

## 气相色谱-热能分析法测定缬沙坦及其制剂中的 *N*-二甲基亚硝胺

咸瑞卿<sup>1</sup>, 巩丽萍<sup>1</sup>, 邢晟<sup>1</sup>, 石晓玥<sup>2</sup>, 胡德福<sup>1\*</sup>, 石峰<sup>1\*</sup>

(1. 山东省食品药品检验研究院, 济南 250101; 2. 中国药科大学, 南京 210009)

**摘要** 目的: 建立气相色谱-热能分析法(GC-TEA法)检测缬沙坦原料药及其制剂中 *N*-二甲基亚硝胺(NDMA)含量。方法: 色谱条件, 采用 INERTTROAP-WAX (30 m × 0.32 mm × 0.5 μm) 毛细管气相色谱柱, 柱温为程序升温(初始温 60 °C, 保持 2 min, 以 10 °C · min<sup>-1</sup> 升至 120 °C, 保持 1 min, 以 50 °C · min<sup>-1</sup> 升至 200 °C, 保持 2 min), 进样口温度 230 °C, 不分流进样, 进样量 0.5 μL; 热能分析仪条件, 接口温度 250 °C, 热解室温度 500 °C, 真空度 59.85~66.5 Pa, 氧气压力 13.79 kPa; 臭氧水平 244 (22.8 V)。结果: 方法的专属性强, *N*-二甲基亚硝胺质量浓度在 10~1 000 ng · mL<sup>-1</sup> 的范围内呈线性 ( $r=1.000$ ,  $n=8$ ), 检测下限为 3 ng · mL<sup>-1</sup>; 13 批样品中 NDMA 含量为 0~87.09 × 10<sup>-6</sup>。结论: 本方法可用于缬沙坦及其制剂中的 NDMA 检测。

**关键词:** 缬沙坦; *N*-二甲基亚硝胺; 气相色谱; 热能分析仪

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2019)06-1501-05

doi: 10.16155/j.0254-1793.2019.08.21

## Determination of *N*-dimethylnitrosamine in valsartan and its preparation by GC-TEA

XIAN Rui-qing<sup>1</sup>, GONG Li-ping<sup>1</sup>, XING Sheng<sup>1</sup>,  
SHI Xiao-yue<sup>2</sup>, HU De-fu<sup>1\*</sup>, SHI Feng<sup>1\*</sup>

(1. Shandong Institute for Food and Drug Control, Jinan 250101, China; 2. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

**Abstract Objective:** To establish a method based on gas chromatography-thermal energy analyzer method (GC-TEA) to detect the content of *N*-dimethylnitrosamine (NDMA) in valsartan bulk drug and its preparation. **Methods:** Chromatography were performed on a column of INERTTROAP-WAX (30 m × 0.32 mm × 0.5 μm) capillary gas chromatography column, the column temperature was programmed to be 60 °C for 2 minutes, and then was raised at a rate of 10 °C · min<sup>-1</sup> to 120 °C and held for 1 min, and was finally raised at a rate of 50 °C · min<sup>-1</sup> to 230 °C and held for 2 min. Inlet temperature was 230 °C, the injection volume was 0.5 μL with splitless injection; The thermal analyzer conditions were, interface temperature of 250 °C, pyrolysis chamber temperature of 500 °C. The degree of vacuum was 59.85 to 66.5 Pa, the oxygen pressure was 13.79 kPa, and the ozone level was 244 (22.8 V).

\* 通信作者 胡德福 Tel: 13553181376; E-mail: hudefu@sdfda.gov.cn

石峰 Tel: 13953175123; E-mail: 13953175123@139.com

第一作者 Tel: 13589097040; E-mail: xianruiqing@126.com

**Results:** The method was specific. The NDMA had a good linear relationship in the range of 10–1 000 ng · mL<sup>-1</sup> ( $r=1.000$ ,  $n=8$ ), and the minimum detection limit was 3 ng · mL<sup>-1</sup>; The NDMA content in 13 batches of sample was 0–87.09 × 10<sup>-6</sup>.

