

1-甲基-4-亚硝基哌嗪国家标准物质的研制及其核磁定量考察

关皓月, 冯玉飞, 孙百浩, 牛剑钊^{*}(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要: 目的 以1-甲基-4-亚硝基哌嗪为例, 介绍亚硝胺类化合物标准物质研制过程, 并讨论采用核磁定量方法分析时需注意的问题。方法 采用气质联用、红外光谱和核磁共振法对该原料进行结构确证, 定量考察方面进行 HPLC 纯度分析及水分测定; 采用质量平衡法计算 1-甲基-4-亚硝基哌嗪的含量, 同时辅以定量核磁共振法验证本批原料的含量。结果 本批 1-甲基-4-亚硝基哌嗪原料结构准确, 在定量核磁考察中发现采用不同内标物对核磁定值结果影响较大。结论 由于 1-甲基-4-亚硝基哌嗪本身具有碱性, 使得其在核磁定量分析中采用酸性内标物测定易降低含量数值, 因此提示对于该类样品在核磁定量过程中应选择适宜的内标物。

关键词: 国家标准物质; 1-甲基-4-亚硝基哌嗪; 质量平衡法

中图分类号: R914.4

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2023)24-3399-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20222551

引用本文: 关皓月, 冯玉飞, 孙百浩, 等. 1-甲基-4-亚硝基哌嗪国家标准物质的研制及其核磁定量考察[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(24): 3399-3403.

Establishment of National Reference Standard of 1-Methyl-4-nitrosopiperazine and Its Nuclear Magnetic Quantitative Investigation

GUAN Haoyue, FENG Yufei, SUN Baihao, NIU Jianzhao^{*}(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To introduce the developing procedure of reference standards of nitrosamines by taking 1-methyl-4-nitrosopiperazine(MNP) as example and discuss the problems needing attention when using nuclear magnetic resonance(NMR) quantitative method. **METHODS** The structure of the material was confirmed by mass spectrometry, infrared spectrum and nuclear magnetic methods. In terms of quantitative assessment, the purity of the material was analyzed by HPLC, and the water was investigated. The content of MNP was determined by mass balance method, the content of the material was verified by NMR quantitative method. **RESULTS** MNP was consistent with its structure. In the quantitative NMR investigation, it was found that the use of different internal standards had a great impact on the calibration results. **CONCLUSION** Since MNP is basic, it is easy to reduce the final determination result by using an acidic internal standard in NMR quantitative analysis. Therefore, it is suggested that an appropriate internal standard should be selected for this kind of sample in the process of NMR quantitative determination.

KEYWORDS: national reference standard; 1-methyl-4-nitrosopiperazine; mass balance method

1-甲基-4-亚硝基哌嗪属于亚硝胺类遗传毒性杂质^[1], 其化学结构见图 1。遗传毒性杂质主要来源于两方面, 一是通过合成过程引入的, 即合成的遗传毒性杂质; 二是由降解产生的物质, 即遗传毒性降解剂^[2]。1-甲基-4-亚硝基哌嗪生产工艺一般由 1-氨基-4-甲基哌嗪在合适的条件下生成, 而 1-氨基-4-甲基哌嗪是合成利福平的起始原料之一^[3], 因此, 利福平原料药中存在含有 1-甲基-4-亚硝基哌嗪的风险, 对于该杂质的控制当予以重视。目前, 对于亚硝胺类遗传毒性杂质有多篇文献报道^[4-12], FDA 公布了在利福平原料药中经 LC-ESI-HRMS 方法分离得到该杂质的方法^[3], 本研究参考上述文献方法, 对 1-甲基-4-亚硝基哌嗪进行 HPLC 纯度

考察。本研究以 1-甲基-4-亚硝基哌嗪为例, 介绍国家标准物质的研制过程, 同时由于 1-甲基-4-亚硝基哌嗪本身结构属于有机碱的特点, 在核磁定量分析时内标物质的不同选择会使其含量计算结果存在明显差异, 从而引发了一些对于国家标准物质定值研制的思考。

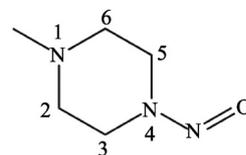


图 1 1-甲基-4-亚硝基哌嗪化学结构式

Fig. 1 Chemical structure formula of 1-methyl-4-nitrosopiperazine

作者简介: 关皓月, 女, 硕士, 副主任药师
njz@nifdc.org.cn

E-mail: guanhaoyue@nifdc.org.cn

*通信作者: 牛剑钊, 男, 硕士, 副主任药师

E-mail:

