

LC-MS/MS 检测雷尼替丁中 11 种亚硝胺基因毒性杂质

LCMSMS-790

摘要: 本文利用岛津三重四极杆液质联用系统建立了雷尼替丁胶囊中 11 种亚硝胺类遗传毒性杂质的检测方法。该方法采用外标法定量, 在 1-500 ng/mL 的范围内, 11 种亚硝胺线性相关系数 r 均在 0.999 以上, 线性良好; 2 ng/mL 标准溶液连续进样 6 次, 保留时间和峰面积的相对标准偏差 (RSD%) 分别在 0.02~0.26% 和 2.28~7.47% 之间, 重复性良好; 雷尼替丁胶囊平行 6 份加标样品加标回收率在 79.5~103.88% 之间, 方法准确可靠, 可用于实际样品的检测。

关键词: LCMS-8050 雷尼替丁 11 种亚硝胺

技术特点:

- ❖ 该方法将雷尼替丁中基因毒性杂质的检测种类扩展至 11 种。
- ❖ 11 种亚硝胺物质与原料药实现很好的分离, 可用于准确定量。

遗传毒性杂质 (Genotoxic Impurities, GTI) 又称基因毒性杂质, 是指化合物本身直接或间接损伤细胞 DNA, 产生基因突变或体内诱变, 具有致癌可能。亚硝胺类化合物 NMPA、NDELA、NPIP、NMOR、NNN、NDPA、NDBA、NDMA、NDEA、NEIPA 和 NDIPA 是常见的遗传毒性杂质。

雷尼替丁, 又名呋喃硝胺, 为强效组胺 H₂ 受体拮抗剂, 能够降低胃酸和胃酶活性, 是非常经典的治疗消化性疾病药物, 在我国广泛用于治疗胃及十二指肠溃疡。2019 年 9 月 13 日, FDA 发表声明, 提

醒患者和医护人员在雷尼替丁中发现 NDMA, FDA 发现该致癌杂质同时会在雷尼替丁正常储存时, 随着时间的推移而含量增加, 可超过人体可接受的安全限量 (96 ng/d 或 0.32 ppm), 因此建立雷尼替丁中基因毒性杂质检测方法对药品监管和用药安全有着重要的现实意义。

目前中检院已发布替丁类药物检测推荐方法, 本文参考中检院推荐分析方法, 采用岛津三重四极杆液质联用仪 LCMS-8050, 建立了雷尼替丁中 11 种亚硝胺类基因毒性杂质的分析方法, 供相关检测人员参考。

实验部分

1.1 仪器

岛津三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为:

系统控制器 :	CBM-20A	脱气机 :	DGU-20A5R
输液泵 :	LC-30AD × 2	自动进样器 :	SIL-30AC
柱温箱 :	CTO-30A	质谱仪 :	LCMS-8050
流路切换阀 :	FCV-20AH	检测器 :	SPD-M20A
色谱工作站 :	LabSolutions 5.114		

1.2 分析条件

液相色谱条件:

- 色谱柱 : ACE EXCEL 3 C18-AR (150 mm × 4.6 mm I.D., 3 μm)
- 流动相 : A-0.1% 甲酸水; B-0.1% 甲酸甲醇
- 流速 : 0.8 mL/min
- 柱温 : 40°C
- 进样体积 : 5 μL
- 洗脱方式 : 梯度洗脱, B 相初始浓度为 5%, 阀初始位置 0 位, 时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.8	控制器	Event	1*
1.0	泵	B.Conc	5
2.0	泵	B.Conc	8
6.5	泵	B.Conc	8
7.5	控制器	Event	0*
10.0	泵	B.Conc	35
11.0	泵	B.Conc	60
12.0	控制器	Event	1*
18.0	泵	B.Conc	100
18.0	控制器	Event	0*
21.0	泵	B.Conc	100
21.1	泵	B.Conc	5
26.0	控制器	Stop	

注：“0”表示流路切换至废液，“1”表示进质谱。

质谱条件：

离子源：	APCI (+)	接口电压：	4.5 kV
接口温度：	300°C	加热块温度：	200°C
雾化气流速：	3.0 L/min	扫描模式：	多反应监测 (MRM)
干燥气流速：	5.0 L/min	MRM 参数：	见表 2
DL 温度：	180°C		

