

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

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於藥品中*N*-nitrosodiethanolamine (NDELA)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，以液相層析串聯質譜儀(liquid chromatograph/tandem mass spectrometer, LC-MS/MS)分析之方法。
  - 2.1. 裝置：
    - 2.1.1. 液相層析串聯質譜儀：
      - 2.1.1.1. 離子源：大氣壓力化學游離(atmospheric pressure chemical ionization, APCI)。
      - 2.1.1.2. 層析管：XSelect HSS T3, 3.5  $\mu\text{m}$ ，內徑3 mm  $\times$  15 cm，或同級品。
    - 2.1.2. 超音波振盪器(Ultrasonicator)。
    - 2.1.3. 離心機(Centrifuge)：可達3000  $\times g$ 以上者。
  - 2.2. 試藥：甲醇、乙腈及甲酸均採用液相層析級；去離子水(比電阻於25 $^{\circ}\text{C}$ 可達18  $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上)；NDELA等12項對照用標準品；*N*-nitrosodiethanolamine- $\text{d}_8$  (NDELA- $\text{d}_8$ )等5項同位素內部標準品(品項見附表)。
  - 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  $\mu\text{m}$ ，PVDF材質。
    - 2.3.4. 研鉢。
  - 2.4. 10% 甲醇溶液之調製：

取甲醇與去離子水以1：9 (v/v)之比例混勻。
  - 2.5. 移動相溶液之調製：
    - 2.5.1. 移動相溶液A：

取甲酸1 mL，加去離子水使成1000 mL，混合均勻後，經濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液A。
    - 2.5.2. 移動相溶液B：

取甲酸1 mL及乙腈200 mL，加甲醇使成1000 mL，混合均勻後，供作移動相溶液B。

2.6. 內部標準溶液之配製：

取適量NDELA-d<sub>8</sub>等5項同位素內部標準品，精確稱定，分別以甲醇溶解並稀釋至50 µg/mL，作為內部標準原液，冷凍避光貯存。臨用時取適量各內部標準原液混合，以甲醇稀釋至0.4 µg/mL，供作內部標準溶液。

2.7. 標準溶液之配製：

取適量NDELA等12項對照用標準品，精確稱定，分別以甲醇溶解並稀釋至50 µg/mL，作為標準原液，冷凍避光貯存。臨用時取適量各標準原液與內部標準溶液混合，以10%甲醇溶液稀釋至2.5~50 ng/mL (含內部標準品濃度20 ng/mL)，供作標準溶液。

2.8. 標準曲線之製作：

精確量取標準溶液各10 µL，分別注入液相層析串聯質譜儀中，依下列條件進行分析，就各亞硝酸類化合物與內部標準品之波峰面積比，與對應之亞硝酸類化合物濃度，分別製作標準曲線。

液相層析串聯質譜分析測定條件<sup>(註)</sup>：

層析管：XSelect HSS T3，3.5 µm，內徑3 mm × 15 cm。

層析管溫度：40°C。

移動相溶液：A液與B液以下列條件，進行梯度分析

時間(min)	A (%)	B (%)
0.0 → 1.0	95 → 95	5 → 5
1.0 → 5.0	95 → 50	5 → 50
5.0 → 6.5	50 → 50	50 → 50
6.5 → 7.5	50 → 35	50 → 65
7.5 → 8.5	35 → 35	65 → 65
8.5 → 9.5	35 → 0	65 → 100
9.5 → 12.0	0 → 0	100 → 100
12.0 → 12.1	0 → 95	100 → 5
12.1 → 15.0	95 → 95	5 → 5

移動相流速：0.6 mL/min。

注入量：10 µL。

離子化模式：APCI正離子。

放電電流(Nebulizer current)：5 µA。

氣簾氣體(Curtain gas)：25 psi。

霧化氣體(Gas 1)：50 psi。

碰撞氣體(Collision gas)：medium。

加熱溫度(Temperature)：400°C。

偵測模式：多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)。偵測離子對、去集簇電壓(declustering potential)及碰撞能量(collision energy)如附表。

註：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。

#### 2.9. 檢液之調製：

將檢體磨碎混勻，取約250 mg，精確稱定，置於離心管中，加入內部標準溶液0.25 mL及甲醇0.25 mL，混合均勻，超音波振盪5分鐘，加入去離子水4.5 mL，混合均勻，超音波振盪5分鐘，以3000 ×g離心5分鐘，取上清液，經濾膜過濾，供作檢液。

