

LCMS-QTOF 用于普萘洛尔中 N- 亚硝基普萘洛尔的测定

LCMS-QTOF-095

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) 和 QC 溶液 (n=2) 进行重现性考察，保留时间 RSD 为 0.13%，面积 RSD 为 10%，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：

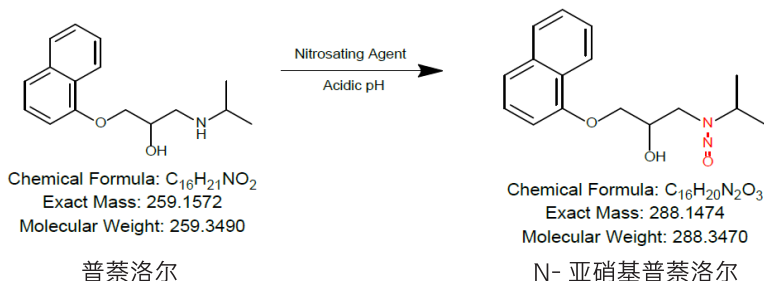
- ❖ 使用离子累积技术，可提高目标物灵敏度约 50 倍。
- ❖ LCMS-9050 高质量精度，有效避免其他离子干扰，提升杂质鉴定准确度。

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。



■ 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.	50
10.00	Pumps	Pump B Conc.	100
12.00	Pumps	Pump B Conc.	100
12.10	Pumps	Pump B Conc.	50
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- 亚硝胺普萘洛尔标准品 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。

