

盐酸二甲双胍缓释片中 *N*-亚硝基二甲胺测定方法的优化

梁梓洋¹, 罗辉泰^{1*}, 张秋炎¹, 梁维维¹, 梁梓豪¹,
周熙¹, 吴惠勤¹, 黄芳¹, 黄飞云², 罗向东²

(1. 广东省科学院测试分析研究所(中国广州分析测试中心) 广东省化学测量与应急检测技术重点实验室
广东省中药质量安全工程技术研究中心, 广州 510070; 2. 广东赛康制药厂有限公司, 惠州 516820)

摘要 目的: 建立一种稳定且可靠的气相色谱-串联质谱法测定盐酸二甲双胍缓释片中 *N*-亚硝基二甲胺(NDMA), 同时通过考察异丙醇和硫代甘油 2 个添加剂对供试品溶液稳定性的影响, 确定了最优的提取条件。**方法:** 采用聚乙二醇为固定相的 AB-InoWax 毛细管柱(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm), 利用电子轰击电离源(EI), 在多反应监测(MRM)模式下检测, 分别以外标法和内标法定量。**结果:** 添加硫代甘油可显著改善供试品溶液稳定性, NDMA 在 0.25 ~ 50 ng · mL⁻¹ 浓度范围内有良好的线性($r > 0.999$), 方法检测限为 0.1 ng · g⁻¹, 方法定量限为 0.2 ng · g⁻¹, 分别在内外标法计算下, 平均加标回收率($n = 9$)均为 97.3% 和 94.9%, 精密度、重复性、稳定性及耐用性的 RSD 均小于 8%。对 90 批次的盐酸二甲双胍缓释片进行检测, 结果均小于国家药品监督管理局以及 FDA 规定的可接受限度的 30% 之内。**结论:** 本文建立的方法灵敏度高, 专属性强, 结果准确且稳定性好, 适用于盐酸二甲双胍缓释片中 NDMA 的定量分析, 可为有关产品的质量安全提供技术支持。

关键词: 盐酸二甲双胍缓释片; *N*-亚硝基二甲胺(NDMA); 气相色谱-串联质谱(GC-MS/MS); 基因毒性杂质; 硫代甘油

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2024)06-1089-08
doi: 10.16155/j.0254-1793.2024.06.21

Optimization of determination of *N*-nitrosodimethylamine in metformin hydrochloride sustained-release tablets

LIANG Zi-yang¹, LUO Hui-tai^{1*}, ZHANG Qiu-yan¹,
LIANG Wei-wei¹, LIANG Zi-hao¹, ZHOU Xi¹, WU Hui-qin¹,
HUANG Fang¹, HUANG Fei-yun², LUO Xiang-dong²

(1. Institute of Analysis, Guangdong Academy of Sciences(China National Analytical Center, Guangzhou), Guangdong Provincial Key Laboratory of Chemical Measurement and Emergency Test Technology, Guangdong Provincial Engineering Research Center for Quality and Safety of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510070, China; 2. Guangdong Sinocorp Pharmaceutical Co., Ltd., Huizhou 516820, China)

Abstract Objective: To establish a stable and reliable gas chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of *N*-nitrosodimethylamine (NDMA) in metformin hydrochloride sustained-release tablets, and to optimize extraction conditions by investigating the effects of isopropyl alcohol and thioglycerin on the

* 通信作者 Tel: (020)88320139; E-mail: luohuitai@qq.com
第一作者 Tel: (020)88321850; E-mail: liang_ziyang@qq.com

stability of the tested solution. **Methods:** Separation was achieved on AB – InoWax capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm) with polyethylene glycol as the stationary phase. Electron ion (EI) source and multiple reaction monitoring (MRM) mode were used. Quantitative determination was performed by both external standard and internal standard. **Results:** The addition of thioglycerin could significantly improve the stability of the test solution. NDMA showed good linearity within the concentration range of 0.25 – 50 ng · mL⁻¹ ($r > 0.999$). The detection limit of the method was 0.1 ng · g⁻¹ and the quantification limit of the method was 0.2 ng · g⁻¹. The average recoveries ($n = 9$) were 97.3% and 94.9% while using external standard and internal standard, respectively. Precision, repeatability and stability were good with RSD less than 8%. Ninety batches of metformin hydrochloride sustained release tablets were tested. NDMA content in all detected samples were all less than 30% of the acceptable limit set by the National Medical Products Administration and FDA. **Conclusions:** This method shows satisfactory sensibility, specificity, accuracy, stability and durability, which is suitable for quantitative analysis of NDMA in metformin hydrochloride sustained – release tablets, providing technical support for the quality and safety of related products.

