

固相萃取-离子色谱法检测盐酸普萘洛尔片剂中亚硝酸盐和硝酸盐及其来源研究



芦 丽, 邵方娴, 许 慧, 黄朝瑜, 严 菲

江苏省药品监督检验研究院 (南京 210019)

【摘要】目的 建立固相萃取-离子色谱-抑制电导 (SPE-IC-CD) 测定盐酸普萘洛尔片剂及辅料中亚硝酸根和硝酸根离子的方法, 探讨其与基因毒性杂质 *N*-亚硝基普萘洛尔 (NPPN) 形成的相关性及其来源。**方法** 采用 Dionex IonPac™ AS11-HC RFIC™ 阴离子分析柱 (250 mm×4.0 mm, 9 μm) 及 AG11-HC RFIC™ 配套保护柱 (50 mm×4.0 mm), 柱温: 35 °C, 电导检测器池温: 40 °C, 流速: 0.8 mL/min, 进样体积: 100 μL, 以淋洗液发生器在线产生的氢氧化钾溶液为流动相进行梯度洗脱。**结果** 亚硝酸根和硝酸根在 10.00~500.00 ng/mL 范围内线性良好 ($r > 0.999 6$); 平均回收率分别为 97.8% 和 98.0%, *RSD* 分别为 1.3% 和 0.8% ($n=9$); 检测限均为 3.00 ng/mL, 定量限均为 10.00 ng/mL。在 NPPN 含量不同的片剂及辅料中均检出目标离子, 相关性分析显示 NPPN 含量与亚硝酸根、硝酸根含量呈显著正相关 ($P < 0.05$), 且离子来源均为制剂辅料。**结论** 本法灵敏度高、专属性强, 适用于片剂及辅料中亚硝酸盐和硝酸盐的测定; NPPN 的产生与辅料中残留的亚硝酸盐和硝酸盐直接相关, 研究结果为制剂中 NPPN 杂质的质量控制策略制定提供了重要试验依据与理论参考。

【关键词】 盐酸普萘洛尔片; *N*-亚硝基普萘洛尔; 相关性分析; 硝酸盐; 亚硝酸盐; 固相萃取-离子色谱法

【中图分类号】 R917

【文献标识码】 A

Determination of nitrite and nitrate in propranolol hydrochloride tablets by solid phase extraction-ion chromatography and study of their sources

LU Li, SHAO Fangxian, XU Hui, HUANG Chaoyu, YAN Fei

Jiangsu Institute for Drug Control, Nanjing 210019, China

Corresponding author: YAN Fei, Email: yanfei@jsifdc.org.cn

【Abstract】Objective To establish a solid-phase extraction coupled with ion chromatography-suppressed conductivity detection (SPE-IC-CD) method for the determination of nitrite and nitrate ions in propranolol hydrochloride tablets and their excipients, and to explore their correlation with the formation of the genotoxic impurity *N*-nitrosopropranolol (NPPN) as well as their sources. **Methods** The separation was performed on a Dionex IonPac™ AS11-HC RFIC™ anion analytical column (250 mm × 4.0 mm, 9 μm) with a matching AG11-HC RFIC™ guard column (50 mm × 4.0 mm). The column temperature was maintained at 35 °C, and the conductivity detector cell temperature was set at 40 °C. The flow rate was 0.8 mL/min, and the injection volume was 100 μL. Gradient elution was

DOI: 10.12173/j.issn.2097-4922.202603100

基金项目: 2024 年国家药品抽检计划项目

通信作者: 严菲, 硕士, 主任药师, Email: yanfei@jsifdc.org.cn

<https://yxqy.whuzhmedj.com>

carried out using potassium hydroxide solution as the mobile phase, which was generated online by an eluent generator. **Results** The calibration curves for nitrite and nitrate showed good linearity in the range of 10.00–500.00 ng/mL, with correlation coefficients greater than 0.999 6. The average recoveries were 97.8% and 98.0% for nitrite and nitrate, respectively, with corresponding RSD values of 1.3% and 0.8% ($n=9$). The limits of detection and limits of quantification were 3.00 ng/mL and 10.00 ng/mL for both analytes, respectively. The target ions were detected in both tablet and excipient samples with different NPPN contents. Correlation analysis revealed a significant positive correlation between NPPN content and the levels of nitrite and nitrate ions ($P < 0.05$), and the ionic residues were all traced back to the excipients used in the formulation. **Conclusion** The developed method exhibits high sensitivity and strong specificity, and is suitable for the determination of nitrite and nitrate in tablets and excipients. The formation of NPPN is directly associated with residual nitrite and nitrate in the excipients. These findings provide important experimental evidence and theoretical reference for establishing quality control strategies for NPPN impurity in the formulation.

