

使用 Agilent 6475 三重四极杆液质联用系统测定亚硝酸杂质



作者

Linfeng Wu 和 Lee Bertram
安捷伦科技有限公司
美国加利福尼亚州圣克拉拉市

Shan-An Chan
安捷伦科技有限公司
中国台湾

摘要

亚硝酸杂质是药品生产过程中产生的痕量副产物。这些杂质被归类为潜在遗传毒性杂质，长期摄入可能致癌。因此，以高灵敏度和可靠性测定它们在成品药中的含量水平非常重要。本应用简报评估了 Agilent 6475 三重四极杆 LC/MS (LC/TQ) 系统、Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统和大气压化学电离 (APCI) 离子源组合对 8 种亚硝酸杂质的定量性能。

前言

最近宣布召回部分血管紧张素 II 受体阻滞剂 (ARB) 药物, 使亚硝酸胺杂质成为监管机构关注的重点^[1]。亚硝酸胺杂质是药品生产过程中的副产物。它们属于“关注队列”, 被归类为潜在遗传毒性杂质, 长期摄入可能致癌。

本应用简报通过 6475 LC/TQ 联用 1290 Infinity II 生物液相色谱系统和 APCI 离子源对 8 种亚硝酸胺化合物进行了全面分析。结果表明, 该联用系统可以测定低浓度的以下化合物:

- N-亚硝基二甲胺 (NDMA)
- N-亚硝基吗啉 (NMOR)
- N-亚硝基甲基乙胺 (NMEA)
- N-亚硝基吡咯烷 (NPYR)
- N-亚硝基二乙胺 (NDEA)
- N-亚硝基哌啶 (NPIP)
- N-亚硝基二正丙胺 (NDPA)
- N-亚硝基二正丁胺 (NDBA)

实验部分

试剂与标准品

分析中使用的所有试剂和溶剂均为 LC/MS 级。超纯水产自配备 LC-Pak Polisher 和 0.22 μm 膜式终端过滤器滤芯的 Milli-Q Integral 系统 (MilliporeSigma, Billerica, MA, U.S.)。含有 8 种亚硝酸胺 (NDMA、NDEA、NMOR、NMEA、NPYR、NPIP、NDPA 和 NDBA) 的标准品来自于安捷伦 (货号 US-113N-1)。

样品前处理

将亚硝酸胺标准品以 9 种不同的浓度加入溶剂空白 (10:90 甲醇:水) 中, 加标浓度范围为 0.0125–10 ng/mL。按以下步骤处理活性药物成分 (API) 基质: 将 100 mg 氯沙坦钾药品溶于 2 mL 溶剂 (50:50 甲醇:水) 中, 超声处理 30 分钟。然后, 样品在 12000 rpm 下离心 10 分钟。收集上清液, 用水按 1:5 的比例进行稀释。将亚硝酸胺标准品加入处理后的 API 基质中, 加标浓度范围为 0.05–1 ng/mL。

设备

使用 **Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统** 进行样品分离, 该系统由以下模块组成:

- Agilent 1290 Infinity II 生物高速泵 (G7132A)
- 配备恒温箱的 Agilent 1290 Infinity II 生物 Multisampler (G7137A)
- Agilent 1290 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116B)

该液相色谱系统与配备安捷伦 APCI 离子源 (G1947B) 的 **Agilent 6475 三重四极杆液质联用系统** (G6475AA) 联用。使用 Agilent MassHunter Workstation 软件 12.0 进行数据采集。

方法

液质联用 (LC/MS) 系统条件和参数如表 1 和表 2 所示。化合物的多反应监测 (MRM) 设置如表 3 所示。使用忽略原点的线性拟合以及 $1/x$ 加权进行校准曲线分析。

