

使用安捷伦 GC/TQ 和氢气作载气定量分析沙坦类药物中的亚硝酸杂质



作者

Soma Dasgupta,
Vivek Dhyani,
Anastasia Andrianova,
Joel Ferrer
安捷伦科技有限公司

摘要

为应对氦气短缺问题，实验室正在探索用于气质联用 (GC/MS) 分析的替代载气。本应用简报将 Agilent 8890 气相色谱系统与配备高效离子源 (HES) 的 **Agilent 7010 系列三重四极杆 (TQ) GC/MS 系统** 联用，或与配备 **Agilent HydroInert 离子源** 的 **Agilent 7000E 三重四极杆 GC/MS** 联用，证明了氢气作为载气用于分析某些沙坦类药物中的八种亚硝酸杂质的适用性，并与氦气进行了比较。使用氢气作为载气分析 8 种亚硝酸杂质，其 NIST 检索匹配分数在 79 到 97。在 0.3–50 ng/mL 的浓度范围内获得了出色的校准线性， $R^2 > 0.99$ 。当浓度为 0.03 ppm 的时候，满足信噪比 (S/N) 为 10 的要求。OpenLab ECM XT 与 MassHunter 采集软件 13.0 的集成简化了数据管理，为分析人员提供了对仪器所生成的数据的集中访问，可促进协作、保持数据可靠性并优化工作流程。

前言

多年来，氦气供应一直是一个问题，这导致对以包括氢气在内的其它可用气体作为载气的关注显著上升。虽然氢气是一种高效的 GC 载气，但了解其与分析物的反应性对于获得准确的结果至关重要。与氦气相比，氢气具有一些优势，包括分析速度更快且色谱分离度更出色。然而，氢气也面临一些挑战，例如可能导致灵敏度降低以及氢气与样品分析物发生反应所引起的谱图变化。这些反应会改变总离子流色谱图 (TIC) 中峰的质谱图，可能导致化合物鉴定出错。从氦气换用为氢气作为载气是一项重大变化，需要仔细规划和执行。“[EI GC/MS 仪器载气由氦气转换为氢气的指南^{\[1\]}](#)”提供了详细说明来帮助实现载气转换。另外，安捷伦推出的 [HydroInert 离子源](#)能够保留谱图保真度，即使活性化合物在氢气存在的情况下也是如此。目前以氢气作为载气已经在各种应用当中获得成功，包括挥发性有机化合物^[2]、多环芳烃 (PAHs)^[3,4] 以及 EPA TO-15 中列出的目标化合物^[5] 的分析。

除这些热门应用以外，另一项重要应用是药品中亚硝胺杂质的分析。氦气作为载气被广泛应用于分析药品中的亚硝胺杂质。亚硝胺在某些条件下可能与氢气发生反应，转化为不需要的胺或肼。因此，使用氢气作为载气时确定谱图质量不受影响非常重要。本应用简报评估了以氢气作为载气，分别使用 HES 和 HydroInert 离子源分析以下八种亚硝胺杂质的结果：亚硝基二甲胺 (NDMA)、N-亚硝基甲基乙胺 (NMEA)、N-亚硝基二乙胺 (NDEA)、N-亚硝基-乙基异丙胺 (NEIPA)、N-亚硝基二异丙胺 (NDIPA)、N-亚硝基二丙胺 (NDPA)、N-亚硝基二正丁胺 (NDBA) 和 N-亚硝基哌啶 (NPIP)。对检测结果从谱图质量、线性、重复性、回收率以及关于药品中亚硝胺分析的现行法规的合规性方面进行了评估。

实验部分

所检测的活性药物成分 (APIs) 和药品包括缬沙坦、厄贝沙坦、氯沙坦和奥美沙坦。准确称取 500 mg 原料药，置于一次性 15 mL 玻璃离心管中，并使用移液管加入 5 mL 内标溶液 (约 50 ng/mL NDMA-d₆ 的二氯甲烷溶液)。将样品涡旋 1 min，然后放入离心机中，以 4000 rpm 离心 5 min。未溶解的原料药沉降在底部。使用一次性移液器，将约 2 mL 二氯甲烷层通过 0.45 μm 尼龙过滤器过滤，然后转移至 GC 样品瓶中待分析。

标样配制

稀释标准品储备液，以获得 0.3–50 ng/mL 范围内的校准溶液，并且使用含有作为内标的 NDMA-d₆ 的二氯甲烷进行配制。

仪器和分析

将配备 Agilent 7693A 自动液体进样器 (ALS) 的 8890 气相色谱系统与配备 HES 的 7010 系列 GC/TQ 和配备 HydroInert 离子源的 7000E GC/TQ 联用进行分析。采用 Agilent J&W VF-WAXms 气相色谱毛细管柱 (60 m × 0.25 mm, 0.25 μm) (部件号 CP9207) 进行分离。或者，可以使用包含两根 Agilent J&W VF-WAXms 气相色谱毛细管柱 (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm) (部件号 CP9205) 的柱中反吹配置应用相同的参数，流量分别为 1 mL/min 和 1.2 mL/min。还对反吹装置进行了评估。表 1 和表 2 分别提供了 GC 和 MS 参数。

