

LC-MS/MS 测定布美他尼中亚硝基布美他尼含量

LCMSMS-941

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布美他尼原料药中亚硝基布美他尼含量的方法。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 > 0.998，检出限 0.058 ng/mL，定量限 0.175 ng/mL。取三个不同浓度的标准液按分析条件分别连续进样 7 次，保留时间和峰面积的 RSD 分别在 0.008~0.069% 和 2.386~5.396% 之间，仪器精密度良好。样品加标回收率在 97.00~103.24% 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 0.057~0.172% 和 0.933~7.162% 之间，符合 FDA 推荐检测方案要求。岛津全新 LCMS-8045RX 系统性能良好，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 布美他尼 亚硝基布美他尼

技术特点:

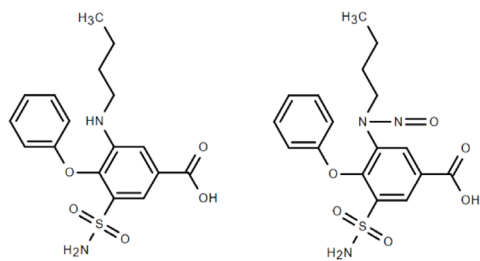
- ❖ 8 min 即可完成样品的准确定量，较 FDA 推荐检测方案检测效率更高；
- ❖ 线性最低浓度为 0.2 ng/mL，低于 FDA 推荐检测方案的 1 ng/mL，灵敏度更高；
- ❖ 使用全新 RX 系列 LC-MS/MS 检测，化合物响应对喷针水平位置敏感度有所降低，稳定性有所提升，在灵敏度和稳健性之间取得了平衡。

布美他尼是间氨基苯磺酰胺的衍生物，属强效利尿药。广泛用于治疗心力衰竭、肝病、肾脏病水肿。主要用于各种顽固性水肿及急性肺水肿。对急慢性肾功能衰竭病人尤为适宜。

因其结构中含有二级胺结构，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）及亚硝基布美他尼。此类杂质具有致癌性或致突变性风险，且已经引发多个药物的召回。USP 在其亚硝基布美他尼杂质的研究指引中使用高分辨质谱对其进行了定量，方法检测限 (LOD) = 0.5 ppm。定量限 (LOQ) = 1.0 ppm。

本文利用岛津全新 LCMS-8045RX 三重四极杆

液质联用仪，建立了原料药中的亚硝基布美他尼的检测方法。经过方法学验证，结果表明该分析方法可准确、快速测定原料药中亚硝基布美他尼量，可供相关检测人员参考。



布美他尼

亚硝基布美他尼

实验部分

1.1 仪器

输液泵 : LC-40B×2
脱气机 : DGU-403
自动进样器 : SIL-40C
柱温箱 : CTO-40S

系统控制器 : CBM-40
质谱仪 : LCMS-8045RX 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 Velox SP-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: 227-32001-03
流 动 相 : A-0.1% 甲酸水 +5 mM 乙酸铵溶液; B- 甲醇
流 速 : 0.4 mL/min 进 样 体 积 : 2 μL
柱 温 : 40°C
洗 脱 方 式 : 梯度洗脱, 初始 20%B, FCV 初始状态为 0

表 1 时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.50	Pumps	Pump B Conc.	20
3.00	Oven	OvenValve	1
4.35	Oven	OvenValve	0
5.00	Pumps	Pump B Conc.	95
6.00	Pumps	Pump B Conc.	95
6.01	Pumps	Pump B Conc.	20
8.00	Controller	Stop	

其中: OvenValve 的 1 代表接入质谱端; OvenValve 的 0 代表废液端

质谱条件

离子源 : ESI (+)	D L 温 度 : 250°C
接口电压 : 4 kV	加 热 块 温 度 : 450°C
雾化气 : 氮气 3.0 L/min	接 口 温 度 : 350°C
Qarray RF : 使用调谐文件	聚 焦 电 压 : 2 KV
干燥气 : 氮气 3.0 L/min	扫 描 模 式 : MRM
加热气 : 空气 18.0 L/min	MRM 参 数 : 见表 2
碰撞气 : 氩气	扫 描 方 式 : 正离子扫描 (ESI+)

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	亚硝基布美他尼	2490432-02-3	394.00>364.20*	-20.0	-12.0	-27.0
			394.00>321.10	-11.0	-16.0	-22.0
			394.00>240.10	-11.0	-24.0	-25.0
2	布美他尼	28395-03-1	364.90>240.20*	-18.0	-16.0	-26.0
			364.90>284.20	-18.0	-14.0	-20.0
			364.90>348.10	-18.0	-14.0	-25.0

