

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.15.023

气相色谱-串联质谱法测定芬地柞酸左旋氯哌斯汀中 *N*-亚硝基二甲胺和 *N*-亚硝基二乙胺含量

王璐, 刘峰[△]

(四川省药品检验研究院·四川省医疗器械检测中心·药物制剂体内外相关性技术研究重点实验室, 四川 成都 611731)

摘要:目的 建立同时测定芬地柞酸左旋氯哌斯汀中的遗传毒性杂质 *N*-亚硝基二甲胺(NDMA)和 *N*-亚硝基二乙胺(NDEA)含量的气相色谱-串联质谱(GC-MS/MS)法。方法 气相色谱条件中,色谱柱为安捷伦 DB-WAX 毛细管柱(30 m × 0.25 mm, 0.5 μm);程序升温,恒流模式;流速为 1.0 mL/min;载气为氦气;进样口温度为 250 °C,脉冲不分流进样,进样压力为 15 psi,持续时间为 1.5 min,进样量为 2 μL。质谱条件中,检测器为三重四级杆串联质谱检测器;离子源为电子轰击离子源;采集模式为多反应监测模式。结果 NDMA 和 NDEA 质量浓度分别在 0.922 2~46.109 3 ng/mL 和 0.235 6~11.781 0 ng/mL 范围内与峰面积线性关系良好, *r* 分别为 0.998 3 和 0.999 8 (*n*=6);NDMA 的检测限为 0.139 00 ng/mL, NDEA 的检测限为 0.045 83 ng/mL;NDMA 的精密度、稳定性、重复性试验结果均符合要求(*n*=6);NDMA 与 NDEA 的加样回收率分别为 96.82% 和 95.93%, *RSD* 分别为 4.32% 和 6.58% (*n*=9)。结论 所建立的方法结果准确灵敏,重复性好,可用于芬地柞酸左旋氯哌斯汀中 NDMA 和 NDEA 的含量测定。

关键词:芬地柞酸左旋氯哌斯汀;气相色谱-串联质谱法; *N*-亚硝基二甲胺; *N*-亚硝基二乙胺;含量测定

中图分类号:R927.1;R974+.2

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)15-0081-05

Content Determination of *N*-Nitrosodimethylamine and *N*-Nitrosodiethylamine in Levocloperastine Fendizoate by GC-MS/MS

WANG Lu, LIU Feng

(Sichuan Institute for Drug Control · Sichuan Testing Center of Medical Devices · NMPA Key Laboratory for Technical Research on Drug Products in Vitro and in Vivo Correlation, Chengdu, Sichuan, China 611731)

Abstract: Objective To establish a gas-chromatography tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) method for the simultaneous determination of genotoxic impurities of *N*-Nitrosodimethylamine (NDMA) and *N*-Nitrosodiethylamine (NDEA) in levocloperastine fendizoate. **Methods** In the conditions of GC, the chromatographic column was Agilent DB-WAX capillary column (30 m × 0.25 mm,

第一作者:王璐,女,硕士,主管药师,研究方向为药品质量评价与控制,(电子信箱)14817963@qq.com。

[△]通信作者:刘峰,男,硕士,副主任药师,研究方向为药品质量评价与控制,(电子信箱)52986758@qq.com。

表5 样品含量测定结果(mg, *n*=3)

Tab. 5 Content determination of five components in the samples
(mg, *n*=3)

批号	A	B	C	D	E
20191101	1.045	2.580	1.800	2.210	25.15
20190302	1.135	3.010	1.985	1.185	28.90
20181005	1.190	3.165	2.040	1.220	29.77
20190903	1.000	2.440	1.685	2.025	23.70
20190602	1.020	2.470	1.715	2.060	23.88
20180701	1.250	3.050	1.730	1.340	29.41
20180303	1.225	3.030	1.805	1.265	28.38
20171203	1.090	3.155	2.065	1.325	25.92
20171202	1.035	3.120	1.860	1.240	24.32
20171001	1.240	3.205	2.110	1.250	28.43

