

在痕量N-亚硝胺定量分析中尽可能减小低质量MRM通道背景化学噪音的建议方法

Marian Twohig, Padmakar Wagh博士, Margaret Maziarz, Amy Bartlett

Waters Corporation

这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

摘要

自2018年活性药物成分(API)缬沙坦中检出N-亚硝基二甲胺(NDMA)，以及随后其他几类药物中也检出亚硝胺以来，卫生监管机构要求药品上市许可持有人(MAH)采取措施，减少和控制新药、在研药物和已上市药物中的亚硝胺。亚硝胺具有致突变作用，被视为可能的人类致癌物。

要在法规规定的可接受摄入量(AI)阈值水平分析痕量亚硝胺，需要采用高灵敏度且高选择性的分析方法。串联四极杆质量分析器具有简单易用、稳定性好、灵敏度高以及分析选择性出色（可在多重反应监测(MRM)实验中选择（采集）母离子和子离子）等优势，为定量测定复杂基质样品提供了理想的性能特征。

尽管LC-MS/MS实验具有优异的选择性，但在MRM采集中仍然可能观察到噪音，这会降低方法的检测灵敏度。低分子量分析物的痕量分析可能会有一定的挑战性，因为该质量范围内通常存在化学干扰。以下研究使用超高效液相色谱(UPLC)结合大气压化学电离(APCI)和串联四极杆质谱仪分析亚硝胺，并结合多种策略（包括评估锥孔气体、锥孔电压和使用高纯度流动相）来降低分析NDMA和其他亚硝胺的过程中出现的背景噪音。

优势

- 使用Xevo™ TQ Absolute串联四极杆质谱仪在MRM采集模式下检测痕量亚硝胺

- 使用多个确认离子，对杂质检测的选择性更有信心
- 降噪工具帮助改善分析物信噪比
- 使用Premier HSS T3色谱柱和ACQUITY™ Premier UPLC系统成功保留了7种亚硝胺杂质（包括 m/z 130的同量异位NDPA和NDIPA）并实现色谱分离

简介

自2018年活性药物成分(API)缬沙坦中检出N-亚硝基二甲胺(NDMA)，以及随后其他几类药物中也检出亚硝胺以来，业界一直致力于减少所有市售药物中的亚硝胺。由于亚硝胺具有致突变性，并且被视为可能的人类致癌物，监管机构要求制药厂商和上市许可持有人仔细监测和控制药品中的亚硝胺，以确保患者能持续获得安全的关键药物。卫生监管机构指导生产商遵循三步流程来减少和控制所有市售药品和新上市药品中的亚硝胺含量，该流程包括风险评估、确认分析检测（旨在识别风险），以及报告。

如果风险评估确定最终药品中可能形成亚硝胺，就必须通过分析检测进行定量¹⁻³。由于某些亚硝胺的AI非常低，在法规允许的阈值水平下分析痕量亚硝胺需要使用高灵敏度且高选择性的分析方法。此外，为了让制造商能够减少现行的放行批次检测，需要定量限可低至法规规定的杂质AI阈值10%的高灵敏度分析方法。通过使用MS/MS，可以借助串联四极杆质量分析器优异的性能特征对复杂基质中痕量水平的分析物进行准确定量。特别是MRM采集模式可以将结构相关的子离子与特定的母离子关联起来，有助于实现高选择性和高灵敏度。LC-MS/MS和GC-MS/MS方法都被用于各种N-亚硝胺的痕量定量分析⁴⁻⁸。LC-MS/MS特别适用于分析极性和非极性化合物，以及热不稳定化合物⁷。电喷雾电离（ESI，一种基于溶液的电离技术）和APCI电离技术（在气相中实施电离）被用于分析各种基质中的亚硝胺^{4,5,9,10-12}。有研究表明APCI不易受基质干扰的影响^{7,11,12}。

尽管LC-MS/MS实验的选择性较高，但在极低质量分析物（例如亚硝胺）的痕量分析时中，一个常见的挑战是MRM采集中会观察到背景噪音，而这可能会干扰并降低检测灵敏度。为了保持LC-MS/MS分析的痕量检测能力，必须采取措施保持系统洁净度，避免分析过程中可能引入系统的污染。以下研究探讨了使用超高效液相色谱(UPLC™)和APCI正离子电离模式以及串联四极杆质谱仪（图1）分析亚硝胺时，如何降低背景化学噪音对分析的影响。研究将探讨降低亚硝胺定量和确认MRM通道噪音的策略，包括评估锥孔电压、锥孔气体流速和流动相。经过优化的方法被应用于分析7种N-亚硝胺确证标准品（表1和图2），达到了超低的检测限。