Keywords: metformin hydrochloride sustained release tablets; *N* – nitrosodimethylamine (NDMA); gas chromatography – tandem mass spectrometry (GC – MS/MS); genotoxic impurity; monothioglycerol

基因毒性杂质 (genotoxic impurities, GTIs) 是一类在痕量水平即可诱导基因突变和染色体损伤,甚至引发癌症的杂质^[1],具有重大的安全风险。基因毒性杂质种类繁多,多数 *N* – 亚硝胺化合物已被证实具有致癌作用^[2],而世界卫生组织在 2020 年发布了致癌物清单中^[3],有 10 多种短脂肪链的 *N* – 亚硝胺化合物被归入 A 类致癌物,其中 *N* – 亚硝基二甲胺 (*N* – nitrosodimethylamine, NDMA) 为 2A 类致癌物,根据 FDA 发布关于亚硝胺杂质控制的指南,NDMA 的每日摄入限制为 96 ng^[4]。药品中的 NDMA 主要来源于药品的生产、运输、储存等过程,其生成途径较多,包括但不限于二甲胺的亚硝化,二甲基甲酰胺的氧化,以及特定药物的降解^[5-7]。

盐酸二甲双胍是一种用于治疗 2 型糖尿病的药物,其每日最高剂量可达 2 g^[8]。早在 2019 年 12 月, FDA 发布了从降糖药盐酸二甲双胍制剂中检出了 NDMA 的消息,随后多国陆续开展了相关的检测工作。而在 2020 年 5 月, FDA 再次宣布在某些盐酸二甲双胍缓释制剂中检出了高于每日摄入限制 96 ng 的 NDMA,并要求相关企业召回相关产品^[9]。盐酸二甲双胍具有降血糖,减轻体重,抑制肿瘤发生等多种临床应用,具有重要的地位,为目前治疗 2 型糖尿病的一线药物,在市场上需求量大,因此需要对盐酸二甲双胍药物中的 NDMA 进行有效的控制。

目前药物中 NDMA 的分析方法主要包括有

GC – MS 法^[10]、GC – MS/MS 法^[11]、HS – GC – MS 法^[12]、HS – SPME – GC – MS 法^[13]、HS – SPME – GC – MS/MS 法^[14]、LC – MS/MS 法^[15]、LC – HRMS 法^[16] 等,其中 GC – MS/MS 法因其对 NDMA 的高灵敏度而常被运用于各类药品的分析中^[17]。中国食品药品检定研究院在 2019 年发布了《盐酸二甲双胍中 *N* – 亚硝基二甲胺推荐检测方法》(中检化药函[2019] 839 号),其中针对缓释片的前处理采用二氯甲烷进行振摇提取后以 GC – MS/MS 法测定。NDMA 在二氯甲烷中有较好的溶解度,而盐酸二甲双胍在二氯甲烷中则几乎不溶,与使用甲醇或乙腈进行提取的方法相比,该法能够避免因供试品溶液中溶解大量二甲双胍而造成的基质效应。景援朝等^[18]使用该方法对多种二甲双胍制剂测定,结果发现缓释片 NDMA 的超标率高达 83.3%。然而, Fritzsche 等^[19]发现,在使用二氯甲烷为溶剂对盐酸二甲双胍缓释片进行提取时,缓释片中残留二甲胺 (DMA) 与亚硝酸盐会反应并生成了额外的 NDMA 而导致测定含量偏高。在实际检测过程中,本实验室也发现使用二氯甲烷提取后制得的供试品溶液稳定性较差,且 NDMA 的浓度随着放置时间增加出现明显的增长,在分析批中样品较多时,容易造成时间顺序上较后上机分析的样品结果不可靠。因此,本文旨在该方法的基础上进行优化,避免在制备样品时额外产生 NDMA,并改善供试品溶液的稳定性,为盐酸二甲双胍缓释片的质量

控制提供依据与保障。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

7890GC/7000A 气相色谱 - 串联质谱仪、0.22 μm 有机微孔滤膜 (Agilent 公司); BT25S 十万分之一电子分析天平 (Sartorius 公司); 涡旋振荡器 (IKA 公司)。

1.2 试剂

NDMA 对照品 (纯度 99.8%, 批号 0326 - RB - 0053, 广州佳途科技股份有限公司), NDMA - $^{13}\text{C}_2\text{D}_6$ 内标溶液 (浓度 $1\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 批号 SDJC - 005A, Cambridge Isotope Laboratories 公司), 甲醇、二氯甲烷、异丙醇 (色谱纯, Merck 公司), 90 批盐酸二甲双胍缓释片 (广东赛康制药厂有限公司), 硫代甘油 (分析纯, 上海麦克林生化科技有限公司)。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 提取液 称取硫代甘油适量, 用二氯甲烷配制成硫代甘油浓度为 $100\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的提取液。

2.1.2 对照品溶液 精密称取 NDMA 对照品, 用甲醇配制成浓度为 $1\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品储备液, 于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下保存。精密量取储备液 1 mL , 置于 100 mL 量瓶中, 用二氯甲烷稀释至刻度, 摇匀, 得到浓度为 $10\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品中间液。精密量取 NDMA - $^{13}\text{C}_2\text{D}_6$ 内标溶液 $100\text{ }\mu\text{L}$, 置于 100 mL 量瓶中, 用二氯甲烷稀释至刻度, 摇匀, 得到浓度为 $1\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的内标中间液。精密量取内标中间液 10 mL , 置于 100 mL 量瓶中, 用二氯甲烷稀释至刻度, 摇匀, 得到浓度为 $100\text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的内标工作液。精密量取对照品中间液和内标工作液, 用“2.1”中的提取液稀释成浓度为 $0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50\text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列线性对照品溶液 (内标浓度为 $1\text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

