

安全监测

LC-Q-TOF-MS 法测定氯沙坦钾及其复方制剂中痕量杂质 *N*-亚硝基-*N*-甲基-4-氨基丁酸*

徐文峰, 金鹏飞**, 徐硕, 张闪闪, 吴学军

(北京医院药学部 国家老年医学中心, 药物临床风险与个体化应用评价北京市重点实验室, 北京 100730)

摘要 目的: 采用高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱(LC-Q-TOF-MS)建立氯沙坦钾及其复方制剂中基因毒性杂质 *N*-亚硝基-*N*-甲基-4-氨基丁酸(NMBA)的测定方法。方法: 采用 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×50 mm, 1.8 μm)进行分离, 流动相为 0.1% 甲酸水溶液-乙腈, 梯度洗脱, 流速 0.3 mL·min⁻¹; 质谱采用电喷雾离子源, 正离子模式下选择 [M+H]⁺ *m/z* 147.0764 对 NMBA 进行测定。结果: NMBA 在 5~100 ng·mL⁻¹ 浓度范围内线性良好, 相关系数为 0.995 6。定量下限(LOQ)为 2.1 ng·mL⁻¹, 精密度试验和重复性试验 RSD 均小于 10.0%。3 批药品中均未检出 NMBA。结论: 本方法可用于氯沙坦钾及其复方制剂中 NMBA 的测定。

关键词: 氯沙坦钾; 复方制剂; *N*-亚硝基-*N*-甲基-4-氨基丁酸; 基因毒性杂质; 高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱; 含量测定

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2019)11-2047-04

doi: 10.16155/j.0254-1793.2019.11.17

Determination of trace impurity NMBA in potassium losartan and its compound preparations by LC-Q-TOF-MS*

XU Wen-feng, JIN Peng-fei**, XU Shuo,
ZHANG Shan-shan, WU Xue-jun

(Department of Pharmacy, Beijing Hospital, National Center of Gerontology, Assessment of Clinical Drugs Risk and Individual Application Key Laboratory, Beijing 100730, China)

Abstract Objective: To determine the genotoxic impurity *N*-nitroso-*N*-methyl-4-amimobutyric acid (NMBA) in losartan potassium and its compound preparation by high performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (LC-Q-TOF-MS). **Methods:** The separation was carried out on an Agilent ZORBAX SB-C₁₈ column with the mobile phase consisting of 0.1% formic acid-water solution and acetonitrile. The flow rate

* 北京医院科技新星项目(BJ-2016-039); 国家自然科学基金项目(81803715)

** 通信作者 Tel:(010)85133620; E-mail: j790101@163.com

第一作者 Tel:(010)85133621; E-mail: xuwenfenghill@126.com

was $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ with gradient elution. Electronic spray ion (ESI) in positive ionization mode was performed and $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z$ 147.0764 was extracted for the determination. **Results:** The calibration curve of NMBA was in good linearity with a correlation coefficient of 0.995 6 in the range of $5\sim 100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$. The limit of quantification (LOQ) of NMBA was $2.1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, and RSDs of both precision and repeatability tests were less than 10.0%. NMBA was not detected in the three batches of samples. **Conclusion:** The method can be used to determine NMBA in potassium losartan and its compound preparations.

Keywords: potassium losartan; compound preparation; *N*-nitroso-*N*-methyl-4-aminobutyric acid (NMBA); genotoxic impurity; LC-Q-TOF-MS; determination

沙坦类药物即血管紧张素 II 受体拮抗剂 (angiotensin II receptor blocker, ARB) 类抗高血压药物, 可通过与血管紧张素 II 受体中的 AT1 受体特异性结合, 阻断血管紧张素 II 与 AT1 受体结合, 从而达到阻断动脉血管收缩, 抑制交感神经兴奋, 促进血压减低的作用^[1]。因作用机制新颖、疗效确切且副作用小, 沙坦类药物在高血压药物市场占据着重要地位, 具有广阔的开发前景^[2]。氯沙坦钾是首个 ARB 类药物, 1994 年率先在瑞典上市, 在全球范围内作为治疗高血压的一线药物而广泛应用^[1]。

