

使用高分辨率 Agilent 6546 LC/Q-TOF 测定雷尼替丁原料药与成品药中的 NDMA 遗传毒性杂质

作者

Chander Mani
Saikat Banerjee
安捷伦科技有限公司



摘要

杂质是依赖 FDA 批准的安全有效药物的患者和消费者高度关注的问题。雷尼替丁和尼扎替丁均为 H₂ 受体阻滞剂，可降低胃中的酸含量，用于治疗胃炎和胃溃疡。雷尼替丁原料药与成品药中均检出过一种致癌性亚硝胺杂质，导致许多这类药物被召回。行业需要一种分析方法来检测这些致癌性亚硝胺杂质。雷尼替丁因疑含有 N-二甲基亚硝胺 (NDMA)，是最近被召回的药物之一。本应用简报描述了一种使用 Agilent 6546 LC/Q-TOF 的灵敏高分辨率 LC/MS/MS 方法，用于检测与定量雷尼替丁原料药和成品药中的 NDMA。

前言

FDA 宣布召回雷尼替丁成品药，因为这些药物中可能含有亚硝胺杂质，这也使得 NDMA 杂质（图 1）成为了 FDA 和 EMA 等监管机构关注的重点。这些亚硝基化合物被列为可能的人类致癌物，它们是生产过程中的痕量副产物，并由此被引入药物成品中。最近，USFDA 在某些批次的雷尼替丁药品中检出了 NDMA。

基于液相色谱/质谱联用系统的方法通常具有高灵敏度和高特异性，已成为检测和定量雷尼替丁原料药与成品药中 NDMA 的方法开发基础。本应用简报描述的方法在 6546 LC/Q-TOF 仪器上进行，在极低检测限下实现了 NDMA 的全面分析。本应用简报还展示了高分辨率 6546 LC/Q-TOF 的高灵敏度。

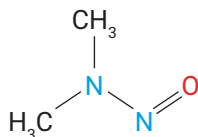


图 1. NDMA 的化学结构

实验部分

化学品与试剂

本研究使用的一种 NDMA 标准品来自当地 PS3 Labs LLP (Hyderabad, TS, India)。其他 LC/MS 级溶剂（如甲醇、水）购自 Honeywell (Charlotte, NC, USA)。甲酸购自 Fluka（现属于 Honeywell）。

液相色谱配置和参数

表 1. UHPLC 配置和设置

参数	值			
仪器	Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A)			
	Agilent 1290 Infinity II Multisampler (G7167B)			
	Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱 (G7116B)			
	Agilent 1290 Infinity II 可变波长检测器 (G7114B)			
进样针清洗	甲醇:水 (80:20 v/v)			
样品稀释剂	水:甲醇 (95:5 v/v)			
Multisampler 温度	6 °C			
进样量	20 µL			
分析柱	Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C18, 4.6 × 150 mm, 2.7 µm (部件号 693975-702)			
柱温	40 °C			
流动相 A	0.2% 甲酸水溶液			
流动相 B	甲醇			
流速	0.3 mL/min			
梯度	时间 (min)	%A	%B	流速 (mL/min)
	0	95	5	0.3
	6	92	8	0.3
	6.1	92	8	0.5
	11	5	95	0.5
	11.1	5	95	0.3
	11.2	95	5	0.3
	14	95	5	0.3
停止时间	14 min			
波长	300 nm, 320 nm			

Q-TOF 质谱仪配置和参数

表 2. 质谱仪配置和离子源设置

仪器	Agilent 6546 LC/Q-TOF
离子源	大气压化学电离 (APCI)
MS 模式	质谱仪
电离模式	正离子
干燥气温度	300 °C
干燥气流速	6 L/min
雾化器压力	45 psi
APCI 加热器	350 °C
APCI 喷雾针，正离子模式	4 µA
正离子化的毛细管电压	3000 V
质量数范围	<i>m/z</i> 70–170

分析物的 MS 化合物信息

表 3. Agilent 6546 LC/Q-TOF 的详细 MS 设置

时间段	开始时间 (min)	质量范围 (<i>m/z</i>)	碎裂电压 (V)	分流阀位置
1	0	70–170	120	废液
2	6.5	70–170	120	质谱仪
3	8.2	70–170	120	废液

