

SCIEX Triple Quad™ 4500系统快速检测二甲双胍中8种亚硝胺类基因毒杂质

Rapid Determination of Nitrosamines of Genotoxic Impurities in Metformin by SCIEX Triple Quad™ 4500 System

陈俊苗, 司丹丹, 龙志敏

Junmiao Chen, Dandan Si, Zhimin Long

SCIEX 应用支持中心, 中国

Key Words: SCIEX Triple Quad™ 4500 System, Nitrosamines, Genotoxic Impurities, Metformin

引言

基因毒性杂质 (GTIs, Genotoxic impurities) 是药物合成、配置及储存过程中可能的中间体, 反应产物或降解物, 其能直接或间接损伤细胞DNA, 甚至产生致突变和致癌作用。基因毒性杂质的特点是在很低的浓度即可造成人体遗传物质的损伤, 因其毒性较强对用药安全性产生了极大的威胁。自2018年从雷尼替丁及二甲双胍中相继发现亚硝胺类杂质NDMA (N-亚硝基二甲胺), 亚硝胺类杂质也受到了极大的关注, 为防范类似事件再次发生, 严格控制药物的用药安全, 监管部门陆续发布了关于药物成分中基因毒性杂质允许限值的指导原则以确保药品的安全。

药物研发过程中亚硝胺类化合物也常被用作有机合成的中间体, 由于其强大的基因毒性, 在药物研发过程中准确测定其含量显得非常重要。但是由于大部分亚硝胺类化合物分子量较小, 亲水性强且部分化合物较难带电等特点都加大了该类化合物检测的难度。二甲双胍是一种处方药, 临床主要用来控制二型糖尿病人的高血糖, 本文首次展示使用LC-MS/MS法同时测试二甲双胍不同剂型中8种亚硝胺类基因毒杂质的含量, 该方法完全满足FDA对8种亚硝胺类基因毒性杂质灵敏度的要求^[1]。

仪器设备:

SCIEX ExionLC™ AD系统和SCIEX Triple Quad™ 4500系统



图1. ExionLC™ AD系统和SCIEX Triple Quad™ 4500系统

对照品溶液制备

精密量取NDMA、NMBA、NEIPA、NDEA、NDIPA、DPNA和NDBA对照品各适量, 分别加入1 µg/ml 内标d6-NDMA 100 µl (无内标可不加)。用甲醇定量稀释制成每1 ml中含内标溶液10 ng, 分别约含0.5 ng、1 ng、2 ng、5 ng、10 ng、20 ng、50 ng和100 ng的混合对照品溶液。

供试品溶液制备

盐酸二甲双胍原料药，肠溶胶囊及肠溶片：取本品内容物适量（相当于二甲双胍500 mg），精密加1 mol/L盐酸10 ml（内含10 ng/ml d6-NDMA），涡旋混匀，振摇20 min，高速离心10 min，取上清液滤过，取续滤液进液质分析。

盐酸二甲双胍缓释片：取本品内容物适量（相当于二甲双胍500 mg），精密加无水甲醇10 ml（内含10 ng/ml d6-NDMA），涡旋混匀，振摇20 min，高速离心10 min，取上清液滤过，取续滤液进液质分析。

注：当采用外标法进行测定时，供试溶液与对照溶液无需加入d6-NDMA。

液相条件

液相系统：SCIEX ExionLC™ AD系统

色谱柱：HALO AQ-C18 2.7 μm, 4.6 x 250 mm

流动相：A: 含0.1%甲酸的水; B: 含0.1%甲酸的甲醇

流速：0.55 mL/min

柱温：40 °C

进样体积：5 μL

液相梯度：

时间(min)	A(%)	B(%)
0	95	5
6	95	5
8	70	30
9	40	60
10	20	80
14	5	95
15	0	100
16	0	100
16.1	95	5