美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 于当地时间 2019 年 3 月 1 日, 就其正在调查的多种通用 ARB 类药品的自愿召回事件发表公告。印度 Hetero Labs Ltd. 宣布召回 87 批氯沙坦钾片, 涉及 25 mg、50 mg 和 100 mg 3 种规格。此次召回的由 Hetero Labs 制造并由 Camber Pharmaceuticals 销售的氯沙坦钾片中含有杂质 *N*-亚硝基-*N*-甲基-4-氨基丁酸 (NMBA, 结构式如图 1 所示), NMBA 是已知的动物和潜在的人类致癌物质^[3]。此后, Torrent Pharmaceuticals、Vivimed Life Sciences Pvt Ltd、Teva Pharmaceuticals 等制药公司又相继自愿召回涉及氯沙坦钾的 200 余批药品, 其原因皆为 NMBA 含量超标^[4]。氯沙坦钾每日最高服用剂量为 100 mg, NMBA 每日最大阈值为 96 ng, 因此氯沙坦钾中 NMBA 的限度为 $0.96 \text{ ng} \cdot \text{mg}^{-1}$ ^[3]。液相色谱-质谱联用技术具有灵敏度高、分析速度快、结果准确可靠的特点, 能够满足痕量毒性杂质测定的要求^[5]。本文采用高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱 (LC-Q-TOF-MS) 建立氯沙坦钾及其复方制剂中 NMBA 的测定方法, 为其质量控制提供参考。

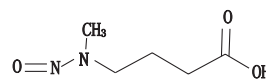


图 1 NMBA 结构式

Fig. 1 Structure of NMBA

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1290 Infinity II 高效液相色谱仪, 包括 G7120A 型二元泵, G7167B 型进样器, G7116B 型柱温箱, Agilent 6545 Q-TOF 质谱仪 (Agilent 公司); METTLER TOLEDO XP-205 电子天平 0.01 mg, (METTLER TOLEDO 公司); KQ-800KDE 超声仪 (中国昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

NMBA 对照品 (批号 10-KMT-18-2, 含量 100.0%, Toronto Research Chemicals); 乙腈 (色谱纯, 批号 177795), 甲酸 (色谱纯, 批号 168642) 均购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; 质谱所用调谐液、参比液均购自 Agilent 公司。氯沙坦钾片 (批号 R031531, 规格 100 mg)、氯沙坦钾片 (批号 S006544, 规格 50 mg) 和氯沙坦钾氢氯噻嗪片 (批号 R036047, 规格: 氯沙坦钾 50 mg/ 氢氯噻嗪 12.5 mg), 杭州默沙东制药有限公司。

2 方法与结果

2.1 色谱及质谱条件

2.1.1 色谱条件 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm); 柱温: 30 °C; 进样体积: 10 μL; 流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液, B 为乙腈; 梯度洗脱 (0~2.5 min, 95%A; 2.5~3 min, 95%A → 10%A; 3~8 min, 10%A; 8~8.5 min, 10%A → 95%A); 流速: $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

2.1.2 质谱条件 离子源: 电喷雾离子源 (ESI); 采集模式: 正离子模式; 扫描范围 m/z : 100~300。质谱

检测时间为 1~2.5 min。离子源参数:雾化气(N_2)压力:276 kPa;干燥器(N_2):温度 325 $^{\circ}C$,流速 7 mL \cdot min $^{-1}$;鞘气(N_2):温度 400 $^{\circ}C$,流速 12 mL \cdot min $^{-1}$;毛细管电压:4.0 kV;碎裂电压:75 V;锥孔电压:65 V。选择参比离子 m/z 121.050 9 实时校正。NMBA 的提取离子为 $[M+H]^+$ m/z 147.076 4,质量窗口为 10×10^{-6} 。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品储备液 精密称取 NMBA 对照品适量,用 0.1% 甲酸水溶液溶解,配制成每 1 mL 含 1 μ g NMBA 的对照品储备液。

2.2.2 供试品溶液 取供试品 10 片,精密称定,研细,精密称取粉末适量(约相当于氯沙坦钾 100 mg),置 10 mL 量瓶中,加 0.1% 甲酸水溶液适量,超声(频率 40 kHz,功率 800 W)提取 15 min,加 0.1% 甲酸水溶液定容至刻度,摇匀,取供试品溶液适量,13 000 r \cdot min $^{-1}$ 离心 5 min,上清液用 0.22 μ m 滤膜过滤,即得。

2.3 线性及灵敏度

精密量取“2.2.1”项下 NMBA 对照品储备液适量,用 0.1% 甲酸水溶液分别稀释成 5、10、25、50、100 ng \cdot mL $^{-1}$ 的 NMBA 对照品溶液。对上述溶液分别进样,记录色谱图,以浓度(X , ng \cdot mL $^{-1}$)为横坐标,峰面积 Y 为纵坐标进行线性回归。得线性方程:
 $Y=6\ 141.3X-1\ 654.2$ $r=0.995\ 6$

NMBA 在 5~100 ng \cdot mL $^{-1}$ 浓度范围内线性良好。将对照品溶液逐级稀释,在信噪比(S/N)约为 10.0 时测得定量下限为 2.1 ng \cdot mL $^{-1}$,在 S/N 约为 3.0 时测得检测下限为 1.0 ng \cdot mL $^{-1}$ (色谱图如图 2-C 所示)。

