

# LC-MS/MS 法测定普萘洛尔中的亚硝胺药物成分相关杂质 N- 亚硝胺普萘洛尔

LCMSMS-885

**摘要：** 本文建立了使用岛津三重四极杆液质联用仪测定普萘洛尔中亚硝胺药物成分相关杂质 N- 亚硝胺普萘洛尔。该方法在 13 min 内完成测试。方法学结果表明，N- 亚硝胺普萘洛尔物质在 0.5~20 ng/mL 浓度范围内线性关系良好，仪器检出限为 0.08 ng/mL。1 ng/mL 标准溶液重复进样 6 次，保留时间和峰面积的相对标准偏差 (RSD%) 分别为 0.12 % 和 2.10% 之间。1 ng/mL 浓度的加标回收率测试，平均回收率为 108.52%，相对标准偏差为 1.07%。该方法满足检测要求，能快速、有效的分析普萘洛尔中 N- 亚硝胺普萘洛尔杂质的含量。

**关键词：** N- 亚硝胺普萘洛尔 三重四极杆液质联用仪 普萘洛尔 基因毒性杂质

## 技术特点：

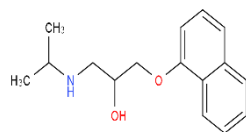
- ❖ 建立一种亚硝胺药物成分相关杂质的定量方法，仪器检出限可达 0.08 ng/mL。
- ❖ 通过柱后切阀程序的设置，可将主成分切除，避免定量检测中干扰和仪器污染。

ICH M7 基因毒指导原则中，亚硝胺被归为重点关注物质。近两年药品监管机构监管基因毒性杂质重点转向了由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)。

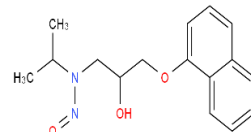
近期因国外某普萘洛尔中的 N- 亚硝胺普萘洛尔基因毒性杂质因亚硝胺水平超标而被召回事件，再次得到各个国家的重视。NDSRI 亚硝胺杂质通常没有明确确定的允许摄入量 (Allowed Intake, AI)，

FDA 基于每日最大日剂量，亚硝胺杂质总量应控制在 26.5 ng/ 天 (最强效亚硝胺的 AI)。

本文建立了 LC-MS/MS 法测定普萘洛尔中的 NDSRI 杂质 N- 亚硝胺普萘洛尔，为相关基因毒性杂质的检测提供参考。



普萘洛尔



N- 亚硝胺普萘洛尔

## 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 LCMS-8045 联用系统，具体配置为：

系统控制器：	CBM-40	脱气机：	DGU-405
输液泵：	LC-40DXR	自动进样器：	SIL-40CXR
柱温箱：	CTO-40C	质谱检测器：	LCMS-8045
色谱工作站：	LabSolutions Ver. 5.118		

### 1.2 分析条件

液相条件：

色谱柱：Shim-pack GIST C18 (150 mm x 2.1 mm I.D., 2 μm, 岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N:227-30093-05)

流动相：A 相 -0.1% 甲酸水溶液；B 相 -0.1% 甲酸乙腈

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 50%，洗脱程序见表 1

流速：0.5 mL/min                      进样量：10 μL  
柱温：50°C                                R0 清洗液：50% 甲醇（含 0.3% 甲酸）

表 1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
5.00	柱温箱	CTO.RVR	1*
5.00	泵	B.Conc	50
7.00	泵	B.Conc	70
9.00	柱温箱	CTO.RVR	0
9.00	泵	B.Conc	70
9.10	泵	B.Conc	50
13.00	Controller	Stop	

\* 表示柱温箱柱后切换阀位置，1 代表进入质谱

质谱条件

离子化模式：ESI+                      接口温度：300°C  
接口电压：4.0 kV                      雾化气：氮气 3.0 L/min  
干燥气：氮气 10.0 L/min              碰撞气：氩气  
DL 温度：250°C                      加热模块温度：400°C  
扫描模式：多反应监测（MRM）      驻留时间：30 ms  
延迟时间：3 ms                      MRM 参数：见表 2

