

# N-亚硝胺类化合物检测研究进展

詹健, 朱登文, 张甲利, 张生宏, 黎文海\*

中国药科大学, 理学院, 江苏 南京

收稿日期: 2023年10月10日; 录用日期: 2023年11月16日; 发布日期: 2023年11月22日

## 摘要

N-亚硝胺类化合物由于其本身和代谢后的产物都会对人体造成严重的破坏甚至发生癌变。所以一直以来作为一类重要的基因毒性杂质, 对其分析方法的开发就备受关注。本文将对N-亚硝胺类化合物的致病机理以及在不同条件下的产生途径进行讨论, 并着重介绍在食品、烟草、化妆品、水体、日用品、药品等不同基质中的检测方法的最新进展。

## 关键词

N-亚硝胺, 基因毒性, 检测方法, 基质

# Research Progress on the Detection of N-Nitrosamines Compounds

Jian Zhan, Dengwen Zhu, Jiali Zhang, Shenghong Zhang, Wenhai Li\*

College of Science, China Pharmaceutical University, Nanjing Jiangsu

Received: Oct. 10<sup>th</sup>, 2023; accepted: Nov. 16<sup>th</sup>, 2023; published: Nov. 22<sup>nd</sup>, 2023

## Abstract

N-nitrosamine compounds can cause serious damage to the human body and even cancer due to their own and metabolic products. Therefore, as an important class of genotoxic impurities, the development of its analytical methods has attracted much attention. In this paper, the pathogenic mechanism of N-nitrosamines and their production pathways under different conditions are discussed, and the latest progress of detection methods in different matrices such as food, tobacco, cosmetics, water, daily necessities and drugs is introduced.

\*通讯作者。

## Keywords

**N-Nitrosamines, Genotoxicity, Detection Methods, Matrix**

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



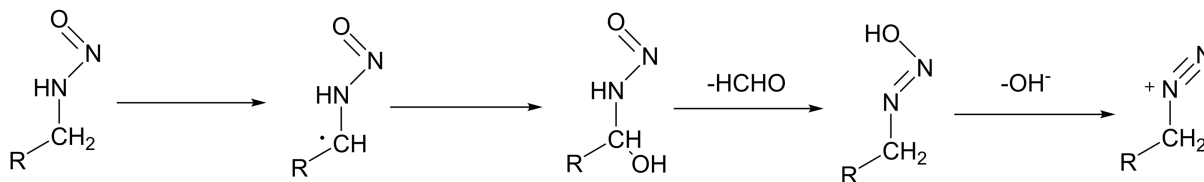
Open Access

## 1. 背景

N-亚硝胺类基因毒性杂质是一类结构为  $R(R)=N-N=O$  的化合物, 是目前研究基因毒性杂质的重要方向之一[1]。人体接触 N-亚硝胺的来源可分为内源和外源两个方向。内源性 N-亚硝胺类化合物可以由其前体在体内进一步形成, 这些前体包括一系列的亚硝酸盐、硝酸盐和胺类[2] [3]。细菌在内源性来源中的作用是我们最值得注意的, 其自身不但会产生一些前体物质并且还会代谢出一些还原酶将硝酸盐还原成亚硝酸盐[4] [5]。外源性的 N-亚硝胺类化合物广泛地存在于我们的日常生活当中, 常见的包括鱼、肉制品中的亚硝胺、蔬菜水果中的二甲基亚硝胺等。此外化妆品、日用品、饮用水中都或多或少地存在 N-亚硝胺类化合物的身影[6] [7]。

### N-亚硝胺类化合物可能存在的致病机理

N-亚硝胺类化合物本身是不会使人体的组织或者细胞直接癌变的, 其在人体内的 pH 环境中能够稳定存在。但是经过一系列地代谢作用后就会产生具有各种致癌作用的副产物[8] [9]。目前较为主流的看法是其致癌作用是通过细胞内的 P450 酶催化代谢而造成结构上的改变而产生强亲电性的物质对 DNA 造成破坏[10] [11]。Zhao 等人[12] [13]通过使用计算化学的方法阐述了第一步羟基化的作用机理。首先 P-450 酶会催化同 N 原子连接的  $\alpha$ -碳原子, 使其脱氢完成羟基化形成  $\alpha$ -羟基亚硝胺, 然后继续在体内代谢脱去醛基生成  $\alpha$ -羟基偶氮化合物。 $\alpha$ -羟基偶氮化合物本身就具有强烈的致癌作用, 而且其还会进一步解离生成重氮化合物, 这种重氮类化合物具有很强的亲电性, 能够和 DNA 牢牢的结合从而使碱基对发生烷基化而破坏 DNA 结构从而产生致癌作用。化合物完成羟基化是其表现出致癌作用最重要的步骤之一, 而 N-亚硝胺类化合物正是通过人体内的 P-450 酶完成转化生成一系列的潜在致癌化合物, 威胁人类的生命健康。所以检测人体所接触的 N-亚硝胺类化合物水平是很重要的, 本文将对日常生活中所经常接触到的物品含有的 N-亚硝胺类化合物的最新检测方法进行综述(图 1)。