各种成分的理论板数、分离度、对称因子等均符合要求。

考察了不同流动相及其比例(甲醇-0.1%磷酸水溶液和乙腈-0.1%磷酸水溶液)下色谱峰出峰顺序的不同,根据各成分的分离情况,最终选定乙腈-0.1%磷

酸水溶液为测定用流动相。不同品牌的色谱柱和不同流动相组成,色谱峰均能有效分离,表明方法耐用性良好。

综上所述,本研究中建立的方法简便、可靠,专属性强,准确度高,重复性好,可用于同时测定寒热痹颗粒中芒果苷、升麻素苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、肉桂酸和芍药苷5种成分的含量,可供产品质量控制提供参考。

参考文献

- [1] WS₃-B-3104-98, 中华人民共和国卫生部药品标准·中药成方制剂(第十六册)[S].
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [3] 朱成艳, 周春玲, 杨惠博. UPLC 波长切换法同时测定桂龙咳喘宁片中5种成分的含量[J]. 中国药师, 2017, 20(10): 1871-1873.
- [4] 毛爱丽. HPLC 法测定黄连上清片中4种成分的含量[J]. 中国药师, 2016, 19(1): 196-197.
- [5] 费龙, 文煜, 毛晓丽. UPLC 波长切换法同时测定小青龙颗粒中9种成分的含量[J]. 中国药师, 2019, 22(9): 1757-1760.

(收稿日期:2020-08-15;修回日期:2020-12-18)

0.5 μm), temperature-programmed and the constant current mode was adopted, the flow rate was 1.0 mL/min, the carrier gas was helium, the injection port temperature was 250 $^{\circ}\text{C}$, injection with pulse splitless, the injection pressure was 15 psi, the injection time was 1.5 min, and the injection volume was 2 μL . In the condition of MS, the detector was triple quadrupole tandem mass spectrometer, the ion source was electron bombardment ion source, and the acquisition mode was multiple reaction monitoring (MRM) mode. **Results** The linear ranges of NDMA and NDEA were 0.922 2–46.109 3 ng/mL ($r=0.998\ 3$, $n=6$) and 0.235 6–11.781 0 ng/mL ($r=0.999\ 8$, $n=6$), respectively. The limits of detection (LOD) of NDMA and NDEA were 0.139 00 ng/mL and 0.045 83 ng/mL, respectively. The results of precision, stability and repeatability tests of NDMA could meet the requirements ($n=6$). The recoveries of NDMA and NDEA were 96.82%, 95.93% with RSDs of 4.32% and 6.58% ($n=9$), respectively. **Conclusion** The established method is accurate, sensitive and reproducible, which can be used for the content determination of NDMA and NDEA in levocloperastine fendizoate.

Key words: levocloperastine fendizoate; GC-MS/MS; *N*-nitrosodimethylamine; *N*-nitrosodiethylamine; content determination

氯哌斯汀为中枢性镇咳药,通过抑制咳嗽中枢而产生镇咳作用,也有微弱的抗组胺作用,无成瘾性及耐受性,临床用于治疗呼吸道感染引起的咳嗽。芬地柞酸左旋氯哌斯汀为左旋氯哌斯汀与芬地柞酸所制成的盐,活性更高,疗效是外消旋氯哌斯汀的数倍,基本无副作用^[1],市场需求量较大。但其生产过程中可能产生或被污染亚硝胺类杂质 *N*-亚硝基二甲胺(NDMA)和 *N*-亚硝基二乙胺(NDEA)。2018年7月在缙沙坦原料药中检出了各类亚硝胺杂质,且在非沙坦类药物中检出了亚硝胺类杂质。亚硝胺类杂质属人用药品注册技术要求国际协调会议(ICH)M7(R1)《评估和控制药物中DNA反应性(致突变)杂质以限制潜在致癌风险》提及的“关注队列”物质^[2]。根据世界卫生组织公布的致癌物清单^[3],NDMA和NDEA属2A类致癌物质,故有必要测定芬地柞酸左旋氯哌斯汀中NDMA和NDEA的含量。目前,关于亚硝胺类杂质的检测方法多针对沙坦类或二甲双胍类药物^[4-8],本研究中建立了同时测定芬地柞酸左旋氯哌斯汀中NDMA和NDEA含量的气相色谱-串联质谱(GC-MS/MS)法。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

7890B+7000D型气质联用色谱仪(美国安捷伦公司),配有7693型自动液体进样器,电子轰击离子源(EI)及MasshunterB.07.06工作站;Sartorius CPA255D型微量天平(德国赛多利斯公司,精度为0.01 mg)。

