GC-MS 法测定酮咯酸氨丁三醇中的 *N*- 亚硝基吡咯烷、*N*- 亚硝基吗啉和呋喃

卢红华，魏瑞霞，郝贵周，孙建合，张贵民*

（鲁南制药集团股份有限公司，国家手性制药工程技术研究中心，山东临沂 273400）

摘要：建立了气相色谱 - 质谱（GC-MS）法测定酮咯酸氨丁三醇（**1**）中基因毒性杂质 *N*- 亚硝基吡咯烷（**2**）、*N*- 亚硝基吗啉（**3**）和呋喃（**4**）的含量。采用 ZB-1MS 毛细管柱（30 m×0.25 mm×0.25 μm），以多反应离子监测模式进行测定。结果显示，**2**、**3**、**4** 分别在 33.48 ～ 100.44、4.96 ～ 14.88、19.28 ～ 57.84 ng/ml 内线性关系良好；定量限分别为 25.11、3.72、14.46 ng/ml，检测限分别为 8.54、1.26、4.92 ng/ml；平均回收率（*n*=9）分别为 96.98%、98.17%、98.50%，RSD 分别为 5.42%、4.30%、1.93%。本研究可为 **1** 的质量控制研究提供参考。

关键词：气相色谱 - 质谱；酮咯酸氨丁三醇；基因毒性杂质；*N*- 亚硝基吡咯烷；*N*- 亚硝基吗啉；呋喃

中图分类号：R917　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1001-8255（2022）03-0384-04

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.03.016

Determination of *N*-Nitrosopyrrolidine, *N*-Nitrosomorpholine and Oxole in Ketorolac Tromethamine by GC-MS

LU Honghua, WEI Ruixia, HAO Guizhou, SUN Jianhe, ZHANG Guimin*

(*National Chiral Pharmaceutical Engineering and Technology Research Center, Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi 273400*)

ABSTRACT: A gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method was established for the determination of genotoxic impurities, *N*-nitrosopyrrolidine (**2**), *N*-nitrosomorpholine (**3**) and oxole (**4**), in ketorolac tromethamine (**1**). A ZB-1MS capillary column (30 m×0.25 mm×0.25 μm) was used for the determination in multiple reaction monitoring mode. The results showed that it was linear for **2**, **3** and **4** in the ranges of 33.48 − 100.44, 4.96 − 14.88 and 19.28 − 57.84 ng/ml, respectively. The limits of quantification were 25.11, 3.72, and 14.46 ng/ml, and the limits of detection were 8.54, 1.26, and 4.92 ng/ml, respectively. The average recoveries (*n*=9) were 96.98%, 98.17%, and 98.50%, with the RSDs of 5.42%, 4.30%, and 1.93%, respectively. This study can provide a reference for the quality control of **1**.

Key Words: GC-MS; ketorolac tromethamine; genotoxic impurity; *N*-nitrosopyrrolidine; *N*-nitrosomorpholine; oxole

酮咯酸氨丁三醇（ketorolac tromethamine，**1**）是一种非甾体抗炎药，用于减轻多种术后疼痛[1]。目前 **1** 的合成工艺主要为吡咯法和 3- 酮基 -1,5- 戊二酸二甲酯法，其中吡咯法工艺中采用吡咯和吗啉[2—3]，同时，**1** 的起始物料氨丁三醇的合成工艺中会采用硝基甲烷，可能会与吡咯、吗啉分别反应产生 *N*- 亚硝基吡咯烷（*N*-nitrosopyrrolidine，**2**）和 *N*- 亚硝基吗啉（*N*-nitrosomorpholine，**3**），二者均为具有遗传毒性结构的 *N*- 亚硝基取代物[4]。此外，吡咯的一种合成工艺中以呋喃（oxole，**4**）为起始物料[5]，且 **4** 已在世界卫生组织国际癌症研究机构（International Agency for Research on Cancer，IARC）致癌物清单中被列为 2B 类致癌物，并已证实具有生殖毒性[6]。**2**、**3**、**4** 的半数中毒剂量（TD_{50}）分别为每天 0.679、0.109、0.396 mg/kg，根据人用药品技术要求国际协调理事会（The International