数据分析

采集数据，使用 Agilent MassHunter LC/MS 数据采集软件 10 版对 6546 LC/Q-TOF 采集的数据进行分析。使用 Agilent Masshunter 定量分析软件 10 版（适用于 TOF）对 NDMA 进行定量分析。

结果与讨论

校准浓度范围为 0.25–100 ng/mL (表 4)。NDMA (m/z 75.0553) 的 R^2 值大于 0.9997，在整个浓度范围内表现出线性

响应。图 2 显示了 5 ng/mL NDMA 的代表性提取离子色谱图和以及雷尼替丁 UV 色谱图，图中展示出洗脱模式。表 3 所示的分流阀程序用于将高浓度雷尼替丁分流至废液中。

表 4. Agilent 6546 LC/Q-TOF 的结果汇总。数据包括信噪比 (S/N)、计算得到的定量限 (LOQ)、回归系数、校准曲线拟合结果和线性范围。NDMA 采用线性函数和 1/x 加权的校准曲线

化合物	检测限 (ng/mL)	检测限 (S/N)	LOQ (ng/mL)	LOQ (S/N)	R^2	校准曲线	线性范围 (ng/mL)
NDMA	0.15	18.8	0.25	47.48	0.9997	线性	0.25–100

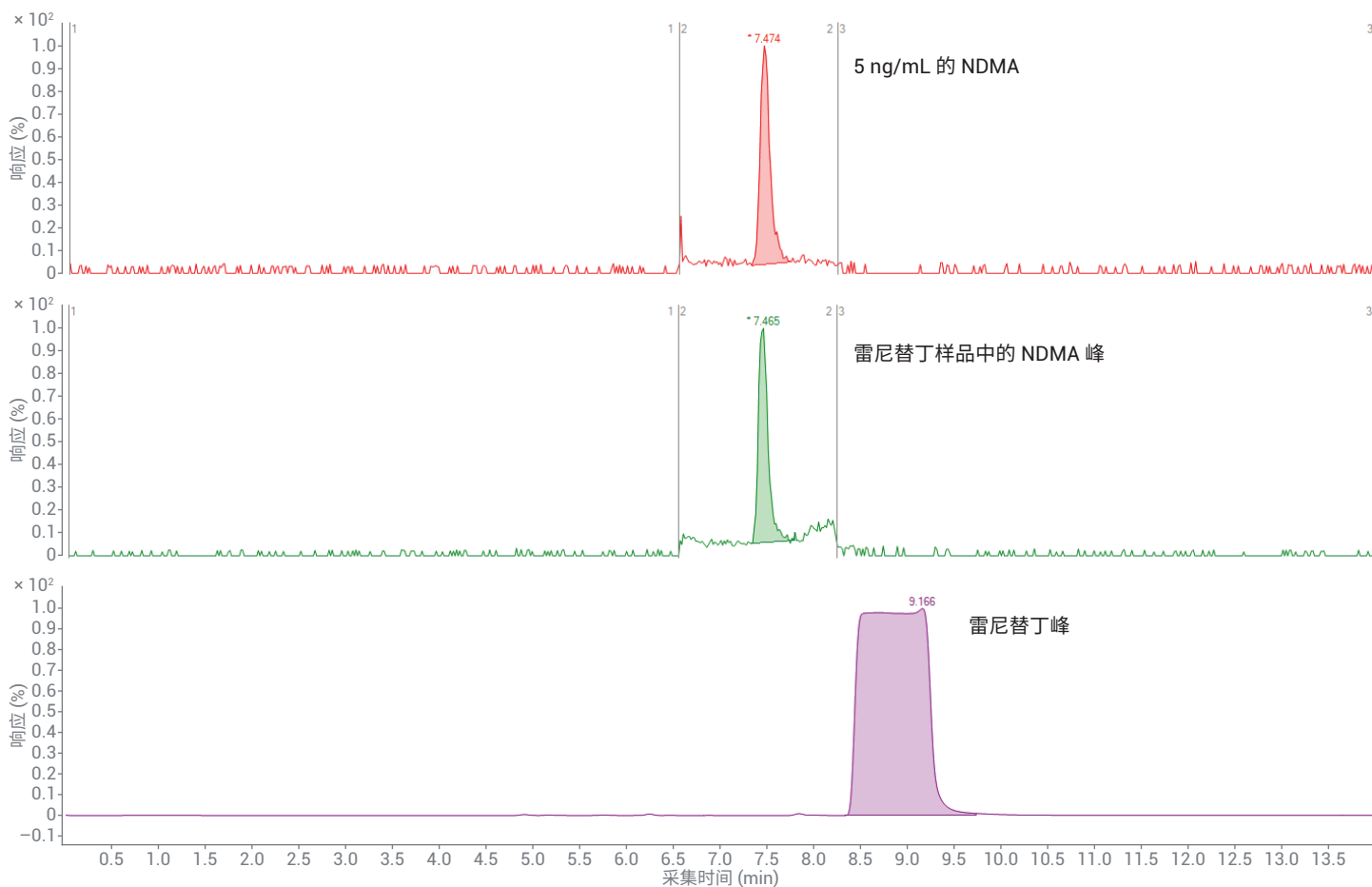


图 2. 显示洗脱模式的代表性 NDMA (5 ng/mL) MRM 色谱图以及雷尼替丁 UV 色谱图

准确度和重现性

NDMA 的校准曲线表明在各校准浓度下，准确度均处于预期浓度的 ±20% 以内，且所有浓度下的变异系数 (CV) 均小于 15%，表现出重现性 (图 3)。图 4A、图 4B 与表 5 详细比较了不同浓度下的准确度和重现性。

