

化学原料药及制剂中N-亚硝基药物成分 相关杂质（NDSRIs）质谱分析应用文集



前言

在沙坦类药物的亚硝胺致癌杂质 NDMA（二甲基亚硝胺）事件爆发之后，FDA 和 EMA 等监管机构就一直在强调原料药与成品药生产过程中，对于亚硝胺杂质的质量控制的必要性。它们一再出台并更新相关的指南，责令各制药公司和 CDMO 加强亚硝胺杂质的控制管理。

FDA 在 2024 年 9 月 4 日更新了人用药物亚硝胺杂质指南，这是继 2021 年 2 月该指南第一次修订后，FDA 第二次对该指南进行增订和更新。本次更新将 2023 年 8 月 4 日发布的药物基质亚硝胺杂质允许摄入量设定的指南文件：Recommended Acceptable Intake Limits for Nitrosamine Drug-Substance-Related Impurities (NDSRIs) Guidance for Industry。核心内容增加进来，同时根据近 3 年来（2021 年-2024 年）各主要研究机构和监管当局的研究内容，较大幅度完善更新了该指南。可以说这部指南是当前亚硝胺杂质研究和申报指南中最为完善的一个，相比于 EMA 的亚硝胺指南问答更先进一步指南文件。为制药工业界极其关注的 NDSRIs 杂质阈值含量的设定做出了关键性的指导。

NDSRIs (Nitrosamine Drug Substance-Related Impurities) 是指那些药物分子本身参与亚硝胺杂质形成的一类与原料药结构相似（结构中含有 API 或 API 片段）的亚硝胺杂质。这些药物或原料中通常都含有二级胺（包括叔胺）结构，为亚硝胺的形成提供了氨基单元。而产生的这些杂质是每种原料药特有的杂质，通常缺乏致癌性或致突变性研究数据，因此无法确定每日可接受摄入量 (AI)。因此 FDA 发布了该指南，制药商和申请人可以使用该指南并结合 2021 年 2 月发布的《Control of Nitrosamine Impurities in Human Drugs》行业指南来制定 NDSRIs 的 AI 限度。相对于 NDMA 和 NDEA 这样的单纯亚硝胺杂质，这些产品相关的亚硝胺杂质的上限值被指定得非常低。FDA 公布 NDSRIs 杂质 AI 上限设定的指南意见，对 AI 值未设定的 NDSRIs 杂质的 AI 设定流程进行了重要的变更。建立了 5 个活性级别，对应不同的 AI 值（从 26.5 ng/mL 到 1500 ng/mL）。

根据 FDA 意见，所有含有二级胺结构的药物都应该关注其相应 NDSRIs 杂质的情况。因其药物本身结构的不同，使得此类基因毒性杂质种类繁多，结构多样。而基于其活性级别划定的限值浓度范围又非常宽。所以为了准确的对此类杂质进行分析研究，对仪器的定性定量能力提出了更高的要求。

作为全球知名的实验室分析测试服务供应商，岛津致力于提供技术领先的仪器设备及全面可靠的综合方案。从多品种切入，关注 FDA 发布的风险警示，全方位应对 NDSRIs 杂质研究。其中主要涉及机种包括 (LC-MS/MS、LCMS-Q-TOF 等)。在各种药物 NDSRIs 杂质研究不断推进阶段，将持续提供技术支援。为了满足客户需求和行业发展趋势，岛津推出了《化学原料药及制剂中 N-亚硝基药物成分相关杂质 (NDSRIs) 质谱分析应用文集》。

本文集仅供有关人员学习交流使用，不用于任何商业用途。

岛津企业管理（中国）有限公司
分析中心

目 录

第 1 章 遗传毒性杂质及相关法规	1
第 2 章 关于 NDSRIs 杂质	4
第 3 章 NDSRIs 杂质检测及应用案例	7
3.1 液相色谱串联三重四极杆质谱联用分析	7
酒石酸伐尼克兰中 N-亚硝基伐尼克兰含量测定	8
依那普利中 N-亚硝基依那普利含量测定	12
喹那普利中 N-亚硝基喹那普利的含量测定	17
布美他尼中 N-亚硝基布美他尼的含量测定	22
普萘洛尔中 N-亚硝基普萘洛尔的含量测定	29
氯丙嗪片中 N-亚硝基-去甲基氯丙嗪的含量测定	34
托莫西汀中的亚硝胺药物成分相关杂质含量测定	40
格列齐特中亚硝胺药物成分相关杂质含量测定	45
去甲替林中 N-亚硝基去甲替林的含量测定	50
3.2 液相色谱四极杆飞行时间质谱联用分析	54
布美他尼中 N-亚硝基布美他尼的高分辨质谱法含量测定	55
依那普利中 N-亚硝基依那普利的高分辨质谱法含量测定	61
普萘洛尔中 N-亚硝基普萘洛尔的高分辨质谱法含量测定	65
酒石酸伐尼克兰中 N-亚硝基伐尼克兰的高分辨质谱法含量测定	70
喹那普利中 N-亚硝基喹那普利的高分辨质谱法含量测定	76
附录：本文集 NDSRIs 杂质检测应对一览表	82

第 1 章 遗传毒性杂质及相关法规

遗传毒性杂质，也称基因毒性杂质，通常是指能够引起 DNA 突变、染色体断裂或者 DNA 重组的物质。其对 DNA 的损害作用包括染色体断裂、DNA 重组及复制过程中共价键的插入和修饰，也包括在细胞水平上产生基因毒性物质而产生的突变。绝大部分致癌物和诱变剂都具有基因毒性，但并非所有的基因毒性杂质都具有致突变性或致癌性。

2007 年 6 月罗氏制药公司将其抗 HIV 药物奈非那韦 (viracept) 从欧盟市场撤出。欧委会 2007 年 8 月 4 日宣布暂停罗氏制药公司在欧盟国家销售奈非那韦的许可，原因是某些批次检出了一种具有遗传毒性的物质——甲磺酸乙酯。随后罗氏修正了工艺并增加对甲磺酸乙酯的控制，低于 0.5ppm。EMA 重新评估检查后，2007 年 10 月恢复其上市销售。在该事件后，各国的法规机构 EMA、FDA、ICH 等都对遗传毒性杂质有了更明确的要求。

由于遗传毒性杂质 (基因毒性杂质) 在很低的浓度下即可诱导基因突变并导致染色体的断裂和重排，因此具有潜在的致癌性。ICH 也针对遗传毒性杂质着手制订 M7 指导原则。这些指导原则为遗传毒性杂质的确认、研究和控制提供了指导性建议和技术要求。但是，由于杂质化学结构的多样性，对于绝大多数的杂质而言，往往没有充分的基因毒性或致癌性研究数据，因而难以对其归类。在缺乏安全性数据支持的情况下，这些指导原则采用“警示结构”作为区分普通杂质和遗传毒性杂质的标志；对于含有警示结构的杂质，应当进行 (定量) 构-型关系 [(Q) SAR] 预测和体内外遗传毒性和致癌性研究，或者将杂质水平控制在毒理学关注阈值 (TTC) 之下。

遗传毒性杂质种类多，有关致癌性化学物质警示结构的报道日益增加。包括了：卤代烃、酰卤类、磺酸酯类、环氧类、叠氮类、甲基联苯类、N-亚硝胺、烷基-偶氮化合物等等。Tennant 与 Ashby 在 1991 年发表的文章总结出 18 种警示结构，设计成一个超级致癌物-虚拟的分子结构如图 1：

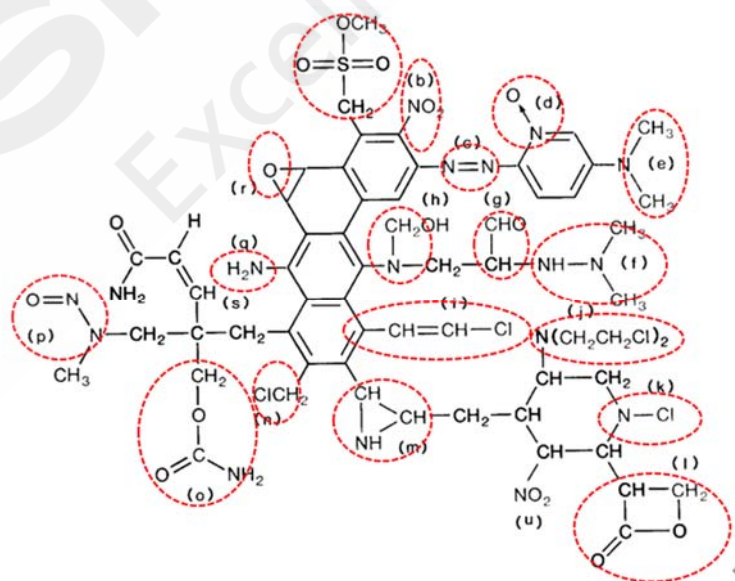


图 1：超级致癌物-虚拟的分子结构

这些结构的杂质多样且来源非常广泛：生产工艺、残留溶剂、原料药降解产物、辅料和药包材的物质等。当然，含有警示结构并不意味着该杂质一定具有遗传毒性。杂质的理化性质

和其他结构特点会对其毒性产生抑制或调节作用。警示结构只是提示了可能存在的遗传毒性和致癌性,为进一步的杂质安全性评价和控制策略的选择指明方向。在 ICH M7 指导原则草案中,基于基因毒性和致癌性将杂质分为 5 类,其中第 3 类就是含有与原料药本身结构无关的警示结构的杂质而目前没有遗传毒性相关的数据。对第 3 类杂质,可以选择按照指导原则要求将其含量控制在可接受限度(TTC)以内,也可以选择开展细菌致突变试验确定其是否具有遗传毒性,进而确定合理的控制策略。

遗传毒性杂质有关的法规

法规/标准名称	发布时间	发布单位	关键内容或作用
FDA《仿制药申请的原料药和制剂杂质研究指导原则》	1999 年首次	美国食品药品监督管理局 (FDA)	规范仿制药杂质研究要求, 2023 年修订后引入 ICH Q3A(R)和 Q3B(R), 强调基因毒性杂质需单独控制。
EMA《遗传毒性杂质限度指南》	2006 年首次	欧洲药品管理局 (EMA)	提出基因毒性杂质的分类和控制策略, 后续多次更新, 明确不同治疗周期下的 TTC 值和风险评估要求。
FDA《行业指南: 遗传毒性杂质》	2008 年草案	美国食品药品监督管理局 (FDA)	提出基因毒性杂质检测的推荐方法及限度控制策略, 后续与 ICH M7 整合。
ICH M7《遗传毒性杂质评估和控制指导原则》	2014 年	国际人用药品注册技术协调会 (ICH)	统一全球遗传毒性杂质分类、控制策略及限度计算方法, 提出基于毒理学关注阈值 (TTC) 的限度设定。
《遗传毒性杂质控制指导原则》	2019 年	中国国家药典委员会 (NMPA)	要求对基因毒性杂质进行警示结构识别、毒性评估及控制策略设计, 参考 ICH M7 框架。
EMA Q&A《基因毒性杂质控制问答》	2019 年更新	欧洲药品管理局 (EMA)	解答基因毒性杂质控制中的常见问题, 包括工艺验证、分析方法及限度豁免条件。
《中国药典》四部通则《遗传毒性杂质控制指导原则》	2020 年	中国国家药典委员会 (NMPA)	明确遗传毒性杂质的分类、危害评估及控制方法, 与 ICH M7 保持一致
《化学药物中亚硝胺类杂质研究技术指导原则》	2020 年	中国国家药品监督管理局 (NMPA)	针对亚硝胺类杂质的来源、检测及控制提出具体要求, 要求企业进行风险评估和方法验证
《人用药中亚硝胺杂质控制》	2021 年	美国食品药品监督管理局 (FDA)	关注点主要在小分子亚硝胺相关的控制措施
ICH Q3A(R2)《新原料药杂质研究指导原则》	2023 年修订	国际人用药品注册技术协调会 (ICH)	修订后强化对基因毒性杂质的关注, 要求明确杂质的来源及毒性评估。
《亚硝胺原料药相关杂质 (NDSRIs) 推荐可接受摄入量限度值的最终指南》	2023 年	美国食品药品监督管理局 (FDA)	指南根据预测的致癌效力分类为 NDSRIs 杂质的 AI 限值提供了建议
《已上市化学药品药学变更研究技术指导原则 (试行)》	2024 年	中国药品审评中心 (CDE)	规定原料药供应商变更时需评估基因毒性杂质影响, 包括杂质谱对比及稳定性验证。
《人用药中亚硝胺杂质控制》修订版 2	2024 年	美国食品药品监督管理局 (FDA)	描述了两类亚硝胺杂质: 小分子亚硝胺和 NDSRIs。并为行业提供了关于检测以及控制和其它策略的实施建议。

在遗传毒性杂质中亚硝胺类就是被广泛关注并研究的一类杂质。其又可以被细分为两大类：
1.小分子亚硝胺杂质，这些单纯亚硝胺杂质的致癌性与致畸性已经得到了充分的研究，它们的AI（允许摄入量，Acceptable Intake）值已经得到了明确的规定。例如 NDMA 的 AI 值为 96 ng/天，NDEA 的 AI 值为 26.5 ng/天。此类杂质的检测岛津已经有对应的应用文集，可以根据需要进行查阅参考。
2. NDSRIs（Nitrosamine Drug Substance-Related Impurities，药物基质亚硝胺杂质），此类杂质的化学结构与化学药本身的结构有关，所以毒性各不相同。结合不同的剂量标准限度也有很大的不同。是目前制药行业关注的焦点，也是本文集聚焦的一类杂质。



SHIMADZU
Excellence in Science

第 2 章 关于 NDSRIs 杂质

目前，FDA 与 EMA 对于亚硝胺类遗传毒性杂质的监管重点已经转移到了所谓的 NDSRIs（药物基质亚硝胺杂质，nitrosamine drug substance related impurities）。这是一个政策紧缩的标志。与单纯亚硝胺杂质不同，NDSRIs 指的是那些药物分子本身参与亚硝胺杂质形成的类型。这些药物中通常都含有二级胺（包括叔胺）结构，为亚硝胺的形成提供了氨基单元。例如治疗尼古丁成瘾药伐尼克兰（Varenicline tartrate，商业名称：Chantix）中发现的亚硝胺类杂质：N-亚硝基伐尼克兰；以及用于治疗精神分裂症、躁狂症或其他精神病性障碍的药物氯丙嗪（Chlorpromazine）中发现的 N-亚硝基氯丙嗪（叔胺也能引发亚硝胺形成的完美案例）。前者引发了美国著名制药企业多个批次的药品召回。

相对于 NDMA 和 NDEA 这样的单纯亚硝胺杂质，这些产品相关的亚硝胺杂质的上限值被制定得非常低。

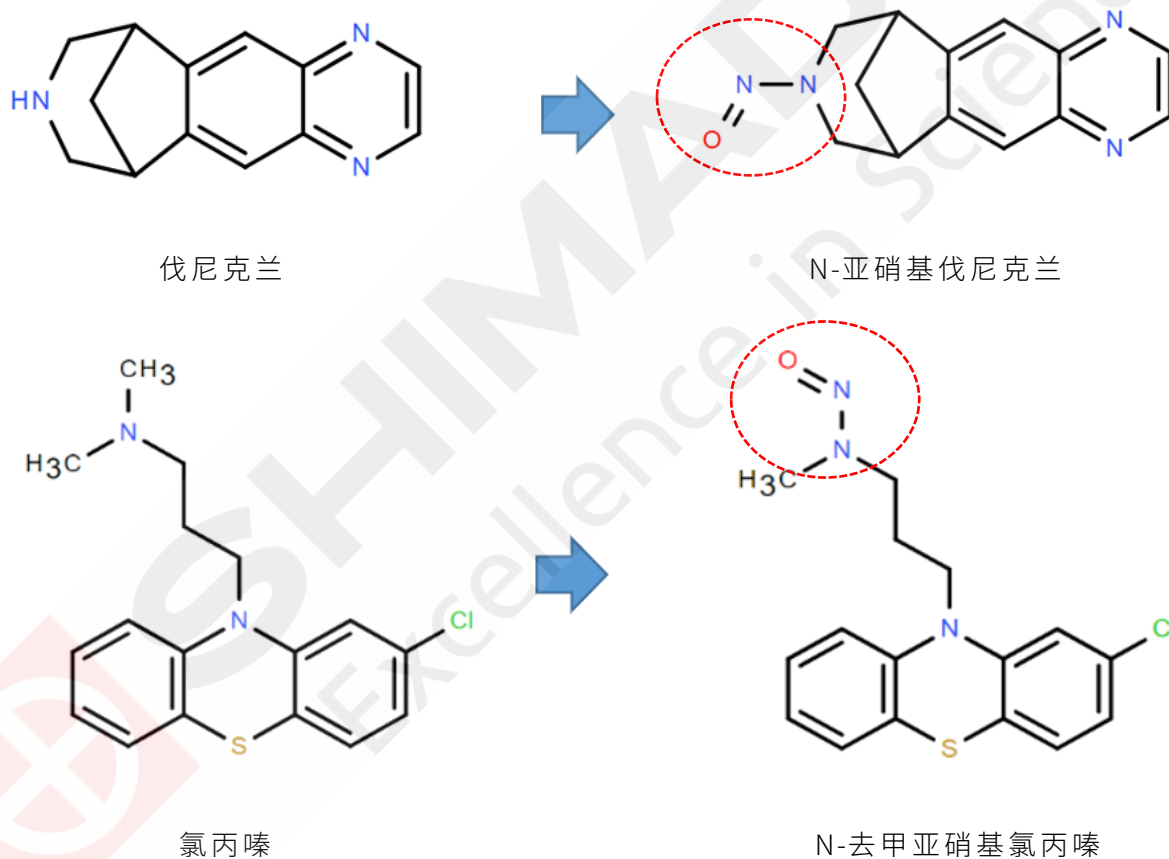


图 1：伐尼克兰和氯丙嗪以及它们的 NDSRIs

在缺少足够的技术支持的情况下，监管机构在 NDSRIs 杂质的 AI 设定上，起初非常严格。EMA 在 2022 年发布了针对特定药品的亚硝胺杂质 NDSRIs 限制指南，对某些易感药物的亚硝胺杂质 NDSRIs 的 AI 上限提出了详细建议：如果某种药物已形成亚硝胺类杂质 NDSRIs，但具体限值没有在此份指南中限定的话，将统一采取 18 ng/天的 AI 标准。相比之下，FDA 当时采纳的标准相对宽松，为 26.5 ng/天。

促进亚硝胺形成的条件包括易反应性胺的存在，如仲胺和叔胺。这些胺在酸性条件下与亚硝酸反应，导致亚硝胺的形成。亚硝酸本身是不稳定的，在酸性条件下由亚硝酸盐（NO₂）形成。绝大多数药物基质亚硝胺杂质的主要产成阶段，其实并不在原料药的合成部分，毕竟使用亚硝基化为原料的合成路线并不多，而且需要酸性条件。再考虑生产过程中的纯化步骤，形成并残留药物基质亚硝胺 NDSRIs 的可能性并不大。但在制剂阶段，需要考虑到包括含亚硝酸盐的起始材料、中间体以及合成过程中溶剂、反应物、催化剂和试剂的重复使用等等因素。尤其对于那些含有二级、三级胺结构的药物来说，更是如此。此外，生产后因素，如水分含量、pH 值和产品的储存温度也可能导致药物基质亚硝胺的产生。因此在制剂过程，储存，包装中都需要严格监控。如果对其指定 18 ng/天的 AI 标准，特别对于那些剂量极大的药物来说，这个要求就非常高了。

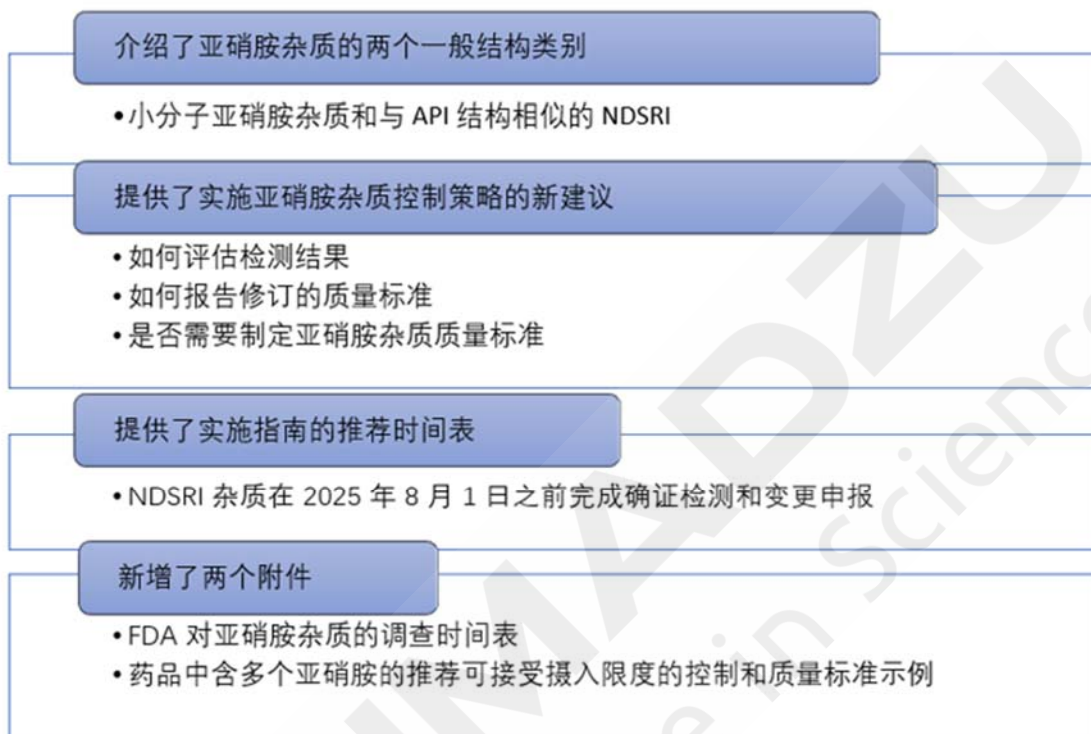
面对制药工业界的质疑声，FDA 在 2023 年 8 月 4 日发布了药物基质亚硝胺杂质允许摄入量设定的指南文件：Recommended Acceptable Intake Limits for Nitrosamine Drug-Substance-Related Impurities (NDSRIs) Guidance for Industry。文件中，FDA 承认并非所有 NDSRIs 杂质都具有相同的致癌性和致畸性（从目前的数据来看，不同亚硝胺分子的致癌性之间存在四个数量级的差异），这主要取决于它们具体的化学结构。AI 值的设定，应该考虑这些亚硝胺分子化学结构。并凭借 NDSRIs 分子结构中的活化结构特征（Activating structural features）以及去活化结构特征（deactivating structural features），来预测这些分子的致癌性，并在这个基础上给它们设定相应的 AI 值。

指南对不同的亚硝胺化学物提出了五类推荐限度，范围从 26.5 ng/天到 1500 ng/天。标准与设定如图 2 所显示。如果一个分子内同时含有一个以上亚硝胺基团，那么整个分子的 AI 值由致癌性更高的那个亚硝胺基团决定。

FDA 建议的 NDSRIs 五档标准与 AI 设定

活性级别	AI(ng/day)	说明
1	26.5	AI值等同于亚硝胺杂质中致癌性最强的分子（例如二乙基亚硝胺，NDEA）。归档于活性级别1的NDSRIs分子，其预测致癌性不高于NDEA等致癌性最强的纯粹亚硝胺致癌物。
2	100	活性级别2的NDSRIs杂质的AI值设定是基于两个已经获得详尽研究的NDSRIs杂质亚硝胺致癌物二甲基亚硝胺（NDMA）、4-(甲基亚硝胺)-1-(3-吡啶基)-1-(丁酮)（NKK）。这两个亚硝胺致癌物的AI值均为96ng/天。归档于活性级别2的NDSRIs分子，其预测致癌性不高于NDMA和NKK。
3	400	相对于活性级别2，3类NDSRIs具有更低的致癌性，这主要是源于它们化学结构中的弱去活化特征。
4	1500	活性级别4的NDSRIs，也可以通过 α -羟基化产生活性致癌代谢物。然而，这类物质的致癌性较低，因为在代谢活化的过程中，由于化学结构中的不利因素，诸如位阻效应或电子效应，活化过程收到了阻碍。
5	1500	活性级别5的NDSRIs不会通过 α -羟基化产生活性致癌代谢物。可能的阻碍原因包括位阻效应，或者化学结构中根本不具备 α -氢，或者产生的代谢物不稳定，无法与DNA发生反应。

在 2024 年 9 月 4 日 FDA 更新了《人用药物亚硝酸胺杂质指南》，这是继 2021 年 2 月该指南第一次修订后，FDA 第二次对该指南进行增订和更新。本次更新将 2023 年发布的药物基质亚硝酸胺杂质允许摄入量设定的指南文件的核心内容增加进来，同时根据近 3 年来（2021 年-2024 年）各主要研究机构和监管当局的研究内容，较大幅度完善更新了该指南。



《人用药物亚硝酸胺杂质指南》自发布之日起即时生效，这一规范性文件的出台，不仅是药品监管领域的重要里程碑，更是保障公众用药安全的关键防线。近年来，多起行业事件已敲响警钟：多款上市数十年、年销售额超十亿元的经典药品，因亚硝酸胺杂质含量超出百万分之几的安全阈值，被迫全面召回、黯然退市；部分处于临床关键阶段的创新药，亦因亚硝酸胺杂质控制问题，面临研发周期延长、生产成本激增，单项目成本激增，企业利润空间被大幅压缩。这些案例充分印证，亚硝酸胺杂质控制已成为关乎药品全生命周期管理的核心要素。

药品安全是民生底线，更是企业发展的生命线。在医药行业高质量发展的时代要求下，各药品生产经营企业、研发机构及相关单位，须以高度的责任感和使命感，将《指南》要求全面融入质量管理体系，从原料采购、生产工艺优化到成品检测实施全链条管控。唯有以敬畏之心严守质量红线，方能在激烈的市场竞争中赢得长远发展；反之，任何对药品质量安全的忽视，终将以企业声誉受损、市场份额流失甚至法律责任追究的沉重代价为结局。行业各方应深刻认识《指南》的战略价值，以切实行动筑牢药品安全防线，共同守护人民群众的生命健康。

第 3 章 NDSRIs 杂质检测及应用案例

近年来，药品中一直有相关亚硝胺杂质的报道。然而，仍有许多含有这些杂质的产品尚未被彻底探索。最近药品退出市场的激增引起了全球监管机构的极大关注。作为回应，美国食品药品监督管理局（U.S.FDA）、欧洲药品管理局（EMA）、世界卫生组织（WHO）等监管机构敦促所有相关利益相关者对这些杂质进行严格的识别和报告，并建议 API 和药品制造商开发高灵敏度的分析方法，特别是能够定量下限（LOQ）水平的亚硝胺的分析检测方法。这对于有效检测和定量原料药、药物合成中间体和药品成品中痕量水平的这些杂质至关重要，最终确保消费者的药品安全。开发这种新颖而灵敏的方法是一项具有挑战性的任务，需要大量的专业知识和研究经验。分析方法开发中的主要挑战可能来自分析物电离不足和基质干扰等问题。特别是药品遗传毒性杂质的检测涉及到 NDSRIs 时，较低的分子量、结构的复杂性以及缺乏现成的标准可能会给实现灵敏检测带来困难。它还需要使用高成本仪器，包括液相色谱串联四极杆质谱（LC-MS/MS）和液相色谱四极杆飞行时间质谱仪（LC-Q-TOF）。

岛津在分析方法开发过程中，结合制药行业目前设备的普适性、仪器灵敏度、杂质限度等因素对多品种分别在 LC-MS/MS、LCMS-Q-TOF 上建立了分析方法，并对分析方法进行了充分的验证。保证了岛津的相关设备对于 NDSRIs 项目良好的适用性。

3.1 液相色谱串联三重四极杆质谱联用分析

液相色谱串联三重四极杆质谱联用分析仪（LC-MS/MS）简称三重四极杆液质联用仪，是一种结合了液相色谱（LC）的物理分离能力和串联质谱（MS/MS）的质谱分析能力的化学分析仪器。它的特点主要包括高灵敏度、高选择性、能够提供结构信息以及广泛的应用领域，是中小极性和非挥发性分析物的优选分析工具。FDA 等权威机构明确推荐采用液相色谱-串联质谱（LC-MS/MS）技术对该类杂质进行分析检测。在 LC-MS/MS 分析过程中，基质干扰是常见且影响检测准确性的关键问题，而在线分流阀的应用为此提供了有效的解决方案。该分流阀能够通过优化样品进入质谱检测器的路径，使质谱检测器规避高浓度样品中基质成分的干扰，从而显著提升检测的精准度与可靠性。

