

台灣藥物法規
資訊網法規公告台灣藥品
臨床試驗資訊TFDA 藥物
食品安全週報致力法規科學
守護生命健康

Regulatory Science, Service for Life

Sartan 類原料藥中亞硝胺類不純物之審查重點與考量

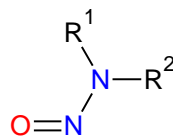
施宏興、許瑋心¹ 周家瑋²

前言

部分亞硝胺類化合物(nitrosamines)，在動物實驗上證實具有致癌性。自 2018 年 7 月歐盟公布原料藥 valsartan 中，發現亞硝胺類不純物 *N*-亞硝二甲胺(NDMA)開始迄今，我國與歐、美各國已發現多種亞硝胺類不純物存在於 sartan 類原料藥中。本文將分析其生成原因，並對 sartan 類原料藥中亞硝胺類不純物之審查重點與考量，作一說明。

亞硝胺介紹

亞硝胺類化合物通常是由二級、三級胺類化合物(secondary or tertiary amines)，經亞硝化(nitrosation)反應生成，其化學結構通式如圖一。根據文獻報導^[1,2]，部分亞硝胺類化合物，經動物實驗證實具有致癌性，例如：*N*-nitrosodimethylamine (NDMA)、*N*-nitrosodiethylamine (NDEA)、*N*-nitroso-*N*-methyl-4-aminobutyric acid (NMBA)、*N*-nitrosodibutyl-amine (NDBA)等，其可能的來源包含添加亞硝酸鹽之醃漬食品、菸草、水等。



圖一、亞硝胺類化合物化學結構通式

亞硝胺(*N*-Nitrosamine)之致突變性及致癌性

大多數的亞硝胺類化合物都被認為具有致癌性。國際癌症研究中心(International Agency for Research on Cancer, IARC)將具有動物致癌性資料的亞硝胺類化合物，歸類為極可能對人類致癌的 2A 級(Probably carcinogenic to humans)，或可能對人類致

¹ 財團法人醫藥品查驗中心 藥劑科技組

² 財團法人醫藥品查驗中心 新藥科技組

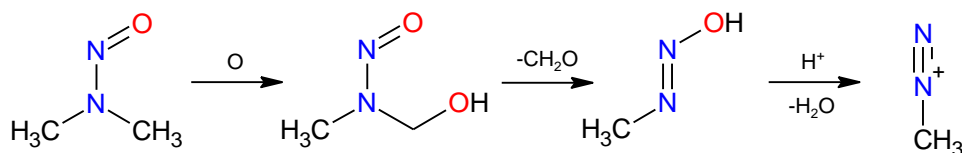
台灣藥物法規
資訊網法規公告台灣藥品
臨床試驗資訊TFDA 藥物
食品安全週報致力法規科學
守護生命健康

Regulatory Science, Service for Life

癌的 2B 級(Possibly carcinogenic to humans)· 沒有足夠動物致癌性資料的亞硝胺類化合物歸為第 3 類。有少數亞硝胺化合物儘管缺乏足夠的人體致癌性資料，仍被 IACR 歸類為對人類致癌的第 1 級(carcinogenic to humans)· 例如· 一些與煙草相關的亞硝胺化合物例如· *N*-nitrosornicotine、4-(*N*-nitrosomethylamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone。[3]

其中· 最令人關注的是某些在食品中可能形成具有致突變性和潛在致癌性的揮發性亞硝胺化合物(volatile *N*-nitrosamines)· 例如· *N*-nitrosodimethylamine (NDMA)· *N*-nitrosodiethylamine (NDEA)· *N*-nitrosopyrrolidine (NPYR)· *N*-nitropiperidine (NPIP)· nitroso-*N*-methyl-*N*-(2-phenyl)ethylamine (NMPEA)· *N*-nitrosodibutylamine (NDBA)· *N*-nitrosomorpholine (NMOR)· *N*-nitrosomethylethylamine (NMEA)及 *N*-nitroso-di-*n*-propylamine (NDPA)。[4]