实验



图1.Xevo TQ Absolute串联四极杆质谱仪和ACQUITY Premier系统

化合物	名称	化学式	[M+H] ⁺	CAS编号
NDMA	<i>N</i> -亚硝基二甲胺	C ₂ H ₈ N ₂ O	75.05	62-75-9
NDEA	<i>N</i> -亚硝基二乙胺	C ₄ H ₁₀ N ₂ O	103.08	55-18-5
NEIPA	<i>N</i> -亚硝基乙基异丙胺	C ₉ H ₁₂ N ₂ O	117.10	16339-04-1
NDPA	<i>N</i> -亚硝基二丙胺	C ₆ H ₁₄ N ₂ O	131.11	621-64-7
NDIPA	<i>N</i> -亚硝基二异丙胺	C ₈ H ₁₄ N ₂ O	131.11	601-77-4
NMBA	<i>N</i> -亚硝基- <i>N</i> -甲基-4-氨基丁酸	C ₉ H ₁₀ N ₂ O ₃	147.07	61445-55-4
NDBA	<i>N</i> -亚硝基二丁胺	C ₈ H ₁₈ N ₂ O	159.14	924-16-3

表1.*N*-亚硝胺、化学式、实测 m/z 和CAS编号列表

化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	锥孔电压(V)	碰撞能量(eV)
NDMA	75.10	58.00 (定量离子)	30	10
		43.00 (确认1)	50	8
		44.00 (确认2)	30	8
NDEA	103.10	75.00 (定量离子)	25	10
		47.00 (确认1)	25	14
		29.00 (确认2)	25	10
NEIPA	117.10	75.00 (定量离子)	20	9
		47.00 (确认1)	20	14
		43.05 (确认2)	20	14
NDPA	131.10	89.10 (定量离子)	16	10
		47.05 (确认1)	16	12
		43.05 (确认2)	16	12
NDIPA	131.10	89.10 (定量离子)	20	8
		47.05 (确认1)	20	12
		43.10 (确认2)	20	12
NMBA	147.10	117.00 (定量离子)	15	5
		44.10 (确认1)	15	12
NDBA	159.20	57.10 (定量离子)	30	12
		103.10 (确认1)	30	10
		41.10 (确认2)	30	12

表2.本研究分析7种亚硝胺时采用的定量和确认MRM通道、锥孔电压以及碰撞能量设置

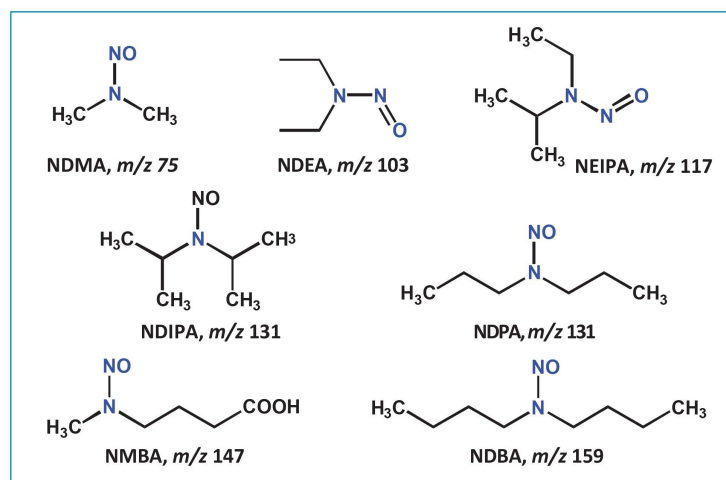


图2.本研究分析的亚硝胺的结构

结果与讨论

优化锥孔气体

使用确认离子及其与定量离子的比率（表2）对提高正确鉴定可疑杂质的可信度很有帮助。如果要在存在高化学背景或干扰（例如高浓度的活性药物成分(API)）的情况下检测和定量低浓度的低质量杂质，这种方法特别有用。图3A为NDMA确证标准品在保留时间(t_R) 2.09 min处的初级MRM通道和两个确认MRM通道的色谱图。我们在方法开发过程中研究了锥孔气流速，旨在帮助降低75.1>43 NDMA确认通道中观察到的背景噪音。锥孔气体是一个很有用的参数，经优化后有助于减少溶剂簇和其他干扰离子，从而改善信噪比(S/N)。图3B显示了增大锥孔气流速对NDMA的75.1>43 MRM通道中观察到的背景噪音的影响。随着锥孔气流速从150 L/h增加到500 L/h，噪音降低。优化该参数可以获得理想的信噪比。很重要的一点是要确保增大锥孔气流速不会对其他分析物的信噪比或MRM通道产生不利影响。

