

使用Xevo TQ-S micro和Atlantis Premier BEH C₁₈ AX色谱柱测定氯沙坦钾原料药和药品中的亚硝胺杂质

Jun Xiang Lee, Zhen Han Mong, Wenlin Zhang

Waters Corporation

摘要

本应用纪要展示了一种灵敏、稳定的UPLC-MS/MS方法，该方法使用配备APCI的Xevo TQ-S micro三重四极杆质谱仪定量分析氯沙坦钾原料药和药品中的三种亚硝胺杂质（NDMA、NDEA和NMBA）。开发的仪器方法使NDMA和NDEA (0.5~100 ng/mL)以及NMBA (1~100 ng/mL)表现出优异的线性， R^2 高于0.997。所有化合物的定量限(LOQ)为0.5 ng/mL (0.005 ppm)，符合美国FDA的亚硝胺杂质可接受限值要求。氯沙坦钾DS和DP中所有杂质的平均提取效率均超过70%。本研究的结果还表明，Atlantis Premier BEH C₁₈ AX色谱柱能够克服小分子极性化合物保留性差的问题，因此成为分析极性亚硝胺（例如NDMA）的理想选择。

优势

- 使用ACQUITY UPLC I-Class与Xevo TQ-S micro三重四极杆质谱联用系统开发出一种稳定、可重现、高选择性和高灵敏度方法，准确定量分析氯沙坦钾原料药和药品(0.001 ppm)中的1 ng/mL NDMA、NDEA和NMBA
- 开发的方法能够使NDMA、NDEA和NMBA的LOQ达到0.5 ng/mL，低于美国食品药品监督管理局(FDA)于2021年2月规定的最新可接受限值¹
- Atlantis Premier BEH C₁₈ AX色谱柱经证明对小分子极性化合物（例如NDMA）具有优异的保留能力
- 检测ARB原料药和药品中是否存在亚硝胺杂质，通过预加标测试确定所有3种亚硝胺杂质的提取效率均超过70%

简介

自2018年初以来，美国FDA已经报告多例高血压和心脏病治疗药品所含亚硝酸胺杂质超出可接受阈值的事件。长期摄入高于可接受阈值的亚硝酸胺杂质可能会增加罹患癌症的风险。这一现象导致全球范围内多种药品被召回，造成此类药物在一段时间内发生短缺。

亚硝酸胺杂质可能来源于活性药物成分(API)，也称为原料药，或来源于药品合成过程中所用的溶剂。此外，不适当的储存条件也会导致亚硝酸胺杂质的浓度随时间推移而提高至不可接受的阈值。

但是，如果将亚硝酸胺杂质的浓度很好地控制在可接受阈值或更低水平，应不会增加罹患癌症的风险。因此，制造商须在药物合成的不同阶段检测亚硝酸胺杂质的存在情况。根据最新的FDA法规，原料药和药品制造商应使用LOQ等于或低于0.03 ppm的仪器方法准确定量分析含量不超过可接受摄入量26.5 ng/天的亚硝酸胺杂质¹。

在本应用纪要中，我们使用ACQUITY UPLC I-Class与Xevo TQ-S micro三重四极杆质谱联用系统开发出一种稳定灵敏并且符合FDA指南要求的方法来分析三种亚硝酸胺杂质：N-亚硝基二甲胺(NDMA)、N-亚硝基二乙胺(NDEA)和N-亚硝基-N-甲基-4-氨基丁酸(NMBA)。与有关亚硝酸胺杂质的其他研究一样²，我们观察到大气压化学电离(APCI)相比于电喷雾电离(ESI)具有更出色的灵敏度，因此本实验采用APCI。本文报告了线性、定量限(LOQ)、准确度、精密度和提取效率。本研究采用的Atlantis Premier BEH C₁₈ AX色谱柱在保留高极性小分子（例如NDMA）方面表现出优异的性能。

实验

工作标样制备

用甲醇分别制备浓度为50 µg/mL和0.5 µg/mL的混标储备液（NDMA、NDEA和NMBA）和内标混合储备液（NDMA-d₆、NDEA-d₄和NMBA-d₃）。