1 仪器与试剂

LC-20A 高效液相色谱仪(日本岛津); Spectrum Two 红外光谱仪、Avance Neo 600 MHz 核磁共振波谱仪(Bruker); Agilent 7890 5975 气质联用仪(美国 Agilent); XPE206DR 电子天平、SevenExcellence 酸度计均购自 Mettler 公司; 852 Titrand 水分测定仪(瑞士万通)等。

1-甲基-4-亚硝基哌嗪原料(杭州新博思科技股份有限公司, 批号: 20210323); 1-甲基-4-亚硝基哌嗪试剂(Cato 公司, 批号: 1119-RB-1010; 纯度: 96.3%); 甲醇(Merck, 批号: I1123007049); 甲酸铵(Sigma, 批号: MKCM5825); 氨水(国药集团化学试剂有限公司, 批号: 10002108); 溴化钾(Merck, 批号: B0800807227); 氘代二甲亚砜(DMSO-d₆, CIL 公司, 批号: PR-28072/07206DM1); 二甲亚砜(Sigma-Aldrich, 批号: 1002580098); 对苯二甲酸二甲酯(中国食品药品检定研究院, 批号: 510137-201601); 马来酸(Sigma-Aldrich, 批号: BCBV7235); 库伦法阳极液(Fluka, 批号: K2110)。

2 方法与结果

2.1 结构确认

2.1.1 GC-MS 分析 取样品适量, 用甲醇稀释制成约 0.01 mg·mL⁻¹ 的溶液即供试品溶液, 采用 GC-MS 对 1-甲基-4-亚硝基哌嗪进行质谱分析。

GC 条件: GsBP-5MS 毛细管柱 (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm), 进样口温度 250 °C, 氦气载气, 纯度 >99.999%, 程序升温 (100 °C 保持 5 min, 以 20 °C·min⁻¹ 升至 260 °C, 保持 2 min), 进样方式为不分流, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 进样量 1 μL。

MS 条件: 离子源温度 230 °C; 四级杆温度 150 °C; 检测器为 EI, 质量扫描范围 *m/z* 50~400。总离子流图及二级质谱图见图 2~3。谱图结果显示, 该化合物出现了 *m/z* 129[M]、*m/z* 99[M-30]、*m/z* 84[M-45]、*m/z* 70[M-30-29]、*m/z* 56[M-30-43] 的碎片离子峰^[13]。分子裂解过程见图 4。

