

化学药中遗传毒性杂质 NDMA的检测方案

前言

N-亚硝基二甲胺又称二甲基亚硝基胺，英文简称 NDMA，属于 N-亚硝胺类化合物。N-亚硝胺类化合物是一类较典型的遗传毒性物质，NDMA 是 N-亚硝基化合物中结构最简单而致癌性、诱变性与致畸性最强的物质之一，被国际癌症研究机构（IARC）判定为 2A 类物质，对人类致癌性证据有限但实验动物致癌性证据充足。

2018 年 6 月，某大型药企在对缬沙坦原料药生产工艺进行优化评估的过程中，发现并检出其中一未知杂质为 NDMA，随后主动向中国、欧洲及美国药品监管机构报告并主动召回相关产品。该事件迅速发酵并扩大到其他沙坦类药物，各国药品监管机构对该类药物进行了严格的审查。

2019 年 9 月 13 日，美国 FDA 发布公告称，多个品牌生产的雷尼替丁药品中含有低浓度的亚硝胺杂质致癌物 NDMA。随后雷尼替丁在全球多个国家掀起召回风波，多家知名药企遭受冲击，深陷致癌泥潭。面对来势汹汹的雷尼替丁风波，多家药品监管机构纷纷出台了 NDMA 的相关检测方法，中国药典委员会也发布了雷尼替丁相关制剂药品标准修订草案的公示，对雷尼替丁相关药品标准拟增加 NDMA 杂质的控制。

在经历全球范围内对沙坦类降压药和雷尼替丁胃药中含致癌物 NDMA 的恐慌之后，药品监管机构越来越警惕其他药物可能受到污染的风险。2019 年 12 月 5 日，美国 FDA 宣布开始检测一线降糖药二甲双胍的样品是否含有超过限度的致癌物 NDMA，如果发现二甲双胍药品中存在高含量的 NDMA，将酌情建议召回。至此，从缬沙坦到雷尼替丁，再到二甲双胍，由遗传毒性杂质 NDMA 引起的风波接连不断，NDMA 控制的重要性不言而喻。为了更好地对该类药物中的遗传毒性杂质进行质量控制，岛津公司开发了基于 GCMS、GCMS/MS、LC、LCMS/MS 以及 LCMS-QTOF 平台的相关药物中 NDMA 检测方法。

岛津公司作为全球著名的分析仪器厂商，自 1875 年创立以来，一直以“为了人类和地球的健康”为理念，始终以“以科学技术向社会做贡献”为宗旨，不断研发先进仪器、钻研先进技术，为不同行业提供突发事件、热点事件及行业难点提供解决方案。为了应对制药行业相关用户对遗传毒性杂质 NDMA 的检测需求，岛津分析中心精心推出这本《化学药中遗传毒性杂质 NDMA 的检测方案》，汇编了沙坦类原料、雷尼替丁原料与制剂以及二甲双胍原料与制剂中 NDMA 检测的应用文集，希望我们的工作对您有所帮助。

岛津企业管理中国有限公司
分析中心
2020 年 7 月

目录

一、遗传毒性杂质的概念和分类	2
二、NDMA 的基本信息	3
三、NDMA 杂质的来源及控制限度	3
四、NDMA 杂质的检测方法	4
五、沙坦类药物中 NDMA 的检测	5
1. GCMS 法用于缬沙坦药物中 NDMA 测定	5
2. GCMS 法测定缬沙坦原料药中遗传毒性杂质 NDMA 和 NDEA	8
3. HS-GCMS 检测厄贝沙坦原料药中 NDMA 和 NDEA	12
4. GCMSMS 法测定缬沙坦原料药中遗传毒性杂质 NDMA 和 NDEA	16
5. HS-GCMSMS 法测定厄贝沙坦原料药中 NDMA 与 NDEA	20
6. HPLC 应用于沙坦类原料药中 NDMA 和 NDEA 的检测	24
7. LCMS-8050 同时检测遗传毒性杂质 NDMA、NDEA 和 NMBA	29
六、替丁类药物中 NDMA 的检测	33
1. LCMS-8050 检测雷尼替丁中遗传毒性杂质 NDMA	33
2. LCMS-8050 检测尼扎替丁中基因毒性杂质 NDMA	39
3. LCMS-8050 检测枸橼酸铋雷尼替丁中遗传毒性杂质 NDMA	45
4. LCMS-QTOF 定量检测盐酸雷尼替丁原料药中的 NDMA	49
七、二甲双胍药品中 NDMA 的检测	54
1. GCMS 法测定二甲双胍药品中 NDMA 含量	54
2. GC-MSMS 法测定二甲双胍药品中 NDMA 含量	57
3. LCMS-8050 检测盐酸二甲双胍中遗传毒性杂质 NDMA	61
4. LCMS-8050 测定盐酸二甲双胍缓释片中 N-亚硝基二甲胺	66



遗传毒性杂质的概念和分类

药品中的杂质一般包括有机杂质、无机杂质和残留溶剂。遗传毒性杂质属于有机杂质的范畴，但不同于药品中的一般有机杂质。它是指化合物本身直接或间接损伤细胞 DNA，产生致突变和致癌的物质。遗传毒性杂质或称基因毒性杂质，早期由于翻译的不同大多习惯称之为基因毒性杂质。遗传毒性杂质对 DNA 的损害作用包括染色体断裂、DNA 重组及复制过程中共价键的插入和修饰，也包括在细胞水平上产生基因毒性物质而产生的突变。由于遗传毒性杂质在低暴露水平时就可能导致严重的毒性，存在重大的安全风险，所以评估和控制药品中的遗传毒性杂质是保障药品质量和安全的重点。

随着科学的进步和药品监管机制的日趋完善，遗传毒性杂质的控制要求也越来越明确。在 2006 年和 2008 年，欧洲药品管理局（EMA）联合美国医药研究与制造商协会（PhRMA）以及美国食品药品监督管理局（FDA）先后颁发了基因毒性杂质限度的相关指南（Guideline on the Limits of Genotoxic Impurities）。2014 年 ICH M7 正式发布，标志着 ICH 成员国对遗传毒性杂质的评估和控制初步达成了共识。ICH M7 为遗传毒性杂质的鉴别、分类、定性和控制提供了实用框架。在 ICH M7 指导原则中，根据诱变性和致癌性以及控制措施对杂质分为以下 5 类：

表 1. 遗传毒性杂质的分类及控制措施

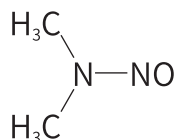
分类	定义	拟定控制措施
1	已知诱变致癌性	控制不高于化合物可接受限度
2	已知具有诱变性，致癌效应未知（细菌诱变呈阳性*，没有啮齿动物致癌数据）	控制不高于可接受限度（适当的 TTC）
3	警示结构，与原料药结构无关，无诱变性数据	控制不高于可接受限度（适当的 TTC）或检测细菌诱变含量 如果非诱变性 = 第 5 类；如果具有诱变性 = 第 2 类
4	警示结构，与原料药或有关物质有相同警示（例如，工艺中间体），经测试为无诱变性	与非诱变性杂质同等对待
5	无警示结构，或警示结果具有充分的证据证明其不具诱变性和致癌性	与非诱变性杂质同等对待

* 或其他相关阳性诱变数据，说明与诱导基因变性的 DNA 反应活性（例如，体内基因诱变研究显示阳性）

警示结构单元是指一些具有与遗传物质发生化学反应能力的特殊结构单元，会诱导基因突变或者导致染色体重排或断裂，从而具有潜在的致癌风险。警示结构单元是遗传毒性杂质识别的起点，细菌突变性试验（Ames 试验）是遗传毒性杂质判定的标准。EMA、FDA 及 ICH 相关指导原则均将警示结构作为区分普通杂质和潜在基因毒性杂质的主要标志。如果一个杂质具有“警示结构”，且该杂质的细菌突变试验结果为阳性时，则可以判断该化合物具有致突变性，为遗传毒性杂质。

NDMA 的基本信息

N-二甲基亚硝胺又称二甲基亚硝基胺，缩写为 NDMA，黄色液体，可溶于水、乙醇、乙醚、二氯甲烷，属于亚硝胺类化合物。NDMA 的合成通常由二甲胺与亚硝酸盐在酸性条件下反应生成。NDMA 在环境、工业产品、烟草及腌制食品中广泛存在，常用作溶剂、有机合成中间体等。分子式为 $C_2H_6N_2O$ ，分子量 74.08，结构式如下：



根据欧盟发布的《Development of structure alerts for the in vivo micronucleus assay in rodents》中的相关信息，可知 NDMA 的结构式中含有烷基亚硝酸盐的遗传毒性警示结构。此外，有文献报道，在已检测的 300 种亚硝胺类化合物中，已证实有 90% 至少可诱导一种动物致癌，其中乙基亚硝胺、二乙基亚硝胺和二甲基亚硝胺至少对 20 种动物具有致癌活性。根据 ICH M7 通则对基因毒性杂质的分类原则，NDMA 应属于第一类已知诱变性和致癌性的物质。在世界卫生组织国际癌症研究机构公布的致癌物清单中 NDMA 被列为 2A 类致癌物。

NDMA 杂质的来源及控制限度

遗传毒性杂质主要来源于原料药合成过程中的起始物料、中间体、试剂和反应副产物。此外，药物在合成、储存或者制剂生产过程中也可能会降解产生遗传毒性杂质。药物中 NDMA 的可能来源包含以下方面：

1. 硝酸环境下与体系中的二甲胺发生反应得到
2. 药物本身发生降解产生二甲胺，然后继续与硝酸盐反应得到
3. 生产工艺过程中使用了二甲胺前体试剂，由其发生降解得到
4. 药物含有二甲胺或者类似结构，通过氯化胺化或者氧化等途径降解产生 NDMA，如雷尼替丁、二甲双胍等
5. 药物合成过程中使用了叠氮试剂或亚硝酸盐，在有二甲胺供体的情况下反应生成 NDMA，如四氮唑类药物缬沙坦、厄贝沙坦、氯沙坦等
6. 其他途径引入，如制药用水、辅料等

参考 ICH M7 通则对遗传毒性杂质的分类原则，NDMA 应属于第一类已知具有基因毒性和致癌性的物质，其控制不高于化合物可接受限度 (AI)。根据 WHO 的数据，NDMA 的 AI 值为 0.005~0.016 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，换算后为 0.375~1.2 $\mu\text{g}/\text{天}$ 。但对于缬沙坦等患者需要长期服用的药物来说，对其中的遗传毒性杂质的控制要求则更为严格。“缬沙坦事件”后，中国药品监督管理局在官网上公示了国家药典委《关于缬沙坦国家标准修订稿》，增订了缬沙坦生产要求，规定了 NDMA 的限度不得过千万分之三（相当于 EMA 的暂定参考限定值 0.3 ppm）。“缬沙坦事件”持续发酵后，2018 年 12 月，FDA 发布了血管紧张素 II 受体拮抗剂 (ARB) 中亚硝胺杂质的临时可接受摄入水平供生产商用以确保其制剂产品对患者是安全的。从 FDA 发布的 ARB 药物中 NDMA 和 NDEA 临时限度列表可知，NDMA 的可接受摄入量为 96 ng/天。根据各 ARB 的最大日剂量，则可计算 NDMA 的可接受摄入含量。如缬沙坦以最大日剂量 320 mg 计，NDMA 的可接受含量为 0.3 ppm，与中国及 EMA 要求的限度相同。对于雷尼替丁，FDA 在公告信中提到，建议公司如检测发现 NDMA 超出可接受日摄入水平（雷尼替丁 96 ng/天或 0.32 ppm）则应召回其产品。同样地，在 FDA 的公告信中也提到二甲双胍中 NDMA 的可接受日摄入水平为 96 ng/天，根据该值及最大日剂量则可计算出二甲双胍药品中 NDMA 的限度控制水平。如盐酸二甲双胍片最大日剂量为 2 g，则该产品中 NDMA 的可接受摄入水平是 0.048 ppm。



NDMA 杂质的检测方法

药品中遗传毒性杂质 NDMA 的含量极微，控制限度比较低，对检测方法灵敏度提出了很高的要求。目前中国药典委员会、美国 FDA、欧洲药典委员会 EDQM 及加拿大卫生部等机构公布的 NDMA 检测方法主要有 GCMS、GC-MS/MS、LC、LC-HRMS、LC-MS/MS 法等。

表 2. 遗传毒性杂质 NDMA 的检测方法

序号	来源	检测化合物	仪器方法	国家或机构	发布时间
1	缬沙坦国家标准修订稿的公示	NDMA	GCMS 直接进样法	中国药典委员会	2018.8
2	缬沙坦国家标准修订稿的公示（第二次）	NDMA 和 NDEA	GCMS 直接进样法	中国药典委员会	2019.12
3	Swiss medic method	NDMA 和 NDEA	GCMS 顶空进样法	欧洲 EDQM	2018.7
4	CVUA Karlsruhe method	NDMA 和 NDEA	UHPLC-APCI-MS/MS	欧洲 EDQM	2019.4
5	PALG method	NDMA	GCMS 顶空进样法	欧洲 EDQM	2018.9
6	ANSM method	NDMA	HPLC-UV	欧洲 EDQM	2018.9
7	CVUA Karlsruhe method	NDMA	APCI-UHPLC-MS/MS	欧洲 EDQM	2018.9
8	FDA method	NDMA 和 NDEA	GC-MS/MS 直接进样法	美国 FDA	2018.12
9	FDA method	NDMA 和 NDEA	GCMS 顶空进样法	美国 FDA	2019.1
10	FDA method	NDMA、NDEA、NEIPA、NDIPA、NDBA	GC-MS/MS 直接进样法，GCMS 顶空进样法	美国 FDA	2019.4
11	FDA method	NDMA	LC-HRMS	美国 FDA	2019.9
12	FDA method	NDMA	LC-MS/MS	美国 FDA	2019.10
13	Health Canada method	NDMA 和 NDEA	GC-MS/MS 直接进样法	加拿大卫生部	2019.7

沙坦类药物中 NDMA 的检测

GCMS 法用于缬沙坦药物中 NDMA 测定

摘要：利用岛津 GCMS-QP2020 气质联用仪，建立了缬沙坦药物中 N-亚硝基二甲胺的分析方法。结果表明，5 $\mu\text{g/L}$ 的 N-亚硝基二甲胺信噪比为 26。该方法条件下 N-亚硝基二甲胺与二甲基甲酰胺的分离度为 2.7，达到基线分离。对 30 $\mu\text{g/L}$ 的 N-亚硝基二甲胺标准溶液进行重复实验，6 次平行进样，峰面积的 RSD% 为 3.99%。该方法简单、分析速度快、灵敏度高，满足药品中痕量基因毒物检测方面的需求。

关键词：GCMS 缬沙坦 N-亚硝基二甲胺 NDMA

缬沙坦是一款血管紧张素 II 受体拮抗剂抗高血压类药物，具有降血压效果持久稳定，毒副作用小的特点。近期，缬沙坦原料药查出“毒性”杂质 N-亚硝基二甲胺 (NDMA) 事件，成为了舆论的焦点。NDMA 为缬沙坦原料药特定生产工艺中可能产生的潜在基因毒性杂质。经过动物实验，NDMA 已确定为动物致癌物，靶器官主要为肝和肾。美国政府工业卫生学家协会 (ACGIH) 将 NDMA 列为人类可疑化学致癌物。根据毒理学数据推算 NDMA 的每日最大摄入限量为 0.1 μg 。

8 月 17 日，国家药典委员会发布拟修订缬沙坦药典标准（《中国药典》2015 年版二部第 1547 页）公示，就缬沙坦标准公示稿向社会公开征求意见。较现行缬沙坦药典标准，公示稿明确：生产企业应评估生产工艺形成 N-亚硝基二甲胺的可能性；必要时，需对生产工艺进行验证以说明在成品中 N-亚硝基二甲胺的含量符合规定。

应对 NDMA 安全事件，建立测定缬沙坦 NDMA 有效分析方法至关重要。本文建立了 NDMA 的气相色谱质谱法，该方法快速、有效，灵敏度能满足对痕量基因毒物分析的需求。

实验部分

1.1 仪器

气相色谱质谱联用仪：GCMS-QP2020

1.2 分析条件

色谱柱：Rtx-WAX (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm)	进样方式：不分流
柱温程序：45 $^{\circ}\text{C}$ (1min) _ 8 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ _ 125 $^{\circ}\text{C}$ _ 25 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ _ 200 $^{\circ}\text{C}$ (2 min)	进样时间：1 min
载气控制方式：恒线速度	离子源温度：230 $^{\circ}\text{C}$ (EI)
线速度：36.2 cm/sec	接口温度：220 $^{\circ}\text{C}$
	采集模式：SIM 法 (采集参数见表 1)

表 1. 化合物信息

No.	中文名称	英文名	CAS 号	T(m/z)	Ref.1
1	N-亚硝基二甲胺	N-Nitrosodimethylamine	62-75-9	74	42
2	二甲基甲酰胺	N,N-Dimethylformamide	68-12-2	73	42

1.3 标液配置

1.3.1 系统适用性溶液：将 NDMA 和二甲基甲酰胺配制成 6 mg/L 的混合溶液待用。

1.3.2 灵敏度溶液：将 NDMA 标准溶液稀释至 5 $\mu\text{g/L}$ 待用。

1.3.3 对照品溶液：将 NDMA 标准溶液稀释至 30 $\mu\text{g/L}$ 待用。



1.4 样品前处理

精密称取供试品，使称取的供试品中缬沙坦含量约为 0.1 g，溶解于 1 mL 甲醇中，充分混合后静置，取上清液上机测试。

■ 结果与讨论

2.1 系统适用性实验

系统适用性溶液的 TIC 图谱见图 1(SCAN 模式)，SIM 模式 MC 图 (30 $\mu\text{g/L}$) 如图 2 所示。

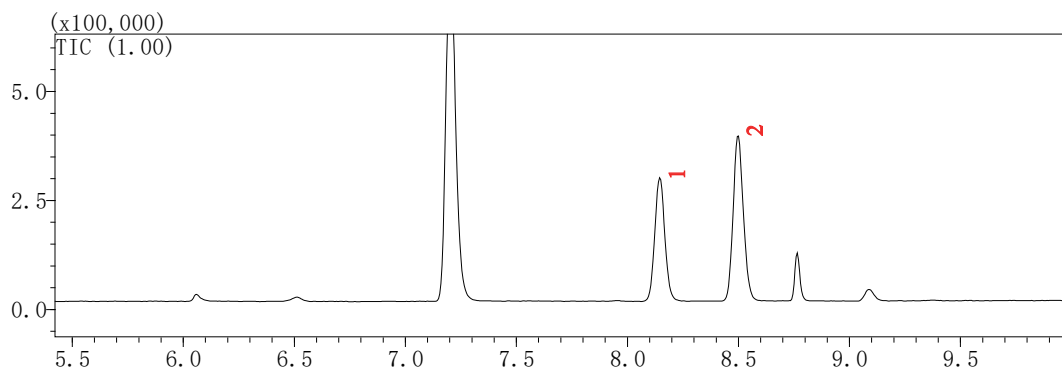


图 1. 系统适用性溶液 TIC 图 (6 mg/L)

表 2. 物质出峰信息表

No.	组分名称	保留时间 (min)	峰底宽 (min)
1	N- 亚硝基二甲胺	8.145	0.12
2	二甲基甲酰胺	8.497	0.14

根据分离度计算公式 $R = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2}$ 计算得出 N- 亚硝基二甲胺和二甲基甲酰胺的分离度为 2.7，达到基线分离。

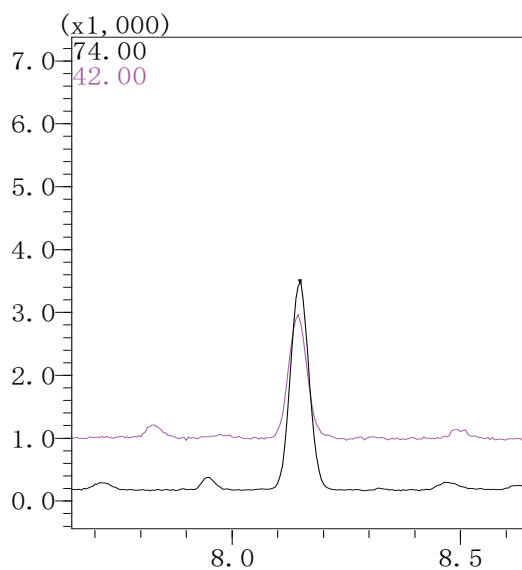


图 2. N- 亚硝基二甲胺的 MC 图 (30 $\mu\text{g/L}$)

2.2 灵敏度实验

使用选择离子监测模式 (SIM) 对 5 $\mu\text{g/L}$ 的 N-亚硝基二甲胺标准溶液进行测试, 计算质量色谱 m/z 74 主峰的信噪比为 26.56。

2.3 重复性结果

对 30 $\mu\text{g/L}$ 的标准样品, 重复进样 6 次, N-亚硝基甲酰胺峰面积的 RSD% 见表 3。

表 3. 重复性结果

No.	组分名称	RSD%
1	N-亚甲基二甲胺	3.99

2.4 实际样品测试结果

对市售的缬沙坦药物进行检测, 检测结果见下表。

表 4. 实际样品测试结果

No.	名称	含量 (ng/g)
1	缬沙坦胶囊	ND
2	缬沙坦氨氯地平片	ND

注: ND 表示未检出

■ 结论

本文利用岛津 GCMS-QP2020 气质联用仪对缬沙坦药物中可能产生的 N-亚硝基二甲胺进行分析。方法灵敏度高, 测定下限小于 5 $\mu\text{g/L}$; 重复性好, 使用 30 $\mu\text{g/L}$ 的标准溶液重复测试 6 次, 峰面积的 RSD% 为 3.99%; 分离效果好, N-亚硝基二甲胺与二甲基甲酰胺基线分离, 二甲基甲酰胺不会干扰 NDMA 的测定。该方法能够满足分析检测的要求。



GCMS 法测定缬沙坦原料药中遗传毒性杂质 NDMA 和 NDEA

摘要: 本文利用岛津 GCMS-QP2020 气相色谱质谱联用仪, 建立了缬沙坦原料药中遗传毒性杂质 N-亚硝基二甲胺 (NDMA)、N-亚硝基二乙胺 (NDEA) 的液体进样检测方法。在 1.0~100 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内 NDMA、NDEA 线性关系良好, 相关系数均达到 0.999 以上。1.0 $\mu\text{g/L}$ 标准品溶液连续进样 6 针, 峰面积 RSD 小于 5.4%。实际样品加标回收率为 89.0%~107.6%。该方法简单、成本较低, 灵敏度满足原料药中痕量杂质成分的检测要求。相对于 GCMSMS 方法, 该法在实际样品测试时, 辅助定性离子易受干扰, 为保证测量准确性, 样品测试时需增加加标回收等质控措施。

关键词: GCMS 缬沙坦 遗传毒性杂质 NDMA NDEA

亚硝基化合物是一类强致癌有机化合物, 亚硝胺化合物由前体物质硝酸盐、亚硝酸盐和胺类通过化学或生物学途径合成。这类物质广泛存在于食品、饮用水、外界环境中。根据 ICH M7 通则对基因毒性杂质的分类, NDMA 应属于【第一类: 已知的、具有基因毒性 (突变性) 和致癌性的物质。控制不高于化合物可接受限度 (AI) 。】根据 WHO 的数据, NDMA 的 AI 值为 0.005-0.016 $\mu\text{g/kg}$, 换算后为 0.375-1.2 $\mu\text{g/天}$ 。

缬沙坦属于血管紧张素 II 受体拮抗剂 (沙坦类, ARB), 是多年来高血压治疗领域的主流产品, 也是全球市场上最大一类抗高血压药物。近期, 缬沙坦原料药中出现 NDMA 杂质, 引发社会关注。值得注意的是对于高血压患者来说, 缬沙坦等抗高血压药物需要长期服用, 所以对其中的遗传毒性杂质检测要求更为严格。由于药品中的 NDMA、NDEA 含量极微, 这就对检测方法灵敏度提出了更高的要求。

