

LC-MS/MS 测定盐酸丙咪嗪、盐酸地昔帕明中 N-亚硝基 - 去甲基丙咪嗪含量

LCMSMS-1081

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盐酸丙咪嗪、盐酸地昔帕明中 N-亚硝基 - 去甲基丙咪嗪杂质含量的方法。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 > 0.999，检出限 0.026 ng/mL，定量限 0.08 ng/mL。取两个不同浓度的标准液按分析条件分别连续进样 8 次，保留时间和峰面积的 RSD 分别在 0.065~0.086% 和 4.055~5.651% 之间，仪器精密度良好。样品加标回收率在 96.94~114.92% 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 0.038~0.107% 和 2.151~4.183% 之间，符合 FDA 要求。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 丙咪嗪 地昔帕明 N-亚硝基 - 去甲基丙咪嗪

技术特点：

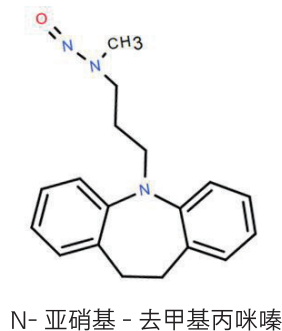
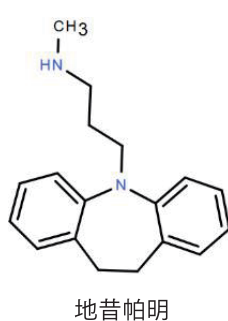
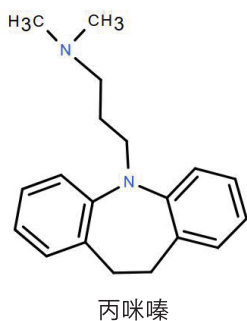
- ❖ 8.0 min 即可完成样品的准确定量，效率高；
- ❖ 线性最低浓度为 0.1 ng/mL，满足检测低限值杂质对仪器高灵敏度的要求。

丙咪嗪，化学式为 $C_{19}H_{24}N_2$ ，抗抑郁药，有兴奋和消除忧郁的作用。能减弱因刺激网状结构所致的觉醒反应，增强麻醉、催眠和镇痛等药物的作用，还有对抗乙酰胆碱、去甲肾上腺素和组织胺的作用。地昔帕明，化学式为 $C_{18}H_{22}N_2$ ，抗抑郁药，有阻滞单胺类神经介质，如去甲肾上腺素或 5-羟色胺回收的作用。地昔帕明是丙咪嗪的代谢物。作用与丙咪嗪相似，但镇静和抗毒蕈碱作用明显较弱，因而更适合用于老年人。

他们的结构中分别含有二级、三级胺结构，为亚硝胺的形成提供了氨基单元。在生产、贮存过程中会产生相同的一种 NDSRIs (药物基质亚硝胺杂质)：N-亚硝基 - 去甲基丙咪嗪。NDSRIs 类杂质具有致癌性

或致突变性风险，已经引发多个药物的召回。FDA 在发布的关于控制人用药物中亚硝胺杂质 (NDSRIs) 推荐 AI 限值，其中 N-亚硝基 - 去甲基丙咪嗪被划归为风险最大的 I 类，AI 值为 26.5 ng/天^[1]。按照最大日服用量 (两种药物同为 300 mg/天) 计算，原料药中杂质含量不得超过 88 ng/g。

本文利用岛津 LCMS-8050 三重四极杆液质联用仪，建立了盐酸丙咪嗪、盐酸地昔帕明中 N-亚硝基 - 去甲基丙咪嗪含量检测方法。经过方法学验证，结果表明该分析方法可准确、快速测定盐酸丙咪嗪、盐酸地昔帕明中 N-亚硝基 - 去甲基丙咪嗪含量，可供相关检测人员参考。



■ 实验部分

1.1 仪器

输 液 泵 :	LC-40DXS X2	系 统 控 制 器 :	CBM-40
脱 气 机 :	DGU-405	质 谱 仪 :	LCMS-8050 三重四极杆质谱
自动进样器 :	SIL-40CXS	色 谱 工 作 站 :	Labsolutions Ver. 5.128
柱 温 箱 :	CTO-40S		

