

# LC-MS/MS 用于普萘洛尔中 N- 亚硝基普萘洛尔的测定

LCMSMS-952

**摘要：** 本文使用岛津三重四极杆液质联用仪建立了普萘洛尔中 N- 亚硝基普萘洛尔杂质的测定方法。方法学实验表明，N- 亚硝基普萘洛尔在 0.1-20 ng/mL 范围内线性良好，相关系数大于 0.999；灵敏度高，定量限为 0.03 ng/mL；0.2 ng/mL 低浓度的标准品溶液，连续进样 6 次，保留时间 RSD 为 0.045%，峰面积的 RSD 为 1.68%，表明仪器精密度良好；N- 亚硝基普萘洛尔在 50%、100% 和 150% 限度值加标回收率均大于 93%，相对标准偏差 < 3.78%，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- 亚硝基普萘洛尔

## 技术特点：

- ❖ 灵敏度高，定量下限至 0.03 ng/mL，优于目前法规 0.5 ng/mL 检测要求。
- ❖ 耐用性好，基于 RX 离子源离子聚焦功能，喷针位置 +4 mm 不降低灵敏度，提高质谱抗污染能力。

普萘洛尔是一种  $\beta$  受体激动剂，临床上主要用于治疗心律失常、高血压和心绞痛。

近两年，NDSRI（药物基质亚硝胺杂质）逐渐进入监管部门的管控名单，对药物本身参与的亚硝胺杂质类型进行检测。2023 年，FDA 发布药物基质亚硝胺杂质允许摄入量设定指南《Recommended Acceptable Intake Limits for Nitrosamine Drug-Substance-Related Impurities (NDSRIs) Guidance for Industry》，为业界关注的 NDSRI 杂质阈值含量

的设定做出了关键性的指导。

目前，N- 亚硝基普萘洛尔杂质的检测手段主要为三重四极杆串联质谱法、高分辨液质联用法。本文使用岛津三重四极杆液质联用仪 LCMS-8045RX，基于其稳健的离子源性能，建立了普萘洛尔中 N- 亚硝基普萘洛尔杂质含量测定方法，该方法前处理简便，灵敏度高，稳定性好，可用于普萘洛尔中基因毒性杂质 N- 亚硝基普萘洛尔的含量测定，供相关实验人员参考使用。

## 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-8045RX。具体配置为：

系统控制器：	SCL-40	在线脱气机：	DGU-405
输液泵：	LC-40BX3	质谱仪：	LCMS-8045RX
自动进样器：	SIL-40CX3	色谱工作站：	LabSolutions Version 5.128
柱温箱：	CTO-40S		

### 1.2 分析条件

液相色谱条件：

色谱柱：Shim-pack GIST C18 (100 mm × 2.1 mm I.D., 2  $\mu$ m),  
岛津（上海）实验器材有限公司，P/N:227-30001-04

流动相：A 相 -0.1% 甲酸水；B 相 -0.1% 甲酸甲醇

流速：0.4 mL/min 进样体积：10  $\mu$ L

柱温：40°C 洗脱方式：梯度洗脱

洗脱方式：B 相初始浓度为 50%，时间程序见表 1

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
5.00	Pumps	Pump B Conc.	50
6.00	Oven	Oven Valve 1	0*
7.00	Pumps	Pump B Conc.	100
9.00	Pumps	Pump B Conc.	100
9.01	Pumps	Pump B Conc.	5
10.00	Oven	Oven Valve 1	1
13.00	Controller	Stop	

\* 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
接口电压：	2 kV	聚焦电压：	0.5 KV
喷针位置：	+4 mm	加热模块温度：	400°C
雾化气流速：	3.0 L/min	接口温度：	300°C
加热气流速：	10.0 L/min	干燥气流：	10.0 L/min
扫描模式速：	多反应监测 (MRM)	MRM 参数：	见表 2