本文采用岛津 GCMS-QP2020 建立了缬沙坦原料药中遗传毒性杂质 NDMA、NDEA 的检测方法。

实验部分

1.1 仪器

GCMS-QP2020 气相色谱 - 质谱联用仪

1.2 分析条件

色谱柱: Rtx-WAX (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm)

柱温程序: 40 $^{\circ}\text{C}$ (1 min)_15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ _160 $^{\circ}\text{C}$ _
40 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ _240 $^{\circ}\text{C}$ (10 min)

进样口温度: 220 $^{\circ}\text{C}$

流速控制方式: 恒线速度方式

线速度: 44.2 mL/min

采集模式: SIM, 离子信息见表 1

进样方式: 不分流进样

高压进样: 250 kPa (1 min)

离子化方式: EI

离子源温度: 230 $^{\circ}\text{C}$

色谱质谱接口温度: 250 $^{\circ}\text{C}$

检测器电压: 调谐电压 +0.3 kV

样品前处理

准确称取 0.5 g 样品于 15 mL 离心管中, 加入 5 mL 甲醇溶液, 涡旋混匀 1 min, 将混匀的样品转移至离心管中, 在 4000 rpm 离心 2.5 min, 用注射器吸取约 2 mL 上清液经 0.45 μm 尼龙滤膜过滤, 取中段滤液至 2 mL 进样小瓶中, 直接上 GCMS 分析。

结果与讨论

3.1 标准溶液谱图

标准溶液 SIM 图见图 1, 各组分 SIM 图见图 2。

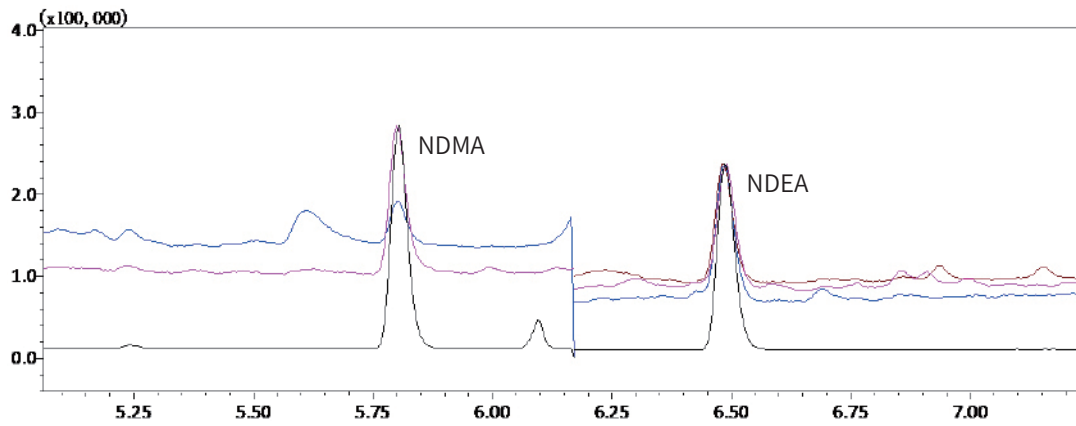


图 1. 标准溶液 SIM 图 (100 µg/L)

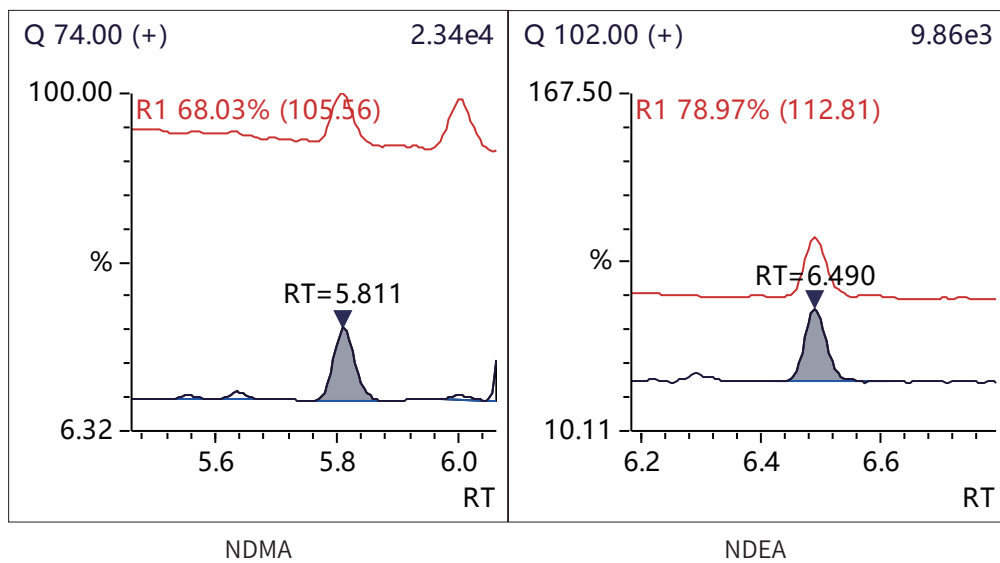


图 2. 目标组分 SIM 图 (1 µg/L)

表 1. 各组分信息

No.	名称	CAS 号	保留时间 (min)	定量离子	定性离子
1	NDMA	62-75-9	5.811	74	42
2	NDEA	55-18-5	6.490	102	56

3.2 标准曲线和检出限

分别配制浓度为 1.0、2.0、5.0、10、30、50、100 µg/L 的混合标准溶液，取 1 µL 进样，以浓度为横坐标，峰面积比为纵坐标绘制标准曲线，化合物标准曲线如图 3 所示。使用 2 µg/L 标样，对仪器灵敏度进行测试，信噪比结果、线性相关系数见表 2。



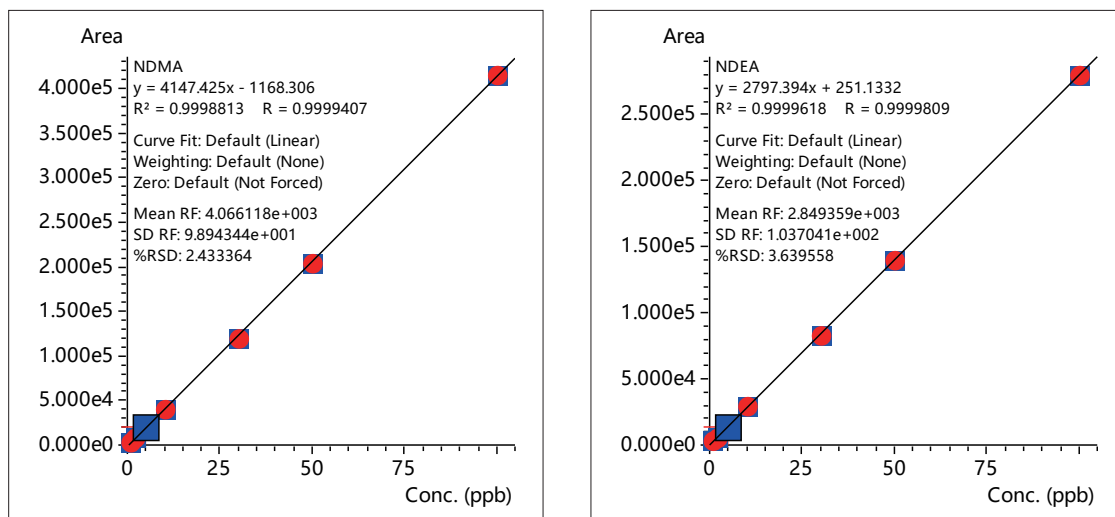


图 3. 化合物标准曲线

表 2. 相关系数及灵敏度测试结果

ID	组分名称	相关系数 (R)	2.0 µg/L 标准溶液信噪比
1	NDMA	0.9999	36.79
2	NDEA	0.9999	31.49

3.3 重复性实验

取 1.0 µg/L 标准品溶液，连续进样 6 次，考察仪器的重复性，测定结果见表 3。

表 3. 重复性测试结果

No.	组分	面积 1	面积 2	面积 3	面积 4	面积 5	面积 6	RSD (%)
1	NDMA	4230	4388	4138	3959	4173	4279	3.45
2	NDEA	2774	2942	3010	3059	3226	3163	5.33

3.4 加标回收率

对 2 个缬沙坦原料药样品进行加标测试，加标浓度为 50 和 200 ng/g，NDMA 结果见表 4，NDEA 结果见表 5。

表 4. NDMA 样品测试及回收率结果

No.	样品测试结果 (ng/g)	加标量 (50 ng/g)		加标量 (200 ng/g)	
		加标测试结果 (ng/g)	加标回收率 (%)	加标测试结果 (ng/g)	加标回收率 (%)
1	7.24	54.34	94.2	198.62	95.7
2	28.68	73.71	90.1	243.85	107.6

表 5. NDEA 样品测试及回收率结果

No.	样品测试结果 (ng/g)	加标量 (50 ng/g)		加标量 (200 ng/g)	
		加标测试结果 (ng/g)	加标回收率 (%)	加标测试结果 (ng/g)	加标回收率 (%)
1	9.71	58.02	96.6	196.48	93.4
2	57.35	107.79	100.9	235.27	89.0

■ 结论

本方法采用岛津 GCMS-QP2020 液体进样检测遗传毒性杂质 NDMA、NDEA，在 1.0~100 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内标准曲线线性良好，相关系数均在 0.999 以上。1.0 $\mu\text{g/L}$ 标准品溶液连续进样 6 针，峰面积 RSD 小于 5.40%，精密度良好。对 2 个样品进行 50 ng/g、200 ng/g 两个浓度加标，加标回收率为 89.0%~107.6%。方法简单方便，灵敏度好，满足缬沙坦原料药中痕量遗传毒性杂质 NDMA、NDEA 的检测。相对于 GCMSMS 方法，该法在实际样品测试时，辅助定性离子易受干扰，为保证测量准确性，样品测试时需采取加标回收等质控措施。



HS-GCMS 检测厄贝沙坦原料药中 NDMA 和 NDEA

摘要：本文利用岛津公司 GCMS-QP2020 NX 气相色谱 - 质谱联用仪结合 HS-20 顶空进样器，建立了原料药厄贝沙坦中 N-亚硝基二甲胺和 N-亚硝基二乙胺的同时测定方法。在 10~500 ng/mL 浓度范围内各组分线性关系良好，相关系数均达到 0.999 以上，100 ng/mL 标准品溶液连续进样 6 针，各组分峰面积 RSD 均小于 2.40%。阴性空白样品在 40, 80, 160 ng/mL 加标浓度时，回收率为 100.6%-104.6%，阳性空白样品回收率为 101.8%-108.7%。该方法简单方便，顶空进样不污染气化室，能够有效的检测原料药厄贝沙坦中 N-亚硝基二甲胺和 N-亚硝基二乙胺的含量。

关键词：顶空进样 气相色谱 - 质谱联用仪 沙坦类药物 亚硝胺 NDMA NDEA

根据世界卫生组织国际癌症研究机构致癌物清单¹，N-亚硝基二甲胺（N-Nitrosodimethylamine, NDMA）和 N-亚硝基二乙胺（N-Nitrosodiethylamine, NDEA）均属于 2A 类致癌物质，在 ICH M7 指南中明确该类化合物具有较高致癌性，对实验动物致癌性证据充分。

2018 年 7 月，欧盟药品管理局报道在其对浙江某企业含有缬沙坦原料药的药物抽查汇总发现了杂质 NDMA，其平均含量达 66.5 ppm，超过欧盟标准 0.3 ppm²。随后全球已有包括美国，加拿大，挪威，德国等 22 个国家召回共 2300 批该企业的含有沙坦类原料药的降压药。

相关药企沙坦原料药中的 NDMA 经推断疑似来源于药物合成过程中使用的溶剂 N,N-二甲基甲酰胺（DMF）与亚硝酸钠在酸性条件下反应产生的微量副产物，即 NDMA。由于通用工艺原因，厄贝沙坦和氯沙坦等沙坦类药物中也相继发现了 NDMA 和 NDEA 杂质的存在。为确保药物产品质量，控制潜在风险，很多制药公司已经将 NDMA 和 NDEA 纳入沙坦类原料药内控质量标准中。

本文参考现行《中国药典》缬沙坦国家标准修订稿公示（第二次）中 N-亚硝基二甲胺和 N-亚硝基二乙胺检查法和美国 FDA 直接进样方法（Combined direct injection N-Nitrosodimethylamine (NDMA) and N-Nitrosodiethylamine (NDEA) impurity assay by GC/MS）和顶空进样方法（Combined N-Nitrosodimethylamine (NDMA) and N-Nitrosodiethylamine (NDEA) impurity assay by GC/MS-Headspace），建立了厄贝沙坦中 N-亚硝基二甲胺和 N-亚硝基二乙胺的检测方法。本方法检出限低，重现性好，顶空进样可明显降低高浓度样品直接进样对色谱气化室的污染，可以为沙坦类原料药中基因毒性杂质的检测提供参考。

实验部分

1.1 仪器

GCMS-QP2020 NX 气相色谱 - 质谱联用仪

HS-20 顶空进样系统

AP135W 高性能电子天平

1.2 试剂

NDMA 和 NDEA 对照品（中国食品药品检定研究院）

NMP 溶剂（Headspace GC Grade, K50085197815, Merck, Germany）

1.3 分析条件

HS-20 条件：

平衡温度：130 °C

平衡时间：15 min

定量环温度：150 °C

进样时间：2 min

传输线温度：160 °C

GC-MS 条件:

色谱柱: SH-Rtx-Wax (30 m×0.25 mm×0.5 μm)
柱温程序: 60 °C (0.5 min)_15 °C /min_150 °C _
20 °C /min_240 °C (2 min)

进样方式: 不分流

流速控制方式: 线速度

线速度: 51.6 cm/sec

离子化方式: EI

离子源温度: 230 °C

接口温度: 230 °C

检测器电压: 调谐电压 +0.2 kV

采集模式: SIM, 离子信息见表 1

样品前处理

空白溶液: N- 甲基吡咯烷酮 (NMP)。

标准溶液: 采用天平精密称取适量对照品, 以 NMP 为溶剂, 制备浓度约为 700 μg/ml 的贮备液。移取适量体积 NDMA 和 NDEA 标准品贮备溶液, 加 NMP 定量稀释制成浓度为对照品 1000 ng/mL 溶液。

线性溶液: 准确移取适量体积标准溶液至容量瓶中, 用 NMP 逐级定量稀释制成浓度为 10, 30, 50, 100, 250, 500 ng/mL 的溶液。

供试品溶液: 精密称取厄贝沙坦原料药适量, 加 NMP 溶解并定量稀释制成 100 mg/mL 的溶液。

取 2 mL 以上样品至 20 mL 顶空瓶中, 迅速密封, 上机待测。

结果与讨论

3.1 NDMA 和 NDEA 标准溶液谱图

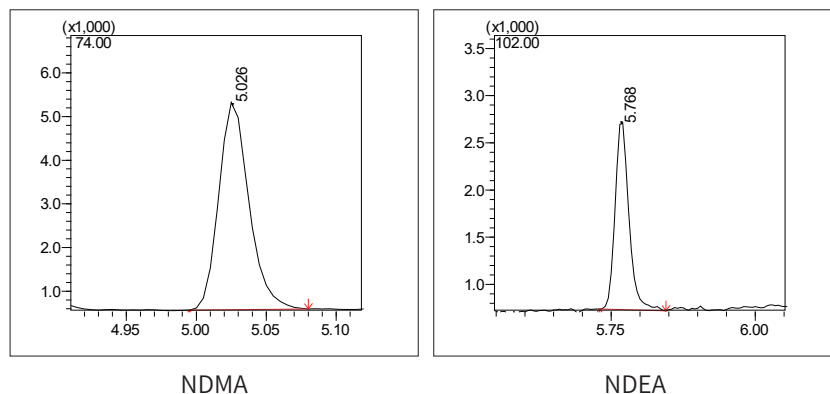


图 1. NDMA 和 NDEA 色谱图 (100 ng/mL)

表 1. NDMA 和 NDEA 组分信息

No.	中文名称	英文名称	CAS 号	保留时间	特征离子
1	N- 二甲基亚硝胺	N-Nitrosodimethylamine	62-75-9	5.025	74.00
2	N- 二乙基亚硝胺	N-Nitrosodiethylamine	55-18-5	5.770	102.00

3.2 标准曲线和检出限

向 6 个 20 mL 顶空瓶中各加入 2 mL 浓度分别为 10、30、50、100、250、500 ng/mL 的 NDMA 和 NDEA 混标, 顶空进样, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标做标准曲线, 标准曲线如图 2 所示。参照 ICH Q2 (R1) 方法学验证指南³, 使用标准曲线 y 轴截距标准偏差与斜率计算检出限 (LOD) 和定量限 (LOQ), 得到 NDMA 的 LOD 和 LOQ 分别为 1.71 ng/mL 和 5.18 ng/mL, NDEA 的 LOD 和 LOQ 分别为 4.53 ng/mL 和 13.74 ng/mL。



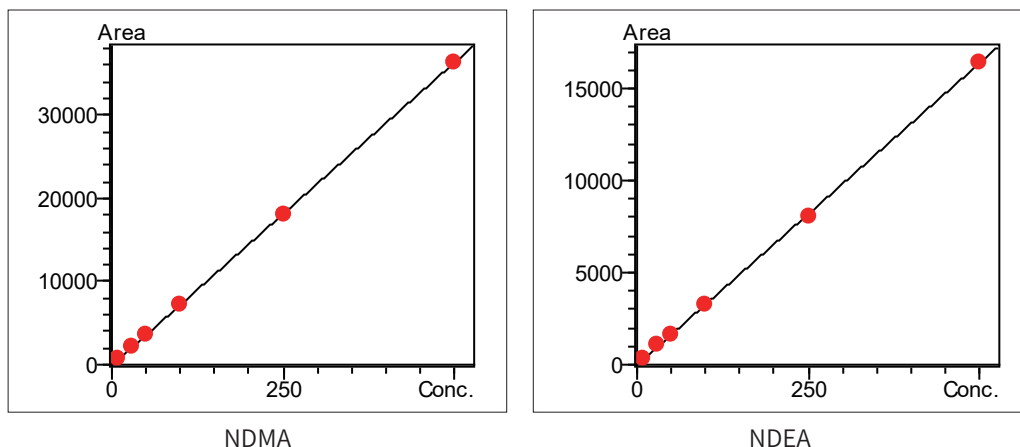


图 2. NDMA 和 NDEA 标准曲线

表 2. NDMA 和 NDEA 线性相关系数及检出限量限

ID	组分名称	相关系数 (R^2)	定量限 (ng/mL)	检出限 (ng/mL)
1	NDMA	0.9999	5.18	1.71
2	NDEA	0.9998	13.74	4.53

3.3 重复性和回收率实验

取 100 ng/mL 标准品溶液，连续进样 6 次，考察仪器的重复性，测定结果见表 3。

表 3. NDMA 和 NDEA 重复性结果

ID	组分名称	峰面积 1	峰面积 2	峰面积 3	峰面积 4	峰面积 5	峰面积 6	RSD(%)
1	NDMA	7154	7060	7201	7313	7425	7387	1.96
2	NDEA	3140	3186	3175	3235	3338	3303	2.40

3.4 加标回收率

平行精密称取 1.0 g 厄贝沙坦供试品粉末 9 份至 9 个 10 mL 容量瓶中，分别加含对照品 400 ng，800 ng，1600 ng 的标准溶液，每个浓度各 3 份，用 N-甲基吡咯烷酮稀释至刻度，得到含对照品浓度 40 ng/mL，80 ng/mL，160 ng/mL 的供试品溶液各 3 份。阴性样品添加回收率结果如表 4 和表 5 所示。

表 4. 阴性样品 NDMA 添加回收率结果

ID	加标浓度 (ng/mL)	平均加标检测浓度 (ng/mL)	平均回收率 (%)	RSD(%)
1	40	41.73	104.3	2.59
2	80	82.78	103.5	1.53
3	160	167.41	104.6	1.27

表 5. 阴性样品 NDEA 添加回收率结果

ID	加标浓度 (ng/mL)	平均加标检测浓度 (ng/mL)	平均回收率 (%)	RSD(%)
1	40	40.24	100.6	1.81
2	80	81.92	102.4	1.52
3	160	165.05	103.2	1.96

3.5 样品测试结果

取 3 种厄贝沙坦原料药供试品, 按照上述前处理方法进行样品前处理, 测定结果如表 6 所示, 样品 1 和样品 2 均无杂质检出, 样品 3 中检出 NDEA。随后将样品 3 作为阳性样品进行加标回收实验, 阳性样品 NDEA 添加回收率结果如表 7 所示。

表 6. 样品中 NDMA 和 NDEA 测定结果

No.	中文名称	样品 1	样品 2	样品 3
1	NDMA	N.D	N.D	N.D
2	NDEA	N.D	N.D	35.88 ng/mL

注: N.D 为未检出

表 7. 阳性样品 NDEA 添加回收率结果

ID	加标浓度 (ng/mL)	平均加标检测浓度 (ng/mL)	平均回收率 (%)	RSD(%)
1	40	79.85	108.7	2.68
2	80	117.84	101.8	1.13
3	160	205.93	106.2	2.13

■ 结论

本方法采用岛津 GCMS-QP2020 NX 结合 HS-20 顶空进样器建立了厄贝沙坦原料药中 NDMA 和 NDEA 的检测方法。该方法在 10~500 ng/mL 范围内标准曲线线性良好, 相关系数大于 0.999, NDMA 的检出限和定量限分别为 1.71 ng/mL 和 5.18 ng/mL, NDEA 的检出限和定量限分别为 4.53 ng/mL 和 13.74 ng/mL。采用阳性样品厄贝沙坦原料药 NDEA 的低中高加标回收率分别为 108.7%, 101.8%, 106.2%。该方法采用直接顶空检测, 简单方便, 不污染色谱气化室, 能有效应用于检测厄贝沙坦原料药中 NDMA 和 NDEA 的含量。

参考文献

1. 世界卫生组织国际癌症研究机构致癌物清单, <https://monographs.iarc.fr>
2. CHMP list of outstanding issues, European Medicines Agency, EMA/CHMP/668548/2018
3. ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)



GCMSMS 法测定缬沙坦原料药中遗传毒性杂质 NDMA 和 NDEA

摘要：本文利用岛津 GCMS-TQ8040 NX 三重四极杆气质联用仪，建立了缬沙坦原料药中遗传毒性杂质 N-亚硝基二甲胺 (NDMA)、N-亚硝基二乙胺 (NDEA) 的液体进样检测方法。在 2.5~300 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内 NDMA、NDEA 线性关系良好，相关系数均达到 0.999 以上。2.5 $\mu\text{g/L}$ 标准品溶液连续进样 6 针，峰面积 RSD 小于 4.60%。实际样品加标回收率为 86.6%~123.3%。该方法简单、抗干扰能力强，灵敏度高，满足原料药中痕量杂质成分的检测。

关键词：GCMSMS 缬沙坦 原料药 遗传毒性杂质 NDMA NDEA

亚硝基化合物是一类强致癌有机化合物，亚硝胺化合物由前体物质硝酸盐、亚硝酸盐和胺类通过化学或生物学途径合成。这类物质广泛存在于食品、饮用水、外界环境中。根据 ICH M7 通则对基因毒性杂质的分类，NDMA 应属于【第一类：已知的、具有基因毒性（突变性）和致癌性的物质。控制不高于化合物可接受限度 (AI) 。】根据 WHO 的数据，NDMA 的 AI 值为 0.005-0.016 $\mu\text{g/kg}$ ，换算后为 0.375-1.2 $\mu\text{g/天}$ 。

缬沙坦属于血管紧张素 II 受体拮抗剂（沙坦类，ARB），是多年来高血压治疗领域的主流产品，也是全球市场上最大一类抗高血压药物。近期，缬沙坦原料药中出现 NDMA 杂质，引发社会关注。值得注意的是对于高血压患者来说，缬沙坦等抗高血压药物需要长期服用，所以对其中的遗传毒性杂质检测要求更为严格。由于药品中的 NDMA、NDEA 含量极微，这就对检测方法灵敏度提出了更高的要求。