表 1. Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统方法

参数	数值
色谱柱	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3.0 \times 150 mm, 2.7 μm (货号 693975-302)
进样器温度	4 $^{\circ}\text{C}$
流动相 A	ddH ₂ O + 0.1% 甲酸
流动相 B	甲醇 + 0.1% 甲酸
流速	0.5 mL/min
进样量	20 μL
柱温	40 $^{\circ}\text{C}$
梯度程序	时间 (min) %B
	0.0 5
	3.5 5
	7.0 45
	9.0 60
	11.0 60
	15.0 65
	16.0 90
	16.1 5
	20.0 5

表 2. Agilent 6475 LC/TQ 参数

参数	数值
离子源	安捷伦 APCI 离子源
极性	正离子
气体温度	300 °C
干燥气流速	7 L/min
雾化器	25 psi
APCI 气化温度	350 °C
毛细管电压	4000 V
电晕电流	4.0 μ A
扫描类型	基于时间段的 MRM 方法
检测器增益因子 (+)	10
液相流转移至废液	0–2 min; 12–13 min; 14–18 min (其余时间转移至 MS)

表 3. Agilent 6475 LC/TQ 的详细多反应监测 (MRM) 设置和化合物信息

化合物名称	母离子 m/z	子离子 m/z	驻留时间 (ms)	碎裂电压 (V)	池加速电压 (V)	碰撞能量 (V)	极性	实测保留时间 (min)
NDMA	75	43	50	95	3	16	+	2.51
	75	58	50	95	3	10	+	2.51
NMOR	117	45	50	80	4	21	+	3.99
	117	87	50	80	4	11	+	3.99
NMEA	89	43	50	75	3	12	+	5.35
	89	61	50	75	3	10	+	5.35
NPYR	101	41	50	90	3	24	+	5.70
	101	55	50	90	3	19	+	5.70
NDEA	103	47	50	80	4	20	+	7.48
	103	75	50	80	4	12	+	7.48
NPIP	115	41	50	90	3	24	+	7.90
	115	69	50	90	3	12	+	7.90
NDPA	131	43	50	80	4	10	+	10.10
	131	89	50	80	4	16	+	10.10
NDBA	159	41	50	80	3	20	+	13.50
	159	57	50	80	3	12	+	13.50

结果与讨论

校准曲线分析

为了评估对亚硝胺的定量性能，分析了溶剂中浓度范围为 0.0125–10 ng/mL 的 8 种亚硝胺化合物的校准曲线。

分析结果汇总如下：

- 所有分析物均获得良好的色谱分离和峰形（图 1）
- 所有测试浓度下均具有出色的精密度和准确度，包括定量下限 (LLOQ)（表 4）
- 所有目标分析物的 LLOQ \leq 0.025 ng/mL，具有高分析灵敏度（表 4）
- 在测试浓度下，8 种分析物均获得出色的定量线性， $R^2 > 0.99$ （图 2）

