

## 仿制药中遗传毒性杂质的研究进展

孙百浩, 李文龙, 关皓月\*, 许鸣镛\*

中国食品药品检定研究院 化学药品检定所, 北京 102629

**【摘要】**我国是仿制药大国,在整个化学药品市场中仿制药占比约三分之二,其质量控制尤为重要。杂质控制是药品质量控制的重要一环,仿制药在杂质控制方面不仅要关注其参比药物中存在的杂质,更应结合实际生产工艺确定可能存在的需要加以控制的杂质。近年来,行业内对于仿制药中遗传毒性杂质的关注度不断提升。本文在宏观上对遗传毒性杂质的来源、检测方法等进行总结,以期对行业内的仿制药研发分析提供参考。

**【关键词】**仿制药;遗传毒性杂质;亚硝胺类;检测方法

**【中图分类号】**R927.11

**【文献标识码】**A

**【文章编号】**1672-3384(2022)02-0008-05

**Doi:**10.3969/j.issn.1672-3384.2022.02.002

### Research progress of genotoxic impurities in generic drugs

SUN Bai-hao, LI Wen-long, GUAN Hao-yue\*, XU Ming-di\*

Institute for Chemical Drug Control, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China

**【Abstract】**China is a big country producing generic drugs, with generic drugs accounting for about two-thirds of the whole chemical drug market. The quality control in generic drugs is particularly important. Impurity control is an important part of drug quality control. In terms of impurity control for generic drugs, we should not only pay attention to the impurities in the reference drugs, but also determine the possible impurities that need to be controlled according to the actual production process. In recent years, the industry has been increasingly concerned about genotoxic impurities in generic drugs. This article presents the sources and detection methods of genotoxic impurities in a macroscopic perspective, so as to provide a reference for the research and development of generic drugs in the industry.

**【Key words】**generic drug; genotoxic impurity; nitrosamines; detection method

仿制药是指具有与参比药品相同的活性成分、剂型、规格、适应证、给药途径和用法用量的原料药及其制剂<sup>[1]</sup>。我国仿制药市场巨大,截至2020年仿制药市场规模约8087亿元,虽受疫情影响较2019年有所下滑,但仍是国内医药消费市场的主体<sup>[2]</sup>。药品在临床使用中产生的不良反应除了与药品本身的药理活性有关外,同时与药品中存在的杂质也有很大关系<sup>[3]</sup>。某些药物特别是多手性中心药物中异构体杂质的存在有时会影响其药物疗效<sup>[4]</sup>。此外,致突变杂质与其他杂质相比对人体的危害更大<sup>[5]</sup>。因此,仿制药中杂质的准确定位及研究分析对于确保药品的安全、有

效、均一、稳定具有重要意义。

仿制药由于原料来源、辅料种类和生产工艺与参比有所差异,可能导致与参比制剂的杂质不尽相同,因此仿制药的杂质控制不仅需要关注其参比药物质量标准中的杂质谱,更需要结合实际的生产路线进行分析。综合分析,仿制药的杂质来源主要包括<sup>[6]</sup>:①由起始原料引入的杂质,即根据起始原料的合成路线及结构推测起始原料中可能存在的杂质;②根据合成路线、反应条件及药物结构,推测在合成过程中可能产生的副产物、降解产物、残留溶剂等;③在药物贮藏过程中产生的降解产物、聚合产物等。近年来,行业

基金项目:中国食品药品检定研究院中青年发展研究基金资助项目(2019G1)

\*通信作者:关皓月, E-mail:guanhaoyue@nifdc.org.cn;许鸣镛, E-mail:xumingdi@nifdc.org.cn

内对于仿制药中遗传毒性杂质的关注度不断提升。本文对遗传毒性杂质的来源及其检测方法等进行总结,以期对行业内的仿制药研发分析提供参考。

## 1 遗传毒性杂质的来源

遗传毒性杂质,又叫基因毒性杂质,指经过适当的遗传毒性实验模型,如细菌基因突变(Ames)实验,证实具有遗传毒性的杂质<sup>[7]</sup>,包括致突变性杂质和其他类型的无致突变性杂质。致突变性杂质指在较低水平时也有可能直接引起DNA损伤,导致DNA突变,从而可能引发癌症的遗传毒性杂质<sup>[8]</sup>。本文所涉及的遗传毒性杂质主要指致突变性杂质。

