

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.12.020

气相色谱串联质谱法检测替格瑞洛原料药中 *N*-亚硝胺类杂质*

朱 婧¹, 徐海燕^{1△}, 朱跃芳², 赵静芝³, 谭鑫强³

(1. 沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 110000; 2. 湖南省株洲市食品药品检验所, 湖南 株洲 412000; 3. 株洲千金药业股份有限公司, 湖南 株洲 412000)

摘要:目的 建立同时检测替格瑞洛原料药中3种 *N*-亚硝胺类杂质 *N*-亚硝基二异丙胺(NDIPA)、NDMA 和 NDEA 的气相色谱串联质谱(GC-MS/MS)法。方法 色谱柱为 Agilent VF-WAXms 毛细管柱(30 m × 0.25 mm, 1.0 μm), 程序升温, 进样口温度为 250 °C, 载气为高纯氦气, 流速为 1.0 mL/min, 进样方式不分流, 进样量为 1 μL。离子源为电子轰击离子源(EI), 溶剂延迟 7 min; 电压为 70 eV, 离子源温度为 250 °C; 多反应监测模式(MRM), 检测定量离子质荷比(*m/z*)为 130→88(NDIPA), 74→44(NDMA), 102→85(NDEA), 检测定性离子 *m/z* 为 130→42(NDIPA), 74→42(NDMA), 102→56(NDEA)。结果 NDMA, NDEA 和 NDIPA 的质量浓度分别在 2.09~20.88 ng/mL($r=1.0000, n=5$), 0.61~6.14 ng/mL($r=0.9999, n=5$)和 0.58~5.83 ng/mL($r=0.9999, n=5$)范围内与各自和内标物峰面积的比值线性关系良好; 精密性、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 5.0%; 定量限分别为 0.10, 0.03, 0.03 μg/g, 检测限分别为 0.05, 0.01, 0.01 μg/g; 平均加样回收率分别为 104.14%, 105.02%, 103.73%, RSD 分别为 5.15%, 1.87%, 1.47%($n=9$)。所有样品中均未检出替格瑞洛。结论 该方法专属性强、灵敏度高、准确度高, 可用于替格瑞洛中 *N*-亚硝胺类杂质检测。

关键词: 气相色谱串联质谱法; *N*-亚硝胺类杂质; 遗传毒性杂质; 替格瑞洛

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2022)12-0084-05

Determination of *N*-Nitrosoamine Impurities in Ticagrelor Active Pharmaceutical Ingredients by GC-MS/MS

ZHU Jing¹, XU Haiyan¹, ZHU Yuefang², ZHAO Jingzhi³, TAN Xinqiang³

(1. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang, Liaoning, China 110000; 2. Institute for Food and Drug Control in Zhuzhou, Zhuzhou, Hunan, China 412000; 3. Zhuzhou Qianjin Pharmaceutical Co., Ltd., Zhuzhou, Hunan, China 412000)

Abstract: Objective To establish a gas chromatography tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) method for the simultaneous determination of three *N*-nitrosoamine impurities [*N*-nitroso diisopropylamine (NDIPA), *N*-nitrosodimethylamine (NDMA) and *N*-nitrosodiethylamine (NDEA)] in ticagrelor active pharmaceutical ingredients (API). **Methods** The chromatographic column was Agilent VF-WAXms capillary column (30 m × 0.25 mm, 1.0 μm) with temperature programmed, the temperature of the sample inlet was 250 °C, the carrier gas was high-purity helium, the flow rate was 1.0 mL/min, and the injection volume was 1 μL without split-flow. The ion source was electron impact ion source (EI), and the solvent delay was 7 min. The voltage was 70 eV and the ion source temperature was 250 °C. Multi-reaction monitoring mode (MRM) was adopted, the mass-to-charge ratio (*m/z*) of detected quantitative ions was from 130 to 88 for NDIPA, from 74 to 44 for NDMA, from 102 to 85 for NDEA, and the *m/z* of detected qualitative ions was from 130 to 42 for NDIPA, from 74 to 42 for NDMA, from 102 to 56 for NDEA. **Results** The linear ranges of NDMA, NDEA and NDIPA were 2.09-20.88 ng/mL ($r=1.000, n=5$), 0.61-6.14 ng/mL ($r=0.9999, n=5$) and 0.58-5.83 ng/mL ($r=0.9999, n=5$), respectively. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were less than 5.0%. The limits of quantitation (LOQ) were 0.10, 0.03, 0.03 μg/g, respectively. The limits of detection (LOD) were 0.05, 0.01, 0.01 μg/g, respectively. The average recoveries of NDMA, NDEA and NDIPA were 104.14%, 105.02% and 103.73% with RSDs of 5.15%, 1.87% and 1.47% ($n=9$), respectively. Ticagrelor was not detected in all samples. **Conclusion** The method is specific, sensitive and accurate, which can be used for the determination of *N*-nitrosoamine impurities in ticagrelor.