**Figure 1.** Major metabolic pathways of N-nitrosamines catalyzed by P450

**图 1.** N-亚硝胺类化合物代谢反应机理图

## 2. N-亚硝胺类化合物的产生途径

### 2.1. 肉类制品

当我们处理肉类、鱼类等动物性食品时, 由于其体内含有脂肪、蛋白质和有机胺类化合物。在经过

腌制、油炸、烧烤等方式处理过后，他们会产生大量的胺类化合物，其中就包括二甲胺、精胺、吡咯烷等。当这些胺类与亚硝酸盐接触时就会产生亚硝胺类化合物[14] [15]。

## 2.2. 发酵类食品

啤酒类饮品也常检查出含有亚硝胺类化合物，其含量在几微克水平[16] [17]。这是由于在烘干过程中麦芽中的酪氨酸转化为大麦碱，再和气态的亚硝化试剂(特别是 NO 与 NO<sub>2</sub> 的混合气体)发生一系列作用后生成二甲基亚硝胺。此外，在酸菜、酱油、醋等发酵食品中也都能检测出少量亚硝胺类化合物[18]。

## 2.3. 药物

自从 2018 年在缬沙坦原料药中发现 N,N-二甲基亚硝胺以及 N,N-二乙基亚硝胺以来，此后陆陆续续在厄贝沙坦、氯沙坦钾等原料药中也先后出现了亚硝胺类化合物的报道和召回事件[19]。药品中出现亚硝胺类化合物这是由于在原料药自身、制备过程，以及溶剂和设备中产生了直接或间接的交叉污染，还有在储存过程中发生了化学降解反应等可能原因[20]。由于合成过程中的原料、中间体、溶剂和试剂的不同，所以引入亚硝胺类化合物的方式也大不相同[21]。但是总体上可以从胺的类别和亚硝化试剂这两个方面进行探讨[22] (图 2, 图 3)。

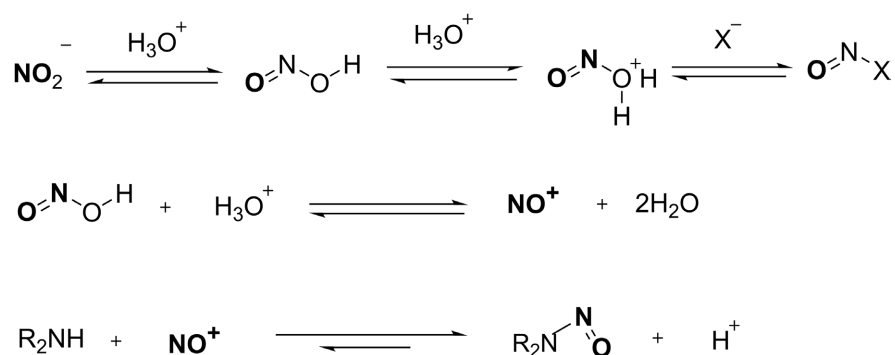


Figure 2. Nitrosation of the nitrite ions

图 2. 亚硝酸离子的亚硝化

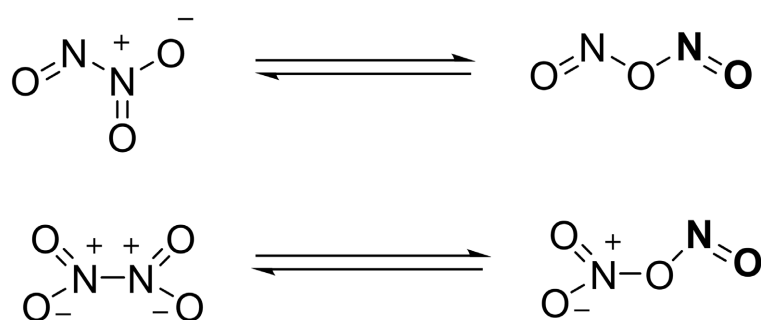


Figure 3. Nitrosation of the nitrite ions

图 3. 氮氧化合物的亚硝化

## 3. N-亚硝胺类化合物检测方法

同其他基因毒性杂质一样，N-亚硝胺类化合物也同样制定了国际公认的每日可接受摄入量(ADI)，表 1 基本上常见的不同种类的亚硝胺杂质的 ADI 都在几十纳克每日[23]。由于 N-亚硝胺类化合物的致癌风险高并且 ADI 值较低，这就对检测技术提出了更高的要求。对于 ADI 水平的 N-亚硝胺类化合物，

我们需要更高灵敏度的检测手段。若同时检测多种亚硝胺类杂质，则对定量限的要求还要更高。另一方面，针对不同基质的检测还需要考虑采用合适的前处理方式以获得进一步的灵敏度。下面将介绍在日常生活中我们常接触的不同基质中使用的前处理和检测方法的最新进展。

**Table 1.** Common acceptable daily intake of N-nitrosamines

**表 1.** 常见 N-亚硝胺的每日可接受摄入量

Ninestrone	AI Limit (ng/day)
NDMA	96
NDEA	26.5
NMBA	96
NIPEA	26.5
NDIPA	26.5
NMPA	26.5

