МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
(ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)

РУКОВОДСТВО

по контролю примесей *N*-нитрозаминов

ПРОЕКТ

Научный центр
экспертизы средств
медицинского применения

Институт фармакопеи и стандартизации
в сфере обращения лекарственных средств

Москва
2024

ПРЕДИСЛОВИЕ

Руководство рекомендовано для производителей фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов.

В настоящем руководстве представлены рекомендации по контролю примесей *N*-нитрозаминов, которые следует соблюдать производителям фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов, чтобы обнаружить и предотвратить появление данных примесей в неприемлемых количествах. В руководстве приводятся потенциальные источники примесей *N*-нитрозаминов, описываются условия, которые могут способствовать появлению этих примесей, и даются рекомендации по оценке рисков и стратегии контроля, чтобы избежать присутствия примесей в фармацевтических субстанциях и лекарственных препаратах. Рекомендации, содержащиеся в данном руководстве, применимы ко всем действующим веществам, получаемые путем химического синтеза. Они также применимы к лекарственным препаратам, содержащие химические синтезированные действующие веществ, и к лекарственным препаратам, подверженным риску появления примесей *N*-нитрозаминов из-за других факторов, описанных в данном руководстве. Подробно описана токсикологическая характеристика и предельные значения и допустимая доза. Описаны методики определения примесей *N*-нитрозаминов.

ПРОЕКТ

СОДЕРЖАНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ 4
2. ИСТОРИЯ ВОПРОСА 5
3. ПРИМЕСИ *N*-НИТРОЗАМИНОВ 6
4. ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ 9
5. ДОПУСТИМОЕ СОДЕРЖАНИЕ 11
6. ИСТОЧНИКИ ПРИМЕСЕЙ *N*-НИТРОЗАМИНОВ 13
7. РЕКОМЕНДАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯМ 19
8. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРИМЕСЕЙ *N*-НИТРОЗАМИНОВ 24
9. МЕТОДИКИ АНАЛИЗА 26
9.1. Методика 1 26
9.2. Методика 2 30
9.3. Методика 3 33
9.4. Методика 4 38
9.5. Методика 5 41
9.6. Методика 6 45

ПРОЕКТ

1. ВВЕДЕНИЕ

Соединения группы нитрозаминов известны с 80-х годов XX века. Международное агентство по изучению рака (IARC) классифицировало *N*-нитрозамины как «вероятные канцерогены для человека», в то время как международная конференция по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных препаратов для медицинского применения (ICH) в течение нескольких лет относила их, наряду с другими *N*-нитрозосоединениями, к «когорте вызывающих опасения» из-за их мутагенной активности. По данным научных исследований они встречаются в различных концентрациях в продуктах питания (вода, мясная и копченая продукция), до 2018 года не было установлено, что эти соединения присутствуют в фармацевтических субстанциях и, следовательно, они не рассматривались в качестве примесей в регистрационных досье.

В последнее время в ряде фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов, принадлежащих к разным фармакологическим группам (ангиотензина II рецепторов антагонист, H_2-гистаминовых рецепторов блокатор и гипогликемическое средство) обнаружены примеси *N*-нитрозаминов.

ПРОЕКТ

2. ИСТОРИЯ ВОПРОСА

Впервые в 2018 году фармацевтический рынок столкнулся с проблемой содержания примесей *N*-нитрозаминов в фармацевтических субстанциях и лекарственных препаратах группы сартанов (валсартан, лозартан, ирбесартан). Обнаружили *N*-нитрозодиэтиламин (НДЭА), *N*-нитрозодиизопропиламин (НДИПА), *N*-нитрозоэтилизопропиламин (НЭИПА) и *N*-нитрозо-*N*-метил-4-аминобутановая кислота (НМАК). В 2019 году установлено, что *N*-нитрозодиметиламин (НДМА) в недопустимых количествах содержится в ранитидине и низатиниде, примеси *N*-нитрозаминов обнаружили в метформине.

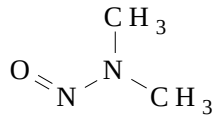
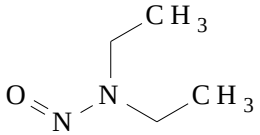
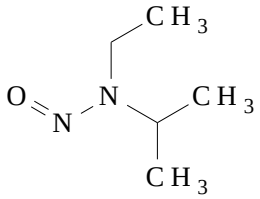
ПРОЕКТ

3. ПРИМЕСИ *N*-НИТРОЗАМИНОВ

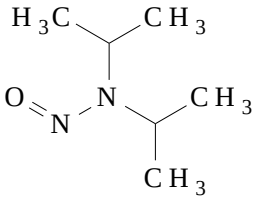
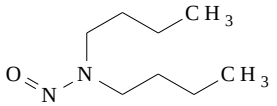
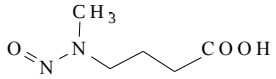
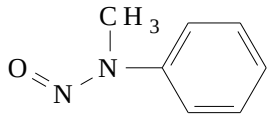
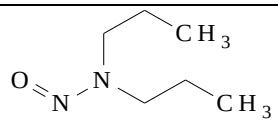
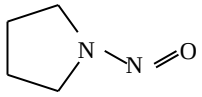
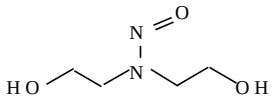
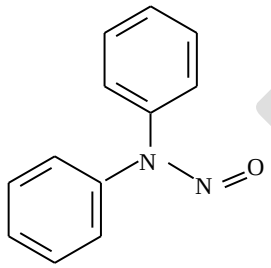
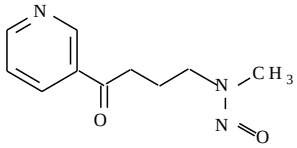
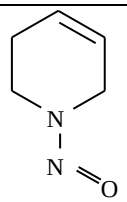
N-нитрозамины – класс органических азотсодержащих веществ, молекулы которых в своей структуре содержат алкилнитрозаминогруппу (–N_2O–). В зависимости от строения, могут быть в форме кристаллического порошка или маслянистой жидкости, желтого цвета. Из-за большого дипольного момента они растворимы в воде и во многих органических растворителях (метанол, этанол, хлороформ). Чем крупнее и менее полярные алкильные заместители, тем менее растворимы в воде. Этот факт важен при рассмотрении вопроса о том, как *N*-нитрозамины могут быть удалены из реакционной смеси путем водной обработки. Они также подвержены процессам фотолиза, поэтому при разработке и валидации аналитических методик следует учитывать фотостабильность образцов для анализа. *N*-нитрозамины могут подвергаться нескольким органическим и синтетическим превращениям.

На сегодняшний день особое значение имеют соединения, приведенные в таблице 1.

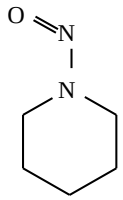
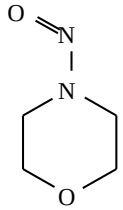
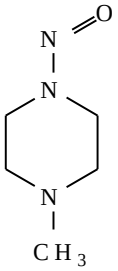
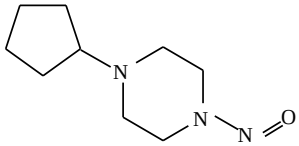
Таблица 1 – Примеси *N*-нитрозаминов, обнаруженные в фармацевтических субстанциях или лекарственных препаратах

Структурная формула	Химическое название	Брутто формула	Мол. масса	Рег. № CAS
	*N*-нитрозодиметиламин (НДМА)	$C_2H_6N_2O$	74,082	62-75-9
	*N*-нитрозодиэтиламин (НДЭА)	$C_4H_{10}N_2O$	102,135	55-18-5
	*N*-нитрозоэтил-изопропиламин (НЭИПА)	$C_5H_{12}N_2O$	116,162	16339-04-1

