

LC-MS/MS 法测定盐酸二甲双胍缓释片中 N-亚硝基二甲胺

LCMSMS-437

摘要：盐酸二甲双胍的剂型种类较多，不同制剂工艺及辅料对其中的 N-亚硝基二甲胺（NDMA）检测会产生不同程度的影响，因此针对不同剂型需要开发相应的检测方法。本文使用岛津三重四极杆液相色谱质谱联用仪（LCMS-8050）开发了盐酸二甲双胍缓释片这一剂型中 NDMA 的检测方法。通过紫外色谱图确定二甲双胍主峰的出峰时间，使用流路切换阀将其切入废液，尽可能降低质谱的污染。实验结果表明，1 ng/mL NDMA 标准溶液的 S/N 为 22.84。2 ng/mL 标准溶液连续进样 6 次，峰面积相对标准偏差为 2.27%，仪器精密度良好。在 1-100 ng/mL 浓度范围内，方法线性良好，线性相关系数大于 0.9999。曲线各标点浓度回读值准确度在 94.0-111.7% 之间。40、50 和 60 ng/g 三个不同浓度加标回收率在 98.1-110.3% 之间，平行三份样品的相对标准偏差 (RSD%) 在 1.50-3.39% 之间。该方法简单、方便、准确，满足中检化药函（2019）848 号的要求，适用于二甲双胍缓释片中 NDMA 的检测。

关键词：LC-MS/MS 盐酸二甲双胍缓释片 NDMA

盐酸二甲双胍是一种广泛用于治疗 2 型糖尿病的药物，在国内外多种治疗指南中被列为一线降糖药物，具有降糖作用确切，低血糖风险小，价格低廉等优点，是目前应用最为广泛的甲类降糖药物之一。目前，据报道国内外多家药企的二甲双胍原料药和成品药中检出 N-亚硝基二甲胺（NDMA）。NDMA 是一种亚硝胺类物质，属于基因毒性物质，具有致癌可能或者倾向。FDA 规定药品中 NDMA 的日摄入量不得超过 96 ng，按照大部分二甲双胍每日最大服用量 2 g 计算，二甲

双胍中 NDMA 的限量值为 48 ng/g。

盐酸二甲双胍的剂型较多，为避免不同制剂工艺及辅料的影响，针对不同剂型需要开发相对应的检测方法。2019 年 12 月 23 日中检院印发了盐酸二甲双胍缓释片中 NDMA 的推荐检测方法（中检化药函（2019）848 号），本文参考该方法，采用岛津三重四极杆液质联用仪 LCMS-8050，建立了盐酸二甲双胍缓释片中 NDMA 的分析方法，供相关检测人员参考。

实验部分

1.1 仪器

岛津 LCMS-8050 三重四极杆液质联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A5 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30A 柱温箱，FCV-32AH 流路切换阀，CBM-20A 系统控制器，SPD-M20A 二极管阵列检测器，LCMS-8050 三重四极杆质谱仪，数据采集使用 LabSolutions Ver. 5.97，数据处理使用 LabSolutions Insight 3.4。

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：ACE-C18-AR (4.6 mm I.D. × 150 mm L., 3 μm)

流动相：A 相 -0.1% 甲酸水；B 相 -0.1% 甲酸甲醇

流速：0.8 mL/min

柱温：40°C

进样器温度：10°C

进样量：10 μL

检测波长：190-700 nm

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 5%，洗脱程序见表 1。

表 1. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
2.85	Column Oven	CTO.RVR	0
6.00	Pumps	Pump B Conc.	5
7.00	Pumps	Pump B Conc.	95
7.00	Column Oven	CTO.RVR	1
10.00	Pumps	Pump B Conc.	95
10.50	Pumps	Pump B Conc.	5
14.00	Controller	Stop	

注：* CTO.RVR 为色谱柱后流路切换阀指令，Value 值为“0”时流路与质谱相连，Value 值为“1”时流路与废液管相连。

LCMS-8050 质谱条件：

离子源	: APCI (+)	接口电压	: 4.5 kV
雾化气流速	: 3 L/min	加热模块温度	: 200°C
DL 温度	: 180°C	扫描模式	: 多反应监测 (MRM)
接口温度	: 300°C	干燥气流速	: 5.0 L/min
MRM 参数	: 见表 2		

表 2.MRM 参数

No.	名称	CAS	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	NDMA	62-75-9	74.95	43.10*	-12	-17	-46
				58.20	-16	-16	-24

