

中图分类号: R927.2; R983 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2026)09-0090-04  
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2026.09.018



# 超高效液相色谱串联质谱法测定呋塞米原料药中 *N*-亚硝基呋塞米含量\*

汪均明<sup>1</sup>, 伍明琴<sup>2</sup>, 刘峰<sup>1△</sup>

(1. 四川省药品检验研究院·监管科学创新研究基地, 四川 成都 611731; 2. 四川省达州市食品药品检验所, 四川 达州 635000)

**摘要:**目的 建立测定呋塞米原料药中*N*-亚硝基呋塞米含量的超高效液相色谱串联质谱(UPLC-MS/MS)法。方法 色谱柱为 Waters XBridge C<sub>18</sub> 柱(150 mm × 4.6 mm, 3.5 μm), 流动相为 0.01% 甲酸水溶液(含 0.005 mol/L 甲酸铵)-乙腈(梯度洗脱), 流速为 0.6 mL/min, 柱温为 30 °C, 进样量为 10 μL; 采用电喷雾电离负离子(ESI<sup>-</sup>)、多反应监测(MRM)模式进行定量分析。离子源温度为 500 °C, 雾化气为 50 psi, 毛细管电压为 -4 500 V, 电势能为 -30 V, 质荷比(*m/z*)为 357.8 → 283.9, 碰撞能为 -13 V, 采集时间为 8.5~10.0 min。结果 *N*-亚硝基呋塞米质量浓度在 0.38~2.86 ng/mL 范围内与内标峰面积比值线性关系良好( $r=0.9996, n=7$ ); 定量限和检测限分别为 0.38, 0.19 ng/mL; 中间精密密度、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 6%。平均加样回收率为 97.32%, RSD 为 3.86% ( $n=9$ )。6 批样品中均检出 *N*-亚硝基呋塞米, 含量分别为 0.55, 0.54, 0.62, 0.58, 0.41, 0.58 μg/L。结论 该方法操作简便、专属性强、灵敏度与准确度高, 适用于呋塞米原料药中 *N*-亚硝基呋塞米含量测定, 可为呋塞米原料药及相关制剂中基因毒性杂质含量控制提供参考。

**关键词:** 呋塞米; 原料药; *N*-亚硝基呋塞米; 超高效液相色谱串联质谱法; 基因毒性杂质; 含量测定

## Determination of *N*-Nitrosfurosemide in Furosemide by UPLC-MS/MS

WANG Junming<sup>1</sup>, WU Mingqin<sup>2</sup>, LIU Feng<sup>1△</sup>

(1. Sichuan Institute for Drug Control·Regulatory Science Innovation Research Base, Chengdu, Sichuan 611731, China; 2. Dazhou Institute for Food and Drug Inspection, Dazhou, Sichuan 635000, China)

**Abstract Objective** To establish an ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method for the content determination of *N*-nitrosfurosemide in furosemide active pharmaceutical ingredient (API). **Methods** The chromatographic column was Waters XBridge C<sub>18</sub> column (150 mm × 4.6 mm, 3.5 μm), the mobile phase was 0.01% formic acid solution (containing 0.005 mol/L ammonium formate) - acetonitrile (gradient elution), the flow rate was 0.6 mL/min, the column temperature was 30 °C, and the injection volume was 10 μL. Electrospray ionization with negative ion (ESI<sup>-</sup>) combined with multi-reaction monitoring (MRM) model was performed for quantitative analysis, the ion source temperature was 500 °C, the atomization gas pressure was 50 psi, the capillary voltage was -4 500 V, the potential was -30 V, the mass-to-charge ratio (*m/z*) was 357.8 → 283.9, the collision energy was -13 V, and the acquisition time was 8.5 - 10.0 min. **Results** The linear range of *N*-nitrosfurosemide was 0.38 - 2.86 ng/mL ( $r=0.9996, n=7$ ). The limit of quantification and limit of detection were 0.38 ng/mL and 0.19 ng/mL, respectively. The RSDs of intra-laboratory precision, stability, and repeatability test results were all lower than 6%. The average recovery of *N*-nitrosfurosemide was 97.32%, with an RSD of 3.86% ( $n=9$ ). *N*-nitrosfurosemide was detected in all six batches of samples, with contents of 0.55, 0.54, 0.62, 0.58, 0.41, and 0.58 μg/L, respectively. **Conclusion** The established method is simple, specific, with highly sensitivity and accuracy, which is suitable for the determination of *N*-nitrosfurosemide in furosemide API, and can provide a reference for controlling the levels of genotoxic impurities in furosemide API and related formulations.