■ 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。

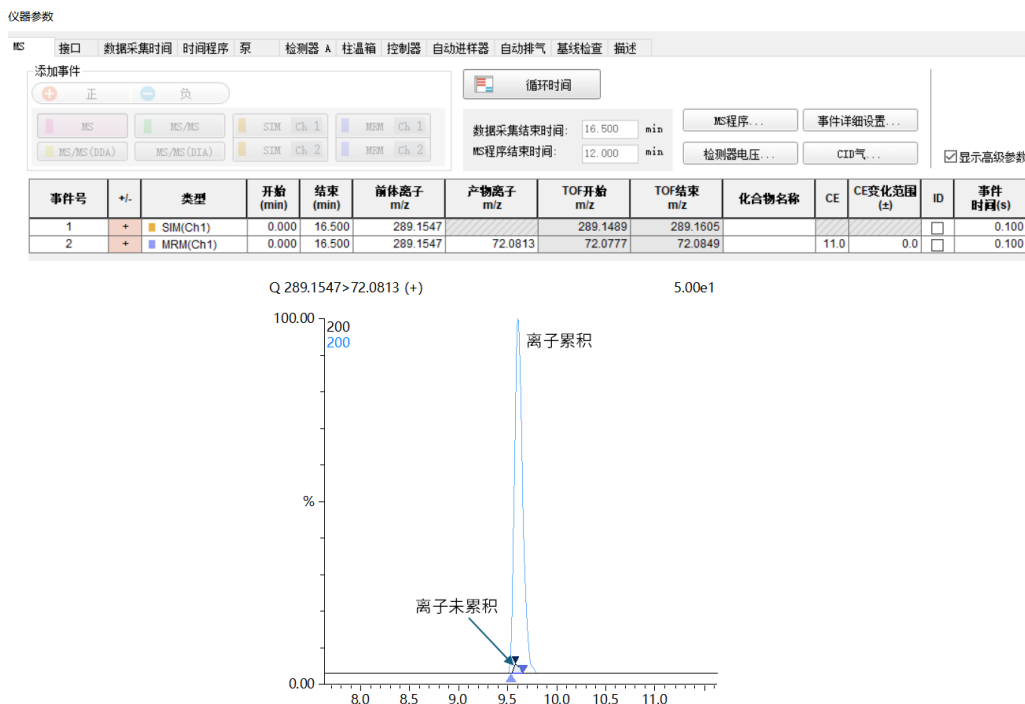


图 1 离子累积模式的设置方式（上）以及两种模式对比图（下）

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。

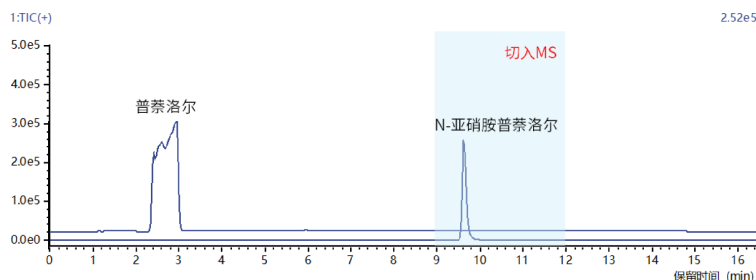


图 2 N-亚硝基普萘洛尔及制剂普萘洛尔色谱图

2.3 专属性

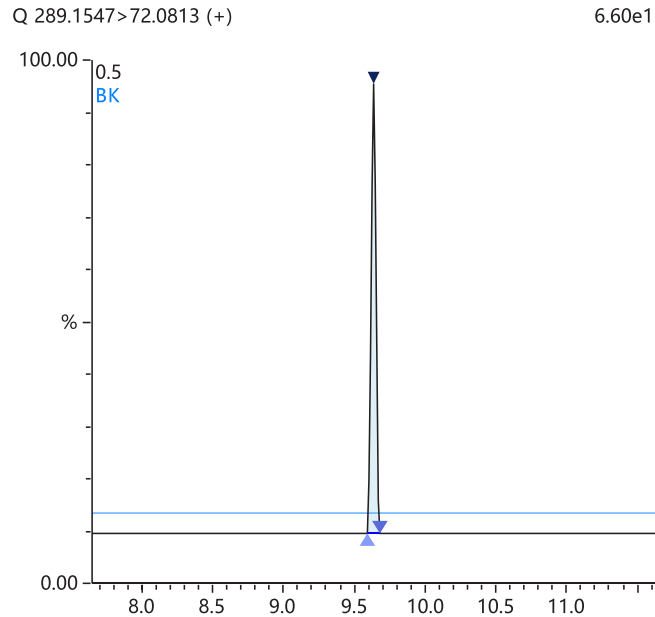


图3 溶剂空白和 0.5 ng/mL N-亚硝胺普萘洛尔标准溶液 MRM 重叠色谱图

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。

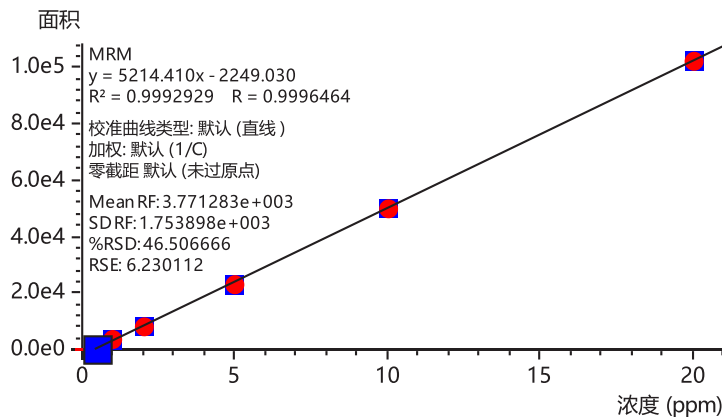


图4 校准曲线结果

2.5 精密度测定结果

对标准工作溶液 (n=6) 和 QC 溶液进行重复性考察，计算重复性。结果如下所示。

表 3 精密度测定结果 (n=6)

No.	名称	保留时间	峰面积
1	REP-1	9.631	14488
2	REP-2	9.631	14340
3	REP-3	9.628	13868
4	REP-4	9.639	14875
5	REP-5	9.640	15083
6	REP-6	9.619	14427
7	QC-1	9.604	1452
8	QC-2	9.621	1235
	RSD-1%*	0.08	8
	RSD-2%*	0.13	10

* 注：RSD-1% 为标准工作溶液重复进 6 针的重现性；RSD-2% 指标准工作溶液和 QC 溶液的重现性。

Q 289.1547>72.0813 (+) 3.09e2

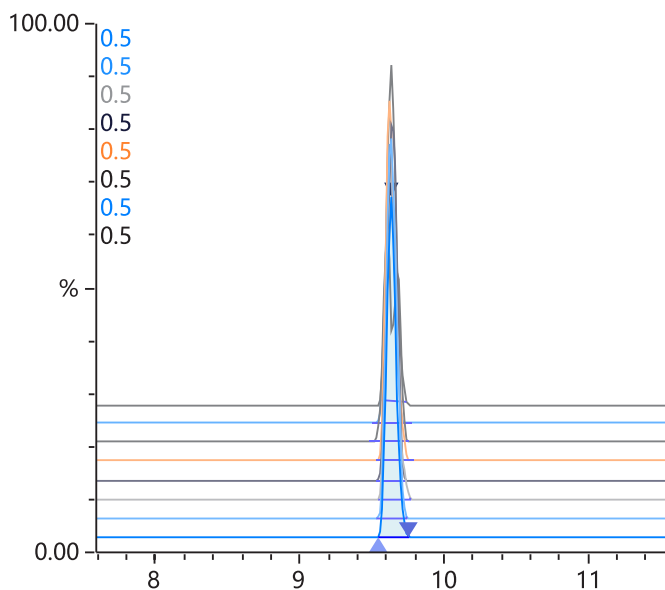


图 5 重现性和 QC 叠加图

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 加标样品分析结果

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

■ 结论

本文利用岛津公司的 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 标准溶液和 QC 溶液重复进样，其保留时间 RSD 为 0.13%，面积 RSD 为 10%，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。

岛津应用云

