

使用 LC/MS/MS 对普萘洛尔 API 及 40 mg 片剂中的致突变性 NDSRI N-亚硝基普萘洛尔进行高灵敏度定量分析

检测药物生产过程中受监管的遗传毒性杂质

作者

Kartheek Srinivas Chidella,
Gaurav Kulkarni, Saikat Banerjee,
Kannan Balakrishnan
安捷伦科技有限公司



摘要

亚硝胺杂质是致突变性杂质，根据 ICH M7 指南分类为“关注队列”(cohorts of concern)，必须受到控制以保证患者安全摄入药物。亚硝胺药物成分相关杂质 (NDSRI) 是一类与 APIs 结构相似的亚硝胺杂质，可在药品生产或储存期间生成。自 2018 年以来，发生了多起因亚硝胺杂质高于可接受摄入量导致的药品召回。自 2021 年 7 月以来，发生了多起因特定亚硝胺药物成分相关杂质 (NDSRI) 导致的若干种药品召回。近期一个例子是加拿大辉瑞召回了若干种剂量的普萘洛尔片剂，因含有的 N-亚硝基普萘洛尔高于可接受摄入量。因此，有必要开发一种高灵敏度的 LC/MS/MS 方法，来定量分析普萘洛尔 API 及片剂中的 N-亚硝基普萘洛尔。本应用简报介绍了一种使用 Agilent 6470 LC/TQ 的高灵敏度 LC/MS/MS 方法，对 N-亚硝基普萘洛尔的定量限为 25 pg/mL，并建立了所有关键的方法性能相关参数，可用于分析普萘洛尔 API 及片剂。

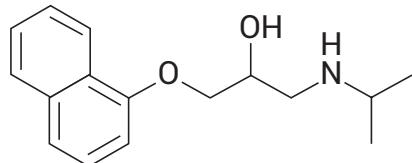
前言

药品中的亚硝胺杂质污染已成为一个关键的安全问题，根据 ICH M7 指南分类为“关注队列”^[1]。自 2018 年以来已有若干起因亚硝胺高于可接受摄入量导致的药品召回（如沙坦类、雷尼替丁和二甲双胍）^[2-4]。USFDA 和 EMEA 等监管机构已发布指南，以控制有可能生成亚硝胺的药品中的亚硝胺杂质^[5,6]。自 2021 年 7 月以来，发生了多起因亚硝胺药物成分相关杂质 (NDSRI) 高于可接受摄入量限值导致的若干类药品召回^[7]。一个例子是加拿大辉瑞因 NDSRI 召回若干种剂量的普萘洛尔片剂，其中含有高于该限值的 N-亚硝基普萘洛尔^[8]。

由于这些复杂的情况，有必要开发高灵敏度的分析方法以定量分析普萘洛尔 API 及片剂中的 N-亚硝基普萘洛尔。LC/MS/MS 天然是一种高选择性和高灵敏度的分析技术，非常适合鉴定与定量分析含量极低的致突变性杂质，已在制药行业中得到广泛应用。采用多反应监测 (MRM) 模式进行定量，因其选择性地过滤目标化合物的母离子和子离子，因此增加了分析的灵敏度和选择性。本应用简报使用安捷伦喷射流 (AJS) 离子源，通过采用热梯度离子聚焦技术，有助于提高仪器的灵敏度，达到更低的检测限。

因关于 N-亚硝基普萘洛尔限值的可用信息较少，本方法开发时采用了广泛接受的限值，相对普萘洛尔样品浓度 0.03 ppm，并达到了更低的定量限 (LOQ)，即相对普萘洛尔样品浓度 0.005 ppm，对应于 N-亚硝基普萘洛尔绝对浓度 25 pg/mL。本研究使用 Agilent 6470 LC/TQ 定量 N-亚硝基普萘洛尔，建立了所有关键的方法性能相关参数，包括检测限 (LOD)、定量限 (LOQ)、特异性、回收率、重现性和线性。