亞硝胺會藉由代謝· 活化而形成不同之重氮離子(diazonium ions) (圖二)· 如 methyldiazonium· ethyldiazonium 等。烷基重氮離子(alkyldiazonium ions)是具反應親電子性碳陽離子(carbenium ions)之前驅物· 碳陽離子可直接與 DNA—主要與鳥嘌呤(guanine)· 胞嘧啶(cytosine)和胸腺嘧啶(thymine)之氮和氧—發生反應· 形成穩定之加成物(adduct)· 特定亞硝胺形成重氮離子之結構和數量· 係取決於每個亞硝胺之化學結構· 所形成之 DNA 加成物· 則取決於所形成之重氮離子性質· 這些 DNA 加成物· 可被不同之細胞修復機制· 以不同之能力· 速度和準確度進行修復。



圖二、*N*-nitrosodimethylamine 生成 methanediazonium 之反應示意圖

簡而言之· 亞硝胺之致癌性是由多種因素決定的：1) 亞硝胺被代謝活化之能力；2) 組織之代謝能力和形成 diazonium ions/carbenium ions 之能力；3) diazonium ions/carbenium ions 及其所形成 DNA 加成物之性質和安定性；4) 組織中修復不同 DNA 加成物之能力· 速度和準確度及 5) 暴露組織之增殖活性。

台灣藥物法規
資訊網法規公告台灣藥品
臨床試驗資訊TFDA 藥物
食品安全週報致力法規科學
守護生命健康

Regulatory Science, Service for Life

亞硝酸胺(*N*-Nitrosamine)對於動物之致癌性

以全生命週期進行之動物致癌性試驗，是目前評估化學物質致癌性及其與人體關聯性最可靠的資料來源。然而，根據動物致癌性資料各化學物質的致癌性特性鑑別和排序，相當困難。而且能互相比較之範圍亦相當有限。大多數嚙齒類動物致癌性試驗，都是在大鼠和鼯鼠進行的。然而，即便是同一種嚙齒類動物，各實驗室使用之動物品系也不盡相同，不同品系之動物對於化學物質之敏感性通常也不相同。目前最全面之動物致癌性資料來源是 Carcinogenic Potency Database (CPDB, 2007)。在 CPDB 中，收錄 1547 種化學物質、6540 項長期動物致癌試驗資料，並藉由數學模型計算 50%動物致癌劑量 (TD₅₀)。

TD₅₀ 之準確性，很大程度取決於致癌性試驗的品質和規模。只有一個或兩個劑量組試驗所得之 TD₅₀ 值，其信賴區間顯然會比有更多劑量組試驗所得之 TD₅₀ 要寬。然而，只有極少數之致癌性試驗具有四個或更多劑量組；只有 NDMA 和 NDEA 才有相同大鼠品系且相同劑量組數之試驗資料可供比較；而在 CPDB 資料庫中，大多數亞硝酸胺類化合物之致癌性試驗，只有一到兩個劑量組。

動物口服亞硝酸胺化合物主要產生腫瘤之器官是肝臟(大鼠、猴)、食道(大鼠)、肺(大鼠)、膀胱(大鼠)和其他器官，其中以肝臟受影響最大。肝臟成為亞硝酸胺最主要目標器官之原因，可能是因為肝臟具有較強之代謝能力。^[5]