【Keywords】 Propranolol hydrochloride tablets; *N*-nitrosopropranolol; Correlation analysis; Nitrite; Nitrate; SPE-IC

基因毒性杂质是指直接或间接损伤 DNA，引发基因突变、染色体畸变或 DNA 链断裂的微量杂质，即使极低浓度下，长期暴露也可能增加癌症风险或导致可遗传的基因缺陷^[1–2]。亚

硝胺类杂质是公认的基因毒性杂质^[3]，其生成的根本原因在于前体胺（二级胺、三级胺、季铵盐或酰胺）与亚硝酸试剂在酸性条件下反应（图 1）^[4]。

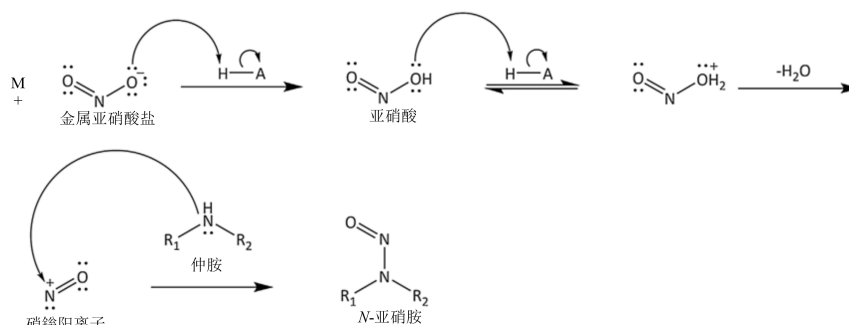


图 1 药物中 *N*-亚硝胺杂质产生反应方程式

Figure 1. Reaction equation for the formation of *N*-nitrosamine impurities in pharmaceuticals

盐酸普萘洛尔片主要用于高血压、心绞痛和心律失常的治疗^[5]，其分子中的仲胺结构是生成 *N*-亚硝基普萘洛尔（*N*-nitrosopropranolol, NPPN）的核心前体，而药品生产全链条中水、起始物料、中间体、催化剂等可能残留亚硝化试剂，其中亚硝酸根离子（NO₂⁻）和硝酸根离子（NO₃⁻）因来源广、稳定性较高，成为最主要的风险诱因——NO₃⁻在酸性环境下可转化为 NO₂⁻，进而与仲胺反应生成基因毒性杂质 NPPN，即使痕量残留也需严格定量控制^[6]。

NO₂⁻和 NO₃⁻的常见检测技术包括滴定法、比色法、UV 法、电化学法、荧光光谱法、GC 法、HPLC 法和离子色谱法等。其中，滴定法和比色法操作繁琐且误差较大^[7]；UV 法易受样品基质

干扰^[8]；电化学法重现性不佳^[9]；荧光法灵敏度低且操作复杂^[10]；GC 法需衍生化处理，耗时且易引入误差^[11]；HPLC 法依赖衍生或特殊检测器，成本高且易受基质干扰^[12]；而离子色谱法具有专属性强、灵敏度高、操作简便、绿色低毒等优势，广泛应用于复杂基质中 NO₂⁻与 NO₃⁻的痕量分析^[13–14]。

为系统探究盐酸普萘洛尔中 NPPN 的生成与辅料中 NO₂⁻、NO₃⁻残留的关联性，完善该类药物的基因毒性杂质质量控制体系，本研究以盐酸普萘洛尔片剂及其辅料为对象，建立了固相萃取–离子色谱–抑制电导法（solid-phase extraction coupled with ion chromatography-suppressed conductivity detection, SPE-IC-CD）测定痕量

NO_2^- 与 NO_3^- ，通过统计分析确定NPPN与残留 NO_2^- 与 NO_3^- 的相关性并探究其来源，以期为片剂中NPPN的控制提供参考。

1 仪器与材料

1.1 主要仪器

CS-6000⁺离子色谱仪（包括EG淋洗液在线发生器、电导检测器、ASRS 300抑制器、AS自动进样器及Chromelon软件）、OnGuard II RP Cartridge 2.5cc和OnGuard II Ag-H Cartridge 2.5cc固相萃取柱均购自美国Dionex公司；Milli Q IQ7000型超纯水仪（德国Millipore公司）；MSE125P-000-DU电子天平（美国Sartorius公司）；WIGGENS-UA22MFD型超声波清洗器（德国Wiggens公司）；Eppendorf AG 22337高速冷冻离心机（德国Eppendorf公司）；Seven Excellence pH计（瑞士Mettler-Toledo公司）。

1.2 主要药品与试剂

NO_2^- 标准溶液（国家有色金属及电子材料分析测试中心，批号：248053-1，含量：1 000 $\mu\text{g/mL}$ ）； NO_3^- 标准溶液（国家有色金属及电子材料分析测试中心，批号：247055-1，含量：1 000 $\mu\text{g/mL}$ ）；甲醇为色谱纯；其余试剂均为分析纯；水为超纯水。

本研究所用样品为2024年国家药品抽检计划中抽取的盐酸普萘洛尔片（规格：10 mg），共计18批次，涉及A、B、C、D、E、F共6家生产企业；同时收集了其中5家生产企业所用辅料，以及G企业生产的3批次参比样品（批号：60048437、60048438、60048566）。