A



B

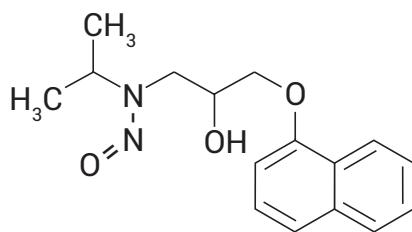


图 1. (A) 普萘洛尔和 (B) N-亚硝基普萘洛尔杂质的化学结构

化学品与试剂

N-亚硝基普萘洛尔杂质标准品和普萘洛尔 API 来自制药公司。普萘洛尔 40 mg 片剂购自本地药店。其他 LC/MS 级溶剂（甲醇、水）购自 Honeywell (Charlotte, NC, USA)。醋酸铵和甲酸购自 Fluka (现属于 Honeywell)。

实验部分

普萘洛尔 API (5 mg/mL) 样品前处理：

- 准确称取 25 mg 药品 API 于 15 mL 离心管中
- 加入 5 mL 样品稀释剂
- 溶液涡旋混合 1 分钟后超声 15 分钟，使 API 完全溶解
- 将溶液转移到 HPLC 样品瓶中，上样至 LC/MS/MS 进行分析

普萘洛尔 40 mg 片剂样品前处理 (API 最终样品浓度 5.0 mg/mL)：

- 根据标称含量，碾碎足量片剂，达到至少三倍 API 目标重量
- 根据各片剂平均重量，准确称取相当于 25 mg API 的重量
- 转移至 15 mL 离心管中，加入 5 mL 稀释剂
- 涡旋混合 1 分钟后用振荡器振荡 40 分钟
- 提取后，以 4500 rpm 的转速离心样品 15 分钟
- 使用 0.22 μm PVDF 膜过滤上清液，移至 HPLC 样品瓶中，上样至 LC/MS/MS 进行分析

液相色谱配置和参数

表 1. UHPLC 配置和设置

参数	值
仪器	Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A) Agilent 1290 Infinity II Multisampler (G7167B) Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱 (G7116B) Agilent 1290 Infinity II 可变波长检测器 (G7114B)
进样针清洗	甲醇/水 (80/20)
样品稀释剂	100% 甲醇
Multisampler 温度	5 °C
进样量	10 µL
分析柱	Agilent Pursuit XRs Diphenyl, 3.0 × 150 mm, 3 µm (部件号 A6021150X030)
柱温	40 °C
流动相 A	5 mmol/L 乙酸铵
流动相 B	0.1% 甲酸的甲醇溶液
流速	0.4 mL/min
梯度	时间 (min) %A %B 流速 (mL/min) 0 90 10 0.4 2.0 90 10 0.4 5.0 50 50 0.4 9.0 30 70 0.4 13.0 25 75 0.4 13.2 10 90 0.4 15.2 10 90 0.4 15.3 90 10 0.4 18.0 90 10 0.4
停止时间	18 min
波长	230 nm

三重四极杆质谱仪配置和参数

表 2. 质谱仪配置和离子源设置

参数	值
仪器	Agilent 6470 三重四极杆质谱仪
离子源	安捷伦喷射流离子源 (AJS) 电喷雾离子源
MS/MS 模式	MRM
离子模式	正离子
气体温度	200 °C
气体流速	10 L/min
雾化器压力	45 psi
鞘气温度	350 °C
鞘气流速	12 L/min
正离子化的毛细管电压	5500 V
喷嘴电压	1000 V
MS1/MS2 分辨率	0.7/0.7 (unit/unit)

分析物的 MS/MS 化合物信息

表 3. Agilent 6470 LC/TQ MRM 模式下的详细 MRM 设置

化合物	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	驻留时间 (ms)	碎裂电压 (V)	碰撞能量 (V)	CAV (V)	极性
N-亚硝基普萘洛尔 (定量离子)	289.1	259.2	200	60	2	5	+
N-亚硝基普萘洛尔 (定性离子)	289.1	259.2	200	60	4	5	+

数据分析

使用 Agilent MassHunter 软件 10.1 MS/MS 版采集并分析数据。利用 Agilent MassHunter Acquisition Optimizer 软件获得离子对并对其进行优化，在进样分析浓度为 1000 ng/mL 的纯溶液（流动注射模式下进样量为 1 μ L）时确定合适的母离子、子离子、碎裂电压和碰撞能量。

结果与讨论

采用安捷伦喷射流离子源以正离子模式进行方法开发，优化分析 N-亚硝基普萘洛尔时的质谱参数，包括母离子、子离子、毛细管电压、碎裂电压和碰撞能量，以获得理想灵敏度。优化气体温度、气体流速和驻留时间，以建立响应重现性。谨慎选择 MRM 离子对，以免基质干扰。使用 Agilent Pursuit XRs Diphenyl 色谱柱实现了 N-亚硝基普萘洛尔和普萘洛尔的色谱分离。还使用普萘洛尔的 N-甲酰化杂质

