

用于 *N*-亚硝基杂质致突变性评价的增强细菌回复突变实验研究

寇小旋^{1,2,3}, 田 冶^{2,4#}, 蒋晨晨^{1,2}, 宋 捷^{1,2}, 文海若^{1,2*}

1. 中国食品药品检定研究院 安全评价研究所, 北京 100176

2. 药品监管科学全国重点实验室, 北京 102629

3. 中国药科大学, 江苏 南京 210009

4. 中国食品药品检定研究院 化学药品检定所, 北京 102629

摘要: **目的** 建立增强版细菌回复突变实验, 并应用于 *N*-亚硝基普萘洛尔 (NNP) 的致突变风险评价。 **方法** 使用 *N*-亚硝基二乙胺 (NDEA)、*N*-亚硝基二甲胺 (NDMA)、1-环戊基-4-亚硝基哌嗪 (CPNP) 比较不同预培养时间及不同 S9 含量对细菌回复突变实验结果的影响: 采用鼠伤寒沙门氏菌 (TA98、TA100、TA1535、TA1537) 及大肠杆菌 WP2 *uvrA* (pkM101) 回复突变实验预培养法, NDEA 和 NDMA 设置 6 个质量浓度 (每皿 5 000、2 500、1 000、500、250、125 μg), 并分别在 10%大鼠 S9/10%仓鼠 S9/30%大鼠 S9/30%仓鼠 S9/非代谢活化条件下开展 Ames 实验; CPNP 设置 2 个质量浓度 (每皿 500、125 μg), 在 30%大鼠 S9/30%仓鼠 S9/非代谢活化条件下开展 Ames 实验。NDEA 和 NDMA 与 S9 mix 或 0.1 mol·L⁻¹ 缓冲液、细菌混合后置于恒温水浴摇床在 37 °C、50 r·min⁻¹ 预培养 30 或 60 min (仅 10%大鼠 S9 代谢活化条件下预培养 60 min), CPNP 在相同设备条件下预培养 30 min。NNP 的致突变风险评价: NNP 设置 5 个质量浓度 (每皿 62.500 0、31.250 0、15.625 0、7.812 5、3.900 0 μg), 并于 30%大鼠 S9、30%仓鼠 S9 及非代谢活化条件下进行, NNP 与 S9 mix 或 0.1 mol·L⁻¹ 缓冲液、菌株混合后置于恒温水浴摇床在 37 °C、50 r·min⁻¹ 预培养 30 min。 **结果** 所有代谢活化条件下, 与溶媒对照组比较, NDEA 可诱导 TA98、TA100、TA1535 和 WP2 *uvrA* (pkM101) 出现与剂量相关的回复突变菌落数增加; 在仓鼠 S9 代谢活化条件下, NDMA 可诱导 TA100、TA1535 和 WP2 *uvrA* (pkM101) 出现与剂量相关的回复突变菌落数增加。CPNP 在非 S9 条件下可诱导 TA1535 和 TA1537 的各菌回复突变率明显增加; 30%大鼠和仓鼠 S9 代谢条件下诱导 TA100、TA1535、TA1537 和 WP2 *uvrA* (pkM101) 的菌落回复突变数明显增加。延长预培养时间 (30~60 min) 未增强 NDEA/NDMA 的代谢活化效果。增加大鼠 S9 含量 (10%至 30%) 提高了 NDEA 对 TA1535 和 TA1537 的诱变性, 也提高了 NDMA 对 TA1537 的诱变性, 但降低了其对 TA98、TA100 和 WP2 *uvrA* (pkM101) 的诱变性; 增加仓鼠 S9 含量仅提高 NDEA 对 WP2 *uvrA* (pkM101) 的诱变性。在仓鼠 S9 代谢活化条件下, NNP 导致 TA1535 回复突变菌落数增加。 **结论** 相同剂量条件下, CPNP 诱导的回复突变菌落数量远超过 NDEA 和 NDMA。预培养时间延长至 60 min 对代谢活化效果无进一步改进, S9 的代谢活化条件与其含量成正相关, 仓鼠 S9 的代谢活化效果优于大鼠 S9。NNP 的增强细菌回复突变实验结果为阳性, 提示其代谢活化产物具有致突变性风险。

关键词: 增强版细菌回复突变实验; 鼠伤寒沙门氏菌; 大肠杆菌 WP2 *uvrA* (pkM101); 代谢活化; 致突变性; *N*-亚硝基普萘洛尔

中图分类号: R965

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2026)03-0813-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.03.008

Study on enhanced bacterial revertant test for mutagenicity evaluation of *N*-nitroso impurities

KOU Xiaoxuan^{1,2,3}, TIAN Ye^{2,4}, JIANG Chenchen^{1,2}, SONG Jie^{1,2}, WEN Hairuo^{1,2}