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 聚醚砜滤头: 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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，用甲醇稀释成浓度为 0.2、0.5、1、5、10、50、100 ng/mL 七个浓度的系列标准溶液，现用现配。

1.5 样品前处理

称取原料药用甲醇溶解并配置成 1 mg/mL 样品溶液，过 0.22 μm 滤头后上机检测。

■ 结果与讨论

2.1 方法优化

以 100 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、加热块温度；（2）雾化气、加热气、干燥气的流速；（3）聚焦的电压。优化结果见图 1：

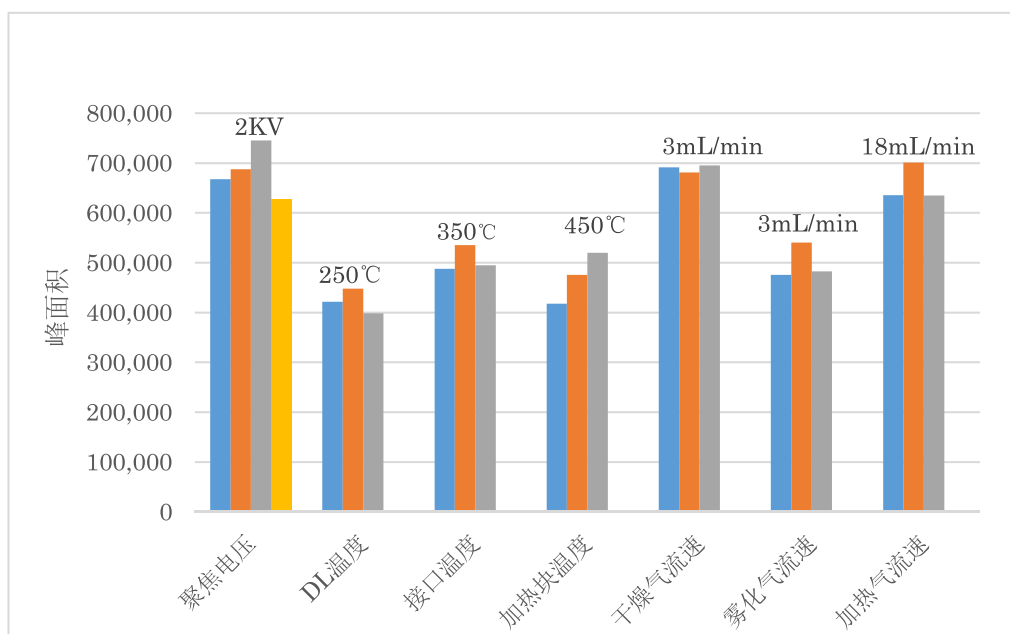


图 1 质谱参数优化

2.2 专属性与灵敏度

布美他尼样品在色谱条件下，保留时间为 4.48 min。目标杂质亚硝基布美他尼保留时间为 4.21 min 左右，方法中设置 4.35 min 后切阀进质谱，可避免高浓度布美他尼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。

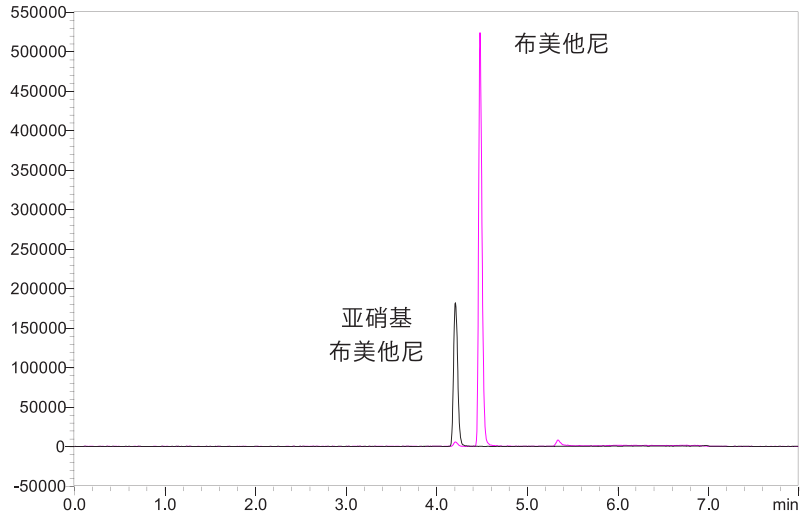


图2 原料药与杂质 TIC 色谱图 (100 ng/mL)