在经优化的相同色谱柱和方法条件下验证了特异性。

通过改变提取溶剂和提取时间对样品前处理进行了优化，获得了理想的普萘洛尔 API 和片剂中的 N-亚硝基普萘洛尔的回收率。

建立了关键参数，如特异性、重现性、线性、回收率、LOQ 和 LOD。

表 4 列出了 LOQ 和 LOD 限值及信噪比值。表 5 和表 6 列出了重现性数据，包括在限值水平 0.03 ppm 和 LOQ 时（含间插标样）的值。

校准浓度范围为 0.025–10 ng/mL，详细信息汇总于表 4 中。所有分析 N-亚硝基普萘洛尔的 R^2 值均大于 0.99，在整个浓度范围内表现出线性响应。

普萘洛尔 API 中限值水平的 N-亚硝基普萘洛尔以及普萘洛尔 40 mg 片剂中 0.12 ppm 水平的 N-亚硝基普萘洛尔回收率实验汇总于表 7 和表 8。

图 2 至图 4 为 6470 LC/TQ 获得的代表性提取离子 MRM 色谱图，分别展示了标准、LOQ 和加标条件下 N-亚硝基普萘洛尔的洗脱和分离。采集 DAD 色谱图以获取高浓度普萘洛尔 API 的保留时间，从而将普萘洛尔 API 引入废液以免质谱污染。如表 9 所述，通过创建分流阀程序，使用内置分流阀将此高浓度普萘洛尔 API 引入废液。

表 4. N-亚硝基普萘洛尔 LOQ 和 LOD 的代表性信噪比数据和线性数据

序号	化合物	LOD		LOD (S/N)	LOQ		LOQ (S/N)	R^2	线性范围	
		ng/mL	ppm		ng/mL	ppm			ng/mL	ppm
1	N-亚硝基普萘洛尔	0.0075	0.0015	34.7	0.025	0.005	107.3	0.99504	0.025–10	0.005–2