GC/TQ 在动态多反应监测 (dMRM) 模式下运行。利用 GC/TQ 的 Agilent MassHunter Optimizer 软件优化所有九种杂质的 MRM 离子对，并将其用于数据采集 (表 3)。

表 1. 气相色谱参数

参数	值
气相色谱系统	Agilent 8890 气相色谱系统
MMI 进样模式	脉冲不分流: 15 psi 持续 0.5 min
进样口温度	250 °C
进样口衬管	超高惰性不分流单锥衬管, 带玻璃毛 (部件号 5190-2293)
柱温箱升温程序	40 °C (1.5 min) 以 20 °C/min 升至 200 °C (0 min) 以 60 °C/min 升至 250 °C (3 min)
总运行时间	13.33 min
MS 传输线温度	250 °C
进样量	2 µL
气相色谱柱	VF-WAXms 色谱柱 氦气: 30 m × 0.25 mm, 0.25 µm (部件号 CP9205) 氦气: 60 m × 0.25 mm, 0.25 µm (部件号 CP9207), 以及使用两根 30 m × 0.25 mm, 0.25 µm 色谱柱进行柱中反吹
载气	氦气 1 mL/min (用于 HES 和 HydroInert 离子源) 或 氦气 1.2 mL/min (用于 HES)

表 2. 质谱参数

参数	值
质谱系统	配备 HES 的 Agilent 7010 系列 GC/TQ 和 配备 HydroInert (HI) 离子源的 Agilent 7000E GC/TQ
模式	电子轰击电离, 70 eV (在 HES 和 HI 离子源上均如此)
离子源温度	250 °C
四极杆温度	Q1 和 Q2 = 150 °C
MS1 和 MS2 分辨率	所有化合物 unit
碰撞气体流量	氮气, 1.5 mL/min
淬灭气体流量	使用氦气作为载气时, 氮气流量为 2.25 mL/min; 使用氦气作为载气时关闭

软件和数据可靠性

采用 Agilent MassHunter Workstation (包括用于 GC/MS 的 MassHunter 采集软件 13.0 和 MassHunter 定量分析软件 12.1) 进行数据采集和分析。OpenLab 电子内容管理系统 (ECM) XT 配置提供了各种功能来确保符合各个国家/地区和欧盟电子记录法规的要求。自动化工具和过程能够创建具有相关权限的用户、生成审计追踪并支持远程数据存储, 以尽可能降低数据泄露或丢失的风险。OpenLab ECM XT 与 MassHunter 应用程序配合使用, 提供了一种灵活的数据管理解决方案, 能够单点访问由仪器、数据系统和实验室软件生成的数据。通过访问存储位置的数据, 分析人员可以在不损害数据可靠性的情况下进行协作, 并且能够为工作流程创建一致的流程。

表 3. 定量/定性离子对 (基于 dMRM)

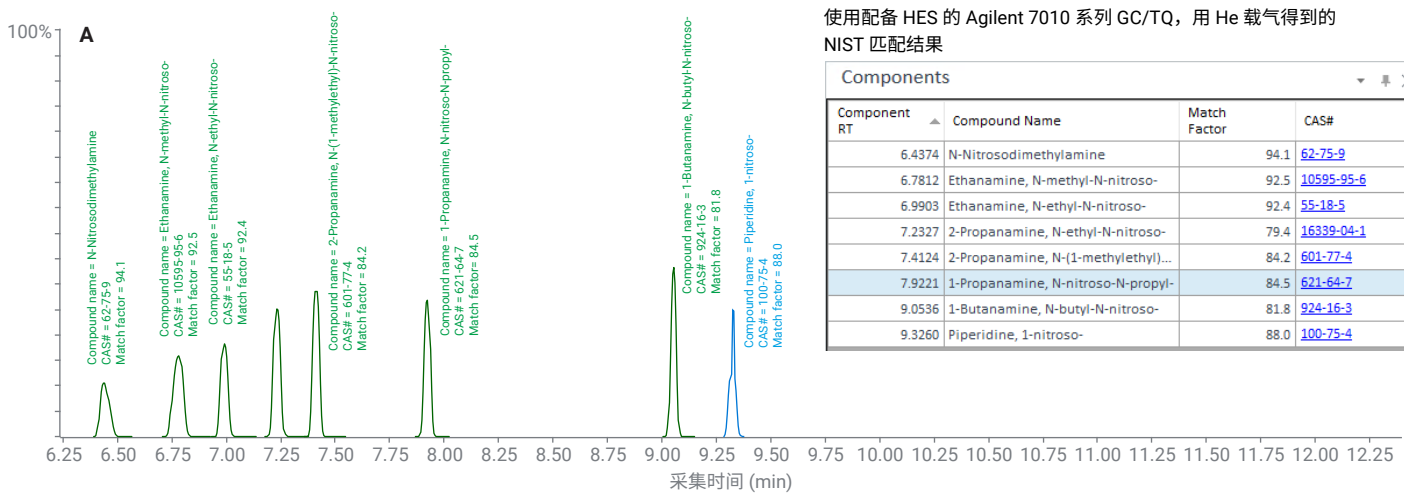
化合物	保留时间 (min)	MRM 离子对	CE
NDMA-D ₆	8.437	80 → 50	5
NDMA	8.448	74 → 44.1	6
		74 → 42.1	24
		43.1 → 42.1	10
NMEA	8.767	87.9 → 71	4
		87.9 → 42.1	24
		43.1 → 42.1	10
NDEA	8.969	101.9 → 85.1	4
		101.9 → 56	20
		101.9 → 44.1	14
NEIPA	9.198	115.9 → 99	6
		115.9 → 44	16
		71 → 56	6
NDIPA	9.366	130 → 88	6
		130 → 71	16
		130 → 42.1	12
NDPA	9.832	130 → 113.1	2
		101 → 70	2
		70 → 43.1	6
NDBA	10.796	158 → 141.1	4
		158 → 99.1	10
		116 → 99.1	4
		84 → 56	22
NPIP	11.088	113.9 → 97.1	8
		113.9 → 84.1	8
		113.9 → 55	26
		113.9 → 42.1	24