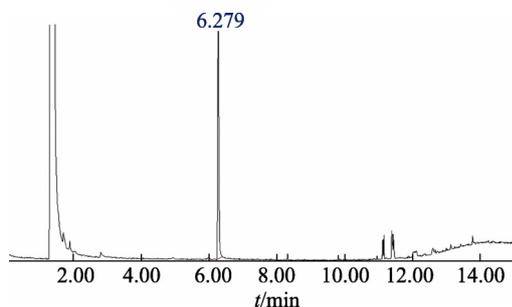


图 2 1-甲基-4-亚硝基哌嗪的总离子流图

Fig. 2 Total ion chromatography of 1-methyl-4-nitrosopiperazine

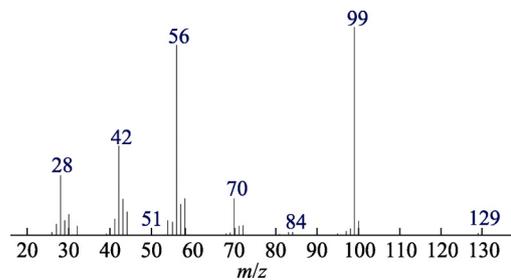


图 3 1-甲基-4-亚硝基哌嗪的二级碎片离子图

Fig. 3 Fragment ions chromatography of 1-methyl-4-nitrosopiperazine

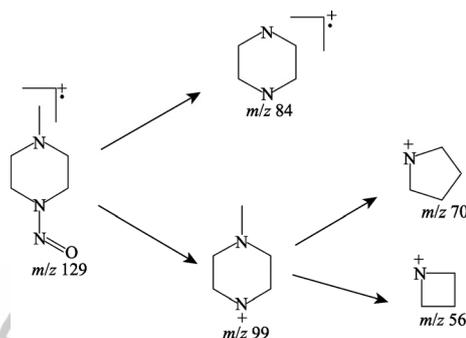


图 4 GC-MS 扫描裂解过程

Fig. 4 GC-MS scanning pyrolysis process

2.1.2 红外光谱 红外光谱显示, 1-甲基-4-亚硝基哌嗪在 2 944.45, 2 849.92 cm⁻¹ 处存在尖峰, 证明该化合物结构中存在甲基及亚甲基; 1 456.42 cm⁻¹ 处吸收峰推测为亚硝胺中 N=O 伸缩振动所产生; 1 432.42, 1 354.03 cm⁻¹ 处尖峰推测为亚硝胺中 C-N 伸缩振动特征吸收峰。上述推断与化合物结构基本吻合。红外扫描图谱见图 5。

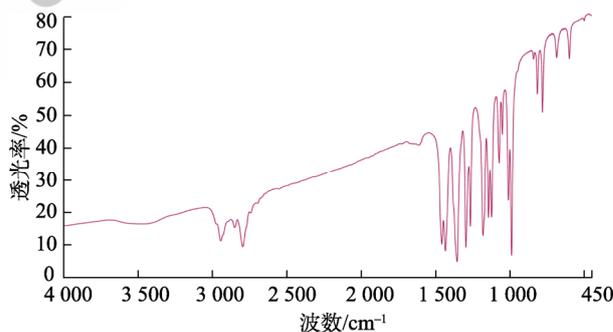


图 5 1-甲基-4-亚硝基哌嗪红外扫描图谱

Fig. 5 IR spectrum of 1-methyl-4-nitrosopiperazine

2.1.3 核磁共振 取 1-甲基-4-亚硝基哌嗪约 10 mg 置于石英核磁管中, 用 DMSO-d₆ 为溶剂, 分别扫描 ¹H-NMR、¹³C-NMR、¹H-¹H COSY、¹H-¹³C HMBC、¹H-¹⁵N HMBC、HSQC 谱。

¹H-NMR 谱中化学位移 2.24 的峰以强单峰的形式存在, 根据其结构可推断为甲基结构中的 H, 即

1 位 N 上的甲基 H, 受 N 原子电负性影响, 其化学位移向低场位移。其余 4 组信号峰均以 t 峰的形式存在, 是受其邻位亚甲基的影响。受 N-NO 基团的影响, 3, 5 位 H 的化学位移较 2, 6 位向低场位移, 受 N=O 基团的影响, 2, 3 位 H 处于屏蔽区, 因此其化学位移较 5, 6 位向高场位移。综上所述, 2, 3, 5, 6 位 H 的化学位移值大小关系应为 5>3>6>2。

基于 $^1\text{H-NMR}$ 谱结果, 结合 $^{13}\text{C-NMR}$ 、 $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$ 、 $^1\text{H-}^{13}\text{C HMBC}$ 、 $^1\text{H-}^{15}\text{N HMBC}$ 、HSQC 谱信息, 1-甲基-4-亚硝基哌嗪的核磁解析结果见表 1。

表 1 核磁解析结果

Tab. 1 Results of NMR analysis

峰位	氢谱位移	碳谱位移
6,5	2.53~2.52t; 4.19~4.17t	49.47; 55.17
3,2	3.73~3.71t; 2.29~2.27t	53.59; 45.66
1-CH	2.24 s	39.55

取上述 MNP 原料与外购对照品试剂适量, 用 DMSO-d₆ 溶解并进行 $^1\text{H-NMR}$ 谱比对, 2 个图谱一致, 证实供试品为 1-甲基-4-亚硝基哌嗪。核磁图谱见图 6。