1. Institute of Safety Evaluation, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100176, China

2. State Key Laboratory of Drug Regulatory Science, Beijing 102629, China

3. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

4. Institute of Chemical Drugs Control, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China

收稿日期: 2025-06-30

基金项目: 药品监管科学全国重点实验室课题“药品杂质遗传毒性评价新技术和生物标志物研究”(2023SKLDRS0128)

作者简介: 寇小旋, 女, 硕士研究生, 研究方向为遗传毒理学。E-mail: 1468021836@qq.com

#共同第一作者: 田 冶, 男, 博士, 研究方向为药品质量控制研究。E-mail: tianye@nifdc.org.cn

*通信作者: 文海若, 女, 博士, 研究员, 研究方向为药理毒理学。E-mail: wenhairuo@nifdc.org.cn

Abstract: Objective To establish an enhanced bacterial reverse mutation test and apply it to the mutagenic risk assessment of *N*-nitroso-propranolol. **Methods** The effects of different pre-culture times and different S9 contents on the results of the bacterial reverse mutation test were compared using *N*-nitrosodiethylamine (NDEA), *N*-nitrosodimethylamine (NDMA), and 1-cyclopentyl-4-nitrosopiperazine (CPNP). The reverse mutation experiments of *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537) and *Escherichia coli* WP2 *uvrA* (pkM101) were conducted using the pre-culture method. For NDEA and NDMA, six mass concentrations (5 000, 2 500, 1 000, 500, 250, and 125 μg per plate) were set, and the Ames test was carried out under 10% rat S9/10% hamster S9/30% rat S9/30% hamster S9/non-metabolic activation conditions. For CPNP, two mass concentrations (500 and 125 μg per plate) were set, and the Ames test was carried out under 30% rat S9/30% hamster S9/non-metabolic activation conditions. NDEA and NDMA were mixed with S9 mix or 0.1 mol·L⁻¹ buffer solution and bacteria, and then pre-cultured for 30 or 60 min at 37 °C and 50 r·min⁻¹ in a constant temperature water bath shaker (only 60 min for 10% rat S9 metabolic activation condition), while CPNP was pre-cultured for 30 min under the same conditions. The mutagenic risk assessment of NNP: NNP was set at five mass concentrations (62.500 0, 31.250 0, 15.625 0, 7.812 5, and 3.900 0 μg per plate), and the Ames test was conducted under 30% rat S9, 30% hamster S9, and non-metabolic activation conditions. NNP was mixed with S9 mix or 0.1 mol·L⁻¹ buffer solution and the strain, and then pre-cultured for 30 min at 37 °C and 50 r·min⁻¹ in a constant temperature water bath shaker. **Results** Under all metabolic activation conditions, NDEA could induce a dose-related increase in the number of revertant colonies in all strains except TA98, TA100, TA1535 and WP2 *uvrA* (pkM101). Under hamster S9 metabolic activation conditions, NDMA could induce a dose-related increase in the number of revertant colonies in all strains except TA100, TA1535 and WP2 *uvrA* (pkM101). CPNP could induce a significant increase in the reverse mutation rate of TA1535 and TA1537 under non-S9 conditions; at 30% rat and hamster S9 metabolic conditions, it could induce a significant increase in the number of revertant colonies in TA100, TA1535, TA1537 and WP2 *uvrA* (pkM101). Extending the pre-incubation time from 30 to 60 minutes did not enhance the metabolic activation effect of NDEA/NDMA. Increasing the S9 content in rats (from 10% to 30%) enhanced the mutagenicity of NDEA towards TA1535 and TA1537, and also increased the mutagenicity of NDMA towards TA1537, but reduced its mutagenicity towards TA98, TA100, and WP2 *uvrA* (pkM101). but reduced it on TA98, TA100 and WP2 *uvrA*; increasing the content of hamster S9 only enhanced the mutagenicity of NDEA on WP2 *uvrA*. Under hamster S9 metabolic activation conditions, 3.9 to 62.5 μg per plate of *N*-nitroso-propranolol could cause an increase in the number of revertant colonies in TA1535. **Conclusion** Under the same dose conditions, the number of revertant colonies induced by CPNP far exceeds that of NDEA and NDMA. Extending the pre-incubation time to 60 minutes did not further improve the metabolic activation effect, and the metabolic activation effect of S9 was positively correlated with its content. The metabolic activation effect of hamster S9 was better than that of rat S9. The result of the enhanced bacterial reverse mutation test for NNP is positive, indicating that its metabolically activated products have a mutagenic risk.

