

5种β受体拮抗剂类药物中的N-亚硝基类杂质的含量研究^Δ

田 珩*, 杨仪雪, 戴 聪, 刘亚雄, 严全鸿(广东省药品检验所/国家药品监督管理局药用辅料质量控制与评价重点实验室, 广州 510180)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2024)08-0936-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.08.07



摘要 目的 测定普萘洛尔、美托洛尔、阿替洛尔、艾司洛尔、比索洛尔原料药/制剂中N-亚硝基类杂质含量,明确其含量的关注阈值。方法 采用超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱技术。以ACE Excel 3 C₁₈-AR为色谱柱,以含0.01 mol/L乙酰胺的0.2%甲酸溶液-甲醇为流动相进行梯度洗脱,流速为0.60 mL/min,柱温为40 °C,进样量为5 μL;以可加热的电喷雾离子源为离子源,以全扫描-选择离子监测模式进行正离子扫描。采用该法对10家企业生产的15批β受体拮抗剂类药物原料药/制剂中N-亚硝基类杂质含量进行测定,并采用Discovery Studio软件对待测杂质进行毒性预测和关注阈值估算。结果 5种β受体拮抗剂类药物中,N-亚硝基普萘洛尔、N-亚硝基美托洛尔、N-亚硝基阿替洛尔、N-亚硝基艾司洛尔、N-亚硝基比索洛尔检测质量浓度的线性范围分别为1.01~503.38、1.02~508.38、0.97~483.63、1.11~554.27、1.05~523.92 ng/mL($r>0.999$),定量限分别为1.04、0.25、0.05、0.55、1.05 ng/mL,检测限分别为0.52、0.08、0.02、0.17、0.52 ng/mL,精密密度、重复性、加样回收率、稳定性、耐用性试验的RSD均小于7.5%($n=6$ 或 $n=5$)。15批样品中,除1批样品外,其余批次均检出了N-亚硝基普萘洛尔(1.07~8.91 ng/mg)、N-亚硝基美托洛尔(1.43~3.37 ng/mg)、N-亚硝基阿替洛尔(1.33 ng/mg)、N-亚硝基艾司洛尔(0.19 ng/mg)、N-亚硝基比索洛尔(1.27 ng/mg)。经预测,上述5种杂质有不同程度的生育毒性、致突变性、致癌性,关注阈值分别为1.0、0.4、4.3、0.2、46.7 ng/mg。结论 所建方法简单快捷、灵敏度高、专属性强,估算的关注阈值明确,可用于多种β受体拮抗剂类药物中N-亚硝基类杂质的含量控制。

关键词 β受体拮抗剂类药物;N-亚硝基类杂质;超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱技术;基因毒性;关注阈值

Content study of N-nitroso impurities in 5 types of β-blockers

TIAN Heng, YANG Yixue, DAI Cong, LIU Yaxiong, YAN Quanhong (Guangdong Institute for Drug Control/NMPA Key Laboratory for Quality Control and Evaluation of Pharmaceutical Excipients, Guangzhou 510180, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To determine the contents of N-nitroso impurities in raw materials/formulations of propranolol, metoprolol, atenolol, esmolol and bisoprolol, and clarify the attention threshold. **METHODS** Ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic field orbitrap high-resolution mass spectrometry(UPLC-Q/Orbitrap HRMS) was adopted. An ACE Excel 3 C₁₈-AR column was used for the separation and a mixture of 0.2% formic acid solution with 0.01 mol/L ammonium acetate and methanol was employed as the mobile phase by gradient elution, at a flow rate of 0.60 mL/min. The column temperature was set at 40 °C, and the sample size was 5 μL. The heated electrospray ionization source was employed in the positive full mass spectra-selected ion monitoring mode. The contents of N-nitroso impurities in raw materials/formulations of 15 batches of β-blockers from 10 manufacturers were determined by this method. Discovery Studio software was applied to predict the toxicity of the impurities and estimate the attention threshold. **RESULTS** Among 5 kinds of β-blockers, the linear ranges of N-nitroso propranolol, N-nitroso metoprolol, N-nitroso atenolol, N-nitroso esmolol and N-nitroso bisoprolol were 1.01-503.38, 1.02-508.38, 0.97-483.63, 1.11-554.27 and 1.05-523.92 ng/mL, respectively ($r>0.999$). The limits of quantitation were 1.04, 0.25, 0.05, 0.55 and 1.05 ng/mL, and the limits of detection were 0.52, 0.08, 0.02, 0.17 and 0.52 ng/mL, respectively. RSDs of precision, reproducibility, recovery, stability and durability tests were all lower than 7.5% ($n=6$ or $n=5$). Among the 15 batches of samples, except for 1 batch, N-nitroso propranolol (1.07-8.91 ng/mg), N-nitroso metoprolol (1.43-3.37 ng/mg), N-nitroso atenolol (1.33 ng/mg), N-nitroso esmolol (0.19 ng/mg) and N-nitroso bisoprolol (1.27 ng/mg) were detected in all other batches. According to predictions, the above 5 impurities had varying degrees of reproductive toxicity, mutagenicity and carcinogenicity, with attention thresholds of 1.0, 0.4, 4.3, 0.2 and 46.7 ng/mg, respectively. **CONCLUSIONS** The established method is simple, rapid, sensitive and specific, the estimated attention thresholds are clear, which can be used for the control of N-nitroso impurities in various