2.1.3 供试品溶液 取盐酸二甲双胍缓释片细粉适量 (约相当于盐酸二甲双胍 500 mg), 精密称定, 置 50 mL 离心管中, 精密加入内标工作液 $100\text{ }\mu\text{L}$ 后, 再精密加入提取液 10 mL , 涡旋 1 min , 以 $350\text{ 次} \cdot \text{min}^{-1}$ 频率振摇 10 min , 以 $8000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min , 上清液以 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 有机滤膜过滤, 取续滤液作为供试品溶液。

2.2 检测条件

2.2.1 气相色谱条件 采用 AB - InoWax ($30\text{ m} \times 0.25\text{ mm} \times 0.25\text{ }\mu\text{m}$) 色谱柱, 升温程序为 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 保持

1 min , 以 $15\text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升至 $160\text{ }^\circ\text{C}$, 以 $25\text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升至 $230\text{ }^\circ\text{C}$ 保持 10 min , 载气为氦气 (纯度 $\geq 99.999\%$), 流速为 $1.0\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 进样口温度为 $200\text{ }^\circ\text{C}$, 进样量为 $2\text{ }\mu\text{L}$, 进样方式为脉冲不分流进样, 脉冲压力为 0.172 MPa , 0.75 min 后打开分流阀和隔垫吹扫。

2.2.2 质谱条件 采用电子轰击电离源 (70 eV); 离子源温度为 $250\text{ }^\circ\text{C}$; 传输线温度为 $260\text{ }^\circ\text{C}$; 碰撞气为氦气 (纯度 $\geq 99.999\%$); 扫描方式为多反应监测 (MRM), 质谱参数如下: NDMA 的定量离子对为 $m/z\ 74 \rightarrow 44$, 定性离子对为 $m/z\ 74 \rightarrow 42$, 碰撞能量 (CE) 分别为 5 eV 和 12 eV ; NDMA - $^{13}\text{C}_2\text{D}_6$ 的定量离子对为 $m/z\ 82 \rightarrow 52$, CE 为 6 eV 。

2.3 供试品溶液稳定性影响因素的考察

2.3.1 供试品溶液稳定性 取同一批研磨后的样品 3 份, 以二氯甲烷为提取液, 按“2.1”项方法制备供试品溶液, 同时, 以二氯甲烷为提取液, 按“2.2”项方法制备浓度为 $1\text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。本方法中气相色谱运行时间为 17 min , 柱温箱降温时间约 7 min , 即循环时间约为 24 min , 因此在制备供试品溶液时, 控制时间以保证每个平行试验间隔约为 24 min 。在上机测定设定进样序列时, 按照空白溶液 1 份、对照品溶液 1 份、供试品溶液 3 份的顺序为 1 个循环设置, 每 2 h 完成 1 个循环。由于二氯甲烷具有较强的挥发性, 因此加入 NDMA - $^{13}\text{C}_2\text{D}_6$ 作为内标, 以校正应溶剂挥发与进样差异带来的不稳定性。以时间为横坐标, 峰面积比的增长倍数为纵坐标, 作出供试品溶液中 NDMA 浓度每隔 4 h 的变化情况, 如图 1 所示, 随着放置时间的增加, 供试品溶液中 NDMA 含量呈明显的上升趋势, 在 20 h 后趋于稳定, 最高增长倍数达 167% 。

