



## *N*-亚硝胺类基因毒性杂质毒性与检测方法研究进展\*

葛雨琦<sup>1,2,3</sup>, 叶晓霞<sup>2,3</sup>, 乐健<sup>2,3</sup>, 杨永健<sup>2,3</sup>, 王彦<sup>2,3\*\*</sup>

(1. 复旦大学药学院, 上海 201203; 2. 上海市食品药品检验所, 上海 201203;

3. 国家药品监督管理局化学药品制剂质量分析重点实验室, 上海 201203)

**摘要:** 基因毒性杂质能够损伤 DNA, 造成 DNA 突变, 致癌, 严重危害人类健康。本文主要针对基因毒性杂质中的 *N*-亚硝胺类化合物, 介绍其毒理学研究进展以及食品、水体、烟草、药品等不同基质中检测方法的研究进展, 包括毒理学作用机制、前处理方法、定量方法等, 旨在为药品基质中 *N*-亚硝胺类化合物的检测研究提供参考。

**关键词:** *N*-亚硝胺; 基因毒性杂质; 毒理学; 检测方法

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2020)01-0083-07

doi: 10.16155/j.0254-1793.2020.01.12

## Research progress on toxicity and detection methods of *N*-nitrosamines genotoxic impurities\*

GE Yu-qi<sup>1,2,3</sup>, YE Xiao-xia<sup>2,3</sup>, LE Jian<sup>2,3</sup>, YANG Yong-jian<sup>2,3</sup>, WANG Yan<sup>2,3\*\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203, China; 2. Shanghai Institute for Food and Drug Control,

Shanghai 201203, China; 3. National Medical Products Administration Key Laboratory for

Quality Analysis of Chemical Drug Preparations, Shanghai 201203, China)

**Abstract:** Genotoxic impurities can lead to structural damage of DNA, DNA mutation or even cancer, which can greatly damage the health of human. *N*-nitrosamines is a category of genotoxic impurities. This article describes research advances on toxicological study and various detection methods of *N*-nitrosamines in various matrix, such as food, water, tobacco and medicines. Toxicological mechanism, sample pretreatment procedures and quantitative methods are also discussed. This article can provide references for the detection method development of *N*-nitrosamines in medicines.

**Keywords:** *N*-nitrosamines; genotoxic impurities; toxicology; detection methods

*N*-亚硝胺是一类以亚硝基 - NO 的氮原子与氨基中的氮原子连接, 并在氨基上发生取代而生成的一类化合物, 在碱性溶液中稳定。其生成机制多样, 包

括仲胺类化合物与亚硝酸之间的相互作用<sup>[1]</sup>, 叔胺类化合物与一氯胺之间的亲核取代反应<sup>[2]</sup>, 溶剂 *N*, *N*-二甲基甲酰胺 (DMF) 的氧化<sup>[3]</sup>, 橡胶硫化剂与空气

\* 国家药典委员会综改课题—基因毒性杂质通用检测方法的建立 (ZG2018-4-03)

\*\* 通信作者 Tel: 13611646889; E-mail: wangyan\_yjs@smda.sh.cn

第一作者 Tel: 18101828661; E-mail: 17211030028@fudan.edu.cn

中氮氧化合物相互作用<sup>[4]</sup>等。基因毒性杂质是指能够直接或间接损伤细胞 DNA, 产生致突变和致癌变的化合物; 含有基因毒性杂质警示结构, 毒性未经证明的化合物称为潜在基因毒性杂质。目前普遍认为基因毒性杂质损伤 DNA 的机制为造成染色体断裂, DNA 重组, 在 DNA 复制过程中以共价键结合或插入。鉴于基因毒性杂质对人类健康的危害, 欧盟发布了 1 个超级化合物结构, 包含了目前所有的基因毒性杂质和潜在基因毒性杂质, 例如磺酸酯类、卤代烷烃类、肼类和 *N*-亚硝胺类等。最近多个厂家生产的缙沙坦原料药中检出 *N*-亚硝基二甲胺 (NDMA), 引发制药行业对 *N*-亚硝胺类化合物的广泛关注, 本文主要对 *N*-亚硝胺类化合物的毒性和检测方法的研究进展进行综述。