结果与讨论

谱图匹配质量

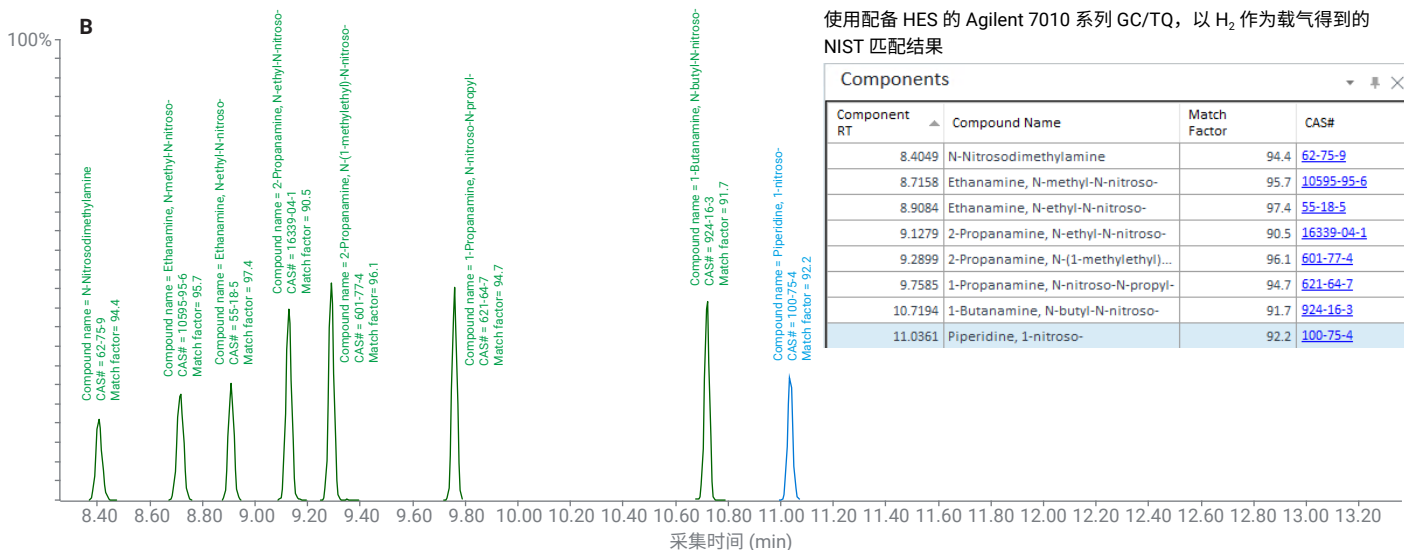
使用氦气或氢气作为载气采集所有八种分析物的全扫描谱图, 然后与 NIST 谱库进行比较。如图 1 所示, 使用氦气作为载气与 7010 系列 GC/TQ-HES 系统获得了出色的匹配得分 (> 90)。当使用氦气作为载气与 7000E GC/TQ-HydroInert 离子源配置时, 获得了良好的匹配得分 (> 80)。使用 HES 获得了更高的平均匹配得分可归因于更高的灵敏度所带来的更高的响应。