用甲醇:水(5:95)制备浓度为0.5、1、2、5、10、20和100 ng/mL的混标校准系列，添加5 ng/mL内标。

原料药样品前处理

准确称取100 mg氯沙坦钾API加入离心管中，用10 mL甲醇:水(5:95)溶解。向混合物中加入50 ng内标，使内标的浓度达到5 ng/mL。随后，将样品涡旋、超声处理并以9,000 rpm离心15 min。收集上清液并通过0.22 µm尼龙滤器过滤，然后进样至LC-MS以供分析。

药品样品前处理

将氯沙坦药片(100 mg)粉碎成细粉。随后从溶解到样品分析的样品前处理过程与原料药样品前处理过程相同。

提取效率分析样品前处理

在进行上述DS和DP样品前处理之前，将2.5 ng/mL亚硝胺杂质（NDMA、NDEA和NMBA）预加标至氯沙坦钾DS和DP中。收集上清液并通过0.22 μm尼龙滤器过滤，然后进样至LC-MS以供分析。

色谱条件

液相色谱系统:	ACQUITY UPLC I-Class
色谱柱:	Atlantis Premier BEH C ₁₈ AX, 1.7 μm, 2.1 × 100 mm (部件 号: 186009368)
柱温:	40 °C
样品温度:	10 °C
进样体积:	10 μL
流速:	0.45 mL/min
流动相A:	含0.1%甲酸的5 mM甲酸铵水溶 液
流动相B:	含0.1%甲酸的5 mM甲酸铵的甲 醇溶液

Gradient

时间 (min)	%A	%B	曲线
初始	95	5	初始
0.5	95	5	6
3.5	25	75	6
4.0	5	95	6
6.0	5	95	6
8.5	95	5	6

质谱仪条件

质谱系统:	Xevo TQ-S micro
电离模式:	APCI+
APCI探头温度:	300 °C
电晕针电流:	2 μ A (针对特定系统/撞击针)
锥孔气流速(L/h)	100
脱溶剂气流速(L/h):	1200
数据管理	色谱软件: MassLynx 4.2版 定量软件: TargetLynx

MRM通道

使用MRM通道模式采集数据, 每种化合物及相关内标2个通道。NDMA、NDEA和NMBA的相关内标分别为NDMA-d6、NDEA-d4和NMBA-d3。表1中标记*的通道为定量通道。

化合物名称	锥孔电压 (V)	MRM通道	碰撞能量 (V)	内标	锥孔电压 (V)	MRM通道	碰撞能量 (V)
NDMA	25	75.00>58.00*	10	NDMA-d6	25	81.00>64.00*	10
	60	75.00>43.00	12		60	81.00>46.00	12
NDEA	16	103.00>75.00*	10	NDEA-d4	16	107.00>77.00*	10
	16	103.00>47.00	16		16	107.00>47.00	16
NMBA	20	147.00>117.00*	7	NMBA-d3	20	150.00>47.00*	13
	20	147.00>44.00	13		20	150.00>87.00	13

表1.NDMA、NDEA和NMBA的通道

结果与讨论

Atlantis Premier BEH C18 AX色谱柱的保留能力

NDMA是一种常见的亚硝胺，其极性特点造成一些保留问题。因此，如果没有选择合适的色谱柱和合适的固定相，NDMA可能会与极性基质干扰物质一起洗脱，造成灵敏度和准确度下降。

本研究评估了两种尺寸相似的不同色谱柱（ACQUITY UPLC CSH氟苯基色谱柱和Atlantis Premier BEH C₁₈ AX色谱柱）对NDMA的保留性能。从图1可以看出，与CSH氟苯基色谱柱相比，Atlantis Premier BEH C₁₈ AX色谱柱能够更好地保留极性最强的亚硝胺，即NDMA，使极性基质干扰物能够更好地与分析物分离，最终改善灵敏度和准确度，正如本分析所报告。

