

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.19.016

高效液相色谱串联质谱法检测阿奇霉素原料药及其制剂中 6种 *N*-亚硝胺类基因毒性杂质*

郝丽娟¹,徐艳梅¹,高燕霞^{1△},刘峰²,崔巧利²

(1. 河北省药品医疗器械检验研究院·仿制药质量控制与评价重点实验室,河北 石家庄 050227; 2. 石药集团中奇制药技术
<石家庄>有限公司·河北省制技工程技术研究中心·新型药物制剂与辅料国家重点实验室,河北 石家庄 050035)

摘要:目的 建立同时测定阿奇霉素原料药及其制剂中 *N*-亚硝基二甲胺(NDMA)、*N*-亚硝基-*N*-甲基-4-氨基丁酸(NMBA)、*N*-亚硝基二乙胺(NDEA)、*N*-亚硝基乙基异丙胺(NEIPA)、*N*-亚硝基二异丙胺(NDIPA)、*N*-亚硝基二丁胺(NDBA) 6种 *N*-亚硝胺类基因毒性杂质含量的高效液相色谱串联质谱(HPLC-MS/MS)法。方法 色谱柱为 ACE Excel 3 C₁₈-AR 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-0.1% 甲酸水溶液(梯度洗脱),流速为 0.6 mL/min,离子源为大气压化学电离(APCI)源,采用多反应监测(MRM)模式。结果 NDMA, NMBA 和 NDEA, NEIPA, NDIPA, NDBA 的质量浓度分别在 0.48~48.00 ng/mL 和 0.13~13.25 ng/mL 范围内与峰面积线性关系良好($r > 0.995$, $n = 6$); NDMA, NMBA, NDEA, NEIPA, NDIPA, NDBA 的检测限分别为 0.16, 0.16, 0.04, 0.04, 0.04, 0.04 ng/mL, 定量限分别为 0.49, 0.48, 0.13, 0.13, 0.13, 0.13 ng/mL; 精密度、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 2.0% ($n = 6$); 平均加样回收率分别为 90.50%, 90.43%, 93.36%, 99.30%, 96.09%, 98.59%, RSD 分别为 3.01%, 6.02%, 3.30%, 2.78%, 4.45%, 5.34% ($n = 9$)。结论 该方法操作简便、灵敏度高、结果准确、专属性强,可用于阿奇霉素原料药及其制剂中 6 种 *N*-亚硝胺类基因毒性杂质的含量测定。

关键词:阿奇霉素;高效液相色谱串联质谱法;*N*-亚硝胺类;基因毒性杂质;含量测定

中图分类号:R927.2;R978.1

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)19-0077-04

Determination of Six *N*-Nitrosamine Genotoxic Impurities in Azithromycin API and Its Preparations by HPLC-MS/MS

