NNK 遗传毒性杂质及其异构体检测方法的探索性研究

关皓月，刘 年，许 凯，牛剑钊*，杨 锐*
（中国食品药品检定研究院，北京 100050）

摘要：亚硝胺类化合物由于其结构上存在 N-N=O 键，容易发生异构化现象。本研究在采用 HPLC 法对 4-（甲基亚硝胺基）-1-（3-吡啶基）-1- 丁酮（NNK）进行分析时，观察到双色谱峰现象。并采用 PFP 色谱柱对 NNK 及其异构体进行有效分离，采用 LC/MS 二级质谱扫描确认了色谱图中 2 个色谱峰的分子、离子以及碎片离子均相同。同时采用 NMR 法对一级和二级核磁信号进行结构归属，进一步确证 NNK 中的杂质峰均属于同分异构体。此外，通过变温试验，采用 NMR 法测定了 NNK 的异构化比例范围；通过 HPLC 的变温试验，确证了 NMR 的结果。本研究通过多角度试验方法验证 NNK 存在互变异构体的现象，有利于 NNK 含量的准确分析，同时为该类异构化遗传毒性杂质的检测提供了理论依据。

关键词：4-（甲基亚硝胺基）-1-（3- 吡啶基）-1- 丁酮（NNK）；异构体；核磁定量；LC-MS；变温试验
中图分类号：R917 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255(2023)12-1753-08
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.12.010

Exploratory Study on Detection Methods of NNK Genotoxic Impurity and Its Isomers

GUAN Haoyue, LIU Nian, XU Kai, NIU Jianzhao*, YANG Rui*
(*National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050*)

ABSTRACT: Nitrosamine compounds, due to the N-N=O bonds in their structure, can easily cause isomerization. When an HPLC method was used to analyze 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone(NNK), double peaks were observed. NNK and its isomers were effectively separated by PFP chromatographic column. Then a LC/MS method was used to investigate the secondary fragment ions of the two separated sample peaks. NMR investigation further confirmed that the impurity peaks in NNK belonged to its isomer, and the isomerization ratio range of NNK was determined by NMR quantitative method through variable temperature experiment. And the NMR results were confirmed through the temperature change test of HPLC. This study verified structure of the isomer through a variety of methods, which was conducive to the accurate analysis of NNK content and provided a theoretical basis for the detection of genotoxic impurities.

Key Words: 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone(NNK); isomer; nuclear magnetic quantification; LC-MS; variable temperature experiment

4-（甲基亚硝胺基）-1-（3- 吡啶基）-1- 丁酮（NNK，其化学结构如图 1 所示）属于烟草中需要严格控制的 *N*- 亚硝胺杂质（tobacco-specific *N*-nitrosamines，TSNAs）[1]，是已知的 7 种 TSNAs 中最强的致癌源以及卷烟致癌的主要标志物，可诱发小鼠、大鼠及叙利亚金田鼠肺癌 [2]。NNK 在细胞色素 P450 的催化下，可以进行 α- 碳羟基化和吡啶环的 *N*- 氧化转化，这 2 种途径都会产生一系列 DNA 损伤，从而导致该化合物具有强烈的致突变性和毒性 [3—5]。世界卫生组织国际癌症研究机构亦将 NNK 列为 1 类致癌物 [6]，强烈提示其对人体有明显的致癌作用。

收稿日期：2022-12-16
基金项目：国家“重大新药创制”科技重大专项基金资助项目（2017ZX09101001）
作者简介：关皓月（1983—），女，副主任药师，从事仿制药研究。
通信作者：牛剑钊（1978—），男，副主任药师，从事仿制药研究。
E-mail：njz@nifdc.org.cn
杨 锐（1978—），男，研究员，从事药用辅料研究。
E-mail：yangrui@nifdc.org.cn

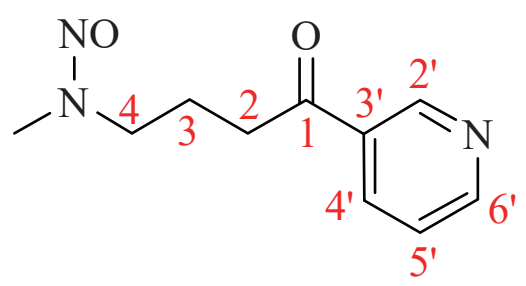


图 1　NNK 的化学结构

Fig.1　Chemical Structure of NNK

NNK 的检测方法主要为气相色谱 - 热能检测（GC-TEA）法、气相色谱 - 氮磷检测（GC-NPD）法、气相色谱 - 质谱联用（GC-MS）法及液相色谱 - 串联质谱联用（LC-MS/MS）法和红外法等 [1,7—13]。目前，NNK 的检测方法以质谱法为主。对于 NNK 的异构化现象，CHRISTER 等 [14] 认为是由 NNK 质子化后形成的；DENG 等 [15] 从 *N*- 亚硝胺类化合物中 N-N=O 键的性质出发，认为是该部分结构具备某些双键的性质，单键（N-N）旋转受阻，造成各向异性效应的强烈变化所致。本课题组在前期核磁共振波谱分析 [16] 中已推断 NNK 存在异构化现象，但尚未提及其他分析方法检测异构化现象的相关报道，NNK 的 2 种构象具有与双键 *E*/*Z* 相似的特征（图 2）。