Key words: enhanced bacterial reverse mutation test; *Salmonella typhimurium*; *Escherichia coli* WP2 *uvrA* (pkM101); metabolic activation; mutagenicity; *N*-nitroso-propranolol

自 2018 年在缙沙坦原料药中检出超量 *N*-亚硝基二甲胺 (NDMA) 以来, 受到 *N*-亚硝基杂质影响的药物比例明显增加。研究显示, 超过 40% 的原料药和 29.6% 的原料药杂质是潜在的亚硝胺前体, 其中大多数为 *N*-亚硝基药物结构相关杂质 (IARC) [1]。国际癌症研究机构将亚硝胺类化合物列为 2A 类致癌物, 存在致癌性风险 [2-3], *N*-亚硝基杂质风险评估已成为国内外药品监管的重点。

细菌回复突变实验是杂质遗传毒性风险评价的重要实验方法, ICH M7 [4] 指导原则中指出, 杂质的实验评价建议在药物非临床研究质量管理规范 (GLP) 条件下开展。*N*-亚硝胺类化合物的致突变性主要与其代谢产物有关, 常规的平皿掺入法通常无法检出 *N*-亚硝基杂质的致突变性风险, 需在预培养

条件下开展研究以确保菌株与受试物及其代谢产物充分暴露。欧洲药品管理局 (EMA) 在 2023 年发布的指南文件 [5] 中指出, 评价 *N*-亚硝基杂质的致突变性风险时, 应开展增强的细菌回复突变实验。即使用鼠伤寒沙门氏菌 TA98、TA100、TA1535、TA1537 和大肠杆菌 WP2 *uvrA* (pkM101) 共 5 种菌株, 在无代谢活化、30% 大鼠 S9 和 30% 仓鼠 S9 代谢活化以及预培养 30 min 条件下开展 [6]。此外, 应包括 2 种 *N*-亚硝基类化合物作为阳性对照。然而, 预培养时间延长、S9 含量的增加可能对细菌生长产生一定抑制, *N*-亚硝基类阳性对照及浓度的选择也有待研究。为保证致突变性评价结果的可靠性, 国家药物安全评价监测中心参照 EMA 的要求应用建立增强版细菌回复突变实验, 并应用于 *N*-亚硝基普

萘洛尔 (NNP) 的致突变风险评价。

1 材料

1.1 菌株

鼠伤寒沙门氏菌组氨酸营养缺陷型 (*his⁻*) 菌株 TA98、TA100、TA1535、TA1537 和大肠杆菌 WP2 *uvrA* (pkM101) 引自日本 (株) 生物科学中心 (JBS INC.)，经分离筛选后对其是否存在氨基酸及生物素合成缺陷、细胞壁脂多糖缺失 (*rfa* 基因)、紫外线 (*uvrA* 或 Δ *uvrB* 基因) 修复缺陷、抗氨基青霉素及抗四环素 (含 pKM101 或 pAQ1 质粒) 等特性进行鉴定，鉴定结果符合要求后用于实验。

1.2 主要试剂

NNP (质量分数 >95%)、1-环戊基-4-亚硝基吡嗪 (CPNP) (批号 100018-201610, 质量分数 >95%)，购自中国食品药品检定研究院；*N*-亚硝基二乙胺 (NDEA) (批号 21-NIT-21-07, 质量分数 99.43%)、NDMA (批号 19-NNI-10-32, 质量分数 >99%)，购自 Pharmace chemi Lad；营养肉汤 (批号 20240313)、琼脂粉 (批号 711C021, 质量分数 >95%)、葡萄糖 (批号 2231121003, 质量分数 >95%)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADP) (批号 24231123004, 质量分数 >99%)，Solarbio 公司；G-6-P (批号 WXBD6345V, 质量分数 >98%)、9-AA (批号 102553599)、2-AA (批号 102495402)，Sigma 公司；大鼠肝 S9 混合液 (批号 24FS0222)、仓鼠肝 S9 混合液 (批号 25HS004F)，CHI SCIENTIFIC 公司；AF-2 (TRC 公司，批号 18-JQW-125-2)；NaN₃ (Merck 公司，批号 S32296047)；B (a) P (Sigma 公司，批号 34231026005)。

1.3 主要仪器

HERA cell VIOS 160i 二氧化碳培养箱 (Thermo Fisher 公司)；NU-543-400S 生物安全柜 (Nuair 公司)；MIR-253 恒温培养箱 (SANYO Electric Co., Ltd.)；CKX31 倒置显微镜 (Nikon 公司)；NTS-1300

水浴摇床 (EYELA 公司)；IS600 细菌培养箱 (YAMATO 公司)。

2 方法

2.1 细菌回复突变实验

2.1.1 增强细菌回复突变实验的建立 琼脂及溶液制备方法见本课题组前期发表文献方法^[7]。细菌冻融液与营养肉汤混合后置于水浴摇床在 37 °C、120 r·min⁻¹ 条件下扩增 10 h，扩增后使用酶标仪对吸光度 (*A*) 值进行检测，估算活菌浓度达到每毫升 1×10^9 个后用于实验。

根据 Kajavadara^[8]亚硝胺化合物阳性对照浓度的研究，并根据抑菌情况调整后，NDEA 和 NDMA 设置 6 个质量浓度 (每皿 5 000、2 500、1 000、500、250、125 μg)，并分别在 10%大鼠 S9/10%仓鼠 S9/30%大鼠 S9/30%仓鼠 S9/非代谢活化条件下开展 Ames 实验；CPNP 设置 2 个质量浓度 (每皿 500、125 μg)，在 30%大鼠 S9/30%仓鼠 S9/非代谢活化条件下开展 Ames 实验。NDEA 和 NDMA 与 S9 mix 或 0.1 mol·L⁻¹ 缓冲液、细菌混合后置于恒温水浴摇床在 37 °C、50 r·min⁻¹ 预培养 30 或 60 min (仅 10%大鼠 S9 代谢活化条件下预培养 60 min)，CPNP 在相同设备条件下预培养 30 min。