### 3.1. 食品，化妆品

食品和化妆品是我们日常生活中最多直接同身体接触的，所以这一部分目前也做了很多分析方法的研究[24]。

Li 等[25]采用串联液相萃取(TLPE)结合高效液相测定食物中的 N-亚硝胺类化合物的含量。其中串联液相萃取方法是基于加压热水萃取(PHWE)和分散式液-液微萃取(DLLME)的串联并用实现的。该方法具有良好的线性度( $r^2 \geq 0.981$ )，亚硝胺的回收率均达到 74%~117%，精密度 RSD 小于 12.8%。盐渍鸭蛋中所有亚硝胺的检测限(LODs)均在 0.08~0.55  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  之间。该方法采取的加压热水和分散式的萃取联用的方法具有大幅缩短测试时间并且能够明显减少基质负面影响的优点。

Lehotay 等[26]开发了一种新型样品前处理和分析方法用于检测培根类食物中的亚硝胺的含量，其采用氯仿-乙腈混合溶剂先对目标基质中的 N-亚硝胺集中，大大提高检测精度。在进样方式上其创新性地每次进样后使用反冲保护柱，注射衬垫和色谱柱等操作来提高对亚硝胺的分析的可靠性。该方法使用 QuEChERS 方法对样品进行前处理和使用气相-串联质谱来对 5 种 N-亚硝胺类化合物进行检测，该方法的回收率在 70%~120%之间，精密度 RSD 小于 20%，其检测限为 0.1  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

Dong 等[27]人采用盐析均匀萃取法结合气相-串联质谱法对干腌鲭鱼中的 9 种 N-亚硝胺类化合物进行了微量分析。结果表明，校准曲线从 0.5~200  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  呈线性关系，线性相关系数大于 0.9998。定量限和检测限的范围分别在 0.08~0.15 和 0.25~0.5  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  之间。具有良好的回收率在 77.1%~112.9%之间。该方法较之其他方法，针对腌鱼这种基质，采用盐析均匀萃取法能够做到取样量少，并且操作简单，提取效率高等特点。该方法成功应用于对干腌鲭鱼含有的所有种类的 9 种 N-亚硝胺类化合物的检测。

荧光探针是一种由 1980 年代陆续开发使用的，其作用机理在于荧光探针分子其两端分别连接有荧光基团和识别基团，他们分别决定了探针对于客体分子的识别和选择的特异性和识别结果的灵敏度。通过识别荧光基团与客体分子结合后产生的一系列的诸如荧光强度的改变、荧光光谱的移动、荧光寿命的变化等来对客体分子进行定性和定量分析 Minami 等[28]开发了一种环状葫芦藜(Cucurbit[n]urils) (CB[n])的荧光探针作为超分子传感器，用于检测与烟草相关的 N-亚硝胺类化合物，特别是甲基亚硝胺、N-亚硝基降烟碱等。该分子是由桥联的亚甲基与多个昔脲形成的一个可以包含不同大小客体分子的空腔以及两个可以和金属离子配位的探针端口组合而成。这些探针端口是具有荧光的，与金属离子结合后荧光会发生

猝灭。然后由于不同的客体分子竞争性地进入空腔从而挤走了金属离子进而会造成荧光不同程度的恢复或者进一步的猝灭,根据这种交叉反应阵列的荧光反应程度的高低进行定量分析,该方法对于烟草中几种的特异性的客体分子的检测具有灵敏度高、速度快、无破坏性等优点。其对这几种分子的检测限为组胺(0.09 ppm)、尼古丁(0.75 ppm)、N-亚硝基降烟碱(0.05 ppm)和甲基亚硝胺(0.27 ppm)。

Choi 等[29]开发了一种合适的定量分析方法,该方法专门用于对乳液型水不溶性的化妆品样品中的 7 种挥发性的 N-亚硝胺类化合物的检测。针对化妆品呈现出乳膏性状的特点,该方法采用顶空固相微萃取法(HS-SPME)来对样品中的亚硝胺进行提取、清理和预浓缩。与其他吸附剂墨盒清理方法相比,该方法的优点在于从化妆品基质中去除了亲水性和亲脂性的干扰物质的负面影响。该方法采用化学电离(CI)模式下的单四级杆气相色谱/质谱(GC/MS)对亚硝胺进行定量分析。在亚硝胺的浓度为  $50 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  时,该方法的平均回收率为 79%,RSD 小于 20%。检测限下限为  $0.46 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

### 3.2. 水体

Mun 等[30]开发了使用 FeP/Dend-MCM-41 作为吸附剂,再结合固相膜尖端提取(SPMTE)和高效液相-紫外法成功应用于对自来水、废水和湖水样中的 N-亚硝基吡咯烷、N-亚硝基哌啶和 N-亚硝基吗啉的检测分析。FeP/Dend-MCM-41 是一种功能化的金属卟啉,其可以和介孔材料(MCM-41)加和形成吸附剂。该吸附剂的作用原理是亚硝胺的官能团 N-NO 与铁卟啉形成 N 结合或 O 结合,这致使亚硝胺配体能够与铁中心结合吸附。该分析方法对 N-亚硝基吡咯烷(NPYR)、亚硝基吗啉(NMOR)和亚硝基哌啶(NPIP)的检测限和定量限分别在  $0.6 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  和  $2.0 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。线性范围为  $1\sim 1000 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,线性相关系数大于 0.9997。该方法创造性的开发了全新的吸附剂,大大提高了对于水体中的 N-亚硝胺的提取效率,并且具有使用溶剂便宜,萃取效率高,色谱运行时间短等一系列优点。

