

LC-MS/MS 测定氯沙坦钾中叠氮类杂质 AZBT 的含量

LCMSMS-834

摘要： 本文使用岛津三重四极杆液质联用仪测定氯沙坦钾中叠氮类杂质 AZBT 的含量。在 0.15~50 ng/mL 浓度范围内线性关系良好，相关系数大于 0.99，检出限为 0.006 ng/mL，定量限为 0.018 ng/mL。0.15 ng/mL 标准品溶液连续进样 6 针，AZBT 的保留时间及峰面积的 RSD 为 0.084% 和 1.15%。三个浓度水平的加标回收率为 87.56~98.61%。该方法灵敏度高，重复性好，能够有效的测定氯沙坦钾中叠氮类杂质 AZBT 的含量。

关键词： 氯沙坦钾 叠氮类杂质 AZBT 液质联用法

技术特点：

- ❖ 此方法检测 AZBT，灵敏度高，可至限量的十分之一。
- ❖ 采用柱后切换装置，可有效的减少非目标物对系统的污染，减少干扰。

沙坦类药物是一种选择性、非竞争性血管紧张素 II (Ang II) 受体拮抗剂，用于治疗高血压病。其特点为作用机制新颖、疗效确切且不良反应少，是治疗高血压的一线药物。沙坦类药物根据结构可以分为，一类是含有四唑环的，如氯沙坦、缬沙坦、厄贝沙坦、替米沙坦和奥美沙坦等；另一类是不含四唑环的，如依普沙坦。近年来，全球的药品监管机构及药物制造商对遗传基因毒素杂质日益关注。2021 年，在含四唑类的沙坦类药物中发现了新的致突变性叠氮化物副产物，即叠氮基杂质，引发了人们对药品杂质控制的进一步关注。2021 年因含有的 5-(4'-叠氮甲基-[1,1'-联苯]-2-基)-1H-四氮唑 (AZBT) 等叠氮类杂质，加拿大 FDA 倡议召回氯沙坦、厄沙贝坦等沙坦类药物。

AZBT 是沙坦类药物已知叠氮类杂质之一。在

2021 年 4 月进行的两次埃姆斯测验呈现阳性，说明该杂质具有致癌作用。根据 ICH M7 指南中规定类似沙坦类药物中遗传基因毒素杂质的摄入量应低于 1.5 μg/day。

本实验使用岛津三重四极杆液质联用仪建立了测定氯沙坦钾中 AZBT 含量的方法。可为相关从业人员提供参考。

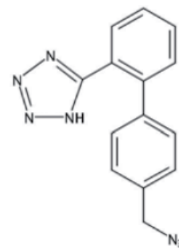


图 1 AZBT

实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津 LCMS-8050 液质联用系统，配置信息如下：

系统控制器：	CBM-20A	脱气机：	DGU-20A _{5R}
输液泵：	LC-30AD×2	柱温箱：	CTO-30A
自动进样器：	SIL-30AC	质谱仪：	LCMS-8050
色谱工作站：	Labsolutions Ver. 5.114	切换阀：	FCV-32AH

1.2 分析条件

液相色谱条件

色 谱 柱 : Shim-pack Velox C18 (100 mm x 3.0 mm I.D., 2.7 μm, 岛津(上海)实验器材有限公司, P/N:227-32010-03)
流 动 相 : A-0.1% 甲酸水; B- 乙腈;
进 样 体 积 : 3 μL 柱 温 : 35°C
流 速 : 0.4 mL/min 洗 针 液 : 甲醇 / 水 =1:1 (v:v)
洗 脱 方 式 : 梯度洗脱, B 相初始浓度为 27%, FCV 初始状态为 1, 时间程序见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
4.00	Pumps	Pump B Conc.	30
8.50	CTO	CTO.RVL	0
10.00	Pumps	Pump B Conc.	35
10.10	Pumps	Pump B Conc.	90
15.00	Pumps	Pump B Conc.	90
15.01	Pumps	Pump B Conc.	27
20.00	Controller	Stop	

其中: FCV 的 0 代表接入质谱端; FCV 的 1 代表废液端

质谱条件

离子化模式 : ESI (+) /ESI(-) 雾化气流速 : 3.0 L/min
接口电压 : 4.0 kV 干燥气流速 : 8.0 L/min
接口温度 : 400°C 加热气流速 : 12.0 L/min
加热块温度 : 400°C D L 温 度 : 200°C

表 2 MRM 参数

No.	中文名	CAS. No.	前体离子	产物离子	Q1 Pre (V)	CE	Q3 Pre (V)
1	AZBT(+)	152708-24-2	278.10	235.10*	-19	-9	-23
				207.10	-19	-15	-20
2	氯沙坦钾 (-)	124750-99-8	421.10	179.30*	15	23	12
				157.20	30	25	26

* 代表定量离子对。

1.3 标准品溶液配制

称取 AZBT 标准品适量配制成 100 μg/mL 标准储备液。取适量标准储备液, 配制成浓度为 0.15 ng/mL、0.50 ng/mL、1.00 ng/mL、5.00 ng/mL、20.00 ng/mL、50 ng/mL 的标准系列溶液。

