

LC-MS/MS方法快速测定基因毒杂质N-亚硝基二乙胺

Rapid Determination of The Genotoxic Impurities N-Nitrosodiethylamine by LC-MS/MS

陈慧敏 (Cheng Huimin), 龙志敏 (Long Zhimin), 郭立海 (Guo Lihai)
SCIEX亚太应用支持中心 SCIEX China

Key Words: genotoxic impurities, N-nitrosodiethylamine, LC-MS/MS

基因毒性杂质 (GTIs, Genotoxic impurities) 是药物合成、配置或者储存过程中可能形成的中间体, 反应产物或降解物, 基因毒性杂质的特点是在很低浓度时即可造成人体遗传物质的损伤, 进而导致基因突变并可能促使肿瘤的发生。因其毒性较强, 对用药的安全性产生了极大的威胁, 2005年发生了甲磺酸萘非维拉事件, 为防范此类事件再度发生, 监管机构 (包括欧洲药品管理局 (EMA)、美国FDA和国际协调会议 (ICHM7)) 陆续发布了关于药物成分中基因毒性杂质允许限值的指导原则, 以确保药品的安全。2019年FDA最新发布亚硝胺类杂质的临时可接受摄入量, 其中增加了N-亚硝基-N-甲基-4-氨基丁酸甲酯的限度。

亚硝胺类化合物属于ICHM7指南中明确提出的具有较高致癌性 (“关注队列”) 的物质, 因此该类化合物应在药品中予以严格控制。并且近期, 在已上市的缙沙坦原料药中发现存在检出微量的亚硝胺类化合物杂质的风险。FDA规定若某品牌缙沙坦每日最大剂量320 mg, 药物中N-亚硝基二乙胺(NDEA, N-Nitrosodiethylamine)临时可接受摄入量为26.5 ng/day, 即26.5 ng/day/0.32 g=0.083 µg/g(0.000083%)。本文应NDEA最新限度需求使用LC-MS/MS测试缙沙坦中NDEA的含量, 仅4 min的方法完全满足FDA灵敏度要求, 与HPLC和GC方法相比有效的节省了时间成本。本方法定量下限可低至0.02 ng/mL (相当于2.0 mg/mL样品中含NDEA的含量为0.01 µg/g, 低于要求水平), 仪器的灵敏度高, 重现性好。

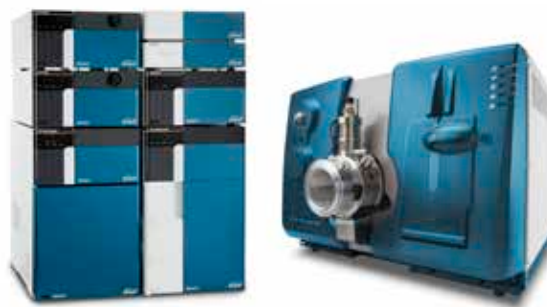
仪器设备

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

液相方法

色谱柱: Phenomenex Kinetex 2.6 µm F5 100A

流动相: A相: 水 B相: 甲醇



流速: 0.5 mL/min

柱温: 40 °C;

流动相梯度:

Time(min)	A (%)	B (%)
0.00	90	10
1	90	10
2.8	2	98
2.85	90	10
4	90	10

质谱方法

离子源: APCI源, 正离子模式

离子源参数:

NC电流: 5 µA 气帘气 CUR: 30 psi

雾化气 GS1: 35 psi 碰撞气 CAD: 6

源温度 TEM: 350 °C 检测离子对: m/z 103.1 > 75

去簇电压DP: 42 V 碰撞能 CE: 15 V

1 特异性：取缬沙坦标品配制成2.0 mg/mL溶液，加入NDEA的标准工作溶液至缬沙坦标准液中，浓度分别为0.05 ng/mL，0.5 ng/mL和10.0 ng/mL，做为加标样品，此溶液相当于样品中含亚硝基二乙胺的含量分别为0.025 $\mu\text{g/g}$ ，0.25 $\mu\text{g/g}$ 和5 $\mu\text{g/g}$ ；称量一定量的某品牌缬沙坦药品，溶解并稀释至2.0 mg/mL，做为实际样品溶液；进样分析后，提取离子流图如下，实际样品中NDEA均未检出；空白溶剂中NDEA未检出；空白溶剂、加标样品和实际样品结果见图1。