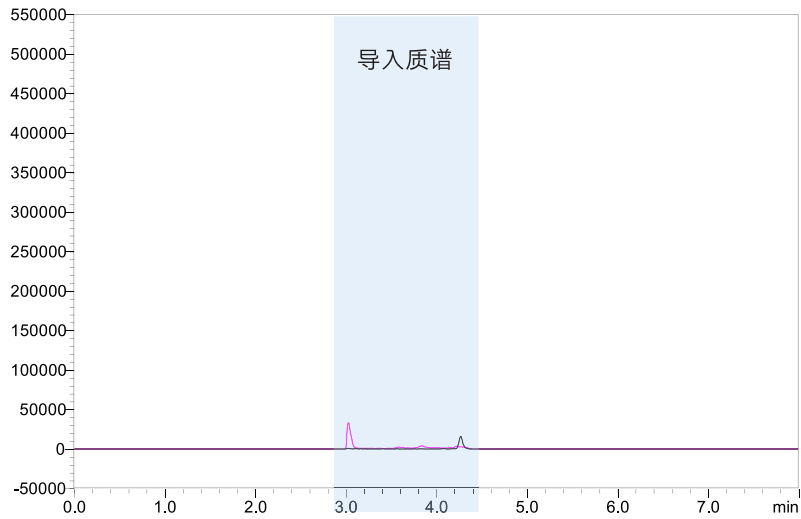


图3 实际样品切阀后 TIC 色谱图 (主药浓度 1 mg/mL)

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 4 所示, 目标物保留时间处, 空白溶剂无干扰。

Q 394.00>364.20 (+)

6.58e2

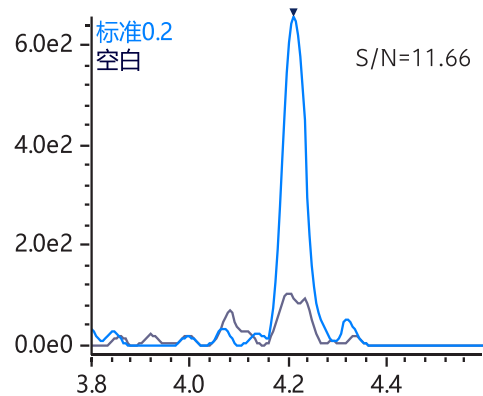


图4 亚硝基布美他尼 (0.2 ng/mL) 标准品与空白溶剂 MRM 色谱图

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5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 > 0.998,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。

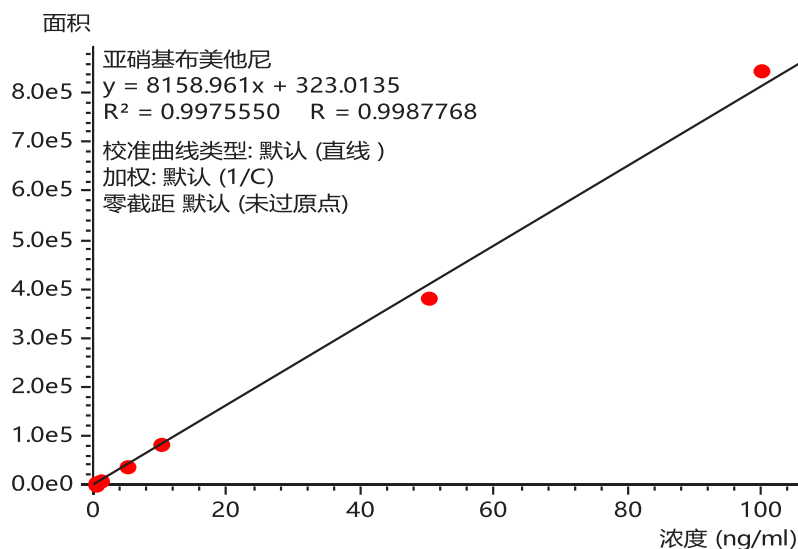


图5 目标物的校准曲线

表3 校准曲线参数

化合物	校准曲线	线性范围 (ng/mL)	相关系数 r	精确度 (%)	检出限 (ng/mL)	定量限 (ng/mL)
亚硝基布美他尼	$y = 8158.961x + 323.0135$	0.2-100	0.9988	91.2-105.3	0.058	0.175

2.4 精密度实验

取 1 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL 浓度的标准液按分析条件分别连续进样 7 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 0.008~0.069% 和 2.386~5.396% 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=7)

化合物	1 ng/mL (RSD%)		10 ng/mL (RSD%)		50 ng/mL (RSD%)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
亚硝基布美他尼	0.008	5.396	0.008	2.680	0.069	2.386

2.5 样品检测与加标回收率实验

取原料药样品 2 份,按 1.5 的方法过滤后检测,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: 1 ng/mL、5 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。