* 采用均方根算法计算 S/N，噪音宽度 0.5 min，使用 Agilent MassHunter 定量分析软件 10.1 版选择参比作为样品

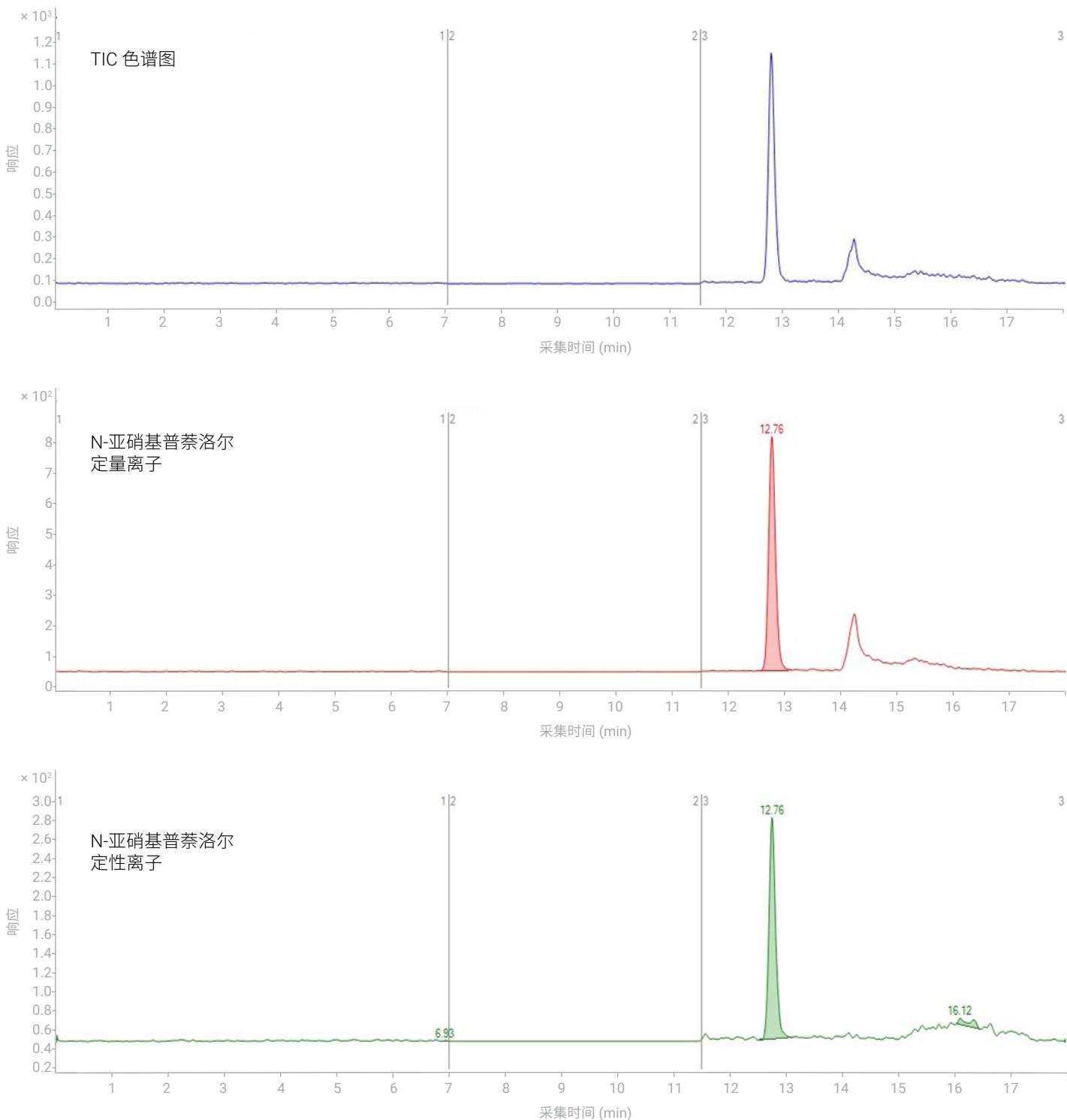


图 2. 0.15 ng/mL N-亚硝基普萘洛尔 (0.03 ppm, 相当于 API 浓度 5.0 mg/mL) 的代表性标准色谱图

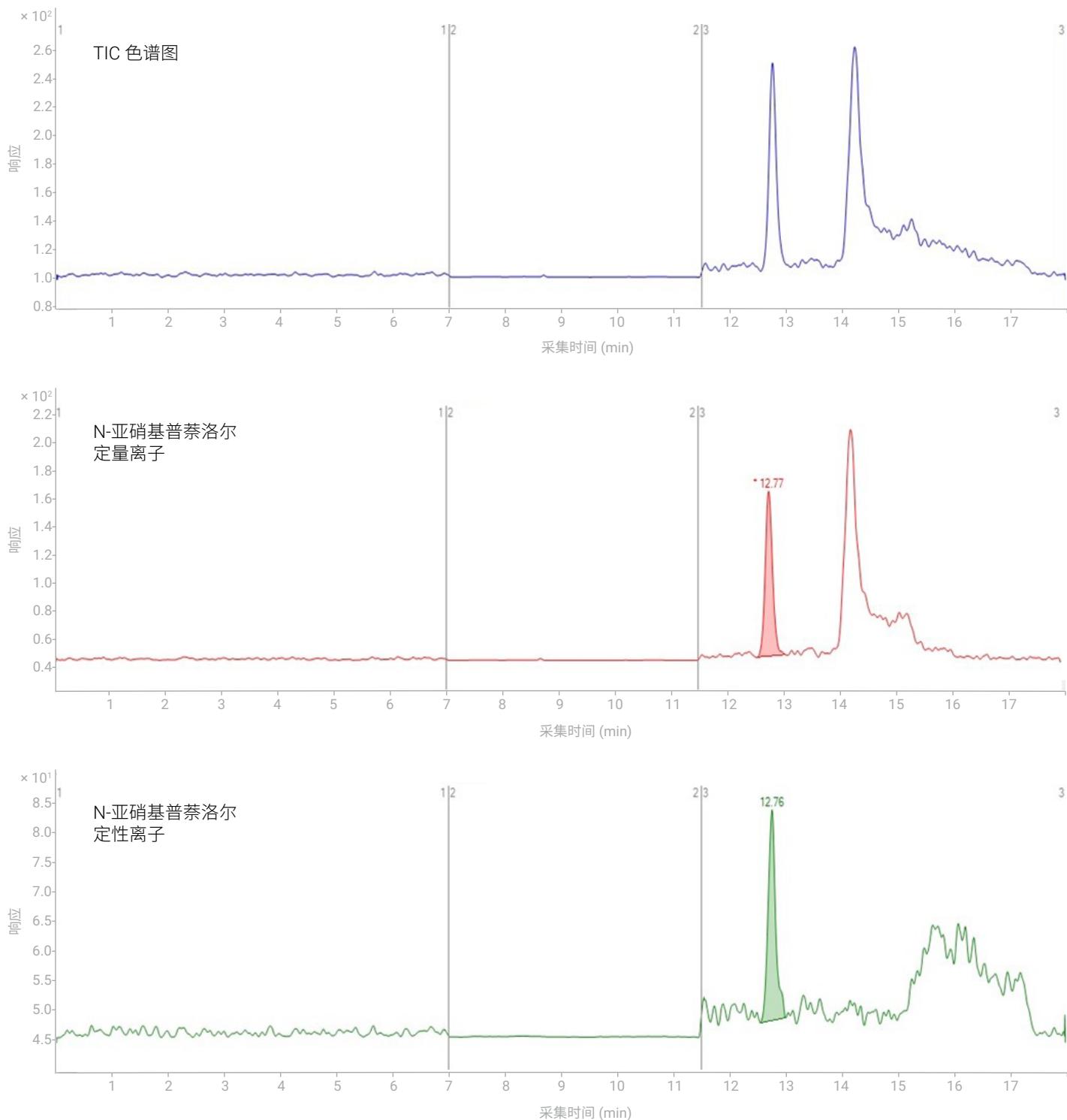


图 3. 0.025 ng/mL N-亚硝基普蔡洛尔 (0.005 ppm, 相当于 API 浓度 5.0 mg/mL) 的代表性 LOQ 色谱图