2 方法与结果

2.1 测定方法

2.1.1 SPE-IC-CD法测定 NO_2^- 与 NO_3^- 的色谱条件

色谱条件：采用Dionex IonPacTM AS11-HC RFICTM阴离子色谱柱（250 mm $\times$ 4.0 mm，9 μm ）及同系列AG11-HC RFICTM保护柱（50 mm $\times$ 4.0 mm），配备Dionex ASRS[®] 300型抑制器（4 mm）；柱温为35 $^{\circ}\text{C}$ ；流动相为淋洗液发生器在线产生的氢氧化钾溶液，梯度洗脱（0~5 min，5 mmol/L；5~18 min，5 $\rightarrow$ 20 mmol/L；18~21 min，20 mmol/L；21~21.1 min，20 $\rightarrow$ 30 mmol/L；21.1~24 min，30 mmol/L；24~24.1 min，30 $\rightarrow$ 5 mmol/L；24.1~

30 min，5 mmol/L）；流速为0.8 mL/min；电导检测器池温为40 $^{\circ}\text{C}$ ；进样体积为100 μL 。

2.1.2 NPPN测定方法色谱和质谱条件

色谱条件：采用Agilent Pursuit XRs Diphenyl 色谱柱（150 mm $\times$ 3.0 mm，2.7 μm ），以含10 mmol/L甲酸铵的0.1%甲酸溶液为流动相A，以含0.1%甲酸的甲醇溶液为流动相B，进行梯度洗脱（0~2 min，10% B；2~5 min，10% $\rightarrow$ 50% B；5~14 min，50% $\rightarrow$ 70% B；14~17 min，70% $\rightarrow$ 90% B；17~19 min，90% B；19~19.1 min，90% $\rightarrow$ 10% B；19.1~23 min，10% B）；流速为0.4 mL/min，柱温为40 $^{\circ}\text{C}$ ，进样体积为5 μL [5]。

质谱条件：采用三重四极杆质谱分析器，电喷雾离子源正离子模式；干燥气温度为325 $^{\circ}\text{C}$ ，干燥气流速为7 L/min；喷雾电压为40 psi；鞘气温度为350 $^{\circ}\text{C}$ ，鞘气流速为11 L/min；毛细管电压为3 000 V；采用多反应监测模式，监测离子对为 m/z 289.2 $\rightarrow$ 72.1（定量离子）、 m/z 289.2 $\rightarrow$ 259.2和 m/z 289.2 $\rightarrow$ 145.2（定性离子） [5]。

2.2 溶液的配制

2.2.1 供试品溶液

取盐酸普萘洛尔片剂20片，精密称定，研细，精密称取适量粉末（约相当于盐酸普萘洛尔100 mg），置50 mL离心管中，精密加入10 mL去离子水，涡旋混匀10 min，振摇10 min，离心（10 800 $\times g$ ）10 min，取上清液经0.45 μm 滤膜过滤，用10 mL注射器吸取续滤液8 mL，置处理后的OnGuard II RP Cartridge 2.5cc和OnGuard II Ag-H Cartridge 2.5cc固相萃取柱上（2根固相萃取柱上下串联，依次用注射器吸取甲醇5 mL与水10 mL冲洗活化），推动注射器活塞过滤或用抽滤泵抽滤，待续滤液流出，收集第6~8 mL续滤液，即得。

2.2.2 空白溶液

精密加入10 mL去离子水，置处理后的OnGuard II RP Cartridge 2.5cc和OnGuard II Ag-H Cartridge 2.5cc固相萃取柱上，推动注射器过滤，待续滤液流出，收集第6~8 mL续滤液，即得。

2.2.3 辅料溶液

精密称取约100 mg单一辅料，置50 mL离心管中，精密加入10 mL去离子水，涡旋混匀10 min，振摇10 min，离心（10 800 $\times g$ ）10 min，0.45 μm 滤膜过滤，即得。

2.2.4 混合对照品储备液

精密量取 NO_2^- 与 NO_3^- 标准溶液各 0.1 mL, 置同一 100 mL 量瓶中, 加去离子水定量稀释成每 1 mL 中各约含 1 000 ng 的溶液, 即得。

2.2.5 系列对照品溶液

精密量取混合对照品储备液 1.0 mL, 分别置 100、50、25、15、10、5、2 mL 量瓶中, 用去离子水稀释至刻度, 摇匀, 制成每 1 mL 约含 10、20、40、60、100、200、500 ng 的系列对照品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 系统适用性试验

精密量取空白溶液、100 ng/mL 混合对照品溶液、供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 记录色谱图 (图2)。在该色谱条件下空白溶液和供试品溶液在 NO_2^- 与 NO_3^- 的出峰处无干扰, 证明该方法专属性良好。

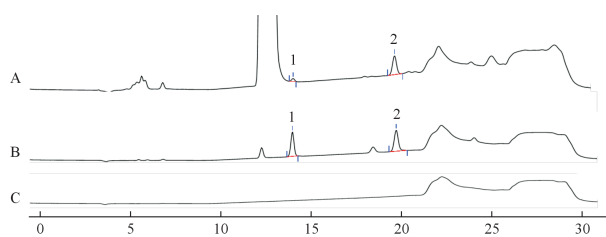


图2 SPE-IC法检测 NO_2^- 与 NO_3^- 专属性典型色谱图

Figure 2. Typical chromatograms of specificity for the determination of NO_2^- 与 NO_3^- by SPE-IC

注: A. 空白溶液; B. 对照品溶液; C. 供试品溶液; 1. NO_2^- ; 2. NO_3^- 。

2.3.2 线性关系考察

精密量取“2.2.5”项下系列对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 以浓度为横坐标 (X , ng/mL)、峰面积为纵坐标 (Y) 进行线性回归, 结果见表1。