ПРОЕКТ

Структурная формула	Химическое название	Брутто формула	Мол. масса	Рег. № CAS
	*N*-нитрозодиизопропил-амин (НДИПА)	$C_6H_{14}N_2O$	130,188	601-77-4
	*N*-нитрозодибутиламин (НДБА)	$C_8H_{18}N_2O$	158,241	924-16-3
	*N*-нитрозо-*N*-метил-4-аминобутановая кислота (НМАК)	$C_5H_{10}N_2O_3$	143,145	6144-5-55-4
	*N*-нитрозометилфениламин (НМФА)	$C_7H_8N_2O$	136,151	614-00-6
	*N*-нитрозодипропиламин (НДПА)	$C_6H_{14}N_2O$	130,188	621-64-7
	*N*-нитрозопирролидин (НПИР)	$C_4H_8N_2O$	100,12	930-55-2
	*N*-нитрозодиэтанол-амин (НДЭА)	$C_4H_{10}N_2O_3$	134,13	1116-54-7
	*N*-нитрозодифениламин (НДФА)	$C_{12}H_{10}N_2O$	198,22	86-30-6
	4-(метилнитрозамино)-1-(3-пиридил)-1-бутанон (ННК)	$C_{10}H_{13}N_3O_2$	207,23	64091-91-4
	*N*-нитрозо-1,2,3,6-тетрагидропиридин (НТГП)	$C_5H_8N_2O$	112,13	55556-92-8

ПРОЕКТ

Структурная формула	Химическое название	Брутто формула	Мол. масса	Рег. № CAS
	*N*-нитрозопиперидин (НПП)	$C_5H_{10}N_2O$	114,15	100-75-4
	*N*-нитрозоморфолин (НМФ)	$C_4H_8N_2O_2$	116,13	59-89-2
	1-метил-4-нитропиперазин (МНП)	$C_5H_{11}N_3O$	129,16	16339-07-4
	1-циклопентил-4-нитропиперазин (ЦПНП)	$C_9H_{17}N_3O$	129,16	16339-07-4

Маловероятно, что все перечисленные примеси из таблицы 1 будут фактически присутствовать в качестве примесей в одной фармацевтической субстанции или лекарственном препарат. Потенциальное присутствие одной или нескольких примесей зависит от химических реакций или процессов, происходящих при синтезе фармацевтической субстанции (схема 1).

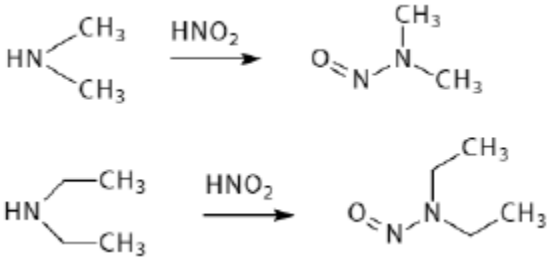


Схема 1 – Образование НДМА (верхняя реакция) и НДЭА (нижняя реакция) из вторичных аминов в присутствии азотистой кислоты

ПРОЕКТ

4. ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ

Установлено, что соединения группы *N*-нитрозаминов являются сильнодействующими генотоксичными агентами для млекопитающих, а некоторые из них классифицируются Международным агентством по изучению рака, как вероятные или возможные канцерогены для человека, и относятся к группе 2А и 2В. Как было показано, они вызывают мутагенез и канцерогенез у лабораторных животных, что приводит к серии высокоопасных заболеваний пищевода, желудка, прямой кишки, легких.

Вследствие метаболической активации *N*-нитрозаминов, опосредованной ферментами семейства цитохрома Р450 (α-гидроксилирование), происходит образование нестабильных α-гидроксиметил-*N*-нитрозаминов, которые, метаболизируясь микросомальной системой окисления, преобразуются в ионы (свободные радикалы) алкил- или арилдиазония (схема 2).

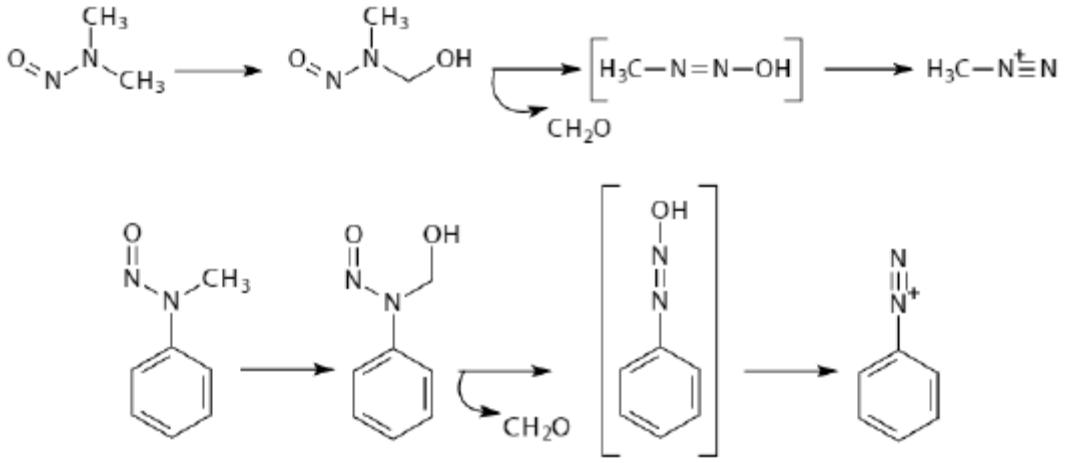


Схема 2 – Метаболизм НДМА (верхняя реакция) и НДМА (нижняя реакция) в организме млекопитающих

Ионы диазония в биологическом смысле являются крайне высокоактивными соединениями. Они ответственны за ковалентную модификацию ДНК посредством метилирования нуклеозидов. Метилирование ДНК оказывает влияние непосредственно на транскрипцию через изменение эффективности связывания факторов транскрипции с соответствующими участками нуклеиновых кислот либо через формирование

абсолютно неактивных в транскрипционном отношении ее участков. Наблюдаемое вследствие нитрозаминовой нагрузки гиперметилирование ДНК может опосредованно инициировать химический канцерогенез при накоплении критической массы указанных повреждений в генетическом аппарате (схема 3).

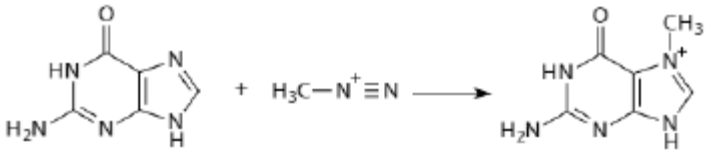


Схема 3 – Метилирование гуанина под действием иона алкилдиазония

Органами-мишенями, в первую очередь страдающими от нитрозаминового туморогенеза, являются печень и органы желудочно-кишечного тракта, а также почки и легкие, богатые специфическими пероксидазными ферментами. Кроме того, наблюдается кумуляция с желчью, что еще больше увеличивает вероятность малигнизации тканей гепатобилиарной системы.

ПРОЕКТ

5. ДОПУСТИМОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Производителям рекомендуются допустимые дозы при определении предельных значений примесей *N*-нитрозаминов в фармацевтических субстанциях и лекарственных препаратах (таблица 2).

Таблица 2 – Допустимые пределы *N*-нитрозаминов

Нитрозамин	Допустимое потребление (нг/сутки)
НДМА	96
НДЭА	26,5
НМАК	96
НМФА	26,5
НЭИПА	26,5
НДИПА	26,5
НДБА	26,5
НМФ	127
НДПА	26,6
НТГП	37
НДФА	8
ННК	100

Данные предельные значения применимы только в том случае, если лекарственный препарат содержит лишь один *N*-нитрозамин. Для лекарственных препаратов с дозировкой менее 880 мг/в сутки рекомендуемая общая концентрация нитрозаминов составляет не более 26,5 нг/сутки и считается приемлемой. Для лекарственных препаратов с дозировкой более 880 мг/в сутки общая концентрация *N*-нитрозаминов должна быть скорректирована так, чтобы не превышать рекомендуемое предельное значение 26,5 нг/сутки.