1.2 试剂

芬地柞酸左旋氯哌斯汀(四川摩尔生物制药有限公司,批号分别为200501,200601,190801);NDMA对照品(东京化成工业株式会社,含量为99.0%,批号为TFRMG);NDEA对照品(美国J&K公司,含量为99.0%,批号为LKB0S44);水为超纯水(德国赛多利斯公司);二氯甲烷(色谱纯,美国Fisher公司)

2 方法与结果

2.1 色谱与质谱条件

2.1.1 色谱条件

色谱柱:安捷伦DB-WAX毛细管柱(30 m $\times$ 0.25 mm,

0.5 μm ,固定液为聚乙二醇);程序升温:起始温度为40 $^{\circ}\text{C}$,维持0.5 min,以20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率升温至180 $^{\circ}\text{C}$,再以50 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率升温至240 $^{\circ}\text{C}$,保持8 min,恒流模式;流速:1.0 mL/min;载气:氦气;进样口温度:250 $^{\circ}\text{C}$,脉冲不分流进样;进样压力:15 psi;持续时间:1.5 min;进样量:2 μL ;采用安捷伦5190-2293超惰性不分流衬管。

2.1.2 质谱条件

检测器:三重四极杆串联质谱检测器,电离源为EI,电离能量为70 eV,离子源温度为280 $^{\circ}\text{C}$,四极杆温度为150 $^{\circ}\text{C}$;质谱传输接口温度:250 $^{\circ}\text{C}$;增益因子:10;溶剂延迟时间:5.5 min,运行时间:7.5 min;采集模式:多反应监测模式(MRM);NDMA的扫描:开始时间为5.5 min,定量离子对质荷比为(m/z)74 $\rightarrow$ 44,碰撞能量为2 eV,定性离子对为74 $\rightarrow$ 42,碰撞能量为6 eV;NDEA的扫描:开始时间为6.6 min,定量离子对 m/z 为102 $\rightarrow$ 85,碰撞能量为2 eV,定性离子对 m/z 为102 $\rightarrow$ 56,碰撞能量为6 eV。

2.2 溶液配制

分别取NDMA和NDEA对照品100 mg,精密称定,置10 mL容量瓶中,加二氯甲烷溶解,并稀释至刻度,摇匀,得NDMA和NDEA质量浓度均为10 mg/mL的对照品贮备液;分别精密量取NDMA和NDEA对照品贮备液适量,加二氯甲烷逐级稀释,得NDMA和NDEA的质量浓度分别为900 ng/mL和250 ng/mL的混合对照品贮备液;精密量取混合对照品贮备液1 mL,置100 mL容量瓶中,加二氯甲烷定容至刻度,摇匀,即得NDMA和NDEA的质量浓度分别为9 ng/mL和2.5 ng/mL的混合对照品溶液;取芬地柞酸左旋氯哌斯汀0.1 g,精密称定,置10 mL容量瓶中,加适量二氯甲烷超声使溶解,并稀释至刻度,摇匀,即得供试品溶液。

2.3 方法学考察

专属性及系统适用性试验:精密量取空白溶剂(二氯甲烷)、混合对照品溶液、供试品溶液各2 μL ,分别按2.1项下条件进样测定6次,并记录色谱图。结果空白溶剂不干扰测定,供试品溶液色谱中无其他杂质峰干扰。详见图1。

