

LC-MS/MS 测定依那普利中 N- 亚硝基依那普利

LCMSMS-886

摘要：本文建立了一种使用岛津三重四极杆液质联用仪检测依那普利中 N- 亚硝基依那普利的方法。N- 亚硝基依那普利在 0.1 ~ 10 ng/mL 浓度范围内，其相关系数大于 0.999，精确度在 97.2 ~ 102.0%；回收率为 93.40 ~ 103.50%；对不同浓度的标准溶液平行 6 次，其浓度 RSD 为 2.77 ~ 4.16%，仪器精密度良好。与中检院的推荐使用的高分辨质谱方法不同，本文采用了普适性相对更广的 LC-MS/MS 进行分析，且进样量更小，灵敏度更高，同时采用了切阀的方式减少质谱的污染。该方法可有效应对依那普利中的亚硝胺类基因毒性杂质 N- 亚硝基依那普利的检测。

关键词：依那普利 N- 亚硝基依那普利 亚硝胺

技术特点：

- ❖ 应对硝胺类遗传毒性杂质 -N- 亚硝基依那普利的分析。
- ❖ 采用组校准定量、切阀减少污染等手段，建立 LC-MS/MS 快速分析方法。

基因毒性杂质是指在很低的浓度下即可诱导基因突变并导致染色体的断裂和重排的杂质，具有潜在的致癌性”。N- 亚硝胺类化合物由于在细胞色素 P450 酶介导代谢活化后，生成不稳定的 α - 羟甲基-N- 亚硝胺，最终形成的高度亲电物质与 DNA 反应形成烷基化的 DNA 碱基对，从而具有很强的致癌性。ICH M7(R1) 指南已将 N- 亚硝胺类化合物列入“关注队列”。近年来多个品种的药品中检测出了 N- 亚硝胺类化合物，引起了各国药品监管机构的广泛关注，出台了一系列 N- 亚硝胺杂质的控制方案。

马来酸依那普利 (enalapril maleate) 系第二代血管紧张素转换酶抑制剂，可强烈抑制血管紧张素转换酶，降低血管紧张素工的含量，使全身血管舒张，从而降低血压。临床用于治疗高血压，具有药理作用平稳，持续时间长的特点。然而，近期在依那普利中发现了新的亚硝胺类基因毒性杂质 N- 亚硝基依那普利，使得亚硝胺类基因毒性杂质又一次引起大家关注。因此，本文建立了使用岛津三重四极杆液质联用仪检测依那普利中 N- 亚硝基依那普利的方法，供相关检测人员参考。

实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津超高效液相色谱仪 LC-40 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为：

系统控制器：	CBM-40	自动进样器：	SIL-40C X3
输液泵：	LC-40B X3	检测器：	SPD-M40
柱温箱：	CTO-40S	质谱仪：	LCMS-8050
色谱工作站：	LabSolutions Ver.5.118		

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：	Shim-pack Velox C18 2.1×100 mm; 1.8 μ m
流动相：	A-10 mM 乙酸铵溶液 (含 0.1% 甲酸)；B- 乙腈 (含 0.1% 甲酸)
流速：	0.35 mL/min
柱温：	40°C

进样体积：1 μ L

洗脱方式：梯度洗脱，B相初始浓度为20%，初始阀位“1”，时间程序见表1。

表1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
7.00	柱温箱	Oven Valva 2	0
7.50	Pump	B.Conc	42
9.00	Pump	B.Conc	42
9.00	柱温箱	Oven Valva 2	1
10.00	Pump	B.Conc	95
11.00	Pump	B.Conc	95
11.01	Pump	B.Conc	20
14.00	Control	Stop	

*注：“1”号阀位进废液，“0”号阀位进质谱

质谱条件

离子化模式：ESI+	接口电压：1.0 kV
雾化气流速：3.0 L/min	接口温度：300°C
加热模块温度：400°C	干燥气流速：10 L/min
D L 温度：250°C	加热气流速：10 L/min
MRM 参数：见表2	扫描模式：多反应监测 (MRM)

表2 MRM 参数

名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
N-亚硝基依那普利	406.20	234.15*	-20.0	-21.0	-24.0
		116.05	-20.0	-12.0	-10.0
		117.10	-20.0	-43.0	-19.0

