doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2021.24.022

气相色谱串联质谱法测定药用辅料中 *N*－亚硝基二甲胺含量

韩 勇[1],彭 程[1],杨 芳[1],王 冉[2],薛 雯[1]

(1. 山东省济宁市食品药品检验检测研究院,山东 济宁 272071; 2. 中国中医科学院中药研究所,北京 100700)

摘要:目的 建立测定药用辅料中 *N*－亚硝基二甲胺(NDMA)含量的气相色谱串联质谱法。**方法** 色谱柱为 Thermo TG－WAMS 毛细管柱(30 m×0.25 mm,0.25 μm),程序升温,流速为 1.0 mL/min,载气为氦气,进样口温度为 250 ℃;脉冲不分流进样,进样压力为 12.285 psi,持续时间为 0.5 min,进样量为 1.5 μL。离子源为电子轰击离子源,多反应监测模式。**结果** NDMA 质量浓度在 0.28～55.08 ng/mL 范围内与峰面积线性关系良好(R^2=1.000 0,n=9),检测限为 0.11 ng/mL,定量限为 0.28 ng/mL;精密度、稳定性、重复性试验的 *RSD* 均小于 3.0%;平均加样回收率为 95.05%,*RSD* 为 3.62%(n=9)。**结论** 该方法操作简便,重复性好,准确度高,可用于测定药用辅料中 NDMA 的含量。

关键词:药用辅料;基因毒性杂质;*N*－亚硝基二甲胺;气相色谱串联质谱法;含量测定

中图分类号:R927.2 **文献标志码:A** **文章编号:1006－4931(2021)24－0083－04**

Content Determination of Genotoxic Impurity *N*－Nitrosodimethylamine in Pharmaceutical Excipients by Gas Chromatography－Tandem Mass Spectrometry

HAN Yong[1], PENG Cheng[1], YANG Fang[1], WANG Ran[2], XUE Wen[1]

(1. Jining Center for Food and Drug Control, Jining, Shandong, China 272071; 2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, China 100700)

Abstract: Objective To establish a gas chromatography－tandem mass spectrometry (GC－MS/MS) method for the content determination of *N*－nitrosodimethylamine (NDMA) in pharmaceutical excipients. **Methods** The chromatographic column was Thermo TG－WAMS capillary column (30 m×0.25 mm, 0.25 μm) with temperature－programmed, the flow rate was 1.0 mL/min, the carrier gas was helium, the injection port temperature was 250 ℃. Pulse splitless injection technique was adopted, the injection pressure was 12.285 psi, the duration time was of 0.5 min, and the injection volume was 1.5 μL. NDMA was ionized by electron ionization (EI), and detected with multiple－reaction monitoring (MRM) mode. **Results** The linear range of NDMA was 0.28－55.08 ng/mL (R^2=1.000 0, n=9), the limit of detection(LOD) was 0.11 ng/mL and the limit of quantitation(LOQ) was 0.28 ng/mL. The *RSD*s of precision, stability and repeatability tests were less than 3.0%. The average recovery of NDMA was 95.05% with an *RSD* of 3.62% (n=9). **Conclusion** The method is simple, reproducible and accurate, which can be used for the content determination of NDMA in pharmaceutical excipients.

Key words: pharmaceutical excipients; genotoxic impurity; *N*－nitrosodimethylamine; GC－MS/MS; content determination

第一作者:韩勇,男,硕士研究生,副主任药师,研究方向为化学药品检验、质量标准(电子信箱)15589785569@163.com。

有干扰[9]。前期研究显示,3 批样品的 pH 约为 5.4。故首先根据硼替佐米的溶解性选择甲醇溶解,再用 Tris 缓冲液调节 pH,最后经 BET 用水稀释得检查用溶液。经上述方法稀释后,能完全消除各种干扰因素对样品细菌内毒素检查的影响,且方法的灵敏度高、可靠性强。本试验结果显示,当硼替佐米原料药的 *L* 确定为 16 EU/mg,质量浓度稀释至 0.003 90 mg/mL,选用灵敏度不低于 0.06 EU/mL 的鲎试剂进行试验时,对鲎试剂与细菌内毒素的反应无明显干扰。

综上所述,本研究中建立的方法可用于硼替佐米的细菌内毒素检查。

参考文献

[1] 张冬华,孙建群. 硼替佐米联合吡柔比星、地塞米松治疗初治多发性骨髓瘤 14 例临床分析[J]. 中国药业,2015,24(1):78－80.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:178－181.

