

亚硝胺类原料药相关杂质的控制策略分析



李昊^{1#}, 齐前程^{2#}, 张帅³, 孙彩霞²

1. 青岛国信制药有限公司 (山东青岛 266426)
2. 潍坊食品科技职业学院食品与生物工程学院 (山东潍坊 262100)
3. 安丘市检验检测中心有限公司 (山东潍坊 262100)

【摘要】亚硝胺类原料药相关杂质 (NDSRI) 是亚硝胺类杂质中一类特殊的杂质, 与传统小分子亚硝胺杂质不同, NDSRI 与原料药具有结构相似性 (在化学结构中具有原料药或原料药片段), 故每种原料药均有其特有的 NDSRI。自 2023 年 8 月美国食品药品监督管理局首次发布一项关于 NDSRI 的指导原则以来, 此类杂质就越来越受关注。为保障人体用药安全, 必须对 NDSRI 实施严格管控。本文系统阐述了 NDSRI 的形成机制与主要来源, 并分别从风险评估、限度制定、分析方法及清除策略 4 个维度, 深入剖析了其控制策略, 旨在为 NDSRI 的有效治理提供系统性的参考与借鉴。

【关键词】亚硝胺类原料药相关杂质; 控制策略; 风险评估; 限度确定; 分析方法; 清除策略

【中图分类号】 R917

【文献标识码】 A

Analysis of control strategies for nitrosamine drug substance-related impurities

LI Hao^{1#}, QI Qiancheng^{2#}, ZHANG Shuai³, SUN Caixia²

1. Qingdao Guoxin Pharmaceutical Co., Ltd., Qingdao 266426, Shandong Province, China

2. School of Food and Biology Engineering, Weifang Vocational College of Food Science and Technology, Weifang 262100, Shandong Province, China

3. Anqiu Inspection and Testing Center Co., Ltd, Weifang 262100, Shandong Province, China

[#]Co-first authors: LI Hao and QI Qiancheng

Corresponding author: SUN Caixia, Email: scxia.gxj@163.com

【Abstract】The nitrosamine drug substance-related impurities (NDSRI) is a special class of nitrosamine impurities. Unlike traditional small-molecule nitrosamine impurities, NDSRI shares structural similarity to the API (having an API or an API fragment in the chemical structure) and is therefore unique to each API. Since the US Food and Drug Administration firstly issued a guidance on NDSRI in August 2023, this class of impurities has been paid more and more concern. For the safety of human medication, it must be strictly controlled. This article systematically introduced the formation mechanisms and main sources of NDSRI and deeply analyzed the control strategies of NDSRI from 4 dimensions: risk assessment, limit determination, analytical methods and elimination strategies in order to provide systematical references for the effective control of NDSRI.

【Keywords】Nitrosamine drug substance-related impurities; Control strategies; Risk assessment; Limit determination; Analytical methods; Elimination strategies

DOI: 10.12173/j.issn.2097-4922.202602037

[#]共同第一作者

通信作者: 孙彩霞, 硕士, 高级工程师, Email: scxia.gxj@163.com

<https://yxqy.whuzhmedj.com>

亚硝胺类原料药相关杂质 (nitrosamine drug substance-related impurities, NDSRI) 是亚硝胺类杂质中一类特殊的杂质, 与原料药具有结构相似性, 每种原料药含有特有的NDSRI杂质。2020年7月, 世界卫生组织首次通告, 从赛诺菲公司的抗结核药利福平和利福喷丁中分别检出2种NDSRI: 1-甲基-4-亚硝基哌嗪 (1-methyl-4-nitrosopiperazine, MNP) 和1-环戊基-4-亚硝基哌嗪 (1-cyclopentyl-4-nitrosopiperazine, CPNP), 导致利福平、利福喷丁被召回^[1-2]。2021年7月, 辉瑞公司的戒烟药酒石酸伐尼克兰中检出一种NDSRI为N-亚硝基-伐尼克兰, 导致产品被召回^[3]。2022年3月和12月, 因一种NDSRI为N-亚硝基-喹那普利检测超标, 辉瑞公司降压药盐酸喹那普利^[4]和鲁宾公司的降压药喹那普利片^[5]先后被召回。上述因NDSRI超标导致产品被召回事件引起了各国监管机构、制药企业和研究单位对NDSRI的高度重视。不同于小分子亚硝胺杂质, 该类杂质往往缺乏致癌性和致突变性研究数据, 因此无法直接确定可接受摄入量 (acceptable intake, AI) 限度, 这也是该类杂质控制的一大难点。美国食品药品监督管理局 (FDA) 于2023年8月首先发布了关于NDSRI的指导原则——《亚硝胺类原料药相关杂质推荐AI限度行业指导原则 [Recommended acceptable intake limits for nitrosamine drug substance-related impurities (NDSRIs) guidance for industry]》^[6], 该指导原则介绍了根据NDSRI的结构特点预测其潜在致癌性, 并进一步确定AI限度的方法, 为广大研究者提供了思路和借鉴。上述指导原则发布后, 行业内对此类杂质的研究日益增多。我国目前尚无NDSRI专项指导原则, 本文拟以FDA的指导原则为参考, 总结近几年的研究进展, 系统介绍NDSRI形成机制及主要来源, 并从风险评估、限度确定、分析方法和清除策略4个方面详细分析NDSRI的控制策略, 旨在为我国实现NDSRI的有效控制、提升药品质量和保障人体用药安全提供借鉴。

1 NDSRI形成机制及主要来源

1.1 形成机制

NDSRI与原料药结构相似 (杂质结构中具有原料药或原料药片段), 因此每种原料药都有其特有的NDSRI。NDSRI通常由制剂中含有仲胺或

叔胺的原料药或原料药片段, 在接触亚硝化试剂 (如亚硝酸盐、亚硝酰卤化物、亚硝酸酯、三氧化二氮和四氧化二氮) 时发生亚硝化反应形成。亚硝化反应是NDSRI最常见的形成机制, 因任何含氨基的化合物都可能发生亚硝化反应^[7], 如利福平中1种NDSRI为MNP, 由起始物料1-氨基-4-甲基哌嗪接触NaNO₂等亚硝化试剂后, 结构中的-NH₂转化为-NO, 即生成MNP^[2]。