β-blockers.

KEYWORDS β-blockers; N-nitroso impurities; UPLC-Q/Orbitrap HRMS; gene toxicity; attention thresholds

^Δ基金项目 广东省医学科学技术研究基金项目(No.B2023406)

* 第一作者 主管药师,硕士。研究方向:药物分析、质量控制。电话:020-32447921。E-mail:dongqingfish@126.com

β 受体拮抗剂类药物包括普萘洛尔、阿替洛尔、美托洛尔、艾司洛尔、卡维地洛、比索洛尔、阿罗洛尔、卡替洛尔、噻吗洛尔和拉贝洛尔等,用于高血压、心绞痛、心律失常、心肌梗死、青光眼和甲状腺功能亢进等疾病的临床治疗^[1]。该类药物具有相似的结构片段,且含有易发生亚硝化反应的二级胺(即与烷基或芳香环连接的氮),故在生产、储存和使用过程中可能产生相应的*N*-亚硝基类杂质^[2]。研究指出, β 受体拮抗剂类药物的*N*-亚硝基类杂质由于潜在的基因毒性而备受学界关注,有多种药物因该类杂质超标而被召回^[3-4]。考虑到 β 受体拮抗剂类药物是一线降压药物,临床用量大,且患者需长期使用,故有必要对其中的*N*-亚硝基类杂质进行控制。

目前,对药物中*N*-亚硝基类杂质的定量检测方法包括高效液相色谱(HPLC)法、电位滴定法、气质联用法、液质联用法和纳米分子印迹聚合膜电位滴定法^[5-7]等。超高效液相-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱(ultra performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic field orbitrap high-resolution mass spectrometry, UPLC-Q/Orbitrap HRMS)技术可准确提供待测成分的精确分子量,具有前处理简便、快捷,灵敏度和专属性优于现有方法等优点,被广泛用于药物中基因毒性杂质的检测。基于此,本研究拟利用UPLC-Q/Orbitrap HRMS技术建立同时测定5种 β 受体拮抗剂类药物(普萘洛尔、美托洛尔、阿替洛尔、艾司洛尔、比索洛尔)中*N*-亚硝基类杂质(*N*-亚硝基普萘洛尔、*N*-亚硝基美托洛尔、*N*-亚硝基阿替洛尔、*N*-亚硝基艾司洛尔、*N*-亚硝基比索洛尔)含量的方法,对市售样品进行测定,并对上述*N*-亚硝基类杂质进行毒性预测和关注阈值估算,以期该类药物的质量控制和安全性评价提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器及软件

本研究所用主要仪器包括Q Exactive Focus型四极杆/高分辨静电场轨道阱液质联用仪、UltiMate 3000型超高效液相色谱仪、MultifugeX3R型离心机(美国Thermo Fisher Scientific公司);MS105DU型十万分之一电子天平(瑞士Mettler Toledo公司),MS 3 Digital型漩涡振荡器(德国IKA公司),KQ-500GDV型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),Discovery Studio 毒性预测软件(美国CambridgeSoft公司)等。

1.2 主要药品与试剂

盐酸普萘洛尔原料药分别来自企业A(批号CP07-190101,纯度99.8%)和企业J(批号171201,纯度99.7%);盐酸普萘洛尔片分别来自企业B(批号5190601、5190602,规格10 mg)、企业C(批号180901、

