

西咪替丁中甲胺残留检查方法的建立

郭东宇*

(山西诺普生物医药科技股份有限公司, 大同 037000)

摘要:目的 建立西咪替丁原料药中甲胺残留的检查方法, 并进行方法适用性验证。**方法** 采用 2,4-二硝基氟苯衍生化后高效液相色谱法进行检测, 选用 WondaSil C18 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以 0.1% 磷酸溶液-甲醇 (35:65) 为流动相, 流速为 1.0 mL/min 进行洗脱; 检测波长为 380 nm。**结果** 衍生化反应彻底, 溶液稳定, 方法具有良好专属性, 质量浓度在 0.00752~0.15005 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好 ($r=0.9991$)。定量限浓度为 7.52 ng/mL, 检测限浓度为 2.51 ng/mL。方法回收率、重现性和精密度均符合要求。**结论** 本方法专属性强、精密度高、准确度高, 可用于西咪替丁原料药中甲胺的日常限度检查。

关键词: 西咪替丁; 甲胺限度; 柱前衍生; 方法适用性

0 引言

西咪替丁又称甲胍咪呱, 临床上广泛用于治疗胃酸分泌过多的疾病。西咪替丁上市后, 各国均有报道其不同工艺路线^[1-2], 大体可分为直线顺序法、会聚法、反向直线顺序法。其合成过程中均过量投入甲胺作为原料, 甲胺可经眼、皮肤和呼吸道等进入机体, 产生刺激作用, 对人体健康产生不利影响, 有必要对西咪替丁中的甲胺进行质量控制。西咪替丁注射液参比制剂说明书中用药最长周期为 1~4 个月, 根据国际人用药品注册技术协调会 (ICH)^[3] 中西咪替丁疗程在 1~12 个月, 甲胺 PDE 值均为 20 μg/d, 按照西咪替丁注射液日最大剂量 800 mg 计算, 甲胺在西咪替丁中限度应为 0.0025%。甲胺无紫外吸收, 常规气相色谱法 (GC) 无法达到检测灵敏度要求, 本研究参考赵伟淑等^[4]、张一平等^[5] 研究中胺类杂质柱前衍生化高效液相色谱 (HPLC) 法, 并参考段文胜等^[6-10] 的研究对方法进行了优化, 甲胺用 2,4-二硝基氟苯衍生后, 产物在紫外 380 nm 有最大吸收, 据此建立的用于测定西咪替丁原料药中甲胺含量的柱前衍生化 HPLC 法, 具有高灵敏度、操作简便的特点。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪 (U3000 型, 紫外-可见分光检测器, 美国 Thermo Scientific 公司); 十万分之一电子分析天平 (梅特勒-托利多公司); HH-4 型数显恒温水浴锅 (上海华

燕医疗器械有限公司)。

甲胺 (天津市大茂化学试剂厂, 批号为 20240401, 含量为 40%); 西咪替丁 (山西诺成制药有限公司, 批号为 X20210601、X20210701、X20210801); 2,4-二硝基氟苯 (东京化成工业株式会社); 甲醇为色谱纯; 磷酸、三乙胺为分析纯; 水为娃哈哈纯净水。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件

色谱柱: 选用 WondaSil C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱; 以 0.1% 磷酸溶液-甲醇 (35:65) 为流动相; 流速为 1.0 mL/min 进行洗脱; 柱温 30 °C; 检测波长为 380 nm; 进样体积 20 μL。

1.2.2 溶液制备

衍生溶液: 取 50 mL 容量瓶, 加入 2,4-二硝基氟苯 0.5 mL, 加甲醇定量稀释至刻度, 摇匀。临用前配制。

对照品溶液: 取 10 mL 容量瓶, 精密称定甲胺适量, 加甲醇适量使溶解并定量稀释制成 1.0 μg/mL 的甲胺对照品溶液。取 10 mL 容量瓶, 精密量取上述甲胺对照品溶液 1.0 mL, 加入 1 mL 衍生溶液、5 mL 甲醇和 0.1 mL 三乙胺, 摇匀, 于 50 °C 加热 20 min, 取出, 冷却至室温, 加甲醇定量稀释至刻度, 摇匀。