1.2 主要来源

NDSRI可通过多种途径引入, 主要来源有生产工艺、外部污染和降解。

生产工艺引入主要由含仲胺或叔胺的原料药或原料药片段 (起始物料、中间体), 在工艺过程中, 与亚硝化试剂 (可能为主动添加, 也可能由试剂、物料、包材、生产设备、环境等引入) 发生亚硝化反应生成NDSRI, 这也是最主要的来源。

外部污染引入主要由其他物料含有的NDSRI造成终产品的污染, 如起始物料和中间体中含有的NDSRI被引入到原料药或制剂中。

降解途径生成NDSRI主要由原料药本身在生产或储存过程中, 通过高温、高湿、光照、催化、酸、碱等因素作用发生降解生成NDSRI。

2 控制策略

在药品生产、质检、储存全过程都应对NDSRI进行严格控制, 制定控制策略主要从风险评估、限度确定、分析方法和清除方式4个方面入手。

2.1 风险评估

风险评估是控制杂质的前提和基础。NDSRI的引入或产生途径复杂多样, 应根据NDSRI的形成机制及工艺和储存条件, 充分考虑所有潜在来源以进行风险评估, 来源包括起始物料、中间体、原料药、辅料、水/溶剂、试剂/物料、生产设备、环境、不同批次产品交叉污染、包材、产品稳定性等。最常用的风险评估方法是人用药品注册技术要求国际协调会 (ICH) 发布的关于质量风险管理核心指导原则ICH Q9中风险管理的基本方法之一鱼骨图^[8], 具体涉及的风险因素见图1。起始物料、中间体、原料药中主要的风险因素是由于物质本身含有仲胺或叔胺基团, 接触亚硝化试剂发生反应后生成NDSRI; 辅料、水/溶剂、试剂/物料、包材、生产设备、环境中主要的风险因素是存在亚硝酸盐等亚硝化试剂, 其与

药物中的仲胺或叔胺反应生成NDSRI；不同批次产品交叉污染主要是在同一生产线上不同批次的相同产品存在NDSRI残留，造成交叉污染；产品稳定性主要的风险为产品在储存过程中降解生成NDSRI或降解生成含原料药片段的胺类物质，胺与亚硝化试剂发生反应形成NDSRI。

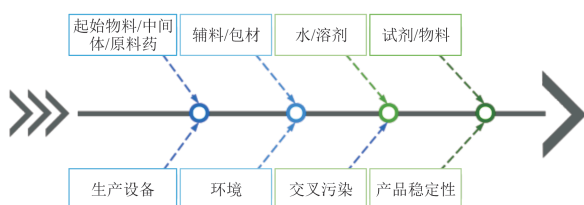


图1 NDSRI的潜在风险因素

Figure 1. Potential risk factors of NDSRIs

根据ICH Q9，风险评估的基本流程为危害源识别→风险分析→风险评价^[8]。以替格瑞洛原料药中的NDSRI为例，李庆等^[9]在分析合成工艺时发现，中间体TG-4、TG-6及原料药中均含有-NH₂-和-NH-，由于合成过程中使用了NaNO₂/CH₃COOH进行重氮环化反应，故TG-4、TG-6及原料药接触NaNO₂后均有生成NDSRI的风险，对应的NDSRI分别为TG-4-NO、TG-6-NO及原料药-NO，三者的AI限度均为18 ng/d，因此TG-4、TG-6、原料药和NaNO₂即为危害源；其通过反应机理分析、试验论证（摸索杂质合成的工艺条件、结构鉴定等）进行风险分析，评估上述3种NDSRI生成的可能性，结果为TG-4-NO和原料药-NO无法合成制备，TG-6-NO会转化为原料药-NO，故3种杂质均无生成的可能性；风险评价是指将已经识别和分析的风险与给定的风险可接受标准进行比较，得出风险评估结果。通过危害源识别和风险分析，TG-4-NO、TG-6-NO及原料药-NO这3种NDSRI均无在工艺中产生的风险，必然低于AI限度。全面的来源预测、充分的风险评估是识别所有潜在NDSRI的关键前提，这一前置性风控策略为产品安全加固屏障。

2.2 限度确定

风险评估的结果（如某杂质无生成风险）可直接作为限度确定的依据，若风险评估显示有生成NDSRI的风险，则需确定AI限度作为可接受标准。NDSRI往往缺乏致癌性和致突变性研究数据，因此无法直接确定AI限度。为解决这一难点，FDA发布的指导原则^[6]介绍了2种确定NDSRI限

度的方法：一种是推荐的预测致癌潜力分类方法（predicted carcinogenic potency categorization approach, PCPCA）；另一种是基于特定化合物评估或替代化合物交叉参照评估方法。

2.2.1 PCPCA法

PCPCA法是一种基于NDSRI的激活和失活结构特征预测NDSRI的致癌性分类，从而确定AI限度的方法。PCPCA法的原理是结合结构-活性关系来确定AI限度^[10-11]；该方法认为 α -羟基化代谢激活机制是导致许多亚硝胺产生致突变性和高致癌性的原因^[12]，含有直接促进或抑制激活机制倾向的结构特征，或具有可通过其他生物途径加快亚硝胺清除的结构特征，均将对NDSRI致癌潜力产生相应的影响。综上所述，可基于NDSRI的结构特征来预测其致突变和致癌潜力。该方法适用于N-亚硝基两侧各结合1个碳原子的NDSRI，这些碳原子不直接通过双键与杂原子连接（如N-亚硝基胺、N-亚硝基脒、N-亚硝基胍及其他类似分子结构均不包括在内），故该方法也不适用于N-亚硝基在芳环结构内的NDSRI（如亚硝基吡啶）。根据PCPCA法，预测的致癌潜力可分为5类，每一类均有对应的AI限度，具体见表1。

图2详细展示了如何运用PCPCA法将NDSRI进行致癌潜力分类，并确定相应的AI限度。对于结构中含有2个或2个以上N-亚硝基的NDSRI，应选择预测致癌潜力最高的基团来确定整个分子的AI限度。