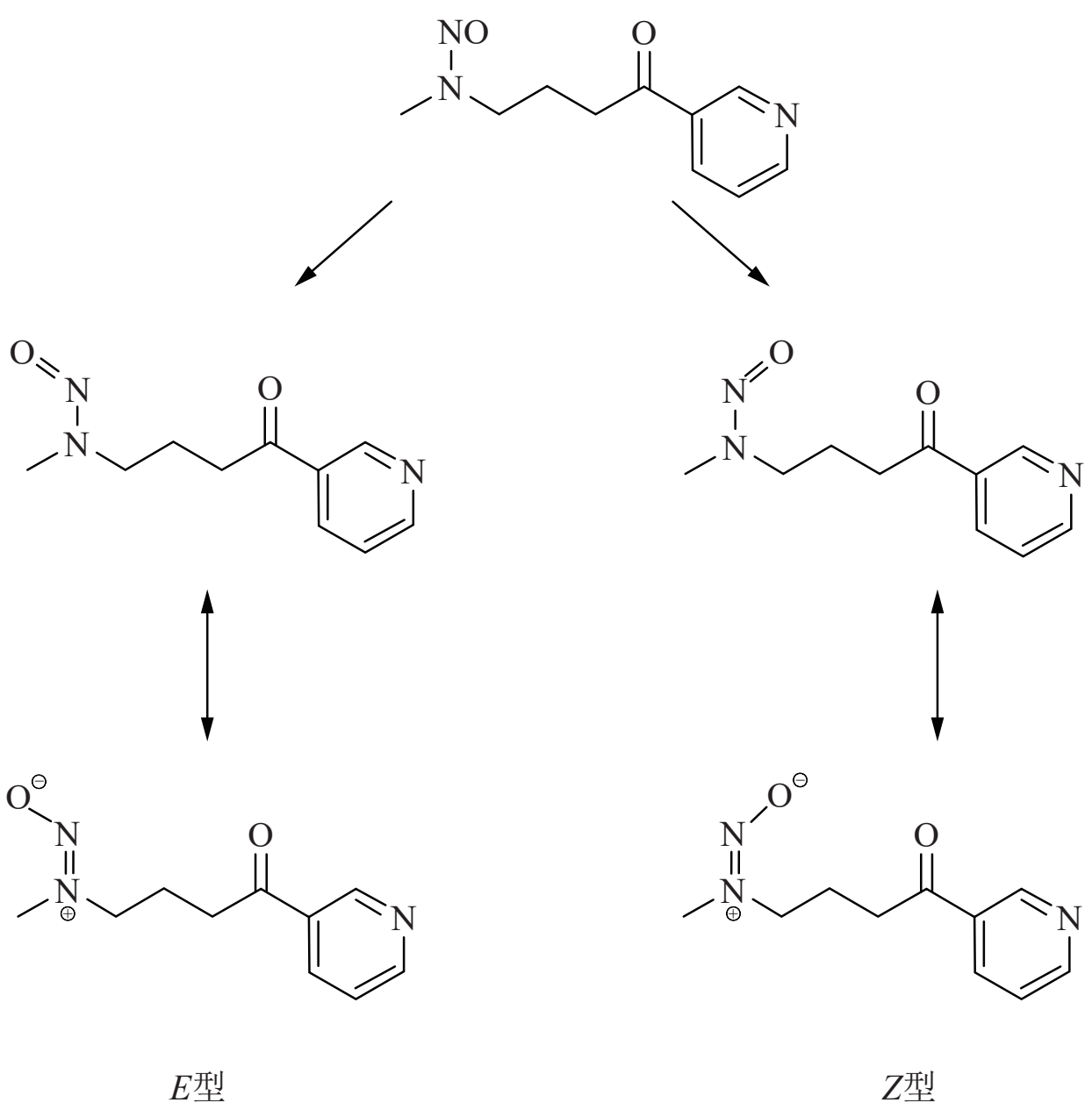


图 2　NNK 可能存在的 *E*/*Z* 构型

Fig.2　Possible *E*/*Z* Configurations of NNK

本研究在原有核磁共振波谱法对亚硝胺异构化研究 [16] 的基础上，采用 HPLC、LC/MS 以及 HPLC 变温试验，从多角度分析、考察 NNK 的异构化现象和 *E*/*Z* 比例，以期为 NNK 及其异构体的准确计算提供参考依据，并为亚硝胺化合物的异构化研究提供一种分析思路。

1　仪器与试药

LC-20A 型高效液相色谱仪（日本岛津仪器有限公司）；UltiMate 3000 型高效液相色谱仪（美国赛默飞世尔科技公司）；UPLC-Xevo-G2-XS-QTOF 型液质联用仪（美国 Waters 公司）；AVANCE Ⅲ HD 400 型核磁共振波谱仪（德国 Bruker 公司）；XPE206DR 型电子天平（瑞士梅特勒 - 托利多仪器有限公司）。