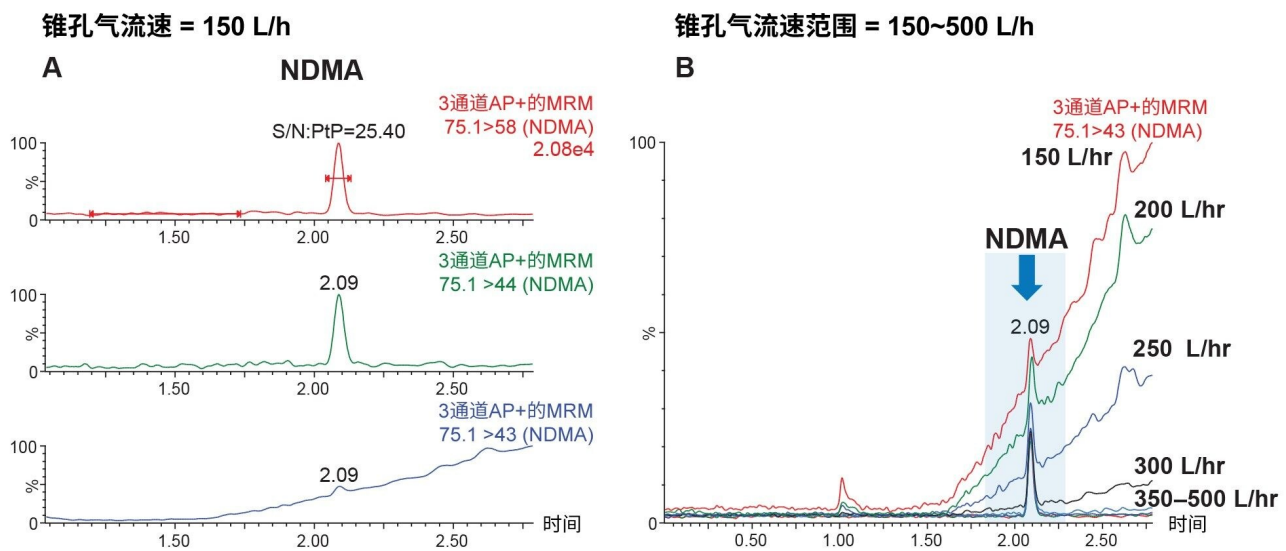


图3.分析NDMA确证标准品(0.5 ng/mL, 10 μ L)得到的色谱图。确认MRM通道(75.1>43)的背景噪音升高，如图3A（左下图）所示。在叠加色谱图中可以观察到锥孔气流速从150 L/h增加到500 L/h对75.1>43 MRM通道噪音水平的影响（图3B，右图）。

实验确定最佳锥孔气流速为350 L/h（图4A），因为采用该流速可以达到理想的信噪比，而不会对其他NDMA MRM通道的信噪比产生不利影响（图4B）。使用350 L/h的锥孔气流速可显著改善75.1>43通道的背景噪音，从而