1.2 分析条件

液相色谱条件

色 谱 柱 :	Shim-pack GISS C18 (100 mm x 2.1 mm I.D., 1.9 μm) 岛津(上海)实验器材有限公司, P/N: 227-30084-02		
流 动 相 :	A相 - 0.1% 甲酸水溶液; B相 - 甲醇		
流 速 :	0.3 mL/min	进 样 体 积 :	2 μL
柱 温 :	40°C	洗 脱 方 式 :	梯度洗脱, 初始 10%B, Oven Valve 2 初始状态为 0

表 1 时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.50	Pumps	Pump B Conc.	10
4.00	Pumps	Pump B Conc.	95
4.95	Oven	Oven Valve 2	1
5.4	Oven	Oven Valve 2	0
6.00	Pumps	Pump B Conc.	95
6.01	Pumps	Pump B Conc.	10
8.00	Controller	Stop	

其中: Oven Valve 2 的 1 代表接入质谱端; Oven Valve 2 的 0 代表废液端

质谱条件

离 子 源 :	ESI (+)	D L 温 度 :	200°C
接 口 电 压 :	1 kV	加 热 块 温 度 :	400°C
雾 化 气 :	氮气 3.0 L/min	接 口 温 度 :	300°C
干 燥 气 :	氮气 10.0 L/min	扫 描 模 式 :	MRM
加 热 气 :	空气 10.0 L/min	MRM 参 数 :	见表 2
碰 撞 气 :	氦气	扫 描 方 式 :	正离子扫描

表 2 MRM 优化参数

中文名	CAS 号	监测离子对	Q1 Pre (V)	CE	Q3 Pre (V)
N- 亚硝基 - 去甲基丙咪嗪	57164-17-7	296.00 >234.20*	-14.0	-30.0	-26.0
		296.00 >194.20	-22.0	-39.0	-20.0
		296.00 >180.10	-11.0	-37.0	-12.0

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（批号：STDF2250158），于 4℃冰箱保存，备用。

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 μg/mL 的标准工作液，现用现配。

精密量取 1 μg/mL 标准工作液，用 50% 甲醇稀释成浓度为 0.1、0.5、1、2、5、10、20 ng/mL 七个浓度的系列标准溶液，现用现配。

1.5 样品前处理

取盐酸丙咪嗪、盐酸地昔帕明原料药样品 10 mg，用 4 mL 50% 甲醇溶解、摇匀后进样分析。

■ 结果与讨论

2.1 方法优化

以 20 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、接口温度；（2）加热块温度；（3）接口电压；（4）喷针水平位置。优化结果见图 1：

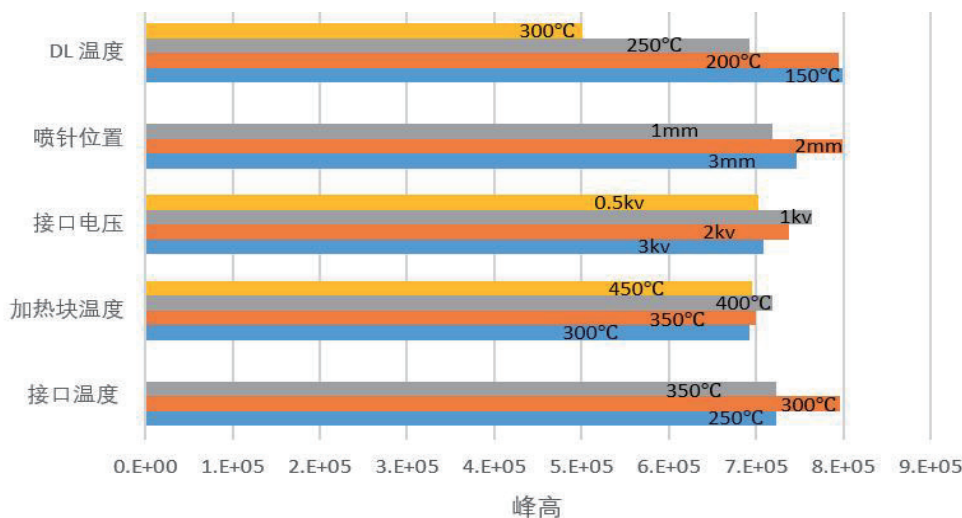


图 1 质谱参数优化

结果显示，DL 管温度 150°C 和 200°C 时峰面积差别不大，为提高检测大浓度药物样品时仪器的抗污染能力，DL 管温度为 200°C；喷针水平位置 +2 mm，接口电压 1 kV，加热块温度 400°C，接口温度 300°C 时目标化合物有最大响应。