表1 回归方程和线性范围

Table 1. Regression equations and linear ranges

待测物	线性方程	r	线性范围 (ng/mL)
NO_2^-	$Y=9.738 \times 10^{-4}X-1.157 \times 10^{-3}$	1.000 0	10.00~500.00
NO_3^-	$Y=7.452 \times 10^{-4}X+3.168 \times 10^{-3}$	0.999 6	10.00~500.00

2.3.3 定量限和检测限

精密量取“2.2.4”项下混合对照品储备液, 倍比稀释, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 分别以信噪比为 10 和 3 计算定量限和检测限。结果 NO_2^- 与 NO_3^- 的检测限均为 3.00 ng/mL, 相当于供试品溶液的浓度 0.3 mg/kg, 定量限均为 10.00 ng/mL, 相当于供试品溶液的浓度 1.0 mg/kg。

2.3.4 精密度试验

取浓度为 100 ng/mL 的混合对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 针, 结果计算得 NO_2^- 与 NO_3^- 峰面积的 RSD 分别为 0.6% 和 0.3% ($n=6$), 表明仪器精密度良好。

2.3.5 重复性试验

取同一批次样品 (批号: 2111007), 按“2.2.1”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 并按“2.1”项下色谱条件测定, 按标准曲线法计算含量。计算得 NO_2^- 与 NO_3^- 的平均含量分别为 1.99 mg/kg 和 22.04 mg/kg, RSD 分别为 0.5% 和 0.8% ($n=6$), 表明本方法重复性良好。

2.3.6 回收率试验

精密称取 9 份 B 企业提供的未检出 NO_2^- 与 NO_3^- 的处方量的混合空白辅料 100 mg, 置 50 mL 离心管中, 再分别加入 1 000 ng/mL 混合对照品溶液 0.1、0.5、1.0 mL, 制成 3 个浓度分别为 10、50、100 ng/mL 的加标样品溶液, 每个浓度样品制备 3 份, 按“2.2.1”项下供试品溶液制备方法平行制备 9 份加标回收率测定溶液, 并按“2.1”项下色谱条件进样测定, 计算得 NO_2^- 与 NO_3^- 的平均回收率分别为 97.8% 和 98.0%, RSD 分别为 1.3% 和 0.8% ($n=9$), 表明本方法回收率良好。

2.4 样品测定

取 6 家生产企业的抽检样品 (18 批次)、参比样品 (3 批次)、5 家生产企业提供的辅料, 按“2.2.1”项下制备供试品溶液, “2.2.3”项下制备辅料溶液, 并按“2.1”项下色谱条件测定, 采用标准曲线法计算片剂和辅料中 NO_2^- 与 NO_3^- 含量, 结果见表2和表3。

采用实验室建立并经过方法学验证的超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 法^[5], 对上述 6 家生产企业 18 批次抽检样品和 3 批次参比样品中的 NPPN 进行定量检测, 结果见表2。比较 6 家生产企业 NPPN 的检出量, 图3结果显示, 在 6 家生产企业的 18 批次样品中, 企业 D 的 2 批样品超过拟定限度 (6.25 ppm)^[15-16], 其他生产企业样品均小于拟定限度, 但检测结果普遍高于限度的 10%, 属于高风险控制杂质。

比较 6 家生产企业的抽检样品和参比样品中 NO_2^- 与 NO_3^- 含量, 图4结果显示, 抽检样品和参比样品均检出 NO_2^- , 检出量均小于 3 mg/kg, 其中 D 企业片剂中 NO_2^- 含量明显高于其他 5 家生产企

表2 各生产企业盐酸普萘洛尔片中NO₂⁻与NO₃⁻含量 (n=3)

Table 2. Contents of NO₂⁻与NO₃⁻ in propranolol hydrochloride tablets from various manufacturing enterprises (n=3)

生产企业	批号	生产日期	NPPN 含量 (ppm)	NO ₂ ⁻ 含量 (mg/kg)	NO ₃ ⁻ 含量 (mg/kg)
F 企业	240201	2024-02-01	0.18	未检出	20.52
	230106	2023-01-30	1.42	未检出	20.64
	230509	2023-05-23	0.43	未检出	22.27
A 企业	E221215	2022-12-14	2.07	1.19	0.80
	E240212	2024-02-25	0.65	未检出	0.36
	E231228	2023-12-19	1.29	1.21	0.29
B 企业	2401039	2024-01-29	1.97	0.0	0.04
	2402005	2024-02-28	1.19	1.38	0.04
	2402004	2024-03-16	0.57	未检出	0.28
E 企业	D230802	2023-08-15	1.17	1.95	1.40
	D230905	2023-09-13	0.91	未检出	未检出
	D230906	2023-09-14	1.46	未检出	1.89
G 企业 (参比样品)	60048438	2024-01-08	3.25	未检出	0.47
	60048437	2024-01-11	3.08	1.04	未检出
	60048566	2024-02-05	1.51	1.24	1.18
C 企业	20221003	2022-10-09	0.72	2.75	未检出
	20230106	2023-01-29	1.58	1.98	0.75
	20230610	2023-06-25	0.25	未检出	0.26
D 企业	2111007 ·	2021-11-24	14.07	1.99	22.04
	2206005	2022-06-11	10.44	2.67	5.71
	2402002 ·	2024-02-23	1.41	2.46	49.40

