

应用纪要

使用Xevo G2-XS QTof对雷尼替丁中的NDMA进行选择性和特异性定量分析

Viviane Nascimento, Michael Murgu, Lauren Mullin

Waters Corporation



摘要

N-亚硝基二甲胺(NDMA)具有致癌性，并普遍存在于各类人用商品和药品中，因此，监测各种基质中的这种化

合物受到极大关注。这些化合物需要在复杂制剂样品中的亚ng/mL范围内进行高灵敏度、高选择性检测。本文探讨了Xevo G2-XS QToF在靶向增强模式下对雷尼替丁药品中的NDMA进行高灵敏度、高选择性定量分析的性能。除展示线性、检测和浓度计算结果以外，还描述了该方法分离NDMA与近期鉴定的干扰物质的色谱能力。

优势

- 根据法规建议以高灵敏度、高选择性测定药品中的NDMA
- 采用靶向增强模式提升HRMS灵敏度
- NDMA与已知的共洗脱干扰物二甲基甲酰胺实现色谱分离

简介

N-亚硝基二甲胺(NDMA)是一种已知的潜在致癌物质，近来在各种药品中作为杂质检出¹。在这些情况下，NDMA的形成可归因于使用二甲基甲酰胺(DMF)和硝酸盐试剂合成活性药物成分(API)的过程¹。受影响的药物起初包括广泛销售的血管紧张素II受体阻滞剂^{2,3}，例如“沙坦”原料药缬沙坦^{3,4}。此后发现更多的NDMA污染，目前已扩展至雷尼替丁^{4,5}（用于治疗胃溃疡和胃灼热⁴）和缓释二甲双胍⁶。随后，US FDA和全球其他监管机构对这些药品的生产采取了召回或限制措施^{2,3}，并发起一场要求准确检测并定量分析NDMA及其他N-亚硝胺的推广活动^{2,4}。目前，美国FDA已经将NDMA的每日摄入量限值确定为96 ng/天⁵，并在积极考虑降低该限值。

因此，主动监测NDMA非常重要，且需要采用高灵敏度、高特异性分析方法。液相色谱-质谱联用(LC-MS)技术已成功应用于对NDMA进行可靠的鉴定和定量¹。例如，测量雷尼替丁中的NDMA时，液相色谱法优于气相色谱法，因为后者在分析过程中会导致原料药降解而形成NDMA⁷。高分辨率质谱(HRMS)平台通过离子的精确质量数测量发挥了特异性优势，能够生成质量数范围较窄的提取离子色谱图(XIC)。仪器设计方面的新进展大幅提高了某些HRMS平台的灵敏度⁸，还可以通过在感兴趣的目标质荷比(m/z)周围应用增强的占空比进一步增加信号强度。之前已有研究表明，HRMS方法能够准确、精密地定量分析原料药和药品中的NDMA^{2,3,7}。

本文介绍了Xevo G2-XS QToF与UPLC系统联用作为HRMS平台对药品雷尼替丁和二甲双胍中的NDMA进行的选择性和高灵敏度测量。还展示了该方法对NDMA与N,N-二甲基甲酰胺(DMF)实现的色谱分离（已知DMF会导致潜在的定量干扰）。

实验

样品描述

本研究所用样品的制备方法为：将雷尼替丁和二甲双胍药品溶于水中，制成最终浓度为30 mg/mL的溶液。具体而言，将150 mg雷尼替丁溶于5 mL药物溶液注射用水中。对于二甲双胍，则将三个500 mg药片溶于50 mL水中；本研究还溶解了二甲双胍API，使用120 mg API和4 mL水，制成最终浓度为30 mg/mL的溶液。

用水将NDMA储备液稀释至工作浓度10 µg/mL，并用适当体积的水将储备液稀释至浓度1.0、5.0、10、50和100 ng/mL。使用以下从文献²中直接引用的计算方法来测定制得的药品溶液中NDMA的浓度，其中 A_{spl} 和 A_s 使用NDMA提取离子色谱图(XIC)中75.0552 m/z处的靶向增强面积。

