

SCIEX Triple Quad™ 4500系统快速检测β-内酰胺类抗生素中N-亚硝基二甲胺杂质

Rapid Determination of N-Nitromethamidine Impurity in β-Lactam antibiotics by SCIEX Triple Quad™ 4500 System

谢亚平, 司丹丹, 龙志敏

Yaping Xie, Dandan Si, Zhimin Long

SCIEX 应用支持中心, 中国

Key Words: SCIEX Triple Quad™ 4500 System,
N-Nitromethamidine Impurity, β-Lactam Antibiotics

引言

N-亚硝基二甲胺杂质 (NDMA) 作为已知的2A类致癌物质, 在很低浓度时即可造成人体遗传物质的损伤, 具有致癌、致突变的特点。其常存在于谷物、烟酒、熏肉以及饮水中, 也常被用作有机合成的中间体。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) 后, 该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。

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。抗生素类药物在临床主要用于抑菌或杀菌作用, β-内酰胺类抗生素是临床上经常使用的一类抗生素, 包括最常用的青霉素与头孢菌素, 以及新发展的头霉素类、硫霉素类、单环β-内酰胺类等其他非典型β-内酰胺类抗生素。此类抗生素具有杀菌活性强、毒性低、适应症广及临床疗效好的优点。为更好的控制此类抗生素的安全问题, 本文使用LC-MS/MS法检测多种β-内酰胺类抗生素中N-亚硝基二甲胺杂质的含量, 该方法快速准确, 完全满足法规对N-亚硝基二甲胺基因毒性杂质限量以及灵敏度的要求。

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对照品适量, 分别用甲醇、甲醇:水=50:50 (v:v)、甲醇 (氨水调节PH为碱性, PH约为9.2) 定量稀释制成每1ml含1ng、2ng、5ng、10ng、20ng、50ng和100ng的三组标准曲线对照品溶液。

供试品溶液制备

注射用普鲁卡因青霉素: 取注射用普鲁卡因青霉素无菌粉末适量 (约500mg), 精密加入甲醇10ml, 涡旋混匀溶解, 滤膜过滤, 取续滤液进液质分析。

注射用头孢曲松钠：取注射用头孢曲松钠无菌粉末适量（约500mg），精密加入甲醇:水=50:50（v:v）10ml，涡旋混匀溶解，滤膜过滤，取续滤液进液质分析。

注射用苄星青霉素：普鲁卡因青霉素：青霉素钠（1:1:1）：取注射用苄星青霉素：普鲁卡因青霉素：青霉素钠（1:1:1）无菌粉末适量（约500mg），精密加入甲醇（氨水调节PH为碱性，PH约为9.2）10ml，涡旋混匀溶解，滤膜过滤，取续滤液进液质分析。

液相条件

液相系统：SCIEX ExionLC™ AD系统

色谱柱：ACE 3 C18 15 × 4.6 mm

流动相：A: 含0.1%甲酸的水；B: 甲醇

流速：0.8 mL/min

柱温：40 °C

液相梯度：

时间(min)	A(%)	B(%)
0	95	5
1	95	5
5	5	98
7	5	98
7.1	95	5
8	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: 35psi

NC电流: 2 μA

源温度 Tem: 450°C

雾化气Gas1: 40psi

碰撞气 CAD: 8

MRM参数：如表1

表1. NDMA基因毒杂质的质谱参数

化合物名称 (Name)	Q1	Q3	DP	CE
N-亚硝基二甲胺 (NDMA 1)	75.0	43.1	20	22
N-亚硝基二甲胺 (NDMA 2)	75.0	58.0	20	16

实验结果

灵敏度和重现性：NDMA最低定量限为1ng/ml，典型色谱图见图1；最低定量限样品连续进样6针，RSD为2.76%。

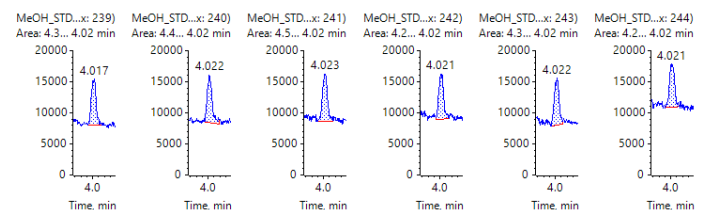


图2. 1ng/mL NDMA提取离子流图(甲醇对照品溶液)