2.2 专属性与灵敏度

在 1.2 色谱条件下，丙咪嗪保留时间为 4.42 min，地昔帕明保留时间为 4.45 min。目标杂质 N- 亚硝基 - 去甲基丙咪嗪保留时间为 5.09 min 左右，方法中设置 4.95 min 后切阀进质谱，可避免高浓度丙咪嗪和地昔帕明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。

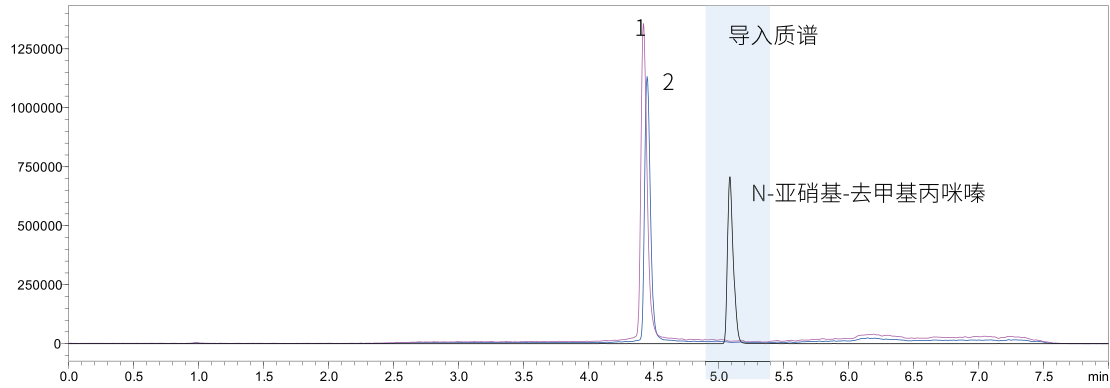


图 2 原料药与杂质 TIC 色谱图 (1. 丙咪嗪; 2. 地昔帕明; 50 ng/mL)

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 3 所示, 目标物保留时间处, 空白溶剂无干扰。

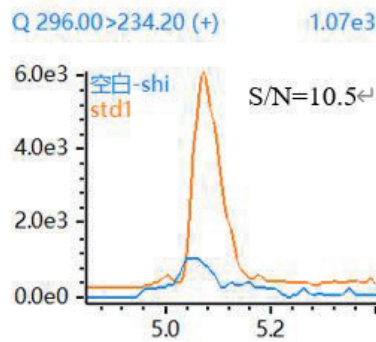


图 3 N-亚硝基-去甲基丙咪嗪 (0.1 ng/mL) 标准品与空白溶剂 MRM 色谱图

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 4 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 > 0.999, 具体结果见表 3。

采用 LabSolutions 软件, 按照 2025 年版《中国药典》^[2] 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。

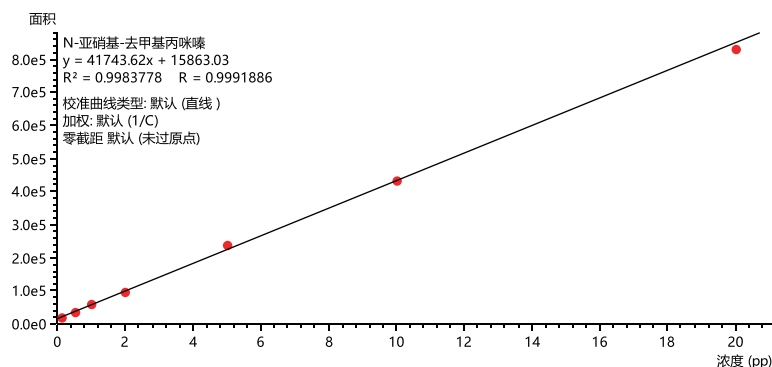


图 4 目标物的校准曲线

表3 校准曲线参数

化合物	校准曲线	线性范围 (ng/mL)	相关数 r	精确度 (%)	检出限 (ng/mL)	定量限 (ng/mL)
N-亚硝基-去甲基丙咪嗪	$y = 41743.62x + 15863.03$	0.1-20	0.9992	83.4-110.6	0.026	0.08

2.4 精密度实验

取 0.2 ng/mL、2 ng/mL 浓度的标准液按分析条件分别连续进样 8 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 0.065~0.086% 和 4.055~5.651% 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=8)

化合物	0.2 ng/mL (RSD%)		2 ng/mL (RSD%)	
	R.T.	Area	R.T.	Area
N-亚硝基-去甲基丙咪嗪	0.086	5.651	0.065	4.055