FDA公布了多达284种NDSRI的AI限度，均由PCPCA法得到，以便快速查阅^[14]。其余FDA未公布AI限度的杂质，可参照表1和图2，自行运用PCPCA法确定AI限度。以酒石酸伐尼克兰中的一种NDSRI——N-亚硝基-伐尼克兰为例（结构式见图3）。该杂质分子中不含叔胺 α -碳原子，且每个 α -碳原子上均连有2个氢原子，因此其 α -氢原子分数为1。亚硝基位于1个七元环内，依据结构活性评估规则，该环状结构可使失活性能分数增加1。此外，亚硝基基团两侧各存在1条由 ≥ 5 个连续非氢原子组成的链（可为环状或非环状），但由于2条链位于同一环内且每条链上原子数均不超过4个，因此失活性能分数再增加1。该结构不满足激活性能分数的赋分条件，故激活性能分数为0。按照FDA发布的指导原则，致癌潜力分数= α -H原子分数+失活性能分数+激活性能分

表 1 NDSRI 的 5 种预测致癌潜力分类和相应推荐的 AI 限度

Table 1. The 5 predicted carcinogenic potency categories and associated recommended AI limits for NDSRIs

致癌潜力分类	推荐的 AI 限度 (ng/d)	注解
1	26.5	推荐的 AI 限度为 26.5 ng/d, 致癌性最强、经可靠测试的亚硝酸胺即 <i>N</i> -亚硝基二乙胺的类别特异性限度; 归类为 1 类的 NDSRI, 预测其致癌潜力不应超过亚硝酸胺杂质的类别特异性限度
2	100	推荐的 AI 限度为 100 ng/d, 其代表了 2 种强效的、经可靠测试的亚硝酸胺, 即 <i>N</i> -亚硝基二甲胺和 4-(甲基亚硝酸胺)-1-(3-吡啶)-1-(丁酮), 这 2 种杂质推荐的 AI 限度分别为 96 ng/d 和 100 ng/d; 归类为 2 类的 NDSRI, 预测其致癌潜力不应超过 <i>N</i> -亚硝基二甲胺和 4-(甲基亚硝酸胺)-1-(3-吡啶)-1-(丁酮)
3	400	与 2 类 NDSRI 致癌潜力相比, 这类 NDSRI 的致癌潜力较弱, 可能由于存在较弱的失活结构特征; 推荐的 AI 限度如此设定是为了反映 2 类 NDSRI 的致癌潜力降低了 4 倍
4	1 500	归类为 4 类的 NDSRI 可能通过 α -羟基化途径被代谢激活, 但预测其具有较低致癌潜力, 例如由于空间位阻效应或电子效应, 激活途径受阻或者清除途径通畅。推荐的 AI 限度为 1 500 ng/d 是依据 ICH M7 (R2) 中的毒理学关注阈值确立 ^[13]
5	1 500	由于空间位阻或缺少 α -氢原子, 归类为 5 类的 NDSRI 预测其无法通过 α -羟基化途径代谢激活, 或预测其生成无法与 DNA 反应的不稳定代谢物; 推荐的 AI 限度为 1 500 ng/d 是依据 ICH M7 (R2) 中的毒理学关注阈值确立 ^[13]

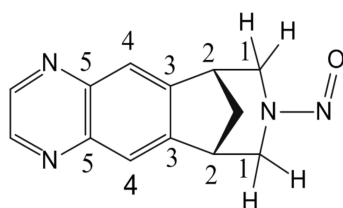
数。经计算, 上述杂质的致癌潜力分数为 3, 对照图 2 中分类标准归属于第 3 类, 故 AI 限度为 400 ng/d。此外, 该指南附录 A 也提供了 2 个案例, 用于示例评分过程及 AI 限值的确定方法^[6]。

上述指导原则同时指出, 推荐的 AI 限度适用于单一 NDSRI 杂质。若产品中检出多个亚硝酸胺杂质 [NDSRI 和 (或) 小分子亚硝酸胺], 且按每日



图 2 预测 NDSRI 致癌潜力分类并确定相应推荐的 AI 限度的流程图

Figure 2. Flowchart to predict the carcinogenic potency category of an NDSRI and identify an associated recommended AI limit

图 3 *N*-亚硝基-伐尼克兰的化学结构式Figure 3. The chemical structure of *N*-nitroso-varenicline

最大剂量折算后, 所有亚硝酸胺杂质的总暴露量超过了其中致癌潜力最高的单个杂质所对应的 AI 限度, 则生产企业或申请人应与监管机构进行沟通。若各亚硝酸胺杂质的推荐 AI 限度差异悬殊, 直接以其中致癌潜力最高者的 AI 限值作为总亚硝酸胺杂质限度的判定依据, 可能缺乏实际可操作性。在此情形下, FDA 鼓励申请人主动与监管机构沟通, 共同探讨针对多杂质情形的限度制定策略。

2.2.2 基于特定化合物评估或替代化合物交叉参照评估

如“2.2.1”项所述, 通过 PCPCA 法制定 AI 限度并不适用于所有 NDSRI, 主要存在以下 2 种例外情形: 其一, 部分 NDSRI 的化学结构不适用该评估方法, 例如 *N*-亚硝基基团通过双键直接与碳原子连接的化合物; 其二, 产品中单个或多个 NDSRI 的含量水平已超出 FDA 推荐的 AI 限度。因此, 上述指导原则给出另外 2 种确定 AI 限度的方法, 即基于特定化合物的评估和基于替代化合物的交叉参照评估, 以拟定替代 AI 限度^[6]。基于特定化合物评估应获得特定化合物的安全性数据, 如致突变性数据 (可通过 Ames 试验得到)^[15-16]; 基于替代化合物的交叉参照评估, 其核心思路是依据替代化合物为 NDSRI 推导一个合理的 AI 限度。该 AI 限度是基于该替代化合物对应十万分之一的癌症风险水平确定, 其数值可能高于通过 PCPCA 法计算所得的 AI 限度。FDA 建议选择具备可靠致癌性数据的替代化合物进行交叉参照评估。然而, FDA 同时指出, 在实际操作中, 通常难以找到一种能够充分代表目标 NDSRI 结构特征与作用机制且经过可靠毒理学测试的亚硝酸胺类替代化合物。因此, FDA 推荐了几种具有