### 1 *N*-亚硝胺类化合物的毒性研究

多个细胞和动物水平的实验证明, *N*-亚硝胺类化合物具有强致癌作用和明显的肝毒性, 不但长期小剂量接触可以致癌, 而且 1 次较大剂量的冲击也可以引发癌症, 医学实验中也常使用 *N*-亚硝胺类化合物对动物进行疾病造模<sup>[5-6]</sup>。2017 年世界卫生组织发布的致癌物清单中, 多种 *N*-亚硝胺类化合物位列一类、二类致癌物, 包括常见的 4-(甲基亚硝胺基)-1-(3-吡啶基)-1-丁酮、*N*-亚硝基降烟碱、*N*-亚硝基二甲胺、*N*-亚硝基二乙胺、*N*-亚硝基甲基乙基胺、*N*-亚硝基二丙胺、*N*-亚硝基二丁胺、*N*-亚硝基吗啉、*N*-亚硝基哌啶、*N*-亚硝基吡咯等。FDA 根据 The Carcinogenic Potency Database (CPDB 数据库) 中的毒理学数据, 通过换算, 列出了可供参考的 *N*-亚硝基二甲胺和 *N*-亚硝基二乙胺的人体摄入限值, 分别为  $0.096 \mu\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$  和  $0.0265 \mu\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$ 。但是大多数 *N*-亚硝胺类化合物的毒性研究仍缺乏充分的人体实验数据, 所以在进行毒理学研究时常使用阶段性毒理学阈值, 按照长期接触计算, 每日允许摄入限值为  $1.5 \mu\text{g}$ 。此类化合物常出现在腌制类食品<sup>[7]</sup>、化妆品<sup>[8]</sup>、烟草<sup>[9]</sup>、水<sup>[10]</sup>、药品<sup>[11-13]</sup>等物质中, 对人体健康具有极大的危害。

**1.1 致癌机理** 自 20 世纪 *N*-亚硝胺类化合物被发现以来<sup>[14]</sup>, 关于此类化合物的毒性研究从未停止。百年来陆续发现 *N*-亚硝胺类化合物与多种癌症的发病相关, 并对其作用机制进行了进一步研究。

Gankhuyag 等<sup>[15]</sup>发现烟草中的 *N*-亚硝胺类化合物与乳腺癌发病有因果关系。烟碱型乙酰胆碱

受体 (nicotine acetylcholine receptor, nAChR) 是阳离子选择性通道受体, 其激活与细胞增殖、抗凋亡和血管生成过程有关, 而 nAChR 受体家族成员中  $\alpha 9\text{nAChR}$  的表达受 4-(甲基亚硝胺基)-1-(3-吡啶基)-1-丁酮的调节, 在雌激素受体阳性的乳腺癌细胞中上调, 与雌激素受体联合刺激乳腺癌的发生。且侧流烟雾的毒性约是主流烟雾的 4 倍, 被动暴露也是不可忽视的高危因素。

Hirata 等<sup>[16]</sup>采用醛脱氢酶 (ALDH) 免疫组化技术检测 4-(甲基亚硝胺基)-1-(3-吡啶基)-1-丁酮对腺癌人类肺泡基底上皮细胞 (A549 细胞) 的影响, 发现烟草中特有的 4-(甲基亚硝胺基)-1-(3-吡啶基)-1-丁酮, 通过剂量依赖的方式增加醛脱氢酶阳性细胞的比例, 诱导活性氧产生, 而产生的活性氧激活了 A549 细胞中的 Wnt 信号通路, 进一步诱发了肺癌。而 Kume 等<sup>[17]</sup>发现大鼠膀胱癌中, *N*-丁基-*N*-(4-羟基丁基)亚硝胺诱导 *L* 型氨基酸转运体 1 (*L*-type amino acid transporter 1, LAT1) 高表达, 有利于肿瘤血管的生成, 加速肿瘤的生成和转移。

**1.2 DNA 损伤机理** 对 *N*-亚硝胺类化合物与 DNA 作用的进一步研究还发现, 4-(甲基亚硝胺基)-1-(3-吡啶基)-1-丁酮经代谢活化后, 会产生许多 DNA 加合物, 包括  $O^2$ -甲基胸苷 ( $O^2$ -Me-dT) 和  $O^2$ -[4-(3-吡啶基)-4-氧代丁基-1-胸苷 ( $O^2$ -POB-dT)], 体积较大的  $O^2$ -POB-dT 具有较高的遗传毒性, 有 26% 的跨损伤合成发生, 而  $O^2$ -Me-dT 的遗传毒性较小, 但有 55% 的跨损伤合成发生。2 种病变均引起质粒中 T → A 突变的频率增高<sup>[18]</sup>。同时 Du 等<sup>[19]</sup>对 *N*-亚硝胺引发的 DNA 加合物进行研究也发现在双链质粒中,  $O^2$ -POB-dT 和  $O^4$ -POB-dT 加合物能中度阻断 DNA 复制, 分别诱导 T → A (14.9%) 和 T → C (35.2%) 突变; 另一方面,  $O^6$ -POB-dG 对 DNA 复制有轻微抑制作用, 主要引起 G → A 转变 (75%)。

**1.3 其他毒性机理** *N*-亚硝胺类化合物除了能够致癌, 造成 DNA 突变, 在其他方面也具有不同程度的毒性。例如, *N*-亚硝基二丁胺、*N*-亚硝基二乙胺、*N*-亚硝基二甲胺、*N*-亚硝基二苯胺等能提高大鼠体内肌酸激酶和乳酸脱氢酶活性, 提高自由基水平, 降低抗氧化酶活性, 从而增加心血管疾病的发生率<sup>[20]</sup>。Sheweita 等<sup>[21]</sup>研究了环境中常见的 4 种 *N*-亚硝胺: *N*-亚硝基二甲胺、*N*-亚硝基二乙胺、*N*-亚硝基甲基乙基胺和 *N*-亚硝基二苯胺, 通过测定雄性家兔体