**Conclusion:** The established method can be used for the determination of NDMA in valsartan and its preparations.

**Keywords:** valsartan; *N*-dimethylnitrosamine (NDMA); gas chromatography; thermal energy analyzer

*N*-二甲基亚硝胺(*N*-dimethylnitrosamine, NDMA), 又名 *N*-亚硝基二甲胺, 具有很强的肝脏毒性, 世界卫生组织将其划分为 2A 类致癌物质<sup>[1-4]</sup>。近期在全球市场主流的降压药物缬沙坦中检出超量的 NDMA, 严重威胁患者的生命健康, 全球 20 多个国家和地区紧急召回缬沙坦原料及制剂, 成为全球关注的“缬沙坦事件”。

目前, NDMA 的检测方法主要为气相色谱质谱法<sup>[5-9]</sup>、液相色谱质谱法<sup>[10-11]</sup>、气相色谱热能分析法<sup>[12-13]</sup>, 主要应用于食品、化妆品和烟草行业。国内外对药品中 NDMA 检测方法的研究报道较少<sup>[14-15]</sup>, 本研究建立了利用气相色谱-热能分析法测定缬沙坦及其制剂中 NDMA 的方法, 该方法前处理方法简单, 专属性强, 重复性好, 灵敏度高。

## 1 仪器与试剂

Ellutia 800 系列热能分析仪 (Ellutia 公司), INERTROAP-WAX (30 m × 0.32 mm × 0.5 μm) (岛津公司); NDMA 标准储备液溶液 (100 μg · mL<sup>-1</sup>, AccusStandard 公司); 甲醇 (色谱纯, 默克公司); 缬沙坦原料药 4 批 (批号 VST20180601、64617090604、0101220170804、C5356-17-037)、缬沙坦分散片 (批号 180302、180303、170303、36180520)、缬沙坦氢氯噻嗪分散片 (批号 180648、180649)、缬沙坦氢氯噻嗪胶囊 (批号 180524521、180525521)、市售缬沙坦氢氯噻嗪片 (批号 37180502) 均购于药店。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: INERTCAP-WAX (30 m × 0.32 mm × 0.5 μm); 进样口温度: 220 °C; 进样方式: 不分流进样; 进样量: 0.5 μL; 载气: 氮气 (纯度 >99.999%), 流速为 1.0 mL · min<sup>-1</sup>; 程序升温: 初温为 60 °C, 保持 2 min, 以 10 °C · min<sup>-1</sup> 升至 120 °C, 保持 1 min, 以 50 °C · min<sup>-1</sup> 升至 200 °C, 保持 2 min。

### 2.2 热能分析仪条件

接口温度: 250 °C; 热解室温度: 500 °C; 真空度: 59.85~66.5 Pa; 氧气压力: 13.79 kPa; 臭氧水平: 244 (22.8 V)。

### 2.2 溶液制备

**2.2.1 对照品溶液** 精密量取 NDMA 标准储备液溶液 (100 μg · mL<sup>-1</sup>) 适量, 用甲醇稀释制成 30 ng · mL<sup>-1</sup> 的对照品溶液。

**2.2.2 供试品溶液** 原料药: 精密称取缬沙坦原料 1 g, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇适量溶解并稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 即得。

制剂: 精密称取缬沙坦制剂粉末 2.5 g, 用甲醇 10 mL 分 2 次提取, 合并提取液置 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 滤过, 即得。

### 2.3 专属性

分别精密量取空白辅料溶液、氢氯噻嗪溶液、甲醇及样品溶液各 0.5 μL, 按照“2.1”项下条件进样测定, 记录色谱图 (见图 1)。NDMA 出峰时间约为 6.4 min, 相同保留时间处各溶液均无干扰峰。