质谱条件

离子源：APCI，正离子模式

扫描方式：MRM多反应监测

气帘气CUR: 25psi

NC电流: 3.0 μA

源温度 Tem: 400°C

雾化气Gas1: 40psi

辅助气Gas2: 55psi

MRM参数：如表1

表1. 8种基因毒杂质的质谱参数

化合物名称 (Name)	Q1	Q3	RT	DP	CE
N-亚硝基二甲胺 (NDMA)	75	43.1	6.5	20	20
N-亚硝基二乙胺 (NDEA)	103.1	75.1	9.6	40	15
乙基异丙基亚硝胺 (NEIPA)	117.1	75	10.3	25	15
N-亚硝基-二异丙胺 (NDIPA)	131.2	89	10.8	30	12
N-硝基二丙胺 (NDPA)	131.1	89	11.2	35	14
N-亚硝基甲基苯胺 (NMPA)	137.1	66.1	11.2	60	25
N-亚硝基二丁胺 (NDBA)	159.1	103.2	12.6	35	15
N-亚硝基-4-甲基-4-氨基丁酸 (NMBA)	147.1	44	8.8	25	20
D6-N-亚硝基二甲胺 (NDMA)	81.1	46	7.7	55	23

实验结果

灵敏度和线性结果：所有8种亚硝胺化合物在线性范围内线性良好，线性关系R值均大于0.995，定量下限（LLOQ）及定量上限（ULOQ）以及R值信息如表2。8种亚硝胺类化合物在1 ng/mL浓度下保留时间及出峰情况详见图1。

表2. 8种基因毒杂质线性范围

化合物名称 (Name)	LLOQ (ng/mL)	ULOQ (ng/mL)	线性关系R值
N-亚硝基二甲胺 (NDMA)	1	100	0.999
N-亚硝基二乙胺 (NDEA)	0.5	100	0.999
乙基异丙基亚硝胺 (NEIPA)	0.5	100	0.999
N-亚硝基-二异丙胺 (NDIPA)	0.5	100	0.999
N-硝基二丙胺 (NDPA)	0.5	100	0.999
N-亚硝基甲基苯胺 (NMPA)	0.05	20	0.997
N-亚硝基二丁胺 (NDBA)	0.5	100	0.999
N-亚硝基-4-甲基-4-氨基丁酸 (NMBA)	0.5	100	0.999