注：“未检出”表示含量小于0.3 mg/kg; ppm. 百万分之一。

表3 各生产企业辅料中NO₂⁻与NO₃⁻离子含量 (n=3)

Table 3. Contents of NO₂⁻与NO₃⁻ in excipients from various manufacturing enterprises (n=3)

生产企业	名称	批号	NO ₂ ⁻ 含量 (mg/kg)	NO ₃ ⁻ 含量 (mg/kg)
D 企业	羟丙甲纤维素	2303-075	0.40	3.84
	磷酸氢钙	2311015B4	未检出	4.72
	硬脂酸镁	240166	未检出	3.97
	玉米淀粉	20240111	未检出	13.73
	蔗糖	232401	0.52	1.18
A 企业	甘露醇	F44a240401	未检出	未检出
	明胶	F74240301	未检出	未检出
	硬脂酸	F21a240301	0.30	未检出
	硬脂酸镁	F64a240302	未检出	0.70
C 企业	甘露醇	30230737	未检出	未检出
	羟丙甲纤维素	NCC-0341	未检出	1.62
	聚维酮K30	CC240218008	未检出	未检出
	硬脂酸	20231113	0.27	0.91
	硬脂酸镁	240161	0.28	2.90
B 企业	明胶-1	LF2304061	0.80	0.70
	明胶-2	LF23110602	0.69	3.79
	混合辅料-1	—	未检出	0.84
	混合辅料-2	—	未检出	未检出
	混合辅料-3	—	未检出	未检出
F 企业	玉米淀粉	D230601	0.73	39.63
	硫酸钙	230519	未检出	3.48
	硬脂酸镁	230321	未检出	3.96

注：“未检出”表示含量小于0.3 mg/kg；“—”表示无批号。

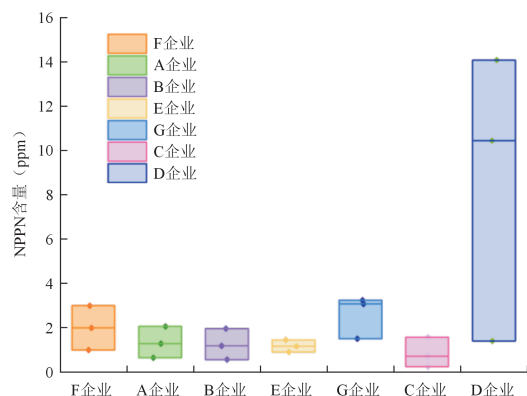


图3 不同生产企业片剂中NPPN检测结果的箱式图

Figure 3. Box plot of NPPN detection results in tablets from different manufacturers

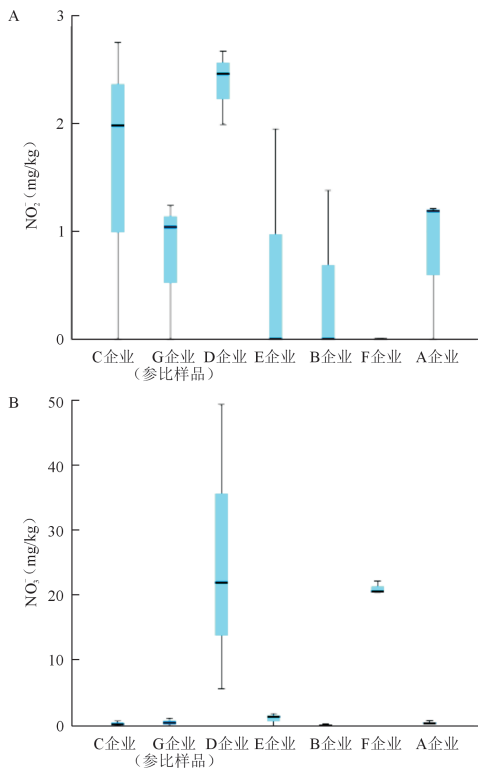


图4 不同生产企业片剂中NO₂⁻与NO₃⁻定结果箱式图

Figure 4. Box plots of NO₂⁻与NO₃⁻ determination results in tablets from different generic manufacturers

注：A. NO₂⁻；B. NO₃⁻。

业样品；NO₃⁻的检出量明显高于NO₂⁻的检出量，其中D企业和F企业样品中NO₃⁻检出量明显高于其他生产企业样品。

对片剂中NPPN检出量与NO₂⁻、NO₃⁻含量之间进行Pearson相关性分析，由NPPN、NO₂⁻、NO₃⁻含量3个变量两两之间的矩阵散点图（图5）可知，NO₂⁻和NPPN之间存在显著正相关（ $P < 0.05$ ），Pearson相关系数为0.434（表4）；而NO₃⁻和NPPN之间相关性不显著，提示片剂中NO₂⁻的残留是产