#### 2.10. 鑑別試驗及含量測定：

精確量取檢液及標準溶液各10 μL，分別注入液相層析串聯質譜儀中，依2.8.節條件進行分析。就檢液與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<sup>(註)</sup>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(μg/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：萃取檢體之甲醇溶液體積(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(≤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，NDELA等12項亞硝胺類化合物均為0.05 μg/g。

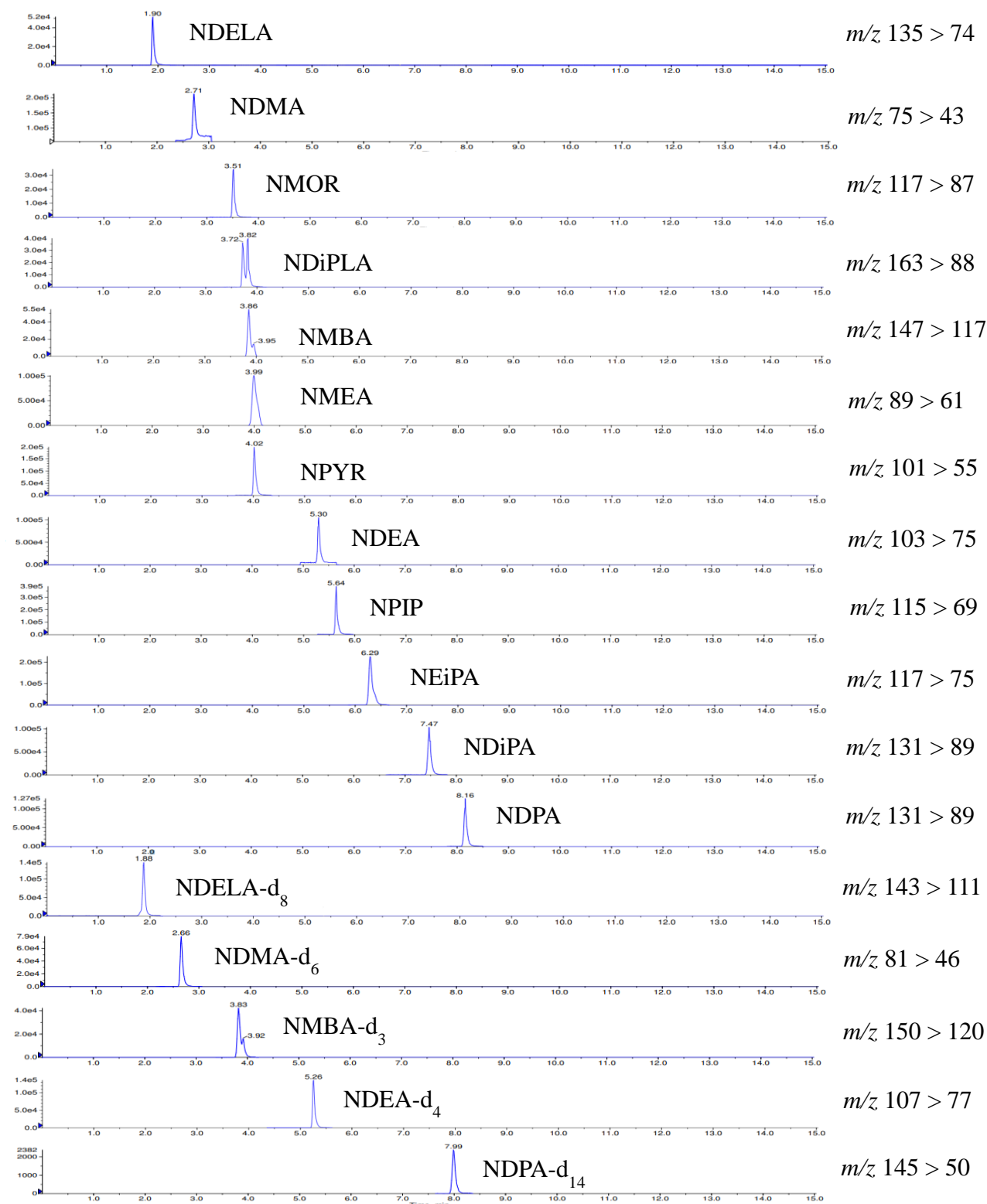
2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