保持质谱图的完整性使氦气和氢气作载气方法能够使用相同的 MRM 离子对 (表 3)。



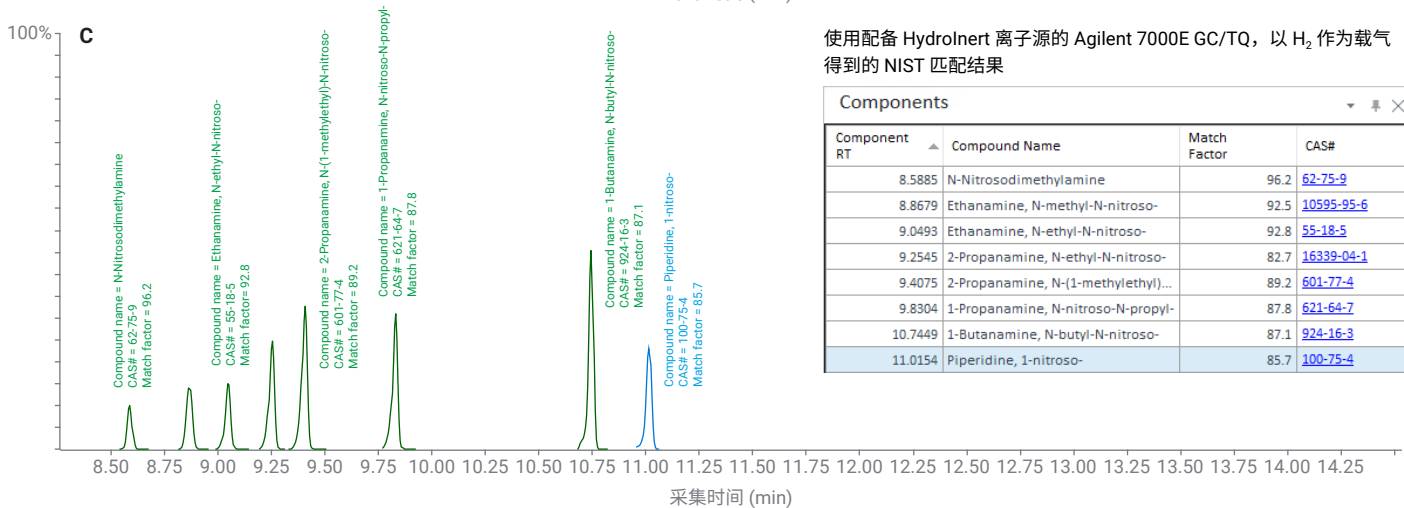
使用配备 HES 的 Agilent 7010 系列 GC/TQ, 用 He 载气得到的 NIST 匹配结果

Component RT	Compound Name	Match Factor	CAS#
6.4374	N-Nitrosodimethylamine	94.1	62-75-9
6.7812	Ethanamine, N-methyl-N-nitroso-	92.5	10595-95-6
6.9903	Ethanamine, N-ethyl-N-nitroso-	92.4	55-18-5
7.2327	2-Propanamine, N-ethyl-N-nitroso-	79.4	16339-04-1
7.4124	2-Propanamine, N-(1-methylethyl)...	84.2	601-77-4
7.9221	1-Propanamine, N-nitroso-N-propyl-	84.5	621-64-7
9.0536	1-Butanamine, N-butyl-N-nitroso-	81.8	924-16-3
9.3260	Piperidine, 1-nitroso-	88.0	100-75-4



使用配备 HES 的 Agilent 7010 系列 GC/TQ, 以 H₂ 作为载气得到的 NIST 匹配结果

Component RT	Compound Name	Match Factor	CAS#
8.4049	N-Nitrosodimethylamine	94.4	62-75-9
8.7158	Ethanamine, N-methyl-N-nitroso-	95.7	10595-95-6
8.9084	Ethanamine, N-ethyl-N-nitroso-	97.4	55-18-5
9.1279	2-Propanamine, N-ethyl-N-nitroso-	90.5	16339-04-1
9.2899	2-Propanamine, N-(1-methylethyl)...	96.1	601-77-4
9.7585	1-Propanamine, N-nitroso-N-propyl-	94.7	621-64-7
10.7194	1-Butanamine, N-butyl-N-nitroso-	91.7	924-16-3
11.0361	Piperidine, 1-nitroso-	92.2	100-75-4



使用配备 Hydrolnert 离子源的 Agilent 7000E GC/TQ, 以 H₂ 作为载气得到的 NIST 匹配结果

Component RT	Compound Name	Match Factor	CAS#
8.5885	N-Nitrosodimethylamine	96.2	62-75-9
8.8679	Ethanamine, N-methyl-N-nitroso-	92.5	10595-95-6
9.0493	Ethanamine, N-ethyl-N-nitroso-	92.8	55-18-5
9.2545	2-Propanamine, N-ethyl-N-nitroso-	82.7	16339-04-1
9.4075	2-Propanamine, N-(1-methylethyl)...	89.2	601-77-4
9.8304	1-Propanamine, N-nitroso-N-propyl-	87.8	621-64-7
10.7449	1-Butanamine, N-butyl-N-nitroso-	87.1	924-16-3
11.0154	Piperidine, 1-nitroso-	85.7	100-75-4

图 1. 使用氦气作载气与 HES (A)、氢气作载气与 HES (B) 以及氢气作载气与 Hydrolnert 离子源 (C) 对八种亚硝胺杂质的分离结果。插图显示了所采集的全扫描质谱图的相关 NIST 匹配得分

线性

在 0.3–50 ng/mL 的范围内，八种杂质显示出了良好的校准性能，其 $R^2 > 0.99$ (表 4)。最低校准水平是指定性离子比率恰好符合离子比率标准的浓度。当使用氢气作为载气时，使用 7010 系列 GC/TQ-HES 和 7000E GC/TQ-HydroInert 离子源配置均达到了 3 ng/mL 或更低的检出限。

定量限

根据最新的监管指令^[6,7]，定量限 (LOQ) 不得超过所测定的特定亚硝酸杂质规定的可接受限值。当使用单一分析方法评估各种亚硝酸时，必须验证该方法在 LOQ 水平下对各种亚硝酸的选择性。制药行业对原料药和药品的普遍要求是使用 LOQ 等于或低于 0.03 ppm 的方法。

