

## 基于 LC-MS/MS 法对 *N*-亚硝基二乙胺检测中的未知峰调查及排除策略

蔡虹<sup>1</sup>, 谢鹤<sup>1</sup>, 李晓玲<sup>2</sup>, 赵诗怡<sup>1</sup>, 荆冰江<sup>3</sup>, 金建阳<sup>1</sup>, 陈文斌<sup>1</sup>, 叶坚<sup>1</sup>, 李敏<sup>1</sup>, 林金生<sup>1\*</sup>

(1. 浙江华海药业股份有限公司高等分析技术中心, 临海 317024; 2. 浙江华海药业股份有限公司制剂分厂分析检测中心, 临海 317024; 3. 浙江华海药业股份有限公司综合管理部, 临海 317024)

**摘要 目的:** 采用检测厄贝沙坦中 *N*-亚硝基二乙胺 (NDEA) 的高分辨 LC-Q TOF MS 法对未知峰 [相对保留时间 (RRT) 为 0.95] 进行调查, 确定该未知峰结构及产生来源, 制定出相应的分析方法优化策略。**方法:** 采用 LC-Q TOF MS 全扫描的方法对该未知峰进行质谱全扫描, 确定出未知峰的结构式, 比较该未知峰与 NDEA 一级质谱及二级质谱的差异, 并参照 LC-MS/MS 方法对待测组分的定量离子选择, 阐述 NDEA 检测中该未知峰出现的原因, 制定相应的分析方法优化策略。**结果:** 根据 LC-Q TOF MS 分析结果, 推测该未知峰为 1-戊酰胺, 这是沙坦原料药样品中含有的微量常规杂质, 并通过与 1-戊酰胺对照品比对进行最终确认。由于 1-戊酰胺摩尔相对分子质量比 NDEA 少 1, 因此, 在 ESI 正离子模式下, 1-戊酰胺氢离子加合离子  $[M+H]^+ + 1$  的同位素峰  $m/z$  与 NDEA  $[M+H]^+$  离子  $m/z$  相同, 即 103, 并且与 NDEA 类似, 1-戊酰胺氢离子加合离子  $[M+H]^+ + 1$  同位素峰在 MRM 模式下也能裂解 1 个乙烯中性分子, 产生  $m/z$  75 同位素离子, 导致当选择  $m/z$  103 作为母离子,  $m/z$  75 为定量离子时, 1-戊酰胺会对 NDEA 的检测产生干扰。**结论:** 在沙坦类药物 NDEA LC-MS/MS 检测中 RRT 0.95 的未知峰为 1-戊酰胺, 是沙坦类药物生产过程中产生的常规微量工艺杂质, 而不是另外的亚硝胺杂质; 在后续的研究中, 将采用特征选择性更强的  $m/z$  47 定量离子模式, 可以避免该未知峰产生。

**关键词:** 沙坦类药物; *N*-亚硝基二乙胺 (NDEA); 液相色谱质谱联用; 未知峰; 调查; 同位素; 干扰; MRM 模式; 1-戊酰胺

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793 (2025) 02-0265-10

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024-0383

## Investigation and exclusion strategy of an unknown peak in *N*-nitrosodiethylamine detection of irbesartan by LC-MS/MS

CAI Hong<sup>1</sup>, XIE He<sup>1</sup>, LI Xiao-ling<sup>2</sup>, ZHAO Shi-yi<sup>1</sup>, JING Bing-jiang<sup>3</sup>, JIN Jian-yang<sup>1</sup>,  
CHEN Wen-bin<sup>1</sup>, YE Jian<sup>1</sup>, LI Min<sup>1</sup>, LIN Jin-sheng<sup>1\*</sup>

(1. Center of Excellence for Modern Analytical Technologies (CEMAT), Zhejiang Huahai Pharmaceuticals Co., Ltd., Linhai 317024, China;

2. Analytical and Testing Center, Formulation Plant, Zhejiang Huahai Pharmaceuticals Co., Ltd., Linhai 317024, China;

3. General Management Department, Zhejiang Huahai Pharmaceuticals Co., Ltd., Linhai 317024, China)

**Abstract Objective:** To investigate an unknown peak at relative retention time (RRT) 0.95 of *N*-nitrosodiethylamine

\* 通信作者 Tel: (0576) 85016339; E-mail: linkingson@163.com

第一作者 Tel: (0576) 85016339; E-mail: caihong@huahai pharm.com

(NDEA) of irbesartan API with the LC-MS/MS detection method. To elucidate the structure and origin of this unknown peak. Its structure was confirmed with a reference compound, and a method optimization strategy was proposed to eliminate the impact of this unknown peak. **Methods:** The unknown peak causing interference in the determination of NDEA within sartan drug substances was examined using a full scan method of LC-MS/MS analysis. The unknown peak at RRT 0.95 was validated by conducting high resolution LC-MS analyses and comparing with that of a reference sample. Additionally, a strategy for resolving this issue was proposed in the further investigation. **Results:** According to the LC-Q TOF MS results, the unknown peak at RRT 0.95 was confirmed to be 1-pentanamide, a trace regular impurity commonly existing in the sartan samples. As the extract mass of 1-pentanamide was 1 less than that of NDEA, the  $m/z$  value of an isotope in 1-pentanamide ( $[M+H]^+ + 1$ ) was 103 and was equal to the  $m/z$  value of the main  $[M+H]^+$  isotope of NDEA under the MRM mode. Furthermore, the  $[M+H]^+ + 1$  isotope ion of 1-pentanamide could occur a neutral lose by leaving a molecule of ethylene to generate the isotope ion of  $m/z$  75, which was similar to NDEA in the MRM analysis under ESI positive mode. Therefore, when  $m/z$  103 was used as the precursor ion and  $m/z$  75 was used as the quantitative ion, 1-pentanamide will interfere with detection of NDEA. **Conclusion:** In the LC-MS/MS analysis for NDEA, the unknown peak observed at a retention time of 0.95 has been identified as 1-pentanamide. This compound is confirmed as a common trace impurity that regularly occurs during the production of sartan active pharmaceutical ingredients (APIs), rather than being another nitrosamine impurity. Subsequent research has revealed that employing a more selective quantitative model and choosing  $m/z$  47 as the quantifier ion effectively avoid the unknown peak caused by 1-pentanamide.

