

# 本土化SCIEX Triple Quad™ 4500系统测定依那普利中的N-亚硝基依那普利

## Quantitative Analysis of N-Nitroso-Enalapril in Enalapril by Localize SCIEX Triple Quad™ 4500 System

雷敏, 龙志敏, 郭立海

Lei Min, Long Zhimin, Guo Lihai

SCIEX, 中国

**Keywords:** Quantitation, N-Nitroso-Enalapril, Enalapril, Genotoxic impurities, Localize SCIEX Triple Quad™ 4500 System

### 引言

依那普利为血管紧张素转换酶抑制剂 (ACEI), 主要用于治疗高血压等心血管疾病。随着中国老龄化加重, 因此心血管等疾病用药量也逐年增加。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)<sup>[1]</sup>。N-亚硝基依那普利作为依那普利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, 为依那普利原料和制剂中N-亚硝基依那普利的定量检测提供参考。

### 本文中实验方法特点

本方法使用本土化SCIEX Triple Quad™ 4500系统进行定量, 方法特点如下:

- 1、使用本土化SCIEX Triple Quad™ 4500系统, 建立7 min 色谱梯度, 实现高通量定量分析。
- 2、方法灵敏度高 (定量下限LOQ: 0.02 ng/mL, 相当于5 mg/ml原料药中的含量为4 µg/kg); 标准溶液线性范围宽 (0.02 ~ 100 ng/mL, 5000倍线性范围); 线性关系良好 (相关系数0.9999); 不同浓度点重现性好 (3针RSD均在4.92%以内), 表明仪器和方法重现性好。
- 3、两个不同浓度的提取回收率在103-112%之间, 满足回收率的要

求; 不同浓度的提取回收率RSD (平行3针) 均在3.11%, 表明不同浓度回收率结果一致, 且仪器的重复性好。

- 4、该方案中包含的液质条件为基因毒性杂质N-亚硝基依那普利的检测提供参考。

### 实验方法

#### 1、仪器设备



图1. ExionLC™ AE系统和本土化SCIEX LC-MS/MS系统

#### 2、液相条件

液相: SCIEX ExionLC™AE系统

色谱柱: Phenomenex Kinetex Bi-phenol C18, 3.0 × 100 mm, 2.6 µm

流动相A相: H<sub>2</sub>O(含 0.005%甲酸)

B相: ACN(含 0.005%甲酸)

流速：0.5 mL/min

柱温：40 °C

梯度洗脱程序如表1:

表1. 液相梯度条件

时间 (min)	A%	B%
0	75	25
3.2	35	65
3.5	5	95
5.0	5	95
5.1	75	25
7.0	75	25

### 3、质谱条件

本土化SCIEX Triple Quad™ 4500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: 30psi

IS电压: 5500V

源温度 TEM: 550°C

雾化气Gas1: 55psi

辅助气Gas2: 55psi

碰撞气 CAD: Medium

N-Nitroso-Enalapril化合物结构式如下，图2:

多反应监测离子通道如表2

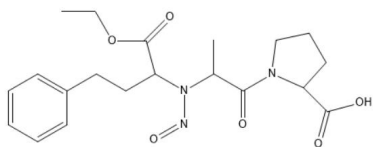


图2. N-Nitroso-Enalapril结构式

表2. MRM离子对信息

化合物	母离子 Q1(m/z)	子离子Q3 (m/z)	DP (V)	CE (V)
N-Nitroso-Enalapril	406.2	234.1	70	25

## 4、实验结果

### 灵敏度和线性考察

空白溶剂、0.02 ng/mL和100 ng/mL 标准溶液典型谱图见图3。从图2可以看出，空白溶剂中无干扰，表明方法专属性好，特异性高。LOQ可低至0.02 ng/mL，表明仪器灵敏度高。该色谱条件下，色谱峰峰形良好。

备注：该化合物会出现两个色谱峰，推测可能是化合物在溶剂中发生结构互变，因此在保留时间上有差异，出现两个色谱峰。后续在处理数据时通过软件的加和功能将两个峰加和后再拟合标曲，及计算回收率等结果。

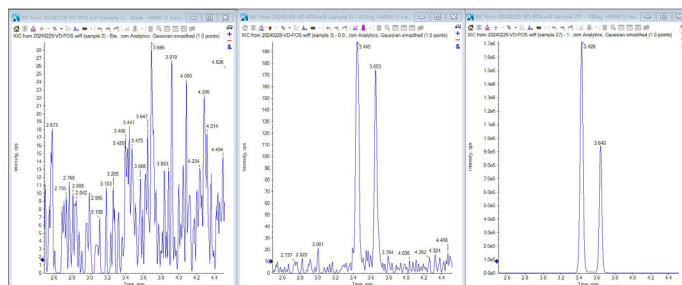


图3. 典型色谱图 (从左到右, 分别为空白溶剂、0.02 ng/mL和100 ng/mL标准溶液)

