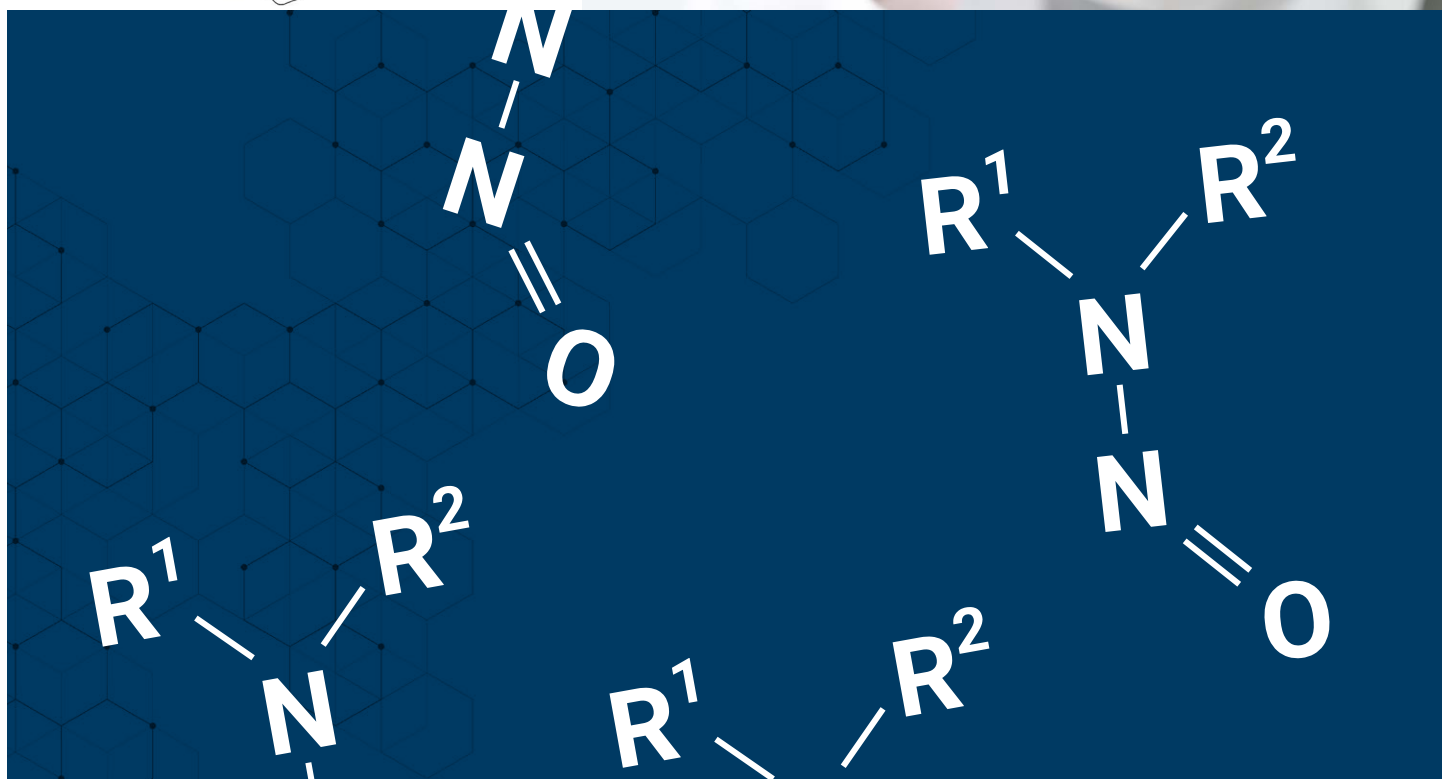


# 药物中亚硝胺的分析

使用三重四极杆 LC/MS/MS 和四极杆飞行时间 LC/MS 系统  
消耗品工作流程订购指南



APIs 和成品药中的致突变性杂质即使含量极低，也会对患者的健康构成巨大风险，因此是药品生产商关注的主要问题。致突变性杂质可与 DNA 相互作用，从而导致突变并可能引发癌症。处理并控制痕量致突变性杂质的工作是全球监管机构关注的重点。因此，美国 FDA 和其他监管机构已采取措施解决药物中致突变性杂质的问题<sup>1</sup>。APIs 和成品药中这些痕量亚硝胺的检测和定量可能非常困难，需要使用先进且灵敏的工具才能达到法规要求。