本文采用岛津 GCMS-TQ8040 NX 建立了缬沙坦原料药中遗传毒性杂质 NDMA、NDEA 的检测方法。

实验部分

1.1 仪器

GCMS-TQ8040 NX 三重四极杆气相色谱 - 质谱联用仪

1.2 分析条件

色谱柱：Rtx-WAX (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm)

柱温程序：40 $^{\circ}\text{C}$ (1 min)_10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ _120 $^{\circ}\text{C}$ _
30 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ _240 $^{\circ}\text{C}$ (5 min)

进样口温度：250 $^{\circ}\text{C}$

流速控制方式：恒线速度方式

线速度：44.2 mL/min

采集模式：MRM，离子信息见表 1

进样方式：不分流进样

高压进样：250 kPa (1 min)

离子化方式：EI

离子源温度：230 $^{\circ}\text{C}$

色谱质谱接口温度：250 $^{\circ}\text{C}$

检测器电压：调谐电压 +0.5 kV

样品前处理

准确称取 0.5 g 样品于 15 mL 离心管中，加入 5 mL 二氯甲烷溶液，10 μL 50 mg/L 的 NDMA-D6 内标溶液涡旋混匀 1 min，将混匀的样品转移至离心管中，在 4000 rpm 离心 2.5 min，用注射器吸取约 2 mL 上清液经 0.45 μm 尼龙滤膜过滤至 2 mL 进样小瓶中，直接上 GCMSMS 分析。

结果与讨论

3.1 标准溶液谱图

标准溶液 MRM 图见图 1，各组分 MRM 图见图 2。

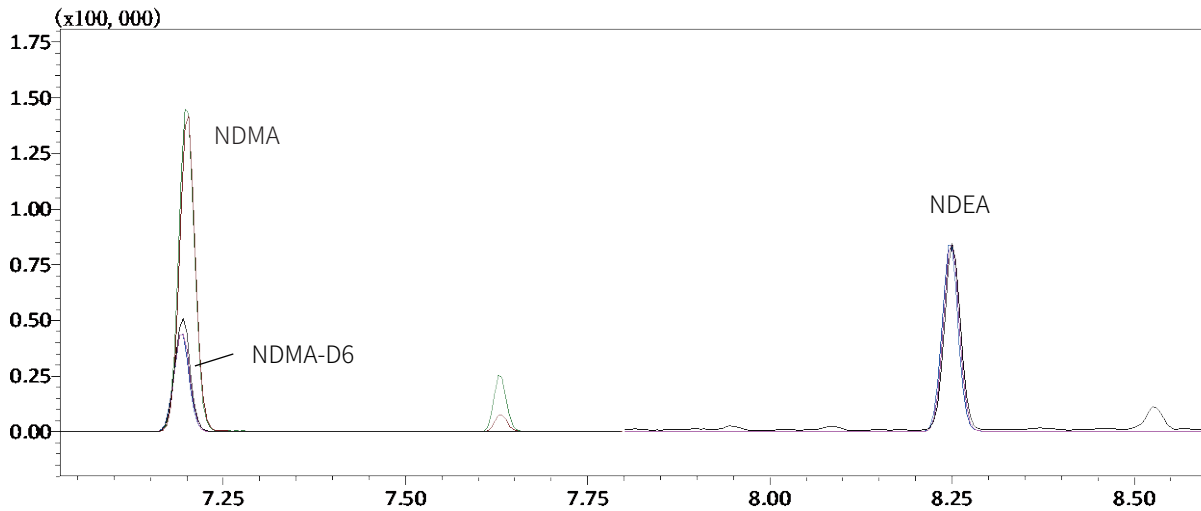


图 1. 标准溶液 TIC 图 (300 µg/L)

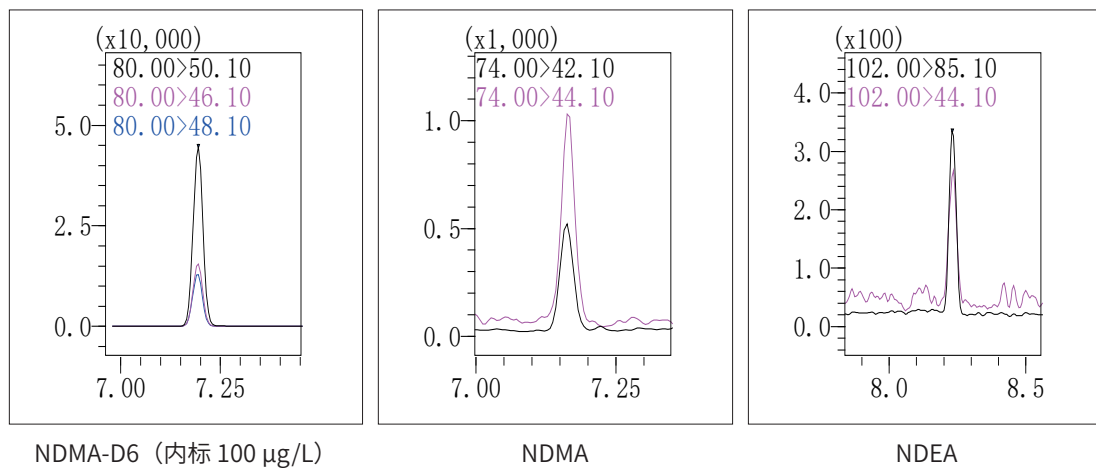


图 2. 各组分 MRM 图 (2.5 µg/L)

表 1. 各组分信息

No.	名称	CAS 号	保留时间 (min)	定量离子对	CE	定性离子对 1	CE	定性离子对 2	CE
1	NDMA-D6	17829-05-9	7.156	80.00>50.1	6	80.00>46.10	24	80.00>48.10	12
2	NDMA	62-75-9	7.161	74.00>42.10	21	74.00>44.10	6		
3	NDEA	55-18-5	8.234	102.00>85.10	6	102.00>44.10	12		

3.2 标准曲线和检出限

分别配制浓度为 2.5、5、10、25、50、80、100、300 µg/L 的混合标准溶液，加入 NDMA-D6 作为内标，使内标浓度为 100 µg/L，取 1 µL 进样，以浓度比为横坐标，峰面积比为纵坐标绘制标准曲线，化合物标准曲线如图 3 所示。使用 2.5 µg/L 标样，对仪器灵敏度进行测试，信噪比结果、线性相关系数见表 2。



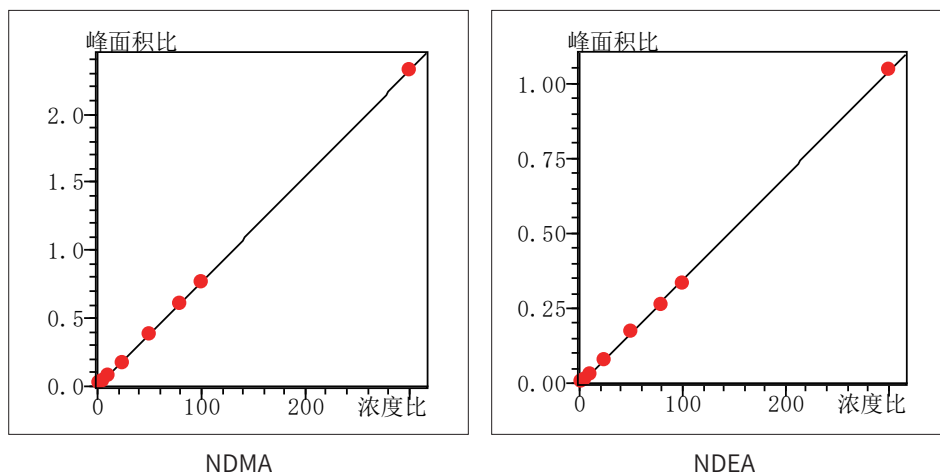


图 3. 化合物标准曲线

表 2. 相关系数及灵敏度测试结果

ID	组分名称	相关系数 (R)	2.5 $\mu\text{g/L}$ 标准溶液信噪比
1	NDMA	0.9999	23.39
2	NDEA	0.9998	35.81

3.3 重复性实验

取 2.5 $\mu\text{g/L}$ 标准品溶液，连续进样 6 次，考察仪器的重复性，测定结果见表 3。

表 3. 重复性测试结果

No.	组分	面积 1	面积 2	面积 3	面积 4	面积 5	面积 6	RSD (%)
1	NDMA	772	756	768	705	776	770	3.52
2	NDEA	552	520	552	563	508	572	4.60

3.4 加标回收率

对 6 个缬沙坦原料药样品进行 25 ng/g 、250 ng/g 、500 ng/g 加标，NDMA 结果见表 4，NDEA 结果见表 5。

表 4. NDMA 样品测试及回收率结果

No.	样品测试结果 (ng/g)	加标量 (25 ng/g)		加标量 (250 ng/g)		加标量 (500 ng/g)	
		加标测试结果 (ng/g)	加标回收率 (%)	加标测试结果 (ng/g)	加标回收率 (%)	加标测试结果 (ng/g)	加标回收率 (%)
1	0.00	23.15	92.58	233.93	93.57	540.35	108.07
2	0.00	29.10	116.40	230.20	92.08	526.28	105.26
3	0.00	26.82	107.26	240.28	96.11	511.59	102.32
4	13.61	35.26	86.60	233.40	87.92	630.04	123.28
5	0.00	27.51	110.05	244.53	97.81	519.38	103.88
6	0.00	22.59	90.37	232.90	93.16	545.94	109.19

表 5. NDEA 样品测试及回收率结果

No.	样品测试结果 (ng/g)	加标量 (25 ng/g)		加标量 (250 ng/g)		加标量 (500 ng/g)	
		加标测试结果 (ng/g)	加标回收率 (%)	加标测试结果 (ng/g)	加标回收率 (%)	加标测试结果 (ng/g)	加标回收率 (%)
1	7.71	39.31	126.41	257.72	100.00	535.35	105.53
2	10.69	40.51	119.27	266.07	102.15	521.41	102.14
3	13.05	37.08	96.12	260.60	99.02	506.86	98.76
4	12.47	37.09	98.51	255.30	97.13	624.21	122.35
5	0.00	24.18	96.71	253.50	101.40	514.58	102.92
6	0.00	27.55	110.18	234.99	94.00	540.89	108.18

结论

本方法采用岛津 GCMS-TQ8040 NX 液体进样检测遗传毒性杂质 NDMA、NDEA，在 2.5~300 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内标准曲线线性良好，相关系数均在 0.999 以上。2.5 $\mu\text{g/L}$ 标准品溶液连续进样 6 针，峰面积 RSD 小于 4.60%，精密度良好。对 6 个样品进行低、中、高浓度加标，加标回收率为 86.6%~123.3%。该方法简单方便，灵敏度好，满足缬沙坦原料药中痕量遗传毒性杂质 NDMA、NDEA 的检测。



HS-GCMSMS 法测定厄贝沙坦原料药中 NDMA 与 NDEA

摘要：本文使用岛津公司三重四极杆气质联用仪 GCMS-TQ8050 结合顶空进样建立了一种快速检测原料药厄贝沙坦中 N-亚硝基二甲胺 (NDMA) 与 N-亚硝基二乙胺 (NDEA) 的方法。在两个浓度范围 0.025~0.5 μg 与 0.025~100 μg 两种物质均表现出良好线性，相关系数达到 0.999 以上，方法检出限 (LOD) NDMA 为 0.013 μg ，NDEA 为 0.0024 μg 。标准品连续进样 6 针，0.1 μg 与 5 μg 峰面积 RSD 分别小于 3% 与 2%。0.1 μg 、0.2 μg 与 5 μg 的加标平均回收率在 96.2%~106.4% 之间。该方法简单方便，可以较好的应用于厄贝沙坦原料药中 NDMA 和 NDEA 的含量的测定。

关键词：三重四极杆气相色谱质谱联用仪 NDMA NDEA 厄贝沙坦

N-亚硝基二甲胺 (NDMA) 和 N-亚硝基二乙胺 (NDEA) 是两种亚硝胺类物质，根据 2017 年世界卫生组织国际癌症研究机构公布的致癌物清单这两种物质均属于 2A 类致癌物，而在 ICH M7 指南中明确这两种化合物具有较高致癌性，对实验动物致癌性证据充分。

2018 年 7 月中国浙江某制药企业爆发“缬沙坦事件”在业内引起震动，其出口的缬沙坦原料药被欧洲药品管理局查出含有杂质 NDMA。此事造成大量含有缬沙坦原料药的药品被召回。随着事态的发酵，厄贝沙坦和氯沙坦等沙坦类药物中也相继发现了 NDMA 与 NDEA 杂质的存在，这可能是沙坦类原料的通用工艺造成的。目前已有不少制药企业将 NDMA 与 NDEA 纳入沙坦类药物的质量控制中。

目前 NDMA 与 NDEA 的检测方法有气质法与顶空 + 气质法等。本文参考美国 FDA 顶空进样方法采用顶空 + 三重四极杆气质建立了厄贝沙坦中 NDMA 与 NDEA 的检测方法。本方法灵敏度高，重现性好，顶空进样可避免直接注入药品溶液对仪器造成污染，使用三重四极杆检测可提高检测的灵敏度。

实验部分

1.1 仪器

GCMS-TQ8050 三重四极杆气相色谱质谱联用仪

HS-20 顶空进样系统

1.2 分析条件

顶空条件

平衡温度：130 $^{\circ}\text{C}$

平衡时间：15min

传输线温度：160 $^{\circ}\text{C}$

GC-MS/MS 条件

色谱柱：SH-Rtx-Wax, 30m \times 0.25mmID
 \times 0.5 μm

柱温程序：60 $^{\circ}\text{C}$ (0.5min)_15 $^{\circ}\text{C}$ /min_
150 $^{\circ}\text{C}$ _20 $^{\circ}\text{C}$ /min_ 240 $^{\circ}\text{C}$ (2min)

流速控制方式：恒线速度方式

线速度：44.7mL/min

样品瓶加压气压：50kPa

样品流路温度：150 $^{\circ}\text{C}$

GC 循环时间：25min

分流比：22.5

离子化方式：EI

离子源温度：230 $^{\circ}\text{C}$

色谱质谱接口温度：230 $^{\circ}\text{C}$

检测器电压：调谐电压 +0.6kV

采集模式：MRM，离子信息见表 1

样品前处理

精密称取厄贝沙坦原料药 500 mg 于 20 mL 顶空瓶中，加 N-甲基吡咯烷酮 (NMP) 5 mL 溶解，迅速密封，上机待测。

结果与讨论

3.1 NDMA 与 NDEA 标准谱图

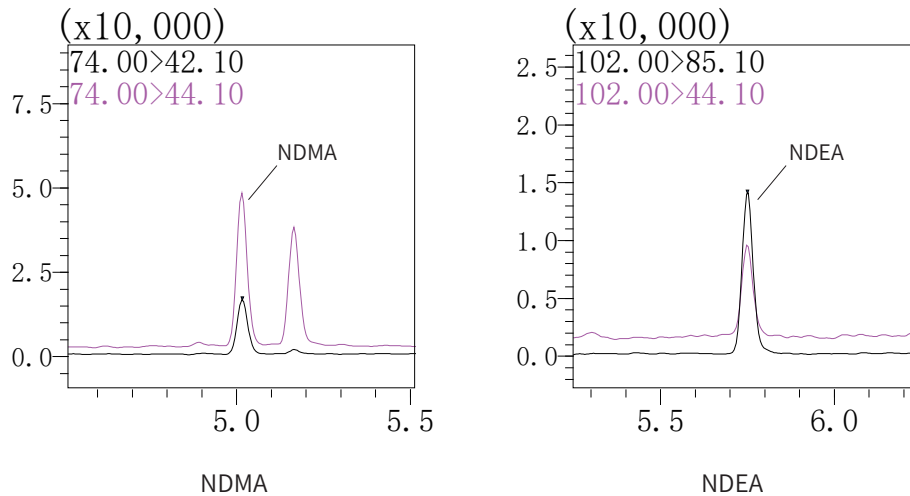


图 1. NDMA 与 NDEA 质量色谱图 (0.1 μg)

表 1. NDMA 与 NDEA 组分信息

No.	中文名称	CAS 号	保留时间	定量离子对	定性离子对
1	NDMA	62-75-9	5.016	74.00>42.10	74.00>44.10
2	NDEA	55-18-5	5.750	102.00>85.10	102.00>44.10

3.2 标准曲线和检出限

配制 7 个梯度浓度的混标, 使各项空瓶内的目标物含量分别为 0.025、0.05、0.1、0.5、5、10、100 μg , 立即压盖密封, 顶空进样。由于样品中的检出量可能较低也可能很高, 参照 FDA 方法《Combined N-Nitrosodimethylamine (NDMA) and N-Nitrosodiethylamine (NDEA) Impurity Assay by GC/MS-Headspace》制作 0.025~0.5 μg 与 0.025~100 μg 两条标线, 检测峰面积小于 0.5 μg 标液则采用 0.025~0.5 μg 标线, 否则采用另一条标线, 各标线如图 2 与图 3 所示。参照 ICH Q2 (R1) 方法学验证指南, 使用标准曲线 y 轴截距标准偏差 (δ) 与斜率 (S) 计算检出限 (LOD) 和定量限 (LOQ) (计算公式 $\text{LOD}=3.3\delta/S$, $\text{LOQ}=10\delta/S$)。各化合物线性相关系数、LOD、LOQ 如表 2 所示。

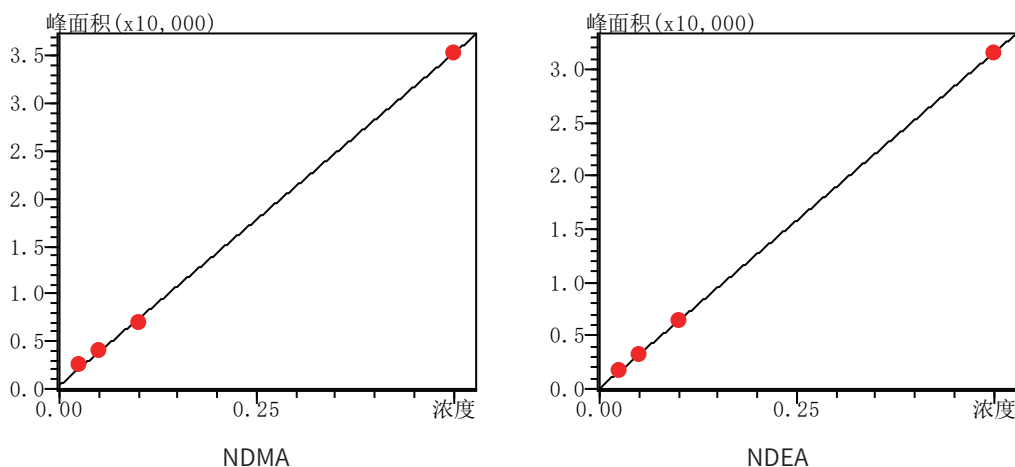


图 2. NDMA 与 NDEA 标准曲线 (0.025~0.5 μg)



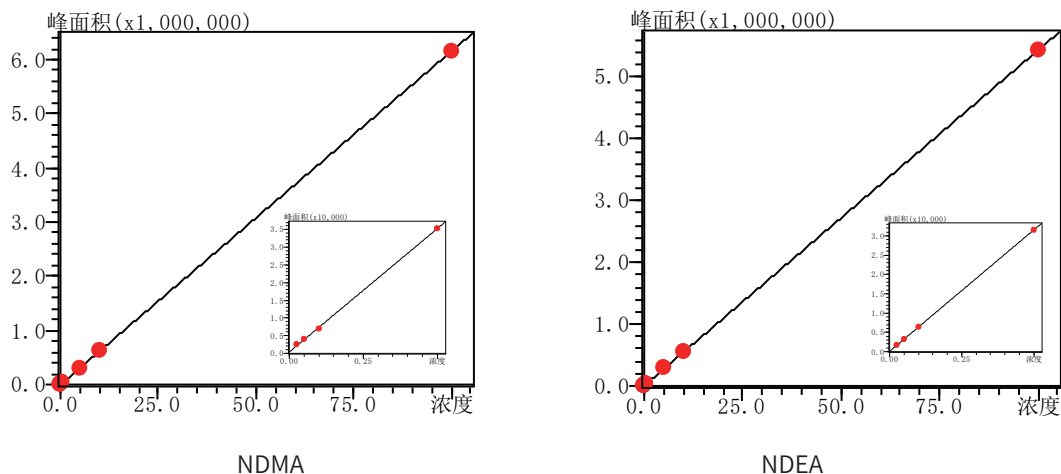


图 3. NDMA 与 NDEA 标准曲线 (0.025~100 µg)

表 2. NDMA 和 NDEA 线性相关系数及检出限量限

ID	组分名称	相关系数 (R2) (0.025~0.5 µg)	相关系数 (R2) (0.025~100 µg)	定量限 (µg)	检出限 (µg)
1	NDMA	0.9995	0.9999	0.040	0.013
2	NDEA	0.9999	0.9999	0.0071	0.0024

3.3 重复性实验

取 0.1 µg 与 5 µg 标准品溶液，分别连续进样 6 次，考察仪器的重复性，测定结果见表 3 与表 4。

表 3. NDMA 和 NDEA 重复性结果 (0.1 µg)

ID	组分名称	峰面积 1	峰面积 2	峰面积 3	峰面积 4	峰面积 5	峰面积 6	RSD(%)
1	NDMA	6,542	6,836	6,414	6,591	6,764	6,697	2.33
2	NDEA	6,219	6,320	6,282	6,188	6,304	5,997	1.92

表 4. NDMA 和 NDEA 重复性结果 (5 µg)

ID	组分名称	峰面积 1	峰面积 2	峰面积 3	峰面积 4	峰面积 5	峰面积 6	RSD(%)
1	NDMA	314181	312202	312531	316668	312629	305904	1.14
2	NDEA	293383	291324	290896	292,698	295224	280771	1.76

3.4 加标回收率

检测厄贝沙坦样品未检出目标物，平行精密称取 500 mg 厄贝沙坦样品 9 份至 9 个 20 mL 顶空瓶中，分别加含目标物 0.1 µg, 0.2 µg, 5 µg 的标准溶液，每个浓度各 3 份，再加入 N-甲基吡咯烷酮使溶液总体积为 5 mL，密封，检测。添加回收率结果如表 5 和表 6 所示。

表 5. 阴性样品 NDMA 添加回收率结果

ID	加标浓度 (μg)	平均加标检测浓 (μg)	平均回收率 (%)	RSD(%)
1	0.1	0.1024	102.4	1.97
2	0.2	0.1924	96.2	2.58
3	5	5.161	103.2	2.19

表 6. 阴性样品 NDEA 添加回收率结果

ID	加标浓度 (μg)	平均加标检测浓 (μg)	平均回收率 (%)	RSD(%)
1	0.1	0.1036	103.6	4.99
2	0.2	0.2010	100.5	1.61
3	5	5.318	106.4	1.25

■ 结论

本方法采用岛津 GCMS-TQ8050 结合 HS-20 顶空进样器建立了厄贝沙坦原料药中 NDMA 和 NDEA 的检测方法。该方法在 0.025~0.5 μg 与 0.025~100 μg 范围内标准曲线均线性良好, 相关系数大于 0.999, NDMA 的检出限和定量限分别为 0.013 μg 和 0.040 μg, NDEA 的检出限和定量限分别为 0.0024 μg 和 0.0071 μg。空白样品中以 0.1 μg, 0.2 μg, 5 μg 三个浓度水平加标, 平均回收率在 96.2%~106.4 之间。该方法灵敏度高、重复性好, 采用顶空进样, 前处理简便同时避免了直接注入药品溶液对仪器造成污染, 可以较好的应用于厄贝沙坦原料药中 NDMA 和 NDEA 的含量的测定。



HPLC 应用于沙坦类原料药中 NDMA 和 NDEA 的检测

摘要：本文以 Nexera LC-40 超高效液相色谱建立了厄贝沙坦原料药中 NDMA 和 NDEA 的分析方法，该方法定量限为 0.08 ppm，重复性结果显示，NDMA 和 NDEA 保留时间和峰面积 %RSD 均在 5.0% 以内，重复性良好，满足 ANSM French OMSL 法规的要求，可以作为分析厄贝沙坦原料药中 NDMA 和 NDEA 的选择。