样品前处理会导致 10 倍稀释 (用 5 mL 二氯甲烷萃取 500 mg)。在回收率研究中，加标浓度为 30 ppb (0.03 ppm) 的原料药得到的提取物中各亚硝酸杂质的浓度为 3 ng/mL。此浓度符合各亚硝酸杂质的典型 LOQ 要求 (30 ppb)。

使用 7010 系列 GC/TQ，在六个月的时间内，载气在氮气和氢气之间切换，并对其中三次载气切换的结果进行了比较。图 2 显示，观察到一致的谱图保真度、校准响应、离子比和灵敏度。谱图保真度在测量时间范围内不受影响，并且所有分析物均获得了高谱库匹配得分 (> 90)。更换载气后仍能保持谱图保真度并获得一致的校准响应、离子比和灵敏度，证明了该方法在实际应用中的适用性。

表 4. 针对不同载气和离子源的校准浓度水平

化合物	校准范围 (ng/mL)			最低校准水平下定量离子对的美国药典 (USP) S/N		
	Agilent 7010 系列 GC/TQ, 使用氮气作为载气	Agilent 7010 系列 GC/TQ, 使用 H ₂ 作为载气	配备 HydroInert 离子源的 Agilent 7000E GC/TQ	Agilent 7010 系列 GC/TQ, 使用氮气作为载气	Agilent 7010 系列 GC/TQ, 使用 H ₂ 作为载气	配备 HydroInert 离子源的 Agilent 7000E GC/TQ
NDMA	0.1–50	0.5–50	3–50	> 12	> 10	> 10
NMEA	0.2–50	0.3–50	1–50	> 200	> 12	> 40
NDEA	0.05–50	0.5–50	1–50	> 20	> 10	> 100
NEIPA	0.05–50	1–50	3–50	> 50	> 80	> 90
NDIPA	0.05–50	0.5–50	1–50	> 80	> 10	> 60
NDPA	0.1–50	0.3–50	3–50	> 100	> 10	> 10
NDBA	0.1–50	1–50	3–50	> 60	> 10	> 20
NPIP	0.1–50	1.25–50	3–50	> 60	> 10	> 10