表 2 MRM 参数

No.	中文名称	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-Nitrosopropranol	84418-35-9	289.00	145.00	-14.0	-10.0	-15.0
					72.10*	-30.0	-17.0	-27
2	普萘洛尔	Propranol	/	260.20	116.00	-15	-35	-15

注：\* 表示定量离子

1.3 标准品及样品制备

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。

校准曲线配制: 以纯水为溶剂, 将标准中间液逐级稀释至浓度为 0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20 ng/mL 的标准点, 上机分析。

样品前处理: 将 10 mg 规格普萘洛尔片剂样品 4 片, 研磨粉碎, 用 50% 甲醇水 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。

■ 结果讨论

2.1 喷针位置对灵敏度影响

考察了不同的喷针位置 0 mm ~+ 7 mm, 常规 ESI 源、RX 源、NX 源之间的 5 ng/mL 标准溶液的质谱响应, 如下图 1 所示。

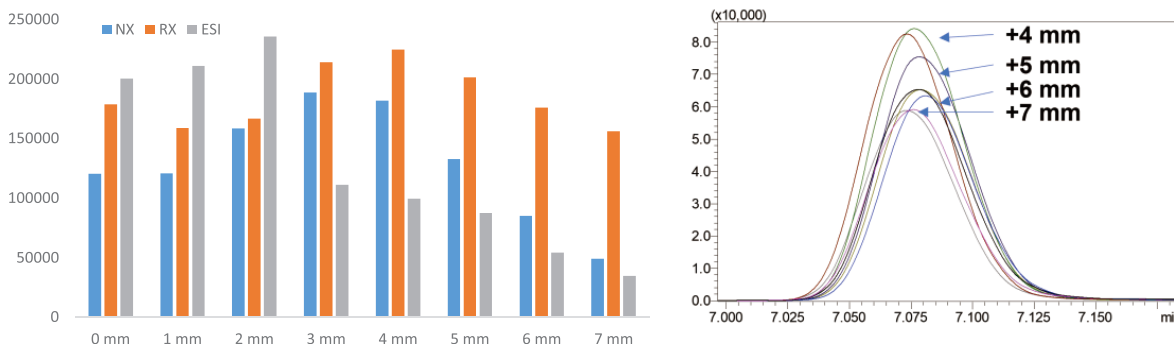


图 1 不同离子源喷针位置质谱响应 (左图) 和 RX 离子源不同位置 MS 色谱图 (右图)

由图 1 可知, 1) 不同离子源具有不同最优喷针位置: NX 同 RX 类似, 在 +3, +4 mm 处, 响应最高, 常规 ESI 在 +2 mm 处有最高响应; 2) 不同离子源喷针位置对质谱响应不同: 随着喷针位置远离 DL 入口, RX 与 NX 离子源类似, 响应强度降低较小, 以 +5 mm 位置处响应降低情况为例: RX 离子源较最大响应值降低 30.6%, NX 为 29.7%, 常规 ESI 为 62.9%。在复杂基质检测中, 满足检测灵敏度前提下, 可调整合适的喷针水平位置, 提升抗污染能力。