1.4 样品前处理

称取适量氯沙坦钾样品, 用甲醇溶解配制 5 mg/mL 氯沙坦钾的溶液, 离心, 取上清液过滤。

■ 结果与讨论

2.1 AZBT 标准溶液谱图

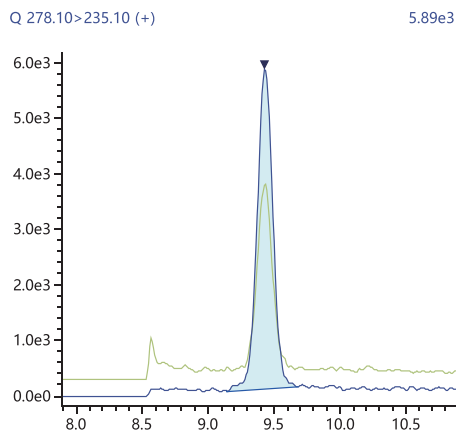


图2 AZBT 准溶液 MRM 色谱图 (0.15 ng/mL)

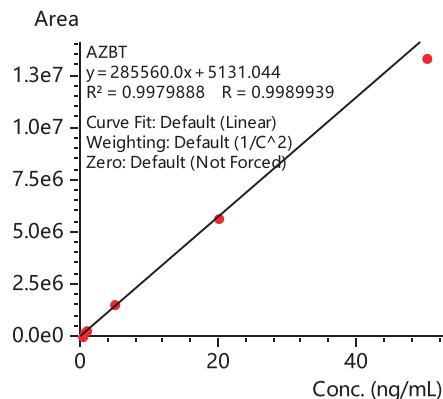


图3 AZBT 标准曲线

2.2 校准曲线和检出限

按照 1.3 及 1.4 项下分析条件，标准系列溶液为 0.15 ng/mL、0.50 ng/mL、1.00 ng/mL、5.00 ng/mL、20.00 ng/mL、50 ng/mL，按照浓度从低到高的顺序依次上机测定，以系列标准工作液中 AZBT 的浓度为横坐标，以 AZBT 的响应值与内标的响应值的比值为纵坐标，绘制校准曲线，如图 3 所示。AZBT 在校准曲线浓度范围内线性关系良好，相关系数 r 大于 0.99，各校准点准确度在 93.10%-103.90% 之间。根据 AZBT 最低浓度点标样数据，以 3 倍信噪比计算检出限，检出限及线性相关系数如表 3 所示。

表 3 左旋肉碱的校准曲线及检出限

化合物	校准曲线	相关系数 R	准确度 %	检测限 (ng/mL)	定量限 (ng/mL)
AZBT	$Y=(285560)X + (5131.04)$	0.9989	93.10%-103.90%	0.006	0.018

2.3 重复性实验

取 0.15 ng/mL 标准品溶液，连续进样 6 次，考察仪器的精密度，AZBT 的保留时间及峰面积的 RSD 为 0.084% 和 1.15%。

2.4 样品含量测定

将氯沙坦钾原料药按照上述前处理方法进行处理，上机进行测定，药品中 AZBT 的 MRM 色谱图如图 4 所示。平行测定 6 份样品，AZBT 的含量为 0.928 $\mu\text{g/g}$ ，RSD 为 0.82%。

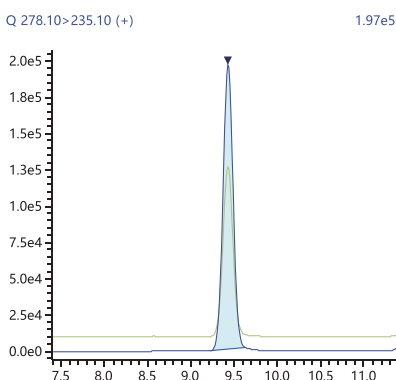


图4 样品中 AZBT MRM 色谱图

3.5 加标回收率

根据氯沙坦钾原料药中 AZBT 的含量，分别向氯沙坦钾中加入 AZBT 含量为 0.8 $\mu\text{g/g}$ 、1.0 $\mu\text{g/g}$ 、1.2 $\mu\text{g/g}$ 的标准品，按照 1.4 进行前处理，测定不同水平样品的加标回收率在 87.56~98.61% 范围内，RSD 结果如表 4 所示。

表 4 不同浓度水平 AZBT 添加回收率结果 (n=6)

样品含量 $\mu\text{g/g}$	加标后含量 $\mu\text{g/g}$	加标量 $\mu\text{g/g}$	回收率 %	RSD%
0.928	1.717	0.8	98.61	0.22
	1.846	1.0	91.77	0.25
	1.979	1.2	87.56	0.49

■ 结论

本文使用岛津三重四极杆液质联用仪建立了测定氯沙坦钾中 AZBT 的方法。结果显示：对 AZBT 标准品溶液进行重复性测试，AZBT 的保留时间及峰面积的 RSD 为 0.084% 和 1.15%；以外标法定量，其结果显示校准曲线相关系数大于 0.99；使用 0.15 ng/mL 标样数据，以 3 倍信噪比（峰至峰）计算 AZBT 方法检出限与定量限。使用氯沙坦钾原料药作为加标基质，考察三个不同浓度水平加标回收以及 RSD，结果显示，三个不同水平的加标回收率在 87.56~98.61% 之间，实验结果表明，该方法前处理简单，专属性强，能够满足 AZBT 的含量测定需要，可为相关从业人员提供参考。

岛津应用云

