

LCMS-8050 检测尼扎替丁中基因毒性杂质 N-亚硝基二甲胺 (SOP)

■ 方法概述

1.1 方法编制说明

本方法参照中检化药函〔2019〕722号《关于印发替丁类药物中N-亚硝基二甲胺推荐检测方法的函》制定。

1.2 方法使用范围

本方法适用于尼扎替丁原料及制剂中N-亚硝基二甲胺含量的测定。

1.3 方法技术指标

重复性：浓度为2 ng/mL的对照品溶液重复进样6次，定量离子对(m/z 75.15>43.05)峰面积的相对标准偏差不超过10%；

灵敏度：浓度为1 ng/mL的对照品溶液所得主峰的信噪比应不低于10；

线性：1 ng/mL ~ 100 ng/mL，相关系数(r)应不低于0.995。

■ 方法原理

用高效液相色谱仪将N-亚硝基二甲胺(NDMA)从尼扎替丁原料药中分离出来，并通过三重四极杆质谱仪对其进行检测，采用外标法绘制校准曲线进行定量分析。

■ 试剂与材料

3.1 甲醇：LCMS级。

3.2 甲酸：LCMS级。

3.3 超纯水：屈臣氏蒸馏水。

3.4 一次性使用无菌注射器。

3.5 微孔过滤膜：水相滤膜0.22 μm。

3.6 N-亚硝基二甲胺标准品。

3.7 标准溶液配置

3.7.1 标准储备液配制

精密称取N-亚硝基二甲胺对照品10 mg至10 mL容量瓶中，加入超纯水完全溶解，再定容至10 mL，得到1 mg/mL标准储备液。用1 mL移液管从标准储备液中移取1 mL于100 mL容量瓶中，得到10 mg/L标准储备液。用1 mL移液管从10 mg/L混标中移取1 mL于10 mL容量瓶中，得到1 mg/L标准储备液。

3.7.2 标准工作溶液配制

用1 mL移液管从1 mg/L储备液中移取1 mL于10 mL容量瓶中，得到100 ng/mL标液。

用5 mL移液管从100 ng/mL标液中移取5 mL于10 mL容量瓶中，得到50 ng/mL标液。

用1 mL移液管从100 ng/mL标液中移取1 mL于10 mL容量瓶中，得到10 ng/mL标液。

用1 mL移液管从50 ng/mL标液中移取1 mL于10 mL容量瓶中，得到5 ng/mL标液。

用5 mL移液管从10 ng/mL标液中移取2 mL于10 mL容量瓶中，得到2 ng/mL标液。

用5 mL移液管从2 ng/mL标液中移取5 mL于10 mL容量瓶中，得到1 ng/mL标液。

标准工作溶液应现用现配。取此系列中标样各进样5 μL，以标样浓度对响应值绘制工作曲线。

■ 仪器设备

4.1 岛津 LCMS-8050 三重四极杆液相色谱质谱联用仪配有二极管阵列检测器，APCI 离子源，FCV-20AH 流路切换阀。

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

4.2 分析天平：Shimadzu AP135W；

4.3 涡旋仪：Talboys；

4.4 移液管：5mL, 1mL

■ 测定步骤

5.1 制备制备

精密称定 300 mg 供试品至 10 mL 容量瓶中，加入超纯水，涡旋混匀使样品完全溶解，再定容至 10 mL，经过 0.22 μm 滤膜过滤上机分析。

5.2 色谱参考条件

5.2.1 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 % 甲酸水溶液 B 相 -0.1% 甲酸甲醇溶液

流速：0.80 mL/min

柱温：40°C

进样量：5 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 4 %，时间程序见下表

为避免样品污染离子源，建议 NDMA 出峰后切入废液，且由于不同色谱系统的延迟体积的差异，NDMA 和尼扎替丁的保留时间会发生变化，因此建议配置紫外检测器进行尼扎替丁样品色谱图的监控。

梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
2	泵	B.Conc	4
6.5	控制器	Event	0*
8	泵	B.Conc	15
8.1	泵	B.Conc	100
12	泵	B.Conc	100
12.1	泵	B.Conc	4
20	控制器	Stop	

注：* “0” 表示流路切换至废液；

离子源：APCI (+)

接口电压：4.5 kV

雾化气流速：3.0 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：见下表

MRM 参数

No.	名称	CAS	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bi- as(V)	CE(V)	Q3 Pre Bi- as(V)
1	NDMA	62-75-9	74.95	43.05*	-32	-16	-16
				58.10	-14	-16	-36

注：* 表示定量离子

5.3 色谱分析

分别吸取 5 μ L 标准溶液和样品溶液，按照 5.2 的仪器分析条件进行分析，以保留时间和参比离子比率定性，以样品溶液定量离子（m/z 74.95>43.05）峰面积定量。

若检测溶液中的残留量超过本方法的标准曲线范围，则需要稀释检测溶液后进样分析。

5.4 计算和报告

5.4.1 定性分析

进行样品测定时，供试品中 NDMA 以保留时间和参比离子比率定性。

5.4.2 定量分析

本方法采用外标法定量测定，以定量离子（m/z 74.95>43.05）峰面积计算目标物浓度。尼扎替丁原料药及制剂中 NDMA 杂质含量可通过以下公式计算：

$$\text{NDMA impurity (ppm)} = \frac{A}{A_s} \times C_s \times \frac{1 \text{ mg}}{1 \times 10^6 \text{ ng}} \times \frac{1}{30 \text{ mg/mL}} \times 10^6$$

A — 供试品溶液中被测物的色谱峰面积；

A_s — 对照溶液中被测物的色谱峰面积；

C_s — 对照溶液中被测物的浓度，单位为 ng/mL。

岛津应用云