Для соблюдения ограниченного количества *N*-нитрозаминов необходимы, как правило, чувствительные методы с пределом количественного определения (LOQ) в диапазоне частей на миллиард (ppb). Производители фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов

ПРОЕКТ

должны применять методы с пределом количественного определения не более 0,03 ppm. Производители должны установить методы, для которых предел количественного определения и предел обнаружения (LOD) являются настолько низкими, насколько это целесообразно для препаратов, чья максимальная суточная доза высока (например, более 1 г).

ПРОЕКТ

6. ИСТОЧНИКИ ПРИМЕСЕЙ *N*-НИТРОЗАМИНОВ

Информация, полученная за последнее время, указывает на несколько общих причин появления нитрозаминов в фармацевтических субстанциях и лекарственных препаратах.

1. Общие условия, ведущие к образованию N-нитрозаминов

В кислых условиях вторичные или третичные амины реагируют с нитритами и образуют *N*-нитрозамины (рисунок 1).

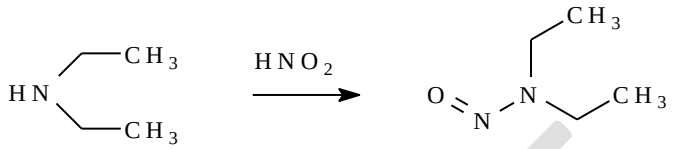


Рисунок 1 – Реакция образования *N*-нитрозамина

Существует больший риск образования нитрозаминов, если в присутствии аминов-предшественников для прекращения реакции (гашения остаточного азида, который обычно применяют для образования тетразольного кольца или введения азидной функциональной группы в молекулу) используется азотистая кислота.

Соли азотистой кислоты, применяемые в качестве реактивов на одной стадии синтеза, могут, несмотря на операции по очистке, переноситься на последующие стадии и реагировать с аминами с образованием примесей *N*-нитрозаминов. Следовательно, в присутствии этих солей будет и опасность их переноса на следующие стадии. Как правило, процессы, в которых соли азотистой кислоты используются в присутствии вторичных, третичных или четвертичных аминов, подвержены риску образования примесей *N*-нитрозаминов.

2. *Источники вторичных, третичных и четвертичных аминов, из которых могут образовываться нитрозамины*

Амины могут присутствовать в производственном процессе по разным причинам. Вторичные или третичные аминогруппы могут содержаться в действующем веществе (или продуктах его разложения), промежуточных соединениях или исходных материалах. Третичные и четвертичные амины

ПРОЕКТ

также могут добавляться намеренно, в качестве реактивов или катализаторов. Все эти типы аминов могут вступать в реакции с азотистой кислотой или другими нитрозирующими веществами с образованием *N*-нитрозаминов.

Один из источников вторичных аминов являются амидные растворители, которые подвержены разложению при определенных условиях реакции. Например, при высоких температурах в течение продолжительной реакции *N*,*N*-диметилформамид может разлагаться до диметиламина, который, в свою очередь, может реагировать с азотистой кислотой с образованием НДМА (рисунок 2).

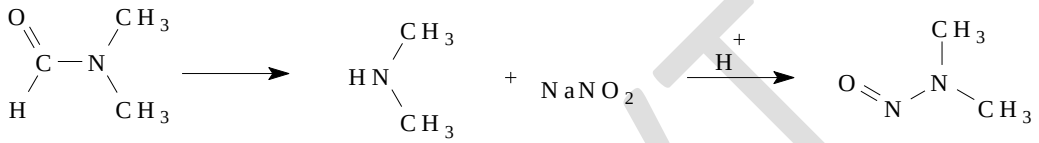


Рисунок 2 – Образование НДМА из *N*,*N*-диметилформамида

N-метилпирролидон, *N*,*N*-диметилацетамид и *N*,*N*-диэтилацетамид имеют аналогичные пути разложения с образованием вторичных аминов, которые могут реагировать с азотистой кислотой с формированием примесей *N*-нитрозаминов. Вторичные амины также могут присутствовать в виде примесей в амидных растворителях. Например, диметиламин, который может реагировать с азотистой кислотой с НДМА, может присутствовать в качестве примеси в *N*,*N*-диметилформамиде.

Третичные и четвертичные амины, используемые при синтезе действующих веществ в качестве реактивов, могут содержать другие амины как примеси. Третичные амины, такие как триэтиламин, в небольших количествах содержат другие вторичные амины (такие как дипропиламин и изопропилэтиламин). Вторичные и третичные амины могут присутствовать в виде примесей или продуктов разложения, образованных деалкилированием четвертичных аминов. Например, часто используемый катализатор межфазного переноса, тетрабутиламмоний бромид, может содержать примеси трибутил- и дибутиламина. Количество примеси амина, которая

ПРОЕКТ

может привести к контаминации действующего вещества нитрозаминами, зависит от процесса и должно определяться производителем каждого действующего вещества.

Приведенный выше список источников контаминации нитрозаминами не является исчерпывающим, поскольку амины в качестве реактивов могут использоваться для осуществления большого количества превращений в ходе синтеза. Производителям следует оценить на предмет потенциального риска образования *N*-нитрозаминов другие реактивы, содержащие функциональные аминогруппы.

3. *Контаминация в закупаемом сырье*

Примеси *N*-нитрозаминов можно занести с контаминированными материалами, получаемыми у поставщиков, в том числе с исходными материалами и сырьем.

- нитрит натрия – известная примесь, может присутствовать в некоторых исходных материалах (например, в азиде натрия) и реагировать с аминами в кислых условиях с образованием *N*-нитрозаминов. В сырье, содержащем соли азотной кислоты, например в нитрате калия, могут быть примеси солей азотистой кислоты.
- вторичные или третичные амины как примеси в некотором сырье и в свежих растворителях.
- риск перекрестной контаминации могут нести исходные материалы или получаемые путем аутсорсинга промежуточные продукты, если они производятся на объектах, где примеси *N*-нитрозаминов образуются в других процессах.

Важным фактором предотвращения контаминации является осведомленность о цепочке поставок сырья. Производители действующих веществ могут не знать о контаминации *N*-нитрозаминами сырья или исходных материалов, которые они закупили у поставщиков; производитель, в производственном процессе которого обычно не образуются *N*-нитрозамины, может не осознавать, что в закупленном материале могут

ПРОЕКТ

быть примеси, попавшие туда во время производства или транспортировки.

4. *Восстановленные растворители, катализаторы и реактивы как источник контаминации*

Восстановленные материалы, такие как растворители, реактивы и катализаторы, могут представлять опасность с точки зрения *N*-нитрозаминовых примесей из-за остаточных аминов (таких как триметиламин или диизопропилэтиламин). Если процесс восстановления включает стадию гашения (азотистая кислота используется для разложения остаточного азида), то во время восстановления растворителя могут образовываться *N*-нитрозамины. Эти *N*-нитрозамины могут вовлекаться в процесс, если имеют точки кипения или растворимость, аналогичные восстанавливаемым материалам, в зависимости от того, как происходит восстановление и последующая очистка (промывка водой или дистилляция).

На производственной площадке одно и то же действующее вещество может изготавливаться с помощью нескольких процессов синтеза, в которых используются распространенные растворители. Использование восстановленных растворителей, которые поступают вперемешку из различных процессов или с разных производственных линий без контроля и мониторинга, может привести к появлению примесей *N*-нитрозаминов. Если восстановленный растворитель контаминирован таким образом, а затем используется для производства действующего вещества, оно тоже будет контаминировано, даже если путь его синтеза обычно не предполагает образования *N*-нитрозаминов.

Восстановление сырья (растворителей, реактивов и катализаторов) часто поручают сторонним подрядчикам. Передача процессов на аутсорсинг может нести риск, если те, кто у подрядчика занимается восстановлением, не получают достаточного количества специализированной информации о составе материалов, которые они обрабатывают, и полагаются исключительно на стандартные процессы восстановления.

