

LCMS-8050 检测尼扎替丁中基因毒性杂质 NDMA

LCMSMS-426

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在 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 (+)	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 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。

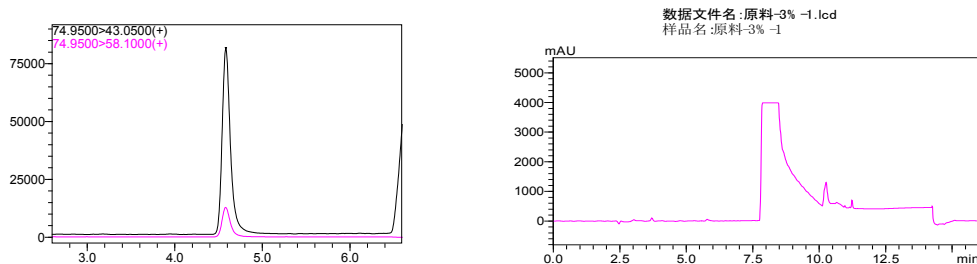


图 1. NDMA 的标准品 (100 ng/mL) MRM 色谱图 (左) 与尼扎替丁原料药 UV 图 (右)

2.2 线性范围

按照 1.3 配制成各浓度标准溶液, 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 90.1%-107.6% 之间。曲线结果如下图 2 所示。

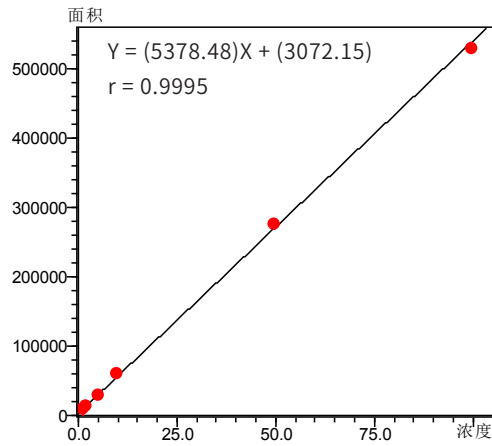


图 2. NDMA 标准曲线

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。

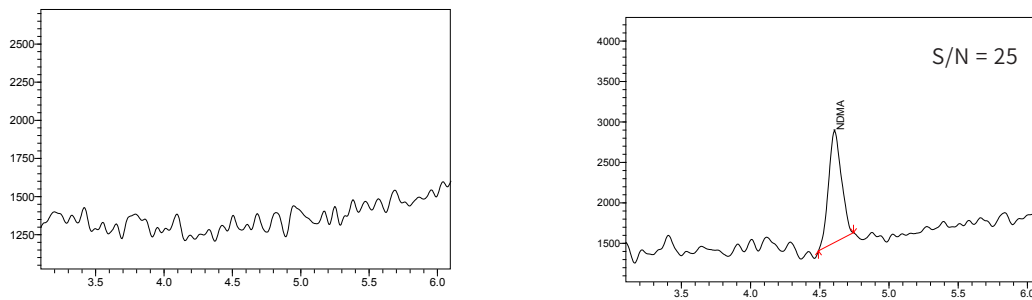


图 3. 空白（左图）与 1.0 ng/mL 标准样品（右图）色谱图

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%) 分别在 0.03% 和 6.24% 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

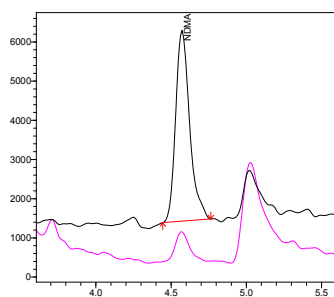
将尼扎替丁原料药样品按 1.4 步骤进行处理，并按照原料药中浓度的 100% 进行加标回收，加标回收结果见表 4，色谱图见图 4；将尼扎替丁制剂样品按 1.4 步骤进行处理并添加三个不同浓度的标准溶液，添加浓度分别为制剂中浓度的 200%、300%、400%，每个浓度的加标样品平行三份，加标回收结果见表 5，色谱图见图 5。在原料药中，加标回收率为 105.6%，平行六份样品的相对标准偏差 (RSD%) 为 5.16%；在制剂中，三个不同浓度加标回收率在 100.5~104.0% 之间，平行三份样品的相对标准偏差 (RSD%) 在 0.76~1.68% 之间，方法准确可靠。

表 4. 原料药加标实验结果 (n=6)

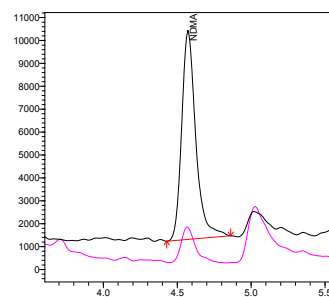
名称	加标浓度 (ng/mL)	测试浓度 (ng/mL)	回收率 /%	RSD/%
原料药样品	-	5.15	-	-
100% 加标	5.0	10.43	105.6	5.16

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

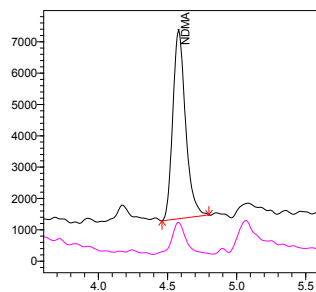


原料药样品

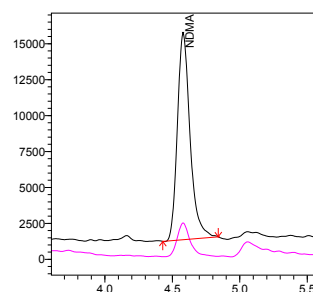


100% 加标

图 4. 原料药加标回收实验色谱图



制剂样品



200% 加标



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。

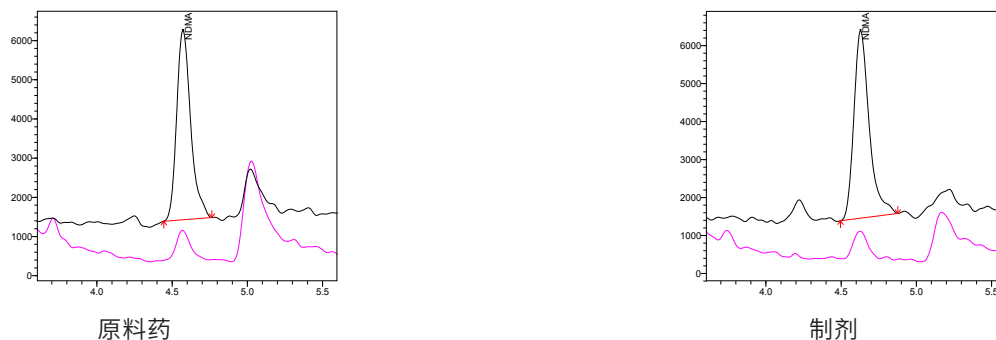


图 6 实际样品检测色谱图

表 6. 原料药与制剂检测结果 (n=2)

样品名称	测试浓度 (ng/mL)	样品浓度 (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 100.5~104.0% 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。

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