关键词：LC-40 遗传毒性杂质 NDMA NDEA

遗传毒性杂质是一类能够直接或间接损害 DNA，导致基因突变或产生癌症的物质，包括磺胺类、N-亚硝胺类等，自从沙坦类原料药中报道检测出 N-亚硝基二甲胺（NDMA）和 N-亚硝基二乙胺（NDEA），引发社会广泛关注。各国监管机构（FDA、EMA）发布了关于 N-亚硝胺类遗传毒性杂质的液质和气质的相关检测方法。最新，ANSM French OMSL 发布了用液相色谱和紫外检测器进行 NDMA 和 NDEA 的检测方法，该方法要求 5 ng/mL 标准品溶液 S/N 大于 10，回收率为 90.0%-110.0%。

本文根据 ANSM 法规要求，建立了采用 Nexera LC-40 超高效液相色谱进行沙坦类原料药中 NDMA 和 NDEA 的检测方法。

■ 实验部分

1.1 仪器

超高效液相色谱仪 Nexera LC-40 X3 系统。具体配置为：LC-40BX3 输液泵，SIL-40CX3 自动进样器，CTO-40S 柱温箱，SCL-40 系统控制器，SPD-M40 光电二极管阵列检测器，LabSolutions Ver. 5.97 色谱工作站。



图 1. Nexera LC-40B X3 系统

1.2 分析条件

色谱柱: Shim-pack Scepter C18-120, 4.6 mm I.D. × 250 mm L., 5 μm

(P/N:227-31020-06, 岛津(上海)实验器材有限公司)

流动相: A相 - 甲醇 / 水 (35/65, v/v); B相 - 甲醇 / 水 (25/75, v/v)

流速: 1.0 mL/min

波长: 228 nm

柱温: 30°C

洗脱程序: 梯度洗脱

进样量: 50 μL

表 1. 梯度程序

Time (min)	Module	Command	Value
5	Pumps	Pump B Conc.	0
10	Pumps	Pump B Conc.	100
25	Pumps	Pump B Conc.	100
27	Pumps	Pump B Conc.	0
35	Controller	Stop	

结果与讨论

1.1 仪器

根据 ANSM French OMCL Method: 19A0416-01 进行对照品和样品溶液的制备。图 2 表明空白溶液在 NDMA 和 NDEA 出峰处无干扰, 专属性良好。



图 2. 专属性色谱图 (10 ng/mL 对照品溶液)

2.2 灵敏度

根据 ANSM French OMCL Method: 19A0416-01 取浓度为 5 ng/mL 标准品溶液按照上述方法进行样分析考察灵敏度, 结果显示, NDMA 和 NDEA 的 S/N 分别为 29.8 和 15.6, 均大于 10, 满足法规要求。

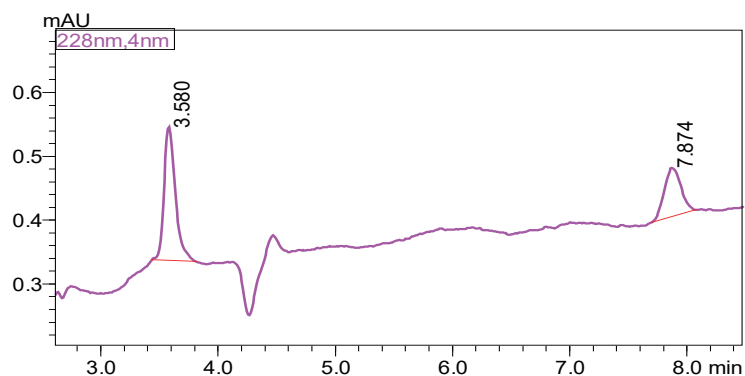


图 3. 灵敏度色谱图

2.3 重复性

以浓度为 10 ng/mL 对照品溶液进行方法重复性考察, 测定 6 次, 结果如下。

从图 4 中可以看出, NDMA 和 NDEA 连续进样 6 针, 保留时间 %RSD 分别为 0.01% 和 0.04%, 峰面积 %RSD 分别为 0.85% 和 3.7%, 均在可接受范围内, 重复性良好。

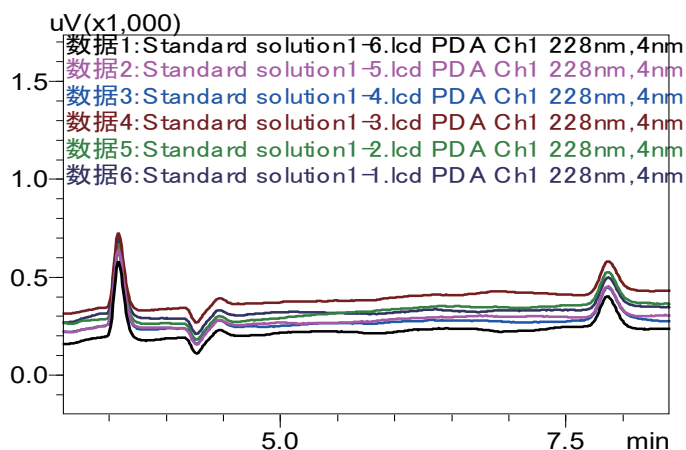


图 4. 10 ng/mL 对照品溶液进样分析时保留时间和峰面积 (n=6) 重复性结果

表 2. 重复性结果

	NDMA		NDEA	
	RT (min)	Area	RT (min)	Area
Injection-1	3.578	2449	7.873	1563
Injection-2	3.578	2413	7.872	1669
Injection-3	3.579	2419	7.869	1609
Injection-4	3.579	2449	7.868	1699
Injection-5	3.579	2450	7.864	1548
Injection-6	3.579	2468	7.869	1585
Average	3.579	2441	7.869	1612
RSD%	0.01	0.85	0.04	3.70

2.4 加标回收率

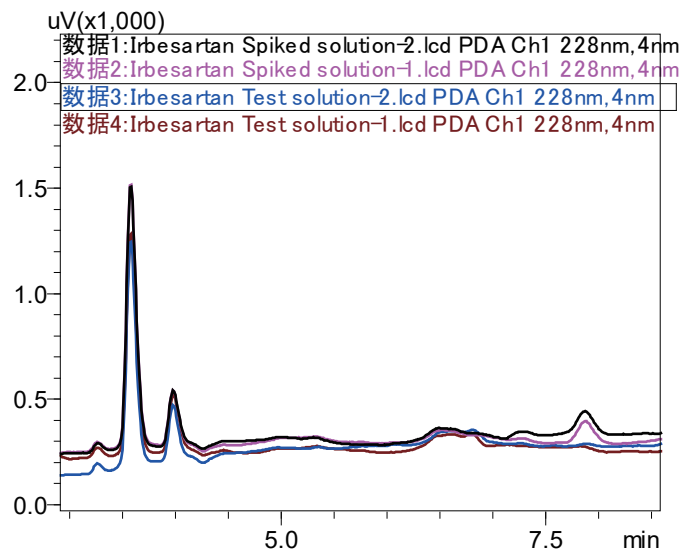


图 5. 样品加标溶液色谱图

根据 ANSM French OMCL Method: 19A0416-01, 准确称取 300 mg 厄贝沙坦原料药样品至 15 mL 离心管中, 加入 1 mL 浓度为 25 ng/mL 对照品溶液, 并加入 4 mL 稀释液 (甲醇: 水 = 35:65, v/v), 震荡 5 min, 超声 5 min, 然后 4000 rpm 离心 5 min, 取上清液作为样品加标溶液进样分析, 进行加标回收率计算。NDMA 和 NDEA 加标回收率分别为 103.2% 和 107.8%, 在 90.0-110.0% 范围内, 满足法规要求。

表 3. 样品加标回收率 (n=2)

化合物名称	样品测定结果 (ng/mL)	5.0 ng/mL	
		回收率 %	RSD%
NDMA	28.4	103.2	1.9
NDEA	ND	107.8	1.2

2.5 实际样品分析

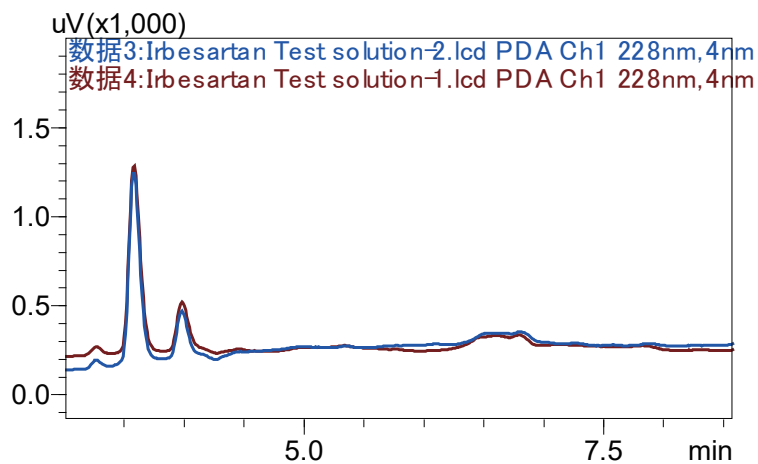


图 6. 样品溶液色谱图



依据 ANSM French OMCL Method: 19A0416-01 要求, 采用液相色谱法进行分析。准确称取 300 mg 厄贝沙坦原料药样品至 15 mL 离心管中, 加入 5 mL 稀释液 (甲醇: 水 =35:65, v/v), 震荡 5 min, 超声 5 min, 然后 4000 rpm 离心 5 min, 取上清液作为样品溶液进样分析, 结果显示, 厄贝沙坦原料药样品 NDMA 浓度为 0.47 ppm, NDEA 为未检出。

表 4. 样品计算结果

#	称样 (mg)	NDMA			NDEA		
		峰面积	浓度 (ng/mL)	含量 (ppm)	峰面积	浓度 (ng/mL)	含量 (ppm)
对照品	/	2441	10	/	1612	10	/
样品 1	300.10	6,953	28.5	0.47	/	/	ND
样品 2	300.06	6,919	28.3	0.47	/	/	ND

■ 结论

根据 ANSM French OMSL Method 19A0416-01 建立了采用 Nexera LC-40 超高效液相色谱仪进行厄贝沙坦原料药中 NDMA 和 NDEA 的分析方法。实验结果显示该方法专属无干扰、灵敏度为 0.08 ppm, 重复性结果显示 NDMA 和 NDEA 的保留时间 %RSD 分别为 0.01% 和 0.04%, 峰面积 %RSD 分别为 0.85% 和 3.7%, 重复性良好, NDMA 和 NDEA 加标回收率分别为 103.2% 和 107.8%。Nexera LC-40 超高效液相色谱的低噪音、高灵敏度和高稳定可靠等特点可轻松应对 HPLC 方法检测厄贝沙坦原料药中 NDMA 和 NDEA。

LCMS-8050 同时检测遗传毒性杂质 NDMA、NDEA 和 NMBA

摘要：本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用同时检测遗传毒性杂质 NDMA、NDEA 和 NMBA 的方法。NDMA 和 NDEA 采用内标法定量，NMBA 采用外标法定量，相关系数大于 0.999。三个浓度下保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.08~0.27 % 和 1.30~3.86 % 之间。方法检出限在 0.0044 ~0.0237 ppm 之间，定量限在 0.0147~0.0790 ppm 之间。缬沙坦原料药三个不同浓度样品加标回收率在 88.3~106.8% 之间，平行处理三次的相对标准偏差在 1.04~7.12% 之间。残留实验结果为阴性。

关键词：超高效液相色谱 三重四极杆质谱 亚硝胺类化合物 遗传毒性杂质

遗传毒性杂质 (Genotoxic Impurity, GTI) 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。药物生产等过程中引入或产生的亚硝基化合物 (N-nitroso compounds) 是一类含有 N - NO 基的强致癌化合物，属于遗传毒性杂质。2018 年以来，沙坦类药物中陆续被发现检出亚硝基类化合物 NDMA、NDEA 和 NMBA，引起社会的广泛关注，并给相关企业造成巨大损失。沙坦类药物作为高血压用药，具有服药时间长特点，因此其中可能含有的亚硝基类遗传毒性杂质将产生致癌风险，故需要进行严格的检测和管控。目前 FDA 规定沙坦类抗高血压药物中 NDMA、NDEA、NMBA 相对含量的限量标准分别为 0.3、0.083、0.3 ppm。

目前 FDA 和 EDQM 均已公布 NDMA 和 NDEA 单独测定的 LC-MS/MS 分析方法，EDQM 公布了 NMBA 单独测定的 LC-MS/MS 分析方法。本文参考以上分析方法，采用岛津三重四极杆液质联用仪 LCMS-8050，建立了同时测定缬沙坦原料药中 NDMA、NDEA 和 NMBA 三种亚硝基类化合物的方法，供相关检测人员参考。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 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-20A 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8050 三重四极杆质谱仪，LabSolutions (Version 5.97) 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：Shimadzu Shim-pack Velox C18 2.1×100 mm, 1.8 μm

流动相：A-0.1% 甲酸；B- 甲醇

洗针模式：进样前后洗针，External only (进样针外壁清洗)，Rinse Port

流速：0.3 mL/min

柱温：40 °C

进样体积：20 μL

洗针液：甲醇 / 水 =1:1 (v:v)

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 5 %，时间程序见表 1。

表 1. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.01	Oven	CTO.RVR	1*
1.00	Pumps	Pump B Conc.	5
1.25	Oven	CTO.RVR	0**
1.50	Pumps	Pump B Conc.	30



3.50	Pumps	Pump B Conc.	30
3.70	Oven	CTO.RVR	1*
4.00	Pumps	Pump B Conc.	95
6.00	Pumps	Pump B Conc.	95
6.01	Pumps	Pump B Conc.	5
8.50	Controller	Stop	

注：* “1” 表示流路切换至废液；** “0” 表示流路切换至质谱。

质谱条件

离子化模式：APCI，正离子模式

雾化气流速：4.4 L/min

接口温度：300°C

DL 温度：150°C

碰撞气：氩气 270 kPa

加热模块温度：200°C

干燥气流速：3.0 L/min

扫描模式：多反应监测 (MRM)

接口电压：4.0 KV

MRM 参数：见表 2

1.3 标准溶液配制

取三种亚硝胺类化合物混合标准贮备液 (10 mg/L)，以超纯水逐级稀释为 0.2、0.5、1、2、5、10、20、50、100 ng/mL 的标准系列工作溶液，再各取 500 μ L，加入 10 μ L 内标使用液，混匀待测。

取内标贮备液 NDMA-d6 (50 mg/L) 和 NDEA-d10 (50 mg/L)，以甲醇稀释为内标使用液 (NDMA-d6: 1 mg/L, NDEA-d10: 0.5 mg/L)。

1.4 样品前处理

准确称取 100 mg 原料药样品至塑料离心管中，加入 200 μ L 内标使用液，加入 300 μ L 甲醇，摇匀，超声提取 5 min，加入 9.5 mL 水，涡旋混匀，超声提取 5 min，4000 r/min 离心 5 min，上清液经过 0.22 μ m 滤膜过滤后，上机分析。

表 2. MRM 参数

No.	中文名称	英文名称	缩写	CAS 号	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	N-Nitrosodimethylamine	NDMA	62-75-9	75.15	58.00*	-30.0	-16.0	-27.0
						42.95	-29.0	-18.0	-19.0
						44.05	-13.0	-10.0	-24.0
2	N-亚硝基二乙胺	N-Nitrosodiethylamine	NDEA	55-18-5	103.00	75.10*	-10.0	-13.0	-30.0
						47.00	-23.0	-18.0	-20.0
						29.20	-30.0	-13.0	-30.0
3	N-亚硝基-N-甲基-4-氨基丁酸	N-Nitroso-N-methyl-4-aminobutyric Acid	NMBA	61445-55-4	147.00	117.00*	-10.0	-11.0	-11.0
						43.95	-25.0	-16.0	-25.0
						87.30	-29.0	-12.0	-29.0
4	氘代 N-亚硝基二甲胺	N-Nitrosodimethyl-d6-amine	NDMA-d6	17829-05-9	81.20	64.30*	-30.0	-16.0	-30.0
						46.00	-15.0	-20.0	-20.0
5	氘代 N-亚硝基二乙胺	N-Nitrosodiethyl-d10-amine	NDEA-d10	121979-54-3	113.15	34.20*	-10.0	-19.0	-10.0
						81.20	-21.0	-10.0	-22.0

* 代表定量离子对。

结果与讨论

2.1 标准样品色谱图

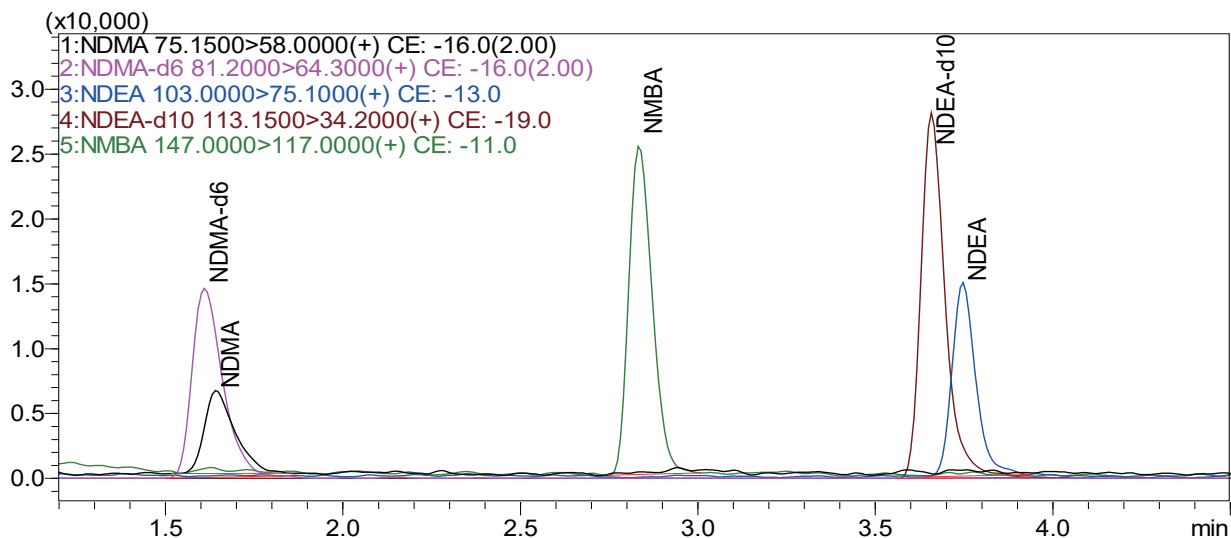


图 1. 5.0 ng/mL 标准样品 MRM 色谱图

2.2 线性关系

按照 1.3 配制九个不同浓度的标准系列溶液，按照 1.2 中的分析条件进行测定。使用 Labsolutions 软件 (Ver. 5.97) 可以在一个方法里同时使用内标法和外标法进行定量的功能。本方法中 NDMA 和 NDEA 用内标法绘制标准曲线，NMBA 用外标法绘制标准曲线。各化合物标准曲线见图 2，线性方程、相关系数、方法检出限 ($S/N=3$, ASTM 方式) 和方法定量限 ($S/N=10$, ASTM 方式) 见表 3。

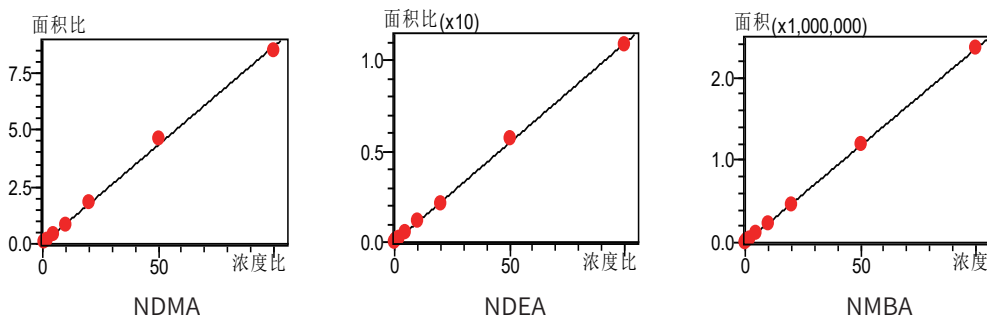


图 2. 亚硝胺类化合物标准曲线

表 3. 线性关系、检出限和定量限

名称	定量方法	校准曲线	线性范围 (ng/mL)	准确度 (%)	相关系数 r	检出限 (ppm)	定量限 (ppm)
NDMA	内标法	$Y=0.0868X+0.0116$	1.0~100.0	94.2~111.3	0.9991	0.0237	0.0790
NDEA	内标法	$Y=0.1096X+0.0035$	0.2~100.0	88.1~110.0	0.9993	0.0044	0.0147
NMBA	外标法	$Y=23505X+65.0798$	0.2~100.0	89.5~110.3	0.9999	0.0053	0.0178

2.3 精密度实验

对三个浓度的混合标准溶液连续 6 次进样，考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的精密度结果如表 4 所示。三个浓度标准品的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.08~0.27% 和 1.30~3.86% 之间，仪器精密度良好。



表 4. 精密度结果 (n=6)

名称	RSD% (2.0 ng/mL)		RSD% (10.0 ng/mL)		RSD% (50.0 ng/mL)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
NDMA	0.25	3.86	0.23	3.86	0.20	2.18
NDEA	0.27	3.63	0.23	2.39	0.08	1.30
NMBA	0.19	2.90	0.17	2.31	0.08	1.78

2.4 加标回收实验

在缬沙坦原料药样品中添加三个不同浓度的标准溶液，每个浓度的加标样品平行处理三份，加标回收结果见表 5。缬沙坦原料药中未检测出三种亚硝胺类化合物。三个不同浓度加标回收率在 88.3~106.8% 之间，平行处理三次的相对标准偏差在 1.04~7.12% 之间，方法准确可靠。

表 5. 样品加标回收率 (n=3)

化合物名称	样品测定结果 (ng/mL)	2.0 ng/mL		10.0 ng/mL		50.0 ng/mL	
		回收率 %	RSD%	回收率 %	RSD%	回收率 %	RSD%
NDMA	未检出	105.5	5.14	106.8	5.05	97.6	5.44
NDEA	未检出	104.8	4.64	98.8	1.04	88.3	7.12
NMBA	未检出	93.9	6.09	96.1	5.60	91.1	5.09

2.5 残留实验

高浓度标准样品 (100 ng/mL) 分析完成后，进样分析空白，考察残留情况。结果表明，亚硝胺类化合物检测通道中无明显目标化合物干扰。

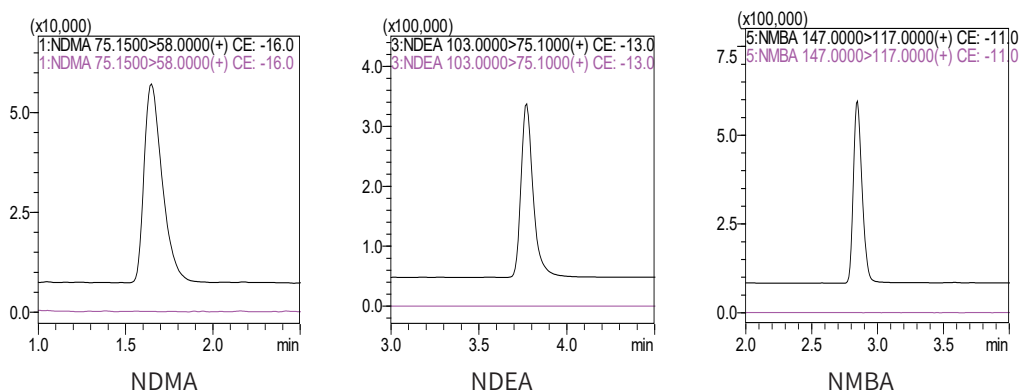


图 3. 标准样品 (100 ng/ml) 和残留考察空白样品叠加色谱图 (黑线: 标准样品; 红线: 空白样品)

结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用同时测定缬沙坦原料药中 NDMA、NDEA 和 NMBA 三种亚硝胺类遗传毒性杂质的方法。使用 Labsolutions 软件 (Ver.5.97) 实现内标法和外标法同时定量，NDMA 和 NDEA 用内标法定量，NMBA 用外标法定量，定量限分别为 0.079 ppm、0.0147 ppm、0.0178 ppm，满足限量标准要求。本方法线性范围宽、重复性好、准确度高、前处理简单，适用于三种亚硝胺类遗传毒性杂质的定量检测。