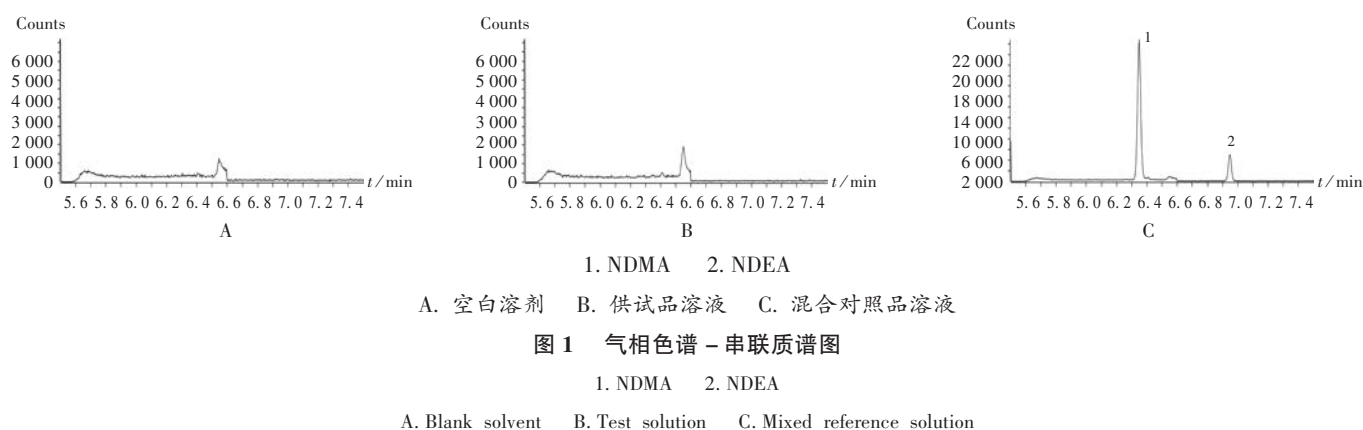


Fig. 1 GC-MS/MS spectrograms

线性关系考察:精密量取 2.2 项下混合对照品贮备液 10, 25, 50, 100, 250, 500 μL , 分别置 10 mL 容量瓶中, 用二氯甲烷稀释至刻度, 摇匀, 作为线性关系考察系列标准溶液, 按 2.1 项下条件测定, 记录色谱图。分别以质量浓度 (X , ng/mL) 为横坐标、峰面积 (Y) 为纵坐标进行线性回归, 线性方程分别为 $Y_{\text{NDMA}} = 4250.9X_{\text{NDMA}} - 3749.8$ ($r = 0.9983$, $n = 6$), $Y_{\text{NDEA}} = 2901.6X_{\text{NDEA}} - 406.8$ ($r = 0.9998$, $n = 6$)。结果表明, NDMA 和 NDEA 质量浓度分别在 0.9222~46.1093 ng/mL 和 0.2356~11.7810 ng/mL 范围内与峰面积线性关系良好。

检测限 (LOD) 与定量限 (LOQ) 测定: 取 2.2 项下 NDMA 和 NDEA 对照品贮备液逐级稀释, 以信噪比 (S/N) 为 3 时的进样量折算后作为 LOD; 以 S/N 为 10 时的进样量折算后作为 LOQ。结果见表 1, 表明方法灵敏度高, 可满足检测需要。

表 1 NDMA 和 NDEA 的检测限与定量限测定结果

Tab. 1 LOD and LOQ of NDMA and NDEA

杂质	LOD (ng/mL)	方法 LOD ($\mu\text{g/g}$)	LOQ (ng/mL)	方法 LOQ ($\mu\text{g/g}$)
NDMA	0.139 00	0.010	0.617 7	0.06
NDEA	0.045 83	0.005	0.258 4	0.03

稳定性试验: 因芬地唑酸左旋氯哌斯汀中均未检出 NDMA 和 NDEA, 故取对照品溶液和加标供试品溶液分别于 0, 3, 6, 9, 13, 15 h 时注入气质联用色谱仪, 记录色谱图。结果对照品溶液中, NDMA 和 NDEA 峰面积的 RSD 分别为 5.09% 和 6.98% ($n = 6$), 加标供试品溶液中 NDMA 和 NDEA 峰面积的 RSD 分别为 5.19% 和 7.16% ($n = 6$), 表明供试品溶液在 15 h 内稳定。

精密度试验: 取对照品溶液, 注入气质联用色谱仪, 按 2.1 项下条件连续进样测定 6 次, 记录色谱图。结果 NDMA 和 NDEA 峰面积的 RSD 分别为 1.42% 和 1.02% ($n = 6$)。取 LOQ 测定项下溶液, 注入气质联用色谱仪, 按 2.1 项下条件连续进样测定 6 次, 记录色谱图。