NNK（广州隽沐生物科技股份有限公司，含量 99.0%，批号 DW21090281）；氘代二甲基亚砜（DMSO-d_6，美国 CIL 公司，批号 PR-31974/0805D）；甲醇和乙腈为色谱纯，乙酸为分析纯，水为纯化水。

2　方法与结果

2.1　HPLC 分析

首先采用 HPLC 法对 NNK 进行考察，实现主成分和异构体的分离。参考美国 FDA 于 2017 年发布的《在烟草中检测 NNK 的 HPLC-MS/MS 法》[17]，采用 LC-20A 型高效液相色谱仪，五氟苯基色谱柱对目标物进行考察，具体色谱条件如下。

色谱条件：色谱柱 Phenomenex Luna® PFP 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相 0.1% 乙酸水溶液和甲醇（体积比 70 ∶ 30）混合液，等度洗脱；检测波长 230 nm；流速 1.0 mL/min；柱温 30 ℃，进样量 10 μL。

取 NNK 适量，精密称定，用乙腈溶解，配制成质量浓度约为 0.8 mg/mL 的溶液，按上述方法进行检测。结果如图 3（图中 2 个峰尚不能确定构型）所示，2 个成分能够达到基线分离，上文提及由于 *N*- 亚硝基类化合物两性离子的共振作用 [18]，NNK 可能有（*E*）-NNK 和（*Z*）-NNK 2 种形式。

2.2　LC/MS 分析

参考烟草科学研究合作中心推荐的方法 [19]，采用 LC-MS/MS 法对 NNK 进行检测，具体色谱和

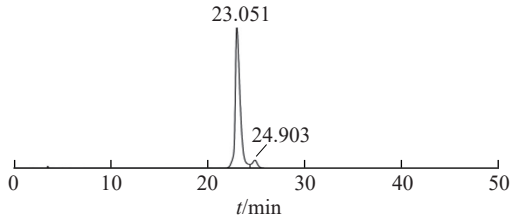


图 3 NNK 的典型色谱图

Fig.3 Typical Chromatogram of NNK

质谱条件如下。

色谱条件：色谱柱 Phenomenex Luna® PFP 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相 0.1%乙酸水溶液和甲醇（体积比 70 ∶ 30）混合液，等度洗脱；检测波长 230 nm；流速 0.2 mL/min；柱温 30 ℃，进样量 10 μL。

质谱条件：离子源 电喷雾离子源（ESI^+）；载气温度 300 ℃；载气流速 5 L/min；雾化气压力 241 kPa；毛细管电压 4 000 V(pos)、3 500 V(neg)；鞘气温度 250 ℃；鞘气流速 11 L/min；母离子 208；提取锥电压 110 V；碰撞能量 8.0 eV。

取 NNK 适量，精密称定，用乙腈溶解，配制成质量浓度约为 0.01 mg/mL 的溶液，按上述方法进行 LC-MS/MS 考察。

使用与“**2.1**”项下相同的色谱柱进行 LC/MS 分析，总离子流（TIC）色谱图如图 4（图中 2 个峰尚不能确定构型）所示，其中的色谱峰同图 3 相似，均出现 2 个峰。

对图 4 中的 2 个目标峰进行二级碎片离子解析，结果如图 5 所示。通过比较图 5 中 2 个色谱峰的二级碎片离子信息，可见其碎片离子一致。进一步对图 5 中的二级碎片离子进行解析，已知 NNK 的相对分子质量为 207，在 ESI^+ 模式下，图中 *m*/*z* 208 是 $[M+H]^+$ 峰，*m*/*z* 176.9 应当是—NO 断裂后形成的碎片离子峰，*m*/*z* 147.9 应当是—NCH_3 断裂后形成的碎片离子峰，与 NNK 结构相符，推测图 4 中 2 个峰所代表的物质为同分异构体。

2.3 核磁共振扫描分析

取 NNK 适量，用 DMSO-d_6 溶解，取 0.6 mL 置 5 mm 核磁管中，分别进行 ^{1}H NMR、^{13}C NMR、^{1}H-^{1}H COSY、HSQC 及 HMBC 谱的考察。

^{1}H NMR 结果如图 6 所示，^{13}C NMR 结果如图 7 所示。为进一步推断其结构，明确原子之间的连接顺序，本研究进一步对 NNK 进行核磁共振二维扫描，其 ^{1}H-^{1}H COSY 谱如图 8 所示，HSQC 谱如图 9 所示，HMBC 谱如图 10 所示。按图 1 中的编号顺序对 NNK 的 ^{1}H NMR、^{13}C NMR、^{1}H-^{1}H COSY、HSQC 及 HMBC 图谱数据进行解析，各峰的化学位移值与 NNK 结构相符，具体数据归属如表 1 所示。2、3、4 位的 H 在耦合常数不发生变化的情况下化学位移存在明显偏差，结合表 1 中其他位置的信息，可以断定 NNK 样品存在异构体。

