

藥品中亞硝胺類化合物之檢驗方法－多重分析(氣相層析串聯質譜法)
Method of Test for Nitrosamines in Medicines - Multiple Analysis (GC-MS/MS
Method)

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於藥品中*N*-nitrosodibutylamine (NDBA)等12項亞硝胺類化合物之檢驗。如有不適用之藥品，可自行探討並經確效後使用。
2. 檢驗方法：檢體經萃取後，以氣相層析串聯質譜儀 (gas chromatograph/tandem mass spectrometer, GC-MS/MS)分析之方法。
 - 2.1. 裝置：
 - 2.1.1. 氣相層析串聯質譜儀：
 - 2.1.1.1. 離子源：電子游離(electron ionization, EI)。
 - 2.1.1.2. 層析管：DB-WAX UI毛細管，內膜厚度0.25 μm ，內徑0.25 mm $\times$ 30 m，或同級品。
 - 2.1.1.3. 襯管(Liner)：Agilent 5190-2293，惰性，不分流，單錐形，含玻璃纖維棉，或同級品。
 - 2.1.2. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.1.3. 超音波振盪器(Ultrasonicator)。
 - 2.1.4. 離心機(Centrifuge)：可達3000 $\times g$ 以上者。
 - 2.2. 試藥：甲醇採用液相層析級；NDBA (2000 $\mu\text{g/mL}$ in dichloromethane)、*N*-nitrosodicyclohexylamine (NDCHA)、*N*-nitrosodiethylamine (NDEA, 5000 $\mu\text{g/mL}$ in methanol)、*N*-nitrosodiisobutylamine (NDiBA)、*N*-nitrosodiisononylamine (NDiNA)、*N*-nitrosodiisopropylamine (NDiPA)、*N*-nitrosodimethylamine (NDMA, 5000 $\mu\text{g/mL}$ in methanol)、*N*-nitrosodiphenylamine (NDPhA, 5000 $\mu\text{g/mL}$ in methanol)、*N*-nitrosodipropylamine (NDPA, 5000 $\mu\text{g/mL}$ in methanol)、*N*-nitrosomethylethylamine (NMEA)、*N*-nitrosomorpholine (NMOR)及*N*-nitrosopiperidine (NPIP, 5000 $\mu\text{g/mL}$ in methanol)對照用標準品；*N*-nitrosodimethylamine- d_6 (NDMA- d_6 , 1000 $\mu\text{g/mL}$ in dichloromethane)、*N*-nitrosodiethylamine- d_4 (NDEA- d_4)、*N*-nitrosodiphenylamine- d_{10} (NDPhA- d_{10})及*N*-nitrosodipropylamine- d_{14} (NDPA- d_{14} , 1000 $\mu\text{g/mL}$ in dichloromethane)同位素內部標準品。

2.3. 器具及材料：

- 2.3.1. 容量瓶：10 mL，褐色。
- 2.3.2. 離心管：15 mL，PP材質。
- 2.3.3. 濾膜：孔徑0.22 μm ，PVDF材質。
- 2.3.4. 研鉢。

2.4. 內部標準溶液之配製：

- 2.4.1. 取NDEA-d₄及NDPhA-d₁₀同位素內部標準品各約10 mg，精確稱定，分別以甲醇溶解並定容至10 mL，作為內部標準原液，冷凍避光貯存。
- 2.4.2. 精確量取NDMA-d₆及NDPA-d₁₄同位素內部標準品各1 mL，分別以甲醇定容至10 mL，作為內部標準原液，冷凍避光貯存。
- 2.4.3. 臨用時取適量各內部標準原液混合，以甲醇稀釋至200 ng/mL，供作內部標準溶液。

2.5. 標準溶液之配製：

- 2.5.1. 取NDCHA、NDiBA、NDiNA、NDiPA、NMEA及NMOR對照用標準品各約10 mg，精確稱定，分別以甲醇溶解並定容至10 mL，再分別以甲醇稀釋至50 $\mu\text{g/mL}$ ，作為標準原液，冷凍避光貯存。
- 2.5.2. 精確量取NDBA、NDEA、NDMA、NDPhA、NDPA及NPIP對照用標準品各1 mL，分別以甲醇定容至10 mL，再分別以甲醇稀釋至50 $\mu\text{g/mL}$ ，作為標準原液，冷凍避光貯存。
- 2.5.3. 臨用時取適量各標準原液與內部標準溶液混合，以甲醇稀釋至1~50 ng/mL (含內部標準品濃度20 ng/mL)，供作標準溶液。

