·实验研究·

阿奇霉素注射剂中潜在 *N*-亚硝胺的测定与风险分析

吴　杨,许　奇,钱　岩,黄逸文
(苏州市药品检验检测研究中心,苏州市药品不良反应监测中心,苏州 215000)

[摘要]　**目的**:识别阿奇霉素中潜在 *N*-亚硝胺风险,并建立相应测定方法进行确认性检测,为生产企业开展风险评估提供借鉴。**方法**:按照美国 FDA、欧洲 EMA 发布的相关指南,基于阿奇霉素结构特点与合成工艺,结合降解实验,对其中可能存在的 *N*-亚硝胺风险进行识别,确定控制限度,并建立相应的 HPLC-MS/MS 法,对 15 个厂家的 61 批阿奇霉素注射剂中潜在 *N*-亚硝基二甲胺(NDMA)含量进行确认性检测。**结果**:阿奇霉素有由原料直接引入或氧化降解生成 NDMA 的风险;实际收集的 61 批样品中 NDMA 含量均低于定量限。**结论**:市面上阿奇霉素注射剂中 NDMA 风险可控;建立的 HPLC-MS/MS 法灵敏度满足限度要求,专属性回收率精密度良好,可用于生产企业对阿奇霉素中 NDMA 风险评估的确认性检测与质量控制,也可为其他化学合成药品中潜在 *N*-亚硝胺风险评估与测定提供借鉴。

[关键词]　*N*-亚硝胺;阿奇霉素注射剂;HPLC-MS/MS;风险分析
[中图分类号]　R917　　[文献标志码]　A　　[文章编号]　1003－3734(2021)21－1998－05

Determination and risk analysis for potential *N*-nitrosamines in azithromycin injection

WU Yang, XU Qi, QIAN Yan, HUANG Yi-wen
(*Suzhou Institute for Drug Control*, *Suzhou Centre of Adverse Drug Reaction Monitoring*, *Suzhou* 215000, *China*)

[**Abstract**]　**Objective**: To identify the potential risk of *N*-nitrosamines in azithromycin and to establish corresponding method for confirmatory testing, providing reference for risk assessment by manufacturers. **Methods**: In conformity with the relevant industry guidance of FDA and EMA, risk identification and control limits for potential *N*-nitrosamines in azithromycin was conducted based on the structure and synthetic route, as well as degradation test. A liquid chromatography-mass spectrometry method was subsequently established and applied to the confirmatory testing of *N*-nitrosodimethylamine in azithromycin injection of 61 batches from 15 different manufacturers. **Results**: *N*-nitrosodimethylamine was probably introduced from starting material or generated as the degradation product of azithromycin. In all cases, *N*-nitrosodimethylamine were found below the limit of quantitation. **Conclusion**: The risk of potential *N*-nitrosamines in azithromycin injection was acceptable. This method proved sensitive, selective, accurate and suitable to the confirmatory testing and quality control of *N*-nitrosodimethylamine in azithromycin injection. The article also provided an example to the risk assessment and confirmatory testing of potential *N*-nitrosamines in chemically synthesized APIs and drug products.

[**Key words**]　*N*-nitrosamines; azithromycin injection; HPLC-MS/MS; risk analysis

N-亚硝胺类杂质是具有更高致癌风险的一类基因毒性杂质,在 ICH M7(R1)指南中被列为基因毒性杂质中的“关注队列”(cohort of concern)。自 2018 年 7 月在缬沙坦中检出 *N*-亚硝基二甲胺(NDMA)以来,陆续在其他药物中检测出 *N*-亚硝胺类杂质,如替丁类药物雷尼替丁、尼扎替丁,降血糖药物吡格列酮、二甲双胍,抗结核药物利福喷汀、利福平等。引发了生产企业去评估产品合成工艺并建立产品中亚硝胺杂质含量测定方法。

国家药品监督管理局(NMPA)、欧洲 EMA、美国

[作者简介]　吴杨,男,副主任药师,主要从事药品质量控制研究。E-mail:wuyang216217@163.com。
[通讯作者]　黄逸文,男,主管药师,主要从事药物合成工艺研究与质量研究。E-mail:cpuhyw2010@163.com。