线性范围：分别进样分析用甲醇、甲醇:水=50:50（v:v）、甲醇（氨水调节PH为碱性，PH约为9.2）定量稀释成的每1ml含1ng、2ng、5ng、10ng、20ng、50ng和100ng的三组标准曲线对照品溶液。以峰面积对浓度做标准曲线，三组标准曲线在线性范围内线性关系良好，相关系数均大于0.997，标曲各点准确度在92.07%-106.01%之间。

表2. NDMA的三组标准曲线和相关系数

标准曲线测试供试品类型	线性方程	线性范围
注射用普鲁卡因青霉素	$y=4.03046e4x+873.62130$ ($r=0.99996$)	1.0ng/ml-100ng/ml
注射用头孢曲松钠	$y=17950.66649x+4035.93276$ ($r=0.99980$)	1.0ng/ml-100ng/ml
注射用苄星青霉素:普鲁卡因青霉素:青霉素钠(1:1:1)	$y=17471.34319x-2045.31905$ ($r=0.99732$)	1.0ng/ml-100ng/ml

回收率结果：取样品加标溶液（加标浓度分别为1.0ng/mL，5.0ng/mL，10ng/mL）双样本进样分析得到加标回收率结果，3种供试品溶液中NDMA的回收率信息如表3，NDMA在不同基质中回收率良好，所有化合物回收率在85%-115%之间，满足NDMA分析要求。

表3. NDMA回收率结果

供试品类型	回收率 (Recovery)		
	1.0 ng/mL	5.0 ng/mL	10 ng/mL
注射用普鲁卡因青霉素	103.96	88.04	89.35
注射用头孢曲松钠	114.05	93.38	87.975
注射用苄星青霉素：普鲁卡因青霉素：青霉素钠 (1:1:1)	112.59	92.185	86.9

专属性：a. 甲醇溶液、b. 水、c.1.0ng/ml NDMA标准工作溶液（甲醇）、d.50mg/ml注射用普鲁卡因青霉素供试品溶液、e. 50mg/ml注射用头孢曲松钠供试品溶液、f. 50mg/ml注射用苄星青霉素：普鲁卡因青霉素：青霉素钠（1:1:1）供试品溶液结果见图3。空白溶剂中未检出NDMA；3种注射用无菌粉末供试品溶液中均未检出NDMA。

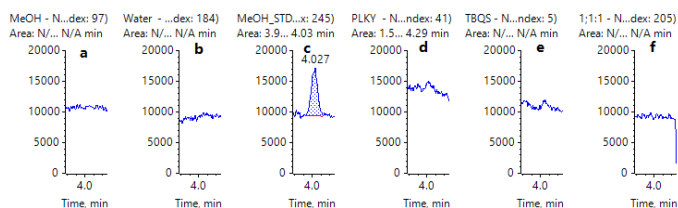


图3. 空白溶剂、NDMA对照品以及供试品溶液提取离子流图

(a、b、c、d、e、f依次为甲醇溶液、水溶液、1ng/ml NDMA甲醇溶液、50mg/ml注射用普鲁卡因青霉素供试品溶液、50mg/ml注射用头孢曲松钠供试品溶液、50mg/ml注射用苄星青霉素：普鲁卡因青霉素：青霉素钠（1:1:1）供试品溶液）

总结

本文使用SCIEX Triple Quad™ 4500 系统建立了多种β-内酰胺类抗生素中N-亚硝基二甲胺杂质含量测定的LC-MS/MS方法。该方法特异性好无干扰，NDMA在多种基质样品中线性关系良好，相关系数大于0.997。方法的灵敏度、重现性以及不同基质中提取回收率均满足NDMA分析要求。此方法可用于多种β-内酰胺类抗生素中N-亚硝基二甲胺杂质的检测。

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. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2021 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-13387-ZH-A



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：SCIEX-China