替丁类药物中 NDMA 的检测

LCMS-8050 检测雷尼替丁中遗传毒性杂质 NDMA

摘要：本文利用岛津 LCMS-8050 三重四极杆液质联用系统建立了雷尼替丁中基因毒性杂质 NDMA 的分析方法。该方法参考 FDA 的测试条件与前处理方案，采用外标法定量，线性相关系数在 0.999 以上；定量限在 1 ng/mL；不同浓度的重复性考察，其保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.06~0.13% 和 1.68~2.96% 之间；雷尼替丁原料药三个不同浓度加标回收率 90.3~100.9% 之间，方法准确可靠，可用于实际样品的检测。

关键词：LCMS-8050 三重四极杆液质联用系统 雷尼替丁 NDMA

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。N-二甲基亚硝胺 (NDMA)，又名 N-亚硝基二甲胺，是由二甲胺与亚硝酸盐在酸性条件下反应而生成的黄色液体，广泛存在于环境中，已确定为动物致癌物，多种短期致突变试验出现阳性结果。2018 年 7 月，沙坦类药物中陆续被发现检出亚硝基类化合物 NDMA，引起社会的广泛关注，并给相关企业造成巨大损失。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 同时亦指出，此前用于沙坦类药物中氮亚硝胺检测的 GCMS 方法不适用于雷尼替丁，原因在于雷尼替丁的结构中，硝基和二甲胺结构在高温下从母核解离，结合为 N-亚硝基二甲胺，对 GCMS 中常用的顶空进样方式结果产生干扰，由此也引起社会上关于此药物基毒杂质超标万倍的不实报道而引发的使用人群恐慌。

目前 FDA 已公布雷尼替丁中 NDMA 测定的 LC-HRMS 和 LCMSMS 分析方法。本文参考以上分析方法，采用岛津三重四极杆液质联用仪 LCMS-8050，建立了雷尼替丁原料药及胶囊剂中 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-20AC 柱温箱，FCV-20AH 流路切换阀，CBM-20A 系统控制器，SPD-20A 紫外检测器，LCMS-8050 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.97 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件：

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

进样量：10 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 5%，时间程序见表 1。



表 1. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
1	泵	B.Conc	5
2	泵	B.Conc	13
4.93	控制器	Event	1*
6	泵	B.Conc	13
6.1	泵	B.Conc	100
10	泵	B.Conc	100
10.1	泵	B.Conc	5
14	控制器	Stop	

注：* “1” 表示流路切换至废液；

LCMS-8050 质谱条件：

离子源：APCI (+)

雾化气流速：3 L/min

DL 温度：180°C

接口温度：300°C

MRM 参数：见表 2

接口电压：3.5 kV

加热模块温度：200°C

扫描模式：多反应监测 (MRM)

干燥气流速：5.0 L/min

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	75.15	43.05*	-11	-12	-17
				58.10	-13	-18	-17

注：* 表示定量离子

1.3 标准溶液的配置

取 NDMA 标准贮备液 (100 mg/L)，用纯水做溶剂逐级稀释为 1、2、5、10、20、50、100、200 ng/mL 的标准系列工作溶液，待上机分析。

1.4 样品前处理方法

原料药：准确称取 120 mg 原料药样品至塑料离心管中，加入 4 mL 纯水溶液，涡旋混匀使样品完全溶解，上清液经过 0.22 μm 滤膜过滤后，上机分析。

胶囊制剂：准确称取适量的内容物，加纯水溶解，以达到 30 mg/mL 雷尼替丁的目标浓度，涡旋震荡混匀 40 min，上清液经过 0.22 μm 滤膜过滤后，上机分析。

结果与讨论

2.1 NDMA 的标准品 MRM 色谱图与雷尼替丁原料药 UV 图

按照 1.3 配制 10 ng/mL 的 NDMA 标准溶液上机分析，所得色谱图如图 1 左图所示，雷尼替丁原料药按照 1.4 处理上机分析，通过紫外检测器监测雷尼替丁色谱图如图 1 右图所示，从图中可以看出 NDMA 与雷尼替丁有很好的分离度。

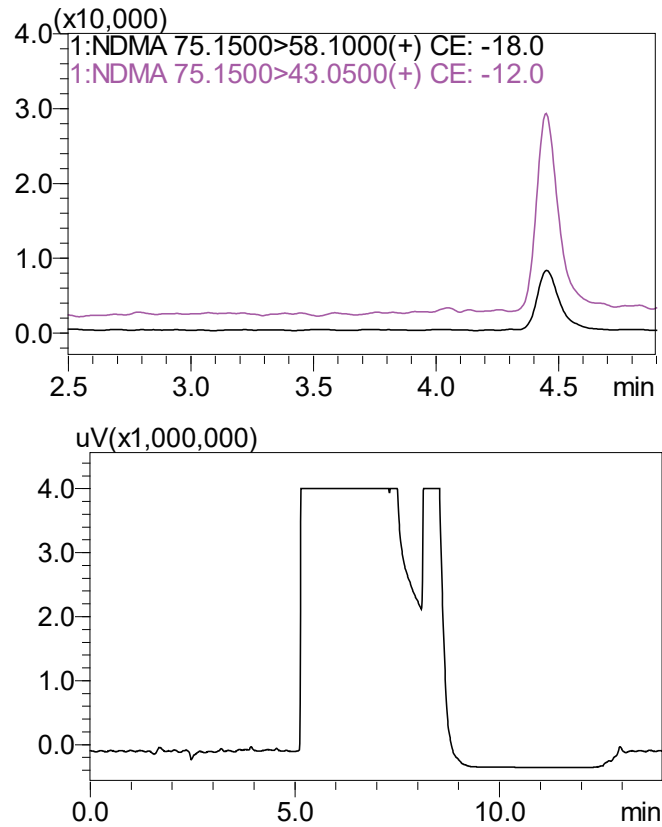


图 1. NDMA 的标准品 (10 ng/mL) MRM 色谱图 (左) 与雷尼替丁原料药 UV 图 (右, 波长 =254 nm)

2.2 线性范围

按照 1.3 配制成各浓度标准溶液, 以目标物浓度为横坐标, 目标物峰面积为纵坐标, 以外标法绘制标准曲线, 所得校准曲线线性关系良好, 线性相关系数大于 0.999, 准确度在 93.2%-110.6% 之间。曲线结果如下图 2 所示。

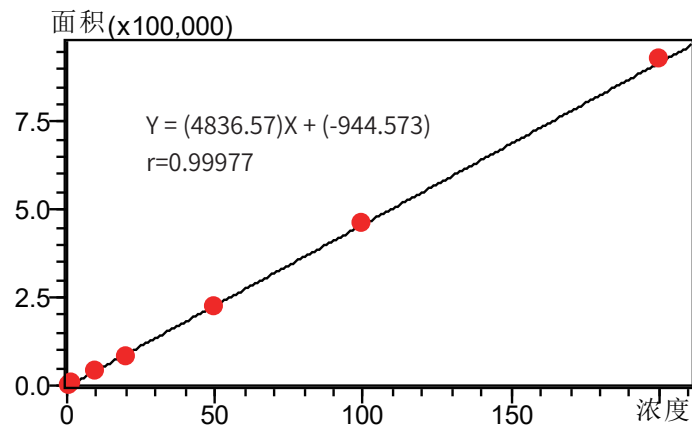


图 2. NDMA 标准曲线

2.3 灵敏度实验

配制 1 ng/mL 标准溶液进行灵敏度测试, 其结果如图 3 所示。

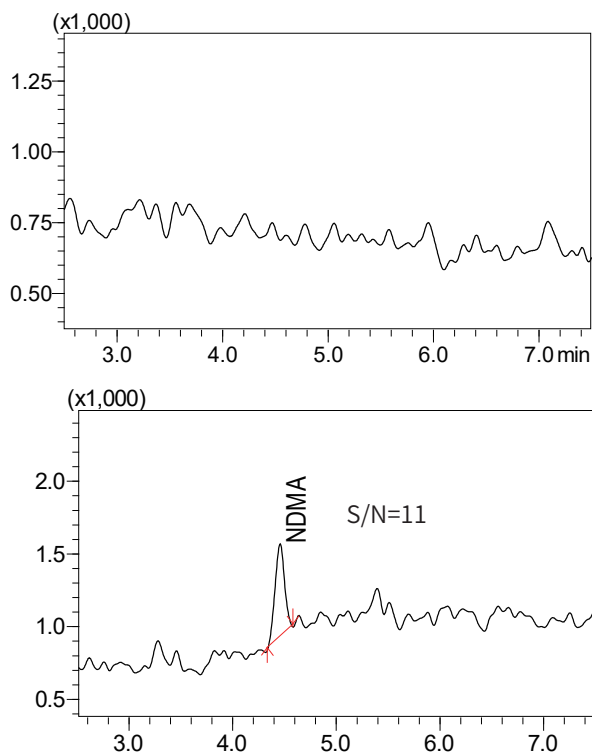


图 3. 空白 (左图) 与 1.0 ng/mL 标准样品 (右图) 色谱图

2.4 重复性考察

按照 1.3 步骤配制低、中、高三个浓度标准溶液，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。三个浓度标准溶液的保留时间和峰面积的相对标准偏差 (RSD%) 分别在 0.06~0.13% 和 1.68~2.96% 之间，满足 FDA 方法要求（保留时间 RSD% < 2%，峰面积 RSD% < 10%），仪器精密度良好。

表 3. 重复性测试 (n=6)

名称	2.0 ng/mL		10.0 ng/mL		50.0 ng/mL	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
1	4.454	8951	4.465	40627	4.480	222385
2	4.466	8727	4.472	40530	4.475	216172
3	4.460	9421	4.472	41574	4.476	224656
4	4.470	9013	4.469	41109	4.475	224270
5	4.465	8726	4.471	41677	4.481	222564
6	4.464	8796	4.557	43096	4.480	216806
AVG	4.463	8939	4.470	41435	4.478	221142
RSD/%	0.13	2.96	0.06	2.27	0.06	1.68

2.5 加标回收实验

将雷尼替丁原料药样品按 1.4 步骤进行处理，并添加三个不同浓度的标准溶液，添加浓度分别为原料药中浓度的 80%、100%、120%，每个浓度的加标样品平行三份，色谱图见图 4，加标回收结果见表 4，三个不同浓度加标回收率在 90.3~100.9% 之间，平行三份样品的相对标准偏差 (RSD%) 在 1.77~4.93% 之间，方法准确可靠。

表 4. 加标实验结果 (n=3)

名称	加标浓度 (ng/mL)	测试浓度 (ng/mL)	回收率	RSD/%
原料药样品	-	7.59	-	-
80% 加标	5.6	12.75	92.1	1.77
100% 加标	7.0	14.65	100.9	4.93
120% 加标	8.4	15.18	90.3	4.85

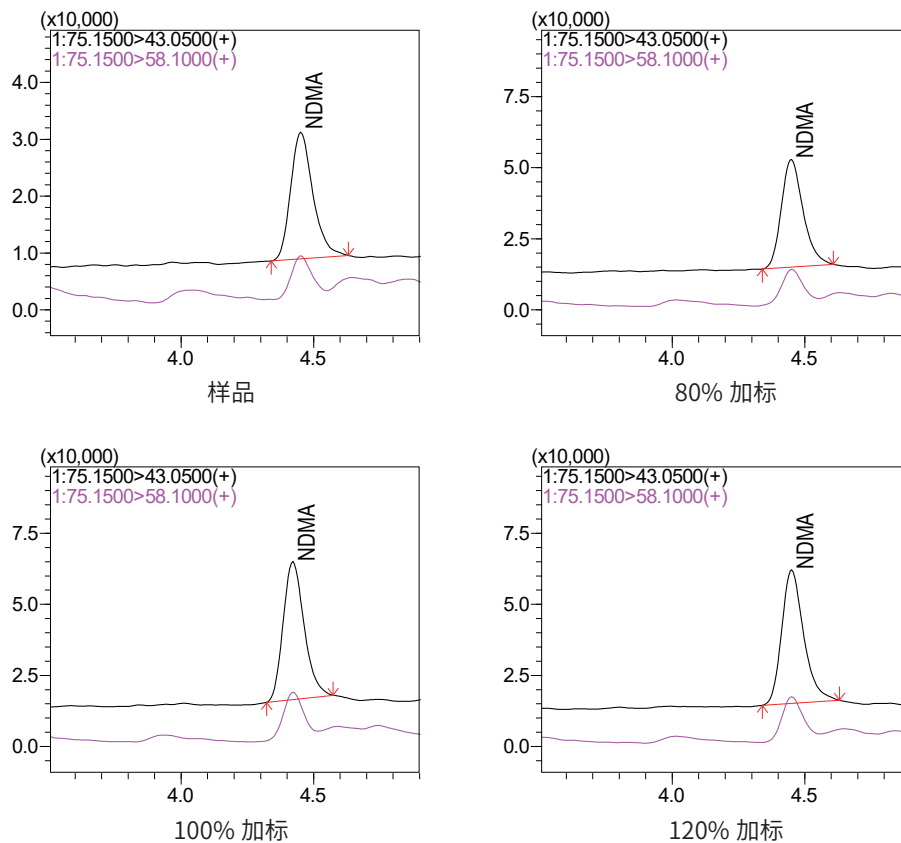


图 4. 加标回收实验色谱图

2.6 实际样品测试

将一份原料药及一份胶囊制剂按 1.4 步骤进行处理，上机分析，平行测定两次，实际样品色谱图见图 5，检测结果见表 5。



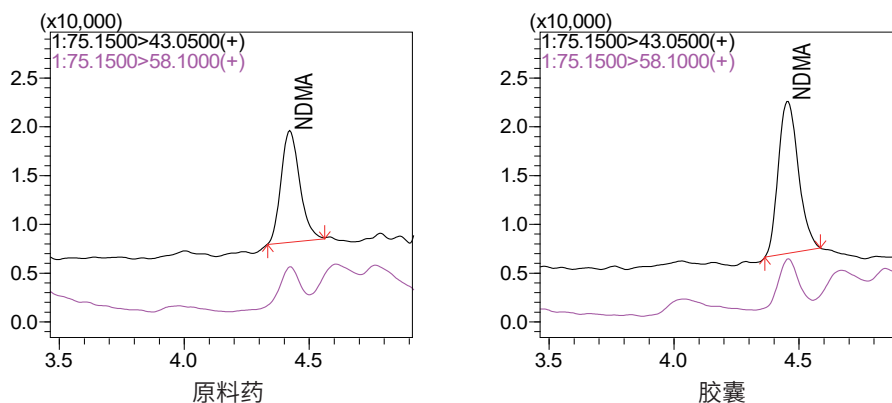


图 5. 实际样品检测色谱图

表 5. 原料药与制剂检测结果 (n=2)

样品名称	测试浓度 (ng/mL)	样品浓度 (ppm)
原料药	3.89	0.13
胶囊	5.25	0.17

结论

本实验建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定雷尼替丁原料药及其制剂中 NDMA 的方法，用外标法定量，定量限为 1 ng/mL (0.033 ppm)，2 ng/mL 重复进样 6 针，其保留时间和峰面积的 RSD% 分别为 0.13% 和 2.27%，满足 FDA 方法要求；雷尼替丁原料药三个不同浓度加标回收率 90.3~100.9% 之间，平行三份样的 RSD% 在 1.77~4.93% 之间，方法准确可靠。该方法适用于雷尼替丁原料药及其制剂中基因毒性杂质 NDMA 的测试，供相关人员参考。

LCMS-8050 检测尼扎替丁中基因毒性杂质 NDMA

摘要：本文利用岛津 LCMS-8050 三重四极杆液质联用系统建立了尼扎替丁中基因毒性杂质 NDMA 的分析方法。该方法参考中检院的测试条件与前处理方案，采用外标法定量，线性相关系数在 0.999 以上；2 ng/mL 进样六次以考察重复性，其保留时间和峰面积的相对标准偏差分别为 0.03% 和 6.24%；尼扎替丁原料及制剂加标回收率 101.1~105.6% 之间，方法准确可靠，可用于实际样品的检测。

关键词：LCMS-8050 三重四极杆液质联用系统 尼扎替丁 NDMA

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。N-二甲基亚硝胺（NDMA），又名 N-亚硝基二甲胺，是由二甲胺与亚硝酸盐在酸性条件下反应而生成的黄色液体，广泛存在于环境中，已确定为动物致癌物，多种短期致突变试验出现阳性结果。2018 年 7 月，沙坦类药物中陆续被发现检出亚硝基类化合物 NDMA，引起社会的广泛关注，并给相关企业造成巨大损失。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也发现 NDMA，而尼扎替丁作为替丁类药物也同样存在此风险。

目前中检院已发布替丁类药物检测推荐方法，FDA 也已公布尼扎替丁中 NDMA 测定的 LC-MS/MS 分析方法。本文参考中检院分析方法，采用岛津三重四极杆液质联用仪 LCMS-8050，建立了尼扎替丁原料药及制剂中 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-20AH 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，LabSolutions Ver. 5.89 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件：

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

进样量：5 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 4%，时间程序见表 1。

表 1. 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；



LCMS-8050 质谱条件:

离子源: APCI (+)

雾化气流速: 3 L/min

DL 温度: 180°C

接口温度: 300°C

MRM 参数: 见表 2

接口电压: 4.5 kV

加热模块温度: 200°C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

干燥气流速: 5.0 L/min

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	43.05*	-32	-16	-16
				58.10	-14	-16	-36

注: * 表示定量离子

1.3 标准溶液的配制

取 NDMA 标准贮备液 (100 mg/L), 用纯水做溶剂逐级稀释为 1、2、5、10、50、100 ng/mL 的标准系列工作溶液, 待上机分析。

1.4 样品前处理方法

取供试品约 300 mg 至 10 mL 的容量瓶中, 加水振摇溶解, 再加水定容至刻度, 经过 0.22 μm 滤膜过滤后, 上机分析。

结果与讨论

2.1 NDMA 的标准品 MRM 色谱图与尼扎替丁原料药 UV 图

按照 1.3 配制 100 ng/mL 的 NDMA 标准溶液上机分析, 所得色谱图如图 1 左图所示, 尼扎替丁原料药按照 1.4 处理上机分析, 通过紫外检测器监测尼扎替丁色谱图如图 1 右图所示, 从图中可以看出 NDMA 与尼扎替丁有很好的分离度。

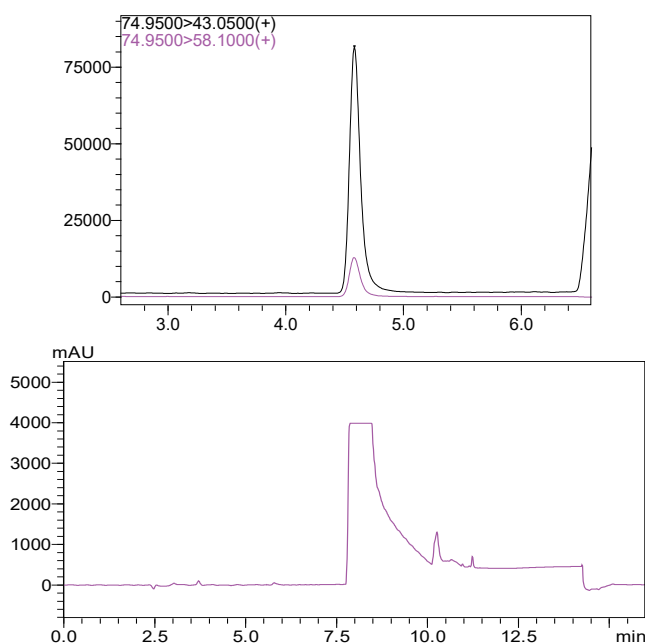


图 1. NDMA 的标准品 (100 ng/mL) MRM 色谱图 (左) 与尼扎替丁原料药 UV 图 (右, 波长 =254 nm)

2.2 线性范围

按照 1.3 配制各浓度标准溶液，以目标物浓度为横坐标，目标物峰面积为纵坐标，以外标法绘制标准曲线，所得校准曲线线性关系良好，线性相关系数大于 0.999，准确度在 90.1%-107.6% 之间。曲线结果如下图 2 所示。

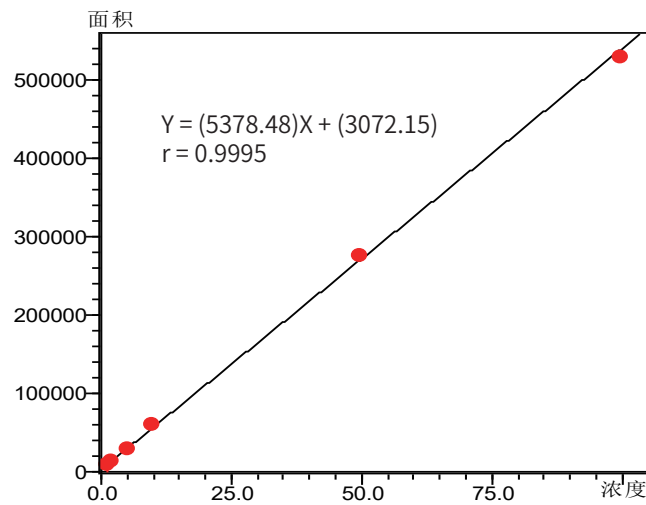


图 2. NDMA 标准曲线

2.3 灵敏度实验

配制 1 ng/mL 标准溶液进行灵敏度测试，其结果如图 3 所示。

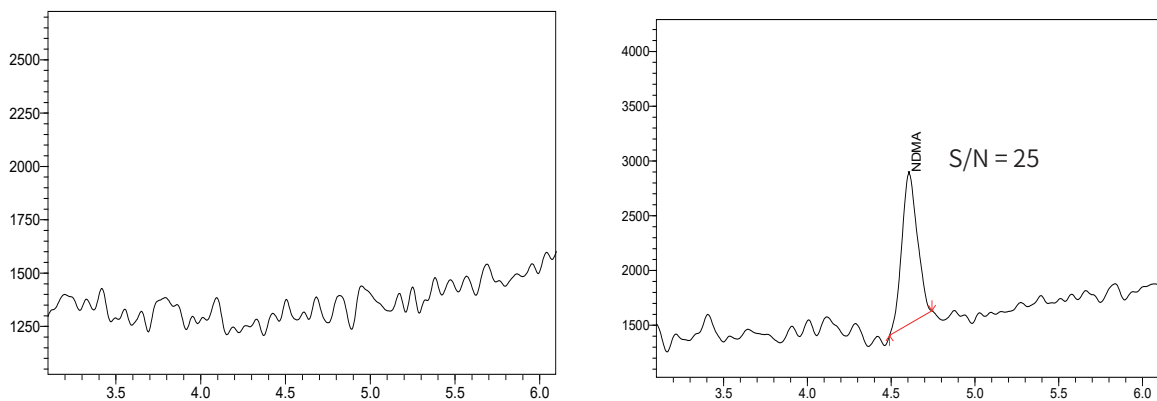


图 3. 空白 (左图) 与 1.0 ng/mL 标准样品 (右图) 色谱图

2.4 重复性考察

按照 1.3 步骤配制 2 ng/mL 浓度标准溶液，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 0.06~0.13% 和 1.68~2.96% 之间，满足中检院方法要求 (峰面积 RSD% < 10%)，仪器精密度良好。



表 3. 重复性测试 (n=6)

名称	2.0 ng/mL	
	R.T.	Area
1	4.578	13,344
2	4.579	12,434
3	4.579	11,731
4	4.577	13,335
5	4.578	12,879
6	4.576	14,051
AVG	4.578	12,962
RSD/%	0.03	6.24

2.5 加标回收实验

将尼扎替丁原料药样品按 1.4 步骤进行处理, 并按照约原料药中浓度的 100% 进行加标回收, 加标回收结果见表 4, 色谱图见图 4; 将尼扎替丁制剂样品按 1.4 步骤进行处理并添加三个不同浓度的标准溶液, 添加浓度分别约为制剂中浓度的 200%、300%、400%, 每个浓度的加标样品平行三份, 加标回收结果见表 5, 色谱图见图 5。在原料药中, 加标回收率为 105.6%, 平行六份样品的相对标准偏差 (RSD%) 为 5.16%; 在制剂中, 三个不同浓度加标回收率在 101.1~104.0% 之间, 平行三份样品的相对标准偏差 (RSD%) 在 0.76~1.68% 之间, 方法准确可靠。