目前对于饮用水的处理大量使用到氯胺,这使得水体中很难避免形成 N-亚硝胺类化合物,所以提前去除和检测水中的 N-亚硝胺就成为了最有效的方案[31] [32]。Ji 等[33]建立了一种基于二维离子色谱(2D-IC)的同时检测微量 N-亚硝胺前体的方法,其中就包括二甲胺、三甲胺、二乙胺、甲乙胺等。二维离子色谱是一种结合了传统一维解析 IC 柱和二维毛细管 IC 柱的离子色谱,其能够使目标离子和基质离子在第一维上实现分离再汇集到第二维上从而获得更高的灵敏度。该方法对 6 种胺的线性范围均在  $0.1\sim 100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,线性回归系数均大于 0.99。二甲胺、三甲胺、二乙胺、甲乙胺的方法检测限分别为 0.035、0.061、0.04、0.1、0.1 和  $0.153 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。回收率在 91.7%~109.8%之间,RSD 小于 5.3%。该方法使用二维离子色谱,针对含有大量碱金属的水体,其能够有效的消除碱金属以及碱土金属等基质离子的影响,提高检测精度。

### 3.3. 日用品

日用品也是我们日常接触 N-亚硝胺类化合物的重要来源,这其中特别是橡胶制品中的 N-亚硝胺无处不在,包括诸如婴儿奶瓶奶头、家庭用品和食品工业机械中的密封件、传送带、垫圈、油管等。这些橡胶制品形成的 N-亚硝胺类化合物是由于二硫代氨基甲酸盐和硫脲等硫化促进剂与氮氧化物( $\text{NO}_x$ )反应的结果。

已经有许多研究者对检测橡胶制品中的 N-亚硝胺做出了研究,但是这些分析研究大都需要使用到氮化学发光探测器(NCD)或热能分析仪(TEA)等,这些仪器在检测 N-亚硝胺类化合物方面确实具有很好的灵敏度和选择性[34] [35] [36] [37]。然而,这些设备都很昂贵所以并不普遍拥有。所以 Sung 等[38]验证了一种使用液相色谱-质谱法代替气相色谱-热能分析仪法的 N-亚硝胺分析方法。该方法采用 N-亚硝基-二丙胺作为定量的内标物质。该方法具有较好的分析能力,其检测限为  $0.1\sim 2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  和线性回归系数 0.99。以及以相对标准差表示的日内和日间精密密度分别为 3.4%~8.0%和 4.4%~11.3%。

Feng 等[39]开发使用顶空固相微萃取和液相色谱-质谱法(HS-SPME-GC-MS)来测定从橡胶手套和气球当中迁移的 N-亚硝胺类化合物的方法。该方法对于常见的 N-亚硝胺类化合物的检测限的范围在  $0.04\sim 0.89\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ , 低于欧盟指令 93/11/EEC 的限制, 该指令是欧洲共同体委员会于 1993 年 3 月 15 日发布的涉及弹性体或橡胶奶嘴和安抚奶嘴中的 N-亚硝胺类化合物的释放[40]。该方法对所有亚硝胺的平均回收率  $75.4\%\sim 116.9\%$  之间, 线性回归系数的范围在  $0.9158\sim 0.9980$  之间, 这些都说明该项空固相微萃取和液相色谱-质谱法的检测能力令人满意。该方法采用顶空固相微萃取提取法, 其具有样本准备简单方便, 能有效地避免一些高沸点基质对于质谱的污染以及液体进样前处理的多过程误差累积。对于一些挥发性组分以及半挥发性组分灵敏度较好, 能得到稳定可靠地定性定量结果。然而顶空(固相微萃取)技术的不足在于检测范围较窄, 检测周期较长, 定量检测的精确度不高。该方法对 N-亚硝基吗啉, N-亚硝基吡咯烷和 N-亚硝基哌啶(NMOR、NPYR 和 NPIP)的精确度并不是很令人满意。