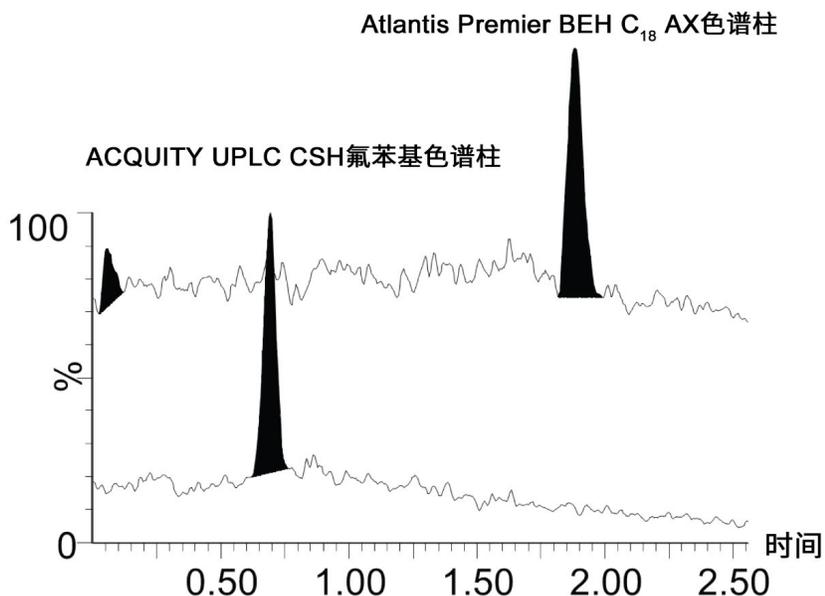


图1. Atlantis Premier BEH C₁₈ AX色谱柱与ACQUITY UPLC CSH氟苯基色谱柱对10 ng/mL NDMA的保留能力比较

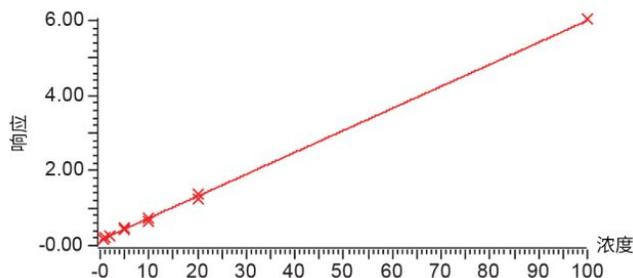
仪器线性和准确度

图2所示的内标校准曲线是对两条单独曲线的校准点取平均后获得的。NDMA和NDEA的线性动态范围为0.5~100 ng/mL，NMBA的范围为1~100 ng/mL。所有分析物线性回归的R²（见图2）均高于0.997，表明获得的峰面积与制备浓度之间具有良好的线性。所有浓度下的残差百分比均小于14.6%。

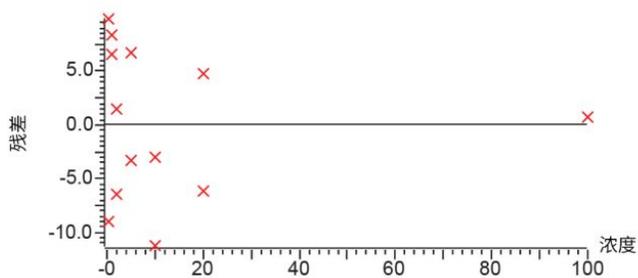
化合物	RT (min)	范围	内标浓度	R ²
NDMA	1.13	0.5~100 ng/mL	5 ng/mL	0.9987
NDEA	2.79	0.5~100 ng/mL		0.9975
NMBA	2.23	1.0~100 ng/mL		0.9978

表2. 亚硝胺的保留时间和校准曲线详细信息

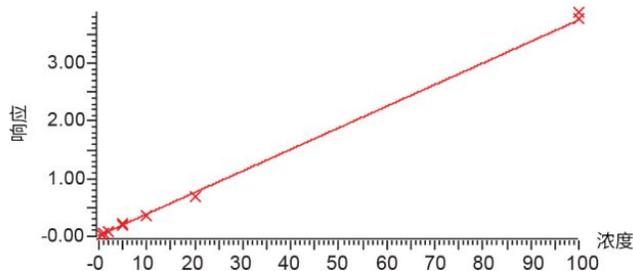
化合物名称: NDMA
 相关系数: $r = 0.999359$, $r^2 = 0.998719$
 标准曲线: $0.0585717 * x + 0.142864$
 响应类型: 内标 (参比1), 峰面积* (内标浓度/内标峰面积)
 曲线类型: 线性, 原点: 排除, 权重: $1/x$, 轴转: 无