[3] 中国药品生物制品检定所,中国药品检验总所. 中国药品检验标准操作规范(2010 年版)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:287.

[4] 晏成倩,黄梅梅,王红平,等. 一种难溶性原料药细菌内毒素检查方法的建立[J]. 中国药师,2018,21(2):365－368.

[5] 裴宇盛,蔡 彤,张国来,等. 紫杉醇脂质体中细菌内毒素的检测[J]. 中国药学:英文版,2018,27(6):436－441.

[6] 赵武群,赵云蓝,付 强,等. 二氯甲烷萃取法检测帕莫酸多奈哌齐中细菌内毒素[J]. 中国药业,2021,30(3):45－49.

[7] CHEN DD, FENG XM, WANG CR, et al. A new method for concentration analysis of bacterial endotoxins in perfluorocarbon[J]. Frontiers of Materials Science, 2014, 8(4): 399－402.

[8] 徐焕焕,王秀丽,贺 成,等. 叔丁醇在难溶性药物硼替佐米冻干粉针剂制备中的应用[J]. 中国新药杂志,2016,25(5):578－582.

[9] 吴露露,刘 洋,刘 琦,等. 硼替佐米细菌内毒素检查方法学研究[J]. 药学研究,2014,33(4):210－212.

(收稿日期:2021－01－13;修回日期:2021－07－06)

药用辅料的安全性和功能性指标水平会直接影响制剂的质量、安全和有效性。随着辅料安全问题的日益突出，医药行业愈发重视药用辅料的风险控制[1]。2017 年，国际药用辅料委员会发布辅料风险评估指南[2]，要求上市许可持有人对包括辅料在内的药品生产所有物料进行风险评估。*N* - 亚硝基二甲胺（NDMA）属 2A 类致癌物质[3]，也属三大“关注队列”的基因毒性杂质[4]。对缬沙坦、二甲双胍和雷尼替丁原料药及其制剂进行专项检查时发现，大部分原料药未检出 NDMA，其制剂却呈 NDMA 阳性，针对性检测其制剂所用 10 种辅料，部分辅料被检出 NDMA。目前尚无检测药用辅料中 NDMA 的研究[5-8]，说明药用辅料中 NDMA 未引起药品监管部门和生产企业足够重视。气相色谱串联质谱（GC - MS/MS）法具有灵敏度高、专属性强等优势，本研究中采用该方法测定药用辅料中 NDMA 的含量，确保辅料安全性符合药用要求。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

7000D 型三重四极杆气质联用仪（安捷伦科技有限公司）；BS21S 型电子天平（北京赛多利斯天平有限公司）；HY - 4 型振荡器（江苏省金坛市医疗仪器厂）；TD16 - WS 型离心机（湖南湘仪实验仪器开发有限公司）；MX - S 型涡旋混匀器（大龙兴创实验仪器 < 北京 > 有限公司）。

1.2 试药

NDMA 对照品（中国食品药品检定研究院，批号为 510166 - 201902，含量为 97.8%）；二氯甲烷（农残级，上海阿拉丁生化科技股份有限公司）；蒸馏水（质谱级，美国 Merck & Co. Inc. 公司）；甲醇（农残级，天津市光复精细化工研究所）；辅料的基本情况见表 1（表中，L - HPC 为低取代羟丙基纤维素，HPMC 为羟丙甲纤维素，CMC - Na 为羧甲淀粉钠，PVP K30 为聚维酮 K30）；水为质谱级。

表 1 10 种辅料基本情况

Tab. 1 Basic information of 10 pharmaceutical excipients

厂家	辅料	批号
安徽山河药用辅料有限公司	玉米淀粉	190316;200622
	糊精	190916;200524
	L - HPC	190814
	HPMC	171201
	CMC - Na	190925
	PVP K30	190822;191118
	硬脂酸镁	190530
	乳糖	190220
	微晶纤维素	180806;190326
湖南九典制药股份有限公司	玉米淀粉	200320
	L - HPC	181230
	HPMC	190925
	CMC - Na	180127
	PVP K30	180415;190526
	硬脂酸镁	200512
	乳糖	180913
	十二烷基硫酸钠	180925;200507
	微晶纤维素	200122
曲阜市药用辅料有限公司	玉米淀粉	200418
	糊精	191226;200311
	L - HPC	181012
	HPMC	191216
	CMC - Na	180815
	硬脂酸镁	190623;200705
	微晶纤维素	200518
湖州展望药业有限公司	L - HPC	191114
	HPMC	200110
	CMC - Na	181230
镇江康富生物工程有限公司	乳糖	200425
湖南尔康制药股份有限公司	乳糖	191204
	十二烷基硫酸钠	181210;190515