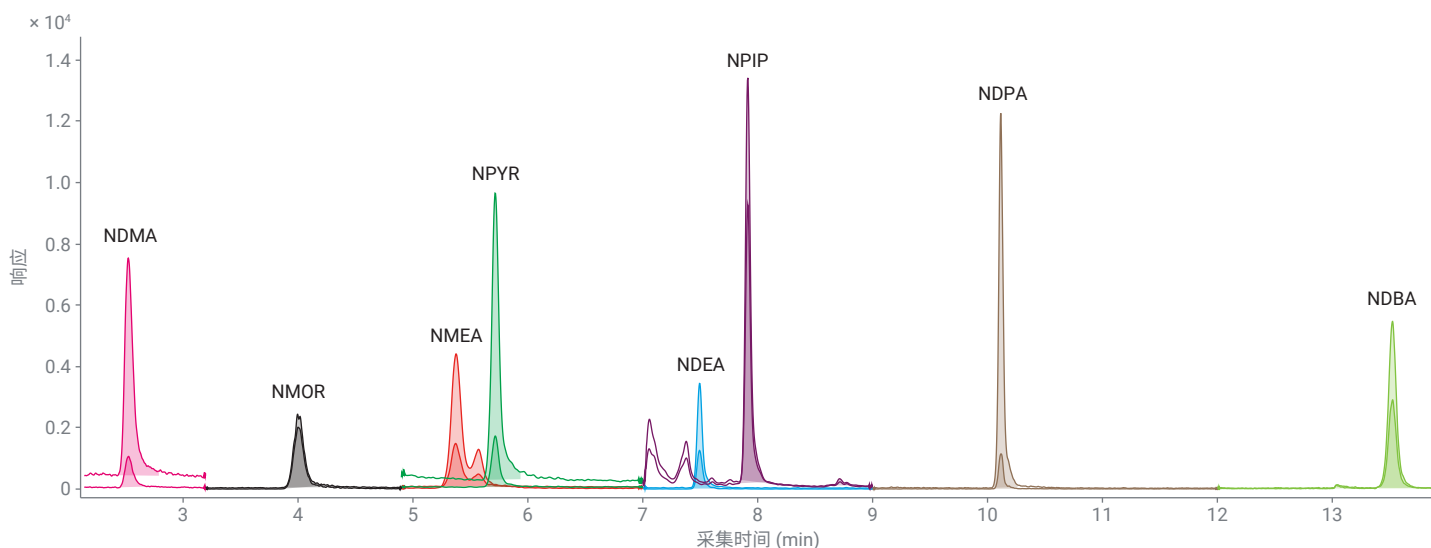


图 1. 1 ng/mL 下 8 种亚硝胺化合物的总 MRM 色谱图

表 4. 使用 Agilent 6475 LC/TQ 系统，在 0.025 和 0.05 ng/mL 下获得的平均响应、定量离子信噪比 (S/N)、%RSD 和准确度 (%) (n = 3)

浓度	0.025 ng/mL (n = 3)				0.05 ng/mL (n = 3)				LLOQ* (ng/mL)	
	名称	响应	信噪比	RSD (%)	准确度 (%)	响应	信噪比	RSD (%)		准确度 (%)
NDMA		1145.08	14.63	1.28	113.86	2154.26	23.08	1.07	105.41	0.025
NMOR		328.76	52.40	15.94	104.90	705.55	105.41	14.94	103.87	0.025
NMEA		1057.38	40.79	3.86	116.86	1909.29	91.84	4.81	101.00	0.0125
NPYR		918.54	24.31	2.65	115.47	1697.56	41.59	2.45	89.61	0.025
NDEA		382.15	31.11	8.14	107.67	606.87	52.10	8.58	87.91	0.025
NPIP		890.01	57.47	6.46	97.45	2106.81	111.72	5.30	98.29	0.025
NDPA		795.93	95.62	12.01	106.13	1647.60	177.47	10.77	95.97	0.025
NDBA		892.36	67.66	7.58	112.05	1581.52	123.78	7.83	101.33	0.025