FDA 均发布了人用药中 *N*-亚硝胺类杂质控制的指导意见[1-3]。EMA 要求上市许可人(MAH)分 3 个阶段完成对所有化学合成药品中亚硝胺杂质风险控制:首先评估产品是否有亚硝胺形成或污染的可能;如识别出风险,继续开展确认性检测,进一步确认或反驳亚硝胺的存在;若亚硝胺被确认存在则需要提交必要的变更申请,实施有效的风险预防或缓解措施[2]。FDA 在亚硝胺杂质控制行业指南[3]中建议 MAH 评估所有化学合成原料药及制剂中亚硝胺风险,当发现风险时应执行确认性检测并采取相应的措施。

阿奇霉素是在红霉素结构上修饰后的第 2 代大环内酯抗生素。相比红霉素,其稳定性更强、抗菌谱更广、临床应用广泛。目前阿奇霉素及相关制剂中 *N*-亚硝胺研究与测定作者还未见文献报道,本文从阿奇霉素结构特点和合成路线两方面,对其中可能存在的 *N*-亚硝胺风险进行识别并建立相应的分析方法进行确证性检测,为生产企业开展风险评估提供借鉴。

阿奇霉素是以红霉素 A 为原料,以羟胺为试剂,经过肟化得到红霉素 E 肟,再经贝克曼重排、还原、甲基化得到阿奇霉素(见图 1)。Parr 等[4]采用气相-热能分析仪(GC-TEA)检测出起始原料红霉素 A 中的 NDMA,其作为起始原料有直接在阿奇霉素中引入 NDMA 的风险。

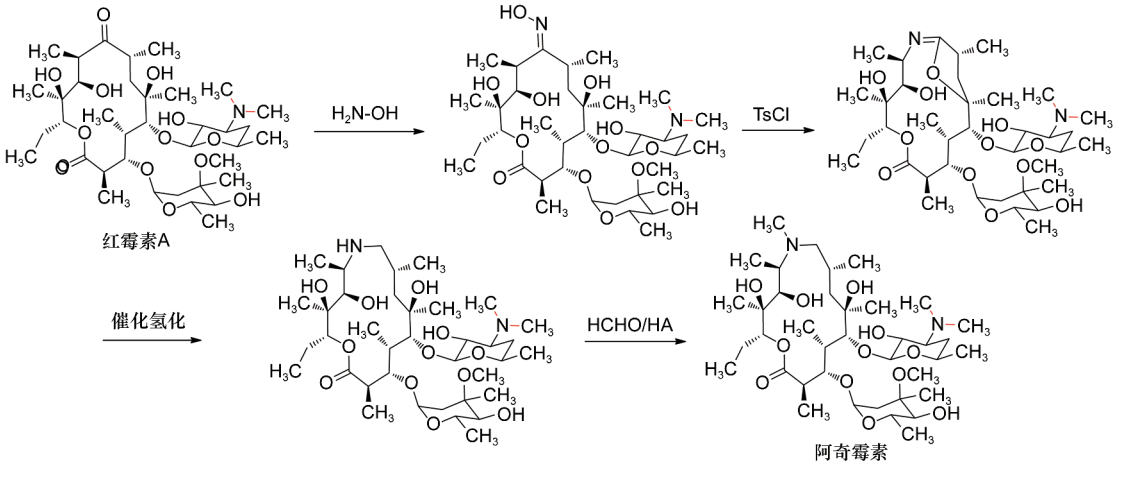


图 1 阿奇霉素合成工艺路线

同时,与雷尼替丁和二甲双胍类似,阿奇霉素 11 位的糖环上存在二甲氨基结构。作为 NDMA 的直接前体物,二甲胺的残留或降解产生二甲胺是 NDMA 产生的重要途径。二甲胺可被氧化生成羟胺,羟胺和二甲胺反应后经氧化得到 NDMA[5],在环境领域中,含二甲胺结构的化合物被认为是 NDMA 的重要前体物[6]。Parr 等[4,7]综述了一些经氯胺化或氧化等途径可生成 NDMA 的药物,这些药物结构都含有二甲胺结构基团。因此一些含有二甲胺结构的药物均有降解产生 NDMA 的风险,如二甲双胍、雷尼替丁等。最后,阿奇霉素肟化反应中以羟胺为肟化试剂,残留的羟胺可直接与降解生成的二甲胺反应,然后氧化生成 NDMA[5]。

