

应用SCIEX Triple Quad™ 4500 系统检测基因毒性杂质N-亚硝基-N-甲基-4-氨基丁酸

Determination of Genotoxic Impurities N-nitroso-N-methyl-4-aminobutyric acid on SCIEX Triple Quad™ 4500 system

陈金梅 (Chen Jinmei), 司丹丹 (Si Dandan), 龙志敏 (Long Zhimin), 郭立海 (Guo Lihai)

SCIEX, 亚太应用支持中心, 中国

SCIEX, APAC Support Center, China

Key Word: SCIEX Triple Quad™ 4500, Genotoxic Impurities, N-nitroso-N-methyl-4-aminobutyric acid, NMBA

前言

基因毒性杂质 (GTIs, Genotoxic Impurities) 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, 具有致癌可能或者倾向。亚硝胺类化合物是常见的基因杂质之一, FDA的评估表明, 在药物的制造过程中存在特定的化学品和反应条件时, 血管紧张素II受体阻滞剂 (ARB) 中可能会产生亚硝胺, 也可能是由于溶剂等材料的再利用造成的。N-亚硝基-N-甲基-4-氨基丁酸 (NMBA) 是ARB药物中检测到的第三种亚硝胺杂质。

EMA (欧洲药物评审组织) 推出《遗传毒性杂质限度指导原则》, 引入了可接受风险的摄入量, 即毒性物质限量, 或称毒理学关注门槛 (TTC, Threshold of Toxicological Concern) 这个概念。设置了限度值 TTC (1.5 µg/day), 即相当于每天摄入1.5 µg的基因毒性杂质, 被认为对于大多数药品来说是可以接受的风险, FDA表明最近对这些被召回的大量氯沙坦钾片进行测试, NMBA水平高于FDA暂定可接受的摄入限度, 某品牌缬沙坦胶囊每日最大剂量为80 mg, TTC水平为1.5 µg/day/80 mg=18.75 µg/g, 根据FDA的初步评估, NMBA暴露患者的癌症风险增加似乎与亚硝基二甲胺 (NDMA) 暴露相同, 但低于亚硝基二乙胺 (NDEA) 暴露的风险。也就是说, 药物产品中存在这些杂质是不可接受的, 所以有必要使用LC-MS/MS建立高效和高灵敏度的方法以帮助制造商和其他监管机构评估这些产品是否存在NMBA等潜在的亚硝胺杂质。

仪器设备

SCIEX ExionLC™液相系统 + Triple Quad™ 4500质谱系统



液相方法

色谱柱: Phenomenex Kinetex F5(100 × 3.0 mm, 2.6 µm)

流动相: A相: 水 (0.05%甲酸)

B相: 甲醇 (0.05%甲酸)

流速: 0.6 mL/min

柱温: 40 °C

进样量: 10 µL

表1. 液相梯度。

Time(min)	A (%)	B (%)
0.0	95	5
0.5	95	5
5.0	5	95
5.1	95	5
7.0	95	5

质谱方法

离子源：APCI源，正离子模式

离子源参数：

NC电流：3 μ A

气帘气 CUR: 15 psi

雾化气 GS1: 35 psi

碰撞气 CAD: low

源温度 TEM: 350 $^{\circ}$ C

Calibration for NMBA $y = 5.1370065x + 43.47806$ ($r = 0.99737$) (weighting 1/ x^2)

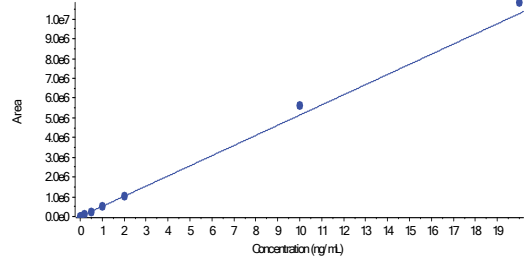


表2. N-亚硝基-N-甲基-4-氨基丁酸的质谱参数。

Compound	Q1	Q3	DP	CE	CXP
NMBA	147.1	117.2	29	9	6

实验结果

1. 特异性：

配置50%甲醇溶液，作为溶剂空白；称取一定量的某品牌缬沙坦药品，溶解并稀释至2.0 mg/mL浓度，作为空白基质溶液；取N-亚硝基-N-甲基-4-氨基丁酸标准品，加入一定量空白基质溶液溶解，并稀释至浓度为0.2 ng/mL的溶液。分别取10 μ L进样，提取离子流图如下，在待测物保留时间处无干扰，见图1。