遗传毒性杂质主要来源于2个方面<sup>[9]</sup>:通过合成过程引入的,即合成的遗传毒性杂质;由降解产生的物质,即遗传毒性降解剂。2020年国家药品审评中心发布了《化学药品中亚硝胺类杂质研究技术指导原则(试行)》<sup>[10]</sup>,明确要结合原料药因素和制剂因素等综合分析确定待研究的基因毒性杂质及来源,参照人用药品注册技术要求国际协调理事会(International Council for Harmonization, ICH)指导原则M7(ICH M7)及毒理学研究数据等拟定合理的限度等。

## 2 遗传毒性杂质的分类

ICH M7根据致突变性和致癌性将遗传毒性杂质分为5类:①已知致突变致癌物;②致癌性未知的已知致突变物;③有与原料药结构无关的警示结构,无致突变性数据;④有警示结构,且与经测试无致突变性的原料药及其相关化合物具有相同的警示结构;⑤无警示结构,或虽有警示结构但有充分的数据证明无致突变性或无致癌性。遗传毒性杂质的警示结构指杂质结构中存在某些特殊基团或者亚单位,这些特殊的结构可能会导致人体的遗传物质发生改变,进而产生基因毒性<sup>[11]</sup>。常见的遗传毒性杂质警示结构见图1<sup>[12]</sup>。遗传毒性杂质根据其警示结构可以分为苯胺类、酰卤类、醛类、亚硝胺类、卤代烃类、磺酸酯类以及环氧化合物等,该分类方法在实际检测过程中广泛应用。

对于无法获得具体分类数据的遗传毒性杂质,ICH M7允许采用计算机毒理学(定量)构-效关系[(Q)SAR]方法对目标杂质进行毒性评估以预测其细菌致突变实验的结果。该指导原则允许通过2种互补的(Q)SAR预测方法(一种是基于专家知识规则,另一种是基于统计学)进行杂质的潜在基因毒性预测,并基于预测结果进行杂质分类。如果2个互补的(Q)

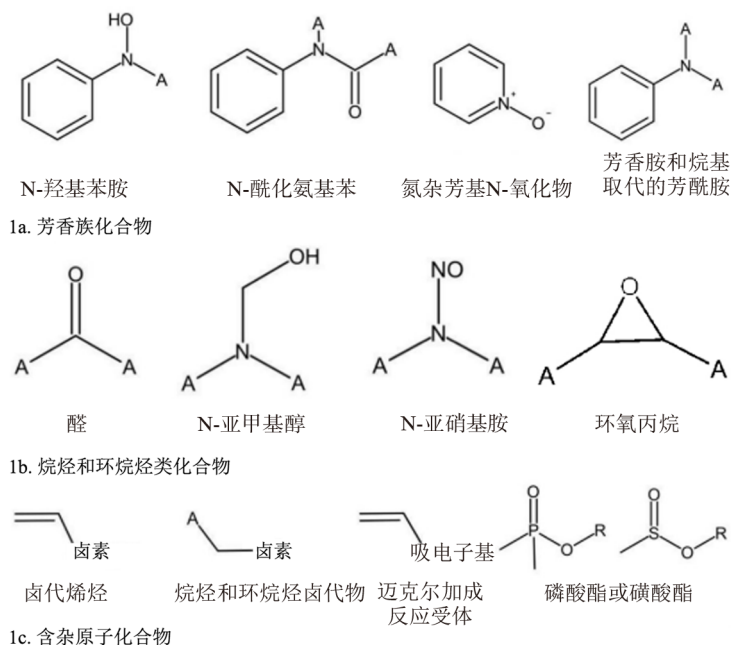


图1 常见的遗传毒性杂质警示结构

SAR 方法均没有警示结构,则足以说明该杂质没有致突变忧虑,为遗传毒性杂质分类中的第5类,不建议做进一步的检测。

本研究采用互补的 Derek Nexus 和 Sarah Nexus 软件对利伐沙班合成过程中可能产生的杂质进行了遗传毒性预测,结果显示其具有遗传毒性概率较低,并且在基于统计学的 Sarah Nexus 中,明确其产物利伐沙班不具有遗传毒性,因此可将利伐沙班合成过程中产生的与其具有相同警示结构的杂质归为第4类。