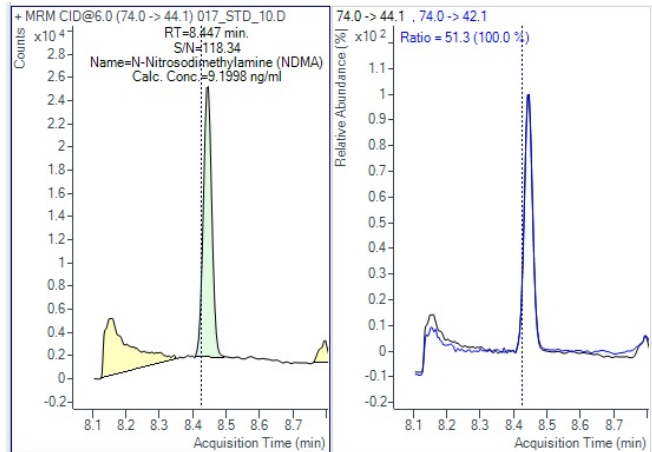
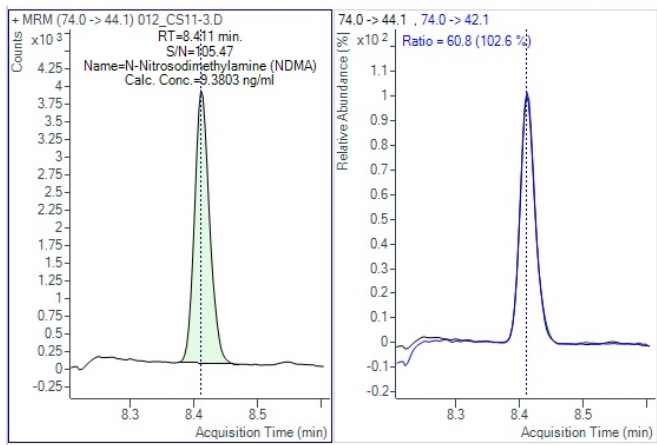
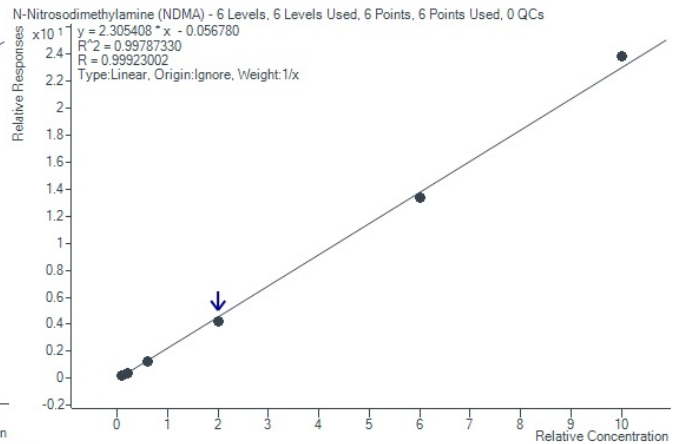
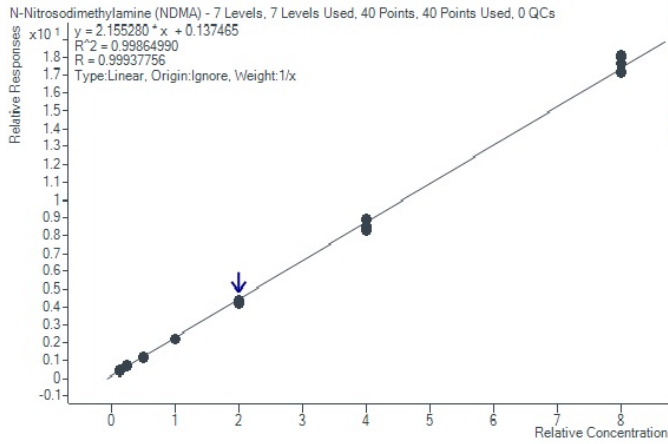
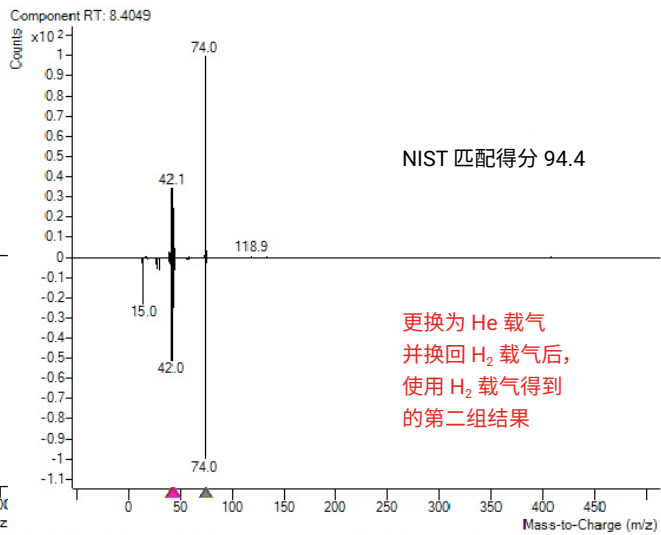
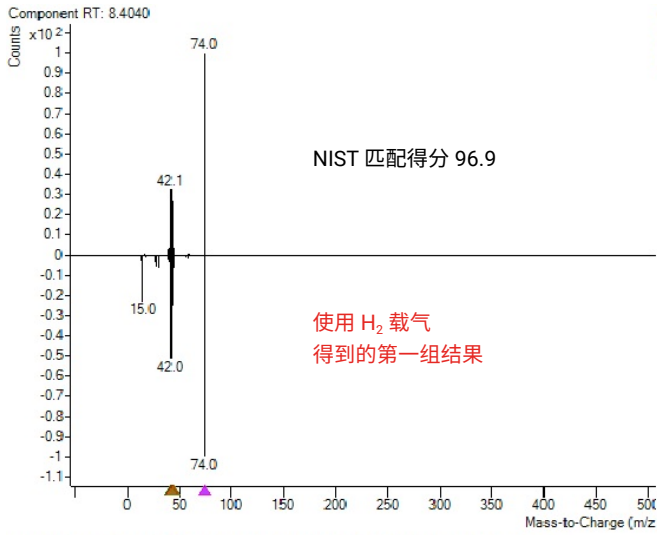


图 2. 使用 Agilent 7010 系列 GC/TQ, 在使用氦气之前和之后, 使用氢气作为载气获得了一致的谱库匹配得分、校准和离子比

稳定性

先前使用氦气作为载气考察了 150 次连续进样的结果稳定性 (如 5994-4618EN^[6] 中所述)。在本研究中, 对使用氢气作为载气进行了相同的评估 (图 3)。所有分析物的 RSDs (以绝对峰面积来计算) 均小于 10%, 且计算浓度的 RSDs (经内标校正后) 小于 7%。这表明响应具有长期稳定性, 且该方法适用于常规分析。