HAO Lijuan¹, XU Yanmei¹, GAO Yanxia¹, LIU Feng², CUI Qiaoli²

(1. Hebei Institute for Drug and Medical Device Control · Key Laboratory for Quality Control and Evaluation of Generic Drug, Shijiazhuang, Hebei, China 050227; 2. CSPC Zhongqi Pharmaceutical Technology < Shijiazhuang > Co., Ltd · Hebei Pharmaceutical Engineering & Technology Research Center · State Key Lab. of Novel Pharmaceutical Preparations and Excipients, Shijiazhuang, Hebei, China 050035)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method for the simultaneous determination of six *N*-nitrosamine genotoxic impurities in azithromycin active pharmaceutical ingredient (API) and its preparations, including *N*-nitrosodimethylamine (NDMA), *N*-nitroso-*N*-methyl-4-aminobutyric acid (NMBA), *N*-nitrosodiethylamine (NDEA), *N*-nitroso-ethyl-isopropylamine (NEIPA), *N*-nitrosodi-*n*-butylaniline (NDIPA) and *N*-nitrosodibutylamine (NDBA). **Methods** The chromatographic column was ACE Excel 3 C₁₈-AR column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol-0.1% formic acid aqueous solution (gradient elution), the flow rate was 0.6 mL/min, the ion source was atmospheric pressure chemical ionization (APCI) source, and the multiple reaction monitoring (MRM) mode was adopted. **Results** The linear range of NDMA and NMBA was 0.48-48.00 ng/mL, and that of NDEA, NEIPA, NDIPA and NDBA was 0.13-13.25 ng/mL ($r > 0.995$, $n = 6$). The limits of detection (LOD) of NDMA, NMBA, NDEA, NEIPA, NDIPA and NDBA were 0.16, 0.16, 0.04, 0.04, 0.04 and 0.04 ng/mL respectively, and the limits of quantification (LOQ) of the above components were 0.49, 0.48, 0.13, 0.13, 0.13 and 0.13 ng/mL respectively. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were lower than 2.0% ($n = 6$). The average recoveries of NDMA, NMBA, NDEA, NEIPA, NDIPA and NDBA were 90.50%, 90.43%, 93.36%, 99.30%, 96.09% and 98.59% with RSDs of 3.01%, 6.02%, 3.30%, 2.78%, 4.45% and 5.34% respectively ($n = 9$). **Conclusion** The method is simple, sensitive, accurate and specific, which can be used for the determination of six *N*-nitrosamine genotoxic impurities in azithromycin API and its preparations.

Key words: azithromycin; HPLC-MS/MS; *N*-nitrosamine; genotoxic impurity; content determination

阿奇霉素是首个十五元环大环内酯类抗菌药物, 霉素 A, 由红霉素 A 经过肟化、贝克曼重排、还原、甲基
化学名为 9a-甲基-9-脱氧-9a-氮杂-9a-同环 化等一系列反应制备而成^[1-2], 主要用于治疗呼吸道、

*基金项目:河北省中央引导地方科技发展资金项目[216Z4802G]。

第一作者:郝丽娟,女,硕士研究生,工程师,研究方向为药品质量控制,(电子信箱)454369979@qq.com。

△通信作者:高燕霞,女,硕士研究生,主任药师,研究方向为药品质量控制,(电子信箱)657968434@qq.com。

软组织、泌尿系统疾病及皮肤感染等,疗程短,副作用少^[3]。基因毒性杂质是可以造成基因突变或体内诱变的物质,痕量即可引起癌变、畸变^[4]。缬沙坦、雷尼替丁、二甲双胍中先后检出 N -亚硝胺类基因毒性杂质,《世界卫生组织国际癌症研究机构致癌物清单》已将多个 N -亚硝胺类化合物归为A类致癌物质。其产生的原因可能与工艺过程、降解途径、污染引入等有关^[5-6]。阿奇霉素的11位糖环上存在二甲胺基结构,是典型基因毒性杂质的警示结构,且原料药的合成过程存在亚胺类中间体,易通过氧化等途径引入基因毒性杂质^[7-8]。起始原料红霉素A和阿奇霉素注射剂中均检出亚硝胺类基因毒性杂质 N -亚硝基二甲胺(NDMA)^[9-10]。我国为全球重要生产国和出口国,国家药品监督管理局网站公布的600多种阿奇霉素药物的注册申报和出口都需要对其 N -亚硝胺类杂质进行研究,但目前未见关于检测阿奇霉素药物中 N -亚硝胺类杂质的相关研究。参照各国药品监管机构发布的 N -亚硝胺类基因毒性杂质的通用检查方法^[11]并参考文献^[12-14],本研究中建立了测定阿奇霉素原料药及其制剂中6种 N -亚硝胺类基因毒性杂质的高效液相色谱串联质谱(HPLC-MS/MS)法,方法灵敏度高、结果准确,为有效控制阿奇霉素及其制剂中的基因毒性杂质提供了依据。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

岛津LC-30AD型高效液相色谱仪(日本岛津公司);SCIEX ATRAP 6500型质谱仪(美国AB公司);XS105型电子天平(瑞士Mettler Toled公司,精度为十万分之一);Milli-Q型纯水制造系统(美国Millipore公司)。