### 2.4 线性关系考察

精密量取 NDMA 标准储备液溶液 (100 μg · mL<sup>-1</sup>) 适量, 用甲醇稀释制成 10、20、30、50、100、200、500、1 000 ng · mL<sup>-1</sup> 系列浓度的标准曲线溶液。进样检测, 记录色谱图, 以 NDMA 浓度 ( $C$ , ng · mL<sup>-1</sup>) 为横坐标, 峰面积 ( $A$ ) 为纵坐标, 进行线性回归, 得线性方程 ( $n=8$ ):

$$A=12.61C+1.070 \quad r=1.000$$

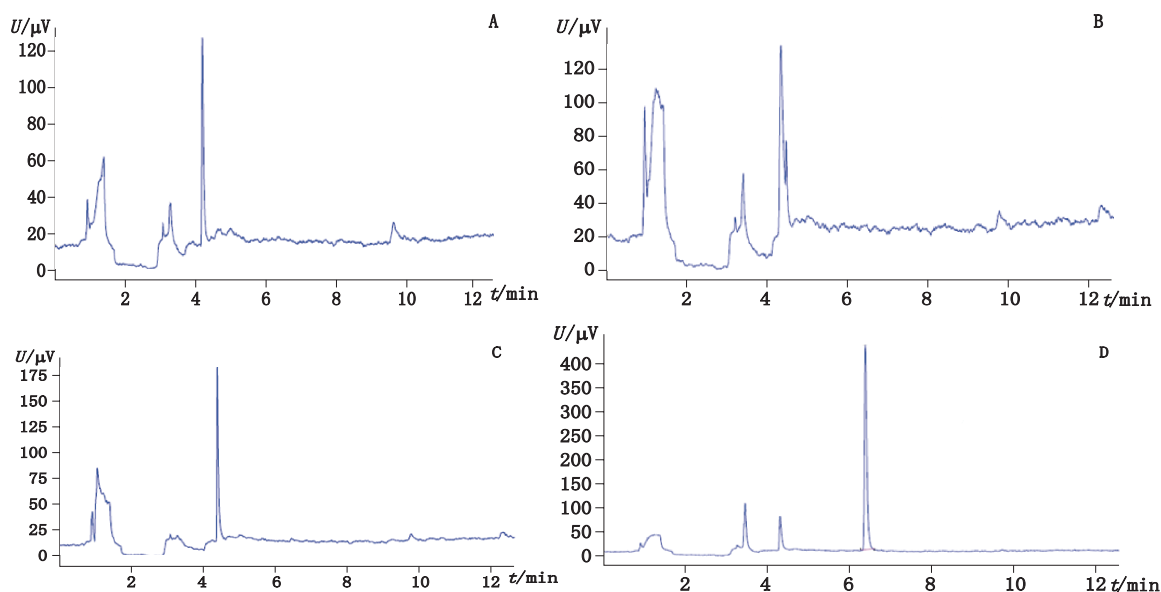
NDMA 在浓度 10~1 000 ng · mL<sup>-1</sup> 范围内线性良好。

### 2.5 精密度

精密量取 30 ng · mL<sup>-1</sup> 的线性试验用标准曲线溶液 0.5 μL, 注入 GC-TEA, 连续进样 6 次, 记录色谱图, 峰面积 RSD 为 0.75%, 表明仪器精密度良好。

### 2.6 重复性

取含 NDMA 的样品 (缬沙坦氢氯噻嗪胶囊, 批号 180525521) 适量, 精密称定, 照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 平行制备 6 份, 按照“2.1”项下条件进样测定, 记录色谱图, 按外标法计算, NDMA 含量分别为 0.060 5、0.061 1、0.059 8、0.060 8、0.059 4、0.061 2 × 10<sup>-6</sup>, RSD 为 1.2%, 表明方法的重复性良好。



A. 辅料(excipients) B. 氢氯噻嗪(hydrochlorothiazide) C. 甲醇(methanol) D. 阳性样品(positive samples)

图1 专属性试验色谱图

Fig. 1 Chromatograms of method specificity tests for determination of NDMA

### 2.7 检测下限与定量下限

精密量取  $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  的线性试验用标准曲线溶液, 稀释一定倍数, 按信噪比 3:1 计算检测下限, 信噪比 10:1 计算定量下限, 结果仪器检测下限为

$3 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 定量下限为  $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。因此, 按照“2.2.2”项下方法, NDMA 的检出下限和定量下限在原料药中分别为  $0.03 \times 10^{-6}$  和  $0.1 \times 10^{-6}$ , 在制剂中分别为  $0.012 \times 10^{-6}$  和  $0.04 \times 10^{-6}$ 。