2.1.2 NNP 细菌回复突变实验 在 NNP 的 Ames 实验评价中，根据之前的预试验，浓度太高导致抑菌性，因此设置 5 个质量浓度 (每皿 62.500 0、31.250 0、15.625 0、7.812 5、3.900 0 μg)，并于 30%大鼠 S9、30%仓鼠 S9 及非代谢活化条件下进行。NNP 与 S9 mix 或 0.1 mol·L⁻¹ 缓冲液、菌株混合后置于恒温水浴摇床在 37 °C、50 r·min⁻¹ 预培养 30 min。

实验均设置 DMSO 溶媒对照组和阳性对照组 (各菌株在各代谢条件下的阳性对照剂及剂量详见表 1)，每组平行 3 皿，所有样本置于 37 °C 恒温培养约 48 h 后进行菌落计数，实验重复 3 次。

表 1 不同菌株在不同代谢条件下的阳性对照试剂

Table 1 Positive control reagents for different strains under various metabolic conditions

代谢条件	阳性对照试剂[剂量/(μg·皿 ⁻¹)]				
	TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2 <i>uvrA</i> (pKM101)
-S9 30 min	AF-2 (0.1)	AF-2 (0.01)	NaN ₃ (0.5)	9-AA (40)	AF-2 (0.05)
+30%仓鼠 S9 mix 30 min	B(a)P (10)	B(a)P (10)	2-AA (2)	2-AA (2)	2-AA (2)
+30%大鼠 S9 mix 30 min	B(a)P (5)	B(a)P (5)	2-AA (1)	2-AA (1)	2-AA (1)
+10%大鼠 S9 mix 30 min	B(a)P (10)	B(a)P (10)	2-AA (2)	2-AA (2)	2-AA (2)
+10%大鼠 S9 mix 60 min	B(a)P (5)	B(a)P (5)	2-AA (1)	2-AA (1)	2-AA (1)
+10%仓鼠 S9 mix 30 min	B(a)P (10)	B(a)P (10)	2-AA (2)	2-AA (2)	2-AA (2)

2.2 菌落计数及结果判定

细菌回复突变实验计数每孔中的回复菌落数量, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。TA98、TA100 和 WP2 *uvrA* (pkM101) 的回复突变菌落数达到阴性对照组的 2 倍或 2 倍以上, 并具有剂量-反应关系时认为结果为阳性。TA1535 和 TA1537 由于背景回复突变菌落数较少, 回复突变菌落数达到阴性对照组的 3 倍或 3 倍以上, 并具有剂量-反应关系时认为结果为阳性。至少 1 个菌株结果为阳性时, 认为受试物具有致突变性作用。

3 结果

3.1 增强细菌回复突变实验的建立

本研究使用 NDEA 和 NDMA 比较不同预培养时间及不同 S9 含量对细菌回复突变实验结果的影响 (表 2)。所有代谢活化条件下, NDEA 可诱导 TA98、TA100、TA1535 和 WP2 *uvrA* (pkM101) 出现与剂量相关的回复突变菌落数增加; 在仓鼠 S9 代谢活化条件下, NDMA 可诱导 TA100、TA1535 和 WP2 *uvrA* (pkM101) 出现与剂量相关的回复突变菌落数增加。CPNP 属于药物基质亚硝酸胺 (NDSRI), 为 EMA 指南性文件推荐的阳性对照之一。与相同条件下溶媒对照组比较, 每皿 125、500 μg 的 CPNP 在非 S9 条件下可诱导 TA1535 和 TA1537 回复突变数明显增加; 30%大鼠和仓鼠 S9 代谢条件下诱导

TA100、TA1535、TA1537 和 WP2 *uvrA* (pkM101) 的菌落回复突变数明显增加。结果提示 NDEA、NDMA 和 CPNP 均可作为增强细菌回复突变实验体系的阳性对照。相同剂量条件下, CPNP 诱导的回复突变菌落数量远超过 NDEA 和 NDMA。

