

使用 Agilent 6470 三重四极杆液质联用系统定量分析二甲双胍及相关制剂中的 N-亚硝基二甲胺

作者

胡楠，刘东静
安捷伦科技（中国）有限公司

摘要

本应用报告介绍了采用 Agilent 6470 三重四极杆液质联用系统检测二甲双胍及相关制剂中的 N-亚硝基二甲胺 (NDMA) 的方法。该方法采用常规反相体系，重现性好、特异性强，且灵敏度优于目前的 NDMA 法规限量要求 (96 ng/天)，适用于对二甲双胍原料药（一般为盐酸二甲双胍）及市面所见的二甲双胍类制剂（片剂、胶囊、肠溶片和缓释剂等）中的 NDMA 进行快速、准确的定量分析。

前言

在经历全球范围内对胃药雷尼替丁及沙坦类降压药中 N-亚硝基二甲胺 (NDMA) 致癌物污染的恐慌之后，监管机构对其它可能遭受污染的化学合成药物越来越警惕。2019 年 12 月，美国食品药品监督管理局 (FDA) 披露，“正在进行二甲双胍中致癌物检测的初级阶段，尚未证实其中所含的 NDMA 是否高于可接受的每日摄入量 96 纳克的限定值”^[1]。随后，除美国外，新加坡、欧洲、加拿大以及我国的药品监管部门也开始对二甲双胍中 NDMA 的含量进行检测，并且在新加坡已有召回案例^[2]。

N-亚硝基二甲胺 (NDMA) 又称二甲基亚硝胺 (CAS 64-75-9)，结构如图 1 所示，具有很强的肝脏毒性，属于亚硝胺类遗传毒性杂质。根据世界卫生组织国际癌症研究机构公布的致癌物清单，NDMA 属于 2A 类致癌物，即“对人很可能致癌，此类致癌物对人致癌性证据有限，对实验动物致癌性证据充分”^[3]。根据 FDA 之前的评估结果，将 NDMA 的可接受限量规定为 96 ng/天^[4]。

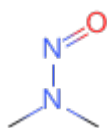


图 1. N-亚硝基二甲胺 (NDMA) 结构

关于二甲双胍中 NDMA 的检测，新加坡卫生科学管理局 (HSA) 于 2019 年 12 月公布了 GC-MS/MS 方法^[2]。同期，我国药品监管部门同时推荐了 LC-MS/MS 和 GC-MS/MS 方法，下发给各省市药品检验机构。2020 年 2 月，FDA 在其官网上更新了 LC-HRMS 检测方法^[1]。

本方法依据中国食品药品检定研究院二甲双胍中 NDMA 推荐检测方法的要求，采用定量的金标准三重四极杆液质联用系统进行测试，操作简单、灵敏度高、特异性强且重现性好，可有效地用于二甲双胍及相关制剂中 NDMA 的定量分析。

实验部分

试剂和样品

甲醇为质谱级，甲酸为色谱级，购自 Merck；所用实验用水为利用 Millipore Milli-Q 超纯水系统现制备的高纯去离子水；NDMA 标准品溶液购自美国 o2si；样品由合作用户提供。

仪器和设备

采用 Agilent 1290 Infinity II 超高效液相色谱系统与 6470 三重四极杆质谱联用系统，其中色谱系统配备二元泵（部件号 G7120A）、自动进样器（部件号 G7167B）和柱温箱（部件号 G7116B），质谱系统配备大气压化学电离 (APCI) 离子源。

为确保高水相体系的耐受性，色谱柱选用 Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-AQ (3.0 × 150 mm, 2.7 μm, 部件号 683975-314)。

标样配制

取 NDMA 标准品溶液（1000 mg/L 甲醇溶液），用水逐级稀释成每 1 mL 中分别含 1、5、10、50、100 ng 标准品的溶液，作为校准标样。并将 1 ng/mL 溶液稀释三倍，作为灵敏度测试溶液。

样品前处理

原料药和非缓释片制剂

称取适量二甲双胍原料药（一般为盐酸二甲双胍）或除缓释片以外的制剂。对于片剂（如盐酸二甲双胍片或二甲双胍肠溶片），需经过预先研磨；对于盐酸二甲双胍胶囊，则称取内容物。所有样品量经过适当计算，以二甲双胍计约 50 mg。加 1 mL 水，摇匀，涡旋混合 1 min，再振摇 10 min，离心后取上清液进行检测。

如果条件允许，建议实验室放大称量及溶剂倍数，以保证结果准确度，使最终样品溶液浓度为 50 mg/mL（以二甲双胍计）。

二甲双胍缓释片

二甲双胍缓释片因辅料影响，不适合用水溶解。建议采用甲醇代替水进行样品前处理，并配合采用甲醇稀释标准品以制备标准标样。

液相色谱条件

色谱柱： Poroshell 120 SB-AQ, 3.0 × 150 mm, 2.7 μm
 流速： 0.4 mL/min
 柱温： 40 °C
 流动相： A) 0.1% 甲酸水溶液
 B) 甲醇
 梯度程序： 时间 (min) B (%)
 0.00 0.00
 5.00 0.00
 6.00 10.00
 7.00 100.00
 8.00 100.00
 8.10 0.00
 9.00 0.00
 后运行时间： 3 min