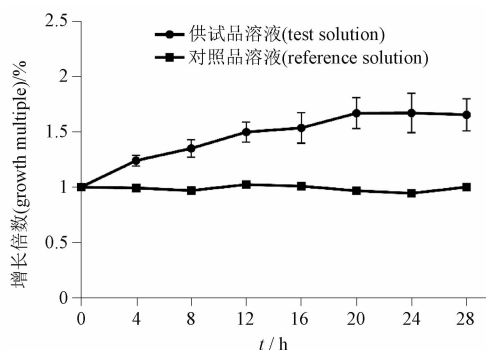


图 1 供试品溶液中 NDMA 随时间的增长倍数

Fig.1 Growth multiple of NDMA in test solution

原料药盐酸二甲双胍采用双氰胺与二甲胺盐酸盐直接合成所得,成品中有二甲胺残留的可能,在 EP 11.0 中也对盐酸二甲双胍中二甲胺残留规定了 0.05% 的限度^[20]。NDMA 的产生途径较多,如二甲胺可在羟基自由基($\cdot\text{OH}$)存在下,经过一系列反应被氧化成 NDMA^[21];二甲胺在酸性条件下与亚硝酸盐发生亚硝化反应而生成 NDMA^[22];二甲双胍可被羟基自由基进攻而降解生成了二甲胺,被进一步氧化成 NDMA^[23]等。由于二甲双胍的合成工艺中未使用亚硝酸盐等亚硝化试剂及酰胺类溶剂,生产过程中所用到的纯化水对亚硝酸盐也有着较为严格的要求,由原料药及其合成过程引入亚硝胺类杂质的风险较低,因此越来越多的报道表明,二甲双胍系列产品中亚硝胺类杂质的引入与其所用的辅料有着密切的关系^[24]。盐酸二甲双胍缓释片所使用的辅料主要有羧甲基纤维素钠(CMC-Na)、羟丙基甲基纤维素(HPMC)和硬脂酸镁,其中,HPMC 含有痕量的过氧化物^[25],可能会造成药物的降解^[26];而 CMC-Na 则含有亚硝酸盐^[27],可能通过与二甲胺发生亚硝化反应而生成 NDMA。结合上述资料,在本实验中供试品溶液 NDMA 浓度随放置时间变长而逐步增加,其可能的原因为一

方面在使用二氯甲烷进行振荡提取的过程中,二甲双胍残留的二甲胺与辅料引入的亚硝酸发生了亚硝化反应而生成 NDMA,另一方面,二氯甲烷将部分二甲胺和过氧化物共萃取出来,随着时间推移在供试品溶液中发生了二甲胺的氧化而逐步生成 NDMA,直至反应的底物耗尽而 NDMA 的浓度也到达了平台。

2.3.2 羟基自由基猝灭剂对供试品溶液稳定的影响 取同一批研磨后的样品 9 份,分别用含异丙醇($v:v$)0.5%、1% 和 5% 的二氯甲烷作为提取液,按“2.1.3”项方法各制备 3 份,每 4 h 进样分析,考察不同浓度异丙醇对供试品溶液中 NDMA 浓度稳定性的影响,结果见图 2。异丙醇为一种效果好且稳定的 $\cdot\text{OH}$ 猝灭剂^[28],其 α -碳上的氢原子可与 $\cdot\text{OH}$ 反应,生成低反应活性的碳正中心自由基($\text{R}\cdot$)而使 $\cdot\text{OH}$ 发生猝灭。当提取液中含有 0.5%、1% 和 5% 异丙醇时,NDMA 的最高增长倍数分别是 0 h 时的 138%、123% 和 154%,与单独使用二氯甲烷作为提取溶剂时相比有一定的下降趋势,由此推测供试品溶液中 NDMA 的持续生成可能与 $\cdot\text{OH}$ 相关,且异丙醇可在一定程度上减缓供试品溶液中 NDMA 的生成。

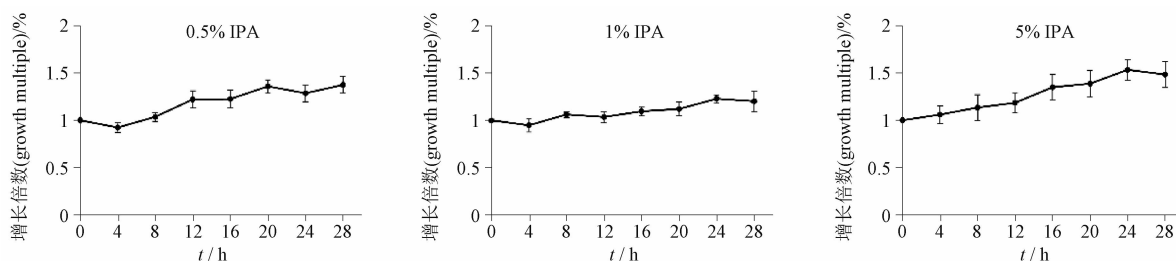


图 2 含不同浓度异丙醇($v:v$)下供试品溶液中 NDMA 随时间的增长倍数

Fig. 2 Growth multiple of NDMA in test solution under different concentrations of isopropanol

二甲双胍缓释片中的辅料可能含有过氧化物,可在一定条件下生成 $\cdot\text{OH}$,进而与残留的二甲胺反应生成 NDMA,而异丙醇的加入可以猝灭 $\cdot\text{OH}$,因此表现为 NDMA 的增长倍数发生下降。然而,醇类在猝灭 $\cdot\text{OH}$ 的过程中会意外产生 H_2O_2 及其光解产物 $\cdot\text{OH}$ ^[29],使得供试品溶液中留有 $\cdot\text{OH}$ 甚至是 H_2O_2 ,仍有 NDMA 继续生成,表现为对供试品溶液中 NDMA 持续生成的抑制作用不明显。当异丙醇浓度增加至 5.0% 时,NDMA 的增长倍数高于浓度为 0.5% 和 1.0%,其原因可能为异丙醇的浓度增大使