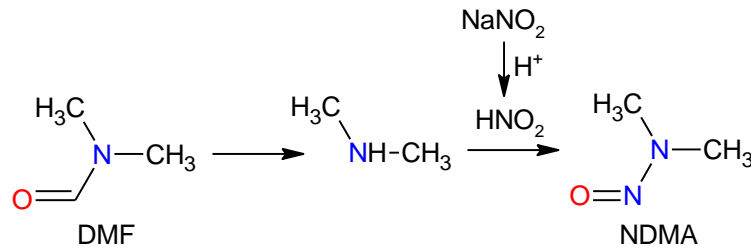
Sartan 類原料藥中生成亞硝酸胺類不純物之原因分析，包含相關汙染來源說明

關於 sartan 類原料藥製程中，生成亞硝酸胺類不純物之原因，以下舉三種亞硝酸胺類不純物作為說明。

例一：根據歐盟在 2018 年 7 月 5 日公布之新聞稿^[6]，來自浙江華海藥業用於治療高血壓之原料藥 valsartan，被發現含有亞硝酸胺類不純物 *N*-nitrosodimethylamine (NDMA)，其化學結構係由二甲胺基(dimethylamino group)與亞硝基(nitroso group)組成。根據歐盟評估報告，原料藥製程在製備四唑環(tetrazole ring)時，使用二甲基甲醯胺(*N,N*-dimethylformamide, DMF)。二甲基甲醯胺可能存在製程不純物二甲胺(dimethylamine)，或二甲基甲醯胺在四唑環製備過程中，降解為二甲胺，此時，二甲

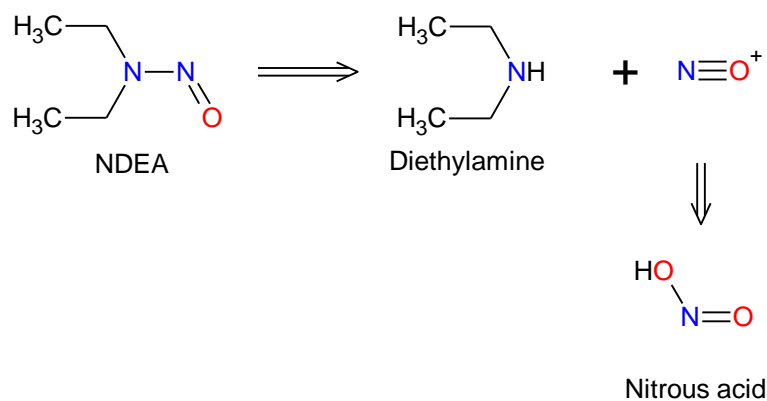


胺與來自製程物料亞硝酸鈉(sodium nitrite)在酸性條件下生成之亞硝酸，進一步反應生成 NDMA (圖三)。



圖三、生成 NDMA 之反應示意圖

例二：*N*-Nitrosodiethylamine (NDEA)為此次 sartan 類原料藥污染事件中，第二個被發現之亞硝胺類不純物，^[7] 根據 NDEA 結構逆合成分析(retrosynthetic analysis) (圖四)，NDEA 是由二乙胺基(diethylamino group)與亞硝基組成。由此可得知，NDEA 生成原因，應是在原料藥製程中使用或帶入三乙胺、二乙胺等化合物，並且在同一步驟下存在亞硝酸，使三乙胺、二乙胺等化合物在亞硝化反應後，生成 NDEA。^[8]



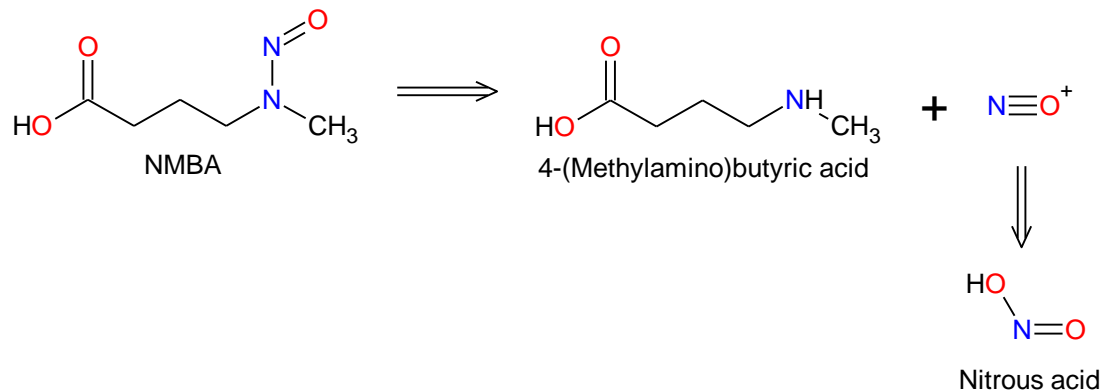
圖四、NDEA 逆合成分析

例三：*N*-Nitroso-*N*-methyl-4-aminobutyric acid (NMBA)為此次事件另一個被發現之亞硝胺類不純物。根據 NMBA 結構化學逆合成分析(圖五)，NMBA 係由 4-(methylamino)butyric acid 與亞硝基兩個片段組成，此外，根據文獻報導，*N*-methyl-2-pyrrolidone (NMP)可經水解，生成 4-(methylamino)butyric acid。綜合