**Keywords:** sartan drugs; *N*-nitrosodiethylamine (NDEA); LC-MS/MS; unknown peak; investigation; isotope; interference; MRM mode; 1-pentanamide

近年来,随着人民生活水平的不断提高和老龄化加剧,高血压成为危害人类健康的常见疾病之一<sup>[1-2]</sup>。目前已上市的抗高血压药物有很多种类,包含利尿剂、 $\beta$ 受体拮抗剂、钙通道阻滞剂(CCB)、血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)、血管紧张素受体拮抗剂(ARB)等<sup>[3-10]</sup>。

沙坦类药物作为最重要的一类血管紧张素受体拮抗剂,其活性成分(active pharmaceutical ingredient, API)结构中普遍含有联苯四氮唑基团,其代表性药物主要有缬沙坦、氯沙坦钾、厄贝沙坦、坎地沙坦酯等。考虑到成本、环保以及可工业化生产的因素,在沙坦类药物的API生产过程中,联苯四氮唑基团的构建通常采用4'-溴甲基联苯-2-腈和叠氮钠作为共同起始原料。这一过程通常包括缩合、四氮唑化、盐化和结晶等工艺步骤,最终得到成品沙坦类药物<sup>[11-16]</sup>。

对厄贝沙坦的工艺进行研究后发现,厄贝沙坦的最后一步化学合成工艺使用了叠氮钠,由于叠氮钠在后处理工序中会转化成有毒、挥发性的叠氮酸,因此,在沙坦类产品的后处理工艺中,一般采用亚硝酸钠在酸性条件下淬灭残留叠氮化物的方式<sup>[17-19]</sup>。但是,由于在上

四氮唑反应中使用三乙胺盐酸盐,其中的三乙胺在高温条件下可能降解产生微量的二乙胺,在沙坦类产品的后处理工序中,可能会进一步与工艺中残留的微量亚硝化试剂反应产生*N*-亚硝基二乙胺(NDEA)。

自从2018年6月发现在缬沙坦API中含有微量的*N*-亚硝基二甲胺(NDMA)杂质后,亚硝胺类杂质的控制策略制定及分析方法开发成了各国药品监管当局及各个医药公司关注的重点<sup>[20-24]</sup>。根据ICH-M7指南,亚硝胺杂质被列为高度警惕的关注队列杂质(cohort of concern),其PDE值或AI值一般低于常规基因毒性杂质( $1.5 \mu\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$ ),特别是对于低分子量的烷基亚硝胺杂质<sup>[25]</sup>。对于低分子量的烷基亚硝胺杂质,比如NDMA、NDEA、*N*-亚硝基二异丙胺(NDIPA)、*N*-亚硝基乙基异丙胺(NEIPA)、*N*-亚硝基二丁胺(NDBA)等,其在药品中限度分别为96、26.5、26.5、26.5及 $26.5 \text{ ng} \cdot \text{d}^{-1}$ ,一般需要采用顶空GC-MS、GC-MS/MS、高分辨LC-MS或LC-MS/MS等方法开发及检测<sup>[26-30]</sup>。参考EMA 2018年10月公布的NDEA检测方法<sup>[31]</sup>,开发了LC-MS/MS方法并对厄贝沙坦、缬沙坦及氯沙坦钾中NDEA进行检测。

在使用开发好的 LC-APCI MS/MS 方法对厄贝沙坦、缬沙坦及氯沙坦钾中 NDEA 进行检测时发现,这些沙坦样品中 NDEA 含量均小于  $30 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ ,但对厄贝沙坦样品的 NDEA 杂质检测方法进行开发及排查时发现,在相对于 NDEA 的相对保留时间(RRT)为 0.95 的位置出现了 1 个明显的未知峰,此未知峰的出现对产品的安全性确认造成很大困扰,因此,急需对其进行调查,鉴定其是否也属于亚硝酸胺杂质,并根据其结构和来源讨论相应的处置措施。

## 1 仪器与试剂

TQS Micro 高效液相色谱联用三重四极杆质谱仪(Waters 公司), Agilent 1260/G6470B 高效液相色谱联用三重四极杆质谱仪(Agilent 公司), Agilent 1260/6545 高效液相色谱联用四极杆-飞行时间高分辨质谱仪(Agilent 公司), XPE205 十万分之一电子天平(梅特勒-托勒多公司), Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> (100 mm × 3.0 mm, 1.7 μm) 色谱柱、Cortecs C<sub>18</sub> (100 mm × 4.6 mm, 2.7 μm) 色谱柱(Waters 公司)。

厄贝沙坦(批号 Irb-19-001, 浙江华海药业股份有限公司); 甲醇、甲酸、磷酸(色谱纯, Sigma 公司), 乙腈(色谱纯, Merck 试剂公司), 纯化水(Thermo Scientific 纯水仪, 华海自制)。

## 2 方法

### 2.1 LC-QQQ MS/MS 分析

**2.1.1 色谱条件** 采用 Waters Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> (100 mm × 3.0 mm, 1.7 μm) 色谱柱, 以 0.1% 甲酸水溶液(A)-甲醇(B)为流动相, 梯度洗脱(0~3 min, 5%B; 3~8 min, 5%B → 60%B; 8~9 min, 60%B → 95%B; 9~12 min, 95%B; 12~12.1 min, 95%B → 5%B; 12.1~16 min, 5%B), 流速  $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 柱温  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , 进样量  $20 \text{ } \mu\text{L}$ 。

**2.1.2 质谱条件** 采用 APCI 离子源, 正离子模式, MRM 质谱扫描模式, 电晕针电流  $7 \text{ } \mu\text{A}$ , 锥孔电压  $36 \text{ V}$ , 脱溶剂流速  $800 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ , 探头温度  $550 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , 碰撞能量 10/12 eV, 采集时间 2~8 min, 目标母离子  $m/z$  103, 定量离子  $m/z$  75, 停留时间 0.025 s。

### 2.2 LC-Q TOF MS/MS 分析

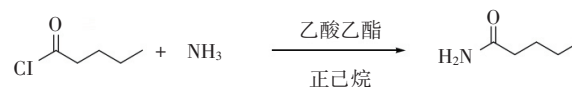
**2.2.1 色谱条件** 采用 Cortecs C<sub>18</sub> (100 mm × 4.6 mm, 2.7 μm) 色谱柱, 流动相及梯度洗脱程序同“2.1.1”项下, 流速  $1.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 柱温  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , 进样量  $50 \text{ } \mu\text{L}$ 。

**2.2.2 质谱条件** 采用 APCI 离子源, 正离子模式, 质谱全扫描模式, 电晕针电流  $7 \text{ } \mu\text{A}$ , 干燥气体流速

$6 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ , 干燥气体温度  $350 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , 蒸发室温度  $500 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , 雾化气体压力  $241 \text{ kPa}$ , 毛细管电压  $3 \text{ } 500 \text{ V}$ , 碎片电压  $70 \text{ V}$ , MS<sup>1</sup> 扫描带宽为  $\sim 4 \text{ amu}$ , MS<sup>1</sup> 扫描范围  $m/z$  50~200, 碰撞能量  $30 \text{ eV}$ , MS<sup>2</sup> 扫描范围  $m/z$  30~200, 目标二级质谱  $m/z$  102.09、103.08。