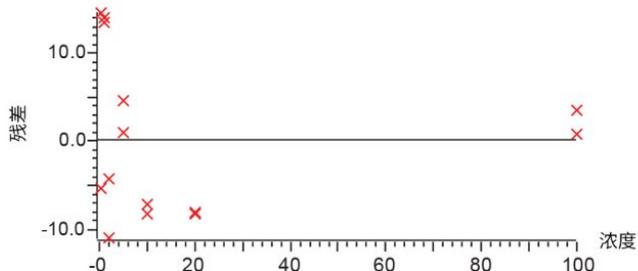
化合物名称: NDMA
 相关系数: $r = 0.999359$, $r^2 = 0.998719$
 标准曲线: $0.0585717 * x + 0.142864$
 响应类型: 内标 (参比1), 峰面积* (内标浓度/内标峰面积)
 曲线类型: 线性, 原点: 排除, 权重: $1/x$, 轴转: 无



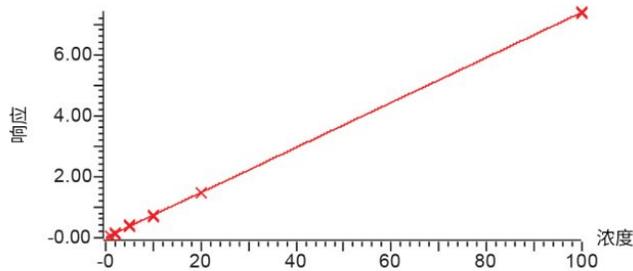
化合物名称: NDEA
 相关系数: $r = 0.998776$, $r^2 = 0.997554$
 标准曲线: $0.0373731 * x + 0.0124063$
 响应类型: 内标 (参比3), 峰面积* (内标浓度/内标峰面积)
 曲线类型: 线性, 原点: 排除, 权重: $1/x$, 轴转: 无



化合物名称: NDEA
 相关系数: $r = 0.998776$, $r^2 = 0.997554$
 标准曲线: $0.0373731 * x + 0.0124063$
 响应类型: 内标 (参比3), 峰面积* (内标浓度/内标峰面积)
 曲线类型: 线性, 原点: 排除, 权重: $1/x$, 轴转: 无



化合物名称: NMBA
 相关系数: $r = 0.999696$, $r^2 = 0.999392$
 标准曲线: $0.0739612 * x + -0.0140783$
 响应类型: 内标 (参比6), 峰面积* (内标浓度/内标峰面积)
 曲线类型: 线性, 原点: 排除, 权重: $1/x$, 轴转: 无



化合物名称: NMBA
 相关系数: $r = 0.999696$, $r^2 = 0.999392$
 标准曲线: $0.0739612 * x + -0.0140783$
 响应类型: 内标 (参比6), 峰面积* (内标浓度/内标峰面积)
 曲线类型: 线性, 原点: 排除, 权重: $1/x$, 轴转: 无

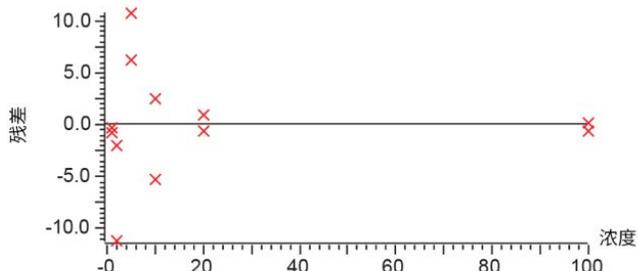


图2. NDMA、NDEA和NMBA的校准曲线

仪器精密度

重现性研究通过将1.0 ng/mL混标连续进样分析10次进行, 所有三种亚硝胺的浓度%RSD均小于12%。图3显示了十次重复进样的计算浓度趋势图, 证明Xevo TQ-S micro三重四极杆质谱仪即使在低分析物浓度下也能提供可重现的结果。

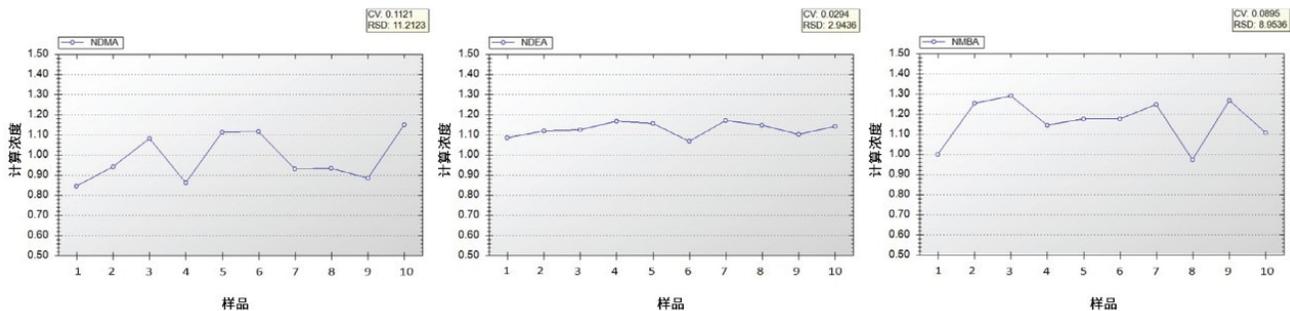


图3.十次重复进样的NDMA、NDEA、NMBA计算浓度趋势图

定量限(LOQ)

