

本土化SCIEX Triple Quad™ 系统定量分析艾司洛尔药物中基因毒性杂质N-亚硝基艾司洛尔

Quantitative Analysis of Genotoxic Impurity N-nitroso Esmolol in Esmolol Drugs by Localized SCIEX Triple Quad™ System

靳祖珑, 钟晨春, 龙志敏, 郭立海

Jin Zulong, Zhong Chenchun, Long Zhimin, Guo Lihai

SCIEX应用支持中心, 中国

SCIEX China

Key words: Localize SCIEX Triple Quad™ 4500 System, Esmolol, Genotoxic impurities, N-Nitroso Esmolol

引言

艾司洛尔为超短效 β -肾上腺素能受体阻滞剂, 可选择性地阻滞 β 1-受体, 故对支气管影响很小, 对伴有慢性阻塞性肺疾患的病人有利, 是治疗室上性快速心律失常、急性心肌缺血、术后高血压等的理想药物。为了保证药品的安全和质量可控, 实现有效的风险控制, 国家药审中心(CDE)发布《化学药物中亚硝胺类杂质研究技术指导原则(试行)》的通告(2020年第1号)^[1]。N-亚硝基艾司洛尔作为艾司洛尔原料和制剂中可能存在的基因毒性杂质, 因此需进行严格的检测及含量控制。本方案在高效液相串联质谱仪上开发液质方法, 为艾司洛尔原料和制剂中N-亚硝基艾司洛尔的定量检测提供参考。

本方法使用本土化SCIEX Triple Quad™ 系统进行定量, 方法特点如下:

- 1、使用本土化SCIEX Triple Quad™ 系统, 建立3.5 min 色谱梯度, 实现N-亚硝基艾司洛尔的高灵敏度定量分析
- 2、方法灵敏度高(最低定量限LLOQ: 5 pg/mL, 相当于500 μ g/ml原料药中的含量为0.01 ng/mg, 远低于关注阈值0.2ng/mg^[2]); 标准溶液线性范围宽(5 pg/mL ~ 15 ng/mL, 3000倍线性范围); 线性关系良好(相关系数0.999); 不同浓度点重现性好(3针RSD均在3.16%以内), 表明仪器和方法重现性好。
- 3、该方案中包含的液质条件为基因毒性杂质N-亚硝基艾司洛尔的检测提供参考

实验方法

仪器设备



图1. ExionLC™ AE系统和本土化SCIEX LC-MS/MS系统

液相方法

液相: SCIEX ExionLC™ AE系统

色谱柱: Phenomenex Kinetex EVO C18, 2.1 \times 50 mm, 1.7 μ m

流动相: A相: 水(含10 mM甲酸铵)

B相: 95%甲醇水含10 mM甲酸铵)

流速: 0.3 mL/min

柱温: 40 $^{\circ}$ C

进样体积: 10 μ L

梯度洗脱程序如表1:

表1. 液相梯度条件

时间 (min)	A%	B%
0.0	95	5
0.3	50	50
2.0	5	95
2.7	5	95
2.8	95	5
3.5	95	5

质谱方法

本土化SCIEX Triple Quad™ 系统

数据采集方法: MRM (多反应监测)

离子源: ESI+源

离子源参数:

气帘气CUR: 30 psi IS 电压: 3500 V

源温度TEM: 150 °C 雾化气Gas1: 35 psi

辅助气Gas2: 60 psi 碰撞气CAD: 7

N-Nitroso-Esmolol化合物结构式如图2

多反应监测离子通道如表2

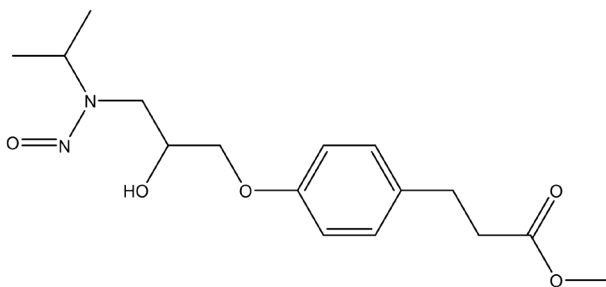


图2. N-Nitroso-Esmolol结构式

表2. MRM离子对信息

Compound	Q1	Q3	DP	CE
N-Nitroso-Esmolol	342.3	72.1	30	23

实验结果

灵敏度和线性考察

空白溶剂、5 pg/mL和15000 pg/mL 标准溶液典型谱图见图3。从图3可以看出, 空白溶剂中无干扰, 表明方法专属性好, 特异性高。最低定量限LLOQ为5 pg/mL, 表明仪器灵敏度高。该色谱条件下, 色谱峰峰形良好。