1.2 试剂

NDMA对照品(TMstandard公司,批号为1681903,含量以99.9%计); N -亚硝基- N -甲基-4-氨基丁酸(NMBA)对照品(批号为51-KFA-33-1,含量以100%计), N -亚硝基二乙胺(NDEA)对照品(批号为50-GHZ-66-1,含量以100%计),均购自加拿大TRC公司; N -亚硝基乙基异丙胺(NEIPA)对照品(批号为D10252828,含量以100%计), N -亚硝基二异丙胺(NDIPA)对照品(批号为D10252827,含量以100%计), N -亚硝基二丁胺(NDBA)对照品(批号为D10252829,含量以100%计),均购自HIC公司;甲醇(色谱纯,德国默克股份有限公司);水为超纯水。抽检样品:阿奇霉素(原料药,批号分别为108200513,108200514,108200518);阿奇霉素肠溶片(批号为FAR2901005);阿奇霉素胶囊(批号为21012001);阿奇霉素干混悬剂(批号为207210201)。

2 方法与结果

2.1 色谱与质谱条件

2.1.1 色谱条件

色谱柱:ACE Excel 3 C₁₈-AR柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:0.1%甲酸水溶液(A)-甲醇(B),梯度洗脱(洗脱程序见表1);流速:0.6 mL/min;柱温:40℃;进样量:10 μL。

表1 流动相梯度洗脱程序(%)

Tab.1 Program of gradient elution of mobile phase (%)

时间	流动相A	流动相B	时间	流动相A	流动相B
0 min	98	2	10.0 min	80	20
3.0 min	98	2	13.0 min	98	2
5.0 min	80	20	15.0 min	98	2
8.0 min	5	95			

2.1.2 质谱条件

电离模式:正离子;离子源:大气压化学电离(APCI)源;监测模式:多反应监测(MRM);中性(NC)电流:3 mA;气帘气(CUR):206.8 kPa;雾化气(GS1):241.3 kPa;离子源温度:350℃。6种 N -亚硝胺类基因毒性杂质的保留时间及质谱分析参数见表2。

表2 6种 N -亚硝胺类基因毒性杂质的保留时间及质谱分析参数

Tab.2 Retention time and HPLC-MS/MS parameters of the six N -nitrosamine genotoxic impurities

杂质	保留时间(min)	子离子对(m/z)	锥孔电压(V)	碰撞电压(V)
NDMA	6.92	75.1→58.1/75.1→43.1*	37/37	16.0/19.5
NDEA	10.10	103.1→75.1*/103.1→47.1	37/37	15.0/18.0
NMBA	9.15	147.1→117.2*/147.1→44.2	14/14	8.5/8.5
NEIPA	10.54	117.1→47.1/117.1→75.0*	35/35	17/16
NDIPA	10.86	131.1→47.1/131.1→89.1*	35/35	17/11
NDBA	11.63	159.2→41.1/159.2→57.1*	30/35	26/17

注:*为定量离子; m/z 为质荷比。

Note: * refers to quantitative ion, and m/z refers to the mass-to-charge ratio.

2.2 溶液制备

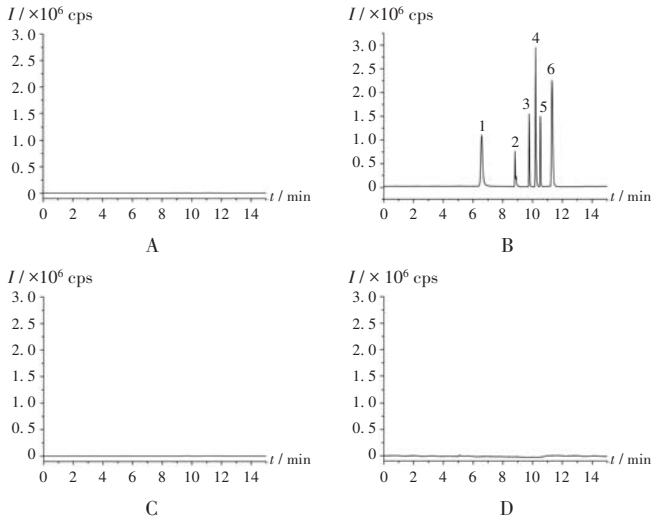
混合对照品溶液:分别取6种 N -亚硝胺类基因毒性杂质对照品适量,精密称定,加水稀释并定容,制成NDMA, NMBA和NDEA, NEIPA, NDIPA, NDBA的质量浓度分别为265 μg/mL和960 μg/mL的混合对照品贮备液。取上述混合对照品贮备液各适量,用水逐级稀释制得系列质量浓度的混合对照品溶液(NDMA和NMBA的系列质量浓度分别为48.00, 24.00, 4.80, 2.40, 0.96, 0.48 ng/mL, NDEA, NEIPA, NDIPA, NDBA的系列质量浓度分别为13.25, 6.62, 1.33, 0.66, 0.26, 0.13 ng/mL)。