得提取液极性增大,二甲双胍在提取液中的溶解度增大,二甲双胍在羟基自由基和过氧化物的作用下发生降解并最终生成了 NDMA^[23],从而使得增长倍数较低浓度更高。

2.3.3 抗氧化剂对供试品溶液稳定性的影响 取同一批研磨后的样品 9 份,分别以含硫代甘油 20、100 和 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的二氯甲烷作为提取液,按“2.1.3”项方法各制备 3 份供试品溶液,每 4 h 进样分析,考察不同浓度 MTG 对供试品溶液中 NDMA 浓度稳定性的影响,结果见图 3。当提取液中硫代甘油

的浓度为 20、100 和 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, NDMA 的最高增长倍数为 120%、110% 和 112%, 与单独使用二氯甲烷作为提取溶剂时相比 NDMA 的增长倍数有明显的下降。硫代甘油在结构上含有一个巯基(-SH)具有还原性, 可与 $\cdot\text{OH}$ 、 H_2O_2 以及其他种类的过氧化物进行反应, 从而阻断了二甲胺被氧化而生成 NDMA 的过程, 因此在 28 h 的放置后供试品溶液 NDMA

增长较低, 稳定性得到了提高。此外, 硫代甘油结构还含有 2 个羟基(-OH), 能屏蔽进样口处玻璃衬管的活性位点, 降低对 NDMA 的吸附, 因此可见硫代甘油浓度在 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 以上时, 平行测定的 SD 值均低于别的实验组。综合上述因素, 选择含 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 硫代甘油的二氯甲烷作为实验中的提取溶剂, 并进行后续的方法学验证。

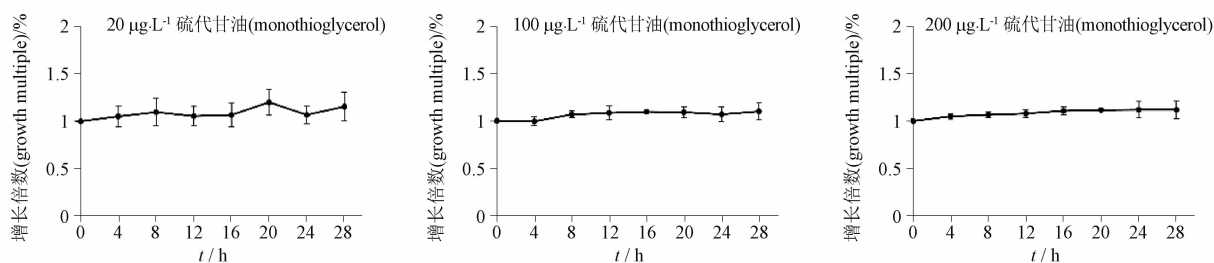


图 3 不同浓度硫代甘油下供试品溶液中 NDMA 随着时间的增长倍数

Fig. 3 Growth multiple of NDMA in test solution under different concentrations of monothioglycerol

2.4 方法学验证

2.4.1 专属性试验 取空白溶剂、对照品溶液、供试品溶液以及干扰溶液, 分别按“2.2”项下的色谱与质谱条件进样, 结果如图 4 所示, 在空白溶剂和对照品溶液在 NDMA 处均无明显的干扰物。由于 *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF) 的同位素峰与 NDMA 的分子离

子峰有着相近的质荷比, 在低分辨质谱上无法实现有效的分辨, 因此 DMF 的存在将会干扰 NDMA 的测定, 为了考察本方法条件下 NDMA 与 DMF 的分离情况, 在供试品溶液中加入 NDMA 与 1 000 倍 NDMA 浓度的 DMF 作为干扰物, 结果表明 NDMA 与 DMF 能够实现分离, DMF 的存在不影响 NDMA 的测定。