**Key words:** Furosemide; active pharmaceutical ingredient; *N*-nitrosfurosemide; UPLC-MS/MS; genotoxic impurities; content determination

\*基金项目: 四川省药品监督管理局药品科技计划项目[2024013]。

第一作者: 汪均明, 女, 硕士研究生, 制药工程师, 研究方向为药品质量评价与质量标准, (电子信箱)Junmingwang20@163.com。

△通信作者: 刘峰, 男, 硕士研究生, 主任药师, 研究方向为药品质量评价与药品标准, (电子信箱)52986758@qq.com。

法测定化妆品中地索奈德含量的不确定度分析[J]. 香料香精化妆品, 2022(5):77-81.

[16] 张小娟. 高效液相色谱-串联质谱法测定化妆品中莫匹罗星等5种药物的不确定度评定[J]. 广东化工, 2024, 51(15):132-134.

[17] 刘齐, 郭洁, 王琪, 等. 化妆品中16α-羟基波尼松龙含量的不确定度评定[J]. 质量与安全检验检测, 2024, 34(6):82-85.

[18] 皮露露, 王璐, 曾辉, 等. 化妆品中添加物α-羟基酸的不确定度评定[J]. 广东化工, 2025, 52(3):140-143.

[19] 李潇, 周长明, 丁锐, 等. 复方营养混悬剂中铁元素的测定及其不确定度评定[J]. 中国药业, 2022, 31(4):75-78.

(收稿日期: 2025-06-13; 修回日期: 2026-03-11)

呋塞米为高效能袪利尿剂,其作用靶点主要集中于肾单位髓袢升支粗段,可通过选择性抑制 $\text{Cl}^-/\text{Na}^+$ 协同转运,降低肾髓质间质渗透压梯度,增加小管腔内溶质浓度,从而直接破坏逆流倍增机制对尿液的浓缩功能,抑制水分被动重吸收,最终产生显著的排钠利尿效应。呋塞米在临床上用于快速缓解水肿及降低血管内容量负荷<sup>[1-6]</sup>,主要治疗水肿性疾病、高血压、高血钾、高钙血症、稀释性低钠血症、抗利尿激素分泌过多症<sup>[7-9]</sup>及预防急性肾功能衰竭。美国食品和药物管理局(FDA)发布的《控制人用药物中亚硝胺杂质行业指南》明确指出,亚硝胺原料药相关杂质(NDSRI)是指药物分子本身参与形成的亚硝胺杂质。这类药物通常含有二级胺(包括叔胺)结构,为亚硝胺的形成提供氨基单元。呋塞米分子中含有仲胺结构,其相关杂质同样具有仲胺基团和生成基因毒性杂质 $N$ -亚硝基呋塞米的潜在风险。目前,已有文献多集中于探讨呋塞米和呋塞米片的临床应用<sup>[10-13]</sup>,以及采用高效液相色谱(HPLC)法或液相色谱-质谱联用法测定呋塞米原料药及其制剂中相关物质含量<sup>[14-20]</sup>。 $N$ -亚硝基呋塞米杂质是新发现的基因毒性杂质,目前尚未报道其检测方法。为此,本研究中建立了测定呋塞米中 $N$ -亚硝基呋塞米含量的超高效液相色谱串联质谱(UPLC-MS/MS)法,为呋塞米原料药及其制剂中基因毒性杂质的测定提供参考。现报道如下。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

LC-40A型UPLC仪(日本Shimadzu公司);AB5500+型MS仪,配备Analyst 1.7.2工作站(美国ABSciex公司);XA205DU型电子天平(精度为0.01 mg),XPR6UD5型电子天平(精度为0.5  $\mu\text{g}$ ),均购自瑞士Mettler Toledo公司。

### 1.2 试剂

呋塞米原料药(批号分别为221201,230101,230102,231001,231102,231101); $N$ -亚硝基呋塞米对照品(深圳摩科生化科技有限公司,批号为N031104,含量为98.98%);乙腈、甲酸、甲酸铵、甲醇(分析纯,美国

Thermo Fisher Scientific公司);水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 试验条件

1)色谱条件。色谱柱:Waters XBridge  $\text{C}_{18}$ 柱(150 mm  $\times$  4.6 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ );流动相:0.01%甲酸水溶液(含0.005 mol/L甲酸铵,A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~3 min时10%B,3~13 min时10%B  $\rightarrow$  90%B,13~15 min时90%B,15~15.1 min时,90%B  $\rightarrow$  10%B,15.1~22 min时10%B);流速:0.6 mL/min;柱温:30  $^{\circ}\text{C}$ ;进样盘温度:5  $^{\circ}\text{C}$ ;进样量:10  $\mu\text{L}$ 。