180903,规格10 mg)和企业D(批号190101、190110,规格10 mg);酒石酸美托洛尔片分别来自企业E(批号20200401、20200402,规格50 mg)和企业F(批号2107129,规格50 mg;批号2109A25,规格25 mg);阿替洛尔片来自企业G(批号220801,规格12.5 mg);盐酸艾司洛尔注射液来自企业H(批号2C0092C04,规格2 mL:0.2 g);富马酸比索洛尔片来自企业I(批号2301094,规格5 mg);*N*-亚硝基普萘洛尔对照品(批号BNP30-09-02,纯度96.99%)、*N*-亚硝基美托洛尔对照品(批号BNM02-01-01,纯度98.10%)、*N*-亚硝基阿替洛尔对照品(批号BNA40-01-01,纯度98.70%)、*N*-亚硝基艾司洛尔对照品(批号BNA16-01-02,纯度95.40%)、*N*-亚硝基比索洛尔对照品(批号BNB02-01-01,纯度99.04%)均购自佛山宝诺生物科技有限公司;乙酸铵(批号C1388730,纯度98%)购自上海麦克林生化科技有限公司;甲醇和甲酸为质谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱与质谱条件

2.1.1 色谱条件

以ACE Excel 3 C₁₈-AR(150 mm×4.6 mm, 3 μ m)为色谱柱,以含0.01 mol/L乙酸铵的0.2%甲酸溶液为流动相A、甲醇为流动相B进行梯度洗脱[程序I(用于普萘洛尔、美托洛尔、艾司洛尔、比索洛尔及对应杂质):0~10 min, 55%B;10~13 min, 55%B→85%B;13~25 min, 85%B;25~25.1 min, 85%B→55%B;25.1~30 min, 55%B。程序II(用于阿替洛尔及对应杂质):0~10 min, 45%B;10~13 min, 45%B→85%B;13~15 min, 85%B;15~15.1 min, 85%B→45%B;15.1~20 min, 45%B];流速为0.60 mL/min;柱温为40 $^{\circ}$ C;进样量为5 μ L。

2.1.2 质谱条件

离子源为可加热的电喷雾离子源,在正离子模式下进行检测;鞘气压力为55 arb;辅助气流速为5 L/min,压力为15 arb;吹扫气流速为3 L/min(3 units);喷雾电压为3.5 kV;离子传输管温度为275 $^{\circ}$ C;干燥器温度为450 $^{\circ}$ C;扫描模式为全扫描-选择离子监测(full mass spectra-selected ion monitoring, full MS-SIM)模式,扫描范围为*m/z* 50~750,分辨率为70 000;自动增益控制目标离子数为 3×10^6 。

2.2 溶液的制备

2.2.1 盐酸普萘洛尔原料药供试品溶液

取盐酸普萘洛尔原料药约50 mg,精密称定,置5 mL容量瓶中,用溶剂[含0.01 mol/L乙酸铵的0.2%甲酸溶液与甲醇的混合溶液(体积比40:60),下同]溶解并稀释至刻度,混匀,即得。

2.2.2 盐酸普萘洛尔片供试品溶液

取盐酸普萘洛尔片,研细,取细粉适量(约相当于主成分 50 mg),精密称定,置 15 mL 离心管中,精密加入溶剂 10 mL,于 3 000 r/min 条件下涡旋 5 min 后再超声 10 min,以 10 000 r/min 离心 10 min,上清液经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 酒石酸美托洛尔片供试品溶液

取酒石酸美托洛尔片,研细,取细粉适量(约相当于主成分 100 mg),精密称定,置 15 mL 离心管中,精密加入溶剂 5 mL,于 3 000 r/min 条件下涡旋 5 min 后再超声 10 min,以 10 000 r/min 离心 10 min,上清液经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.4 阿替洛尔片供试品溶液

取阿替洛尔片,研细,取细粉适量(约相当于主成分 50 mg),精密称定,置 15 mL 离心管中,精密加入溶剂 5 mL,于 3 000 r/min 条件下涡旋 5 min 后再超声 10 min,以 10 000 r/min 离心 10 min,上清液经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.5 盐酸艾司洛尔注射液供试品溶液

取盐酸艾司洛尔注射液,精密量取 1 mL(约相当于主成分 0.1 g)至 10 mL 容量瓶中,用溶剂稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.6 富马酸比索洛尔片供试品溶液