## 2.2 接口电压和聚焦电压对灵敏度影响

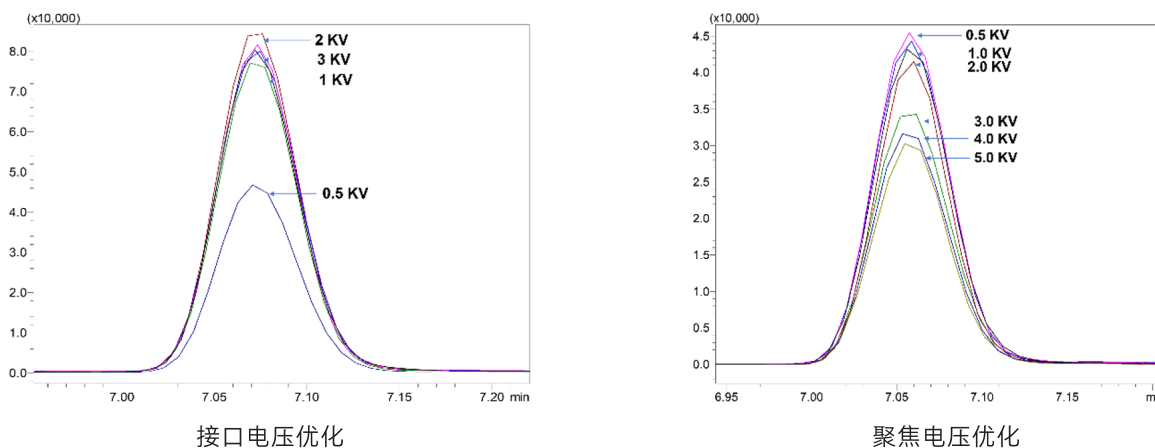


图 2 RX 离子源接口电压和聚焦电压优化

通过对接口电压的优化, 接口电压在 1 KV 以上时, 响应较稳定, 当降至 0.5 KV 时, 响应降低 50%, 基于响应值, 选择 0.5 KV 作为最终的接口电压。质谱响应随着聚焦电压值的增加, 整体呈现降低的趋势, 超过 2 KV, 响应会有明显降低, 最终选择 0.5 KV 作为 N- 亚硝基普萘洛尔最终的聚焦电压进行质谱检测。

## 2.3 Peakintelligence™ 自动积分模式

Peakintelligence™ 为基于 AI 大模型建立的自动化积分方式, 相较传统积分, 无需繁琐的积分参数设定, 即可得到合理的积分结果。如下图 3 所示, 同传统积分结果比较。

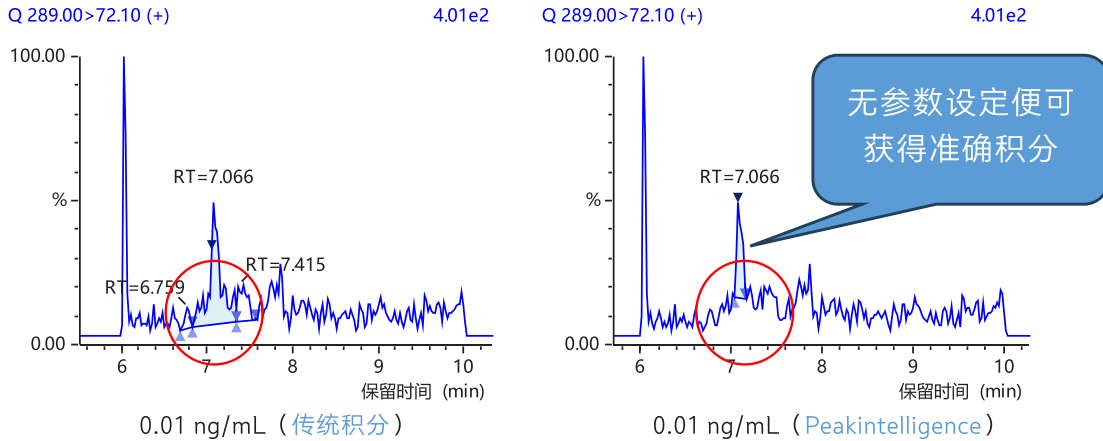


图3 不同积分算法下的色谱图积分比对

## 2.4 方法学考察

### 2.4.1 分离度考察

普萘洛尔样品在色谱条件下，保留时间为 1.463 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 7.053 min, 方法中设置 6.0 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 4 所示。