ПРОЕКТ

Сырье может быть контаминировано, если не проводится надлежащая очистка оборудования при переходе к работе над следующим заказом или со следующими материалами, или если очистка не прошла валидацию, подтверждающую ее способность удалять все вызывающие опасения примеси. Несоответствующие и не прошедшие валидацию процедуры очистки также могут привести к перекрестной контаминации, если меры для предотвращения контаминации *N*-нитрозаминами не будут приняты до того, как объединят для восстановления материалы от разных клиентов.

5. *Процесс гашения как источник контаминации N-нитрозаминами*

Существует риск формирования *N*-нитрозаминов, если этап гашения проходит непосредственно в основной реакционной смеси (то есть, к реакционной смеси для разложения остаточного азида добавляется азотистая кислота). Это позволяет азотистой кислоте вступить в прямой контакт с остаточными аминами в сырье, которое используется в производственном процессе. Если нет соответствующих операций по удалению или очистке или эти операции не оптимизированы для удаления определенных вызывающих опасение примесей, то нитрозаминовые примеси могут переноситься на следующие этапы. Если такие примеси появились, они могут контаминировать все этапы процесса, которые происходят после этого. Даже если гашение проводится не в основной реакционной смеси.

6. *Недостаточно хорошие оптимизация и контроль процесса*

Другим потенциальным источником образования примесей *N*-нитрозаминов является недостаток оптимизации процесса производства действующих веществ, когда условия реакции, такие как температура, pH или последовательность добавления реактивов, промежуточных продуктов или растворителей, являются неподходящими или плохо контролируются.

7. Примеси нитрозаминов в лекарственных препаратах, попавшие туда не как контаминанты из действующего вещества

Соли азотистой кислоты – распространенные примеси в процессе нитрозирования, которые находят во многих вспомогательных веществах в

ПРОЕКТ

количествах порядка ppm. Присутствие примесей солей азотистой кислоты в ряде широко используемых вспомогательных веществ может привести к формированию примесей нитрозаминов в лекарственных препаратах в ходе их производства и хранения. Следует учитывать в программе квалификации поставщиков, что примеси солей азотистой кислоты неодинаковы для разных партий вспомогательных веществ и могут быть неодинаковыми у разных поставщиков. Производителям лекарственных препаратов следует также помнить, что примеси солей азотистой кислоты и *N*-нитрозаминов могут встречаться в питьевой воде.

Некоторые лекарственные препараты могут разлагаться с образованием *N*-нитрозаминовых примесей при хранении.

ПРОЕКТ

7. РЕКОМЕНДАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯМ

Производители субстанций, синтезируемых химическим путем, должны принимать соответствующие меры для снижения риска контаминации нитрозаминами, где существует вероятность образования примесей.

Изготовители субстанций должны пересмотреть свои производственные процессы и провести оценку риска для выявления возможности образования примесей *N*-нитрозаминов. При выявлении риска наличия примесей следует провести подтверждающее испытание серий с использованием чувствительных и надлежащим образом валидированных методов. Если оценка риска определяет отсутствие возможности образования примесей нитрозаминов, нет необходимости предпринимать дальнейшие действия. Если обнаружена примесь *N*-нитрозамина, производители должны выяснить первопричину. Им следует внести изменения в производственный процесс для уменьшения или предотвращения образования примесей нитрозамина

1. Уменьшения наличия примесей N-нитрозаминов

Производители должны оптимизировать процесс производства на этапе разработки метода синтеза, чтобы минимизировать или предотвратить образование примесей нитрозамина.

По возможности избегать условий реакции, которые могут привести к образованию нитрозаминов. Если такая возможность отсутствует, необходимо продемонстрировать, что процесс надлежащим образом контролируется и способен последовательно уменьшать количество примесей нитрозаминов с помощью соответствующих и робастных исследований очистки и миграции контаминантов.

– использование оснований, отличных от вторичных, третичных или четвертичных аминов (по возможности), если в условиях синтеза могут образовываться *N*-нитрозамины.

ПРОЕКТ

– соблюдение мер предосторожности, когда синтез включает использование амидных растворителей (например, *N*,*N*-диметилформамида, *N*,*N*-диметилацетамида, *N*-метилпирролидона).

– замена нитритов другими охлаждающими агентами для процессов разложения азидов.

– оптимизация и постоянный контроль последовательностей реакций, процессов и условий реакции (таких как pH, температура и длительность реакции).

– разработка производственного процесса, облегчающего очистку от примесей *N*-нитрозаминов на последующих этапах обработки.

– производители должны рассмотреть возможность исключения этапов подавления реакции (когда существует риск образования нитрозаминов, например, при использовании азотистой кислоты для разложения остаточного азида) из основной реакционной смеси для снижения риска образования *N*-нитрозаминов. Фармацевтические субстанции или промежуточный метаболит, образованный в результате реакции с использованием азидной соли, можно извлечь из маточного раствора в органическую фазу. Отходы водной стадии, отделенные от органической фазы, следует затем разложить азотистой кислотой без контакта с фармацевтической субстанцией, его промежуточным метаболитом или растворителями, предназначенными для извлечения.

– производители должны проверять свои цепочки поставок и контролировать их на предмет наличия сырья, исходных материалов и промежуточных продуктов, подверженных риску. Производители должны вести учет, включая наименование производителя сырья и его поставщика, функций фактических производителей таких материалов, а также любых переупаковщиков и дистрибьюторов, которые обращаются с материалами до производства. При необходимости производители должны установить меры контроля и рассмотреть дополнительные спецификации на материалы, подверженные риску, чтобы предотвратить контаминацию нитрозаминами.

ПРОЕКТ

– во избежание перекрестной контаминации при использовании в производственном процессе вторичного сырья, таких как растворители, реагенты и катализаторы, его следует использовать только на той же стадии или на более ранней стадии (при достаточной очистке) того же процесса, из которого он был получен. Перед повторным использованием вторичное сырье должно соответствовать установленным требованиям.

– производители должны учитывать, что питьевая вода, используемая при производстве, может содержать низкие уровни нитритов и даже *N*-нитрозаминов из-за загрязнения окружающей среды. Наличие нитритов в технологической воде может привести к контаминации *N*-нитрозаминами при производстве. Поэтому, чтобы избежать недопустимых уровней примесей *N*-нитрозаминов, производители должны анализировать уровень нитритов и нитрозаминов в воде и использовать очищенную воду для удаления неприемлемых примесей. Если *N*-нитрозамины попадают в фармацевтическую субстанцию из внешних источников, которых можно избежать, производители должны устранить источник загрязнения.

2. Контроль примесей нитрозаминов в фармацевтических субстанциях

Если примесь *N*-нитрозаминов обнаруживается выше предела количественного определения, должен разработать стратегию, гарантирующую, что уровень *N*-нитрозаминов останется в пределах допустимого предела. Производители должны разработать соответствующую стратегию контроля, которая должна включать пределы спецификации, чтобы гарантировать, что уровень нитрозаминов стабильно остается значительно ниже допустимого предела.

Рекомендации производителям лекарственных препаратов

Производителям лекарственных препаратов следует проводить оценку риска для определения потенциальной примеси *N*-нитрозаминов в лекарственных препаратах. Оценка риска должна включать сотрудничество с производителем фармацевтических субстанций для помощи в определении путей синтеза или других технологических условий производства, которые

ПРОЕКТ

подвергают лекарственный препарат риску наличия примесей *N*-нитрозаминов. Оценка риска должна также включать оценку любого пути (включая деградацию), при котором нитрозамины могут быть внесены во время производства лекарственного препарата или его хранения. Если оценка риска подтверждает отсутствие потенциальных примесей нитрозаминов, нет необходимости предпринимать дальнейшие действия.

При выявлении риска наличия нитрозаминов в лекарственном препарате следует провести подтверждающие испытания серий с использованием чувствительных и надлежащим образом валидированных методов. При обнаружении примеси нитрозаминов производители должны исследовать первопричину и внести изменения в производственный процесс для уменьшения количества примесей нитрозаминов.