内  $17\beta$ -羟类固醇脱氢酶 ( $17\beta$ -HSD) 活性和组织病理学观察,发现 4 种 *N*-亚硝胺均能抑制家兔肝脏和睾丸组织抗氧化酶活性,改变肝脏和睾丸组织结构,导致肝毒性和不孕症。

由此可见,*N*-亚硝胺类化合物对健康的危害不容忽视,对各个来源的 *N*-亚硝胺类化合物进行检测十分必要。

## 2 *N*-亚硝胺类化合物检测方法研究进展

目前 *N*-亚硝胺类化合物的检测方法既有传统的基于重氮化-显色反应的盐酸萘乙二胺法<sup>[22]</sup>,依赖于新型氧化氮/臭氧化学发光-气相色谱检测器的热能检测法<sup>[23]</sup>、气相色谱串联质谱法<sup>[27]</sup>、液相色谱串联质谱法<sup>[29]</sup>,也有基于新型检测原理的荧光检测法<sup>[24]</sup>。传统的盐酸萘乙二胺法和薄层色谱法操作简便,对设备要求低,但灵敏度低,现在已经难以满足分析的需要,因此灵敏度更高的新型仪器逐渐取代了传统的分析手段。同时分析工作者们针对不同基质中 *N*-亚硝胺类化合物的检测方法进行研究,开发出了不同的前处理方法,进一步提高了检测灵敏度。下面介绍不同基质中 *N*-亚硝胺类化合物检测的最新研究进展。

**2.1 食品中的检测** 食品中的 *N*-亚硝胺类化合物来源主要是各类包装材料生产过程中副产物和腌制发酵过程的副产物。由于食品直接与人体接触,潜在风险高,近些年陆续开发了多种 *N*-亚硝胺类化合物测定方法。

Lu 等<sup>[25]</sup>通过 2-(11*H*-苯[*a*]咔唑)乙基氯甲酸酯 (BCEC-Cl) 对目标化合物进行荧光标记,采用三氯甲烷-乙腈分散液液微萃取来富集标记后的目标化合物,以高效液相色谱法对泡菜、腊肠、咸鸭蛋等中式传统腌制食品进行检测,各种化合物定量下限介于  $0.03\sim 0.21\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  之间,日内精密度和日间精密密度均符合要求。该方法与热能检测法相比,灵敏度提高近 100 倍,而且所需试剂量小,检测仪器简单,易推广。

Kühne 等<sup>[26]</sup>则采用不同的溶剂对食品包装材料进行模拟迁移实验,包括去离子水、3% 乙酸、10% 乙醇和 50% 乙醇,利用液相色谱串联三重四极杆质谱对迁移样品中的 *N*-亚硝胺类化合物进行检测,前处理方法简便,依靠质谱进行定量检测,灵敏度高。同时,Kühne 等在实验中也发现环境温度为  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  时,*N*-亚硝基二苯胺在纯水、3% 醋酸、10% 乙醇、50%

乙醇 4 种介质中均易发生降解,6 h 内含量下降明显,这提示在后续的研究过程中要注意低温保存 *N*-亚硝基二苯胺。

Seo 等<sup>[27]</sup>采用液液萃取结合固相萃取的方式,以 Extrelut NT 为液液萃取基质, Sep-Pak Florisil 为固相萃取填料,以气相色谱串联三重四极杆质谱(化学电离源)定量,对食品中的无脂类基质和富脂类基质中的 *N*-亚硝胺类化合物进行检测,线性、精密度、回收率较好,7 种化合物定量下限范围为  $0.3\sim 0.58\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ;此研究首次针对不同基质的特点开发不同前处理方法,可以实现多种同类型基质样品的同时检测,在色谱柱的选择上也采用了 DB-5ms 柱串接 DB-WAX 柱,能够更好地对化合物进行分离,方法具有通用性,应用前景良好。

Zhao 等<sup>[24]</sup>创新性地采用了柱前荧光标记法检测 *N*-亚硝胺类化合物。样品用二氯甲烷提取甲醇复溶后,提取到的 *N*-亚硝胺类化合物进行脱氨反应,然后用 1,2-苯并-3,4-二氢吡啶-9-氯甲酸乙酯 (BCEOC) 对目标化合物进行标记,再利用 BCEOC 化合物中的大型共轭结构,通过液相色谱-质谱联用仪进行检测,*N*-亚硝基吡咯、*N*-亚硝基二乙胺、*N*-亚硝基二丙胺、*N*-亚硝基二丁胺 4 种化合物线性相关系数大于 0.999 8,检测下限在  $1.3\sim 2.5\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  之间,精密度 RSD 小于 7%。对食品样本牛肉、咸鸭蛋、腌黄瓜等进行加样回收试验,回收率均达到 90%~105%。该方法利用 *N*-亚硝胺结构上的叔胺 N 进行检测,改变了常见的检测模式,为新型检测方法的开发提供了思路。