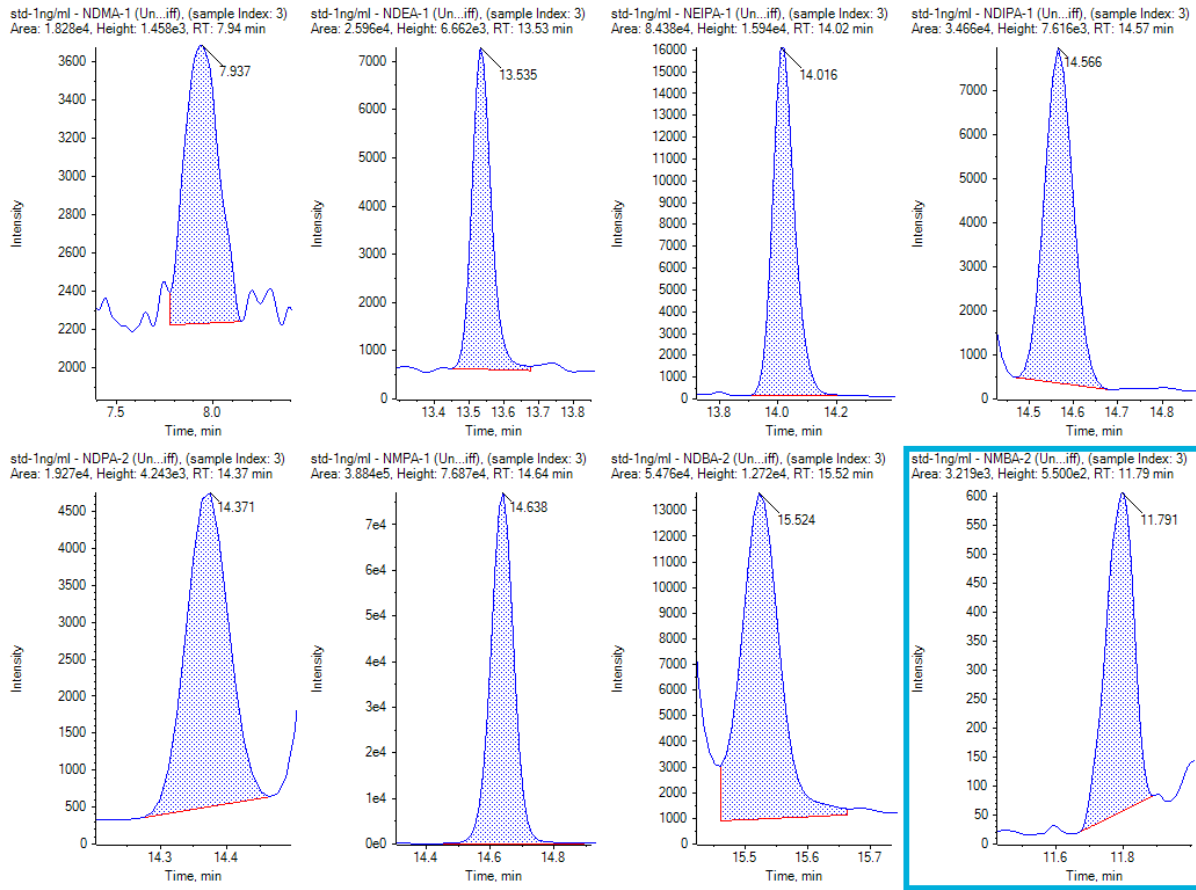


图1. 1 ng/mL 对照品中8种亚硝胺化合物提取离子流图

表3. 8种基因毒杂质回收率结果

化合物名称 (Name)	回收率 (Recovery)		
	1.5 ng/mL	2 ng/mL	2.5 ng/mL
N-亚硝基二甲胺 (NDMA)	106	110	101
N-亚硝基二乙胺 (NDEA)	96	95	89
乙基异丙基亚硝胺 (NEIPA)	89	92	87
N-亚硝基-二异丙胺 (NDIPA)	105	105	97
N-硝基二丙胺 (NDPA)	87	93	85
N-亚硝基甲基苯胺 (NMPA)	102	109	103
N-亚硝基二丁胺 (NDBA)	100	90	86
N-亚硝基-4-甲基-4-氨基丁酸 (NMBA)	86	90	87

回收率结果：取样品加标溶液（浓度分别为1.5ng/mL, 2ng/mL, 2.5ng/mL）进样分析得加标回收率结果，8种亚硝胺类基因毒杂质的回收率信息如表3，全部8种化合物在不同基质中回收率良好，所有化合物回收率在85%-115%之间，表明该方法在不同剂型二甲双胍中通用性好，SCIEX Triple Quad™ 4500 系统抗基质干扰能力强。

总结

本文使用SCIEX Triple Quad™ 4500 系统建立了同时测定二甲双胍中8种亚硝胺类化合物含量的LC-MS/MS方法。该方法特异性好无干扰，8种亚硝胺类化合物在线性范围内线性关系良好，相关系数大于0.997。多批次不同剂型二甲双胍药品的加标回收率良好说明方法的通用性好。

参考文献

1. Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-High Resolution Mass Spectrometry Method for the Determination of Nitrosamine Impurities in Metformin Drug Substance and Drug Product, 2020,03.,U.S. FOOD & DRUG Administration.

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在英国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2021 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-12826-ZH-A

Echo 和 Echo MS是Labcyte, Inc.在美国或其他国家的商标或注册商标，并许可使用。



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808-1388
传真：010-5808-1390
全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419-7200
传真：021-2419-7333
官网：sciex.com.cn

广州分公司
广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话：020-8510-0200
传真：020-3876-0835
官方微信：[ABSciex-China](https://www.absciex.com.cn)