Key words: GC-MS/MS; *N*-nitrosoamine impurities; genotoxic impurities; ticagrelor

N-亚硝胺类化合物属遗传毒性杂质, 进入人体可立即通过细胞色素P450酶代谢活化, 生成活性烷基及小分子醛, 与DNA和蛋白质结合, 进而破坏DNA的复制及损伤蛋白质结构等^[1-2], 在痕量水平即可造成DNA和染色体损伤。故此类化合物属国际人用药品注册技术协调会(ICH)M7(R1)(《评估和控制药物中DNA

反应性(致突变)杂质以限制潜在致癌风险》)指南^[3]中提及的“关注队列”物质。且根据世界卫生组织(WHO)公布的致癌物清单^[3], *N*-亚硝基二甲胺(NDMA)和 *N*-亚硝基二乙胺(NDEA)均属2A类致癌物质。此外中国药典委员会、美国食品药品监督管理局(FDA)、欧洲药品质量管理局(EDQM)已发布了气相色谱串联质谱(GC-

*基金项目: 湖南省自然科学基金[2017JJ2123]。

第一作者: 朱婧, 女, 大学本科, 中级工程师, 研究方向为药物分析, (电子信箱)750572673@qq.com。

△通信作者: 徐海燕, 女, 博士研究生, 教授, 研究方向为药物分析, (电子信箱)xhy411@163.com。

MS/MS)法、液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)法等多种检测方法,以检测沙坦类药物中N-亚硝胺类杂质^[4-14]。替格瑞洛为环戊基三唑嘧啶类新型口服抗血小板药物,于2010年12月在欧洲上市,用于急性冠状动脉综合征(ACS)的治疗^[15]。其主要经缩合反应、环合反应、取代反应、脱异丙基反应合成^[16]。替格瑞洛的起始物料合成过程中使用N,N-二异丙基乙胺(DIPEA),可能含有二甲胺、二乙胺和二异丙基乙胺,在环合反应时使用亚硝酸钠/乙酸条件进行重氮化环化反应,故可能产生N-亚硝胺类杂质^[17],如N-亚硝基二异丙胺(NDIPA)、NDMA和NDEA。为了保证药品的安全和质量可控,本研究中参照2020年版《中国药典(四部)》通则9306“遗传毒性杂质研究指导原则”^[18],采用GC-MS/MS法检测替格瑞洛中N-亚硝胺类杂质。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

8890型气相色谱仪、7010B型三重四极杆质谱检测器(美国Agilent公司);MS105DU型电子分析天平(精度为0.01 mg)及ME204/02型电子分析天平(精度为0.1 mg),均购于梅特勒-托利多国际贸易有限公司。

1.2 试剂

NDMA标准溶液(德国Dr. Ehrenstorfer公司,批号为985092ME,质量浓度100 μg/mL);NDEA对照品(美国Cato Research Chemicals Inc.,批号为0325-RA-0011,含量97.8%);NDIPA对照品(上海启泰生物科技有限公司,批号为19082291,含量95.35%);氘代N-亚硝基二甲胺(NDMA-d₆)标准溶液(北京曼哈格生物科技有限公司,批号为14658-034,质量浓度为100 μg/mL);甲醇(美国Spectrum公司,HPLC级,批号为3TB0010);替格瑞洛(原料药,批号分别为20200801,20200901,20200902,20200903,20200904;粗品,批号分别为20200701,20200801,20200901,20200902,20200903;均购自湖南千金湘江药业股份有限公司)。