表 4. 原料药加标实验结果 (n=6)

名称	加标浓度 (ng/mL)	测试浓度 (ng/mL)	回收率 /%	RSD/%
原料药样品	-	5.15	-	-
100% 加标	5.0	10.43	105.6	5.16

表 5. 制剂加标实验结果 (n=3)

名称	加标浓度 (ng/mL)	测试浓度 (ng/mL)	回收率 /%	RSD/%
原料药样品	-	6.48	-	-
200% 加标	10.0	16.88	104.0	0.76
300% 加标	15.0	21.64	101.1	1.68
400% 加标	20.0	26.58	100.5	1.00

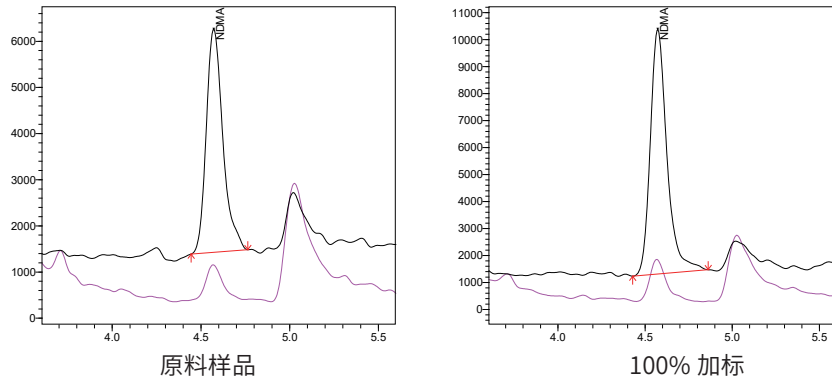


图 4. 原料药加标回收实验色谱图

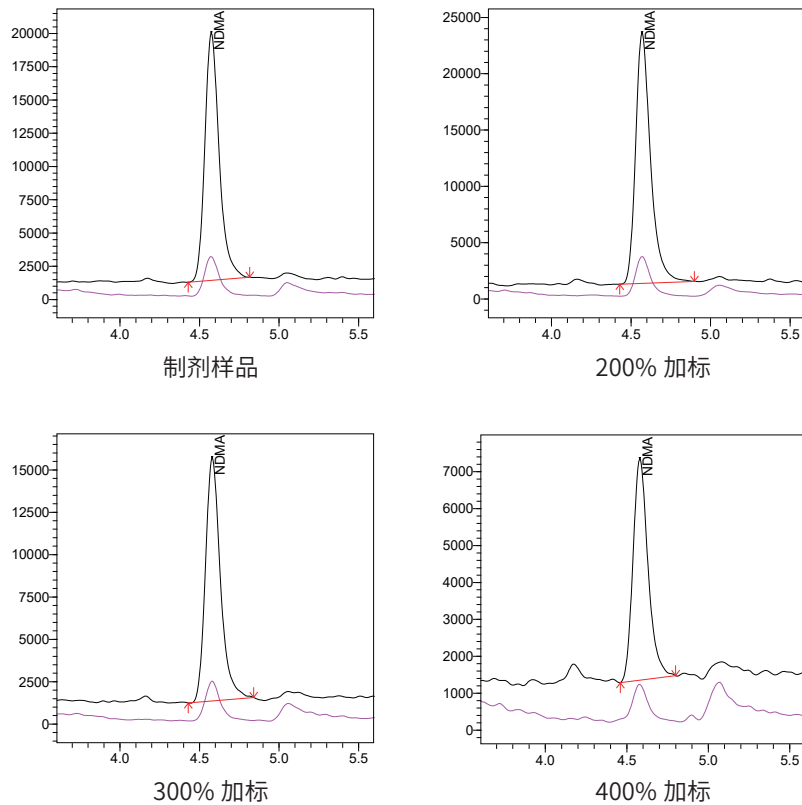


图 5. 制剂加标回收实验色谱图

2.6 实际样品测试

将一份原料药及一份制剂按 1.4 步骤进行处理，上机分析，平行测定两次，实际样品色谱图见图 6，检测结果见表 6。

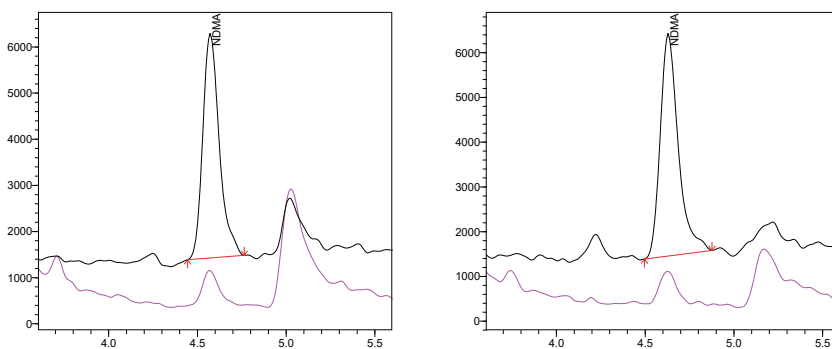


图 6 实际样品原料药 (左) 和制剂 (右) 检测色谱图



表 6. 原料药与制剂检测结果 (n=2)

样品名称	测试浓度 (ng/mL)	杂质含量 (ppm)
原料药	4.57	0.15
制剂	5.81	0.19

■ 结论

本实验建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定尼扎替丁原料药及其制剂中 NDMA 的方法, 用外标法定量, 1 ng/mL 进 5 μ L 信噪比为 25, 2 ng/mL 重复进样 6 针, 其保留时间和峰面积的 RSD% 分别为 0.03% 和 6.24%, 满足中检院方法要求; 在原料药中, 加标回收率为 105.6%, 平行六份样品的相对标准偏差 (RSD%) 为 5.16%; 在制剂中, 三个不同浓度加标回收率在 101.1~104.0% 之间, 平行三份样品的相对标准偏差 (RSD%) 在 0.76~1.68% 之间, 方法准确可靠。该方法适用于尼扎替丁原料药及其制剂中基因毒性杂质 NDMA 的测试, 供相关人员参考。

LCMS-8050 检测枸橼酸铋雷尼替丁中遗传毒性杂质 NDMA

摘要：本文利用岛津 LCMS-8050 三重四极杆液质联用系统建立了枸橼酸铋雷尼替丁中基因毒性杂质 NDMA 的分析方法。该方法参考中检院的测试条件与前处理方案，采用外标法定量，线性相关系数在 0.999 以上；定量限在 1 ng/mL；不同浓度的标准溶液进行重复性考察，其保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.02~0.06% 和 0.71~3.07% 之间；枸橼酸铋雷尼替丁制剂加标回收率 100.6%，方法准确可靠，可用于实际样品的检测。

关键词：LCMS-8050 三重四极杆液质联用系统 枸橼酸铋雷尼替丁 NDMA

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。N-二甲基亚硝胺 (NDMA)，又名 N-亚硝基二甲胺，是由二甲胺与亚硝酸盐在酸性条件下反应而生成的黄色液体，广泛存在于环境中，已确定为动物致癌物，多种短期致突变试验出现阳性结果。2018 年 7 月，沙坦类药物中陆续被发现检出亚硝基类化合物 NDMA，引起社会的广泛关注，并给相关企业造成巨大损失。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 同时亦指出，此前用于沙坦类药物中氮亚硝胺检测的 GCMS 方法不适用于雷尼替丁，原因在于雷尼替丁的结构中，硝基和二甲胺结构在高温下从母核解离，结合为 N-亚硝基二甲胺，对 GCMS 中常用的顶空进样方式结果产生干扰，由此也引起社会上关于此药物基毒杂质超标万倍的不实报道而引发的使用人群恐慌。

目前中检院已发布替丁类药物检测推荐方法，FDA 也已公布雷尼替丁中 NDMA 测定的 LC-HRMS 和 LC-MS/MS 分析方法。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，建立了枸橼酸铋雷尼替丁中 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-20AC 柱温箱，FCV-20AH 流路切换阀，CBM-20A 系统控制器，SPD-20A 紫外检测器，LCMS-8050 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.97 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件：

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

进样量：10 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 2%，起始流路切换至废液，时间程序见表 1。



表 1. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
4.3	控制器	Event	0*
5	泵	B.Conc	2
5.7	控制器	Event	1*
6	泵	B.Conc	13
6.1	泵	B.Conc	100
10	泵	B.Conc	100
10.1	泵	B.Conc	2
14	控制器	Stop	

注：* “0” 表示流路切换至质谱，“1” 表示流路切换至废液；

LCMS-8050 质谱条件：

离子源：APCI (+)

雾化气流速：3 L/min

DL 温度：180°C

接口温度：300°C

MRM 参数：见表 2

接口电压：3.5 kV

加热模块温度：200°C

扫描模式：多反应监测 (MRM)

干燥气流速：5.0 L/min

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	75.10	43.15*	-14	-14	-17
				58.15	-14	-16	-24

注：* 表示定量离子

1.3 标准溶液的配制

取 NDMA 标准贮备液（100 mg/L），用纯水做溶剂逐级稀释为 1、2、5、10、50、100 ng/mL 的标准系列工作溶液，待上机分析。

1.4 样品前处理方法

准确称取供试品约 300 mg 至 10 mL 的容量瓶中，加水振摇溶解，再加水定容至刻度，过 0.22 μm 滤膜过滤，放置 4°C 冰箱冷藏两个小时，再次过 0.22 μm 滤膜过滤，上机分析。

■ 结果与讨论

2.1 NDMA 的标准品 MRM 色谱图与枸橼酸铋雷尼替丁 UV 图

为避免枸橼酸铋雷尼替丁污染离子源的风险，绝大部分铋离子会在 NDMA 出峰前被洗脱，雷尼替丁在 NDMA 出峰后洗脱，所以实验中仅将 NDMA 切换至质谱，其他均切入废液。由于不同色谱系统的延迟体积的差异，NDMA 和枸橼酸铋雷尼替丁的保留时间会发生变化，建议配置紫外检测器进行色谱图的监控。

按照 1.3 配制 100 ng/mL 的 NDMA 标准溶液上机分析，所得色谱图如图 1 左图所示，枸橼酸铋雷尼替丁按照 1.4 处理上机分析，通过紫外检测器监测雷尼替丁色谱图如图 1 右图所示，从图中可以看出 NDMA 出峰前后与枸橼酸铋雷尼替丁均有很好的分离度。

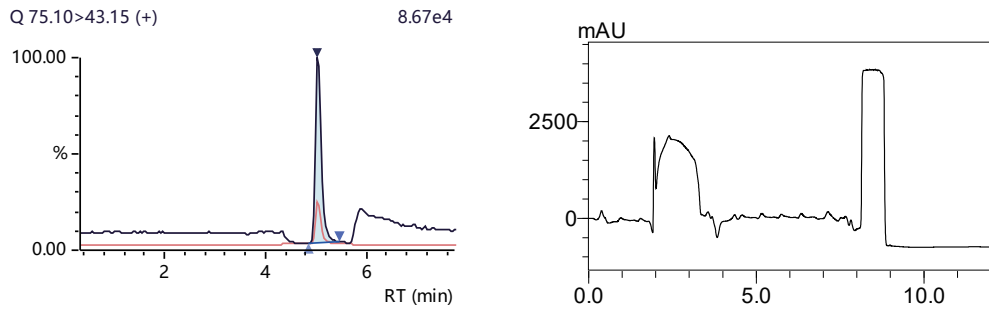


图 1. NDMA 的标准品 MRM 色谱图 (左) 与枸橼酸铋雷尼替丁原料药 UV 图 (波长 =254nm) (右)

2.2 线性范围

按照 1.3 配制成各浓度标准溶液, 以目标物浓度为横坐标, 目标物峰面积为纵坐标, 以外标法绘制标准曲线, 所得校准曲线线性关系良好, 线性相关系数大于 0.999, 准确度在 96.3%-103.3% 之间。曲线结果如下图 2 所示。

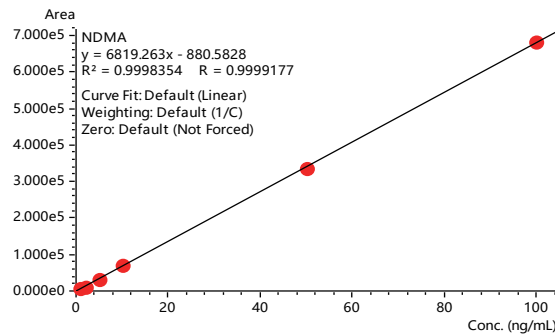


图 2. NDMA 标准曲线

2.3 灵敏度实验

配制 1 ng/mL 标准溶液进行灵敏度测试, 其结果如图 3 所示。

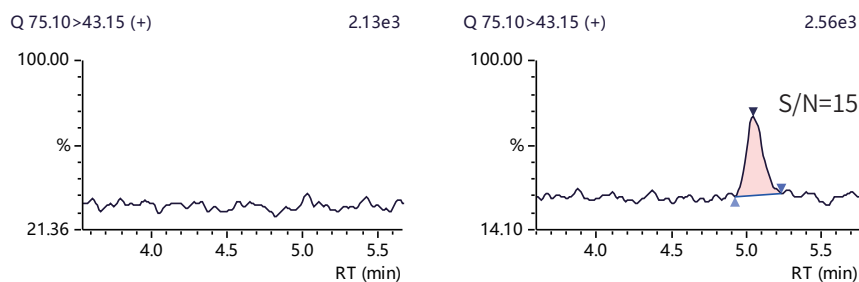


图 3. 空白 (左图) 与 1.0 ng/mL 标准样品 (右图) 色谱图

2.4 重复性考察

按照 1.3 步骤配制低、中、高三个浓度标准溶液, 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。三个浓度标准溶液的保留时间和峰面积的相对标准偏差 (RSD%) 分别在 0.02~0.06% 和 0.71~3.07% 之间, 满足中检院方法要求 (峰面积 RSD% < 10%) 仪器精密度良好。



表 3. 重复性测试 (n=6)

名称	2.0 ng/mL		10.0 ng/mL		50.0 ng/mL	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
1	5.035	13069	5.035	69226	5.034	351397
2	5.029	12443	5.036	68806	5.031	347193
3	5.033	12810	5.036	67014	5.033	349790
4	5.037	12167	5.036	69573	5.030	349280
5	5.032	12365	5.035	68763	5.031	350111
6	5.030	13093	5.037	69386	5.031	354634
AVG	5.033	12658	5.036	68794	5.032	350401
RSD/%	0.06	3.07	0.02	1.35	0.02	0.71

2.5 加标回收实验

将枸橼酸铋雷尼替丁制剂样品按 1.4 步骤进行处理, 并按照约样品浓度 100% 添加进行加标回收实验, 加标样品平行三份, 色谱图见图 4, 加标回收结果见表 4, 加标回收率为 100.6%, 平行三份样品的相对标准偏差 (RSD%) 为 1.29%, 方法准确可靠。

表 4. 加标实验结果 (n=3)

名称	加标浓度 (ng/mL)	测试浓度 (ng/mL)	回收率 (%)	RSD/%
制剂样品	-	24.76	-	-
100% 加标	25.0	25.02	100.6	1.29

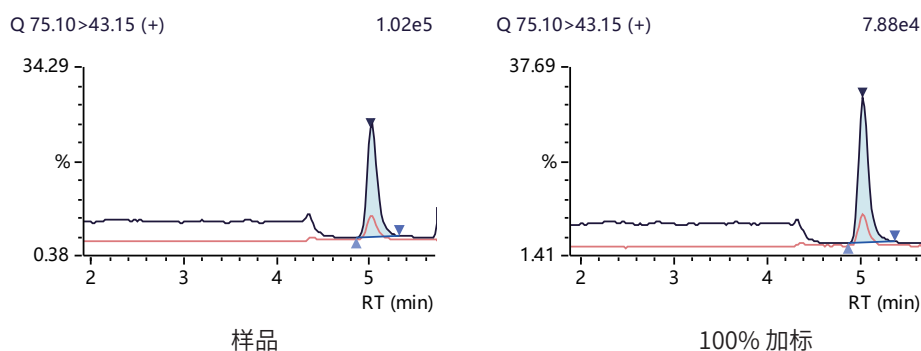


图 4. 加标回收实验色谱图

结论

本实验建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定枸橼酸铋雷尼替丁中 NDMA 的方法, 用外标法定量, 定量限为 1 ng/mL (0.033 ppm), 不同浓度标准品溶液重复进行 6 针考察重复性, 其保留时间和峰面积的 RSD% 分别在 0.02~0.06% 和 0.71~3.07% 之间, 满足中检院方法要求; 枸橼酸铋雷尼替丁制剂样品 100% 加标回收率 100.6%, 平行三份样的 RSD% 为 1.29%, 方法准确可靠。该方法适用于枸橼酸铋雷尼替丁中基因毒性杂质 NDMA 的测试, 供相关人员参考。

LCMS-QTOF 定量检测盐酸雷尼替丁原料药中的 NDMA

摘要：本文使用岛津液相色谱 - 四极杆飞行时间质谱 (LCMS-9030) 对盐酸雷尼替丁原料药中的 N- 亚硝基二甲胺 (NDMA) 进行定量分析。通过紫外色谱图确定雷尼替丁主峰的出峰时间, 使用质谱前端配置的流路切换阀, 将其切入废液。NDMA 出峰时间在 4.1 min, 为尽可能降低质谱的污染, 质谱的切入时间设置为 2.5 到 4.5 min。系统适用性实验结果表明连续六次 1 ng/mL 标准溶液的 S/N 均大于 10, 1 ng/mL 为本法的定量限。2 ng/mL 标准溶液连续进样 6 次, 峰面积重复性 <10%。在 1.14-146 ng/mL 浓度范围内, 方法线性良好, 相关系数 >0.999。曲线各标点浓度计算结果准确度在 86.95-112.32% 之间, 均满足法规要求。外标法计算六份供试品中 NDMA 含量, 测定结果均小于 0.32 ppm。

关键词：液相色谱 - 四极杆飞行时间质谱 Q-TOF 盐酸雷尼替丁 NDMA

雷尼替丁是一种广泛用于治疗和预防胃肠溃疡的组胺 H₂ 受体拮抗剂。目前, 据报道国内外多家药企的雷尼替丁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, 被证实是一种致癌物。雷尼替丁受热可能分解生成 NDMA, 使用 GCMS 测定结果将偏高。2019 年 9 月 13 日 FDA 更新了雷尼替丁中 NDMA 的检测方法, 方法中采用了液质高分辨质谱法, 要求雷尼替丁原料药中检出浓度不得高于 0.32 ppm。

本文使用岛津高分辨质谱仪 LCMS-9030, 配备超高效液相色谱仪 Nexera 用于雷尼替丁原料药中 NDMA 含量测定。本方法操作简单、快速、灵敏度高、重复性好且线性良好, 可供相关检测机构参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津超高效液相色谱仪 Nexera 系统串联四极杆飞行时间质谱仪 LCMS-9030 (配在线流路切换阀)。Nexera 系统包括 LC-30AD×2 (输液泵), DGU-20A5 (在线脱气机), SIL-30AC (自动进样器), CTO-20AC (柱温箱), SPD-M20A (二极管阵列检测器), CBM-20Alite (系统控制器)。数据采集使用 LabSolutions Ver5.97, 数据处理使用 LabSolutions Insight 3.4。

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱: Shim-pack GIST C18 4.6 mm I.D. × 150 mm L, 5.0 μm

流动相: A 相 -0.1% 甲酸水; B 相 - 甲醇

流速: 1.0 mL/min

柱温: 40°C

进样器温度: 5°C

进样量: 5 μL

检测波长: 190-400 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
2.50	Pumps	Pump B Conc.	5
6.00	Pumps	Pump B Conc.	15
9.00	Pumps	Pump B Conc.	100
19.00	Pumps	Pump B Conc.	100
19.10	Pumps	Pump B Conc.	5
25.0	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器：LCMS-9030

离子化模式：APCI(+)

干燥气：空气 5.0 L/min

雾化气：氮气 3.0 L/min

质谱采集时间：2.5-4.5 min

Event times(s)：0.1

EIC 提取 m/z：75.0553

接口温度：300°C

DL 温度：180°C

加热模块温度：200°C

MS scan range：50-95 m/z

Threshold：Low

Corona Needle Voltage: 3.5 kV

EIC 提取误差：15 ppm

1.3 对照品溶液制备

精密称取 N-亚硝基二甲胺对照品约 10 mg，用甲醇定容至 10 mL 容量瓶中，制得约 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 2 ng 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

精密称取供试品 120 mg 放入 15 mL 棕色玻璃瓶中，加入 4 mL 甲醇涡旋 5 分钟至样品充分溶解后，转移至进样小瓶，待检。

结果与讨论

2.1 盐酸雷尼替丁原料药紫外色谱图

盐酸雷尼替丁原料药中 NDMA 含量极其微量。为追求检测灵敏度需提高进样体积。进样体积过大将引起 NDMA 和雷尼替丁分离度下降，阀切不充分带来仪器污染。同时也会带来溶剂效应，使得色谱峰展宽。因此需在保证灵敏度的前提下，尽量减小进样体积。本次实验优化后的进样体积为 5 μ L。

由于不同色谱系统的延迟体积的差异，NDMA 和雷尼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雷尼替丁原料药色谱图的监控。

本法选择了 GIST4.6 内径的 5 μ m 常规色谱柱。优点如下：在常规柱上 NDMA 和雷尼替丁主峰的保留时间间隔相比同款 3 μ m 常规色谱柱大大增加。在甲醇做流动相的条件下，时间间隔为 1.6 min，可确保充分的阀切时间将雷尼替丁主峰完全切至废液。流速选择 1 mL/min，此流速兼顾该款色谱柱和 APCI 源的最佳使用条件，同时又起到快速洗脱原料药的目的。

盐酸雷尼替丁原料药 254 nm 下紫外色谱图见图 1。进样浓度为 30 mg/mL，主峰前沿时间点为 5.73 min。因此务必在此时间点前切入废液，以免污染质谱。主峰出峰后 9-19 min 进行色谱系统的深度冲洗，可避免原料药在柱上残留干扰后续分析。

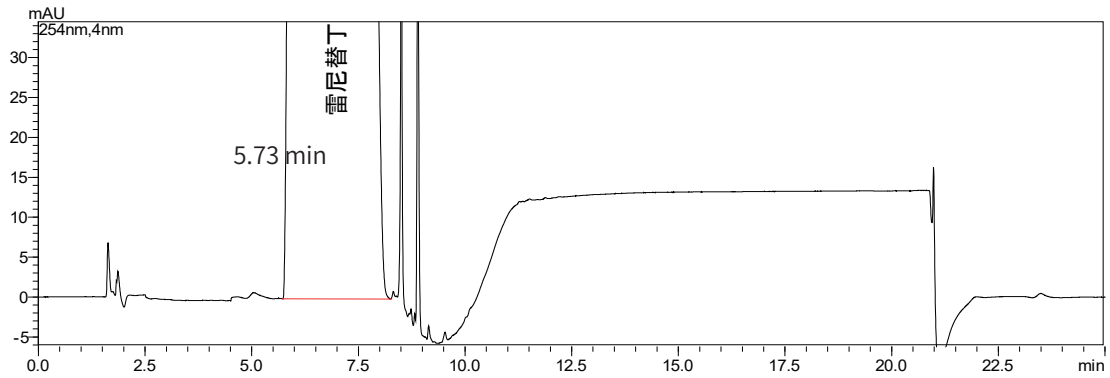


图 1. 盐酸雷尼替丁原料药紫外色谱图

2.2 系统适用性试验

NDMA 标准溶液出峰时间为 4.1 min，为避免原料药样品污染离子源，尽可能缩短质谱的采集时间。本方法中设置 2.5-4.5 min 导入质谱，其余时间均切入废液。噪音的选取范围为 2.8-3.8 min，使用 ASTM 法计算 S/N，实验结果显示 1 ng/mL 灵敏度测试液连续进样六次，S/N 均高于 12.8；2 ng/mL 对照品溶液连续进样六次，S/N 均高于 39.1。由此确定 1 ng/mL 为本法定量限。甲醇空白溶液、1 ng/mL 标准溶液和 2 ng/mL 标准溶液典型色谱图见图 2。