表 2 化合物信息及 MRM 优化参数

No.	化合物	英文名称	CAS 号	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
1	N- 亚硝酸普萘洛尔	N-Nitrosopropranol	84418-35-9	289.30	72.20*	-11	-14	-28
					145.20	-11	-8	-15
2	普萘洛尔	Propranol	525-66-6	260.20	116.00	-15	-35	-15

注：\* 表示定量离子

1.3 标准品的配制

准确称取 N- 亚硝酸普萘洛尔标准品 10 mg 于 10 mL 容量瓶中，用甲醇溶液溶解，得到 1 mg/mL 标准储备溶液。准确移取 100 μL 各单标储备液于 10 mL 容量瓶中，用甲醇定容，得到浓度为 10 μg/mL 的标准中间液。

校准曲线配制：以 50% 甲醇溶液为溶剂，将标准中间液逐级稀释至浓度为 0.5、1、2、5、10、20 ng/mL 的标准点，上机分析。

1.4 样品前处理方法

将 10 mg 规格普萘洛尔片剂样品 4 片，研磨粉碎，用甲醇 5 mL 溶解，摇匀，静置 10 min 后，取适量于塑料离心管中，于 12000 r/min 离心 5 min 后，上清液过 0.22 μm 滤膜后上机。

## ■ 结果与讨论

### 2.1 普萘洛尔主成分和杂质分离考察

普萘洛尔样品在色谱条件下，出峰时间在 1.432 min, 4 min 后主成分可完全洗脱出。N- 亚硝酸普萘洛尔出峰时间为 6.888 min, 方法中设置 5.0 min 后切阀进质谱，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，如下图 1 所示。