结果 NDMA 和 NDEA 峰面积的 RSD 分别为 1.92% 和 7.79% ($n = 6$), 表明仪器精密度良好。

重复性试验: 取样品 (批号为 200501) 0.1 g, 共 6 份, 精密称定, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下条件测定。结果样品中均未检出 NDMA 和 NDEA, 故考察加标重复性。取样品 (批号为 200501) 0.1 g, 精密称定, 共 6 份, 精密加入混合对照品贮备液 0.1 mL, 即得加标供试品溶液, 依法进样测定。结果 NDMA 和 NDEA 的平均含量分别为 0.95 $\mu\text{g/g}$ 和 0.22 $\mu\text{g/g}$, RSD 分别为 1.92% 和 4.81% ($n = 6$), 表明方法重复性良好。

加样回收试验: 取样品 (批号为 200501) 0.1 g, 共 9 份, 精密称定, 置 10 mL 容量瓶中, 分别精密加入混合对照品贮备液 0.05, 0.10, 0.15 mL, 各 3 份, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 同时配制对照品溶液, 以重复性试验测定结果作为样品本底值, 按 2.1 项下条件进样测定, 记录色谱图。按外标法计算 NDMA 和 NDEA 的含量和回收率, 结果见表 2。

耐用性试验: 取供试品溶液 (批号为 200501)、加标 (100% 浓度) 供试品溶液及对照品溶液, 分别按下列条件: 耐用性 1, 调整进样口温度为 230 $^{\circ}\text{C}$; 耐用性 2, 调整进样口温度为 270 $^{\circ}\text{C}$; 耐用性 3, 调整流速为 1.1 mL/min; 耐用性 4, 调整升温程序起始温度为 40 $^{\circ}\text{C}$, 维持 0.5 min, 以 18 $^{\circ}\text{C/min}$ 的速率升温至 180 $^{\circ}\text{C}$, 再以 50 $^{\circ}\text{C/min}$ 的速率升温至 240 $^{\circ}\text{C}$, 保持 8 min; 耐用性 5, 调整升温程序起始温度为 40 $^{\circ}\text{C}$, 维持 0.5 min, 以 22 $^{\circ}\text{C/min}$ 的速率升温至 180 $^{\circ}\text{C}$, 再以 50 $^{\circ}\text{C/min}$ 的速率升温至 240 $^{\circ}\text{C}$, 保持 8 min, 测定 NDMA 和 NDEA 的含量。结果供试品溶液中各条件下均未检出 NDMA 和 NDEA, 加标供试品溶液各条件下 NDMA 和 NDEA 含量测定结果的 RSD 分别为 3.07% 和 6.46% ($n = 5$), 表明色谱条件在一定范围变化时, 方法耐用性良好。

2.4 样品中 NDMA 和 NDEA 含量测定

取 3 批样品 (批号分别为 200501, 200601, 190801), 按 2.1 项下条件进样测定。结果 3 批样品中均

表2 NDMA和NDEA加样回收试验结果($n=9$)Tab. 2 Results of the recovery tests of NDMA and NDEA($n=9$)

取样量(g)	本底值(ng)	NDMA					NDEA				
		加入量(ng)	测得量(ng)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)	加入量(ng)	测得量(ng)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
0.097 56	0	46.109 3	42.192 0	91.29			11.781 0	10.956 9	92.18		
0.100 30	0	46.109 3	42.863 9	92.74			11.781 0	10.799 4	91.82		
0.102 10	0	46.109 3	43.040 0	93.12			11.781 0	10.326 6	86.79		
0.098 89	0	92.218 5	89.901 6	97.38			23.562 0	23.025 0	97.30		
0.099 50	0	92.218 5	89.642 1	97.10	96.82	4.32	23.562 0	22.696 6	95.90	95.93	6.58
0.100 30	0	92.218 5	93.018 0	100.76			23.562 0	24.331 4	102.84		
0.101 10	0	138.327 8	144.576 3	104.44			35.343 0	37.631 4	106.19		
0.097 90	0	138.327 8	132.590 9	95.78			35.343 0	32.332 2	91.20		
0.097 80	0	138.327 8	136.718 1	98.77			35.343 0	35.483 4	100.12		