2.6. 標準曲線之製作：

精確量取標準溶液各2 μL ，分別注入氣相層析串聯質譜儀中，依下列條件進行分析，就各亞硝胺類化合物與內部標準品之波峰面積比，與對應之亞硝胺類化合物濃度，分別製作標準曲線。

氣相層析串聯質譜分析測定條件^(註1)：

層析管：DB-WAX UI毛細管，內膜厚度0.25 μm ，內徑0.25 mm $\times$ 30 m。

層析管溫度：初溫：80°C，3 min；

升溫速率：20°C/min；

終溫：250°C，3 min。

注入器溫度：250°C。

注入模式^(註2)：加壓不分流(pulsed splitless)，加壓壓力35 psi，加壓時間1 min。

注入量：2 μL 。

移動相氣體及流速：氮氣，1 mL/min。

介面溫度：250°C。

離子源溫度：230°C。

離子化模式：EI，70 eV。

偵測模式：多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)。偵測離子對及碰撞能量如附表。

註：1. 上述測定條件分析不適時，可依所使用之儀器，設定適合之測定條件。

2. 樣品進樣氣化後之膨脹體積須小於襯管體積，可依所使用之儀器及襯管，設定適合之加壓壓力及時間。

2.7. 檢液之調製：

將檢體磨碎混勻，取約100 mg，精確稱定，置於離心管中，加入內部標準溶液0.5 mL及甲醇4.5 mL，超音波振盪30分鐘，以3000 $\times g$ 離心5分鐘，取上清液，經濾膜過濾，供作檢液。

2.8. 鑑別試驗及含量測定：

精確量取檢液及標準溶液各2 μL ，分別注入氣相層析串聯質譜儀中，依2.6.節條件進行分析。就檢液與各標準溶液所得波峰之滯留時間及多重反應偵測相對離子強度^(註)鑑別之，並依下列計算式求出檢體中各亞硝胺類化合物之含量($\mu\text{g/g}$)：

$$\text{檢體中各亞硝胺類化合物之含量}(\mu\text{g/g}) = \frac{C \times V}{M} \times 10^{-3}$$

C：由標準曲線求得檢液中各亞硝胺類化合物之濃度(ng/mL)

