复杂化合物中亚硝胺杂质检测方法的开发难点解析

杨学芳，李　燕
（济川药业集团有限公司，江苏泰兴 225441）

摘要：对于相对分子质量 1 000 及以上、含有多个手性中心的复杂化合物，其中的亚硝胺杂质检测是其产业化开发与质量控制的突出瓶颈。该文从样品前处理、液相色谱质谱联用方法的条件优化等多个维度深入探讨了基质干扰、中性丢失、位置异构与立体异构、结构互变、响应低及离子比率异常等问题的成因与解决方法。通过调整前处理方式及优化色谱质谱条件，可有效降低基质干扰，提高方法灵敏度、稳定性及精密度。该文建立的系统策略可为复杂手性新药的亚硝胺杂质控制与安全评价提供参考。

关键词：亚硝胺杂质；复杂化合物；手性中心；方法开发；条件优化；综述
中图分类号：R917；R927.1　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2026)06-0634-06
引用：杨学芳, 李　燕. 复杂化合物中亚硝胺杂质检测方法的开发难点解析[J]. 中国医药工业杂志, 2026, **57**(6): 634-639.
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2026.06.002

Analysis of the Difficulties in Developing Detection Methods for Nitrosamine Impurities in Complex Compounds

YANG Xuefang, LI Yan
(*Jumpcan Pharmaceutical Co., Ltd., Taixing 225441*)

ABSTRACT: Detection of nitrosamine impurities in complex compounds with molecular weights of 1 000 or more and multiple chiral centers has become a major bottleneck in industrial development and quality control. To address this analytical challenge, this study investigated the origins and countermeasures of key issues including matrix interference, neutral loss fragmentation, positional isomerism and stereoisomerism, structural interconversion, low mass spectral response, and abnormal ion ratio deviation, focusing on sample pretreatment and optimization of LCMS/MS conditions. By adjusting sample pretreatment methods and optimizing chromatographic-mass spectrometric conditions, matrix interference can be effectively reduced, and the sensitivity, stability and precision of analytical methods can be improved. The systematic strategy established in this study can provide a reference for the control and safety evaluation of nitrosamine impurities in complex chiral new drugs.

Key Words: nitrosamine impurity; complex compound; chiral center; method development; condition optimization; review

亚硝胺类化合物是典型的强基因毒性杂质，所含的 *N*- 亚硝基结构被公认为“警示结构”，具有致突变性和致癌性[1]。依据 2023 年发布的 ICH M7(R2) 指导原则《评估和控制药物中的 DNA 反应性（致突变）杂质以限制潜在致癌风险》要求，含该警示结构的化合物在缺乏充分的致癌性数据时，须实施严格的控制策略。自 2018 年沙坦类药品中亚硝胺杂质事件发生以来，对药品中亚硝胺杂质的管控已成为全球药品监管机构关注的焦点[2-3]。各国药品监管机构相继制定了严格的控制限度，并对分析方法的灵敏度与专属性提出了更高要求[4-5]。因此，开发面向产业化应用的亚硝胺杂质分析方法具有重

收稿日期：2025-12-30
作者简介：杨学芳，副主任中药师，从事药物分析工作。

要的现实意义。

目前小分子药物中亚硝胺杂质的检测技术已相对成熟，但当目标化合物的相对分子质量大于1 000并含有1个以上手性中心时，检测方法的开发难度呈指数级上升。该类化合物在特定工艺条件下易与亚硝化试剂反应生成亚硝胺衍生物[6-7]，即亚硝胺类药物相关杂质（nitrosamine drug substance-related impurities，NDSRI，图1），其检测面临基质干扰严重、质谱行为特殊、色谱分离困难等诸多挑战。目前，鲜有针对此类复杂体系方法开发的相关文献。因此，本文从基质干扰、中性丢失、位置异构与立体异构、结构互变、响应低及离子比率异常等多个维度探讨解决方案，旨在为新药研发中亚硝胺杂质的风险控制提供参考。