**2.2 水体中的检测** 含氯消毒剂的使用和臭氧化消毒是水体中 *N*-亚硝胺的产生途径之一<sup>[28]</sup>。由于水体在生活中无处不在,但污染经常被忽视或难以察觉,因此有必要对环境水和饮用水中的 *N*-亚硝胺类化合物含量进行检测。

Zhao 等<sup>[29]</sup>用自制的固相萃取小柱对饮用水中的 *N*-亚硝胺类化合物进行提取分离,弱碱性条件下上样,二氯甲烷洗脱,液相色谱串联三重四极杆质谱定量检测,并对比了电喷雾和大气压电离 2 种离子源对 *N*-亚硝胺的离子化效果,2 种电离方式均能检测到目标 *N*-亚硝胺的电离。电喷雾离子源 (ESI) 能产生母体化合物的特征离子和所有 *N*-亚硝胺的离子,大气压化学电离离子源 (APCI) 则不能产生热不稳定的 *N*-亚硝胺如 *N*-亚硝基二苯胺的母离子,

而母离子和子离子的检测对于水中痕量 *N*-亚硝胺的专属性测定具有重要意义。因此,对热不稳定的 *N*-亚硝胺类化合物而言,ESI 有利于提高离子化效率,提高灵敏度。

McDonald 等<sup>[30]</sup>则采用椰子活性炭为填料的固相萃取小柱,对水中 *N*-亚硝胺类化合物进行富集,二氯甲烷洗脱后以气相色谱串联三重四极杆质谱检测,并加入同位素内标对检测结果进行校正。城市自来水和 3 次处理城市废水检测的日内 RSD 和日间 RSD 均小于 10%,检测下限低于  $1 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 。Chen 等<sup>[31]</sup>用椰子壳活性炭小柱富集水中的 *N*-亚硝胺类化合物,无水硫酸钠脱水,氮吹至 500  $\mu\text{L}$  后进样,比较了 EI 源的单极质谱和串联质谱定量测定结果,发现串联质谱在去除基质干扰方面具有更好的优势。

Fan 等<sup>[32]</sup>开发了一种固相微萃取前处理结合气相色谱-质谱联用仪对饮用水和啤酒中的 7 种 *N*-亚硝胺类物质进行检测的方法,以碳分子筛和聚二甲基硅氧烷(carboxen polydimethylsiloxane)为固相萃取纤维,样品在 85  $^{\circ}\text{C}$  保持 60 min 条件下完成吸附后,转移至气相色谱进样口,250  $^{\circ}\text{C}$  保持 5 min 解吸附,以选择离子模式定量检测,饮用水中定量下限可达  $0.6\sim 2 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ,啤酒中定量下限可达  $20\sim 52.4 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ,2 种样品中回收率为 84.5%~95.5%;这种前处理方法所需溶剂少,而且最大限度降低了基质效应的影响。

近年来随着分子印迹技术的发展,分子印迹结合固相萃取技术也在 *N*-亚硝胺类化合物的检测中得到应用。Li 等<sup>[33]</sup>采用沉淀聚合法,以甲基丙烯酸为功能单体,乙二醇二甲基丙烯酸酯为交联剂,*N*,*N*-二苯基甲酰胺为模板分子,合成了一款分子印迹固相萃取小柱用于水中 *N*-亚硝基二苯胺(NDPhA)的富集分离,超纯水中的 NDPhA 的加样平均回收率均高于 94%,检测下限和定量下限分别为  $0.8 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $2.4 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ,实际样品中的 NDPhA 的加样回收率在 92%~107% 之间,RSD 在 0.3%~7.9% 之间。Li 等还考察了方法的耐用性,结果表明该萃取小柱在 pH 5~10 和钙、铁、镁、钾、锰、铜、锌多种离子存在的条件下均可以达到 90% 以上的回收率。综上所述,水中 *N*-亚硝胺类化合物的检测方法越来越重视样品的前处理,期望以更少的试剂消耗,最大限度地降低基质干扰。

**2.3 烟草中的检测** 烟草中的 *N*-亚硝胺类化合物

是在烟草调制、加工过程中,由烟草中的生物碱发生亚硝化反应生成的,是烟草中特有的化合物,常见的有 4-(甲基亚硝胺基)-1-(3-吡啶基)-1-丁酮(NNK)、*N*-亚硝基降烟碱(NNN)、*N*-亚硝基新烟草碱(NAT)、*N*-亚硝基假木贼碱(NAB)4 种。

Zhang 等<sup>[34]</sup>采用了分散固相萃取的方式对烟草中的 *N*-亚硝胺类化合物进行提取,分散固相萃取(DSPE)是一种快速、耐用、简便、廉价、安全的前处理方法,向烟气提取物中加入 0.1% 三甲胺水溶液并超声处理 30 min 后,取 1.5 mL 溶液加载至 DSPE 小柱上,依靠涡旋和离心进行提取分离,无需复杂的样品处理步骤。采用高效液相色谱结合轨道离子阱质谱仪进行检测,通过对 6 个平行样品的分析,验证了该方法的有效性,平均回收率为 84.7%~118%,RSD 小于 15%。