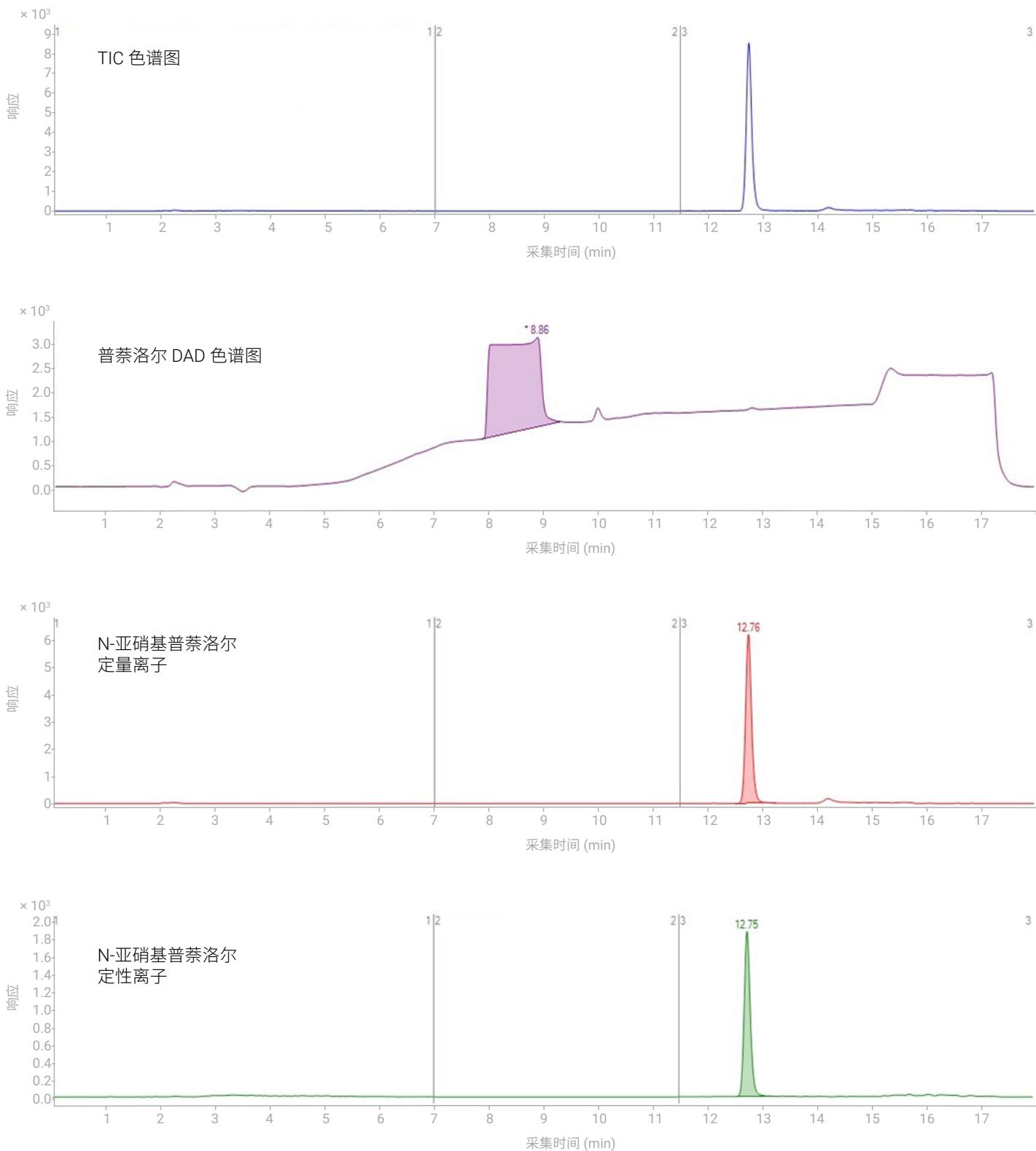


图 4. 0.6 ng/mL N-亚硝基普萘洛尔加标普萘洛尔 40 mg 片剂 (0.12 ppm, 相当于 API 浓度 5.0 mg/mL) 的代表性色谱图

准确度和重现性

N-亚硝基普萘洛尔的校准曲线表明准确度在预期浓度的上下 15% 以内。校准浓度范围如表 4 所示，各浓度下的重现性指标 CVs 均小于 15%。以下是 6470 LC/TQ 系统生成的校准曲线。

N-亚硝基普萘洛尔杂质相对普萘洛尔 N-甲酰化杂质的特异性

制备普萘洛尔 N-甲酰化杂质

1. 准确称取 25 mg 普萘洛尔，转移至 15 mL 离心管中
2. 加入 5 mL 2 N 甲酸
3. 将离心管置于热水浴中，使反应在 70 °C 下进行 90 分钟
4. 将混合物置于 HPLC 样品瓶中进行 LC/MS 分析

使用全扫描模式采集数据，在正离子模式下于 288 m/z 处提取色谱图（普萘洛尔甲酰化杂质分子质量：287）。

图 6 显示了普萘洛尔甲酰化杂质 (EIC) 和 0.6 ng/mL N-亚硝基普萘洛尔 (0.12 ppm, 相当于 API 浓度 5.0 mg/mL) 分离的代表性色谱图，以证明特异性。