### 3 遗传毒性杂质的限度

杂质限度是鉴定原辅料及其制剂中杂质含量是否合格的关键指标,一般杂质限度应按照最低合理可行(as low as reasonable practicable, ALARP)的原则,根据其活性、稳定性、分析方法等因素制定。

为明确遗传毒性杂质在药品中的限度,ICH 引入了可接受摄入量的概念。可接受摄入量指每人每日摄入一定量的遗传毒性杂质,其患癌风险可以忽略时的最大量。

基于毒性学关注阈值(threshold of toxicological concern, TTC)计算可接受摄入量时,致突变性杂质的最大摄入量在 1.5  $\mu\text{g}/\text{d}$  时被认为是风险可控的。这一计算方法一般用于长期给药药物中存在的第2类、第3类遗传毒性杂质。如果某些杂质没有 TTC,但具有充分的致癌性数据,可采用半数中毒剂量(median

toxic dose,  $\text{TD}_{50}$ )线性外推法来计算可接受摄入量。不同治疗时间药品中遗传毒性杂质的可接受摄入量具体要求见表1。

表1 不同治疗时间药品中遗传毒性杂质的可接受摄入量( $\mu\text{g}/\text{d}$ )

治疗时间(月)	单个杂质日摄入量	多个杂质日总摄入量
$\leq 1$	120.0	120.0
$> 1 \sim \leq 12$	20.0	60.0
$> 12 \sim \leq 120$	10.0	30.0
$> 120$	1.5	5.0

### 4 亚硝胺类遗传毒性杂质

亚硝胺类杂质是遗传毒性杂质的重要组成之一。2020年9月美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)发布的《人用药物中亚硝胺杂质控制指南》<sup>[13]</sup>对常见的亚硝胺类杂质控制提供参考。

FDA 已经确定了7种理论上可能存在于药品中的亚硝胺杂质:N-亚硝基二甲胺、N-亚硝基二乙胺、N-亚硝基-N-甲基-4-氨基丁酸、N-亚硝基异丙基乙胺、N-亚硝基甲基苯胺、N-亚硝基二异丙胺和亚硝基二丁胺,其结构见图2。其中前5种实际上已在原料药或药品中检测到<sup>[13]</sup>。为保障公众用药安全, FDA对其中6种杂质的可接受摄入量限度提出了建议,见表2。

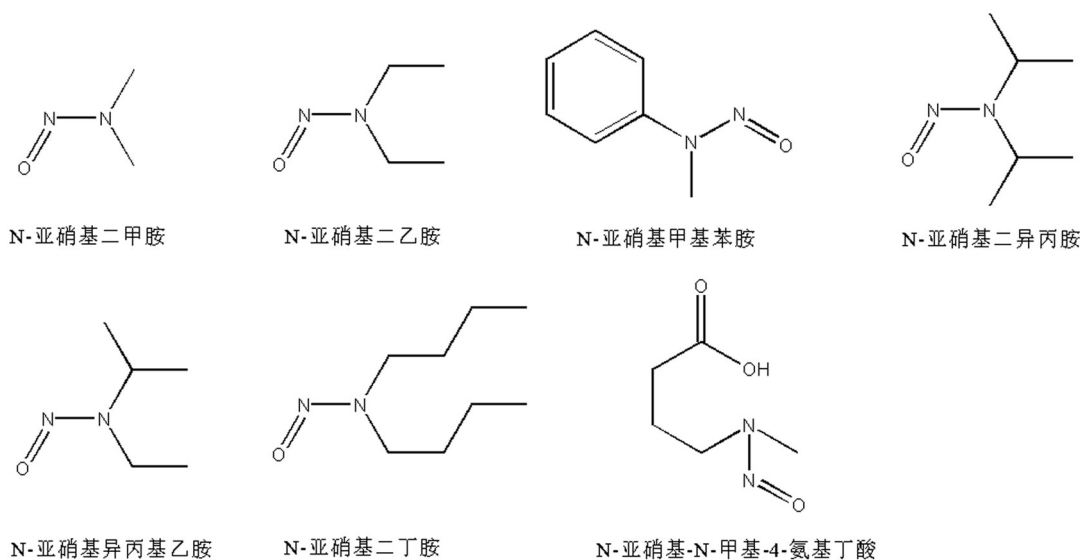


图2 7种理论上可能存在于药品中的亚硝胺杂质结构

表2 6种亚硝胺杂质可接受摄入量限度(ng/d)