药品：

$$\text{NDMA杂质(ppm)} = \frac{A_{spl}}{A_s} \times C_s \times \frac{1 \text{ mg}}{1 \times 10^6 \text{ ng}} \times \frac{1}{30 \text{ mg/mL}} \times 10^6$$

其中：

A_{spl} = 样品溶液中NDMA定量离子峰(m/z 75.1 $\rightarrow$ m/z 43.1)的峰面积

A_s = 标准溶液前6次连续进样得到的NDMA定量离子峰(m/z 75.1 $\rightarrow$ m/z 43.1)的平均峰面积($n = 6$)

C_s = 标准溶液中NDMA的浓度(ng/mL)

报告

- 如果NDMA杂质含量值 $\geq$ LOD，则以ppm报告并保留三位有效数字
- 如果未检出NDMA杂质或其含量值 $<$ LOD，则报告为“未检出”

二甲基甲酰胺(DMF)和NDMA的制备方法为：溶于水中，制成最终浓度分别为30 µg/mL和2 ng/mL的溶液。

液相色谱条件

液相色谱系统：

ACQUITY UPLC H-Class

检测条件：

Xevo G2-XS Qtof

色谱柱：

ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1 $\times$ 100 mm, 1.8 µm)

柱温：30 °C

样品温度：7 °C

进样体积：10 μL

流速：300 μL/min

流动相A：水 + 0.1%甲酸

流动相B：甲醇 + 0.1%甲酸

梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	0.3	99	1	初始
2.5	0.3	99	1	6
3.0	0.3	10	90	6
5.0	0.3	10	90	6
5.5	0.3	99	1	6
10	0.3	99	1	6

质谱条件

质谱系统：Xevo G2-XS Qtof

分析器模式：灵敏度

采集模式：TOF MS

扫描时间：0.8 s

电离模式：APCI正离子模式

采集范围：30–150 m/z

靶向增强质量数：75.0 m/z

电晕电流：0.5 mA

探头温度：250 °C

脱溶剂气流速：1200 L/h

碰撞能量：6 eV

锥孔电压：40 V

锥孔气流速：10 L/h

离子源温度：130 °C

实时校正标准液：亮氨酸脑啡肽(120.0813 m/z)

四极杆配置文件：手动配置文件（设置如下）

The image shows a software window titled "Quad Profile" with a question mark icon and a close button. It contains two main sections: "Quadrupole Options" and "Quadrupole MS Profile".

Quadrupole Options:

- ☐ Manual Fixed
- ☒ Manual Profile
- ☐ Auto Profile

Quadrupole MS Profile:

	Mass	Dwell Time (% Scan Time)	Ramp Time (% Scan Time)
1.	60	25	25
2.	110	25	25
3.	140		

At the bottom right, there are two buttons: "Update" and "Close".

数据管理

色谱软件：	MassLynx 4.2版
质谱软件：	MassLynx 4.2版
数据处理：	UNIFI v1.9.4

结果与讨论

利用溶剂标准品评估NDMA的初步检测结果。为改善NDMA的检测效果，本文采用一种靶向增强方法。Xevo G2-XS QToF上的靶向增强通过同步TOF区域中的排斥极实现，本例中针对的是NDMA的 $[M+H]^+$ ⁹。操作非常简单，只需在MS方法（如图1所示）中启用“Target Enhancement”（靶向增强）并输入目标质量数即可（在本例中为75.0 Da）。图2显示了稀释剂空白样和系列中每个浓度点的提取离子色谱图汇总以及所得的校准曲线数据。根据峰间信噪比10:1确定的定量限(LOQ)为1.0 ng/mL，其中噪音取自2.5~3.0 min区域。范围1.0~100 ng/mL的稀释系列表现出优异的线性（ R^2 为0.996，图2）。该值低于FDA最近推荐的药品/原料药中NDMA限值30 ng/mL¹⁰。