质谱条件

离子源： APCI 离子源
 雾化气、干燥气及碰撞气： 氮气
 雾化气压力： 50.0 psi
 干燥气温度： 300 °C
 干燥气流速： 5 L/min
 蒸发室温度： 350 °C
 VCap 电压： 1500 V
 电晕针电流： 6 μA
 检测模式： 多反应监测 (MRM)
 MRM 参数： 如表 1 所列

表 1. NDMA 的 MRM 参数

化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	裂解电压 (V)	碰撞电压 (V)	极性
NDMA	75	43*	100	15	正
		58		12	

* 定量离子

结果与讨论

色谱分离结果

二甲双胍极性很高，在常规反相色谱系统中无保留。为提高色谱系统的适用性和耐用性，本研究选择亲水型反相色谱柱 SB-AQ，起始采用 100% 水相洗脱二甲双胍及盐酸盐。利用 NDMA 的弱保留性，将其与高浓度二甲双胍分离。在本研究中所用的色谱条件下，NDMA 的保留时间约为 4.6 min，随后使用高比例有机相洗脱辅料等物质，结果如图 2 所示。

由于二甲双胍浓度很高，为避免污染质谱系统，建议在 NDMA 出峰前流路中设置“引入废液”。如果制剂比较复杂，则建议在 NDMA 出峰后再设置流路“引入废液”，避免辅料的污染。

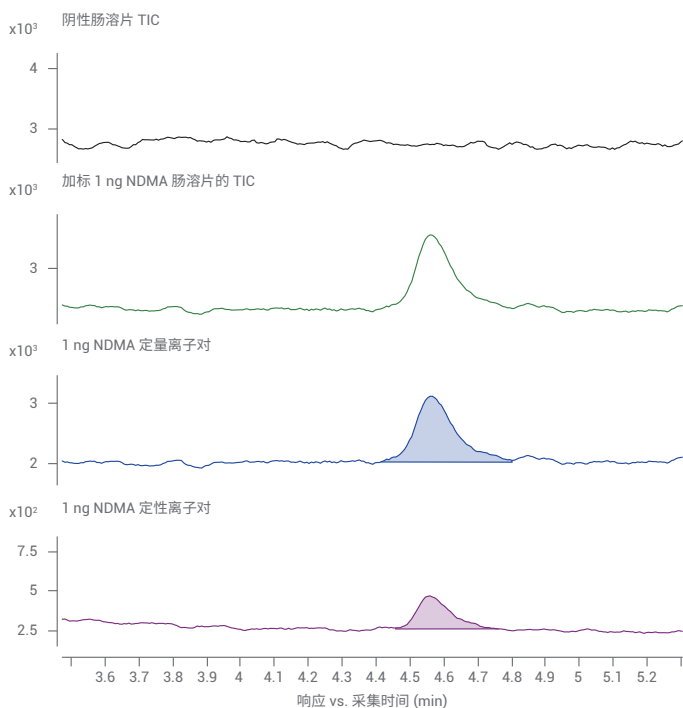


图 2. NDMA 的分离和检测，自上而下依次为：阴性肠溶片 TIC；加标 1 ng NDMA 肠溶片的 TIC；1 ng NDMA 定量离子对；1 ng NDMA 定性离子对

方法学考察：校准曲线、灵敏度与重现性

将 NDMA 校准标样按浓度由低到高进样。结果发现，在 1–100.0 ng/mL 的浓度范围内，NDMA 的线性良好，相关系数 R^2 高于 0.99（如图 3 所示），每个浓度点的准确度均在 90%–110% 范围内。

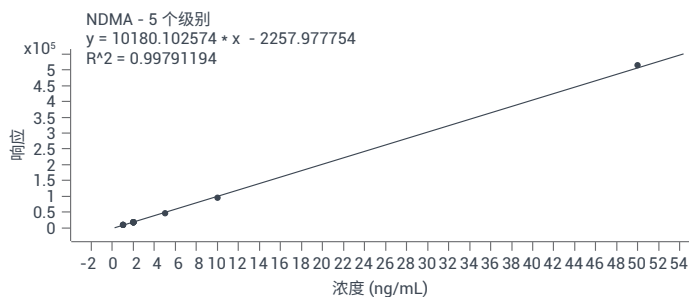


图 3. NDMA 的校准曲线 (1–100.0 ng/mL)

在灵敏度测试中，方法检测下限轻松达到 0.3 ng/mL，定量离子信噪比 (peak to peak) 接近 10，同时可以观察到定性离子，结果如图 4 所示。按照 50 mg/mL（以二甲双胍计）配制二甲双胍原料药及制剂，本方法的灵敏度可达 0.006 ppm，满足目前日摄入量和 NDMA 的法定限量要求。