台灣藥物法規
資訊網法規公告台灣藥品
臨床試驗資訊TFDA 藥物
食品安全週報致力法規科學
守護生命健康

Regulatory Science, Service for Life

上述資訊可得知，當原料藥製程生成亞硝酸，同時該製程步驟中使用之物料 NMP 經水解反應生成 4-(methylamino)butyric acid (或者 4-(methylamino)butyric acid 被帶入原料藥製程生成亞硝酸之步驟)，此時 4-(methylamino)butyric acid 將可與亞硝酸進一步反應，生成 NMBA。



圖五、NMBA 逆合成分析

除此之外，根據我國審查經驗及歐、美法規單位報導，^[8,9] sartan 類原料藥製程亦曾發現 *N*-nitrosodibutylamine (NDBA)、*N*-nitrosodiisopropylamine (DIPNA)、*N*-nitrosoethylisopropylamine (EIPNA)、*N*-nitrosomethyl-phenylamine (NMPhA) 等亞硝酸胺類不純物。

綜合我國審查經驗及歐盟報導，^[8,9] 原料藥製程中，因有以下數個污染因子，導致生成或帶入亞硝酸胺類不純物：

- 一、於存在亞硝酸之原料藥製程步驟中，同時使用二級胺或三級胺類化合物，或二級胺或三級胺化合物使用於原料藥製程任一步驟，但該二級胺或三級胺化合物被帶至存在亞硝酸之步驟中。
- 二、製程中使用之製程物料，存在二級胺或三級胺類不純物，或導致降解成二級胺類化合物。例如：三乙胺可能存在二甲胺或二乙胺等不純物；溴化四丁銨中可能存在二丁胺或三丁胺等不純物。
- 三、製程中使用之製程物料，存在亞硝酸鹽不純物。例如：疊氮化鈉(sodium azide)中可能存在亞硝酸鹽；回收物料時利用亞硝酸鹽在酸性條件下，去除殘留之疊



台灣藥物法規
資訊網法規公告



台灣藥品
臨床試驗資訊



FDA
TFDA 藥物
食品安全週報



致力法規科學
守護生命健康

Regulatory Science, Service for Life

氮化合物，導致回收物料中殘留亞硝酸鹽。

四、製程使用之回收溶劑中，存在二級胺或三級胺類不純物；或製程使用之回收溶劑，回收自存在亞硝酸胺類不純物之步驟，導致回收溶劑中存在亞硝酸胺類不純物。

五、由製程物料直接帶入，例如來自水廠之水，經消毒過程，可能使其生成亞硝酸胺類不純物。^[10-12]

六、使用受汙染之製程設備。

審查與考量重點

根據亞硝酸胺類不純物生成之原因，在原料藥製程方面，廠商應考量製程中，可能進行亞硝化反應之步驟，是否同時使用或可能帶入二級胺或三級胺類化合物，導致生成亞硝酸胺類不純物。因此，原料藥製程如何管制二級胺或三級胺類化合物，使其不被帶入可能進行亞硝化反應之步驟，以及對於已生成之亞硝酸胺類不純物，原料藥製程如何清除與管制，將是審查重點。

此外，對於原料藥製程中使用之物料或回收物料，廠商須評估這些物料或回收物料中，是否會將相關汙染因子(例如：二級胺、三級胺類化合物、亞硝酸鹽、亞硝酸胺類不純物)帶入原料藥製程中。對於廠內如何管制相關汙染因子，亦是審查重點。