LOQ浓度是分析物可以得到准确鉴定以实现定量分析的最低浓度水平。在本研究中，LOQ根据信噪比大于10时，化合物的最低浓度确定。

图4显示了0.5 ng/mL（产生信号高于基线10倍的最低浓度）NDMA、NDEA和NMBA的色谱图。因此，将所有三种化合物的LOQ确定为0.5 ng/mL。

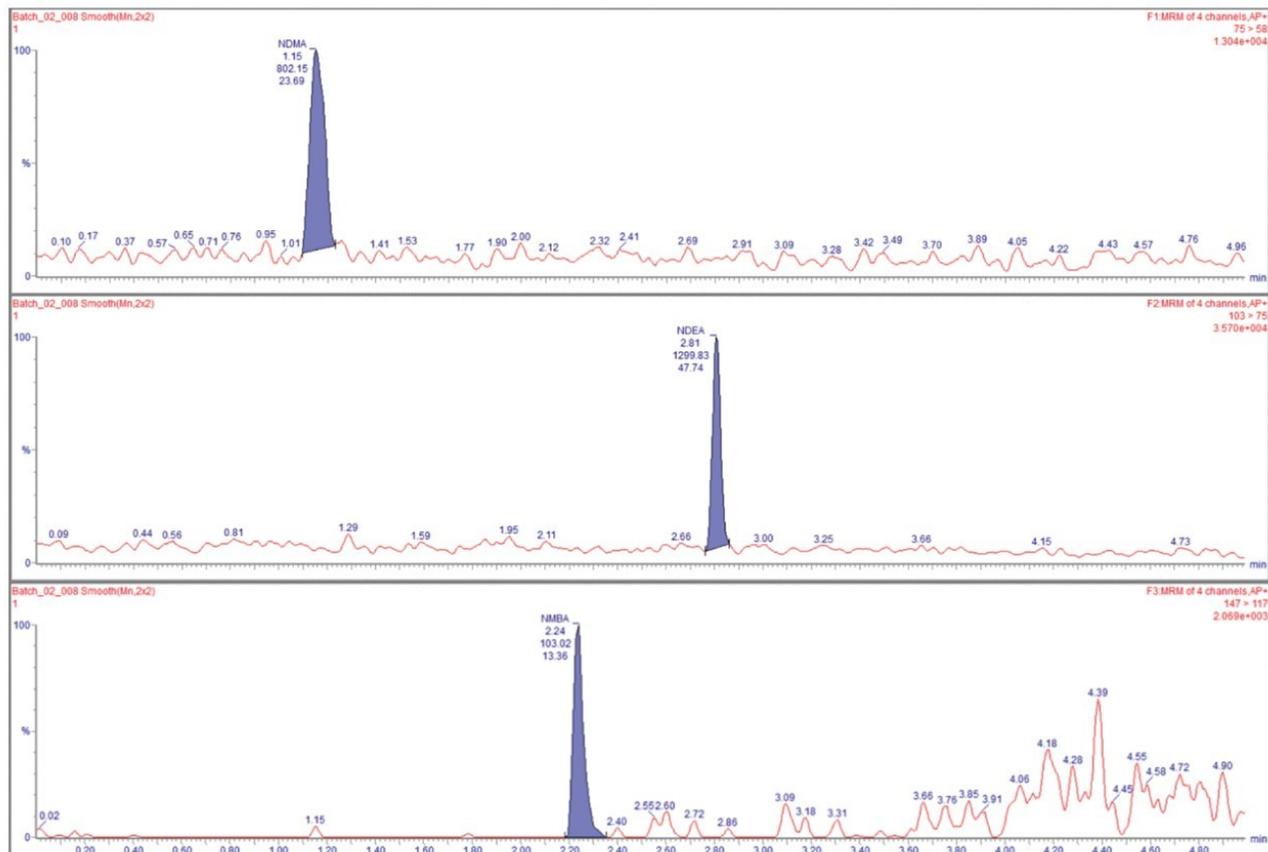


图4.LOQ浓度下的NDMA（上图）、NDEA（中图）和NMBA（下图）色谱图

氯沙坦钾DS和DP的分析以及亚硝胺提取效率的评估

使用开发的方法筛查氯沙坦钾原料药(DS)和药品(DP)中的亚硝胺杂质,发现所有亚硝胺均低于LOQ,因此报告为未检出。为研究氯沙坦DS和DP中亚硝胺的提取效率,将最终浓度为2.5 ng/mL (0.025 ppm)的亚硝胺杂质分别预加标至DS和DP中,并按照实验部分所述的样品前处理方法处理样品。采用两个DS和四个DP样品进行评估。

提取效率%按以下公式计算。如表3所示,NDMA、NDEA和NMBA的回收率范围分别为70.7%~88%、85.3%~105.3%和89.3%~116.0%。

提取效率% = [在加标氯沙坦钾DS和DP中测得的杂质浓度/2.50 ng/mL] × 100%

		NDMA	NDEA	NMBA
原料药1	空白样品	ND	ND	ND
	加标样品	1.77	2.47	2.50
	提取效率(%)	70.7	98.7	100.0
原料药2	空白样品	ND	0.50	ND
	加标样品	1.93	2.87	2.53
	提取效率	77.3	94.7	101.3
药品1	空白样品	ND	ND	ND
	加标样品	1.97	2.63	2.90
	提取效率	78.7	105.3	116.0
药品2	空白样品	ND	ND	ND
	加标样品	2.10	2.30	2.43
	提取效率	84.0	92.0	97.3
药品3	空白样品	ND	0.83	ND
	加标样品	2.20	3.43	3.00
	提取效率	88.0	104.0	120.0
药品4	空白样品	ND	ND	ND
	加标样品	1.90	2.13	2.23
	提取效率	76.0	85.3	89.3

ND: 未检出

表3.氯沙坦钾DS和DP中0.025 ppm预加标亚硝胺的提取效率

仪器质量控制检查

利用已知浓度 (1 ng/mL和10 ng/mL) 的标样进行质量控制(QC)检查,以评估整个分析过程中的系统性能。在整个样品列表中分析一组所述QC (n = 7), 每运行六个样品后进样分析一次QC样品。

质量检查样品中所有化合物在1 ng/mL和10 ng/mL时的精密度均为%RSD < 10%,表现出良好的重现性。质量检查样品中所有化合物在1 ng/mL和10 ng/mL时的准确度分别为%RSD < 21%和< 11%,表明在整个分析过程中获得了可靠的结果。