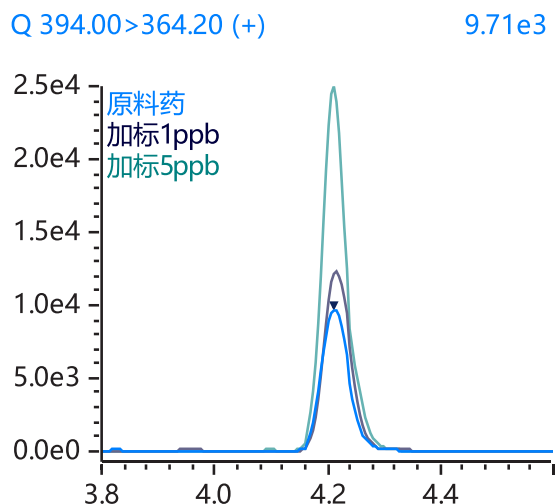


图 6 原料药及加标色谱图

表 5 回收率结果 (n=3)

编号	样品液含量 (ng/mL)	平均值 (ng/mL)	加标水平 (ng/mL)	回收率 %	平均回收率 %	RSD%
1	4.01	3.94	1	97.00	98.49	2.522
				97.11		
				101.36		
2	3.87	3.94	5	103.24	101.85	1.934
				102.71		
				99.59		

2.6 方法耐用性考察

分别对分析条件：接口温度、聚焦电压、DL 温度、加热块温度、柱温、以及 A 泵甲酸水浓度进行耐用性考察。以 50 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	聚焦电压	1 KV	0.070	4.421
		3 KV	0.091	7.162
2	DL 管温度	220°C	0.057	2.803
		280°C	0.072	0.934
3	加热块温度	420°C	0.174	2.163
		480°C	0.076	1.512
4	接口温度	320°C	0.057	2.521
		380°C	0.059	5.290
5	A 泵甲酸浓度	0.08%	0.132	1.882
		0.12%	0.148	3.313

6	柱温	38°C	0.062	2.174
		42°C	0.129	2.651

根据 USP 在其亚硝基布美他尼杂质的研究指引，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。

2.7 喷针位置考察

为了考察 RX 系列仪器相对于传统 ESI 源在稳定性上的差异，在不同水平位置进行了相对响应值的比较。结果见图 7：

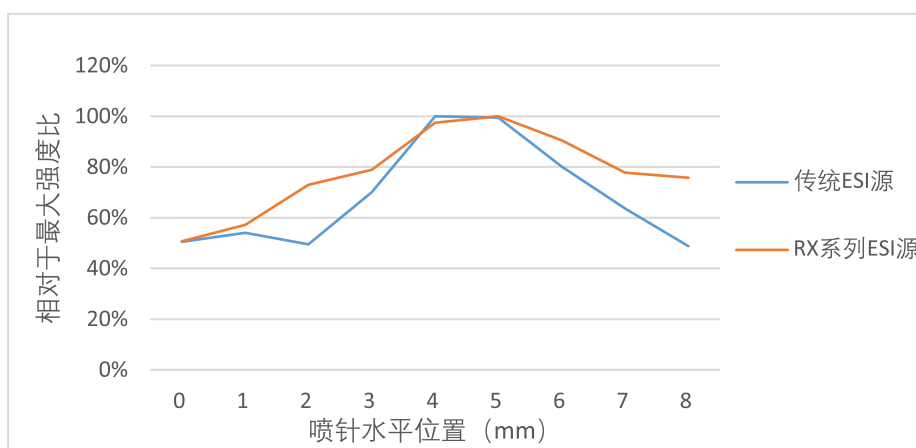


图 7 喷针水平位置与相对响应值比较

以上实验显示，对于亚硝基布美他尼来说，喷针水平位置在 4-5 mm 时质谱响应强度最佳，距离进一步远离响应略有降低。提示在保证必要响应强度前提下，较远的距离可有助于降低质谱污染和提高系统稳定性。当然方法考察时需要综合包括喷针位置在内的多个参数因素一同考虑。同时，结果也说明在全新 RX 系列 ESI 源上，化合物响应对喷针水平位置敏感度有所降低，稳定性有所提升，在灵敏度和稳健性之间取得了平衡。

■ 结论

本文使用岛津新推出的三重四极杆液质联用系统 LCMS-8045RX 建立了一种测定布美他尼原料药中药物基质亚硝胺杂质——亚硝基布美他尼含量的方法。此分析方法较 FDA 的推荐检测方案研究方案检测效率和灵敏度都更高。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