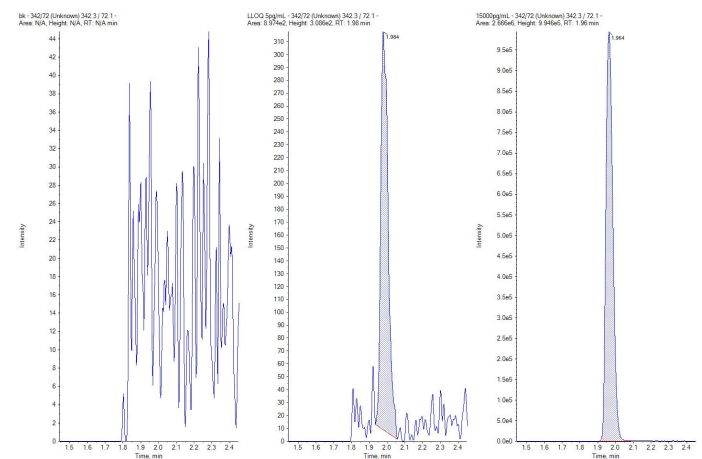


图3. 典型色谱图 (从左到右分别为空白溶剂、5 pg/mL和15000 pg/mL标准溶液)

以50%甲醇水作为溶剂配制不同浓度的标准溶液, 浓度分别为5, 15, 50, 150, 500, 1500, 5000和15000 pg/mL, 进LC-MS/MS系统进行分析。每个浓度重复进样3次, 用于考察方法和仪器的重复性。不同浓度的峰面积及线性回归方程见图4。从图4可见,

Sample Name	Sample Type	Component	Component Type	Actual Concentration	Expected RT	Area	Height	Retention Time	Retention Time	Us	Calcul. Concentration	Adduct / Charge	Accuracy	Form	Preconcentration
5pg/mL	Standard	342/72	Qualifiers	5.00	1.95	8.818e2	2.824e2	1.92	0.03	☑	5.270e0		105.41		342.300
5pg/mL	Standard	342/72	Qualifiers	5.00	1.95	9.030e2	3.471e2	1.96	0.01	☑	5.392e0		107.84		342.300
5pg/mL	Standard	342/72	Qualifiers	5.00	1.95	9.149e2	3.360e2	1.97	0.02	☑	5.460e0		109.21		342.300
15pg/mL	Standard	342/72	Qualifiers	15.00	1.95	2.664e3	8.913e2	1.97	0.03	☑	1.551e1		103.38		342.300
15pg/mL	Standard	342/72	Qualifiers	15.00	1.95	2.535e3	8.789e2	1.94	0.00	☑	1.477e1		98.47		342.300
15pg/mL	Standard	342/72	Qualifiers	15.00	1.95	2.586e3	8.309e2	1.96	0.02	☑	1.506e1		100.42		342.300
50pg/mL	Standard	342/72	Qualifiers	50.00	1.95	8.180e3	2.767e3	1.94	0.00	☑	4.720e1		94.40		342.300
50pg/mL	Standard	342/72	Qualifiers	50.00	1.95	7.777e3	2.653e3	1.96	0.02	☑	4.489e1		89.77		342.300
50pg/mL	Standard	342/72	Qualifiers	50.00	1.95	7.868e3	2.610e3	1.95	0.01	☑	4.541e1		90.81		342.300
150pg/mL	Standard	342/72	Qualifiers	150.00	1.95	2.763e4	9.340e3	1.94	0.01	☑	1.550e2		105.98		342.300
150pg/mL	Standard	342/72	Qualifiers	150.00	1.95	2.655e4	8.913e3	1.95	0.00	☑	1.527e2		101.83		342.300
150pg/mL	Standard	342/72	Qualifiers	150.00	1.95	2.631e4	8.731e3	1.95	0.00	☑	1.514e2		100.90		342.300
500pg/mL	Standard	342/72	Qualifiers	500.00	1.95	8.553e4	2.885e4	1.94	0.00	☑	4.916e2		98.32		342.300
500pg/mL	Standard	342/72	Qualifiers	500.00	1.95	8.472e4	2.801e4	1.96	0.01	☑	4.870e2		97.39		342.300
500pg/mL	Standard	342/72	Qualifiers	500.00	1.95	8.102e4	2.745e4	1.95	0.01	☑	4.657e2		93.13		342.300
1500pg/mL	Standard	342/72	Qualifiers	1500.00	1.95	2.741e5	9.245e4	1.94	0.00	☑	1.575e3		105.00		342.300
1500pg/mL	Standard	342/72	Qualifiers	1500.00	1.95	2.717e5	9.301e4	1.94	0.00	☑	1.561e3		104.07		342.300
1500pg/mL	Standard	342/72	Qualifiers	1500.00	1.95	2.651e5	9.020e4	1.95	0.00	☑	1.523e3		101.55		342.300
5000pg/mL	Standard	342/72	Qualifiers	5000.00	1.95	8.571e5	2.889e5	1.96	0.02	☑	4.924e3		98.49		342.300
5000pg/mL	Standard	342/72	Qualifiers	5000.00	1.95	8.481e5	2.855e5	1.95	0.02	☑	4.873e3		97.46		342.300
5000pg/mL	Standard	342/72	Qualifiers	5000.00	1.95	8.119e5	2.745e5	1.96	0.01	☑	4.665e3		93.29		342.300
15000pg/mL	Standard	342/72	Qualifiers	15000.00	1.95	2.692e6	9.004e5	1.95	0.00	☑	1.547e4		103.11		342.300
15000pg/mL	Standard	342/72	Qualifiers	15000.00	1.95	2.676e6	8.945e5	1.94	0.01	☑	1.537e4		102.48		342.300
15000pg/mL	Standard	342/72	Qualifiers	15000.00	1.95	2.540e6	8.607e5	1.97	0.02	☑	1.459e4		97.29		342.300

