

GC-MS/MS 法测定药品中 8 种挥发性亚硝胺

GCMSMS-100

摘要：建立了三重四极杆气质联用仪 GC-MS/MS 同时检测药品中 8 种挥发性亚硝胺的分析方法。在 10~200 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内，8 种挥发性亚硝胺组分相关系数均在 0.999 以上，在药品中添加 2 $\mu\text{g/g}$ 亚硝胺混合标准溶液，各种分回收率在 67.0~99.7% 之间。此方法可为药品中挥发性亚硝胺的检测提供参考。

关键词：GC-MS/MS 药品 挥发性亚硝胺

基因毒性杂质是指化合物本身直接或间接损伤细胞 DNA，产生致突变和致癌的物质。基因毒性物质的特点是在很低的浓度时即可造成人体遗传物质的损伤，进而导致基因突变并可能促使肿瘤发生。因其毒性较强，对用药的安全性产生了强烈的威胁。近年来，已上市药品中发现痕量的基因毒性杂质残留而发生大范围的医疗事故，继而被召回的案例，时有发生，给药厂造成了巨大的经济损失。

世界各国的法规机构如 EMA、ICH、FDA 等都对基因毒性杂质做了明确的规定和要求。目前基因毒性列表中有 1574 种致癌物质，其中苯并芘、黄曲霉毒素、偶氮苯类、N-亚硝胺等物质属于高基因毒性物质。

本实验采用岛津 GCMS-TQ8040 三重四级杆气质联用仪，建立了一种测定药品中 8 种挥发性亚硝胺的方法，该方法处理简单、灵敏度高。可以为药品中挥发性亚硝胺的检测提供参考。

实验部分

1.1 仪器

三重四极杆气质联用仪：GCMS-TQ8040

1.2 分析条件

色谱柱：SH-Rtx-Wax, 30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm
柱温程序：50 $^{\circ}\text{C}$ (2 min) _6 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ _130 $^{\circ}\text{C}$ _30 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ _220 $^{\circ}\text{C}$ _5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ _230 $^{\circ}\text{C}$ (10 min)
进样口温度：240 $^{\circ}\text{C}$
柱流量：2 mL/min
进样方式：不分流进样 (1 min)

高压进样：250 kPa(1 min)
进样量：1 μL
离子源：200 $^{\circ}\text{C}$
色谱质谱接口温度：240 $^{\circ}\text{C}$
检测器电压：调谐电压 +0.6 kV
采集方式：多反应监测模式 (MRM)
MRM 采集条件见表 1。

1.3 样品制备

将药品研磨制成粉末。准确称取 0.02 g，置于试管中，准确加入 2 mL 甲醇 / 乙酸乙酯 (1:1) 溶液，旋涡混合 2 min，超声萃取 15 min。将该处理液过 0.22 μm 有机滤膜，上机分析。