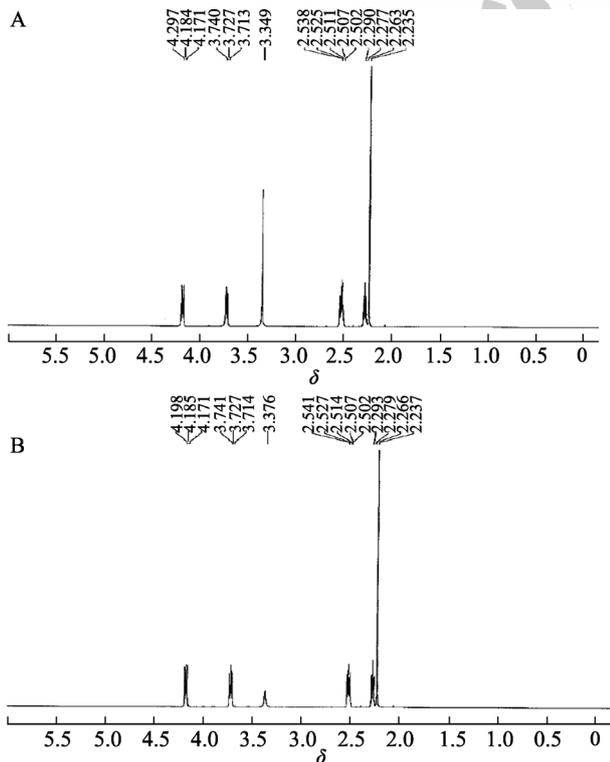


图 6 外购对照品与本批原料的核磁氢谱图谱

A-外购对照品; B-原料。

Fig. 6 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of external reference substance and raw materials

A-external reference substance; B-raw materials.

2.2 质量分析

2.2.1 HPLC 有关物质分析 为了确定 1-甲基-4-亚硝基哌嗪的纯度, 需要对其有关物质进行考察。首选 FDA 公布的在利福平中检测该物质的方法^[3]。溶液配制: 精密称取 1-甲基-4-亚硝基哌嗪适量, 用甲醇定量稀释成约 $0.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液, 作为供试品溶液。精密量取供试品溶液适量, 用甲醇定量稀释制成 $0.5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液, 作为 0.1% 的自身对照溶液。色谱条件: Gemini[®] C₆-Phenyl 110A (150 mm×4.6 mm, 3 μm) 色谱柱, 流动相为甲醇(B)-甲酸铵缓冲液(pH 9.0, A), 梯度洗脱(0~2 min, 60%A; 2~6 min, 60%→0%A; 6~9 min, 0%A; 9~9.1 min, 0%→60%A; 9.1~25 min, 60%A), 柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长为 235 nm, 流速为 $0.5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。各杂质在该色谱条件下分离良好, 杂质及供试品典型色谱图见图 7。

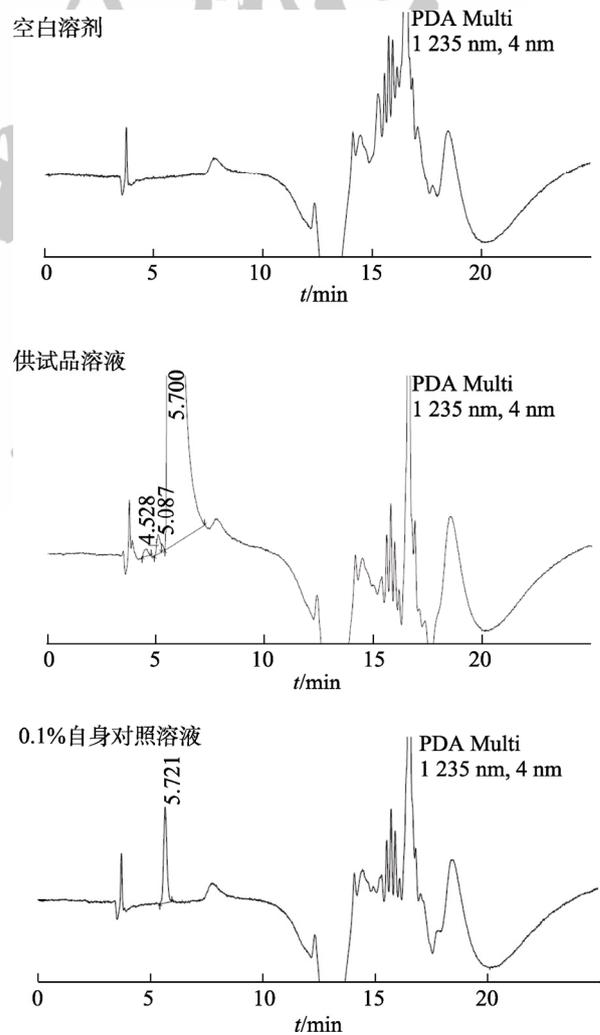


图 7 1-甲基-4-亚硝基哌嗪的高效液相色谱图

Fig. 7 HPLC chromatography of 1-methyl-4-nitrosopiperazine

以 0.1% 自身对照法测定 1-甲基-4-亚硝基哌嗪的纯度为 99.96%，面积归一化纯度约为 99.97%。对本品进行线性考察，线性范围为 0.18~0.90 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，回归方程为 $y=21\,788.9x-70.618\,2$ ， $r^2=0.999$ ，检出限为 0.03 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.2.2 水分 采用卡尔费休法对 1-甲基-4-亚硝基哌嗪的水分进行检测，水分测定结果为 0.61%。