收稿日期：2021-03-05

作者简介：卢红华（1986—），女，硕士，从事药物质量分析研究。

通信作者：张贵民（1969—），男，研究员，从事新药的研究与开发。

E-mail：Lunanzhangguimin@163.com

Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use，ICH）M7 指南规定，按线性外推法计算得 **2**、**3**、**4** 的限度分别为 1.7×10^{-5}、7.7×10^{-6}、9.9×10^{-6}[7]。

本研究建立了气相色谱 - 质谱（GC-MS）法检测 **1** 中 **2**、**3**、**4** 的含量，由于 **2** 和 **3** 的结构相似、沸点相近，在全扫描（SCAN）模式条件下会合并为一个峰，因此本研究采用多反应监测（MRM）模式对两组分不同的离子片段进行监测，以期为 **1** 的质量控制研究提供参考。

1 仪器与试药

7890B-7000D 型气相色谱 - 质谱仪（美国 Agilent 公司）；MS205DU 型电子分析天平（瑞士 Mettler 公司）。

1（山东新时代药业有限公司，含量≥ 98.5%，批号 191201、191202、191203）；**2** 对照品［阿拉丁试剂（上海）有限公司，含量 99.0%，批号 A2006053］；**3** 对照品（东京化成工业株式会社，含量 99.0%，批号 MBSPF）；**4** 对照品（北京伊诺凯科技有限公司，含量 99.5%，批号 KCDLQ26）；*N*,*N*-二甲基甲酰胺（DMF，德国 Merck 公司，含量 99.9%，批号 K49395002739）；其他试剂均为分析纯，水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 溶液配制

空白溶剂：DMF。

对照品贮备液：取 **2**、**3**、**4** 对照品各约 75.0、12.5、47.5 mg，置同一 10 ml 量瓶中，用 DMF 溶解并定容，摇匀，即得对照品贮备液。

对照品溶液：取上述对照品贮备液适量，稀释制成每 1 ml 中约含 **2**、**3**、**4** 分别为 75.0、12.5、47.5 ng 的混合溶液。

供试品溶液：精密称取 **1** 50 mg，置 10 ml 量瓶中，用 DMF 溶解并定容，摇匀后即得。

线性系列标准溶液：取上述对照品贮备液定量稀释制成每 1 ml 中约含 **2**、**3**、**4** 分别为 750、125、475 ng 的混合溶液，作为线性贮备液；精密量取线性贮备液 0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 ml，分别置 10 ml 量瓶中，用 DMF 定容，摇匀，即得线性系列标准溶液。

回收率试验溶液：精密称取 **1** 50 mg，共 3 份，各置 10 ml 量瓶中，分别加入线性贮备液 0.8、1.0、1.2 ml，用 DMF 溶解并定容，摇匀，每个浓度制备 3 份，作为 80%～ 120%回收率试验溶液。

2.2 色谱及质谱条件

色谱条件：色谱柱 ZB-1MS 毛细管柱（30 m×0.25 mm×0.25 μm），以 100%二甲基聚硅氧烷为固定液；柱温 初始柱温 40 ℃，保持 2 min 后，以 10 ℃ /min 升温至 100 ℃，再以 30 ℃ /min 升温至 280 ℃保持 6 min；进样口温度 250 ℃；载气 氦气；流速 1.0 ml/min；分流比 10 ∶ 1；进样量 1 μl。

质谱条件：电子轰击（EI）离子源，SCAN 模式，MRM 模式；离子源电压 －70 eV；离子源温度 230 ℃；传输线温度 250 ℃；监测离子对 *m*/*z* 100.0→55.0、*m*/*z* 100.0→41.1（**2**）；*m*/*z* 116.0→56.0、116.0→86.1（**3**）；*m*/*z* 68.0→39.1、*m*/*z* 68.0→39.9（**4**）。