三重四极杆液质联用仪

- 通过全新的加热 ESI 源和碰撞室来实现高灵敏度；
- 快速的正负离子切换和高速度 MRM 来保证数据质量和灵敏度；
- 即便在高速分析时，快速扫描也可获得高质量的质谱图；
- 在保证数据准确和精度的同时，LCMS-8050 可进行 555ch/sec 的高速 MRM。



酒石酸伐尼克兰中N-亚硝基伐尼克兰含量测定

摘要: 本文建立了使用岛津三重四极杆液质联用仪测定戒烟药酒石酸伐尼克兰中基因毒性杂质N-亚硝基伐尼克兰含量。方法学结果表明, N-亚硝基伐尼克兰在0.5~50 ng/mL浓度范围内线性关系良好, 仪器检出限为0.006 ng/mL。0.1 ng/mL标准溶液重复进样6次, 保留时间和峰面积的相对标准偏差(RSD%)分别为0.100%和3.64%。1 ng/mL和10 ng/mL 2个水平浓度的加标回收率测试, 平均回收率为108.13%-112.99%, 相对标准偏差为0.24%-0.58%。该方法满足法规对于灵敏度检测要求, 能快速、有效的分析N-亚硝基伐尼克兰基因毒性杂质的含量。

关键词: 酒石酸伐尼克兰 N-亚硝基伐尼克兰 戒烟药

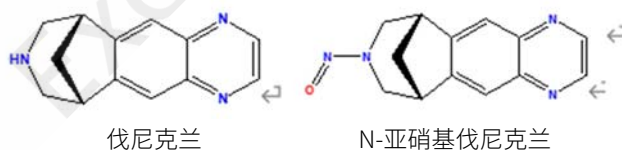
技术特点:

- ❖ 满足 FDA 关于 N-亚硝基伐尼克兰 18.5 ppm (2 mg 每天最大摄入量) 检出要求。
- ❖ 前处理方便简单, 切阀后主成分干扰小。

酒石酸伐尼克兰是一种高选择性的 $\alpha 4\beta 2$ 尼古丁乙酰胆碱受体部分激动剂, 可缓解对尼古丁的戒断症状, 主要用于烟草的依赖性治疗, 是一类新型的戒烟药。2021年7月, 美国食品药品监督管理局 (FDA) 发表声明召回部分批次规格的酒石酸伐尼克兰, 此次召回因为这些批次样品中检出N-亚硝基伐尼克兰基因毒性杂质超过每日最大允许摄入量。随后, FDA发布原料药和制剂中伐尼克兰N-亚硝基LC-ESI-HRMS检出方法。考虑到高分辨质谱的价格成本高和灵敏度相对较差等原因, 开发LC-MS/MS的检测方法。

欧洲药品管理局在亚硝胺杂质检测中推荐N-亚硝基伐尼克兰最大摄入量37 ng, 在酒石酸伐尼克兰最大给药剂量2 mg情况下, N-亚硝基伐尼克兰的限度为18.5 ppm。

本文建立了LC-MS/MS法测定酒石酸伐尼克兰中N-亚硝基伐尼克兰胺基因毒性杂质的含量, 为相关研究提供方法参考。



1. 实验部分

1.1 仪器

岛津三重四极杆液质联用仪 LCMS-8045, 配置信息如下:

系统控制器	: CBM-40	脱气机	: DGU-405
输液泵	: LC-40B X3×2	柱温箱	: CTO-40S
自动进样器	: SIL-40C X3	色谱工作站	: Labsolutions Ver. 5.109

1.2 分析条件

液相色谱条件

色 谱 柱 : Shim-pack Velox C18 (100 mm x 2.1 mm I.D., 1.8 μ m 岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N:227-32007-03)

流 动 相 : A-0.1%甲酸水溶液; B-0.1%甲酸甲醇溶液

进 样 体 积 : 10 μ L 柱 温 : 45 $^{\circ}$ C

流 速 : 0.3 mL/min 洗 针 液 : 甲醇/水=1:1 (v:v)

洗 脱 方 式 : 梯度洗脱, B 相起始浓度为 10%, 时间程序如表 1 所示。

表 1. 梯度洗脱时间程序

时间(min)	单元	处理命令	值
1.00	泵	B Conc	10
3.50	柱温箱	CTO.RVR	1*
7.00	泵	B Conc	100
5.50	柱温箱	CTO.RVR	0*
9.00	泵	B Conc	100
9.10	泵	B Conc	10
12.00	控制器	STOP	

*表示柱温箱柱后切换阀位置, 1 代表进入质谱

质谱条件

离子化模式 : ESI+ 雾化气流速 : 3.0 L/min

接口电压 : 4 kV 干燥气流速 : 10.0 L/min

喷针位置 : +1 mm 加热气流速 : 10.0 L/min

接口温度 : 300 $^{\circ}$ C 碰撞气 : 氦气

D L 温度 : 250 $^{\circ}$ C 扫描模式 : 多反应监测(MRM)

加热模块温度 : 400 $^{\circ}$ C M R M 参 数 : 见表2

表 2. MRM 参数

中文名称	CAS 号	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
N-亚硝基 伐尼克兰	无	241.00	211.10	-28.0	-15	-23
			169.10*	-24.0	-24	-29

*代表定量离子对。

2. 样品前处理

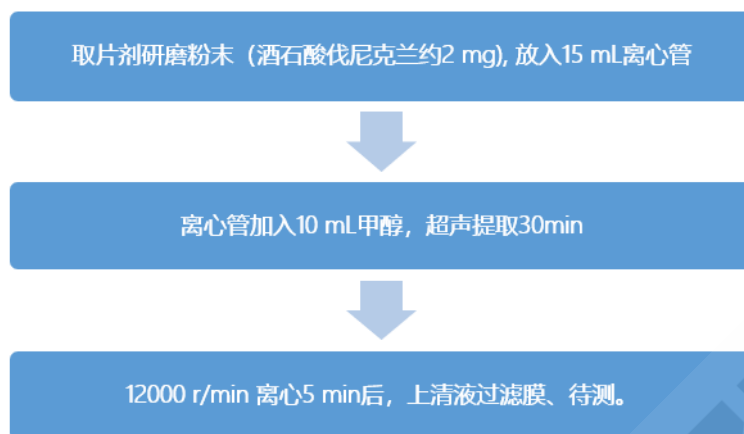


图 1. 样品前处理步骤

3. 结果与讨论

3.1 标准样品谱图

0.1 ng/mL N-亚硝基伐尼克兰目标峰保留时间处，空白溶液未见明显干扰。

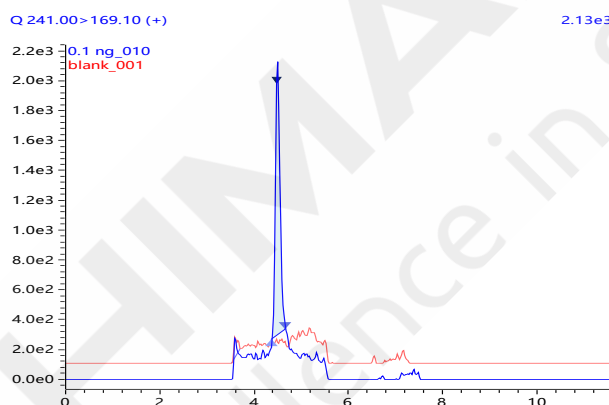


图 2. 空白溶液和 0.1 ng/mL N-亚硝基伐尼克兰溶液 MRM 色谱图

3.2 校准曲线和检出限

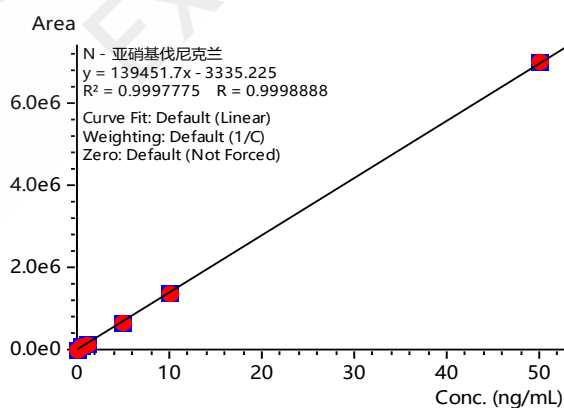


图 3. N-亚硝基伐尼克兰校准曲线(0.1-50 ng/mL)

分别配制0.1、0.5、1、5、10、50 ng/mL的N-亚硝基伐尼克兰标准溶液，取10 μ L进样，以化合物浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，进行线性回归分析，权重设置为1/C，N-亚硝基伐尼克兰在0.1~50 ng/mL浓度范

围内线性良好，相关系数大于0.999。LabSolutions软件采用ASTM的计算方式，以信噪比 S/N=3.3和10.0，分别计算检出限为0.006 ng/mL和定量限0.028 ng/mL。

3.3 重复性实验

取 0.1 ng/mL 标准溶液连续分析 6 次，考察仪器的重复性，测定结果见表 3。保留时间和峰面积 RSD 分别为：0.100%和 3.64%，仪器精密度良好。

表 3. N-亚硝基伐尼克兰的重复性结果 (n=6)

化合物名称	保留时间	峰面积
N-亚硝基伐尼克兰	0.100	3.64

3.4 加标回收率

将基质样品进行1、10 ng/mL浓度加标后，按照上述前处理方法处理后上机，平行3份样品考察回收率和RSD，具体结果如下：N-亚硝基伐尼克兰的平均加标回收率为108.13%-112.99%，RSD为0.24%-0.58%。

表 4. N-亚硝基伐尼克兰回收结果 (n=3)

化合物	样品浓度	加标浓度 (ng/mL)	实测浓度 (ng/mL)	平均回收率 (%)	相对标准偏差 RSD%
N-亚硝基伐尼克兰	N/A	1	1.127	112.99	0.24
			1.132		
			1.130		
		10	10.885	108.13	0.58
			10.769		
			10.784		

4. 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱串联质谱联用仪测基因毒性杂质 N-亚硝基伐尼克兰的方法。该方法满足法规关于该基因毒性杂质检测灵敏度要求，方法学考察中，线性、灵敏度、重复性和加标回收率良好，为戒烟药伐尼克兰的基因毒杂质含量检测研究提供参考。

依那普利中N-亚硝基依那普利含量测定

摘要: 本文建立了一种使用岛津三重四极杆液质联用仪检测依那普利中 N-亚硝基依那普利的方法。N-亚硝基依那普利在 0.1~10 ng/mL 浓度范围内, 其相关系数大于 0.999, 精确度在 97.2~102.0%; 回收率为 93.40~103.50%; 对不同浓度的标准溶液平行 6 次, 其浓度 RSD 为 2.77~4.16%, 仪器精密度良好。与中检院的推荐使用的高分辨质谱方法不同, 本文采用了普适性相对更广的 LC-MS/MS 进行分析, 且进样量更小, 灵敏度更高, 同时采用了切阀的方式减少质谱的污染。该方法可有效应对依那普利中的亚硝胺类基因毒性杂质 N-亚硝基依那普利的检测。

关键词: 依那普利 N-亚硝基依那普利 亚硝胺

技术特点:

- ❖ 应对硝胺类遗传毒性杂质-N-亚硝基依那普利的分析。
- ❖ 采用组校准定量、切阀减少污染等手段, 建立 LC-MS/MS 快速分析方法。

基因毒性杂质是指在很低的浓度下即可诱导基因突变并导致染色体的断裂和重排的杂质, 具有潜在的致癌性”。N-亚硝胺类化合物由于在细胞色素P450酶介导代谢活化后, 生成不稳定的 α -羟甲基-N-亚硝胺, 最终形成的高度亲电物质与DNA反应形成烷基化的DNA碱基对, 从而具有很强的致癌性。ICH M7(R1)指南已将 N-亚硝胺类化合物列入“关注队列”。近年来多个品种的药品中检测出了N-亚硝胺类化合物, 引起了各国药品监管机构的广泛关注, 出台了一系列N-亚硝胺杂质的控制方案。

马来酸依那普利(enalapril maleate)系第二代血管紧张素转换酶抑制剂, 可强烈抑制血管紧张素转换酶, 降低血管紧张素工的含量, 使全身血管舒张, 从而降低血压。临床用于治疗高血压, 具有药理作用平稳, 持续时间长的特点。然而, 近期在依那普利中发现了新的亚硝胺类基因毒性杂质N-亚硝基依那普利, 使得亚硝胺类基因毒性杂质又一次引起大家关注。因此, 本文建立了使用岛津三重四极杆液质联用仪检测依那普利中N-亚硝基依那普利的方法, 供相关检测人员参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津超高效液相色谱仪 LC-40 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为:

系统控制器	: CBM-40	自动进样器	: SIL-40C X3
输液泵	: LC-40B X3	检测器	: SPD-M40
柱温箱	: CTO-40S	质谱仪	: LCMS-8050
色谱工作站	: LabSolutions Ver.5.118		

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：Shim-pack Velox C18 2.1×100 mm; 1.8 μm
 流动相：A-10 mM 乙酸铵溶液（含0.1%甲酸）；B-乙腈（含0.1%甲酸）
 流速：0.35 mL/min 柱温：40°C
 进样体积：1 μL
 洗脱方式：梯度洗脱，B相初始浓度为20%，初始阀位“1”，时间程序见表1。

表 1. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
7.00	柱温箱	Oven Valva 2	0
7.50	Pump	B.Conc	42
9.00	Pump	B.Conc	42
9.00	柱温箱	Oven Valva 2	1
10.00	Pump	B.Conc	95
11.00	Pump	B.Conc	95
11.01	Pump	B.Conc	20
14.00	Control	Stop	

*注：“1”号阀位进废液，“0”号阀位进质谱

质谱条件

离子化模式：ESI+ 接口电压：1.0 kV
 雾化气流速：3.0 L/min 接口温度：300 °C
 加热模块温度：400 °C 干燥气流速：10 L/min
 D L 温度：250 °C 加热气流速：10 L/min
 M R M 参数：见表2 扫描模式：多反应监测(MRM)

表 2. MRM 参数

名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
N-亚硝基依那普利	406.20	234.15*	-20.0	-21.0	-24.0
		116.05	-20.0	-12.0	-10.0
		117.10	-20.0	-43.0	-19.0

*代表定量离子对。

1.3 校准品及样品制备

校准曲线制备：以甲醇为稀释剂，配置浓度约为 100 ng/mL 的亚硝基依那普利对照品储备液，随后用稀释剂将标准品储备液溶液分别配制为 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0 和 10.0 ng/mL 的标准品溶液。

供试品溶液：取马来酸依那普利片 10 片，精密称定，研细，混匀，精密称取细粉适量（约相当于依那普利 1 mg）置离心管中，精密加入甲醇 1 mL，涡旋 5 min，滤过，取续滤液作为供试品溶液。

回收率溶液：取马来酸依那普利片 10 片，精密称定，研细，混匀，精密称取细粉适量（约相当于依那普利 1 mg）置离心管中，精密加入适量对照品储备液和甲醇溶液，涡旋 5 min，滤过，取续滤液作为回收率溶液。

2. 结果与讨论

2.1 MRM 色谱图

亚硝基依那普利定量限浓度 (0.1 ng/mL) MRM 谱图如下所示, 在此液相条件下标准品出现 RT=7.45 min 和 RT=8.28 min 两个色谱峰, 其中以 S/N 较小的峰用于确定定量限, 以两个峰面积之用于定量分析。

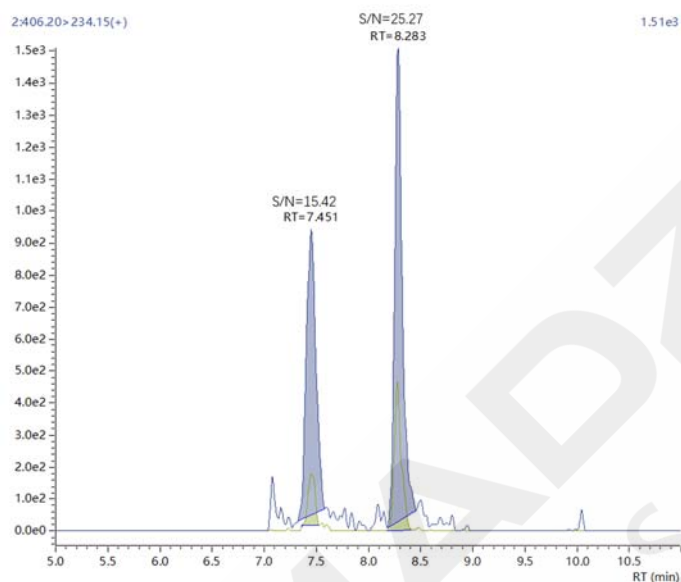


图 1. 亚硝基依那普利定量限浓度点 MRM 色谱图

2.2 校准曲线

按照 1.3 项下配制方法, 配制校准曲线浓度点对应的溶液。以化合物浓度为横坐标, 两色谱峰面积之和为纵坐标, 以组校准的方式进行分析, 亚硝基依那普利在 0.1~10 ng/mL 浓度范围内相关系数大于 0.999, 精确度在 97.2%~102.0%, 曲线结果如下图 2 所示。

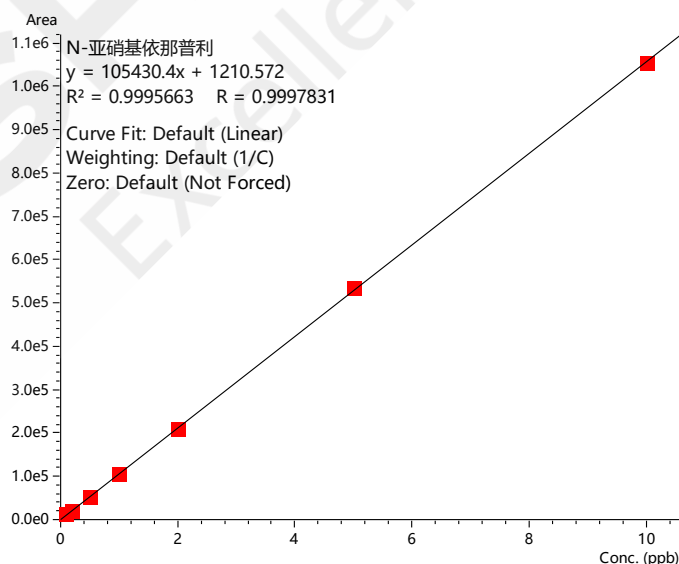


图 2. 校准曲线结果

2.3 准确度测定结果

按 1.3 项下配制回收率溶液, 每个浓度质控品重复制备 3 份, 按 1.2 中的分析条件对质控品进行分析, 质控品的准确度如表 3 所示。

表 3. 回收率分析结果

	理论值 (ng/mL)	测定值 (μg/mL)	回收率 (%)
LQC	0.2	0.21	103.50
		0.21	102.50
		0.19	96.50
MQC	1	1.02	102.40
		0.94	93.90
		0.93	93.40
HQC	5	4.68	93.68
		4.72	94.44
		4.77	95.36

2.4 精密度测定结果

分别取低中高浓度点样品，连续进样 6 针考察精密度，结果如表 4 所示。

表 4. 精密度测定结果

浓度	0.2 ng/mL	1 ng/mL	5 ng/mL
1	0.194	1.051	4.986
2	0.200	0.987	4.930
3	0.208	1.025	5.293
4	0.206	0.979	4.819
5	0.208	0.930	5.303
6	0.200	0.996	4.991
平均值	0.20	0.99	5.05
RSD(%)	2.77	4.16	3.94

2.5 实际样本

按 1.3 项下配制供试品溶液，对两个实际样品进行分析，结果如下所示。

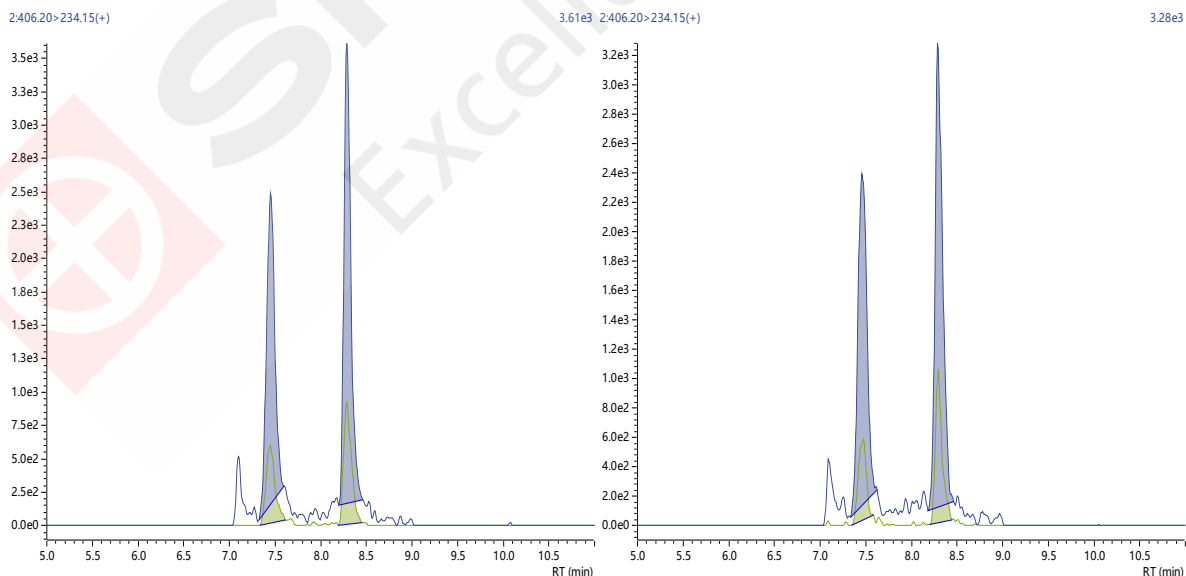


图 3. 实际样品色谱图 (左: 样品 1; 右: 样品 2)

表 5. 实际样品测定结果

序号	浓度 (ng/mL)
样品 1	0.321
样品 2	0.312

3. 结论

本文利用LCMS-8050三重四极杆液质联用仪，建立了对依那普利中N-亚硝基依那普利的测定方法。使用外标法定量分析，由于该方法条件下N-亚硝基依那普利有两个色谱峰，故结合组校准进行分析。N-亚硝基依那普利在0.1~10 ng/mL浓度范围内相关系数大于0.999，精确度在97.2%~102.0%；加标回收实验中，分别考察了3个不同浓度的加标量，回收率为93.40~103.50%；重复性实验中，对不同浓度的标准溶液重复进样6次，RSD为2.77~4.16%，仪器精密度良好。该方法能满足依那普利中N-亚硝基依那普利的检测要求。



SHIMADZU
Excellence in Science

喹那普利中 N-亚硝基喹那普利的含量测定

摘要: 本文使用岛津三重四极杆液质联用仪测定喹那普利中 N-亚硝基喹那普利的含量。在 0.25~100 ng/mL 浓度范围内线性关系良好, 相关系数大于 0.999, 检出限为 0.015 ng/mL, 定量限为 0.045 ng/mL。三个不同浓度 N-亚硝基喹那普利对照溶液分别连续进样 6 针, 保留时间 RSD 在 0.058%~0.091% 范围内, 峰面积 RSD% 在 0.83%~3.74% 范围内。三个浓度水平的加标回收率为 86.28~92.73%。该方法灵敏度高, 重复性好, 能够有效的测定喹那普利中 N-亚硝基喹那普利的含量。

关键词: 喹那普利 N-亚硝基喹那普利 液质联用法

技术特点:

- ❖ 此方法检测 N-亚硝基喹那普利, 灵敏度高, 可至限量的百分之一以下。
- ❖ 采用 Peakintelligence™ 色谱峰智能算法进行色谱峰积分, 便捷准确。
- ❖ 使用 Shim-pack C18-AQ 可以将 N-亚硝基喹那普利的空间异构体分离。

喹那普利是血管紧张素转化酶 (ACE) 抑制剂, 用于治疗高血压病。2022年3月21日, 辉瑞主动召回了 3 款常用的降压药, 其中包括盐酸喹那普利片剂以及两种授权仿制药, 原因为药物中含有 N-亚硝基喹那普利的高于人体每日可接受摄入量水平。

N-亚硝基喹那普利是属于亚硝胺类杂质, 具有致癌潜力, 根据EMA发布的法规说明, 对尚无充分毒性数据的亚硝胺类化合物, 可暂定每日最大摄入量不得过 18ng。依据喹那普利最大服用剂量 40 mg 计算, N-亚硝基喹那普利可接受限度为 0.45 ppm。

本实验使用岛津三重四极杆液质联用仪建立了测定喹那普利中 N-亚硝基喹那普利含量的方法。可为相关从业人员提供参考。

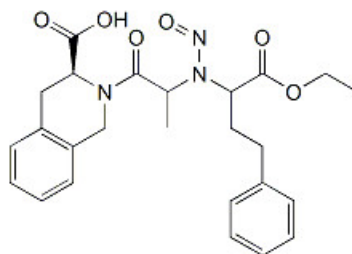


图 1. N-亚硝基喹那普利

1. 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. 5.118
切换阀 : FCV-32AH

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱 : Shim-pack GIST C18-AQ (100 mm×2.1 mm I.D., 1.9 μ m, 岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N:227-30807-02)
捕集柱 : Shim-pack Scepter C18-120 [metal free](50mm×2.1 mm I.D., 1.9 μ m, 岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N:227-31072-01)
流动相 : A-0.1%甲酸水; B-0.1%甲酸乙腈;
进样体积 : 5 μ L 柱温 : 40°C
流速 : 0.3 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 10%, 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
1.00	Pumps	Pump B Conc.	55
5.30	CTO	CTO.RVL	0
6.50	Pumps	Pump B Conc.	60
7.00	Pumps	Pump B Conc.	95
7.50	CTO	CTO.RVL	1
9.00	Pumps	Pump B Conc.	95
9.10	Pumps	Pump B Conc.	10
12.00	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 (+) 雾化气流速 : 3.0 L/min
接口电压 : 4.0 kV 干燥气流速 : 10.0 L/min
接口温度 : 300°C 加热气流速 : 10.0 L/min
加热块温度 : 400°C D L 温度 : 250°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	N-亚硝基喹那普利	-	468.20	234.20*	-17	-21	-11
				178.10	-23	-13	-30
2	喹那普利	85441-61-8	439.20	234.20*	-16	-21	-24
				130.10	-16	-30	-13

*代表定量离子对。

1.3 标准品溶液配制

称取N-亚硝基喹那普利标准品适量配制成100 μg/mL标准储备液。取适量标准储备液，使用甲醇配制成浓度为0.25 ng/mL、0.50 ng/mL、1.00 ng/mL、2.00 ng/mL、5.00 ng/mL、20.00 ng/mL、100 ng/mL的标准系列溶液。

1.4 样品前处理

精密称取适量喹那普利样品50 mg，置入离心管中，加入5 mL甲醇，涡旋使溶解，过滤，作为供试品溶液。

2. 结果与讨论

2.1 N-亚硝基喹那普利标准溶液谱图

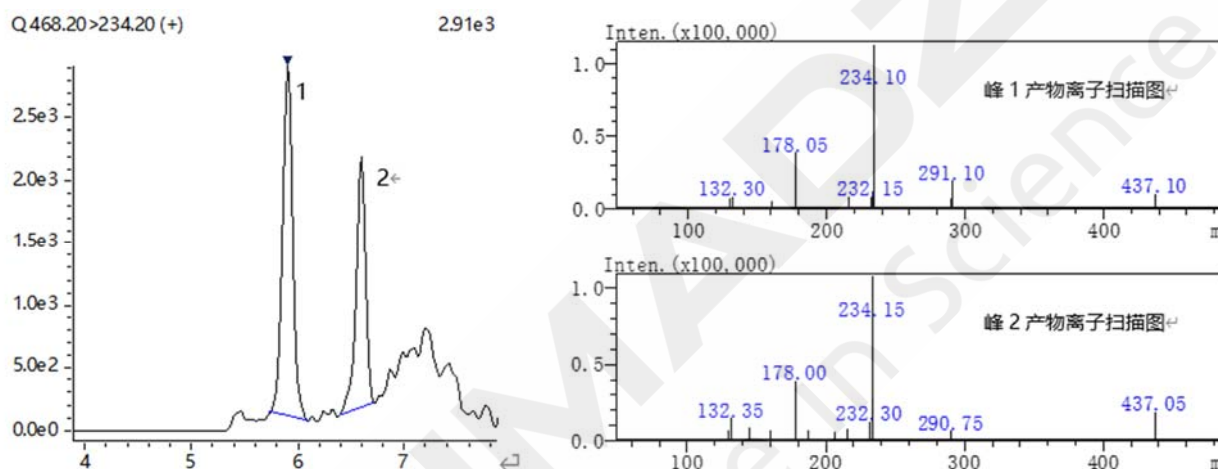


图 2. N-亚硝基喹那普利标准溶液 MRM 色谱图 (0.25 ng/mL) 及产物离子扫描图 (100 ng/mL)

