

全新一代三重四极杆质谱仪TSQ Fortis检测二甲双胍中的N-亚硝基二甲胺

王立杰、高鹏、郭藤, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司

关键词:

二甲双胍 N-亚硝基二甲胺 TSQ Fortis

摘要

针对二甲双胍中的基因毒性杂质N-亚硝基二甲胺, 基于赛默飞液相色谱串联三重四极杆质谱TSQ Fortis建立了稳定灵敏的分析方法。该方法使用大气压化学电离源(APCI)进行有效检测分析, 在适宜的浓度范围内线性关系良好($r^2 > 0.99$)。2ng/mL浓度水平重复性试验结果优异。该方法稳定快速, 灵敏度能满足二甲双胍中微量基因毒性物质N-亚硝基二甲胺的日常分析要求。

引言

二甲双胍为首选用单纯饮食控制及体育锻炼治疗无效的2型糖尿病, 特别是肥胖的2型糖尿病, 且与胰岛素合用, 可减少胰岛素用量, 防止低血糖发生、与磺酰脲类降血糖药合用, 具协同作用。N-亚硝基二甲胺等基因毒性杂质是指化合物本身直接或间接损伤细胞DNA, 产生致突变和致癌的物质。特点是在很低的浓度时即可造成人体遗传物质的损伤, 进而导致基因突变并可能促使肿瘤发生。因其毒性较强, 对用药的安全性产生了强烈的威胁。

已上市药品中发现痕量的基因毒性杂质残留而被召回的案例, 时有发生, 给药厂造成了巨大的经济损失。近期, 据报道美国FDA正在检测二甲双胍中可能含有的致癌物。新加坡、欧洲药品监管部门也已经对二甲双胍中NDMA的含量进行了检测。新加坡卫生科学管理局宣布二甲双胍中NDMA可能高于“国际可接受水平”后, 已经召回了在新加坡销售的46种二甲双胍药品中的3种。欧洲药品管理局(EMA)也表示, 正在对二甲双胍样本进行NDMA检测, EMA在一份声明中表示: “尽管目前为止发现的NDMA风险非常低, 但药物中应避免NDMA等杂质, 如果发现NDMA水平高于一定要求, 有关部门将采取必要行动”。

基于上述检测需要, 本文建立了基于Thermo Fisher Scientific TSQ Fortis三重四极杆串联质谱仪分析二甲双胍中的N-亚硝基二甲胺的高灵敏度检测方法, 定量限为1ng/mL。本方法重现性好, 线性范围宽, 适于进行二甲双胍中N-亚硝基二甲胺的日常分析检测。

1. 实验部分

1.1 仪器与试剂

1.1.1 Thermo Fisher Vanquish Binary Flex超高效液相色谱仪

Thermo Fisher TSQ Fortis三重四极杆质谱仪

1.1.3 Thermo Scientific Hypersil GOLD Phenyl色谱柱 (P/N: 25903-104630)

1.1.4 甲醇, LCMS级 (Fisher A456-4)

1.1.5 乙腈, LCMS级 (Fisher A955-4)

1.1.6 水, LCMS级 (Fisher W6-4)

1.1.7 甲酸, LCMS级 (Fisher A117-50)

1.1.8 Titan3, 17mmPVDF过滤器, 0.22um (P/N: 42213-PV)

1.2 样品前处理

1.2.1 NDMA标准品储备液

N-亚硝基二甲胺标准品, 纯度98.5%

化合物名称	英文名称	英文简写	CAS	分子式	分子量
N-亚硝基二甲胺	N-Nitrosodimethylamine	NDMA	62-75-9	C ₂ H ₆ N ₂ O	74.05

用超纯水配置NDMA标准品溶液，并用水稀释至100 ng/mL作为标准品储备液

1.2.2 灵敏度溶液

精密量取对照品溶液适量，定量稀释制成每1mL中含1ng的溶液。

1.2.3 供试品溶液制备

取本品药片（或胶囊）细粉适量，精密称定，至50 mL离心管中，精密加入甲醇10mL，涡旋混匀1 min，震荡20 min，以4500转/分的速率离心10分钟，取上清液滤过，取续滤液即得。

1.3 色谱条件

本实验中采用Thermo Scientific Hypersil GOLD Phenyl HPLC分析柱，高载量，峰型好，对NDMA有较好的保留，和API可以做到有效分离。该分析柱基于高纯硅胶设计，用于解决诸多色谱难题，包含C4连接基团，具备中等疏水性，与芳香族化合物具有加强的 pi-pi 相互作用，具有出众的峰形和灵敏度，特别适合苯环和芳环化合物的分析，对芳环分析物具有出众的保留能力和独特的选择性。

色谱条件

HPLC Column	Hypersil Gold Phenyl 4.6*100mm, 3um		
Column Temp.	30°C		
Flow Rate	0.6 mL/min		
Mobile Phase A	0.1% formic acid in water		
Mobile Phase B	0.1% formic acid in methanol		
Gradient	Time(min)	A%	B%
	0.0	95	5
	1.0	95	5
	3.0	80	20
	7.0	0	100
	9.0	0	100
	9.1	95	5
14.0	95	5	
Injection Volume	10 ul		
Autosampler Temp.	8 °C		
Needle Wash	80: 20, Methanol: Water with 0.1% Formic Acid		

表1 色谱条件

1.4 质谱条件

本实验采用全新一代Thermo Scientific TSQ Fortis三重四极杆质谱仪，该质谱仪具备卓越的耐用性，通过主动离子管控技术（AIM+）和基质分离离子引导（MSIG）保持离子路径清洁，确保系统更长时间正常运行；配合多款液相色谱实现日常高通量定量分析。