2.3 专属性试验

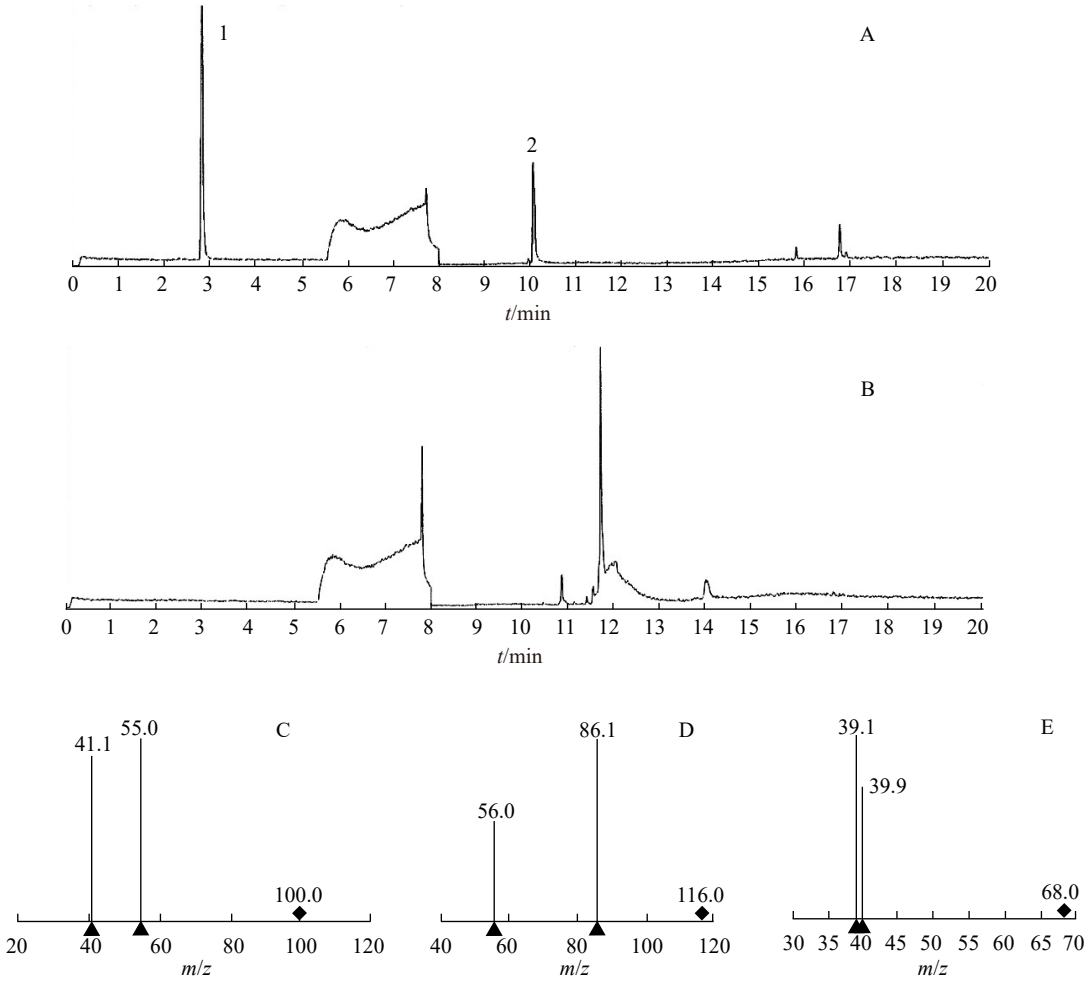
取“**2.1**”项下对照品溶液和供试品溶液，采用 SCAN 模式，按“**2.2**”项下色谱质谱条件进样测定，记录色谱图。结果见图 1，**2**、**3** 与 **4** 的保留时间分别为 10.08、10.11、2.82 min，且空白溶剂对待测组分无干扰。

2.4 线性试验

取“**2.1**”项下线性系列标准溶液，按“**2.2**”项下色谱质谱条件进样测定，记录色谱图。以各组分的质量浓度 *c* 为横坐标、峰面积 *A* 为纵坐标进行线性回归。结果显示，**2**、**3**、**4** 的回归方程分别为：A=9.33c+117.86，r=0.993 4；A=22.52c－67.83，r=0.994 5；A=44.44c+281.27，r=0.997 1；结果表明，**2**、**3**、**4** 分别在 33.48 ～ 100.44、4.96 ～ 14.88、19.28 ～ 57.84 ng/ml 内线性关系良好。

