

# LC-MS/MS 法测定托莫西汀中的亚硝胺药物成分相关杂质

LCMSMS-937

**摘要：** 本文建立了使用岛津三重四极杆液质联用仪测定托莫西汀中 2 种亚硝胺药物成分相关杂质 (NDSRI) 的方法。2 种 NDSRI 在 0.1~10 ng/mL 浓度范围内，校准曲线线性良好，线性相关系数均为 0.9999，精确度分别在 96.3~104.0% 和 92.5~105.9% 之间；2 种 NDSRI 的仪器定量限分别为 0.072 和 0.056 ng/mL，方法灵敏度高；对 0.2 ng/mL 和 2 ng/mL 标准溶液连续分析 6 次，2 种 NDSRI 的保留时间 RSD 均不大于 0.07%，峰面积 RSD 均不大于 5.13%，重复性良好；加标回收实验表明，2 种 NDSRI 在原料药中的回收率分别为 94.4% 和 98.9%，在胶囊中回收率分别为 87.5% 和 80.3%，在口服液中的回收率分别为 90.0% 和 91.7%。该方法满足检测要求，能快速、有效的分析托莫西汀中 2 种 NDSRI 的含量。

**关键词：** 三重四极杆液质联用仪 托莫西汀 亚硝胺药物成分相关杂质 NDSRI

## 技术特点：

- ❖ 建立托莫西汀中 2 种亚硝胺药物成分相关杂质的定量方法，仪器定量限低于 0.1 ng/mL。
- ❖ 通过设置阀切换时间程序，可将主成分等切除，避免定量检测中干扰和仪器污染。

ICH M7 基因毒性杂质指导原则中，亚硝胺被归为重点关注对象。近两年药品监管机构监管基因毒性杂质重点转向了与药物本身相关的亚硝胺杂质上，这些亚硝胺杂质的形成和药物活性成分密切相关，即被称为亚硝胺药物成分相关杂质 (Nitrosamine Drug Substance-Related Impurities, NDSRI)。

托莫西汀是用于治疗儿童和青少年注意缺陷 / 多动障碍 (ADHD) 的常用药物，其 NDSRI 主要包括 N-(3-羟基-3-苯基丙基)-N-甲基亚硝胺 (后文中

简称为亚硝胺 A) 和 N-甲基-N-[3-苯基-3(邻甲基苯氧基)丙基]亚硝胺 (后文中简称为亚硝胺 B)。

NDSRI 亚硝胺杂质通常没有明确确定的允许摄入量 (Allowed Intake, AI)，FDA 和 EMA 给 NDSRI 设定了不同的临时 AI 值，分别为 26.5 ng/天和 18 ng/天。

本文使用三重四极杆液质联用仪建立了测定托莫西汀 (包括原料药、胶囊和口服液) 中 2 种 NDSRI 杂质含量的方法，为相关基因毒性杂质的检测提供参考。

表 1 托莫西汀和 NDSRI 信息

No.	化合物名	后文简称	分子式	分子量	化合物结构
1	托莫西汀	托莫西汀	C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> NO	255.35	
2	N-(3-羟基-3-苯基丙基)-N-甲基亚硝胺	亚硝胺 A	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	194.11	
3	N-甲基-N-[3-苯基-3(邻甲基苯氧基)丙基]亚硝胺	亚硝胺 B	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	284.15	

## ■ 实验部分

### 1.1 仪器

本实验采用岛津超高效液相色谱仪 LC-40D X3 与 LCMS-8050 联用系统，具体配置为：

系统控制器：	SCL-40	脱气机：	DGU-405
输液泵：	LC-40D X3	自动进样器：	SIL-40C X3
柱温箱：	CTO-40C	质谱检测器：	LCMS-8050
检测器：	SPD-M40	色谱工作站：	LabSolutions V 5.118

### 1.2 分析条件

液相条件：

色谱柱：Shim-pack GIS C18 (150 mm×2.1 mm, 4 μm)  
(岛津(上海)实验器材有限公司, P/N: 227-30097-07)

