

LC-MS/MS 测定氯丙嗪片中 N-亚硝基 - 去甲基氯丙嗪含量

LCMSMS-991

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片剂中 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 0.096~0.103% 和 4.462~5.756% 之间，仪器精密度良好。样品加标回收率在 80.23~94.07% 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 0.008~0.089% 和 2.188~5.071% 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

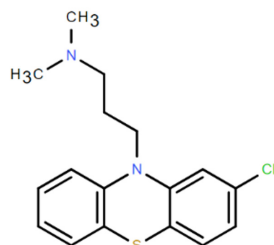
技术特点：

- ❖ 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。

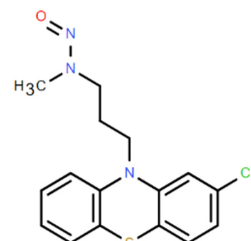
氯丙嗪作为一种吩噻嗪类药物，其药理作用包括多巴胺受体拮抗作用、组胺受体拮抗作用和抗胆碱作用。临床上通常以盐酸氯丙嗪的形式广泛应用于治疗精神病的治疗、镇吐、低温麻醉及人工冬眠等领域。

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 NDSRI（药物基质亚硝胺杂质）：N-亚硝基 - 去甲基氯丙嗪。NDSRI 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 (NDSRI) 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。



氯丙嗪



N-亚硝基 - 去甲基氯丙嗪

实验部分

1.1 仪器

输液泵：LC-40DXS ×2
脱气机：DGU-405
自动进样器：SIL-40CX5
柱温箱：CTO-40S

系统控制器：CBM-40
质谱仪：LCMS-8050 三重四极杆质谱
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 GISS HP-C18 (100 mm x 2.1 mm I.D., 3 μm)
岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N: 227-30084-02

流 动 相 : A 相 - 0.05% 甲酸水溶液; B 相 - 乙腈

流 速 : 0.3 mL/min 进 样 体 积 : 2 μL

柱 温 : 30°C 洗 脱 方 式 : 梯度洗脱, 初始 55%B,
Oven Valve 2 初始状态为 0

表 1 时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.50	Pumps	Pump B Conc.	55
1.51	Pumps	Pump B Conc.	100
2.80	Oven	Oven Valve 2	1
3.40	Oven	Oven Valve 2	0
3.50	Pumps	Pump B Conc.	100
3.51	Pumps	Pump B Conc.	55
5.50	Controller	Stop	

其中: Oven Valve 2 的 1 代表接入质谱端; Oven Valve 2 的 0 代表废液端

质谱条件

离 子 源 : ESI (+) D L 温 度 : 200°C

接 口 电 压 : 1 kV 加 热 块 温 度 : 400°C

雾 化 气 : 氮气 3.0 L/min 接 口 温 度 : 350°C

干 燥 气 : 氮气 10.0 L/min 扫 描 模 式 : MRM

加 热 气 : 空气 10.0 L/min MRM 参 数 : 见表 2

碰 撞 气 : 氦气 扫 描 方 式 : 正离子扫描

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- 去甲基氯丙嗪	55855-44-2	332.80 >303.10*	-18.0	-16.0	-15.0
			332.80 >246.10	-26.0	-19.0	-17.0
			332.80 >214.15	-24.0	-35.0	-16.0
2	氯丙嗪	50-53-3	318.90 >86.20*	-12.0	-21.0	-17.0
			318.90 >214.10	-16.0	-44.0	-23.0
			318.90 >246.10	-16.0	-26.0	-12.0

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 尼龙滤头: 购于津腾。

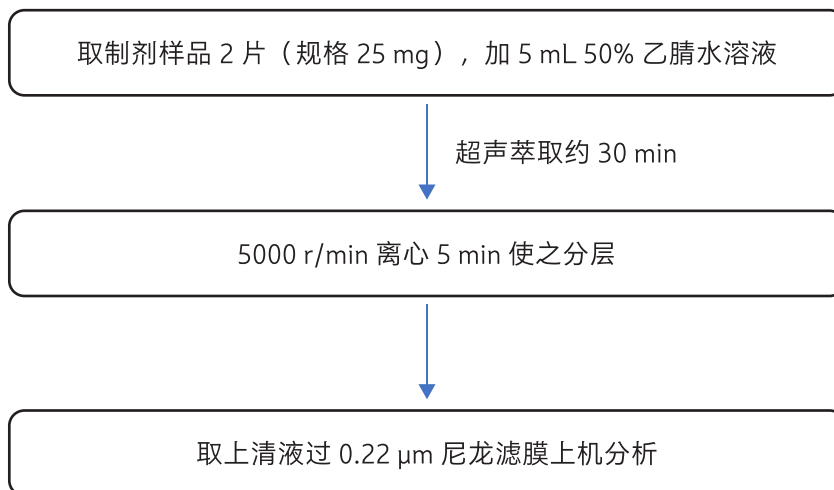
1.4 校准曲线的制备

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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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：