### 3.4. 药品

根据目前接触水平以及危害力度而言, 对于监控药品中的 N-亚硝胺类化合物是我们研究的重中之重。早在 2014 年 N-亚硝胺类化合物就被国际人用药品注册技术协调会发布的 ICH M7 (R1) 列为了基因毒性杂质中的特殊关注队列[41]。该指导原则还给出需要使用 AI 法作为这类化合物限度的计算方法, 但没有给出具体每个亚硝胺杂质的 50% 肿瘤发生率( $TD_{50}$ )值或可接受摄入量的值。2018 年 7 月自从药品监管部门首次在含有缬沙坦的产品中发现 N-二甲基亚硝胺(NDMA)以来, 随后在沙坦药物家族中的其他药物中也检测到了其他亚硝胺杂质, 例如 N-二乙基亚硝胺(NDEA)、N-二异丙基亚硝胺(NDIPA)、N-乙基异丙基亚硝胺(NEIPA)和 N-亚硝基-N-甲基-4-氨基丁酸(NMBA)。接下来的几年间美国食品药品监督管理局(FDA)和欧洲药品管理局(EMA)相继给出并且补充对于这几种亚硝胺杂质的可接受摄入量的值。2020 年 9 月, FDA 发布了一份名为《人类药物中 N-亚硝胺杂质的控制》的行业指南, 以帮助确保美国药品供应的安全, 建议制造商采取措施来检测和防止药品中 N-亚硝胺杂质的不可接受水平。该指南还描述了可能引入 N-亚硝胺杂质的条件以供参考。2021 年 2 月欧洲药品管理局(EMA)最新发布, 如果在没有足够的数据来生成特定的可接受摄入量, 则可以使用基于毒理学阈值(TTC)考虑的  $18\text{ ng}$  每天的通用类特定限制。或者推导出一个经过适当证明的结构活性关系(SAR)限制[42]。此外, 如果同时出现多种 N-亚硝胺, 则总日限量不应超过最有毒 N-亚硝胺的限量, 并且总风险不应超过 10 万分之一。

目前对于药物当中的 N-亚硝胺类化合物的分析工作有大量的研究在进行, 他们大多数都是基于使用气相色谱或液相色谱与质谱相结合的色谱技术来进行的。Boczar 等[43]开发了一种新的高效液相荧光检测方法, 用于测定马来酸依那普利中 N-亚硝基二甲胺(NDMA)和 N-亚硝基二乙胺(NDEA)的含量。由于亚硝胺无法直接使用荧光检测, 所以需要对其进行反硝化作用, 使用溴化氢在醋酸的条件将亚硝基转化为氨基, 然后再与芴甲氧羰酰氯(Fmoc-Cl)进行衍生化反应生成一个具有良好荧光检测特性的结构。该方法具有优秀的线性度, N-亚硝基二甲胺的线性回归系数大于  $0.9994$ , 定量限为  $0.038\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , 回收率在  $74.2\%\sim 101.6\%$  之间。N-亚硝基二乙胺的线性回归系数大于  $0.9990$ , 定量限为  $0.050\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , 回收率在  $90.6\%\sim 125.4\%$  之间。

Wichitnithad 等[44]基于常规实验室的条件以及减轻基质负载造成的机器污染的考虑开发了一种顶空气相色谱-质谱(HS-GC-MS)的方法, 用于测定氯沙坦钾原料药中的四种 N-亚硝胺类化合物。针对 N-二甲基丙烯酰胺、N-亚硝基二乙胺、N-亚硝基二异丙胺、N-亚硝基乙基异丙基胺这四种杂质使用单重四极杆质谱仪在单粒子检测扫描模式下采用电轰击电离对其进行检测。该方法根据国际人用药品注册技术协调会所发布的 Q2 (R1) 分析方法验证指南进行了验证。N,N-二甲基丙烯酰胺和 N-亚硝基二乙胺的线性浓度范围在  $25\sim 5000\text{ ppb}$ , N-亚硝基二异丙胺和 N-亚硝基乙基异丙基胺的线性浓度范围在

50~5000 ppb, 线性回归系数大于 0.995, N,N-二甲基丙烯酰胺和 N-亚硝基二乙胺的定量限为 25 ppb, N-亚硝基二异丙胺和 N-亚硝基乙基异丙基胺的定量限为 50 ppb。另外该方法的特异性良好, 针对稀释剂如 DMSO、DMF、和甲醇等这些溶剂, 还包括洛沙坦钾、奥美沙坦酯和缬沙坦等空白沙坦基质都对标准亚硝胺溶液无明显干扰。

Chang 等[45]开发了新的适用于检测沙坦类药物的分析方法, 该方法利用了液相二级质谱在极性以及非极性、非挥发性有机物质的分析中的优秀表现, 以及其适用于热不稳定的分析物和基质特点。该方法使用 APCI 源在正离子模式下进行检测, 其具有最佳的离子选择性能和对基质抗干扰的优点。对于 N, N-二甲基-4-亚硝基苯胺、N-亚硝基二甲胺、N-亚硝基二丁基胺等 12 种亚硝胺的浓度从 2.5~50 ng·mL<sup>-1</sup> 呈线性相关, 其线性相关系数大于 0.995。另外在 1~10 ng·mL<sup>-1</sup> 范围内, 回收率为 60%~125%, 相对标准偏差小于 30%, 10~100 ng·mL<sup>-1</sup> 内, 回收率为 70%-120%, 相对标准偏差小于 20%。对这 12 种亚硝胺的检测限和定量限分别为 20 ng·g<sup>-1</sup> 和 50 ng·g<sup>-1</sup>。

#### 4. 总结

N-亚硝胺类化合物被认为是最重要的化学致癌物之一, 也是四大食品污染物之一[46] [47]。这类化合物可以分为 N-亚硝胺和 N-亚硝酰胺两大类。天然存在的 N-亚硝基类化合物含量极微, 但它的前体物(胺类、亚硝酸盐及硝酸盐)却广泛存在于我们日常接触的环境当中, 在合适的条件下就会形成亚硝胺或亚硝酰胺来威胁我们的健康。