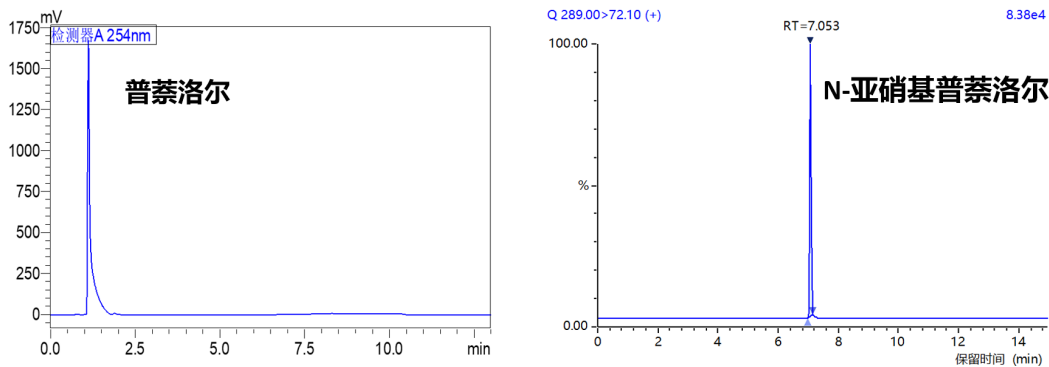


图4 普萘洛尔 UV (样品) 及 N- 亚硝基普萘洛尔 (10 ng/mL) 色谱图

### 2.4.2 专属性考察

溶剂空白与 0.2 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。

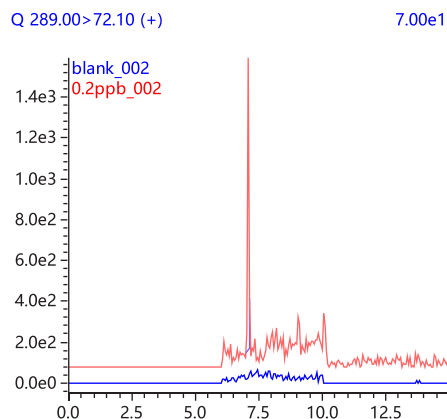


图5 溶剂空白和 0.2 ng/mL N- 亚硝基普萘洛尔标准溶液 MRM 重叠色谱图

### 2.4.3 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 0.1~20 ng/mL 浓度范围内线性良好，相关系数大于 0.999。

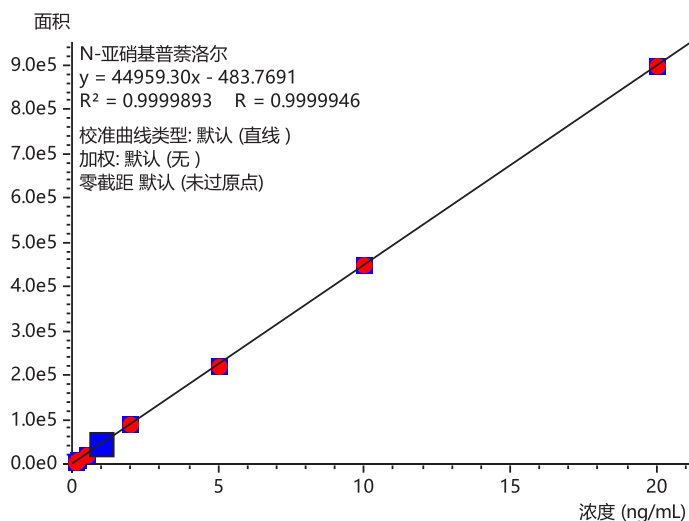


图 6 N- 亚硝基普萘洛尔校准曲线

### 2.4.4 定量限和检出限

参考中国药典 2020 版《9101 分析方法验证指导原则》，定量限检出限的确定，采用信噪比方法，以信噪比约为 3:1 和 10:1 时对应浓度对照品溶液注入仪器，得到定量限为 0.03 ng/mL，检出限为 0.01 ng/mL，如下图 7 所示。

