成 NDMA 的假阳性或测定含量偏高的情况。

使用 ShimNex S-GTIs 色谱柱可以将 NDMA 与 DMF 可以完全分离，分离度可以达到 1.942，能够提高 NDMA 含量测定的准确性。如图 4 所示。



图 2 NDMA 与 DMF 的结构式

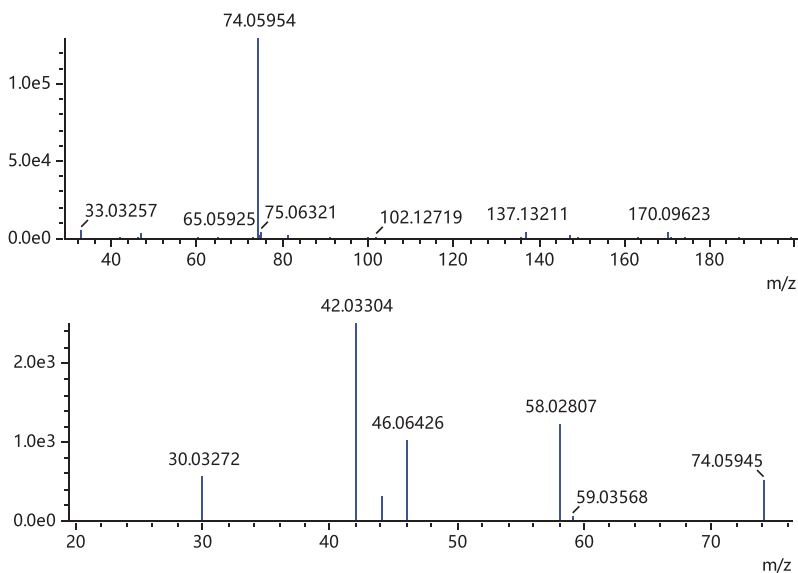


图 3 DMF 的 MS1 (上) 和 MS2 (下) 扫描质谱图

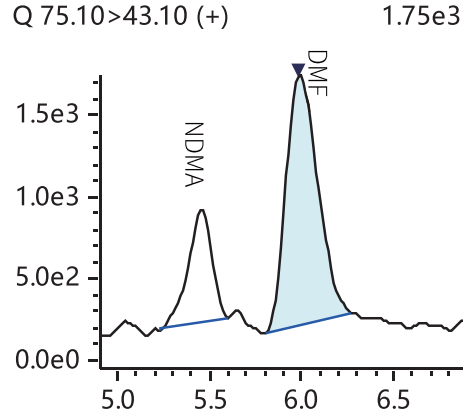
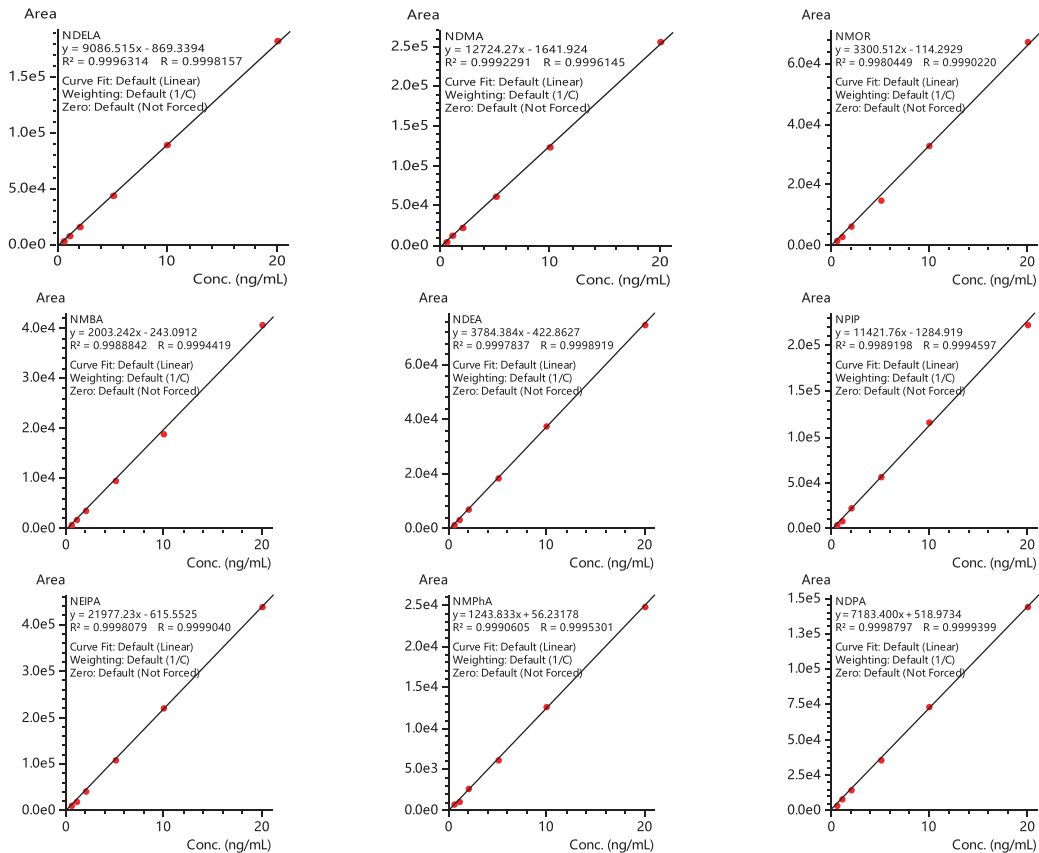