注：* 表示定量离子

1.3 对照品溶液制备

储备液：精密称取 N-亚硝基二甲胺对照品 10 mg，用甲醇定容至 10 mL 容量瓶中，制得 1 mg/mL N-亚硝基二甲胺储备液。

对照品测试溶液：从上述储备液中移取适量，用甲醇稀释制成 1 mL 中约含 1、2、5、10、50、100ng 的溶液。

灵敏度测试溶液：从上述储备液中移取适量，用甲醇稀释制成 1 mL 中约含 1 ng 的溶液。

1.4 供试品溶液制备

取本品细粉适量（约相当于盐酸二甲双胍 500 mg），精密称定至 50 mL 离心管中，精密加入甲醇 10 mL，涡旋混匀 1 分钟，再振荡 20 分钟，以 10000 转 / 分的速率离心 5 分钟，取上清液过 0.22 μm 滤膜过滤，取滤液上机。

结果与讨论

2.1 二甲双胍缓释片紫外光谱图

二甲双胍缓释片按照 1.4 进行样品前处理后，233 nm 下紫外光谱图见图 1。二甲双胍峰结束时间点为 2.532 min，NDMA 标准溶液出峰时间为 4.344 min，为避免二甲双胍进入质谱，污染仪器，造成基线的波动，应尽

可能阀切充分。同时，阀切换也会造成基线的波动，应预留足够的时间让基线恢复正常。本方法中设置 2.85-7.00 min 导入质谱，其余时间均切入废液。NDMA 出峰后依然要进行色谱系统的深度冲洗，避免药品在柱上残留干扰后续分析。不同色谱系统的延迟体积存在差异，NDMA 和二甲双胍的保留时间会发生变化，因此建议配置紫外检测器进行二甲双胍保留时间的确定。

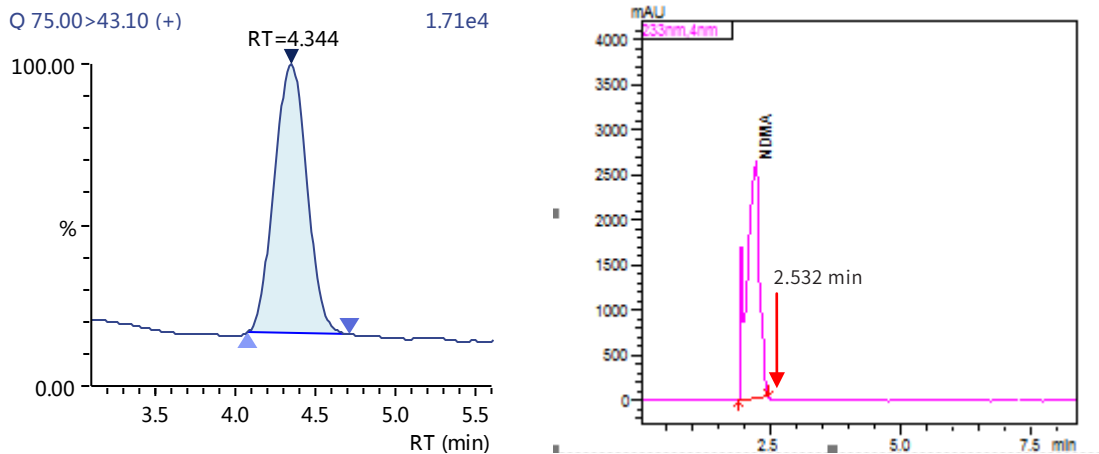


图 1. 挥发性有机物 TIC 图 (20 $\mu\text{g/L}$)

2.2 线性范围考察

用甲醇分别配制 1、2、5、10、50、100 ng/mL 的标准溶液，取 10 μL 进样，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，使用外标法拟合工作曲线。NDMA 在 1-100 ng/mL 范围内线性良好，相关系数大于 0.9999。曲线各标点浓度回读值准确度在 94.0-111.7% 之间。