2 方法与结果

2.1 试验条件

色谱条件:色谱柱为Agilent VF-WAXms毛细管柱(30 m × 0.25 mm, 1.0 μm),程序升温(初始柱温为40 °C,保持0.5 min,以20 °C/min的速率升至200 °C,再以60 °C/min的速率升至230 °C,保持8 min),进样口温度为250 °C,载气为高纯氮气,流速为1.0 mL/min,进样方式为不分流,进样量为1 μL。

质谱条件:离子源为电子轰击离子源(EI),溶剂延迟7 min;电压为70 eV,离子源温度为250 °C;多反应监测模式(MRM),检测定量离子质荷比(m/z)为130→88(NDIPA),74→44(NDMA),102→85(NDEA),检测定性

离子m/z为130→42(NDIPA),74→42(NDMA),102→56(NDEA)。

2.2 溶液制备

内标溶液:精密量取NDMA-d₆标准溶液50 μL,置500 mL容量瓶中,用甲醇定容,摇匀,即得。

混合对照品溶液:取NDIPA和NDEA对照品各约15 mg,精密称定,分别置50 mL容量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,分别作为NDIPA和NDEA对照品贮备液。各精密量取1 mL,置同一100 mL容量瓶中,用内标溶液定容,即得NDIPA和NDEA对照品溶液;分别精密量取1 mL,与NDMA标准溶液0.1 mL置同一50 mL容量瓶中,用内标溶液定容,摇匀,即得NDIPA,NDMA,NDEA混合对照品贮备液。精密量取1 mL,置20 mL容量瓶,用内标溶液定容,摇匀,即得。

供试品溶液:取替格瑞洛约400 mg,精密称定,置20 mL容量瓶中,加内标溶液溶解并定容,摇匀。

2.3 方法学考察

专属性试验:取2.2项下内标溶液、混合对照品溶液,按2.1项下试验条件进样测定,记录色谱图。结果见图1和图2,表明内标溶液不干扰NDMA,NDEA,NDIPA的检测。