## 2.3 1-戊酰胺的合成

**2.3.1 反应式** 1-戊酰胺按照下式反应而成:



**2.3.2 1-戊酰胺对照品的制备** 取戊酰氯 1 mL, 加入 10 mL 乙酸乙酯中, 再加入氨水 2 mL, 室温下搅拌反应 30 min,  $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$  旋转蒸发仪中蒸除乙酸乙酯, 分别用正己烷约 5 mL 洗涤固体 3 次,  $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$  真空烘干 12 h, 即得。

## 2.4 溶液配制

**2.4.1 稀释液** 甲酸-甲醇-水(1:100:900), 也作为空白溶液。

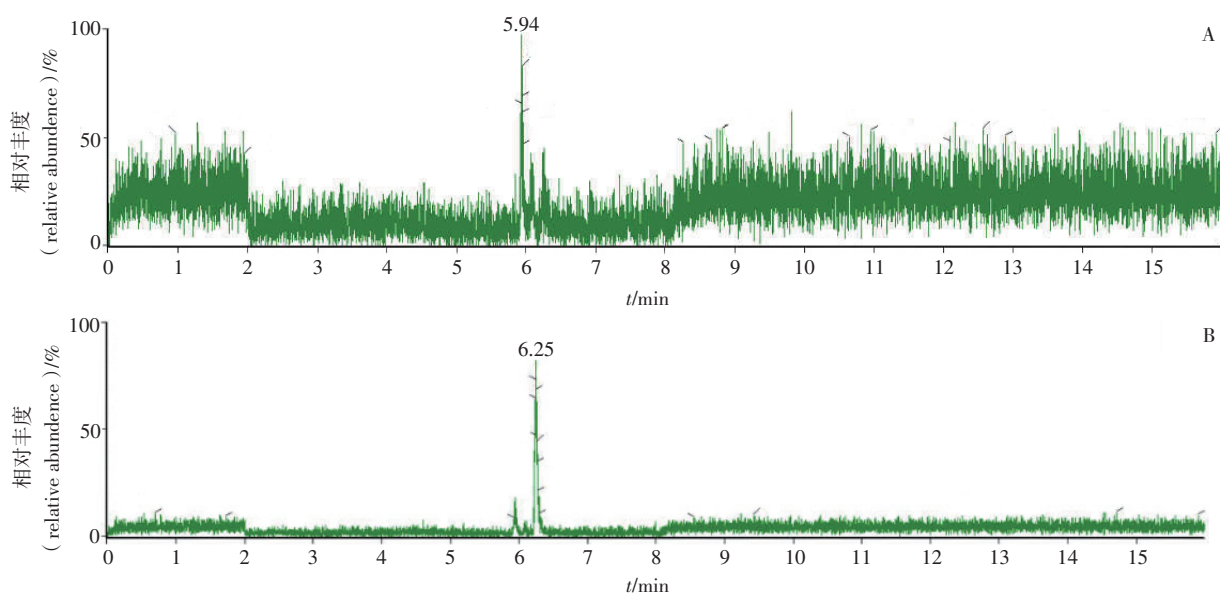
**2.4.2  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钠溶液** 精密称取氢氧化钠 4 g 于 100 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 即得。

**2.4.3 厄贝沙坦溶液** 精密称取厄贝沙坦 30 mg, 置于 5 mL 离心管中, 加入  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钠溶液  $300 \text{ } \mu\text{L}$  涡旋溶解, 加入稀释液 1.700 mL, 混匀, 得质量浓度为  $15 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的厄贝沙坦溶液。

## 3 结果和讨论

### 3.1 厄贝沙坦产品中 NDEA 检测 RRT 0.95 未知峰定位

采用 UPLC-APCI MS/MS 技术对厄贝沙坦中的 NDEA 杂质进行了分析方法的开发与检测。在 MRM 下(具体参数见“2.1”项下, 其中母离子设置为  $m/z$  103, 定量离子设置为  $m/z$  75), 对厄贝沙坦样品及其 NDEA 加标样品中的 NDEA 含量进行测定。发现厄贝沙坦加标  $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  NDEA 的样品除了在 6.25 min 的 NDEA 出峰位置有色谱峰出现外, 在 5.94 min 出现了 1 个未知峰(RRT 0.95, 以下均称为 RRT 0.95 未知峰)。厄贝沙坦样品虽然在 6.25 min 处没有出现色谱峰, 但在 5.94 min 处也出现了未知峰(厄贝沙坦样品及厄贝沙坦加标  $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  NDEA 的样品 LC-MS/MS 谱图见图 1), 按 NDEA 外标对照品溶液的质谱响应进行换算, 其含量将超过  $100 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ , 已经对 NDEA 的检测造成干扰, 因此需调查此杂质结构, 判断其是否也为另外 1 种亚硝酸胺杂质。



A. 厄贝沙坦 (irbesartan) B. 加标  $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  NDEA 对照品的厄贝沙坦 (irbesartan spiked with  $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  of NDEA)

图1 LC-MS/MS MRM 模式 (母离子  $m/z$  103, 定量离子  $m/z$  75) 下的色谱图

Fig. 1 Chromatograms under LC-MS/MS MRM mode (parent ion  $m/z$  103, quantification ion  $m/z$  75)

### 3.2 RRT 0.95 未知峰质谱解析

采用高分辨的液相色谱-四极杆飞行时间质谱仪 (LC-Q TOF MS 仪) 对待测厄贝沙坦溶液及 NDEA 对照品溶液进行分析 (总离子流图见图 2)。用 LC-Q TOF MS 仪提取 NDEA 对照品溶液中 10.4 min 色谱峰质谱信号时, 发现其  $[\text{M}+\text{H}]^+$  质谱信号为  $m/z$  103.087 6 (见图 3-A), 精确分子式匹配结果为  $[\text{C}_4\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}+\text{H}]^+$ , 匹配误差为 4.85, 与 NDEA 分子式

一致, 说明 10.4 min 色谱峰为 NDEA。提取厄贝沙坦样品溶液中 NDEA RRT 0.95 出峰位置, 也即在 9.6~9.9 min 出峰位置的质谱信号, 发现其  $[\text{M}+\text{H}]^+$  质谱信号为  $m/z$  102.092 1 (见图 3-B), 同时可以观察到其  $\text{M}+1$  同位素信号  $m/z$  103.095 9, 与 NDEA 一级质谱母离子在 LC-MS/MS 检测的低分辨条件下无法区分开; 同时, 在 ESI 离子源检测模式下, 二者刚好又有相同的质谱裂解规律, 即可能对 NDEA 的检测造成干扰。