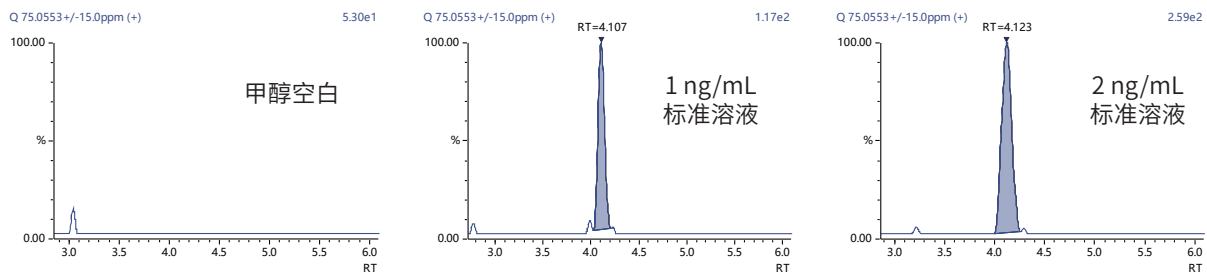


图 2. 空白和 NDMA 标准溶液色谱图

样品分析前，2 ng/mL 对照品溶液连续分析 6 次，NDMA 峰面积的 RSD 为 8.4%，满足法规 < 10% 要求。样品分析中，每隔 6 个样品进一针对照品溶液。所有 NDMA 对照品溶液峰面积的 RSD 为 8.15%。质谱扫描宽度为 50-95 m/z 之间，精确质量数均小于 15 ppm。以上均满足法规要求。

表 2. NDMA 2 ng/mL 标准溶液重复性结果

编号	峰面积	保留时间
1	1892	4.107
2	1953	4.113
3	1595	4.118
4	1820	4.123
5	2040	4.142
6	1776	4.127
平均值	1846	4.122
RSD%	8.4	0.29



2.3 线性范围考察

本文配制储备液浓度为 1200 mg/L，用甲醇倍比稀释至约 1 ng/mL。选取 1.14、2.28、4.56、9.12、18.2、36.5、73 和 146 ng/mL 标准工作溶液上机测定。使用外标法拟合工作曲线，加权方式为 1/C，NDMA 在 1.14-146 ng/mL 范围内线性良好，相关系数大于 0.999。曲线各标点浓度回读值精确度在 86.95-112.32% 之间。详细结果见表 3 和图 3。

表 3. NDMA 线性范围 (1.14-146 ng/mL)

#	Flags	Data Filename	Sample Type	Cal Point	Level	Found RT	Conc. (ppb)	Area	S/N	Accuracy(%)
1		5UL-MEOH-NDMA STD-1.14 PPb	Standard	1	1	4.087	1.05301	994	12.87	92.32
2		5UL-MEOH-NDMA STD-2.28 PPb	Standard	2	2	4.092	1.98357	1744	38.12	86.95
3		5UL-MEOH-NDMA STD-4.56 PPb	Standard	3	3	4.088	4.60631	3859	38.85	100.96
4		5UL-MEOH-NDMA STD-9.125 PPb	Standard	4	4	4.117	10.03077	8232	72.80	109.93
5		5UL-MEOH-NDMA STD-18.25 PPb	Standard	5	5	4.104	20.49777	16670	137.86	112.32
6		5UL-MEOH-NDMA STD-36.5 PPb	Standard	6	6	4.108	36.13136	29274	366.06	98.99
7		5UL-MEOH-NDMA STD-73 PPb	Standard	7	7	4.109	73.30724	59244	449.45	100.42
8		5UL-MEOH-NDMA STD-146 PPb	Standard	8	8	4.101	143.24934	115630	1362.95	98.12

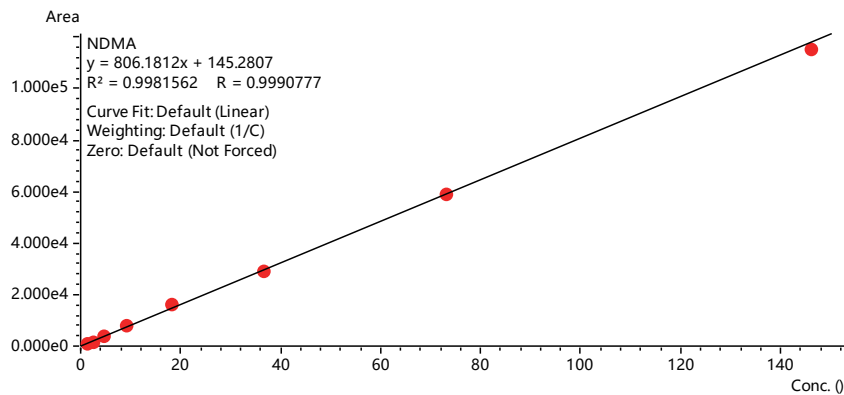


图 3. NDMA 工作曲线

2.4 加标回收率及重复性考察

精密称取含 NDMA 3.3 ppb 折算为 0.11 ppm 含量的样品，按照 1.4 进行前处理，加入适量 NDMA 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 0.087、0.109 和 0.13 ppm。未加标样品谱图和 0.109 ppm 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。

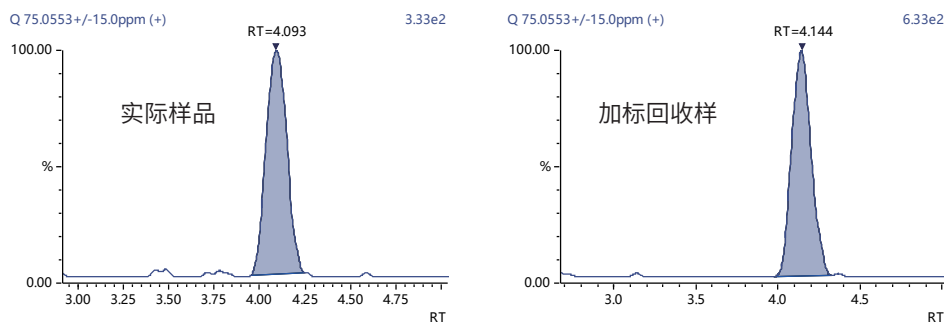


图 4. 实际样品谱图 (左) 和加标回收样品谱图 (右)

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 (ppm)	0.087 ppm 加标结果		0.109 ppm 加标结果		0.13 ppm 加标结果	
		实测值 (ppm)	回收率 (%)	实测值 (ppm)	回收率 (%)	实测值 (ppm)	回收率 (%)
1	0.1	0.187	100.0	0.192	84.4	0.222	93.8
2		0.171	81.6	0.197	89.0	0.217	90.0
3		0.176	87.4	0.199	90.8	0.217	90.0
平均值		0.178	89.7	0.196	88.1	0.219	91.5
CV%		4.58		1.74		1.37	

2.5 供试品测定结果

6 份供试品按照 1.4 所述方法制备上机测定。典型色谱图见图 5 所示。外标法计算样品含量，根据样品制备过程折算出雷尼替丁原料药中 NDMA 的含量如表 5 所示。结果均小于法规要求的 0.32 ppm。

表 5. 供试品中 NDMA 含量测定结果

样品编号	NDMA 含量 (ppm)
1	0.13
2	0.11
3	0.03
4	0.04
5	ND
6	ND

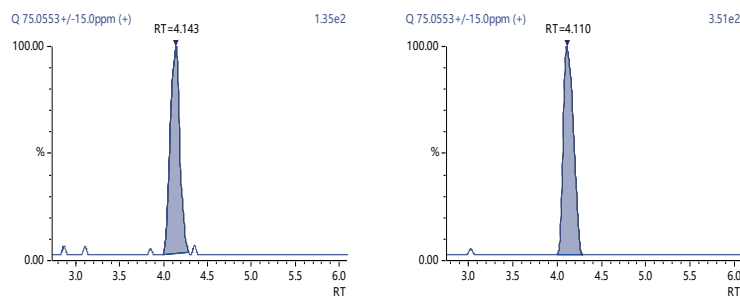


图 5. 雷尼替丁原料药中 NDMA 检测谱图 (4 号与 2 号样品)

结论

本文利用岛津 LCMS-9030 高分辨质谱定量测定了盐酸雷尼替丁中的 NDMA。实验结果表明连续六次 1 ng/mL 标准溶液的 S/N 均大于 10, 1 ng/mL 适用于本法的定量限。2 ng/mL 标准溶液连续进样 6 次, 峰面积重复性 <10%。在 1.14-146 ng/mL 浓度范围内, 方法线性良好, 相关系数 >0.999。曲线各标点浓度计算结果回读值准确度在 86.95-112.32% 之间。该法灵敏准确, 稳定性好, 适合此类药物基因毒性杂质的检测。



二甲双胍药品中 NDMA 的检测

GCMS 法测定二甲双胍药品中 NDMA 含量

摘要：本文建立了气相色谱 - 质谱联用仪测定二甲双胍药品中 NDMA 含量的方法。结果表明：在 1~100 ng/mL 的浓度范围内，NDMA 的线性相关系数 r 为 0.999，各浓度点准确度在 90.0~108.3% 之间，线性关系良好。取 NDMA（浓度 2 ng/mL）标准溶液重复进样 6 次，峰面积比的相对标准偏差（RSD%）为 3.99%，精密度良好。实际样品在浓度 48 ng/g 的加标水平下，加标回收率为 93.0%。本方法操作简单方便，成本较低，可为二甲双胍中 NDMA 的测定提供参考。

关键词：二甲双胍 NDMA 气相色谱 - 质谱联用仪

NDMA，N-亚硝基二甲胺，是遗传毒性杂质的一种，属于 2A 类致癌物。

NDMA 是一种常见的污染物，在水和食品中，包括熏肉和烤肉、奶制品中均有发现。最早在药品中被发现是 2018 年 07 月，EMA 发布公告称其在抗压药缙沙坦中检出 NDMA，引起社会的广泛关注，并给相关企业造成巨大损失。紧接着，2019 年 9 月 FDA、EMA 均发布相关治疗高胃酸分泌疾病药物雷尼替丁中检出 NDMA 的公告，2019 年 12 月 FDA、EMA 接连发文称在二甲双胍糖尿病药物中发现 NDMA。

缙沙坦中 NDMA 的检测，参考 FDA 和中国药典方法，可以采用顶空 +GCMS 进行检测，雷尼替丁由于结构的特殊性，其中 NDMA 采用 LC-MS/MS 检测，以上两种方法岛津均已完整解决方案，二甲双胍成分与其不同，可以经盐酸溶液溶解，二氯甲烷提取后，直接使用 GCMS 进行检测。

■ 实验部分

1.1 仪器

气相色谱 - 质谱联用仪：GCMS-QP2020 NX

1.2 分析条件

色谱柱：InertCap wax MS，
(30 m × 0.25 mm × 1 μm)

柱温程序：40°C (0.5 min) _ 20°C /min _ 200°C
_ 60°C /min _ 250°C (3min)

载气控制方式：恒线速度 (36.1 cm/sec)

进样方式：不分流进样

进样量：2 μL

离子源温度：230°C

接口温度：240°C

检测器电压：调谐电压 + 0.3kV

采集方式：SIM（具体参数见表 1）

1.3 样品前处理

准确称取样品 0.5 g 至 50 mL 离心管中，加入 1N 盐酸溶液 10 mL，涡旋混合，振摇 10min，加入内标溶液 10 mL（NDMA-d6 的二氯甲烷溶液，浓度为 50 ng/mL），涡旋混合，振摇 10min。采用 4000 rpm 离心 10min，吸取有机相经 0.22 μm 滤膜过滤，收集滤液，采用 GCMS 分析。

■ 结果与讨论

2.1 标准品图谱

配制 NDMA 浓度为 1 ng/mL 的标准溶液，根据 1.2 中分析条件上机分析，得到 SIM 图如图 1 所示，相关化合物信息见表 1 所示。

表 1 NDMA 及内标相关信息

No.	名称	保留时间 (min)	CAS 号	定量离子 (m/z)	定性离子 (m/z)
1	NDMA-d6	7.596	17829-05-9	80	46
2	NDMA	7.609	62-75-9	74	42

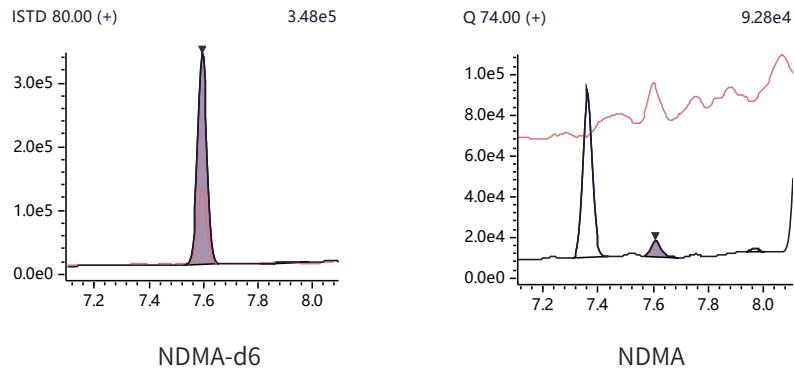


图 1 NDMA 及内标 SIM 图 (NDMA-d6 浓度为 50 ng/mL, NDMA 浓度为 1 ng/mL)

2.2 标准曲线与检出限

配制 7 个不同浓度的标准品溶液, 制作校准曲线, 含量分别为 1、2.5、5、10、20、50 和 100 ng/mL。以目标组分与内标浓度的比值为横坐标, 目标组分与内标峰面积的比值为纵坐标, 绘制标准曲线, 见图 2。线性相关系数和准确性见表 2。

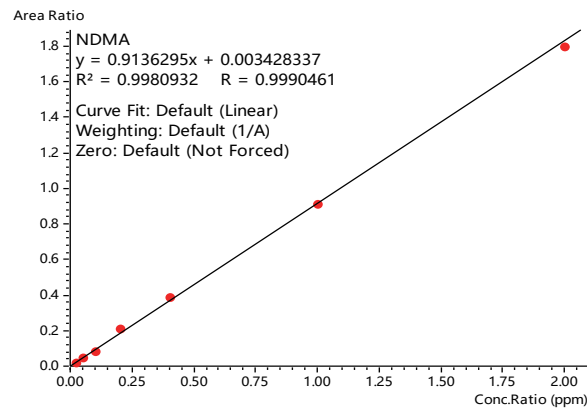


图 2 NDMA 校准曲线

表 2 NDMA 线性相关系数、准确度及信噪比 (1 ng/mL)

化合物	校准曲线	准确度 (%)	相关系数 r	S/N
NDMA	$Y = (0.9941212)X + (0.00001178)$	90.0~108.3	0.9990	16.2



2.3 重复性结果

取浓度为 2 ng/mL 的 NDMA 标准溶液，重复进样 6 次，各组分浓度及 RSD% 见表 3。

表 3 重复性实验结果 (n=6)

No.	化合物名称	峰面积比						RSD%
		1	2	3	4	5	6	
1	NDMA	0.03511	0.03528	0.03417	0.03837	0.03530	0.03578	3.99

2.4 样品测试结果及回收率

FDA 对药品中 NDMA 限值为 96 ng/d，大部分二甲双胍每天最大允许摄入量为 2 g，计算得到每克样品中的 NDMA 最大允许含量为 48 ng，确定加标浓度为 48 ng/g。实际样品 SIM 图见图 3，样品加标回收率见表 4。

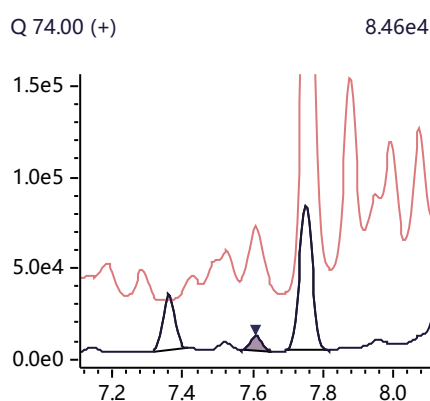


图 3 实际样品 SIM 图

表 4 样品测试结果及加标 (48 ng/g) 回收率

No.	化合物名称	样品浓度 (ng/g)	加标后浓度 (ng/g)			平均回收率 (%)	RSD(%)
			1	2	3		
1	NDMA	68.0	117.2	113.6	108.0	93.70	4.11

结论

本方法采用岛津公司气相色谱-质谱联用仪 (GCMS-QP2020 NX) 测定二甲双胍药品中 NDMA 含量。结果表明：在 1~100 ng/mL 的浓度范围内，NDMA 的线性相关系数 r 为 0.999，各浓度点准确度在 90.0~108.3% 之间，线性关系良好。取 NDMA (浓度 2 ng/mL) 标准溶液重复进样 6 次，峰面积比的相对标准偏差 (RSD%) 为 3.99%，精密度良好。实际样品在浓度 48 ng/g 的加标水平下，加标回收率为 93.0%。本方法操作简单方便，成本较低，可为二甲双胍中 NDMA 的测定提供参考。

GC-MSMS 法测定二甲双胍药品中 NDMA 含量

摘要：本文使用岛津公司 GCMS-TQ8050 NX 建立了一种检测二甲双胍药品中 N-亚硝基二甲胺 (NDMA) 的方法。在浓度范围 0.25~100 ng/mL 线性关系良好，相关系数为 0.999，0.25 ng/mL 标液信噪比 (S/N) 为 14.5。0.5、1 和 5 ng/mL 标液分别平行进样 6 次，峰面积 RSD% 分别为 4.03、3.30 和 2.76%。某二甲双胍成品药中 NDMA 检测平均值为 13.6 ng/g。20、40 和 100 ng/g 三个浓度水平加标平均回收率分别为 85.0、87.0 和 86.6%。该方法灵敏度高重复性好，可以很好的应用于二甲双胍原料药及成品药中 NDMA 含量的检测。

关键词：三重四极杆气相色谱质谱联用仪 二甲双胍 NDMA

N-亚硝基二甲胺 (N-Nitrosodimethylamine, NDMA) 是一种遗传毒性杂质，在 ICH M7 指南中明确该化合物具有较高致癌性，对实验动物致癌性证据充分。

最近两年该物质屡屡在化学药品中被发现，造成行业内重大影响。2018 年 7 月 NDMA 在治疗高血压的药物缬沙坦中被发现，2019 年 9 月治疗胃酸分泌疾病的药物雷尼替丁中也发现该物质，2019 年 12 月有报道称治疗糖尿病的药物二甲双胍中可能含有不安全水平的 NDMA，FDA 随即开始着手检测美国市场的二甲双胍中 NDMA 的污染情况。

目前 NDMA 的检测方法有顶空+GCMS 方法、GCMS 法、GC-MS/MS 法、LC-MS/MS 法，需要根据各种药物的物理与化学性质以及限量要求选择合适的方法。本文采用盐酸溶液溶解，二氯甲烷萃取，GC-MS/MS 检测，建立了二甲双胍中 NDMA 的检测方法。

■ 实验部分

1.1 仪器

GCMS-TQ8050 NX 三重四极杆气质谱联用仪

1.2 分析条件

色谱柱：SH-Rtx-Wax, 30 m×0.25 mmID×0.5 μm	进样方式：不分流
柱温程序：60°C (0.5 min)_15°C /min_ 150°C _ 20°C /min_ 240°C (2 min)	离子化方式：EI
流速控制方式：恒线速度方式	离子源温度：230°C
线速度：51.6 mL/min	色谱质谱接口温度：230°C
采集模式：MRM，离子信息见表 1	检测器电压：调谐电压 +0.8 kV

■ 样品前处理

称取二甲双胍原料药 0.5 g，如果是成品药则先将药品粉碎均匀再称取含二甲双胍有效成分 0.5 g 的样品，记录精确质量。加入 1N 盐酸溶液 10 mL，振摇并涡旋使之溶解（成品药可能会有少量残渣不溶，不影响检测），加入二氯甲烷 10 mL，充分振摇，涡旋 1 min，5000 rpm 离心 8 min，吸取下层有机相经 0.22 μm 滤膜过滤，收集滤液约 1 mL，待测。



结果与讨论

3.1 NDMA 谱图

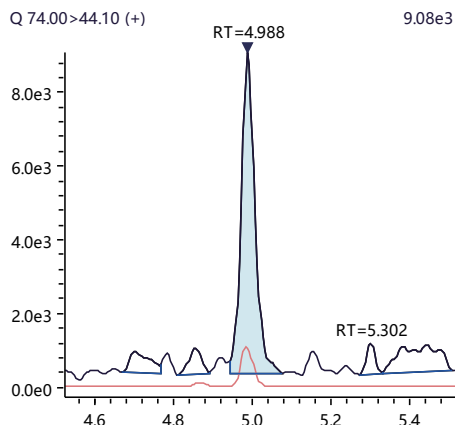


图 1. NDMA 质量色谱图 (0.25 ng/mL)

表 1. NDMA 组分信息

中文名称	CAS 号	保留时间	保留时间 (min)	定量离子
N-亚硝基二甲胺	62-75-9	4.988	74.00>44.10	74.00>42.10

3.2 标准曲线和灵敏度

配制 8 个不同浓度的标准品溶液，制作校准曲线，含量分别为 0.25、0.5、1、5、10、20、50 和 100 ng/mL。以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标做标准曲线，标准曲线如图 2 所示。线性相关系数及 0.25 ng/mL 标液信噪比如表 2 所示。

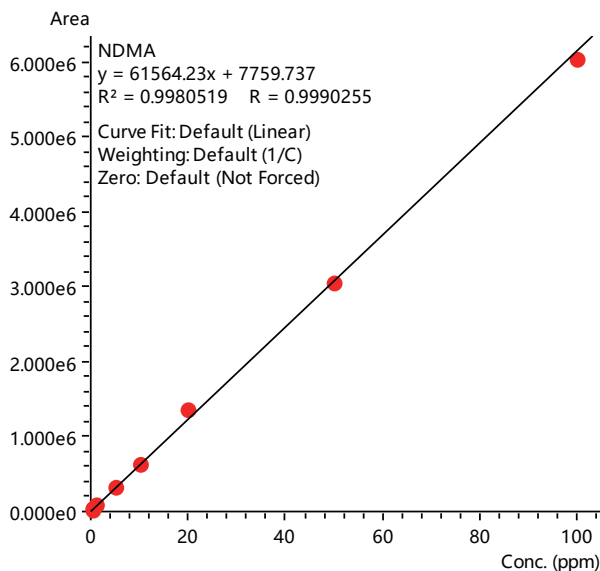


图 2. NDMA 标准曲线 (0.25~100 ng/mL)

表 2. NDMA 线性相关系数及信噪比 (0.25 ng/mL)

组分名称	相关系数 (R)	S/N
NDMA	0.9990	14.5

3.3 重复性实验

取浓度为 0.5、1、5 ng/mL 的 NDMA 标准溶液，分别重复进样 6 次，各浓度水平 RSD% 见表 3。

表 3. NDMA 重复性结果 (n=6)

浓度 (ng/mL)	峰面积						RSD%
	1	2	3	4	5	6	
0.5	39,550	37,822	42,398	40,576	41,752	40,231	4.03
1	86,238	84,742	84,472	78,887	86,369	83,050	3.30
5	333,760	321,949	326,196	321,469	345,785	329,887	2.76

3.4 加标回收率

以某品牌的二甲双胍成品药为检测对象，平行检测 6 次，检测结果如表 4 所示。以此样品为本底进行加标实验，分别加标 20、40、100 ng/g，每个加标水平平行检测 6 次，检测结果如表 5 所示。