取富马酸比索洛尔片,研细,取细粉适量(约相当于主成分 20 mg),精密称定,置 15 mL 离心管中,精密加入溶剂 2 mL,于 3 000 r/min 条件下涡旋 5 min 后再超声 10 min,以 10 000 r/min 离心 10 min,上清液经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

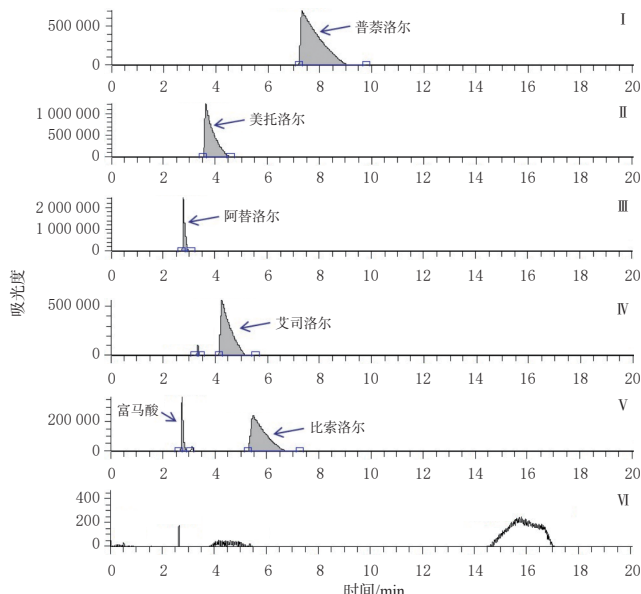
2.2.7 杂质对照品贮备液和杂质对照品溶液

取 *N*-亚硝基普萘洛尔、*N*-亚硝基美托洛尔、*N*-亚硝基阿替洛尔、*N*-亚硝基艾司洛尔和 *N*-亚硝基比索洛尔对照品各约 10 mg,精密称定,分别置于 100 mL 容量瓶中,用溶剂溶解并稀释至刻度,混匀,即得对照品贮备液。精密量取上述各对照品贮备液 1 mL,分别置于 200 mL 容量瓶中,用溶剂稀释至刻度,混匀;精密量取上述溶液 1 mL,分别置于 10 mL 容量瓶中,用溶剂稀释至刻度,混匀,即得对照品溶液(质量浓度均约为 50 ng/mL)。

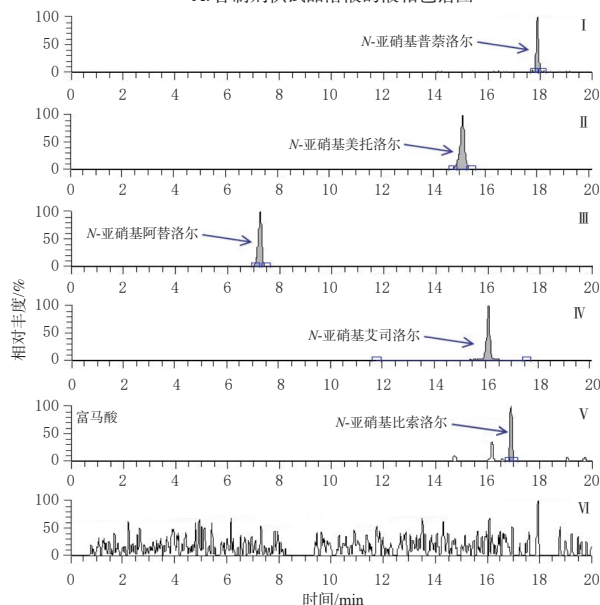
2.3 方法学验证

2.3.1 专属性考察

取“2.2”项下供试品溶液、对照品溶液和溶剂,分别按“2.1”项下色谱与质谱条件进样测定,记录色谱图。结果(图 1、图 2、表 1)表明,各待测 *N*-亚硝基类杂质与相应主成分的分度良好,溶剂无干扰,用于定量的实测 *m/z* 与理论 *m/z* 的偏差均小于 1 ppm,方法专属性良好。



A. 各制剂供试品溶液的液相色谱图



B. 对应 *N*-亚硝基类杂质的选择离子流图

I: 盐酸普萘洛尔片供试品溶液; II: 酒石酸美托洛尔片供试品溶液; III: 阿替洛尔片供试品溶液; IV: 盐酸艾司洛尔注射液供试品溶液; V: 富马酸比索洛尔片供试品溶液; VI: 溶剂。