对峰1、峰2进行产物离子扫描，发现二者的碎片离子基本一致，根据N-亚硝基喹那普利空间构型，因此，推断峰1和峰2为空间异构体，均为N-亚硝基喹那普利。

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0.25 ng/mL、0.50 ng/mL、1.00 ng/mL、2.00 ng/mL、5.00 ng/mL、20.00 ng/mL、100 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N-亚硝基喹那普利的浓度为横坐标，以N-亚硝基喹那普利两个异构体峰面积之和为纵坐标，绘制校准曲线，如图3所示。N-亚硝基喹那普利在校准曲线浓度范围内线性关系良好，相关系数r大于0.999，各校准点准确度在91.70%-107.70%之间。根据N-亚硝基喹那普利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.N-亚硝基喹那普利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)
N-亚硝基喹那普利	$Y = (107608)X + 2351.45$	0.9999	91.70%-107.70%	0.015	0.045

2.3 重复性实验

取校准曲线低中高，三个不同浓度点对照溶液，连续进样6次，考察仪器的精密度，保留时间RSD在0.058%~0.091%范围内，峰面积RSD%在0.83%~3.74%范围内。具体结果见表4，仪器精密度良好。

表 4. 精密度结果 (n=6)

化合物名称	0.25 µg/mL		5 µg/mL		20 µg/mL	
	保留时间 RSD (%)	峰面积 RSD (%)	保留时间 RSD (%)	峰面积 RSD (%)	保留时间 RSD (%)	峰面积 RSD (%)
N-亚硝基喹那普利 1	0.091	3.74	0.080	1.78	0.061	0.83
N-亚硝基喹那普利 2	0.090	3.05	0.076	1.38	0.058	0.92

2.4 实际样品测定及准确度测定

按照以上建立的方法对喹那普利原料药进行测定，该样品中 N-亚硝基喹那普利的含量为 3.612 mg/kg。其色谱图如图 3 所示。

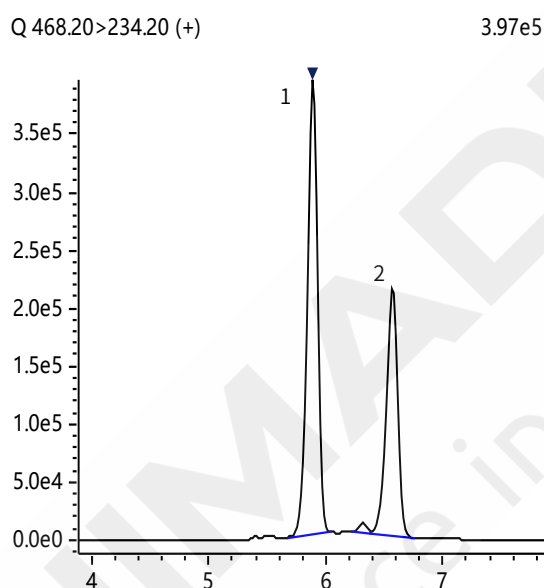


图 3. 样品中 N-亚硝基喹那普利 MRM 色谱图

根据喹那普利原料药中 N-亚硝基喹那普利的含量，分别向喹那普利加入含量为 2.5 mg/kg、4 mg/kg、4.5 mg/mL 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 86.28~92.73% 范围内，RSD 结果如表 5 所示。

表 5. 不同浓度水平 N-亚硝基喹那普利回收率结果 (n=3)

样品含量 mg/kg	加标后含量 mg/kg	加标量 mg/kg	回收率%	RSD%
3.612	5.836	2.5	86.38	1.30
	7.380	4.0	92.57	1.65
	7.850	4.5	92.73	1.37

2.5 Peakintelligence™ 色谱峰智能算法积分

本实验色谱图积分处理使用的是 Peakintelligence™ 色谱峰智能算法，在进行数据过程中，仅需要在质谱处理软件 Labsolutions Insight 打开 LC-MS/MS 采集的数据，在积分功能选择 “Peakintelligence_Ver2” 及模型 “LCMS_Model_V1”，无需设置任何积分参数，即可自动、快速、准确完成目标物色谱峰的积分。

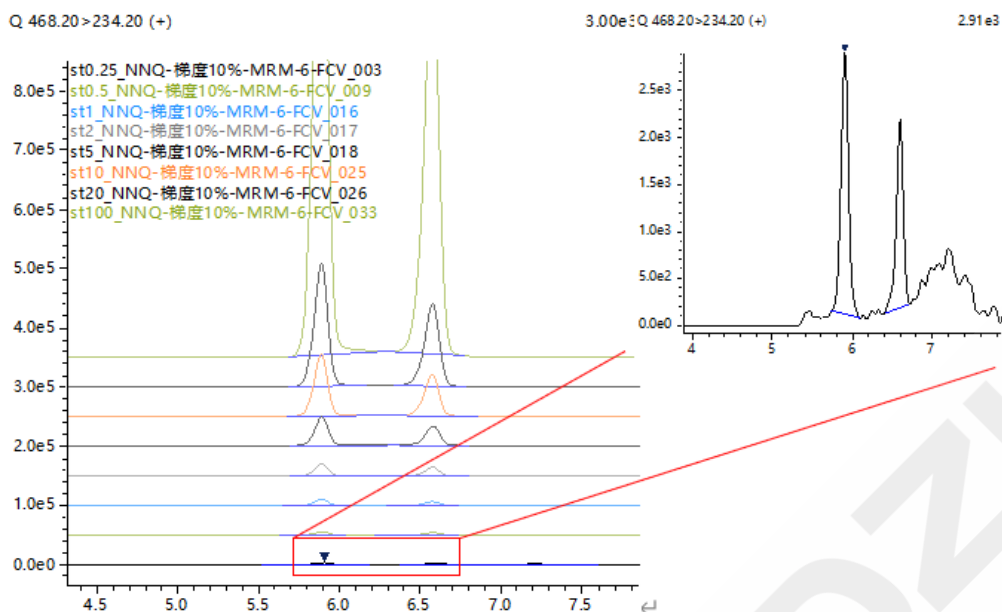


图 4.不同浓度的 N-亚硝基喹那普利 MRM 叠加色谱图

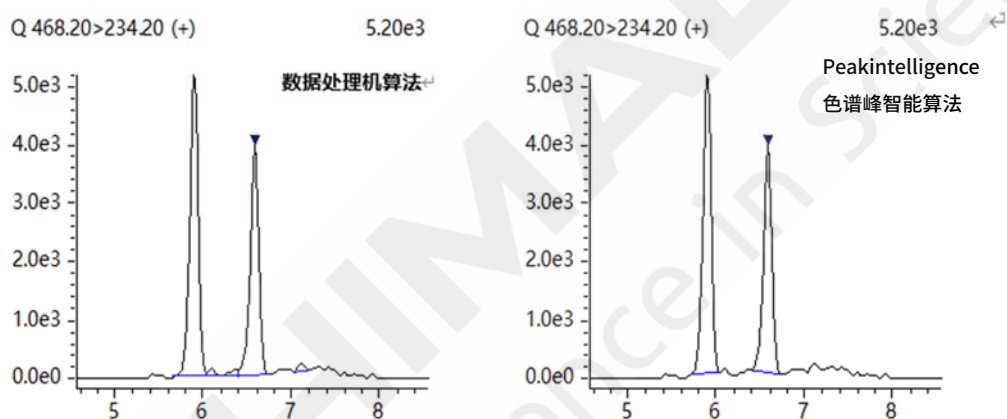


图 5. 不同积分算法的色谱图比对

本实验中由于色谱峰附近杂峰较多，对于N-亚硝基喹那普利的校准曲线范围是从0.25 ng/mL到100 ng/mL，线性范围比较宽，标样浓度从小到大均可以快速精准进行积分，校准曲线的相关系数大于0.999，色谱图如图4所示。同一浓度的色谱图使用Peakintelligence™色谱峰智能算法进行积分时，积分的起落点更为合理。使用不同积分算法的色谱图比对见图5。

3. 结论

本文使用岛津三重四极杆液质联用仪建立了测定喹那普利中 N-亚硝基喹那普利的的方法。结果显示：对 N-亚硝基喹那普利对照品溶液进行重复性测试，三个不同浓度 N-亚硝基喹那普利的保留时间及峰面积的 RSD 均小于 0.091%和 3.74%；以组校准方式进行外标法定量，其结果显示校准曲线相关系数大于 0.999。使用喹那普利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 86.28~92.73%之间，实验结果表明，该方法前处理简单，专属性强，能够满足 N-亚硝基喹那普利的含量测定需要，可为相关从业人员提供参考。

布美他尼中 N-亚硝基布美他尼的含量测定

摘要: 本文使用岛津三重四极杆液质联用仪建立了一种测定布美他尼原料药中亚硝基布美他尼含量的方法。目标物在线性浓度范围内具有良好的线性关系, 线性相关系数 >0.998 , 检出限 0.058 ng/mL , 定量限 0.175 ng/mL 。取三个不同浓度的标准液按分析条件分别连续进样 7 次, 保留时间和峰面积的 RSD 分别在 $0.008\sim 0.069\%$ 和 $2.386\sim 5.396\%$ 之间, 仪器精密度良好。样品加标回收率在 $97.00\sim 103.24\%$ 之间, 方法准确度良好。经过多条件耐用性考察, 保留时间和峰面积 RSD 分别在 $0.057\sim 0.172\%$ 和 $0.933\sim 7.162\%$ 之间, 符合 USP 要求。岛津全新 LCMS-8045RX 系统性能良好, 该分析方法满足标准要求, 可用于实际样品的检测。

关键词: 三重四极杆串联质谱 LC-MS/MS 布美他尼 N-亚硝基布美他尼

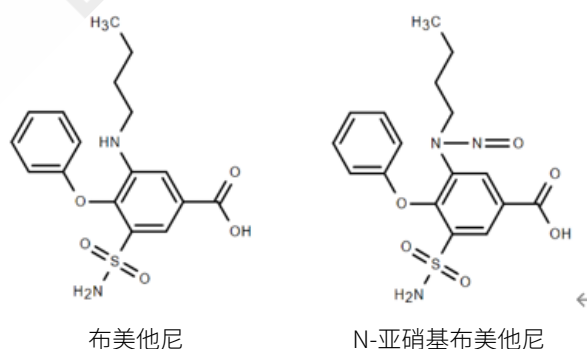
技术特点:

- ❖ 8 min 即可完成样品的准确定量, 较 USP 方法检测效率更高;
- ❖ 线性最低浓度为 0.2 ng/mL , 低于 USP 研究方案的 1 ng/mL , 灵敏度更高;
- ❖ 使用全新 RX 系列 LC-MS/MS 检测, 化合物响应对喷针水平位置敏感度有所降低, 稳定性有所提升, 在灵敏度和稳健性之间取得了平衡。

布美他尼是间氨基苯磺酰胺的衍生物, 属强效利尿药。广泛用于治疗心力衰竭、肝病、肾脏病水肿。主要用于各种顽固性水肿及急性肺水肿。对急慢性肾功能衰竭病人尤为适宜。

因其结构中含有二级胺结构, 为亚硝胺的形成提供了氨基单元。在生产过程中会产生所谓的 NDSRIs (药物物质亚硝胺杂质) 及 N-亚硝基布美他尼。此类杂质具有致癌性或致突变性风险, 且已经引发多个药物的召回。USP 在其 N-亚硝基布美他尼杂质的研究指引中使用高分辨质谱对其进行了定量, 方法检测限 (LOD) $=0.5\text{ ppm}$ 。定量限 (LOQ) $=1.0\text{ ppm}$ 。

本文利用岛津全新 LCMS-8045RX 三重四极杆液质联用仪, 建立了原料药中的 N-亚硝基布美他尼的检测方法。经过方法学验证, 结果表明该分析方法可准确、快速测定原料药中 N-亚硝基布美他尼量, 可供相关检测人员参考。



1. 实验部分

1.1 仪器

输液泵	: LC-40B×2	系统控制器	: CBM-40
脱气机	: DGU-403	质谱仪	: LCMS-8045RX 三重四极杆质谱
自动进样器	: SIL-40C	色谱工作站	: Labsolutions Ver. 5.128
柱温箱	: CTO-40S		

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱	: Shim-pack Velox SP-C18 (100 mm x 2.1 mm I.D., 1.8 μm)		
	岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N: 227-32001-03		
流动相	: A相- 0.1%甲酸水溶液; B相-甲醇		
流速	: 0.4 mL/min	进样体积	: 2 μL
柱温	: 40°C	洗脱方式	: 梯度洗脱, 初始 20%B, FCV 初始状态为 0

表 1. 时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.50	Pumps	Pump B Conc.	20
3.00	Oven	OvenValve	1
4.35	Oven	OvenValve	0
5.00	Pumps	Pump B Conc.	95
6.00	Pumps	Pump B Conc.	95
6.01	Pumps	Pump B Conc.	20
8.00	Controller	Stop	

其中: OvenValve 的 1 代表接入质谱端; OvenValve 的 0 代表废液端

质谱条件

离子源	: ESI (+)	D L 温度	: 250°C
接口电压	: 4 kV	加热块温度	: 450°C
雾化气	: 氮气 3.0 L/min	接口温度	: 350°C
Qarray RF	: 使用调谐文件	聚焦电压	: 2KV
干燥气	: 氮气 3.0 L/min	扫描模式	: MRM
加热气	: 空气 18.0 L/min	MRM 参数	: 见表 2
碰撞气	: 氩气	扫描方式	: 正离子扫描 (ESI+)

表 2. MRM 优化参数

序号	中文名	CAS 号	监测离子对	Q1 Pre (V)	CE	Q3 Pre (V)
1	N-亚硝基布美他尼	2490432-02-3	394.00>364.20*	-20.0	-12.0	-27.0
			394.00>321.10	-11.0	-16.0	-22.0
			394.00>240.10	-11.0	-24.0	-25.0
2	布美他尼	28395-03-1	364.90>240.20*	-18.0	-16.0	-26.0
			364.90>284.20	-18.0	-14.0	-20.0
			364.90>348.10	-18.0	-14.0	-25.0

注: *表示定量离子

1.3 主要标准品与耗材

标准品及标准品溶液：购于重庆塞姆，于 4°C 冰箱保存，备用；

0.22 μm 聚醚砜滤头：购于津腾。

1.4 校准曲线的制备

精密取各标准品适量，分别用甲醇配置并稀释成浓度为 1 μg/mL 的标准工作液，现用现配。

精密量取 1 μg/mL 标准工作液，用甲醇稀释成浓度为 0.2、0.5、1、5、10、50、100 ng/mL 七个浓度的系列标准溶液，现用现配。

1.5 样品前处理

称取原料药用甲醇溶解并配置成 1 mg/mL 样品溶液，过 0.22 μm 滤头后上机检测。

2. 结果与讨论

2.1 方法优化

以 100 ng/mL 标准品浓度，进样量 1 μL 的色谱图峰高为指标，分别对质谱不同条件进行了单因素优化。优化参数包括：(1) DL 管、接口、加热块温度；(2) 雾化气、加热气、干燥气的流速；(3) 聚焦的电压。优化结果见图 1：

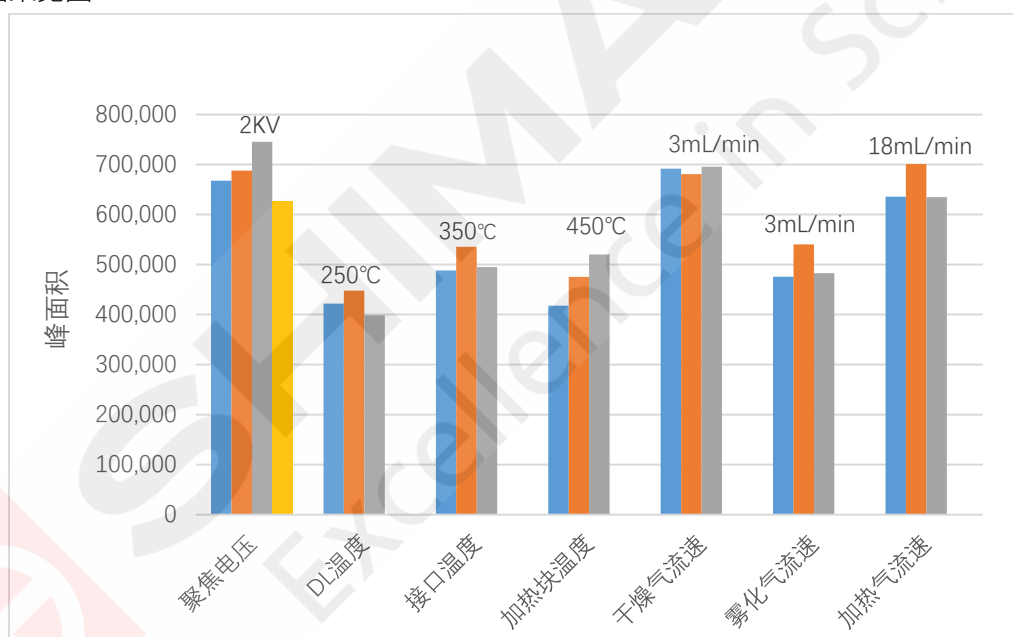


图 1. 质谱参数优化

2.2 专属性与灵敏度

布美他尼样品在色谱条件下，保留时间为 4.48 min。目标杂质 N-亚硝基布美他尼保留时间为 4.21min 左右，方法中设置 4.35min 后切阀进质谱，可避免高浓度布美他尼主成分对质谱系统的污染，保留情况见图 2、切阀结果如图 3 所示。杂质与主成分分离良好，高浓度主成分进样后经切换阀被完全导入废液，保证了质谱检测器不被污染。

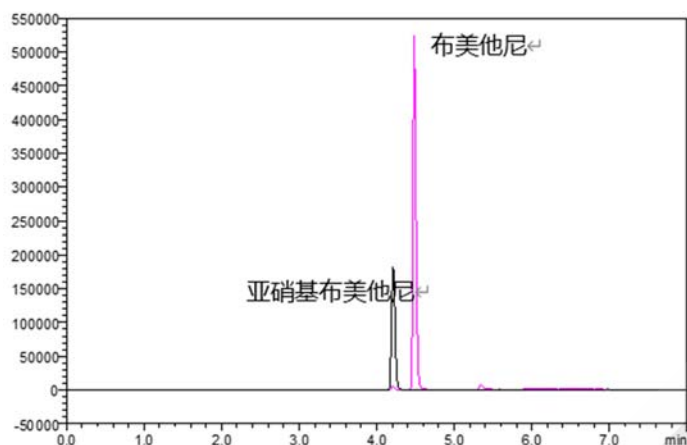


图 2. 原料药与杂质 TIC 色谱图 (100ng/mL)

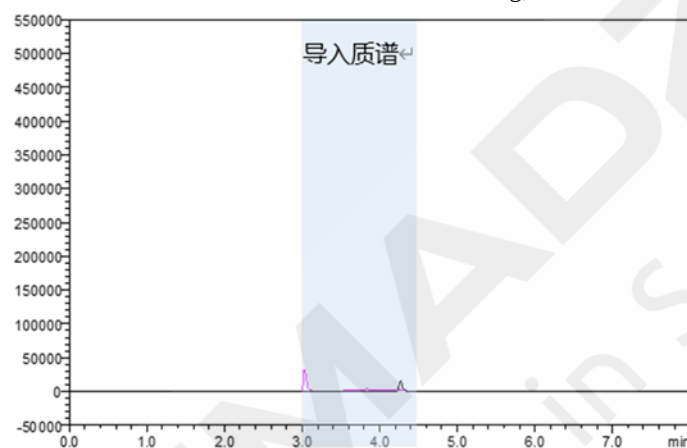


图 3. 实际样品切阀后 TIC 色谱图 (主药浓度 1 mg/mL)

按照 1.2 中的仪器条件进行测定, 标准样品的 MRM 色谱图如图 4 所示, 目标物保留时间处, 空白溶剂无干扰。

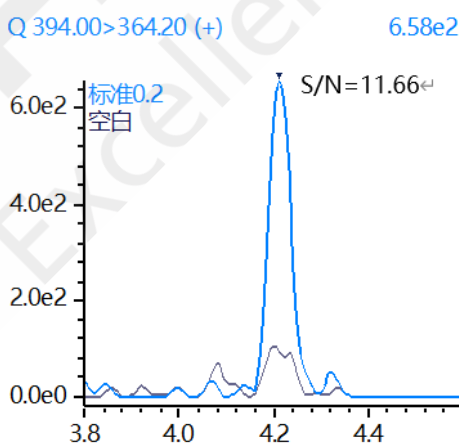


图 4. N-亚硝基布美他尼 (0.2 ng/mL)标准品与空白溶剂 MRM 色谱图

2.3 线性

将不同浓度的混合标准工作液, 按相同条件进行测定, 以浓度 (C) 为横坐标, 峰面积(A)为纵坐标, 权重 $1/C$ 。采用外标法建立校准曲线, 结果如图 5 所示。目标化合物上机浓度范围内具有较好的线性关系, 线性相关系数 >0.998 , 具体结果见表 3。

采用 LabSolutions 软件, 按照 USP<621>要求的信噪比计算方式, 以信噪比 $S/N=3.3$ 和 10.0 , 分别计

算检出限和定量限。

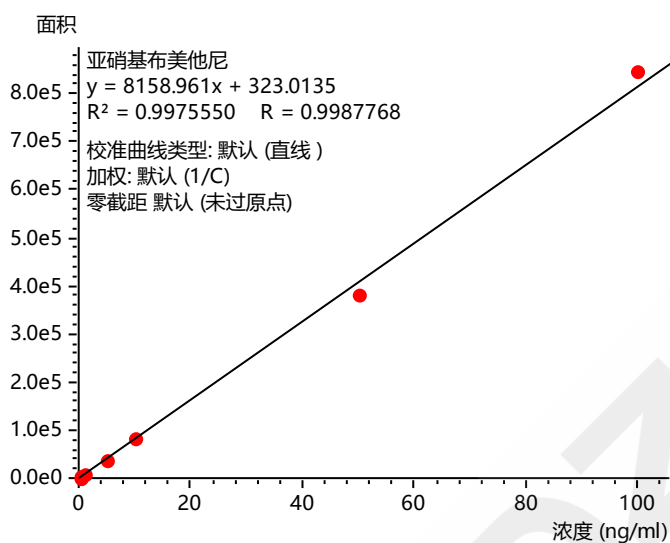


图 5.目标物的校准曲线

表 3. 校准曲线参数

化合物	校准曲线	线性范围 (ng/mL)	相关系数 r	精确度 (%)	检出限 (ng/mL)	定量限 (ng/mL)
N-亚硝基布美他尼	$y = 8158.961x + 323.0135$	0.2-100	0.9988	91.2-105.3	0.058	0.175

2.4 精密度实验

取 1 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL 浓度的标准液按分析条件分别连续进样 7 次，用于考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的重复性结果如表 4 所示。结果显示，保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.008~0.069%和 2.386~5.396%之间，仪器精密度良好。

表 4. 保留时间和峰面积重复性结果 (n=7)

化合物	1 ng/mL (RSD%)		10 ng/mL (RSD%)		50 ng/mL (RSD%)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
N-亚硝基布美他尼	0.008	5.396	0.008	2.680	0.069	2.386

2.5 样品检测与加标回收率实验

取原料药样品 2 份，按 1.5 的方法过滤后检测，目标化合物均有检出。后对样品进行加标回收实验。添加浓度为：1 ng/mL、5 ng/mL，每个浓度平行处理 3 份，经处理后进样检测并计算回收率，结果见表 5。

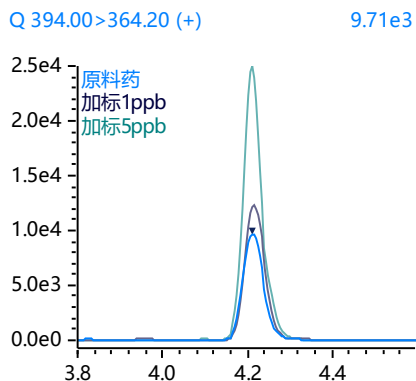


图 6. 原料药及加标色谱图

表 5. 回收率结果 (n=3)

编号	样品液含量 (ng/mL)	平均值 (ng/mL)	加标水平 (ng/mL)	回收率%	平均 回收率%	RSD%
1	4.01	3.94	1	97.00	98.49	2.522
				97.11		
				101.36		
2	3.87	3.94	5	103.24	101.85	1.934
				102.71		
				99.59		

2.6 方法耐用性考察

分别对分析条件：接口温度、聚焦电压、DL 温度、加热块温度、柱温、以及 A 泵甲酸水浓度进行耐用性考察。以 50 ng/mL 的标准溶液的 6 针保留时间和峰面积的 RSD 为指标。结果见表 6。

表 6. 样品检测及回收率结果 (n=6)

序号	条件	参数	RSD%	
			R.T.	Area
1	聚焦电压	1 KV	0.070	4.421
		3 KV	0.091	7.162
2	DL 管温度	220°C	0.057	2.803
		280°C	0.072	0.934
3	加热块温度	420°C	0.174	2.163
		480°C	0.076	1.512
4	接口温度	320°C	0.057	2.521
		380°C	0.059	5.290
5	A 泵甲酸浓度	0.08%	0.132	1.882
		0.12%	0.148	3.313
6	柱温	38°C	0.062	2.174
		42°C	0.129	2.651

根据 USP 在其 N-亚硝基布美他尼杂质的研究指引，系统适用性考察的峰面积 RSD 不得超过 10%。以上方法学耐用性结果符合系统适用性要求。

2.7 喷针位置考察

为了考察 RX 系列仪器相对于传统 ESI 源在稳定性上的差异，在不同水平位置进行了相对响应值的比较。结果见图 7:

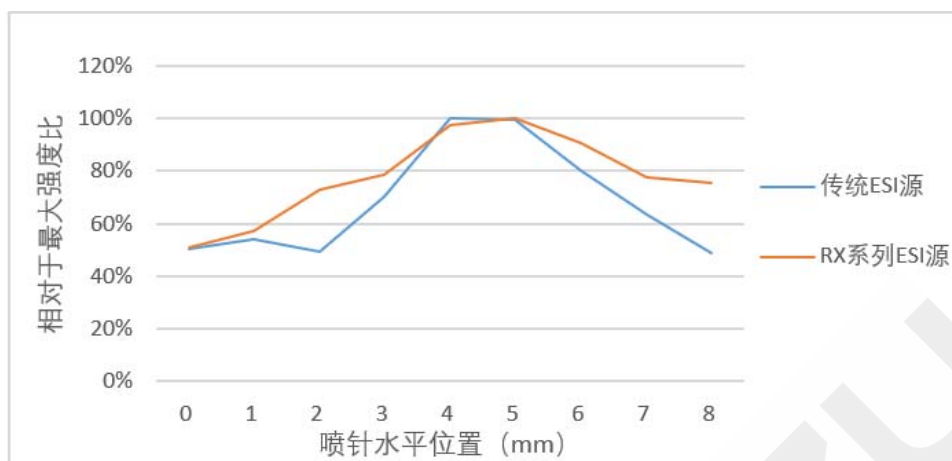


图 7. 喷针水平位置与相对响应值比较

以上实验显示，对于 N-亚硝基布美他尼来说，喷针水平位置在 4-5 mm 时质谱响应强度最佳，距离进一步远离响应略有降低。提示在保证必要响应强度前提下，较远的距离可有助于降低质谱污染和提高系统稳定性。当然方法考察时需要综合包括喷针位置在内的多个参数因素一同考虑。同时，结果也说明在全新 RX 系列 ESI 源上，化合物响应对喷针水平位置敏感度有所降低，稳定性有所提升，在灵敏度和稳健性之间取得了平衡。