1. Контроль примесей нитрозаминов в лекарственных препаратах

Производители лекарственных препаратов при разработке своей стратегии контроля должны оценить, могут ли нитриты присутствовать в производственных процессах, где используются подверженные риску фармацевтические субстанции. Они также должны оценить, могут ли *N*-нитрозамины образовываться в готовом лекарственном препарате в течение его срока годности. Если *N*-нитрозамины попадает в лекарственный препарат через внешние источники, которых можно избежать, производители должны устранить источник контаминации.

Если примесь нитрозаминов обнаруживается выше предела количественного определения, производитель должен разработать стратегию, гарантирующую, что уровень *N*-нитрозаминов останется в пределах допустимого предела. Стратегия контроля должна включать в себя пределы спецификации для установленного *N*-нитрозамина. Такая стратегия контроля также рекомендуется, когда введение *N*-нитрозамина является неотъемлемой частью структуры фармацевтической субстанции, методом синтеза или процесса производства или лекарственного препарата. Учитывая существующую неопределенность в отношении примесей *N*-нитрозаминов и

ПРОЕКТ

их наличия в лекарственных препаратах, следует проводить испытания каждой серии при выпуске.

ПРОЕКТ

8. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРИМЕСЕЙ *N*-НИТРОЗАМИНОВ

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) имеет особое значение для фармацевтического анализа лекарственных средств. Она широко и наиболее часто используется для определения примесей в фармацевтических субстанциях и лекарственных препаратах, а также для разделения сложных биологических смесей и композиций природных биологически активных соединений. Этот метод отличает высокая универсальность и повсеместная распространенность. Для определения *N*-нитрозаминов применяют ВЭЖХ на обращено-фазовых колонках (С8 или С18).

Наиболее доступным, но наименее селективным и чувствительным методом определения *N*-нитрозаминов является ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектором (ВЭЖХ-УФ).

Высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрофотометрическим детектором (ВЭЖХ-МС) обладает высокой чувствительностью и селективностью. В методиках используется ионизация электрораспылением (ESI) или химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI)

Газовая хроматография (ГХ) является распространенным методом. Он оптимально подходит для анализа *N*-нитрозаминовых примесей, учитывая их высокую летучесть при нагревании. Однако данным методом нельзя определять *N*-нитрозамины в лекарственных средствах, образующих примеси *in situ* под воздействием высоких температур. Для этих целей лучше подойдет ВЭЖХ-МС.

Метод ГХ-МС можно описать большинством характеристик, приведенных для ВЭЖХ. Важнейшее из них то, что сочетание разделения с помощью ГХ и обнаружения с помощью МС-детектора позволяет достичь значений LOD, которые подходят для анализа НА, содержащихся даже в ультраследовых количествах.

ПРОЕКТ

В настоящее время из-за высоких чувствительности МС-детекторов методы с их использованием остаются наиболее популярным выбором при определении *N*-нитрозаминов. Развитие МС-анализаторов еще больше облегчило углубленное изучение примесей в сложных матрицах, к которым, безусловно, можно отнести любой лекарственный препарат. Из-за летучести большинства примесей *N*-нитрозаминов наиболее распространенными является анализ ГХ-МС. Вместе с тем, ВЭЖХ-МС также обладает хорошими характеристиками селективности и чувствительности.

ПРОЕКТ

9. МЕТОДИКИ АНАЛИЗА

9.1. Методика 1

Методика распространяется на определение шести примесей *N*-нитрозаминов в валсартане, ирбесартане, лозартане калия и кандесартане цилексетиле и телмисартане: *N*-нитрозодиметиламина (НДМА), *N*-нитрозодиэтиламина (НДЭА), *N*-нитрозоэтилизопропиламина (НЭИПА), *N*-нитрозо-диизопропиламина (НДИПА), *N*-нитрозодибутиламина (НДБА) и *N*-нитрозо-*N*-метил-4-аминобутановой кислоты (НМАК).

Определение проводят методом ВЭЖХ-МС/МС (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», ОФС «Масс-спектрометрия»).

Подвижная фаза А (ПФА). В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 1,0 мл муравьиной кислоты безводной, прибавляют 500 мл воды и доводят объем раствора водой до метки.

Подвижная фаза Б (ПФБ). В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 1,0 мл муравьиной кислоты безводной, прибавляют 500 мл метанола и доводят объем раствора метанолом до метки.

Испытуемый раствор (валсартан, лозартан калия). В пробирку помещают 0,1 г (точная навеска) субстанции, прибавляют 5 мл метанола, интенсивно перемешивают до растворения и фильтруют через шприцевой мембранный фильтр из поливинилиденфторида с размером пор 0,2 мкм, отбрасывая первый 1 мл фильтрата.

Испытуемый раствор (кандесартана цилексетил, ирбесартан, телмисартан). В пробирку помещают 0,1 г (точная навеска) субстанции, прибавляют 5,0 мл метанола. Смесь перемешивают на шейкере в течение 40 мин, центрифугируют при 4500 об/мин в течение 15 мин. Надосадочную жидкость фильтруют через шприцевой мембранный фильтр из поливинилиденфторида с размером пор 0,2 мкм.

ПРОЕКТ

Стандартный раствор примесей N-нитрозамина. Готовят раствор фармакопейных стандартных образцов НДМА, НДЭА, НДБА, НМАК, НДИПА, НЭИПА в метаноле с концентрацией по 6 нг/мл.

Раствор для проверки чувствительности хроматографической системы. Готовят раствор фармакопейных стандартных образцов НДМА, НДЭА, НДБА, НМАК, НДИПА, НЭИПА в метаноле с концентрацией по 1 нг/мл.

Испытуемый раствор (валсартан, лозартан калия) с добавкой стандарта. В пробирку помещают 0,1 г (точная навеска) субстанции, прибавляют 5,0 мл стандартного раствора примесей *N*-нитрозаминов в метаноле с концентрацией по 6 нг/мл, интенсивно перемешивают до растворения и фильтруют через шприцевой мембранный фильтр из поливинилиденфторида с размером пор 0,2 мкм.

Испытуемый раствор (кандесартана цилексетил, ирбесартан, телмисартан) с добавкой стандарта. В пробирку помещают 0,1 г (точная навеска) субстанции, прибавляют 5,0 мл стандартного раствора примесей *N*-нитрозаминов в метаноле с концентрацией по 6 нг/мл. Смесь перемешивают на шейкере в течение 40 мин, центрифугируют при 4500 об/мин в течение 15 мин. Надосадочную жидкость фильтруют через шприцевой мембранный фильтр из поливинилиденфторида с размером пор 0,2 мкм.

Примечание: стандартные и испытуемые растворы защищают от воздействия света.

Хроматографические условия

Колонка	100 × 4,6 мм, силикагель пентафторфенилпропильный, эндкепированный, для хроматографии, 2,6 мкм;
Температура колонки	40 °С;
Температура образца	10 °С;
Скорость потока	0,6 мл/мин;
Объем пробы	3 мкл.

ПРОЕКТ

Режим хроматографирования

Время, мин	ПФА, %	ПФБ, %
0–1,5	90	10
1,5–7,0	90 → 45	10 → 55
7,0–17,0	45	55
17,0–17,1	45 → 10	55 → 90
17,1–21,0	10	90
21,0–21,1	10 → 90	90 → 10
21,1–25,0	90	10

Условия МС/МС

Режим ионизации	Химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI)
Полярность	Положительная

Параметры режима MRM

Аналит	Относительное время удерживания	Контролируемые MRM-переходы
НДМА	0,21 (около 2,8 мин.)	75,0 → 58,0 (основной)
		75,0 → 43,0 (подтверждающий)
НМАК	0,33 (около 4,3 мин.)	147,0 → 117,0 (основной)
		147,0 → 44,0 (подтверждающий)
НДЭА	0,48 (около 6,3 мин.)	103,0 → 75,0 (основной)
		103,0 → 47,0 (подтверждающий)
НЭИПА	0,58 (около 7,6 мин.)	117,0 → 75,0 (основной)
		117,0 → 43,0 (подтверждающий)
НДИПА	0,67 (около 8,8 мин.)	131,0 → 47,0 (основной)
		131,0 → 89,0 (подтверждающий)
НДБА	1,0 (около 13,2 мин.)	159,0 → 103,0 (основной)

ПРОЕКТ

Хроматографируют раствор для проверки чувствительности хроматографической системы, стандартный раствор, испытуемый раствор, испытуемый раствор с добавкой стандарта и метанол.