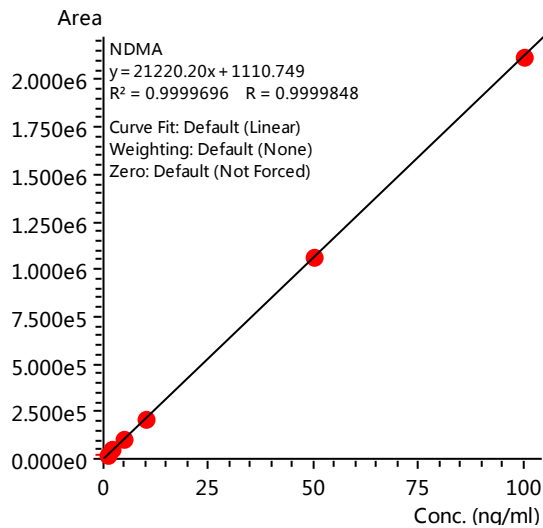


图 2. NDMA 工作曲线

2.3 灵敏度实验

配制 1 ng/mL 标准溶液进行灵敏度测试，噪音的选取范围为 4.8-5.5 min，使用 ASTM 法计算 S/N，其结果如图 3 所示，1 ng/mL NDMA 标准溶液 S/N 为 22.84。

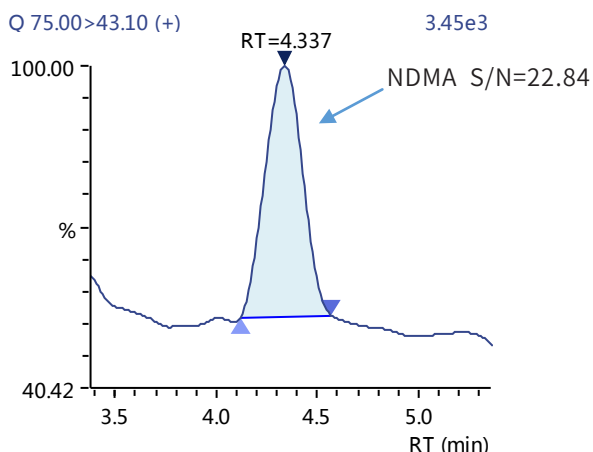


图 3. 1.0 ng/mLNDMA 标准样品色谱图

2.4 重复性考察

2 ng/mL 浓度对照品溶液，连续进样 6 次，考察保留时间和峰面积的重复性，结果如下表 3 所示。保留时间和峰面积的相对标准偏差 (RSD%) 分别为 0.16% 和 2.27% 之间，满足中检化药函（2019）848 号中要求的峰面积 RSD%<10%，仪器精密度良好。

表 3. 2 ng/mL NDMA 标准溶液连续 6 针重复性结果

编号	峰面积	保留时间
1	37039	4.334
2	38310	4.340
3	37215	4.341
4	36210	4.346
5	36854	4.347
6	35938	4.354
平均值	36928	4.344
RSD%	2.27	0.16

2.5 加标回收率及重复性考察

按照 1.4 法处理后，往二甲双胍缓释片实际样品中加入低、中、高三个浓度 NMDA 标准溶液，进行三个浓度水平加标回收率考察。每个浓度平行制备三份样品，进行重复性考察。低、中、高三个加标浓度分别为 40、50 和 60 ng/g。未加标样品谱图和加标样品谱图见图 4。三水平加标回收率及重复性结果见表 4。