3. 结论

本文使用岛津新推出的三重四极杆液质联用系统 LCMS-8045RX 建立了一种测定布美他尼原料药中药物基质亚硝胺杂质——N-亚硝基布美他尼含量的方法。此分析方法较 USP 研究方案检测效率和灵敏度都更高。在方法学考察中，该方法的线性、重复性、加标回收率以及耐用性均满足检测需求，可用于实际样品的检测。

普萘洛尔中 N-亚硝基普萘洛尔的含量测定

摘要： 本文建立了使用岛津三重四极杆液质联用仪测定普萘洛尔中亚硝胺药物成分相关杂质 N-亚硝基普萘洛尔。该方法在 13 min 内完成测试。方法学结果表明，N-亚硝基普萘洛尔物质在 0.5~20 ng/mL 浓度范围内线性关系良好，仪器检出限为 0.08 ng/mL。1 ng/mL 标准溶液重复进样 6 次，保留时间和峰面积的相对标准偏差(RSD%)分别为 0.12 %和 2.10%之间。1 ng/mL 浓度的加标回收率测试，平均回收率为 108.52%，相对标准偏差为 1.07%。该方法满足检测要求，能快速、有效的分析普萘洛尔中 N-亚硝基普萘洛尔杂质的含量。

关键词： N-亚硝基普萘洛尔 三重四极杆液质联用仪 普萘洛尔 基因毒性杂质

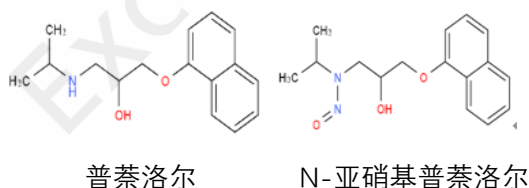
技术特点：

- ❖ 建立一种亚硝胺药物成分相关杂质的定量方法，仪器检出限可达0.08 ng/mL。
- ❖ 通过柱后切阀程序的设置，可将主成分切除，避免定量检测中干扰和仪器污染。

ICH M7 基因毒指导原则中，亚硝胺被归为重点关注物质。近两年药品监管机构监管基因毒性杂质重点转向了由药物本身相关的亚硝胺杂质上，这些亚硝胺杂质的形成和药物活性成分密切相关，即被称为亚硝胺药物成分相关杂质（Nitrosamine Drug Substance-Related Impurities, NDSRIs）。

近期因国外某普萘洛尔中的N-亚硝基普萘洛尔基因毒性杂质因亚硝胺水平超标而被召回事件，再次得到各个国家的重视。NDSRIs亚硝胺杂质通常没有明确确定的允许摄入量（Allowed Intake, AI），FDA基于每日最大日剂量，亚硝胺杂质总量应控制在26.5 ng/天（最强效亚硝胺的AI）。

本文建立了 LC-MS/MS 法测定普萘洛尔中的 NDSRI 杂质 N-亚硝基普萘洛尔，为相关基因毒性杂质的检测提供参考。



1. 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津超高效液相色谱仪LC-40与LCMS-8045联用系统，具体配置为：

系统控制器：	CBM-40	脱气机：	DGU-405
输液泵：	LC-40DXR	自动进样器：	SIL-40CXR
柱温箱：	CTO-40C	质谱检测器：	LCMS-8045

色谱工作站: LabSolutions Ver. 5.118

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱: Shim-pack GIST C18 (150 mm x 2.1 mm I.D., 2 μ m, 岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N:227-30093-05)

流动相: A相-0.1%甲酸水溶液; B相-0.1%甲酸乙腈

洗脱方式: 梯度洗脱, B相初始浓度为 50%, 洗脱程序见表 1

流速: 0.5 mL/min 进样量: 10 μ L

柱温: 50°C R0 清洗液: 50%甲醇 (含 0.3%甲酸)

表 1. 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
5.00	柱温箱	CTO.RVR	1*
5.00	泵	B.Conc	50
7.00	泵	B.Conc	70
9.00	柱温箱	CTO.RVR	0
9.00	泵	B.Conc	70
9.10	泵	B.Conc	50
13.00	Controller	Stop	

*表示柱温箱柱后切换阀位置, 1 代表进入质谱

质谱条件

离子化模式: ESI+ 接口温度: 300°C
接口电压: 4.0 kV 雾化气: 氮气 3.0 L/min
干燥气: 氮气 10.0 L/min 碰撞气: 氩气
DL 温度: 250°C 加热模块温度: 400°C
扫描模式: 多反应监测 (MRM) 驻留时间: 30 ms
延迟时间: 3 ms MRM 参数: 见表 2

表 2. 化合物信息及 MRM 优化参数

No.	化合物	英文名称	CAS#	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
1	N-亚硝基普萘洛尔	N-Nitrosopropranolol	84418-35-9	289.30	72.20*	-11	-14	-28
					145.20	-11	-8	-15
2	普萘洛尔	Propranolol	525-66-6	260.20	116.00	-15	-35	-15

注: *表示定量离子

1.3 标准品的配制

准确称取 N-亚硝基普萘洛尔标准品 10 mg 于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇溶液溶解, 得到 1 mg/mL 标准储备溶液。准确移取 100 μ L 各单标储备液于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇定容, 得到浓度为 10 μ g/mL 的标准中间液。

校准曲线配制：以 50% 甲醇溶液为溶剂，将标准中间液逐级稀释至浓度为 0.5、1、2、5、10、20 ng/mL 的标准点，上机分析。

1.4 样品前处理方法

将 10 mg 规格普萘洛尔片剂样品 4 片，研磨粉碎，用甲醇 5 mL 溶解，摇匀，静置 10 min 后，取适量于塑料离心管中，于 12000 r/min 离心 5 min 后，上清液过 0.22 μm 滤膜后上机。

2. 结果与讨论

2.1 普萘洛尔主成分和杂质分离考察

普萘洛尔样品在色谱条件下，出峰时间在 1.432 min, 4 min 后主成分可完全洗脱出。N-亚硝基普萘洛尔出峰时间为 6.888 min, 方法中设置 5.0 min 后切阀进质谱，可避免普萘洛尔主成分对目标基因毒性杂质分析检测的影响，如下图 1 所示。

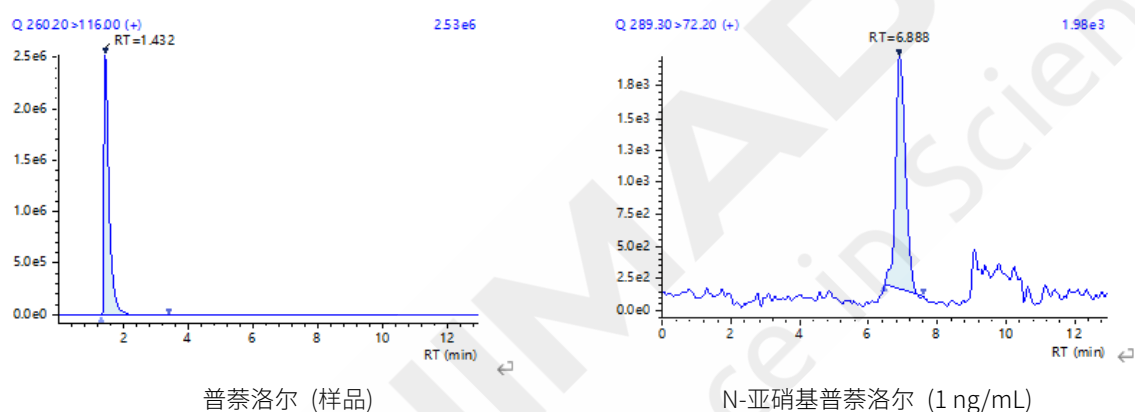


图 1. 普萘洛尔主成分和 N-亚硝基普萘洛尔色谱图

2.2 专属性

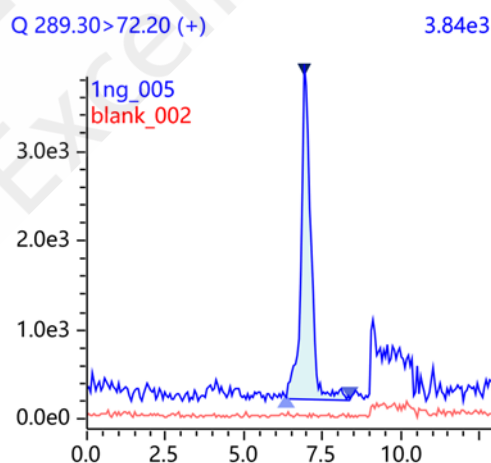


图 2. 溶剂空白和 1 ng/mL N-亚硝基普萘洛尔标准溶液 MRM 重叠色谱图

溶剂空白与标准溶液 MRM 重叠谱图显示，目标峰处，未见明显干扰，专属性良好。

2.3 线性范围

按照 1.3 项下配制方法配制校准曲线溶液。以化合物浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，进行线性回归分析，N-亚硝基普萘洛尔在 0.5~20 ng/mL 浓度范围内线性良好，相关系数大于 0.999。LabSolutions 软件采用 ASTM 的计算方式，以信噪比 S/N=3.3 和 10.0，分别计算定量限和检出限，定量限为 0.26 ng/mL，检出限为 0.08 ng/mL。

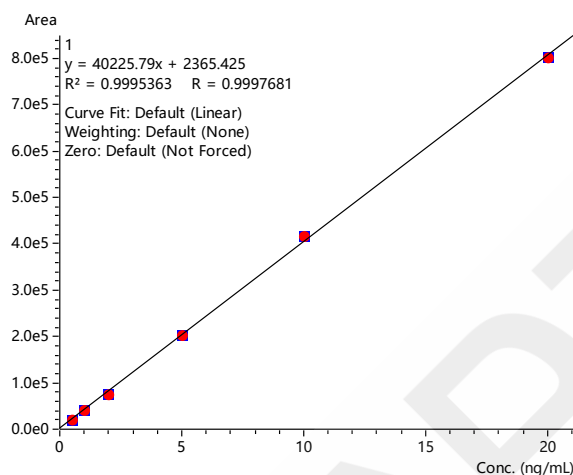


图 3. N-亚硝基普萘洛尔校准曲线

2.4 精密度实验

对 1.0 ng/mL 标准溶液连续分析 6 次，计算重复性。结果见表 3。N-亚硝基普萘洛尔的保留时间 RSD 为 0.12%，峰面积 RSD 为 2.10%，重复性良好。

表 3. N-亚硝基普萘洛尔重复性结果 (RSD%, n=6)

化合物名称	保留时间	峰面积
N-亚硝基普萘洛尔	0.12	2.10

2.5 加标回收率

取某品牌普萘洛尔 10 mg 规格片剂，按照 1.4 前处理方式进行处理，样品中未检出 N-亚硝基普萘洛尔物质。

表 4. N-亚硝基普萘洛尔回收率结果 (n=3)

化合物	样品浓度 (ng/mL)	添加浓度 (ng/mL)	实测浓度 (ng/mL)	平均回收率 (%)	相对标准偏差 RSD%
N-亚硝基普萘洛尔	N.D.	1.0	1.091	108.52	1.07
			1.093		
			1.072		

注：N.D. 表示未检出。

向样品中添加浓度为 1 ng/mL 的标准溶液，每个水平重复 3 次，进行加标回收率和精密度试验。表 4 为实验结果，N-亚硝基普萘洛尔的平均回收率为 108.52%，相对标准偏差为 1.07%。

3. 结论

本文建立了一种使用岛津三重四极杆液质联用仪测定普萘洛尔中 NDSRI 杂质 N-亚硝基普萘洛尔含量的方法。该方法可将 N-亚硝基普萘洛尔同主成分完全分离开，在 13 min 内完成测试。方法学考察中，线性、灵敏度、精密度和加标回收率均满足检测需求，可适用于普萘洛尔中基因毒性杂质 N-亚硝基普萘洛尔的检测。



氯丙嗪片中 N-亚硝基-去甲基氯丙嗪的含量测定

摘要：本文使用岛津三重四极杆液质联用仪建立了一种测定氯丙嗪剂中 N-亚硝基-去甲基氯丙嗪含量的方法。目标物在线性浓度范围内具有良好的线性关系，线性相关系数 >0.999 ，检出限 0.016 ng/mL ，定量限 0.048 ng/mL 。取两个不同浓度的标准液按分析条件分别连续进样 6 次，保留时间和峰面积的 RSD 分别在 $0.096\sim 0.103\%$ 和 $4.462\sim 5.756\%$ 之间，仪器精密度良好。样品加标回收率在 $80.23\sim 94.07\%$ 之间，方法准确度良好。经过多条件耐用性考察，保留时间和峰面积 RSD 分别在 $0.008\sim 0.089\%$ 和 $2.188\sim 5.071\%$ 之间，符合 FDA 要求。该分析方法满足标准要求，可用于实际样品的检测。

关键词：三重四极杆串联质谱 LC-MS/MS 氯丙嗪 N-亚硝基-去甲基氯丙嗪

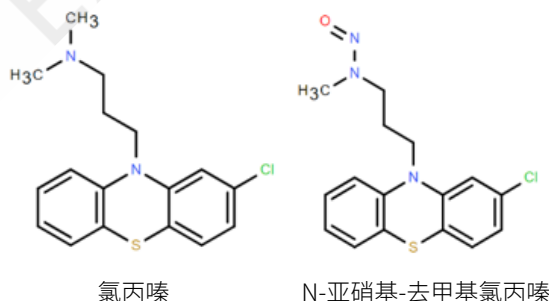
技术特点：

- ❖ 5.5 min 即可完成样品的准确定量，效率高；
- ❖ 线性最低浓度为 0.1 ng/mL ，满足检测低限值杂质对仪器高灵敏度的要求。

氯丙嗪作为一种吩噻嗪类药物，其药理作用包括多巴胺受体拮抗作用、组胺受体拮抗作用和抗胆碱作用。临床上通常以盐酸氯丙嗪的形式广泛应用于治疗精神病的治疗、镇吐、低温麻醉及人工冬眠等领域。

因其结构中含有三级胺结构，为亚硝胺的形成提供了氨基单元。在生产过程中会产生所谓的 NDSRIs (药物基质亚硝胺杂质)：N-亚硝基-去甲基氯丙嗪。NDSRIs 类杂质具有致癌性或致突变性风险，已经引发多个药物的召回。FDA 在 2024 年 9 月发布的关于控制人用药物中亚硝胺杂质(NDSRIs)推荐 AI 限值，其中 N-亚硝基-去甲基氯丙嗪被划归为风险最大的 I 类，AI 值为 26.5 ng/天 。按照最大日服用量 600 mg 计算，每片 (25 mg) 杂质含量不得超过 1.1 ng 。

本文利用岛津 LCMS-8050 三重四极杆液质联用仪，建立了氯丙嗪制剂中的 N-亚硝基-去甲基氯丙嗪的检测方法。经过方法学验证，结果表明该分析方法可准确、快速测定氯丙嗪制剂中 N-亚硝基-去甲基氯丙嗪含量，可供相关检测人员参考。



1.3 主要标准品与耗材

标准品及标准品溶液：购于重庆塞姆，于 4℃冰箱保存，备用；

0.22 μm 尼龙滤头：购于津腾。

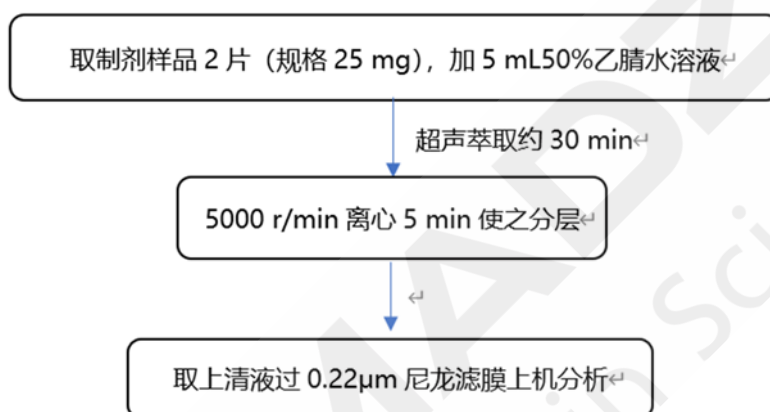
1.4 校准曲线的制备

精密取各标准品适量，分别用甲醇配置并稀释成浓度为 1 μg/mL 的标准工作液，现用现配。

精密量取 1 μg/mL 标准工作液，用乙腈稀释成浓度为 0.1、0.2、0.5、1、5、10、20、50、80 ng/mL 九个浓度的系列标准溶液，现用现配。

1.5 样品前处理

取氯丙嗪片剂样品按照以下步骤处理后进样：



2. 结果与讨论

2.1 方法优化

以 50 ng/mL 标准品浓度, 进样量 1 μL 的色谱图峰高为指标, 分别对质谱不同条件进行了单因素优化。

优化参数包括：(1) DL 管、接口温度；(2) 接口电压；(3) 喷针水平位置。优化结果见图 1：

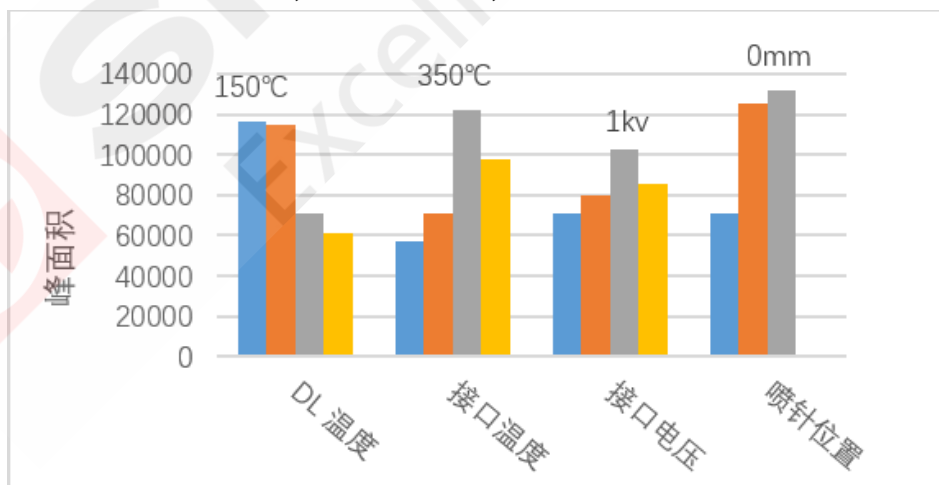


图 1. 质谱参数优化

结果显示，接口温度为 350℃，接口电压为 1 kV 时目标化合物有最大响应。喷针水平位置 0 和+1 mm 以及 DL 管温度 150℃和 200℃时峰面积差别不大，为提高检测大浓度药物样品时仪器的抗污染能力，最终选择喷针水平位置为+1 mm，DL 管温度为 200℃。

2.2 专属性与灵敏度

氯丙嗪在 1.2 色谱条件下，保留时间为 1.39 min。目标杂质 N-亚硝基-去甲基氯丙嗪保留时间为 3.02 min 左右，方法中设置 2.80 min 后切阀进质谱，可避免高浓度氯丙嗪主成分对质谱系统的污染，保留情况见图 2、切阀结果如图 3 所示。杂质与主成分分离良好，高浓度主成分进样后经切换阀被完全导入废液，保证了质谱检测器不被污染。

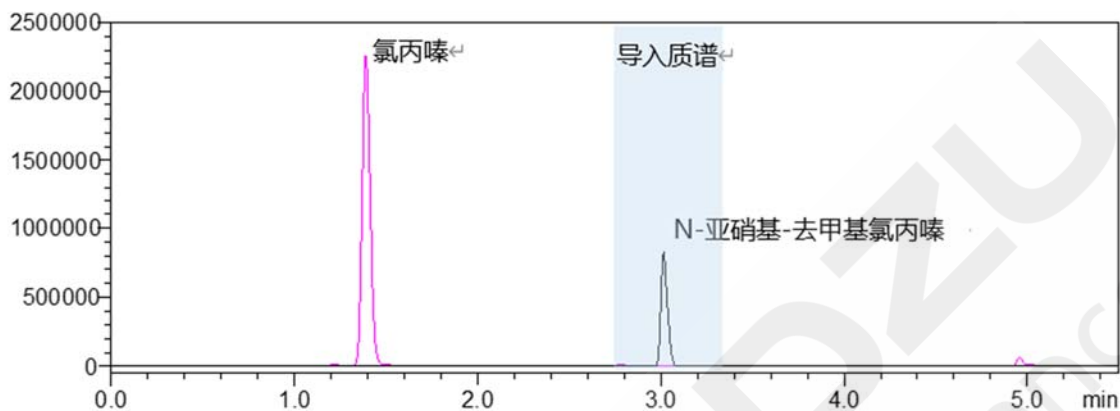


图 2. 原料药与杂质 TIC 色谱图 (50 ng/mL)

按照 1.2 中的仪器条件进行测定，标准样品的 MRM 色谱图如图 3 所示，目标物保留时间处，空白溶剂无干扰。

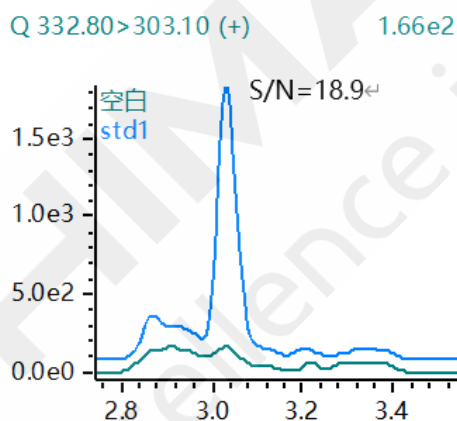


图 3. N-亚硝基-去甲基氯丙嗪(0.1 ng/mL)标准品与空白溶剂 MRM 色谱图

2.3 线性

将不同浓度的混合标准工作液，按相同条件进行测定，以浓度 (C) 为横坐标，峰面积(A)为纵坐标，权重 $1/C$ 。采用外标法建立校准曲线，结果如图 4 所示。目标化合物上机浓度范围内具有较好的线性关系，线性相关系数 >0.999 ，具体结果见表 3。

采用 LabSolutions 软件，按照 USP<621>要求的信噪比计算方式，以信噪比 $S/N=3.3$ 和 10.0 ，分别计算检出限和定量限。

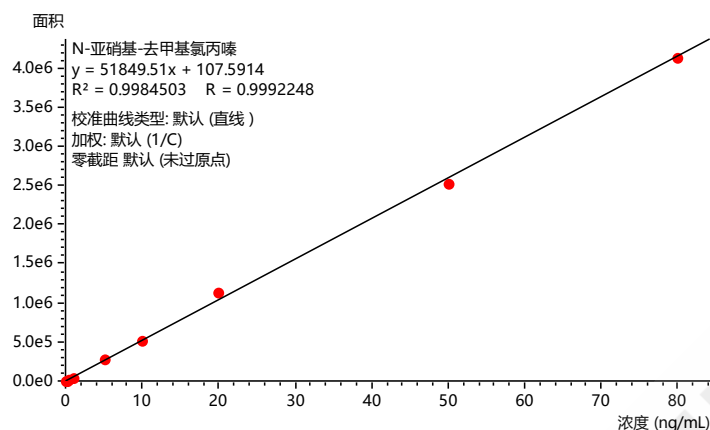


图 4. 目标物的校准曲线

表 3. 校准曲线参数

化合物	校准曲线	线性范围 (ng/mL)	相关数 r	精确度 (%)	检出限 (ng/mL)	定量限 (ng/mL)
N-亚硝基-去甲基氯丙嗪	$y = 51849.51x + 107.5914$	0.1-80	0.9992	94.3-109.9	0.016	0.048

2.4 精密度实验

取 0.5 ng/mL、5 ng/mL 浓度的标准液按分析条件分别连续进样 6 次，用于考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的重复性结果如表 4 所示。结果显示，保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.096~0.103% 和 4.462~5.756% 之间，仪器精密度良好。

表 4. 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

化合物	0.5 ng/mL (RSD%)		5 ng/mL (RSD%)	
	R.T.	Area	R.T.	Area
N-亚硝基-去甲基氯丙嗪	0.103	5.756	0.096	4.462

2.5 样品检测与加标回收率实验

取片剂样品 2 份，按 1.5 的方法处理过滤后检测，目标化合物均有检出。后对样品进行加标回收实验。添加浓度为：0.4 ng/mL、4 ng/mL，每个浓度平行处理 3 份，经处理后进样检测并计算回收率，结果见表 5。

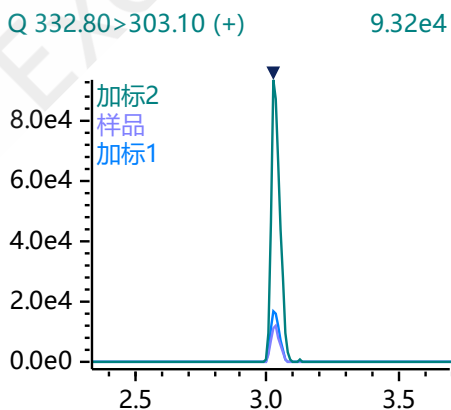


图 5. 片剂样品及加标色谱图

表 5. 回收率结果 (n=3)

序号	样品含量 (ng/mL)	平均值 (ng/mL)	加标水平 (ng/mL)	回收率%	平均 回收率%	RSD%
1	0.568	0.56	0.4	83.80	81.79	2.23
				80.23		
				81.35		
2	0.559	0.56	4	94.07	91.80	2.73
				92.20		
				89.11		

2.6 方法耐用性考察

分别对分析条件：DL 温度、柱温、以及 A 泵甲酸水浓度进行耐用性考察。以 5 ng/mL 的标准溶液的 6 针保留时间和峰面积的 RSD 为指标。结果见表 6。

表 6. 样品检测及回收率结果 (n=6)

序号	条件	参数	RSD%	
			R.T.	Area
1	DL 管温度	190°C	0.008	3.900
		210°C	0.058	2.188
2	A 泵甲酸浓度	0.03%	0.088	5.071
		0.07%	0.076	4.205
3	柱温	28°C	0.087	4.142
		32°C	0.089	3.282

根据 FDA 要求，系统适用性考察的峰面积 RSD 不得超过 10%。以上方法学耐用性结果符合系统适用性要求。

3. 结论

本文使用岛津新推出的三重四极杆液质联用系统 LCMS-8050 建立了一种测定氯丙嗪片剂中药物基质亚硝胺杂质 N-亚硝基-去甲基氯丙嗪含量的方法。此分析方法 5.5 分钟即可完成样品检测。在方法学考察中，该方法的线性、重复性、加标回收率以及耐用性均满足检测需求，可用于实际样品的检测。

托莫西汀中的 N-亚硝基药物成分相关杂质含量测定

摘要: 本文建立了使用岛津三重四极杆液质联用仪测定托莫西汀中 2 种 N-亚硝基药物成分相关杂质 (NDSRIs) 的方法。2 种 NDSRIs 在 0.1~10 ng/mL 浓度范围内, 校准曲线线性良好, 线性相关系数均为 0.9999, 精确度分别在 96.3~104.0%和 92.5~105.9%之间; 2 种 NDSRIs 的仪器定量限分别为 0.072 和 0.056 ng/mL, 方法灵敏度高; 对 0.2 ng/mL 和 2 ng/mL 标准溶液连续分析 6 次, 2 种 NDSRIs 的保留时间 RSD 均不大于 0.07%, 峰面积 RSD 均不大于 5.13%, 重复性良好; 加标回收实验表明, 2 种 NDSRIs 在原料药中的回收率分别为 94.4%和 98.9%, 在胶囊中回收率分别为 87.5%和 80.3%, 在口服液中的回收率分别为 90.0%和 91.7%。该方法满足检测要求, 能快速、有效的分析托莫西汀中 2 种 NDSRIs 的含量。

关键词: 三重四极杆液质联用仪 托莫西汀 N-亚硝基药物成分相关杂质 NDSRIs

技术特点:

- ❖建立托莫西汀中 2 种 N-亚硝基药物成分相关杂质的定量方法, 仪器定量限低于 0.1 ng/mL。
- ❖通过设置阀切换时间程序, 可将主成分等切除, 避免定量检测中干扰和仪器污染。