2.5 回收率试验

取“**2.1**”项下回收率试验溶液（**1** 批号 191201）、对照品溶液与供试品溶液（**1** 批号 191201），按“**2.2**”项下色谱质谱条件进样测定，记录各组分的峰面积。结果显示，**2**、**3**、**4** 的平均回收率（n=9）分别为 96.98%、98.17%、98.50%；RSD 分别为 5.42%、4.30%、1.93%，方法准确度高。



A：对照品溶液的色谱图，B：供试品溶液（批号 191201）的色谱图，C：**2** 的质谱图，D：**3** 的质谱图，E：**4** 的质谱图

1－**4**；2－**2** 和 **3**

图 1　典型色谱图和质谱图

Fig.1　Typical Chromatograms and Spectra

2.6　定量限与检测限

取对照品溶液逐级稀释，分别以信噪比 *S*/*N* 为 10 和 3 时的溶液作为定量限溶液与检测限溶液，按“**2.2**”项下色谱质谱条件进样测定，重复测定 6 次。结果显示 **2** ～ **4** 峰面积的 RSD（*n*=6）分别为 5.57%、5.95%、1.70%，定量限分别为 25.11、3.72、14.46 ng/ml，检测限分别为 8.54、1.26、4.92 ng/ml，表明本法灵敏度高。

2.7　稳定性试验

取“**2.1**”项下对照品溶液与供试品溶液（**1** 批号 191201），分别于室温放置 0、2、4、6、8、10、12 h 时，按“**2.2**”项下色谱质谱条件进样测定。结果显示，12 h 内 **2**、**3**、**4** 峰面积的 RSD（*n*=6）均小于 10%，保留时间的 RSD（*n*=6）均小于 2%，表明对照品溶液与供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.8　样品测定

取 3 批 **1**，按“**2.1**”项下方法配制供试品溶液，按“**2.2**”项下色谱质谱条件进样测定，按外标法以峰面积计算。结果显示，3 批样品中均未检出 **2**、**3**、**4**。

3　小结

本研究建立了 GC-MS 法同时测定 **1** 中 **2**、**3**、**4** 的含量，采用 SCAN 模式对本法的专属性进行了

验证，结果表明空白溶剂对 **2**、**3**、**4** 的测定无干扰。虽然 **2**、**3** 在 SCAN 模式下，保留时间接近，但因监测离子不同，于 MRM 模式下互不干扰测定。采用 MRM 模式对本法的线性浓度范围、精密度、回收率、定量限与检测限、溶液稳定性进行了验证，结果显示，本法的准确性好、灵敏度高，溶液稳定性好，可用于 **1** 中 **2**、**3**、**4** 的检测。此外，本研究中待检成分并非 **1** 降解产生，且气质联用法检查中只提取待检成分的离子片段，因此 **1** 降解与否对待测成分的测定没有影响。

参考文献：

[1] GILLIS J C, BROGDEN R N. Ketorolac. A reappraisal of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in pain management [J]. *Drugs*, 1997, **53**(1): 139-188.

[2] 徐蓉生, 段 云, 梅 艳, 等. 酮咯酸氨丁三醇的合成工艺优化[J]. 中国医药工业杂志, 2019, **50**(8): 868-870.

[3] GILLIS J C, BROGDEN R N. Ketorolac [J]. *Drugs*, 1990, **39**(1): 86-109.

[4] BENIGNI R, BOSSA C. Structure alerts for carcinogenicity and the *Salmonella* assay system: anovel insight through the chemical relational databases technology [J]. *Mutat Res*, 2008, **659**(3): 248-261.

[5] 娄智慧, 贾梦秋, 薛传薪. 由呋喃制备吡咯的催化剂研究[J]. 北京化工大学学报, 2002, **29**(4): 36-39.

[6] REHMAN H, JAHAN S, ULLAH I, *et al*. Toxicological effects of furan on the reproductive system of male rats: an "*in vitro*" and "*in vivo*"-based endocrinological and spermatogonial study [J]. *Chemosphere*, 2019, **230**: 327-336.

[7] ICH. Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk [EB/OL]. [2020-03-01]. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use_en-0.pdf.