以甲醇作为溶剂配制不同浓度的标准溶液，浓度分别为0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 1, 2, 10, 20, 100 ng/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，0.02~100 ng/mL的浓度范围内，线性相关系数0.9999，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92.79~105.40% (见图4中Accuracy列)，表明仪器和方法的准确性高。

### 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4.92%以内 (见图5中percent CV列)，远满足方法学中对重复性要求，表明仪器和方法的重现性好。

### 提取回收率考察

取一定量依那普利原料药加入甲醇，超声溶解，配制浓度为5 mg/ml。该溶液平行制备9份，其中3份作为样品空白；另取3份

Index	Sample N...	Sample Type	Component Na...	Component Type	Actual Concentr...	Area	Height	Retenti... Time	Used	Calculated Concentra...	Accuracy	Form...	Addit / Charge	Pres. Mat
3	Blank	Unknown	406.2 / 234.1	Quantifiers	N/A	N/A	N/A	N/A	☑	N/A	N/A			406.2
5	0.02ng	Standard	406.2 / 234.1	Quantifiers	0.02	9.879e2	1.952e2	3.51	☑	0.019	95.98			406.2
7	0.02ng	Standard	406.2 / 234.1	Quantifiers	0.02	9.496e2	2.573e2	3.46	☑	0.019	92.79			406.2
9	0.02ng	Standard	406.2 / 234.1	Quantifiers	0.02	1.062e3	2.853e2	3.46	☑	0.020	102.18			406.2
11	0.05ng	Standard	406.2 / 234.1	Quantifiers	0.05	2.999e3	7.642e2	3.47	☑	0.053	105.40			406.2
13	0.05ng	Standard	406.2 / 234.1	Quantifiers	0.05	2.864e3	7.226e2	3.47	☑	0.050	100.91			406.2
15	0.05ng	Standard	406.2 / 234.1	Quantifiers	0.05	3.141e3	8.683e2	3.45	☑	0.055	110.16			406.2
17	0.1ng	Standard	406.2 / 234.1	Quantifiers	0.10	5.682e3	1.716e3	3.44	☑	0.097	97.42			406.2
19	0.1ng	Standard	406.2 / 234.1	Quantifiers	0.10	5.851e3	1.635e3	3.47	☑	0.100	100.24			406.2
21	0.1ng	Standard	406.2 / 234.1	Quantifiers	0.10	5.979e3	1.801e3	3.43	☑	0.102	102.36			406.2
23	0.2ng	Standard	406.2 / 234.1	Quantifiers	0.20	1.203e4	3.472e3	3.44	☑	0.203	101.62			406.2
25	0.2ng	Standard	406.2 / 234.1	Quantifiers	0.20	1.201e4	3.456e3	3.44	☑	0.200	101.47			406.2
27	0.2ng	Standard	406.2 / 234.1	Quantifiers	0.20	1.182e4	3.390e3	3.45	☑	0.200	99.86			406.2
29	1ng	Standard	406.2 / 234.1	Quantifiers	1.00	5.880e4	1.681e4	3.45	☑	0.977	97.74			406.2
31	1ng	Standard	406.2 / 234.1	Quantifiers	1.00	5.749e4	1.673e4	3.44	☑	0.961	96.08			406.2
33	1ng	Standard	406.2 / 234.1	Quantifiers	1.00	5.796e4	1.680e4	3.45	☑	0.969	96.85			406.2
35	2ng	Standard	406.2 / 234.1	Quantifiers	2.00	1.195e5	3.465e4	3.44	☑	1.994	99.72			406.2
37	2ng	Standard	406.2 / 234.1	Quantifiers	2.00	1.194e5	3.464e4	3.45	☑	1.992	99.58			406.2
39	2ng	Standard	406.2 / 234.1	Quantifiers	2.00	1.209e5	3.606e4	3.44	☑	2.018	100.08			406.2
41	10ng	Standard	406.2 / 234.1	Quantifiers	10.00	5.916e5	1.697e5	3.45	☑	9.861	98.61			406.2
43	10ng	Standard	406.2 / 234.1	Quantifiers	10.00	5.981e5	1.721e5	3.45	☑	9.970	99.70			406.2
45	10ng	Standard	406.2 / 234.1	Quantifiers	10.00	6.020e5	1.724e5	3.45	☑	10.035	100.35			406.2
47	20ng	Standard	406.2 / 234.1	Quantifiers	20.00	1.201e6	3.444e5	3.44	☑	20.024	100.12			406.2
49	100ng	Standard	406.2 / 234.1	Quantifiers	100.00	5.701e6	3.475e5	3.44	☑	50.976	100.97			406.2