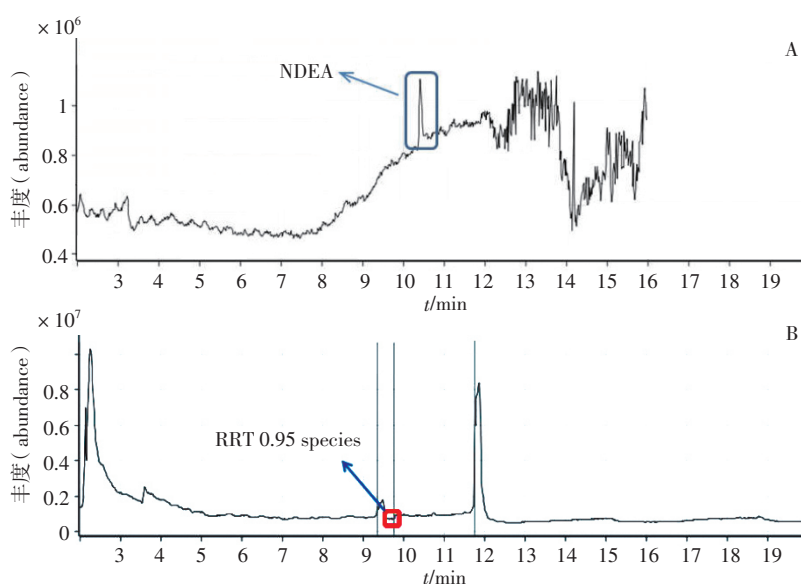


图2 NDEA 对照品溶液 (A) 与厄贝沙坦样品 (批号 Irb-19-001) 溶液 (B) 总离子流色谱图

Fig. 2 TIC chromatograms of the reference solution of NDEA (A) and the irbesartan sample (B), Lot No. Irb-19-001

对  $m/z$  102.092 1 离子进行分子式匹配, 匹配结果为  $[(C_5H_{11}NO)+H]^+$ , 匹配误差为 1.96, 与 NDEA 分子式相比, 多了 1 个碳原子及 1 个氢原子, 少了 1 个氮原子, 分子式不饱和度为 1, 通过查阅 Reaxys 及

SciFinder 数据库, 发现能与此  $C_5H_{11}NO$  分子式匹配的化合物达 600 多个, 因此, 还需要通过其他方式来获得 RRT 0.95 未知峰的结构信息。

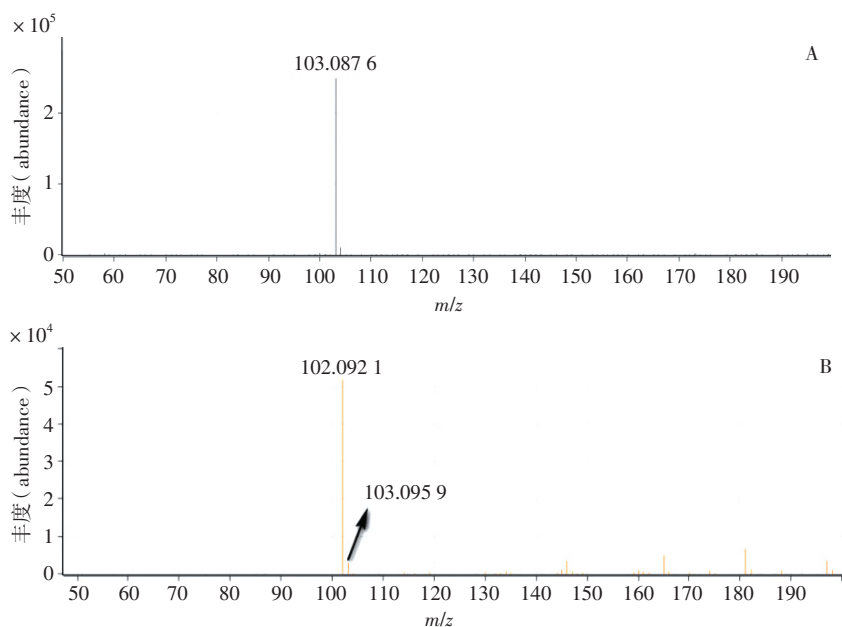


图 3 NDEA 对照品溶液中 10.4 min 组分 (A) 及 RRT 0.95 未知峰 (B) 的高分辨质谱图

Fig. 3 High resolution MS spectra of the component at 10.4 min (A) and the unknown peak at RRT 0.95 (B) in the NDEA reference solution

### 3.3 RRT 0.95 未知峰结构解析

为解析该杂质结构, 对厄贝沙坦 API 的合成路线进行了分析 (合成简图见图 4)。在厄贝沙坦中间体环合物盐酸盐的合成过程中, 使用到了戊酰氯; 同

时在上一步的合成工序中, 使用到了氨水。戊酰氯与氨作用即可产生 1-戊酰胺, 而 1-戊酰胺的分子式即为  $C_5H_{11}NO$ , 因此, 初步推测目标杂质可能为 1-戊酰胺。1-戊酰胺的可能产生路径见图 5。