图 1 5 种 β 受体拮抗剂类药物供试品溶液的液相色谱图及其中 *N*-亚硝基类杂质的选择离子流图

2.3.2 线性关系考察与精密度试验

取“2.2.7”项下各杂质对照品贮备液,用溶剂逐级稀释成质量浓度分别约为 500、100、50、10、5、1 ng/mL 的系列单一对照品溶液,按“2.1”项下色谱与质谱条件进样测定,记录峰面积。以待测杂质的质量浓度为横坐标(*x*)、峰面积为纵坐标(*y*)进行线性回归,得各待测杂质在其检测质量浓度范围内与峰面积的线性关系均良好($r > 0.999$)。精密吸取“2.2.7”项下对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱与质谱条件连续进样 6 次,记录峰面积,得各待测杂质峰面积的 RSD 均小于 7.5% ($n=6$),表明仪器精密度良好。结果见表 2。

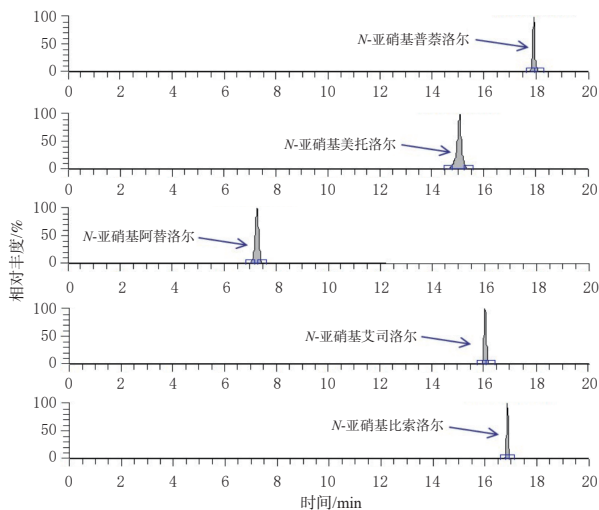


图2 各待测杂质对照品溶液的选择离子流图

表1 N-亚硝基类杂质的质谱信息

待测杂质	保留时间/min	分子式(加合离子)	理论m/z	实测m/z	质量偏差/ppm
N-亚硝基普萘洛尔	17.91	C ₁₆ H ₂₀ N ₂ O ₃ (+H)	289.154 7	289.154 2	0.9
N-亚硝基美托洛尔	15.12	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O ₄ (+H)	297.180 9	297.180 6	0.5
N-亚硝基阿替洛尔	7.27	C ₁₄ H ₂₁ N ₂ O ₄ (+H)	296.160 5	296.160 1	0.7
N-亚硝基艾司洛尔	16.09	C ₁₆ H ₂₄ N ₂ O ₅ (+H)	325.175 8	325.175 5	0.5
N-亚硝基比索洛尔	16.89	C ₁₈ H ₂₆ N ₂ O ₅ (+H)	355.222 7	355.222 3	0.6

表2 线性关系考察与精密度的试验结果

待测杂质	线性回归方程	r	线性范围/(ng/mL)	精密度的试验RSD(n=6)/%
N-亚硝基普萘洛尔	y=451 444x+215 839	1.000 0	1.01~503.38	2.1
N-亚硝基美托洛尔	y=2 934 300x-638 604	1.000 0	1.02~508.38	1.1
N-亚硝基阿替洛尔	y=1 179 437x-835 394	1.000 0	0.97~483.63	0.7
N-亚硝基艾司洛尔	y=1 660 282x+690 076	1.000 0	1.11~554.27	1.1
N-亚硝基比索洛尔	y=76 507x-191 437	0.999 9	1.05~523.92	7.3

2.3.3 重复性试验

按“2.2.1”~“2.2.6”项下方法制备同一批次原料药/制剂的供试品溶液,共6份,按“2.1”项下色谱与质谱条件进样测定,记录峰面积并代入回归方程计算各待测杂质含量。结果显示,各待测杂质含量的RSD均不高于6.2%(n=6),提示方法重复性良好。

2.3.4 准确度试验

取同一批次的原料药/制剂适量,精密称定,精密加入N-亚硝基类杂质对照品溶液适量(加入量与已知量相当),按“2.2.1”~“2.2.6”项下方法制备供试品溶液(每样品平行操作6份),再按“2.1”项下色谱与质谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果显示,各待测杂质的平均加样回收率为90.97%~97.07%,RSD为2.5%~6.6%(n=6),提示方法准确度良好。