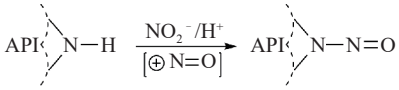


图1 NDSRI的形成机制

Fig.1 Formation Mechanism of NDSRI

1 检测背景

目前，亚硝胺杂质的测定主要依赖于GC-MS/MS与LC-MS/MS技术。三重四极杆质谱是一种基于串联质谱技术的高精度分析方法，灵敏度高、特异性强。在分析过程中可通过调节毛细管电压和筛选高响应离子对，有效提高检测方法的灵敏度。另外，UPLC与HRMS联用时，可通过精确质量数进行定性识别，并通过设置窄质量窗口，在复杂的大分子降解产物中精准识别和定量分析痕量亚硝胺杂质。针对相对分子质量大于1 000且含有多个手性中心的复杂化合物，LC-MS/MS技术是开发其亚硝胺杂质检测方法的核心技术手段。

2 方法开发中的难点

目标分析物的相对分子质量大、结构复杂、控制限度低，分析过程中存在诸多相互关联的不确定干扰因素，这成为检测方法建立的主要障碍。

2.1 复杂基质的干扰

相对分子质量较大的化合物本身及其合成、降解过程中产生的多种杂质，共同构成了复杂的样品基质。在质谱的离子化过程中，基质组分会与目标分析物（亚硝胺杂质）竞争电荷及液滴表面位点，引发离子抑制或增强效应，即基质效应[8]。依据来源，可将样品基质分为以下两类。

无机盐与缓冲体系：高浓度无机盐（如钠、钾离子）会降低目标分析物的离子化效率，并在电喷雾电离源中形成加合离子（如$[M+Na]^+$），影响定量准确性[9]。因此，选择合适的提取方式，对样品进行纯化至关重要。例如采用混合型阳离子交换固相萃取柱，可有效去除大分子样品中的盐和大部分极性干扰物，显著降低基质效应。对于稳定性差的化合物，在前处理过程中须严格控制溶剂种类与操作温度。此外，可结合内标法进一步消除基质干扰。

有机杂质与降解产物：大分子药物的同系物、酸化和高温降解产物都会与亚硝胺杂质发生色谱共洗脱，造成假阳性或定量偏差[10]。在亚硝胺杂质分析中，高浓度原料药与痕量杂质共流出会引起基质干扰。采用亲水作用色谱（hydrophilic interaction chromatography，HILIC）、固相萃取等针对性前处理技术，可有效分离并去除过量原料药以减少干扰。此外，减小供试品的进样浓度或体积，或选择HRMS，也可有效降低基质干扰。

2.2 质谱行为中的中性丢失

在开展复杂化合物中亚硝胺杂质的分析时，常出现分子离子峰与理论相对分子质量不匹配、质谱结果与核磁数据不一致的情况。这主要是母离子发生中性丢失所致。典型的中性丢失类型如表1所示。中性丢失是亚硝胺类化合物的一个典型质谱特征，在碰撞诱导解离（collision-induced dissociation，CID）过程中较易发生，部分化合物甚至在离子化阶段即出现源内裂解，这与分子结构中相关化学键的键能密切相关。

以·NO（*m*/*z* 30）中性丢失为例。亚硝胺基团（N—N=O）中N—N键的键能相对较低，在CID条件下易发生均裂[11]，丢失一个中性·NO自由基（*m*/*z* 30），生成$[M+H-NO]^+$碎片离子。从键能角度分析，N—N单键的键能低于N=O双键，因此N—N键断裂是

表 1　质谱裂解中的中性丢失

Tab.1　Neutral Loss in Mass Spectrometry Fragmentation

中性丢失质量	元素组成	对应碎片
30	NO	亚硝基
28	CO/C_2H_4	羰基化合物或乙基
44	$CONH_2$	酰胺类
46	NO_2	硝基化合物
18	H_2O	醇类或羧酸类
16	O	亚硝基或 *N*- 氧化氮杂环