Примечание: стандартный раствор примесей *N*-нитрозаминов вводится каждые 6 анализов испытуемых растворов и испытуемых растворов с добавкой стандарта. После стандартного раствора вводится метанол.

Пригодность хроматографической системы

На хроматограмме стандартного раствора (основной MRM-переход) *относительное стандартное отклонение* площади каждого из пиков примесей *N*-нитрозаминов должно быть не более 20,0 % (6 введений).

На хроматограмме стандартного раствора (основной MRM-переход) *относительное стандартное отклонение* площади каждого из пиков примесей *N*-нитрозаминов должно быть не более 20,0 % после первых 6 введений, а также промежуточных и закрывающих анализов.

На хроматограмме раствора (основной MRM-переход) для проверки чувствительности *отношение сигнал/шум (S/N)* для каждого из пиков примесей *N*-нитрозаминов должно быть не менее 10.

На хроматограмме раствора (подтверждающий MRM-переход) для проверки чувствительности *отношение сигнал/шум (S/N)* для каждого из пиков примесей *N*-нитрозаминов должно быть не менее 3.

Обработка результатов

Степень извлечения каждой примеси *N*-нитрозамина в испытуемом растворе с добавкой стандарта должна находиться в диапазоне 70,0 – 130,0%.

Примечание: примеси НМАК и НЭИПА существуют как синконформационный и антиконформационный изомеры из-за ограниченного вращения связи N–N. Эти изомеры в условиях метода разделяются частично. Пик НМАК наблюдается как дублет, для расчета концентрации НМАК интегрируют оба пика и используют суммарную площадь. Пик НЭИПА может быть как дублетом, так и одиночным пиком с хвостовым плечом. Если конформеры разделяются, для расчета концентрации НЭИПА интегрируют оба пика и суммируют их площади, если же конформеры разделены не полностью (наблюдается полупик), для расчета концентрации НЭИПА интегрируют основной пик и полупик как единый.

ПРОЕКТ

Содержание каждой из примесей *N*-нитрозаминов в субстанции в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot C_0 \cdot P}{S_0 \cdot C_1},$$

где: S_1 – площадь пика каждой из примесей *N*-нитрозаминов на хроматограмме испытуемого раствора;

S_0 – площадь пика соответствующей примеси *N*-нитрозаминов на хроматограмме стандартного раствора;

C_1 – концентрация субстанции в испытуемом растворе, нг/мл;

C_0 – концентрация каждой из примеси НДМА, НДЭА, НДБА, НМАК, НДИПА и НЭИПА в стандартном растворе, нг/мл;

P – содержание основного вещества в стандартном образце соответствующей примеси, %.

9.2. Методика 2

Методика распространяется на определение четырех примесей *N*-нитрозаминов в валсартане, ирбесартане, лозартане калия, олмесартане медоксомиле, кандесартане цилексетиле и телмисартане: *N*-нитрозодиметиламина (НДМА), *N*-нитрозодиэтиламина (НДЭА), нитрозоэтилизопропиламина (НЭИПА) и *N*-нитрозодиизопропиламина (НДИПА).

Определение проводят методом ГХ-МС/МС (парофазный анализ, ОФС «Газовая хроматография», ОФС «Масс-спектрометрия»).

Раствор внутреннего стандарта А. Готовят раствор *N*-нитрозодиметиламина-d_6 в метаноле с концентрацией 0,4 мкг/мл.

Раствор внутреннего стандарта Б. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 2,0 мл раствора внутреннего стандарта А и доводят объем раствора метанолом до метки.

Испытуемый раствор. В хроматографический флакон для парофазного анализа помещают 0,2 г (точная навеска) субстанции, 0,1 г имидазола, 1,0 мл раствора внутреннего стандарта Б и 1,0 мл ацетонитрила. Укупоривают пробкой, закрывают крышкой и плотно прижимают их обкаткой.

ПРОЕКТ

Стандартный раствор А. Готовят раствор фармакопейных стандартных образцов НДМА, НДЭА, НДИПА и НЭИП в метаноле с концентрацией по 0,4 мкг/мл.

Стандартный раствор Б. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 2,0 мл стандартного раствора А, 2,0 мл раствора внутреннего стандарта А и доводят объем раствора метанолом до метки.

Стандартный раствор В. Помещают 1,0 мл стандартного раствора Б во флакон для парофазного анализа, содержащий 0,1 г имидазола и 1,0 мл ацетонитрила. Укупоривают пробкой, закрывают крышкой и плотно прижимают их обкаткой.

Раствор для проверки чувствительности хроматографической системы А. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 0,5 мл стандартного раствора А, 2,0 мл раствора внутреннего стандарта А и доводят объем раствора метанолом до метки.

Раствор для проверки чувствительности хроматографической системы Б. Во флакон для парофазного анализа, содержащий 0,1 г имидазола и 1,0 мл ацетонитрила, помещают 1,0 мл раствора для проверки чувствительности хроматографической системы А. Укупоривают пробкой, закрывают крышкой и плотно прижимают их обкаткой.

Контрольный раствор. В хроматографический флакон помещают 0,1 г (точная навеска) имидазола, прибавляют 1,0 мл раствора внутреннего стандарта Б и 1,0 мл ацетонитрила. Укупоривают пробкой, закрывают крышкой и плотно прижимают их обкаткой.

Примечание: все растворы защищают от воздействия света.

Хроматографические условия

Колонка	кварцевая капиллярная 30 м × 0,32 мм, покрытая слоем макрогола 20 000, 1,0 мкм;
Детектор	масс-спектрометрический;
Газ-носитель	гелий для хроматографии;
Деление потока	1:1 или 1:3;

ПРОЕКТ

Скорость потока	1,8 мл/мин;		
Температура	колонка	0–3 мин	45 °С
		3–10 мин	45 → 130 °С
		10 мин	190 → 240 °С

Условия парофазного анализа

Температура уравновешивания	95–110 °С;
Время уравновешивания	10 мин;
Температура петли	150 °С;
Температура линии переноса	160 °С.

Условия детектирования

Источник ионизации	электронная ионизация (EI);
Режим детектирования	мониторинг реакций заданных ионов (MRM).

Переходы сканирования масс и энергии столкновений

Наименование примеси	**Относительное время удерживания**	**Переходы сканирования масс**	**Энергия столкновений, эВ**
НДМА	около 0,8	74 → 44 74 → 42	4 15
НДМА-d_6	около 0,8	80 → 50	5
НДЭА	около 0,9	102 → 85,1 102 → 56,1	6 15
НЭИПА	около 0,96	116 → 99,1 99 → 44,1	6 9
НДИПА	1 (около 14 мин)	130 → 42 130 → 43,1	10 18

Хроматографируют контрольный раствор, стандартный раствор В, раствор для проверки чувствительности хроматографической системы Б и испытуемый раствор.

Пригодность ГХ-МС системы

На хроматограмме стандартного раствора В *относительное стандартное отклонение* отношения площади каждого из пиков примесей

ПРОЕКТ

НДМА, НДЭА НЭИПА и НДИПА к площади пика НДМА-d_6 должно быть не более 20 % (6 введений).

На хроматограмме раствора для проверки чувствительности *отношение сигнал/шум (S/N)* для каждого из пиков примесей НДМА, НДЭА НЭИПА и НДИПА должно быть не менее 10.