Chen 等<sup>[35]</sup>采用二维液相色谱-串联三重四极杆质谱仪,对弗吉尼亚型卷烟烟气中特有的中低浓度的 *N*-亚硝胺类化合物进行了分析。先用 Cambridge 纤维收集主流烟雾,并用  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  乙酸铵溶液萃取,然后超声 30 min,用  $0.22 \mu\text{m}$  聚四氟乙烯滤头过滤,作为供试品溶液。供试品溶液进样后首先采用强阳离子交换柱对烟气中酸性和中性组分进行第一维分离,然后采用反相液相色谱-串联三重四极杆质谱仪,并以同位素氘代物为内标,在多反应监测模式下,对卷烟主流烟气中的 *N*-亚硝胺类化合物进行了高灵敏的测定;与传统方法相比,该方法几乎没有基质干扰,测得的亚硝胺含量在  $0.027\sim 0.094 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  范围内,重复性好,准确度高;最后,将该方法应用于肯塔基州香烟的分析,结果与烟草科学研究合作中心联合试验的结果一致。

Zhang 等<sup>[36]</sup>自主设计了一种前处理方法,首先利用 Cambridge 滤板和聚四氟乙烯注射器过滤样品,然后采用自主设计的全自动在线固相萃取技术对样品进行前处理,液相色谱-串联质谱法定量,对 NNN、NNK、NAT 和 NAB 的定量下限分别达到每根香烟 6.0、1.0、3.0 和 0.6 pg 的水平,远低于目前市售香烟中的最低水平,方法的准确度在 92.8%~107.3% 之间,日内和日间的 RSD 分别小于 5.4% 和 7.5%。该方法具有灵敏度高,选择性好,准确度高,自动化程度高,能够批量处理等优点。

**2.4 药品中的检测** 药品中的 *N*-亚硝胺类化合物的研究在 20 世纪 70 年代就已经开展<sup>[11-13]</sup>,但是后

续的研究进展缓慢,只有少量的文献报道。

Castegnaro 等<sup>[37]</sup>对水蒸气蒸馏进行了改进,在蒸馏体系中加入一定量的矿物油,以克服蒸馏过程中的起泡现象,并将此方法应用于氨基比林、土霉素、双硫仑中 *N*-亚硝胺二甲胺的检测。该方法以气相色谱进行分离,以热能检测器进行定量,最低检测限可低至  $1 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,但该方法取样量大,且操作过程烦琐,提取效率较低。

Norwood 等<sup>[38]</sup>采用气相色谱-热能检测器定量分析吸入气雾剂中挥发性 *N*-亚硝胺类化合物。该方法从药品包装中提取目标分析物,并通过气相色谱-热能分析检测进行分析。样品分析表明,在每罐  $1 \text{ ng}$  的微量水平上,吸入气雾剂未检测出 *N*-亚硝胺类化合物。

2018年7月缬沙坦原料药中检测出 *N*-亚硝基二甲胺 (NDMA) 以及厄贝沙坦制剂中检测出 *N*-亚硝基二甲胺 (NDEA),氯沙坦钾制剂中检测出 *N*-亚硝基-*N*-甲基-4-氨基丁酸 (NMBA) 为我们敲响

了警钟,开发高灵敏度的检测方法和简便高效的前处理方法迫在眉睫。因此各国药品监管部门纷纷发布检测方法,要求加强对 *N*-亚硝胺类化合物的监测,表 1 中列出中国、美国、欧盟药监部门推荐的检测方法,并对前处理方法、定量方法、灵敏度水平进行了总结。这些检测方法仅是针对 NDMA 或 NDEA 进行检测,*N*-亚硝基二丙胺等其他 *N*-亚硝胺类化合物的检测,还需要进一步开发更合适的方法。中国食品药品检定研究院<sup>[39]</sup>的方法采用甲醇溶解样品后直接进样,但缬沙坦易溶于甲醇,大量不挥发性物质进入质谱系统,易污染离子源,造成背景噪音升高。FDA 直接进样的方法则采用二氯甲烷作为提取溶剂,除溶解大量基质外,二氯甲烷的强挥发性对准确定量也有一定的影响。虽然相对食品、烟草,药品中的基质较为简单,但大量基质进入检测系统,多次进样后系统的稳定性、灵敏度均会受到影响。因此如何进行前处理,去除基质干扰,是药品中 *N*-亚硝胺类化合物检测今后研究的重点。

表 1 各国药监部门推荐的 *N*-亚硝胺类物质检测方法

Tab. 1 Detection methods of *N*-nitrosamines recommended by national drug regulatory authorities