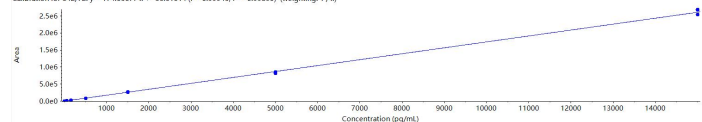


图4. 标准曲线和线性回归方程, 线性相关系数0.999

5~15000 pg/mL的浓度范围内，线性相关系数0.999，表明仪器的线性范围宽，且线性关系良好。不同浓度的回收率均在89.77-109.21%（见图4中Accuracy列），表明仪器和方法的准确性高。

Row	Component Name	Actual Concentration	Num. Values	Mean	Standard Deviation	Percent CV	Average Accuracy across Replicates	Value #1
1	342/72	5.00	3 of 3	5.374e0	9.621e-2	1.79	107.49	5.270e0
2	342/72	15.00	3 of 3	1.511e1	3.700e-1	2.45	100.76	1.555e1
3	342/72	50.00	3 of 3	4.583e1	1.214e0	2.65	91.66	4.720e1
4	342/72	150.00	3 of 3	1.544e2	4.053e0	2.63	102.90	1.590e2
5	342/72	500.00	3 of 3	4.814e2	1.384e1	2.87	96.28	4.916e2
6	342/72	1500.00	3 of 3	1.559e3	2.677e1	1.72	103.54	1.575e3
7	342/72	5000.00	3 of 3	4.821e3	1.376e2	2.85	96.41	4.924e3
8	342/72	15000.00	3 of 3	1.514e4	4.789e2	3.16	100.96	1.547e4

图5. RSD计算结果列表

重现性

为考察方法和仪器的重现性，将标准溶液中的不同浓度点分别重复进样3次，计算RSD%。3针样品（图5）连续采集，精密度RSD均在3.16%以内（见图5中percent CV列），远满足方法学中对外重复性要求，表明仪器和方法的重现性好。

加标回收率考察

取三份不同批次的艾司洛尔原料药样品，加入甲醇超声溶解，用50%甲醇水稀释至500 µg/mL，每种样品平行配制6份，其中3份加入N-亚硝基艾司洛尔标准溶液使终浓度增加7.5 pg/mL。

加标回收率结果（表3）可知，两个不同浓度的加标回收率在92-95%之间，加标回收率表明样本无明显基质效应，且定量准确，满足方法学要求。

结论

本方案中使用本土化SCIEX Triple Quad™质谱系统，建立3.5 min色谱梯度，实现N-亚硝基艾司洛尔的高灵敏度定量分析。该方法中空白溶剂无干扰，专属性好，特异性高；最低定量限

表3. 不同样本的加标回收率结果

样品	样品测定浓度 (pg/mL)	样品平均浓度 (pg/mL)	加标测定浓度 (pg/mL)	加标后平均浓度 (pg/mL)	加标回收率 (%)
样品1	7.68		14.85		
	7.55	7.61	14.37	14.41	95.4
	7.59		14.01		
样品2	9.56		16.35		
	9.84	9.54	15.57	15.92	93.4
	9.22		15.83		
样品3	6.95		13.29		
	7.35	7.17	13.42	13.54	92.3
	7.21		13.91		

LLOQ: 5 pg/mL，相当于500 µg/ml原料药中的含量为0.01ng/mg，远低于关注阈值0.2ng/mg，表明仪器灵敏度高；线性范围为5~15000 pg/mL，线性范围宽，线性关系良好；不同浓度点连续3针RSD均在3.16%以内，表明仪器和方法的重现性和稳定性好。三个不同的样品加标回收率在92~95%之间，表明该方法定量准确。该方案中包含的液质条件为基因毒性杂质N-亚硝基艾司洛尔的检测提供参考。

参考文献

- [1]. 化学药物中亚硝胺类杂质研究技术指导原则（试行），2020.05.08.
- [2]. 田珩; 杨仪雪; 戴聪; 刘亚雄; 严全鸿; 5种β受体拮抗剂类药物中的N-亚硝基类杂质的含量研究[J]; 中国药房; 2024年08期

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2024 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-32739-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话: 010-5808-1388
传真: 010-5808-1390
全国咨询电话: 800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话: 021-2419-7201
传真: 021-2419-7333
官网: sciex.com.cn

广州办公室
广州国际生物岛星岛环北路1号
B2栋501、502单元
电话: 020-8842-4017

官方微信: [SCIEX-China](https://www.sciex.com.cn)