每皿 125~5 000 μg 的 NDEA 和 NDMA 在 10% 大鼠 S9 处理条件下, 将预培养时间自 30 min 延长至 60 min, 各菌的回复突变数均未见增加。预培养 30 min 时, 大鼠 S9 含量由 10%提高至 30%后, 每皿 125~5 000 μg 的 NDEA 诱导的 TA1535 和 TA1537 的回复突变菌落数有所增加, 每皿 125~5 000 μg 的 NDMA 诱导的 TA1537 的回复突变菌落数也有所增加, 而 TA98、TA100 和 WP2 *uvrA* (pkM101) 的回复突变菌落数则有所降低。预培养 30 min 时, 仓鼠 S9 含量由 10%提高至 30%后, 每皿 125~5 000 μg 的 NDEA 诱导的 WP2 *uvrA* (pkM101) 的回复突变菌落数有所增加, 而其他菌株的回复突变菌落数未见进一步增加; NDMA 诱导的各菌回复突变菌落数均未见进一步增加。仓鼠 S9 处理条件下, 每皿 125~5 000 μg 的 NDEA 诱导的各菌的回复突变数均高于相同含量大鼠 S9 处理条件下的回复突变率。可见, 预培养时间延长至 60 min 对代谢活化效果无进一步改进, S9 的代谢活化条件与其含量成正相关, 仓鼠 S9 的代谢活化效果优于大鼠 S9。

表 2 不同代谢条件 Ames 实验结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Results of Ames test under different metabolic conditions ($\bar{x} \pm s, n=3$)

代谢条件	受试物	剂量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{皿}^{-1}$)	突变回复菌落数				
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2 <i>uvrA</i> (pKM101)
-S9 30 min	溶媒对照	—	14±8	154±15	7±3	8±4	128±16
	NDEA	125	16±2	136±11	7±3	6±1	118±11
		250	18±3	128±16	7±3	5±4	114±15
		500	20±4	125±13	7±3	6±3	115±4
		1 000	15±4	134±27	10±3	6±2	125±22
		2 500	19±4	144±8	9±3	8±3	118±15
	NDMA	5 000	16±3	154±12	8±6	6±4	129±14
		125	22±1	151±18	7±7	7±4	138±33
		250	12±3	140±9	9±3	7±3	135±17
		500	14±2	154±0	7±4	8±1	128±10
		1 000	17±2	143±6	8±2	7±1	123±7
	CPNP	2 500	17±6	140±15	12±3	4±4	138±3
		5 000	14±2	154±4	12±3	8±2	117±13
		125	16±2	110±7	24±4	45±10	155±5
		500	16±4	105±6	30±3	32±9	162±8
阳性对照		—	371±47	664±50	380±38	228±21	4 240±212

表 2 (续)

代谢条件	受试物	剂量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	突变回复菌落数					
			TA98	TA98	TA98	TA98	TA98	
+30%仓鼠	溶媒对照	—	26±3	83±7	12±2	13±4	175±9	
	S9 mix 30 min	NDEA	125	26±5	93±15	16±5	13±6	327±6
			250	31±6	121±21	24±3	16±3	466±117
			500	35±4	221±77	29±4	15±6	791±57
			1 000	34±6	348±70	55±2	12±2	1 339±228
			2 500	76±11	445±30	118±23	14±2	2 059±665
			5 000	155±20	1 761±1 447	200±20	14±5	4 101±95
	NDMA		125	19±4	103±12	11±1	14±5	195±21
			250	21±6	138±8	11±0	12±3	235±15
			500	27±8	143±5	10±3	19±3	275±40
			1000	21±3	165±18	12±2	14±5	379±32
			2 500	24±3	248±22	21±14	17±2	775±67
			5 000	23±1	299±62	35±20	11±3	1 271±116
	CPNP		125	42±16	1 268±43	2 701±33	34±5	266±18
			500	30±4	2 296±243	3 802±162	25±3	731±38
		阳性对照	—	124±8	346±16	65±16	36±6	669±65
	+30%大鼠	溶媒对照	—	19±4	136±5	11±2	9±1	96±2
		S9 mix 30 min	NDEA	125	25±3	123±18	14±2	14±3
			250	17±2	120±10	13±3	15±4	90±2
			500	23±4	115±15	23±4	47±10	97±9
			1 000	34±3	124±5	18±3	54±3	118±3
			2 500	49±9	218±22	37±4	20±6	180±13
			5 000	54±15	328±20	39±2	16±4	239±18
NDMA			125	21±6	124±8	11±5	13±3	105±12
			250	18±3	131±5	15±2	15±6	96±10
			500	21±5	128±13	10±2	16±7	96±8
			1 000	17±4	64±6	10±2	9±2	108±10
			2 500	25±5	122±13	7±3	12±1	130±8
			5 000	24±2	179±18	12±5	16±3	117±15
CPNP			125	20±3	432±22	494±81	40±10	240±14
			500	15±6	647±38	653±129	44±5	274±22
		阳性对照	—	107±2	431±32	22±3	30±4	291±36
+10%大鼠		溶媒对照	—	30±4	62±10	10±1	11±2	100±6
		S9 mix 30 min	NDEA	125	21±3	70±12	10±3	10±3
			250	21±0	94±16	12±2	12±2	291±33
			500	23±8	108±24	12±4	12±4	525±121
			2 500	50±7	344±87	16±5	11±5	1 507±287
			5 000	82±17	571±120	20±3	20±3	2 088±306
			NDMA	125	32±5	68±14	11±7	11±7
		250	28±8	83±8	13±4	13±4	116±28	
		500	36±6	75±7	15±6	12±6	130±13	
		2 500	35±3	84±5	15±4	12±4	177±7	
		5 000	31±12	85±11	16±1	11±1	181±9	
		阳性对照	—	100±7	219±14	49±6	42±8	195±41