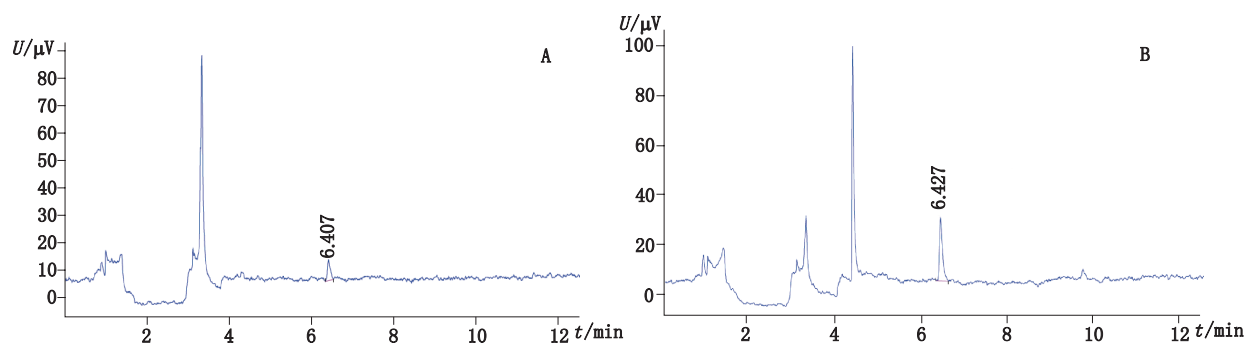


图2 检测下限(A)与定量下限(B)色谱图

Fig. 2 Chromatograms of the LOD (A) and LOQ (B) tests for determination of NDMA

### 2.8 回收率

取已知 NDMA 含量的样品(缬沙坦氢氯噻氢胶囊, 批号 180525521)适量, 精密称取 9 份, 分成 3 组, 分别加入一定量的 NDMA, 加甲醇适量溶解, 滤过, 制得低、中、高 3 个不同浓度的回收率试验用供试品溶液。按照“2.1”项下条件进样测定, 记录色谱图, 按外标法计算 NDMA 含量见表 1。试验结果表明, 3 个不同浓度的回收良好。

### 2.8 溶液稳定性

供试品溶液室温保存于棕色进样瓶中, 于 0、6、

12、24、48 h 分别进样, 峰面积 RSD 为 1.8%, 说明供试品溶液 48 h 稳定性良好。

### 2.10 样品检测

取收集的 13 批次缬沙坦原料及制剂, 按照“2.2.2”项制备供试品溶液, 按照“2.1”项下条件进样测定, 记录色谱图, 外标法计算 NDMA 含量。样品测定结果见表 2, 其中 3 批缬沙坦原料药、5 批含缬沙坦制剂中 NDMA 含量范围为  $0.41 \sim 87.09 \times 10^{-6}$ , 超过欧盟暂定限度 ( $0.3 \times 10^{-6}$ )。

表 1 加样回收率试验结果

Tab. 1 Results of recovery test

含量 (content)/ng	加入量 (added)/ng	测得量 (found)/ng	回收率 (recovery)/%	平均值 (average)/%(n=3)	RSD/ %
76.5	80	154.2	97.1	94.6	2.5
73.1	80	148.6	94.3		
72.8	80	146.8	92.5		
73.8	250	310.7	94.8	97.7	2.7
72.1	250	318.8	98.7		
71.8	250	321.1	99.7		
71.6	400	469.2	99.4	99.0	1.8
70.1	400	458.3	97.1		
72.8	400	475.3	100.6		