流动相：A相 -0.1% 甲酸水溶液；B相 - 乙腈

洗脱方式：梯度洗脱，B相初始浓度为 25%，阀位起始为 1

流速：0.3 mL/min 进样量：20 μL

柱温：40°C

表 2 时间程序

Time (min)	Module	Command	Value
4.50	柱温箱	Oven Valve 1	0
5.80	柱温箱	Oven Valve 1	1
7.00	泵	B.Conc	40
14.10	柱温箱	Oven Valve 1	0
15.60	柱温箱	Oven Valve 1	1
16.00	泵	B.Conc	95
18.20	泵	B.Conc	95
18.30	泵	B.Conc	25
22.00	Controller	Stop	

注：阀位为 0 时，洗脱液进入质谱

质谱条件

离子化模式：	ESI+	接口温度：	300°C
接口电压：	1.0 kV	雾化气：	氮气 3.0 L/min
干燥气：	氮气 10.0 L/min	加热气：	空气 10.0 L/min
DL 温度：	150°C	加热模块温度：	300°C
扫描模式：	多反应监测 (MRM)	喷针位置：	+4 mm

表 3 MRM 参数

No.	化合物	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
1	亚硝酸 A	195.20	117.10*	-12	-11	-11
			177.20	-11	-8	-11

2	亚硝酸 B	285.20	177.00*	-13	-8	-11
			117.15	-13	-16	-21

注：\* 表示定量离子

### 1.3 标准品的配制

称取适量标准物质,以有机溶剂溶解,配制浓度为 10-20 mg/mL 的标准溶液,后以水和有机溶剂混合溶液(水 / 有机溶剂 =3:1, v/v) 逐级稀释,配制浓度为 0.1~10 ng/mL 的标准溶液。以上有机溶剂为甲醇 / 乙腈 =1:1 (v/v)。

### 1.4 样品前处理方法

原料药: 准确称取 20 mg 原料药,加入 1 mL 有机溶剂,涡旋 2 min 使溶解,后加入 3 mL 水,涡旋混匀,以 0.22  $\mu$ m PTFE 滤膜过滤后待测。

口服液: 准确量取 1 mL 口服液,加入水和有机溶剂混合溶液(水 / 有机溶剂 =3:1, v/v) 3 mL,涡旋混匀,以 0.22  $\mu$ m PTFE 滤膜过滤后待测。

胶囊: 称取 0.12 g 胶囊内容物,加入 1 mL 有机溶剂,涡旋 2 min,超声提取 10 min,8000 rpm 离心 5 min,取上清液 0.5 mL,加入 3 倍体积的水,涡旋混匀,以 0.22  $\mu$ m PTFE 滤膜过滤后待测。

以上有机溶剂为甲醇 / 乙腈 =1:1 (v/v)。

## ■ 结果与讨论

### 2.1 托莫西汀主成分和 NDSRI 分离考察

托莫西汀样品在色谱条件下,保留时间在 3.478 min,4.310 min 为峰结束时间。亚硝酸 A 和亚硝酸 B 出峰时间分别为 5.169 min 和 14.812 min,方法中设置将 4.5~5.8 min 和 14.1~15.6 min 之间的洗脱液切阀进入质谱,其他时间流出组分导入废液,可避免托莫西汀主成分和实际样品中基质对分析检测的影响,如下图 1 所示。