表 2 (续)

代谢条件	受试物	剂量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{皿}^{-1}$)	突变回复菌落数					
			TA98	TA98	TA98	TA98	TA98	
+10%大鼠	溶媒对照	—	24±4	63±3	11±3	11±3	88±13	
	S9 mix 60 min	NDEA	125	23±6	81±10	10±1	12±4	104±20
			250	22±2	78±4	12±7	12±4	165±14
			500	22±4	135±55	13±4	12±3	197±31
			2 500	44±12	181±44	18±6	14±3	579±69
			5 000	58±13	258±43	17±3	15±2	1 400±42
	NDMA		125	30±5	71±6	9±2	10±2	137±11
			250	38±7	72±4	13±3	12±3	138±17
			500	42±8	72±7	11±3	13±3	147±15
			2 500	40±4	83±12	10±1	11±3	155±21
			5 000	45±15	85±13	12±5	13±1	145±34
		阳性对照	—	94±6	208±11	21±5	33±3	98±12
+10%仓鼠	溶媒对照	—	21±8	132±13	11±3	12±3	203±13	
	S9 mix 30 min	NDEA	125	27±7	142±16	11±5	11±4	337±44
			250	22±4	155±15	11±2	13±2	443±70
			500	33±5	162±8	14±5	16±2	461±47
			2 500	106±22	1 248±202	73±5	15±2	1 205±243
			5 000	142±23	1 528±302	121±25	21±7	1 609±272
	NDMA		125	19±3	125±5	9±2	16±1	217±11
			250	16±6	129±4	10±1	14±2	236±11
			500	20±5	133±12	11±1	15±2	238±17
			2 500	23±1	158±16	13±3	17±6	315±23
			5 000	24±12	303±28	23±10	17±4	517±33
		阳性对照	—	87±23	435±21	98±5	51±3	852±336

3.2 NNP 细菌回复突变实验

本研究分别在无 S9 代谢活化、30%大鼠 S9 代谢活化和 30%仓鼠 S9 代谢活化条件下评估 NNP 的致突变性风险 (表 3)。在无 S9 代谢活化和 30%大鼠 S9 代谢活化条件下, 每皿 3.9~62.5 μg 的 NNP 诱导的回复菌落突变数与溶媒对照组比较未见明显差异, 且无与剂量增加的突变菌落数增加趋势。在仓鼠 S9 代谢活化条件下, 每皿 3.9~62.5 μg 的 NNP 导致 TA1535 回复突变菌落数增加, 且存在浓度效应相关性, 每皿 62.5 μg 时的平均回复突变数为溶媒对照组的 8.6 倍。NNP 的增强细菌回复突变实验结果为阳性, 提示其代谢活化产物具有致突变性风险。

4 讨论

为确保公众用药安全, 对药物中有致癌性风险的 *N*-亚硝胺杂质的致突变性进行合理评估与监管

至关重要。*N*-亚硝基杂质的致突变性与其体内代谢过程有关, 如, 细胞色素酶 CYP2E1、CYP2A6、CYP2C9、CYP3A4 和 CYP1A1 等 I 相药物代谢酶可通过在 α -碳 (与 *N*-亚硝基部分相邻的碳) 的羟基化反应, 使其形成具有致突变性的代谢产物^[9]。因此, 适宜的代谢活化体系及相关菌株和阳性对照的选择是实验体系成立的核心。本研究比较了不同条件下多种 *N*-亚硝基杂质的增强细菌回复突变实验结果, 系统评估了该类方法的检测效能, 并在此基础上提出若干创新点。

与传统 Ames 实验相比, 本研究所建立的增强型实验体系在以下几个方面体现出显著优势: 首先, 在代谢活化条件方面, 本研究明确使用 30%的大鼠或仓鼠 S9 预培养 30 min 可充分检出 NDMA、NDEA 和 CPNP 的致突变性风险。这一条件的优化有效模拟了体内代谢环境, 尤其突出了仓鼠 S9 在

表 3 不同代谢条件 Ames 实验结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
 Table 3 Results of Ames test under different metabolic conditions ($\bar{x} \pm s, n=3$)