供试品溶液:取原料药0.5 g,精密称定,置10 mL容量瓶中,加水5 mL,涡旋5 min,用水稀释并定容,振摇10 min,以4 500 r/min的速率离心10 min,制成质量浓度为50 mg/mL的溶液,滤过,取续滤液,即得原料药

供试品溶液。取样品(或内容物)20片(或粒、袋)研细,混匀,取细粉适量(约相当于阿奇霉素0.5 g),精密称定,置10 mL容量瓶中,加水5 mL,涡旋5 min,用甲醇稀释并定容,振摇10 min,以4 500 r/min的速率离心10 min,滤过,制成质量浓度为50 mg/mL的溶液,取续滤液,即得制剂供试品溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验:取空白溶剂及2.2项下混合对照品溶液、原料药供试品溶液、制剂供试品溶液,按2.1项下条件进样测定。结果6种N-亚硝胺类基因毒性杂质均无干扰峰,表明方法专属性良好。色谱图见图1。



1. NDMA 2. NMBA 3. NDEA 4. NEIPA 5. NDIPA 6. NDBA
A. 空白溶剂 B. 混合对照品溶液 C,D. 供试品溶液(分别为原料药和制剂)

图1 专属性试验高效液相色谱串联质谱图

1. NDMA 2. NMBA 3. NDEA 4. NEIPA 5. NDIPA 6. NDBA
A. Blank solvent B. Mix reference solution C,D. Test solution (azithromycin API and its preparations, respectively)

线性关系考察、检测限和定量限确定:取2.2项下系列质量浓度的混合对照品溶液适量,按2.1项下色谱与质谱条件分别进样测定,记录色谱图。以待测成分质量浓度($X, \mu\text{g/mL}$)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归。结果表明,NDMA, NMBA 和 NDEA, NEIPA,

NDIPA, NDBA 质量浓度分别在0.48~48.00 ng/mL和0.13~13.25 ng/mL范围内与峰面积线性关系良好。分别以混合对照品溶液信噪比(S/N)为3:1和10:1的质量浓度为检测限与定量限。结果见表3。

精密度试验:精密量取2.2项下混合对照品溶液适量,按2.1项下色谱与质谱条件平行测定6次。结果见表3,表明仪器精密度良好。

稳定性试验:精密量取2.2项下系列质量浓度的混合对照品溶液,分别于室温放置0,1,2,3,6,10 h时按2.1项下色谱与质谱条件进样测定。结果见表3,表明对照品溶液在室温下放置10 h稳定性良好。

重复性试验:取原料药样品(批号为108200513),依法平行制备供试品溶液6份,分别量取对照品溶液适量,同法制备加标供试品溶液,按2.1项下色谱与质谱条件进样测定。结果见表3,表明方法重复性良好。

加样回收试验:取原料药样品(批号为108200513),按2.2项下方法制备供试品溶液,共9份,分别精密加入2.2项下混合对照品溶液适量,制备成高、中、低3个质量浓度,各3份,按2.1项下色谱与质谱条件进样测定,并按外标法计算加样回收率。结果见表3,表明方法准确度良好。

耐用性试验:更换流动相流速(0.4,0.8 mL/min),起始柱温(35,45℃),流动相B起始比例(0,4%)、不同品牌色谱柱进行测定。结果显示,小范围的改变测定条件,色谱峰峰面积变化不大,表明方法耐用性良好。