*代表定量离子对。

1.3 校准品及样品制备

校准曲线制备：以甲醇为稀释剂，配置浓度约为100 ng/mL的亚硝基依那普利对照品储备液，随后用稀释剂将标准品储备液溶液分别配制为0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0和10.0 ng/mL的标准品溶液。

供试品溶液：取马来酸依那普利片10片，精密称定，研细，混匀，精密称取细粉适量（约相当于依那普利1 mg）置离心管中，精密加入甲醇1 mL，涡旋5 min，滤过，取续滤液作为供试品溶液。

回收率溶液：取马来酸依那普利片10片，精密称定，研细，混匀，精密称取细粉适量（约相当于依那普利1 mg）置离心管中，精密加入适量对照品储备液和甲醇溶液，涡旋5 min，滤过，取续滤液作为回收率溶液。

■ 结果与讨论

2.1 MRM 色谱图

亚硝基依那普利定量限浓度（0.1 ng/mL）MRM 谱图如下所示，在此液相条件下标准品出现 RT=7.45 min 和 RT=8.28 min 两个色谱峰，其中以 S/N 较小的峰用于确定定量限，以两个峰面积之用于定量分析。

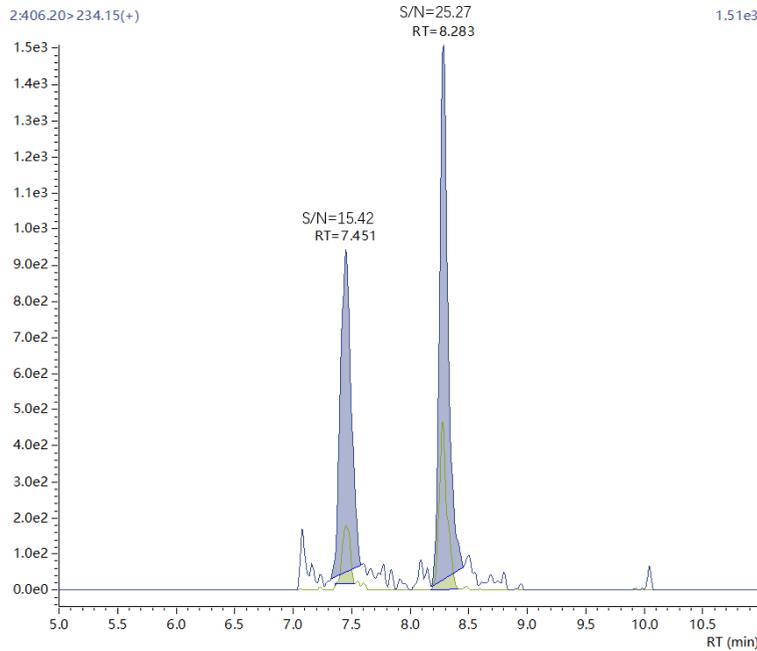


图1 亚硝基依那普利定量限浓度点 MRM 色谱图

2.2 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，两色谱峰面积之和为纵坐标，以组校准的方式进行分析，亚硝基依那普利在 0.1 ~ 10 ng/mL 浓度范围内相关系数大于 0.999，精确度在 97.2% ~ 102.0%，曲线结果如下图 2 所示。