国家 (country)	检测物质 (compound)	前处理方法 (pretreatment method)	定量方法 (quantitative method)	灵敏度 (sensitivity)
中国 (The People's Republic of China) <sup>[39]</sup>	NDMA NDEA	甲醇溶解 (dissolve in methanol)	GC-MS	$5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ( $S/N \geq 10$ )
美国 (USA) <sup>[40]</sup>	NDMA	DMSO 溶解 (dissolve in DMSO)	HS-GC-MS	$50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ( $S/N \geq 10$ )
美国 (USA) <sup>[41]</sup>	NDMA NDEA	二氯甲烷溶解后,离心,取上清液过滤 (after dissolving in dichloromethane, centrifuge and filter the supernatant)	GC-MS/MS	$5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ( $S/N \geq 10$ )
爱尔兰 (Ireland) <sup>[42]</sup>	NDMA	DMSO 溶解 (dissolve in DMSO)	HS-GC-MS	$20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ( $S/N \geq 3$ )
法国 (France) <sup>[43]</sup>	NDMA	先后加入甲醇、纯水溶解,离心,取上清液过滤 (after dissolving in methanol and water, centrifuge and filter the supernatant)	HPLC-UV	$3.2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ( $S/N \geq 3$ )
德国 (Germany) <sup>[44]</sup>	NDMA	甲醇溶解 (dissolve in methanol)	LC-MS/MS	$10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ( $S/N \geq 10$ )

### 3 总结与展望

食品、水体、烟草中的 *N*-亚硝胺类化合物的检测已经开展了多年,而关于药品中 *N*-亚硝胺类化合物的研究则进展缓慢。自缬沙坦中检出 *N*-亚硝基二甲胺后,*N*-亚硝胺类化合物的检出范围不断扩大,今后制药企业、药品监管部门对此类化合物的毒性研

究和检测方法研究势必更加重视,但是沙坦类化合物中 *N*-亚硝胺类化合物的检测仍然存在一些难点。首先,沙坦类化合物与 *N*-亚硝胺类化合物极性相近,且 *N*-亚硝胺类化合物的含量相对于沙坦类药物来说属于痕量杂质,药品中大量基质的存在影响方法的稳定性和准确度。所以如何在前处理过程中除去

大量的沙坦类药物,而不损失或尽可能少损失 *N*-亚硝胺类化合物是前处理过程中需要关注的重点。虽然在食品、水、烟草领域,有很多新颖的前处理方法,如椰子壳活性炭固相萃取小柱萃取法<sup>[30]</sup>、荧光标记衍生化结合分散液液微萃取法<sup>[25]</sup>、分子印迹固相萃取小柱萃取法<sup>[33]</sup>,但是受化合物极性、取样量等限制,这些处理方法无法在药品体系中直接应用。因此原理简单,操作简便,回收率稳定的前处理方法更适用于药品体系。其次 *N*-亚硝胺类化合物是一系列含有相同官能团的化合物,因此如何保证检测的专属性则是定量环节需要优先考虑的。相比于单四极杆质谱仪,选择性更强的三重四极杆质谱仪能够提供更好的专属性,避免假阳性的结果。在此,由衷地期望本文为药品中 *N*-亚硝胺类基因毒性杂质检测提供参考,能有更深入的研究成果出现,能够扩大检测范围,提高分析效率,提高检测灵敏度,严格保证药品质量安全。