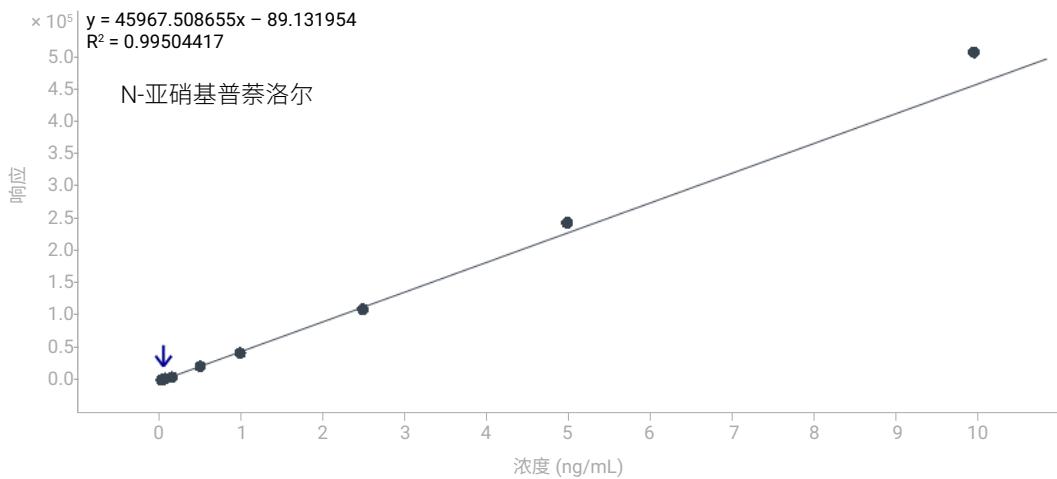


图 5. 使用 Agilent 6470 LC/TQ 生成、分散在整个色谱图中的 N-亚硝基普萘洛尔代表性校准曲线。校准曲线采用 $1/x^2$ 的加权因子

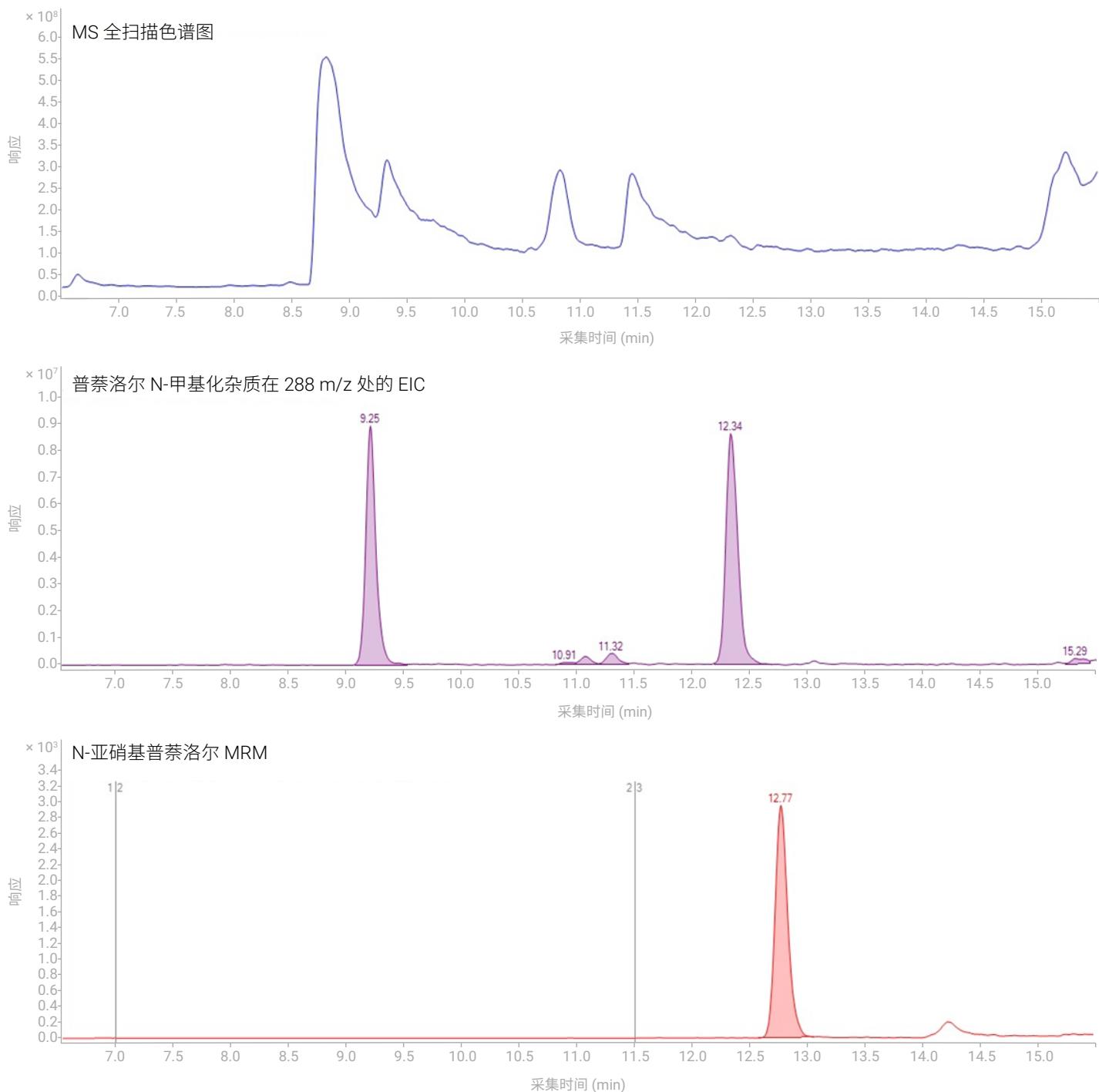


图 6. 显示普萘洛尔甲酰化杂质 (EIC) 和 0.6 ng/mL N-亚硝基普萘洛尔 (0.12 ppm, 相当于 API 浓度 5.0 mg/mL) 分离的代表性色谱图, 以证明特异性