图4 NDMA与DMF的MRM图

### 2.3 校准曲线和检出限

按照 1.2 及 1.3 项下分析条件，标准系列溶液为 0.5 ng/mL、1.00 ng/mL、2.00 ng/mL、5.00 ng/mL、10.00 ng/mL、20.00 ng/mL，按照浓度从低到高的顺序依次上机测定，以系列标准工作液中 13 种亚硝胺的浓度为横坐标，以 13 种亚硝胺的峰面积为纵坐标，绘制校准曲线，如图 5 所示。13 种亚硝胺的浓度在校准曲线浓度范围内线性关系良好，相关系数  $r$  大于 0.999，各校准点准确度在 87.9%-112.3% 之间。根据 13 种亚硝胺类杂质最低浓度点标样数据，以 3 倍信噪比计算检出限，检出限及线性相关系数如表 3 所示。



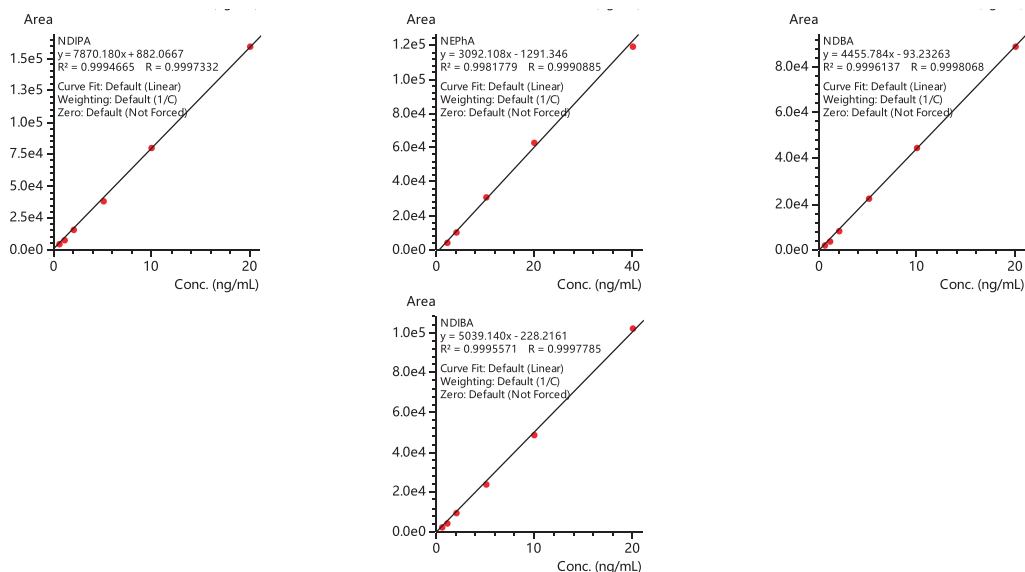


图 5 13 种亚硝胺类杂质的校准曲线

表 3 N-亚硝基喹那普利的校准曲线及检出限

序号	化合物	校准曲线	相关系数 R	准确度 %	检测限 (ng/mL)	定量限 (ng/mL)
1	NDELA	$Y = 9086.52X - 869.339$	0.9998	96.3%-108.0%	0.040	0.14
2	NDMA	$Y = 12724.3X - 1641.92$	0.9996	91.7%-107.7%	0.061	0.20
3	NMOR	$Y = 3300.51X - 114.293$	0.9990	91.4%-112.3%	0.14	0.48
4	NMBA	$Y = 2003.24X - 243.091$	0.9994	95.3%-108.7%	0.059	0.20