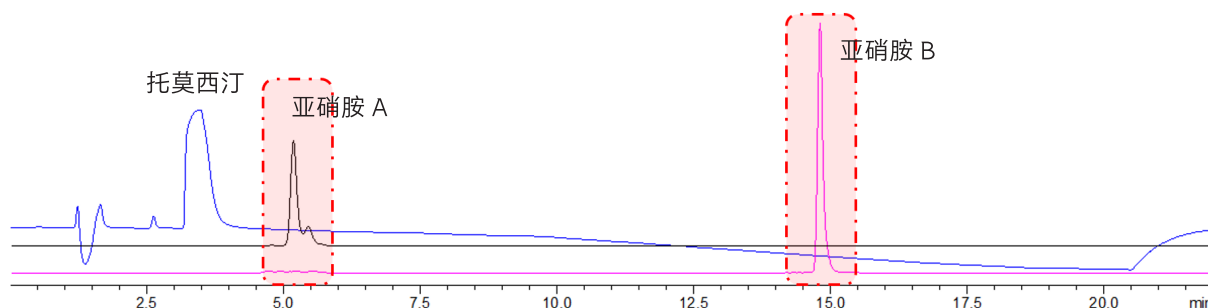


图 1 托莫西汀主成分和 NDSRI 色谱图

### 2.2 专属性和灵敏度

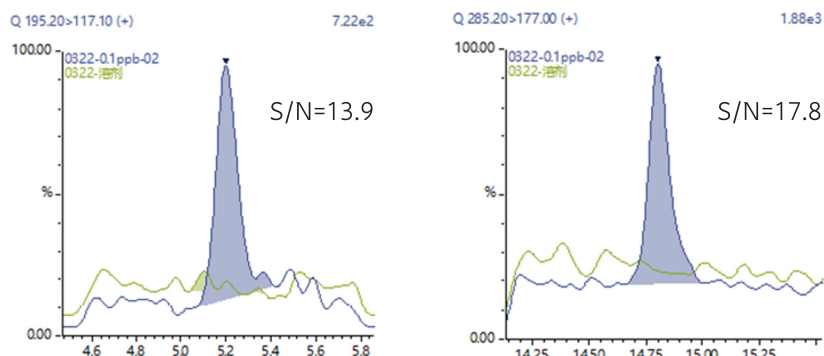


图 2 溶剂空白和 0.1 ng/mL 亚硝酸 (左图为亚硝酸 A, 右图为亚硝酸 B) 标准溶液 MRM 重叠色谱图

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。0.1 ng/mL 亚硝酸 A 和亚硝酸 B 标准溶液定量离子信噪比分别为 13.9 和 17.8，其仪器定量限分别为 0.072 和 0.056 ng/mL。

### 2.3 校准曲线

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，亚硝酸 A 和亚硝酸 B 在 0.1~10 ng/mL 浓度范围内线性良好，相关系数均为 0.9999，精确度在 96.3~104.0% 和 92.5~105.9% 之间。

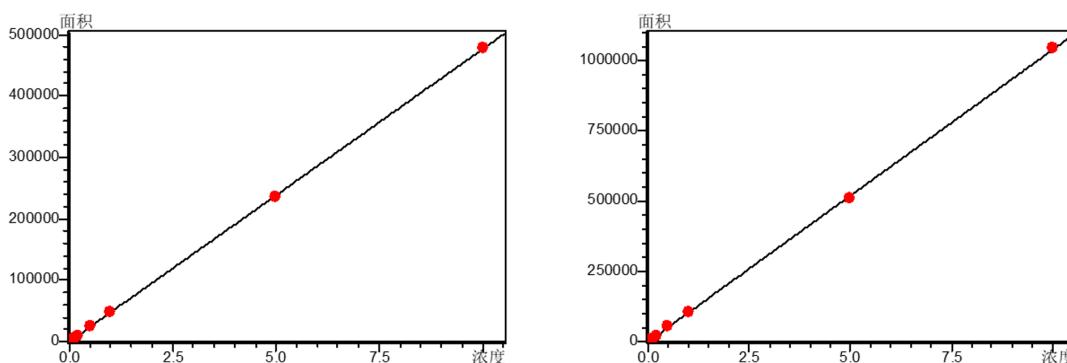


图 3 亚硝酸 A (左) 和亚硝酸 B (右) 校准曲线

表 4 校准曲线

No.	化合物	线性范围 (ng/mL)	线性方程	相关系数 (R)	精确度 (%)
1	亚硝酸 A	0.1~10	$Y=47589.4X+161.9$	0.9999	96.3~104.0
2	亚硝酸 B	0.1~10	$Y=103874.0X+27.9$	0.9999	92.5~105.9

### 2.4 精密度实验

对 0.2 ng/mL 和 2 ng/mL 标准溶液连续分析 6 次，亚硝酸 A 和亚硝酸 B 的保留时间 RSD 均不大于 0.07%，峰面积 RSD 均不大于 5.13%，仪器的重复性良好。

表 5 亚硝酸 A 和亚硝酸 B 重复性结果 (n=6)

No.	化合物	0.2 ng/mL		2 ng/mL	
		保留时间 RSD (%)	峰面积 RSD (%)	保留时间 RSD (%)	峰面积 RSD (%)
1	亚硝酸 A	0.07	5.13	0.06	2.67
2	亚硝酸 B	0.03	3.07	0.03	1.95

### 2.5 样品测试和加标回收率

按照 1.4 前处理方式进行处理，分别检测了某托莫西汀原料药、胶囊和口服液样品，其中口服液中亚硝酸 A 和亚硝酸 B 均未检出，原料药和胶囊中检出了亚硝酸 B。

在样品中加标计算回收率，最终结果显示：原料药中亚硝酸 A 和亚硝酸 B 的回收率分别为 94.4% 和 98.9%，胶囊中亚硝酸 A 和亚硝酸 B 的回收率分别为 87.5% 和 80.3%，口服液中亚硝酸 A 和亚硝酸 B 的回收率分别为 90.0% 和 91.7%。