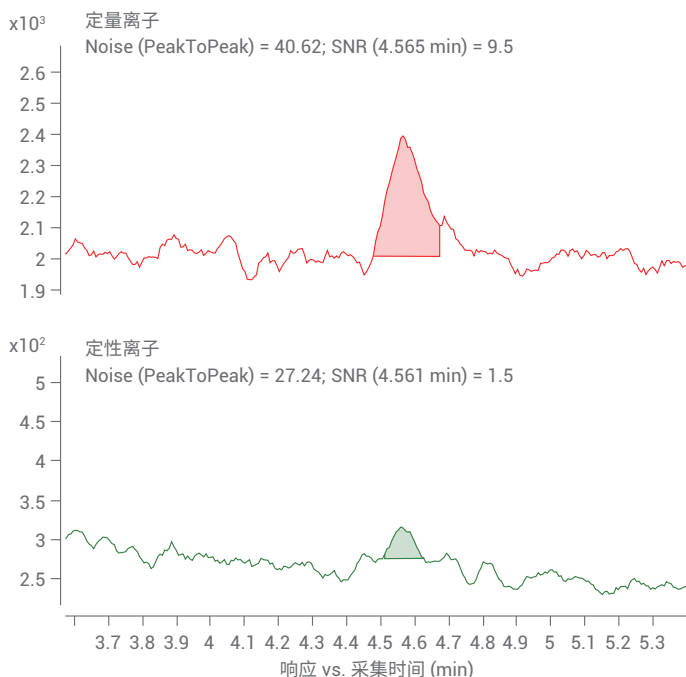


图 4. 0.3 ng/mL NDMA MRM 色谱图：上图为定量离子，下图为定性离子

将中低浓度点 (2 ng/mL) 校准溶液连续进样 6 次，以考察评估方法重现性。结果如表 2 所列。6 次进样得到的峰面积相对标准偏差 (RSD) 为 1.49%，表明该方法具有良好的重现性。

表 2. 2 ng/mL NDMA 连续进样 6 次所得到的峰面积

进样针数	1	2	3	4	5	6
定量离子峰面积	17048	17539	17584	17794	17371	17287

样品处理及加标回收率

本研究分析了盐酸二甲双胍原料药、二甲双胍片、盐酸二甲双胍胶囊、二甲双胍肠溶片和盐酸二甲双胍缓释片。盐酸二甲双胍原料药的水溶性良好，其中的 NDMA 回收率高。将其片剂、胶囊和肠溶片研磨后，采用水溶液提取，加以振摇等辅助手段，在不同加标浓度下得到的回收率均在 80%–120% 之间（见表 3）。

对于二甲双胍缓释片，由于辅料的影响，直接用水溶解将呈“果冻”状，无法继续操作。由于 NDMA 在甲醇中的溶解性良好，且二甲双胍在甲醇中也具有较高的溶解度，因此采用甲醇超声提取二甲双胍缓释片 10 min，所得到的回收率可达 90% 以上（见表 3）。建议缓释片采用甲醇代替水进行样品前处理，并配合采用甲醇稀释标准品制备标准曲线溶液。

表 3. 不同剂型二甲双胍样品的低浓度加标回收率

剂型	肠溶片	片剂	胶囊	缓释剂
样品中 NDMA 含量	N.D.	N.D.	N.D.	33.27 ng/mL
1 ng/mL 加标回收率	105.5%	104.5%	107.2%	
10 ng/mL 加标回收率	因为用户给出的缓释剂为阳性样品，NDMA 含量很高，故加标 10 ng/mL			91.5%

N.D.: 未检出

结论

本研究采用配备 APCI 离子源的 6470 三重四极杆液质联用系统检测二甲双胍及其制剂中的亚硝胺类杂质 NDMA。该方法稳定、特异性强且灵敏度优于目前限量检测要求。考察了不同剂型的成品药，它们经过适当的前处理，均可实现有效分离并使 NDMA 获得 80%–120% 的加标回收率，准确定量分析低浓度 NDMA。另外，该方法采用反相色谱系统，通用性强且重现性好，通过方法设置将高浓度药品基质引入废液，可减少质谱系统的污染。因此，非常适合对大批量二甲双胍样品中的 NDMA 进行常规定量分析。

参考文献

1. 美国 FDA 官网：
<https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-updates-and-press-announcements-ndma-metformin>
2. 新加坡 HAS 官网：
<https://www.hsa.gov.sg/announcements/safety-alert/update-on-impurities-in-metformin-products>
3. 世界卫生组织国际癌症研究机构致癌物清单：
<http://samr.cfda.gov.cn/WS01/CL1991/215896.html>
4. 美国 FDA 官网：
<https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-updates-and-press-announcements-angiotensin-ii-receptor-blocker-arb-recalls-valsartan-losartan>

查找当地的安捷伦客户中心:

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线:

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们:

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价:

www.agilent.com/chem/erfq-cn



微信搜一搜

安捷伦视界

www.agilent.com

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更,恕不另行通知。

© 安捷伦科技(中国)有限公司, 2020
2020年6月22日, 中国出版
5994-2207ZHCN