能量上更有利的路径。在紫外光照条件下，·OH 会进攻亚硝胺的 N—NO 基团，导致 N—N 键断裂并产生 ·NO。

在实验过程中，可通过 LC-MS/MS 中性丢失扫描模式准确识别发生中性丢失的母离子峰，并结合 HRMS 精确质量数进行验证。对于大分子亚硝胺杂质，其母离子 $[M+H]^+$ 本身的响应通常较弱，且主要的裂解路径为丢失 ·NO，导致可用于定量分析的特征子离子响应偏低，降低了方法的灵敏度。

2.3　位置异构与立体异构

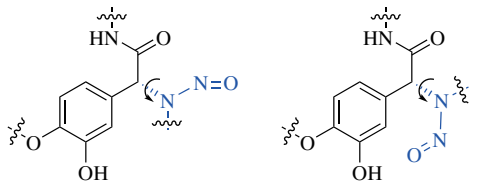
当药物分子中存在多个可亚硝化的位点时，可能形成相对分子质量相同、质谱裂解行为高度相似的位置异构体。复杂化合物本身作为高浓度干扰物，会显著增加痕量异构体杂质与其共流出的风险；即使采用串联质谱检测，其碎片离子也往往高度相似，难以区分[12]。降低位置异构体干扰的关键在于色谱分离。应根据位置异构体的极性、结构等差异，选用具有不同分离选择性的固定相。例如，对于难以采用 C_{18} 柱分离的异构体，可尝试用具有更强偶极作用和 π-π 相互作用的五氟苯基柱；对于极性较强的异构体，可选择 HILIC[13]。此外，通过系统优化流动相体系，可抑制化合物降解、改善峰形。在选用有机相时，应系统对比乙腈与甲醇的分离效果，通过调节二者在体系中的比例，有效调节高浓度原料药与痕量异构体的洗脱窗口，实现杂质与基质的基线分离。

含多个手性中心的复杂化合物发生降解时生成的亚硝胺杂质，可能同时存在非对映异构体和对映异构体。对于非对映异构体，因其具有不同的理化性质，应优先采用经济性较佳的 C_{18} 柱分离法，其次可尝试正相色谱柱、HILIC 柱或五氟苯基柱。对映异构体的分离则主要依赖手性固定相色谱柱，或手性流动相添加剂[14-15]。键合纤维素型和键合直链淀粉型手性柱的兼容性良好，在分离结构复杂的化合物时具有明显优势。当正相色谱条件分离困难时，可选用反相手性柱。近年来，基于二维手性金属有机框架纳米片的新型手性固定相，在异构体分离领域展现出巨大的应用潜力[16-17]。若需实现非对映异构体与对映异构体的同时分离，可采用二维液相色谱法。联用 2 种基于不同分离原理的色谱柱，可大幅提升峰容量与分离能力，有望在单次分析中实现所有异构体组分的基线分离[18]。

2.4　互变平台峰

除“**2.3**”项下所述的异构体外，还存在顺反异构体（图 2）。该类异构体能否实现色谱分离，取决于构型互变的能垒大小。当旋转能垒较低时，2 种异构体在色谱柱中表现为动态共流出而无法分离；当能垒显著升高时，在色谱图上表现为 2 个可分离的峰。亚硝胺类杂质的亚硝基（—N=O）具有强吸电子效应，使 N—N 键呈现出类似双键的特性，易发生顺反异构互变[19-20]。因此，分析过程中若出现难以解释的双峰（如马鞍峰）或异常宽峰，应考虑可能是顺反异构体互变形成的互变平台峰，然后通过变温色谱或核磁共振研究加以验证。选择耐高温、pH 值范围宽的色谱柱，有利于优化峰形。

部分含有吸电子基团的亚硝胺杂质，在溶液中存在酮式与烯醇式 2 种形式[21-22]。这种互变在色谱图上表现为峰拖尾、峰分裂或峰展宽，会降低定量分析的准确性和精密度。但此类互变本质上是质子



A　　B

A—顺式构型；B—反式构型。

图 2　亚硝胺杂质的顺反构型

Fig.2　The *cis*/*trans* Configuration of Nitrosamine Impurities

转移伴随双键转移的官能团异构互变，其质谱碎片峰的相似性低于顺反异构体互变。因而，在检测方法的开发过程中，可通过系统筛选不同 pH 值的流动相，使待测体系稳定地以单一优势构型存在，从而有效解决该问题；同时亦可借助柱温调节实现辅助优化。