供试品溶液: 称取西咪替丁约 40 mg, 置 10 mL 容量瓶中, 加 5 mL 甲醇溶解, 加入 0.1 mL 三乙胺和 1 mL 衍生溶液, 摇匀, 于 50 °C 加热 20 min, 取出, 冷却至室温, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀。

* 通信作者: 郭东宇, 工程师, 副总经理, 研究方向为药品质量。E-mail: 83652565@qq.com

空白溶液：量取 5 mL 甲醇置 10 mL 容量瓶中，加入 0.1 mL 三乙胺和 1 mL 衍生溶液，摇匀，于 50 °C 加热 20 min，取出，自然冷却至室温 (25 °C)，用甲醇定量稀释至刻度，摇匀。

1.2.3 测定方法

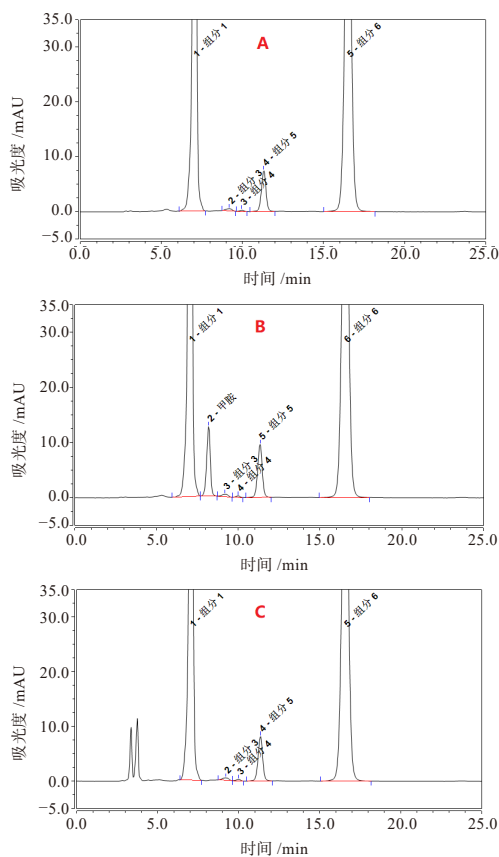
精密量取供试品溶液与对照品溶液各 20 μ L，分别注入高效液相色谱仪，记录色谱图至保留时间 25 min。按 1.2.1 节色谱条件进样测定，按外标法，以甲胺峰面积计算供试品溶液中甲胺的含量，含甲胺量不得过 0.0025%。

2 结果与分析

2.1 方法学考察

2.1.1 专属性

量取供试品溶液、空白溶液、对照品溶液各 20 μ L 进样，按 1.2.1 节色谱条件进样分析，色谱图见图 1。结果显示，甲胺衍生物峰形良好，该方法用于甲胺的测定不受空白溶液及供试品溶液中西咪替丁的干扰，方法专属性良好。



注：A—空白溶剂；B—对照品溶液；C—供试品溶液。

图 1 高效液相色谱图

2.1.2 检测限及定量限

精密称取甲胺适量，加甲醇适量使溶解并定量稀释制成一定浓度的溶液，按 1.2.2 节方法衍生化反应后，用甲醇逐级稀释后作为待测溶液，按拟定色谱条件进样测定，

检测限信噪比(S/N)约为 3，定量限信噪比(S/N)约为 10。测定结果显示该法检测限以甲胺计为 2.51 ng/mL，相当于供试品溶液浓度的 0.000063%；定量限为 7.52 ng/mL，相当于供试品溶液浓度的 0.00019%。

2.1.3 线性和范围

称取甲胺约 40 mg，置 20 mL 容量瓶中，加甲醇稀释至刻度，精密量 1 mL 置 20 mL 容量瓶中，加甲醇稀释刻度，精密量 1 mL 置 100 mL 容量瓶中，加甲醇稀释刻度，摇匀，再精密吸取 0.5、0.8、1.0、1.2、1.5 mL 置 5 个 10 mL 无色容量瓶中，分别加入 5 mL 甲醇、0.1 mL 三乙胺和 1 mL 衍生溶液，摇匀，于 50 °C 加热 20 min 取出，自然冷却至室温(约 25 °C)，用甲醇稀释至 10 mL，摇匀。精密量取 5 种不同浓度的甲胺对照品溶液及定量限浓度溶液各 20 μ L 注入液相色谱仪，以甲胺对照品溶液浓度为横坐标，以甲胺峰面积为纵坐标进行线性回归，甲胺对照品的线性回归方程为 $Y=6.0754X-0.0254$ 。结果表明，甲胺质量浓度在 0.00752~0.15005 μ g/mL 范围内与峰面积线性关系良好($r=0.9991$)。