Function:1 MS

Acquisition TOF MS Collision Energy

Acquisition Times

Total time for this acquisition

Start Time 0 min

End Time 10 min

Source

Source ES

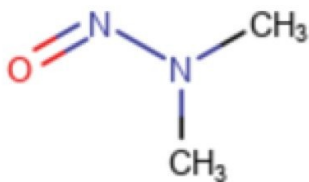
Acquisition Mode

Polarity ☒ Positive ☐ Negative

Analyser Mode ☐ Resolution ☒ Sensitivity

Dynamic Range ☒ Normal ☐ Extended

Target Enhancement ☐ Off ☒ Target Mass 75 Da



NDMA
 $C_2H_6N_2O$
MW: 74.0480
[M+H]⁺: 75.0552

OK Cancel Apply

图1.在TOF MS MassLynx采集方法中对NDMA启用靶向增强



图2.空白样和所有标样的NDMA XIC以及校准曲线数据

完成NDMA溶剂标准品分析后，继续分析雷尼替丁药品(DP)。NDMA与雷尼替丁之间的色谱分离结果如图3所示，图中比较了5 ng/mL NDMA标准品进样与30 mg/mL雷尼替丁进样的结果。利用Xevo G2-XS QToF进行精确质量数测量对NDMA鉴定发挥了特异性（图3）。分析雷尼替丁DP发现其中存在NDMA污染。图4显示了雷尼替丁中未经进一步加标以及四个加标水平（1.0、5.0、10和20 ng/mL）的NDMA的XIC，还显示了所有进样的响应汇总。每次进样得到的汇总图中均标注了标准品和药品样品中NDMA的计算浓度。最后，对雷尼替丁DP中的加标NDMA曲线进行1/X加权，结果表现出良好的线性（ R^2 值为0.996）。

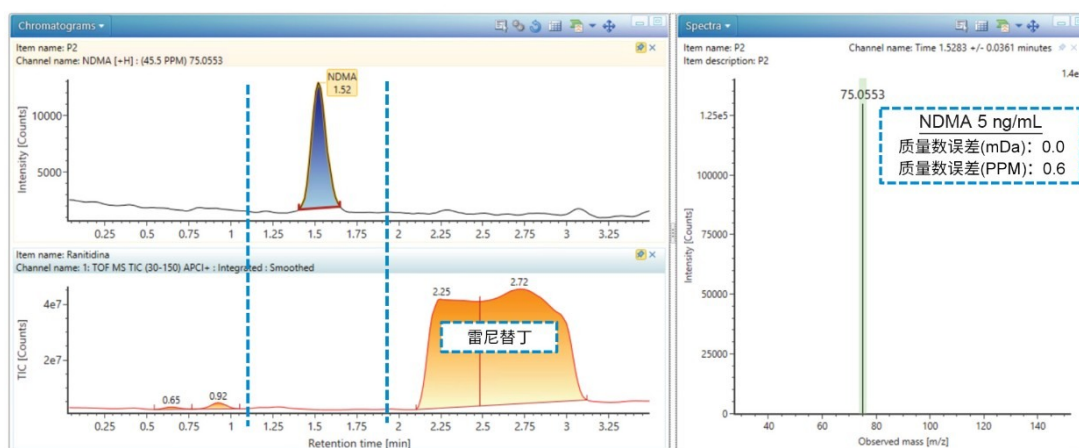


图3.使用ACQUITY HSS T3 UPLC色谱柱对NDMA（5 ng/mL标准品）和雷尼替丁(30 mg/mL)实现的色谱分离。该LC-HRMS方法通过精确质量数测量进一步提升了特异性，从NDMA标准品的谱图可以证明。