杂质名称	可接受摄入量限度
N-亚硝基二甲胺	96.0
N-亚硝基二乙胺	26.5
N-亚硝基-N-甲基-4-氨基丁酸	96.0
N-亚硝基甲基苯胺	26.5
N-亚硝基异丙基乙胺	26.5
N-亚硝基二异丙胺	26.5

注:以上数据为美国食品药品监督管理局对6种亚硝胺杂质可接受摄入量限度的建议

## 5 遗传毒性杂质的检测方法及应用进展

致突变性遗传毒性杂质在较低水平即有可能引起DNA损伤,因此药物中的遗传毒性杂质必须严格控制在接受水平。

刘博等<sup>[14]</sup>率先在国内建立了基于高效液相色谱-高分辨质谱联用检测药物中可能存在的7种亚硝胺杂质的方法。张岩琛等<sup>[15]</sup>采用高效液相色谱-三重四极杆质谱法成功测定了盐酸雷尼替丁胶囊中N-亚硝基二甲胺的含量;王璐等<sup>[16]</sup>建立了气相色谱-串联质谱法测定芬地杓酸左旋氯哌斯汀中N-亚硝基二甲胺和N-亚硝基二乙胺含量的方法;邵伍军等<sup>[17]</sup>采用超高效液相色谱-三重四极杆质谱建立了N-亚硝基-N-甲基-4-氨基丁酸的测定方法,用于厄贝沙坦及其复方制剂中N-亚硝基-N-甲基-4-氨基丁酸的检测。

特戊酰氯是一种重要的酰化试剂,其存在酰卤警示结构,因此可视为潜在的遗传毒性杂质。而其作为酰化试剂,在某些药物合成过程中难以避免会残留。为更好地检测药物中残留的特戊酰氯,廖文婷等<sup>[18]</sup>建立了一种柱前衍生化高效液相色谱法测定特戊酰氯

的方法,用于艾拉莫德中特戊酰氯残留量的检测。

陈忆铃等<sup>[19]</sup>为更好地检测甲磺酸中甲磺酸烷基酯类杂质,在研究《欧洲药典》方法的基础上,通过改变前处理条件,采用液液萃取-气相色谱串联质谱技术成功对甲磺酸中3种遗传毒性杂质进行检测。Zacharis等<sup>[20]</sup>采用较气相色谱串联质谱法操作更为简便的高效液相色谱法检测了阿瑞匹坦中苯基磺酸酯类遗传毒性杂质对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸异丙酯。李丹等<sup>[21]</sup>对烷基或苯基磺酸酯类杂质检测方法进行总结,并采用离子色谱法,以常规C<sub>18</sub>色谱柱对三氟甲酸酯类杂质进行检测,其较常规的阴离子交换柱更加经济、便于操作。

沙坦类药物如缬沙坦、厄贝沙坦在合成过程中可能会产生N-亚硝基二甲胺、叠氮沙坦联苯或叠氮沙坦联苯四氮唑等具有明显警示结构的遗传毒性杂质。徐艳梅等<sup>[22]</sup>采用高效液相色谱串联质谱法成功检测了厄贝沙坦原料药及其片剂中的3种亚硝胺类遗传毒性杂质,汤伟彬等<sup>[23]</sup>使用高效液相色谱-三重四极杆质谱法实现了对叠氮沙坦联苯或叠氮沙坦联苯四氮唑类遗传毒性杂质的检测。Gričar等<sup>[24]</sup>建立了一种简便可靠的梯度高效液相色谱法来测定厄贝沙坦、坎地沙坦、缬沙坦中叠氮化物的含量,并且采用了流通池较长的检测器,灵敏度比常规流通池高10倍。