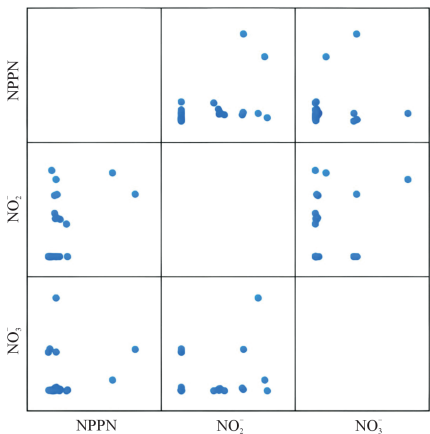


图5 片剂中NPPN、NO₂⁻与NO₃⁻3个变量的矩阵散点图

Figure 5. Matrix scatter plots of three variables (NPPN, NO₂⁻ and NO₃⁻)

表4 片剂中NPPN、NO₂⁻与NO₃⁻3个变量的矩阵散点图和Pearson相关系数

Table 4. Pearson correlation coefficient table of three variables (NPPN, NO₂⁻ and NO₃⁻)

名称	相关性	NPPN	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻
NPPN	Pearson相关性	1.000	0.434*	0.163
	显著性（双尾）		0.049	0.480
	平方和与叉积	235.664	30.548	142.948
	协方差	11.783	1.527	7.147
	个案数	21	21	21
NO ₂ ⁻	Pearson相关性	0.434*	1	0.181
	显著性（双尾）	0.049		0.433
	平方和与叉积	30.548	21.048	47.378
	协方差	1.527	1.052	2.369
	个案数	21	21	21
NO ₃ ⁻	Pearson相关性	0.163	0.181	1.000
	显著性（双尾）	0.48	0.433	
	平方和与叉积	142.948	47.378	3 262.624
	协方差	7.147	2.369	163.131
	个案数	21	21	21

注：*表示在0.05水平（双尾）上相关性显著。

生NPPN的主要因素，NO₃⁻的残留是次要因素。

在进行亚硝胺类杂质风险评估时，通常认为亚硝胺的生成需要3个要素：亚硝化试剂、胺和酸性条件。其中评估物料中亚硝化试剂的来源，可从起始物料、溶剂和试剂、副产物、生产用水和辅料中的杂质、操作单元以及辅助操作等方面进行评估 [17-18]。在实验室条件下，为了考察亚硝化试剂的来源，对各生产企业提供的部分原料和辅料中的NO₂⁻与NO₃⁻进行测定，原料中均未检出NO₂⁻与NO₃⁻，而辅料中检出不同含量的NO₂⁻与NO₃⁻，说明NO₂⁻与NO₃⁻主要由辅料引入。

对各生产企业提供的辅料进行检测,结果显示玉米淀粉、糊精、蔗糖和羟丙甲纤维素中检出了不同量的 NO_2^- 与 NO_3^- ;辅料中残留的 NO_2^- 与 NO_3^- 是产生NPPN的主要因素;用量较大的辅料糊精和羟丙甲纤维素中引入 NO_2^- 风险较高;当存在蔗糖等还原性辅料时,玉米淀粉中残留的 NO_3^- 也会作为间接亚硝化试剂,促进亚硝化反应生成NPPN;不同来源的辅料 NO_2^- 与 NO_3^- 的残留量差异较大。

3 讨论

3.1 前处理方法的优化

3.1.1 称样量的选择

盐酸普萘洛尔片剂中辅料占比较高,易对检测造成较强干扰,因此称样量的选择对试验结果至关重要。称样量过大时,样品会出现严重糊化现象,主成分与氯离子(Cl^-)会干扰目标峰;称样量过小则无法满足检测灵敏度要求。本研究考察了5、10、20片3个称样量水平,结合色谱峰形、分离度、灵敏度及基线稳定性进行综合评价,结果表明,称样量为10片(约相当于盐酸普萘洛尔100 mg)时效果最佳。

3.1.2 固相萃取条件优化

采用50 mL离心管进行提取,精密加入10 mL去离子水,涡旋混匀10 min,振摇10 min,离心分离上清液;上清液依次过SH- C_{18} 柱、SH-Ag柱净化;由于样品中主成分干扰测定,采用SH- C_{18} 柱去除大部分主成分。 Cl^- 含量较高,使用SH-Ag柱去除 Cl^- ,避免过量的 Cl^- 干扰 NO_2^- 与 NO_3^- 的测定。并对涡旋时间进行优化,涡旋5 min时样品提取回收率偏差较大,延长涡旋时间至10 min后,回收率接近100%且趋于稳定。

3.2 色谱条件优化

3.2.1 色谱柱与淋洗液的选择

选用ThermoDionexIonPac AS11阴离子交换色谱柱(250 mm×4.0 mm, 9 μm),搭配AG11保护柱(50 mm×4.0 mm),针对 NO_2^- 与 NO_3^- 的分离特性,对比考察了氢氧化钾(KOH)溶液(5~30 mmol/L)梯度洗脱与碳酸钠-碳酸氢钠(Na_2CO_3 - NaHCO_3)混合淋洗液。 Na_2CO_3 - NaHCO_3 体系中2种离子保留时间接近,分离度小于1.5,且存在基质干扰;KOH梯度洗脱(同“2.1”项下色谱条件),5.0~18.0 min KOH浓度由5 mmol/L线性升至20 mmol/L, NO_2^- 与 NO_3^- 分离度大于3.0,