5	NDEA	$Y = 3784.38X - 422.863$	0.9998	97.2%-104.1%	0.12	0.38
6	NPIP	$Y = 11421.8X - 1284.92$	0.9994	90.3%-103.7%	0.15	0.49
7	NEIPA	$Y = 21977.2X - 615.552$	0.9999	95.5%-105.8%	0.076	0.25
8	NMPhA	$Y = 1243.83X + 56.2318$	0.9995	87.9%-106.6%	0.14	0.47
9	NDPA	$Y = 7183.40X + 518.973$	0.9999	97.3%-101.9%	0.14	0.45
10	NDIPA	$Y = 7870.18X + 882.067$	0.9997	96.1%-107.5%	0.11	0.37
11	NEPhA	$Y = 3092.11X - 1291.35$	0.9990	95.4%-103.9%	0.069	0.23
12	NDBA	$Y = 4455.784X - 93.233$	0.9998	93.0%-108.4%	0.063	0.21
13	NDiBA	$Y = 5039.14X - 228.216$	0.9998	97.4%-104.2%	0.066	0.22

## 2.4 重复性实验

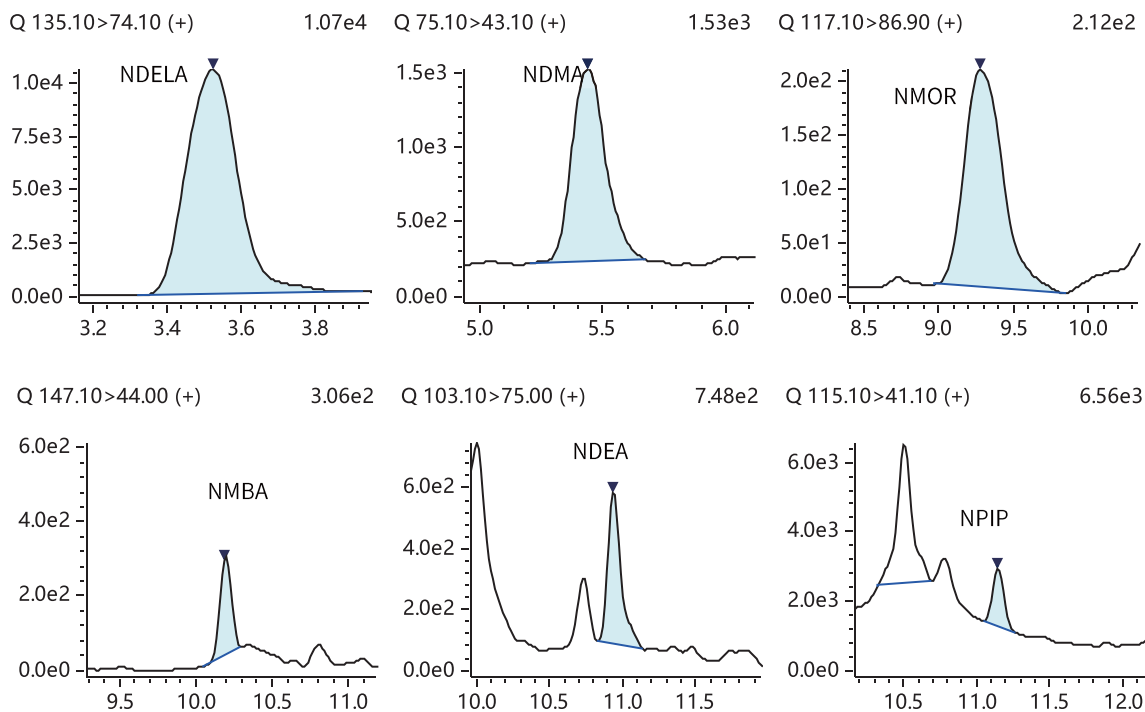
取 1 ng/mL 对照溶液，连续进样 6 次，考察仪器的精密度，保留时间 RSD 在 0.0035%~0.182% 范围内，峰面积 RSD% 在 0.37%~4.81% 范围内。具体结果见表 4，仪器精密度良好。

表4 精密度结果 (n=6)