2.2.3 含量计算 采用质量平衡法对 1-甲基-4-亚硝基哌嗪含量进行计算，本品含量=(100%-水分)×HPLC 纯度=(100%-0.61%)×99.96%=99.36%，修约为 99.4%。

2.2.4 核磁定量验证 采用核磁共振波谱法对 1-甲基-4-亚硝基哌嗪含量进行测定，以佐证 HPLC 质量平衡法测定结果。

本试验最初以马来酸为内标物对其含量进行检测。精密称定 1-甲基-4-亚硝基哌嗪样品与马来酸适量，加入 DMSO- d_6 1 mL，超声溶解，移取样品溶液 0.6 mL 置 5 mm 核磁管中进行检测。以样品化学位移 $\delta=2.73$ 的信号峰为定量峰，化学位移 $\delta=6.11$ 的信号峰为马来酸内标峰计算，按照下式计算供试品 1-甲基-4-亚硝基哌嗪含量为 96.92%，定量图谱见图 8。

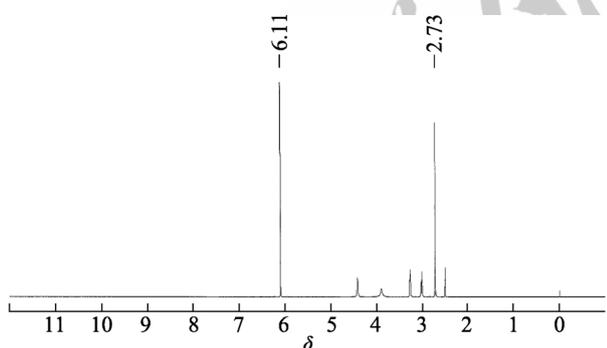


图 8 以马来酸为内标物的核磁定量图谱
Fig. 8 NMR quantitative spectrum with maleic acid as internal standard

$$C_2 = \frac{W_1 \times C_1 \times V_2 \times MW_2}{MW_1 \times V_1 \times W_2} \times 100\% \times f$$

其中：内标物称样量为 W_1 ，内标物纯度为 C_1 (99.8%)，内标物分子量为 MW_1 (168.19)，内标物峰积分面积为 V_1 ，供试品称样量为 W_2 ，供试品分子量为 MW_2 (460.5)，供试品峰积分面积为 V_2 ，供试品纯度为 C_2 ，质子比系数为 f 。

核磁定量结果与质量平衡法计算结果相差 2%，因此，为更准确地定值，考虑到本品为有机碱，用马来酸做内标可能会在溶液中与本品发生

反应而影响最终结果，因此，以对苯二甲酸二甲酯为内标物再次对 1-甲基-4-亚硝基哌嗪进行核磁定量。精密称取 1-甲基-4-亚硝基哌嗪及对苯二甲酸二甲酯适量，用 DMSO- d_6 溶解后转移至核磁管中进行检测。以样品化学位移 $\delta=4.26\sim 4.28$ 的信号峰为定量峰，化学位移 $\delta=8.10$ 的信号峰为对苯二甲酸二甲酯内标峰计算，根据上式计算供试品 1-甲基-4-亚硝基哌嗪含量为 98.67%，定量图谱见图 9。

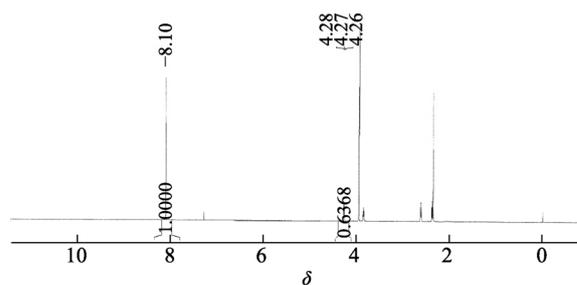


图 9 以对苯二甲酸二甲酯为内标物的核磁定量图谱
Fig. 9 NMR quantitative spectrum with dimethyl terephthalate as internal standard