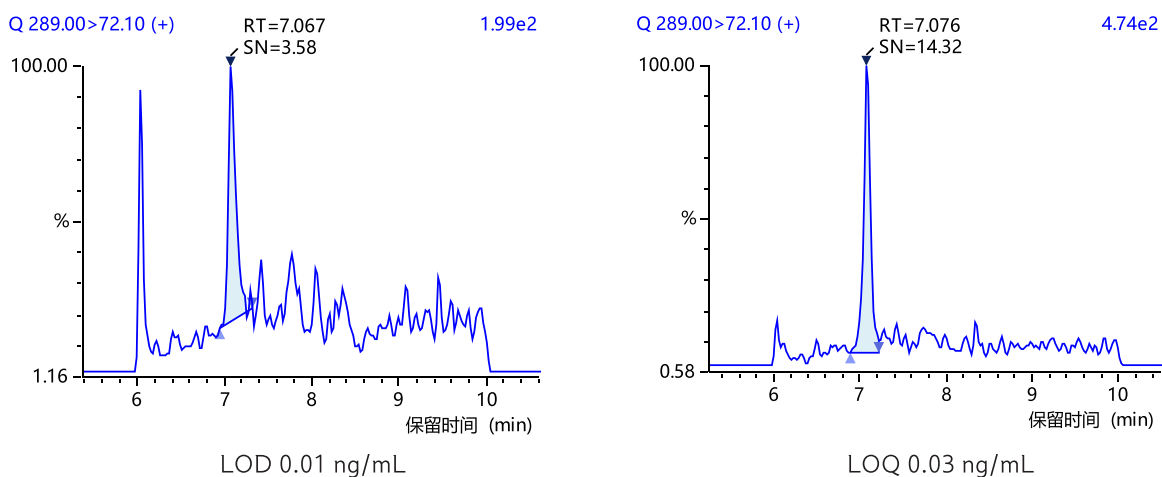


图 7 检出限 (LOD) 0.01 ng/mL 和定量限 (LOQ) 0.03 ng/mL 色谱图

### 2.4.5 精密度实验

对 0.2 ng/mL 低浓度的标准溶液连续分析 6 次，计算保留时间和峰面积的 RSD。保留时间 RSD 为 0.045%，峰面积的 RSD 为 1.68%，仪器精密度良好。

表 3 N-亚硝基普萘洛尔重复性结果 (n=6)

No.	测试浓度 (ng/mL)	保留时间 (min)	保留时间 RSD%	峰面积	峰面积 RSD%
1	0.2	7.078	0.045	9,369	1.68
2	0.2	7.079		9,636	
3	0.2	7.072		9,783	
4	0.2	7.071		9,674	
5	0.2	7.073		9,806	
6	0.2	7.073		9,770	

#### 2.4.6 加标回收率实验

取某品牌普萘洛尔 10 mg 规格片剂 4 片 (40 mg)，按照 1.3 前处理方式进行处理，样品中有检出 N-亚硝基普萘洛尔物质，3 次重复检测平均值为 0.4 mg/kg。根据 EMA 对亚硝胺类物质 18ng/天的最大摄入量要求，N-亚硝基普萘洛尔可接受的限度为 0.45 mg/kg，按照限度要求的 50%、100% 和 150% 进行加标，结果如下表 4 所示。

表 4 N-亚硝基普萘洛尔加标回收和精密度结果 (n=3)

化合物	样品含量 (mg/kg)	添加量 (mg/kg)	实测浓度 (mg/kg)	平均回收率 (%)	相对标准偏差 RSD%
N-亚硝基普萘洛尔	0.4	50% (0.113)	0.510	98.81	1.54
			0.513		
			0.511		
		100% (0.225)	0.608	93.04	3.78
			0.614		
			0.606		
		150% (0.338)	0.739	99.51	3.29
			0.737		
			0.731		

## ■ 结论

本文使用岛津超高效液相色谱 - 三重四极杆质谱联用仪 LCMS-8045RX 建立了检测普萘洛尔药物中 N-亚硝基普萘洛尔的检测方法：1) 基于离子源离子聚焦的功能，优化了喷针位置，在 +4 mm 处，N-亚硝基普萘洛尔响应最高，喷针位置远离可提高仪器的耐用性和抗污染能力；2) 离子源接口电压和聚焦电压的优化可提高 N-亚硝基普萘洛尔的响应；3) 方法学表明：该方法分离度和专属性良好，灵敏度高，加标回收准确，可以用于相关行业的质量控制及分析检验工作。

岛津应用云