代谢条件	受试物	剂量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{皿}^{-1}$)	突变回复菌落数					
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2 <i>uvrA</i> (pKM101)	
-S9 30 min	溶媒对照	—	27±4	99±15	14±4	11±5	91±24	
	NNP	3.900	25±3	52±11	9±1	11±1	92±4	
		7.800	27±5	85±7	7±1	13±4	95±1	
		15.625	23±5	100±12	10±3	11±5	74±14	
		31.250	23±6	102±9	7±2	10±6	77±9	
		62.500	21±9	98±5	15±1	5±2	75±27	
	阳性对照	—	441±32	241±55	265±34	134±10	1 361±145	
+30% 仓鼠	溶媒对照	—	25±10	93±19	10±3	8±2	30±1	
	NNP	3.900	25±5	91±6	19±10	9±4	41±9	
		S9 mix	7.800	30±5	114±6	38±3	11±2	39±6
		30 min	15.625	33±6	136±17	57±8	11±2	35±11
			31.250	30±5	139±13	70±16	6±2	46±8
			62.500	28±12	131±25	76±7	8±5	55±3
	阳性对照	—	414±54	271±18	214±9	226±28	183±11	
+30% 大鼠	溶媒对照	—	25±8	90±18	10±1	13±2	96±3	
	NNP	3.900	30±5	85±16	12±1	17±6	112±9	
		S9 mix	7.800	31±4	82±13	16±6	17±2	96±4
		30 min	15.625	32±4	75±14	21±4	12±3	111±34
			31.250	33±7	75±3	22±7	8±1	104±13
			62.500	33±3	88±9	23±5	16±10	96±7
	阳性对照	—	365±14	547±22	275±7	122±10	291±36	

CYP 酶活性方面的优势。在既往研究中, Bartsch 等^[10]报道, 与大鼠肝脏切片相比, 仓鼠肝脏切片中可检出更多的 ¹⁴C 标记的 NDMA 和 NDEA 诱导的 ¹⁴CO₂, 提示仓鼠 S9 对 *N*-亚硝基的代谢效力更优。Evans 等^[11]指出尽管大鼠和仓鼠 S9 中均含有 *N*-亚硝基杂质相关的代谢酶, 但仓鼠 S9 的 CYP 底物的活性更强, 其中仓鼠 S9 中 CYP2A6 的活性比大鼠 S9 高 60 倍。既往研究^[6, 12]也证实了与大鼠 S9 相比, 仓鼠 S9 处理后的细菌回复突变菌落数进一步增加。

其次, 在菌株选择策略上, 本研究识别出 TA100、TA1535 和 WP2 *uvrA* (pKM101) 为最灵敏的菌株。叶倩等^[12]在不同条件下开展细菌回复突变实验对 NDMA、NDEA、*N*-亚硝基二丙胺 (NDPA) 和 *N*-亚硝基二丁胺 (NDBA) 的致突变性进行评估, 结果提示 TA100、TA1535 和 WP2 *uvrA* 可有效检出上述杂质的致突变性。Akihiro 等^[13]报道, 与 WP2 *uvrA* 比较, WP2 *uvrA* (pKM101) 可更为灵敏地检

出 *N*-亚硝基杂质的致突变性风险, 如, *N*-亚硝基-*N*-甲基苯胺 (NMPHA) 和 *N*-硝基联苄基胺 (NPhBeA) 仅在 WP2 *uvrA* (pKM101) 中呈阳性结果。上述结果与本研究结果基本一致。该结果提示, 针对不同结构类型的 NDSRIs, 需采用具备不同修复背景及质粒增强机制的菌株组合, 以提升检测体系的覆盖能力和可靠性。

此外, 本研究首次提出将 CPNP (利福喷丁类似杂质) 作为 NDSRI 类阳性对照物的适用性。CPNP 为利福喷丁结构类似的杂质, 可来自原料药的起始物料 1-氨基-4-环戊基哌嗪^[14]。尽管基于分子结构认为 CPNP 的人体致癌性风险低于 NDMA, 本研究结果则提示与 NDMA 相比, CPNP 可在更低剂量条件和更多菌株范围内引起细菌回复菌落数大幅增加, 验证了 CPNP 可作为增强细菌回复突变实验的 NDSRI 类阳性对照。

进一步地, 本研究成功验证了增强型 Ames 实验在实际药物杂质评估中的应用价值。盐酸普萘洛

尔片为 β -肾上腺素受体阻滞剂，临床广泛用于心律失常和高血压的治疗，而 NNP 为其降解产生的 NDSRI。因缺乏致癌性数据，EMA 根据 *N*-亚硝基致癌物效价分类方法（CPCA）给出 NNP 的可接受限度值为每天 1 500 ng^[5]。早期 NNP 的细菌回复突变实验结果不一。Li 等^[6]引入预培养和仓鼠 S9 代谢活化条件后，发现 NNP 可导致 TA98、TA100 和 TA1535 的回复菌落突变数增加。本研究条件下，NNP 在 30%仓鼠预培养 30 min 的条件下，可诱导 TA1535 的回复突变菌落数明显增加。本研究结果与 Li 等^[6]的实验结果存在差异，可能与具体的剂量水平设置、最高剂量的确定标准（如以溶解度或细菌毒性为限）、大鼠 S9 来源与活性、试剂成分差异和菌株背景等因素有关。不同实验室中 NNP 对不同菌株的致突变性作用敏感性的差异提示该化合物在不同代谢环境下可能存在不同的致突变性作用特征，可通过后续研究中进一步探讨。尽管如此，本研究结论与国外文献基本一致，提示建立的增强细菌回复突变实验可有效检出 NDSRI 的致突变性风险。因所有 β -肾上腺素受体阻滞剂均包含 *N*-烷基乙醇胺基团，意味着该类药物均存在降解形成 NDSRI 的风险。Sondin 等^[15]回顾已知 *N*-亚硝基杂质的致突变性和致癌性数据后发现并非所有发生 α -羟基化的 *N*-亚硝胺都是致突变致癌物，且并非大量 *N*-亚硝基杂质的致突变性与致癌性的强弱不成正相关。因此，积累大量复杂 NDSRI 的体外代谢数据，将有助于基于化学结构进行更精确的化合物特异性风险评估。