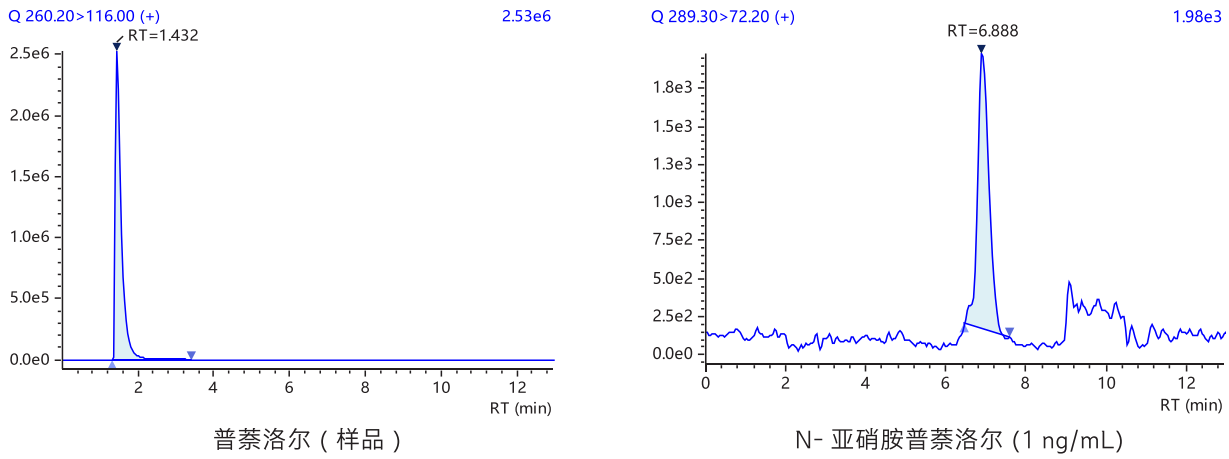


图 1 普萘洛尔主成分和 N- 亚硝酸普萘洛尔色谱图

### 2.2 专属性

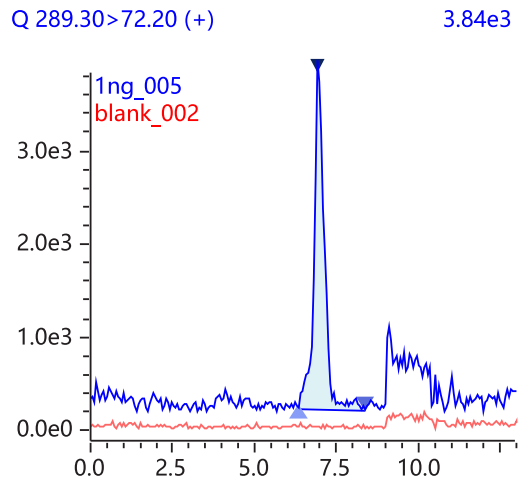


图 2 溶剂空白和 1 ng/mL N- 亚硝酸普萘洛尔标准溶液 MRM 重叠色谱图

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。

### 2.3 线性范围

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，N- 亚硝酸普萘洛尔在 0.5~20 ng/mL 浓度范围内线性良好，相关系数大于 0.999。LabSolutions 软件采用 ASTM 的计算方式，以信噪比 S/N=3.3 和 10.0，分别计算定量限和检出限，定量限为 0.26 ng/mL，检出限为 0.08 ng/mL。

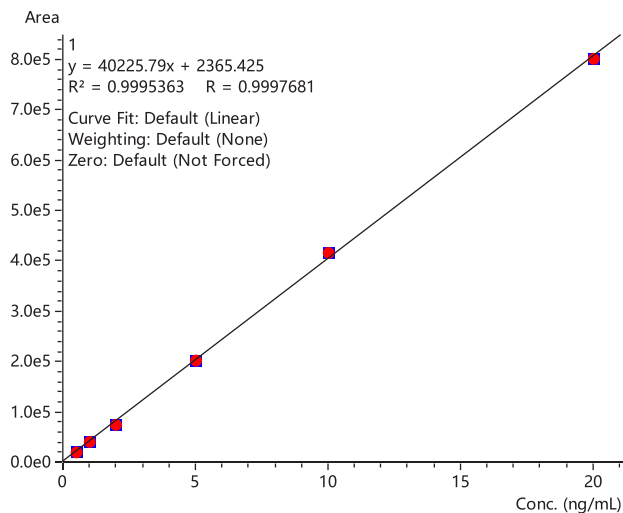


图 3 N-亚硝酸胺普萘洛尔校准曲线

#### 2.4 精密度实验

对 1.0 ng/mL 标准溶液连续分析 6 次, 计算重复性。结果见表 3。N-亚硝酸胺普萘洛尔的保留时间 RSD 为 0.12%, 峰面积 RSD 为 2.10%, 重复性良好。

表 3 N-亚硝酸胺普萘洛尔重复性结果 (n=6)

No.	测试浓度 (ng/mL)	保留时间 (min)	保留时间 RSD%	峰面积	峰面积 RSD%
1	1.0	6.899	0.12	47194.16	2.10
2	1.0	6.888		47230.22	
3	1.0	6.898		44714.02	
4	1.0	6.906		46187.31	
5	1.0	6.909		47059.66	
6	1.0	6.909		46943.55	

#### 2.5 加标回收率

取某品牌普萘洛尔 10 mg 规格片剂, 按照 1.4 前处理方式进行处理, 样品中未检出 N-亚硝酸胺普萘洛尔物质。

表 2 化合物信息及 MRM 优化参数

化合物	样品浓度 (ng/mL)	添加浓度 (ng/mL)	实测浓度 (ng/mL)	平均回收率 (%)	相对标准偏差 RSD%
N-亚硝酸胺普萘洛尔	N.D.	1.0	1.091	108.52	1.07
			1.093		
			1.072		

注: N.D. 表示未检出。

向样品中添加浓度为 1 ng/mL 的标准溶液, 每个水平重复 3 次, 进行加标回收率和精密度试验。表 4 为实验结果, N-亚硝酸胺普萘洛尔的平均回收率为 108.52%, 相对标准偏差为 1.07%。

## ■ 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普萘洛尔中 NDSRI 杂质 N- 亚硝胺普萘洛尔含量的方法。该方法可将 N- 亚硝胺普萘洛尔同主成分完全分离开，在 13 min 内完成测试。方法学考察中，线性、灵敏度、精密度和加标回收率均满足检测需求，可适用于普萘洛尔中基因毒性杂质 N- 亚硝胺普萘洛尔的检测。

岛津应用云