未检出 NDMA 和 NDEA。

3 讨论

3.1 控制策略

照 EMA/511347/2019 文件要求,需对所有化学合成药物中亚硝胺的潜在污染进行风险评估。而遗传毒性杂质的控制策略包括源头控制,如起始物料、反应试剂等的控制;过程控制,如生产环境的设备运行条件控制、产品工艺控制、工艺参数控制、中间体控制等;终点控制,如通过原料药或制剂控制等。本研究中采用终点控制的策略。芬地柞酸左旋氯哌斯汀由左旋 4-氯二苯甲醇与 N -(2-氯乙基)-哌啶盐酸盐反应制得左旋氯哌斯汀碱基,再与芬地柞酸成盐制得目标化合物,在合成过程中叔胺类物质可能引入仲胺杂质,另合成过程中使用的酰胺类溶剂在适宜条件下(如酸性、高温等)也可能产生仲胺,其与自然界常见的亚硝酸盐在酸性环境中可生成亚硝胺类化合物。推测这可能是本品中引入潜在亚硝胺类杂质的原因;此外,生产过程、包装材料或环境中也可能由污染引入亚硝胺类杂质,经过多批次样品的筛查,本品中均未检出 NDMA 和 NDEA,表明严格按当前合成工艺生产,本品被亚硝胺类物质污染的风险较小。

3.2 分析方法选择

N -亚硝胺类杂质的测定方法主要有 GC-MS/MS 法和液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法^[9-12]。LC-MS/MS 法中,NDMA 出峰较早,峰形受溶剂强度影响较大,有机溶剂比例较高时,NDMA 色谱峰变形,灵敏度降低^[13];而芬地柞酸左旋氯哌斯汀在水中几乎不溶,LC-MS/MS 法灵敏度难以满足检测需求。故本研究中采用 GC-MS/MS 法进行测定。

建立测定方法时,根据样品的溶解性,分别选用甲醇、乙腈和二氯甲烷为溶剂进行试验,结果以二氯甲烷作为溶剂时,待测化合物响应值约为另外两种溶剂的 3 倍,故最终选择二氯甲烷为溶剂。

进样方式的选择,考虑到本品为原料药,成分较单一,直接进样可选择脉冲不分流模式,提高进样量,较顶空进样方式灵敏度更高^[14]。另考虑到 N -亚硝胺类化合物是一系列含有相同官能团的化合物,相较单离子扫描方式,MRM 具有更强的专属性和灵敏度,能最大限度地避免假阳性结果。故最终选择直接进样、MRM 进行测定。

3.3 限度设定依据

根据美国食品药品监督管理局、欧洲药品管理局建议的限度,NDMA 每人每日摄入量不能超过 96 ng, NDEA 每人每日摄入量不能超过 26.5 ng,日最大服用剂量为 106.2 mg,拟订本品中含 NDMA 不得超过 0.90 $\mu\text{g/g}$, NDEA 不得超过 0.25 $\mu\text{g/g}$ 。

参考文献

- [1] 刘宏本,马培奇.镇咳药左氯哌斯汀及有关建议[J].上海医药情报研究,2003,1(68):1-4.
- [2] ICH. Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals of limit potential carcinogenic risk. M7(R1) [EB/OL]. (2017-03-31) [2020-10-27]. https://database.ich.org/sites/default/files/M7_R1_Guideline.pdf.
- [3] WHO. 世界卫生组织国际癌症研究机构致癌物清单[EB/OL]. (2017-10-30) [2020-10-27]. <https://www.nmpa.gov.cn/directory/web/nmpa/xxgk/mtbd/20171030163101383.html>.
- [4] 范婷婷,张晓栋.缙沙坦中 N -二甲基亚硝胺的高效液相色谱法检查方法[J].医学食疗与健康,2019(15):16.
- [5] 徐艳梅,韩彬,闫凯,等.高效液相色谱-串联质谱法同时检测厄贝沙坦原料药及其制剂中 3 种 N -亚硝胺类基因毒性杂质[J].药物分析杂志,2021,41(4):720-725.
- [6] 刘博,张佟,黄露,等.液相-高分辨质谱技术测定盐酸二甲双胍缓释片中 7 种亚硝胺杂质的方法学研究[J].中国药物警戒,2021,18(5):454-458.
- [7] 徐小力,青旺旺,邹佳佳,等.气相色谱-质谱联用法测定不同厂家盐酸二甲双胍缓释片中 N -亚硝基二甲胺的含量[J].中国医院药学杂志,2020,40(24):2531-2534.
- [8] 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].