2)质谱条件。监测模式:电喷雾电离(ESI)离子源,负离子扫描,多反应监测(MRM)模式;离子源温度:500  $^{\circ}\text{C}$ ;雾化气:50 psi;毛细管电压:-4 500 V;电势能:-30 V;质荷比( $m/z$ ):357.8  $\rightarrow$  283.9;碰撞能:-13 V;采集时间:8.5~10.0 min。

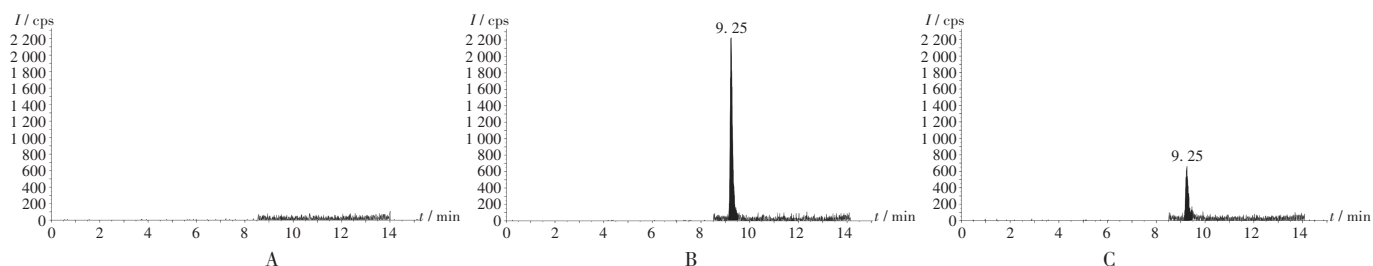
### 2.2 溶液制备

取 $N$ -亚硝基呋塞米对照品适量,精密称定,加甲醇制成每1 mL含 $N$ -亚硝基呋塞米15 ng的对照品贮备液。取对照品贮备液1 mL,置10 mL容量瓶中,用甲醇稀释并定容,即得对照品溶液。取呋塞米原料药10 mg,精密称定,置10 mL容量瓶中,加甲醇溶解并定容,即得供试品溶液。以甲醇为空白溶液。

### 2.3 方法学考察

专属性试验:取2.2项下3种溶液各适量,按2.1项下试验条件进样测定,记录色谱图。结果供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相同保留时间(9.25 min)处有相应色谱峰出现,且阴性对照无干扰,表明方法专属性良好。详见图1。

线性关系考察与检测限及定量限确定:取对照品贮备液适量,配制成质量浓度分别为0.38,0.75,1.20,1.50,1.80,2.25,2.86 ng/mL的系列溶液,以质量浓度( $X$ , ng/mL)为横坐标、峰面积与内标峰面积比值( $Y$ )为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 7\,440.782\,4 X + 472.030\,2$  ( $r = 0.999\,6$ ,  $n = 7$ ),表明 $N$ -亚硝基呋塞米质量浓度在0.38~2.86 ng/mL范围内峰面积与内标峰面



A. 空白溶液 B. 对照品溶液 C. 供试品溶液

图1 超高效液相色谱串联质谱图

A. Blank solution B. Reference solution C. Test solution

Fig. 1 UPLC-MS/MS chromatograms

积比值线性关系良好。以信噪比( $S/N$ ) $\geq 3$ 时的质量浓度为检测限(LOD),以 $S/N \geq 10$ 时的质量浓度为定量限(LOQ),结果其LOD和LOQ分别为0.19,0.38 ng/mL。对应样品的LOD和LOQ分别为0.19,0.38 ng/mL。

中间精密度试验:取2.2项下对照品溶液、供试品溶液各适量,由2位试验人员按2.1项下试验条件分别进样测定6次,记录峰面积。结果的RSD为5.21%( $n=12$ ),表明中间精密度良好。

稳定性试验:取2.2项下供试品溶液、对照品溶液各适量,在5℃条件下放置0,0.5,1.5,2.0,4.0,6.0,8.0,9.5,12.5 h时按2.1项下试验条件进样测定,记录峰面积。结果对照品溶液、供试品溶液峰面积的RSD分别为3.32%,4.44%,表明对照品溶液、供试品溶液在5℃条件下放置12.5 h内稳定性均良好,但6.0 h后两者的峰面积均呈降低趋势,故为确保 $N$ -亚硝基咪塞米含量测定的准确性,建议在5℃条件下于6.0 h内完成测定。

重复性试验:取样品(批号为221201)适量,按2.2项下方法制备供试品溶液,平行6份,按2.1项下试验条件进样测定,记录峰面积。结果所有供试品溶液中均检出 $N$ -亚硝基咪塞米,平均含量为0.58  $\mu\text{g/L}$ ,RSD为4.43%( $n=6$ ),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取咪塞米原料药10 mg,精密称定,置10 mL容量瓶中,分别按50%,100%,150%比例加入 $N$ -亚硝基咪塞米对照品,平行3份,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下试验条件进样测定,记录峰面积,并计算回收率。结果见表1,表明方法准确度良好。