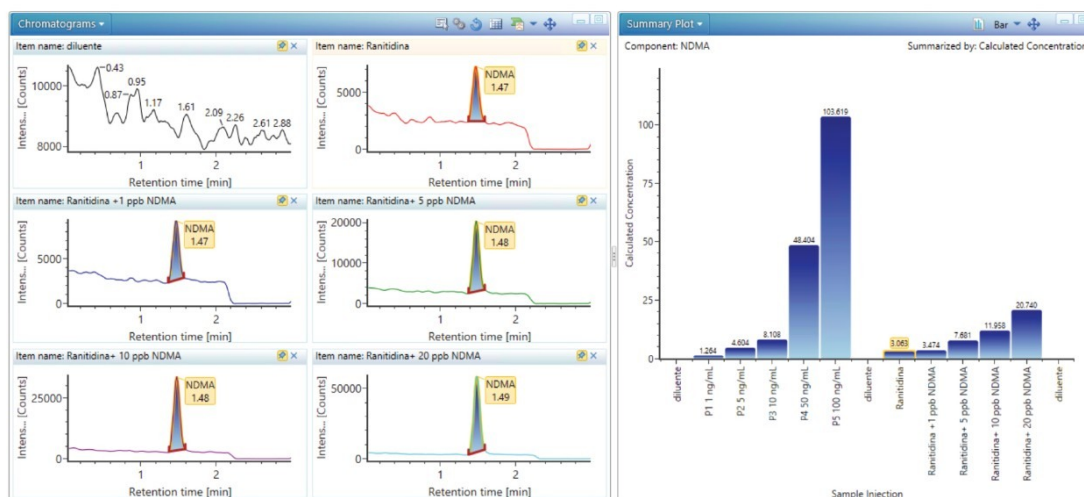


图4.空白稀释剂、雷尼替丁药品和加标药品的NDMA XIC，以及所有进样中NDMA计算浓度的汇总表。

完成方法性能表征后，分析7种雷尼替丁样品发现其中包含不同浓度的NDMA。这些结果以及3 ng/mL NDMA标准品的平均响应（峰面积）见表1。本研究根据在水中制备的标准曲线定量NDMA，还分析了二甲双胍样品，未发现可检出的NDMA。

样品编号	结果 (ppm)
1	0.422
2	0.001
3	0.344
4	0.189
5	0.188
6	0.020
7	0.059

表1.7种不同雷尼替丁样品中的NDMA浓度(ppm)汇总

最近有报告强调，由于二甲双胍药品中含有共洗脱的N,N-二甲基甲酰胺(DMF)，NDMA定量可能存在差异。DMF (C_3H_7NO)和NDMA ($C_2H_6N_2O$)的分子量相似（理论 $[M+H]^+$ 分别为74.0600 m/z和75.0553 m/z），尽管

这些质量数在名义质量数条件下很容易区分，但由于存在DMF15 N同位素离子（理论 m/z 为75.0631），NDMA在色谱共洗脱环境下发生了定量结果偏高的情况¹¹。本研究采用的色谱方法虽然是在这一NDMA定量问题披露之前开发出来的，但仍然对NDMA与DMF实现了合适的基线分离，如图5所示。即使在HRMS方法中，色谱分离也是避免不准确定量的可靠方法。