提高此确认通道的可见性。此外，还观察到其他NDMA通道（75.1>58和75.1>44）的信号增强，这些通道的信噪比也因此得以改善（图4B）。

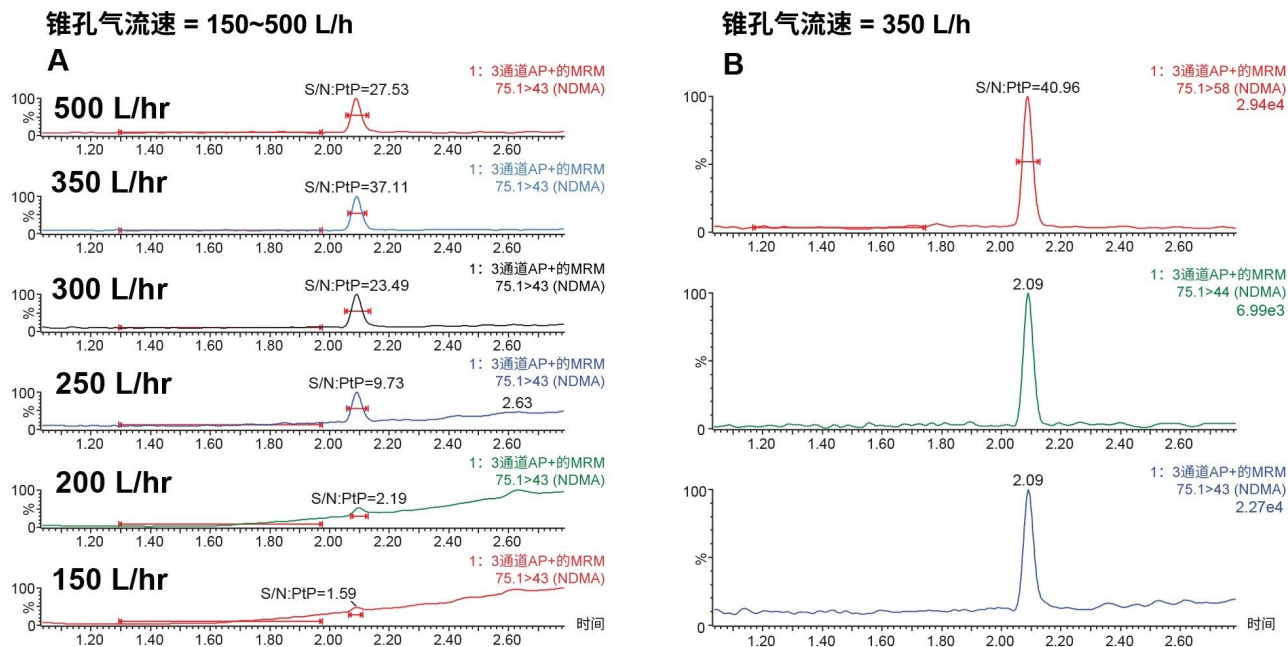


图4.A) 150~500 L/h范围内不同锥孔气流速下的色谱图，图中显示了各流速下的信噪比。B)分析NDMA (NDMA 0.5 ng/mL, 10 μ L)得到的MRM色谱图，采用优化后的锥孔气流速(350 L/h)获得，由图可见噪音明显降低。

优化受噪音影响的MRM通道的锥孔电压

为了尽可能提高离子源到下一级质量分析器的离子传输效率，本研究对锥孔电压进行了优化。使用MassLynx软件的IntelliStart自动调谐功能可以自动优化特定化合物的锥孔电压。如果观察到基线噪音升高，也可以通过调节锥孔电压来解决。上一节提到NDMA的一个确认MRM通道中观察到了背景噪音升高。我们针对这个通道开展锥孔电压优化研究，成功降低了该MRM通道的噪音，并结合锥孔气体参数使用。