#### 参考文献

- [1] MILLS AL, ALEXANDER M. *N*-nitrosamine formation by cultures of several microorganisms[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1976, 31(6): 892
- [2] le ROUX J, GALLARD H, CROUE J, *et al.* NDMA formation by chloramination of ranitidine: kinetics and mechanism[J]. *Environ Sci Technol*, 2012, 46(20): 11095
- [3] BUNKAN AJC, HETZLER J, MIKOVINY T, *et al.* The reactions of *N*-methylformamide and *N,N*-dimethylformamide with OH and their photo-oxidation under atmospheric conditions: experimental and theoretical studies[J]. *Phys Chem Chem Phys*, 2015, 17(10): 7046
- [4] SENTHONG P, BORIBOON U. Evaluation of occupational exposure to nitrosamine, carbon black and dust in rubber processing industry[J]. *Int J Occup Environ Med*, 2017, 8(3): 181
- [5] ARANTES-RODRIGUES R, PINTO-LEITE R, da COSTA RG, *et al.* Cytogenetic characterization of an *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine-induced mouse papillary urothelial carcinoma[J]. *Tumor Biol*, 2013, 34(5): 2691
- [6] PRABHU B, BALAKRISHNAN D, SUNDARESAN S. Antiproliferative and anti-inflammatory properties of diindolylmethane and lupeol against *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine induced bladder carcinogenesis in experimental rats[J]. *Human Exp Toxicol*, 2016, 35(6): 685
- [7] LI W, CHEN N, ZHAO Y, *et al.* Online coupling of tandem liquid-phase extraction with HPLC-UV for the determination of trace *N*-nitrosamines in food products[J]. *Anal Methods*, 2018, 10(15): 1733
- [8] MIRALLES P, CHISVERT A, SALVADOR A. Determination of *N*-nitrosamines in cosmetic products by vortex-assisted reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography with mass spectrometry[J]. *J Sep Sci*, 2018, 41(15): 3143
- [9] CHOI K, SABADO M, EL-TOUKHY S, *et al.* Tobacco product use patterns, and nicotine and tobacco-specific nitrosamine exposure: NHANES 1999-2012[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2017, 26(10): 1525
- [10] WEST DM, WU Q, DONOVAN A, *et al.* *N*-nitrosamine formation by monochloramine, free chlorine, and peracetic acid disinfection with presence of amine precursors in drinking water system[J]. *Chemosphere*, 2016, 153: 521
- [11] ABDULBAKI A, LAUVENWETJE AK, ROTH HJ. Formation of nitrosamine from drugs 3. Quantitative-determination of *N*-nitrosodimethylamine formed from promethazine and nitrite[J]. *Arch Pharm*, 1978, 311(9): 775
- [12] ALSARRAJ S, ROTH HJ. Formation of nitrosamine from drugs 2. Reaction of nitrite with amfepramone[J]. *Arch Pharm*, 1978, 311(5): 441
- [13] LAUVENWETJE AK, ABDULBAKI A. Formation of nitrosamine from drugs 5. Catalytic influence of vitamin-B<sub>6</sub> on the formation of *N*-nitrosodimethylamine (NDMA) from tetracycline and nitrous-acid[J]. *Arch Pharm*, 1979, 312(4): 361
- [14] JONES RN, THORN GD. The ultraviolet absorption spectra of aliphatic nitramines, nitrosamines, and nitrates[J]. *Can J Res Sect B—Chem Sci*, 1949, 27(11): 828
- [15] GANKHUYAG N, LEE K, CHO J. The role of nitrosamine (NNK) in breast cancer carcinogenesis[J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2017, 22(3): 159
- [16] HIRATA N, YAMADA S, SEKINO Y, *et al.* Tobacco nitrosamine NNK increases ALDH-positive cells via ROS-Wnt signaling pathway in A549 human lung cancer cells[J]. *J Toxicol Sci*, 2017, 42(2): 193
- [17] KUME E, MUTOU T, KANSAKU N, *et al.* Ultrastructural immunohistochemical study of *L*-type amino acid transporter 1-4F2 heavy chain in tumor microvasculatures of *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN) induced rat bladder carcinoma[J]. *Microscopy*, 2017, 66(3): 198
- [18] WEERASOORIYA S, JASTI VP, BOSE A, *et al.* Roles of translesion synthesis DNA polymerases in the potent mutagenicity of tobacco-specific nitrosamine-derived *O*-2-alkylthymidines in human cells[J]. *DNA Repair*, 2015, 35: 63
- [19] DU H, LENG J, WANG P, *et al.* Impact of tobacco-specific nitrosamine-derived DNA adducts on the efficiency and fidelity of DNA replication in human cells[J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(28): 11100
- [20] SHEWEITA SA, EL-BENDERY HA, MOSTAFA MH. Novel study on *N*-nitrosamines as risk factors of cardiovascular diseases[J].