* LLOQ 为定量离子 S/N > 10，定性离子 S/N > 3，RSD < 20%，准确度为 80%–120%

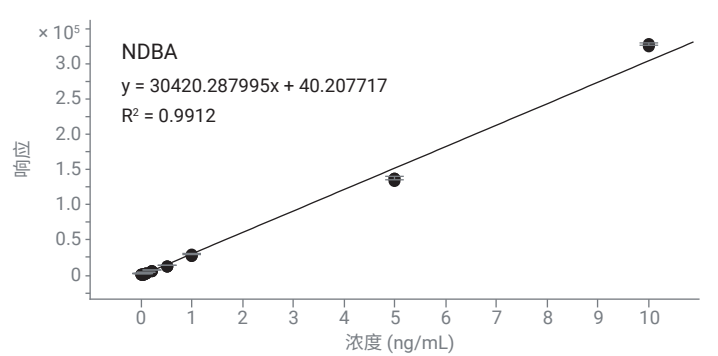
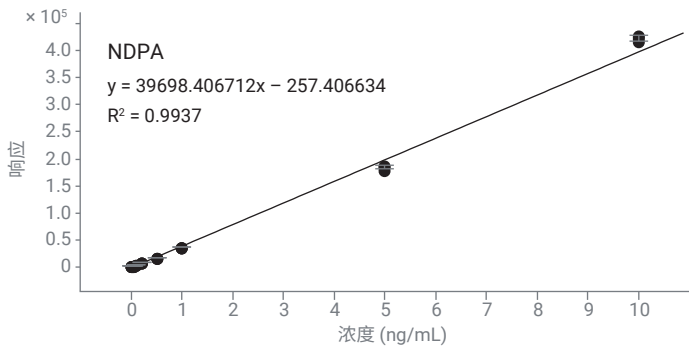
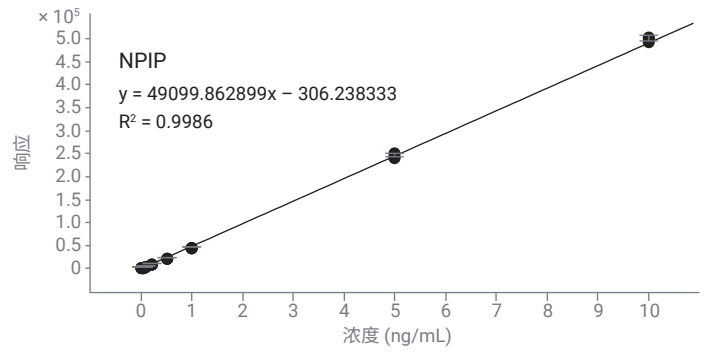