本研究根据国际最新技术要求，建立增强细菌回复突变实验并初步用于 NDSRI 的致突变性风险评估，为该检测技术在国内的规范化和实验条件的摸索奠定重要基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Schlingemann J, Burns M J, Ponting D J, et al. The landscape of potential small and drug substance related nitrosamines in pharmaceuticals [J]. *J Pharm Sci*, 2023, 112(5): 1287-1304.

[2] Yang C S, Smith T J. *Mechanisms of Nitrosamine Bioactivation and Carcinogenesis* [M] // *Biological Reactive Intermediates V*. Boston, MA: Springer US,

1996: 385-394.

[3] 叶倩, 汪祺, 于敏, 等. 亚硝胺化合物致突变风险研究 [J]. *中国药物警戒*, 2022, 19(8): 881-888.

Ye Q, Wang Q, Yu M, et al. Study on the mutagenic risk of nitrosamine compounds [J]. *Chin J Pharmacovigil*, 2022, 19(8): 881-888.

[4] European Medicines Agency. ICH M7 Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk - Scientific guideline [EB/OL]. (2018-04-26) [2025-06-24]. <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m7-assessment-control-dna-reactive-mutagenic-impurities-pharmaceuticals-limit-potential-carcinogenic-risk-scientific-guideline>.

[5] European Medicines Agency. Questions and answers for marketing authorisation holders/applicants on the CHMP Opinion for the Article 5(3) of Regulation (EC) No 726/2004 referral on nitrosamine impurities in human medicinal products [EB/OL]. (2024-07) [2015-06-24]. <https://www.gmp-compliance.org/gmp-news/ema-cmdh-q-a-document-nitrosamines-revised>.

[6] Li X L, Le Y, Seo J E, 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.

[7] Zeiger E. The test that changed the world: The Ames test and the regulation of chemicals [J]. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 2019, 841: 43-48.

[8] Kajavadara K C, Patel N S, Shukla M R, et al. Selection of solvent and positive control concentration for enhanced ames test conditions for *N*-nitrosamine compounds [J]. *Regulatory toxicology and pharmacology: RTP*, 2024, 154105711.

[9] Fujita K, Kamataki T. Role of human cytochrome P450 (CYP) in the metabolic activation of *N*-alkylnitrosamines: Application of genetically engineered *Salmonella typhimurium* YG7108 expressing each form of CYP together with human NADPH-cytochrome P450 reductase [J]. *Mutat Res*, 2001, 483(1/2): 35-41.

[10] Bartsch H, Malaveille C, Montesano R. *In vitro* metabolism and microsome-mediated mutagenicity of dialkylnitrosamines in rat, Hamster, and mouse tissues [J]. *Cancer Res*, 1975, 35(3): 644-651.

[11] Evans K, Boitnotte S, Zeiger E, et al. A comparative analysis of select P450 enzymes in uninduced and PB/BNF-induced Hamster and rat liver S9 [J]. *Mutat*

- Res Genet Toxicol Environ Mutagen, 2025, 902: 503855.
- [12] 叶倩, 汪祺, 文海若. 不同代谢活化条件对 *N*-亚硝胺类化合物细菌回复突变结果的影响 [J]. 中国医药生物技术, 2022, 17(2): 118-124.
- Ye Q, Wang Q, Wen H R. Effect of different metabolic activation conditions on the results of bacterial reverse mutation test of *N*-nitrosamine compounds [J]. Chin Med Biotechnol, 2022, 17(2): 118-124.
- [13] Araki A, Muramatsu M, Matsushima T. Comparison of mutagenicities of *N*-nitrosamines on *Salmonella typhimurium* TA100 and *Escherichia coli* WP2 uvrA/pKM101 using rat and Hamster liver s9 [J]. Gan, 1984, 75(1): 8-16.
- [14] 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 C H, Gong Q, Zhang X F. Control strategies for nitrosamine impurities in rifampin and rifapentin [J]. Chin J New Drugs, 2024, 33(1): 23-27.
- [15] Snodin D J, Trejo-Martin A, Ponting D J, et al. Mechanisms of nitrosamine mutagenicity and their relationship to rodent carcinogenic potency [J]. Chem Res Toxicol, 2024, 37(2): 181-198.

[责任编辑 兰新新]