需要测定亚硝胺的 APIs 和药品的列表已扩展到血管紧张素 II 受体阻滞剂 (ARB) 沙坦药物之外，包括二甲双胍、一种口服糖尿病药物和组胺-2 受体拮抗剂（例如雷尼替丁）。最近，美国食品药品监督管理局 (FDA)、欧洲药品质量管理局 (EDQM) 和卫生科学局 (HSA) 等多个监管机构因二甲双胍中存在 N-亚硝基二甲胺 (NDMA) 而将其召回，就证明了这一点。这些杂质：N-亚硝基二甲胺 (NDMA)、N-亚硝基二乙胺 (NDEA)、N-亚硝基二异丙胺 (NDIPA)、N-亚硝基异丙胺 (NEIPA) 和 N-亚硝基二丁胺 (NDBA) 被列为可能的人类致癌物，它们因 API 生产过程中发生的化学反应被引入成品中。

这些杂质可使用单四极杆 GC/MS (GC/MSD)、三重四极杆 GC/MS/MS (GC/TQ)<sup>[1]</sup>、三重四极杆 LC/MS/MS (LC/TQ) 或四极杆飞行时间 LC/MS (LC/Q-TOF) 进行检测<sup>[2-7]</sup>。基于 LC/MS/MS 的方法通常具有高特异性和高灵敏度。因此，这些方法已成为检测和定量原料药与成品药（如二甲双胍、缬沙坦、氯沙坦和厄贝沙坦）中亚硝胺杂质的方法开发基础。



图 1. 从左到右：1260 Infinity II 液相色谱系统，6470B 三重四极杆液质联用系统，6550 iFunnel Q-TOF LC/MS 系统和 Ultivo 三重四极杆液质联用系统

<sup>1</sup>美国 FDA: [www.fda.gov/media/131868/download](http://www.fda.gov/media/131868/download) 欧洲理事会: [www.edqm.eu/en/news/omcls-release-three-methods-determination-ndma-sartans](http://www.edqm.eu/en/news/omcls-release-three-methods-determination-ndma-sartans)

2 加拿大卫生部: [Healthycanadians.gc.ca/recall-alert-rappel-avis/hc-sc/2020/72963a-eng.php](http://Healthycanadians.gc.ca/recall-alert-rappel-avis/hc-sc/2020/72963a-eng.php) 台湾 FDA: [www.fda.gov.tw/ENG/siteList.aspx?sid=10360](http://www.fda.gov.tw/ENG/siteList.aspx?sid=10360)

## 色谱柱选择

方法 2 (表 1)<sup>[8]</sup> 中使用的 **InfinityLab Poroshell 120 PFP 色谱柱** 上的五氟苯基 (PFP) 配体可提供与 C18 化学键形成正交的分选机制。PFP 固定相可根据结构、取代基和极性基团空间位阻的微小差异分离分析物。它对位置异构体、卤代物和极性分析物的选择性使其特别适用于分析复杂混合物。由于 NDIPA 和 NDPA 是位置异构体，因此 InfinityLab Poroshell 120 PFP 是推荐用于分离这两种物质的**简便易用的**理想色谱柱。

在方法 1 (表 1)<sup>[8]</sup> 中，还使用 **InfinityLab Poroshell HPH-C18 色谱柱** 进行了此分析，该色谱柱采用杂化填料技术，改善了颗粒在**更高 pH 条件下的耐用性**，延长了使用寿命并减少了柱更换次数。但是，在使用该色谱柱时，稳定的方法开发过程对保证分析方法的耐用性、稳定性和可靠性至关重要。在不同 pH 条件下，可电离化合物的保留和选择性会发生显著变化，因此在方法开发中使用低、中和高 pH 条件正逐渐成为标准操作规范。除了优化梯度条件外，为了实现位置异构体 NDIPA 和 NDPA 的分离，还需要优化仪器 MS/MS 参数，从而大大提高灵敏度。