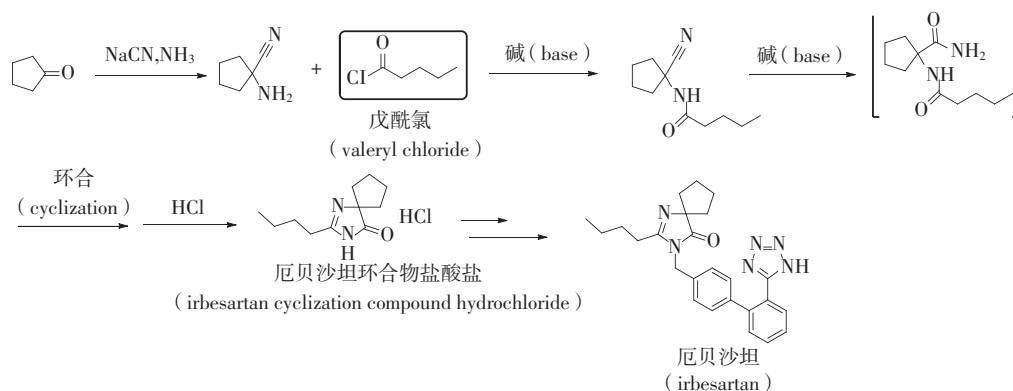


图 4 厄贝沙坦合成路线图

Fig. 4 Synthetic route for irbesartan

### 3.4 RRT 0.95 未知峰确认及其在 LC-MS/MS 中出峰时间定位

在前面的研究中, 分析了厄贝沙坦的合成工艺,

推测目标杂质可能为 1-戊酰胺。为进一步确认, 采用戊酰氯与氨水反应的方法合成了 1-戊酰胺对照品 (合成方法见“2.3”项下), 并用核磁共振证明目标

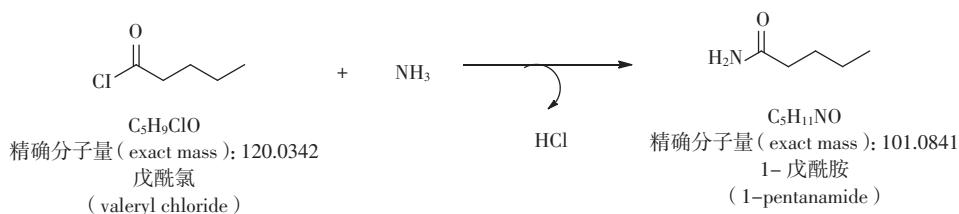
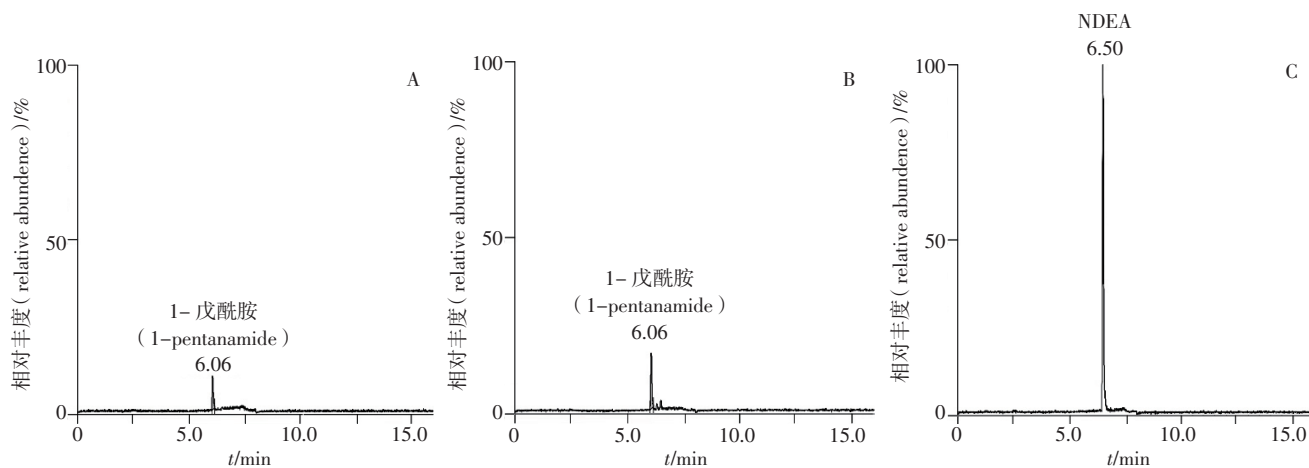


图5 1-戊酰胺产生路径分析

Fig. 5 Proposed formation mechanism of 1-pentanamide

杂质结构的准确性。用得到的 1-戊酰胺对照品、厄贝沙坦样品以及 NDEA 对照品在 LC-MS/MS 中进行出峰时间比对, NDEA 出峰时间为 6.50 min (图 6), 同时 LC-MS/MS 分析中 1-戊酰胺对照品在此处也能出峰, 出峰时间为 6.06 min, 通过计算可得 RRT 为 0.94。虽然相比第 1 次检测, NDEA 及 1-戊酰胺出峰结果均往后延迟了 0.25、0.12 min, 但厄贝沙坦样品在本次检测中未知干扰峰也为 6.06 min。在 LC-

MS/MS 系统中, 采用子离子扫描模式, 在 10、20、30、40 eV 能量下分别采集了 1-戊酰胺及 NDEA 的二级质谱数据, 发现 1-戊酰胺能产生  $m/z$  74 的离子, 其 M+1 同位素即为  $m/z$  75 离子, 这也从理论上解释了为何 1-戊酰胺在 MRM 模式下, 当以  $m/z$  103 作为母离子,  $m/z$  75 作为定量离子的检测条件时会干扰 NDEA 的检测。NDEA 及 1-戊酰胺的二级质谱图分别见图 7、8。

图6 1-戊酰胺对照品 (50 ng · mL<sup>-1</sup>, A)、厄贝沙坦 (B) 和 NDEA 对照品 (C) 的 MRM 色谱图Fig. 6 MRM chromatograms of the reference sample of 1-pentanamide (50 ng · mL<sup>-1</sup>, A), the irbesartan sample (B) and the reference sample of NDEA (C)

### 3.5 NDEA、1-戊酰胺的二级质谱裂解规律研究及 RRT 0.95 未知峰解决方案

根据上述研究结果, 确认在原 NDEA 检测中 RRT 0.95 未知峰为 1-戊酰胺。分析 NDEA 及 1-戊酰胺在 10、20、30、40 eV 能量下的二级质谱结果, NDEA 主要产生  $m/z$  75、47 及 30 等二级子离子, 其中先前作为 NDEA 定量离子的  $m/z$  75 离子是 NDEA 母离子  $m/z$  103 中性丢失一分子乙烯产生的离子, 而  $m/z$  47 离子再进一步中性丢失一分子乙烯产生的, 同时  $m/z$  47 离子再进一步中性丢失一分子氨气即可能产生  $m/z$  30 离子 (见图 7)。

1-戊酰胺主要产生  $m/z$  74、57、41 及 39 等二级子离子, 其中  $m/z$  74 离子就是干扰 NDEA 检测的离子, 与 NDEA 裂解规律类似, 为 1-戊酰胺母离子  $m/z$  102 中性丢失一分子乙烯产生的离子; 此外, 在不同的 CID 碰撞能量下,  $m/z$  74 离子可以中性丢失一分子氨气即可能产生特征 1-戊酰胺特征的  $m/z$  57 离子 (见图 8)。NDEA 及 1-戊酰胺的二级质谱裂解规律研究见图 9。最重要的是, 在 1-戊酰胺的二级质谱碎片中,  $m/z$  74 离子无法进一步中性丢失一分子乙烯产生  $m/z$  46 离子 (其 M+1 同位素会干扰 NDEA 的检测), 因此, 在 NDEA 的检测过程中, 当使用  $m/z$  47 当定量