当化合物结构中既有活泼 α-H、羰基，又有较大的空间位阻时，顺反异构体互变和酮式 - 烯醇式互变可能同时发生，且难以区分，此时需借助 pH 值调节、变温试验、高分辨碎片离子分析、核磁共振氢谱进行综合研判。

2.5 质谱响应低与离子比率异常

大分子亚硝胺杂质的质谱响应通常较弱，主要原因包括：分子结构复杂，难以实现高效去溶剂化与电荷转移；化学结构高度相似的基质导致的离子抑制效应；易发生中性丢失，导致用于定量分析的特征子离子较少。同时，基于可接受摄入量的限制，亚硝胺杂质的控制限度通常极低[23-24]。多重因素共同对检测方法的灵敏度形成较高要求。此外，样品普遍存在溶解性和稳定性差等问题，增加了痕量杂质定量分析的难度。

针对质谱响应低的问题，可从以下几个方面考虑。①当选用的定量和定性离子对响应低时，可选择带多电荷的次级离子对（表 2）。②筛选流动相体系时，可选用电解能力较强的添加剂，同时通过调节毛细管电压，关注峰形变化。值得注意的是，并非毛细管电压越高，响应就越强。若过度带电，会导致毛刺峰形的产生，降低灵敏度和重复性。③需结合化合物的结构特点，筛选色谱柱填料。④样品浓度的确定需兼顾灵敏度与基质效应。提高进样浓度虽可增强信号，但也会加剧基质干扰，因此需在二者间寻求平衡点。若流动相体系和质谱参数均适宜，适当降低样品浓度，依旧可满足痕量检测的灵敏度要求。

在大分子亚硝胺杂质的 LC-MS/MS 分析中，保持离子比率的稳定是保证定性和定量分析结果可靠性的关键。通常，样品中测得的离子比率与对照品（或校正曲线中点）离子比率的偏差应在规定范围内，该范围可随子离子相对丰度的不同而有所变化。若离子比率偏离规定范围，大多是共洗脱干扰、裂解行为复杂，或是色谱分离效果欠佳引发的质子化离子纯度不足所致。此类问题可通过优化样品前处理方法、色谱分离条件、离子源参数和碰撞能量等加以改善。实际操作中，可结合质谱响应和抗干扰需求，选取次级离子对作为定性分析的依据。若基质干扰仍无法消除，可采用 HRMS 通过精确质量数区分目标分析物与干扰物。该方法的定性分析不依赖碎片离子比率，抗干扰能力较强。

表 2 离子对及碎片信息举例

Tab.2 Examples of Ion Pairs and Fragment Information

分子离子峰（双电荷离子对）	碎片离子（含中性丢失碎片）
739.217 5 $[M+2H]^{2+}$	1 306.338 1 $[M+H-C_8H_{14}NO_3]^+$，1 144.285 3 $[M+H-C_8H_{14}NO_3-C_6H_{10}O_5]^+$，1 116.290 4 $[M+H-C_8H_{14}NO_3-C_6H_{10}O_5-CO]^+$，1 098.279 8 $[M+H-C_8H_{14}NO_3-C_6H_{10}O_5-CO-H_2O]^+$
922.806 7 $[M+2H]^{2+}$	907.303 8 $[M+2H-NO]^{2+}$，899.803 9 $[M+2H-CH_2O_2]^{2+}$，892.790 5 $[M+2H-CH_3N_2O]^{2+}$，886.316 7 $[M+2H-CHNO_3]^{2+}$，358.222 5 $[M+H-CH_2O_2-C_{52}H_{67}Cl_2N_{10}O_{21}]^+$