序号	化合物	保留时间 RSD (%)	峰面积 RSD (%)
1	NDELA	0.035	0.37
2	NDMA	0.131	3.06
3	NMOR	0.182	1.99
4	NMBA	0.037	4.29
5	NDEA	0.037	2.62
6	NPIP	0.047	1.85
7	NEIPA	0.036	4.81
8	NMPhA	0.091	3.61
9	NDPA	0.061	1.33
10	NDIPA	0.040	2.07
11	NEPhA	0.074	3.57
12	NDBA	0.044	2.31
13	NDiBA	0.084	2.22

## 2.5 实际样品测定及准确度测定

按照 1.4 进行前处理对缬沙坦胶囊的 13 种亚硝胺类物质进行测定, 并分别向缬沙坦胶囊加入含量为 0.1 mg/kg、0.5 mg/kg、1.0 mg/kg 的 13 种亚硝胺类物质混合对照品, 测定不同水平样品的加标回收率在 80.47~110.88% 范围内, RSD 结果如表 5 所示, 1.0 mg/kg 的加标样品的 MRM 色谱图如图 6 所示。



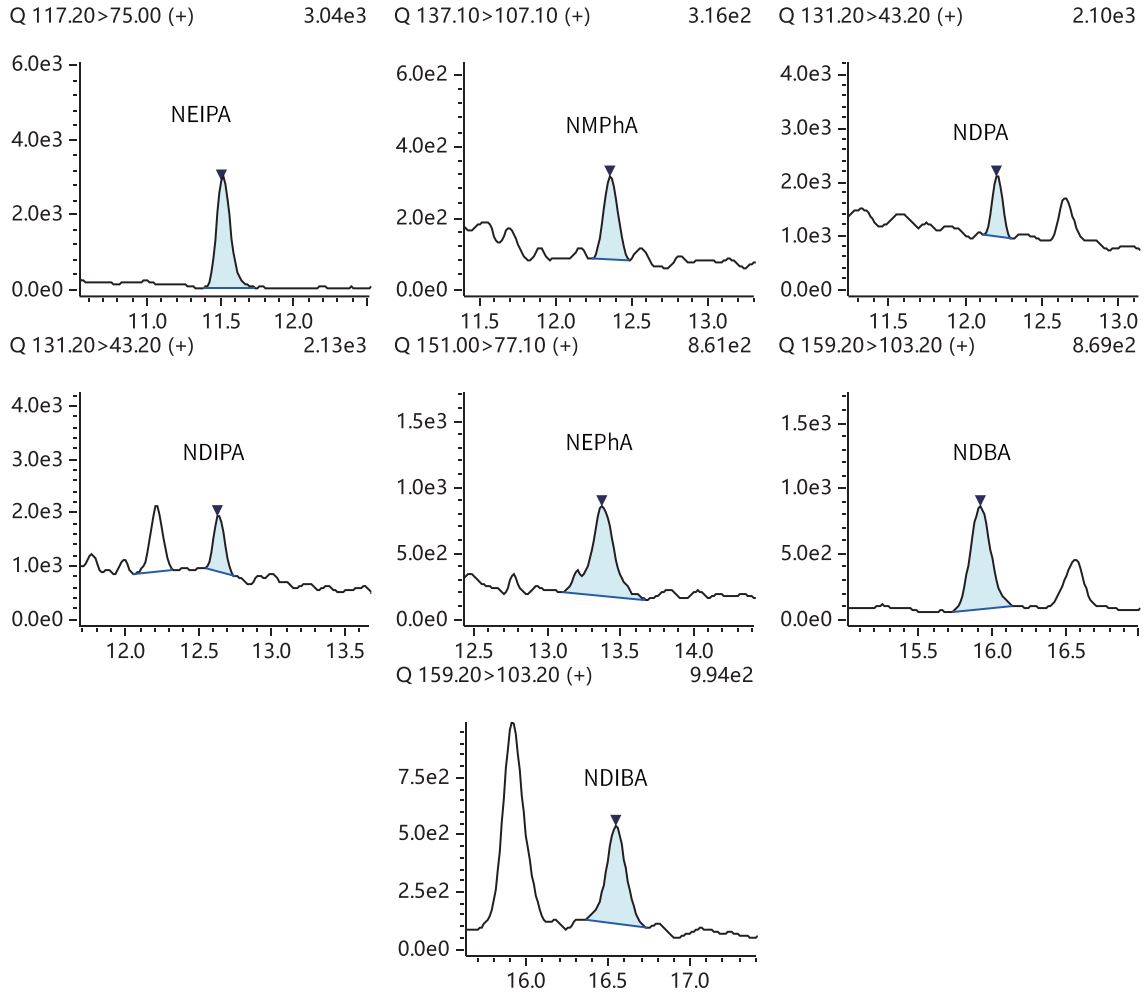


图 6 加标样品 (1.0 mg/kg) 中 13 种亚硝胺类物质 MRM 色谱图

表 5 不同浓度水平 13 种亚硝胺类杂质的添加回收率结果 (n=3)