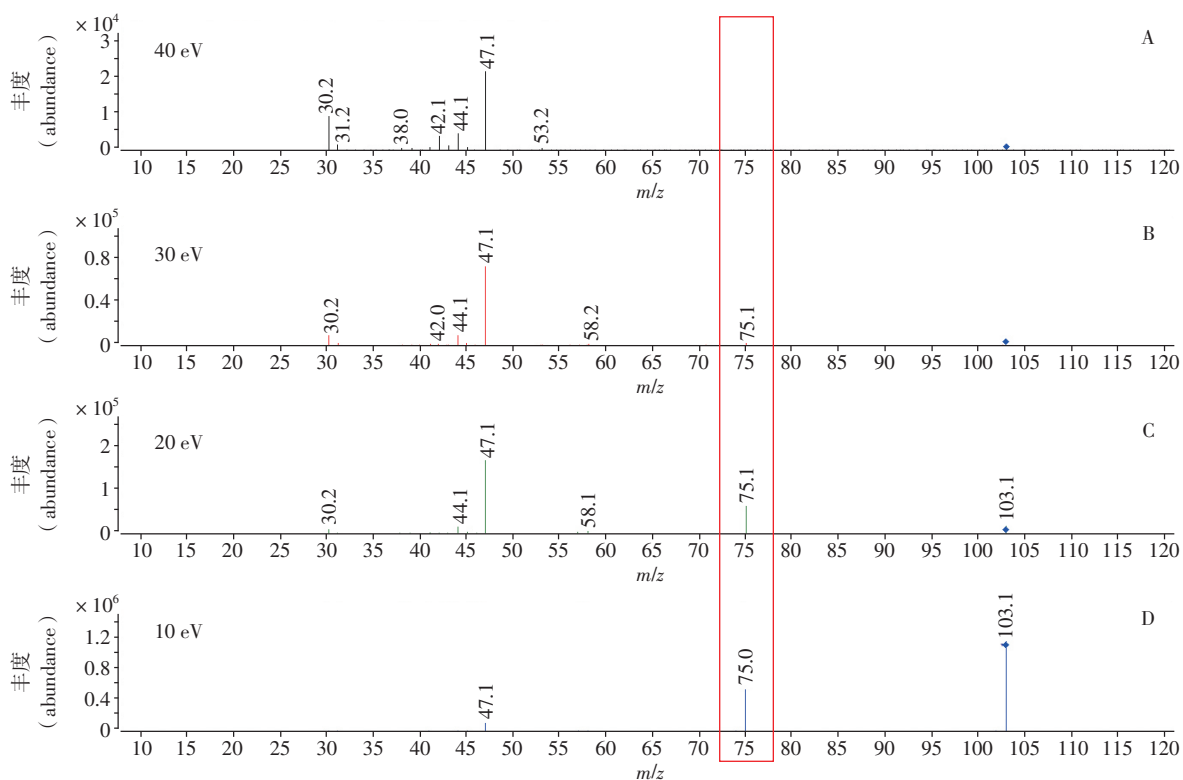


图7 NDEA不同碰撞能量下MS/MS二级质谱图(10、20、30、40 eV)

Fig. 7 MS/MS spectra of NDEA under various collision energies at 10, 20, 30 and 40 eV, respectively

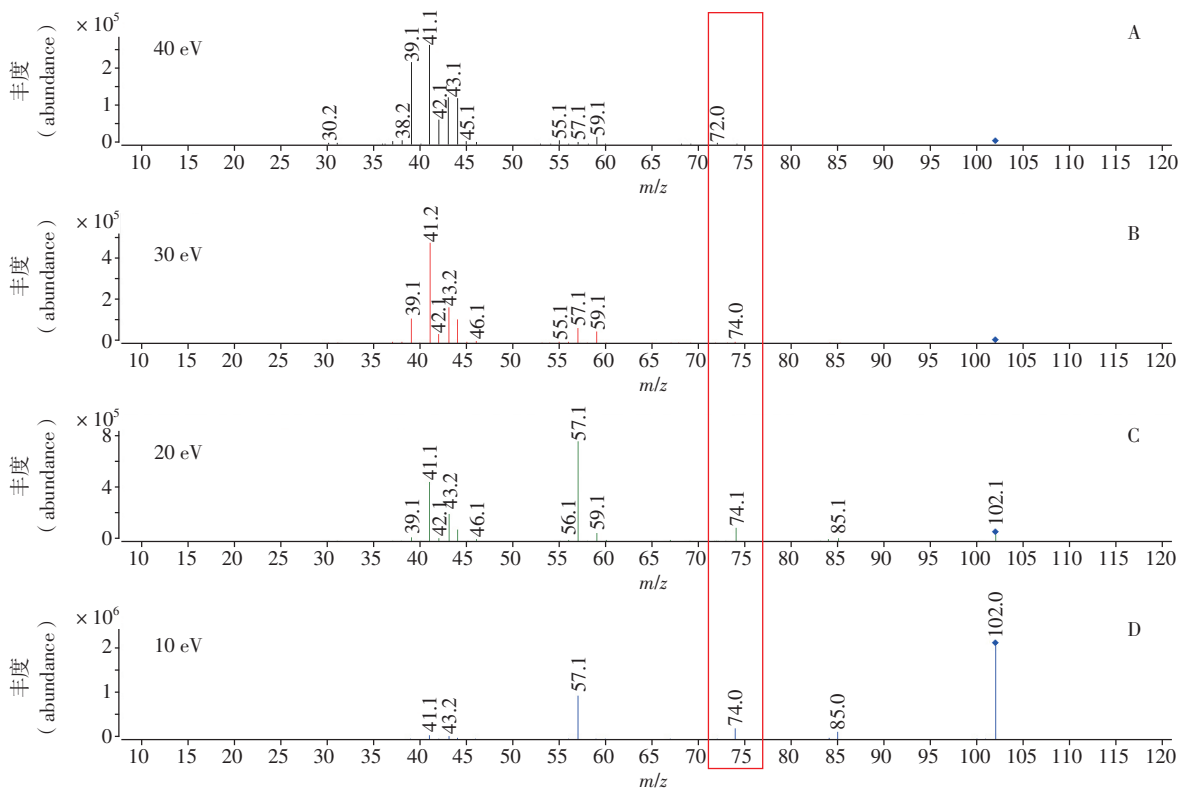


图8 1-戊酰胺(RRT 0.95未知峰)不同碰撞能量下MS/MS二级质谱图(10、20、30、40 eV)

Fig. 8 MS/MS spectra of 1-pentanamide (unknown peak at RRT 0.95) under various collision energies at 10, 20, 30 and 40 eV, respectively

离子时,应该可避免 1-戊酰胺对 NDEA 的检测干扰。为了验证这一方法的可行性,重新选择  $m/z$  47 作为定量离子对厄贝沙坦样品及加标  $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  NDEA