根据图 2 所示的异构化特点，结合上述试验图谱结果，NNK 存在 *Z*/*E* 构型。由于空间位阻效应，推测 NNK 的优势构象为 *E* 构型。

2.4 异构化程度的考察

为考察 NNK 异构化的最大程度，本研究开展了恒温和变温试验，采用核磁共振氢谱（^{1}H NMR）法，分别对 2 种异构体的质子信号峰进行积分，以 2 种异构体积分面积的比例计算其相对含量。同时采用 HPLC 法考察了不同溶剂下 NNK 异构体比例的变化，进一步验证温度对异构化的影响。

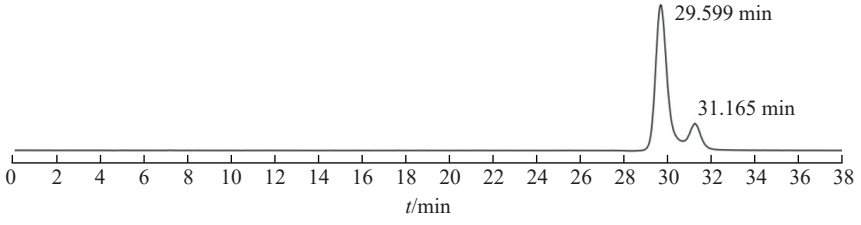
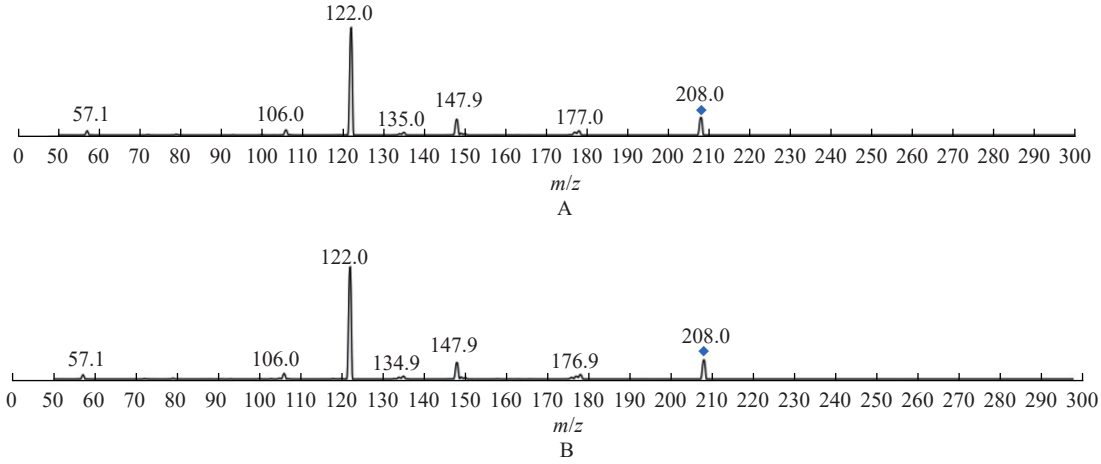