2.3.5 定量限与检测限考察

取按“2.2.7”项下方法配制的各N-亚硝基类杂质对照品贮备液,用溶剂逐级稀释,再按“2.1”项下色谱与质谱条件进样测定,记录峰面积。当信噪比约为10:1时,得N-亚硝基普萘洛尔、N-亚硝基美托洛尔、N-亚硝基阿替洛尔、N-亚硝基艾司洛尔、N-亚硝基比索洛尔的定量限分别为1.04、0.25、0.05、0.55、1.05 ng/mL;当信噪比约

为3:1时,得上述各待测杂质的检测限分别为0.52、0.08、0.02、0.17、0.52 ng/mL。

2.3.6 稳定性试验

取“2.2.1”~“2.2.6”项下各供试品溶液,于进样器内放置0、2、4、6、8、12 h时按“2.1”项下色谱与质谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示,各待测杂质峰面积的RSD均不高于7.3%(n=6),表明各样品在上述条件下稳定性良好。

2.3.7 耐用性试验

以N-亚硝基艾司洛尔对照品溶液为例,分别对柱温和流动相流速进行±10%的变动,即于柱温36℃、流速0.60 mL/min,柱温40℃、流速0.60 mL/min,柱温44℃、流速0.60 mL/min,柱温40℃、流速0.54 mL/min,柱温40℃、流速0.66 mL/min条件下进样测定。结果显示,N-亚硝基艾司洛尔的色谱峰峰形无变化,峰面积的RSD为5.5%(n=5),提示方法耐用性良好。

2.4 样品测定

取各批次原料药/制剂适量,按“2.2.1”~“2.2.6”项下方法配制供试品溶液,再按“2.1”项下色谱与质谱条件进样测定,记录峰面积并代入回归方程计算各批样品中N-亚硝基类杂质的含量。结果见表3。

表3 样品中N-亚硝基类杂质的含量测定结果

品名	待测杂质	类型	批号	杂质含量/(ng/mg)			
盐酸普萘洛尔	N-亚硝基普萘洛尔	原料药	CP07-190101	—			
			171201	8.91			
			5190601	2.87			
			5190602	2.84			
			180901	1.18			
酒石酸美托洛尔	N-亚硝基美托洛尔	片剂	180903	1.07			
			190101	2.45			
			190110	1.49			
			20200401	1.43			
			20200402	1.77			
阿替洛尔	N-亚硝基阿替洛尔	片剂	2107129	1.56			
			2109A25	3.37			
			220801	1.33			
			盐酸艾司洛尔	N-亚硝基艾司洛尔	注射液	2C0092C04	0.19
						富马酸比索洛尔	N-亚硝基比索洛尔

—:低于检测限。

2.5 毒性预测与关注阈值估算

采用Discovery Studio软件对上述5种N-亚硝基类杂质进行潜在发育毒性、致突变性、啮齿动物致癌性和中毒剂量(TD₅₀)等模块的毒理学预测^[8-11],参考人用药注册技术要求国际协调会(International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH)发布的协调指导原则M7(R2),按照更为保守的大鼠TD₅₀值和人体重50 kg来计算各杂质的人每日最大摄入量(线性外推至肿瘤发生风险为十万分之一),同时结合5种β受体拮抗剂类药物药品说明书中的主成分日最大剂量进一步估算各杂质的关注阈值^[12],结果见表4。

表4 毒性预测与关注阈值估算结果

杂质名称	潜在发育毒性	致突变性	啮齿动物致癌性	TD ₅₀ /(mg/(kg·d))		杂质的人每日最大摄入量/ng	主成分日最大剂量/mg	杂质的关注阈值/(ng/mg)
				小鼠	大鼠			
N-亚硝基普萘洛尔	无	有	有	78.3	0.24	240	240	1.0
N-亚硝基美托洛尔	有	无	有	79.6	0.084 2	84.2	200	0.4
N-亚硝基阿替洛尔	有	无	有	49.7	0.854	854	200	4.3
N-亚硝基艾司洛尔 ^a	有	无	无	116	0.036 1	36.1	200	0.2
N-亚硝基比索洛尔	有	无	无	96.8	0.467	467	10	46.7