表1 加样回收试验结果( $n=9$ )

Tab. 1 Results of the recovery test ( $n=9$ )

样品含量(ng)	加入量(ng)	测得量(ng)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
6.60	9.06	15.15	94.37		
6.32	9.06	15.66	103.09		
6.19	9.06	15.26	100.11		
6.42	18.12	24.51	99.83		
6.13	18.12	23.08	93.54	97.32	3.86
6.13	18.12	24.00	98.62		
5.81	27.18	30.77	91.83		
5.83	27.18	31.63	94.92		
6.49	27.18	33.55	99.56		

## 2.4 样品含量测定

取6批咪塞米原料药,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下试验条件进样测定。结果6批样品中均检出 $N$ -亚硝基咪塞米,含量分别为0.55,0.54,0.62,0.58,0.41,0.58  $\mu\text{g/L}$ 。

## 3 讨论

### 3.1 含量限度拟订

FDA明确规定, $N$ -亚硝基咪塞米的毒理学关注阈

值(TTC)为1.5  $\mu\text{g/d}$ 。我国审批的咪塞米最大日服用剂量为1 g,据此计算其限度为(1.5  $\mu\text{g/d}$ )/(1 g/d)=1.5  $\mu\text{g/L}$ ,即不得超过1.5  $\mu\text{g/L}$ 。该限度既符合科学原则,又确保了产品的安全性、有效性。本研究中的6批咪塞米原料药中 $N$ -亚硝基咪塞米含量均符合要求。

### 3.2 检测方法选择

基因毒性杂质均以痕量形式存在,故选择了专属性好、灵敏度高的UPLC-MS/MS法。预试验中,取 $N$ -亚硝基咪塞米杂质高标对照品溶液(150 ng/mL),采用针泵进样、质谱离子扫描发现,采用亚硝胺类物质分析常用的大气压化学电离源(APCI)检测灵敏度较低,在ESI离子源负离子模式下响应显著提高。继续对ESI条件进行优化,获得 $N$ -亚硝基咪塞米最佳离子对参数为 $m/z$  357.8  $\rightarrow$  283.9,碰撞能为-13 V。

参考文献[13],选择50%乙腈为稀释剂,进样盘温度为5℃时, $N$ -亚硝基咪塞米极不稳定;将稀释剂更换为甲醇后,其稳定性较好,故选择甲醇为稀释剂。

同时考察了不同流动相(0.01%甲酸水溶液-乙腈、0.005 mol/L甲酸铵水溶液-乙腈、0.01%甲酸水溶液(含0.005 mol/L甲酸铵)-乙腈),不同色谱柱[Waters XBridge C<sub>18</sub>柱(150 mm  $\times$  4.6 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ ), Agilent Poroshell 120 EC-C<sub>18</sub>柱(150 mm  $\times$  4.6 mm, 2.7  $\mu\text{m}$ ), Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub>柱(150 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ )]对 $N$ -亚硝基咪塞米与咪塞米主峰分离度的影响。结果流动相为0.01%甲酸水溶液(含0.005 mol/L甲酸铵)-乙腈、色谱柱为Waters XBridge C<sub>18</sub>柱(150 mm  $\times$  4.6 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ )时, $N$ -亚硝基咪塞米峰(9.25 min)与咪塞米主峰(10.20~12.00 min)能有效分离,且响应较高。故选择色谱柱为Waters XBridge C<sub>18</sub>(150 mm  $\times$  4.6 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ ),流动相为0.01%甲酸水溶液(含0.005 mol/L甲酸铵)-乙腈(梯度洗脱)。

### 3.3 方法评价

该方法操作简便、专属性强、灵敏度与准确度高,适用于咪塞米原料药中 $N$ -亚硝基咪塞米的含量测定,可为咪塞米原料药及相关制剂中基因毒性杂质的含量控制提供参考。

### 参考文献

- [1] 郑爽,王益. 治疗老年难治性心力衰竭并利尿剂抵抗应用大剂量咪塞米联合氨茶碱的价值[J]. 辽宁医学杂志, 2024,38(2):51-54.
- [2] 钟汉,黄海华,詹先峰. 托拉塞米与咪塞米对肝硬化腹水患者利尿引起的低钾血症风险对比研究[J]. 医学信息, 2024,37(22):22-25.
- [3] 罗正菊. 托拉塞米对急性脑出血患者脑水肿的影响[J]. 中国药业, 2015,24(21):90-92.
- [4] 曾伟,黄佳,耿娟娟,等. 鼻内镜术后微波热凝联合咪塞