对照品的厄贝沙坦样品进行分析,结果发现,采用  $m/z$  47 作为定量离子对的确可以避免 1-戊酰胺对 NDEA 的检测干扰,检测图谱见图 10。

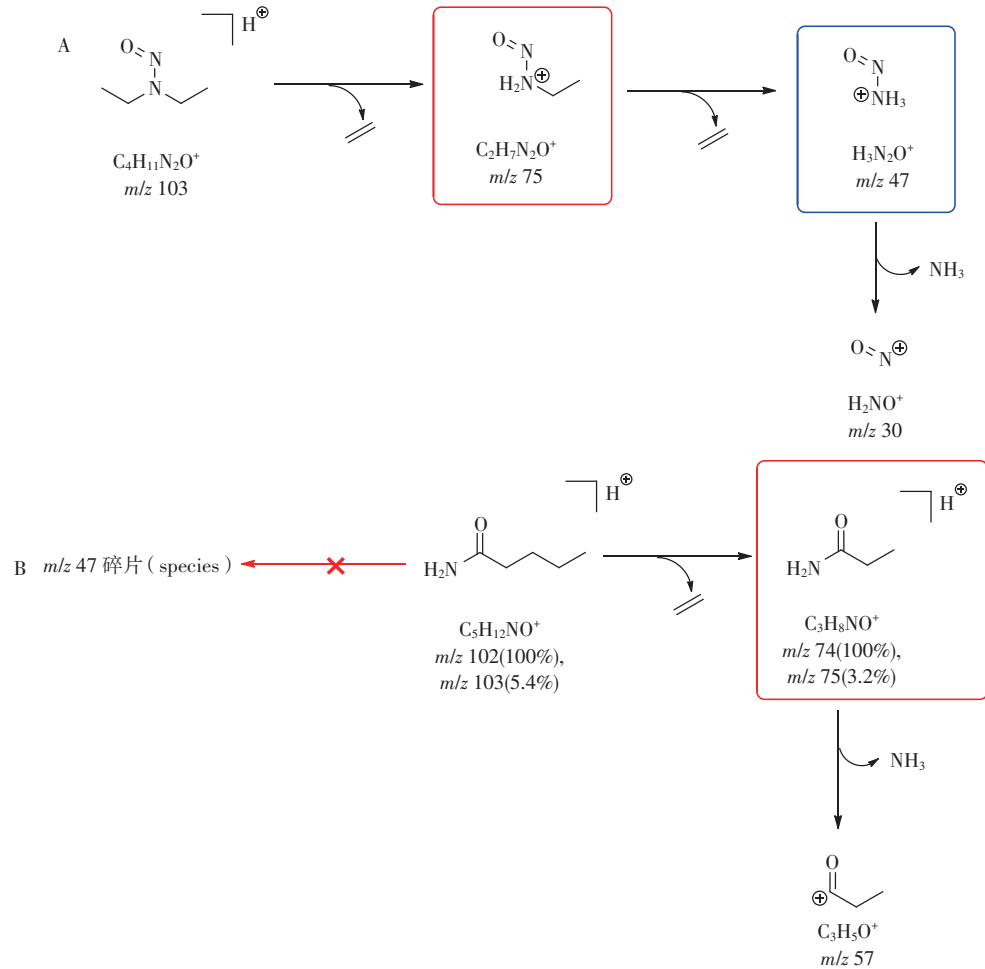


图 9 NDEA (A) 及 RRT 0.95 未知峰 (1-戊酰胺, B) MS/MS 二级质谱碎片机理解析

Fig. 9 MS/MS fragmentation mechanism analysis of NDEA (A) and the unknown peak at RRT 0.95 (1-pentanamide, B)

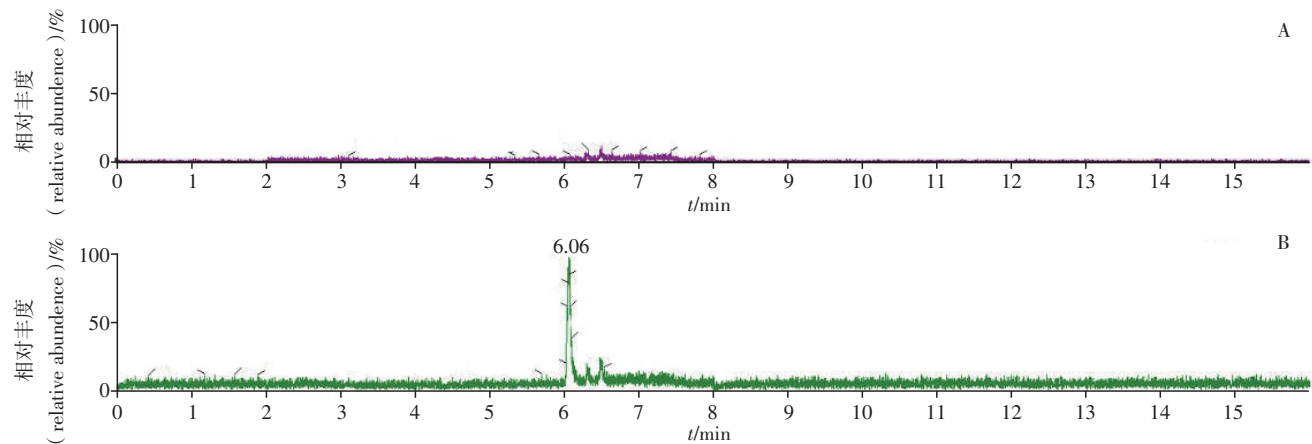


图 10 厄贝沙坦 (A) 和加标  $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  NDEA 的厄贝沙坦 (B) 的 MRM 色谱图

Fig. 10 MRM chromatograms of the irbesartan (A) and the irbesartan spiked with  $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  of NDEA (B)

#### 4 结论

本研究采用 LC-Q TOF MS 全扫描技术,结合杂质对照品确认,对沙坦类药物中 NDEA 的 LC-MS/MS 检测中在 RRT 0.95 处出现的未知峰进行了深入调查,确定该未知峰的结构及其产生来源,并据此制定分析方法的改进策略。通过比较该未知峰与 NDEA 的一级和二级质谱数据,并参考 LC-MS/MS 方法中对待测组分的定量离子选择,基于 LC-Q TOF MS 的分析及合成工艺调查的结果,推测该未知峰为 1-戊酰胺,这是一种在沙坦原料药样品中存在的微量常规杂质。随后,合成了 1-戊酰胺对照品并进行了最终确认。本文阐述了该未知峰对 NDEA 检测的影响,并提出了 1-戊酰胺在高度专属性的 LC-MS/MS 方法下对 NDEA 检测依然存在干扰的根本原因。在沙坦类药物的 NDEA 检测中被确认的未知峰 1-戊酰胺,是沙坦类药物生产过程中产生的一种常规微量工艺杂质,而非另一种亚硝胺杂质。在后续的研究中,对沙坦类产品中 NDEA 的检测采用了选择性更强的  $m/z$  103 为母离子及  $m/z$  47 为子离子的定量模式,从而从根本上避免了 1-戊酰胺的干扰。