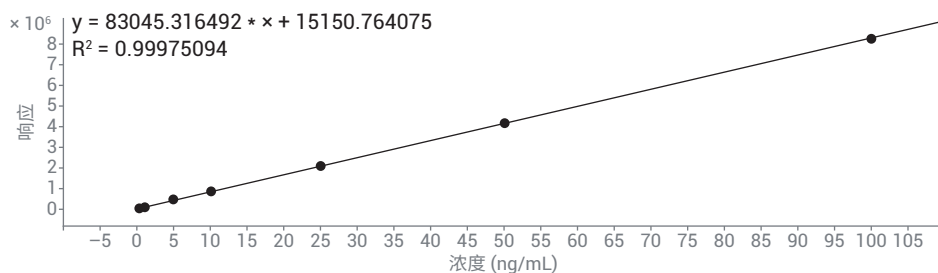


图 3. 分散在整个色谱图中的代表性 NDMA 校准曲线。NDMA 校准曲线均采用线性函数和 1/x 的加权因子

Sample					NDMA M.L.		NDMA Results							
Name	Data File	Type	Level	Dil.	Exp. Conc.	RT	Resp.	MI	Calc. Conc.	Final Conc.	Accuracy	Mass Accuracy	S/N	
Blank	Blank-r002.d	Blank		1.0000				<input type="checkbox"/>						
0.25 ppb	0.25 ppb-r001.d	Cal	1	1.0000	0.2500	7.496	33707	<input type="checkbox"/>	0.2061	0.2061	82.4	-1.3770	47.46	
0.5 ppb	0.5 ppb-r001.d	Cal	2	1.0000	0.5000	7.497	53629	<input type="checkbox"/>	0.4461	0.4461	89.2	-0.2417	92.22	
0.5 ppb	0.5 ppb-r002.d	Cal	2	1.0000	0.5000	7.465	53993	<input type="checkbox"/>	0.4505	0.4505	90.1	-2.0896	140.60	
1 ppb	1 ppb-r001.d	Cal	3	1.0000	1.0000	7.476	104775	<input type="checkbox"/>	1.0625	1.0625	106.2	-2.0565	184.65	
1 ppb	1 ppb-r002.d	Cal	3	1.0000	1.0000	7.480	104836	<input type="checkbox"/>	1.0632	1.0632	106.3	-2.0449	230.68	
1 ppb	1 ppb-r003.d	Cal	3	1.0000	1.0000	7.481	104316	<input type="checkbox"/>	1.0569	1.0569	105.7	-1.7189	368.90	
1 ppb	1 ppb-r004.d	Cal	3	1.0000	1.0000	7.482	100169	<input type="checkbox"/>	1.0070	1.0070	100.7	-2.2917	99.90	
1 ppb	1 ppb-r005.d	Cal	3	1.0000	1.0000	7.483	100928	<input type="checkbox"/>	1.0161	1.0161	101.6	-1.2478	357.81	
1 ppb	1 ppb-r006.d	Cal	3	1.0000	1.0000	7.480	105196	<input type="checkbox"/>	1.0675	1.0675	106.8	-1.3829	160.20	
5 ppb	5 ppb-r001.d	Cal	4	1.0000	5.0000	7.474	452997	<input type="checkbox"/>	5.2586	5.2586	105.2	-0.8311	1209.04	
5 ppb	5 ppb-r002.d	Cal	4	1.0000	5.0000	7.475	445129	<input type="checkbox"/>	5.1637	5.1637	103.3	-1.3531	560.45	
10 ppb	10 ppb-r001.d	Cal	5	1.0000	10.0000	7.474	856882	<input type="checkbox"/>	10.1254	10.1254	101.3	-0.9374	1438.92	
10 ppb	10 ppb-r002.d	Cal	5	1.0000	10.0000	7.489	864754	<input type="checkbox"/>	10.2203	10.2203	102.2	-1.7301	1477.89	
25 ppb	25 ppb-r001.d	Cal	6	1.0000	25.0000	7.471	2063008	<input type="checkbox"/>	24.6593	24.6593	98.6	-1.2186	2690.34	
25 ppb	25 ppb-r002.d	Cal	6	1.0000	25.0000	7.469	2114326	<input type="checkbox"/>	25.2777	25.2777	101.1	-0.8898	2937.14	
50 ppb	50 ppb-r001.d	Cal	7	1.0000	50.0000	7.470	4190567	<input type="checkbox"/>	50.2965	50.2965	100.6	-1.0925	4673.75	
50 ppb	50 ppb-r002.d	Cal	7	1.0000	50.0000	7.470	4149707	<input type="checkbox"/>	49.8042	49.8042	99.6	-1.9279	6299.63	
100 ppb	100 ppb-r001.d	Cal	8	1.0000	100.0000	7.468	8266473	<input type="checkbox"/>	99.4115	99.4115	99.4	-1.4094	12159.20	
100 ppb	100 ppb-r002.d	Cal	8	1.0000	100.0000	7.468	8286854	<input type="checkbox"/>	99.6571	99.6571	99.7	-1.5509	11701.05	