2 方法与结果

2.1 试验条件

2.1.1 色谱条件

色谱柱：ThermoTG - WAMS 毛细管柱（30 m × 0.25 mm，0.25 μm）；程序升温：起始柱温为 40 ℃，保持 0.5 min，以 20 ℃/min 的速率升至 200 ℃，再以 60 ℃/min 的速率升至 240 ℃，保持 5 min；载气：氦气；流速：1.0 mL/min；进样口温度：250 ℃；隔垫吹扫流量：3.0 mL/min，脉冲不分流进样，进样压力：12.285 psi，持续时间：0.5 min；进样量：1.5 μL。

2.1.2 质谱条件

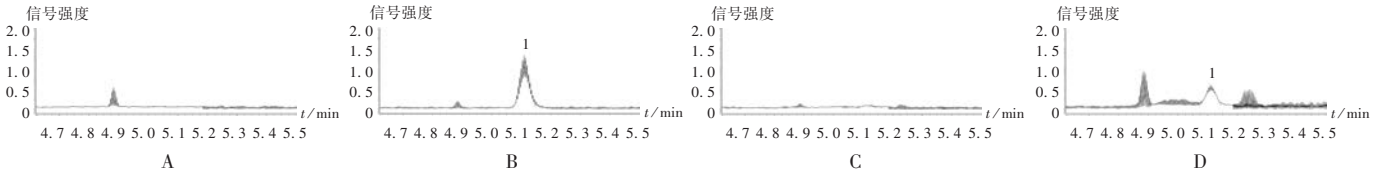
碰撞气为氩气，离子源为电子轰击离子源（EI），电离能量为 70 eV，离子源温度为 300 ℃，质谱传输线温度为 250 ℃；溶剂延迟时间为 4.5 min；采集模式为多反应监测模式（MRM）；NDMA 的母离子质荷比（*m/z*）74.1，定量离子 *m/z* 44.1（CE5V），定性离子 *m/z* 42.1（CE18V）。

2.2 溶液制备

取 NDMA 对照品 14.08 mg，精密称定，加二氯甲烷溶解，即得质量浓度为 275.40 ng/mL 的对照品溶液。取辅料 0.5 g，精密称定，置 25 mL 离心管中，精密加水 10 mL，涡旋，振荡，再精密加入二氯甲烷 10 mL，振荡 30 min，8 000 r/min 离心 10 min，取二氯甲烷层，经 0.22 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，即得供试品溶液。取 HPMC 阳性、阴性样品各 0.5 g，精密称定，同供试品溶液制备方分别制备 HPMC 阳性及阴性对照品溶液。以二氯甲烷为空白溶剂。

2.3 方法学考察

专属性试验：取 2.2 项下 HPMC 阳性和阴性对照



1. NDMA

A. 空白对照溶液 B. 对照品溶液 C. HPMC 阴性对照品溶液 D. HPMC 阳性对照品溶液

图 1 总离子流图

1. NDMA

A. Blank solvent B. Reference solution C. HPMC negative reference solution D. HPMC positive reference solution

Fig. 1 Total ion chromatograms

品溶液、空白对照溶液(二氯甲烷)、对照品溶液各适量,按 2.1 项下试验条件进样测定,记录色谱图。详见图 1。结果分离度大于 1.5,HPMC 阴性对照品溶液和空白对照溶液色谱中,在与对照品溶液相同保留时间处无干扰峰,表明方法专属性良好。

线性关系考察:分别量取对照品溶液适量,共 9 份,加二氯甲烷稀释,即得质量浓度分别为 0.22,0.28,0.55,1.10,2.75,5.51,11.02,22.03,55.08 ng/mL 的系列对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定,以 NDMA 质量浓度(X,ng/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得 NDMA 回归方程 $Y=1702.6135X-6.016\ 6$($R^2=1.000\ 0$, $n=9$)。结果表明,NDMA 质量浓度在 0.28 ~ 55.08 ng/mL 范围内与峰面积线性关系良好。

