

LCMS-8050 检测盐酸二甲双胍中基因毒性杂质 NDMA

LCMSMS-429

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 加标回收率在 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 (+)	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	43.05*	-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 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。

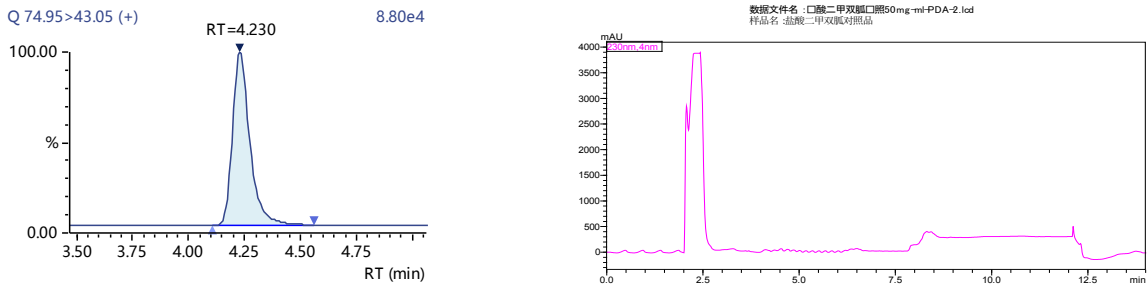


图 1. NDMA 的标准品 (100 ng/mL) MRM 色谱图 (左) 与二甲双胍原料药 UV 图 (右)

2.2 线性范围

按照 1.3 配制各浓度标准溶液, 以各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。

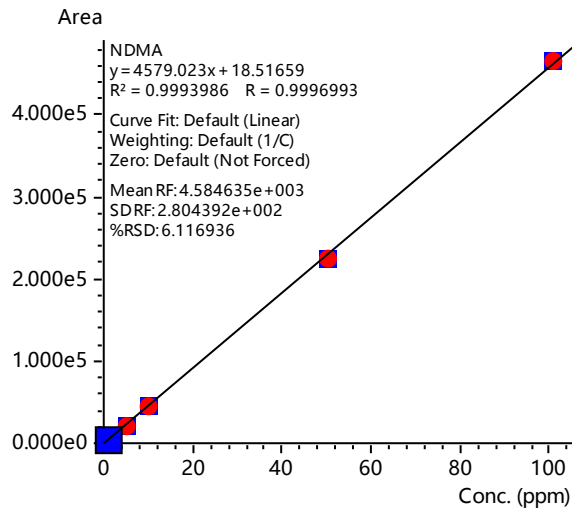


图 2. NDMA 标准曲线

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。

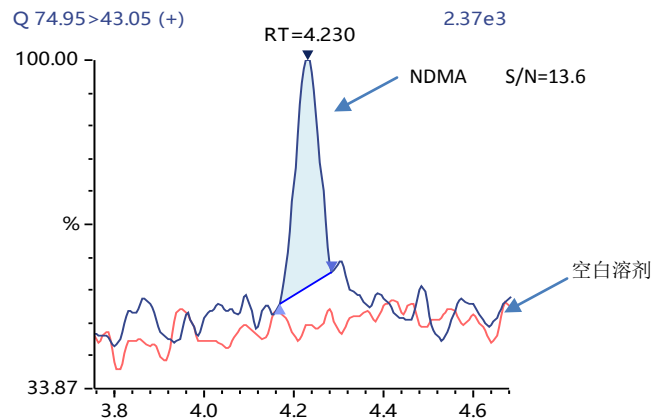


图 3. 空白 (红色线) 与 1.0 ng/mL 标准样品 (蓝色线) 色谱图

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% 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	4.235	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

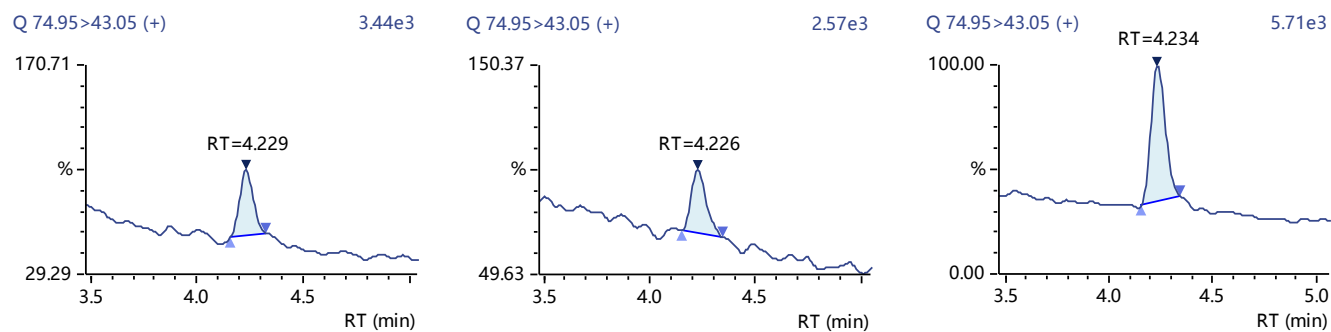


图 4. 加标回收实验色谱图

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。

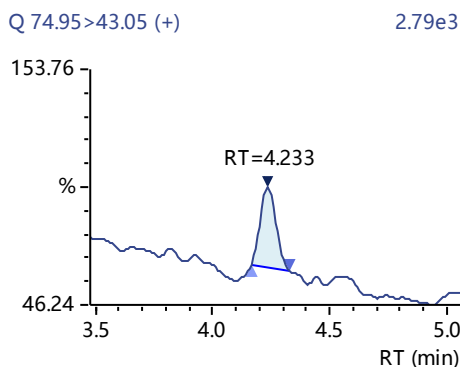


图 5 实际样品检测色谱图

表 5 样品检测结果 (n=2)

样品名称	测试浓度 (ng/mL)	样品浓度 (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。

致谢：该应用报告同湖南省药检院合作完成，在此表示感谢。

岛津应用云