#### 參考文獻：

1. Ripollés, C., Pitarch, E., Sancho, J. V., López, F. J. and Hernández, F. 2011. Determination of eight nitrosamines in water at the ng L<sup>-1</sup> levels by liquid

- chromatography coupled to atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 702: 62-71.
2. Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt (CVUA) Karlsruhe. 2019. Method for the determination of NDMA and NDEA by LC-MS/MS in Sartan containing film coated tablets. CVUA Karlsruhe, Germany (OMCL BW).
  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.

### 參考層析圖譜



圖、以 LC-MS/MS 分析 NDELA 等 12 項對照用標準品及 NDELA-d<sub>8</sub> 等 5 項同位素內部標準品之 MRM 圖譜

附表、NDELA 等 12 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

項次	分析物	定量離子對			定性離子對			內部標準品
		前驅離子( $m/z$ )> 產物離子( $m/z$ )	去集簇 電壓 (V)	碰撞 能量 (eV)	前驅離子( $m/z$ )> 產物離子( $m/z$ )	去集簇 電壓 (V)	碰撞 能量 (eV)	
1	<i>N</i> -Nitrosodiethanolamine (NDELA)	135 > 74	29	17	135 > 104	29	9	NDELA-d <sub>8</sub>
2	<i>N</i> -Nitrosodiethylamine (NDEA)	103 > 75	25	13	103 > 47	25	29	NDEA-d <sub>4</sub>
3	<i>N</i> -Nitrosodiisopropanolamine (NDiPLA)	163 > 88	44	17	163 > 70	44	28	NMBA-d <sub>3</sub>
4	<i>N</i> -Nitrosodiisopropylamine (NDiPA)	131 > 89	50	13	131 > 43	50	22	NDPA-d <sub>14</sub>
5	<i>N</i> -Nitrosodimethylamine (NDMA)	75 > 43	28	21	75 > 58	28	15	NDMA-d <sub>6</sub>
6	<i>N</i> -Nitrosodipropylamine (NDPA)	131 > 89	59	14	131 > 43	59	21	NDPA-d <sub>14</sub>
7	<i>N</i> -Nitrosoethylisopropylamine (NEiPA)	117 > 75	16	14	117 > 47	16	22	NDEA-d <sub>4</sub>
8	<i>N</i> -Nitroso- <i>N</i> -methyl-4-aminobutyric acid (NMBA)	147 > 117	10	8	147 > 87	10	16	NMBA-d <sub>3</sub>
9	<i>N</i> -Nitrosomethylethylamine (NMEA)	89 > 61	7	16	89 > 29	7	27	NMBA-d <sub>3</sub>
10	<i>N</i> -Nitrosomorpholine (NMOR)	117 > 87	38	17	117 > 86	38	20	NMBA-d <sub>3</sub>
11	<i>N</i> -Nitrosopiperidine (NPIP)	115 > 69	42	21	115 > 41	42	33	NDEA-d <sub>4</sub>
12	<i>N</i> -Nitrosopyrrolidine (NPYR)	101 > 55	58	22	101 > 41	58	37	NMBA-d <sub>3</sub>
I.S.	<i>N</i> -Nitrosodiethanolamine-d <sub>8</sub> (NDELA-d <sub>8</sub> )	143 > 111	23	8	—	—	—	—
I.S.	<i>N</i> -Nitrosodiethylamine-d <sub>4</sub> (NDEA-d <sub>4</sub> )	107 > 77	48	16	—	—	—	—
I.S.	<i>N</i> -Nitrosodimethylamine-d <sub>6</sub> (NDMA-d <sub>6</sub> )	81 > 46	106	25	—	—	—	—
I.S.	<i>N</i> -Nitrosodipropylamine-d <sub>14</sub> (NDPA-d <sub>14</sub> )	145 > 50	130	46	—	—	—	—
I.S.	<i>N</i> -Nitroso- <i>N</i> -methyl-4-aminobutyric acid-d <sub>3</sub> (NMBA-d <sub>3</sub> )	150 > 120	36	9	—	—	—	—