图 4 NNK 的 TIC 色谱图

Fig.4 TIC Chromatogram of NNK



A—峰 1 的 LC/MS 二级质谱图；B—峰 2 的 LC/MS 二级质谱图。

图 5　NNK 溶液 LC/MS 碎片离子信息

Fig.5　LC/MS Fragment Ion Information of NNK Solution

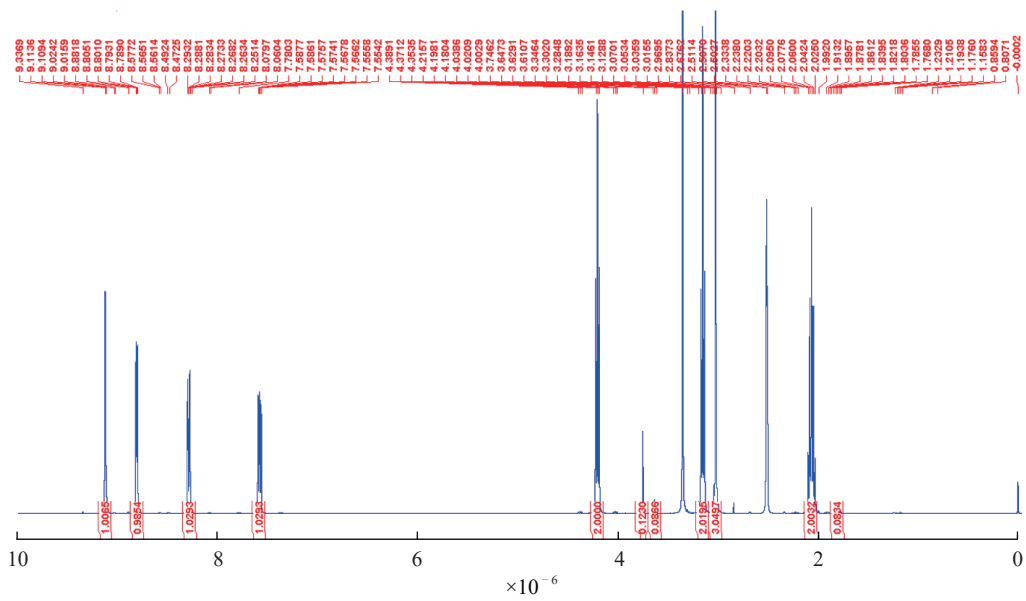


图 6　NNK 的 ^{1}H NMR 信息

Fig.6　^{1}H NMR Information of NNK

2.4.1　HNMR 恒 / 变温试验

取 NNK 适量，用 DMSO-d_6 溶解，分别进行下述恒温、变温试验。

恒温试验：在 30 ℃条件下放置 9 h，前 400 min 以 80 min 为间隔共放置 6 个时间点，后续以 40 min 为间隔放置 3 个时间点，连续测试 9 个时间段的样品溶液。

变温试验：将溶液置不同温度（依次为 30、40、50、60、70、80、90、80、70、60、50、40、30 ℃）下，每个测试温度保持 0.5 h，连续测试。

恒温试验结果显示，*E*/*Z* 异构体的比例缓慢地从 1 ∶ 0.035 持续增长至 1 ∶ 0.10，*E*/*Z* 比例保持持续上升的趋势，说明随时间的延长 *E* 构型向 *Z* 构型转化增加。变温试验结果显示，含量低

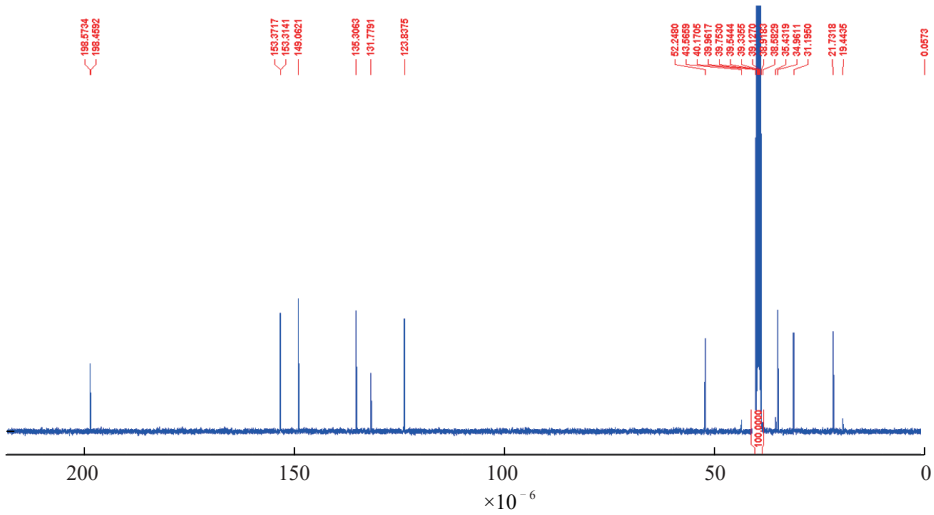


图 7 NNK 的 ^{13}C NMR 信息

Fig.7 ^{13}C NMR Information of NNK

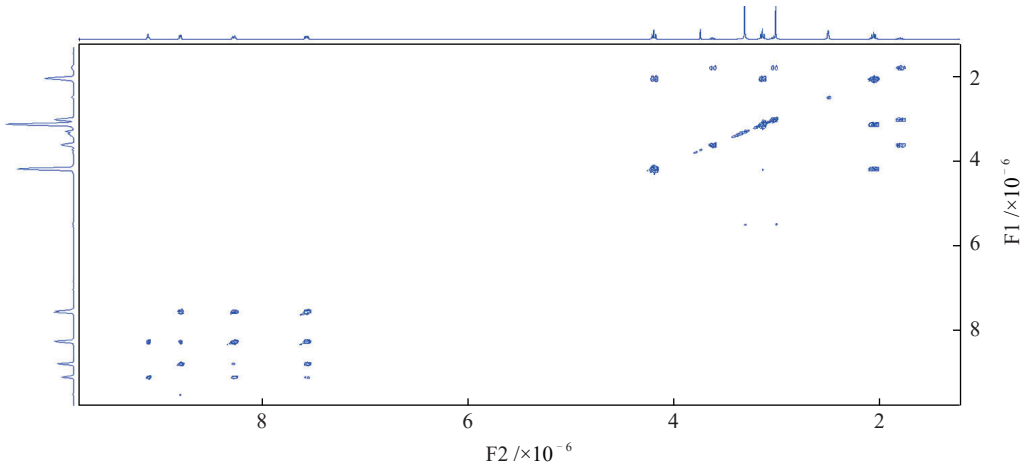


图 8 NNK 的 ^{1}H-^{1}H COSY 信息

Fig.8 ^{1}H-^{1}H COSY Information of NNK

的 *Z* 构型异构体的比例随着温度升高而快速增加，从 30 ℃上升至 90 ℃，*E*/*Z* 比例由 1 ∶ 0.038 升至 1 ∶ 0.33；当温度由 90 ℃降低至 30 ℃，*E*/*Z* 比例由 1 ∶ 0.33 降至 1 ∶ 0.28，该比例基本无明显变化，说明了 NNK 的异构化是非可逆的。