關於亞硝酸胺類不純物之管制，廠商應依據其安全性評估數據，建立適當之允收標準。依據 ICH M7 指引，對於已知具基因毒性之致癌物質，應將之管制在低於該化合物特定風險評估所訂定之可接受限量下，我國食藥署經評估討論，於 2019 年 4 月公告亞硝酸胺類不純物暫定限量表。^[13] 此外，歐盟依照構效關係(SAR)安全性評估結果，公布建議之亞硝酸胺類不純物 NDBA、DIPNA 及 EIPNA 臨時限量應為 26.5 ng/day，^[9] 即 sartan 類原料藥中之 NDBA、DIPNA 及 EIPNA 暫定允收標準應與 NDEA 相同。

台灣藥物法規
資訊網法規公告台灣藥品
臨床試驗資訊TFDA 藥物
食品安全週報致力法規科學
守護生命健康

Regulatory Science, Service for Life

表一、亞硝胺類不純物暫定限量表^[13]

	每日使用 最大劑量	NDMA (ppm)	NDEA (ppm)	NMBA (ppm)
Valsartan	320 mg	0.3	0.082	0.3
Losartan	100 mg	0.96	0.27	0.96
Irbesartan	300 mg	0.32	0.088	0.32
Azilsartan	80 mg	1.2	0.33	1.2
Olmesartan	40 mg	2.4	0.66	2.4
Candesartan	32 mg	3.0	0.82	3.0
Telmisartan	80 mg	1.2	0.33	1.2

*ppm : $\mu\text{g/g}$, or ng/mg , etc.

關於分析方法之選擇，廠內應依據原料藥製程與檢測極限等，選擇適合之分析方法，包括 LC-MS/MS、GC-MS、GC-MS/MS 等。對於用於檢測原料藥中是否含亞硝胺類不純物之分析方法，廠商應執行分析方法確效(validation)或確認(verification)試驗，以確保該方法效能及特性，確實適合期望達到之目的。此外，原料藥檢驗規格中，亞硝胺類不純物允收標準之單位「ppm」，係指重量重量比，例如： $\mu\text{g/g}$ 、或 ng/mg 等；而實驗室檢品分析過程之單位 $\mu\text{g/mL}$ 、或 mg/L 亦常以 ppm 表示，此處之 ppm 係指重量體積比，兩者間須經檢品濃度換算。因此，廠商應注意亞硝胺類不純物之分析結果，是否屬經檢品濃度回推後之分析結果，以及是否可符合法規要求。

結語

根據文獻報導，亞硝胺類化合物通常由二級、三級胺類化合物經亞硝化反應生成。因此，sartan 類原料藥製程，應儘量避免使用二級胺或三級胺類化合物(例如三乙胺、*N,N*-二異丙基乙基胺、*N,N*-二甲基苯胺等)、含有二級胺或三級胺類不純物之製程物料(例如三乙胺、溴化四丁銨等)、或可能導致降解成二級胺或三級胺類化合物之製程物料(例如 *N,N*-二甲基甲醯胺、*N,N*-二甲基乙醯胺、*N*-甲基吡咯烷酮等)；此外，於製程去除剩餘之疊氮化合物(azide)，應避免使用亞硝酸鈉類之物料，或可適當地將疊氮化合物



台灣藥物法規
資訊網法規公告



台灣藥品
臨床試驗資訊



TFDA 藥物
食品安全週報



致力法規科學
守護生命健康

Regulatory Science, Service for Life

與原料藥分離後，再進行去除疊氮化合物製程；對於製程物料可能帶入二級胺或三級胺類不純物(例如三乙胺、溴化四丁銨、回收溶/試劑等)、亞硝酸鹽不純物(例如疊氮化鈉、回收溶/試劑等)、或亞硝胺類不純物(例如製程用水、回收溶/試劑等)，相關製程物料或製程中應對相關汙染因子有相對應之管制措施；應避免使用受汙染之製程設備，導致亞硝胺類不純物或相關反應前驅物，帶入 sartan 類原料藥製程。

當原料藥製程步驟中，存在二級胺、三級胺等製程物料，且該步驟伴隨進行亞硝化反應者，即該原料藥製程有可能生成亞硝胺類不純物，廠商應以經確效的分析方法，評估分析原料藥中，相關亞硝胺類不純物殘留情形。