## 液相色谱配置和参数

表 1. UHPLC 配置和设置如需了解方法的详细信息，请参阅参考文献 8

参数	值																																																																					
	方法 1	方法 2																																																																				
仪器	Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A) Agilent 1290 Infinity II Multisampler (G7167B) Agilent 1290 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116B) Agilent 1260 Infinity 二极管阵列检测器 (G1315C)	Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A) Agilent 1290 Infinity II Multisampler (G7167B) Agilent 1290 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116B) Agilent 1260 Infinity 二极管阵列检测器 (G1315C)																																																																				
进样针清洗	甲醇:水 (80:20)	甲醇:水 (80:20)																																																																				
样品稀释剂	水:甲醇 (95:5)	甲醇																																																																				
Multisampler 温度	10 °C	10 °C																																																																				
进样量	20 µL	5 µL																																																																				
分析柱	Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C18, 4.6 × 150 mm, 2.7 µm (部件号 693975-702(T))	Agilent InfinityLab Poroshell 120 PFP, 3.0 × 150 mm, 2.7 µm (部件号 693975-308)																																																																				
柱温	40 °C	40 °C																																																																				
流动相 A	0.1% 甲酸水溶液	0.1% 甲酸水溶液																																																																				
流动相 B	0.1% 甲酸的甲醇溶液	0.1% 甲酸的甲醇溶液																																																																				
流速	0.5 mL/min	0.5 mL/min																																																																				
梯度	<table border="1"> <thead> <tr> <th>时间 (min)</th> <th>% A</th> <th>% B</th> <th>流速 (mL/min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>95</td><td>5</td><td>0.5</td></tr> <tr><td>2</td><td>95</td><td>5</td><td>0.5</td></tr> <tr><td>7</td><td>40</td><td>60</td><td>0.5</td></tr> <tr><td>10</td><td>25</td><td>75</td><td>0.5</td></tr> <tr><td>11</td><td>10</td><td>90</td><td>0.5</td></tr> <tr><td>16.5</td><td>10</td><td>90</td><td>0.5</td></tr> <tr><td>16.6</td><td>95</td><td>5</td><td>0.5</td></tr> <tr><td>20.0</td><td>95</td><td>5</td><td>0.5</td></tr> </tbody> </table>	时间 (min)	% A	% B	流速 (mL/min)	0	95	5	0.5	2	95	5	0.5	7	40	60	0.5	10	25	75	0.5	11	10	90	0.5	16.5	10	90	0.5	16.6	95	5	0.5	20.0	95	5	0.5	<table border="1"> <thead> <tr> <th>时间 (min)</th> <th>% A</th> <th>% B</th> <th>流速 (mL/min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>95</td><td>5</td><td>0.5</td></tr> <tr><td>3</td><td>95</td><td>5</td><td>0.5</td></tr> <tr><td>14</td><td>40</td><td>60</td><td>0.5</td></tr> <tr><td>17</td><td>10</td><td>90</td><td>0.5</td></tr> <tr><td>19</td><td>10</td><td>90</td><td>0.5</td></tr> <tr><td>19.1</td><td>95</td><td>5</td><td>0.5</td></tr> <tr><td>22</td><td>95</td><td>5</td><td>0.5</td></tr> </tbody> </table>	时间 (min)	% A	% B	流速 (mL/min)	0	95	5	0.5	3	95	5	0.5	14	40	60	0.5	17	10	90	0.5	19	10	90	0.5	19.1	95	5	0.5	22	95	5	0.5
时间 (min)	% A	% B	流速 (mL/min)																																																																			
0	95	5	0.5																																																																			
2	95	5	0.5																																																																			
7	40	60	0.5																																																																			
10	25	75	0.5																																																																			
11	10	90	0.5																																																																			
16.5	10	90	0.5																																																																			
16.6	95	5	0.5																																																																			
20.0	95	5	0.5																																																																			
时间 (min)	% A	% B	流速 (mL/min)																																																																			
0	95	5	0.5																																																																			
3	95	5	0.5																																																																			
14	40	60	0.5																																																																			
17	10	90	0.5																																																																			
19	10	90	0.5																																																																			
19.1	95	5	0.5																																																																			
22	95	5	0.5																																																																			
停止时间	20 min	22 min																																																																				
紫外波长	230 nm	230 nm																																																																				