- Biomed Res Int, 2014; 817019. doi: 10. 1155/2014/817019. Epub 2014 Aug 27
- [ 21 ] SHEWEITA SA, el BANNA YY, BALBAA M, *et al.* *N*-nitrosamines induced infertility and hepatotoxicity in male rabbits [ J ]. *Environ Toxicol*, 2017, 32 ( 9 ): 2212
- [ 22 ] 刘彦. 食品中亚硝酸盐的检测 [ J ]. *食品安全导刊*, 2017 ( 24 ): 89  
LIU Y. Detection of nitrite in food [ J ]. *China Food Saf Mag*, 2017 ( 24 ): 89
- [ 23 ] BYUN MW, AHN HJ, KIM JH, *et al.* Determination of volatile *N*-nitrosamines in irradiated fermented sausage by gas chromatography coupled to a thermal energy analyzer [ J ]. *J Chromatogr A*, 2004, 1054 ( 1-2 ): 403
- [ 24 ] ZHAO M, LI G, KONG W, *et al.* Convenient and sensitive HPLC Method for determination of nitrosamines in foodstuffs based on pre-column fluorescence labeling [ J ]. *Chromatographia*, 2016, 79 ( 7-8 ): 431
- [ 25 ] LU S, WU D, LI G, *et al.* Facile and sensitive determination of *N*-nitrosamines in food samples by high-performance liquid chromatography via combining fluorescent labeling with dispersive liquid-liquid microextraction [ J ]. *Food Chem*, 2017, 234: 408
- [ 26 ] KUEHNE F, KAPPENSTEIN O, STRASSGUETL S, *et al.* *N*-nitrosamines migrating from food contact materials into food simulants: analysis and quantification by means of HPLC-APCI-MS/MS [ J ]. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2018, 35 ( 4 ): 792
- [ 27 ] SEO J, PARK J, LEE J, *et al.* Determination of seven *N*-nitrosamines in agricultural food matrices using GC-PCI-MS/MS [ J ]. *Food Anal Methods*, 2016, 9 ( 6 ): 1595
- [ 28 ] ALABA PA, SANI YM, OLUPINLA SF, *et al.* Toward *N*-nitrosamines free water: formation, prevention, and removal [ J ]. *Crit Rev Environ Sci Technol*, 2017, 47 ( 24 ): 2448
- [ 29 ] ZHAO Y, BOYD J, HRUDEY SE, *et al.* Characterization of new nitrosamines in drinking water using liquid chromatography tandem mass spectrometry [ J ]. *Environ Sci Technol*, 2006, 40 ( 24 ): 7636
- [ 30 ] MCDONALD JA, HARDEN NB, NGHIEM LD, *et al.* Analysis of *N*-nitrosamines in water by isotope dilution gas chromatography-electron ionisation tandem mass spectrometry [ J ]. *Talanta*, 2012, 99: 146
- [ 31 ] CHEN W, LI X, HUANG H, *et al.* Comparison of gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-tandem mass spectrometry with electron ionization for determination of *N*-nitrosamines in environmental water [ J ]. *Chemosphere*, 2017, 168: 1400
- [ 32 ] FAN C, LIN T. *N*-nitrosamines in drinking water and beer: detection and risk assessment [ J ]. *Chemosphere*, 2018, 200: 48
- [ 33 ] LI Z, QIAN Z, HU S, *et al.* Molecularly imprinted solid phase extraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry for determination of *N*-nitrosodiphenylamine in water samples [ J ]. *Chemosphere*, 2018, 212: 872
- [ 34 ] ZHANG X, WANG R, ZHANG L, *et al.* Simultaneous determination of tobacco minor alkaloids and tobacco-specific nitrosamines in mainstream smoke by dispersive solid-phase extraction coupled with ultra-performance liquid chromatography/tandem orbitrap mass spectrometry [ J ]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2018, 32 ( 20 ): 1791
- [ 35 ] CHEN M, WANG L, DONG H, *et al.* Quantitative method for analysis of tobacco-specific *N*-nitrosamines in mainstream cigarette smoke by using heart-cutting two-dimensional liquid chromatography with tandem mass spectrometry [ J ]. *J Sep Sci*, 2017, 40 ( 9 ): 1920
- [ 36 ] ZHANG J, BAI R, YI X, *et al.* Fully automated analysis of four tobacco-specific *N*-nitrosamines in mainstream cigarette smoke using two-dimensional online solid phase extraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry [ J ]. *Talanta*, 2016, 146: 216
- [ 37 ] CASTEGNARO M, PIGNATELLI B, WALKER EA. Analysis of volatile *N*-nitrosamines in commercial drugs [ J ]. *Food Cosmet Toxicol*, 1981, 19 ( 4 ): 489
- [ 38 ] NORWOOD DL, MULLIS JO, FEINBERG TN, *et al.* *N*-nitrosamines as "special case" leachables in a metered dose inhaler drug product [ J ]. *PDA J Pharm Sci Technol*, 2009, 63 ( 4 ): 307
- [ 39 ] 国家药典委员会. 关于缬沙坦国家标准修订稿的公示 (第二次) [ EB/OL ]. [ 2019-01-20 ]. <http://www.chp.org.cn/view/ff80808167f36c8401680c3d64812849?a=bzhxyp>  
Chinese Pharmacopoeia Commission. Publication of the Valsartan National Standard Revising ( the Second Time ) [ EB/OL ]. [ 2019-01-20 ]. <http://www.chp.org.cn/view/ff80808167f36c8401680c3d64812849?a=bzhxyp>
- [ 40 ] FDA. GC/MS Headspace Method for Detection of NDMA in Valsartan Drug Substance and Drug Products [ EB/OL ]. [ 2019-01-25 ]. <https://www.fda.gov/media/115965/download>
- [ 41 ] FDA. Combine Direct Injection *N*-Nitrosodimethylamine ( NDMA ) and *N*-Nitrosodiethylamine ( NDEA ) Impurity Assay by GC/MS [ EB/OL ]. [ 2018-12-12 ]. <https://www.fda.gov/media/117807/download>.
- [ 42 ] OMCLS. Determination of NDMA ( HS-GC-MS ) [ EB/OL ]. [ 2018-09-21 ]. <https://www.edqm.eu/sites/default/files/omcl-ndma-method-palg-ie-september2018.pdf>
- [ 43 ] OMCLS. Determination of NDMA in Valsartan Active Substances and Finished Products by HPLC/UV [ EB/OL ]. [ 2018-09-21 ]. <https://www.edqm.eu/sites/default/files/omcl-method-determination-ndma-valsartan-ansm-september2018.pdf>
- [ 44 ] OMCLS. Test Method for the Determination of NDMA by LC/MS/MS in Valsartan Finished Products [ EB/OL ]. [ 2018-09-21 ]. <https://www.edqm.eu/sites/default/files/omcl-method-determination-ndma-valsartan-cvua-september2018.pdf>

( 本文于 2019 年 4 月 29 日收到 )