基于目前的研究我们有很多种方法来检测包括食品、水、化妆品和橡胶制品等不同环境中的 N-亚硝胺类化合物[48]。例如, 气相色谱质谱联用法、气相色谱热能分析仪法和分光光度法等都可以用来检测挥发性 N-亚硝胺类化合物。

但是依然存在很多挑战, N-亚硝胺类化合物具有低分子量、部分挥发性和高毒性等理化性质, 并且 N-亚硝胺类化合物种类很多且化学性质接近, 这就要求分析方法具有良好的特异性、色谱分离和高灵敏度等特点。此外, 测试材料(例如水体、气源、塑料产品和橡胶、弹性体产品)中存在痕量亚硝胺杂质也会造成干扰, 还有分析过程中 N-亚硝胺的原位生成, 以及共流出分析物都会造成一系列的干扰。

此外, 虽然目前的检测方法大都能够满足对于各种参数以及验证标准的要求, 但是都是先对原料药以及制剂中的 N-亚硝胺判断, 有的放矢的选择检测手段[49] [50]。实际上就存在很多无法预知杂质的来源以及种类, 这些都使得对药品中亚硝胺杂质进行准确的风险评估极具挑战性。

#### 参考文献

- [1] Bian, Y., Zhang, Y., Zhou, Y., *et al.* (2020) Progress in the Pretreatment and Analysis of N-Nitrosamines: An Update since 2010. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **61**, 3626-3660. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1803790>
- [2] Walters, C.L., Carr, F.P.A., Dyke, C.S., *et al.* (1979) Nitrite Sources and Nitrosamine Formation *in Vitro* and *in Vivo*. *Food and Cosmetics Toxicology*, **17**, 473-479. [https://doi.org/10.1016/0015-6264\(79\)90006-3](https://doi.org/10.1016/0015-6264(79)90006-3)
- [3] Richar, D.N., Loepky, C., Lonni, E.G. and Hazlitt, A.W.E.A. (1979) N-Nitrosamine Fragmentation and N-Nitrosamine Transformation. *ACS Symposium Series*, **101**, 109-123. <https://doi.org/10.1021/bk-1979-0101.ch007>
- [4] Guadagni, S., Walters, C.L., Smith, P.L., *et al.* (1996) N-Nitroso Compounds in the Gastric Juice of Normal Controls, Patients with Partial Gastrectomies, and Gastric Cancer Patients. *Journal of Surgical Oncology*, **63**, 226-233. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9098\(199612\)63:4<226::AID-JSO3>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9098(199612)63:4<226::AID-JSO3>3.0.CO;2-E)
- [5] Walters, C.L. (1992) Reactions of Nitrate and Nitrite in Foods with Special Reference to the Determination of N-Nitroso Compounds. *Food Additives and Contaminants*, **9**, 441-447. <https://doi.org/10.1080/02652039209374096>
- [6] Mirvish, S.S. (1975) Formation of N-Nitroso Compounds: Chemistry, Kinetics, and *in Vivo* Occurrence. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **31**, 325-351. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(75\)90255-0](https://doi.org/10.1016/0041-008X(75)90255-0)
- [7] Nawrocki, J. and Andrzejewski, P. (2011) Nitrosamines and Water. *Journal of Hazardous Materials*, **189**, 1-18.