强制降解试验:取原料药样品(批号为108200513)4份,按2.2项下方法制备供试品溶液,分别进行强酸、强碱、氧化和加热(乙腈溶解,沸水浴)破坏试验,按2.1项下色谱与质谱条件进样测定,结果降解产物中均未检出6种N-亚硝胺类基因毒性杂质。色谱图见图2。

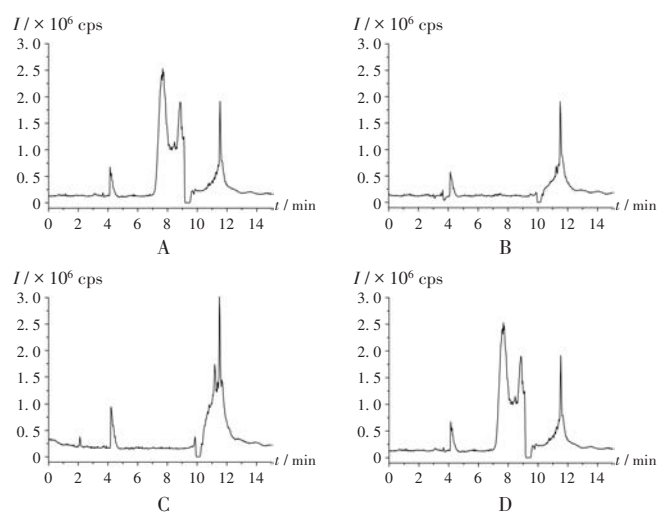
2.4 样品检测

分别取3批(批号分别为108200513,108200514,108200518)阿奇霉素原料药和3批(批号分别为FAR2901005,21012001,207210201)阿奇霉素制剂,依法制备供试品溶液,按2.1项下色谱与质谱条件进样测定。结果3批阿奇霉素原料药和3批制剂中均未检出6种N-亚硝胺类基因毒性杂质。

表3 方法学考察结果

Tab.3 Results of the methodological investigation

杂质	回归方程	r	线性范围 (ng/mL)	检测限 (ng/mL)	定量限 (ng/mL)	RSD(% , $n=6$)			加样回收试验(% , $n=9$)	
						精密密度试验	重复性试验	稳定性试验	$\bar{X}$	RSD
NDMA	$Y=358\,079.012\,6\,X+46\,925.878\,1$	0.997 7	0.48~48.00	0.16	0.49	1.54	1.72	1.27	90.50	3.01
NMBA	$Y=265\,492.304\,8\,X+55\,329.813\,3$	0.995 1	0.48~48.00	0.16	0.48	1.90	1.82	1.45	90.43	6.02
NDEA	$Y=512\,711.695\,4\,X+157\,165.846\,6$	0.999 5	0.13~13.25	0.04	0.13	1.37	1.03	1.22	93.36	3.30
NEIPA	$Y=724\,800.591\,8\,X+58\,533.163\,0$	0.997 0	0.13~13.25	0.04	0.13	1.05	0.90	1.31	99.30	2.78
NDIPA	$Y=320\,907.672\,4\,X+34\,506.914\,0$	0.996 2	0.13~13.25	0.04	0.13	1.11	1.67	1.86	96.09	4.45
NDBA	$Y=650\,929.920\,9\,X+88\,222.811\,0$	0.996 0	0.13~13.25	0.04	0.13	1.05	0.90	1.31	98.59	5.34



A. 强酸破坏 B. 强碱破坏 C. 加热破坏 D. 氧化破坏

图2 强制降解试验高效液相色谱串联质谱图

A. Strong acid damage B. Strong alkali damage C. Heating damage

D. Oxidation damage

Fig. 2 HPLC-MS/MS chromatograms of the forced degradation test

3 讨论

3.1 提取方法选择

以各成分的提取率为指标,考察了甲醇、乙醇、水、50% 甲醇等提取溶剂及前处理方法,最终选择水作为溶剂,前处理方法采用先涡旋后振摇、再离心,以提高各成分的回收率。

3.2 色谱条件选择

考察了甲醇-0.1% 甲酸水溶液、0.1% 甲酸甲醇-0.1% 甲酸水溶液、甲醇-0.2% 甲酸水溶液、乙腈-0.1% 甲酸水溶液等流动相系统,结果以甲醇-0.1% 甲酸水溶液为流动相时,各成分色谱峰峰形及分离度均良好,12 min 内可完全洗脱。