结果讨论

2.1 标准样品色谱图

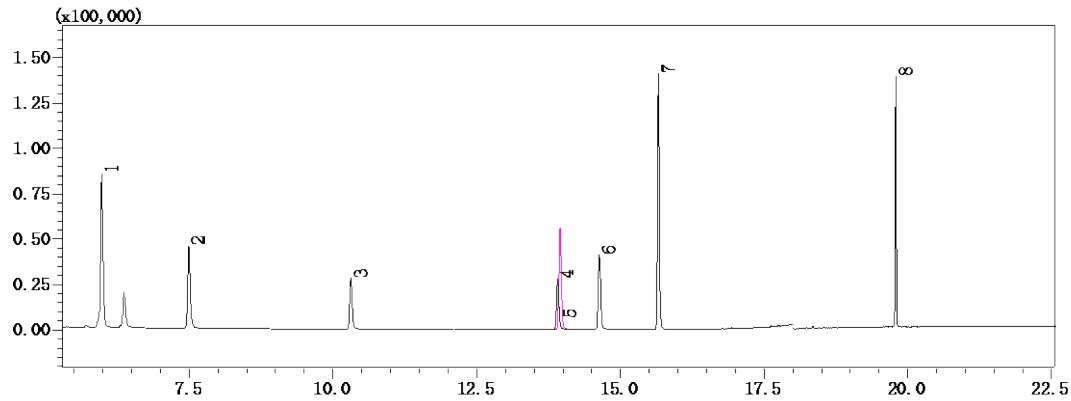


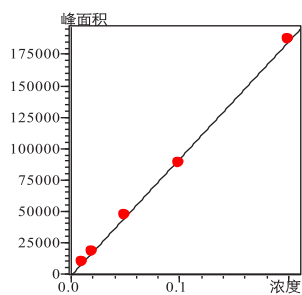
图1 标样MRM色谱图 (200 μ g/L)

表1 挥发性亚硝胺保留时间及MRM参数

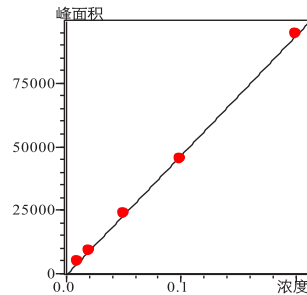
No.	中文名称	英文简称	CAS 号	保留时间 (min)	定量离子对	CE	定性离子对	CE
1	N-亚硝基二甲胺	NDMA	62-75-9	5.826	74>44	21	74>42	7
2	N-亚硝基二乙胺	NDEA	55-18-5	7.398	102>85	5	102>57	13
3	N-亚硝基二丙基胺	NDPA	621-64-7	10.276	130>113	5	130>88	5
4	N-亚硝基二丁基胺	NDBA	924-16-3	13.911	158>99	9	158>141	5
5	N-亚硝基哌啶	NPiP	100-75-4	13.952	114>84	9	114>55	20
6	N-亚硝基吡咯烷	NPir	930-55-2	14.638	100>55	10	100>68	9
7	N-亚硝基吗啉	NMor	59-89-2	15.669	116>86	5	116>56	12
8	N-亚硝基二苯基胺	NDPhA	86-30-6	19.797	169>66	23	169>115	30

2.2 标准曲线

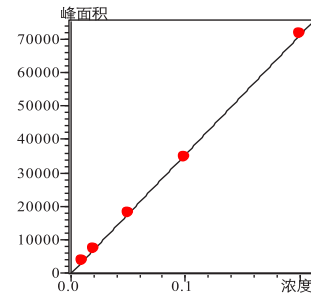
用甲醇/乙酸乙酯(1:1)溶液,分别配制系列浓度为10、20、50、100、200 μ g/L的亚硝胺混合标准溶液,绘制标准曲线,标准曲线和MRM质量色谱图(10 μ g/L)如图3所示。检出限按照3倍的峰峰比计算。8种挥发性亚硝胺组分标准曲线方程、相关系数、最低检出限(LOD)见表2。