■ 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：

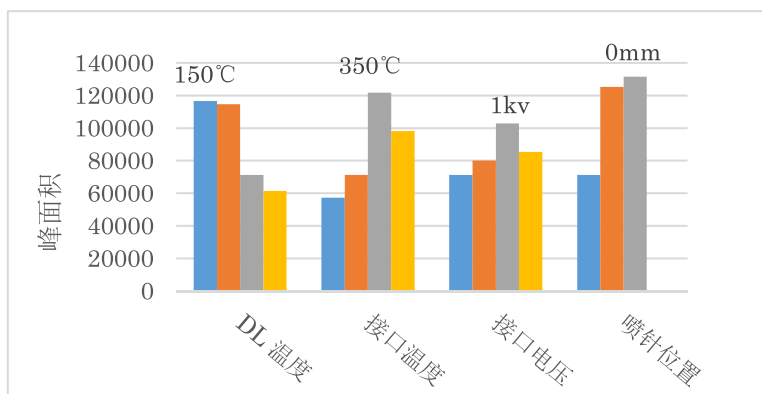


图 1 质谱参数优化

结果显示，接口温度为 350 $^{\circ}\text{C}$ ，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 $^{\circ}\text{C}$ 和 200 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 。

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。

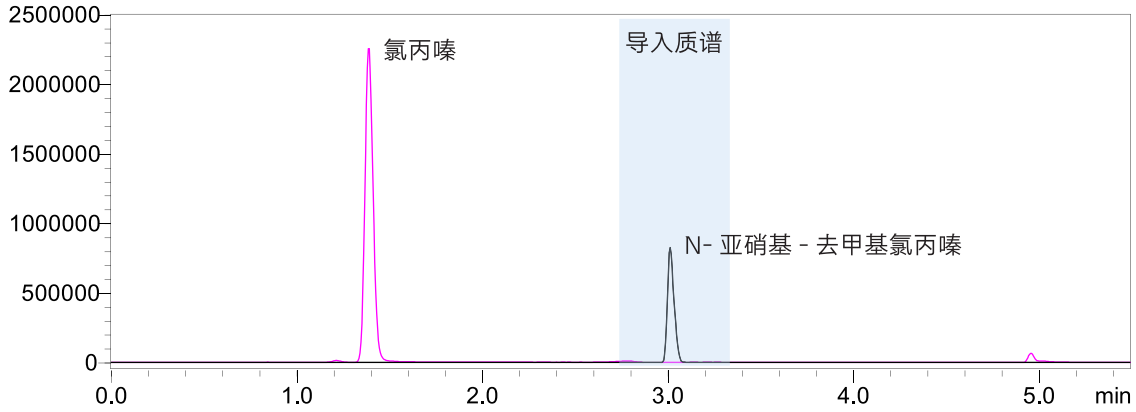


图2 原料药与杂质 TIC 色谱图 (50 ng/mL)

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。

Q 332.80>303.10 (+) 1.66e2

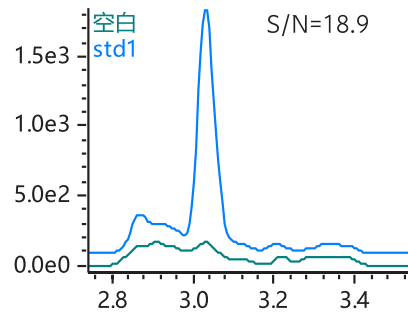


图3 N-亚硝基-去甲基氯丙嗪 (0.1 ng/mL) 标准品与空白溶剂 MRM 色谱图

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。

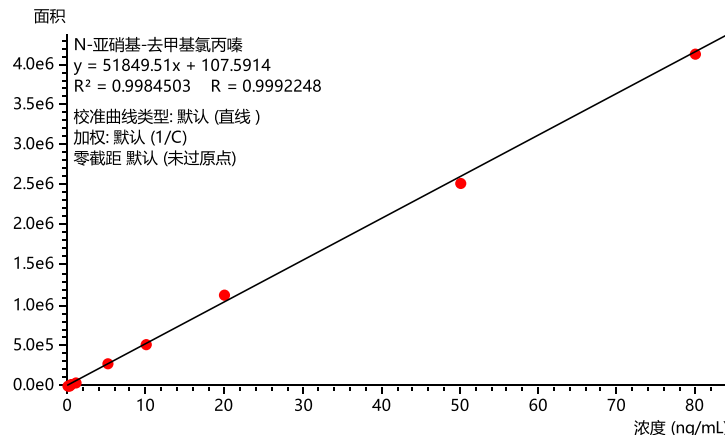


图4 目标物的校准曲线

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。

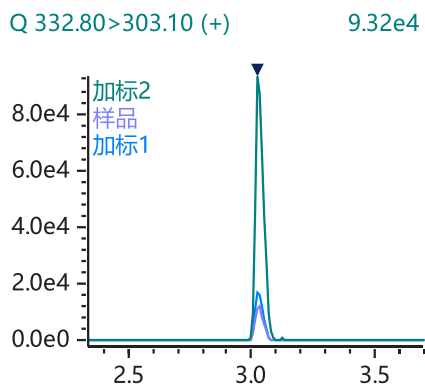


图5 片剂样品及加标色谱图

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。

■ 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酸胺杂质 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。

岛津应用云