ICH M7 基因毒性杂质指导原则中, 亚硝胺被归为重点关注对象。近两年药品监管机构监管基因毒性杂质重点转向了与药物本身相关的亚硝胺杂质上, 这些亚硝胺杂质的形成和药物活性成分密切相关, 即被称为 N-亚硝基药物成分相关杂质 (Nitrosamine Drug Substance-Related Impurities, NDSRIs)。

托莫西汀是用于治疗儿童和青少年注意缺陷/多动障碍(ADHD)的常用药物, 其 NDSRIs 主要包括 N-(3-羟基-3-苯基丙基)-N-甲基亚硝胺 (后文中简称为亚硝胺 A) 和 N-甲基-N-[3-苯基-3-(邻甲基苯氧基)丙基]亚硝胺 (后文中简称为亚硝胺 B)。NDSRIs 亚硝胺杂质通常没有明确确定的允许摄入量 (Allowed Intake, AI), FDA 和 EMA 给 NDSRIs 设定了不同的临时 AI 值, 分别为 26.5 ng/天和 18 ng/天。

本文使用三重四极杆液质联用仪建立了测定托莫西汀 (包括原料药、胶囊和口服液) 中 2 种 NDSRIs 杂质含量的方法, 为相关基因毒性杂质的检测提供参考。

表 1. 托莫西汀和 NDSRIs 信息

No.	化合物名	后文简称	分子式	分子量	化合物结构
1	托莫西汀	托莫西汀	C ₁₇ H ₂₁ NO	255.35	
2	N-(3-羟基-3-苯基丙基)-N-甲基亚硝胺	亚硝胺 A	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₂	194.11	
3	N-甲基-N-[3-苯基-3-(邻甲基苯氧基)丙基]亚硝胺	亚硝胺 B	C ₁₇ H ₂₀ N ₂ O ₂	284.15	

表 3. MRM 参数

No.	化合物	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
1	亚硝酸 A	195.20	117.10*	-12	-11	-11
			177.20	-11	-8	-11
2	亚硝酸 B	285.20	177.00*	-13	-8	-11
			117.15	-13	-16	-21

注：*表示定量离子

1.3 标准品的配制

称取适量标准物质，以有机溶剂溶解，配制浓度为 10-20 mg/mL 的标准溶液，后以水和有机溶剂混合溶液（水/有机溶剂=3:1, v/v）逐级稀释，配制浓度为 0.1~10 ng/mL 的标准溶液。以上有机溶剂为甲醇/乙腈=1:1 (v/v)。

1.4 样品前处理方法

原料药：准确称取 20 mg 原料药，加入 1 mL 有机溶剂，涡旋 2 min 使溶解，后加入 3 mL 水，涡旋混匀，以 0.22 μ m PTFE 滤膜过滤后待测。

口服液：准确量取 1 mL 口服液，加入水和有机溶剂混合溶液（水/有机溶剂=3:1, v/v）3 mL，涡旋混匀，以 0.22 μ m PTFE 滤膜过滤后待测。

胶囊：称取 0.12 g 胶囊内容物，加入 1 mL 有机溶剂，涡旋 2 min，超声提取 10 min，8000 rpm 离心 5 min，取上清液 0.5 mL，加入 3 倍体积的水，涡旋混匀，以 0.22 μ m PTFE 滤膜过滤后待测。

以上有机溶剂为甲醇/乙腈=1:1 (v/v)。

2. 结果与讨论

2.1 托莫西汀主成分和 NDSRIs 分离考察

托莫西汀样品在色谱条件下，保留时间在 3.478 min, 4.310 min 为峰结束时间。亚硝酸 A 和亚硝酸 B 出峰时间分别为 5.169 min 和 14.812 min，方法中设置将 4.5~5.8 min 和 14.1~15.6 min 之间的洗脱液切阀进入质谱，其他时间流出组分导入废液，可避免托莫西汀主成分和实际样品中基质对分析检测的影响，如下图 1 所示。

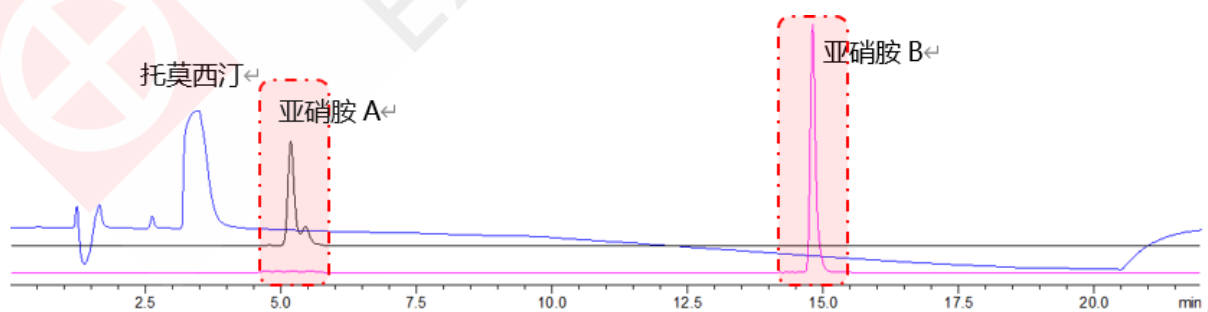


图 1. 托莫西汀主成分和 NDSRIs 色谱图

2.2 专属性和灵敏度

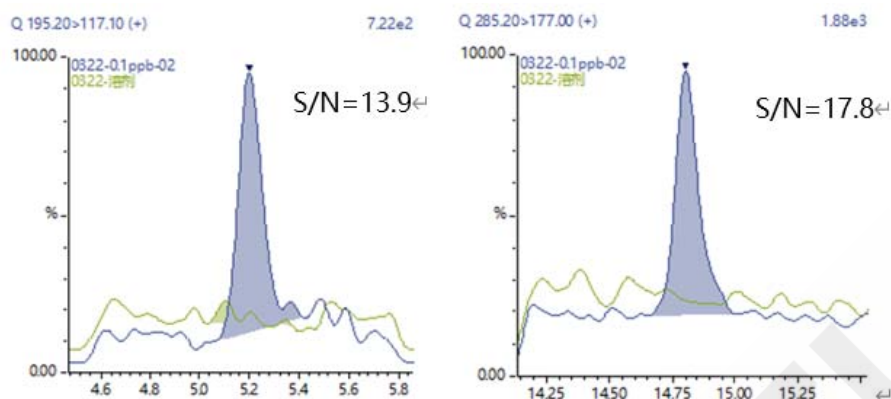


图 2. 溶剂空白和 0.1 ng/mL 亚硝酸胺（左图为亚硝酸胺 A，右图为亚硝酸胺 B）标准溶液 MRM 重叠色谱图

溶剂空白与标准溶液 MRM 重叠谱图显示，目标峰处，未见明显干扰，专属性良好。0.1 ng/mL 亚硝酸胺 A 和亚硝酸胺 B 标准溶液定量离子信噪比分别为 13.9 和 17.8，其仪器定量限分别为 0.072 和 0.056 ng/mL。

2.3 校准曲线

按照 1.3 项下配制方法配制校准曲线溶液。以化合物浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，进行线性回归分析，亚硝酸胺 A 和亚硝酸胺 B 在 0.1~10 ng/mL 浓度范围内线性良好，相关系数均为 0.9999，精确度在 96.3~104.0% 和 92.5~105.9% 之间。

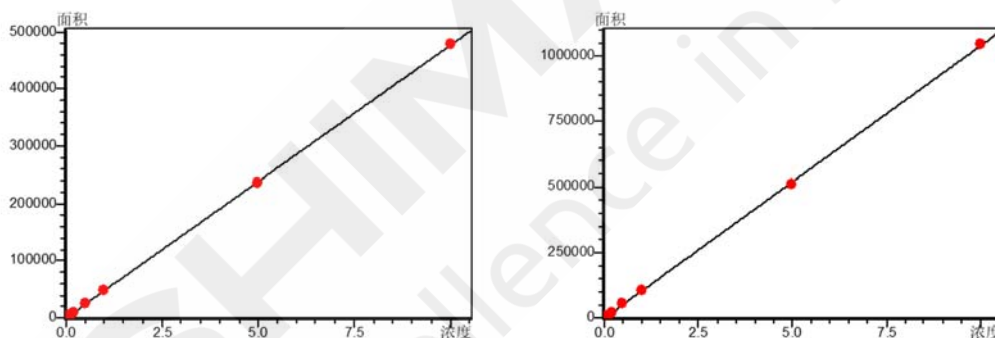


图 3. 亚硝酸胺 A（左）和亚硝酸胺 B（右）校准曲线

表 4. 校准曲线

No.	化合物	线性范围 (ng/mL)	线性方程	相关系数 (R)	精确度(%)
1	亚硝酸胺 A	0.1~10	$Y=47589.4X+161.9$	0.9999	96.3~104.0
2	亚硝酸胺 B	0.1~10	$Y=103874.0X+27.9$	0.9999	92.5~105.9

2.4 精密度实验

对 0.2 ng/mL 和 2 ng/mL 标准溶液连续分析 6 次，亚硝酸胺 A 和亚硝酸胺 B 的保留时间 RSD 均不大于 0.07%，峰面积 RSD 均不大于 5.13%，仪器的重复性良好。

表 5. 亚硝酸胺 A 和亚硝酸胺 B 重复性结果 (n=6)

No.	化合物	0.2 ng/mL		2 ng/mL	
		保留时间 RSD(%)	峰面积 RSD(%)	保留时间 RSD(%)	峰面积 RSD(%)
1	亚硝酸胺 A	0.07	5.13	0.06	2.67
2	亚硝酸胺 B	0.03	3.07	0.03	1.95

2.5 样品测试和加标回收率

按照 1.4 前处理方式进行处理, 分别检测了某托莫西汀原料药、胶囊和口服液样品, 其中口服液中亚硝酸胺 A 和亚硝酸胺 B 均未检出, 原料药和胶囊中检出了亚硝酸胺 B。

在样品中加标计算回收率, 最终结果显示: 原料药中亚硝酸胺 A 和亚硝酸胺 B 的回收率分别为 94.4%和 98.9%, 胶囊中亚硝酸胺 A 和亚硝酸胺 B 的回收率分别为 87.5%和 80.3%, 口服液中亚硝酸胺 A 和亚硝酸胺 B 的回收率分别为 90.0%和 91.7%。

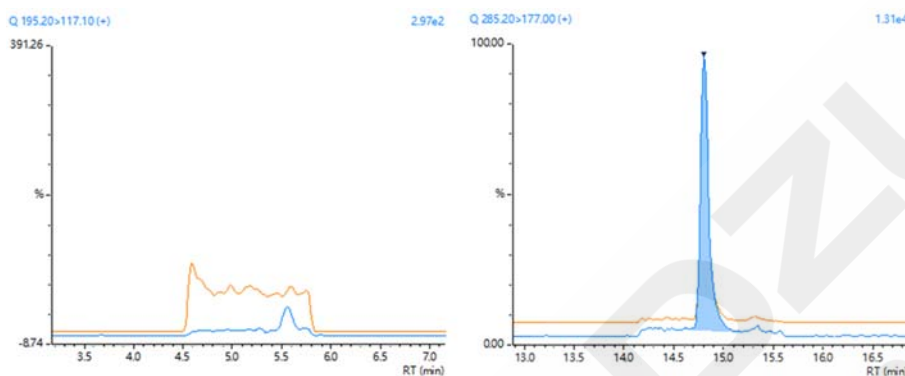


图 4. 胶囊样品色谱图 (左: 亚硝酸胺 A, 右: 亚硝酸胺 B)

表 6. 样品检测结果和加标回收率 (浓度单位: 原料药和胶囊为 ng/g, 口服液为 ng/mL)

No.	样品	化合物	检测值	加标量	加标样品实测平均 (n=3)	平均回收率 (%, n=3)
1	原料药	亚硝酸胺 A	N.D.	90	84.96	94.4
		亚硝酸胺 B	14.29	90	103.31	98.9
2	胶囊	亚硝酸胺 A	N.D.	26.67	23.34	87.5
		亚硝酸胺 B	20.42	26.67	41.84	80.3
3	口服液	亚硝酸胺 A	N.D.	1.20	1.08	90.0
		亚硝酸胺 B	N.D.	1.20	1.10	91.7

注 1: N.D.表示未检出

注 2: 加标量确定方式为: 根据 NDSRIs 日允许摄入量(18 ng/天)和口服药物每天最大使用量, 计算称取或量取样品中 NDSRIs 的限量值, 加标量为限量值的 50%~150%, 具体为: (1) 原药每日最大口服量以 100 mg 计, 检测时原料药称样 20 mg, 则称取的样品中 NDSRIs 不得超过 3.6 ng, 实验加标量为 90 ng/g; (2) 用作方法验证的胶囊样品规格为 25 mg, 内容物的质量约为 0.23 g/粒, 检测时称样 0.12 g, 则称取的样品中 NDSRIs 不得超过 2.35 ng, 实验加标量为 26.67 ng/g; (3) 口服液每日推荐最大口服量为 20 mL, 检测时量取 1 mL, 则量取的样品中目标物不得超过 0.9 ng, 实验加标量为 1.2 ng/mL。

3. 结论

本文建立了一种使用岛津三重四极杆液质联用仪测定托莫西汀中 2 种亚硝酸胺药物成分相关杂质(NDSRIs)的方法。该方法的灵敏度、精密度、校准曲线和加标回收率均满足检测需求, 可适用于托莫西汀中 NDSRIs 的检测。

格列齐特中 N-亚硝基药物成分相关杂质含量测定

摘要: 本文使用岛津三重四极杆液质联用仪建立了格列齐特中遗传毒性杂质 B (N-亚硝基-3-氮杂双环[3,3,0]辛烷) 的测定方法。方法学实验表明, 杂质 B 在 1-250 ng/mL 范围内线性良好, 相关系数大于 0.999; 低中高三个不同浓度点对照溶液, 连续进样 6 次, 保留时间 RSD 在 0.04%~0.09% 范围内, 峰面积 RSD% 在 0.75%~3.26% 范围内, 表明仪器精密度良好; 杂质 B 在低中高三个不同加标浓度, 回收率在 93~102% 范围内, 方法准确可靠。该方法可为相关从业人员提供参考。

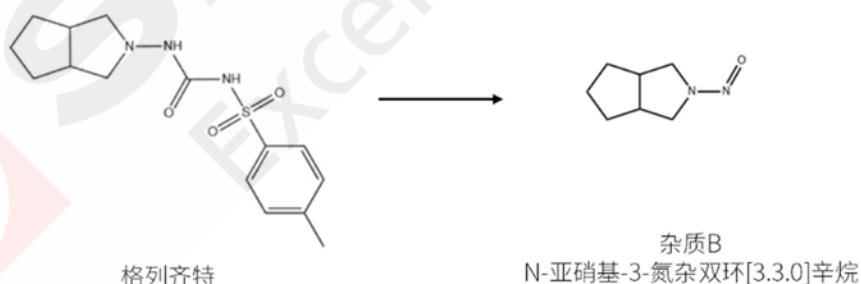
关键词: 三重四极杆液质联用仪 N-亚硝基-3-氮杂双环[3,3,0]辛烷

技术特点:

- ❖ 采用 LCMS-8050 建立了格列齐特中杂质 B 的检测方法, 有效拓展了 NDSRI 的检测范围。
- ❖ 该方法样品前处理操作简便, 仅需进行浸泡后过滤。

格列齐特为第 2 代口服磺脲类降血糖药, 其分子中的仲胺结构与在制备过工程中的试剂、生产环境中引入微量的亚硝酸盐, 可能会形成亚硝胺类药物相关杂质 (NDSRIs)。FDA 发布的“Recommended Acceptable Intake Limits for Nitrosamine Drug Substance Related Impurities (NDSRIs) Guidance for Industry”指南, 基于化合物分子结构中的活化特征和去活化特征, 建立了针对 NDSRIs 杂质的五个活性级别分类体系, 并确定了相应的 AI 值。其中, 杂质 B (N-亚硝基-3-氮杂双环[3,3,0]辛烷) 被归为第 4 级活性级别, 其每日最大摄入量不得超过 1500 ng。根据格列齐特的最大服用剂量 320 mg 计算, 杂质 B 的可接受限度为 5 ppm。

本文参照中国食品药品检定研究院检测方法使用岛津三重四极杆液质联用仪 LCMS-8050 建立了格列齐特中遗传毒性杂质 B 含量测定方法, 该方法前处理简便, 灵敏度高, 稳定性好, 可用于格列齐特中遗传毒性杂质 B 的含量测定, 供相关实验人员参考使用。



1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用仪 LCMS-8050。具体配置为:

系统控制器	: CBM-20A	输液泵	: LC-30AD x2
自动进样器	: SIL-30ACMP	柱温箱	: CTO-30A
检测器	: SPD-20A	质谱仪	: LCMS-8050
色谱工作站	: LabSolutions Version 5.128		

1.2 分析条件

液相色谱条件

色 谱 柱 : Shim-pack Scepter C8-120 (50 mm × 2.1 mm I.D., 1.9 μm),
岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N:227-31033-03

流 动 相 : A 相-水; B 相-乙腈

流 速 : 0.2 mL/min 进 样 体 积 : 1 μL

柱 温 : 35°C 样 品 盘 温 度 : 10°C

洗 脱 方 式 : 等度洗脱, A/B=80:20

表 1. 时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
4.25	Oven	Oven Valve 1	0*
7	Oven	Oven Valve 1	1*

*表示柱温箱柱后切换阀位置, 0 代表进入质谱, 1 代表进入废液

质谱条件

离 子 源 : ESI (+) D L 温 度 : 250°C

雾化气流速 : 3.0 L/min 加热模块温度 : 400°C

加热气流速 : 10.0 L/min 接 口 温 度 : 300°C

干燥气流速 : 10.0 L/min 扫 描 模 式 : 多反应监测(MRM)

MRM 参 数 : 见表 2

表 2. MRM 参数

化合物名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
杂质 B	141.13	95.14*	-16.0	-16.0	-16.0
		93.51	-16.0	-21.0	-18.0
		81.02	-16.0	-25.0	-13.0

注: *表示定量离子

1.3 对照品及样品制备

溶剂: 乙腈/水=1/1

对照品溶液: 准确称取杂质 B 对照品适量, 用溶剂溶解并稀释成 1、5、8、10、25、50、80、100、250 ng/mL 的系列标准溶液, 上机分析。

供试品溶液: 取格列齐特胶囊 (规格 40 mg) 10 粒, 倾出内容物, 置 10 mL 容量瓶中, 用 2 mL 溶剂洗涤囊壳, 洗液并入容量瓶中, 加溶剂 5 mL, 浸泡过夜, 混匀, 用溶剂稀释至刻度, 摇匀, 离心, 取上清液滤过, 续滤液作为供试品溶液上机分析。

2. 结果讨论

2.1 分离度考察

为避免高浓度格列齐特进入质谱, 造成污染, 本研究成功实现了杂质 B 与格列齐特的完全分离。4.25 分钟后切换进样至质谱, 其余时间则将样品导入废液。这一方法有效避免了格列齐特主成分对目标遗传毒性

杂质分析检测的干扰，如下图1所示。

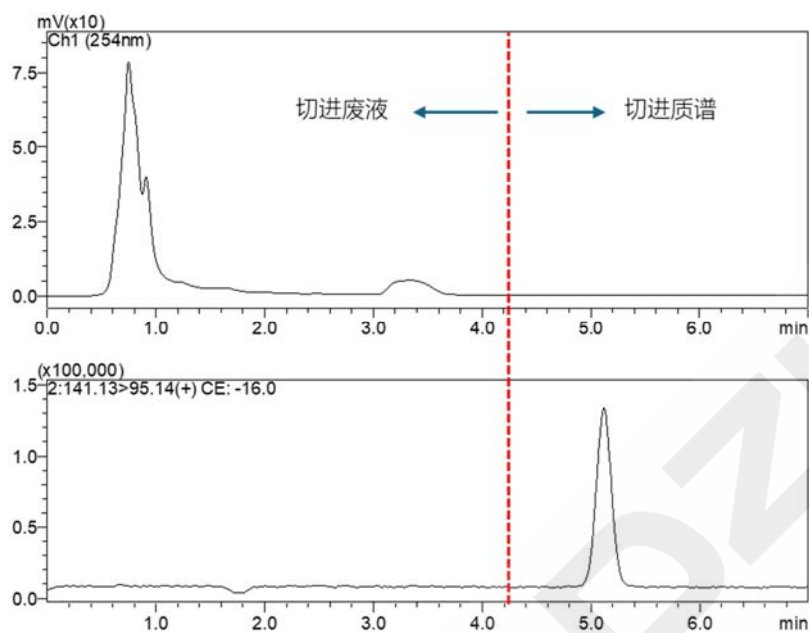


图 1. 格列齐特供试品溶液 (40 mg/mL) UV 色谱图 (上) 及杂质 B (10 ng/mL) 的 MRM 色谱图 (下)

2.2 专属性考察

溶剂空白与 1 ng/mL 标准溶液 MRM 重叠谱图显示，目标峰处，未见明显干扰，方法专属性良好。

Q 141.1500>95.1500 (+) 2.35e4

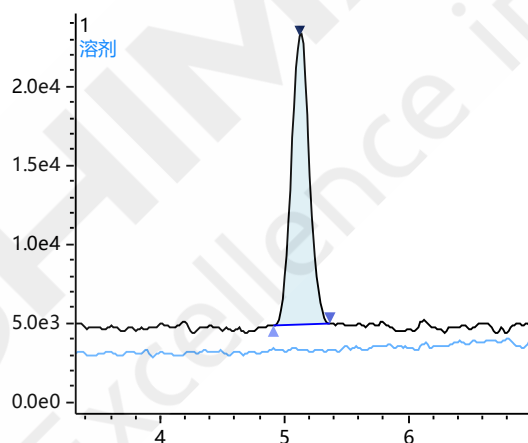


图 2. 溶剂空白和 1 ng/mL 杂质 B 标准溶液 MRM 重叠色谱图

2.3 校准曲线

按照 1.3 项下配制方法配制校准曲线溶液。以化合物浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，进行线性回归分析，杂质 B 在 1~250 ng/mL 浓度范围内线性良好，相关系数大于 0.999，准确度在 90.55%~106.40%之间。

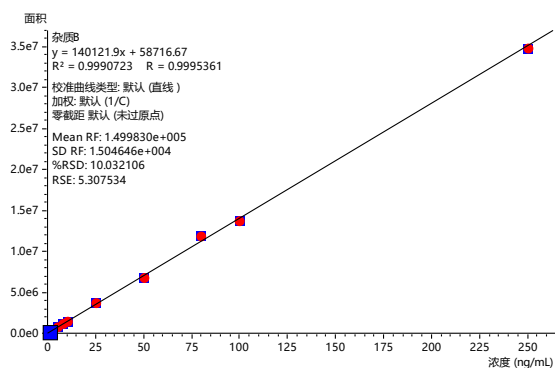


图 3. 杂质 B 校准曲线

2.4 精密度实验

取校准曲线低中高，三个不同浓度点对照溶液，连续进样6次，考察仪器的精密度，保留时间RSD在0.04%~0.09%范围内，峰面积RSD在0.75%~3.26%范围内。具体结果见表3，仪器精密度良好。

表 3. 精密度结果 (RSD%, n=6)

化合物名称	1 ng/mL		80 ng/mL		250 ng/mL	
	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积
杂质 B	0.09	3.26	0.04	0.84	0.07	0.75

2.5 加标回收率实验

按照以上建立的方法对市售某品牌格列齐特胶囊进行测定，其色谱图如图4所示。根据格列齐特中杂质B的含量，向格列齐特样品中分别加入含量为0.5 mg/kg、1 mg/kg、2 mg/kg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93~102%范围内，如表4所示。

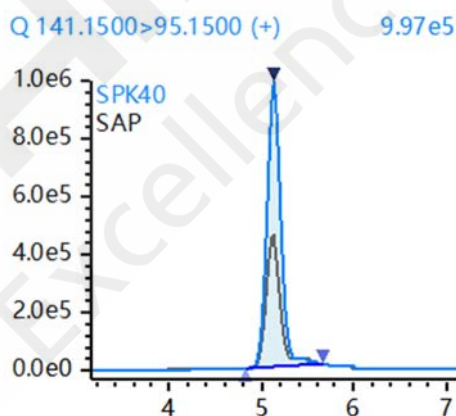


图 4. 样品及加标样品（加标量 1 mg/kg）中杂质 B 的 MRM 色谱图

表 4. 不同浓度水平杂质 B 添加回收率结果

化合物名称	样品含量	加标量	实测浓度	回收率
	mg/kg	mg/kg	mg/kg	%
杂质 B	0.83	0.5	1.34	102%
		1	1.83	100%
		2	2.68	93%

3. 结论

本文使用岛津三重四极杆液质联用仪建立了格列齐特中遗传毒性杂质 B (N-亚硝基-3-氮杂双环[3,3,0]辛烷) 的测定方法。结果显示：对杂质 B 对照品溶液进行重复性测试，三个不同浓度杂质 B 的保留时间及峰面积的 RSD 均小于 0.09%和 3.26%；使用 MRM 模式采集，进行外标法定量，其结果显示校准曲线相关系数大于 0.999。使用格列齐特胶囊作为加标基质，考察三个不同浓度水平加标回收，结果显示，三个不同水平的加标回收率在 93~102%之间，实验结果表明，该方法前处理简单，专属性强，能够满足杂质 B 的含量测定需要，可为相关从业人员提供参考。



SHIMADZU
Excellence in Science

去甲替林中 N-亚硝基去甲替林的含量测定

摘要: 本文建立了一种使用岛津三重四极杆液质联用仪检测去甲替林中 N-亚硝基去甲替林的方法。N-亚硝基去甲替林在 0.2~20 ng/mL 浓度范围内, 其相关系数大于 0.999, 精确度在 92.5~109.1%; 回收率为 94.86~111.96%; 对不同浓度的标准溶液平行 6 次, 其保留时间 RSD 为 0.04~0.06%, 浓度 RSD 为 1.43~3.00%, 仪器精密度良好。该方法可有效应对去甲替林中的药物基质亚硝胺杂质 N-亚硝基去甲替林的检测。

关键词: 去甲替林 N-亚硝基去甲替林 药物基质亚硝胺

技术特点:

- ❖ 应对药物基质亚硝胺杂质 N-亚硝基去甲替林的分析。
- ❖ 将高浓度主成分通过切换阀切入废液, 避免进入质谱, 减少仪器污染。

基因毒性杂质是指在很低的浓度下即可诱导基因突变并导致染色体的断裂和重排的杂质, 具有潜在的致癌性”。N-亚硝胺类化合物由于在细胞色素P450酶介导代谢活化后, 生成不稳定的 α -羟甲基-N-亚硝胺, 最终形成的高度亲电物质与DNA反应形成烷基化的DNA碱基对, 从而具有很强的致癌性。ICH M7(R1)指南已将 N-亚硝胺类化合物列入“关注队列”。近年来多个品种的药品中检测出了N-亚硝胺类化合物, 引起了各国药品监管机构的广泛关注, 出台了一系列N-亚硝胺杂质的控制方案。

去甲替林 (Nortriptyline) 作为三环类抗抑郁药, 广泛用于抑郁症和焦虑症的治疗, 其安全性与杂质控制密切相关。近年来, 药物中亚硝胺类基因毒性杂质 (如N-亚硝基去甲替林) 因其强致癌性备受关注, 此类杂质可能源于合成工艺、储存条件或辅料降解, 对患者健康构成潜在威胁。根据国际药监机构 (如FDA) 的指南, 亚硝胺杂质的摄入量需严格限制。然而, 针对去甲替林中N-亚硝基去甲替林的检测方法尚未充分报道, 亟需建立高灵敏度、高专属性的分析方法。因此, 本文建立了使用岛津三重四极杆液质联用仪检测去甲替林中N-亚硝基去甲替林的方法, 供相关检测人员参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津超高效液相色谱仪 LC-40 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 RX 联用系统。具体配置为:

系统控制器	: CBM-40	自动进样器	: SIL-40C X3
输液泵	: LC-40B X3	检测器	: SPD-M40
柱温箱	: CTO-40C	质谱仪	: LCMS-8050 RX
色谱工作站	: LabSolutions Ver.5.128		

