

# LCMS-8050 检测雷尼替丁中基因毒性杂质 NDMA

## LCMSMS-417

**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 三重四极杆液质谱联用系统。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 标准溶液的配制

取 NDMA 标准储备液 (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。

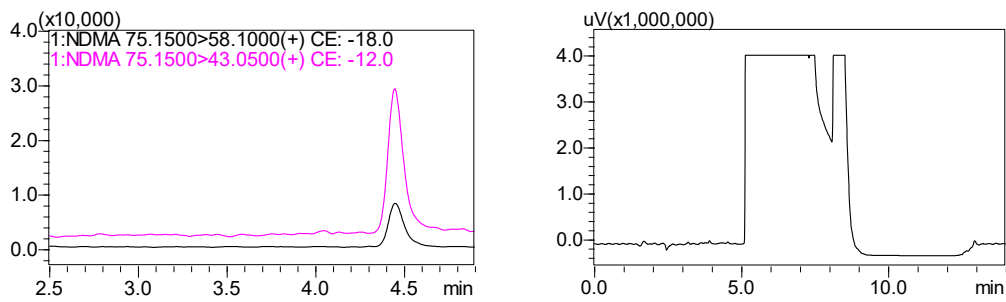


图1 NDMA 的标准品 (10 ng/mL) MRM 色谱图 (左) 与雷尼替丁原料药 UV 图 (右)

## 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 93.2%-110.6% 之间。曲线结果如下图 2 所示。

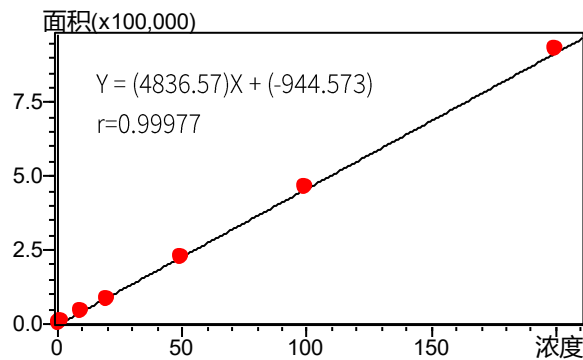


图2 NDMA 标准曲线

## 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。

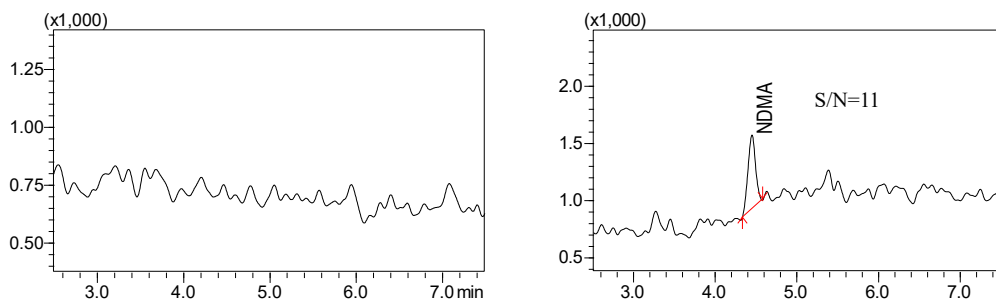


图3 空白 (左图) 与 1.0 ng/mL 标准样品 (右图) 色谱图

## 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)

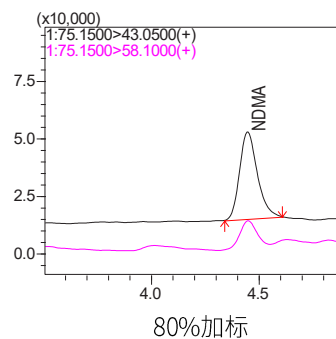
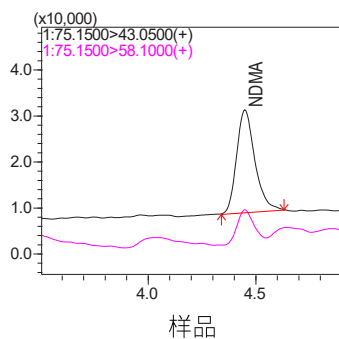
名称	2.0 ng/mL		10.0 ng/mL		50.0 ng/mL	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
1	4.454	8951	4.465	40627	4.480	222385
2	4.466	8727	4.472	40530	4.475	216172
3	4.460	9421	4.472	41574	4.476	224656
4	4.470	9013	4.469	41109	4.475	224270
5	4.465	8726	4.471	41677	4.481	222564
6	4.464	8796	4.557	43096	4.480	216806
AVG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



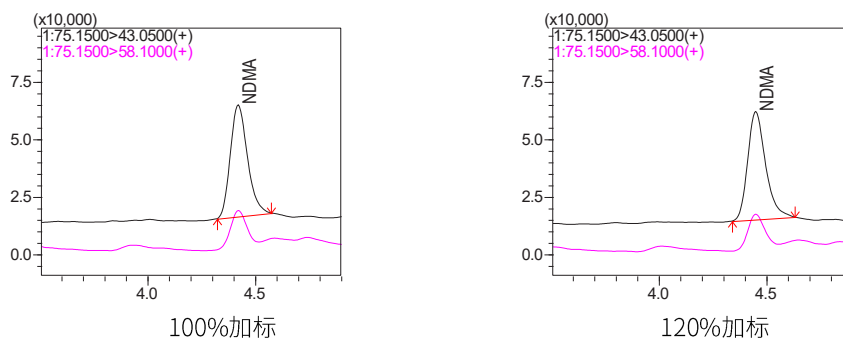


图4 加标回收实验色谱图

## 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。

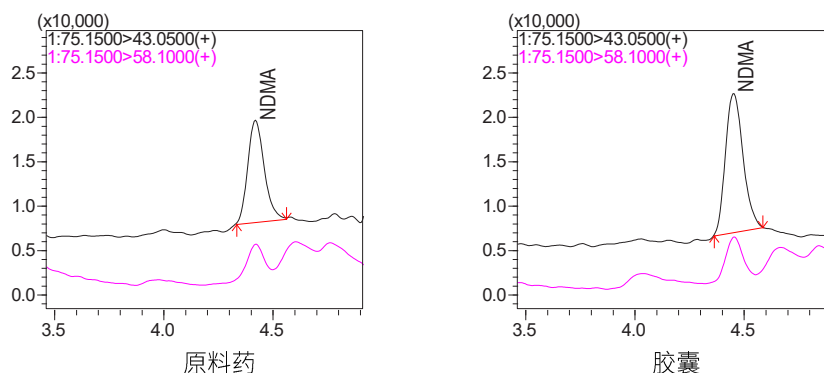


图5 实际样品检测色谱图

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。