表 2 MRM 优化参数

No.	名称	CAS	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
1	N-亚硝基二甲胺 (NDMA)	62-75-9	74.95	42.95*	-13.0	-20.0	-15.0
				58.20	-12.0	-14.0	-24.0
2	N-亚硝基二乙胺 (NDEA)	55-18-5	103.00	75.10*	-12.0	-14.0	-29.0
				47.00	-11.0	-16.0	-16.0
3	N-亚硝基-N-乙基异丙胺 (NEIPA)	16339-04-1	117.00	75.00*	-13.0	-12.0	-27.0
				47.20	-13.0	-15.0	-19.0
4	N-亚硝基二异丙胺 (NDIPA)	601-77-4	131.00	89.30*	-10.0	-11.0	-18.0
				47.10	-10.0	-14.0	-18.0
5	N-亚硝基二正丁胺 (NDBA)	924-16-3	159.30	56.95*	-12.0	-14.0	-22.0
				102.90	-11.0	-13.0	-17.0
6	N-亚硝基二乙醇胺 (NDELA)	116-54-7	135.20	74.10*	-15.0	-13.0	-28.0
				56.15	-15.0	-23.0	-21.0
7	(2S)-N-亚硝基降烟碱 (NNN)	16543-55-8	178.10	147.85*	-20.0	-13.0	-14.0
				20.10	-21.0	-17.0	-21.0
8	N-亚硝基吗啉 (NMOR)	59-89-2	117.05	85.15*	-23.0	-14.0	-17.0
				45.10	-13.0	-19.0	-18.0

9	N-亚硝基哌啶 (NPIP)	100-75-4	115.10	69.20*	-12.0	-16.0	-27.0
				41.10	-12.0	-22.0	-16.0
10	N-亚硝基二正丙胺 (NDPA)	621-64-7	131.15	89.05*	-14.0	-11.0	-17.0
				43.15	-14.0	-12.0	-17.0
11	N-甲基-N-亚硝苯胺 (NMPA)	614-00-6	137.20	66.10*	-15.0	-22.0	-28.0
				107.00	-15.0	-15.0	-20.0

注：* 表示定量离子

1.3 标准溶液的配置

用水将 11 种亚硝胺中间液逐级稀释为 1、2、5、10、50、100、500 ng/mL 的标准系列工作溶液。

1.4 样品前处理方法

称取本品内容物适量，约相当于雷尼替丁 300 mg，至 15 mL 的离心试管中，精密加入水 10 mL，涡旋混匀 1 分钟，再振摇 40 分钟，10000 r/min 离心 10 分钟，取上清液过滤后上机分析。

■ 结果与讨论

2.1 标准品 MRM 色谱图与雷尼替丁 UV 图

为避免高浓度的雷尼替丁进入仪器污染质谱，实验中通过调整液相洗脱程序，实现 11 种亚硝胺同雷尼替丁色谱分析，具体结果如图 1 所示：0.8-7.5 min 切入质谱，监控 MDELA、NDMA、NNN、NMOR，7.5-12.0 min 为雷尼替丁出峰时间，切入废液，12.0-18.0 min 切回质谱，监控其他亚硝胺。由于不同系统出峰时间会有所差别，建议配置紫外检测器进行色谱图的监控，以便重新调整流路切阀时间。