2.1.4 精密度

量称甲胺适量，加甲醇定量稀释制成 0.1 μ g/mL，经衍生化后，按拟定的液相色谱条件连续进样 6 针。测定结果的相对标准偏差(RSD)为 0.63%($n=6$)，表明检测仪器精密度良好。

2.1.5 重现性

在可报告范围内，取同一浓度的加标后供试品，用至少 6 份溶液进行测定，按拟定色谱条件进样测定，记录甲胺峰面积；于不同工作日，同法配制按限度加标后同一浓度的供试品溶液 6 份，在不同的高效液相色谱仪上按拟定色谱条件进样测定，记录峰面积。结果 12 份按限度加标后供试品溶液中甲胺的含量的 RSD 为 1.32%($n=12$)，表明方法重现性良好。

2.1.6 溶液稳定性

按拟定方法分别配制供试品溶液和对照品溶液，在室温(25 °C)条件下分别放置 24 h，于 0、2、4、6、8、12、18、24 h 按拟定方法进样测定。结果显示，在室温(25 °C)条件下放置 24 h，供试品溶液和对照品溶液中的甲胺峰面积均无明显变化趋势，表明供试品溶液和对照品溶液室温条件下 24 h 内稳定性良好。

2.1.7 加样回收率

称取 9 份西咪替丁各约 40 mg，分别置 9 个 10 mL 容量瓶中，向其中 3 个容量瓶中分别加入 0.8 mL 对照贮备液，加 3 mL 甲醇、0.1 mL 三乙胺和 1 mL 衍生溶液，摇匀，分别于 50 °C 加热 20 min，取出冷却至室温，加甲醇稀释至刻度，摇匀，作为准确度 80% 溶液；向其中 3 个量瓶中分

别加入 1.0 mL 对照贮备液，加 3 mL 甲醇、0.1 mL 三乙胺和 1 mL 衍生溶液，摇匀，分别于 50 °C 加热 20 min，取出冷却至室温，加甲醇稀释至刻度，摇匀，作为准确度 100% 溶液；向其中 3 个容量瓶中分别加入 1.2 mL 对照贮备液，加 3 mL 甲醇、0.1 mL 三乙胺和 1 mL 衍生溶液，摇匀，分别于 50 °C 加热 20 min，取出冷却至室温，加甲醇稀释至刻度，摇匀，作为准确度 120% 溶液。精密量取 9 份不同浓度溶液各 20 μ L 进样，按外标法以峰面积计算，见表 1。回收率为 87.45%~110.65%，结果在 80%~120% 之间，RSD 为 9.83%($n=9$)，准确度符合方法学验证要求。

表 1 甲胺在西咪替丁中的回收率试验结果

加入量 / 底物量 / 加入量 / % μ g μ g	测得量 / μ g	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD/ %
80	0 0.80024	0.70279	87.82	9.83
	0 0.80024	0.71282	89.08	
	0 0.80024	0.69978	87.45	
100	0 1.00030	1.10363	110.33	
	0 1.00030	1.09472	109.44	
	0 1.00030	1.10679	110.65	
120	0 1.20036	1.24652	103.85	
	0 1.20036	1.23438	102.83	
	0 1.20036	1.26999	105.80	

2.1.8 方法耐用性

对拟定的色谱条件下进行微调：①更换另一品牌同填料的色谱柱；②流速变为 0.9 mL/min；③流速变为 1.1 mL/min；④柱温变为 25 °C；⑤柱温变为 35 °C；⑥流动相变为：0.1% 磷酸溶液 - 甲醇 (40 : 60)；⑦流动相变为：0.1% 磷酸溶液 - 甲醇 (30 : 70)；⑧磷酸溶液变为 0.08%；⑨磷酸溶液变为 0.12%。精密量取按限度加标后供试品溶液、对照品溶液、空白溶液，各进样 20 μ L，以峰面积按外标法计算甲胺含量。结果显示，对拟定色谱条件进行微调后，空白溶液及供试品溶液中西咪替丁对甲胺的测定无干扰，甲胺检测结果均基本一致，RSD 为 3.76% ($n=9$)，表明方法耐用性良好。