采用350 L/h的锥孔气流速设置，将75.1>43 MRM通道的锥孔电压设为25~70 V范围内的不同值。图5A展示了每种锥孔电压设置下的信噪比。通过测量峰洗脱后区域（此区域基线噪音升高）的噪音，确定最佳锥孔电压为50 V。尽管锥孔电压为25 V时的信号最高，但此时该区域的噪音也升高，导致该锥孔电压下观察到的总体信噪比降低（图5B）。在信噪比增益与观察到的任何信号强度下降之间找到平衡非常重要。锥孔电压可以单独应用于受影响的MRM通道，而不影响定量离子强度或其他可能不受背景噪音影响的MRM通道的强度。

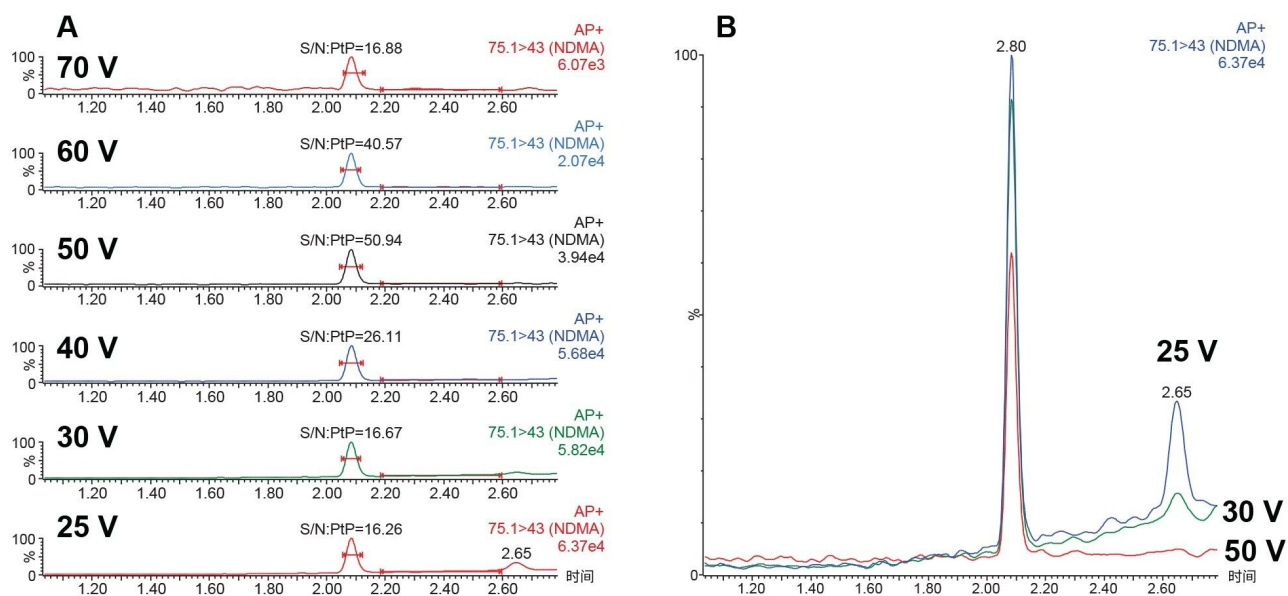


图5.A)分析NDMA确证标准品(1.0 ng/mL, 10 μ L)得到的确认通道(75.1>43)色谱图，图中显示了25~70 V范围内不同锥孔电压下的信噪比；B)叠加色谱图，图中显示了25 V、30 V和50 V锥孔电压对信号强度和基线噪音的影响。