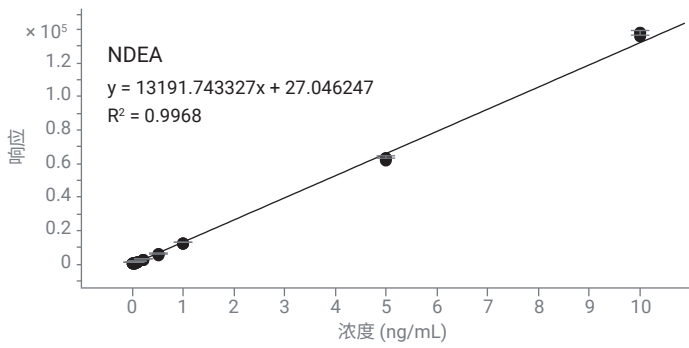
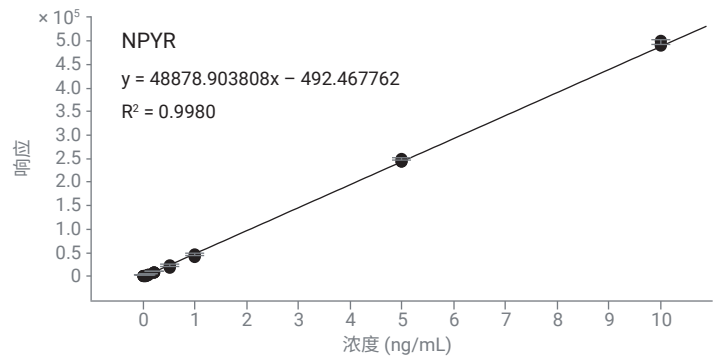
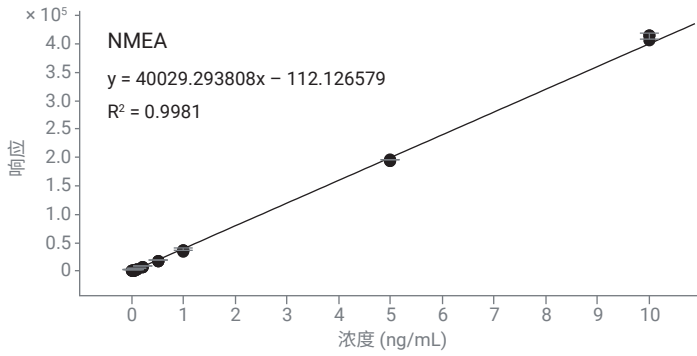
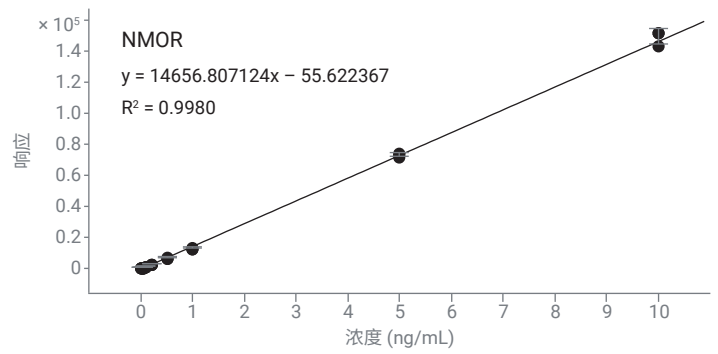
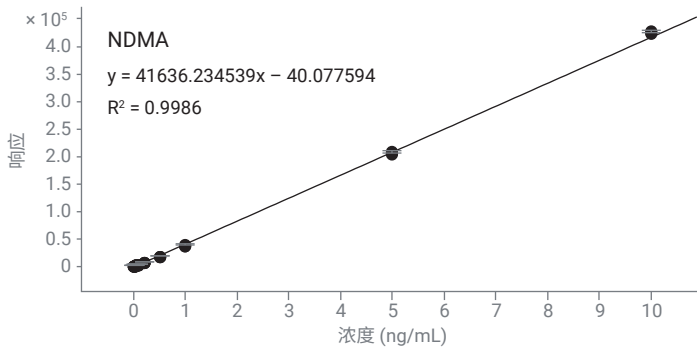