表 2 样品测定结果

Tab. 2 Results of sample determination

编号 (No.)	产品名称 (product name)	批号 (batches)	结果 (result)/ $\times 10^{-6}$
1	缬沙坦原料 (valsartan raw material)	VST20180601	未检出 (not detected)
2	缬沙坦原料 (valsartan raw material)	64617030606	0.53
3	缬沙坦原料 (valsartan raw material)	0101220170804	2.28
4	缬沙坦原料 (valsartan raw material)	C5356-17-037	87.09
5	缬沙坦分散片 (valsartan dispersion tablets)	170303	9.46
6	缬沙坦分散片 (valsartan dispersion tablets)	180302	23.40
7	缬沙坦分散片 (valsartan dispersion tablets)	180303	23.90
8	缬沙坦分散片 (valsartan dispersion tablets)	36180520	未检出 (not detected)
9	缬沙坦氢氯噻氢片 (valsartan hydrochlor othiazine tablets)	37180502	0.04
10	缬沙坦氢氯噻氢胶囊 (valsartan hydrochlor othiazine capsules)	180524521	0.02
11	缬沙坦氢氯噻氢胶囊 (valsartan hydrochlor othiazine capsules)	180525521	0.06
12	缬沙坦氢氯噻氢分散片 (valsartan hydrochlor othiazine disperision tablets)	180648	0.45
13	缬沙坦氢氯噻氢分散片 (valsartan hydrochlor othiazine disperision tablets)	180649	0.41

### 3 讨论

#### 3.1 热能分析仪测定 NDMA 的优势

热能分析仪能特异性催化裂解 *N*-亚硝胺类化合物生成一氧化氮 (NO) 基团, 再与臭氧反应后, 利用光电倍增管检测产生的近红外光, 是 *N*-亚硝胺类化合物的特异性检测器。热能分析仪结合气相色谱仪对硝胺进行分析, 具有高选择性和高灵敏度的特点。

#### 3.2 前处理方法优选

目前文献报道的 NDMA 测定方法主要应用于

食品、烟草及化妆品, 前处理过程一般需蒸馏提取、萃取净化、蒸发浓缩等过程, 操作繁琐。本研究根据缬沙坦和 NDMA 在甲醇中均易溶解的特点, 以甲醇为溶剂, 无需净化直接进样分析, 前处理简单、重复性好。

#### 3.3 不同测定方法对比

参考国家药典委员会《关于缬沙坦国家标准修订稿的公示》, 采用 GC-MS 法检测缬沙坦中 NDMA, 定量离子为 74, 定性离子为 43 和 42, 结果显示 GC-MS 与 GC-TEA 2 种测定方法结果无显著性差

异,但 GC-MS 法比 GC-TEA 特异性差,背景和基质干扰较多,定性定量离子保留时间附近有较多干扰色谱峰,影响低浓度样品的定性定量准确性。

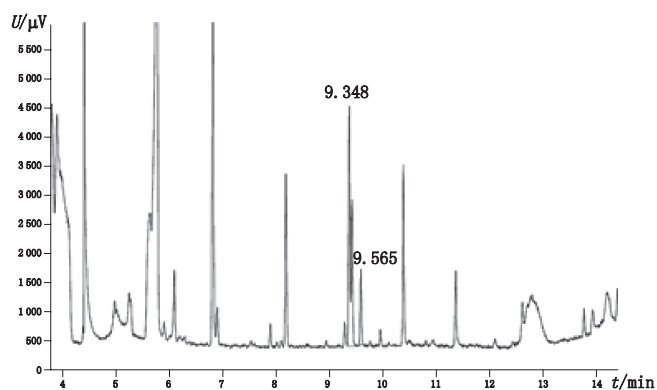


图 3 GC-MS 提取离子图 ( $m/z$  74)