流动相导致的噪音

开展痕量定量分析时必须谨慎设置整个分析系统，避免流动相储液瓶和溶剂受污染，因为这可能导致背景噪音增加和分析灵敏度下降。使用高纯度流动相和添加剂对于维持痕量水平检测所需的检测灵敏度至关重要。本研究使用LC-MS级甲酸和甲酸铵以及LC-MS级溶剂，还比较了两个不同品牌的LC-MS级甲醇。图6A为使用甲醇作为强洗脱溶剂分析NEIPA确证标准品(0.1 ng/mL, 进样10 μ L)得到的色谱图。使用每个溶剂品牌的甲醇时各进样5次标准品，然后将所得色谱图叠加到同一个强度轴上。使用品牌A的甲醇时，观察到NEIPA初级通道(117.1>75)的背景噪音升高，显著影响了测得的信噪比(图6B)。此外，还观察到NEIPA的确认通道以及NDPA和NDIPA的定量和确认通道噪音增加(数据未显示)。使用品牌B的甲醇作为强洗脱溶剂时，观察到这些通道的背景噪音降低，信噪比值增加。

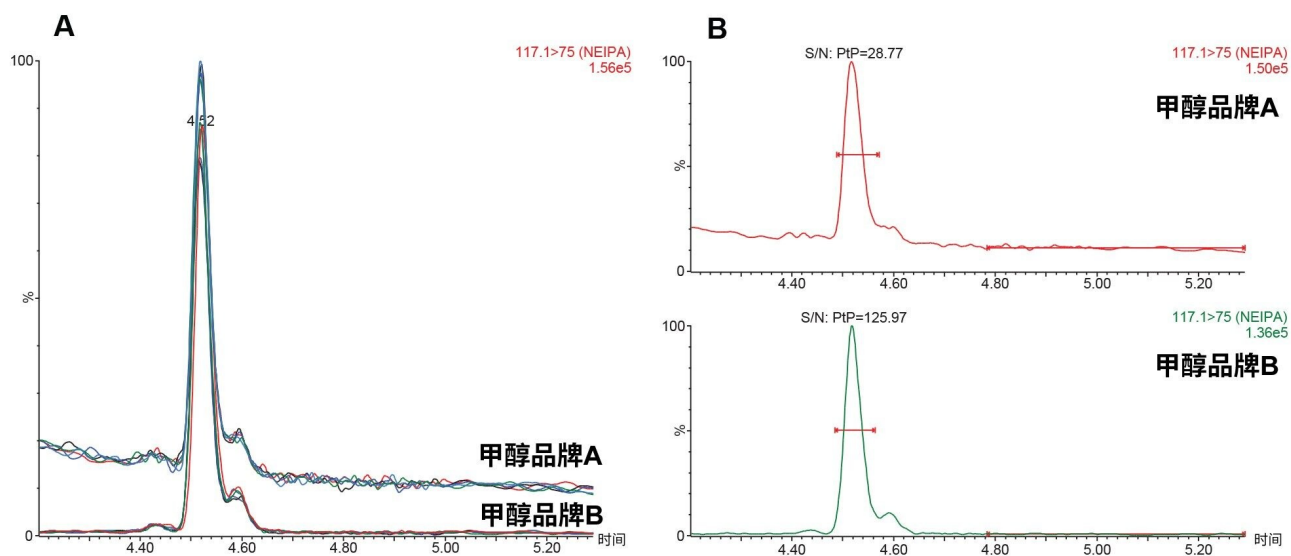


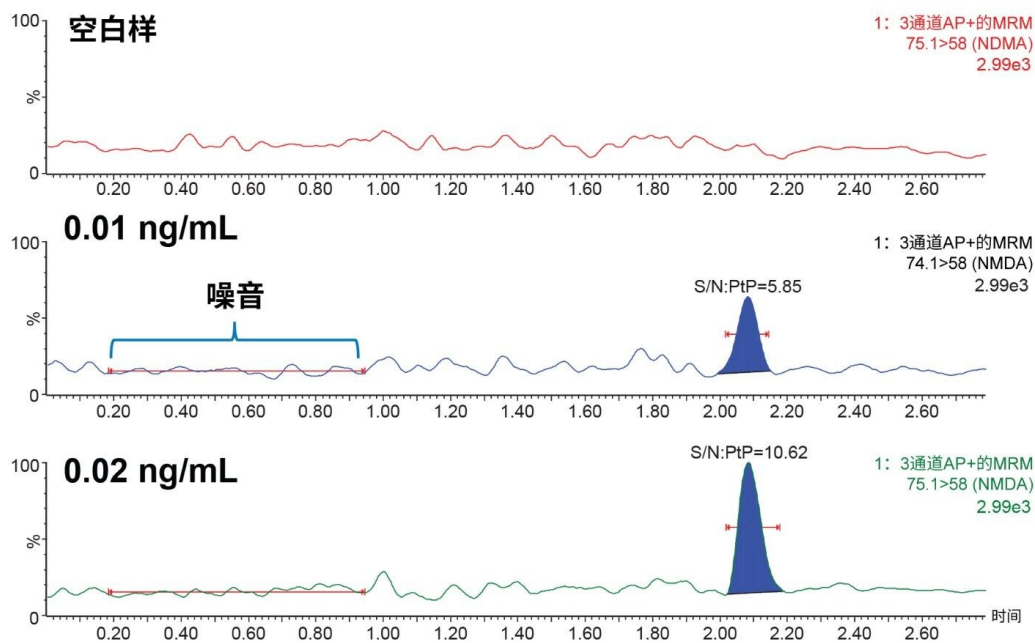
图6.A)分别使用溶剂品牌A的甲醇($n=5$)和溶剂品牌B的甲醇($n=5$)分析NEIPA初级通道(117.1>75)的叠加色谱图,由图可见使用溶剂品牌A的甲醇时,该MRM通道的可见噪音增大(0.1 ng/mL , $10\text{ }\mu\text{L}$)。B)使用各品牌甲醇时测得的信噪比比较。

定量痕量N-亚硝胺

优化方法并尽量减小背景噪音后,使用亚硝胺溶剂确证标准品执行三次进样,评估质谱仪的灵敏度和线性范围。分别按信噪比3:1和10:1的标准确定每种亚硝胺的检测限(LOD)和定量限(LOQ)。利用亚硝胺标准品保留时间处的信号以及基线噪音的代表性区域计算每种化合物在LOD和LOQ处的信噪比,如图7A中使用峰到峰算法分析NDMA得到的结果所示。

NDMA的响应在 $0.02\sim 100\text{ ng/mL}$ 范围内呈线性(图7B)。其他亚硝胺的分析结果汇总于表3中。

A) 信噪比



B) 线性范围

化合物名称: NDMA
 相关系数: $r = 0.999957$, $r^2 = 0.999915$
 标准曲线: $563232 \cdot x + 127.434$
 响应类型: 外标法, 按峰面积计算
 曲线类型: 线性, 原点: 排除, 权重: 1/x, 轴转: 无