Содержание каждой из примесей *N*-нитрозаминов в субстанции в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot C_0 \cdot P}{S_0 \cdot C_1},$$

где: S_1 – отношение площади пика каждой из примесей *N*-нитрозаминов к площади пика *N*-нитрозодиметиламина-d_6 на хроматограмме испытуемого раствора;

S_0 – отношение площади пика каждой из примесей *N*-нитрозаминов к площади пика *N*-нитрозодиметиламина-d_6 на хроматограмме стандартного раствора В;

C_1 – концентрация субстанции в испытуемом растворе, нг/мл;

C_0 – концентрация каждой из примеси НДМА, НДЭА, НДИПА и НЭИП в стандартном растворе В, нг/мл;

P – содержание основного вещества в соответствующем образце примеси, %.

9.3. Методика 3

Методика распространяется на определение шести примесей *N*-нитрозаминов в валсартане, ирбесартане, лозартане калия, олмесартане медоксомиле и кандесартане цилексетиле: *N*-нитрозодиметиламина (НДМА), *N*-нитрозодиэтиламина (НДЭА), *N*-нитрозо-этил-изопропиламина (НЭИПА), *N*-нитрозо-диизопропиламина (НДИПА), *N*-нитрозо-дибутиламина (НДБА) и *N*-нитрозо-дипропиламина (НДПА).

Определение проводят методом ГХ-МС/МС (ОФС «Газовая хроматография», ОФС «Масс-спектрометрия»).

Раствор внутреннего стандарта. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 5 мг (точная навеска) НЭМА (*N*-нитрозо-этилметиламина,

ПРОЕКТ

CAS 10595-95-6), растворяют в метаноле и доводят объем раствора тем же растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 0,5 мл полученного раствора и доводят объем раствора водой до метки.

Раствор для экстракции. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 40,0 мг натрия гидроксида, растворяют в 500 мл воды, прибавляют 0,1 мл раствора внутреннего стандарта, 50 мл ацетонитрила и доводят объем раствора водой до метки.

Испытуемый раствор. Суспендируют 0,25 г (точная навеска) субстанции в 10 мл раствора для экстракции, встряхивают в течение 5 мин, экстрагируют 2 мл метиленхлорида, встряхивая в течение 5 мин, центрифугируют в течение 5 мин при 10 000 об/мин. Для анализа используют нижний слой (органический).

Стандартный раствор примесей N-нитрозаминов. Готовят раствор фармакопейных стандартных образцов НДМА, НДЭА, НДБА, НДПА, НДИПА и НЭИПА в метаноле с концентрацией по 500 мкг/мл. В мерную колбу 10 мл помещают 0,1 мл полученного раствора и доводят объем раствора водой до метки. В мерную колбу вместимостью 20 мл помещают 0,3 мл полученного раствора и доводят объем раствора водой до метки.

Испытуемый раствор с добавками. Суспендируют 0,25 г субстанции в 10 мл раствора для экстракции, прибавляют 0,1 мл стандартного раствора примесей *N*-нитрозаминов, интенсивно перемешивают в течение 5 мин, экстрагируют с помощью 2 мл метиленхлорида и встряхивают в течение 5 мин, центрифугируют в течение 5 мин при 10 000 об/мин. Для анализа используют нижний слой (органический).

Стандартный раствор А. К 10 мл раствора для экстракции прибавляют 50 мкл стандартного раствора примесей *N*-нитрозаминов, интенсивно перемешивают в течение 5 мин, экстрагируют 2,0 мл метиленхлорида и встряхивают в течение 5 мин, центрифугируют в течение 5 мин при 10 000 g. Для анализа используют нижний слой (органический).

ПРОЕКТ

Стандартный раствор Б. К 10 мл раствора для экстракции прибавляют 100 мкл стандартный раствор примесей *N*-нитрозаминов, интенсивно перемешивают в течение 5 мин, экстрагируют 2,0 мл метиленхлорида, встряхивая в течение 5 мин, центрифугируют в течение 5 мин при 10 000 об/мин. Для анализа используют нижний слой (органический).

Стандартный раствор В. К 10 мл раствора для экстракции прибавляют 0,2 мл стандартного раствора примесей *N*-нитрозаминов, интенсивно перемешивают в течение 5 мин, экстрагируют 2,0 мл метиленхлорида, встряхивая в течение 5 мин, центрифугируют в течение 5 мин при 10 000 об/мин. Для анализа используют нижний слой (органический).

Контрольный раствор. К 10 мл раствора для экстракции, прибавляют 2 мл метиленхлорида, встряхивают в течение 5 мин, центрифугируют в течение 5 мин при 10 000 g. Для анализа используют нижний слой (органический).

Примечание: стандартные и испытуемые растворы защищают от воздействия света.

Хроматографические условия

Колонка	кварцевая капиллярная 30 м × 0,25 мм, покрытая слоем поли(цианопропилфенил)(6)(метил)(94) силоксана, 1,4 мкм;		
Детектор	масс-спектрометрический;		
Газ-носитель	гелий для хроматографии;		
Скорость потока	1,3 мл/мин;		
Объем пробы	3 мкл;		
Температура	колонка	0–0,5 мин	40 °С
		0,5–2,2 мин	40 → 140 °С
		2,2–4,2 мин	140 °С
		4,2–6,2 мин	140 → 180 °С
		6,2–6,7 мин	180 °С
		6,7–8,7 мин	180 → 240 °С

ПРОЕКТ

	8,7–10,5	240 °C
	10,5–11,5	240 → 280 °C
	11,5–14,0	280 °C
Инжектор		250 °C
Линия переноса		240

Условия детектирования

Источник ионизации	электронная ионизация;
Режим детектирования	мониторинг реакций заданных ионов (MRM);
Температура источников ионов	230 °C;
Температура квадруполя	150 °C;
Время выдержки*	200 мс
Энергия ионизации*	40 эВ;
Задержка растворителя	4,5 мин;
Коэффициент усиления	15
Газ для соударений	азот;
Скорость потока газа для соударений	1,5 мл/мин;
Газ для охлаждения	гелий.

* приведенные параметры могут быть изменены при соблюдении условий пригодности системы

Переходы сканирования масс и энергии столкновений

Компонент	**Относительное время удерживания**	**Переходы сканирования масс**	**Энергия столкновений, эВ**
НДМА	около 0,9	74 → 44 (74 → 42)	5 22
НЭМА	1 (около 5,50 мин)	88 → 71	5
НДЭА	около 1,1	102 → 85 (102 → 56)	3 19
НЭИПА	около 1,3	116 → 99	5

ПРОЕКТ

Компонент	Относительное время удерживания	Переходы сканирования масс	Энергия столкновений, эВ
		(116 → 44)	14
НДИПА	около 1,4	130 → 88 (130 → 71)	5 14
НДПА	около 1,5	130 → 113 130 → 88	1 1
НДБА	около 1,8	158 → 141 158 → 99	1 7

Хроматографируют контрольный раствор, стандартный раствор А, стандартный раствор Б, стандартный раствор В, испытуемый раствор с добавками и испытуемый раствор.

Пригодность хроматографический системы

На хроматограмме стандартного раствора Б *относительное стандартное отклонение* отношения площади каждого из пиков примесей НДМА, НДЭА, НДБА, НДПА, НДИПА и НЭИПА к площади пика внутреннего стандарта должно быть не более 20 % (6 введений).

На хроматограмме испытуемого раствора с добавками:

- *отношение сигнал/шум (S/N)* для каждого из пиков примесей НДМА, НДЭА, НДБА, НДПА, НДИПА и НЭИПА, соответствующего основному переходу, должно быть не менее 10;

- *отношение сигнал/шум (S/N)* для каждого из пиков примесей НДМА, НДЭА, НДБА, НДПА, НДИПА и НЭИПА, соответствующего переходу квалификатора (подтверждающий переход), должно быть не менее 3.

Количественное определение примесей

Для расчета содержания используют основные MRM-переходы.