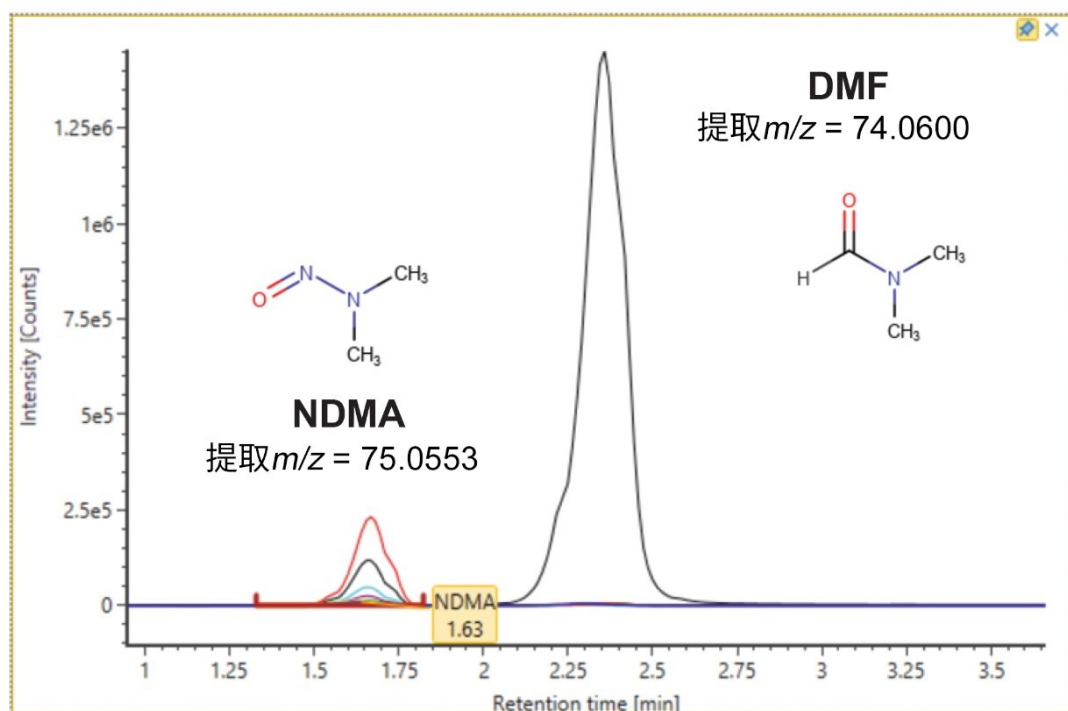


图5.1.63 min处NDMA（样品浓度范围1.0–100 ng/mL内的叠加XIC）与2.30 min处DMF的色谱分离

结论

本文展示了Xevo G2-XS QToF准确定量雷尼替丁和二甲双胍药品中NDMA的能力，该方法的LOQ小于FDA推荐的LOQ (0.03 ppm, 30 ng/mL)。使用该方法能够定量7种二甲双胍片剂中的NDMA。开发出的UPLC色谱方法也被证明在从潜在的共洗脱DMF中分离NDMA方面具有良好的稳定性和选择性。

参考资料

1. Parr MK and Joseph JF. NDMA Impurity in Valsartan and other Pharmaceutical Products: Analytical Methods for the Determination of N-nitrosamines. JPBA 2018;164(2019):536–549.
2. US Food and Drug Administration. Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS) Method for the Determination of Six Nitrosamine Impurities in ARB Drugs. 21 May 2019.
3. Sörgel F et al. The Contamination of Valsartan and other Sartans, Part 1: New findings. JPBA 2019;172(2019):395-405.
4. <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/post-authorisation/referral-procedures/nitrosamine-impurities> <<https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/post-authorisation/referral-procedures/nitrosamine-impurities>> .Accessed 13 July 2020.
5. White CM. Understanding and Preventing (N-Nitrosodimethylamine) NDMA Contaminating of Medications. AOP 2019;54(6):611–614.
6. <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-updates-and-press-announcements-ndma-metformin> <<https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-updates-and-press-announcements-ndma-metformin>> .Accessed 13 July 2020.
7. US Food and Drug Administration. Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS) Method for the Determination of NDMA in Ranitidine Drug Substance and Drug Product. 13 September 2019.
8. Waters Corporation. XS Collision Cell White Paper. Waters Corporation White Paper [720005071EN](https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=134800563&lcid=134800562&locale=en_US) <https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=134800563&lcid=134800562&locale=en_US> .2014 June.
9. Tomczyk N et al. Targeted High Resolution Quantification with ToF-MRM and HD-MRM. Waters Application Note [720004728EN](https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720004728en.pdf) <<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720004728en.pdf>> .2013 June.
10. US Food and Drug Administration. Control of Nitrosamine Impurities in Human Drugs: Guidance for Industry. September 2020.
11. Yang J et al. A Cautionary Tale: Quantitative LC-HRMS Analytical Procedures for the Analysis of N-Nitrosodimethylamine in Metformin. The AAPS Journal 22:89 (2020).

特色产品

ACQUITY UPLC H-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/10138533>>

Xevo G2-XS QToF四极杆飞行时间质谱仪 <<https://www.waters.com/134798222>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

UNIFI科学信息系统 <<https://www.waters.com/134801648>>

720007167ZH, 2021年3月