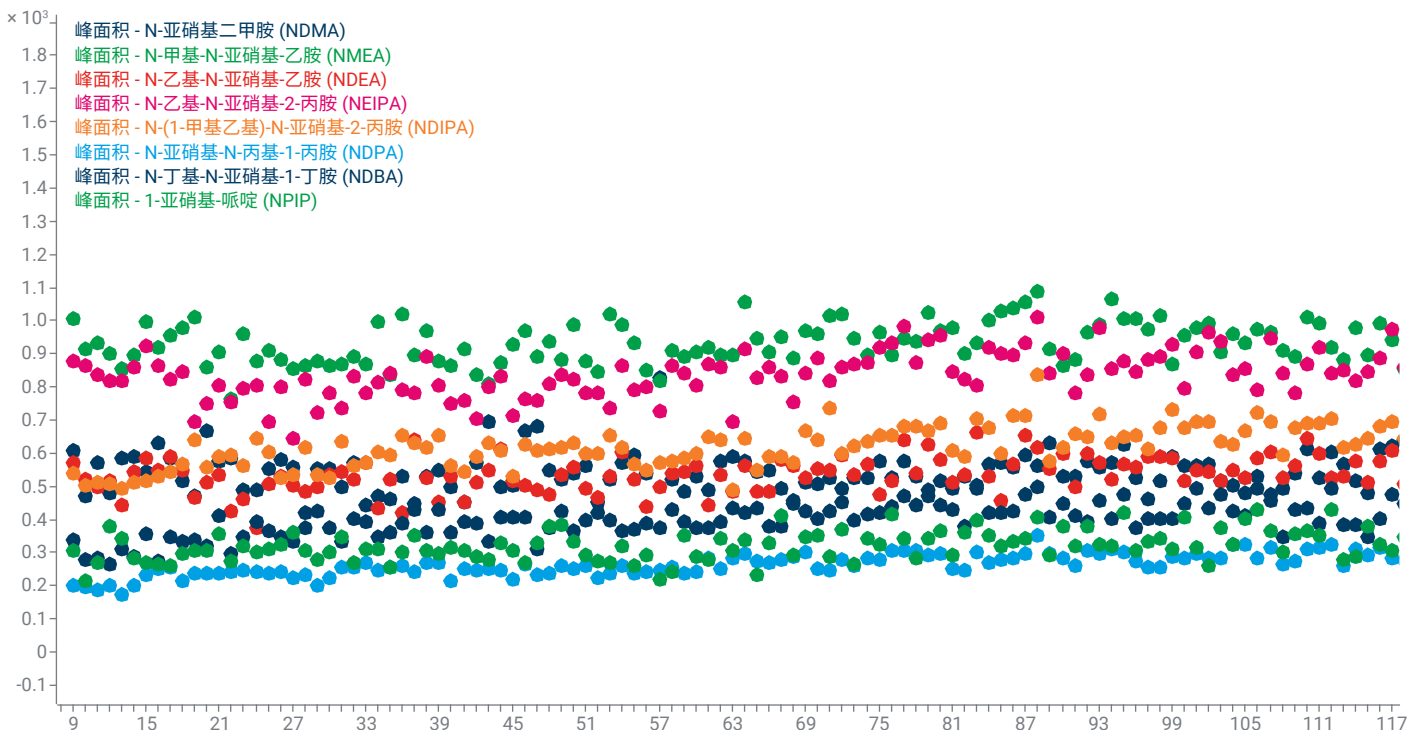


图 3. 30 ppb (相对于原料药) 浓度下亚硝胺杂质回收率样品的峰面积趋势 (使用配备 Hydrolnert 离子源的 Agilent 7000E GC/TQ)。使用 Agilent MassHunter 定量分析软件中的度量图功能作图

柱中反吹

稀释倍数为 10 时，分析系统中引入了相当大量的原料药基质。这可能导致 RT 偏移和峰响应逐渐降低。为了克服这一问题，可以使用柱中反吹功能。在此配置中，在两根相同的

30 m 色谱柱 (0.25 mm × 0.25 μm) 之间安装吹扫 Ultimate 接头 (PUU)。当使用柱中反吹配置时，获得了一致的结果 (包括 RTs 和峰面积)。图 4 为在 25、50 和 100 次连续样品运行后获得的 RTs 和峰面积的示例。