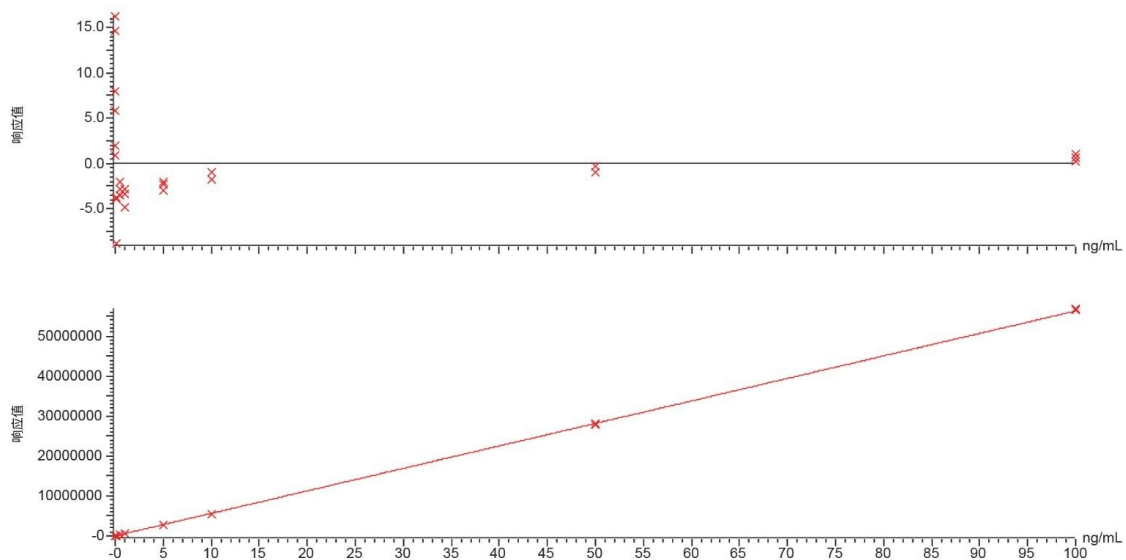


图7.A)浓度为LOD (0.01 ng/mL)和LOQ (0.02 ng/mL)的NDMA确证标准品以及空白进样 (进样30 μ L) 的色谱图。

图中显示了各浓度水平的信噪比。B) NDMA的线性范围为0.02~100 ng/mL，LOQ处的残差<16%，被测校准范围内的残差<+/-9%，重复进样3次（上图）。

亚硝酸胺	LOD ¹ ng/mL	LOQ ng/mL	线性范围 ²	R ²
NDMA	0.01	0.02	0.02-100 ng/mL	0.9999
NDEA	0.005	0.01	0.01-100 ng/mL	0.9999
NEIPA	0.005	0.01	0.01-100 ng/mL	0.9999
NDPA	0.005	0.01	0.01-100 ng/mL	0.9997
NDIPA	0.005	0.01	0.01-100 ng/mL	0.9996
NMBA	0.005	0.01	0.01-10 ng/mL	0.9995
NDBA	0.005	0.01	0.01-100 ng/mL	0.9997

表3.本研究确定了所分析的亚硝酸胺确证标准品的LOD和LOQ，表中还显示了线性范围和R²值。

图8显示了LOD和LOQ浓度下，NDMA的定量MRM通道(75.1>58)和两个确认MRM通道（75.1>43和75.1>44）以及空白进样的色谱图。

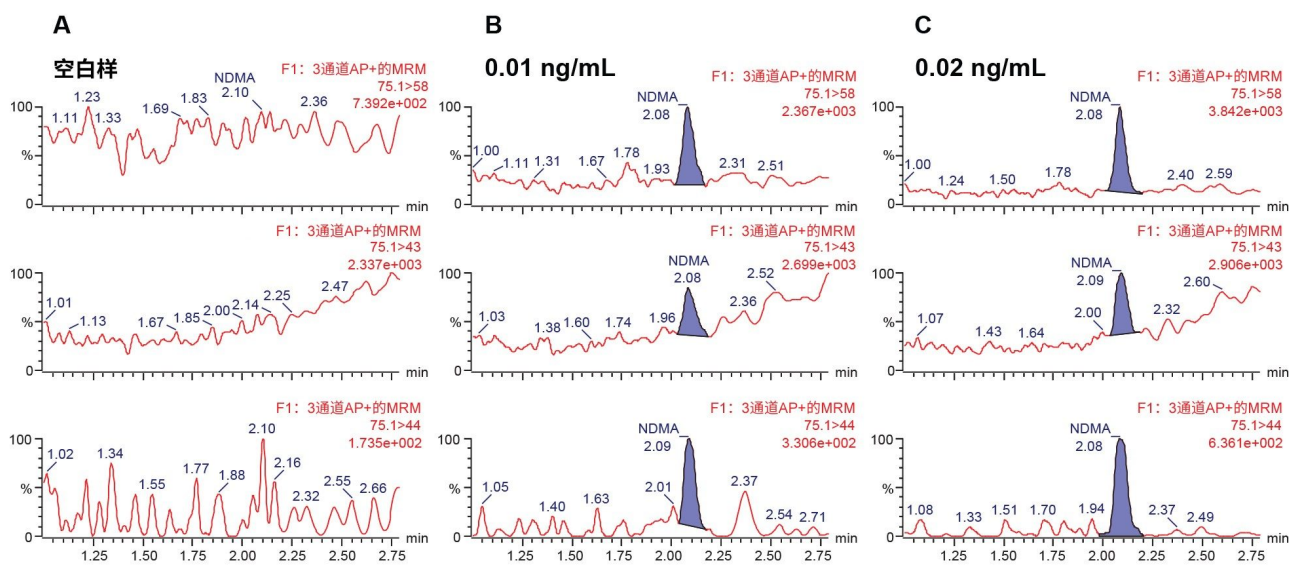


图8.分析NDMA确证标准品（0.01 ng/mL和0.02 ng/mL，进样体积30 μ L）和溶剂空白样的色谱图。

结论

为了在痕量亚硝酸胺分析中保持优异的检测灵敏度，需要控制整个LC-MS/MS系统的背景噪音，以便获得理想的信噪比。优选不会给目标MRM背景增加额外噪音的LC-MS/MS级溶剂和添加剂。如果基线噪音升高，可以尝试优化锥孔气流速，这有助于减少干扰离子，从而提高电离效率并增加定量和确认离子的信噪比。在存在高浓度API的情况下，使用确认离子对于提高杂质鉴定的可信度至关重要。优化锥孔电压既有助于提高分析物的检测灵敏度，也可以帮助改善受噪音影响的MRM通道的信噪比。有必要通过开展优化研究在峰强度降低与信噪比增益之间找到平衡。