- <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.02.005>
- [8] Appel, K.E., Ruf, H.H., Mahr, B., *et al.* (1979) Binding of Nitrosamines to Cytochrome P-450 of Liver Microsomes. *Chemico-Biological Interactions*, **28**, 17-33. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.02.005>
- [9] Fahrer, J. and Christmann, M. (2023) DNA Alkylation Damage by Nitrosamines and Relevant DNA Repair Pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, **24**, Article No. 4684. <https://doi.org/10.3390/ijms24054684>
- [10] Bodell, W.J. (2003) Repair of DNA Alkylation Products Formed in 9L Cell Lines Treated with 1-(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Mutation Research*, **522**, 85-92. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(02\)00262-2](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(02)00262-2)
- [11] Bodell, W.J. (2009) DNA Alkylation Products Formed by 1-(2-chloroethyl)-1-nitrosourea as Molecular Dosimeters of Therapeutic Response. *Journal of Neuro-Oncology*, **91**, 257-264. <https://doi.org/10.1007/s11060-008-9715-1>
- [12] Zhao, L.J., Zhong, R.G., Yuan, X.L., *et al.* (2004) *Ab Initio* Research on DNA Base Alkylation by the  $\beta$ -Position Metabolite of Methylethyl Nitrosamine. *Chinese Science Bulletin*, **49**, 1450-1452. <https://doi.org/10.1360/03wb0185>
- [13] Bai, B., Zhao, L. and Zhong, R. (2011) Quantification of meCCNU-Induced dG-dC Crosslinks in Oligonucleotide Duplexes by Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **25**, 2027-2034. <https://doi.org/10.1002/rcm.5064>
- [14] Drabik-Markiewicz, G., Dejaegher, B., De Mey, E., *et al.* (2011) Influence of Putrescine, Cadaverine, Spermidine or Spermine on the Formation of N-Nitrosamine in Heated Cured Pork Meat. *Food Chemistry*, **126**, 1539-1545. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.149>
- [15] Telling, G.M. (1982) The Determination of N-Nitrosamines in Foods and Cosmetics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **1**, 277-280. [https://doi.org/10.1016/0165-9936\(82\)87008-8](https://doi.org/10.1016/0165-9936(82)87008-8)
- [16] Fan, C. and Lin, T. (2018) N-Nitrosamines in Drinking Water and Beer: Detection and Risk Assessment. *Chemosphere*, **200**, 48-56. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.02.025>
- [17] Goff, E.U. and Fine, D.H. (1979) Analysis of Volatile N-Nitrosamines in Alcoholic Beverages. *Food and Cosmetics Toxicology*, **17**, 569-573. [https://doi.org/10.1016/0015-6264\(79\)90115-9](https://doi.org/10.1016/0015-6264(79)90115-9)
- [18] Charrois, J.W.A., Boyd, J.M., Froese, K.L., *et al.* (2007) Occurrence of N-Nitrosamines in Alberta Public Drinking-Water Distribution Systems. *Journal of Environmental Engineering and Science*, **6**, 103-114. <https://doi.org/10.1139/s06-031>
- [19] Bharate, S.S. (2021) Critical Analysis of Drug Product Recalls Due to Nitrosamine Impurities. *Journal of Medicinal Chemistry*, **64**, 2923-2936. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c02120>
- [20] Gnewuch, C.T. and Sosnovsky, G. (1997) A Critical Appraisal of the Evolution of N-Nitrosoureas as Anticancer Drugs. *Chemical Reviews*, **97**, 829-1014. <https://doi.org/10.1021/cr941192h>
- [21] Horne, S., Vera, M.D., Nagavelli, L.R., *et al.* (2023) Regulatory Experiences with Root Causes and Risk Factors for Nitrosamine Impurities in Pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **112**, 1166-1182. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2022.12.022>
- [22] Wichitnithad, W., Nantaphol, S., Noppakhunsomboon, K., *et al.* (2023) An Update on the Current Status and Prospects of Nitrosation Pathways and Possible Root Causes of Nitrosamine Formation in Various Pharmaceuticals. *Saudi Pharmaceutical Journal*, **31**, 295-311. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2022.12.010>
- [23] FDA (2023) Control of Nitrosamine Impurities in Human Drugs. <https://www.fda.gov/search?s=Control+of+Nitrosamine+Impurities++in+Human+Drugs>
- [24] Yurchenko, S. and Mölder, U. (2006) Volatile N-Nitrosamines in Various Fish Products. *Food Chemistry*, **96**, 325-333. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.04.009>
- [25] Li, W., Chen, N., Zhao, Y., *et al.* (2018) Online Coupling of Tandem Liquid-Phase Extraction with HPLC-UV for the Determination of Trace N-Nitrosamines in Food Products. *Analytical Methods*, **10**, 1733-1739. <https://doi.org/10.1039/C8AY00014J>
- [26] Lehotay, S.J., Sapozhnikova, Y., Han, L., *et al.* (2015) Analysis of Nitrosamines in Cooked Bacon by QuEChERS Sample Preparation and Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry with Backflushing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **63**, 10341-10351. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04527>
- [27] Dong, H., Li, H., Liang, M., *et al.* (2020) Rapid Determination of Nine N-Nitrosamines in Dry-Cured Mackerel (*Scomberomorus niphonius*) Using Salting out Homogeneous Phase Extraction with Acetonitrile Followed by GC-MS/MS. *LWT*, **130**, Article ID: 109716. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109716>
- [28] Minami, T., Esipenko, N.A., Zhang, B., *et al.* (2012) Supramolecular Sensor for Cancer-Associated Nitrosamines. *Journal of the American Chemical Society*, **134**, 20021-20024. <https://doi.org/10.1021/ja3102192>
- [29] Choi, N.R., Kim, Y.P., Ji, W.H., *et al.* (2016) Identification and Quantification of Seven Volatile N-Nitrosamines in Cosmetics Using Gas Chromatography/Chemical Ionization-Mass Spectrometry Coupled with Head Space-Solid Phase Microextraction. *Talanta*, **148**, 69-74. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.10.045>