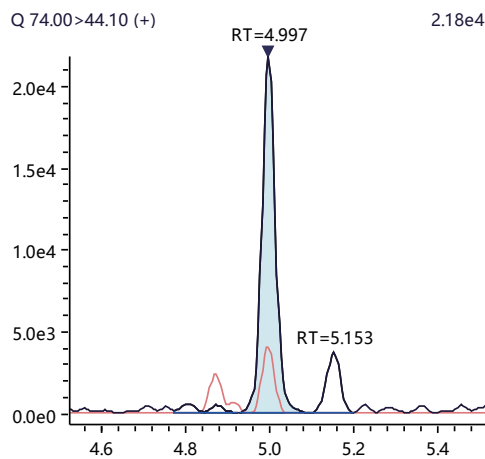


图 3. 二甲双胍成品药检测谱图

表 4. 二甲双胍成品药 NDMA 检测结果

样品检测值 (ng/g)						RSD%	平均值 (ng/g)
1	2	3	4	5	6		
13.6	13.8	12.4	14.2	14.0	14.2	4.50	13.6



表 5. 二甲双胍成品药 NDMA 加标检测结果

加标浓度 (ng/g)	本底值 (ng/g)	加标检测值 (ng/g)						平均值 (ng/g)	RSD%	回收率 (%)
		1	2	3	4	5	6			
20	13.6	28.6	31.0	29.6	32.0	31.2	30.8	30.6	3.94	85.0
40	13.6	45.8	47.0	49.8	47.0	50.6	50.4	48.4	4.39	87.0
100	13.6	101.2	98.8	101.4	99.4	99.0	100.8	100.2	1.20	86.6

■ 结论

本方法采用岛津 GCMS-TQ8050 NX 三重四极杆气相色谱质谱联用仪建立了一种检测二甲双胍药品中 N-亚硝基二甲胺 (NDMA) 的方法。在浓度范围 0.25~100 ng/mL 线性关系良好, 相关系数 R 为 0.9990, 0.25 ng/mL 标液信噪比为 14.5。0.5、1 和 5 ng/mL 标液分别平行检测 6 次, 峰面积 RSD% 分别为 4.03、3.30 和 2.76%。对某品牌二甲双胍成品药中 NDMA 含量进行了检测, 测得含量为 13.6 ng/g。20、40 和 100 ng/g 三个浓度水平加标平均回收率分别为 85.0、87.0 和 86.6%。该方法灵敏度高重复性好, 可以很好的应用于二甲双胍原料药及成品药中 NDMA 含量的检测。

LCMS-8050 检测盐酸二甲双胍中遗传毒性杂质 NDMA

摘要：本文利用岛津 LCMS-8050 三重四极杆液质联用系统建立了盐酸二甲双胍中基因毒性杂质 NDMA 的分析方法。该方法参考中检院的测试条件与前处理方案，采用外标法定量，线性相关系数在 0.999 以上；2 ng/mL 进样六次的以考察重复性，其保留时间和峰面积的相对标准偏差分别为 0.08% 和 7.81%；NDMA 加标回收率 86.0-100.0% 之间，方法准确可靠，可用于实际样品的检测。

关键词：LCMS-8050 三重四极杆液质联用系统 盐酸二甲双胍 NDMA

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。N-二甲基亚硝胺（NDMA），又名 N-亚硝基二甲胺，是由二甲胺与亚硝酸盐在酸性条件下反应而生成的黄色液体，广泛存在于环境中，已确定为动物致癌物，多种短期致突变试验出现阳性结果。2018 年 07 月，EMA 发布公告称其在抗压药缬沙坦中检出 NDMA，2019 年 9 月 FDA、EMA 均发布治疗高胃酸分泌疾病药物雷尼替丁中检出 NDMA 的公告。而二甲双胍药物，由于治疗需要服用的剂量大，服用时间长，因此需要更加严格的杂质限量水平。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。

目前中检院已发布盐酸二甲双胍检测的推荐方法。本文参考中检院分析方法，采用岛津三重四极杆液质联用仪 LCMS-8050，建立了二甲双胍原料药及制剂中 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-20AH 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，LabSolutions Ver. 5.89 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件：

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

进样量：5 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 5%，时间程序见表 1。



表 1. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
1	泵	B.Conc	5
2	泵	B.Conc	13
3.2	控制器	Event	1*
5.2	控制器	Event	0*
6	泵	B.Conc	13
6.1	泵	B.Conc	100
10	泵	B.Conc	100
10.1	泵	B.Conc	5
14	控制器	Stop	

注：* 0 表示流路切换至废液；* 1 表示流路切换至质谱。

LCMS-8050 质谱条件：

离子源：APCI (+)

雾化气流速：3 L/min

DL 温度：180°C

接口温度：300°C

MRM 参数：见表 2

接口电压：4.5 kV

加热模块温度：200°C

扫描模式：多反应监测 (MRM)

干燥气流速：5.0 L/min

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	43.05*	-32	-16	-16
				58.10	-14	-16	-36

注：* 表示定量离子

1.3 标准溶液的配置

取 NDMA 标准贮备液 (100 mg/L)，用纯水做溶剂逐级稀释为 1、2、5、10、50、100 ng/mL 的标准系列工作溶液，待上机分析。

1.4 样品前处理方法

取供试品约 500 mg 至 10 mL 的容量瓶中，加水振摇溶解，再加水定容至刻度，经过 0.22 μm 滤膜过滤后，上机分析。

■ 结果与讨论

2.1 NDMA 的标准品 MRM 色谱图与盐酸二甲双胍原料药 UV 图

按照 1.3 配制 100 ng/mL 的 NDMA 标准溶液上机分析，所得色谱图如图 1 左图所示，二甲双胍原料药按照 1.4 处理上机分析，通过紫外检测器监测二甲双胍色谱图如图 1 右图所示，从图中可以看出 NDMA 与二甲双胍有很好的分离度。

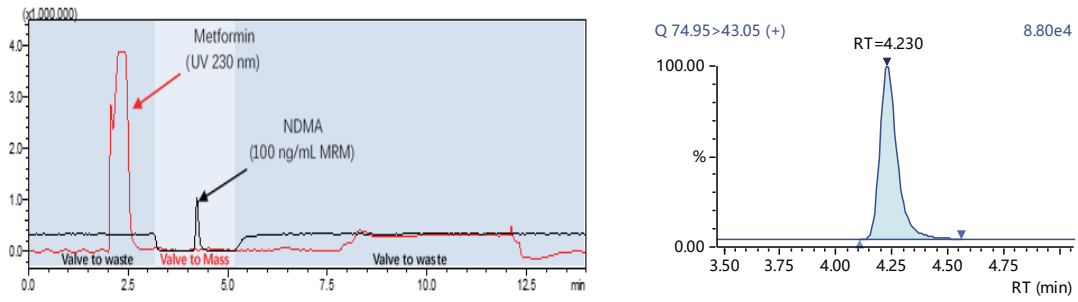


图 1. NDMA 的标准品 (100 ng/mL) MRM 色谱图 (左) 与二甲双胍原料药 UV 图 (右, 红色)

2.2 线性范围

按照 1.3 配制各浓度标准溶液, 以目标物浓度为横坐标, 目标物峰面积为纵坐标, 以外标法绘制标准曲线, 所得校准曲线线性关系良好, 线性相关系数大于 0.999, 准确度在 93.1-110.9% 之间。曲线结果如下图所示 2 所示。

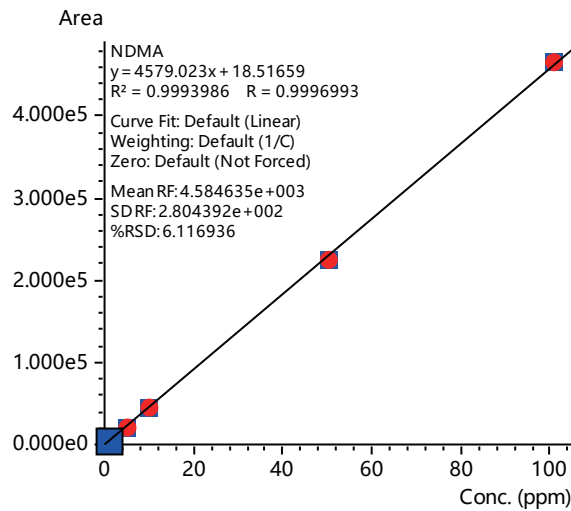


图 2. NDMA 标准曲线

2.3 灵敏度实验

配制 1 ng/mL 标准溶液进行灵敏度测试, 其结果如图 3 所示。

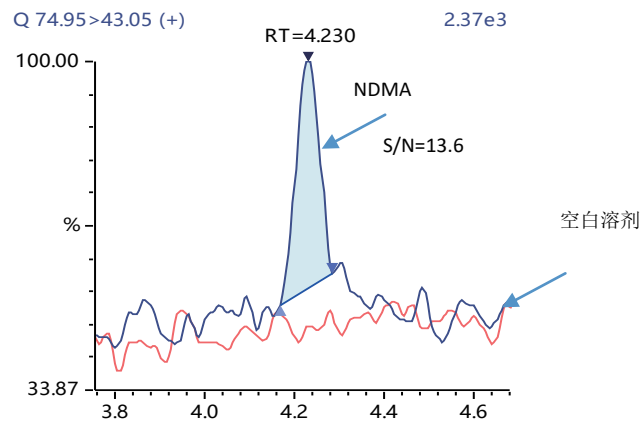


图 3. 空白 (红色线) 与 1.0 ng/mL 标准样品 (蓝色线) 色谱图



2.4 重复性考察

按照 1.3 步骤配制 2 ng/mL 浓度标准溶液, 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 0.08% 和 7.81%, 满足中检院方法要求 (峰面积 RSD% < 10%), 仪器精密度良好。

表 3. 重复性测试 (n=6)

名称	2.0 ng/mL	
	R.T.	Area
1	4.235	7,795
2	4.239	9,299
3	4.232	9,706
4	4.230	9,503
5	4.230	9,336
6	4.231	9,697
AVG	4.233	9,223
RSD/%	0.08	7.81

2.5 加标回收实验

将二甲双胍片样品按 1.4 步骤进行处理并添加三个不同浓度的标准溶液, 添加浓度分别为 1、2、5 ng/mL, 每个浓度的加标样品平行三份, 加标回收结果见表 4, 色谱图见图 4。三个不同浓度加标回收率在 86.0-100.0% 之间, 平行三份样品的相对标准偏差 (RSD%) 在 1.16-3.58% 之间, 方法准确可靠。

表 4. 制剂加标实验结果 (n=3)

名称	加标浓度 (ng/mL)	测试浓度 (ng/mL)	回收率 /%	RSD/%
样品	-	ND	-	-
加标 1	1	0.86	86.0	1.16
加标 2	2	2.00	100.0	1.26
加标 3	5	4.70	94.0	3.58

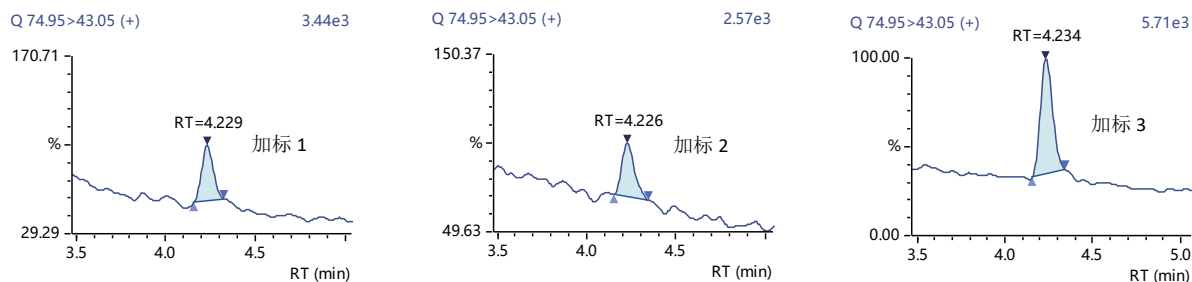


图 4. 加标回收实验色谱图

2.6 实际样品测试

将样品按 1.4 步骤进行处理，上机分析，平行测定两次，实际样品色谱图见图 5，检测结果见表 5，样品中 NDMA 浓度低于法规 48 ng/g 的上限要求。

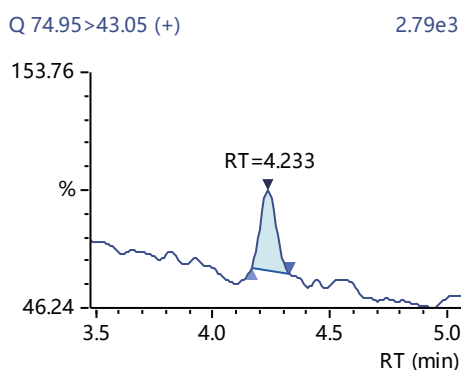


图 5. 实际样品检测色谱图

表 5. 样品检测结果 (n=2)

样品名称	测试浓度 (ng/mL)	样品浓度杂质含量 (ng/g)
制剂	1.35	27.0

■ 结论

本实验建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定盐酸二甲双胍中 NDMA 的方法，用外标法定量，1 ng/mL 进 5 μ L 信噪比为 13.6，2 ng/mL 重复进样 6 针，其保留时间和峰面积的 RSD% 分别为 0.08% 和 7.81%，满足中检院方法要求；三个不同浓度加标回收率在 86.0-100.0% 之间，平行三份样品的相对标准偏差 (RSD%) 在 1.16-3.58% 之间，方法准确可靠。该方法适用于盐酸二甲双胍中基因毒性杂质 NDMA 的测试，供相关人员参考。



LCMS-8050 测定盐酸二甲双胍缓释片中 N-亚硝基二甲胺

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类降糖药物，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 (+)

雾化气流速：3 L/min

DL 温度：180°C

接口温度：300°C

MRM 参数：见表 2

接口电压：4.5 kV

加热模块温度：200°C

扫描模式：多反应监测 (MRM)

干燥气流速：5.0 L/min

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色谱图

二甲双胍缓释片按照 1.4 进行样品前处理后, 233 nm 下紫外色谱图见图 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, 应尽可能阀切换充分。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。

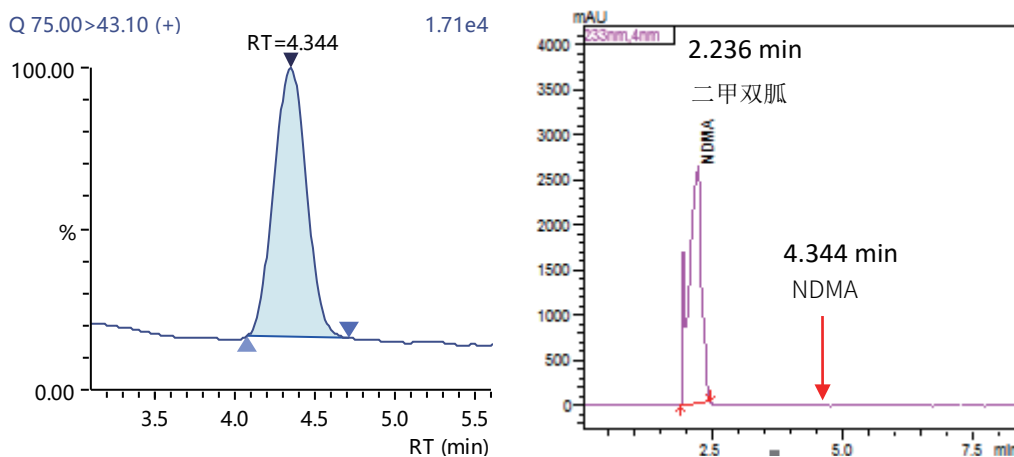


图 1. NDMA 标准品 (10 ng/mL) MRM 色谱图 (左) 与二甲双胍缓释片 (50 mg/mL) UV 图 (右)

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 μ L 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。

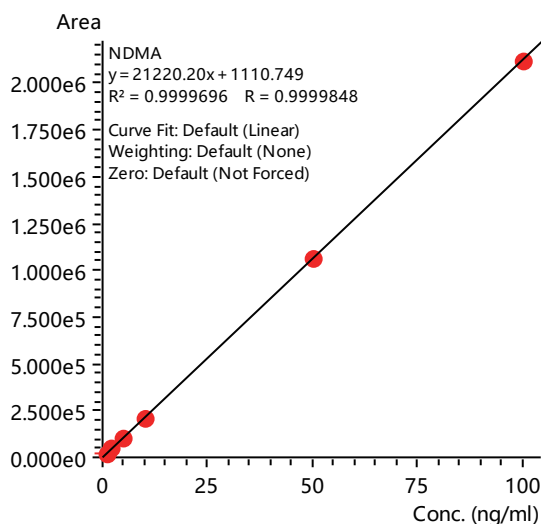


图 2. NDMA 工作曲线

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。

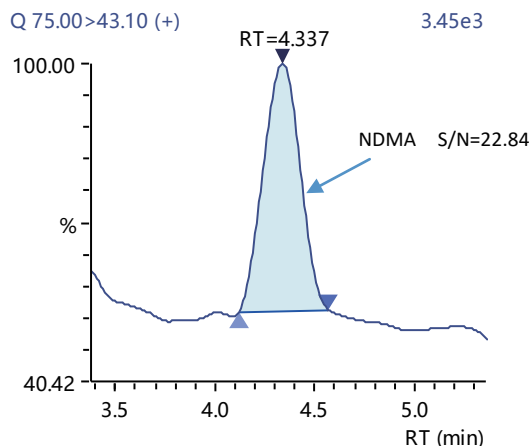


图 3. 1.0 ng/mL NDMA 标准样品色谱图

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%，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 NDMA 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。



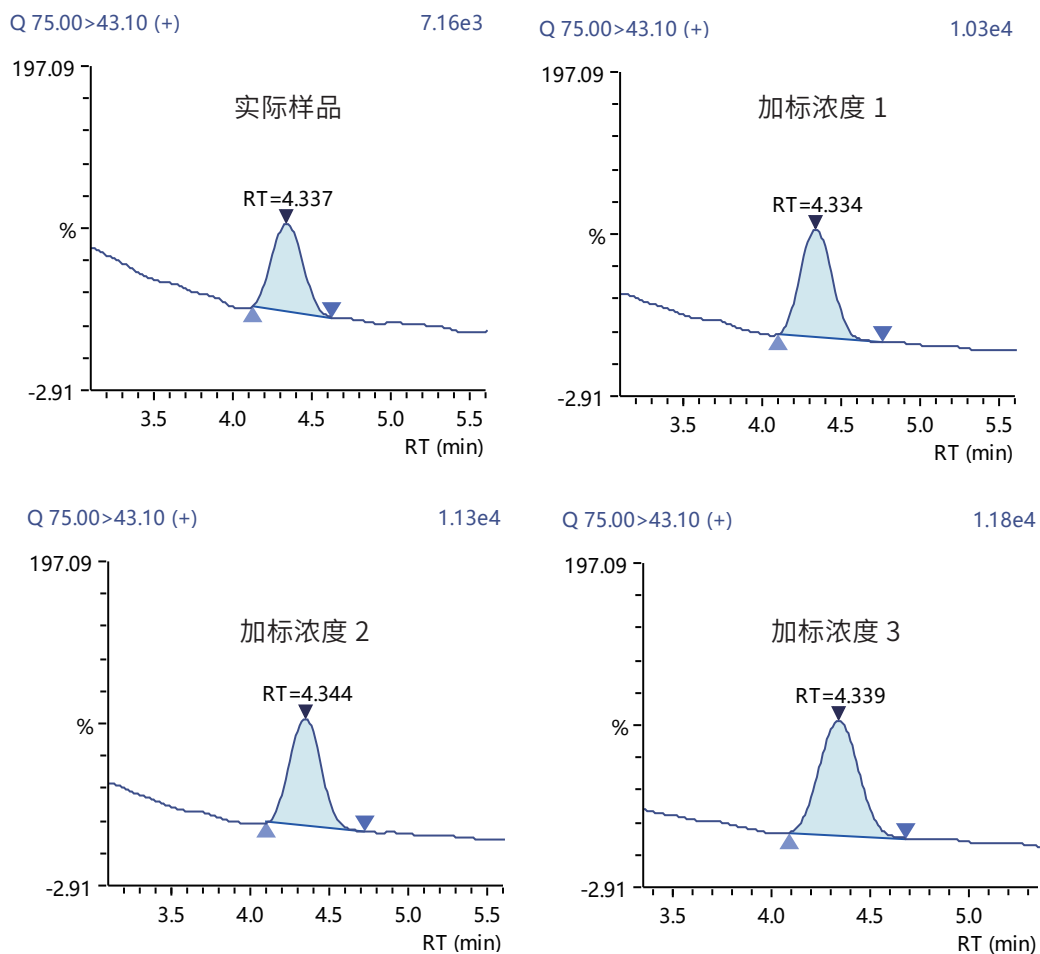


图 4. 实际样品谱图和加标回收样品谱图

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	45.8	91.0	113.0	93.0	94.4	106.8	101.7
2		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.

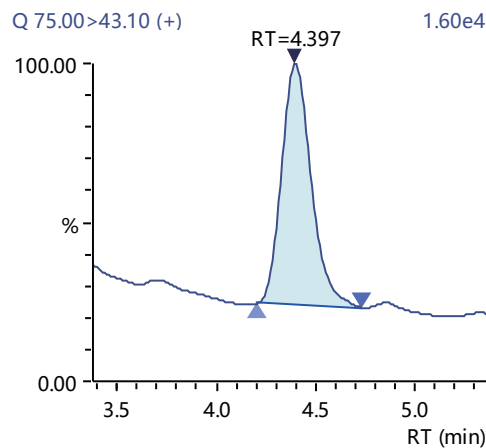


图 5. 实际样品 NDMA 检测谱图

■ 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。





本公司三条工厂获得 ISO 认证

JQA-0376

⊕ 岛津企业管理 (中国) 有限公司 / 岛津 (香港) 有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

北京

北京市朝阳区朝外大街16号中国人寿大厦14层
 邮政编码: 100020
 电话: (010)8525-2310/2312 传真: (010)8525-2531

沈阳

沈阳市青年大街167号北方国际传媒中心11层
 邮政编码: 110016
 电话: 024-23255577 传真: (024)2325-5577

西安

西安市锦业一路56号研祥城市广场A座501
 邮政编码: 710065
 电话: 029-62737878 传真: (029) 6273-7879

乌鲁木齐

乌鲁木齐市中山路339号中泉广场14H座
 邮政编码: 830002
 电话: (0991)230-6271/6272 传真: (0991)230-6273

郑州

郑州市中原路220号裕达国际贸易中心A座20层2011室
 邮政编码: 450007
 电话: (0371)8663-2981/2983 传真: (0371)8663-2982

上海

上海市徐汇区宜州路180号华鑫慧享城B2栋
 邮政编码: 200233
 电话: (021)3419-3888 传真: (021)3419-3666

成都

成都市锦江区创意产业商务区三色路38号博瑞·创意成都写字楼
 邮政编码: 610063 B座12层
 电话: (028)8619-8421/8422 传真: (028)8619-8420

南京

南京市鼓楼区汉中中路2号亚太商务楼27层B座
 邮政编码: 210005
 电话: (025)8689-0258 传真: (025)8689-0237

重庆

重庆市渝中区青年路38号重庆国贸中心1702座
 邮政编码: 400010
 电话: (023)6380-6068/6058 传真: (023)6380-6551

武汉

武汉市武昌区临江大道96号武汉万达中心31层3112室
 邮政编码: 430060
 电话: (027) 5908-0488 传真: (027) 5908-0470

广州

广州市天河区高唐路230号广电智慧大厦
 邮政编码: 510656
 电话: (020) 3718-3888 传真: (020) 3718-3804

昆明

昆明市青年路432号天恒大酒店 908室
 邮政编码: 650021
 电话: (0871)6315-2986/2987 传真: (0871)6315-2991

深圳

深圳市福田区天安数码城天展大厦1楼 F2.6-1C
 邮政编码: 518040
 电话: (0755)8340-2852 传真: (0755)8389-3100

香港

香港九龙尖沙咀海洋中心1028室
 SUITE 1028, OCEAN CENTRE, HARBOUR CITY,
 TSIM SHA TSUI, KOW LOON, HONG KONG
 电话: (00852)2375-4979 传真: (00852)2199-7438

用户服务热线电话: 800-8100439
 400-6500439

本产品样本所宣传的内容, 以本版本为准
 样本中的试验数据除注明外为本公司的试验数据

日本总公司工厂已通过ISO质量·环境管理体系的认证

注: 此样本所有信息仅供参考, 如有变动恕不另行通知