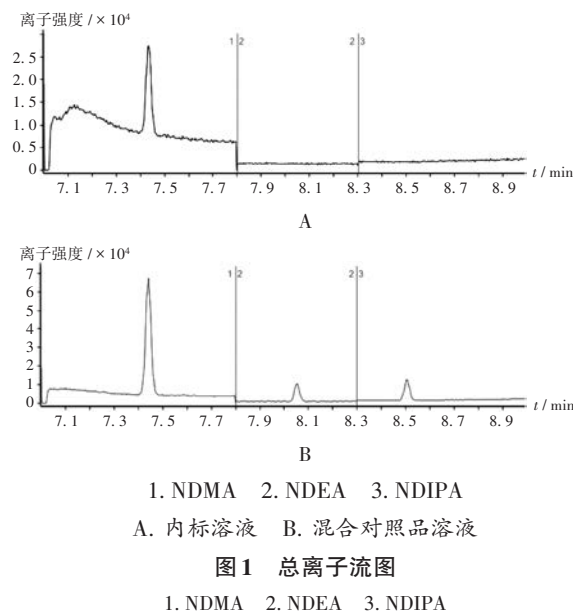


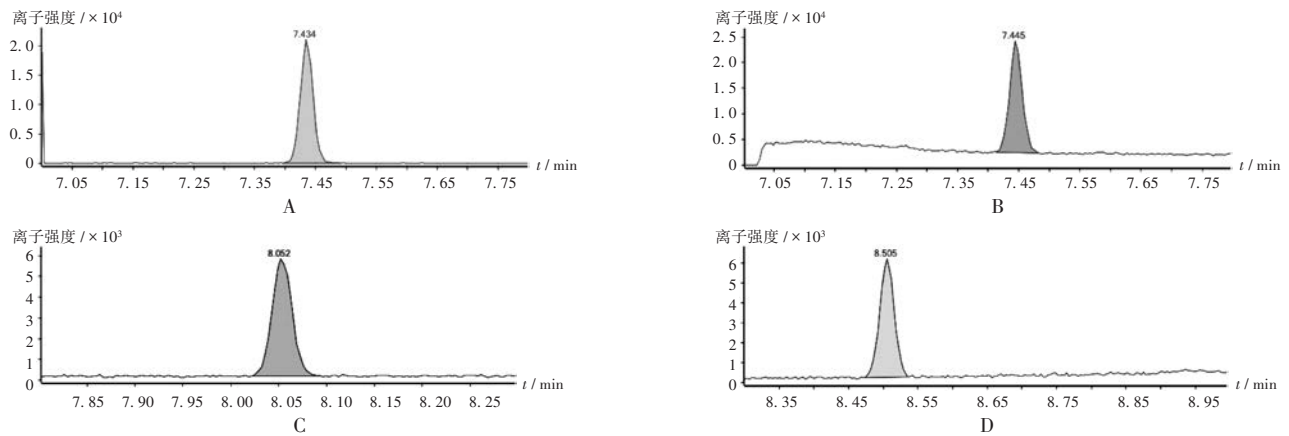
图1 总离子流图

1. NDMA 2. NDEA 3. NDIPA

A. Internal standard solution B. Mixed reference solution

Fig. 1 Total ion flow chromatograms

线性关系考察及定量限与检测限确定:将混合对照品贮备液用内标溶液稀释,得NDMA质量浓度分别为2.09,5.22,10.44,15.66,20.88 ng/mL,NDEA质量浓度为0.61,1.54,3.07,4.61,6.14 ng/mL,NDIPA质量浓度为0.58,1.46,2.91,4.37,5.83 ng/mL的系列混合对照品溶液,按2.1项下试验条件进样测定,以待测成分质量浓度(X)为横坐标、NDMA,NDEA,NDIPA



A. NDMA - d_6 B. NDMA C. NDEA D. NDIPA

图2 MRM 色谱图

A. NDMA - d_6 B. NDMA C. NDEA D. NDIPA

Fig. 2 MRM chromatograms

表1 线性关系考察及定量限和检测限结果 ($n = 5$)

Tab. 1 Results of linear relation test, LOQ and LOD ($n = 5$)

待测成分	回归方程	线性范围 (ng/mL)	r	定量限 ($\mu\text{g/g}$)	检测限 ($\mu\text{g/g}$)
NDMA	$Y_1 = 0.0963X_1 + 0.0021$	2.09~20.88	1.0000	0.10	0.05
NDEA	$Y_2 = 0.0873X_2 + 0.0024$	0.61~6.14	0.9999	0.03	0.01
NDIPA	$Y_3 = 0.0950X_3 + 0.0037$	0.58~5.83	0.9999	0.03	0.01

与内标物峰面积比值为纵坐标(Y)进行线性回归,结果见表1。取混合对照品溶液(NDMA 2.09 ng/mL, NDEA 0.61 ng/mL, NDIPA 0.58 ng/mL),按2.1项下试验条件进样测定,以信噪比分别为10:1, 3:1时的含量计作定量限和检测限,结果见表1。

精密度试验:取2.2项下混合对照品溶液,按2.1项下试验条件1 d内连续进样6次或连续进样3 d、1 d 1次,测定,记录峰面积。结果日内精密度中NDMA, NDEA, NDIPA与内标物峰面积比值的RSD分别为2.10%, 1.48%和1.48% ($n = 6$),均小于5%,表明仪器精密度良好。日间精密度中NDMA, NDEA, NDIPA与内标物峰面

积比值的RSD分别为3.17%, 1.83%和1.42%,均小于5%,表明日间精密度符合要求。

稳定性试验:取混合对照品溶液,室温放置0, 8, 19 h时,按2.1项下试验条件进样测定,记录峰面积。结果,NDMA, NDEA, NDIPA与内标物峰面积比值的RSD分别为1.14%, 2.72%, 1.03% ($n = 3$),表明供试品溶液在室温下放置19 h内稳定性良好。