2.4 精密度试验

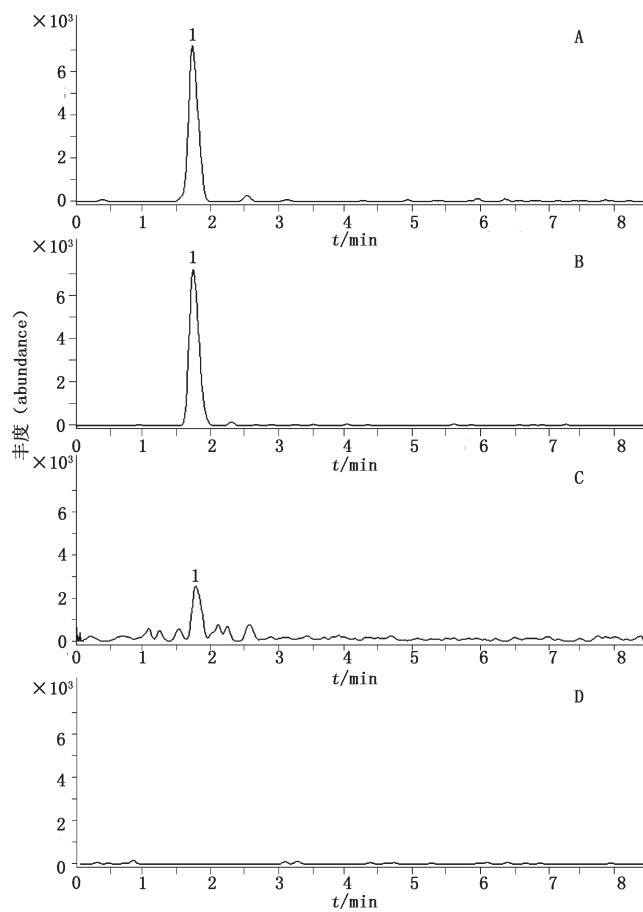
取“2.3”项下 10 ng \cdot mL $^{-1}$ 的对照品溶液连续进样 6 次(色谱图如图 2-A 所示),测得 NMBA 峰面积的 RSD($n=6$)为 6.4%,说明仪器精密度良好。

2.5 重复性试验

精密称取批号为 R031531 的样品粉末(约相当于氯沙坦钾 100 mg),置于 10 mL 量瓶中,精密加入“2.3”项下 100 ng \cdot mL $^{-1}$ 的对照品溶液 1 mL,按“2.2.2”项下方法操作,平行制备 6 份,进样分析,记录色谱图(如图 2-B 所示),NMBA 浓度的 RSD($n=6$)为 9.8%,表明方法的重复性良好。

2.6 回收率试验

精密称取批号为 R031531 的样品粉末(约相当于氯沙坦钾 100 mg,色谱图如图 2-A 所示)9 份,分



1. NMBA

图 2 NMBA 对照品溶液(A, 10.3 ng \cdot mL $^{-1}$)、重复性试验溶液(B)、检测下限溶液(C)和供试品溶液(D, R031531)提取离子流色谱图

Fig. 2 Extracted ion chromatograms of NMBA reference solution (A, 10.3 ng \cdot mL $^{-1}$), repeatability test solution (B), LOD solution (C) and test solution (D, R031531)

别置 10 mL 量瓶中,精密加入 NMBA 对照品溶液,按“2.2.2”项下方法操作,即得 NMBA 质量浓度分别为 5.15、51.5、103 ng \cdot mL $^{-1}$ 的供试溶液各 3 份,进样测定,计算平均回收率($n=9$)为 89.2%,RSD 为 4.4%。

2.7 稳定性试验

取 1 份重复性试验供试品溶液,分别在 0、1、2、4、8、12 h 进样测定,计算 NMBA 峰面积的 RSD($n=6$)为 7.6%,说明 NMBA 供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.8 样品测定

用所建立的方法对 3 批样品进行测定,3 批样品均未检出 NMBA。

3 讨论

基因毒性杂质是指能直接或间接损害 DNA,从而引起基因突变或致癌的物质^[6]。NMBA 因具有烷

基亚硝胺结构而具有基因毒性^[7]。基因毒性杂质的含量很低($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 或 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$),对其进行分析检测不仅要有较高的灵敏度,还要求较好的特异性^[8]。FDA目前已发布测定沙坦类药物中NMBA含量的RapidFire-MS/MS^[9]和LC-Q-Orbitrap-MS^[10]2种方法。本文采用LC-Q-TOF-MS建立氯沙坦钾及其复方制剂中NMBA的含量测定方法,对其质量控制方法进行扩充并提供参考。