#### 参考文献

- [ 1 ] 李苏宁,陈祚,王增武,等.我国老年人高血压现状分析[J].中华高血压杂志,2019,27(2):140  
LI SN, CHEN Z, WANG ZW, *et al.* The hypertension status of the elder population in China[J]. *Chin J Hypertension*, 2019, 27(2): 140
- [ 2 ] 王增武.中国高血压流行和防治现状[J].中国心血管病研究,2022,20(8):673  
WANG ZW. Epidemiology and management status of hypertension in China[J]. *Chin J Cardiovasc Res*, 2022, 20(8): 673
- [ 3 ] CODY RJ. The sympathetic nervous system and the renin-angiotensin-aldosterone system in cardiovascular disease[J]. *Am J Cardiol*, 1997, 80(9B): 9J
- [ 4 ] MILLER AJ, ARNOLD AC. The renin-angiotensin system and cardiovascular autonomic control in aging[J]. *Peptides*, 2022, 159: 170733
- [ 5 ] SANTOS RA, OUDIT GY, VERANO-BRAGA T, *et al.* The renin-angiotensin system: going beyond the classical paradigms[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2019, 316(5): H958
- [ 6 ] WU CH, MOHAMMADMORADI SY, CHEN JZ, *et al.* Renin-angiotensin system and cardiovascular functions[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018, 38(7): e108
- [ 7 ] TIMMERMANS PB. Angiotensin II receptor antagonists: an emerging new class of cardiovascular therapeutics[J]. *Hypertens Res*, 1999, 22(2): 147
- [ 8 ] FATIMA N, PATEL SN, HUSSAIN T. Angiotensin II type 2 receptor-A target for protection against hypertension, metabolic dysfunction, and organ remodeling[J]. *Hypertens*, 2021, 77(6): 1845
- [ 9 ] MCINNES GT. Angiotensin II antagonism in clinical practice: experience with valsartan[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1999, 3: S29
- [ 10 ] SINGH MV, CICHA MZ, NUNEZ S, *et al.* Angiotensin II-induced hypertension and cardiac hypertrophy are differentially mediated by TLR3- and TLR4-dependent pathways[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2019, 316(5): H1027
- [ 11 ] BUEHLMAYER P, OSTERMAYER F, SCHMIDLIN T. Acyl Compounds: US, 5399578[P]. 1995-03-21
- [ 12 ] RUKHMAN I, DOLITZKY BZ, FLYAKS E. Process for The Preparation of Valsartan and Intermediates Thereof: US, 2005059827[P]. 2005-03-17
- [ 13 ] MADASU SB, VEKARIYA NA, KOTESWARAMMA CH, *et al.* An efficient, commercially viable, and safe process for preparation of losartan potassium, an angiotensin II receptor antagonist[J]. *Org Process Res Dev*, 2012, 16(12): 2025
- [ 14 ] DEMKO ZP and SHARPLESS KB. Preparation of 5-substituted <sup>1</sup>H-tetrazoles from nitriles in water[J]. *J Org Chem*, 2001, 66: 7945
- [ 15 ] GENNADY N, IGOR R, BORIS P, *et al.* Novel Synthesis of Irbesartan: Israel, 2004007482[P]. 2004-01-22
- [ 16 ] YATENDRA K, MOHAN P, ASOK N, *et al.* Processes for the Preparation of Highly Pure Irbesartan: Israel, 2005051943[P]. 2005-06-09
- [ 17 ] U.S. Food and Drug Administration(FDA). Information about Nitrosamine Impurities in Medications[EB/OL]. (2023-08-04)[2024-08-22]. <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/information-about-nitrosamine-impurities-medications#:~:text=FDA%2C%20in%20collaboration%20with%20regulatory%20counterparts%20around%20the,drugs%20be%20recalled%20by%20the%20manufacturer%20as%20appropriate>
- [ 18 ] European Medicines Agency(EMA): Sartan Medicines: Companies to Review Manufacturing Processes to Avoid Presence of Nitrosamine Impurities[EB/OL]. (2019-04-017)[2024-08-22]. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/angiotensin-ii-receptor-antagonists-sartans-article-31-referral-sartan-medicines-companies-review-manufacturing-processes-avoid-presence-nitrosamine-impurities\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/angiotensin-ii-receptor-antagonists-sartans-article-31-referral-sartan-medicines-companies-review-manufacturing-processes-avoid-presence-nitrosamine-impurities_en.pdf)
- [ 19 ] TEASDALE A, POKIN M. Regulatory highlights[J]. *Org Process Res Dev*, 2019, 23(7): 1292
- [ 20 ] U.S. Food and Drug Administration(FDA). FDA Announces Voluntary Recall of Several Medicines Containing Valsartan Following Detection of an impurity[EB/OL]. (2018-07-13)[2024-08-22]. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-announces-voluntary-recall-several-medicines-containing-valsartan-following-detection-impurity>
- [ 21 ] U.S. Food and Drug Administration(FDA). FDA Warns API Manufacturer Involved in Valsartan Recall, Provides Information for

- Patients Taking These Medications [EB/OL]. (2018-11-11)[2024-08-22]. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-warns-api-manufacturer-involved-valsartan-recall-provides-information-patients-taking-these>
- [22] LIN JS, ZHOU Q, RU J, *et al.* Reaction of irbesartan with nitrous acid produces irbesartan oxime derivatives, rather than *N*-nitrosoirbesartan [J]. *Org Process Res Dev*, 2022, 26(4): 1236
- [23] XIAO T, HUANG TP, LIN JS, *et al.* Detection Method for *N*-nitrosodimethylamine Impurities: WO, 2020010516 [P]. 2020-01-16
- [24] ZHOU XH, ZHU XR, ZHU YX, *et al.* Method for Synthesizing Valsartan: Israel, 2020010643 [P]. 2020-01-16
- [25] International Conference on Harmonization. ICH Guidelines, M7 (R2): Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic (revision 2) [EB/OL]. (2023-07)[2024-08-22]. <https://www.fda.gov/media/170461/download>
- [26] U.S. Food and Drug Administration (FDA). Guidance for Industry, Control of Nitrosamine Impurities in Human Drugs [EB/OL]. (2021-02)[2024-08-22]. <https://www.regulations.gov/document/FDA-2020-D-1530-0002>
- [27] European Medicines Agency (EMA). Lessons Learnt from Presence of *N*-nitrosamine Impurities in Sartan Medicines [EB/OL]. (2020-06-23)[2024-08-22]. [https://www.ema.europa.eu/system/files/documents/report/sartans\\_lessons\\_learned\\_exercise\\_report\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/system/files/documents/report/sartans_lessons_learned_exercise_report_en.pdf)
- [28] U.S. Food and Drug Administration (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)[2024-08-22]. <https://www.fda.gov/media/125477/download>
- [29] U.S. Food and Drug Administration (FDA). Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-high Resolution Mass Spectrometry (LC-ESI-HRMS) Method for the Determination of Nitrosamine Impurities in Metformin Drug Substance and Drug Product [EB/OL]. (2020-06-03)[2024-08-22]. <https://www.fda.gov/media/138617/download>
- [30] U.S. Food and Drug Administration (FDA). Combined *N*-nitrosodimethylamine (NDMA) and *N*-nitrosodiethylamine (NDEA) Impurity Assay by GC/MS-Headspace [EB/OL]. (2019-01-28)[2024-08-22]. <https://www.fda.gov/media/117843/download>
- [31] European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM). Test Method for the Determination of NDMA and NDEA by LC-MS/MS in Sartan Containing Film Coated Tablets [EB/OL]. (2018-10-10)[2024-08-22]. <https://www.edqm.eu/documents/52006/66284/ndea-and-ndma-detection-in-sartan-containing-tablets-by-lc-ms-ms.pdf/0918cfae-a1e8-6eb0-9134-928dd9f75849?t=1627457270831>

(本文于2024年6月7日收到)