较可靠的致突变和致癌性数据的亚硝胺化合物，可作为替代化合物，如：*N*-亚硝基二甲胺、*N*-亚硝基哌啶、4-(甲基亚硝胺)-1-(3-吡啶基)-1-丁酮、*N*-亚硝基吡咯烷和 *N*-亚硝基吗啉^[17]。研究者可参照基于特定化合物的评估或替代化合物交叉参照评估所确定的 AI 限度来制定目标 NDSRI 的 AI 限度。但无论采用上述何种方法，均需充分论证所拟定替代 AI 限度的科学合理性，并将相关研究资料提交监管机构审评。

2.3 分析方法

NDSRI 的分析方法可参照小分子亚硝胺类杂质建立，常见的分析方法有气相色谱 (GC) 法、液相色谱 (LC) 法、气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 法和液相色谱-质谱联用 (LC-MS) 法。为

便于研究者建立 NDSRI 的分析方法，FDA 与欧洲药品监督管理局 (EDQM) 均已公布部分药品中 NDSRI 的相关分析方法，代表性方法汇总见表 2。

虽然目前国内尚无关于 NDSRI 的指导原则，但近 3 年，国内研究者已对此类杂质的分析方法开展了积极探索，所采用的技术手段以 LC 法和 LC-MS 法为主，部分已报道的分析方法概况见表 3。

2.3.1 LC 法

有研究者采用 HPLC 法测定地氯雷他定口服溶液中一种 NDSRI 亚硝胺地氯雷他定^[26]。采用的检测器为紫外检测器，流动相为十二烷基硫酸钠溶液和乙腈的混合溶液，该方法定量限和检测限分别为 5 ng/mL 和 1 ng/mL，灵敏度较高，且专属性和精密度均良好，检测结果准确可靠，为地

表 2 FDA 和 EDQM 公布的部分 NDSRI 分析方法

Table 2. Analytical methods for parts of NDSRIs issued by FDA and EDQM

监管部门	分析方法	杂质名称	结构式	涉及药品	检测限 (ng/mL)	定量限 (ng/mL)	线性范围 (ng/mL)
FDA	LC-ESI-HRMS ^[18]	MNP		利福平	0.3	0.5	0.5-200
		CPNP		利福喷丁	0.1	0.5	0.5-200
	LC-ESI-HRMS ^[19]	<i>N</i> -亚硝基-布美他尼 (<i>N</i> -nitroso-bumetanide)		布美他尼原料药及制剂	0.5	1.0	1.0-1 000
	LC-ESI-HRMS ^[20]	<i>N</i> -亚硝基-普萘洛尔 (<i>N</i> -nitroso-propranolol)		盐酸普萘洛尔口服溶液	0.03	0.1	0.1-50
	LC-ESI-HRMS ^[21]	<i>N</i> -亚硝基-伐尼克兰 (<i>N</i> -nitroso-varenicline)		酒石酸伐尼克兰原料药及制剂	0.1	0.5	0.5-100
EDQM	GC-MS/MS ^[22]	西格列汀杂质 78 (nitroso-STG-19)		西格列汀片/二甲双胍片	0.005	0.2	0.5-100
	LC-MS/MS ^[23]	<i>N</i> -亚硝基-雷米普利 (<i>N</i> -nitroso-ramipril)		雷米普利片	—	—	0.08-8.0
	LC-MS/MS ^[24]	<i>N</i> -亚硝基-度洛西汀 (<i>N</i> -nitroso-duloxetine)		度洛西汀	—	—	—
	LC-MS/MS ^[25]	<i>N</i> -亚硝基-舍曲林 (<i>N</i> -nitroso-sertraline)		舍曲林	—	—	—

注：“—”表示文献中未提及；LC-ESI-HRMS：液相色谱-电喷雾电离-高分辨质谱法；LC-MS/MS：液相色谱-串联质谱法。

表 3 国内研究者报道的部分 NDSRI 分析方法
Table 3. Analytical methods for parts of NDSRIs reported by domestic researchers

分析方法	杂质名称	结构式	检测限 (ng/mL)	定量限 (ng/mL)	线性范围 (ng/mL)	准确度 (%)	重复性 (%)
LC [26]	亚硝胺地氯雷他定		1	5	5~48	89.9	1.16
LC-MS/MS [27]	N-亚硝基-伐尼克兰		0.014	0.046	0.10~10.04	原料药 92.00~103.58; 片剂 91.53~93.01	原料药 2.88; 片剂 4.14
LC-MS/MS [28]	2-(1-亚硝基哌啶-4-基)-1H-苯并咪唑		0.006	0.02	0.2~4.0	100.98	1.89
	1-(2-乙氧基乙基)-2-(1-亚硝基哌啶-4-基)-1H-苯并咪唑		0.006	0.02	0.2~4.0	101.25	0.91
LC-MS/MS [29]	N-亚硝基-伯氨喹		0.03	0.10	0.10~16.10	95.0~99.0	4.1
LC-HRMS [30]	A		—	1.56	2~16	—	—
	B		—	1.56	2~16	—	—
	C		—	1.56	2~16	—	—
LC-HRMS [31]	N-亚硝基-伏硫西汀		0.02	0.05	0.20~40.61	98.8~101.7	2.3
LC-HRMS [32]	N-亚硝基-托莫西汀		0.01	0.03	0.10~100.04	98.9~101.2	2.8

注：“—”表示文献中未提及；LC-HRMS：液相色谱-高分辨质谱联用法。

氯雷他定口服溶液的质量控制和临床用药的安全性检测提供参考。LC法虽具有操作简捷、重复性好等优点，但灵敏度有限，通常难以满足大多数亚硝胺杂质微量或痕量的检测要求，故并未得到普及。