3 新药开发中的挑战

相对分子质量大、手性中心多、结构新颖的化合物，可能存在仲胺、叔胺等多种警示结构，增加了亚硝胺杂质的检测难度。主要体现在以下几方面。①杂质对照品难获取，需通过定向合成和标化制备，拖累研发进度。②普遍存在溶解性和稳定性差等问题，不仅杂质分析难度大，而且会影响制剂处方设计及生产工艺优化，进而增加检测方法的开发成本与复杂性。因此，在研发早期，应结合药物的合成工艺，考察目标分析物在单一溶剂或混合溶剂中的溶解性与稳定性，筛选出适宜且可适配质谱体系的溶剂。③需关注样品配制过程（如超声、避光处理等）对亚硝胺杂质的影响，考察光照、高温等因素引发的降解情况。④含 2 个以上手性中心的化合物，其立体异构体杂质谱系复杂，异构体数量多。

在新化合物的药物研发过程中，基质干扰、质谱响应低、中性丢失、位置异构、立体异构及结构互变等问题可能同时存在。开发者需在探索过程中

逐步明晰化合物性质，进行综合分析与判别，必要时借助核磁共振氢谱等其他方法佐证，持续优化检测方法。在这一过程中，基于非靶向筛查的 HRMS 应用愈发重要。研究 [25] 表明，将高效前处理技术与 LC-HRMS 联用，可建立通用、高灵敏度的分析方法，用于药品制剂中多种亚硝胺杂质的筛查与定量分析。

4　结语

对于相对分子质量较大且含多个手性中心的化合物，其亚硝胺杂质检测方法的开发是一项极具挑战性的工作。本文从方法开发的实际操作需求出发，深入剖析了该类杂质检测方法开发过程中的难点与应对策略。通过优化前处理方法、色谱及质谱条件，能有效消除复杂基质的干扰。本文结合目标分析物的结构特征，本文重点解析了中性丢失、异构体转变、结构互变等质谱碎片信息，针对定性 / 定量分析中的离子对选择、离子比率异常等问题，提出了切实可行的解决思路。文章系统梳理并总结了复杂化合物中亚硝胺杂质检测方法开发的核心挑战，建立了一套系统化的应对策略，为保障该类新药产品的用药安全提供了参考。

参考文献：

[1] 杨　竹, 杭太俊, 郭晓迪, 等. *N*-亚硝胺类基因毒性杂质的研究进展[J]. 药学与临床研究, 2020, **28**(4): 270-274.

[2] RAY A, ATAL S, SADASIVAM B. Understanding the molecular-pharmaceutical basis of sartan recalls focusing on valsartan [J]. *Glob Cardiol Sci Pract*, 2020, **2020**(2): e202025.

[3] 张　帆, 吕　明, 佟　飞, 等. 化学药物中亚硝胺杂质的控制策略及审评考虑[J]. 中国药事, 2023, **37**(12): 1431-1437.

[4] 王功富, 汤　佳. 人用药品中亚硝胺类杂质的监管现状及思考[J]. 中国新药杂志, 2024, **33**(3): 221-228.

[5] 叶　倩, 耿兴超, 张河战, 等. 亚硝胺类遗传毒性杂质的监管策略及思考[J]. 中国药事, 2021, **35**(2): 127-137.

[6] RAJANA N, GAJANAN K G, KOTA B S K. Review on LC-MS/MS methodologies for analysis of *N*-nitrosamine drug-substance-related impurities [J]. *Crit Rev Anal Chem*, 2025, **20**: 1-32.

[7] REISS K, SAIAKHOV R, CHAKRAVARTI S. (Q) SAR approaches to predict the extent of nitrosation in pharmaceutical compounds [J]. *Chem Res Toxicol*, 2025, **38**(3): 433-447.

[8] 冯媛媛, 田　冶, 尹利辉, 等. 液质联用分析技术中的基质效应[J]. 中国新药杂志, 2024, **33**(10): 1009-1020.

[9] ERNGREN I, HAGLÖF J, ENGSKOG M K R, *et al*. Adduct formation in electrospray ionisation-mass spectrometry with hydrophilic interaction liquid chromatography is strongly affected by the inorganic ion concentration of the samples [J]. *J Chromatogr A*, 2019, **1600**: 174-182.