V：萃取檢體之甲醇體積(5 mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

註：相對離子強度由定性離子對與定量離子對之波峰面積相除而得($\leq 100\%$)，容許範圍如下：

相對離子強度(%)	容許範圍(%)
> 50	± 20
> 20~50	± 25
> 10~20	± 30
≤ 10	± 50

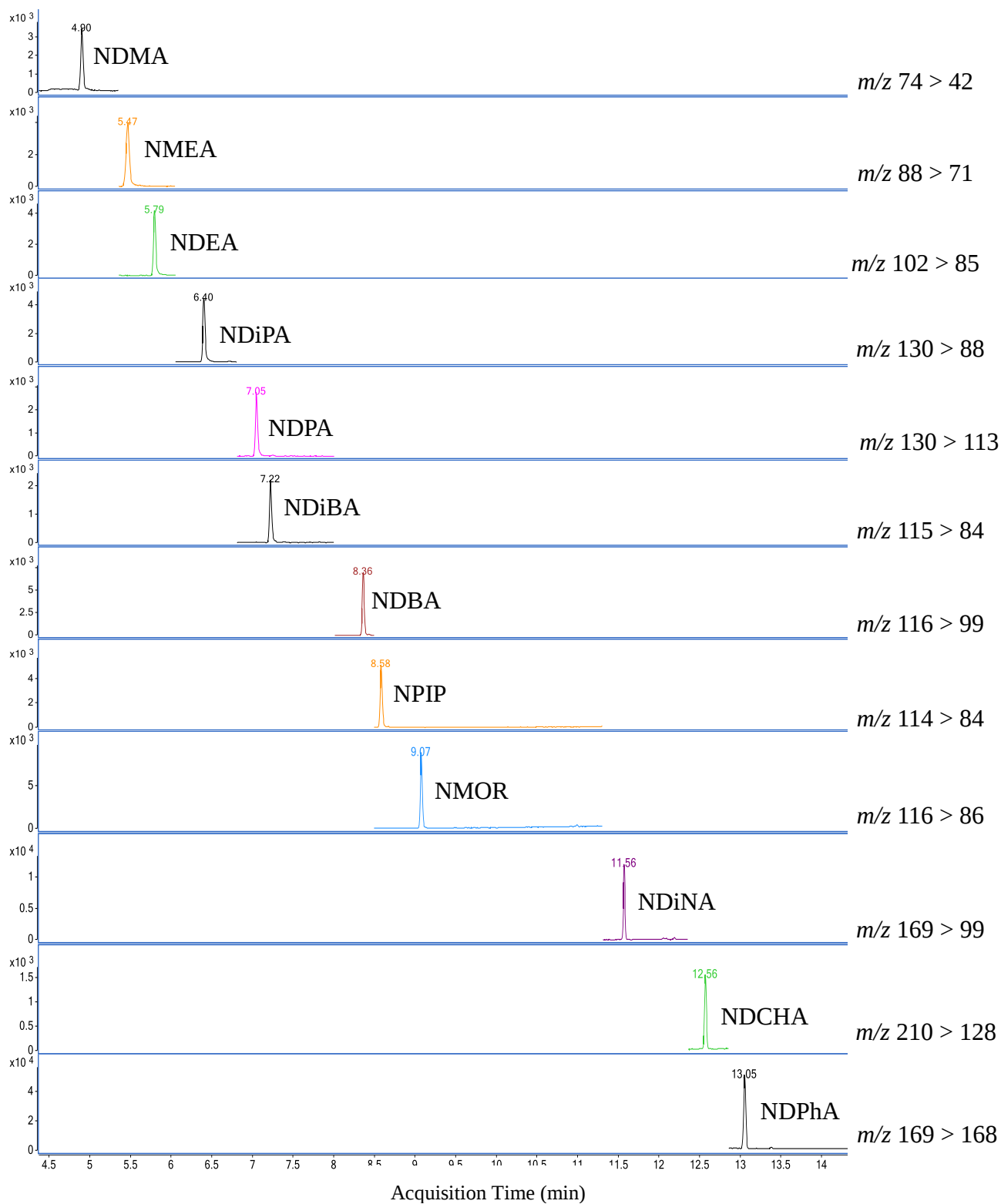
附註：1. 本檢驗方法之定量極限如附表。

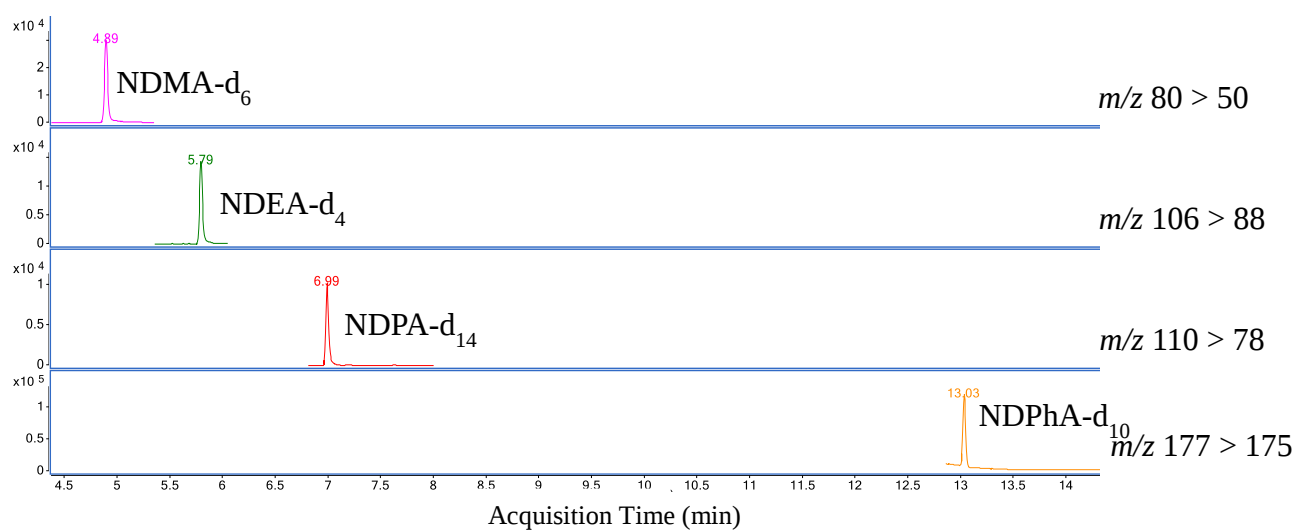
2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