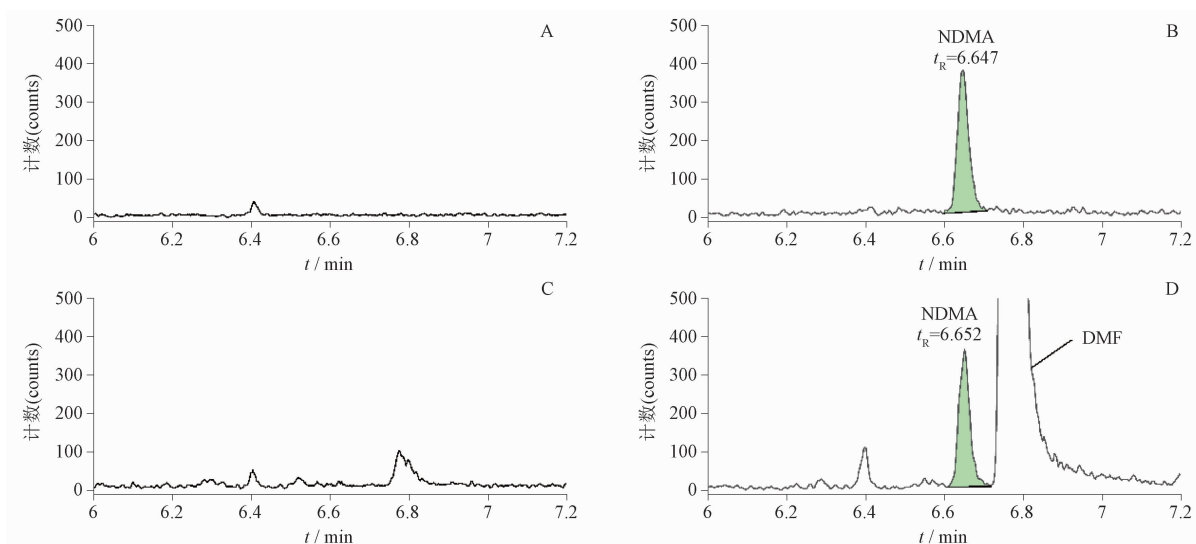


图 4 空白溶剂 (A)、对照品溶液 (B)、供试品溶液 (C) 及干扰溶液 (D) 的提取离子流图 (提取通道为 m/z 74→44, 对照品溶液及干扰溶液中 NDMA 浓度为 1 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 干扰溶液中浓度含 1 000 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 DMF)

Fig. 4 Extraction ion chromatograms of blank solvent (A), reference solution (B), test solution (C) and interference solution (D) (Extraction channel was m/z 74→44. NDMA concentration in the reference solution and interference solution was 1 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ and DMF concentration in interference solution was 1 000 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)

2.4.2 检测限和定量限 取 NDMA 对照品溶液,用二氯甲烷(含 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 硫代甘油)进行逐级稀释,以信噪比(S/N)约为 3 时的浓度作为检测限,信噪比(S/N)约为 10 时的浓度作为定量限。取定量限浓度下的 NDMA 对照品溶液重复进样 6 次,以 NDMA 与内标的峰面积比(内标法)或 NDMA 的峰面积(外标法)计算 RSD,结果表明,在内标法和外标法计算下,检测限均为 $0.1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,定量限均为 $0.2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,RSD 分别为 3.4% 和 5.2%,说明本方法的灵敏度高,能够满足测定的要求。

2.4.3 线性关系 取“2.1.2”项下的系列对照品溶液,分别按照“2.2”项下的色谱与质谱条件进样分析,对于内标法,以峰面积之比 Y 为纵坐标,对应的浓度比 X 为横坐标进行线性回归;对于外标法,以峰面积 Y 为纵坐标,对应的浓度 X 为横坐标进行线性回归。结果表明,NDMA 在 $0.2 \sim 50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好,内标法计算下回归方程为 $Y = 1.056X - 0.1340$ ($r = 0.9999$),外标法计算下为 $Y = 793.9X - 42.98$ ($r = 0.9999$)。

2.4.4 精密度 取浓度为 $0.5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液,按照“2.2”项下的色谱与质谱条件连续进样 6 次分析,NDMA 与内标峰面积之比的 RSD 为 2.7%,NDMA 峰面积的 RSD 为 3.7%,NDMA 保留时间的 RSD 为 0.025%,表明仪器的精密度良好。

2.4.5 重复性试验 取同一批研磨后的样品 6 份,分别精密加入 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 NDMA 对照品溶液 $80 \mu\text{L}$,按“2.1.3”项下的方法制备供试溶液,随后按照“2.2”项下的色谱与质谱条件进行分析,NDMA 在内标法与外标法计算下平均值($n = 6$)分别为 26.32 和 $24.22 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$,RSD 分别为 3.7% 和 2.9%,表明该方法具有良好的重复性。

2.4.6 准确度 取同一批研磨后的样品 9 份,分别精密加入 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 NDMA 对照品溶液 $40 \mu\text{L}$ (50% 限度浓度)、 $80 \mu\text{L}$ (100% 限度浓度)和 $120 \mu\text{L}$ (150% 限度浓度)各 3 份,按“2.1.3”项下的方法制备供试溶液并以“2.2”项下的色谱与质谱条件进行分析,并计算相应的回收率,结果见表 1。结果表明,无论是内标法还是外标法,都有较好的回收率,本方法具有良好的准确性。

表 1 盐酸二甲双胍缓释片中 NDMA 的加标回收率及相对标准偏差

Tab. 1 Recoveries and relative standard deviations of NDMA in metformin hydrochloride sustained release tablets

计算方法 (used methods)	本底量 (original content)/ ($\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$)	加入量 (added content)/ ng	测得量 (measured content)/ ($\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$)	回收率 (recovery, $n = 3$)/%	平均值 (mean, $n = 9$)/%	RSD/ %
内标法(internal standard)	11.49	4	18.94	93.7	97.3	5.6
		8	26.60	95.2		
		12	36.10	103.1		
外标法(external standard)		4	17.20	91.9	94.9	4.9
		8	24.57	92.4		
		12	33.86	100.4		

2.4.7 稳定性试验 取“2.4.5”项下的供试溶液,于室温($25 \text{ }^\circ\text{C}$)中放置,并于 0、4、8、16、20、24 h 进样分析,对照品溶液中,NDMA 与内标峰面积之比的 RSD($n = 6$)为 2.6%,NDMA 峰面积的 RSD($n = 6$)为 4.3%;供试品溶液中,NDMA 与内标峰面积之比的 RSD($n = 6$)为 5.3%,NDMA 峰面积的 RSD($n = 6$)为 5.6%,表明对照品溶液与供试品溶液在 24 h 内均具有较好的稳定性。