2.3.2 LC-MS法

LC-MS法具有高灵敏度，这一点很好地弥补

了LC法的缺陷，适用于基因毒性杂质的检测。近3年内报道的NDSRI的分析方法中，LC-MS/MS和LC-HRMS为LC-MS法中2种主要的分析技术。

LC-MS/MS法可减少基质干扰造成的假阴性（离子抑制）或假阳性（共流出物或同位素干扰）发生，从而提高测试准确性，已成为一种较成熟

的分析技术在基因毒性杂质领域广为应用。袁松等^[27]建立了超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)测定酒石酸伐尼克兰原料药和片剂中*N*-亚硝基-伐尼克兰。MS法采用电喷雾离子源正离子扫描(ESI⁺)和多反应监测定量模式。方法检测限和定量限分别为0.014 ng/mL和0.046 ng/mL;原料药的回收率为92.00%~103.58%;片剂的回收率为91.53%~93.01%。该方法灵敏度和准确度高,同时适用于测定酒石酸伐尼克兰原料药和片剂中*N*-亚硝基-伐尼克兰。陈小伟等^[28]建立了UPLC-MS/MS法测定比拉斯汀中2个NDSRI。MS法为ESI⁺和选择反应监测模式。结果显示,2个NDSRI定量限均为0.02 ng/mL,检测限均为0.006 ng/mL;平均回收率分别为101.0%和101.3%,RSD分别为1.0%和1.3%。该方法灵敏度高,专属性、线性与范围、重复性、准确度等参数均满足测试要求,为比拉斯汀中NDSRI的控制与研究提供了有益借鉴。韦梦瑶等^[29]建立了UPLC-MS/MS法检测磷酸伯氨喹原料药中一种NDSRI *N*-亚硝基-伯氨喹(2种异构体合并定量)。MS法同样为ESI⁺和多反应监测定量模式。结果显示,该法在0.10~16.10 ng/mL浓度范围内线性关系良好,呈现较宽的线性范围;检测限和定量限分别为0.03 ng/mL和0.1 ng/mL,灵敏度较高;3个浓度水平的平均回收率为95.0%~99.0%,RSD为1.3%~1.9%,准确度较高。该方法可作为磷酸伯氨喹中*N*-亚硝基-伯氨喹的质控方法,为规范、强化磷酸伯氨喹的质量提供了依据。LC-MS/MS法虽已成熟地应用于检测NDSRI乃至基因毒性杂质,但其分辨率较低的固有缺陷仍可能造成同质异位素干扰,从而降低测试准确性,这一点不容忽视。

LC-HRMS是将液相色谱与高分辨质量分析器(如飞行时间质谱、静电场轨道阱质谱)联用的分析技术。该法具有分辨率高、分析速度快等优势,可有效弥补LC-MS/MS法在定性能力和未知物筛查方面的不足,近年来已越来越多地应用于基因毒性杂质的检测。有研究^[30]建立了一种基于HPLC-HRMS同时检测伐尼克兰中间体中3种NDSRI(分别命名为A、B、C,结构式见表3)的方法。MS法采用ESI⁺模式,定量分析以平行反应监测模式进行。3种杂质的定量限均为1.56 ng/mL;线性浓度范围均为2~16 ng/mL($r \geq 0.9950$)。该法体现出较强的专属性,避免假阳性杂质的检

出,检测灵敏度较高,可实现伐尼克兰中间体中3种NDSRI的简单、快速、稳定、准确检测,可有效控制和提升伐尼克兰中间体的质量,进而保障用药安全。郭常川等^[31]采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用法分别测定了氢溴酸伏硫西汀片和盐酸托莫西汀胶囊^[32]中的NDSRI。MS法均为ESI⁺和平行反应监测定量模式。以氢溴酸伏硫西汀片中的*N*-亚硝基伏硫西汀及盐酸托莫西汀胶囊中的*N*-亚硝基-托莫西汀为研究对象,开展了NDSRI分析方法验证。结果显示,*N*-亚硝基-伏硫西汀的检测限和定量限分别为0.02 ng/mL和0.05 ng/mL;线性范围为0.20~40.61 ng/mL($r > 0.9999$),线性关系良好;3个浓度水平下的平均回收率为98.8%~101.7%,RSD为2.2%~3.4%;*N*-亚硝基-托莫西汀的检测限和定量限分别为0.01 ng/mL和0.03 ng/mL,在0.10~100.04 ng/mL浓度范围内线性关系良好($r = 0.9999$);3个浓度水平的平均回收率为98.9%~101.2%,RSD为1.3%~2.4%。上述2种方法专属性、精密度和灵敏度均良好,可准确可靠地测定各自药品中的NDSRI,已应用于山东省内两种药品的检测。部分批次中*N*-亚硝基-伏硫西汀超标,*N*-亚硝基-托莫西汀有检出但未超标。该结果为药监部门加强监管和排查风险提供了数据支持。LC-HRMS法也被纳入监管机构的收录范围,如FDA发布了采用LC-ESI-HRMS技术测定不同药品中NDSRI的方法,部分方法见表2。LC-HRMS法凭借其高分辨率、高灵敏度、快速分析及结果准确等优势,能够很好地满足基因毒性杂质的检测需求。该方法有望成为未来基因毒性杂质分析的主要技术手段之一,并在NDSRI检测领域获得更广泛的应用。

无论监管机构公布或是研究者报道的方法,NDSRI的现行主流分析方法为LC-MS法,其可作为首选分析方法,但最终选择何种分析方法,尚需研究者综合杂质的结构与性质、控制限度、基质复杂程度、仪器灵敏度和精密度、实验室条件等各方面因素确定。

2.4 清除策略

由于NDSRI的致癌性和致突变性极强,对人体易造成很大的危害,再加上限度低,清除和测试难度大,故“避免为主,控制为辅”应成为针对此类杂质的清除策略^[33-37]。“避免为主”策略

的核心在于提前预防 NDSRI 的产生, 这种预防理念应贯穿于药品研发生产的各个阶段, 包括原辅料及包材的选择、生产工艺的设计与优化、物料与试剂的回收利用、生产设备的选型、生产环境条件的控制、生产操作过程的规范性管理, 以及清洁工艺的开发与优化等。可基于 ICH Q9^[8] 中的理念, 采用科学合理的风险评估方法对生产工艺进行全面评估, 尽量避免使用可能生成 NDSRI 的物料、试剂、包材等, 如避免使用亚硝化试剂等。