2.4.2 HPLC 变温试验

取 NNK 适量，分别用水和 DMSO-d_6 溶解，于 80 ℃加热 1.5 h 后冷却至室温，按“**2.1**”项下色谱条件进样分析。

结果如图 11 和 12 所示，在 80 ℃条件下，NNK 以水为溶剂溶解的溶液，在加热 1.5 h 再冷却至室温后，与不经加热的样品比，*Z*/*E* 异构体的比例从 0.07 ∶ 1 变化到 0.23 ∶ 1；以 DMSO-d_6 溶解的溶液，加热 1.5 h 再冷却至室温后，*Z*/*E* 异构体的比例从 0.05 ∶ 1 变化到 0.26 ∶ 1。

本研究用不同原理的试验方法，获得相似的结果。说明 NNK 异构化的情况并不是由不同溶剂引起的，而是产品本身特性导致，温度能够影响其异

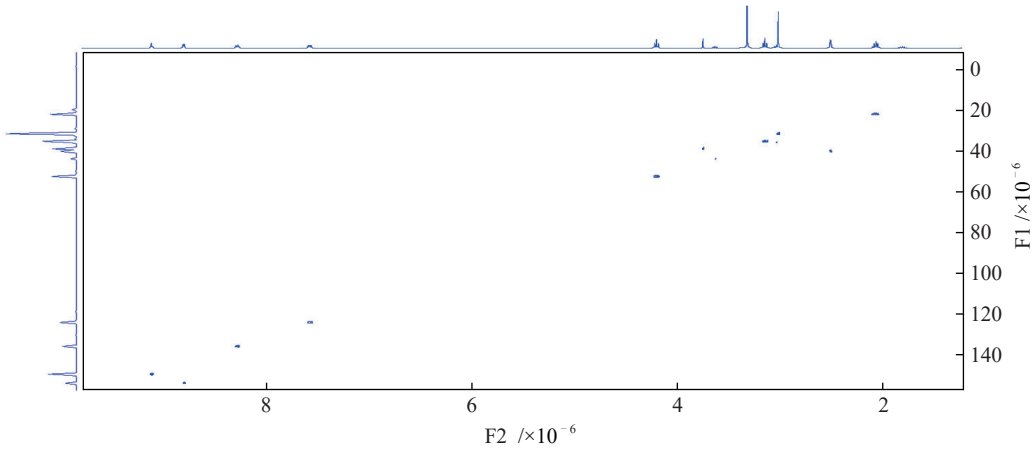


图 9　NNK 的 HSQC 信息

Fig.9　HSQC Information of NNK

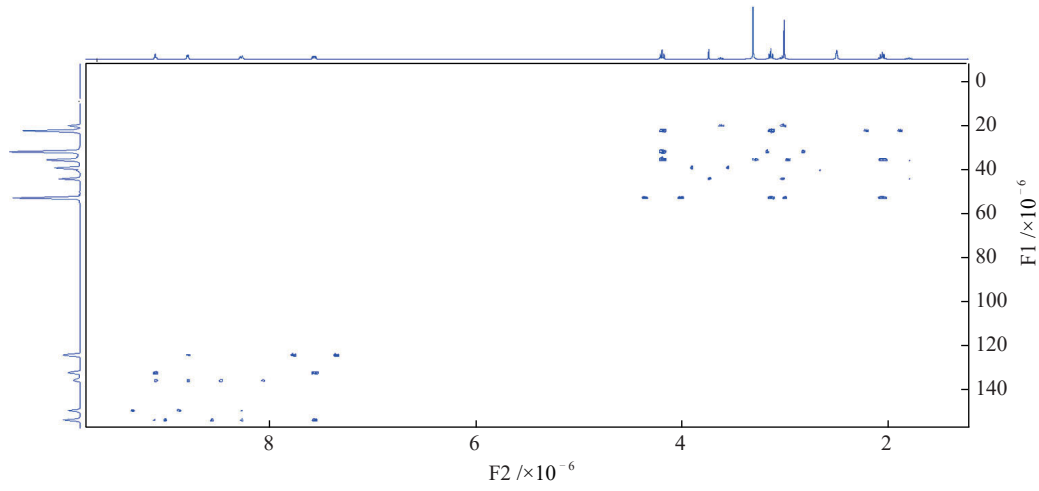


图 10　NNK 的 HMBC 信息

Fig.10　HMBC Information of NNK

表 1　NNK 及其异构体的 H 谱和 C 谱核磁数据 [1)]