a: 无长期用药依据,按疗程≤1个月计算。

3 讨论

3.1 色谱条件的选择

供试品溶液均含有高质量浓度的主成分,如果直接进入质谱系统,会污染离子源并产生基质效应,因此主成分与其对应的N-亚硝基类杂质需达到足够的色谱分离度,才能通过切换阀将主成分切入废液、待测杂质切入质谱检测器,以保证杂质的检测并保护质谱系统。本课题组在色谱条件优化过程中发现,以梯度洗脱程序I进行洗脱时,普萘洛尔、美托洛尔、艾司洛尔、比索洛尔的主成分峰与对应N-亚硝基类杂质峰的保留时间均相差超过10 min,有效避免了主成分对杂质测定的干扰。然而在该洗脱条件下,阿替洛尔及其对应杂质的保留时间分别为2.64、4.63 min,为避免高质量浓度主成分的干扰,本课题组对梯度洗脱程序I进行了调整,得梯度洗脱程序II,从而增加了二者保留时间的差值,以保证检测的准确性和可靠性。

3.2 质谱条件的选择

Orbitrap HRMS具有高通量、高选择性、高灵敏度等优势^[13],其常用的定量模式包括full MS-SIM、目标-选择离子监测(target-selected ion monitoring, target-SIM)、平行反应监测(parallel reaction monitoring, PRM)模式。本课题组前期比较了上述3种模式下各待测杂质的质谱响应情况,其中full MS-SIM模式和target-SIM模式下各杂质的质谱响应差异不大,均可满足灵敏度和专属性要求,而PRM模式则因涉及二级子离子的选择,需要根据不同的待测杂质设置不同的参数,且部分待测杂质的灵敏度低于full MS-SIM模式,因此本研究最终选择了可获取更多质谱信息的full MS-SIM模式。

3.3 毒性预测与关注阈值分析

目前,对于β受体拮抗剂类药物中N-亚硝基类杂质的毒性研究仍停留在体外细胞水平^[14],需要更广泛的证据来评估相关药物的风险以便制订药物使用监控策略。Discovery Studio软件为美国CambridgeSoft公司开发的面向生命科学领域的分子建模和模拟软件,其毒性预测模块(TOPKAT)可用于预测小分子化合物的毒性相关指标,具有分析速度快、成本低、不依赖实验条件等优

势^[15]。本研究预测结果显示,5种β受体拮抗剂类药物的N-亚硝基类杂质存在不同程度的发育毒性、致突变性、致癌性,N-亚硝基普萘洛尔、N-亚硝基美托洛尔、N-亚硝基阿替洛尔、N-亚硝基艾司洛尔、N-亚硝基比索洛尔的关注阈值分别为1.0、0.4、4.3、0.2、46.7 ng/mg;同时,杂质含量实测结果显示,有多批样品的杂质含量超过其关注阈值,相关企业应予以关注。此外有报道指出,制剂中的亚硝酸盐对亚硝化反应有较大影响,有些辅料对N-亚硝基类杂质的产生也有明显的促进作用^[15-17]。相关企业应重视辅料的选择和使用,严格控制亚硝酸盐水平,并持续关注β受体拮抗剂类药物中的N-亚硝基类杂质,以提高该类药物使用的安全性。

综上所述,本文所建方法简单快捷、灵敏度高、专属性强,可用于多种β受体拮抗剂类药物中N-亚硝基类杂质的测定;同时,明确了各杂质的关注阈值,可为该类药物的质量控制和安全性评价提供参考。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典临床用药须知: 化学药和生物制品卷[M]. 2020年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2022: 318-331.
Chinese Pharmacopoeia Commission. Chinese pharmacopoeia clinical medication instruction: chemical drugs and biological products[M]. 2020 edition. Beijing: Chinese Medicine Publishing House, 2022: 318-331.
- [2] LÓPEZ-RODRÍGUEZ R, MCMANUS J A, MURPHY N S, et al. Pathways for N-nitroso compound formation: secondary amines and beyond[J]. Org Process Res Dev, 2020, 24(9): 1558-1585.
- [3] MARTELLI A, ALLAVENA A, SOTTOFATTORI E, et al. Low clastogenic activity *in vivo* of the N-nitroso derivatives of 5 beta-adrenergic-blocking drugs proved to be potent genotoxins *in vitro*[J]. Toxicol Lett, 1994, 73(3): 185-191.
- [4] ROBBIANO L, MARTELLI A, ALLAVENA A, et al. Formation of the N-nitroso derivatives of six beta-adrenergic-blocking agents and their genotoxic effects in rat and human hepatocytes[J]. Cancer Res, 1991, 51(9): 2273-2279.