图 4A. 利用 Agilent 6546 LC/Q-TOF 在不同浓度下得到的代表性准确度和重现性

Sample					NDMA M...	NDMA Results								
Name	Data File	Type	Level	Dil.	Exp. Conc.	RT	Resp.	MI	Calc. Conc.	Final Conc.	Accuracy	Mass Accuracy	S/N	
Ranitidine Tablet	Ranitidine Tablet-r001.d	Sample		0.0333		7.468	664819	<input type="checkbox"/>	7.8110	0.2601		-2.3708	839.15	
Ranitidine Tablet	Ranitidine Tablet-r002.d	Sample		0.0333		7.452	668811	<input type="checkbox"/>	7.8591	0.2617		-2.6682	568.31	
Ranitidine Tablet	Ranitidine Tablet-r003.d	Sample		0.0333		7.466	663197	<input type="checkbox"/>	7.7915	0.2595		-2.5419	989.69	
Ranitidine Tablet	Ranitidine Tablet-r0001.d	Sample		0.0333		7.465	692599	<input type="checkbox"/>	8.1458	0.2713		-2.7911	825.24	
Ranitidine Tablet	Ranitidine Tablet-r0002.d	Sample		0.0333		7.449	685728	<input type="checkbox"/>	8.0630	0.2685		-0.2582	893.10	
Ranitidine Tablet	Ranitidine Tablet-r0003.d	Sample		0.0333		7.450	698539	<input type="checkbox"/>	8.2173	0.2736		-2.6450	1686.68	
1 ppb	1 ppb-r008.d	Sample		1.0000		7.463	102906	<input type="checkbox"/>	1.0399	1.0399		-1.9600	133.72	
1 ppb	1 ppb-r009.d	Sample		1.0000		7.464	100057	<input type="checkbox"/>	1.0056	1.0056		-1.0172	232.91	
1 ppb	1 ppb-r010.d	Sample		1.0000		7.481	101921	<input type="checkbox"/>	1.0281	1.0281		-1.7069	157.19	
API 1	API 1-r001.d	Sample		0.0333		7.461	174701	<input type="checkbox"/>	1.9051	0.0634		-1.4023	339.36	
API 1	API 1-r002.d	Sample		0.0333		7.452	175971	<input type="checkbox"/>	1.9204	0.0639		-1.6121	296.57	
API 2	API 2-r001.d	Sample		0.0333		7.451	330214	<input type="checkbox"/>	3.7790	0.1258		-2.0371	603.20	
API 2	API 2-r002.d	Sample		0.0333		7.452	331673	<input type="checkbox"/>	3.7966	0.1264		-2.2190	813.07	
API 3	API 3-r001.d	Sample		0.0333		7.449	272822	<input type="checkbox"/>	3.0874	0.1028		-1.4437	500.36	
API 3	API 3-r002.d	Sample		0.0333		7.450	271769	<input type="checkbox"/>	3.0748	0.1024		-1.5514	482.95	
API 4	API 4-r001.d	Sample		0.0333		7.451	203712	<input type="checkbox"/>	2.2547	0.0751		-0.9700	351.73	
API 4	API 4-r002.d	Sample		0.0333		7.449	206482	<input type="checkbox"/>	2.2880	0.0762		-1.4015	360.87	
Tablet 1	Tablet 1-r001.d	Sample		0.0333		7.448	1781536	<input type="checkbox"/>	21.2675	0.7082		-0.6552	3700.62	
Tablet 1	Tablet 1-r002.d	Sample		0.0333		7.447	1790194	<input type="checkbox"/>	21.3719	0.7117		-0.7234	2645.69	
Tablet 2	Tablet 2-r001.d	Sample		0.0333		7.448	4235224	<input type="checkbox"/>	50.8346	1.6928		-0.8068	9141.63	
Tablet 2	Tablet 2-r002.d	Sample		0.0333		7.449	4232781	<input type="checkbox"/>	50.8052	1.6918		-0.1469	7276.58	

图 4B. 利用 Agilent 6546 LC/Q-TOF 在不同样品浓度下得到的代表性重现性。注：API 1、API 2、API 3 和 API 4 代表不同批次的原料药，其中 API 1 用于回收率实验的加标。同样，雷尼替丁片剂 1 和片剂 2 代表不同批次的雷尼替丁片剂，其中片剂 1 用于回收率实验的加标

表 5. 利用 Agilent 6546 LC/Q-TOF 在 1 ng/mL 的浓度下得到的代表性重现性

编号	1 ng/mL 的响应
1	104775
2	104836
3	104316
4	100169
5	100928
6	105196
7 (插值)	102906
8 (插值)	100057
9 (插值)	101921
平均值	102789
SD	2086.22
RSD (%)	2.03