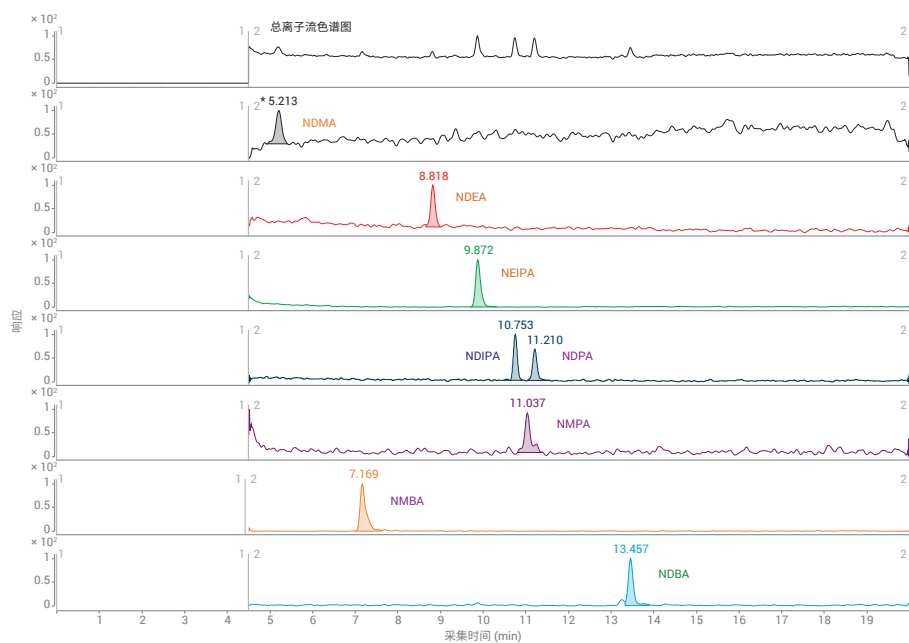


图2. 使用方法1 (方法详情请参阅参考文献8) 获得的浓度为 0.5 ng/mL 的所有亚硝酸胺杂质的代表性 MRM 色谱图

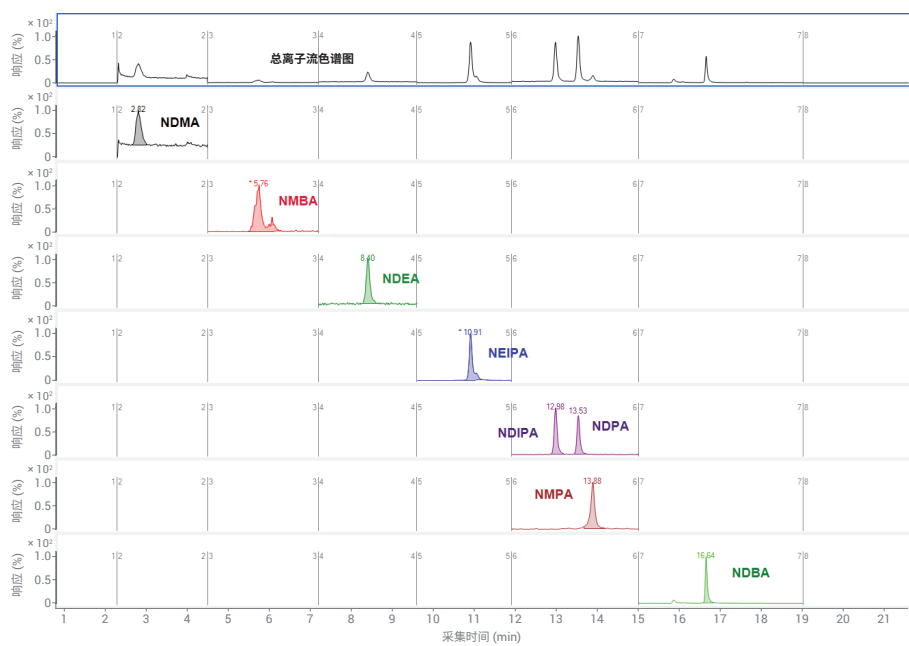


图3. 使用方法2 (方法详情请参阅参考文献8) 获得的浓度为 3 ng/mL 的 8 种亚硝酸胺杂质的代表性 MRM 色谱图

## 轻松挑选和订购信息

本指南提供关于此分析中使用的安捷伦产品的建议，因此您可以快速找到所需的产品。单击下表标题中的“我的列表”\* 链接，将产品添加到安捷伦网上商城“收藏产品”列表中。然后输入您需要的产品数量，您的列表便会保留在“收藏产品”下，供您将来订购时使用。