检测限与定量限考察:取 2.2 项下 NDMA 对照品溶液适量,加二氯甲烷稀释,按 2.1 项下试验条件进样测定,以信噪比(S/N)10∶1 及 3∶1 分别计算定量限和检测限。结果检测限为 0.11ng/mL,定量限为 0.28 ng/mL($RSD=3.76\%$, $n=6$)。

精密度试验:取 2.2 项下对照品溶液适量,加二氯甲烷,摇匀。即得稀释后的 NDMA 对照品溶液(2.75mg/mL),按 2.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次,记录峰面积。结果 NDMA 峰面积的 RSD 为 1.86%($n=6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取 HPMC 阳性样品(批号为 171201)溶液适量,分别于室温下放置 0,1,2,4,6,8,10 h 时按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果 NDMA 峰面积的 RSD 为 2.02%($n=7$),表明供试品溶液在室温下放置 10 h 内基本稳定。

重复性试验:取 HPMC 阳性样品(批号为 171201)溶液适量,共 6 份,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果 NDMA 峰面积的 RSD 为 2.52%($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取 HPMC 阳性样品 0.5 g(批号为 171201),共 9 份,置 25 mL 离心管中,分别精密加入 2.2 项下对照品溶液(质量浓度为 11.02 ng/mL)0.5,1.0,1.5 mL,各 3 份,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算加样回收率。结果见表 2。

2.4 样品中 NDMA 杂质含量测定

取 10 种辅料 40 批样品粉末(各 0.5 g),分别按 2.2 项下方法制备供试品溶液,再按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算样品含量。结果玉米淀粉、糊精、硬脂酸镁、乳糖、十二烷基硫酸钠及微晶纤维素中未检出 NDMA。HPMC,L-HPC,CMC-Na,PVP K30 的部分批次检出 NDMA,但均符合限度要求。结果见表 3。

表 2 NDMA 加样回收试验结果($n=9$)

Tab. 2 Results of the recovery test of NDMA($n=9$)

取样量(g)	样品含量(pg)	加入量(pg)	测得量(pg)	回收率(%)	$\bar{X}$(%)	RSD(%)
0.497 6	1.148 0	0.826 2	1.888 3	89.60		
0.502 3	1.158 8	0.826 2	1.906 8	90.53		
0.503 4	1.161 3	0.826 2	1.928 0	92.80		
0.499 6	1.152 6	1.652 4	2.729 4	95.43		
0.503 2	1.160 9	1.652 4	2.724 6	94.63	95.05	3.62
0.512 0	1.181 2	1.652 4	2.788 5	97.27		
0.501 6	1.157 2	2.478 6	3.591 2	98.20		
0.498 7	1.150 5	2.478 6	3.607 4	99.12		
0.502 4	1.159 0	2.478 6	3.583 8	97.83		

表3 样品含量测定结果（$n=2$，ng/mL）

Tab. 3 Results of content determination of NDMA in the samples ($n=2$, ng/mL)

辅料	批号	NDMA含量
HPMC	171201	0.03
	190925	–
	191216	0.02
	200110	0.04
CMC-Na	180127	–
	181230	–
	180815	0.03
	190925	0.02
L-HPC	181012	0.02
	181230	0.02
	190814	0.01
	191114	–
PVP K30	180415	0.01
	190526	0.02
	190822	–
	191118	–

注：–表示未检出。

Note: – indicates that NDMA is not detected.

3 讨论

3.1 供试品溶液制备

按国家药典委员会发布的《缬沙坦国家标准修订稿》制备供试品溶液，以甲醇为溶剂会出现以下问题：1）精密度较差，NDMA峰面积的 *RSD* 为3%～5%，而以二氯甲烷为溶剂时 *RSD*<2%。2）准确度较差，受基质效应影响，高、中、低3个质量浓度的加样回收率为115%～135%，测定误差较大。以二氯甲烷为溶剂时，加样回收率约为95%，可信度较高。3）排除辅料干扰因素，先用水涡旋、振荡溶解样品，加二氯甲烷振荡萃取后，离心，取二氯甲烷层滤过，可得相对纯净的供试品溶液，可有效减少对气质联用仪的污染。

