

液相色谱 - 四极杆飞行时间质谱联用法 定量检测盐酸雷尼替丁原料药中的 N- 亚硝基二甲胺

LCMS-QTOF-016

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 为本法的定量检出限。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 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

接口温度: 300°C

离子化模式: APCI(+)

DL 温度: 180°C

干燥气: 空气 5.0 L/min

加热模块温度: 200°C

雾化气: 氮气 3.0 L/min

MS scan range: 50-95 m/z

质谱采集时间: 2.5-4.5 min

Threshold: Low

Event times(s): 0.1

Corona Needle Voltage: 3.5 kV

EIC 提取 m/z: 75.0553

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 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 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 NMDA 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, NMDA 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。因此质谱检测器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。

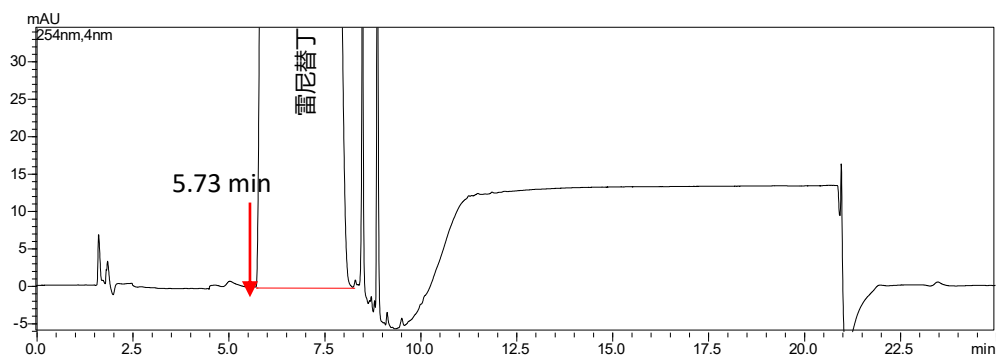


图 1 盐酸雷尼替丁原料药紫外色谱图

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。

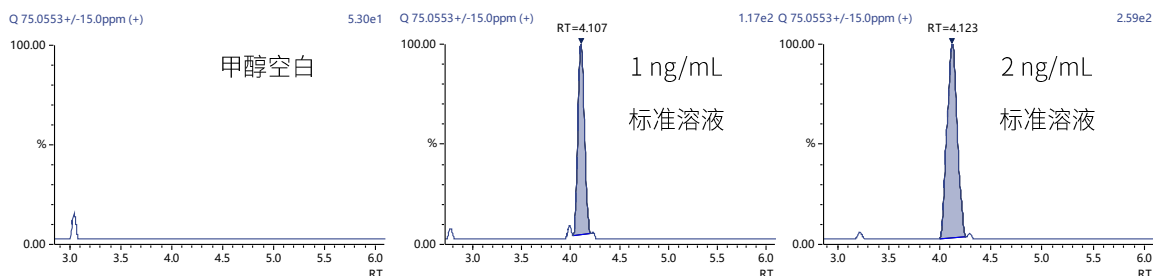


图 2 空白和 NDMA 标准溶液色谱图

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，用甲醇对比稀释至约 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		SUL-MEOH-NDMA STD-1.14 PPb	Standard	1	1	4.087	1.05301	994	12.87	92.32
2		SUL-MEOH-NDMA STD-2.28 PPb	Standard	2	2	4.092	1.98357	1744	38.12	86.95
3		SUL-MEOH-NDMA STD-4.56 PPb	Standard	3	3	4.088	4.60631	3859	38.85	100.96
4		SUL-MEOH-NDMA STD-9.125 PPb	Standard	4	4	4.117	10.03077	8232	72.80	109.93
5		SUL-MEOH-NDMA STD-18.25 PPb	Standard	5	5	4.104	20.49777	16670	137.86	112.32
6		SUL-MEOH-NDMA STD-36.5 PPb	Standard	6	6	4.108	36.13136	29274	366.06	98.99
7		SUL-MEOH-NDMA STD-73 PPb	Standard	7	7	4.109	73.30724	59244	449.45	100.42
8		SUL-MEOH-NDMA STD-146 PPb	Standard	8	8	4.101	143.24934	115630	1362.95	98.12

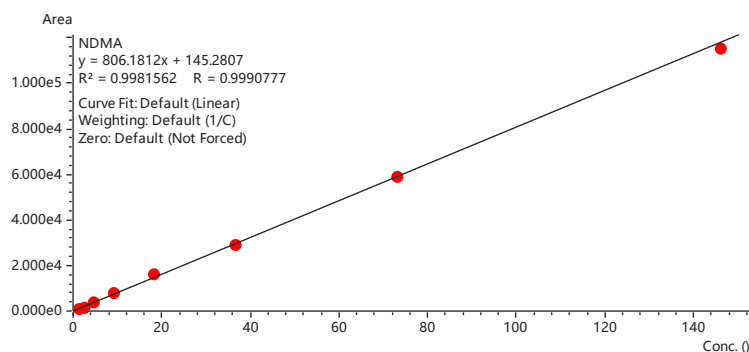


图 3 NDMA 工作曲线

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。

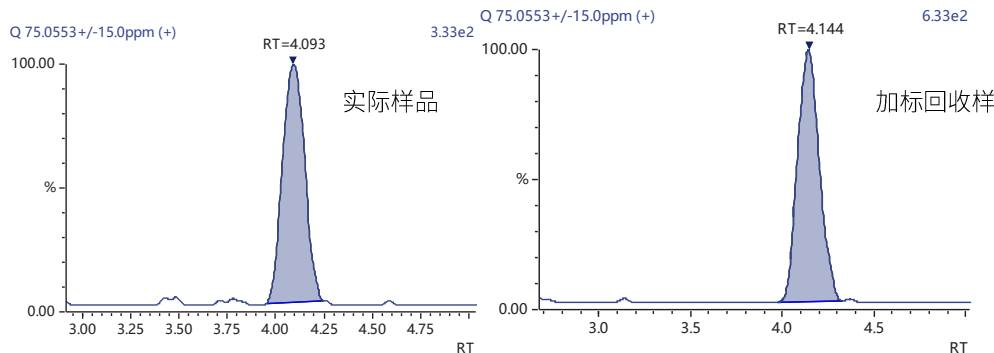


图 4 实际样品谱图 (左) 和加标回收样品谱图 (右)

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

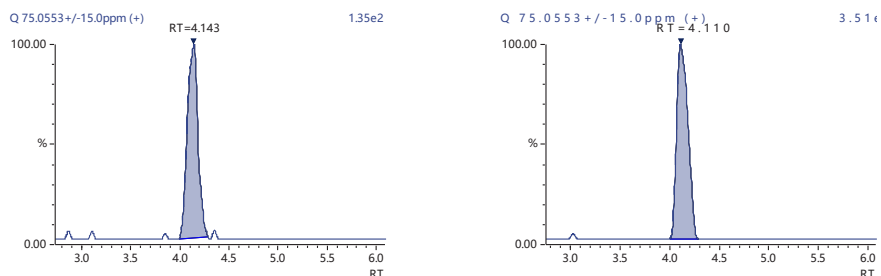


图 5 雷尼替丁原料药中 NDMA 检测谱图 (4 号与 2 号样品)

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。