1.2 分析条件

液相色谱条件

色 谱 柱 : Shim-pack GIST C18-HP 2.1×150 mm; 3.0 μm
 流 动 相 : A-5 mM 乙酸铵溶液 (含0.1%甲酸); B-甲醇
 流 速 : 0.38 mL/min 柱 温 : 40°C
 进 样 体 积 : 2 μL
 洗 脱 方 式 : 梯度洗脱, B 相初始浓度为50%, 初始阀位 “0”, 时间程序见表1。

表 1. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
4.00	Pump	B.Conc	75
7.00	柱温箱	Oven Valva 2	1
8.00	Pump	B.Conc	75
8.01	Pump	B.Conc	75
11.00	Control	Stop	

*注: “0” 号阀位进废液, “1” 号阀位进质谱

质谱条件

离子化模式 : ESI (+) 接口电压 : 1.0 kV
 雾化气流速 : 7.0 L/min 接口温度 : 300 °C
 加热模块温度 : 400 °C 干燥气流速 : 10 L/min
 D L 温度 : 200 °C 加热气流速 : 10 L/min
 M R M 参数 : 见表2 扫描模式 : 多反应监测(MRM)

表 2. MRM 参数

名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
N-亚硝基去甲替林	293.15	233.2*	-15	-12	-22
		105.0	-12	-22	-17

*代表定量离子对。

1.3 校准品及样品制备

校准曲线制备: 以甲醇为稀释剂, 配置浓度约为 100 ng/mL 的亚硝基去甲替林对照品储备液, 随后用稀释剂将标准品储备液溶液分别配制为 0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 和 20.0 ng/mL 的标准品溶液。

供试品溶液: 精密称取去甲替林 5 mg, 精密加入甲醇 1 mL, 混匀, 作为供试品溶液。

回收率溶液: 分别精密称取去甲替林 5 mg, 精密加入适量对照品储备液和甲醇溶液共 1 mL, 混匀, 作为回收率溶液。

2. 结果与讨论

2.1 MRM 色谱图

亚硝基去甲替林定量限浓度 (0.2 ng/mL) 及空白溶液的 MRM 谱图如下所示。

表 3 样品检测及回收率实验结果

序号	样品含量 (ng/mL)	平均值 (ng/mL)	加标水平 (ng/mL)	回收率%	平均 回收率%	RSD%
1	1.57	1.55	0.5	96.44	97.84	3.97
				102.24		
				94.86		
2	1.53	1.55	2	111.96	109.65	1.97
				107.69		
				109.31		
			10	103.75	103.00	0.70
				102.30		
				102.96		

2.4 精密度测定结果

分别取低中高浓度点样品，连续进样6针，考察仪器的精密度，保留时间RSD在0.04%~0.06%范围内，峰面积RSD在1.43%~3.00%范围内。具体结果见表4，仪器精密度良好。

表 4. 精密度结果 (RSD%, n=6)

化合物名称	0.5 ng/mL		2 ng/mL		10 ng/mL	
	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积
N-亚硝基去甲替林	0.05	3.00	0.04	1.43	0.06	2.75

3. 结论

本文利用LCMS-8050三重四极杆液质联用仪，建立了对去甲替林中药物质基质亚硝胺杂质N-亚硝基去甲替林的测定方法。考察了方法的线性范围，使用外标法定量分析，N-亚硝基去甲替林在0.2~20 ng/mL浓度范围内相关系数大于0.999，精确度在92.5~109.1%；在三个浓度水平考察了方法的回收率，N-亚硝基去甲替林的回收率为94.86~111.96%；考察了方法的重复性，对三个浓度水平的标准溶液重复进样6次，其保留时间RSD为0.04~0.06%，浓度RSD为1.43~3.00%，仪器精密度良好。该方法能为相关检测人员提供参考。

3.2 液相色谱四极杆飞行时间质谱联用分析

液相色谱四极杆飞行时间质谱联用分析仪(LCMS-Q-TOF)简称四极杆飞行时间质谱,是液相色谱(LC)串联了高分辨质谱(HRMS)的分析仪器。其具有结构简单、分辨率和灵敏度高、质量范围宽等特点,广泛应用于相关化合物的定性、定量分析。优选用于 NDSRIs 杂质的痕量水平的鉴定和定量检测。在 FDA 官方目前发布了多个药物 NDSRIs 杂质的研究指引中都使用了高分辨质谱仪(LC-ESI-HRMS)的仪器组合。

四极杆飞行时间质谱仪

- 精确质量分析更简单: 传承 LCMS-9030 各项技术;
- 超长时间稳定的高质量精度; 轻松调试, 维护简便;
- 实现 Q-TOF 超稳定快速极性切换: 岛津创新技术 UFstabilization;
- 稳定的高质量精度; 全面提高分析效率; 提升杂质鉴定准确度;
- 多样性扩展单元应对多样化需求: 拓展数据范围;



LCMS-9050

布美他尼中 N-亚硝基布美他尼的高分辨质谱法含量测定

摘要: 本文利用岛津超高效液相色谱-飞行时间质谱仪,建立了布美他尼中杂质N-亚硝基布美他尼的检测方法。亚硝基布美他尼在1.0~20 ng/mL浓度范围内,其相关系数大于0.999,精确度在94.2%~105.2%;回收率为91.59~104.71%;对不同浓度的标准溶液平行分析6次,其保留时间RSD为0.08~0.16%,面积RSD为0.89~2.94%,仪器精密度良好。该方法满足检测要求,同时采用了切阀的方式减少质谱的污染,可有效应对FDA发布的对于布美他尼药物产品中的亚硝胺类杂质N-亚硝基布美他尼的检测。

关键词: LCMS-Q-TOF N-亚硝基布美他尼 定量检测

技术特点:

- ❖ 使用离子累积技术,可提高目标物灵敏度约 20 倍。
- ❖ 采用自动进样器的 Co-injection 功能(共进样模式)消除溶剂效应对峰形的影响。

布美他尼(bumetanide)是一强效利尿剂。化学名为3-丁氨基-4-苯氧基-5-磺酰基苯甲酸。分子式:C₁₇H₂₀N₂O₆S,分子量364.42。临床上布美他尼主要用于治疗水肿疾病,包括充血性心力衰竭、肝硬化、肾脏疾病,高血压尤其伴有肾功能不全或高血压危象等。

在一些布美他尼药物产品中发现可能存在或形成N-亚硝基布美他尼。为帮助确保布美他尼药物产品和药物物质的安全和质量,本文建立了使用岛津四极杆飞行时间质谱联用仪检测布美他尼中N-亚硝基布美他尼的方法,用于确定是否存在布美他尼亚硝胺药物相关杂质(NDSRI)。

1. 实验部分

1.1 仪器

岛津 LCMS-9050 超高效液相色谱四极杆飞行时间质谱联用仪,具体配置为:

系统控制器	: SCL-40	脱气机	: DGU-403
输液泵	: LC-40D XS × 2	柱温箱	: CTO-40C
自动进样器	: SIL-40C XS	质谱仪	: LCMS-9050
色谱工作站	: LabSolutions Ver. 5.118, Insight Ver. 4.0 SP2		

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱	: Shim-pack Velox C18 (100 mm×2.1 mm I.D, 2.7 μm) 岛津(上海)实验器材有限公司, P/N: 227-32009-03		
流动相	: A: 0.1%甲酸水溶液; B: 乙腈		
进样体积	: 10 μL	柱温	: 40°C
流速	: 0.4 mL/min	进样模式	: 同时注入 (15 μL 水)
洗脱方式	: 梯度洗脱, 初始浓度为 B 相 20%, 时间程序见表 1。		

表 1. 液相梯度时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
7.00	Pumps	Pump B Conc.	40
7.50	Pumps	Pump B Conc.	90
8.00	Pumps	Pump B Conc.	90
8.10	Pumps	Pump B Conc.	20
11.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子化模式	: ESI+	雾化气流速	: 3.0 L/min
接口电压	: +4.5 kV	干燥气流速	: 10.0 L/min
接口温度	: 300°C	加热气流速	: 10.0 L/min
D L 温度	: 250°C	加热块温度	: 400°C
扫描模式	: SIM (15 ppm), m/z: 394.1067		
M S 程序	: 分析开始时分流阀选择进样侧, 具体切阀程序见表2。		

表 2. MS 程序

No.	时间	命令
1	7.800	分流阀: 流路切换 排液侧
2	10.500	分流阀: 流路切换 排液侧

1.3 校准品及样品制备

校准曲线制备: 以甲醇为稀释剂, 配置浓度约为 100 ng/mL 的 N-亚硝基布美他尼对照品储备液, 随后用稀释剂将标准品储备液溶液分别配制为 1.0、2.0、5.0、10.0 和 20.0 ng/mL 的标准品溶液。

供试品溶液: 准确称取 20 mg 药物, 定量转移到 20 mL 容量瓶中。用甲醇稀释至一定体积, 搅拌溶液直至完全溶解后定容。使用 0.22 μm 滤膜过滤溶液, 将过滤后的样品转移到进样瓶中进行分析。

回收率溶液: 准确称取 20 mg 药物, 定量转移到 20 mL 容量瓶中。用甲醇稀释至一定体积, 精密加入适量对照品储备液后加甲醇定容, 使用 0.22 μm 滤膜过滤溶液, 将过滤后的样品转移到进样瓶中进行分析。

2. 结果与讨论

2.1 共进样 (Co-injection 功能)

分别使用标准进样模式以及同时注入模式采集 (图 1), 使用标准模式时由于溶剂效应的存在导致峰形差, 同时注入模式可以消除溶剂效应对色谱峰的影响。

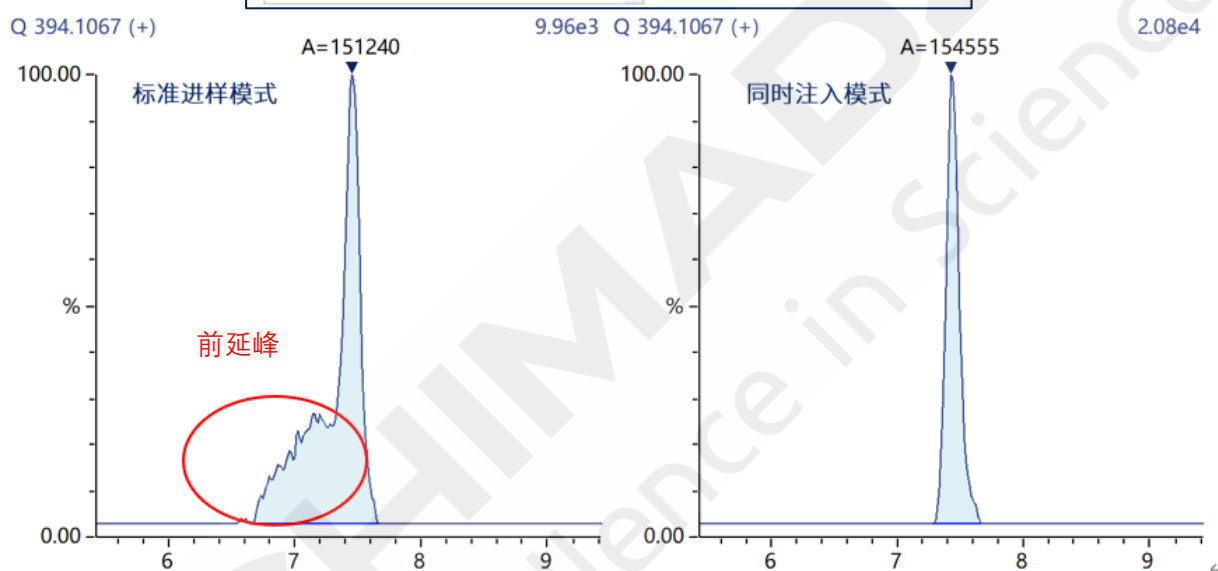


图 1. 不同进样模式的设置方式 (上) 以及标准溶液色谱图 (下)

2.2 离子累积技术 (UF-Accumulation)

不使用离子累积功能时, 将进行连续离子流测定。使用此功能时, 可以通过在 Q2 碰撞池内积累离子, 使离子释放与正交加速单元的离子射出同步, 从而提高离子的使用效率。如图 2 所示, 使用离子累积技术时 (即 ID 选项框不勾选), 可以大幅度提高目标物的响应 (提升约 20 倍), 有利于定量分析。

事件号	+/-	类型	开始 (min)	结束 (min)	前体离子 m/z	产物离子 m/z	TOF开始 m/z	TOF结束 m/z	化合物名称	CE	CE变化范围 (z)	ID	事件时间(s)
1	+	SIM(Ch1)	0.000	11.000	394.1067		394.1008	394.1126	N-乙酰基布美他尼			<input type="checkbox"/>	0.150

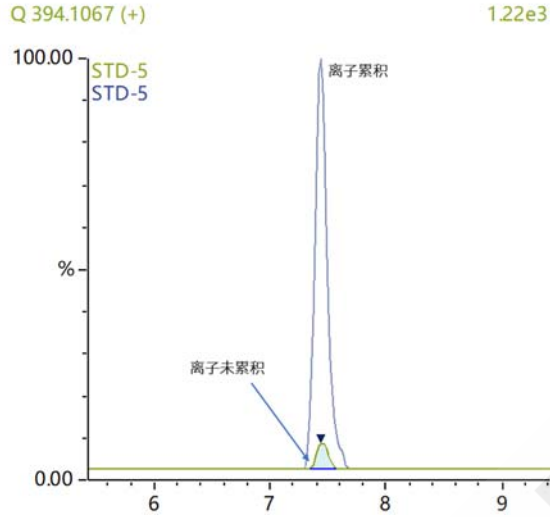


图 2. 离子累积模式的设置方式（上）以及两种模式对比图（下）

2.3 色谱图

N-亚硝基布美他尼 MS 色谱图及布美他尼 PDA 色谱图如下所示，在 7.8~10.5 min 内将布美他尼切入废液中，防止过高的浓度污染质谱。

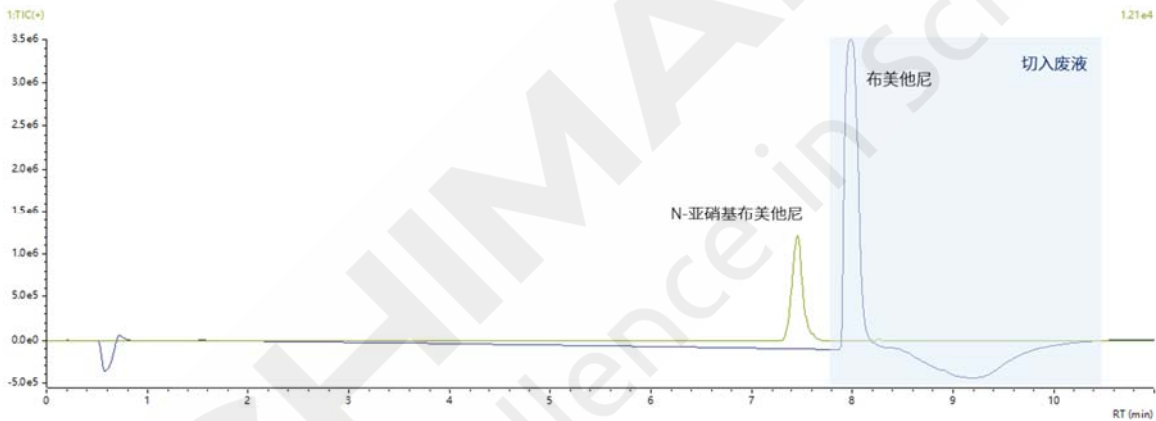


图 3. N-亚硝基布美他尼及原料药布美他尼色谱图

2.4 校准曲线

按照 1.3 项下配制方法，配制校准曲线浓度点对应的溶液。以化合物浓度为横坐标，色谱峰面积为纵坐标进行分析。N-亚硝基布美他尼在 1.0~20.0 ng/mL 浓度范围内相关系数大于 0.999，精确度在 94.2%~105.2%，曲线结果如图 4 所示。

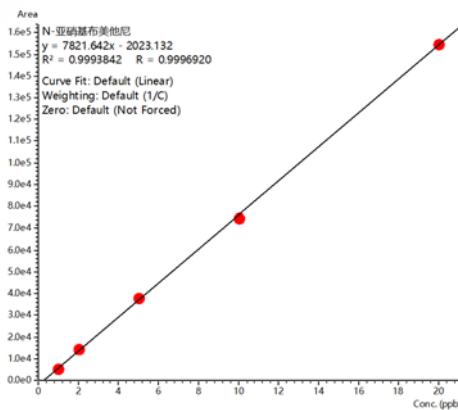


图 4. 校准曲线结果

2.5 精密度测定结果

分别取低浓度和高浓度点样品，连续进样 6 针考察精密度，结果如表 3 所示。保留时间 RSD 在 0.08%~0.16%范围内，峰面积 RSD 在 0.98%~2.94%范围内。仪器精密度良好

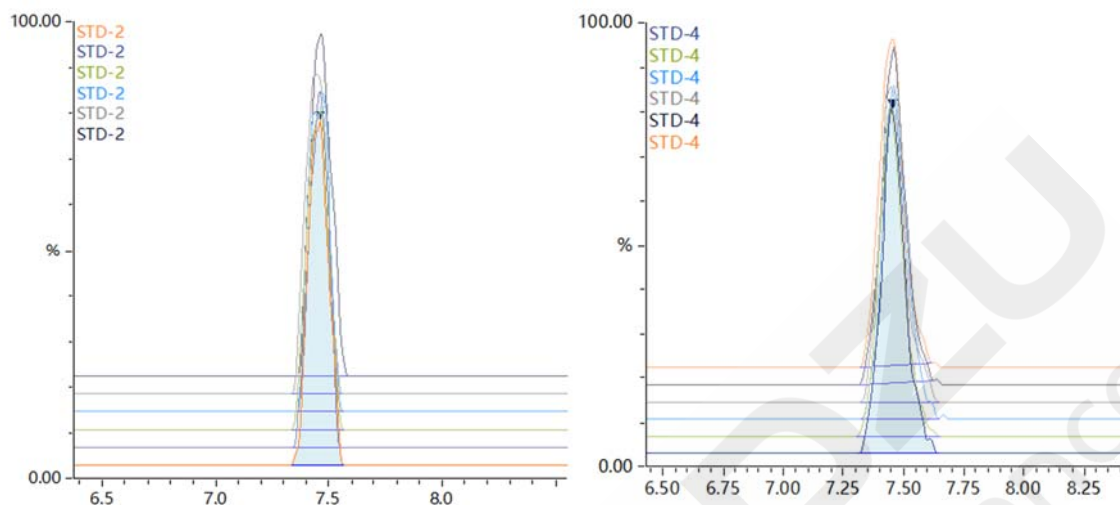


图 5. 不同浓度水平下连续 6 针叠加图 (左: 2 ng/mL; 右: 10 ng/mL)

表 3. 精密度结果 (RSD%, n=6)

化合物名称	2 ng/mL		10 ng/mL	
	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积
N-亚硝基布美他尼	0.16	2.94	0.08	0.98

2.6 加标回收率及实际样品测试

按照 1.3 项下配制方法，分别配制供试品溶液以及加标溶液，其中每个浓度水平加标溶液平行配置 3 份，按 1.2 中的分析条件对供试品及加标样进行分析，测试供试品中 N-亚硝基布美他含量为 1.84 ng/mL，色谱图如图 6 所示；加标回收率在 91.59~104.71%间；如表 4 所示。

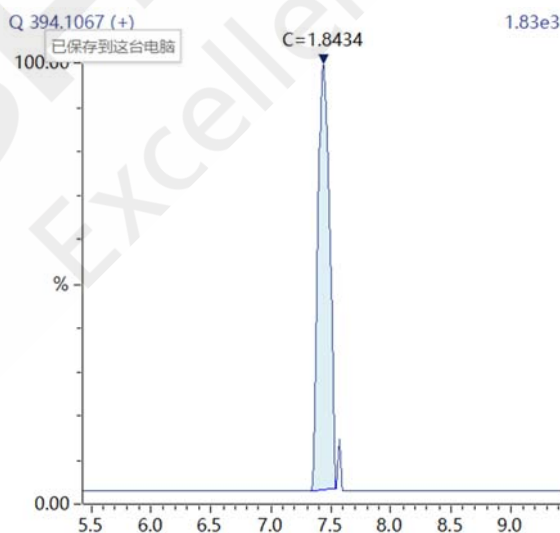


图 6. 供试品溶液色谱图

表 4. 回收率分析结果

序号	样品浓度 (ng/mL)	加标浓度 (ng/mL)	回收率 (%)	平均回收率%	RSD%
1	1.84	2	101.63	102.47	1.91
			101.07		
			104.71		
2	1.84	10	91.59	94.49	2.69
			95.60		
			96.29		

3. 结论

本文利用LCMS-9050四极杆飞行时间液质联用仪，建立了对布美他尼中N-亚硝基布美他尼的测定方法。使用SIM模式采集，外标法定量分析。N-亚硝基布美他尼在1.0~20.0 ng/mL浓度范围内相关系数大于0.999，精确度在94.2%~105.2%；加标回收实验中，考察了2个不同浓度水平，回收率为91.59~104.71%；重复性实验中，对不同浓度的标准溶液重复进样6次，其保留时间RSD为0.08~0.16%，面积RSD为0.89~2.94%，，仪器精密度良好。该方法能满足FDA发布的对于布美他尼药物产品中的亚硝胺类杂质N-亚硝基布美他尼的检测。

依那普利中 N-亚硝基依那普利的高分辨质谱法含量测定

摘要: 本文利用岛津超高效液相色谱-飞行时间质谱仪,建立了依那普利中杂质 N-亚硝基依那普利的检测方法。N-亚硝基依那普利在 0.5~20 ng/mL 浓度范围内,其相关系数大于 0.999,精确度在 96.3~103.5%;低中高三个浓度回收率为 92.27~107.78%;对不同浓度的标准溶液平行 6 次,其面积 RSD 为 1.17~1.99%,仪器精密度良好。该方法可有效应对依那普利中的亚硝胺类基因毒性杂质 N-亚硝基依那普利的检测。

关键词: 依那普利 N-亚硝基依那普利 飞行时间质谱

技术特点:

- ❖ 该方法分析目标物出现双峰,采用组校准(面积之和)进行定量分析。
- ❖ 将高浓度非目标物通过切阀不进入质谱,减少对仪器的污染。

基因毒性杂质是指在很低的浓度下即可诱导基因突变并导致染色体的断裂和重排的杂质,具有潜在的致癌性”。N-亚硝胺类化合物由于在细胞色素P450酶介导代谢活化后,生成不稳定的 α -羟甲基-N-亚硝胺,最终形成的高度亲电物质与DNA反应形成烷基化的DNA碱基对,从而具有很强的致癌性。ICH M7(R1)指南已将 N-亚硝胺类化合物列入“关注队列”。近年来多个品种的药品中检测出了N-亚硝胺类化合物,引起了各国药品监管机构的广泛关注,出台了一系列N-亚硝胺杂质的控制方案。

马来酸依那普利(enalapril maleate)系第二代血管紧张素转换酶抑制剂,可强烈抑制血管紧张素转换酶,降低血管紧张素工的含量,使全身血管舒张,从而降低血压。临床用于治疗高血压,具有药理作用平稳,持续时间长的特点。然而,近期在依那普利中发现了新的亚硝胺类基因毒性杂质N-亚硝基依那普利,使得亚硝胺类基因毒性杂质又一次引起大家关注。因此,本文建立了使用岛津超高效液相色谱-飞行时间质谱仪检测依那普利中N-亚硝基依那普利的方法,供相关检测人员参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

岛津 LCMS-9050 超高效液相色谱四极杆飞行时间质谱联用仪,具体配置为:

系统控制器	: SCL-40	脱气机	: DGU-403
输液泵	: LC-40D XS × 2	柱温箱	: CTO-40C
自动进样器	: SIL-40C XS	质谱仪	: LCMS-9050
色谱工作站	: LabSolutions Ver. 5.118, Insight Ver. 4.0 SP2		

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱	: Shim-pack Velox C18 2.1×100 mm; 1.8 μ m		
流动相	: A-10 mM 乙酸铵溶液 (含0.1%甲酸); B-乙腈 (含0.1%甲酸)		
流速	: 0.35 mL/min	柱温	: 40°C

进样体积：5 μ L

洗脱方式：梯度洗脱，B相初始浓度为20%，时间程序见表1。

表 1. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
7.50	Pump	B.Conc	42
9.00	Pump	B.Conc	42
10.00	Pump	B.Conc	95
11.00	Pump	B.Conc	95
11.01	Pump	B.Conc	20
14.00	Control	Stop	

质谱条件

离子化模式：ESI+

雾化气流速：3.0 L/min

接口电压：+1.0 kV

干燥气流速：5.0 L/min

接口温度：300°C

加热气流速：20.0 L/min

D L 温度：200°C

加热块温度：400°C

扫描模式：SIM (10 ppm), m/z: 406.1973

M S 程序：分析开始时分流阀选择排液侧，具体切阀程序见表2。

表 2. MS 程序

No.	时间	命令
1	5.000	分流阀：流路切换 进样侧
2	9.000	分流阀：流路切换 排液侧

1.3 校准品及样品制备

校准曲线制备：以甲醇为稀释剂，配置浓度约为 1000 ng/mL 的亚硝基依那普利对照品储备液，随后用稀释剂将标准品储备液溶液分别配制为 0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 和 20 ng/mL 的标准品溶液。

供试品溶液：取马来酸依那普利片 10 片，精密称定，研细，混匀，精密称取细粉适量（约相当于依那普利 10 mg）置离心管中，精密加入甲醇 2 mL，涡旋 5 min，滤过，取续滤液作为供试品溶液。

回收率溶液：取马来酸依那普利片 10 片，精密称定，研细，混匀，精密称取细粉适量（约相当于依那普利 10 mg）置离心管中，精密加入适量对照品储备液和甲醇溶液，涡旋 5 min，滤过，取续滤液作为回收率溶液。

2. 结果与讨论

2.1 色谱及质谱图

N-亚硝基依那普利色谱及质谱图如下所示，在此液相条件下标准品出现 RT=7.62 min 和 RT=8.47 min 两个色谱峰。对这两个峰进行全扫描及产物离子扫描结果如图 2 所示，两个峰的 MS¹ 质谱图中的母离子以及 MS/MS 质谱图中碎片离子均相同，故认为该物质在该液相条件下会出现两个峰，其中以 S/N 较小的峰用于确定定量限，以两个峰面积之和用于定量分析。

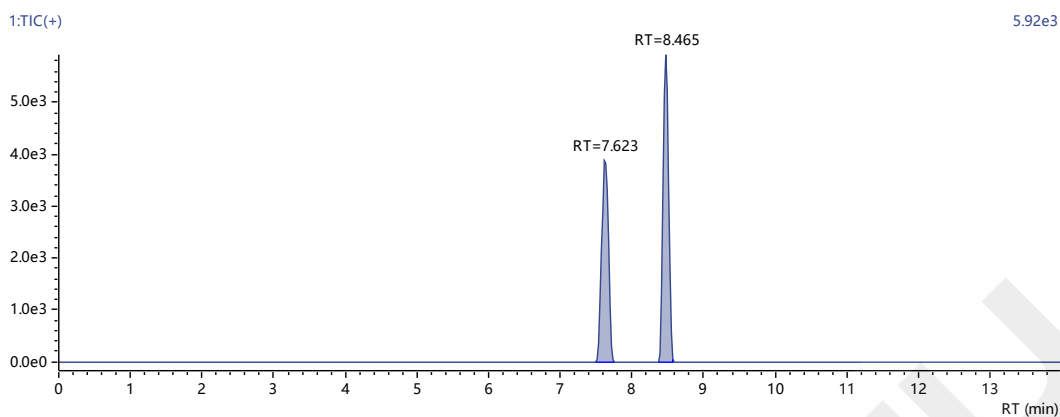


图 1. N-亚硝基依那普利定量限 (0.5 ng/mL) 点 MRM 色谱图

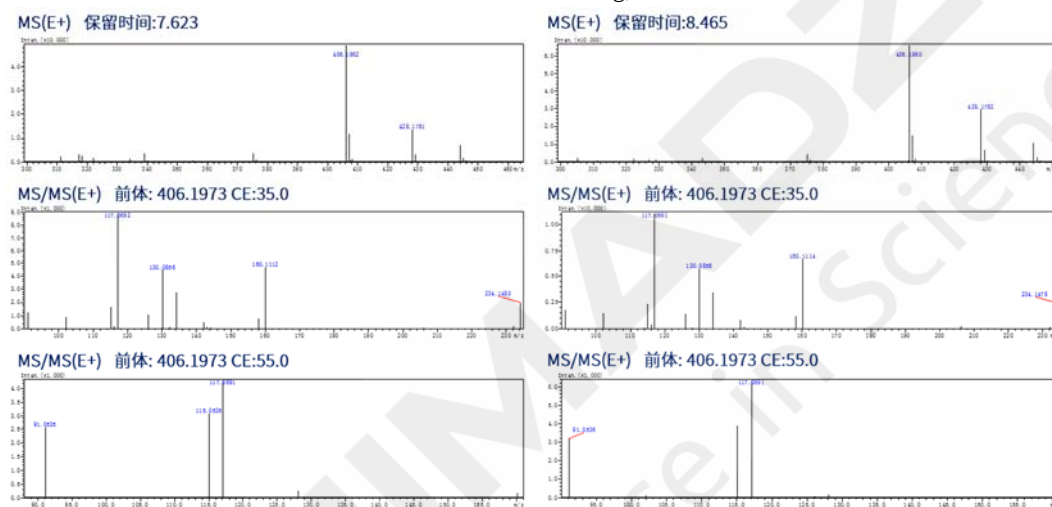


图 2. N-亚硝基依那普利质谱图

2.2 校准曲线

按照 1.3 项下配制方法，配制校准曲线浓度点对应的溶液。以化合物浓度为横坐标，两色谱峰面积之和为纵坐标，以组校准的方式进行分析，亚硝基依那普利在 0.5~20 ng/mL 浓度范围内相关系数大于 0.999，精确度在 96.3%~103.5%，曲线结果如下图 3 所示。