Tab.1　^{1}H NMR and ^{13}C NMR Data for NNK and Its Isomers

结构归属	优势构型		劣势构型	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
NCH_3	3.1	31.5	3.1	39.0
1位	—	197.4	—	197.4
2位	3.08	35.1	2.95	35.7
3位	2.25	21.7	1.99	19.9
4位	4.27	52.8	3.8	43.8
2′位	9.15	149.5	9.15	149.5
3′位	—	131.8	—	131.8
4′位	8.2	135.3	8.2	135.3
5′位	7.4	123.7	7.4	123.7
6′位	8.79	153.8	8.79	153.8

注：[1)]“—”表示该结构位点无氢谱化学位移。

构化程度。

3　小结

本研究通过采用不同方法逐步分析并验证了 NNK 在溶液中存在异构化的现象。NNK 因存在 *N*-亚硝基结构，受两性离子共振的影响，存在异构化的可能。采用五氟苯基柱对 NNK 进行 HPLC 分析时，色谱图呈现双峰，符合上述推论。进一步采用 LC-MS/MS 法进行检测，2 个色谱峰的二级碎片离子基本相同，推断两者互为立体异构。同时，核磁共振图谱结果显示在 2、3、4 位的化学位移值存在明显差异，结合其他位移信息，再次验证目标样品存在

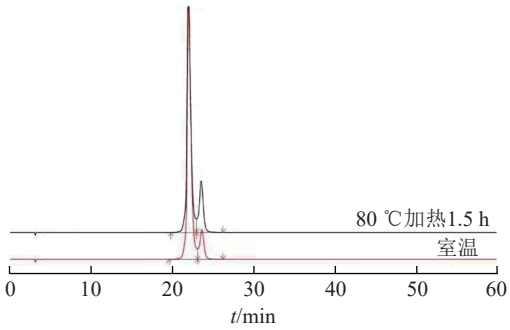


图 11 NNK 水溶液变温试验 HPLC 图谱对比

Fig.11 Comparison of HPLC Chromatograms of Variable Temperature Experiments of NNK Aqueous Solution

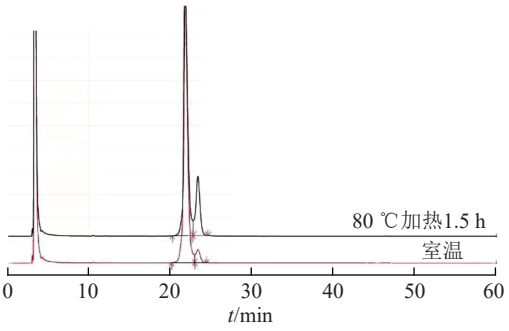


图 12 NNK 的 DMSO-d_6 溶液变温试验 HPLC 图谱对比

Fig.12 Comparison of HPLC Chromatograms of Variable Temperature Experiments of NNK DMSO-d_6 Solution

异构体。同时通过 NMR 和 HPLC 的变温试验，计算 NNK 异构化的比例变化范围，这 2 种不同原理的试验方法得出相似的结论，*Z*/*E* 异构体的比例变化为 0.038 ∶ 1 至 0.33 ∶ 1，并且变温异构化为不可逆行为。

遗传毒性杂质较普通杂质的限度控制更加严格。因此，对于遗传毒性杂质，检测方法以及计算数值的准确性将直接影响对该类杂质的判定。结合前期核磁波谱的研究结果[16]，本研究进一步从不同分析方法角度考察 NNK 异构化情况，介绍了各方法下的代表性图谱及试验方法，同时验证了异构化程度，明确了影响因素，为在实际研究过程中 NNK 的鉴别及分析提供了更为全面的参考及分析思路。同时，建议研究者在 NNK 等类别亚硝胺类化合物的检测分析过程中要对主成分及其异构体进行整体考察，并关注温度对异构化程度的影响，避免出现对其含量水平评估不严谨的现象，影响对其毒性的评价结果。

参考文献：

[1] 陈嘉彬, 孙海峰, 游金清, 等. 磁固相萃取技术应用于主流烟气中烟草特有*N*-亚硝胺的测定[J]. 分析测试学报, 2018, **37**(5): 588-593.

[2] 张颖璞. 烟草*N*-亚硝胺概述[J]. 科技信息, 2009, **289**(5): 340-341.

[3] LAMOUREUX J, CASTONGUAY A. Absence of metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) by flavin-containing monooxygenase (FMO)[J]. *Carcinogenesis*, 1997, **18**(10): 1979-1984.

[4] MARISSA E D, BETH K, CHIA-HSIN L, *et al*. Lung carcinomas induced by NNK and LPS [J]. *Methods Cell Biol*, 2021, **163**: 175-185.

[5] PETERSON L A. Context matters: contribution of specific DNA adducts to the genotoxic properties of the tobacco-specific nitrosamine NNK [J]. *Chem Res Toxicol*, 2017, **30**(1): 420-433.

[6] 世界卫生组织. 国际癌症研究机构致癌物清单[EB/OL]. [2022-11-01]. http://samr. cfda. gov. cn/ WS01/CL1991/215896. htmL.