鉴于以上 NDMA 风险,对阿奇霉素继续展开氧化降解研究并开发相应的分析方法对产品进行确认性检测。目前已有很多其他药物中 NDMA 检测方法的报道[8-15],主要集中在沙坦类、替丁类和二甲双胍。由于阿奇霉素保留性质及辅料基质不同,色谱及质谱条件并不适用。本文建立了测定阿奇霉素及其制剂中 NDMA 的 HPLC-MS/MS 法,并对市面上 15 个生产厂家的 61 批注射剂中潜在 NDMA 展开测定。

材　　料

1　仪器

Q-trap 6500 + 型液质谱联用仪(配超高效液相色谱仪和三重四极杆线性离子阱复合质谱仪,美国 Sciex 公司);XSE205DU 型电子分析天平(瑞士 Mettler 公司);超纯水机(德国 Merck 公司)。

2　试剂与试药

甲酸(LC-MS 级,批号:197147)、甲醇(LC-MS 级,批号:190983)均购自赛默飞世尔公司;30% 过氧化氢溶液(Merck 公司,批号:108597);试验用水来自 Milli-Q 纯水系统;对照品 NDMA 甲醇溶液(购自 Be Pure 公司,规格:1 002.5 μg·mL^{-1},批号:C0008713)。样品为来自批发经营单位(53%)、医疗使用机构(31%)以及生产企业(16%)3 个领域的阿奇霉素

注射剂 61 批,涉及 15 个生产企业,其中注射用阿奇霉素 46 批,涉及 14 个生产企业,3 种规格(0.125,0.25,0.5 g);阿奇霉素注射液 15 批,涉及 1 个生产企业,3 种规格(2 mL∶0.2 g,2.5 mL∶0.25 g,5 mL∶0.5 g)。

方法与结果

1 色谱与质谱条件

色谱条件:色谱柱 ACE EXCEL C_{18}-AR(100 mm × 4.6 mm,3 μm);流动相:以 0.1% 甲酸的甲醇溶液为流动相 A;0.1% 甲酸的水溶液为流动相 B;梯度洗脱:0 ~ 3 min,A 5%;3 ~ 5 min,A 5% ~ 20%;5 ~ 6 min,A 20% ~ 100%;6 ~ 12 min,A 100%;12 ~ 12.1 min,A 100% ~ 5%;12.1 ~ 22 min,A 5%;柱温 40 ℃;流速:0.5 mL·min^{-1};进样体积 10 μL;样品室温度 10 ℃。

质谱条件:大气压化学电离源(APCI 源);扫描模式:正离子;针电流(NC):3 mA;气帘气(CUR)35 psi;喷撞气(CAD):Medium;温度:350 ℃;喷雾气(GS1):45 psi;去簇电压(DP):20 V;入口电压(EP):10 V;碰撞室出口电压(CXP):9 V;监测模式:MRM;MRM 检测窗:90 s;定量离子对:*m/z* 75→*m/z* 58,碰撞能 CE:16 V;定性离子对:*m/z* 75→*m/z* 43,碰撞能 CE:20 V;Q1 分辨率:Unit,Q3 分辨率:Unit;阀切换:3.6 ~ 6.0 min 进质谱,剩余时间切换至废液。

2 溶液的制备

2.1 对照品溶液的制备 精密量取 NDMA 甲醇溶液适量,加水稀释制成每 1 mL 中约含 10 ng 的对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备 取本品适量,用水溶解并稀释制成每 1 mL 约含阿奇霉素 50 mg 的供试品溶液。