2.5 样品检测与加标回收率实验

取原料药样品，按 1.5 的方法处理过滤后检测，盐酸丙咪嗪样品中目标杂质含量低于定量限，盐酸地昔帕明样品中有明显检出。后对样品进行加标回收实验。添加浓度为：80 ng/g、2000 ng/g，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。

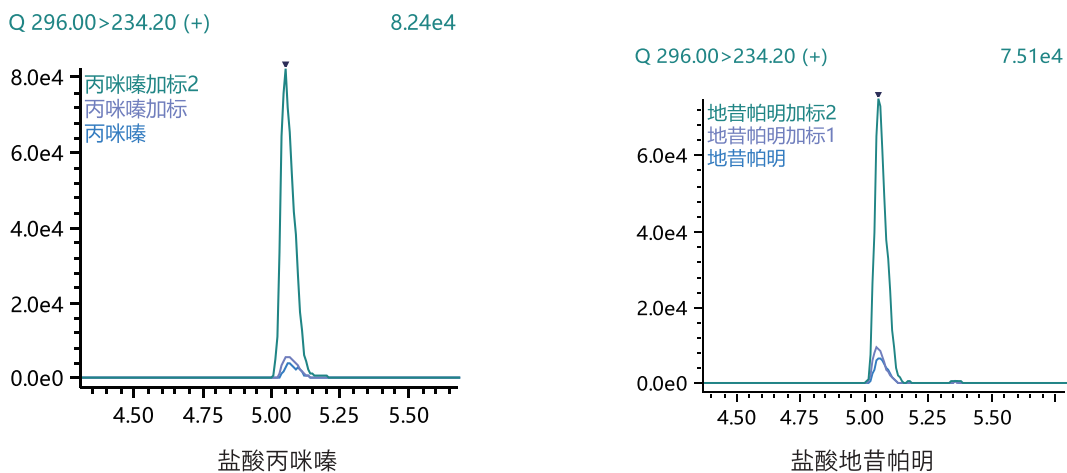


图5 样品及加标色谱图

表 5 回收率结果 (n=3)

化合物	序号	样品含量 (ng/mL)	平均值 (ng/mL)	加标水平 (ng/g)	回收率 %	平均回收率 %	RSD%
盐酸丙咪嗪	1	BLQ	/	80	105.56	105.47	5.02
					110.71		
					100.12		
	2	BLQ	/	2000	114.92	114.14	0.60
					113.87		
					113.62		
盐酸地昔帕明	1	0.21	0.22	80	96.94	100.19	2.87
					102.43		
					101.20		
	2	0.23	0.22	2000	104.17	102.71	1.87
					100.53		
					103.43		

BLQ 表示含量低于定量限。

2.6 方法耐用性考察

分别对分析条件：DL 温度、柱温、以及 A 相甲酸浓度进行耐用性考察。以 1 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	DL 管温度	180°C	0.107	4.183
		220°C	0.073	3.378
2	A 相甲酸浓度	0.05%	0.068	2.151
		0.15%	0.038	2.704
3	柱温	35°C	0.065	3.038
		45°C	0.058	3.181

参考 FDA 推荐方法要求^[3]，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。

■ 结论

本文使用岛津新推出的三重四极杆液质联用系统 LCMS-8050 建立了一种测定盐酸丙咪嗪、盐酸地昔帕明中 N-亚硝基-去甲基丙咪嗪含量的方法。此分析方法 8 分钟即可完成样品检测。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。

【参考文献】

[1] U.S. Food and Drug Administration. CDER Nitrosamine Impurity Acceptable Intake Limits. CDER Nitrosamine Impurity Acceptable Intake Limits [2025-08-18]: FDA Recommended AI Limits for Certain Hypothetical NDSRIs and Other Identified Nitrosamine Impurities. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/cder-nitrosamine-impurity-acceptable-intake-limits>.

[2] 中国药典 [2025 版]. 通则 0512 高效液相色谱法

[3] U.S. Food and Drug Administration. CDER Nitrosamine Impurity Acceptable Intake Limits. CDER Nitrosamine Impurity Acceptable Intake Limits [2025-08-18]: Recommended Analytical Testing Methods: Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry (LC-ESI-HRMS) Method for the Determination of N-Nitroso-Bumetanide in Bumetanide Drug Products and Drug Substance. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/cder-nitrosamine-impurity-acceptable-intake-limits>.

岛津应用云