采用不同的内标物质得到的核磁定量结果存在明显差异，结合 1-甲基-4-亚硝基哌嗪结构进行分析，该物质为有机碱，推测可能会与呈酸性的马来酸发生反应消耗了部分样品进而导致核磁定量结果不准确，结合质量平衡法测定结果，以对苯二甲酸二甲酯为内标物的测定结果更符合实际。

3 讨论

本实验对 1-甲基-4-亚硝基哌嗪的结构和纯度进行了分析，表明该原料结构准确。同时，参考 FDA 公布的亚硝胺检测方法对其进行纯度分析，采用质量平衡法计算本品含量。核磁共振定量分析法，由于其可定性鉴定和定量分析同步完成，并且不依赖于被测物的高纯标准品以及不受样品中杂质的影响，是质量平衡法的有力的定量分析验证工具，但在内标物的选择上应谨慎考量，内标物应能够产生单一易见的共振峰，并且与样品中任何组分不发生相互作用。本品作为有机碱类化合物，不应选择与其能产生反应的酸性内标物，避免验证数值不能真实反映质量。因此，作为国家标准物质的研制，建议根据化合物本身的性质选择最为准确的方法去考察及验证其真实含量水平。

REFERENCES

- [1] 化学药物中亚硝胺类杂质研究技术指导原则(试行)[EB/OL].

- (2020-05-08)[2022-05-25]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/ypggtg/ypqtggtg/20200508160101122.html>.
- [2] LIU M, XUE H X, LI X Y. Analysis and research flow of organic impurities in API[J]. J North Pharm(北方药学), 2013, 10(8): 13.
- [3] FDA. Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-ESI-HRMS) method for the determination of MNP in rifampin and CPNP in rifapentine drug substance and drug product[EB/OL]. (2020-09-02) [2022-05-25]. <https://www.fda.gov/media/142092/download>.
- [4] LIU B, ZHANG T, HUANG L, et al. Determination of 7 *N*-nitrosoamines in metformin hydrochloride sustained release tablets by LC-HRMS[J/OL]. Chin J Pharmacovigil(中国药物警戒), 2021, 18(5): 454-458, 468.
- [5] ZHANG Y C, LIU X Q. Determination of *N*-nitrosodimethylamine in ranitidine hydrochloride capsules by LC-MS/MS[J]. West China J Pharm Sci(华西药学杂志), 2021, 36(4): 463-465.
- [6] WANG L, LIU F. Content determination of *N*-nitrosodimethylamine and *N*-nitrosodiethylamine in levocloperastine fendizoate by GC-MS/MS[J]. China Pharm(中国药业), 2021, 30(15): 81-85.
- [7] SHAO W J, HE Y L, LI J L, et al. The residual research method of trace impurity NMBA in irbesartan and its compound preparation[J]. J Tradit Chin Vet Med(中兽医医药杂志), 2021, 40(1): 46-49.
- [8] YUAN S, FENG Y F, YU Y J, et al. Determination of seven *N*-nitrosamines genotoxic impurities in olmesartan medoxomil by UPLC-MS/MS[J]. Drug Eval Res(药物评价研究), 2021, 44(2): 356-361.
- [9] XU Y M, HAN B, YAN K, et al. Simultaneous detection of 3 *N*-nitrosamine genotoxic impurities in irbesartan[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2021, 41(4): 720-725.
- [10] TANG W B, CAI Q, LIU J, et al. Method for detecting impurities in synthesis of sartan drugs: CN112415107A[P]. 2021-02-26.
- [11] YUAN S, HUANG H W, YU Y J, et al. Determination of sixteen *N*-nitrosamine-type genotoxic impurities in telmisartan by UPLC-MS/MS[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2022, 31(5): 477-482.
- [12] TIAN Y, FENG Y Y, TAO X S, et al. Determination of nitrite ion in rifampicin and rifapentine capsules by solid phase extraction-ion chromatography[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2023, 32(21): 2218-2224.
- [13] HAN H. Determination of piperazinylolethylstrone by electron ionization mass spectrometry and fast-atom bombardment mass spectrometry[J]. J Chin Mass Spectrom Soc(质谱学报), 2006, 27(1): 30-32, 35.

收稿日期: 2022-07-19

(本文责编: 沈倩)