单击[我的列表](#)将此表中的所有产品下载到您的“收藏产品”列表

产品描述	部件号
<b>亚硝酸胺标准品与溶剂</b>	
亚硝酸胺标准品（溶于二氯甲烷）	<a href="#">US-113N-1</a>
InfinityLab LCMS 级超纯甲醇	<a href="#">5191-4497</a>
InfinityLab LCMS 级超纯水	<a href="#">5191-4498</a>
甲酸，5 mL	<a href="#">G2453-85060</a>
<b>亚硝酸胺 — 样品前处理</b>	
15 mL 离心管和管盖，50/包	<a href="#">5610-2039</a>
Captiva 经济型过滤器，PVDF 膜，直径 13 mm，孔径 0.2 μm，1000/包	<a href="#">5190-5261</a>
Captiva 优级针头过滤器，PES 膜，直径 15 mm，孔径 0.2 μm，100/包（经 LCMS 认证）	<a href="#">5190-5096<sup>1</sup></a>
Captiva 优级针头过滤器，尼龙膜，直径 15 mm，孔径 0.2 μm，100/包（经 HPLC 认证）	<a href="#">5190-5088<sup>2</sup></a>
Captiva 一次性注射器，5 mL，100/包	<a href="#">9301-6476</a>
Captiva 一次性注射器，10 mL，100/包	<a href="#">9301-6474</a>
<b>亚硝酸胺 — 液相色谱柱</b>	
InfinityLab Poroshell 120 PFP, 3.0 × 150 mm, 2.7 μm（推荐）	<a href="#">693975-308</a>
InfinityLab Poroshell 120 PFP 保护柱，3.0 mm, 2.7 μm（推荐）	<a href="#">823750-915</a>
InfinityLab Poroshell HPH-C18, 4.6 × 150 mm, 2.7 μm	<a href="#">693975-702</a>
InfinityLab Poroshell HPH-C18, 4.6 mm, 2.7 μm, UHPLC 保护柱，3/包	<a href="#">820750-922</a>
<b>亚硝酸胺 — 液相色谱备件</b>	
InfinityLab Quick Connect 快速连接组件，0.12 × 105 mm，用于 UHPLC 的色谱柱入口连接	<a href="#">5067-5957</a>
InfinityLab Quick Connect 快速连接组件，0.17 × 105 mm，用于 UHPLC 的色谱柱入口连接	<a href="#">5067-6166</a>
InfinityLab Quick Turn 接头，用于色谱柱出口	<a href="#">5067-5966</a>
Quick Turn 毛细管，0.12 × 280 mm，用于色谱柱到检测器的连接	<a href="#">5500-1191</a>
Stay Safe 废液瓶安全盖工具包，S60，带 4 个插口和 10 L 废液桶	<a href="#">5043-1338</a>
用于废液容器的带时间标签的活性炭过滤器	<a href="#">5043-1193</a>
InfinityLab Stay Safe 溶剂瓶安全盖起始工具包	<a href="#">5043-1222</a>
不锈钢溶剂入口过滤器，孔径 10 μm	<a href="#">01018-60025</a>
InfinityLab 溶剂过滤组件，包括 250 mL 玻璃漏斗，膜支架玻璃底座，1 L 玻璃烧瓶，以及铝质装置夹	<a href="#">5191-6776<sup>3</sup></a>
再生纤维素滤膜，47 mm，0.20 μm，100/包	<a href="#">5191-4340<sup>3</sup></a>