离子源参数

Ion Source	APCI+
Sheath Gas Flow Rate	50 arbitrary units
Aux Gas Flow Rate	10 arbitrary units
Sweep Gas Flow Rate	0 units
Spray Current	5 uA
Capillary Temp.	300 °C
Aux Gas Heater Temp.	300 °C

表2 质谱条件

Compound	Precursor (m/z)	Product (m/z)	CE (V)	RF Lens (V)
NDMA	75.0	43.071	16.16	56
		58.071*	12.58	56

表3 离子对信息（*表示定量离子对）

2 实验结果

2.1 结果谱图

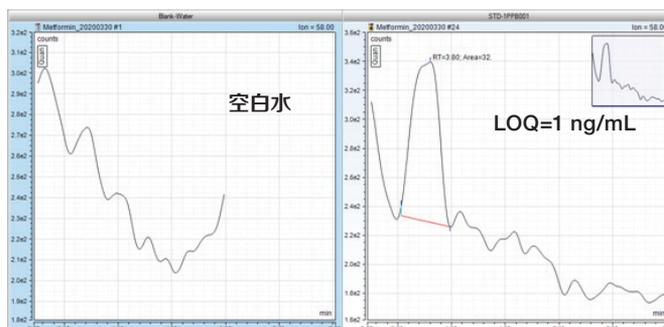


图1 空白水、LOQ溶液色谱图

采用上述仪器条件，在LOQ浓度条件下，NDMA可得到良好峰型，满足FDA（FY20-006-DPA-S）灵敏度要求。

2.2 线性范围及系统适应性测试

配制浓度为1、2、5、10、50、100 ng/mL的标准溶液，采用上述仪器条件进行检测，所得标准曲线线性关系良好，相关系数R² 大于0.99。按照FDA法规进样顺序要求，序列中初始6针标准品溶液（2 ng/mL）相对标准偏差为6.01%，整个序列中标准品溶液偏差小于5%。原料药样品中NDMA的保留时间与标准品偏差小于2%，经测定原料药样品中NDMA的浓度为1.8 ng/mL。



图2 NDMA线性关系

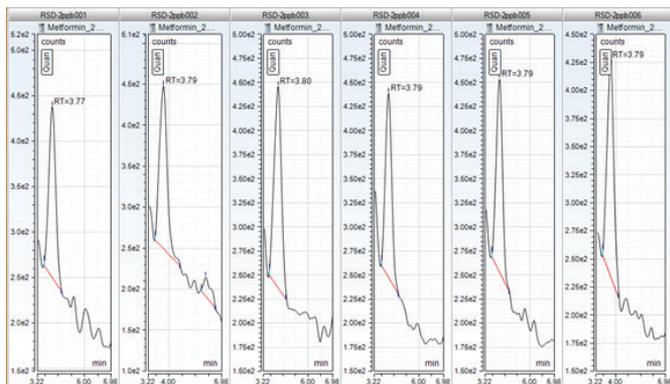


图3 浓度为2 ng/mL重现性图谱

进样顺序	峰面积	保留时间 (min)
Blank-1	-	-
Blank-2	-	-
Standard-1	3273	3.77
Standard-2	3729	3.79
Standard-3	3266	3.80
Standard-4	3352	3.79
Standard-5	3580	3.79
Standard-6	3685	3.79
Blank-3	-	-
Sample-1	3420	3.79
Standard	3764	3.80
...	-	-

表4 进样顺序及结果

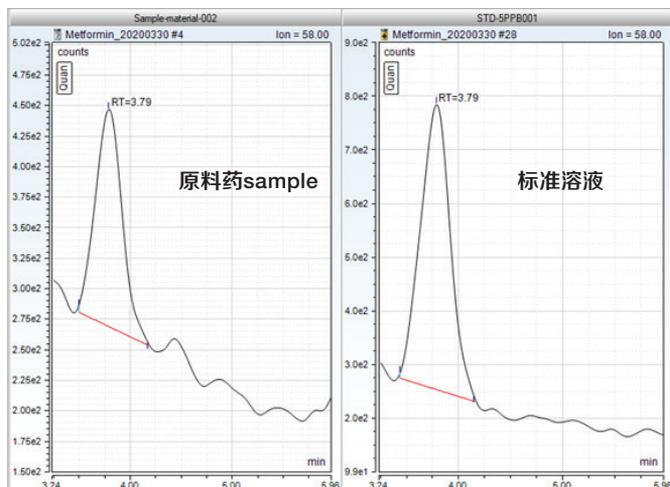


图4 实际样品中NDMA检测色谱图 (样品图谱中3min前与6min后切入废液)

结论

本文建立了基于三重四极杆质谱TSQ Fortis检测二甲双胍中基因毒性杂质N-亚硝基二甲胺 (NDMA) 的方法, 该方法的灵敏度及重现性完全可以满足FDA要求; 实际样品检测时NDMA可与主成分有效分离, 保证结果准确性。同时, 针对制药行业仪器控制及数据处理软件合规性要求, 所有数据完全采用符合法规要求的Chromeleon软件进行处理, 从而可为用户提供NDMA检测的完整解决方案。

参考文献

1. FY20-006-DPA-S_Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) Method for the Determination of NDMA in Ranitidine Drug Substance and Solid Dosage Drug Product (<https://www.fda.gov/media/131868/download>)
2. FY19-177-DPA-S_Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS) Method for the Determination of NDMA in Ranitidine Drug Substance and Drug Product (<https://www.fda.gov/media/130801/download>)

thermo scientific



赛默飞
官方微信

热线 800 810 5118
电话 400 650 5118
www.thermofisher.com

ThermoFisher
SCIENTIFIC