

应用纪要

使用Xevo G2-XS QToF上的ToF MRM开发定量分析N-亚硝胺的高灵敏度、高分辨率质谱方法

Lauren Mullin, Margaret Maziarz, Mary E. Lame, Nathan Anderson

Waters Corporation



摘要

N-亚硝胺具有潜在的致癌性，并普遍存在于各类人用商品和药品中，因此，对各种基质中的*N*-亚硝胺进行监测受到极大关注。这些杂质需要在亚ng/mL范围内进行高灵敏度、高选择性检测。以下方法使用高灵敏度、高选择性QToF采集模式，能够同时检测和定量六种得到广泛分析的*N*-亚硝胺（NDMA、NDEA、NMBA、NDBA、NEIPA和NDIPA），其含量等于或小于0.1 ng/mL。该采集模式称为ToF MRM，通过在四极杆中分离分析物母离子 m/z ，然后靶向增强信号，从而提高选择性。本文介绍了使用ToF MRM方法分析六种*N*-亚硝胺得到的UPLC色谱分离结果以及LLOD、LLOQ和线性。报告了该方法对NDMA和NDEA的定量性能，证明在1.25 ng/mL和12.5 ng/mL质量控制(QC)水平下可实现精密、准确且可重复的测量。此外，使用UNIFI科学信息系统进行数据采集和处理，提供了一套现代化平台用于对研究的*N*-亚硝胺进行符合GxP要求的HRMS分析。

优势

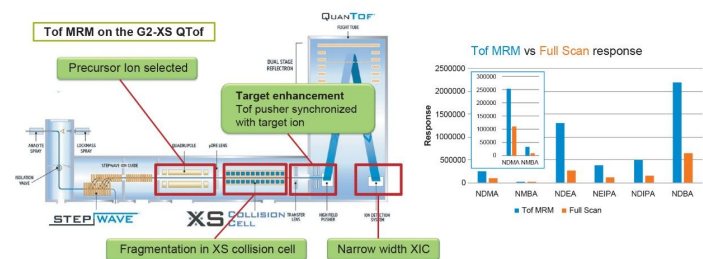
- 使用Xevo G2-XS QToF上的ToF MRM以高灵敏度、高选择性、高特异性检测和定量6种引人关注的*N*-亚硝胺
- 使用ACQUITY UPLC I-Class系统和HSS T3色谱柱实现稳定的色谱分离
- 借助UNIFI科学信息系统提供先进的信息学工具进行合规的仪器控制和数据管理

简介

N-亚硝胺属于小分子化合物，通常为硝酸盐和胺之间形成的反应产物¹。这些化合物是已知的潜在致癌物²，因此需要主动监测以减少人体暴露。这类物质存在于天然水系统²、烟草制品中²，并以杂质形式存在于药品中^{1,3,4}。2019年，在非处方药雷尼替丁中检出*N*-亚硝基二甲胺(NDMA)引起人们特别关注，该药物是一种组胺2受体阻滞剂，可用于治疗胃食管反流疾病和胃/肠溃疡⁵。此外，还发现NDMA、*N*-亚硝基二乙胺(NDEA)和*N*-亚硝基-*N*-甲基-4-氨基丁酸(NMBA)以杂质形式存在于血管紧张素II受体阻滞剂(ARB)药品（“沙坦”类药物）中，此类药品用于治疗心力衰竭和高血压⁴。研究人员怀疑在ARB药物中还可能存在其它三种*N*-亚硝胺，即*N*-亚硝基乙基异丙胺(NEIPA)、*N*-亚硝基二异丙胺(NDIPA)和*N*-亚硝基二丁胺(NDBA)⁴。

在相对较低的浓度下 (ng/mL级或更低) 主动监测这些有害化合物非常重要, 需要使用高灵敏度、高选择性分析方法。液相色谱质谱联用(LC-MS)技术已成功应用于对各种基质中的*N*-亚硝胺进行可靠的鉴定和定量^{1,2}。经验证, 使用靶向采集, 例如串联四极杆质谱仪上的多重反应监测(MRM)模式, 能够使*N*-亚硝胺的定量下限(LLOQ)达到或低于0.1 ng/mL^{6,7}。还研究了使用高分辨率质谱(HRMS)平台进行*N*-亚硝胺分析的方法^{4,8}, 并利用精确质量数测量获得了更高的特异性。

本文展示了使用Xevo G2-XS QToF上的ToF-MRM采集模式对六种*N*-亚硝胺 (NDMA、NDEA、NDIPA、NEIPA、NMBA和NDBA) 进行高灵敏度、高选择性检测的能力。该方法利用四极杆分离已知的前体分子, 然后靶向增强指定的母离子或子离子。与典型的全扫描MS相比, 这种组合提高了*N*-亚硝胺的选择性和灵敏度, 并利用HRMS固有的精确质量数测量额外增加了特异性优势。