化合物	样品含量 mg/kg	加标后含量 mg/kg	加标量 mg/kg	回收率 %	RSD%
NDELA	1.054	1.140	0.1	85.63	3.31
		1.588	0.5	106.82	0.19
		2.031	1.0	97.72	2.20
NDMA	0.056	0.141	0.1	84.43	0.56
		0.550	0.5	98.81	2.79
		1.165	1.0	110.88	0.86
NMOR	N.D.	0.095	0.1	95.20	3.36
		0.507	0.5	101.41	0.18
		1.062	1.0	106.21	3.53

NMBA	N.D.	0.094	0.1	94.00	4.01
		0.512	0.5	102.43	2.01
		1.021	1.0	102.13	1.88
NDEA	N.D.	0.094	0.1	94.20	2.12
		0.502	0.5	100.45	0.38
		1.076	1.0	107.60	1.67
NPIP	N.D.	0.090	0.1	90.23	1.63
		0.504	0.5	100.71	0.83
		1.078	1.0	107.75	2.28
NEIPA	N.D.	0.095	0.1	95.07	2.15
		0.527	0.5	105.32	1.37
		1.099	1.0	109.86	0.92
NMPHA	N.D.	0.106	0.1	105.63	4.37
		0.431	0.5	86.18	1.02
		0.820	1.0	81.95	0.63
NDPA	N.D.	0.085	0.1	85.00	1.45
		0.489	0.5	97.83	1.84
		1.047	1.0	104.69	1.40
NDIPA	N.D.	0.080	0.1	80.47	0.56
		0.476	0.5	95.10	2.68
		0.995	1.0	99.50	0.75
NEPhA	N.D.	0.090	0.1	90.13	2.12
		0.485	0.5	97.05	2.48
		0.928	1.0	92.80	1.34
NDBA	N.D.	0.160	0.1	89.60	4.89
		0.511	0.5	88.09	0.95
		0.928	1.0	85.71	1.51
NDiBA	N.D.	0.086	0.1	85.67	3.10
		0.428	0.5	85.66	3.88
		0.864	1.0	86.43	2.18

## 2.6 Peakintelligence™ 色谱峰智能算法积分

本实验色谱图积分处理使用的是 Peakintelligence™ 色谱峰智能算法，在进行数据过程中，仅需要在质谱处理软件 Labsolutions Insight 打开 LC-MS/MS 采集的数据，在积分功能选择“Peakintelligence\_Ver2”及模型“LCMS\_Model\_V1”，无需设置任何积分参数，即可自动、快速、准确完成目标物色谱峰的积分。以 NEIPA 为例，不同浓度的 NEIPA 的 MRM 色谱图积分如图 7 所示。