表 5. 本方法在 0.15 ng/mL (0.03 ppm, 相当于 API 浓度 5 mg/mL) 时的代表性重现性数据, 包括间插标样

	序号	N-亚硝基普萘洛尔
初始重复样	1	6450
	2	6582
	3	6424
	4	6461
	5	6679
	6	6139
间插标样	7	6492
	平均值	6461.0
	标准偏差	167.5
	%RSD	2.6

表 6. 本方法在 LOQ 0.025 ng/mL (0.005 ppm, 相当于 API 浓度 5.0 mg/mL) 时的代表性重现性数据

	序号	N-亚硝基普萘洛尔
初始重复样	1	1041
	2	1088
	3	1063
	4	1101
	5	1109
	6	1155
	平均值	1092.8
	标准偏差	39.5
	%RSD	3.6

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

DE95718405

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司, 2022

2022 年 8 月 10 日, 中国出版

5994-5161ZHCN

表 7. 普萘洛尔 API 中 0.15 ng/mL (0.03 ppm, 相当于 API 浓度 5.0 mg/mL) 的回收率实验汇总

序号	杂质名称	普萘洛尔 API 中 0.15 ng/mL (0.03 ppm) 的回收率
1	N-亚硝基普萘洛尔	100.6%

表 8. 普萘洛尔 API 中 0.6 ng/mL (0.12 ppm, 相当于 API 浓度 5.0 mg/mL) 的回收率实验汇总

序号	杂质名称	普萘洛尔 40 mg 片剂中 0.6 ng/mL (0.12 ppm) 的回收率
1	N-亚硝基普萘洛尔	99.4%

普萘洛尔 API (表 7) 和 40 mg 片剂 (表 8) 的回收率实验均重复进行两次。片剂中的回收率实验在更高浓度下进行, 因为样品中已有 N-亚硝基普萘洛尔存在。

表 9. 用于将亚硝基普萘洛尔 APIs 引入废液的分流阀程序

编号	开始时间 (min)	扫描类型	分流阀
1	0	MRM	MS
2	7	MRM	废液
3	11.5	MRM	MS

结论

综上所述, 使用 Agilent 6470 LC/TQ 开发了一种高灵敏度和高选择性的方法, 用于普萘洛尔 API 和片剂中 N-亚硝基普萘洛尔的定量分析, 并建立了所有方法性能的关键参数。本应用简报旨在展示使用 6470 LC/TQ 进行亚硝基普萘洛尔定量分析的重现性和灵敏度。

参考文献

- ICH Harmonised Guideline. https://database.ich.org/sites/default/files/M7_R1_Guideline.pdf
- US Food and Drug Administration Updates and Press Announcements. <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-updates-and-press-announcements-angiotensin-ii-receptor-blocker-arb-recalls-valsartan-losartan>
- US Food and Drug Administration Updates and Press Announcements. <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-updates-and-press-announcements-ndma-metformin>
- US Food and Drug Administration Updates and Press Announcements. <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-updates-and-press-announcements-ndma-zantac-ranitidine>
- US Food and Drug Administration Updates and Press Announcements. <https://www.fda.gov/media/141720/download>
- US Food and Drug Administration Updates and Press Announcements. [https://www.edqm.eu/en/n-nitrosamine-contamination-in-brief%22335059%22:\[3\]}](https://www.edqm.eu/en/n-nitrosamine-contamination-in-brief%22335059%22:[3]})
- US Food and Drug Administration Updates and Press Announcements. <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-updates-and-press-announcements-nitrosamine-varenicline-chantix>
- Government of Canada Recalls and Safety Alerts Home Page. <https://recalls-rappels.canada.ca/en/alert-recall/pfizer-recalls-inderal-propranolol-hydrochloride-capsules-due-nitrosamine-impurity>