出峰时间分别为14.2 min和19.6 min,无辅料基质峰和 Cl^- 的干扰,且基线噪音低,最终选定KOH梯度洗脱模式,淋洗液由淋洗液发生器在线产生,避免手动配制带来的误差。

3.2.2 流速与抑制器条件优化

流速考察0.8~1.2 mL/min,抑制器电流考察50~100 mA。流速1.0 mL/min时, NO_2^- 与 NO_3^- 峰形对称,柱压稳定在12 MPa以内;抑制器电流设为50 mA时,背景电导<5 $\mu\text{S}/\text{cm}$,目标离子响应值最高,且基线漂移<0.1 $\mu\text{S}/\text{cm}$,满足定量要求。因此,最终确定流速为1.0 mL/min,抑制器电流为50 mA。

3.2.3 柱温的优化

考察柱温30、35、40 $^{\circ}\text{C}$ 对保留时间与重现性的影响,随温度升高,保留时间略有所提前,但分离度变化不大;35 $^{\circ}\text{C}$ 时保留时间的 RSD <0.5%,基线稳定性最好,故选择柱温为35 $^{\circ}\text{C}$ 。

3.2.4 进样量的选择

由于样品中 NO_2^- 与 NO_3^- 多为痕量水平,对仪器灵敏度有较高要求。适当增加进样量虽可提升检测灵敏度,但进样量过大则易引发色谱柱过载,造成主成分峰、 Cl^- 峰等色谱峰展宽变形,进而干扰目标待测物的分离与准确定量。基于此,本研究考察了50、80、100、200 μL 4种不同进样量,从分离效果、峰形对称性、峰面积响应值及基线稳定性等维度进行综合评价。结果表明,当进样量为100 μL 时,色谱峰峰形规整、对称性良好,兼具较高的检测灵敏度,且基线平稳、噪音水平低,可兼顾检测灵敏度与分离效果的最优平衡。 NO_2^- 与 NO_3^- 的检出限均达到0.3 mg/kg,定量限为1.0 mg/kg,既能满足辅料与片剂中低含量离子的检测需求,又无过载现象,最终确定进样量为100 μL 。

3.3 小结

本研究以盐酸普萘洛尔片及其辅料为研究对象,建立了SPE-IC-CD法检测法测定盐酸普萘洛尔片剂及其辅料中痕量的 NO_2^- 与 NO_3^- ,采用SH- C_{18} 柱、SH-Ag柱去除药物主成分和 Cl^- ,效果较好,经方法学验证,该方法灵敏度高、专属性强、分离度好、前处理简单,可用于盐酸普萘洛尔片剂及其辅料中痕量 NO_2^- 与 NO_3^- 的检测;并通过统计学相关性分析以确定盐酸普萘洛尔片剂中的基因毒性杂质NPPN的产生与辅料中残留的 NO_2^- 与 NO_3^- 直接有关。该方法可为基因毒性杂质的质量控制体系完善与药品监管科学决策提供数据支