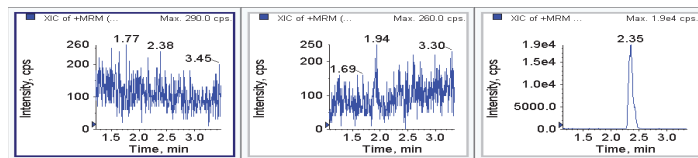


图1. 空白溶剂，空白基质和浓度为0.2 ng/mL的溶液中的提取离子流图。

2. 线性范围：

用50%甲醇水逐级稀释N-亚硝基-N-甲基-4-氨基丁酸标准工作溶液至0.01 ng/mL, 0.02 ng/mL, 0.05 ng/mL, 0.2 ng/mL, 0.5 ng/mL, 1 ng/mL, 2 ng/mL, 10 ng/mL, 20 ng/mL, 以峰面积对浓度做标准曲线。图2为N-亚硝基-N-甲基-4-氨基丁酸线性范围、线性方程和相关系数。

表4. 回收率和重现性测试结果。

Compound	0.025 ng/mL		0.2 ng/mL		12 ng/mL	
	Recovery(%)	RSD(%)	Recovery(%)	RSD(%)	Recovery(%)	RSD(%)
NMBA	98.85	2.56	97.70	0.76	104.67	3.82

图2. N-亚硝基-N-甲基-4-氨基丁酸标准曲线，线性回归系数 $r=0.99737$ 。

3. LLOQ的准确度和重现性：

平行制备六份LLOQ溶液，进样分析，测定结果如下所示。六份平行样品中，N-亚硝基-N-甲基-4-氨基丁酸的准确度和重现性RSD%分别为101.05%和2.81%，表明准确度，重现性良好。

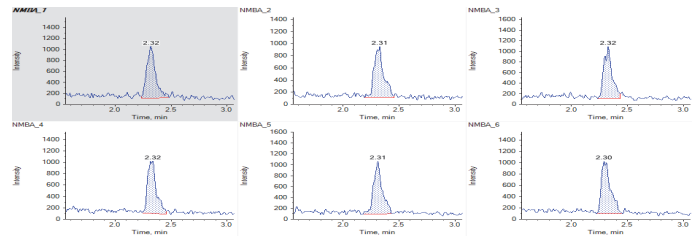


图3. LLOQ浓度下重现性色谱图展示。

表3. LLOQ的准确度和重现性测试结果。

Compound	0.01ng/mL	
	Accuracy (%)	RSD (%)
NMBA	101.05	2.81

4. 加标回收率和重现性：

取2.0 mg/mL缬沙坦药品溶液，配置成浓度分别为0.025ng/mL, 0.2 ng/mL和12 ng/mL N-亚硝基-N-甲基-4-氨基丁酸做为加标样品，平行制备六份，进样分析，测试结果如下表格，不同浓度的回收率在97.70-104.67%，平行样品的RSD%在0.76-3.82%，均满足要求。

总结

本文使用SCIEX Triple Quad™ 4500系统建立了LC-MS/MS方法测定基因毒性杂质N-亚硝基-N-甲基-4-氨基丁酸的含量。方法的特异性好，无干扰；线性范围为0.01 ng/ml-20 ng/ml，线性范围宽，线性关系良好，且灵敏度高；最低定量下限LLOQ为0.01 ng/mL，相当于原料药中（2.0 mg/mL）的含量为0.005 µg/g，远低于TTC水平，灵敏度高，且RSD为2.81%，低、中、高三个浓度的基质加标的RSD分别为2.56%，0.76%和3.82%，表明方法和仪器的重现性良好。该方法为检测该类基因毒性杂质提供了参考。

For Research Use Only. Not for use in Diagnostics Procedures.

AB Sciex is operating as SCIEX.

© 2019. AB Sciex. The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license.

RUO-MKT-02-9645-ZH-A



SCIEX中国公司

北京分公司
地址：北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808 1388
传真：010-5808 1390

全国免费垂询电话：800 820 3488, 400 821 3897

上海公司及亚太区应用支持中心
地址：上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419 7200
传真：021-2419 7333

网址：www.sciex.com.cn

广州分公司
地址：广州市天河区珠江江西路15号
珠江城1907室
电话：020-8510 0200
传真：020-3876 0835

微博：@SCIEX