重复性试验:取样品约400 mg,精密称定,各6份,按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下试验条件进样测定,记录峰面积。结果NDMA, NDEA, NDIPA与内标物峰面积比值的RSD分别为3.62%, 1.46%, 1.48% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取样品约400 mg,精密称定,共9份,分别加入混合对照品贮备液0.5, 1, 1.5 mL,按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下色谱条件进样测定。结果见表2。

2.4 样品检测

取多批次替格瑞洛粗品及对应批次的原料药,按2.2项

表2 加样回收试验结果 ($n = 9$)

Tab. 2 Results of the recovery test ($n = 9$)

加入量(ng)			测得量(ng)			回收率(%)			\bar{X} (%)			RSD(%)		
NDMA	NDEA	NDIPA	NDMA	NDEA	NDIPA	NDMA	NDEA	NDIPA	NDMA	NDEA	NDIPA	NDMA	NDEA	NDIPA
104.41	30.71	29.14	106.82	32.61	29.73	102.31	106.19	102.02						
104.41	30.71	29.14	121.07	33.24	30.44	115.96	108.24	104.46						
104.41	30.71	29.14	108.90	33.00	31.02	104.30	107.46	106.45						
208.82	61.42	58.28	207.47	64.09	61.26	99.35	104.35	105.11						
208.82	61.42	58.28	212.85	64.18	60.92	101.93	104.49	104.53	104.14	105.02	103.73	5.15	1.87	1.47
208.82	61.42	58.28	228.74	62.60	59.41	109.54	101.92	101.94						
313.23	92.13	87.42	321.67	96.56	90.51	102.69	104.81	103.53						
313.23	92.13	87.42	311.40	95.52	90.08	99.42	103.68	103.04						
313.23	92.13	87.42	318.68	95.82	89.58	101.74	104.01	102.47						

下方法制备供试品溶液,按2.1项下试验条件进样测定。结果均未检出这3种亚硝胺类杂质。

3 讨论

3.1 色谱条件选择

替格瑞洛中亚硝胺类杂质NDMA, NDEA和NDIPA检测方法主要依据2019年4月FDA公布的检测方法及文献资料^[19-21]制订,根据杂质限度和主成分理化性质,为保证方法专属性,将供试品溶液质量浓度降低至20 mg/mL,不仅减小了背景噪音,也大大降低了由样品量过大导致主成分在系统残留的风险,延长了灯丝和色谱柱的使用寿命。

N-亚硝胺类为极性化合物,VF-WAX_{ms}毛细管色谱柱(30 mm × 0.25 mm, 1.0 μm)适用于极性化合物,使各杂质在较短的时间内实现良好分离,且柱流失较低,具有较低的背景噪声,故确定使用此色谱柱进行后续研究。

3.2 质谱条件选择

质谱条件也参考2019年4月FDA公布的NDIPA, NDMA和NDEA检测方法^[19-21]制订,配制质量浓度为2 ng/mL的线性溶液,通过比较-40, 70 eV电子轰击离子源电压,响应值无明显差异,且70 eV为常用电子轰击离子源电压,因此采用70 eV。

配制质量浓度为2 ng/mL的线性溶液,对进样方式进行研究,结果显示,与一般直接进样相比,采用脉冲不分流,可减少不稳定待测物在进样口分解的机会,且样品集中进入色谱柱可提高检测的灵敏度。

3.3 样品测定结果分析

亚硝胺类杂质致癌风险高,FDA网站公布的NDIPA、NDMA、NDEA的临时每日可接受摄入量(AI)分别为26.5, 96, 26.5 ng/d^[22],根据替格瑞洛最大日剂量为180 mg,计算其限度(限度=AI/每日用量)分别为0.147, 0.533, 0.147 μg/g。检测多批次粗品及相对应批次成品,3种亚硝胺类杂质均未检出,表明此合成工艺对该类杂质清除效果较好。此外,由于在不同工艺步骤中分别使用能引入仲胺和亚硝化试剂的物料,产生亚硝胺类杂质的可能性本身极低,结合检测数据,质量控制风险较小。