Xevo G2-XS QToF上ToF MRM采集模式的示意图, 与传统的全扫描模式相比, 该模式可靶向提升*N*-亚硝胺分析物的响应。

结果与讨论

使用ACQUITY UPLC I-Class系统与配备Ion Sabre II APCI探头的Xevo G2-XS QToF质谱仪对NDMA、NMBA、NDEA、NDIPA、NEIPA和NDBA进行分析。使用UNIFI科学信息系统进行数据采集、处理和查看, 该系统是一套全面的信息学平台, 其中包含与GxP合规性有关的功能, 例如数据可追溯性和高级安全性⁹。使用之前所述的液相色谱方法⁶和ACQUITY UPLC HSS T3色谱柱 (部件号: 186003539), 实现了6种亚硝胺的分离 (如图1所示)。表1显示了该分析所用的LC-MS条件。确定保留时间和最佳离子传输设置后, 使用ToF MRM采集模式开发出靶向QToF方法。ToF MRM通过按时间分段选择指定的母离子质量数来操作, 在四极杆中将这母离子分离, 随后送至

碰撞室，在碰撞室中发生离子传输或碰撞诱导解离(CID)。之后通过Tof区域中的排斥极同步对用户指定的 m/z 值进行靶向信号增强¹⁰。再对所有离子进行精确质量数测量，并利用UNIFI软件生成指定 m/z 值下的提取离子流图。在本研究的 N -亚硝胺化合物中，对NDMA、NMBA、NDIPA、NEIPA和NDBA的母离子和选定子离子进行靶向增强。对于NDEA，由于信号强度高，因此仅对母离子进行靶向增强。图2显示了最终Tof MRM采集方法，在方法开发过程中通过实验确定了优化的碰撞能量。



图1.所有6种亚硝胺（浓度为10 ng/mL）的提取离子流图

LC system	ACQUITY UPLC I-Class (FTN)				
Column	ACQUITY UPLC HSS T3, 1.8 μ m, 2.1 $\times$ 100 mm				
Column temp.	40 $^{\circ}$ C				
Flow rate	0.4 mL/min				
Injection volume	30 μ L				
Mobile phase	A-5 mM ammonium formate and 0.1% formic acid in water				
	B-5 mM ammonium formate and 0.1% formic acid in methanol				
LC gradient	Time (min)	Flow rate (mL/min)	%A	%B	Curve
	Initial	0.400	98	2	Initial
	0.24	0.400	98	2	6
	4.00	0.400	5	95	6
	4.61	0.400	5	95	6
	5.00	0.400	98	2	6
	7.00	0.400	98	2	6
MS system	Xevo G2-XS QTof				
Ionization mode	APCI+				
Analyzer mode	Sensitivity				
Desolvation flow	1000 L/Hr				
Cone gas flow	50 L/Hr				
Source temp.	120 $^{\circ}$ C				
Corona current	2.1 μ A				
Cone voltage	2.0 V				
Probe temp.	200 $^{\circ}$ C				
Lock mass	Leucine Enkephalin (278.1135; 556.2766 m/z)				
Data management	UNIFI Scientific Information System 1.9.4				

表1.N-亚硝胺分析所用的LC-MS条件

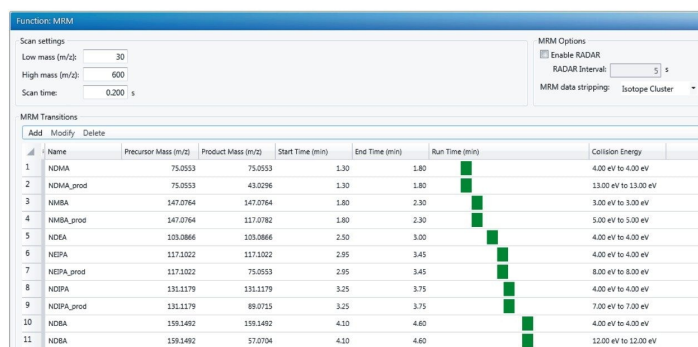


图2.6种N-亚硝胺分析所用的最终Tof MRM方法。在MRM data stripping（MRM数据分条）方法中选择“Isotope Cluster”（同位素簇），采集5 Da区域内的数据。

使用两个稀释系列（浓度范围为0.01~100 ng/mL），在每个点重复进样三次（共进样6次），评估所开发方法的定量性能。表2列出了所得的检测下限和定量下限（LLOD/LLOQ）、线性范围和 R^2 值，表明该方法对本文所研究的6种N-亚硝胺具有亚ng/mL级检测能力。两个QC水平（1.25 ng/mL和12.5 ng/mL）下NDMA和NDEA的更多测量结果见图3。从图中可以看出，这两种化合物在两个水平下均得到了准确、精密的测量。计算5次重复进样的平均浓度，两种化合物的平均浓度均在实际浓度的15%以内（图3a和3b）。此外，根据计算出的浓度可知，两个QC水平下NDMA和NDEA的%RSD均小于7%。这些数据表明，使用开发的UPLC-Tof MRM MS方法能够对这两种引人关注的N-亚硝胺进行可靠的定量分析。

N-nitrosamine	RT (min)	LLOD (ng/mL)	LLOQ (ng/mL)	Linear range (ng/mL)	R ²	Weighting
NDMA	1.65	0.10	0.50	0.5–100	>0.99	None
NMBA	2.10	0.25	0.50	0.5–100		
NDEA	2.72	0.025	0.05	0.05–25		
NEIPA	3.14	0.05	0.10	0.1–100		
NDIPA	3.50	0.05	0.10	0.1–100		1/x
NDBA	4.27	0.05	0.10	0.1–25		None

