

LCMS-QTOF 法测定戒烟药酒石酸伐尼克兰中 N-亚硝基伐尼克兰的含量

LCMS-QTOF-102

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：

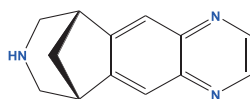
- ❖ LCMS-9050 高质量精度，可有效避免其他离子干扰。
- ❖ 使用离子累积技术，可提高目标物灵敏度约 30 倍，灵敏度超过限量的 100 倍以上。

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。

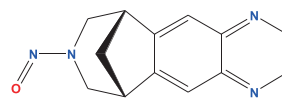
伐尼克兰分子中的仲胺结构与在制备过工程中的试剂、生产环境中引入微量的亚硝酸盐，可形成亚硝胺类药物相关杂质 (NDSRI)。2021 年 7 月，美国食品药品监督管理局 (FDA) 发表声明召回部分批次规格的酒石酸伐尼克兰，此次召回因为这些批次样品中检出 N-亚硝基伐尼克兰基因毒性杂质超过每日最大允许摄入量。随后，FDA 发布原料药和制剂中伐尼克兰 N-亚硝基 LC-ESI-HRMS 检出方法。

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。



伐尼克兰



N-亚硝基伐尼克兰

■ 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- 亚硝胺伐尼克兰	2755871-02-2	241.1084	211.110* 169.0762	-20 -20	-14 -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 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 0.10 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。

■ 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體造成不可逆的损伤，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。

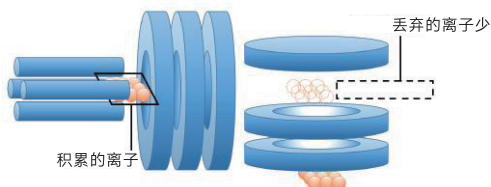


图 1 离子累积过程原理

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 (±)	ID	事件时间 (s)	脉冲
1	+	MRM(Ch1)	0.000	15.000	241.1084	211.1105	211.1063	211.1147	N-Nitroso-Varenicline	14.0	0.0	<input type="checkbox"/>	0.150	
1	+	MRM(Ch2)	0.000	15.000	241.1084	169.0762	169.0728	169.0796	N-Nitroso-Varenicline	26.0	0.0	<input type="checkbox"/>	0.150	