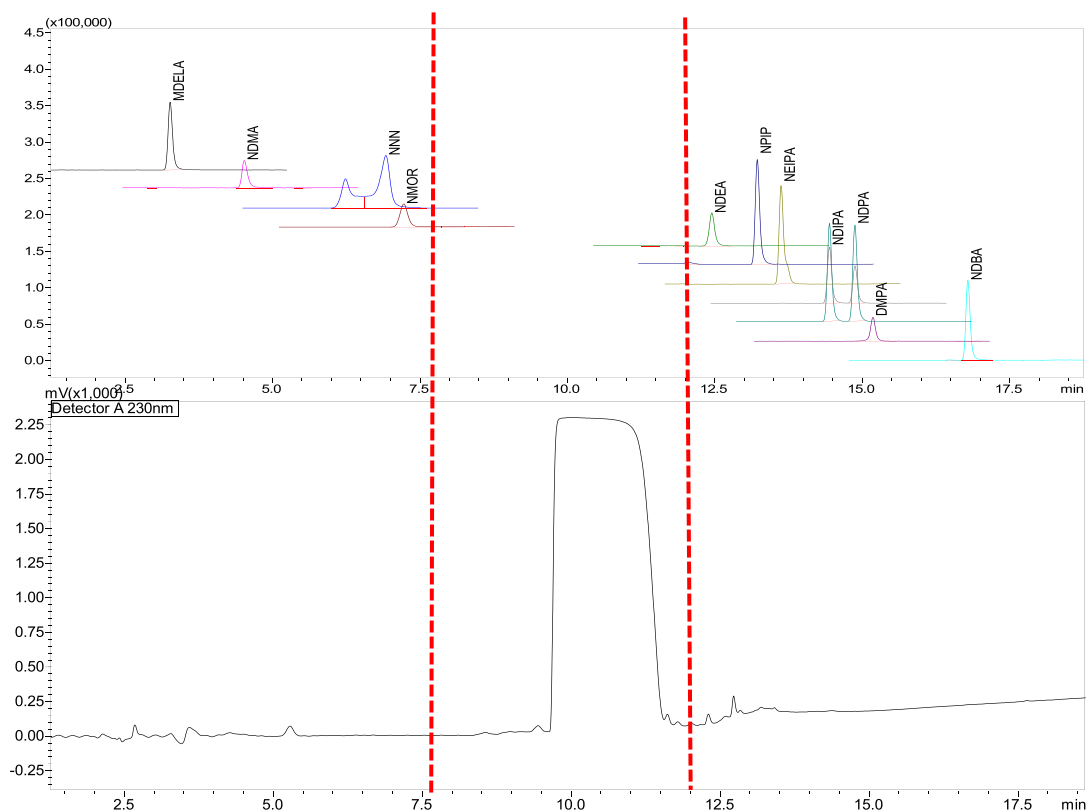


图 1 标准品 (50 ng/mL) MRM 色谱图 (上) 与雷尼替丁 UV 图 (下)

2.2 校准曲线

取 1.3 中的标准系列工作溶液，按照 1.2 分析条件上机分析。以各化合物浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，外标法绘制校准曲线，具体结果见图 2 与表 3。