N-亚硝基二甲胺



N-亚硝基二乙胺



N-亚硝基二丙基胺

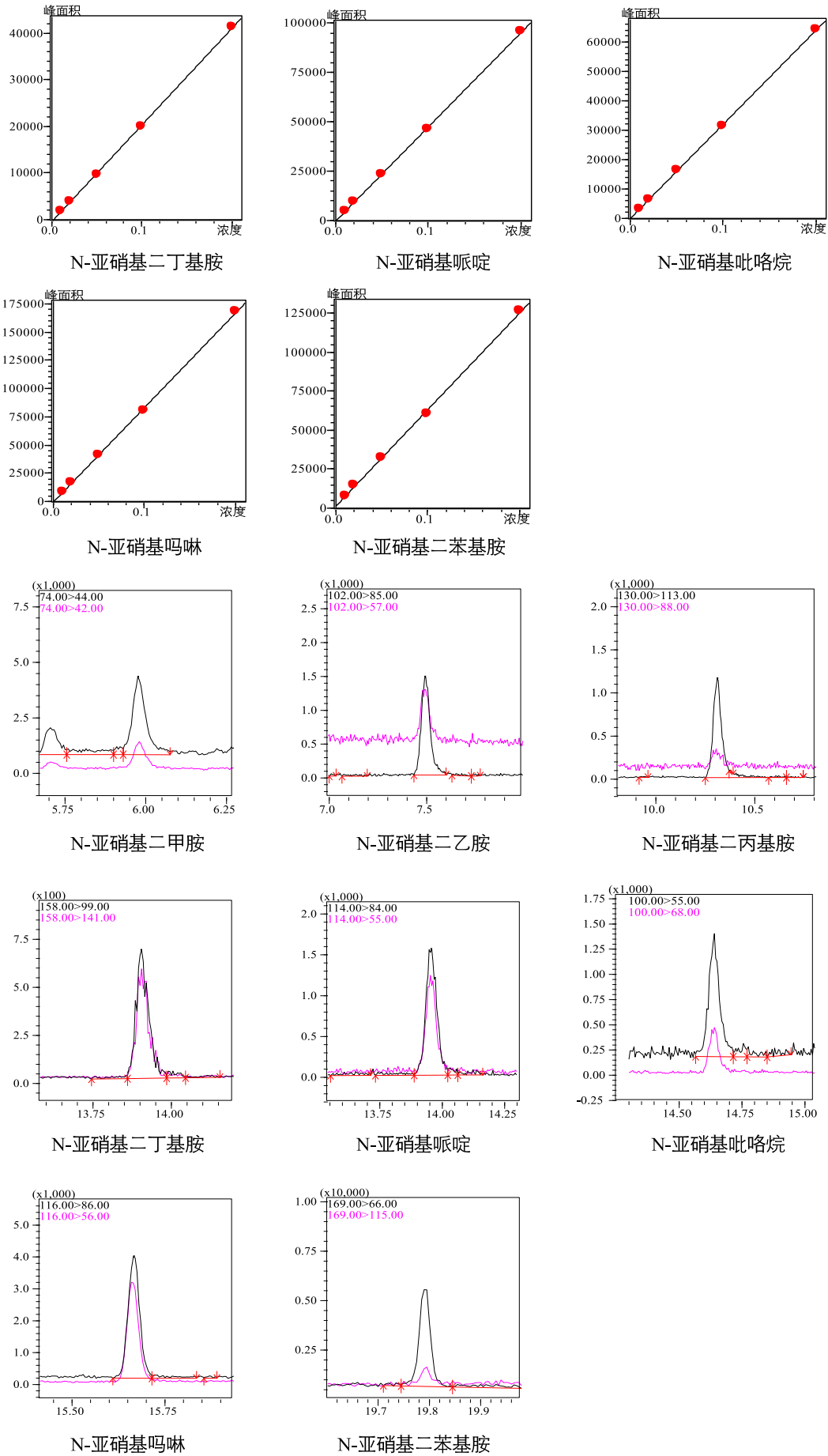


图3 8种挥发性亚硝胺标准曲线及质量色谱图 (10μg/L)

表2 8种挥发性亚硝胺标准曲线方程、相关系数、最低检出限 (LOD)、重复性结果(n=6)

No.	化合物名称	曲线方程	相关系数 R	LOD ($\mu\text{g/L}$)	RSD% (10 $\mu\text{g/L}$)	
					R.T.	Area
1	N-亚硝基二甲胺	$Y = 930458.0X - 1149.411$	0.9996	0.36	0.08	2.73
2	N-亚硝基二乙胺	$Y = 469824.6X - 495.6714$	0.9997	0.09	0.07	2.46
3	N-亚硝基二丙基胺	$Y = 356113.6X - 116.6333$	0.9998	0.07	0.06	2.97
4	N-亚硝基二丁基胺	$Y = 206974.8X - 407.4842$	0.9998	0.17	0.06	2.54
5	N-亚硝基哌啶	$Y = 477009.0X - 292.2867$	0.9998	0.12	0.03	3.12
6	N-亚硝基吡咯烷	$Y = 319466.1X - 15.82242$	0.9998	0.56	0.03	2.06
7	N-亚硝基吗啉	$Y = 837290.9X - 609.3064$	0.9997	0.07	0.02	1.30
8	N-亚硝基二苯基胺	$Y = 618388.8X + 1285.851$	0.9994	0.22	0.01	1.96