综上所述,本试验中采用LC-MS/MS法测定替格瑞洛中*N*-亚硝胺类杂质,方法专属性强,灵敏度高,基质干扰小,适用于实验室中药物基因毒性杂质的日常检测。

参考文献

[1] MILLS AL, ALEXANDER M. *N*-Nitrosamine formation by cultures of several microorganisms [J]. Appl Environ Microbiol, 1976, 31(6): 892-895.
[2] ROUX JL, GALLARD H, CROUE J, et al. NDMA formation by chloramination of ranitidine: kinetics and mechanism [J]. Envi-

ron Sci Technol, 2012, 46(20): 11095-11103.

- [3] ICH. ICH M7 (R1) Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk [EB/OL]. (2017-05-31)[2021-10-12]. https://database.ich.org/sites/default/files/M7_R1_Guideline.pdf.
- [4] 国家食品药品监督管理总局. 世界卫生组织国际癌症研究机构致癌物清单[EB/OL]. (2017-10-30)[2021-10-12]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/mtbd/20171030163101383.html>.
- [5] 国家食品药品监督管理局药品审评中心. 化学药物中亚硝胺类杂质研究技术指导原则(试行)[EB/OL]. (2020-05-08)[2021-10-12]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/776b663787ec5a60ac744071c3714d5a>.
- [6] FDA. Combined Direct Injection *N*-Nitrosodimethylamine (NDMA), *N*-Nitrosodiethylamine (NDEA), *N*-Nitrosoethylisopropylamine (NEIPA), *N*-Nitrosodiisopropylamine (NDIPA), and *N*-Nitrosodibutylamine (NDBA) Impurity Assay by GC-MS/MS [EB/OL]. (2019-04-19)[2021-10-12]. <https://www.fda.gov/media/123409/download>.
- [7] FDA. Development and validation of a RapidFire-MS/MS method for screening of nitrosamine carcinogen impurities *N*-Nitrosodimethylamine (NDMA), *N*-Nitrosodiethylamine (NDEA), *N*-Nitrosoethylisopropylamine (NEIPA), *N*-Nitrosodiisopropylamine (NDIPA), *N*-Nitrosodibutylamine (NDBA) and *N*-Nitroso-*N*-methyl-4-aminobutyric acid (NMBA) in ARB drugs [EB/OL]. (2019-07-24)[2021-10-12]. <https://www.fda.gov/media/125477/download>.
- [8] FDA. Combined *N*-Nitrosodimethylamine (NDMA) and *N*-Nitrosodiethylamine (NDEA) Impurity Assay by GC/MS-Headspace [EB/OL]. (2019-01-28)[2021-10-12]. <https://www.fda.gov/media/117843/download>.
- [9] FDA. Combined Direct Injection *N*-Nitrosodimethylamine (NDMA) and *N*-Nitrosodiethylamine (NDEA) Impurity Assay by GC/MS [EB/OL]. (2018-12-11)[2021-10-12]. <https://www.fda.gov/media/117807/download>.
- [10] FDA. Combined Headspace *N*-Nitrosodimethylamine (NDMA), *N*-Nitrosodiethylamine (NDEA), *N*-Nitrosoethylisopropylamine (NEIPA), and *N*-Nitrosodiisopropylamine (NDIPA) Impurity Assay by GC-MS/MS [EB/OL]. (2019-04-29)[2021-10-12]. <https://www.fda.gov/media/124025/download>.
- [11] FDA. Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS) Method for the Determination of Six Nitrosamine Impurities in ARB Drugs [EB/OL]. (2019-05-21)[2021-10-12]. <https://www.fda.gov/media/125478/download>.
- [12] 韩勇,孔令洋,彭程,等. GC-MS/MS法测定缬沙坦氢氯噻嗪制剂中*N*-亚硝基二甲胺与*N*-亚硝基二甲胺[J]. 中国药师, 2021, 24(9): 1761-1764.