當原料藥製程步驟並未使用二級胺或三級胺等製程物料，但所用製程物料中，可能存在或生成二級胺或三級胺等不純物或降解產物，且該步驟伴隨進行亞硝化反應者，該步驟亦有可能生成亞硝胺類不純物，廠商應以經確效的分析方法，評估分析原料藥中，相關亞硝胺類不純物殘留情形。

當原料藥製程於任一步驟中，使用之製程物料或其內含之不純物，可能導致生成亞硝胺類不純物時，廠商應評估該亞硝胺類不純物，是否會殘留於原料藥中。

參考文獻

1. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, World Health Organization International Agency for Research on Cancer: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 94. Ingested Nitrate and Nitrite, and Cyanobacterial Peptide Toxins, Lyon, IARC, 2010:1-464.
2. Jong-eun Park, Jung-eun Seo, Jee-yeon Lee, et al., Distribution of Seven *N*-Nitrosamines in Food, Toxicol. Res. 2015;31:279-288.
3. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, World Health Organization International Agency for Research on Cancer: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Personal Habits and Indoor Combustions. Volume 100 E. A Review of Human Carcinogens, Lyon, IARC, 2012:1-598.



台灣藥物法規
資訊網法規公告



台灣藥品
臨床試驗資訊



TFDA 藥物
食品安全週報



致力法規科學
守護生命健康

Regulatory Science, Service for Life

4. EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS), Alicja Mortensen, Fernando Aguilar, et al., Re-evaluation of Potassium Nitrite (E 249) and Sodium Nitrite (E 250) as Food Additives, EFSA Journal 2017;15,4786; doi:10.2903/j.efsa.2017.4786.
5. C.S. Yang, T. Smith, H. Ishizaki, et al., Metabolism and Activation of Nitrosamines Catalysed by Cytochrome P-450 Isoenzymes, N-Oxidation of Drugs 1991:295-311.
6. EMA, EMA Reviewing Medicines Containing Valsartan from Zhejiang Huahai Following Detection of An Impurity, EMA/459276/2018.
https://www.ema.europa.eu/en/documents/press-release/ema-reviewing-medicines-containing-valsartan-zhejiang-huahai-following-detection-impurity_en.pdf assessed 2020/7/13.
7. EMA, Valsartan: Review of Impurities Extended to Other Sartan Medicines, EMA/641563/2018.
https://www.ema.europa.eu/documents/press-release/valsartan-review-impurities-extended-other-sartan-medicines_en.pdf assessed 2020/7/13.
8. EMA, Assessment Report, EMA/217823/2019.
https://www.ema.europa.eu/en/documents/variation-report/sartans-article-31-referral-chmp-assessment-report_en.pdf assessed 2020/7/13.
9. EMA, Questions and Answers on “Information on Nitrosamines for Marketing Authorisation Holders” , EMA/CHMP/428592/2019 rev. 3.
https://www.ema.europa.eu/documents/referral/nitrosamines-emea-h-a53-1490-questions-answers-information-nitrosamines-marketing-authorisation_en.pdf assessed 2020/7/13.
10. Maxwell C. Meadows, Soni M. Pradhanang, Takahiro Fujioka, et al., *N*-Nitrosodimethylamine Formation from Treatment of Seasonally and Spatially Varying Source Water, Water 2019;11,2019;doi:10.3390/w11102019.



11. Chun-Cheng Fan, Tsair-Fuh Lin, *N*-Nitrosamines in Drinking Water and Beer: Detection and Risk Assessment, *Chemosphere* 2018;191:48-56.
12. Maria José Farré, Sara Insa, Aaron Lamb, et al., Occurrence of *N*-nitrosamines and Their Precursors in Spanish Drinking Water Treatment Plants and Distribution Systems, *Environ. Sci.: Water Res. Technol.* 2020;6:210-220.
13. 食品藥物管理署 · FDA 藥字第 1081402520 號函 · 108 年 04 月 01 日。