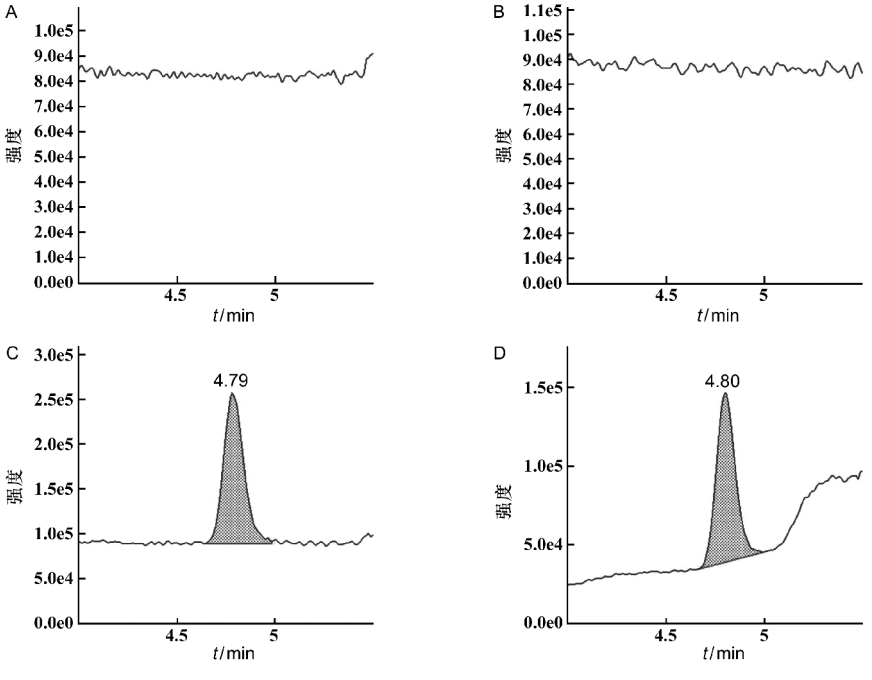
3 氧化降解实验

取阿奇霉素注射用无菌粉末约 500 mg,置于 20 mL 顶空瓶中,精密加入稀释后的 3% 过氧化氢溶液 10 mL,密封后置于 30 ℃ 水浴中放置 24 h。

阿奇霉素经 3% 过氧化氢溶液氧化降解 24 h 后,NDMA 可达 0.1 μg·g^{-1},有氧化降解产生 NDMA 的风险。

4 方法学考察

4.1 专属性 分别进样空白溶液、对照品溶液、供试品溶液,检查空白溶液和样品基质是否有未知峰干扰。结果见图 2,空白溶剂和样品基质不干扰 NDMA 的测定。



A:空白溶液;B:供试品溶液(批号:191013);C:对照品溶液;D:降解溶液

图 2 典型 HPLC-MS/MS 图

4.2 检测限(LOD)与定量限(LOQ) LOD 与 LOQ 是根据信噪比法来确定的。把对照品贮备液稀释到低浓度,以信噪比 >3 时相应的浓度来确定 LOD;以信噪比 >10 时相应的浓度来确定 LOQ。NDMA 的 LOD 与 LOQ 分别为 0.5,1.0 ng·mL^{-1},相当于供试品溶液的 0.01 和 0.02 μg·g^{-1}。分别为限

度值的5%和10%,满足灵敏度要求。定量限溶液连续进样6次,RSD为2.4%,表明该方法在定量限浓度水平具有一定的精密度。

4.3 线性与范围 在LOQ浓度至200%限度浓度范围内取6个浓度点(LOQ,20%,50%,100%,150%,200%)考察线性关系。以待测物浓度为横坐标(C),待测物峰面积为纵坐标(A),按最小二乘法得线性回归方程:$A = 115\,770C + 16\,109$;相关系数r为0.999 6;截距为100%,限度浓度响应值的1.4%。

4.4 精密度 系统重复性:对照品溶液重复进样5次,峰面积RSD($n=5$)为1.3%。方法重复性:平行制备6份供试品溶液(批号:191013),结果均未检出NDMA。向供试品(批号:191013)中加入100%浓度水平的NDMA对照品溶液,平行制备6份,测定结果RSD($n=6$)为1.5%。

表1 加标供试品溶液(批号:191013)测定重复性

序号	加入量/ng·mL^{-1}	测得量/ng·mL^{-1}	回收率/%
1	10.025	9.180	91.6
2		9.469	94.5
3		9.453	94.3
4		9.362	93.4
5		9.279	92.6
6		9.139	91.2