FDA也推荐了许多药品中遗传毒性杂质如利福平中的遗传毒性杂质1-甲基-4-亚硝基哌嗪、利福喷丁中的遗传毒性杂质1-环戊基-4-亚硝基哌嗪的检测方法<sup>[25]</sup>,以供行业参考。

在总结相关政策和文献基础上,按待测物结构对遗传毒性杂质采取不同的检测方法,具体方法见表3<sup>[14-29]</sup>。

表3 不同结构遗传毒性杂质的检测方法

结构类型	检测方法
苯胺类	具有紫外吸收,一般采用HPLC、HPLC-MS等
酰卤类	活泼性强,难以直接测定,一般衍生化后采用HPLC-MS、GC-MS等
醛类	衍生化处理(如肟、羟胺)后采用HPLC等
亚硝胺类	一般采用HPLC-MS、HPLC-MS/MS、GC-MS
卤代烃类	挥发性卤代烃可采用气相色谱-电子俘获检测器、GC-MS;非挥发性卤代烃可采用HPLC、HPLC-MS等
磺酸酯类	HPLC,前处理后采用GC-MS等
环氧化物	HPLC、HPLC-MS,具有挥发性的可采用GC检测
叠氮化物	HPLC、HPLC-MS/MS

注:HPLC表示高效液相色谱法;HPLC-MS表示高效液相色谱串联质谱法;GC-MS表示气相色谱串联质谱法;MS表示质谱法;GC表示气相色谱法



综上所述,在药品研发过程中,杂质的研究始终贯穿于药品研发全过程,并在药品发展过程中不断完善。杂质控制也是目前仿制药研发中的重点和难点。仿制药不能仅依靠参比制剂标准进行杂质的考察,还要结合产品本身,基于源头控制和过程控制理念,对杂质谱建立全面的分析。随着遗传毒性杂质研究的不断深入,毒性杂质与一般有机杂质同样在杂质谱中占据重要的地位,这也成为行业内普遍研究的热点。ICH M7针对遗传毒性杂质做出了明确的分类及限度要求,在此基础上,确定合理的满足限度要求的检测方法是研究过程中的重点和难点。通过建立完善的仿制药杂质控制体系,制定合理的杂质控制策略,保证产品的有效可控,最终保障人民的用药安全。

