

LC-MS/MS 法测定普萘洛尔中的基因毒性杂质 N-亚硝胺普萘洛尔

LCMSMS-708

摘要： 本文建立了使用岛津超高效液相色谱串联质谱联用仪测定普萘洛尔中的 N-亚硝胺普萘洛尔杂质。该方法在 7 min 内完成测试。方法学结果表明，N-亚硝胺普萘洛尔物质在 0.1~100 ng/mL 浓度范围内线性关系良好，仪器检出限为 0.01 ng/mL。0.2 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%) 分别在 0.29% 和 2.43% 之间。1 ng/mL 和 20 ng/mL 2 个水平浓度的加标回收率测试，平均回收率为 95.63-102.55%，相对标准偏差为 1.95-2.32%。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。

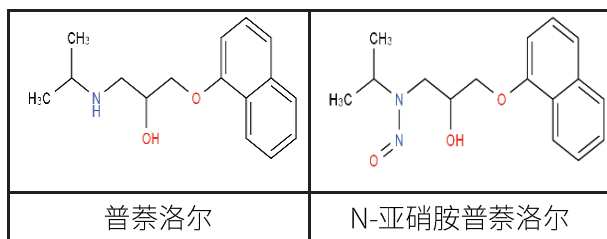
关键词： N-亚硝胺普萘洛尔 三重四极杆质谱 普萘洛尔 基因毒性杂质

普萘洛尔是一种非选择性 β -1 与 β -2 肾上腺素受体阻滞剂，能够减慢心率、减弱心肌收缩、减少心血排量。临床上常适用于各种原因导致的心律失常，如房性及室性早搏、窦性及室上性心动过速。

2022 年 3 月份，辉瑞公司长效降压药盐酸普萘洛尔 (inderal-LA) 因检出亚硝胺水平超标而在加拿大被召回数批次产品。本次被召回，主要因其 N-亚硝胺-普萘洛尔基因毒性杂质超标。世界卫生组织对于亚硝胺的每日摄入量作了明确的限制：确定一种以上亚硝胺杂质，并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)。FDA 认为，

人体如长期接触亚硝胺杂质高于可接受限度，则可能增加患癌症的风险。

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



实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津超高效液相色谱仪 LC-30 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-30D

自动进样器：SIL-30AC

柱温箱：CTO-20AC

质谱检测器：LCMS-8045

色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.109

1.2 分析条件

液相条件：

色谱柱：Shim-pack GLSS C18 (100 mm x 2.1 mm I.D., 1.9 μ m, 岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N:227-30048-02)

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 30%，洗脱程序见表 1

流速：0.3 mL/min

进样量：5 μ L

柱温：40 $^{\circ}$ 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
3.50	柱温箱	CTO.RVR	1*
4.00	泵	B.Conc	95
5.00	泵	B.Conc	95
5.00	柱温箱	CTO.RVR	0
5.10	泵	B.Conc	30
7.00	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

分析仪器：	LCMS-8045	离子化模式：	ESI+
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
接口温度：	300°C	DL 温度：	250°C
扫描模式：	多反应监测 (MRM)	加热模块温度：	400°C
延迟时间：	3 ms	驻留时间：	30 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	289.00	259.00*	-15	-7	-27
					215.00	-11	-9	-22
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 μ L 各单标储备液于 10 mL 容量瓶中，用甲醇定容，得到浓度为 10 μ g/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 0.1、0.5、1、5、10、20、50、100 ng/mL 的标准点，上机分析。

1.4 样品前处理方法

将 10mg 规格普萘洛尔片剂样品 10 片，研磨粉碎，用 50% 甲醇水 10 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 μ m 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 2.008 min，3 min 后主成分可完全洗脱出。N-亚硝酸普萘洛尔出峰时间为 3.907 min，方法中设置 3.7 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。