<b>亚硝酸胺 — 样品瓶和瓶盖</b>	
样品瓶，螺口，棕色，带书写签，经认证，2 mL，100/包。 样品瓶规格：12 × 32 mm（12 mm 瓶盖）	<a href="#">5182-0716</a>
瓶盖，螺口，绿色，预开口 PTFE/硅橡胶，100/包。 瓶盖尺寸：12 mm	<a href="#">5183-2077</a>
样品瓶内插管，250 µL，去活玻璃，带聚合物支脚，100/包	<a href="#">5181-8872</a>
<b>亚硝酸胺 — MS 备件</b>	
APCI 喷雾针备件包	<a href="#">G1946-68704</a>
APCI 喷雾针	<a href="#">G1960-20030</a>
快速切换毛细管，0.6 mm	<a href="#">G1960-80060</a>



\* 如果您是首次使用“我的列表”功能，系统会要求您输入电子邮件地址进行账户验证。如果您已有安捷伦账户，可以直接登录。如果您尚未注册安捷伦账户，则需要[注册账户](#)。该功能仅在启用了电子商务功能的国家/地区有效。您也可以通过客户服务中心或经销商渠道订购所有物品

1. 该膜的性能与 PVDF 相似，蛋白质结合低，非常适用于蛋白质分析。提供小包装（100/包），经过 LC/MS 认证
2. 常规过滤的理想选择。不能用于蛋白质分析。提供小包装（100/包），经过 HPLC 认证
3. 不建议将溶剂过滤组件和相关滤膜与 InfinityLab Ultrapure LC/MS 溶剂一起使用

## 参考文献

1. 使用单四极杆 GC/MS 和三重四极杆 GC/MS/MS 分析药物中的亚硝酸胺：消耗品工作流程订购指南，安捷伦出版物 ([5994-2979EN](#))
2. 亚硝酸胺鉴定应用指南 — 可靠检测和定量 API 和药品中的致突变性杂质 ([5994-2393EN](#))
3. 使用高分辨率 Agilent 6546 LC/Q-TOF 测定雷尼替丁原料药与成品药中的 NDMA 遗传毒性杂质 ([5994-1626ZH-CN](#))
4. 使用 Agilent 6470 三重四极杆液质联用系统同步测定二甲双胍中的 8 种亚硝酸胺杂质 ([5994-2286EN](#))
5. 使用 Ultivo 三重四极杆液质联用系统测定亚硝酸胺杂质 ([5994-1383ZH-CN](#))
6. 使用 Agilent 6470 三重四极杆液质联用系统测定雷尼替丁中的 NDMA 杂质 ([5994-1668ZH-CN](#))
7. 使用高分辨率 Agilent 6546 LC/Q-TOF 测定亚硝酸胺杂质 ([5994-1372ZH-CN](#))
8. 使用 Agilent 6470 三重四极杆液质联用系统同步测定二甲双胍缓释片中的 8 种亚硝酸胺杂质 ([5994-2533EN](#))

## 安捷伦化学标准品

是否正在寻找用于其他应用的高质量标样？[搜索我们含 5000 种化学标准品的目录](#)，寻找适用于您的方法、应用或工作流程的理想标准品。目录中找不到合适的标准品？我们的网站还有一个自动的定制标准品报价工具，可帮助您开发符合您需求的标准品。

## 安捷伦液相色谱选择工具

您是否正在寻找适合您应用的液相色谱柱？使用安捷伦的[液相色谱柱选择工具](#)选择理想的液相色谱柱。

## Agilent CrossLab: 洞察敏锐, 成就超群

除仪器之外, CrossLab 还为您提供服务、消耗品和实验室资源管理, 能帮助实验室提高效率、优化操作、延长仪器正常运行时间, 并提升用户技能等。



如需了解关于 Agilent CrossLab 的更多信息, 以及洞察敏锐、成就超群的示例, 请访问 [www.agilent.com/crosslab](http://www.agilent.com/crosslab)

查找当地的安捷伦客户中心:

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://www.agilent.com/chem/contactus-cn)

如需获取技术问题的答案和安捷伦社区的资源, 请访问:

[community.agilent.com](http://community.agilent.com)

安捷伦客户服务中心:

免费专线: **800-820-3278**

**400-820-3278** (手机用户)

联系我们:

[LSCA-China\\_800@agilent.com](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价:

[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)

本文中的信息、说明和指标如有变更, 恕不另行通知。

RA44239.5764236111

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2021  
2021 年 3 月 10 日, 中国出版  
5994-2977ZHCN