3.1 色谱条件和质谱条件的优化

根据NMBA的结构特点,正离子采集模式和负离子采集模式皆可选用,经比较发现,正离子采集模式下NMBA的响应更好。实验进一步考察了0.1%甲酸水溶液-甲醇、0.1%甲酸水溶液-乙腈对NMBA响应的影响,发现0.1%甲酸水溶液-乙腈作为流动相NMBA的灵敏度更好。供试品溶液中氯沙坦钾($t_R=3.82\text{ min}$)的浓度高达 $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,经实验优化,质谱采集时间设定为1~2.5 min,氯沙坦钾经液相洗脱后可直接从废液管排出,以避免对质谱的污染。

3.2 提取溶剂优化

NMBA对照品采用甲醇、乙腈等有机溶剂溶解后,NMBA的质谱响应差,灵敏度受有机溶剂影响很大,所以实验采用水溶液作为对照品溶解及供试品提取溶剂;为了最大限度减少 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 和 $[\text{M}+\text{K}]^+$ 2种离子,增加 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 的灵敏度,经优化,最终选择0.1%甲酸水溶液作为提取溶剂。

3.3 方法的局限性

NMBA等亚硝胺类杂质是在原料药生产过程中,由特定的工艺步骤和化学反应形成的。制剂除原料药外还含有多种辅料,基质相对原料药复杂,故本文所建立方法对测定干扰相对较小的原料药及中间体同样适用。后续可使用该方法进一步对不同厂家原料药及制剂生产的整个过程进行控制,并追溯其产生的原因,以更好地控制氯沙坦钾等血管紧张素II受体拮抗剂类药物的质量。

参考文献

- [1] 蔡鹏俊,李悦.几种沙坦类药物的杂质谱研究现状[J].药物分析杂志,2016,36(3):377
CAI PJ, LI Y. Research progress of sartans' impurity profile [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2016, 36(3): 377
- [2] 郭拥政,孙晓群,陈程,等. HPLC法测定缬沙坦中的遗传毒性杂

志[J].中国药品标准,2016,17(5):337

GUO YZ, SUN XQ, CHEN C, *et al.* HPLC determination of genotoxic impurities in Valsartan [J]. *Drug Stand China*, 2016, 17(5): 337

- [3] FDA. FDA provides update on its ongoing investigation into ARB drug products; reports on finding of a new nitrosamine impurity in certain lots of losartan and product recall [EB/OL]. [2019-3-1] <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-provides-update-its-ongoing-investigation-arb-drug-products-reports-finding-new-nitrosamine>
- [4] FDA. FDA Updates and Press Announcements on Angiotensin II Receptor Blocker (ARB) Recalls (Valsartan, Losartan, and Irbesartan) [EB/OL]. [2019-6-12] <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-updates-and-press-announcements-angiotensin-ii-receptor-blocker-arb-recalls-valsartan-losartan>
- [5] 钱建钦,张云峰,王建,等. UHPLC-MS法测定2种硫酸氢氯吡格雷晶型中的基因毒性杂质对甲苯磺酰胺[J].药物分析杂志,2017,37(11):1994
QIAN JQ, ZHANG YF, WANG J, *et al.* Determination of genotoxic impurity methyl *p*-toluenesulfonate in two kinds of crystal forms of clopidogrel hydrogen sulfate [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2017, 37(11): 1994
- [6] 张霁,张英俊,聂飏. 药物研发中基因毒性杂质的控制策略与方法探索进展[J].中国医药工业杂志,2018,49(9):1203
ZHANG J, ZHANG YJ, NIE B. Advances in control strategies and methods for genotoxic impurities in drug research and development [J]. *Chin J Pharm*, 2018, 49(9): 1203
- [7] SNODIN DJ. Genotoxic impurities: from structural alerts to qualification [J]. *Org Process Res Dev*, 2010, 14(4): 960
- [8] 谢含仪,林云良,张瑞凌,等. 基因毒性杂质分析方法和前处理技术的研究进展[J].药物分析杂志,2018,38(10):1668
XIE HY, LIN YL, ZHANG RL, *et al.* Advances in analytical methods and pre-treatment techniques for genotoxic impurities [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2018, 38(10): 1668
- [9] FDA. Development and validation of a Rapid Fire-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]. [2019-06-02]. <https://www.fda.gov/media/125477/download>
- [10] FDA. Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) method for the determination of six nitrosamine impurities in ARB drugs [EB/OL]. [2019-06-02]. <https://www.fda.gov/media/125478/download>

(本文于2019年7月2日收到)