### 【参考文献】

- [1] 国家食品药品监督管理总局. 化学药品注册分类改革工作方案[EB/OL]. (2016-03-16) [2021-09-01]. <https://view.officeapps.live.com/op/view.aspx?src=https%3A%2F%2Fwww.nmpa.gov.cn%2Fdirectory%2Fweb%2Fmpa%2Fimages%2FMjAxNsTqt-do1MbrFuau45ri9vP4uZG9j.doc&wdOrigin=BROWSELINK>.
- [2] 中国医学科学院药物研究所, 中国医药工业信息中心, 中国食品药品检定研究院. 中国仿制药蓝皮书 2021 版[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2020: 4-5.
- [3] 《化学药物杂质研究的技术指导原则》课题研究组. 化学药物杂质研究的技术指导原则[EB/OL]. (2005-03-18) [2021-09-01]. <https://www.cde.org.cn/zdyz/domesticinfopage?zdyzldCODE=33d2dd6c1dd4b7b0c3771dbc23d0f4b6>.
- [4] 罗恒真, 张均平, 兰月香, 等. 高效液相色谱法测定氯霉素碱的对映异构体杂质[J]. 广东化工, 2020, 47(16): 161-162.
- [5] 胡昌勤. 化学药品杂质控制的现状与展望[J]. 中国科学: 化学, 2010, 40(6): 679-687.
- [6] 刘敏, 薛红霞, 李晓宇. 原料药有机杂质分析与研究流程[J]. 北方药学, 2013, 10(8): 13.
- [7] 汪生, 杭太俊. 药物中基因毒性杂质检测策略的研究[J]. 中国新药杂志, 2019, 28(23): 2840-2846.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2020年版第四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [9] Liu DQ, Kord AS. Analytical challenges in stability testing for genotoxic impurities[J]. Trends Anal Chem, 2013, 49(3): 108-117.
- [10] 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) [2021-09-01]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/776b663787ec5a60ac744071c3714d5a>.
- [11] 马磊, 马玉楠, 陈震, 等. 遗传毒性杂质的警示结构[J]. 中国新药杂志, 2014, 23(18): 2106-2111.
- [12] 张芮腾, 青旺旺, 廖星星, 等. 药物中基因毒性杂质检测方法研究进展[J]. 中国医院药学杂志, 2021, 41(3): 327-332.
- [13] Center for Drug Evaluation and Research. Control of Nitrosamine Impurities in Human Drugs Guidance for Industry [EB/OL]. (2020-09-02) [2021-09-01]. <https://www.fda.gov/media/141720/download>.
- [14] 刘博, 张佟, 黄露, 等. 液相-高分辨质谱技术测定盐酸二甲双胍缓释片中7种亚硝胺杂质的方法学研究[J]. 中国药物警戒, 2021, 18(5): 454-458, 468.
- [15] 张岩琛, 刘晓强. LC-MS/MS法测定盐酸雷尼替丁胶囊中的N-亚硝基二甲胺[J]. 华西药学杂志, 2021, 36(4): 463-465.
- [16] 王璐, 刘峰. 气相色谱-串联质谱法测定芬地杵酸左旋氯哌斯汀中N-亚硝基二甲胺和N-亚硝基二乙胺含量[J]. 中国药业, 2021, 538(15): 81-85.
- [17] 邵伍军, 和燕玲, 李佳丽, 等. 厄贝沙坦及其复方制剂中痕量杂质N-亚硝基-N-甲基-4-氨基丁酸残留方法学研究[J]. 中兽医医药杂志, 2021, 226(1): 46-49.
- [18] 廖文婷, 李嘉欣, 郑枫. 柱前衍生化HPLC法检测艾拉莫德中特戊酰氯的残留量[J]. 中国药师, 2020, 23(3): 590-592.
- [19] 陈亿铃, 冯江江, 杨海雪, 等. GC-MS法测定甲磺酸中3种甲磺酰烷基酯类遗传毒性杂质[J]. 中国药科大学学报, 2020, 51(4): 472-478.
- [20] Zacharis CK, Vastardi E. Application of analytical quality by design principles for the determination of alkyl p-toluenesulfonates impurities in aprepitant by HPLC. Validation using total-error concept[J]. J Pharm Biomed Anal, 2018, 150: 152-161.
- [21] 李丹, 王淑君, 姚慧敏, 等. 离子色谱法测定氟达拉滨中三氟甲磺酰酯类遗传毒性杂质[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(20): 2557-2560.
- [22] 徐艳梅, 韩彬, 闫凯, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时检测厄贝沙坦原料药及其制剂中3种N-亚硝胺类基因毒性杂质[J]. 药物分析杂志, 2021, 41(4): 720-725.
- [23] 汤伟彬, 蔡强, 刘杰, 等. 一种沙坦类药物合成中杂质的检测方法: 广东省, CN112415107A[P]. (2021-02-26) [2021-09-01]. <https://kns.cnki.net/kns8/defaultresult/index>.
- [24] Gričar M, Andrenšek S. Determination of azide impurity in sartans using reversed-phase HPLC with UV detection[J]. J Pharm Biomed Anal, 2016, 125: 27-32.
- [25] 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) [2021-09-01]. <https://www.fda.gov/media/142092/download>.
- [26] 叶晓霞, 吴静雯, 乐健, 等. 富马酸替诺福韦二吡啶酯中基因毒性杂质溴乙烷的GC-MS/MS法测定[J]. 中国医药工业杂志, 2018, 49(12): 1701-1704.
- [27] 张霁, 张英俊, 聂颢. 药物研发中基因毒性杂质的控制策略与方法探索进展[J]. 中国医药工业杂志, 2018, 49(9): 1203-1220.
- [28] 宋凡, 宋晓妮, 王磊, 等. 酒石酸伐尼克兰中6个类苯胺基因毒性杂质的LC-MS法测定[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(1): 130-134.
- [29] 阮晓玲, 郑项元, 徐洁, 等. 药物中基因毒性杂质分析方法的研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2016, 47(3): 267-274.

收稿日期: 2021-09-28

本文编辑: 任洁