本研究的实验结果旨在为开发亚硝酸胺定量分析方法时观察到背景噪音升高或怀疑背景噪音升高的情况提供参考。在分析含API或药品的样品时，可能需要进一步优化方法（包括样品前处理或色谱分离），以补充上述优化参数。

参考文献

1. Moser J., Schlingemann J., Saal C. N-Nitrosamines Impurities in Pharmaceuticals the Abrupt Challenges That Resulted, the Evolving Science, and the Regulatory Framework. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2023, 112 (5), 1161–1162. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2023.01.016> <<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2023.01.016>> .
2. Teasdale A., Moser J., Ford J. G., Creasy, J. N -Nitrosamines. In *Mutagenic Impurities*, Teasdale, A. Ed., Wiley, 2021; pp 269–320.
3. Bharate, S. S. Critical Analysis of Drug Product Recalls Due to Nitrosamine Impurities. *Journal of Medicinal Chemistry* 2021, 64 (6), 2923–2936. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.0c02120.
4. Lame M. E., Hatch, L. High Sensitivity Quantitation of Nitrosamine Genotoxic Impurities: LC-MS Analysis of Ranitidine Drug Product using the Waters ACQUITY UPLC I-Class/Xevo TQ-XS Tandem Quadrupole Mass Spectrometer. Waters Application Note. [720006899](https://www.waters.com/content/dam/waters/technical-content/application-notes/720006899.pdf), 2020.
5. Maziarz M., Rainville P. D., Bartlett A. 利用Xevo™ TQ Absolute串联四极杆质谱仪和ACQUITY™ Premier系统对二甲双胍中的亚硝酸胺进行高灵敏度定量分析, 沃特世应用纪要, [720007725ZH](https://www.waters.com/content/dam/waters/technical-content/application-notes/720007725ZH.pdf), 2022.
6. Chang S.-H., Ho H.-Y., Chang C.-C., Zang C.-Z., Hsu Y.-H., Lin M.-C., Tseng S.-H., Wang D.-Y. Evaluation and Optimization of a HS-SPME-assisted GC-MS/MS Method for Monitoring Nitrosamine Impurities in Diverse Pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2022, 221, 115003. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.115003> <<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.115003>> .
7. Wichitnithad W., Nantaphol S., Noppakhunsomboon K., Thitikornpong W., Rojsitthisak, P. Current Status and Prospects of Development of Analytical Methods for Determining Nitrosamine and N-Nitroso Impurities in Pharmaceuticals. *Talanta* 2023, 254, 124102. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.124102> <<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.124102>> .
8. David F., Vanhoenacker G., Sandra K., Sandra P., Bristow T., Harrison M. Strategic Approaches to the Chromatographic Analysis of Mutagenic Impurities. In *Mutagenic Impurities*, Teasdale, A. Ed., Wiley, 2021; pp 381–438.
9. Zhao Y.-Y., Boyd J., Hrudey S. E., Li X.-F. Characterization of New Nitrosamines in Drinking Water Using Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Environmental Science & Technology* 2006, 40 (24), 7636–7641. DOI: 10.1021/es061332s.
10. Nagendla N. K., Shaik H., Bala Subrahanyam S., Godugu D., Reddy Mudiam, M. K. Development,

Validation, and Estimation of Measurement Uncertainty for the Quantitative Determination of Nitrosamines in Sartan Drugs Using Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography Open* 2022, 2, 100053. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcoa.2022.100053> <<https://doi.org/10.1016/j.jcoa.2022.100053>> .

11. Lee J.-H., Lee S.-U., Oh J.-E. Analysis of Nine Nitrosamines in Water by Combining Automated Solid-Phase Extraction With High-Performance Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Chemical Ionisation Tandem Mass Spectrometry. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 2013, 93 (12), 1261–1273. DOI: 10.1080/03067319.2013.803281.
12. Ripollés C., Pitarch E., Sancho J. V., López F. J., Hernández F. Determination of Eight Nitrosamines in Water at the ng L⁻¹ Levels by Liquid Chromatography Coupled to Atmospheric Pressure Chemical Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 2011, 702 (1), 62–71. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.06.024>.

特色产品

ACQUITY Premier系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>>

Xevo TQ Absolute <<https://www.waters.com/nextgen/global/products/mass-spectrometry-systems/xevo-tq-absolute.html>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

TargetLynx <<https://www.waters.com/513791>>

720007992ZH, 2023年7月



© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [招聘](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)
[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)