“控制为辅”则指在经全面风险评估后仍无法避免 NDSRI 产生的情况下, 应当系统分析杂质的成因与来源, 并采取物料替换、试剂替换、生产设备更换、包材更换、生产工艺优化、清洁工艺优化、储存条件改善等综合性措施, 以尽可能清除已生成的 NDSRI 或减少其残留量, 确保产品中 NDSRI 的最终残留量控制在规定的 AI 限度以下。有研究^[38]在酒石酸伐尼克兰原料药的制备工艺中, 通过避免使用亚硝化试剂并结合打浆处理, 有效控制了产品中 NDSRI 的残留量。检测结果显示, 原料药中 2 种 NDSRI 未检出, 另 1 种 NDSRI 含量低于 AI 限度的 10%, 表明该策略可显著降低 NDSRI 的残留风险。还有研究^[39]在达肝素钠的制备工艺中, 由于无法避免使用亚硝酸钠进行解聚以获得低分子量产品, 遂在工艺中引入紫外光照射并加入过氧化氢, 利用紫外光致消去原理及过氧化氢产生的羟基自由基的强氧化性, 实现对 N-NO 基团的彻底清除。经此处理, 所有批次产品中均未检出 NDSRI, 成功消除了亚硝胺类杂质的残留风险。另有研究^[40]在维格列汀制备过程中, 通过优化产品纯化工艺来降低 NDSRI 的残留量。该工艺将维格列汀粗品与混合溶剂混合后, 通过加入酸和碱调节体系 pH 值, 再经升温、降温、过滤及干燥等步骤, 制得终产品。检测结果显示, 经纯化后终产品中 NDSRI 含量均低于规定限度。上述 3 个案例分别采用了 3 种不同的清除策略, 均达到了预期的控制效果, 对比结果见表 4。酒石酸伐尼克兰的合成工艺中通过规避亚硝化试剂的使用, 贯彻“避免为主”策略, 将 3 种 NDSRI 残留量均控制在极低的水平。相比之下, 维格列汀仅通过优化纯化工艺实施“控制为辅”策略, NDSRI 虽可降至限度以下, 但仍有检出, 表明“避免为主”策略在残留控制方面更具优势。达肝素钠因工艺中必须使用亚硝

酸钠进行解聚, 故只能采用“控制为辅”策略, 通过优化制备工艺实现 NDSRI 清除。综合上述分析, “控制为辅”策略通常需额外引入抑制或清除 NDSRI 的试剂、物料或设备, 必然增加工艺复杂性与生产成本, 因此更适用于无法避免使用亚硝化试剂的工艺场景。而“避免为主”策略无需对既有工艺进行重大调整, 具有经济性好、操作简便等优势, 尤其适用于起始物料、中间体及原料药本身无亚硝化风险的工艺路线, 应作为 NDSRI 杂质清除的优先策略。

表 4 不同清除策略比较

Table 4. Comparison of different elimination strategies

产品名称	清除策略	清除方式	清除效果 (检测结果)
酒石酸伐尼克兰	避免	避免使用亚硝化试剂	2 种 NDSRI 未检出, 1 种低于 10% 限度
达肝素钠	控制	优化制备工艺	未检出 NDSRI
维格列汀	控制	优化纯化工艺	低于限度

3 结语

本文介绍了 NDSRI 形成机制及主要来源, 并从风险评估、限度确定、分析方法和清除策略 4 个方面详细分析了 NDSRI 的控制策略, 旨在为实现药品中 NDSRI 的有效控制、提升药品质量和保障人体用药安全提供借鉴。NDSRI 的控制策略制定中, 存在以下四大难点: 第一, 限度制定不合理, 采用 PCPCA 法制定的 AI 限度超过 FDA 推荐的 AI 限度^[41], 或拟定的替代 AI 限度缺少合理性证明; 第二, 部分 NDSRI 缺少杂质对照品, 为杂质鉴定和开发准确的定量方法带来困难; 第三, 缺少普适性的分析方法, 尽管 FDA 和 EDQM 发布了一些分析方法, 但大多为 LC-MS/MS 法或 LC-HRMS 法, 采用的仪器如质谱仪, 尤其是高分辨质谱仪的采购和维护成本较高, 对于预算有限的单位是一项不小的挑战; 第四, 也是最为关键的一点, 我国目前尚未出台针对 NDSRI 的专项指导原则, 相关研究报道亦较为有限, 研究者缺乏系统的研究依据与明确的指引方向。企业在限度确定方面应加强与监管机构的沟通交流; 如无市售 NDSRI 对照品, 研究者应尝试自行制备对照品; 国家可在仪器购买方面给予政策支持, 使高分辨质谱仪逐渐普及。随着我国国家药监局积极与国际接轨, 参与 ICH M7 亚硝胺杂质亚组对于亚硝胺杂质的国际协调工作, 我国也终究会拥有属于自己的 NDSRI

相关的指导原则。随着上述四大难点的逐步解决, NDSRI 的研究基础将不断夯实。未来, 被发现或被检出的 NDSRI 种类或将进一步增加, 研究者应制定科学合理的 NDSRI 控制策略, 持续为提升药品质量与保障公众用药安全提供有力支撑。