Sample					NDMA M.L.	NDMA Results							
Name	Data File	Type	Level	Dil.	Exp. Conc.	RT	Resp.	MI	Calc. Conc.	Final Conc.	Accuracy	Mass Accuracy	S/N
API 1	API 1-r001.d	Sample		0.0333		7.461	174701	<input type="checkbox"/>	1.9051	0.0634		-1.4023	339.36
API 1	API 1-r002.d	Sample		0.0333		7.452	175971	<input type="checkbox"/>	1.9204	0.0639		-1.6121	296.57
Tablet 1	Tablet 1-r001.d	Sample		0.0333		7.448	1781536	<input type="checkbox"/>	21.2675	0.7082		-0.6552	3700.62
Tablet 1	Tablet 1-r002.d	Sample		0.0333		7.447	1790194	<input type="checkbox"/>	21.3719	0.7117		-0.7234	2645.69
Spike Standard 6 ppb	Spike Standard 6 ppb-r001.d	Sample		1.0000		7.466	457476	<input type="checkbox"/>	5.3125	5.3125		-0.3589	882.27
Spike Standard 6 ppb	Spike Standard 6 ppb-r002.d	Sample		1.0000		7.464	485174	<input type="checkbox"/>	5.6463	5.6463		-1.0769	1221.93
Spike Standard 48 ppb	Spike Standard 48 ppb-r001.d	Sample		1.0000		7.462	3653515	<input type="checkbox"/>	43.8250	43.8250		0.5924	6178.42
Spike Standard 48 ppb	Spike Standard 48 ppb-r002.d	Sample		1.0000		7.461	3625056	<input type="checkbox"/>	43.4821	43.4821		0.6249	6459.37
Blank	Blank-r00001.d	Sample		1.0000				<input type="checkbox"/>					
API 1_Spike 6 ppb	API 1_Spike 6 ppb-r001.d	Sample		0.0333		7.434	615840	<input type="checkbox"/>	7.2208	0.2405		1.6787	934.18
API 1_Spike 6 ppb	API 1_Spike 6 ppb-r002.d	Sample		0.0333		7.434	620887	<input type="checkbox"/>	7.2816	0.2425		0.9507	1130.88
API 1_Spike 6 ppb	API 1_Spike 6 ppb-r003.d	Sample		0.0333		7.432	616494	<input type="checkbox"/>	7.2287	0.2407		1.5689	1995.76
Tablet1_Spike 48 ppb	Tablet1_Spike 48 ppb-r001.d	Sample		0.0333		7.428	5197274	<input type="checkbox"/>	62.4274	2.0788		1.6808	10813.26
Tablet1_Spike 48 ppb	Tablet1_Spike 48 ppb-r002.d	Sample		0.0333		7.429	5216955	<input type="checkbox"/>	62.6646	2.0867		1.7166	10814.71
Tablet1_Spike 48 ppb	Tablet1_Spike 48 ppb-r003.d	Sample		0.0333		7.435	5224481	<input type="checkbox"/>	62.7553	2.0898		1.4057	6946.74

图 5. 利用 Agilent 6546 LC/Q-TOF 在不同浓度下得到的代表性回收率数据

注：回收率实验在较高浓度下进行，因为原料药和成品药均已含有一定量的 NDMA

表 6A. 6 ng/mL 浓度雷尼替丁原料药的回收率实验汇总

亚硝酸杂质	雷尼替丁 API (30 mg/mL) 的加标浓度 (ng/mL)	回收率 %
NDMA	6	93.86

表 6B. 48 ng/mL 浓度雷尼替丁成品药的回收率实验汇总

亚硝酸杂质	雷尼替丁 API (30 mg/mL) 的加标浓度 (ng/mL)	回收率 %
NDMA	48	94.16

结论

Agilent 6546 LC/Q-TOF 高分辨率 LC/MS/MS 能够分析低浓度水平的 NDMA 亚硝胺杂质。高分辨率质谱仪能够可靠检测雷尼替丁原料药与成品药的亚硝胺化合物。本应用简报证明了 6546 LC/Q-TOF 仪器在检测低浓度 NDMA 方面的灵敏度。本方法的质量准确度优异，能够对雷尼替丁中的 NDMA 进行可靠定量分析。由于分析雷尼替丁片剂时检出了高浓度 NDMA 的存在，这使得本方法可用于满足 USFDA 对雷尼替丁原料药与成品药中低浓度 NDMA 的检测要求。

参考文献

1. USFDA guidance document: Development and Validation of a RapidFire-MS/MS Method for Screening of Nitrosamine Impurities
2. USFDA guidance document: Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS) Method for the Determination of Six Nitrosamine Impurities in ARB Drugs
3. 使用高分辨率 Agilent 6546 LC/Q-TOF 测定亚硝胺杂质，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5994-1372ZHCN，**2019**
4. FDA guidance document: Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS) Method for the Determination of NDMA in Ranitidine Drug Substance and Drug Product
5. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/statement-alerting-patients-and-health-care-professionals-ndma-found-samples-ranitidine>

致谢

我们衷心感谢 PS3 Labs LLP, Hyderabad, TS, India 为我们提供 NDMA 标准品。

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

www.agilent.com

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2019

2019年12月19日，中国出版

5994-1626ZHCN

DE.4242476852