4.5 准确度 向供试品(批号:191013)中加入适量NDMA对照品溶液,配制成LOQ,50%,100%,150%这4个浓度水平的加标供试品溶液。每个浓度平行配制3份。计算回收率($n=12$)。结果见表2。回收率为85.3%~101.6%,平均回收率($n=12$)为93.3%,回收率RSD($n=12$)为5.3%。

表2 回收率测定结果

序号	加入量/ng·mL^{-1}	测得量/ng·mL^{-1}	回收率/%	平均值/%
1	1.002 5	1.019	101.6	94.6
2		0.970	96.8	
3		0.855	85.3	
4	5.012 5	5.083	101.4	93.3
5		4.571	91.2	
6		4.377	87.3	
7	10.025	9.180	91.6	93.4
8		9.469	94.5	
9		9.453	94.3	
10	15.037 5	13.758	91.5	92.0
11		13.618	90.6	
12		14.113	93.9	

5 限度制定

目前共有8个*N*-亚硝胺杂质的日均可接受摄入量(AI)被官方机构公布[2-4]。NDMA被FDA,EMA,NMPA等官方机构公布的AI为96 ng·d^{-1}。阿奇霉素注射剂每日最大用药剂量(MDD)为500 mg。因此以阿奇霉素标示量计,拟定限度为0.2 μg·g^{-1}。

6 样品测定

市面上来自15个生产企业的46批注射用阿奇霉素和15批阿奇霉素注射液中NDMA均小于定量限0.02 μg·g^{-1},说明市面上目前阿奇霉素注射剂中NDMA产生及残留的风险可控。

讨 论

N-亚硝胺风险识别与评估的范围很广,相关指导原则及文献均探讨和总结了亚硝胺杂质潜在形成原因,以帮助识别亚硝胺杂质产生及污染的风险[2-4]。这些原因包括合成工艺副产物、生产过程、物料供应(包括原料、辅料、试剂、回收的溶剂等)、制药用水、包装材料、自身降解产生等各个方面。本文主要从阿奇霉素结构特点和合成路线两方面,结合降解实验,对其中潜在的*N*-亚硝胺杂质风险进行识别。目前FDA是针对化学合成药需进行亚硝胺风险评估;而EMA的评估范围则从最开始的化学合成药扩展到了生物制品,尤其是含化学合成片段的生物制品,如抗体偶联药物,以及包装在含有硝化纤维素泡罩包装中的生物制品等,并提出了明确的时间要求。

目前已有很多文献及指导原则报道了药物中*N*-亚硝胺类杂质的检测方法[8-15],如HS-GC-MS,GC-MS/MS,HPLC-HRMS,HPLC-MS/MS等,测定对象包括了沙坦类、替丁类药物及二甲双胍。由于阿奇霉素的保留特点及其辅料基质不同,其色谱及质谱条件并不适用于阿奇霉素及其制剂中NDMA的测定,尤其是乳糖酸、苹果酸、枸橼酸等辅料保留较弱,易和NDMA共洗脱。目前研究发现亚硝胺杂质的测定易出现假阳性结果[13],尤其是一些本身可能会降解生成亚硝胺杂质的药物,如雷尼替丁、二甲双胍等。这类药物通过气相的分离方法可能会造成偏高的检测结果。因此针对阿奇霉素可能降解产生NDMA的风险,选择建立了HPLC的分离方法,在现有色谱系统基础上,针对阿奇霉素的保留性质以及目前市面上阿奇霉素注射剂中各辅料基质如乳糖酸、苹果酸、枸橼酸等的不同,重新对色谱条件进行

了调整与优化,在优化的梯度洗脱程序下,NDMA 可与阿奇霉素及辅料有效分离,NDMA 出峰时间约在 4.8 min,辅料助溶剂(乳糖酸、苹果酸、枸橼酸等)在 2.5 min 前出峰,阿奇霉素的出峰时间约在 13.2 min,避免了主药及辅料基质对 NDMA 测定的影响。