- [30] Sanagi, M.M., Chong, M.H., Endud, S., *et al.* (2015) Nano Iron Porphyrinated Poly(amidoamine) Dendrimer Mobil Composition Matter-41 for Extraction of N-Nitrosodiphenylamine Nitrosamine from Water Samples. *Microporous and Mesoporous Materials*, **213**, 68-77. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2015.04.011>
- [31] Zhao, Y.Y., Boyd, J.M., Woodbeck, M., *et al.* (2008) Formation of N-Nitrosamines from Eleven Disinfection Treatments of Seven Different Surface Waters. *Environmental Science & Technology*, **42**, 4857-4862. <https://doi.org/10.1021/es7031423>
- [32] Zhao, Y.Y., Boyd, J., Hrudehy, S.E., *et al.* (2006) Characterization of New Nitrosamines in Drinking Water Using Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Environmental Science & Technology*, **40**, 7636-7641. <https://doi.org/10.1021/es061332s>
- [33] Ji, Y., Guo, R., Lee, S.F., *et al.* (2019) Rapid Determination of Trace Level N-Nitrosamine Precursors in Secondary-Treated Wastewater by Using Two Dimensional-Ion Chromatography. *Journal of Hazardous Materials*, **368**, 452-458. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.01.074>
- [34] Takeuchi, M., Mizuishi, K., Yamanobe, H., *et al.* (1986) Determination of Volatile N-Nitrosamines in Rubber Nipples by Gas Chromatography Using Thermal Energy Analyzer. *Analytical Sciences*, **2**, 577-580. <https://doi.org/10.2116/analsci.2.577>
- [35] Havery, D.C. and Fazio, T. (1982) Estimation of Volatile N-Nitrosamines in Rubber Nipples for Babies' Bottles. *Food and Chemical Toxicology*, **20**, 939-944. [https://doi.org/10.1016/S0015-6264\(82\)80232-0](https://doi.org/10.1016/S0015-6264(82)80232-0)
- [36] Sen, N.P., Seaman, S.W. and Kushwaha, S.C. (1987) Improved Method for Determination of Volatile Nitrosamines in Baby Bottle Rubber Nipples and Pacifiers. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, **70**, 434-438. <https://doi.org/10.1093/jaoac/70.3.434>
- [37] Mutsuga, M., Yamaguchi, M. and Kawamura, Y. (2013) Analysis of N-Nitrosamine Migration from Rubber Teats and Soothers. *American Journal of Analytical Chemistry*, **4**, 277-285. <https://doi.org/10.4236/ajac.2013.46035>
- [38] Sung, J.H., Kwak, I.S., Park, S.K., *et al.* (2010) Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Determination of N-Nitrosamines Released from Rubber or Elastomer Teats and Soothers. *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, **27**, 1745-1754. <https://doi.org/10.1080/19440049.2010.508184>
- [39] Feng, D., Liu, L., Zhao, L., *et al.* (2012) Evaluation of Simulant Migration of Volatile Nitrosamines from Latex Gloves and Balloons by HS-SPME-GC-MS. *Journal of Chromatographic Science*, **50**, 733-738. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bms057>
- [40] EUR-LEX (1993) Commission Directive 93/11/EEC of 15 March 1993 Concerning the Release of the N-Nitrosamines and N-Nitrosatable Substances from Elastomer or Rubber Teats and Soothers. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A31993L0011&qid=1693902630082>
- [41] ICH (2023) ICH M7(R1) Addendum Reaches Step 2b of the ICH Process. <https://www.ich.org/news/ich-m7r1-addendum-reaches-step-2b-ich-process>
- [42] EMA (2021) Guidance for Marketing Authorisation Holders. <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/post-authorisation/referral-procedures/nitrosamine-impurities>
- [43] Boczar, D., Wyszomirska, E., Zabrzewska, B., *et al.* (2021) Development and Validation of a Method for the Semi-Quantitative Determination of N-Nitrosamines in Active Pharmaceutical Ingredient Enalapril Maleate by Means of Derivatisation and Detection by HPLC with Fluorimetric Detector. *Applied Sciences*, **11**, Article No. 7590. <https://doi.org/10.3390/app11167590>
- [44] Wichitnithad, W., Sudtanon, O., Srisunak, P., *et al.* (2021) Development of a Sensitive Headspace Gas Chromatography-Mass Spectrometry Method for the Simultaneous Determination of Nitrosamines in Losartan Active Pharmaceutical Ingredients. *ACS Omega*, **6**, 11048-11058. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c00982>
- [45] Chang, S.H., Chang, C.C., Wang, L.J., *et al.* (2020) A Multi-Analyte LC-MS/MS Method for Screening and Quantification of Nitrosamines in Sartans. *Journal of Food and Drug Analysis*, **28**, 292-301. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.1063>
- [46] Gushgari, A.J. and Halden, R.U. (2018) Critical Review of Major Sources of Human Exposure to N-Nitrosamines. *Chemosphere*, **210**, 1124-1136. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.07.098>
- [47] Tricker, A.R. and Preussmann, R. (1991) Carcinogenic N-Nitrosamines in the Diet: Occurrence, Formation, Mechanisms and Carcinogenic Potential. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, **259**, 277-289. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(91\)90123-4](https://doi.org/10.1016/0165-1218(91)90123-4)
- [48] Charrois, J.W., Arend, M.W., Froese, K.L., *et al.* (2004) Detecting N-Nitrosamines in Drinking Water at Nanogram per Liter Levels Using Ammonia Positive Chemical Ionization. *Environmental Science & Technology*, **38**, 4835-4841. <https://doi.org/10.1021/es049846j>
- [49] Parr, M.K. and Joseph, J.F. (2019) NDMA Impurity in Valsartan and Other Pharmaceutical Products: Analytical Me-

thods for the Determination of N-Nitrosamines. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **164**, 536-549.  
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.11.010>

- [50] Sörgel, F., Kinzig, M., Abdel-Tawab, M., *et al.* (2019) The Contamination of Valsartan and Other Sartans, Part 1: New Findings. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **172**, 395-405.  
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.05.022>