Fig. 3 Extraction chromatogram of the GC-MS for determination of NDMA

#### 参考文献

- [1] FRITSCHI L, BENKE G, RISCH HA, *et al.* Occupational exposure to *N*-nitrosamines and pesticides and risk of pancreatic cancer [J]. *Occup Environ Med*, 2015, 72(9): 678
- [2] JAKSZYN P. Endogenous versus exogenous exposure to *N*-nitroso compounds and gastric cancer risk in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC-EURGAST) study [J]. *Carcinogenesis*, 2006, 27(7): 1497
- [3] 马丽珍, 南庆贤, 方长法. *N*-亚硝胺类化合物与食品安全性 [J]. *农产品加工学刊*, 2006, 50(12): 8
- MA LZ, NAN QX, FANG CF. *N*-nitrosamine compounds and food safety [J]. *Acta Period Farm Products Proc*, 2006, 150(12): 8
- [4] BAKIRI L, WAGNER EF. Mouse models for liver cancer [J]. *Mol Oncol*, 2013, 7(2): 206
- [5] GB5009. 26-2016 食品安全国家标准 食品中 *N*-亚硝胺类化合物的测定 [S]. 2016
- GB5009. 26-2016 National Food Safety Standards, Determination of *N*-nitrosamines in Foods [S]. 2016
- [6] 何淑娟, 赵丽敏, 李强, 等. 气相色谱-质谱法测定肉制品中的 9 种挥发性 *N*-亚硝胺类物质 [J]. *肉类研究*, 2015, 29(1): 27
- HE SJ, ZHAO LM, LI Q, *et al.* Determination of nine *N*-nitrosocompounds in meat products by gas chromatograph-mass spectrometry [J]. *Meat Res*, 2015, 29(1): 27
- [7] 乔玲, 纪哈旭, 宋佳, 等. 肉制品中 NDMA 的测定 [J]. *现代食品*, 2018, 1: 103
- QIAO L, JI HX, SONG J, *et al.* Determination of *N*-nitrosodimethylamine in meat products [J]. *Mod Food*, 2018, 1: 103
- [8] 徐赛男, 吴祖芳, 陈杰. 气相色谱-质谱联用法测定传统腌菜中的 *N*-亚硝胺 [J]. *食品与生物技术学报*, 2015, 34(11): 1162
- XU SN, WU ZF, CHEN J. Determination of *N*-nitrosamine compounds in traditional pickled vegetables by gas chromatography-mass spectrometry [J]. *J Food Sci Biotechnol*, 2015, 34(11): 1162
- [9] ALANDRA K, DARRYL J, LISA L, *et al.* 气相色谱三重四级杆气质联用系统分析水样中的 *N*-亚硝基二甲胺 [J]. *环境化学*, 2016, 35(11): 2442
- ALANDRA K, DARRYL J, LISA L, *et al.* Analysis of *N*-nitrosodimethylamine (NDMA) in water using GC triplequadropole mass spectrometr [J]. *Envir Chem*, 2016, 35(11): 2442
- [10] 朱翔, 李伟, 刘玉灿, 等. 超高效液相色谱-三重四级杆质谱联用仪同时检测水中 9 种亚硝胺 [J]. *分析测试学报*, 2014, 33(8): 866
- ZHU X, LI W, LIU YC, *et al.* Determination of nine *N*-nitrosamines in water using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Instrum Anal*, 2014, 33(8): 866
- [11] 简龙海, 孟茜, 陈丹丹, 等. 液相色谱-大气压化学离子化-串联质谱法测定化妆品中 8 种亚硝胺 [J]. *香料香精化妆品*, 2015(4): 59
- JIAN LH, MENG Q, CHEN DD, *et al.* Determination of eight nitrosamines in cosmetics by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry [J]. *Flav Fragr Cosm*. 2015(4): 59
- [12] 张红, 杨保刚. 气相色谱-热能分析仪测定水产品中 *N*-亚硝胺 [J]. *食品研究与开发*, 2015, 35(24): 125
- ZHANG H, YANG BG. Determination of volatile *N*-nitrosamines in aquatic products by thermal energy analyzer using gas chromatography [J]. *Food Res Devel*, 2015, 35(24): 125
- [13] 邢昆明, 刘华, 王贻坤, 等. GC-TEA 同时测定化妆品中的 5 种挥发性亚硝胺 [J]. *安徽化工*, 2016, 42(6): 100
- XIN KM, LIU H, WANG YK, *et al.* Simultaneous determinations of five kinds of volatilenitrosamines in cosmetics by gas chromatography-thermal energy analyser [J]. *Anhui Chem Ind*, 2016, 42(6): 100
- [14] 倪松, 崔颖, 姜涛, 等. 食品中 *N*-亚硝胺类化合物检测方法研究进展 [J]. *食品研究与开发*, 2018, 39(6): 215
- NI S, CUI Y, JIANG T, *et al.* research progress in detection methods of *N*-nitrosamines in foods [J]. *Food Res Devel*, 2018, 39(6): 215
- [15] 董瑾, 刘爱华. *N*-二甲基亚硝胺检测研究进展 [J]. *现代食品*, 2016, 4: 77
- DONG J, LIU AH. Research progress of NDMA detection [J]. *Mod Food*, 2016, 4: 77

(本文于 2018 年 10 月 10 日收到)