N-亚硝胺各类化合物中,NDMA 相对分子质量最小,母离子及子离子是 $m/z < 100$ 的低质荷比离子,采集通道里背景噪声较大,且尤其受到离子源气体质量影响,造成低浓度检测困难,建议使用液氮罐气体可进一步提高方法灵敏度。和其他文献报道的不同,本实验在目前气体条件下选择了噪音背景更小的 m/z 75→m/z 58 离子通道对阿奇霉素注射剂中的 NDMA 进行测定,并优化了离子源气体流量、碰撞能等参数,方法准确灵敏,可用于生产企业对阿奇霉素中亚硝胺杂质风险评估的确认性检测与质量控制。

[参 考 文 献]

[1] 国家药监局药审中心. 国家药监局药审中心关于发布《化学药物中亚硝胺类杂质研究技术指导原则(试行)》的通告(2020 年 1 号)[EB/OL]. [2020 - 05 - 08]. https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/qtggtg/20200508160101122.html.

[2] EMA. Assessment report[EB/OL]. [2020 - 07 - 09]. https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/nitrosamines-emea-h-a53-1490-assessment-report_en.pdf.

[3] FDA. Control of nitrosamine impurities in human drugs[EB/OL]. [2020 - 09 - 01]. https://www.fda.gov/media/141720/download.

[4] PARR MK, JOSEPH JF. NDMA Impurity in valsartan and other pharmaceutical products: analytical methods for the determination of *N*-nitrosamines[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, 164: 536 - 549.

[5] ANDRZEJEWSKI P, KASPRZYK-HORDERN B, NAWROCKI J. *N*-nitrosodimethylamine (NDMA) formation during ozonation of dimethylamine-containing waters[J]. *Water Res*, 2008, 42(4 - 5): 863 - 870.

[6] 舒圆媛, 王成坤, 汪隽, 等. 含二甲胺结构化合物消毒生成 NDMA 的特性研究[J]. 给水排水, 2015, 51(5): 118 - 122.

[7] SHEN R, ANDREWS SA. Demonstration of 20 pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) as nitrosamine precursors during chloramine disinfection[J]. *Water Res*, 2011, 45(2): 944 - 952.

[8] 郭常川, 刘琦, 张雷, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定盐酸二甲双胍及其制剂中痕量 *N*-亚硝基二甲胺[J]. 色谱, 2020, 38(11): 1288 - 1293.

[9] 吴兆伟, 杜凯, 王琳, 等. GC-MS 法测定缬沙坦中的 *N*-亚硝基二甲胺[J]. 中国新药杂志, 2019, 28(20): 2478 - 2481.

[10] 葛雨琦, 叶晓霞, 乐健, 等. 厄贝沙坦制剂中 *N*-亚硝胺类基因毒性杂质的 GC-MS/MS 测定[J]. 中国医药工业杂志, 2020, 51(6): 759 - 764.

[11] 李俊, 陈红波, 王英瑛, 等. GC-MS 测定坎地沙坦酯中微量的 *N*-亚硝基二甲胺和 *N*-亚硝基二乙胺[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(13): 1615 - 1620.

[12] 郭常川, 杨书娟, 刘琦, 等. 超高效液相色谱-静电场轨道阱高分辨质谱法测定法莫替丁及其制剂中的痕量 *N*-亚硝基二甲胺[J]. 分析测试学报, 2020, 39(9): 1079 - 1084.

[13] YANG J, MARZAN TA, YE W, *et al*. A cautionary tale: quantitative LC-HRMS analytical procedures for the analysis of *N*-nitrosodimethylamine in metformin[J]. *AAPS J*, 2020, 22: 89 DOI:10.1208/s12248-020-00473-w.

[14] 袁松, 黄海伟, 于颖洁, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定氯沙坦钾和缬沙坦中 7 个亚硝胺类基因毒性杂质[J]. 药物分析杂志, 2021, 41(7): 1218 - 1225.

[15] WOHLFART J, SCHERF-CLAVEL O, KINZIG M, *et al*. The nitrosamine contamination of drugs, part 3: Quantification of 4-Methyl-1-nitrosopiperazine in rifampicin capsules by LC-MS/HRMS[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2021, 203: 114205.

编辑:刘卓越/接受日期:2021 - 08 - 18