[7] 张凤梅, 杨光宇, 刘志华, 等. 基质固相分散-气相色谱热能检测法测定电子烟烟油中的TSNAs [J]. 现代化工, 2016, **356**(6): 191-194.

[8] 刘万峰, 王元英. 应用气相色谱-NPD测定烟叶中烟草特有亚硝胺[J]. 中国烟草科学, 2003, (2): 20-23.

[9] 刘 欣, 梁梦洁, 张承明, 等. 在线固相萃取-气相色谱/质谱法测定卷烟主流烟气中烟草特有亚硝胺[J]. 分析科学学报, 2019, **35**(5): 597-601.

[10] 陈 霞, 金立锋, 刘萍萍, 等. UPLC-MS/MS法同时测定烟叶中的TSNAs [J]. 烟草科技, 2016, **346**(3): 62-67.

[11] 侯宏卫, 熊 巍, 唐纲岭, 等. 液相色谱-串联质谱法测定卷烟主流烟气中的四种致癌物[J]. 色谱, 2010, **28**(8): 754-758.

[12] 毛友安, 钟科军, 魏万之, 等. 液相色谱-串联质谱技术测定卷烟烟气中烟草特有亚硝胺[J]. 现代科学仪器, 2006, (1): 88-90.

[13] 邓惠敏, 范子彦, 刘珊珊, 等. 一种烟草中NNN旋光异构体分离及测定的合相色谱串联质谱方法: 中国, CN108535389B [P]. 2020-05-15.

[14] CHRISTER J, ALEXANDRE P, BENGT-GORAN O. Analysis of tobacco-specific *N*-nitrosamines in snuff by ethylacetate extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2003, **1008**: 135-143.

[15] DENG H, WANG Y, WANG J, *et al*. Separation of *N*′-nitrosonornicotine isomers and enantiomers by supercritical fluid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2021, **1641**: 461971.

[16] GUAN H Y, FENG Y F, SUN B H, *et al*. NMR assignments of six asymmetrical *N*-nitrosamine isomers determined in an active pharmaceutical ingredient by DFT calculations [J]. *Molecules*, 2022, **27**: 4749.

[17] FDA. Determination of *N*-nitrosonornicotine-(NNN)-in-smokeless-tobacco-and- tobacco-filler-by-HPLCMS/MS [EB/OL]. [2022-11-01]. https://www. fda. gov/media/103533/download.

[18] BEARD J C, SWAGER T M. An organic chemist's guide to *N*-nitrosamines: their structure, reactivity, and role as contaminants [J]. *J Org Chem*, 2021, **86**(3): 2037-2057.

[19] Cooperation Centre for Scientific Research Relative to Tobacco. Determination of tobacco-specific nitrosamines in tobacco and tobacco products by LC/MS [EB/OL]. [2022-11-01]. https://www. nssi. org. cn/nssi/front/108803646. html.

《中国医药工业杂志》向审稿专家致谢

在广大作者、读者，特别是各位审稿专家的大力支持下，本刊 2023 年的出版工作顺利完成，并取得了较好成绩。承蒙下列专家、学者认真负责地审阅稿件，在此公布 2023 年我刊审稿人名单，并向审稿专家致以诚挚的敬意和衷心的感谢！

本统计结果为审稿完成时间 2023 年 1 月 1 日至 12 月 21 日；本排名按审稿数量多少为序。

周伟澄　张启明　吴　彤　乐　健　卢　懿　陈桂良　秦　峰　郑璐侠　冯　军
甘　勇　余　斐　张庆文　张馨欣　陈　芳　何　军　戚建平　吴　飞　张志文
丁　杨　季　申　刘东飞　王优杰　袁运生　罗华菲　涂亮星　王全瑞　殷　明
陈　岚　孔德云　李　悦　吕　扬　沈　琦　王玉成　奚　泉　葛庆华　裘鹏程
佟振博　张庆伟　左根永　柴旭煜　陈少欣　冯艳春　黄　璐　李鹤然　刘向磊
吕　伟　孙会敏　王　健　王似锦　魏　刚　魏佳鸣　谢跃庆　颜若曦　袁耀佐
钟家亮　周建平　周一萌　陈笑艳　陈一飞　崔　靖　方　亮　葛渊源　古双喜
何　勤　侯晋军　胡艾希　胡　凯　黄则度　黄张建　江正瑾　黎　威　李　伟
梁超峰　林快乐　刘相奎　栾瀚森　梅　馨　倪士峰　欧阳德方　时念秋　孙利华
孙沁怡　孙　逊　台万一　汤立达　陶建生　王　浩(上海惠永药物研究有限公司)
王　浩(锦州医科大学)　王　娟　王哲烽　王志军　吴泰志　吴闻哲　伍振峰
肖晓东　谢金平　徐智儒　许真玉　薛向东　阎　超　杨永健　尤启冬　袁春平
张宝红　张　辉　张　霁　张清奎　张毅兰　郑　亮　庄春林