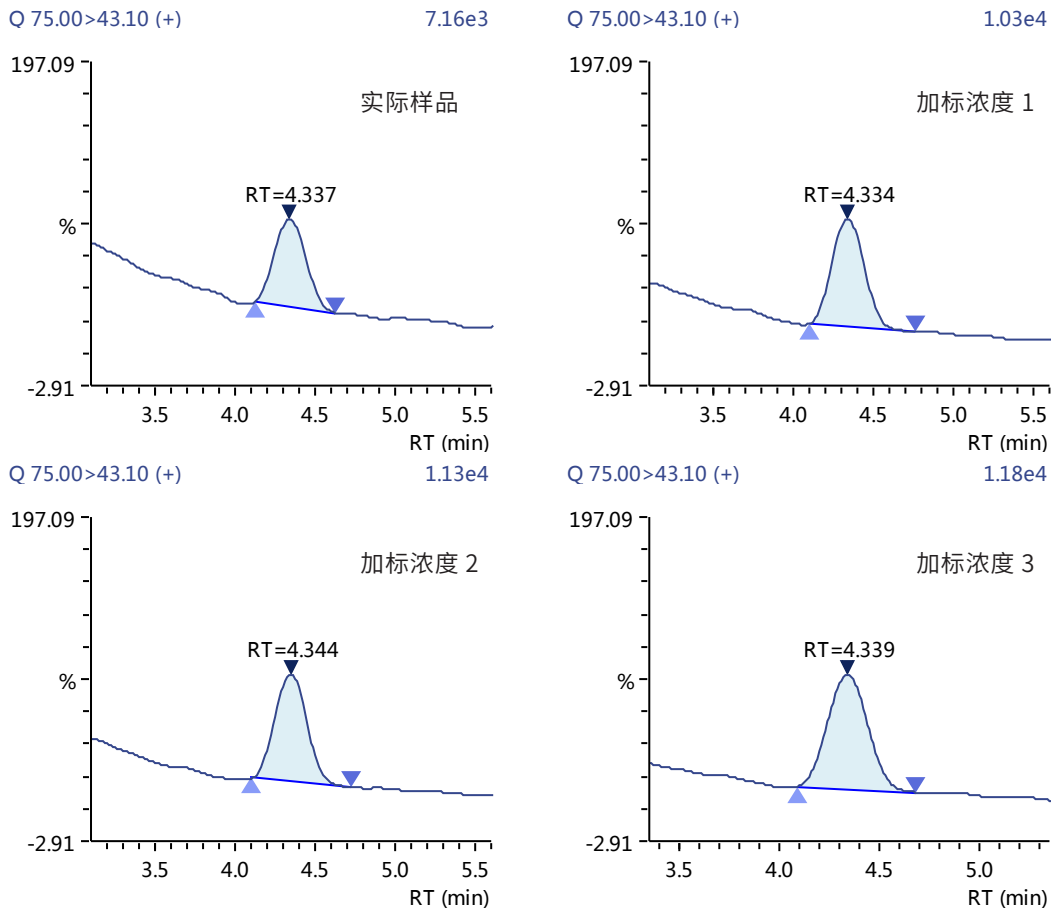


图 4. 实际样品谱图和加标回收样品谱图

表 4. 三水平加标回收率及重复性计算结果 (n=3)

No.	样品本底值 (ng/g)	40 ng/g 加标结果		50ng/g 加标结果		60ng/g 加标结果	
		实测值 (ng/g)	回收率 (%)	实测值 (ng/g)	回收率 (%)	实测值 (ng/g)	回收率 (%)
1		91.0	113.0	93.0	94.4	106.8	101.7
2	45.8	89.2	108.5	96.2	100.8	106.8	101.7
3		89.6	109.5	95.4	99.2	108.4	104.3
平均值		89.9	110.3	94.9	98.1	107.3	102.6
CV%		2.14		3.39		1.50	

2.6 供试品测定结果

6份不同来源的供试品按照1.4所述方法制备上机测定。部分典型色谱图如图5所示。外标法计算样品含量，结果如表5所示。

表 5. 供试品中 NDMA 含量测定结果

样品编号	NDMA 含量 (ng/g)
1	68.4
2	124.2
3	38.2
4	43.4
5	39.2
6	N.D.

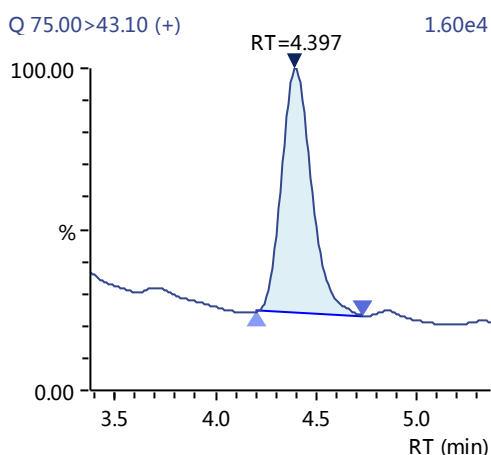


图 5. 实际样品 NDMA 检测谱图

■ 结论

本文利用岛津 LCMS-8050 三重四级杆液质联用仪定量测定了盐酸二甲双胍缓释片中的 NDMA。实验结果表明, 1 ng/mL NDMA 标准溶液的 S/N 为 22.84。2 ng/mL 标准溶液连续进样 6 次, 峰面积相对标准偏差为 2.27%, 仪器精密度良好。在 1-100 ng/mL 浓度范围内, 方法线性良好, 线性相关系数大于 0.9999。曲线各标点浓度回读值准确度在 94.0-111.7% 之间。40、50 和 60 ng/g 三个不同浓度加标回收率在 98.1-110.3% 之间, 平行三份样品的相对标准偏差 (RSD%) 在 1.50-3.39% 之间, 该方法灵敏准确, 稳定性好, 适用于二甲双胍缓释片中 NDMA 的检测。

岛津应用云