2.4.8 耐用性试验 取同一批研磨后的样品 6 份,

分别精密加入 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 NDMA 对照品溶液 $80 \mu\text{L}$,按“2.1.3”项下的方法制备供试溶液。在保持其它条件不变下,分别改变载气流速、进样温度和初始柱温,分别进样对照品溶液和上述的供试品溶液,考察各耐用性条件下 NDMA 测得量的变化情况,结果如表 2 所示。本方法在载气流速 $0.8 \sim 1.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 、进样温度 $195 \sim 205 \text{ }^\circ\text{C}$ 和初始柱温 $38 \sim 42 \text{ }^\circ\text{C}$ 范围内,供试品中 NDMA 测得量无明显差异,RSD 均小于 8%,耐用性良好。

表 2 耐用性试验下 NDMA 的测得量
Tab. 2 Measured content of NDMA in durability test

计算方法 (used methods)	测得量(measured content)/(ng · g ⁻¹)						
	原条件 (original condition)	流速 (flow rate)/(mL · min ⁻¹)		进样口温度 (inlet temperature)/°C		初始柱温 (initial column temperature)/°C	
		0.8	1.2	195	205	38	42
内标法(internal standard)	26.77	27.03	27.52	26.82	27.18	26.77	26.76
外标法(external standard)	26.12	26.84	26.73	26.93	26.70	26.46	26.55

2.5 实际样品的测定

使用本方法对 90 批次的盐酸二甲双胍缓释片进行检测,测定结果均小于国家药品监督管理局以及 FDA 规定的可接受限度的 30% 之内(0.014 4 μg · g⁻¹)。由于 NDMA 具有不容忽视的基因毒性,对于盐酸二甲双胍这类需要长期使用的药物,超过可接受限度水平的 NDMA 将会为使用者带来严重的安全健康问题,因此药物生产企业应继续保持对盐酸二甲双胍类产品中 NDMA 的高度关注与控制。

3 结论

本研究建立了一种稳定且可靠的气相色谱-串联质谱法测定盐酸二甲双胍缓释片中痕量 NDMA 的测定方法,该方法具有灵敏度高,专属性强,结果准确且稳定性好的优点,能够满足盐酸二甲双胍缓释片中 NDMA 的测定,为相关产品的质量控制和日常监管提供相应的技术支撑。

参考文献

- [1] LIU DQ, SUN M, KORD AS. Recent advances in trace analysis of pharmaceutical genotoxic impurities[J]. J Pharm Biomedical Anal, 2010, 51(5): 999
- [2] WHITE CM. Understanding and preventing (*N*-nitrosodimethylamine) NDMA contamination of medications[J]. Annals Pharmacotherapy, 2019, 54(6): 611
- [3] 国家药品监督管理局. 世界卫生组织国际癌症研究机构致癌物清单[EB/OL]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/mtbd/20171030163101383.html>
National Medical Products Administration. List of Classifications by Cancer Site[EB/OL]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/mtbd/20171030163101383.html>
- [4] Control of Nitrosamine Impurities in Human Drugs[S]. 2021
- [5] MILLS AL, ALEXANDER M. *N*-nitrosamine formation by cultures of several microorganisms[J]. Appl Environ Microb, 1976, 31(6): 892
- [6] BUNKAN AJC, HETZLER J, MIKOVINY T, et al. The reactions of *N*-methylformamide and *N,N*-dimethylformamide with oh and their photo-oxidation under atmospheric conditions: Experimental and theoretical studies[J]. Phys Chem Chem Phys, 2015, 17(10): 7046
- [7] FDA. FDA Requests Removal of All Ranitidine Products (zantac) from the Market [EB/OL]. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-requests-removal-all-ranitidine-products-zantac-market>
- [8] 张玉英. 盐酸二甲双胍片的含量测定[J]. 化学世界, 2003, 44(6): 300
ZHANG YY. Determination of metformin tablets by HPLC[J]. Chemical World, 2003, 44(6):300
- [9] FDA. FDA Alerts Patients and Health Care Professionals to Nitrosamine Impurity Findings in Certain Metformin Extended-Release Products[EB/OL]. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-alerts-patients-and-health-care-professionals-nitrosamine-impurity-findings-certain-metformin>
- [10] 吴兆伟, 杜凯, 王琳, 等. GC-MS 法测定缬沙坦中的 *N*-亚硝基二甲胺[J]. 中国新药杂志, 2019, 28(20):2478
WU ZW, DU K, WANG L, et al. Determination of the contents of *N*-nitrosodimethylamine in valsartan by GC-MS[J]. Chin J New Drug, 2019, 28(20):2478
- [11] LIU J, XIE B, MAI B, et al. Development of a sensitive and stable GC-MS/MS method for simultaneous determination of four *N*-nitrosamine genotoxic impurities in sartan substances[J]. J Anal Sci Technol, 2021, 12(1): 3
- [12] WICHTNITHAD W, SUDTANON O, SRISUNAK P, et al. Development of a sensitive headspace gas chromatography-mass spectrometry method for the simultaneous determination of nitrosamines in losartan active pharmaceutical ingredients[J]. ACS Omega, 2021, 6(16): 11048
- [13] ALSHEHRI YM, ALGHAMDI TS, ALDAWSARI FS. HS-SPME-GC-MS as an alternative method for NDMA analysis in ranitidine products[J]. J Pharm Biomed Anal, 2020, 191: 113582
- [14] CHANG SH, HO HY, CHANG CC, et al. Evaluation and optimization of a HS-SPME-assisted GC-MS/MS method for monitoring nitrosamine impurities in diverse pharmaceuticals [J]. J Pharm Biomed Anal, 2022, 221: 115003
- [15] SOLANKI R, PATEL C, PATEL R, et al. UHPLC-APCI-TQ-MS analytical method to quantify nitrosamine impurities in the com-