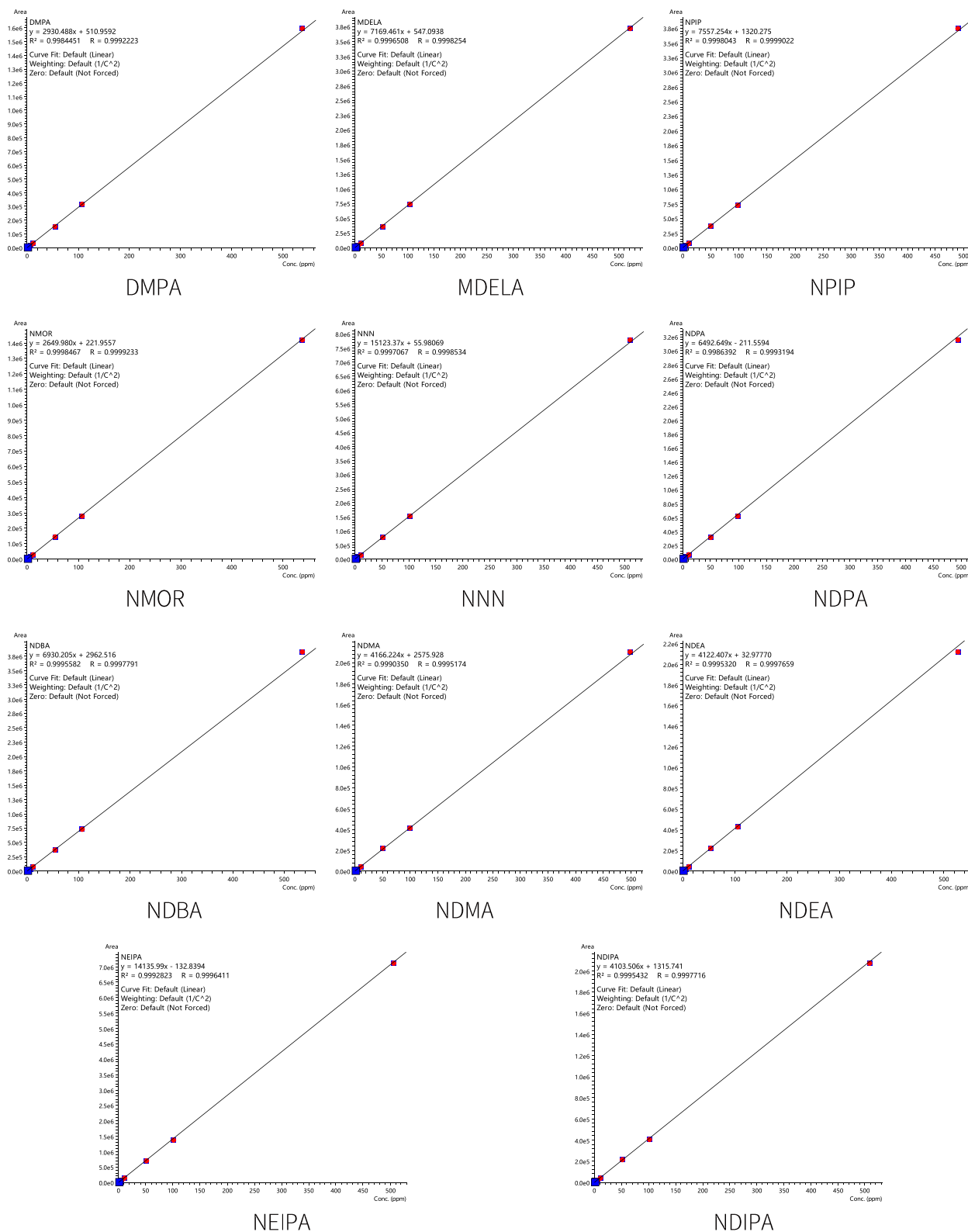


图 2 11 种亚硝酸胺校准曲线

表 3 标准曲线与检出限信息

No.	化合物名称	校准曲线	相关系数 R	准确度 (%)	检出限 (ng/mL)	定量限 (ng/mL)
1	NMPA	$y=2930.49x+510.959$	0.9992	95.5-106.0	0.16	0.49
2	NDELA	$y=7169.46x+547.094$	0.9998	97.4-102.5	0.08	0.26
3	NPIP	$y=7557.25x+1320.28$	0.9999	98.1-101.3	0.57	1.74
4	NMOR	$y=2649.98x+221.956$	0.9999	98.3-101.0	0.17	0.53
5	NNN	$y=15123.4x+55.9807$	0.9998	97.3-101.5	0.06	0.19
6	NDPA	$y=6492.65x-211.559$	0.9993	97.0-106.1	0.27	0.83
7	NDBA	$y=6930.21x+2962.52$	0.9997	98.4-103.3	0.13	0.40
8	NDMA	$y=4166.22x+2575.93$	0.9995	96.2-104.4	0.25	0.76
9	NDEA	$y=4122.41x+32.9777$	0.9997	97.7-102.5	0.35	1.06
10	NEIPA	$y=14136.0x-132.829$	0.9996	96.4-103.9	0.01	0.03
11	NDIPA	$y=4103.51x+1315.74$	0.9997	97.7-102.7	0.01	0.03

2.3 重复性

取浓度为 2 ng/mL 标准溶液连续 6 次进样，考察重复性，保留时间 RSD% 在 0.02~0.16% 间，峰面积的 RSD% 在 2.28~7.47% 间；具体如下表。

表 4 重复性结果 (n=6)

No.	化合物名称	保留时间 RSD%	峰面积 RSD%
1	NMPA	0.02	2.60
2	NDELA	0.12	3.54
3	NPIP	0.02	4.83
4	NMOR	0.09	3.82
5	NNN	0.26	2.28
6	NDPA	0.03	7.47
7	NDBA	0.02	2.45
8	NDMA	0.16	3.06
9	NDEA	0.05	4.69
10	NEIPA	0.02	6.07
11	NDIPA	0.03	5.92

2.4 加标回收实验

按照 1.4 步骤制备雷尼替丁样品和加标样品，加标浓度为 10 ng/mL，加标样品平行处理 6 份，加标回收结果见表 5。结果表明，加标回收率在 79.5~103.88% 之间，平行六份样品的相对标准偏差 (RSD%) 在 2.25~5.09% 之间。

表 5 加标回收率结果 (n=6)

No.	化合物名称	样品浓度 (ng/mL)	加标浓度 (ng/mL)	加标测定结果 (ng/mL)	回收率 %	RSD%
1	NMPA	N.D.	10.756	11.173	103.88	4.85
2	NDELA	0.969	10.418	10.747	101.41	3.40
3	NPIP	N.D.	9.798	9.871	91.77	3.95
4	NMOR	N.D.	10.74	10.780	100.22	3.76
5	NNN	N.D.	10.195	8.551	79.5	3.94
6	NDPA	N.D.	9.87	9.551	88.8	5.09
7	NDBA	0.054	10.692	10.643	98.95	3.68
8	NDMA	1.736	9.966	10.587	98.43	2.25
9	NDEA	N.D.	10.531	9.609	89.33	3.07
10	NEIPA	N.D.	10.12	9.205	85.58	4.01
11	NDIPA	N.D.	10.165	9.183	85.37	2.91

注：N.D. 表示未检出。

■ 结论

本实验利用岛津超高效液相色谱质谱联用仪 LCMS-8050 建立雷尼替丁胶囊中 11 种亚硝胺类基因毒性杂质的检测方法，该方法采用外标法定量，验证数据表明：该方法线性、重复性、加标回收率良好，方法准确可靠，可用于雷尼替丁胶囊中 11 种亚硝胺类遗传毒性杂质的测试，供相关人员参考。

岛津应用云