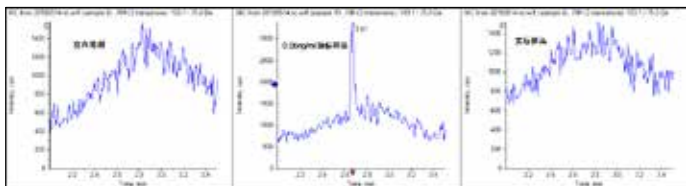


图1. 空白样品、0.05 ng/ml加标样品和实际样品中NDEA的提取离子流图。

2 线性范围：用纯水逐级稀释NDEA标准工作溶液至0.02 ng/mL，0.05 ng/mL，0.2 ng/mL，0.5 ng/mL，2 ng/mL，5.0 ng/mL和20.0 ng/mL分别进样分析，以峰面积对浓度做标准曲线。图2为NDEA的标准曲线和相关系数。

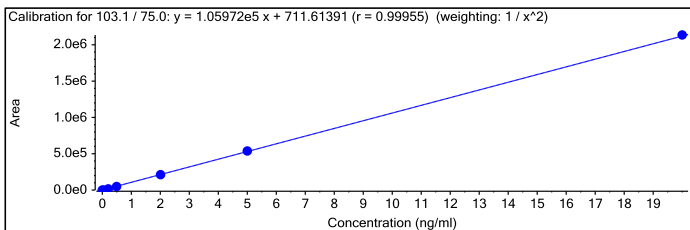


图2. NDEA的标准曲线图。

3 加标回收率和重现性：取样品加标溶液（加标溶液平行制备六份，浓度分别0.05 ng/mL，0.5 ng/mL 和10.0 ng/mL），进样分析。测定结果如下表格。NDEA的三个不同浓度样品的回收率在98.1-109.0%，平行样品的RSD%在0.51-2.42%，回收率和RSD%均满足测试求，结果见表1。定量下限样品（0.02 ng/mL）连续进样6针，RSD为2.32%，表明重现性良好。图3为连续进样定量下限样品6针的色谱图。

表1. 回收率测试结果。

Group	0.05ng/mL	0.5ng/mL	10ng/mL
Recovery(%)	98.1	109	102.3
RSD(%)	2.42	1.38	0.51

本文使用SCIEX Triple Quad™ 4500建立了LC-MS/MS方法测定药物中NDEA的含量。结果表明，该方法的特异性好，无干扰；NDEA化合物的线性范围为0.02 ng/mL-20 ng/mL，在线性范围内线性关系良好，相关系数大于0.999。能测定到的最低浓度相当于原料药中（2.0 mg/mL）NDEA的含量为0.01 $\mu\text{g/g}$ ，低于要求限度水平，说明灵敏度高；定量下限重现性良好。

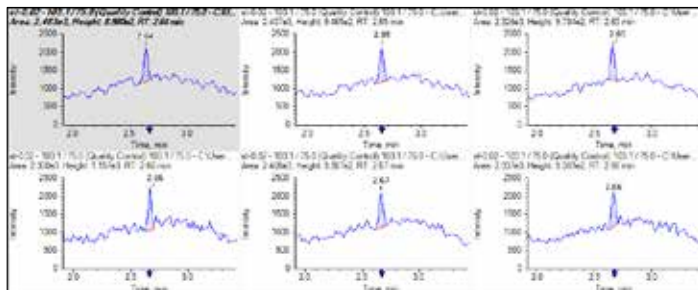


图3. 定量下限0.02 ng/mL NDEA标准溶液连续6针进样的提取离子流图。

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-02-9865-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：广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话：020-8510 0200
传真：020-3876 0835

微博：@SCIEX