- mercial formulation of metformin and glipizide[J]. *J Liq Chromatogr R T*, 2022; 1
- [16] YANG J, MARZAN TA, YE W, *et al.* A cautionary tale: quantitative LC – HEMS analytical procedures for the analysis of *n* – nitrosodimethylamine in metformin[J]. *AAPS J*, 2020, 22(4): 89
- [17] KIM H, SUNG D, YU H, *et al.* Comparison of EI – GC – MS/MS, APCI – LC – MS/MS, and ESI – LC – MS/MS for the simultaneous analysis of nine nitrosamines eluted from synthetic resins into artificial saliva and health risk assessment[J]. *Toxics*, 2021, 9(10): 230
- [18] 景援朝, 王海燕, 孙涛, 等. 基于气相色谱 – 串联质谱法测定盐酸二甲双胍制剂中基因毒性杂质 *N* – 二甲基亚硝胺的质量评价研究[J]. *药物分析杂志*, 2022, 42(12):2122
- JING YC, WANG HY, SUN T, *et al.* Quality evaluation of *N* – nitrosodimethylamine (NDMA) in metformin hydrochloride preparation by gas chromatography tandem mass spectrometry[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2022, 42(12):2122
- [19] FRITZSCHE M, BLOM G, KEITEL J, *et al.* NDMA analytics in metformin products: Comparison of methods and pitfalls[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2022, 168: 106026
- [20] EP 11.0[S]. 2023
- [21] LIAO X, SHEN L, JIANG Z, *et al.* NDMA formation during ozonation of metformin: Roles of ozone and hydroxyl radicals[J]. *Sci Total Environ*, 2021, 796: 149010
- [22] JIREŠ J, KALÁŠEK S, GIBALA P, *et al.* Insight into the formation of *N* – nitrosodimethylamine in metformin products [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2021, 195: 113877
- [23] BADRAN I, MANASRAH AD, NASSAR NASHAAT N. A combined experimental and density functional theory study of metformin oxy – cracking for pharmaceutical wastewater treatment [J]. *RSC Adv*, 2019, 9(24): 13403
- [24] 叶晓霞, 葛雨琦, 乐健, 等. 缓释制剂辅料导致盐酸二甲双胍降解产生 *N* – 亚硝基二甲胺的影响因素研究[J]. *药物分析杂志*, 2021, 41(2): 239
- YE XX, GE YQ, LE J, *et al.* Study on influencing factors of metformin hydrochloride's degradation to *N* – nitrosodimethylamine induced by sustained – release excipients[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2021, 41(2):239
- [25] HAO G, HU R, WANG X, *et al.* *N* – nitrosodimethylamine formation in metformin hydrochloride sustained – release tablets: Effects of metformin and hypromellose used in drug product formulation[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2023, 222: 115066
- [26] NARANG AS, DESAI D, BADAWY S. Impact of excipient interactions on solid dosage form stability [J]. *Pharm Res Dordr*, 2012, 29(10): 2660
- [27] WU Y, LEVONS J, NARANG AS, *et al.* Reactive impurities in excipients: Profiling, identification and mitigation of drug – excipient incompatibility[J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2011, 12(4): 1248
- [28] 戴慧旺, 陈建新, 苗笑增, 等. 醇类对 UV – Fenton 体系羟基自由基淬灭效率的影响[J]. *中国环境科学*, 2018, 38(1): 202
- DAI HW, CHEN JX, MIAO XZ, *et al.* Effect of alcohols on scavenging efficiencies to hydroxyl radical in UV – Fenton system[J]. *China Environ Sci*, 2018, 38(1):202
- [29] WANG L, LI B, DIONYSIOU DD, *et al.* Overlooked formation of H₂O₂ during the hydroxyl radical – scavenging process when using alcohols as scavengers[J]. *Environ Sci Technol*, 2022, 56(6): 3386

(本文于 2024 年 4 月 9 日修改回)