Q 241.1084>211.1105 (+) 3.03e4

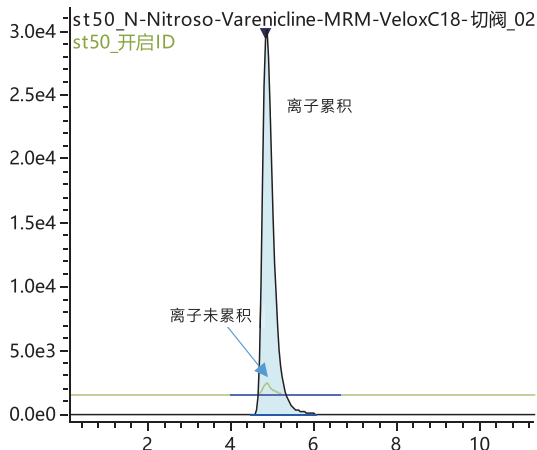


图 2 离子累积模式的设置方式（上）以及两种模式对比图（下）

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

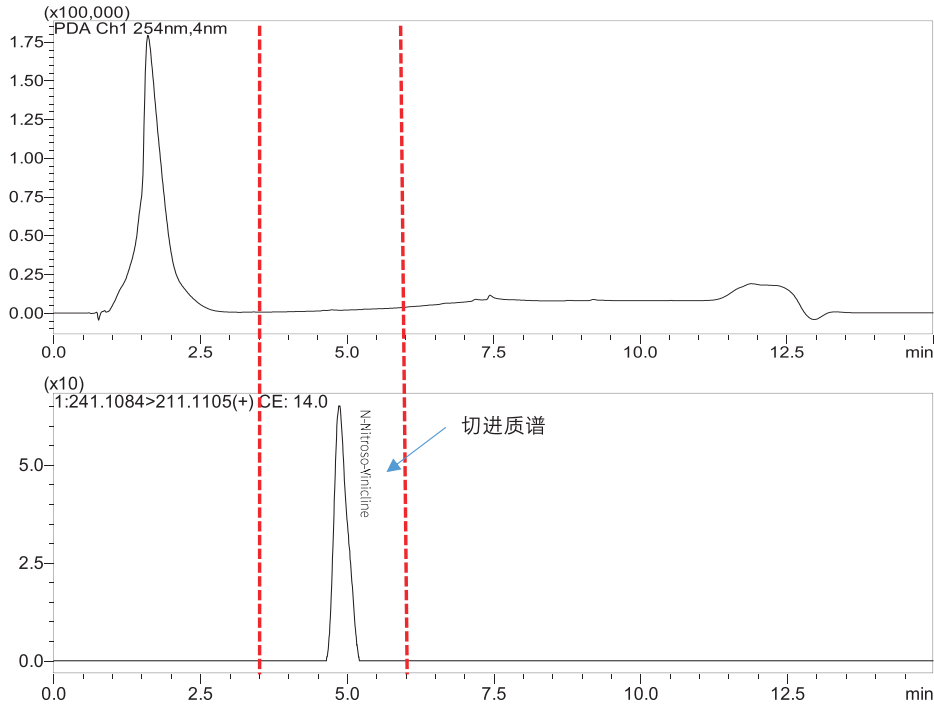


图3 酒石酸伐尼克兰的UV色谱图(上)和0.1 ng/mL的N-亚硝基伐尼克兰杂质的MRM图(下)

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。

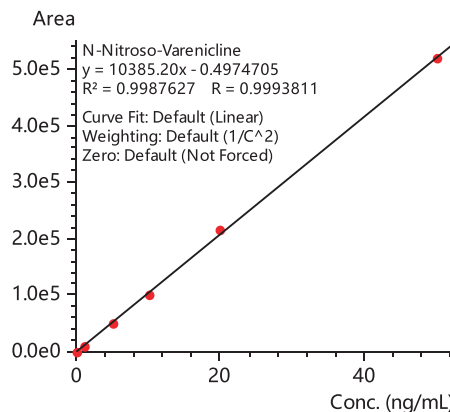


图4 N-亚硝基伐尼克兰的校准曲线

图 4 N-亚硝基伐尼克兰的校准曲线

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 6.4 mg/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。

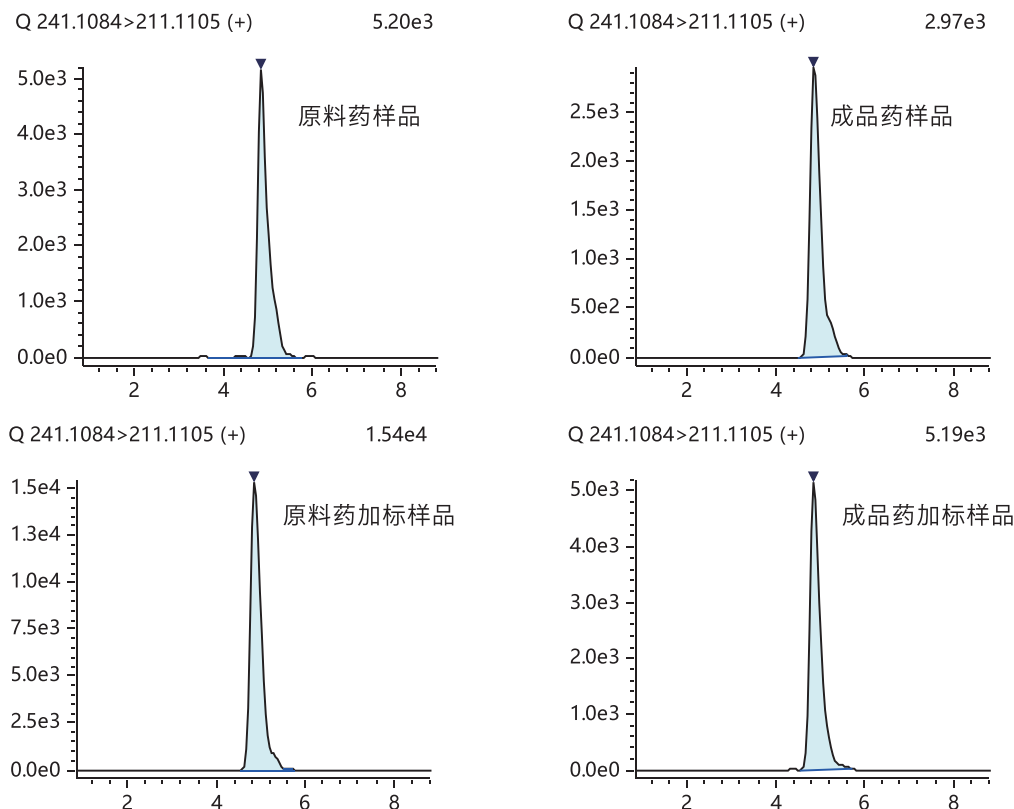


图 5 样品及加标中 N-亚硝基伐尼克兰 MRM 色谱图

表 6 不同浓度水平 N- 亚硝基伐尼克兰添加回收率结果 (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

■ 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- 亚硝基喹那普利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。

岛津应用云