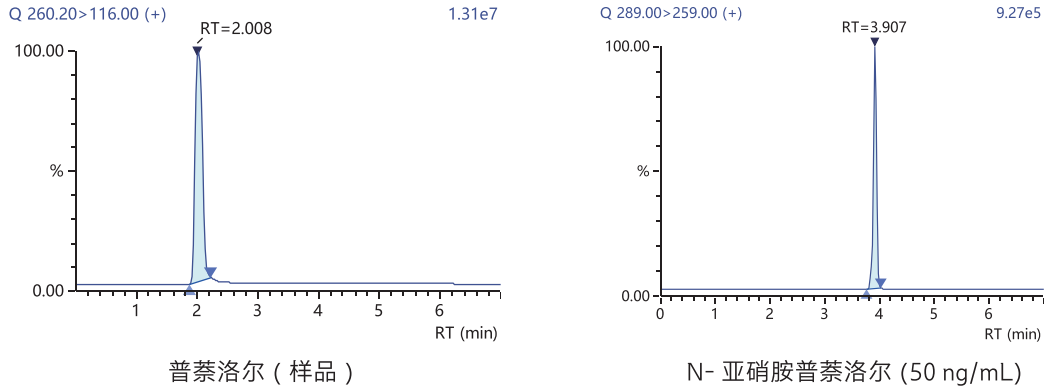


图 1 普萘洛尔主成分和 N- 亚硝酸普萘洛尔色谱图

2.2 专属性

溶剂空白与标准溶液 MRM 重叠谱图显示，目标峰保留时间处，未见明显干扰，专属性良好。

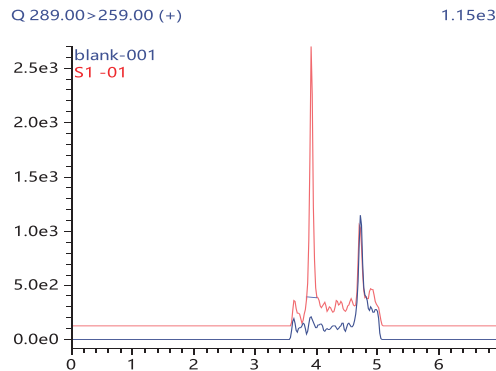


图 2 溶剂空白和 0.1 ng/mL N- 亚硝酸普萘洛尔标准溶液 MRM 重叠色谱图

2.3 线性范围

按照 1.3 项下配制方法，配制校准曲线。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，权重设置为 1/C，N- 亚硝酸普萘洛尔在 0.1~100 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 0.04 ng/mL，检出限为 0.01 ng/mL。

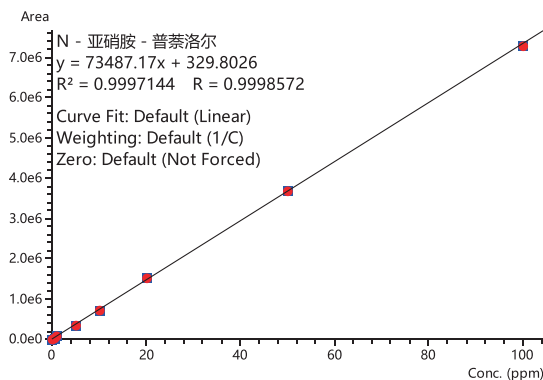


图 3 N- 亚硝酸普萘洛尔校准曲线

2.4 精密度实验

对 0.2 ng/mL 标准溶液连续分析 6 次，计算重复性。结果见表 3。N- 亚硝胺普萘洛尔的保留时间 RSD 为 0.029%，峰面积 RSD 为 2.43%，重复性良好。

表 3 N- 亚硝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	0.2	0.1862	0.029	14014	2.43
2	0.2	0.1933		14537	
3	0.2	0.1981		14888	
4	0.2	0.1863		14018	
5	0.2	0.1942		14602	
6	0.2	0.1939		14576	

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- 亚硝胺普萘洛尔物质。

表 4 N- 亚硝胺普萘洛尔加标回收和精密度结果 (n=3)

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-亚硝胺普萘洛尔	N.D.	1.0	0.982	95.63	2.32
			0.942		
			0.945		
		20	20.192	102.55	1.95
			20.379		
			20.961		

注：N.D. 表示未检出。

向样品中添加浓度为 1、20 ng/mL 2 个水平的标准溶液，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- 亚硝胺普萘洛尔的平均回收率为 95.63-102.55%，相对标准偏差为 1.95-2.32%。

■ 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱串联质谱联用仪测定普萘洛尔中基因毒性杂质 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 7 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