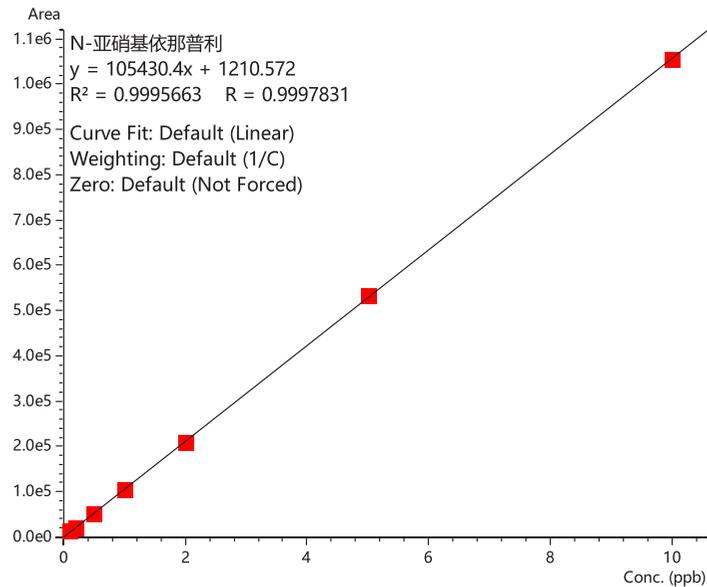


图2 校准曲线结果

2.3 准确度测定结果

按 1.3 项下配制回收率溶液，每个浓度质控品重复制备 3 份，按 1.2 中的分析条件对质控品进行分析，质控品的准确度如表 3 所示。

表 3 质控品分析结果

	理论值 (ng/mL)	测定值 (µg/mL)	准确度 (%)
LQC	0.2	0.21	103.50
		0.21	102.50
		0.19	96.50
MQC	1	1.02	102.40
		0.94	93.90
		0.93	93.40
HQC	5	4.68	93.68
		4.72	94.44
		4.77	95.36

2.4 精密度测定结果

分别取低中高浓度点样品，连续进样 6 针考察精密度，结果如表 4 所示。

表 4 精密度测定结果

浓度	0.2 ng/mL	1 ng/mL	5 ng/mL
1	0.194	1.051	4.986
2	0.200	0.987	4.930
3	0.208	1.025	5.293
4	0.206	0.979	4.819
5	0.208	0.930	5.303
6	0.200	0.996	4.991
平均值	0.20	0.99	5.05
RSD(%)	2.77	4.16	3.94

2.5 实际样本

按 1.3 项下配制供试品溶液，对两个实际样品进行分析，结果如下所示。

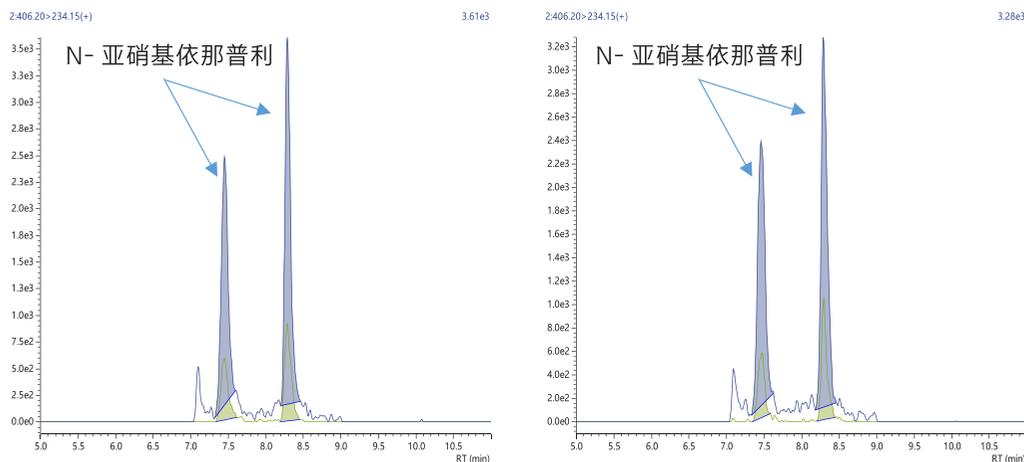


图 3 实际样品色谱图 (左: 样品 1; 右: 样品 2)

表 5 实际样品测定结果

序号	浓度 (ng/mL)
样品 1	0.321
样品 2	0.312

■ 结论

本文利用岛津公司的 LCMS-8050 三重四极杆液质联用仪, 建立了对依那普利中 N- 亚硝基依那普利的测定方法。使用外标法定量分析, 由于该方法条件下 N- 亚硝基依那普利有两个色谱峰, 故结合组校准进行分析。N- 亚硝基依那普利在 0.1 ~ 10 ng/mL 浓度范围内相关系数大于 0.999, 精确度在 97.2% ~ 102.0%; 加标回收实验中, 分别考察了 3 个不同浓度的加标量, 回收率为 93.40 ~ 103.50%; 重复性实验中, 对不同浓度的标准溶液重复进样 6 次, RSD 为 2.77 ~ 4.16%, 仪器精密度良好。该方法能满足依那普利中 N- 亚硝基依那普利的检测要求。

岛津应用云