考察了 Waters XBridge C₁₈ 柱、Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈ 柱、XSelect HSS T3 柱、ACE Excel 3 C₁₈-AR 柱等色谱柱,结果以 ACE Excel 3 C₁₈-AR 柱为色谱柱时,各成分色谱峰峰形良好,分离度较高。又通过对柱温及梯度洗脱程序的调整,进一步提高了分离效率,最终确定 2.1.1 项下色谱条件。

3.3 方法评价

阿奇霉素与敏感微生物的 50s 核糖体的亚单位结合后,对其蛋白质的合成产生干扰,体外试验和临床研究均表明,阿奇霉素对多种革兰阳性菌、革兰阴性菌需氧致病菌有良好的抑菌效果,临床用途广泛。其分子中含有伯胺、仲胺结构,具有典型基因毒性致癌物的警示结构,在制备和储藏过程中易产生 N-亚硝胺类杂质。本研究中建立了测定阿奇霉素原料药及其制剂中 6 种 N-亚硝胺类基因毒性杂质的 HPLC-MS/MS 法,强制降解产物中均未检出这 6 种杂质,推测此类基因毒性杂

质为工艺杂质,应对原料生产的各个环节和步骤进行严格控制。方法学考察结果表明,所建立的方法操作简便、灵敏度高、结果准确、重复性好,可用于生产企业及药监系统日常检查,监测阿奇霉素原料药及其制剂中的 N-亚硝胺类基因毒性杂质。

参考文献

- [1] 李显志,王浴生. 第一个 15 元大环内酯类抗生素 Azithromycin[J]. 国外医药(抗生素分册), 1991, 12(2): 118-125.
- [2] SAMUEL RJ. Azithromycin and derivatives as antiprotozoal agents:0370128[P]. 1992-04-08.
- [3] 孙曼琴,康子胜,许军,等. Azithromycin 的体内抗菌作用研究[J]. 中国抗生素杂志, 1995, 20(5): 362-364.
- [4] LIU DQ, SUN MJ, KORD AS. Recent advances in trace analysis of pharmaceutical genotoxic impurities[J]. J Pharm Biomed Anal, 2010, 51(5): 999-1014.
- [5] TAKEDA Y, KANAYA H. A Screening Procedure for the Formation of Nitroso Derivatives and Mutagens by Drug-Nitrite Interaction[J]. Chem Pharm Bull(Tokyo), 1982, 30(9):3399-3404.
- [6] MITCH WA, SEDLAK DL. Formation of N-Nitrosodimethylamine (NDMA) from Dimethylamine during Chlorination [J]. Environ Sci Technol, 2002, 36(4):588-595.
- [7] SHEN RQ, 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] 刘丽星,王丽云,郭金铭,等. 阿奇霉素二水合物的合成工艺研究[J]. 中国药物化学杂志, 2018, 28(3):215-219.
- [9] 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.
- [10] 钱岩,黄逸文,吴杨,等. 注射用阿奇霉素与阿奇霉素注射液的质量评价[J]. 中国医药工业杂志, 2021, 52(5): 686-692.
- [11] 国家药品监督管理局药品审评中心. 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) [2021-11-15]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/qtggtg/20200508160101122.html>.
- [12] 袁松,冯玉飞,于颖洁,等. UPLC-MS/MS 法测定奥美沙坦酯中 7 个亚硝胺类基因毒性杂质[J]. 药物评价研究, 2021, 44(2):356-361.
- [13] 周刚,李鹏飞,高家敏. GC-MS/MS 法测定阿莫西林原料药中 12 种 N-亚硝胺类基因毒性杂质[J]. 中国抗生素杂志, 2021, 46(4): 291-296.
- [14] 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片剂中 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.

(收稿日期:2021-12-07;修回日期:2022-03-22)