参考文献

- 1 WHO. Nitrosamine concerns for rifapentine and rifampicin[EB/OL]. (2020-10-23) [2026-02-12]. <https://extranet.who.int/prequal/news/nitrosamine-concerns-rifapentine-and-rifampicin>.
- 2 董晨欢, 龚青, 张新房. 利福平和利福喷丁中亚硝胺类杂质控制策略综述[J]. 中国新药杂志, 2024, 33(1): 23-27. [Dong CH, Gong Q, Zhang XF. Control strategies for nitrosamine impurities in rifampin and rifapentin [J]. Chinese Journal of New Drugs, 2024, 33(1): 23-27.] DOI: 10.3969/j.issn.1003-3734.2024.01.004.
- 3 FDA. FDA alerts health care professionals and patients to a voluntary recall of varenicline (Chantix) to the warehouse level[EB/OL]. (2021-07-02) [2026-02-12]. <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-updates-and-press-announcements-nitrosamine-varenicline-chantix>.
- 4 FDA. Pfizer voluntary nationwide recall of lots of ACCUPRIL® (quinapril HCl) due to *N*-nitroso-quinapril content[EB/OL]. (2022-04-22) [2026-02-12]. <https://www.fda.gov/safety/recalls-market-withdrawals-safety-alerts/pfizer-voluntary-nationwide-recall-lots-accupril-quinapril-hcl-due-n-nitroso-quinapril-content>.
- 5 FDA. Lupin Pharmaceuticals, Inc. issues voluntary nationwide recall of four lots of quinapril tablets due to potential presence of *N*-nitroso-quinapril impurity[EB/OL]. (2022-12-21) [2026-02-12]. <https://www.fda.gov/safety/recalls-market-withdrawals-safety-alerts/lupin-pharmaceuticals-inc-issues-voluntary-nationwide-recall-four-lots-quinapril-tablets-due>.
- 6 FDA. Recommended acceptable intake limits for nitrosamine drug substance-related impurities (NDSRIs) guidance for industry[EB/OL]. (2023-08-07) [2026-02-12]. <https://www.fda.gov/media/170794/download>.
- 7 López-Rodríguez R, McManus JA, Murphy NS, et al. Pathways for *N*-nitroso compound formation: Secondary amines and beyond[J]. Org Process Res Dev, 2020, 24(9): 1558-1585. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.0c00323>.
- 8 ICH. ICH Q9(R1): Quality risk management[EB/OL]. (2023-01-18) [2026-02-12]. https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_Q9%28R1%29_Guideline_Step4_2025_0115_0.pdf.
- 9 李庆, 王琳, 熊学武, 等. 替格瑞洛中亚硝胺类杂质研究[J]. 中国药物化学杂志, 2023, 33(4): 260-269. [Li Q, Wang L, Xiong XW, et al. Study on the nitrosamine impurities in ticagrelor[J]. Chinese Journal of Medicinal Chemistry, 2023, 33(4): 260-269.] DOI: 10.14142/j.cnki.cn21-1313/r.2023.04.003.
- 10 Thresher A, Gosling JP, Williams R. Generation of TD₅₀ values for carcinogenicity study data[J]. Toxicol Res, 2019, 8(5): 696-703. <https://doi.org/10.1039/c9tx00118b>.
- 11 Thresher A, Foster R, Ponting DJ, et al. Are all nitrosamines concerning? A review of mutagenicity and carcinogenicity data[J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2020, 116: 104749. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2020.104749>.
- 12 Li Y, Hecht SS. Metabolic activation and DNA interactions of carcinogenic *N*-nitrosamines to which humans are commonly exposed[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(9): 4559. <https://doi.org/10.3390/ijms23094559>.
- 13 ICH. ICH M7(R2): Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk[EB/OL]. (2023-04-03) [2026-02-12]. https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_M7%28R2%29_Guideline_Step4_2023_0216_0.pdf.
- 14 FDA. Recommended acceptable intake limits for nitrosamine drug substance-related impurities (NDSRIs) [EB/OL]. (2025-05-02) [2026-02-12]. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/cder-nitrosamine-impurity-acceptable-intake-limits>.
- 15 Li X, Le Y, Seo JE, et al. Revisiting the mutagenicity and genotoxicity of *N*-nitroso propranolol in bacterial and human in vitro assays[J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2023, 141: 105410. DOI: 10.1016/j.yrtph.2023.105410.
- 16 OECD. Test no. 471 bacterial reverse mutation test: OECD guidelines for the testing of chemicals, section 4[EB/OL]. (2020-06-29) [2026-02-12]. https://www.oecd.org/en/publications/test-no-471-bacterial-reverse-mutation-test_9789264071247-en.html.
- 17 International Agency for Research on Cancer (IARC). Monographs on the identification of carcinogenic hazards to humans: list of classifications[EB/OL]. (2026-02-11) [2026-02-12]. <https://monographs.iarc.who.int/list-of-classifications>.
- 18 FDA. Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-ESI-HRMS) method for the determination of MNP in rifampin and CPNP in rifapentine drug substance and drug product[EB/OL]. (2020-09-02) [2026-02-12]. <https://www.fda.gov/media/142092/download?Attachment>.
- 19 FDA. Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-ESI-HRMS) method for the determination of *N*-nitroso-bumetanide in bumetanide drug products and drug substance[EB/OL]. (2024-02-23) [2026-02-12]. <https://www.fda.gov/media/175550/download?attachment>.
- 20 FDA. Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) method for the determination of *N*-nitroso-propranolol in propranolol hydrochloride oral solution[EB/OL]. (2019-09-13) [2026-02-12]. <https://www.fda.gov/media/175551/download?attachment>.
- 21 FDA. Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-ESI-HRMS) method for the determination of varenicline nitroso-drug substance related impurity (NDSRI) in Chantix™ drug product and varenicline drug substance[EB/OL]. (2021-08-06) [2026-02-12]. <https://www.fda.gov/media/151470/download?attachment>.
- 22 OMCL. GC-MS/MS analytical procedures for the determination of NTP in sitagliptin/sitagliptin/metformin tablets [EB/OL]. (2023-11-20) [2026-02-12]. <https://www.edqm.eu/documents/52006/1925123/>