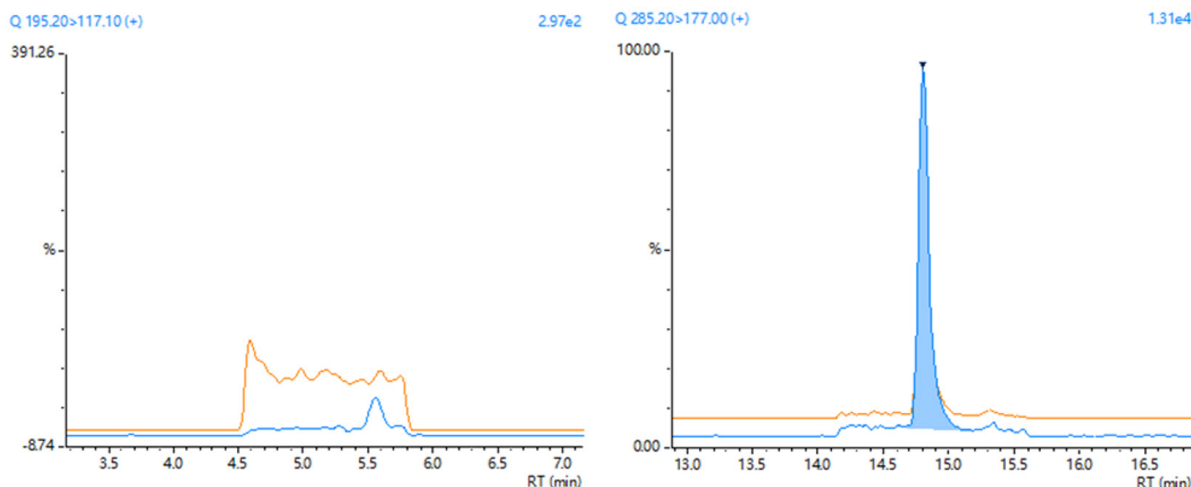


图 4 胶囊样品色谱图（左：亚硝酸胺 A，右：亚硝酸胺 B）

表 6 样品检测结果和加标回收率（浓度单位：原料药和胶囊为 ng/g，口服液为 ng/mL）

No.	样品	化合物	检测值	加标量	加标样品实测平均 (n=3)	平均回收率 (% , n=3)
1	原料药	亚硝酸胺 A	N.D.	90	84.96	94.4
		亚硝酸胺 B	14.29	90	103.31	98.9
2	胶囊	亚硝酸胺 A	N.D.	26.67	23.34	87.5
		亚硝酸胺 B	20.42	26.67	41.84	80.3
3	口服液	亚硝酸胺 A	N.D.	1.20	1.08	90.0
		亚硝酸胺 B	N.D.	1.20	1.10	91.7

注 1: N.D. 表示未检出

注 2: 加标量确定方式为: 根据 NDSRI 日允许摄入量 (18 ng/天) 和口服药物每天最大使用量, 计算称取或量取样品中 NDSRI 的限量值, 加标量为限量值的 50%~150%, 具体为: (1) 原药每日最大口服量以 100 mg 计, 检测时原料药称样 20 mg, 则称取的样品中 NDSRI 不得超过 3.6 ng, 实验加标量为 90 ng/g; (2) 用作方法验证的胶囊样品规格为 25 mg, 内容物的质量约为 0.23 g/粒, 检测时称样 0.12 g, 则称取的样品中 NDSRI 不得超过 2.35 ng, 实验加标量为 26.67 ng/g; (3) 口服液每日推荐最大口服量为 20 mL, 检测时量取 1 mL, 则量取的样品中目标物不得超过 0.9 ng, 实验加标量为 1.2 ng/mL。

## 结论

本文建立了一种使用岛津三重四极杆液质联用仪测定托莫西汀中 2 种亚硝酸胺药物成分相关杂质 (NDSRI) 的方法。该方法的灵敏度、精密度、校准曲线和加标回收率均满足检测需求, 可适用于托莫西汀中 NDSRI 的检测。

岛津应用云

