

Metformin原料藥及其製劑中*N*-亞硝基二甲胺之檢驗方法
Method of Test for *N*-nitrosodimethylamine in Metformin Drug Substance and
Drug Products

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於Metformin原料藥及其製劑中亞硝胺類化合物 *N*-nitrosodimethylamine (NDMA)之檢驗。
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 μm ，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4000 $\times g$ 以上者。
 - 2.2. 試藥：甲醇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)；*N*-nitrosodimethylamine (NDMA, 5.0 mg/mL in methanol)對照用標準品；*N*-nitrosodimethylamine- d_6 (NDMA- d_6 , 1 mg/mL in methanol)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。
 - 2.4. 25% 甲醇溶液之調製：

取甲醇與去離子水以1：3 (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，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，加甲醇使成1000 mL，經濾膜過濾，供作移動相溶液B。
 - 2.6. 內部標準溶液之配製：

取NDMA- d_6 同位素內部標準品0.5 mL，以甲醇定容至10 mL，作為內部標準原液，冷凍避光貯存。臨用時取適量內部標準原液，以甲醇稀釋至

200 ng/mL，供作內部標準溶液。

2.7. 標準溶液之配製：

取NDMA對照用標準品0.1 mL，以甲醇定容至10 mL，作為標準原液，冷凍避光貯存。臨用時取適量標準原液，以25% 甲醇稀釋至0.5~25 ng/mL (含內部標準品濃度10 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5 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NDMA與內部標準品之波峰面積比，與對應之NDMA濃度，製作標準曲線。

2.9. 液相層析串聯質譜分析測定條件^(註)：

層析管：XSelect HSS T3，3.5 µm，內徑3.0 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 → 0	5 → 100
5.0 → 6.5	0 → 0	100 → 100
6.5 → 6.6	0 → 95	100 → 5
6.6 → 9.0	95 → 95	5 → 5

移動相流速：0.6 mL/min。

注入量：5 µL。

離子化模式：APCI正離子。

電暈針電壓(Corona voltage)：3 kV。

探針溫度(Probe temperature)：300°C。

離子源溫度(Ion source temperature)：130°C。

進樣錐氣體流速(Cone gas flow)：300 L/hr。

溶媒揮散氣體流速(Desolvation gas flow)：1200 L/hr。

偵測模式：多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)。偵測離子對、進樣錐電壓(cone voltage)及碰撞能量(collision energy)如下表：

分析物	離子對	進樣錐電壓 (V)	碰撞能量 (eV)
	前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)		
NDMA	75 > 58*	30	10
	75 > 43	60	11

NDMA-d ₆ (I.S.)	81 > 46	30	10
----------------------------	---------	----	----

*定量離子對

註：1. 如有轉向閥，可設定以下參數：

時間(min)	移動相流向
0.0 → 2.4	廢液
2.4 → 5.0	偵測器
5.0 → 9.0	廢液

2. 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。

2.10. 檢液之調製：

2.10.1. 原料藥：

取檢體約1 g，精確稱定，置於離心管中，加入內部標準溶液0.5 mL及甲醇2 mL，混合均勻，超音波振盪10分鐘，以4000 ×g離心10分鐘，取上清液500 μL，加入去離子水1.5 mL，混合均勻，超音波振盪10分鐘，以4000 ×g離心10分鐘，取上清液，經濾膜過濾，供作檢液。

2.10.2. 製劑：

取檢體至少10粒，研成粉末，取約1 g，精確稱定，置於離心管中，加入內部標準溶液0.5 mL及甲醇2 mL，混合均勻，超音波振盪10分鐘，以4000 ×g離心10分鐘，取上清液500 μL，加入去離子水1.5 mL，混合均勻，超音波振盪10分鐘，以4000 ×g離心10分鐘，取上清液，經濾膜過濾，供作檢液。

2.11. 鑑別試驗及含量測定：

精確量取檢液及標準溶液各5 μL，分別注入液相層析串聯質譜儀中，依2.9.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^(註)鑑別之，並依下列計算式求出檢體中NDMA之含量(μg/g)：

$$\text{檢體中NDMA之含量}(\mu\text{g/g}) = \frac{C \times V \times D}{M} \times 10^{-3}$$

C：由標準曲線求得檢液中NDMA之濃度(ng/mL)

V：檢體調製之體積(2.5 mL)

D：稀釋倍數(4)

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：

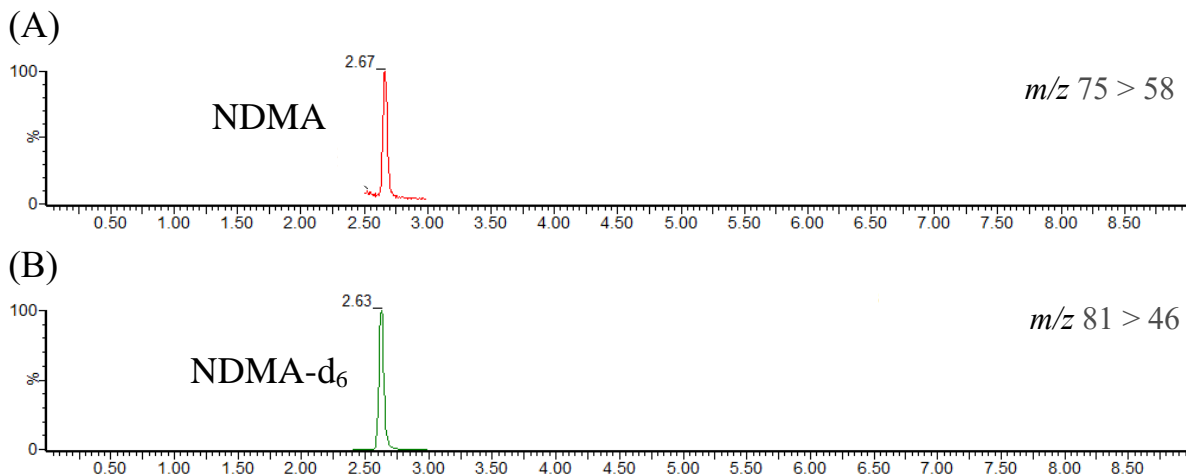
相對離子強度(%)	容許範圍(%)
> 50	± 20
> 20~50	± 25
> 10~20	± 30
≤ 10	± 50

附註：1. 本檢驗方法之定量極限為0.005 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

Chang, S. H., Chang, C. C., Wang, L. J., Chen, W. C., Fan, S. Y., Zang, C. Z., Hsu, Y. H., Lin, M. C., Tseng, S. H. and Wang, D. Y. 2020. A multi-analyte LC-MS/MS method for screening and quantification of nitrosamines in sartans. J. Food Drug Anal. 28: 292-301.

參考層析圖譜



圖、以LC-MS/MS分析NDMA標準品(A)及NDMA-d₆內部標準品(B)之MRM圖譜