

LC-MS/MS 测定去甲替林中的 N- 亚硝基去甲替林

LCMSMS-1007

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。

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- 亚硝胺去甲替林的分析。
- ❖ 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。

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 μ m		
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 μ L		
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：	CoreSpray (+)	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
MRM 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。

■ 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。

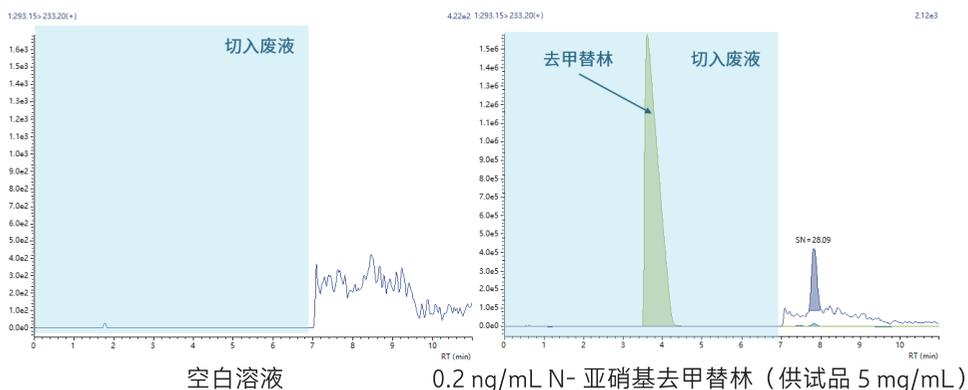


图 1 N- 亚硝基去甲替林定量限浓度点 MRM 色谱图

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，色谱峰面积为纵坐标进行分析，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%，曲线结果如下图 2 所示。

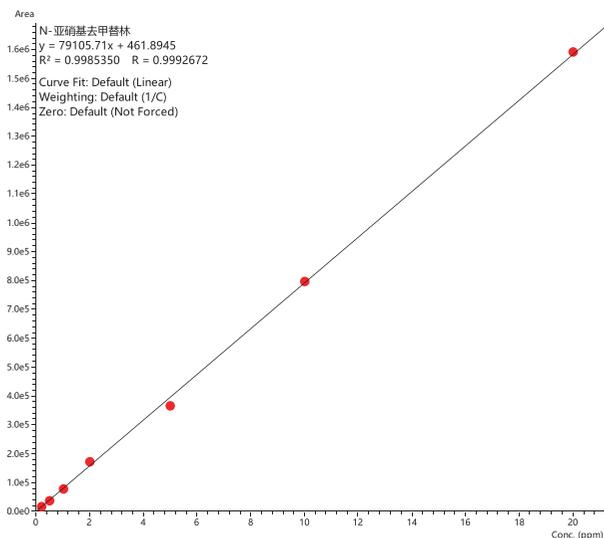


图 2 校准曲线结果

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 质控品分析结果

样品值 (ng/mL)	质控品	理论值 (ng/mL)	测定值 (ng/mL)	准确度 (%)
1.55	LQC	0.5	2.03	96.44
			2.06	102.24
			2.02	94.86
	MQC	2	3.79	111.96
			3.70	107.69
			3.73	109.31
	HQC	10	11.92	103.75
			11.78	102.30
			11.84	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 针考察精密度，结果如表 4 所示。

表 4 精密度测定结果

浓度	0.5 ng/mL (LQC)		2 ng/mL (MQC)		10 ng/mL (HQC)	
	保留时间 (min)	峰面积	保留时间 (min)	峰面积	保留时间 (min)	峰面积
1	7.816	34436	7.813	163102	7.814	768830
2	7.820	36850	7.815	162328	7.818	794029
3	7.811	35972	7.814	166191	7.818	784221
4	7.818	34340	7.817	166734	7.816	808568
5	7.814	35272	7.811	167786	7.810	821973
6	7.821	36577	7.820	167758	7.807	824854
平均值	7.817	35575	7.815	165650	7.814	800413
RSD(%)	0.05	3.00	0.04	1.43	0.06	2.75

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。

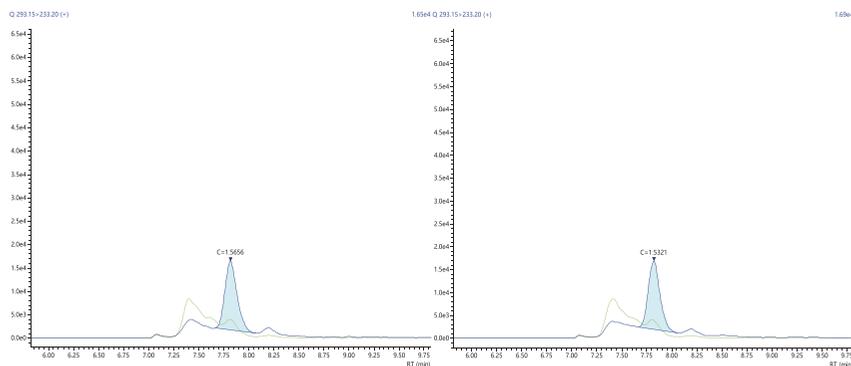


图 3 实际样品色谱图（左：样品 1；右：样品 2）

表 5 实际样品测定结果

序号	浓度 (ng/mL)
样品 1	1.5656
样品 2	1.5321

结论

本文利用岛津公司的 LCMS-8050 三重四极杆液质联用仪，建立了对去甲替林中药物基质亚硝酸杂质 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。

岛津应用云