參考文獻：

1. U.S. Food and Drug Administration. 2019. Combined direct injection *N*-nitrosodimethylamine (NDMA) and *N*-nitrosodiethylamine (NDEA) impurity assay by GC/MS. [<https://www.fda.gov/media/117807/download>]
2. U.S. Food and Drug Administration. 2019. Combined direct injection *N*-nitrosodimethylamine (NDMA), *N*-nitrosodiethylamine (NDEA), *N*-nitrosoethylisopropylamine (NEIPA), *N*-nitrosodiisopropylamine (NDIPA), and *N*-nitrosodibutylamine (NDBA) impurity assay by GC-MS/MS. [<https://www.fda.gov/media/123409/download>]
3. Parr, M. K. and Joseph, J. F. 2019. NDMA impurity in valsartan and other pharmaceutical products: Analytical methods for the determination of *N*-nitrosamines. *J. Pharm. Biochem. Anal.* 164: 536-549.

參考層析圖





圖、以GC-MS/MS分析NDBA等12項對照用標準品及NDEA-d₄等4項同位素內部標準品之MRM圖譜

附表、NDBA 等 14 項亞硝胺類化合物及同位素內部標準品之多重反應偵測模式參數及定量極限

項次	分析物	定量離子對		定性離子對		內部標準品	定量極限 ($\mu\text{g/g}$)
		前驅離子(m/z)> 產物離子(m/z)	碰撞能量 (eV)	前驅離子(m/z)> 產物離子(m/z)	碰撞能量 (eV)		
1	<i>N</i> -Nitrosodibutylamine (NDBA)	116 > 99	2	158 > 99	5	NDPA-d ₁₄	0.05
2	<i>N</i> -Nitrosodicyclohexylamine (NDCHA)	210 > 128	8	210 > 111	20	NDPA-d ₁₄	0.05
3	<i>N</i> -Nitrosodiethylamine (NDEA)	102 > 85	2	102 > 56	15	NDEA-d ₄	0.05
4	<i>N</i> -Nitrosodiisobutylamine (NDiBA)	115 > 84	2	103 > 57	8	NDPA-d ₁₄	0.10
5	<i>N</i> -Nitrosodiisononylamine (NDiNA)	169 > 99	12	281 > 225	12	NDPA-d ₁₄	0.05
6	<i>N</i> -Nitrosodiisopropylamine (NDiPA)	130 > 88	2	130 > 42	10	NDPA-d ₁₄	0.05
7	<i>N</i> -Nitrosodimethylamine (NDMA)	74 > 42	20	74 > 44	13	NDMA-d ₆	0.05
8	<i>N</i> -Nitrosodiphenylamine (NDPhA)	169 > 168	18	169 > 167	30	NDPhA-d ₁₀	0.05
9	<i>N</i> -Nitrosodipropylamine (NDPA)	130 > 113	2	130 > 43	13	NDPA-d ₁₄	0.05
10	<i>N</i> -Nitrosomethylethylamine (NMEA)	88 > 71	2	88 > 42	15	NDEA-d ₄	0.05
11	<i>N</i> -Nitrosomorpholine (NMOR)	116 > 86	2	116 > 56	13	NDPA-d ₁₄	0.05
12	<i>N</i> -Nitrosopiperidine (NPIP)	114 > 84	10	114 > 97	5	NDPA-d ₁₄	0.05
I.S.	<i>N</i> -Nitrosodiethylamine-d ₄ (NDEA-d ₄)	106 > 88	2	—	—	—	—
I.S.	<i>N</i> -Nitrosodimethylamine-d ₆ (NDMA-d ₆)	80 > 50	5	—	—	—	—
I.S.	<i>N</i> -Nitrosodiphenylamine-d ₁₀ (NDPhA-d ₁₀)	177 > 175	18	—	—	—	—
I.S.	<i>N</i> -Nitrosodipropylamine-d ₁₄ (NDPA-d ₁₄)	110 > 78	2	—	—	—	—