表2.6种N-亚硝胺的检测下限/定量下限(LLOD/LLOQ)、线性范围、 R^2 和权重。LLOD/LLOQ分别基于S/N为3和10确定。

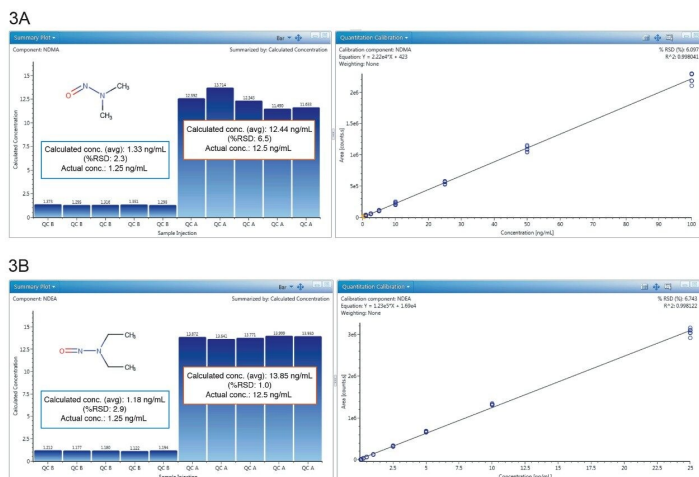


图3A.在QC水平A（加标浓度12.5 ng/mL）和B（加标浓度1.25 ng/mL）以及校准曲线(0.1~100 ng/mL)下计算出的NDMA浓度（平均准确度）汇总图

图3B.在QC水平A（加标浓度12.5 ng/mL）和B（加标浓度1.25 ng/mL）以及校准曲线(0.025~25 ng/mL)下计算出的NDEA浓度（平均准确度）汇总图

结论

潜在致癌物N-亚硝胺的分析方法需要具有足够高的灵敏度才能准确测量亚ng/mL级浓度。本研究证明，使用Xevo G2-XS QToF MS上的ToF MRM与UPLC色谱分离相结合，能够使NDMA、NDEA、NMBA、NMBA、NDIPA、NEIPA和NDBA的LLOQ水平达到或低于0.5 ng/mL。还证明该方法能够在两个QC水平下对低至ng/mL级的NDMA和NDEA进行可靠、准确的定量测量（偏差在15%以内）。总而言之，ACQUITY UPLC系统与Xevo G2-XS QToF质谱仪和UNIFI科学信息系统联用，为N-亚硝胺的定量分析提供了一种符合GxP要求、高灵敏度、高选择性、高特异性的现代化HRMS平台。

参考文献

1. Parr MK and Joseph JF. NDMA Impurity In Valsartan and other Pharmaceutical

Products: Analytical Methods for the Determination of *N*-nitrosamines.*JPBA* 2018;164(2019):536–549.

2. Gushargi AJ and Halden RU. Critical Review of Major Sources of Human Exposure to *N*-nitrosamines.*Chemosphere* 2018;210:1124–1136.
3. Sörgel F *et al.* The Contamination of Valsartan and Other Sartans, Part 1: New Findings.*JPBA* 2019;172(2019):395-405.
4. US Food and Drug Administration. Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS) Method for the Determination of Six Nitrosamine Impurities in ARB Drugs. 21 May 2019.
5. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-requests-removal-all-ranitidine-products-zantac-market> <<https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-requests-removal-all-ranitidine-products-zantac-market>> . Accessed 19 June 2020.
6. Trudeau-Lame M, 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 720006899en. 2020 June. <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006899en.pdf> <<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006899en.pdf>>
7. Hatch L *et al.* Highly Sensitivity and Robust UPLC-MS/MS Quantification of Nitrosamine Impurities in Sartan and Ranitidine Drug Substances. Waters Application Note 720006751en. 2020 Jan. <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006751en.pdf> <<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006751en.pdf>>
8. Sherf-Clavel O *et al.* The Contamination of Valsartan and other Sartans, Part 2: Untargeted Screening Reveals Contamination with Amides Additionally to Known Nitrosamine Impurities.*JPBA* 2019;172(2019):278-284.
9. 沃特世公司. UNIFI科学信息系统在协助保障电子记录合规性方面的作用. 沃特世公司

白皮书 720006139ZH.2018年6月.

<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006139en.pdf> <
<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006139en.pdf>>

10. Tomczyk N *et al.* Targeted High Resolution Quantification with ToF-MRM and HD-MRM. Waters Application Note 720004728en. 2013 June.
<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720004728EN.pdf> <
<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720004728EN.pdf>>

特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

Xevo G2-XS QToF四极杆飞行时间质谱仪 <<https://www.waters.com/134798222>>

UNIFI科学信息系统 <<https://www.waters.com/134801648>>

720006951ZH, 2020年7月



© 2025 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私策略](#) [商标](#) [招聘](#) [法律和隐私声明](#) [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