为了提高检测方法的专属性和灵敏度，使用GC-MS/MS时，采用脉冲不分流进样模式提高进样量，NDMA峰与相邻峰无干扰，NDMA检测限与定量限分别为0.22，0.28 ng/mL。该方法准确可靠、灵敏度高、专属性强，适用于相关药用辅料的质量控制。

3.2 关注药用辅料中基因毒性杂质NDMA

NDMA毒性强，美国致癌性数据库规定，NDMA的半数中毒剂量（TD_{50}）为96.0 μg/（kg·d），对于亚硝胺类杂质用量控制应采取“避免为主，控制为辅”的策略。经专项检查发现，国内生产的部分辅料确实存在微量NDMA，推断[9-10]可能有以下几个原因：1）工艺引入亚硝胺类杂质，由亚硝化试剂与胺类化合物发生仲胺反应生成。亚硝化试剂包括亚硝酸盐、亚硝酸酯、亚硝酸、叠氮化钠等，仲胺包括伯胺、叔胺及季铵，可能引入仲胺杂质；酰胺类溶剂如 *N*，*N*-二甲基甲酰胺、*N*-甲基吡咯烷酮等可能产生仲胺。2）药用辅料生产过程中使用了被亚硝胺类杂质污染的物料，包括起始物料、中间体、溶剂、试剂、催化剂等，特别是含有亚硝酸盐或亚硝胺类的制药用水。3）由于在同一生产线生产不同辅料，清洁不彻底，造成交叉污染。因此相关生产企业应对辅料中NDMA的含量进行风险评估，消除药用辅料的安全隐患。

综上所述，该方法操作简便，重复性好，准确度高，可用于测定药用辅料中NDMA的含量。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典（四部）[M]. 北京：中国医药科技出版社，2020：527-530.

[2] IPEC. The IPEC Risk Assessment Guide for Pharmaceutical Excipients, Part 1: Risk Assessment for Excipient Manufacturers 2017 First Version[EB/OL]. (2017-08-16)[2020-05-16]. http://www.ipec-europe.org/uploads/publications/2017-risk-assessment-guide-1544709252.pdf.

[3] International Agency for Research on Cancer (IARC). Agents Classified by IARC Monographs[EB/OL]. (2020-03-03)[2020-05-16]. http://monographs.iarc.fr/ENG Classification/index.php.

[4] ICH M7(R1). Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals of Limit Potential Carcinogenic Risk [EB/OL]. (2017-03-31)[2020-05-16]. http://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-assessment-control-dan-reactive-mutagenic-impurities-pharmaceuticals-limit-potential_en.pdf.

[5] 李 俊，陈红波，王英瑛，等. GC-MS测定坎地沙坦酯中微量的*N*-亚硝基二甲胺和*N*-亚硝基二乙胺[J]. 中国现代应用药学，2020，37(13)：1615-1620.

[6] 吴兆伟，杜 凯，王 琳，等. GC-MS法测定缬沙坦中的*N*-亚硝基二甲胺[J]. 中国新药杂志，2019，28(20)：2478-2481.

[7] 郭常川，刘 琦，张 雷，等. 高效液相色谱-串联质谱法测定盐酸二甲双胍及其制剂中痕量*N*-亚硝基二甲胺[J]. 色谱，2020，38(11)：1288-1293.

[8] 盛凯丽，盛晓霞，唐 勇，等. 缬沙坦胶囊处方工艺筛选及溶出度评价[J]. 中国现代应用药学，2017，34(6)：864-867.

[9] 国家药品监督管理局药品评审中心. 化学药物中亚硝胺类杂质研究技术指导原则（试行）[EB/OL]. (2020-11-30)[2020-12-23]. https://www.cde.org.cn/zdyz/domesticinfopage?zdyzIdCODE=33d2dd6c1dd4b7b0c3771dbc23d0f4b6.

[10] APIC. Additional Guidance on the Assessment on the Risk Assessment for Presence of N-nitrosamines in APIs [EB/OL]. (2020-02)[2020-05-16]. https://www.apic.cefic.org/pub/APIC_Guidance_on_Nitrosamines_Risk_Assessment-Final-18Feb2020.pdf.

（收稿日期：2021-01-29；修回日期：2021-05-22）