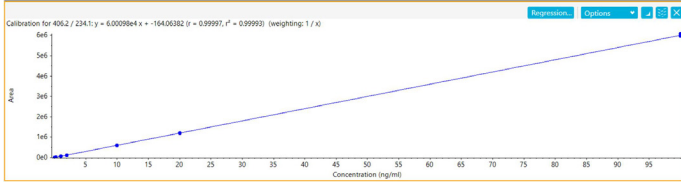


图4. 标准曲线和线性回归方程，线性相关系数 0.9999

Index	Sample N...	Sample Type	Component Na...	Component Type	Actual Concentr...	Area	Height	Retenti... Time	Used	Calculated Concentra...	Accuracy	Form...	Addit / Charge	Pres. Mat
3	Blank	Unknown	406.2 / 234.1	Quantifiers	N/A	N/A	N/A	N/A	☑	N/A	N/A			406.2
5	0.02ng	Standard	406.2 / 234.1	Quantifiers	0.02	9.879e2	1.952e2	3.51	☑	0.019	95.98			406.2
7	0.02ng	Standard	406.2 / 234.1	Quantifiers	0.02	9.496e2	2.573e2	3.46	☑	0.019	92.79			406.2
9	0.02ng	Standard	406.2 / 234.1	Quantifiers	0.02	1.062e3	2.853e2	3.46	☑	0.020	102.18			406.2
11	0.05ng	Standard	406.2 / 234.1	Quantifiers	0.05	2.999e3	7.642e2	3.47	☑	0.053	105.40			406.2
13	0.05ng	Standard	406.2 / 234.1	Quantifiers	0.05	2.864e3	7.226e2	3.47	☑	0.050	100.91			406.2
15	0.05ng	Standard	406.2 / 234.1	Quantifiers	0.05	3.141e3	8.683e2	3.45	☑	0.055	110.16			406.2
17	0.1ng	Standard	406.2 / 234.1	Quantifiers	0.10	5.682e3	1.716e3	3.44	☑	0.097	97.42			406.2
19	0.1ng	Standard	406.2 / 234.1	Quantifiers	0.10	5.851e3	1.635e3	3.47	☑	0.100	100.24			406.2

Row	Component Name	Actual Concentration	Num. Values	Mean	Standard Deviat...	Percent CV	Average Accur...	Value #1	Value #2	Value #3
1	406.2 / 234.1	0.02	3 of 3	0.019	0.001	4.92	96.98	0.019	0.019	0.020
2	406.2 / 234.1	0.05	3 of 3	0.053	0.002	4.39	105.49	0.053	0.050	0.055
3	406.2 / 234.1	0.10	3 of 3	0.100	0.002	2.48	100.00	0.097	0.100	0.102
4	406.2 / 234.1	0.20	3 of 3	0.202	0.002	0.97	100.98	0.203	0.200	0.200
5	406.2 / 234.1	1.00	3 of 3	0.969	0.008	0.86	96.89	0.977	0.961	0.969
6	406.2 / 234.1	2.00	3 of 3	2.001	0.014	0.71	100.06	1.994	1.992	2.018
7	406.2 / 234.1	10.00	3 of 3	9.955	0.088	0.88	99.55	9.861	9.970	10.035
8	406.2 / 234.1	20.00	3 of 3	19.993	0.097	0.49	99.96	20.024	20.019	19.883
9	406.2 / 234.1	100.00	3 of 3	100.078	1.003	1.00	100.08	99.280	99.570	101.204

图5. 不同浓度点峰面积、保留时间及RSD结果列表

分别加入N-亚硝基依那普利标准溶液配制成浓度为0.1 ng/ml的加标溶液；最后3份分别加入N-亚硝基依那普利标准溶液配制成浓度为1.5 ng/ml的加标溶液；2个不同加标浓度相当于原料药中的含量分别为0.02和0.3 mg/kg。

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. 或在美利和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2024 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-15936-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](http://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)

表4. 2个不同浓度的提取回收率结果

加标理论浓度 (ng/ml)	加标样品浓度 (ng/ml)	提取回收率 (%)	提取回收率 RSD (%)
0.1	0.106	105.75	3.11
	0.112	112.03	
	0.107	106.82	
1.5	1.574	104.94	0.56
	1.574	104.23	
	1.563	104.23	

提取回收率结果 (表4) 可知，两个不同浓度的提取回收率在103-112%之间，提取回收率RSD均在3.11%以内，表明不同浓度的提取回收率结果基本一致，且满足方法学要求。

## 5、结论

本方案中使用本土化SCIEX Triple Quad™4500系统，建立7 min 色谱梯度，实现高通量定量分析。该方法中空白溶剂无干扰，专属性好，特异性高；LOQ低至0.02 ng/ml，表明仪器灵敏度高；线性范围为0.02 -100 ng/ml，线性范围宽，线性关系良好；不同浓度点连续3针RSD均在4.92%以内，表明仪器和方法的重现性和稳定性好。两个不同浓度的提取回收率在103-112%之间，满足回收率的要求；提取回收率RSD均在3.11%以内，表明不同浓度回收率结果一致，且仪器的重复性好。该方案中包含的液质条件为基因毒性杂质N-亚硝基依那普利的检测提供参考。

## 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.