[10] 刘晓云, 陈笑艳, 钟大放. 液相色谱-串联质谱生物分析方法的基质效应和对策[J]. 质谱学报, 2017, **38**(4): 388-399.

[11] ZHUANG M, LI H, JIANG J, *et al*. Reagent-free and pH-independent degradation of *N*-nitrosamines using electrons generated via corona discharge at ambient pressure [J]. *J Mass Spectrom*, 2018, **54**(2): 141-147.

[12] WU H T, RIGGS DL, LYON Y A, *et al*. Statistical framework for identifying differences in similar mass spectra: expanding possibilities for isomer identification [J]. *Anal Chem*, 2023, **95**(17): 6996-7005.

[13] KOVAŘÍKOVÁ P, STARIA T J, KLIMEŠ J, *et al*. Hydrophilic interaction liquid chromatography in the separation of a moderately lipophilic drug from its highly polar metabolites—the cardioprotectant dexrazoxane as a model case [J]. *J Chromatogr A*, 2011, **1218**(3): 416-426.

[14] MASAMICHI O, YUUKI E, MIZUHO U, *et al*. Application of polysaccharide-based chiral HPLC columns for separation of nonenantiomeric isomeric mixtures of organometallic compounds [J]. *Organometallics*, 2019, **38**(2): 512-518.

[15] TSUI H W, WANG Y J, WU P J. Conformational changes in polysaccharide-based chiral selectors induced by mobile phase composition: effects on enantioselective retention and enantiomer elution order reversal [J]. *J Chromatogr A*, 2025, **1742**: 465660.

[16] 王雪萍, 高顺秋, 李毅洁, 等. 手性金属-有机框架二维材料的液相色谱拆分性能研究[J]. 化学试剂, 2025, **47**(1): 17-25.

[17] 龙怡幸, 蒋雪菲, 杨梅芳, 等. 二维手性金属有机框架纳米片Ni/Fe-D-(+)-葡萄糖用于高效液相色谱的手性分析[J]. 分析科学学报, 2025, **41**(2): 121-128.

[18] 铁晓威, 谢　敏, 黄百芬, 等. 在线固相萃取/二维液相色谱法检测婴幼儿配方食品中视黄醇顺反异构体和α-生育酚手

性异构体[J]. 分析测试学报, 2023, **42**(9): 1174-1180.

[19] 关皓月, 刘 年, 许 凯, 等. NNK遗传毒性杂质及其异构体检测方法的探索性研究[J]. 中国医药工业杂志, 2023, **54**(12): 1753-1760.

[20] PARITALA S T, SHARMA N, SHAH R P. *In-situ* formation and evaluation of *N*-nitrosamine drug substance related impurities in glycopeptides implying orbitrap mass spectrometry [J]. *J Pharm Sci*, 2024, **114**(2): 934-948.

[21] 冯柳宾, 欧阳捷, 安冬丽, 等. 乙酰丙酮的酮式-烯醇式互变异构的核磁共振研究-推荐一个物理化学实验[J]. 大学化学, 2023, **38**(11): 216-222.

[22] 杨国武. 酮式和烯醇式结构稳定性及应用的学科理解[J]. 化学教育(中英文), 2025, **46**(3): 102-108.

[23] KRUHLAK N L, SCHMIDT M, FROETSCHL R, *et al*. Determining recommended acceptable intake limits for *N*-nitrosamine impurities in pharmaceuticals: development and application of the carcinogenic potency categorization approach (CPCA) [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2024, **150**: 105640.

[24] MUKHERJEE P, YAO X, BRIGNOL N, *et al*. Analytical method development strategy for controlling two new nitrosamine drug substance related impurities (NDSRIs) in a pharmaceutical drug product for treatment of a rare disease [J]. *Chromatographia*, 2025, **88**(5): 1-15.

[25] PLANINŠEK P T, ROŠKAR R. A comprehensive approach for *N*-nitrosamine determination in pharmaceuticals using a novel HILIC-based solid phase extraction and LC-HRMS [J]. *Talanta*, 2024, **282**: 126752.