撑, 既助力制药企业优化产品质量内控流程、实现原辅料高效快速筛查与风险分级管控, 对完善同品种药品杂质控制体系、提升药品安全监管水平具有重要应用价值与研究意义。

参考文献

- 1 李昊, 齐前程, 张帅, 等. 亚硝胺类原料药相关杂质的控制策略分析[J]. 药学前沿, 2026, 30(6): 1047–1056. [Li H, Qi QC, Zhang S, et al. Analysis of control strategies for nitrosamine drug substance-related impurities[J]. Frontiers in Pharmaceutical Sciences, 2026, 30(6): 1047–1056.] DOI: 10.12173/j.issn.2097-4922.202602037.
- 2 ICH. ICH M7(R2). Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk[S/OL]. (2023–07–19) [2024–09–05]. https://consultations.tga.gov.au/tga/international-scientific-guidelines-r01-2023/user_uploads/ich-m7-r2-guideline-assessment-control-dna-reactive-mutagenic-impurities-in-pharmaceuticals-lim.pdf.
- 3 FDA. Control of nitrosamine impurities in human drugs[S/OL]. (2024–09–04). [2024–09–05]. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/control-nitrosamine-impurities-human-drugs>.
- 4 Horne S, Vera MD, Nagavelli LR, et al. Regulatory experiences with root causes and risk factors for nitrosamine impurities in pharmaceuticals[J]. J Pharm Sci, 2023, 112: 1166–1182. DOI: 10.1016/j.xphs.2022.12.015.
- 5 芦丽, 邵方娴, 许慧, 等. 基于国家药品抽检的盐酸普萘洛尔片质量评价[J]. 医药导报, 2025, 44(9): 1390–1400. [Lu L, Shao FX, Xu H, et al. Quality evaluation of propranolol hydrochloride tablets based on national drug sampling and testing[J]. Herald of Medicine, 2025, 44(9): 1390–1400.] DOI: 10.3870/j.issn.1004-0781.2025.09.004.
- 6 Rodriguez RL, Mcmanus JA, Murphy MA, et al. Pathways for *N*-nitroso compound formation: secondary amines and beyond[J]. Org Process Res Dev, 2020, 24(9): 1558–1585. DOI: 10.1021/acs.oprd.0c00323.
- 7 林丽华, 陈璟, 陈奕君, 等. 柳州预包装螺蛳粉理化检测分析与质量控制[J]. 食品安全导刊, 2024, (3): 49–52. [Lin LH, Chen J, Chen YJ, et al. Physical and chemical analysis and quality control of Liuzhou pre-packaged river snails rice noodles[J]. China Food Safety Magazine, 2024, (3): 49–52.] DOI: 10.16043/j.cnki.cfsyx.2024.03.014.
- 8 王瑞萍, 陈纠, 王致. 固相萃取–分光光度法测定人体尿液中亚硝酸盐的含量[J]. 中国无机分析化学, 2024, 14(7): 875–880. [Wang RP, Chen J, Wang Z. Determination of nitrite content in human urine by spectrophotometry with solid-phase extraction[J]. Chinese Journal of Inorganic Analytical Chemistry, 2024, 14(7): 875–880.] DOI: 10.3969/j.issn.2095-1035.2024.07.003.
- 9 胡子益, 郑冬云. 食品亚硝酸盐电化学传感器研发[J]. 传感器与微系统, 2025, 44(1): 80–82. [Hu ZY, Zheng DY. Research and development of electrochemical sensor for nitrite in food[J]. Transducer and Microsystem Technologies, 2025, 44(1): 80–82.] DOI: 10.13873/j.1000-9787(2025)01-0080-03.
- 10 杨彪. 基于荧光碳量子点的食品中亚硝酸盐即时检测方法研究[D]. 福建厦门: 集美大学, 2025. DOI: 10.27720/d.cnki.gjmdx.2025.000228.
- 11 张长贵, 郑耀伟, 潘婉舒, 等. 苦竹笋发酵工艺条件优化及成品挥发性成分分析[J]. 食品研究与开发, 2024, 45(4): 143–150. [Zhang CG, Zheng YW, Pan WS, et al. Fermentation condition optimization of *Pleuroblastus amarus* shoots and volatile components of finished products[J]. Food Research and Development, 2024, 45(4): 143–150.] DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.036412.
- 12 林仁权, 夏海鸣, 桑娴. 亚硝化衍生超高效液相色谱法测定酱腌菜中亚硝酸盐的含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(4): 279–283. [Lin RQ, Xia HM, Sang X. Determination of nitrite content in pickles by nitroso derivative ultra performance liquid chromatography[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(4): 279–283.] DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.2025.04.041.
- 13 朱林, 陈鑫茹, 施海蔚, 等. 药用辅料乳糖中痕量亚硝酸盐和硝酸盐的离子色谱–电导/紫外检测研究[J]. 药学与临床研究, 2024, 32(2): 115–121. [Zhu L, Chen XR, Shi HW, et al. Determination of trace nitrate and nitrite in pharmaceutical lactose by ion chromatography–conductivity/ultraviolet detections[J]. Pharmaceutical and Clinical Research, 2024, 32(2): 115–121.] DOI: 10.16155/j.0254-1793.2024-0483.
- 14 田冶, 冯媛媛, 陶晓莎, 等. 固相萃取–离子色谱法检测利福平及利福喷丁胶囊中亚硝酸根离子[J]. 中国新药杂志, 2023, 32(21): 2218–2224. [Tian Y, Feng YY, Tao XS, et al. Determination of nitrite ion in rifampicin and rifapentine capsules by solid phase extraction–ion chromatography[J]. Chinese Journal of New Drugs, 2023, 32(21): 2218–2224.] DOI: 10.3321/j.issn: 1003-3734. 2023.21.014.
- 15 FDA. Recommended acceptable intake limits for nitrosamine drug substance-related impurities (NDSRIs) [EB/OL]. (2024–12–19) [2025–01–10]. [https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/Updated Information | Recommended Acceptable Intake Limits for Nitrosamine Drug Substance-Related Impurities \(NDSRIs\)](https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/Updated Information | Recommended Acceptable Intake Limits for Nitrosamine Drug Substance-Related Impurities (NDSRIs)).
- 16 EMA. Acceptable intakes (AIs) established for *N*-nitrosamines. Appendix 1 to Q&A for marketing authorisation holders/applicants on the CHMP Opinion for the Article 5(3) of Regulation (EC) No 726/2004 referral on nitrosamine impurities in human medicinal products [S/OL]. (2024–01–13) [2025–01–10] https://www.ema.europa.eu/documents/other/appendix-1-acceptable-intakes-established-n-nitrosamines_en.pdf.
- 17 Padhye L, Wang P, Karanfil T, et al. Unexpected role of activated carbon in promoting transformation of secondary amines to *N*-nitrosamines[J]. Environ Sci Technol, 2010, 44(11): 4161–4168. DOI: 10.1021/es100371s.
- 18 Wu Y, Levons J, Narang AS. Reactive impurities in excipients: profiling, identification and mitigation of drug–excipient incompatibility[J]. AAPS Pharm Sci Tech, 2011, 12(4): 1248–1263. DOI: 10.1208/s12249-011-9693-1.

收稿日期: 2026 年 03 月 28 日 修回日期: 2026 年 07 月 16 日

本文编辑: 钟巧妮 洗静怡