2.3 重复性测试

对浓度为 10 $\mu\text{g/L}$ 的 8 种亚硝胺标准混合溶液, 连续进样 6 次, 考察重复性, 测定结果见表 2。

2.4 回收率测试

在脂溶性药品和水溶性药品中分别加入 8 种挥发性亚硝胺混合标准溶液, 添加浓度为 2 $\mu\text{g/g}$, 各平行 6 份。按上述前处理进行加标回收率试验。样品加标回收率结果见表 3。

表3 回收率结果(n=6)

No.	化合物名称	脂溶性药品 (添加浓度 2 $\mu\text{g/g}$)		水溶性药品 (添加浓度 2 $\mu\text{g/g}$)	
		平均回收率(%)	RSD (%)	平均回收率(%)	RSD (%)
1	N-亚硝基二甲胺	74.0	5.53	67.0	9.86
2	N-亚硝基二乙胺	88.7	3.04	99.7	4.83
3	N-亚硝基二丙基胺	83.4	1.76	93.4	4.74
4	N-亚硝基二丁基胺	85.4	1.69	90.0	5.23
5	N-亚硝基哌啶	83.7	1.89	87.1	4.89
6	N-亚硝基吡咯烷	84.9	4.22	89.8	4.47
7	N-亚硝基吗啉	86.6	2.14	85.7	4.64
8	N-亚硝基二苯基胺	81.7	6.47	84.4	6.84

2.5 样品测试

分别对脂溶性药品和水溶性药品进行分析, 两样品均未检测出上述 8 种挥发性亚硝胺。该两样品色谱图如下。

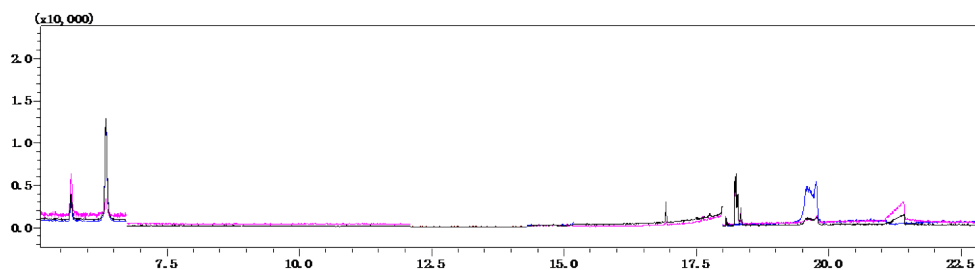


图4 脂溶性药品MRM色谱图

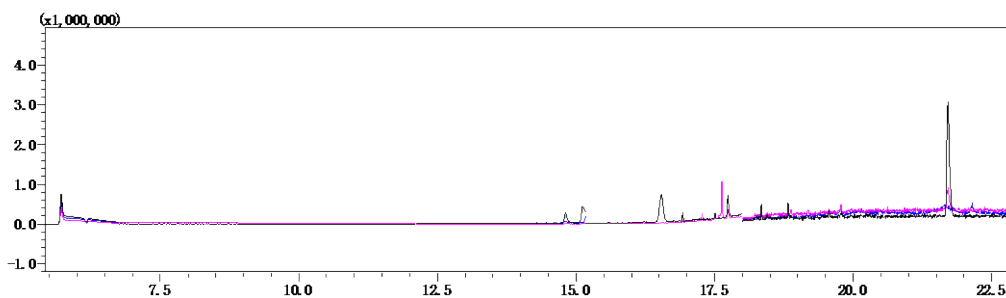


图5 水溶性药品MRM色谱图

■ 结论

采用岛津公司 GCMS-TQ8040 三重四极杆气质联用仪，建立了药品中 8 种挥发性亚硝胺的检测方法。该方法前处理操作简单，重复性好。8 种挥发性亚硝胺的加标回收率在 67.0~99.7% 之间。此方法可为药品中挥发性亚硝胺的检测提供参考。