图 2. Agilent 6475 LC/TQ 上 8 种亚硝胺化合物在 0.0125–10 ng/mL 浓度范围内的校准曲线

氯沙坦钾药物基质中的定量

为了评估药品中亚硝胺杂质的分析性能，将亚硝胺标准品以 0.05–1 ng/mL 的浓度加标至氯沙坦钾药物提取物中。结果表明，在药物基质中加标浓度为 0.05 ng/mL 的条件下，8 种亚硝胺化合物均实现高度可靠的定量。8 种分析物的分析灵敏度均远优于监管机构规定的亚硝胺可接受含量^[2,3]。

NDMA 是亚硝胺杂质分析中常见的挑战性化合物。图 3 所示为基质空白和 10 mg/mL 药物提取物中加标浓度为 0.05 和 0.1 ng/mL 的 NDMA 的代表性重复测定叠加色谱图。结果表明，6475 LC/TQ 为药物基质中低浓度的 NDMA 提供了出色的响应、S/N 和重现性。

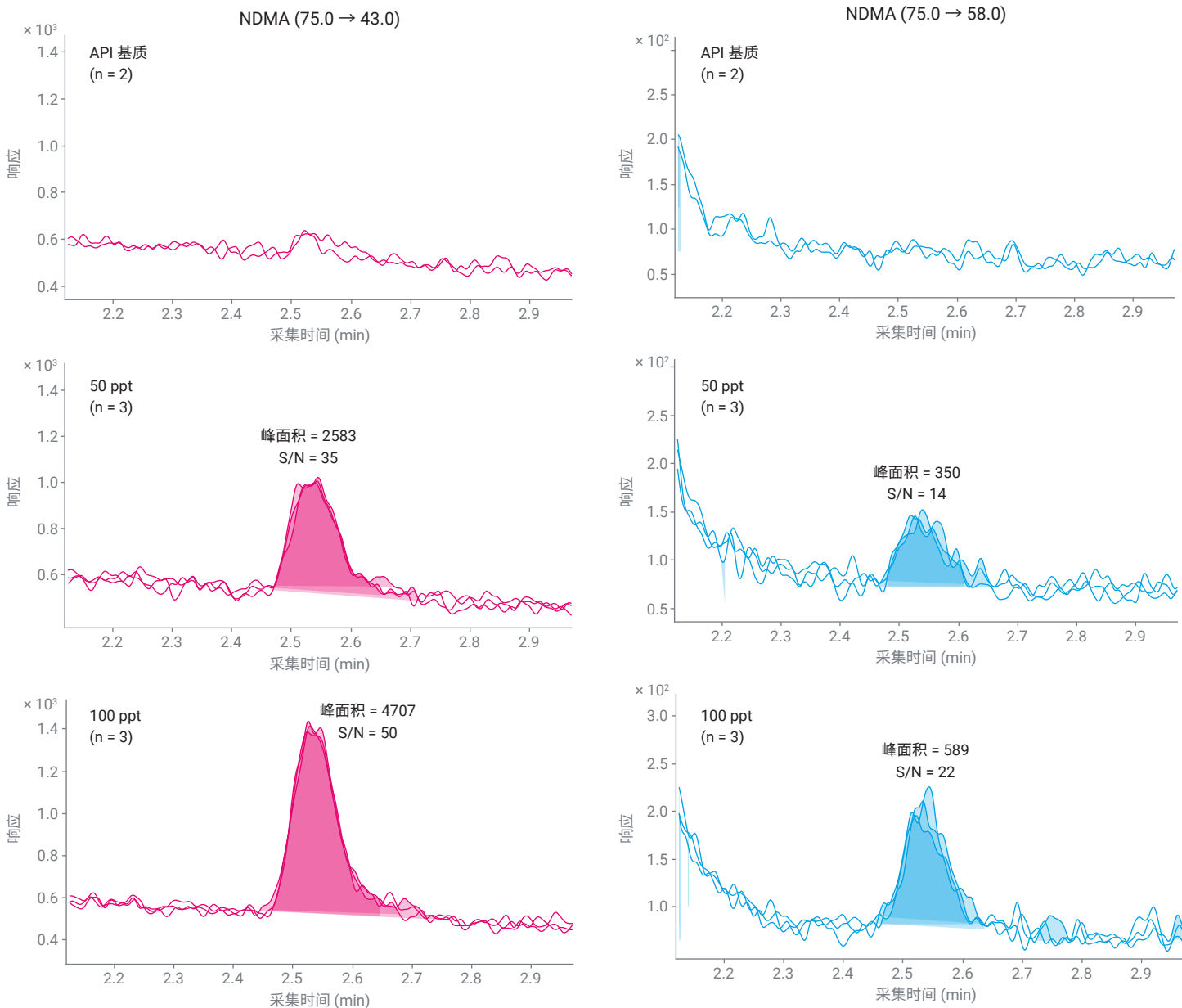


图 3. 氯沙坦钾药物基质中低浓度 NDMA 子离子的重复测定叠加色谱图

结论

本应用简报表明，Agilent 6475 三重四极杆液质联用系统可以在法规规定的低浓度水平下可靠定量亚硝胺杂质。该方法可用于不同 ARB 药品中上述杂质的定量，并可根据药品的洗脱模式改变色谱条件。

参考文献

1. U.S. Food and Drug Administration. FDA Updates and Press Announcements on Angiotensin II Receptor Blocker (ARB) Recalls (Valsartan, Losartan, and Irbesartan). Last revised March 2023. <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-updates-and-press-announcements-angiotensin-ii-receptor-blocker-arb-recalls-valsartan-losartan>
2. Center for Drug Evaluation and Research, U.S. Food and Drug Administration, Control of Nitrosamine Impurities in Human Drugs: Guidance for Industry. Last revised February 2021. Control of Nitrosamine Impurities in Human Drugs | FDA. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/control-nitrosamine-impurities-human-drugs>
3. Committee for Medicinal Products for Human Use, European Medicines Agency. Procedure under Article 5(3) of Regulation EC (No) 726/2004. Procedure number: EMEA/H/A-5(3)/1490. Nitrosamines Impurities in Human Medicinal Products. Last revised June 2020. Nitrosamines EMEA-H-A5(3)-1490 - Assessment Report (europa.eu)

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

DE41584454

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2023
2023 年 3 月 21 日，中国出版
5994-5919ZH-CN