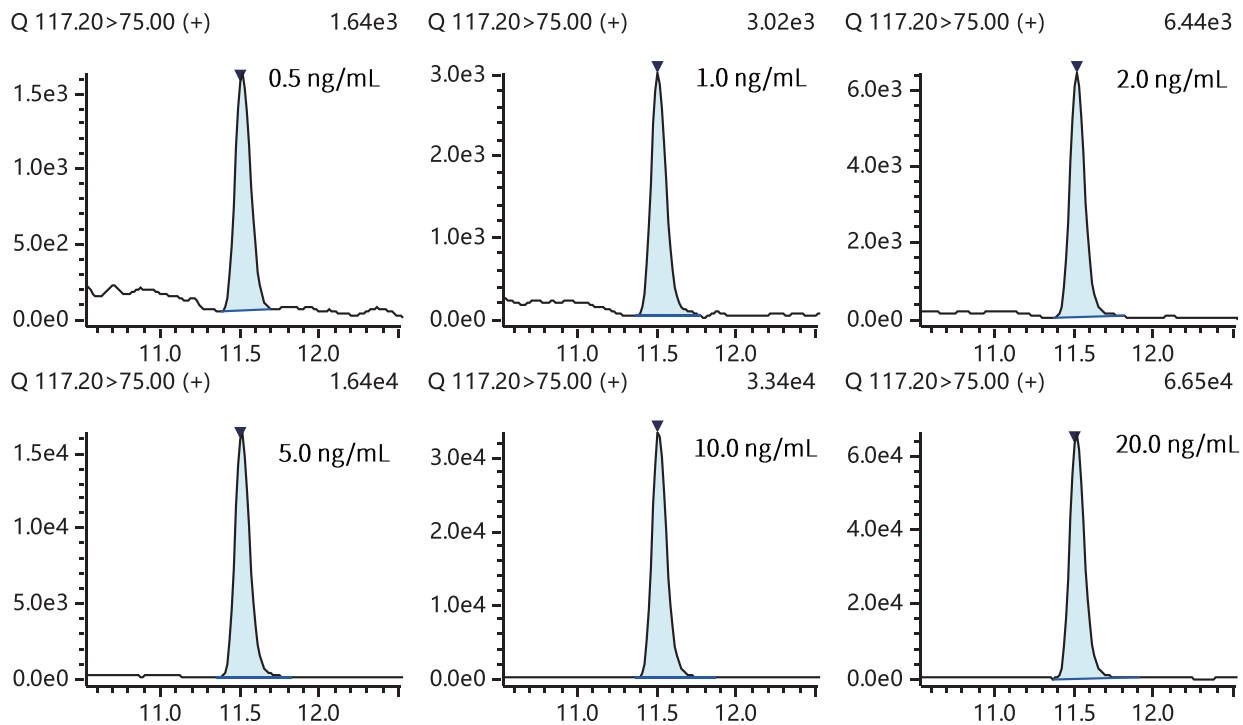


图 7 不同浓度的 NEIPA 的 MRM 色谱图积分

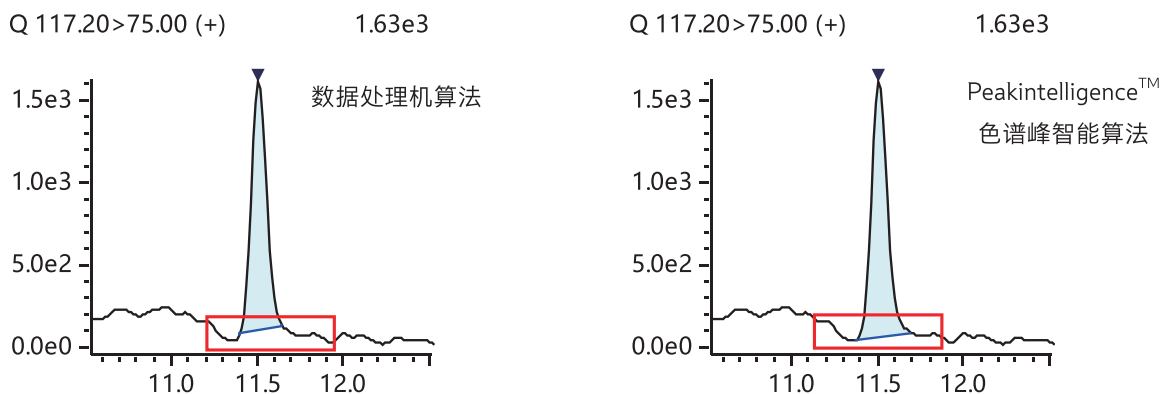


图 8 不同积分算法的色谱图对比

本实验中由于色谱峰较多，使用 Peakintelligence™ 色谱峰智能算法对对照品的色谱峰进行积分，浓度从小到大的均可以快速精准进行积分，校准曲线的相关系数大于 0.999，色谱图如图 8 所示。同一浓度 NEIPA 的色谱图使用 Peakintelligence™ 色谱峰智能算法进行积分时，积分的起落点更为合理。使用不同积分算法的色谱图对比见图 8。

## ■ 结论

本文使用岛津三重四极杆液质联用仪建立了测定缬沙坦胶囊中 13 种亚硝胺类杂质的方法。结果显示：对 1 ng/mL 13 种亚硝胺类物质的对照品溶液进行重复性测试，保留时间及峰面积的 RSD 均小于 0.182% 和 4.81%；以外标法定量，其结果显示校准曲线相关系数大于 0.999。使用缬沙坦胶囊作为加标基质，考察三个不同浓度水平加标回收以及 RSD，结果显示，三个不同水平的加标回收率在 80.47~110.88% 之间，实验结果表明，该方法前处理简单，专属性强，能够满足 13 种亚硝胺类杂质的含量测定需要，可为相关从业人员提供参考。

岛津应用云