- [5] 李尚颖,岳青阳,张耀文,等. GC-MS/MS法同时测定氯沙坦钾原料药及其制剂中6种N-亚硝胺类基因毒性杂质[J]. 中国药房,2023,34(15):1830-1834.
LI S Y, YUE Q Y, ZHANG Y W, et al. Simultaneous determination of 6 kinds of N-nitrosamines genotoxic impurities in losartan potassium raw material and its formulations by GC-MS/MS[J]. China Pharm, 2023, 34 (15) : 1830-1834.
- [6] 黄海伟,袁松,张龙浩,等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定厄贝沙坦和氯沙坦钾原料药中3种叠氮类基因毒性杂质[J]. 中国新药杂志,2023,32(7):742-746.
HUANG H W, YUAN S, ZHANG L H, et al. Determination of three azides genotoxic impurities in irbesartan and losartan potassium active pharmaceutical ingredients by UPLC-MS/MS[J]. Chin J N Drugs, 2023, 32(7) : 742-746.
- [7] ALIZADEH T, ALLAHYARI L. Highly-selective determination of carcinogenic derivative of propranolol by using a carbon paste electrode incorporated with nano-sized propranolol-imprinted polymer[J]. Electrochim Acta, 2013, 111:663-673.
- [8] 韩中惠,王晓敏,张燕,等. 应用Discovery Studio (TOPKAT)软件预测糖抑制PhIP过程中新产物的毒理学性质[J]. 中国食品学报,2020,20(10):247-253.
HAN Z H, WANG X M, ZHANG Y, et al. Prediction of toxicological properties of new products in sugar inhibition of PhIP by Discovery Studio (TOPKAT) [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2020, 20(10) : 247-253.
- [9] HAN Y, ZHANG J P, HU C Q, et al. *In silico* ADME and toxicity prediction of ceftazidime and its impurities[J]. Front Pharmacol, 2019, 10:434.
- [10] WU B, ZHANG Z Y, DOU G J, et al. Novel natural inhibitors targeting B-RAF (V600E) by computational study [J]. Bioengineered, 2021, 12(1) : 2970-2983.
- [11] ZHONG S, ZHANG Z Y, GUO Z, et al. Identification of novel natural inhibitors targeting AKT serine/threonine kinase 1 (AKT1) by computational study[J]. Bioengineered, 2022, 13(5) : 12003-12020.
- [12] ICH. Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk [EB/OL]. [2023-08-10]. https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_M7%28R2%29_Guideline_Step4_2023_0216_0.pdf.
- [13] 贺美莲,郭常川,石峰,等. Orbitrap高分辨质谱技术在药物分析领域中的应用进展[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(1):105-110.
HE M L, GUO C C, SHI F, et al. Application progress of Orbitrap high-resolution mass spectrometry in the field of pharmaceutical analysis[J]. Chin J Pharm Anal, 2019, 39 (1) : 105-110.
- [14] ZHANG S, POWELL M L, NELSON W L, et al. Derivatives of beta-adrenergic antagonists: N-nitrosopropranolol and N-hydroxypropranolol and its aldonitrone[J]. J Med Chem, 1983, 26(3) : 455-458.
- [15] SOTTOFATTORI E, MARTELLI A, BRAMBILLA G. Effects of mono-, di- and tri-hydroxybenzoic acids on the nitrosation of propranolol: structure-activity relationship[J]. Mutat Res, 2001, 490(1) : 81-88.
- [16] 田珩,吴纯敏,贝琦华. 离子色谱法测定雷尼替丁原料药及制剂中亚硝酸根含量[J]. 中国药业, 2021, 30(15) : 74-77.
TIAN H, WU C M, BEI Q H. Content determination of nitrite ion in ranitidine raw materials and preparations by ion chromatography[J]. China Pharm, 2021, 30 (15) : 74-77.
- [17] 叶晓霞,葛雨琦,乐健,等. 缓释制剂辅料导致盐酸二甲双胍降解产生N-亚硝基二甲胺的影响因素研究[J]. 药物分析杂志, 2021, 41(2) : 293-299.
YE X X, GE Y Q, LE J, et al. Study on influencing factors of metformin hydrochloride's degradation to N-nitrosodimethylamine induced by sustained-release excipients [J]. Chin J Pharm Anal, 2021, 41(2) : 293-299.

(收稿日期:2023-09-28 修回日期:2024-02-01)

(编辑:张元媛)