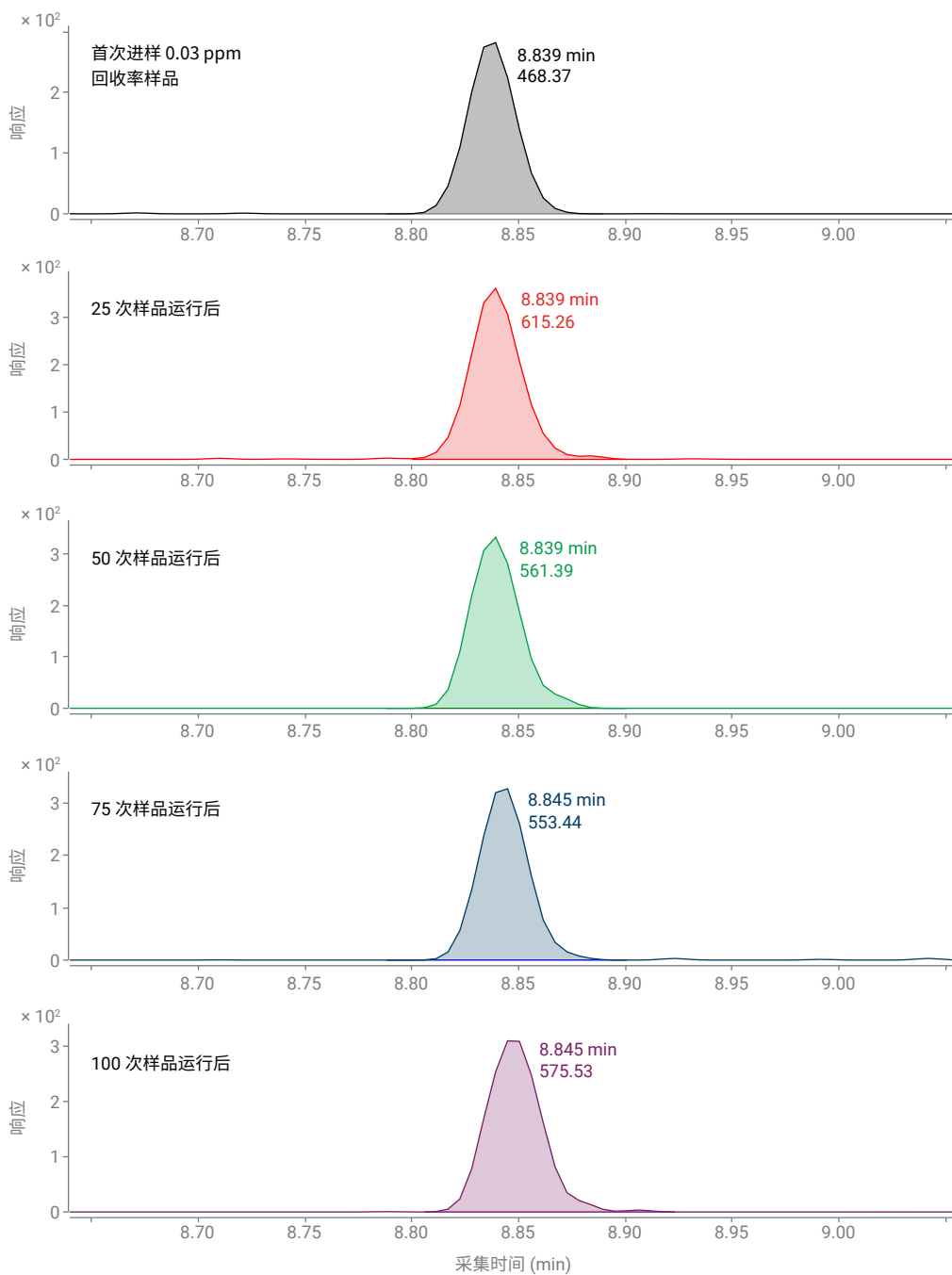


图 4. 当使用柱中反吹设置时，在连续 25 次、50 次和 100 次样品运行后获得了一致的保留时间 (RTs) 和峰面积

回收率

通过将原料药缬沙坦、厄贝沙坦、氯沙坦和奥美沙坦以 0.03 ppm 的浓度加标，计算样品回收率。在 HES 和 HydroInert 离子源配置中使用氢气作为载气时，回收率均符合要求，范围为 80%–120%。

结论

在 Agilent 8890 气相色谱系统与 Agilent 7010 系列 GC/TQ (HES) 或 Agilent 7000E GC/TQ (HydroInert 离子源) 联用系统上使用氢气作为载气时，在沙坦类药品和原料药的八种亚硝胺药物杂质的测定中表现出优异的性能。在 0.03 ppm 下对性能进行了验证，获得了可接受的回收率和长期重复性。配备 HydroInert 离子源的 7000E GC/TQ 和配备 HES 离子源的 7010 系列 GC/TQ 均有助于系统获得所需的检出限。OpenLab ECM XT 与 MassHunter 采集软件 13.0 的集成简化了数据管理，为分析人员提供了对仪器所生成的数据的集中访问，可促进协作、保持数据可靠性并优化工作流程。

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

DE18669787

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2024
2024 年 5 月 16 日, 中国出版
5994-7438ZHCN

参考文献

1. Agilent EI GC/MS Instrument Helium to Hydrogen Carrier Gas Conversion (安捷伦 EI GC/MS 仪器载气由氮气转换为氢气的用户指南), *安捷伦科技公司用户指南*, 出版号 5994-2312EN, **2020**
2. Quimby, B. D.; Andrianova, A. A. 使用氢气载气和 HydroInert 离子源通过顶空 GC/MSD 分析饮用水中的挥发性有机化合物, *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5994-4963ZHCN, **2022**
3. Quimby, B. D.; Haddad, S.; Andrianova, A. A. 使用配备氢气载气和 Agilent HydroInert 离子源的 GC/MS 进行 PAHs 分析, *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5994-5711ZHCN, **2023**
4. Haddad, S.; Quimby, B. D.; Andrianova, A. A. 用氢气载气对 PAHs 进行 GC/MS/MS 分析: 在挑战性的土壤基质中使用 Agilent HydroInert 离子源, *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5994-5776ZHCN, **2023**
5. Miles, L. 等, 使用氢气载气和 Agilent HydroInert 离子源进行 EPA TO-15 分析, *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5994-5359ZHCN, **2022**
6. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research. Control of Nitrosamine Impurities in Human Drugs: Guidance for Industry. February **2021**. <https://www.fda.gov/media/141720/download>
7. European Medicines Agency. Questions and Answers for Marketing Authorization Holders/Applicants on the CHMP Opinion for the Article 5(3) of Regulation (EC) No 726/2004 Referral on Nitrosamine Impurities in Human Medicinal Products. 15 January **2024**. https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/nitrosamines-emea-h-a53-1490-questions-answers-marketing-authorisation-holders/applicants-chmp-opinion-article-53-regulation-ec-no-726/2004-referral-nitrosamine-impurities-human-medicinal-products_en.pdf
8. Dasgupta, S.; Dhyani, V.; Churley, M. Quantification of Nine Nitrosamine impurities in Sartan Drugs Using an Agilent GC-TQ (使用安捷伦 GC-TQ 定量分析沙坦类药物中的 9 种亚硝胺杂质), *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5994-4618EN, **2022**