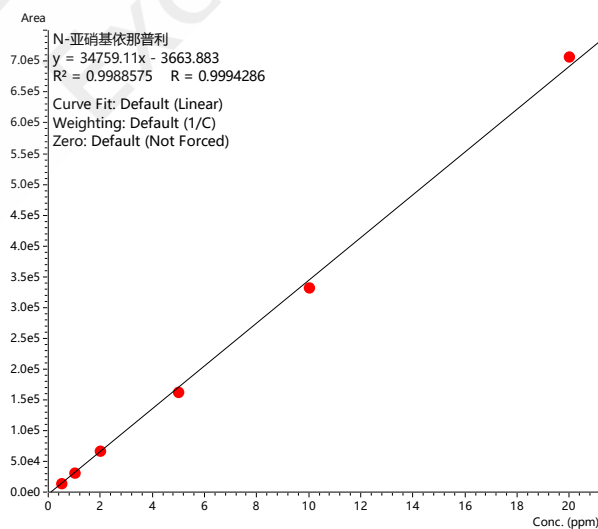


图 3. 校准曲线结果

2.3 精密度测定结果

分别取低中高浓度点样品，连续进样 6 针考察精密度，结果如表 3 所示。

表 3. 精密度结果 (峰面积 RSD%, n=6)

化合物名称	1 ng/mL	5 ng/mL	20 ng/mL
N-亚硝基依那普利	1.99	1.27	1.17

2.4 实际样品及准确度测定结果

按 1.3 项下配制供试品和回收率溶液，每个浓度加标样重复制备 3 份，按 1.2 中的分析条件对质控品进行分析。其中供试品测定浓度为 0.786 ng/mL，色谱图如图 4 所示，加标样回收率如表 4 所示。

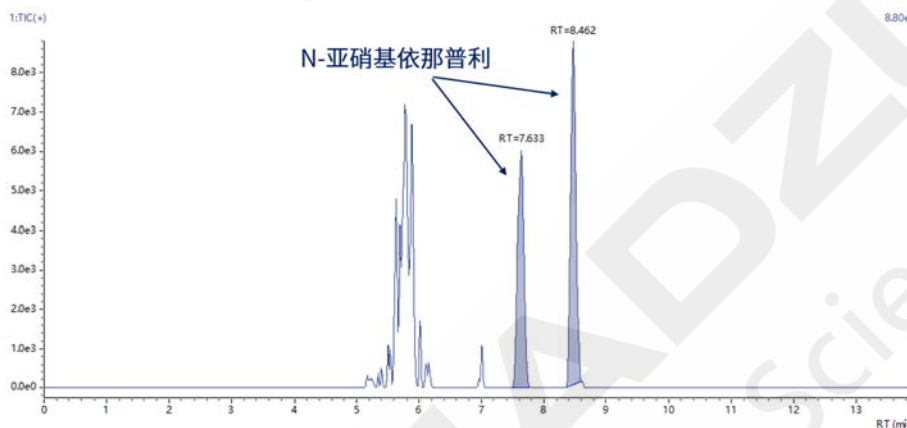


图 4. 供试品色谱图

表 4. 回收率分析结果

	供试品(ng/mL)	加标值(ng/mL)	测定值(ng/mL)	回收率(%)
LQC	0.786	1	1.834	104.82
			1.864	107.78
			1.802	101.58
MQC	0.786	5	5.828	100.84
			6.026	104.80
			5.928	102.84
HQC	0.786	20	19.240	92.27
			19.779	94.97
			19.470	93.42

3. 结论

本文利用岛津超高效液相色谱-飞行时间质谱仪，建立了对依那普利中N-亚硝基依那普利的测定方法。使用外标法定量分析，由于该方法条件下N-亚硝基依那普利有两个色谱峰，故结合组校准进行分析。N-亚硝基依那普利在0.5~20 ng/mL浓度范围内相关系数大于0.999，精确度在96.3~103.5%；加标回收实验中，分别考察了3个不同浓度的加标量，回收率为92.27~107.78%；重复性实验中，对不同浓度的标准溶液重复进样6次，面积RSD为1.17~1.99%，仪器精密度良好。该方法能满足依那普利中N-亚硝基依那普利的检测要求。

普萘洛尔中 N-亚硝基普萘洛尔的高分辨质谱法含量测定

摘要: 本文利用岛津超高效液相色谱-飞行时间质谱仪,建立了普萘洛尔中杂质N-亚硝基普萘洛尔的检测方法。亚硝基普萘洛尔在0.5~20 ng/mL浓度范围内,其相关系数大于0.999,精确度在91.7%~104.1%;对的标准工作溶液(n=6)进行重现性考察,保留时间RSD为0.08%,面积RSD为2.94%,仪器精密度良好。加标回收实验中,考察了线性最低点浓度0.5 ng/mL,回收率为96%~106%;该方法满足检测要求,同时采用了切阀的方式减少质谱的污染,可有效应对FDA发布的对于普萘洛尔药物产品中的亚硝胺类杂质N-亚硝基普萘洛尔的检测。

关键词: LCMS-Q-TOF N-亚硝基普萘洛尔 定量检测

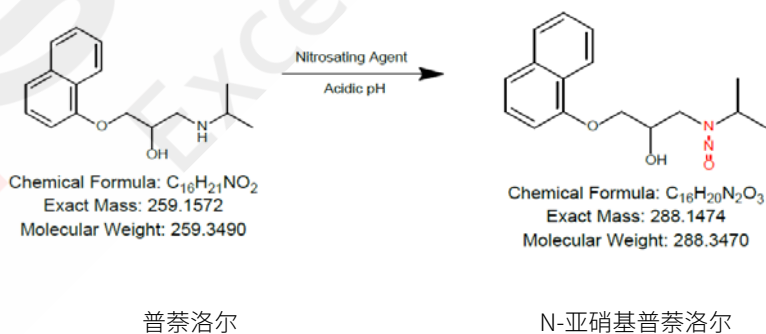
技术特点:

- ❖ 使用离子累积技术,可提高目标物灵敏度约 50 倍。
- ❖ LCMS-9050 高质量精度,有效避免其他离子干扰,提升杂质鉴定准确度。

普萘洛尔,又称心得安,是一种广泛应用于心血管疾病治疗的非选择性β受体阻滞剂。临床上用于治疗心律失常、心绞痛、高血压、嗜铬细胞瘤(手术前准备)等。

普萘洛尔分子中含有二级胺,在酸性条件下与亚硝酸盐反应时可形成亚硝胺类药物相关杂质(NDSRI)。因加拿大某普萘洛尔中的N-亚硝基普萘洛尔基因毒性杂质因亚硝胺水平超标被召回事件,再次得到各个国家的重视。FDA和 EMEA等监管机构均已发布指南,以控制有可能生成亚硝胺的药品中的亚硝胺杂质。

为帮助确保普萘洛尔药物产品和药物物质的安全和质量,本文建立了使用岛津四极杆飞行时间质谱联用仪检测普萘洛尔中N-亚硝基普萘洛尔的方法,用于确定是否存在普萘洛尔亚硝胺药物相关杂质。



1. 实验部分

1.1 仪器

岛津 LCMS-9050 超高效液相色谱四极杆飞行时间质谱联用仪,具体配置为:

系统控制器 : SCL-40

脱气机 : DGU-403

输液泵 : LC-40D XS × 2

柱温箱 : CTO-40C

自动进样器 : SIL-40C XS 质 谱 仪 : LCMS-9050

色谱工作站 : LabSolutions Ver. 5.120, Insight Ver. 4.0 SP2

1.2 分析条件

液相色谱条件

色 谱 柱 : Shim-pack GIS C18 (100 mm×4.6mm I.D, 3 μm)

岛津(上海)实验器材有限公司, P/N: 227-30096-29

流 动 相 : A: 0.1%甲酸水溶液; B: 0.1%甲酸甲醇溶液

进 样 体 积 : 50 μL 柱 温 : 40°C

流 速 : 0.5 mL/min

洗 脱 方 式 : 梯度洗脱, 初始浓度为 B 相 50 %, 时间程序见表 1。

表 1. 液相梯度时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.00	Pumps	Pump B Conc.	40
10.00	Pumps	Pump B Conc.	90
12.00	Pumps	Pump B Conc.	90
12.10	Pumps	Pump B Conc.	20
16.50	Controller	Stop	

质谱条件

离子化模式 : ESI+ 雾化气流速 : 2.5 L/min

接 口 电 压 : 4 kV 干燥气流速 : 10.0 L/min

接 口 温 度 : 250°C 加热气流速 : 5.0 L/min

D L 温 度 : 180°C 加热块温度 : 400°C

扫 描 模 式 : MRM, m/z: 289.1547 > 72.0813

M S 程 序 : 分析开始时分流阀选择进样侧, 具体切阀程序见表 2。

表 2. MS 程序

No.	时间	命令
1	0.000	分流阀: 流路切换 排液侧
2	9.000	分流阀: 流路切换 进样侧
3	10.500	分流阀: 流路切换 排液侧

1.3 校准品及样品制备

标准储备液: 准确称取 N-亚硝基普萘洛尔标准品 10 mg 于 100 mL 容量瓶中, 用甲醇溶液溶解, 配置浓度为 100 μg/mL 的 N-亚硝基普萘洛尔溶液。

标准中间液 A: 准确移取 500 μL 标准储备液于 250 mL 容量瓶中, 用超纯水定容, 得到浓度为 200 ng/mL 的 N-亚硝基普萘洛尔溶液。

标准中间液 B: 准确移取 500 μL 标准中间液 A 于 10 mL 容量瓶中, 用超纯水定容, 得到浓度为 10 ng/mL 的 N-亚硝基普萘洛尔溶液。

标准工作液和 QC 溶液: 准确移取 500 μL 标准中间液 B 于 10 mL 容量瓶中, 用超纯水定容, 得到浓度为 0.5 ng/mL 的 N-亚硝基普萘洛尔溶液。

校准曲线：以超纯水为溶剂，将标准中间液 B 逐级稀释至浓度为 0.5、1、2、5、10、20 ng/mL 的标准点，上机分析。

供试品溶液：将 10mg 规格普萘洛尔片剂样品 2 片，研磨粉碎，用超纯水 10 mL 溶解，摇匀，静置 10 min 后，取适量于塑料离心管中，离心 5 min 后，上清液过 0.22 μm 滤膜后上机。

2. 结果与讨论

2.1 离子累积技术 (UF-Accumulation)

不使用离子累积功能时，将进行连续离子流测定。使用此功能时，可以通过在 Q2 碰撞池内积累离子，使离子释放与正交加速单元的离子射出同步，从而提高离子的使用效率。如图 1 所示，使用离子累积技术时（即 ID 选项框不勾选），可以大幅度提高目标物的响应（提升约 50 倍），有利于定量分析。

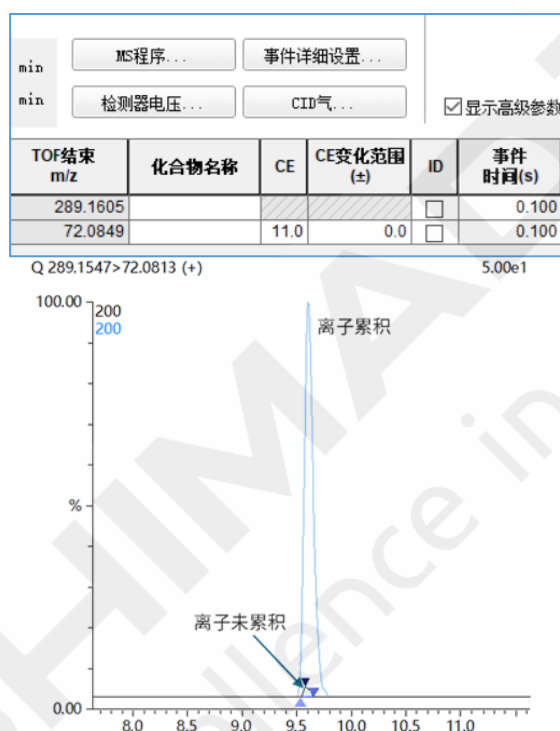


图 1. 离子累积模式的设置方式（上）以及两种模式对比图（下）

2.2 普萘洛尔主成分和杂质分离考察

N-亚硝基普萘洛尔 MS 色谱图及普萘洛尔 UV 色谱图如下所示。普萘洛尔样品保留时间为 2.678 min，3 min 后主成分可完全洗脱出。N-亚硝基普萘洛尔出峰时间为 9.650 min，方法中设置 9~12 min 内切阀进质谱，可避免普萘洛尔主成分对目标基因毒性杂质分析检测的影响。

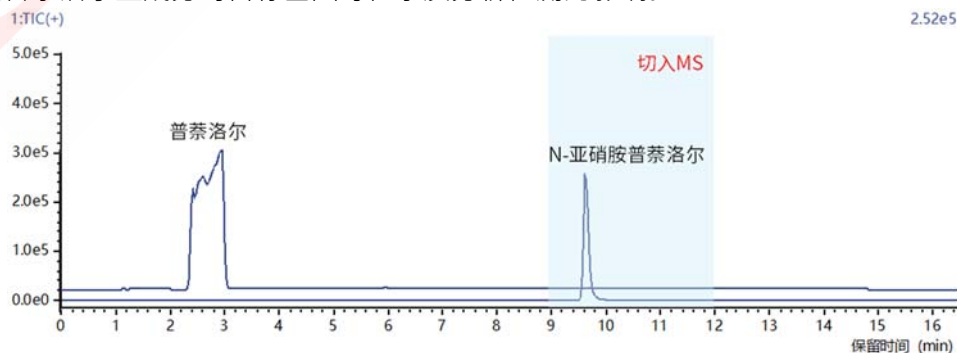


图 2. N-亚硝基普萘洛尔及制剂普萘洛尔色谱图

2.3 专属性

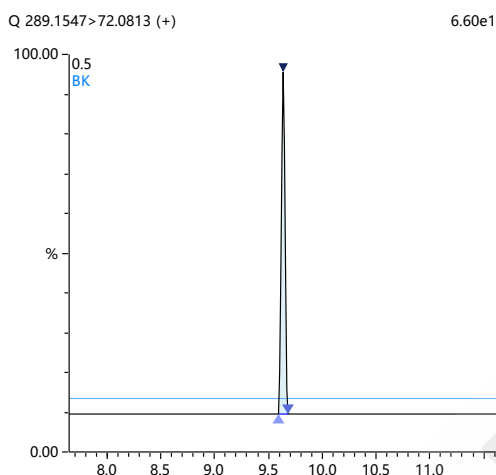


图 3. 溶剂空白和 0.5 ng/mL N-亚硝基普萘洛尔标准溶液 MRM 重叠色谱图

溶剂空白与标准溶液 MRM 重叠谱图显示，目标峰处未见明显干扰，专属性良好。

2.4 校准曲线

按照 1.3 项下配制方法，配制校准曲线浓度点对应的溶液。以化合物浓度为横坐标，色谱峰面积为纵坐标进行分析。N-亚硝基普萘洛尔在 0.5~20 ng/mL 浓度范围内相关系数大于 0.999，精确度在 94.4%~110.2% 之间，曲线结果如图 4 所示。

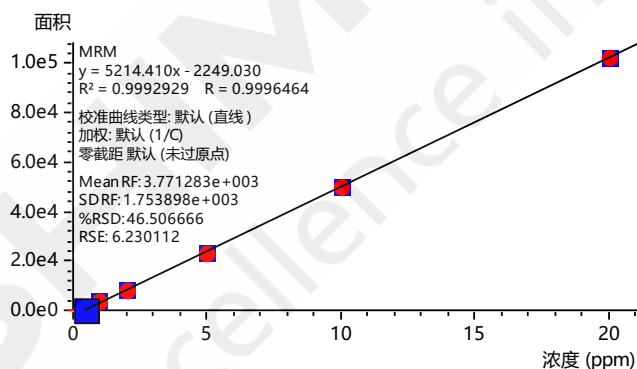


图 4. 校准曲线结果

2.5 精密度测定结果

对 0.5 ng/mL 标准工作溶液 (n=6) 进行重复性考察，计算重复性。结果如下所示。保留时间 RSD 为 0.13%，面积 RSD 为 2.94%，仪器精密度良好

表 3. 精密度测定结果 (RSD%)

化合物名称	保留时间	峰面积
N-亚硝基普萘洛尔	0.13	2.94

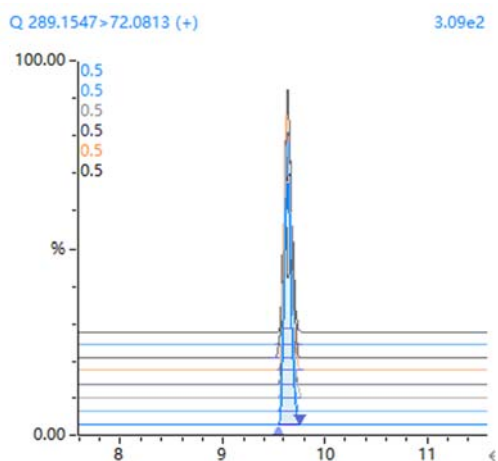


图 5. 精密度色谱图

2.6 加标回收率及实际样品测试

按照 1.3 项下配制方法，配制供试品溶液，并向样品中添加浓度为 0.5 ng/mL 的标准溶液，重复 3 次，进行加标回收率和精密度试验。供试品溶液中未检出 N-亚硝基普萘洛尔，加标回收率在 96%~106%之间。

表 4. 回收率分析结果

NO.	供试品浓度 (ng/mL)	加标测定浓度 (ng/mL)	回收率 (%)
1		0.49	98
2	N.D.	0.48	96
3		0.53	106

注 1: N.D.表示未检出

3. 结论

本文利用LCMS-9050四极杆飞行时间液质联用仪，建立了对普萘洛尔中N-亚硝基普萘洛尔的测定方法。使用MRM模式采集，外标法定量分析。N-亚硝基普萘洛尔在0.5~20 ng/mL浓度范围内相关系数大于0.999，精确度在94.4%~110.2%之间；加标回收实验中，考察了线性最低点浓度，回收率为96%~106%；重复性实验中，对0.5 ng/mL标准溶液重复进样，其保留时间RSD为0.08%，面积RSD为2.49%，仪器精密度良好。该方法能满足FDA发布的对于普萘洛尔药物产品中的亚硝胺类杂质N-亚硝基普萘洛尔的检测。

酒石酸伐尼克兰中 N-亚硝基伐尼克兰的高分辨质谱法含量测定

摘要: 本文使用岛津超高效液相色谱-飞行时间质谱仪测定戒烟药酒石酸伐尼克兰中 N-亚硝基伐尼克兰的含量。N-亚硝基伐尼克兰在 0.1~50 ng/mL 浓度范围内线性关系良好, 相关系数大于 0.999, 检出限为 0.011 ng/mL, 定量限为 0.040 ng/mL。三个不同浓度 N-亚硝基伐尼克兰对照溶液分别连续进样 6 针, 保留时间 RSD 在 0.13%~0.30% 范围内, 峰面积 RSD% 在 0.37%~2.96% 范围内。分别对原料药和制剂进行三个浓度水平加标, 加标回收率在 95.86~106.65% 范围内, 该方法灵敏度高, 重复性好, 专属性强, 能够有效的测定酒石酸伐尼克兰中 N-亚硝基伐尼克兰的含量。

关键词: 定量测定 N-亚硝基伐尼克兰 LCMS-QTOF

技术特点:

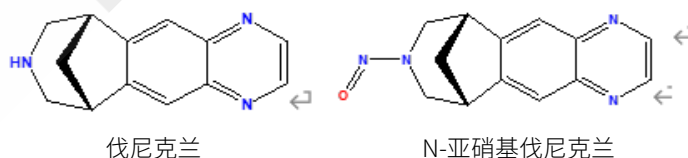
- ❖ LCMS-9050 高质量精度, 可有效避免其他离子干扰。
- ❖ 使用离子累积技术, 可提高目标物灵敏度约 30 倍, 灵敏度超过限量的 100 倍以上。

酒石酸伐尼克兰是一种高选择性的 $\alpha_4\beta_2$ 尼古丁乙酰胆碱受体部分激动剂, 可阻断尼古丁与受体的结合, 主要用于成人烟草的依赖性治疗, 是一类新型的戒烟药。

伐尼克兰分子中的仲胺结构与在制备过工程中的试剂、生产环境中引入微量的亚硝酸盐, 可形成亚硝胺类药物相关杂质 (NDSRI)。2021年7月, 美国食品药品监督管理局 (FDA) 发表声明召回部分批次规格的酒石酸伐尼克兰, 此次召回因为这些批次样品中检出 N-亚硝基伐尼克兰基因毒性杂质超过每日最大允许摄入量。随后, FDA 发布原料药和制剂中伐尼克兰 N-亚硝基 LC-ESI-HRMS 检出方法。

根据 EPA 的推荐, 在酒石酸伐尼克兰最大给药剂量 2 mg 情况下, N-亚硝基伐尼克兰的限度为 18.5 ppm。

本实验使用岛津超高效液相色谱-飞行时间质谱仪建立了测定酒石酸伐尼克兰中 N-亚硝基伐尼克兰含量的方法。可为相关从业人员提供参考。



1. 实验部分

1.1 仪器

岛津 LCMS-9050 超高效液相色谱四极杆飞行时间质谱联用仪, 配置信息如下:

系统控制器 : SCL-40

脱气机 : DGU-405

输液泵 : LC-40D X3×2 柱温箱 : CTO-40C
 自动进样器 : SIL-40C X3 质谱仪 : LCMS-9050
 色谱工作站 : Labsolutions Ver. 5.118 检测器 : SPD-M40

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱 : Shim-pack Velox C18 (100 mm x 2.1 mm I.D., 1.8 μm 岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N:227-32007-03)
 流动相 : A-0.1%甲酸水; B-0.1%甲酸甲醇;
 进样体积 : 5 μL 柱温 : 35°C
 流速 : 0.3 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 20%, 时间程序见表 1。

表 1. 流动相梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.00	Pumps	Pump B Conc.	20
6.00	Pumps	Pump B Conc.	80
9.50	Pumps	Pump B Conc.	80
10.00	Pumps	Pump B Conc.	100
11.00	Pumps	Pump B Conc.	100
11.10	Pumps	Pump B Conc.	20
15.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子化模式 : ESI (+) 雾化气流速 : 2.0 L/min
 接口电压 : 1.0 kV 干燥气流速 : 5 L/min
 接口温度 : 400°C 加热气流速 : 15.0 L/min
 加热块温度 : 200°C D L 温度 : 300°C
 扫描模式 : MRM, 具体参数见表2
 M S 程序 : 分析开始时分流阀选择排液侧, 具体切阀程序见表3。

表 2. MRM 参数

No.	中文名	CAS. No.	前体离子	产物离子	Q1 Pre (V)	CE
1	N-亚硝基伐 尼克兰	2755871-02-2	241.1084	211.110*	-20	-14
				169.0762	-20	-26

“*” 代表定量离子对

表 3. MS 程序

No.	时间	命令
1	3.500	分流阀: 流路切换 进样侧
2	6.000	分流阀: 流路切换 排液侧

1.3 标准品溶液配制

称取N-亚硝基伐尼克兰标准品适量用甲醇配制成100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准储备液。取适量标准储备液，使用甲醇配制成浓度为0.10 ng/mL 、1.00 ng/mL 、5.00 ng/mL 、10.00 ng/mL 、20.00 ng/mL 、50.00 ng/mL 的标准系列溶液。

1.4 样品前处理

(1) 原料药的前处理：精密称取适量酒石酸伐尼克兰原料药样品约48 mg，置入离心管中，加入50 mL 甲醇，涡旋使溶解，过膜，作为原料药供试品溶液。

(2) 成品药的前处理：取适量酒石酸伐尼克兰成品药片剂数片研磨至粉末，精密称取样品适量，用甲醇配制成伐尼克兰浓度为0.5 mg/mL 溶液，超声40 min，4500 rpm离心15 min，过膜，作为成品药供试品溶液。

2. 结果与讨论

2.1 离子累积技术 (UF-Accumulation)

离子累积技术是通过在Q2碰撞池内积累离子，使离子释放与正交加速单元的离子射出同步，提升离子的利用效率，从而可以显著提高灵敏度，离子累积过程原理示意图如图1所示。在进行药物中遗传毒素杂质测定时，杂质含量极低的情况下可能会对人体造成不可逆的损伤，因此，提高检测方法的灵敏度有助于对微量甚至痕量的杂质的准确定量。在本实验中如图2所示，通过对比是否使用离子累积功能（使用离子累计模式时即ID选项框不勾选），发现开启离子累计模式可以大幅度提高目标物的响应（提升约30倍），提升检测方法的灵敏度。