2.2 样品中甲胺测定

精密称取三批西咪替丁原料，制备供试品溶液，进样测定，记录色谱图至保留时间 25 min，按外标法以甲胺峰面积计算供试品中甲胺含量。三批西咪替丁原料均未检出有甲胺残留，说明在生产西咪替丁原料药时对过量投入的反应物料甲胺后处理完全。

3 讨论与结论

根据西咪替丁合成工艺路线分析，有甲胺残留的可能，甲胺为基因毒性杂质，其含量的多少将严重影响药品的质量与安全性，经检索目前可采用气相色谱法、离子色谱法对甲胺进行检测。甲胺在气相色谱中出峰较早，拖尾

严重，响应低，在气相色谱中不能完全准确定量样品中甲胺的含量，且甲胺在本品中限度较低 (25×10^{-6})，气相色谱法不能满足甲胺的检测要求。离子色谱法需要专用仪器与色谱柱，成本高，一般实验室未配置。

本研究建立了一种能在常规实验室内有效检测西咪替丁中甲胺的方法。研究结果显示，甲胺与 2,4-二硝基氟苯能迅速温和地发生化学反应，产物质量稳定，且有较强的紫外吸收，衍生化试剂和副产物对检测无干扰。西咪替丁合成过程中虽然加入过量的反应物甲胺，但生产工艺中经过合理的后处理，可使甲胺残留量降至临床用药安全限以下。该方法能准确地测定西咪替丁残留甲胺的含量，方法简便，灵敏度高，重复性好，可用于西咪替丁的质量控制；且该检测方法仅需采用高效液相色谱仪即可进行，无需采用更高精度分析仪器，降低了分析成本，为临床上使用西咪替丁进一步提供了安全保障。

参考文献

- [1] Smith Kline and French Laboratories Ltd. Ureas Thioureas and Guanidines: GB1338169 [P]. 1973-11-21.
- [2] 刘毅, 凌仰之. 西咪替丁的合成工艺 [J]. 医药工业, 1988, 19(4): 187-190.
- [3] 人用药品注册技术要求国际协调会 (ICH). 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 [EB/OL]. (2017-03-31)[2025-03-05]. http://www.gcpunion.org/web/static/articles/catalog_ff8080815702574c01570866f936002a/article_5b6a85126817a7bc0168eee8b18c0238/5b6a85126817a7bc0168eee8b18e0240.pdf.
- [4] 赵伟淑, 杨茂, 屈晓霞, 等. 一种利伐沙班中甲胺的检测方法: CN110824051A [P]. 2025-03-24.
- [5] 张一平, 张倩, 王一然, 等. 柱前衍生化反相高效液相色谱法测定盐酸二甲双胍缓释片中二甲胺含量 [J]. 中国医药, 2020, 29(21): 44-48
- [6] 段文胜, 刘溢红. 高效液相色谱法同时测定废水中的二甲基甲酰胺和甲胺 [J]. 辽宁化工, 2022, 51(8): 1181-1184.
- [7] 杨婊舒, 金昊坤, 舒耀皋. 邻苯二甲醛/巯基乙醇柱前衍生-高效液相色谱法测定水中 3 种氟乙胺类化合物的含量 [J]. 理化检验-化学分册, 2022, 58(11): 1338-1341.
- [8] 尚颖颖, 杨玲娟. 2,4-二硝基氟苯柱前衍生测定植物样中的甲硫氨酸 [J]. 福建分析测试, 2023, 32(2): 5-10.
- [9] 张新月, 李玖江, 李玥, 等. 柱前衍生-高效液相色谱法检测魔芋飞粉中的神经酰胺 [J]. 分析科学学报, 2024, 40(3): 309-314.
- [10] 徐广见, 徐纪文, 罗素芳. 柱前衍生化-HPLC 法测定牛磺熊去氧胆酸中牛磺酸的残留量 [J]. 应用技术学报, 2024, 24(3): 311-315.