- Method+for+the+determination+of+NTTP+in+Sitagliptin+Sitagliptin+Metformin+tablets+method+for+determination+of+NTTP+in+Sitagliptin+and+Sitagliptin. pdf/8f37f0af-eb68-363e-e4ba-d19ed682deaf?t=1707293734605.
- 23 OMCL. LC-MS/MS analytical procedures for the determination of *N*-nitroso-ramipril in ramipril tablets[EB/OL]. (2022-10-25) [2026-02-12]. <https://www.edqm.eu/documents/52006/1925123/LGL+method+-+LC-MS+MS+method+for+the+determination+of+N-Nitroso-Fluoxetine+in+Fluoxetine+tablets. pdf/c2d4b277-be30-d2d1-fd6c-733f97a77d86?t=1707294155615>.
- 24 OMCL. LC-MS/MS analytical procedure for determination of *N*-nitroso-duloxetine in duloxetine preparations[EB/OL].(2024-03-28) [2026-02-12]. https://www.edqm.eu/en/d/1937124? p_l_back_url=%2Fen%2Fsearch%3Fq%3DDetermination%2Bof%2BN-nitroso%2Bduloxetine%2Bin%2Bduloxetine%2Bpreparations%2Bwith%2BLC-MS.
- 25 OMCL. LC-MS/MS analytical procedure for the determination of *N*-nitroso-sertraline in sertraline preparations[EB/OL]. (2024-03-28) [2026-02-12]. https://www.edqm.eu/en/d/1937204? p_l_back_url=%2Fen%2Fsearch%3Fq%3DDetermination%2Bof%2BN-nitroso%2Bduloxetine%2Bin%2Bduloxetine%2Bpreparations%2Bwith%2BLC-MS.
- 26 北京修正创新药物研究院有限公司. 一种药物中亚硝胺类杂质的检测方法: 中国专利, 202411493795.4[P]. 2024-12-27.
- 27 袁松, 黄海伟, 张龙浩, 等. UPLC-MS/MS测定酒石酸伐尼克兰中基因毒性杂质*N*-亚硝基伐尼克兰[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(9): 1219-1223. [Yuan S, Huang HW, Zhang LH, et al. Determination of genotoxic impurity *N*-nitrosovarenicline in varenicline tartrate by UPLC-MS/MS[J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2023, 40(9): 1219-1223.] DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20221220.
- 28 陈小伟, 郝泽华, 卢红华, 等. 比拉斯汀中两个亚硝胺药物相关杂质的UPLC-MS/MS法检查[J]. 中国医药工业杂志, 2025, 56(12): 1566-1569. [Chen XW, Hao ZH, Lu HH, et al. Determination of two nitrosamine drug substance-related impurities in bilastine by UPLC-MS/MS[J]. Chinese Journal of Pharmaceuticals, 2025, 56(12): 1566-1569.] DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2025.12.010.
- 29 韦梦瑶, 黄勤, 刘树增, 等. UPLC-MS/MS法测定磷酸伯氨喹原料药中*N*-亚硝基伯氨喹基因毒性杂质[J]. 广东化工, 2025, 52(16): 117-119. [Wei MY, Huang Q, Liu SZ, et al. Determination of *N*-nitrosoprimaquine genotoxic impurities in primaquine phosphate API by UPLC-MS/MS[J]. Guangdong Chemical Industry, 2025, 52(16): 117-119.] DOI: 10.3969/j.issn.1007-1865.2025.016.035.
- 30 上海皓鸿生物医药科技有限公司. 一种伐伦克林中间体中亚硝胺类基因毒性杂质的检测方法: 中国专利, 202111418224.0[P]. 2024-01-30.
- 31 郭常川, 文松松, 张连义, 等. 超快速静电场轨道阱高分辨质谱联用测定氢溴酸伏硫西汀片中的亚硝胺杂质[J]. 分析试验室, 2026, 45(2): 213-218. [Guo CC, Wen SS, Zhang LY, et al. Determination of nitrosamine impurities in vortioxetine hydrobromide tablets by ultra-fast orbital high resolution mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2026, 45(2): 213-218.] DOI: 10.13595/j.cnki.issn1000-0720.2024091301.
- 32 郭常川, 程春雷, 尹晔, 等. 超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用法测定盐酸托莫西汀胶囊中的基因毒性杂质*N*-亚硝基托莫西汀[J]. 药物分析杂志, 2025, 45(12): 2107-2115. [Guo CC, Cheng CL, Yin T, et al. Determination of genotoxic impurity *N*-nitroso atomoxetine in atomoxetine hydrochloride capsules by ultra high-performance liquid chromatography-Q-orbitrap high-resolution mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2025, 45(12): 2107-2115.] DOI: 10.16155/j.0254-1793.2024-1352.
- 33 国家药品监督管理局药品审评中心. 化学药物中亚硝胺类杂质研究技术指导原则(试行)[EB/OL]. (2020-05-08) [2026-02-12]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/776b663787ec5a60ac744071c3714d5a>.
- 34 The European Medicines Agency (EMA). Nitrosamine impurities in human medicines [EB/OL].(2025-07-08) [2026-02-12]. https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/report-european-medicines-regulatory-networks-response-nitrosamine-impurities-human-medicines_en.pdf.
- 35 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. [Ye Q, Geng XC, Zhang HZ, et al. Regulatory strategies and reflections on genotoxic impurities of nitrosamines[J]. Chinese Pharmaceutical Affairs, 2021, 35(2): 127-137.] DOI: 10.16153/j.1002-7777.2021.02.002.
- 36 田冶, 陶晓莎, 冯媛媛, 等. 化学药品中的遗传毒性杂质的质量控制[J]. 中国抗生素杂志, 2024, 49(1): 13-25. [Tian Y, Tao XS, Feng YY, et al. Quality control of genotoxicity impurities in chemicals[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2024, 49(1): 13-25.] DOI:10.13461/j.cnki.cja.007624.
- 37 丁嘉信, 李荣荣, 史乙伟, 等. 药品中亚硝胺类杂质研究概述[J]. 中国当代医药, 2025, 32(6): 187-192. [Ding JX, Li RR, Shi YW, et al. Overview of research on nitrosamine impurities in drugs[J]. China Modern Medicine, 2025, 32(6): 187-192.] DOI: 10.3969/j.issn.1674-4721.2025.06.40.
- 38 威智医药有限公司, 山东威智中科药业有限公司. 低亚硝胺杂质含量的酒石酸伐尼克兰原料药及其制备方法: 中国专利, 202110961275.1[P]. 2023-04-04.
- 39 重庆望业药物研究有限公司. 不含亚硝胺杂质的达肝素钠及其制备方法: 中国专利, 202311247382.3[P]. 2024-01-09.
- 40 威智医药股份有限公司, 山东威智中科药业有限公司, 山东威智百科药业有限公司. 一种低亚硝胺杂质含量的维格列汀及其纯化方法: 中国专利, 202211185859.5[P]. 2024-04-05.
- 41 陈美灵, 周植星. FDA “亚硝胺类药物相关杂质推荐可接受摄入量限度行业指导原则”的介绍和启示[J]. 药物评价研究, 2025, 48(6): 1403-1410. [Chen ML, Zhou ZX. Introduction and implications of FDA's Recommended Acceptable Intake Limits for Nitrosamine Drug Substance-Related Impurities Guidance for Industry[J]. Drug Evaluation Research, 2025, 48(6): 1403-1410.] DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.06.003.

收稿日期: 2026年02月13日 修回日期: 2026年04月15日
本文编辑: 钟巧妮 洗静怡