结论

使用ACQUITY UPLC I-Class系统与配备大气压化学电离源的Xevo TQ-S micro三重四极杆质谱联用系统，成功开发出基于MRM通道的方法用于快速筛查并定量分析亚硝胺杂质（NDMA、NDEA和NMBA）。

获得的结果表明，仪器具有良好的精密度、重现性和灵敏度。还证明该仪器能够使所有亚硝胺杂质的LOQ达到0.005 ppm，低于美国FDA针对摄入量不超过26.5 ng/天的亚硝胺杂质所规定的可接受限值0.03 ppm。另外，氯沙坦DS和DP的预加标评估表明，该仪器对所有亚硝胺杂质均具有良好的提取效率。此外，与其他市售色谱柱相比，Atlantis Premier BEH AX色谱柱能够保留小分子极性化合物，即使这些化合物在DS和DP中也是如此。

参考资料

1. Center for Drug Evaluation and Research. Control of nitrosamine impurities in human drugs. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Revision 1, February 2021.
2. Lee, J.-H., Lee, S.-U. and Oh, J.-E. Analysis of nine nitrosamines in water by combining automated solid-phase extraction with high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 93:12, 1261–1273.

特色产品

- [ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <https://www.waters.com/134613317>](https://www.waters.com/134613317)
- [Xevo TQ-S micro三重四极杆质谱仪 <https://www.waters.com/134798856>](https://www.waters.com/134798856)
- [MassLynx MS软件 <https://www.waters.com/513662>](https://www.waters.com/513662)
- [TargetLynx <https://www.waters.com/513791>](https://www.waters.com/513791)

720007393ZH, 2021年10月



© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.