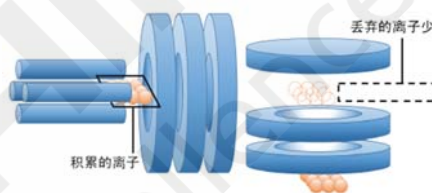


图 1. 离子累积过程原理

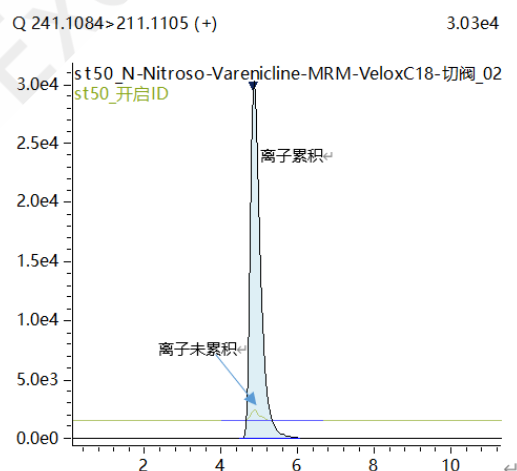


图 2. 离子累积模式的设置方式（上）以及两种模式对比图（下）

2.2 N-亚硝基伐尼克兰的标准溶液谱图及酒石酸伐尼克兰的 UV 图

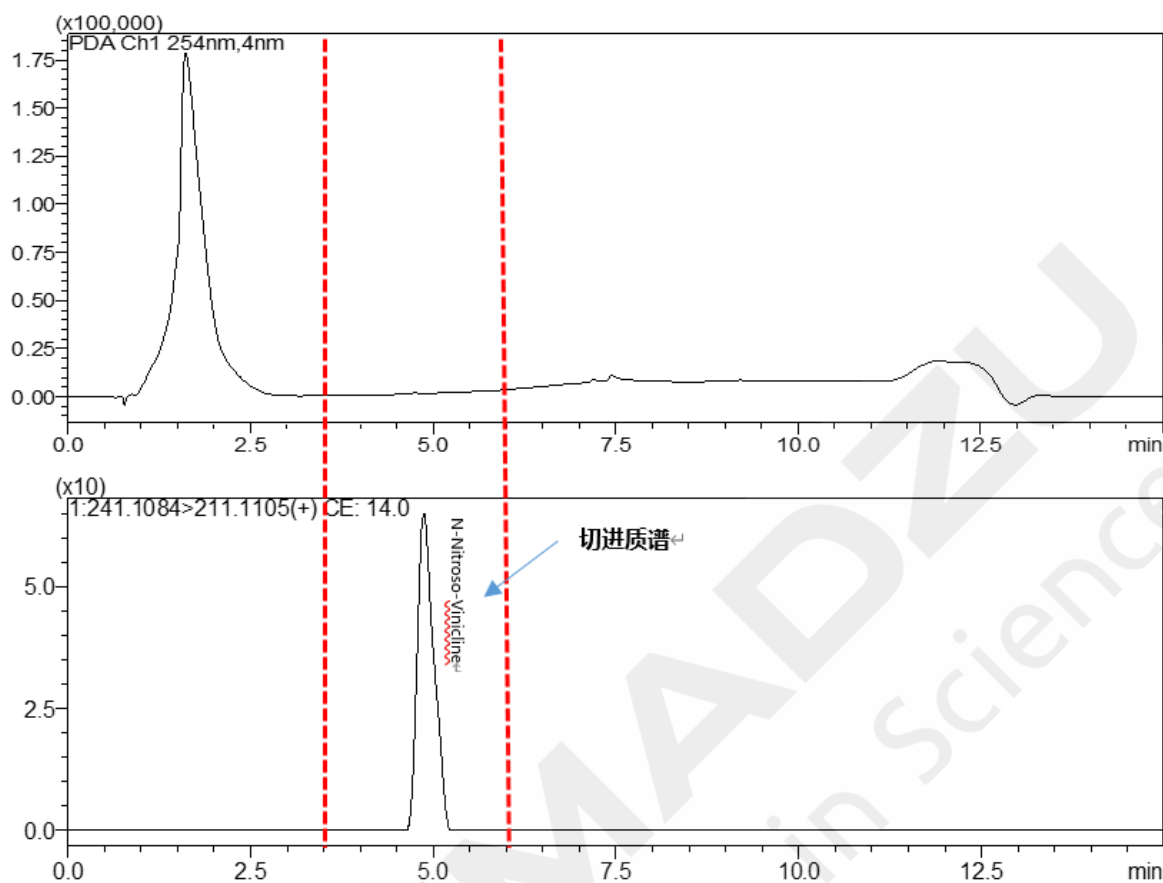


图3. 酒石酸伐尼克兰的UV色谱图（上）和0.1 ng/mL的N-亚硝基伐尼克兰杂质的MRM图（下）

为了避免高浓度的酒石酸伐尼克兰药物进入质谱，造成污染，实验中通过调整液相洗脱程序，实现N-亚硝基伐尼克兰与酒石酸伐尼克兰药物完全分离，如图3所示。通过Q-TOF标配的二位六通阀，将3.5 min~6 min切进质谱进行监控，可以有效的避免高浓度药物对质谱造成干扰。

2.3 校准曲线和检出限

按照1.2及1.3项下分析条件，标准系列溶液为0.10 ng/mL、1.00 ng/mL、5.00 ng/mL、10.00 ng/mL、20.00 ng/mL、50.00 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N-亚硝基伐尼克兰的浓度为横坐标，以N-亚硝基伐尼克兰峰面积为纵坐标，绘制校准曲线，如图4所示。N-亚硝基伐尼克兰在校准曲线浓度范围内线性关系良好，相关系数 r 大于0.999，各校准点准确度在94.4%-104.0%之间。根据N-亚硝基伐尼克兰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4所示。

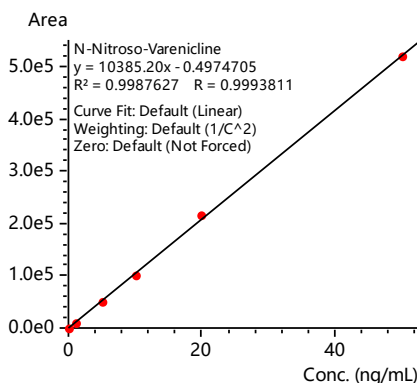


图4. N-亚硝基伐尼克兰的校准曲线

表 4. N-亚硝基伐尼克兰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)
N-亚硝基 伐尼克兰	$Y = (10385.2)X - 0.4974$	0.9994	94.4%-104.0%	0.011	0.040

2.4 重复性

取校准曲线低中高，三个不同浓度点对照溶液，连续进样6次，考察仪器的精密度，保留时间RSD在0.13%~0.30%范围内，峰面积RSD%在0.37%~2.96%范围内。具体结果见表5，仪器精密度良好。

表 5. 精密度结果 (n=6)

化合物名称	1.00 µg/mL		5.00 µg/mL		20.00 µg/mL	
	保留时间 RSD (%)	峰面积 RSD (%)	保留时间 RSD (%)	峰面积 RSD (%)	保留时间 RSD (%)	峰面积 RSD (%)
N-亚硝基伐尼克兰	0.30	2.96	0.15	3.50	0.13	0.37

2.5 实际样品及回收率测定

按照以上建立的方法对酒石酸伐尼克兰原料药及成品药进行测定，其色谱图如图5所示。根据酒石酸伐尼克兰原料药及成品药中N-亚硝基伐尼克兰的含量，向酒石酸伐尼克兰原料药分别加入含量为5.2 mg/kg、8.6 mg/kg、10.4 mg/kg的标准品，酒石酸伐尼克兰成品药分别加入含量为6.4mg/kg、8.0 mg/kg、9.6 mg/kg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95.86~106.65%范围内，RSD结果如表6所示。

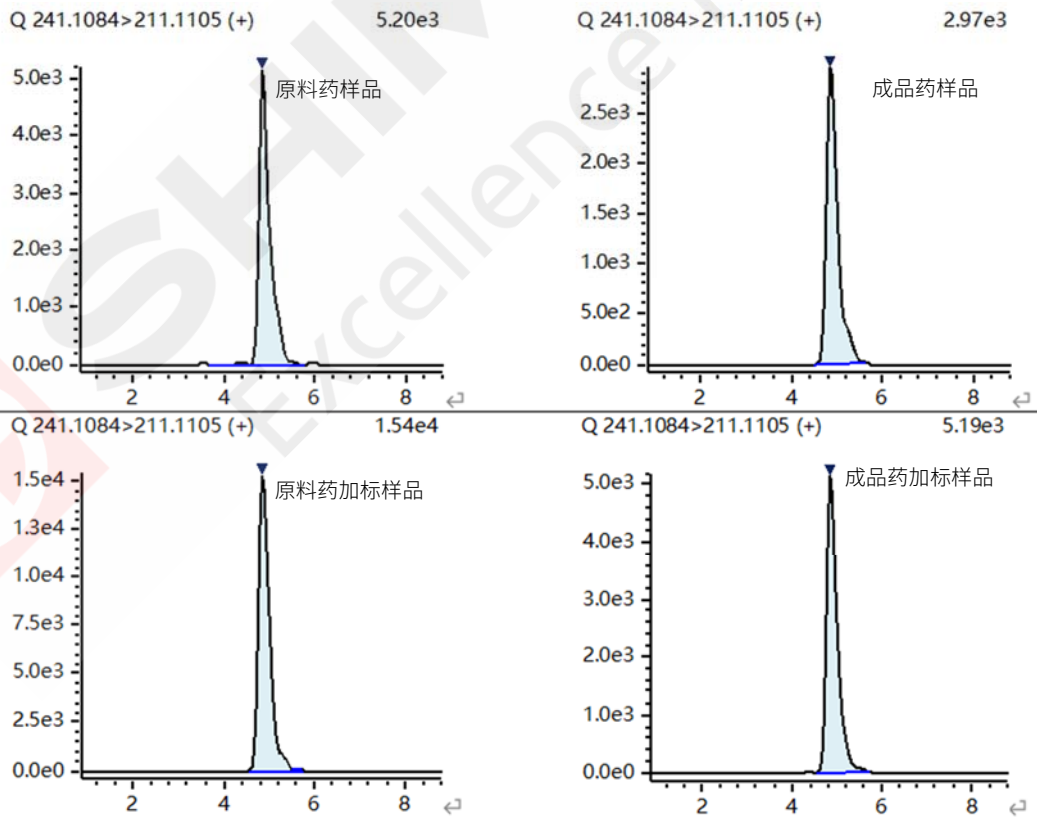


图 5. 样品及加标中 N-亚硝基伐尼克兰 MRM 色谱图

表 6. 不同浓度水平 N-亚硝基伐尼克兰回收率结果 (n=3)

样品类型	样品含量 mg/kg	加标后含量 mg/kg	加标量 mg/kg	回收率%	RSD%
酒石酸伐尼克兰 原料药	8.46	14.073	5.2	99.79	1.21
		18.458	8.6	106.65	0.78
		20.291	10.4	105.17	2.11
酒石酸伐尼克兰 成品药	7.75	14.06	6.4	98.58	0.48
		15.56	8.0	97.63	0.95
		16.96	9.6	95.86	1.34

3. 结论

本文使用岛津超高效液相色谱-飞行时间质谱仪建立了测定戒烟药酒石酸伐尼克兰中 N-亚硝基伐尼克兰的方法。结果显示：对 N-亚硝基伐尼克兰对照品溶液进行重复性测试，三个不同浓度 N-亚硝基伐尼克兰的保留时间及峰面积的 RSD 均小于 0.30%和 2.96%；使用 MRM 模式采集，进行外标法定量，其结果显示校准曲线相关系数大于 0.999。使用酒石酸伐尼克兰原料药及成品药作为加标基质，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 95.86~106.65%之间，实验结果表明，该方法前处理简单，专属性强，能够满足 N-亚硝基伐尼克兰的含量测定需要，可为相关从业人员提供参考。

喹那普利中 N-亚硝基喹那普利的高分辨质谱法含量测定

摘要：本文使用岛津超高效液相色谱-飞行时间质谱仪测定降压药喹那普利中 N-亚硝基喹那普利的含量。在 0.25~100 ng/mL 浓度范围内线性关系良好，相关系数大于 0.999，检出限为 0.055 ng/mL，定量限为 0.18 ng/mL。三个不同浓度 N-亚硝基喹那普利对照溶液分别连续进样 6 针，保留时间 RSD 在 0.055%~0.15% 范围内，峰面积 RSD% 在 1.40%~4.54% 范围内。三个浓度水平的加标回收率为 99.86~103.19%。该方法灵敏度高，重复性好，能够有效的测定降压药喹那普利中 N-亚硝基喹那普利的含量。

关键词：喹那普利 N-亚硝基喹那普利 LCMS-QTOF

技术特点：

- ❖ 使用离子累积技术，可提高目标物灵敏度 10 倍以上。
- ❖ 使用 Shim-pack C18-AQ 可以实现 N-亚硝基喹那普利的空间异构体分离。

喹那普利是血管紧张素转化酶（ACE）抑制剂，用于治疗高血压病。2022年3月21日，辉瑞主动召回了 3 款常用的降压药，其中包括盐酸喹那普利片剂以及两种授权仿制药，原因为药物中含有 N-亚硝基喹那普利的量高于人体每日可接受摄入量水平。

N-亚硝基喹那普利是属于亚硝胺类杂质，具有致癌性，根据EMA发布的法规说明，对尚无充分毒性数据的亚硝胺类化合物，可暂定每日最大摄入量不得超过 18 ng。依据喹那普利最大服用剂量 40 mg 计算，N-亚硝基喹那普利可接受限度为 0.45 ppm。

本文使用岛津超高效液相色谱-飞行时间质谱仪建立了测定降压药喹那普利中 N-亚硝基喹那普利含量的方法。可为相关从业人员提参考。

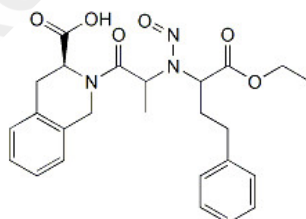


图 1. N-亚硝基喹那普利

1. 实验部分

1.1 仪器

岛津 LCMS-9050 超高效液相色谱四极杆飞行时间质谱联用仪，配置信息如下：

系统控制器：SCL-40

脱气机：DGU-405

输液泵 : LC-40D X3×2 柱温箱 : CTO-40C
 自动进样器 : SIL-40C X3 质谱仪 : LCMS-9050
 色谱工作站 : Labsolutions Ver. 5.118 检测器 : SPD-M40

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱 : Shim-pack GIST C18-AQ (100 mm×2.1 mm I.D., 1.9 μm, 岛津(上海)实验器材有限公司, P/N:227-30807-02)

流动相 : A-0.1%甲酸水; B-0.1%甲酸乙腈;

进样体积 : 10 μL 柱温 : 40°C

流速 : 0.3 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10%, 时间程序见表1。

表1. 流动相梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.00	Pumps	Pump B Conc.	55
6.50	Pumps	Pump B Conc.	60
7.50	Pumps	Pump B Conc.	95
9.00	Pumps	Pump B Conc.	95
9.10	Pumps	Pump B Conc.	10
12.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子化模式 : ESI+ 雾化气流速 : 2.0 L/min

接口电压 : +1.0 kV 干燥气流速 : 10.0 L/min

接口温度 : 300°C 加热气流速 : 10.0 L/min

D L 温度 : 250°C 加热块温度 : 400°C

扫描模式 : SIM (15 ppm), m/z: 468.2129

M S 程序 : 分析开始时分流阀选择排液侧, 具体切阀程序见表2。

表2. MS程序

No.	时间	命令
1	5.500	分流阀: 流路切换 进样侧
2	8.000	分流阀: 流路切换 排液侧

1.3 标准品溶液配制

称取N-亚硝基喹那普利标准品适量配制成100 μg/mL标准储备液。取适量标准储备液, 使用甲醇配制成浓度为0.25 ng/mL、0.50 ng/mL、1.00 ng/mL、2.00 ng/mL、5.00 ng/mL、20.00 ng/mL、100 ng/mL的标准系列溶液。

1.4 样品前处理

精密称取适量喹那普利原料药样品50 mg, 置入离心管中, 加入5 mL甲醇, 涡旋使溶解, 过滤, 作为供

试品溶液。

2. 结果与讨论

2.1 离子累积技术 (UF-Accumulation)

离子累积技术是通过在 Q2 碰撞池内积累离子，使离子释放与正交加速单元的离子射出同步，提升离子的利用效率，从而可以显著提高灵敏度，离子累积过程原理示意图如图 2 所示。在进行药物中遗传毒素杂质测定时，杂质含量极低的情况下可能会对人体造成不可逆的损伤，因此，提高检测方法的灵敏度有助于对微量甚至痕量的杂质的准确定量。在本实验中对谱图如图 4 所示，通过对比是否使用离子累积功能（使用离子累积模式时即 ID 选项框不勾选），发现开启离子累积模式可以大幅度提高目标物的响应（提升约 13 倍），提升检测方法的灵敏度。

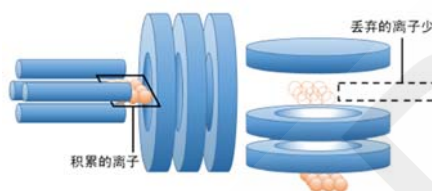


图 2. 离子累积过程原理



图 3. 离子累积模式的设置方式

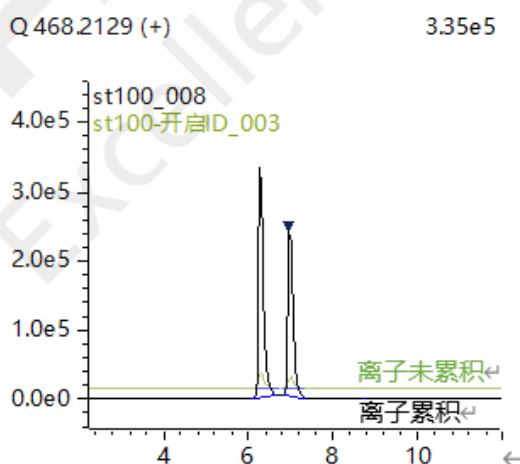


图 4. 两种模式对比图

2.2 不同采集方式对物质响应影响的比较

岛津LCMS-9050有几种常用的分析模式可供选择，分别是MS模式、MS/MS模式、SIM模式以及MRM模式等，主要的分析模式原理如表3所示。本实验分别采用MS模式、SIM模式以及MRM模式进行采集，考察不同采集模式下，N-亚硝基喹那普利的响应，采集或提取的m/z宽度为15ppm，响应结果如表4所示，通过比较可以看出使用SIM模式信噪比 (S/N) 比MS模式和MRM模式高，这是由于SIM模式只关注特定的离子，减

少了背景干扰，因而信噪比更好，而TOF的质量选择性高，也可以在SIM采集时在一定程度上减少基质干扰，因此，选择SIM模式作为分析模式。

表 3. 分析模式原理

分析模式	Q1 透射离子	TOF 获取范围
MS 模式	不依据 m/z	全范围
MS/MS 模式	仅特定 m/z	全范围
SIM 模式	不依据 m/z	仅特定 m/z
MRM 模式	仅特定 m/z	仅特定 m/z

表 4. 不同采集模式响应差异

采集模式	化合物名称	峰面积	峰高	S/N
MS 模式	N-亚硝基喹那普利 1	25282	3450	135.98
	N-亚硝基喹那普利 2	29896	3989	157.25
SIM 模式	N-亚硝基喹那普利 1	26331	3616	245.36
	N-亚硝基喹那普利 2	29134	3783	256.65
MRM 模式	N-亚硝基喹那普利 1	4443	803	36.30
	N-亚硝基喹那普利 2	4907	764	34.54

2.3 N-亚硝基喹那普利标准溶液谱图

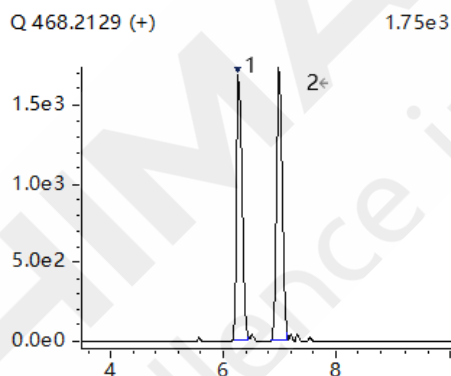


图5. N-亚硝基喹那普利标准溶液MRM色谱图 (0.5 ng/mL)

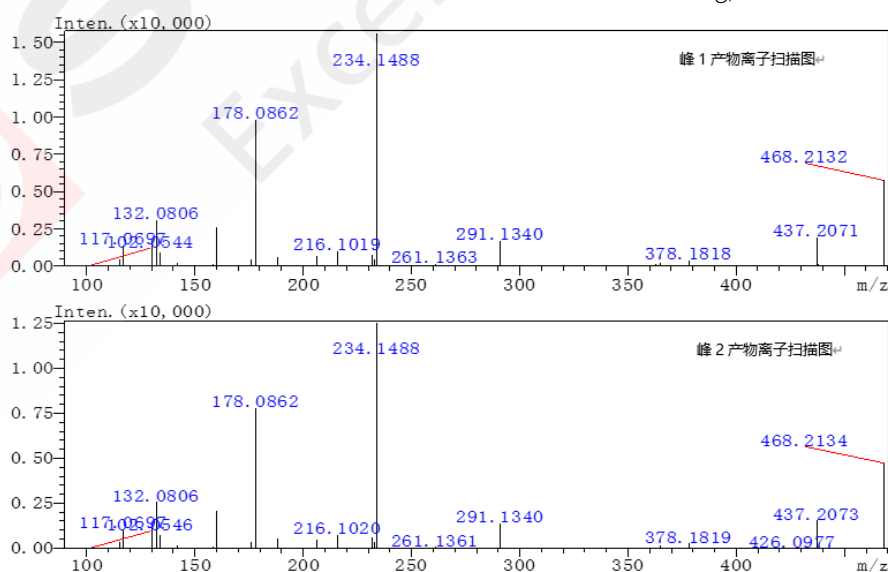


图6. 峰1及峰2的产物离子扫描图 (100 ng/mL)

对峰1、峰2进行产物离子扫描,发现二者的碎片离子基本一致,如图5、6所示,根据N-亚硝基喹那普利空间构型,因此,推断峰1和峰2可能为空间异构体,均为N-亚硝基喹那普利。

2.4 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0.25 ng/mL、0.50 ng/mL、1.00 ng/mL、2.00 ng/mL、5.00 ng/mL、20.00 ng/mL、100.00 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N-亚硝基喹那普利的浓度为横坐标,以N-亚硝基喹那普利两个异构体峰面积之和为纵坐标,绘制校准曲线。N-亚硝基喹那普利在校准曲线浓度范围内线性关系良好,相关系数 r 大于0.999,各校准点准确度在87.14%-106.85%之间。根据N-亚硝基喹那普利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5所示。

表 5. N-亚硝基喹那普利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)
N-亚硝基喹那普利	$Y = (45687.8)X - 246.89$	0.9999	87.14%-106.85%	0.055	0.18

2.5 重复性实验

取校准曲线低中高,三个不同浓度点对照溶液,连续进样6次,考察仪器的精密度,保留时间RSD在0.055%~0.15%范围内,峰面积RSD%在1.40%~4.54%范围内。具体结果见表6,仪器精密度良好。

表 6. 精密度结果 (n=6)

化合物名称	0.50 $\mu\text{g/mL}$		2 $\mu\text{g/mL}$		20 $\mu\text{g/mL}$	
	保留时间 RSD (%)	峰面积 RSD (%)	保留时间 RSD (%)	峰面积 RSD (%)	保留时间 RSD (%)	峰面积 RSD (%)
N-亚硝基喹那普利 1	0.14	4.54	0.064	2.51	0.059	1.54
N-亚硝基喹那普利 2	0.16	3.55	0.055	2.56	0.055	1.40

2.6 实际样品测定及准确度测定

按照以上建立的方法对喹那普利原料药进行测定,该样品中 N-亚硝基喹那普利的含量为 1.49 mg/kg。其色谱图如图 7 所示。

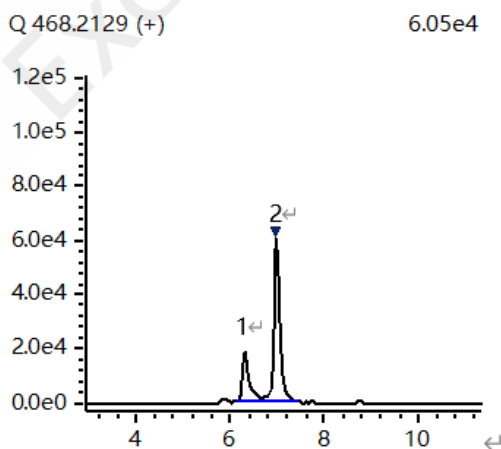


图 7. 样品中 N-亚硝基喹那普利 MRM 色谱图

根据喹那普利原料药中N-亚硝基喹那普利的含量，分别向喹那普利加入含量为1.2 mg/kg、1.5 mg/kg、2.0 mg/mL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99.86~103.19%范围内，RSD结果如表7所示。

表 7. 不同浓度水平 N-亚硝基喹那普利回收率结果 (n=3)

样品含量 mg/kg	加标后含量 mg/kg	加标量 mg/kg	回收率%	RSD%
1.49	2.715	1.2	102.02	3.43
	3.038	1.5	103.19	2.73
	3.487	2.0	99.86	2.33

3. 结论

本文使用岛津超高效液相色谱-飞行时间质谱仪建立了测定喹那普利中 N-亚硝基喹那普利的的方法。结果显示：对 N-亚硝基喹那普利对照品溶液进行重复性测试，三个不同浓度 N-亚硝基喹那普利的保留时间RSD 在 0.055%~0.15%范围内，峰面积 RSD%在 1.40%~4.54%范围内；以组校准方式进行外标法定量，其结果显示校准曲线相关系数大于 0.999。使用喹那普利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 99.86~103.19%之间，实验结果表明，该方法前处理简单，专属性强，能够满足 N-亚硝基喹那普利的含量测定需要，可为相关从业人员提供参考。

附录：本文集 NDSRIs 杂质检测应对一览表

#	药物	目标杂质	分析仪器	页码
1	伐尼克兰	N-亚硝基伐尼克兰	LC-MS/MS	8
2	Varenicline		LCMS-Q-TOF	70
3	依那普利	N-亚硝基依那普利	LC-MS/MS	12
4	Enalapril		LCMS-Q-TOF	61
5	喹那普利	N-亚硝基喹那普利	LC-MS/MS	17
6	Quinapril		LCMS-Q-TOF	76
7	布美他尼	N-亚硝基布美他尼	LC-MS/MS	22
8	Bumetanide		LCMS-Q-TOF	55
9	普萘洛尔	N-亚硝基普萘洛尔	LC-MS/MS	30
10	Propranolol		LCMS-Q-TOF	65
11	氯丙嗪 Chlorpromazine	N-亚硝基-去甲基氯丙嗪	LC-MS/MS	34
12	托莫西汀 Atomoxetine	N-(3-羟基-3-苯基丙基)-N-甲基亚硝胺、N-甲基-N-[3-苯基-3(邻甲基苯氧基)丙基]亚硝胺	LC-MS/MS	40
13	格列齐特 Gliclazide	N-亚硝基-3-氮杂双环[3,3,0]辛烷	LC-MS/MS	45
14	去甲替林 Nortriptyline	N-亚硝基去甲替林	LC-MS/MS	50

分析测试仪器客服热线电话: 800-810-0439
400-650-0439

本产品资料所宣传的内容,以本版本为准,资料中的试验数据除注明外均为本公司的试验数据。本资料所有信息仅供参考,如有变动恕不另行通知。

岛津企业管理(中国)有限公司 / 岛津(香港)有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

北京

北京市朝阳区朝外大街16号中国人寿大厦14层
邮政编码: 100020
电话: (010)8525-2310/2312 传真: (010)8525-2531

沈阳

沈阳市青年大街167号北方国际传媒中心11层
邮政编码: 110016
电话: 024-23255577 传真: (024)2325-5577

西安

西安市锦业一路56号研祥城市广场A座501
邮政编码: 710065
电话: 029-62737878 传真: (029) 6273-7879

乌鲁木齐

乌鲁木齐市中山路339号中泉广场14H座
邮政编码: 830002
电话: (0991)230-6271/6272 传真: (0991)230-6273

郑州

郑州市中原路220号裕达国际贸易中心A座20层2011室
邮政编码: 450007
电话: (0371)8663-2981/2983 传真: (0371)8663-2982

上海

上海市徐汇区宜州路180号华鑫慧享城B2栋
邮政编码: 200233
电话: (021)3419-3888 传真: (021)3419-3666

成都

成都市锦江区创意产业商务区三色路38号博瑞·创意成都写字楼
邮政编码: 610063 B座12层
电话: (028)8619-8421/8422 传真: (028)8619-8420

南京

南京市鼓楼区汉中路2号亚太商务楼27层B座
邮政编码: 210005
电话: (025)8689-0258 传真: (025)8689-0237

重庆

重庆市渝中区长滨路2号来福士A座601
邮政编码: 400011
电话: (023)6380-6057 传真: (023)6380-6551

武汉

武汉市武昌区临江大道96号武汉万达中心31层3112室
邮政编码: 430060
电话: (027) 5908-0488 传真: (027) 5908-0470

广州

广州市天河区高唐路230号广电智慧大厦
邮政编码: 510656
电话: (020) 3718-3888 传真: (020) 3718-3804

昆明

昆明市青年路432号天恒大酒店 908室
邮政编码: 650021
电话: (0871)6315-2986/2987 传真: (0871)6315-2991

深圳

深圳市南山区粤海街道高新南七道18号高新技术产业园区R3-B座一楼
邮政编码: 518057
电话: (0755)8340-2852 传真: (0755)8389-3100

长沙

湖南省长沙市芙蓉区解放西路188号国金中心T1大楼3115室
邮政编码: 410005

香港

香港九龙尖沙咀海洋中心1028室
SUITE 1028,OCEAN CENTRE,HARBOUR CITY,
TSIM SHA TSUI,KOWLOON,HONG KONG
电话: (00852)2375-4979 传真: (00852)2199-7438

株式会社 岛津制作所

604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1
电话: 81(75)823-1111 传真: 81(75)811-3188
URL: <http://www.shimadzu.com>

本书中所记载的公司名称、产品服务名称及商标均为株式会社岛津制作所
的注册商标或商标。本书中有未标明 TM 标志和 © 标志之处。
本书中所使用的其他公司的商号、商标的所有权非株式会社岛津制作所所有。