Пригодность хроматографической системы

Для каждого *N*-нитрозамина:

- *относительное стандартное отклонение* отношения площади пика каждого нитрозамина к площади пика внутреннего стандарта на

ПРОЕКТ

хроматограмме стандартного раствора Б не должно превышать 20 % (6 введений);

- *отношение сигнал/шум (S/N)* для пика, соответствующего основному переходу, должно быть не менее 10;

- *отношение сигнал/шум (S/N)* для пика, соответствующего переходу квалификатора, должно быть не менее 3.

- отношение площади пика, соответствующего основному переходу, к площади пика, соответствующего переходу квалификатора, для испытуемого раствора не должно отличаться от того же отношения для раствора с добавками более чем на 20 %;

- рассчитанное извлечение для всех растворов с добавками должно составлять от 70 до 130 %.

Расчет: используют основные MRM-переходы.

Строят калибровочную кривую зависимости отношения площади пика каждого *N*-нитрозамина к площади пика внутреннего стандарта в зависимости от концентрации *N*-нитрозамина на хроматограммах стандартных растворов А, Б и В. По полученной калибровочной кривой определяют концентрацию *N*-нитрозамина в испытуемом растворе.

9.4. Методика 4

Методика распространяется на определение примеси *N*-нитрозодиметиламина (НДМА), в фармацевтической субстанции метформина гидрохлорида методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с детектированием тандемным масс-спектрометром высокого разрешения (ВЭЖХ-МС/МС).

Определение проводят методом ВЭЖХ-МС/МС (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», ОФС «Масс-спектрометрия»).

ПРОЕКТ

Подвижная фаза А (ПФА). В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 1,0 мл муравьиной кислоты безводной, прибавляют 500 мл воды и доводят объем раствора водой до метки.

Подвижная фаза Б (ПФБ). В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 1,0 мл муравьиной кислоты безводной, прибавляют 500 мл метанола и доводят объем раствора метанолом до метки.

Стандартный раствор примесей N-нитрозодиметиламина. Готовят раствор фармакопейного стандартного образца НДМА в метаноле с концентрацией по 3 нг/мл.

Испытуемый раствор. В пробирку помещают 0,5 г (точная навеска) субстанции, прибавляют 5,0 мл метанола. Смесь перемешивают на шейкере в течение 40 мин, центрифугируют при 4500 об/мин в течение 15 мин. Надосадочную жидкость фильтруют через шприцевой мембранный фильтр из поливинилиденфторида с размером пор 0,2 мкм.

Испытуемый раствор с добавкой стандарта. В пробирку помещают 0,5 г (точная навеска) субстанции, прибавляют 5,0 мл стандартного раствора примеси *N*-нитрозодиметиламина в метаноле с концентрацией по 3 нг/мл. Смесь перемешивают на шейкере в течение 40 мин, центрифугируют при 4500 об/мин в течение 15 мин. Надосадочную жидкость фильтруют через шприцевой мембранный фильтр из поливинилиденфторида с размером пор 0,2 мкм.

Примечание: стандартные и испытуемые растворы защищают от воздействия света.

Хроматографические условия

Колонка	150 × 3,0 мм, силикагель бифенильный, эндкепированный, для хроматографии, 2,6 мкм;
Температура колонки	40 °С;
Температура образца	15 °С;
Скорость потока	0,4 мл/мин;
Объем пробы	3 мкл.

ПРОЕКТ

Режим хроматографирования

Время, мин	ПФА, %	ПФБ, %
0 – 3,0	95	5
3,0 – 5,0	95 → 90	5 → 10
5,0 – 6,0	90 → 40	10 → 60
6,0 – 10,0	40	60
10,0 – 13,0	40 → 20	60 → 80
13,0 – 13,1	20 → 0	80 → 100
13,1 – 15,0	0	100
15,0 – 15,1	0 → 95	100 → 5
15,1 – 18,0	95	5

Условия МС/МС

Детектор	Квадрупольно-времяпролетный или сочетание квадруполя и орбитальной ионной ловушки
Режим ионизации	Химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI)
Полярность	Положительная

Параметры режима детектирования

Наименование примеси	Переходы HRMRM			Энергия столкновений, В
	Молекулярный ион, m/z	Экстагируемая m/z в режиме MS2/PRM	Ширина изоляции (XIC), m/z	
НДМА	75	43,029	±0,004	25

Хроматографируют метанол, стандартный раствор примеси *N*-нитрозодиметиламина, испытуемый раствор и испытуемый раствор с добавкой стандарта.

Примечание: стандартный раствор примеси *N*-нитрозодиметиламина вводится каждые 6 анализов испытуемых растворов и испытуемых растворов с добавкой стандарта. После стандартного раствора вводится метанол.

ПРОЕКТ

Пригодность хроматографической системы:

На хроматограммах стандартного раствора *относительное стандартное отклонение* площади пика примеси *N*-нитрозодиметиламина должно быть не более 20,0 % после первых 6 введений.

На хроматограммах стандартного раствора *относительное стандартное отклонение* площади пика примеси *N*-нитрозодиметиламина должно быть не более 20,0 % после первых 6 введений, а также промежуточных и закрывающих анализов.

На хроматограммах стандартного раствора *отношение сигнал/шум (S/N)* для пика примеси *N*-нитрозодиметиламина должно быть не менее 10.

Степень извлечения примеси *N*-нитрозодиметиламина в испытуемом растворе с добавкой стандарта должна находиться в диапазоне 70,0 – 130,0%.

Количество примесей *N*-нитрозодиметиламина в субстанции в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot C_0 \cdot P}{S_0 \cdot C_1},$$

где: S_1 – площадь пика каждой из примесей *N*-нитрозодиметиламина на хроматограмме испытуемого раствора

S_0 – площадь пика соответствующей примеси *N*-нитрозодиметил-амина на хроматограмме стандартного раствора;

C_1 – концентрация субстанции в испытуемом растворе, нг/мл;

C_0 – концентрация стандартного образца примеси *N*-нитрозодиметил -амина, нг/мл;

P – содержание основного вещества в образце примеси *N*-нитрозодиметиламина, %.

9.5. Методика 5

Методика распространяется на определение примеси *N*-нитрозодиметиламина (НДМА), в покрытых оболочкой таблетках препаратов, содержащих фармацевтическую субстанцию метформин, методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с детектированием тандемным масс-спектрометром высокого разрешения (ВЭЖХ-МС/МС).

ПРОЕКТ

Определение проводят методом ВЭЖХ-МС/МС (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», ОФС «Масс-спектрометрия»).

Подвижная фаза А (ПФА). В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 1,0 мл муравьиной кислоты безводной, прибавляют 500 мл воды и доводят объем раствора водой до метки.

Подвижная фаза Б (ПФБ). Метанол.

Основной стандартный раствор НДМА с концентрацией 5,0 мкг/мл

В мерную колбу объемом 100 мл добавляют 0,1 мл стандартного раствора НДМА с концентрацией 5000 мкг/мл в метаноле, доводят метанолом до метки и перемешивают.

Раствор сравнения НДМА с концентрацией 3,2 нг/мл. В мерную колбу объемом 100 мл помещают 2 мл основного раствора НДМА с концентрацией 5 мкг/мл и доводят водой до метки. В мерную колбу объемом 100 мл помещают 3,2 мл полученного раствора, доводят метанолом до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Примечание 1: процедура приготовления стандартного раствора и раствора сравнения может быть скорректирована при использовании в качестве стандартного образца раствора НДМА другой концентрации или субстанции НДМА.

Примечание 2: стандартные и испытуемые растворы защищают от воздействия света.

Испытуемый раствор. Взвешивают на аналитических весах 20 таблеток. Рассчитывают среднюю массу таблетки по формуле:

$$M=m/20,$$

где: M – средняя масса таблетки, г

m – навеска 20 таблеток, г.

Таблетки растирают в ступке до получения гомогенного порошка. В пробирку или химический стакан переносят точную навеску растертой таблеточной массы, добавляют 5,0 мл воды очищенной. Выдерживают на ультразвуковой бане в течение 10 мин, центрифугируют при 10000 об/мин в

ПРОЕКТ

течение 5 мин. Надосадочную жидкость фильтруют через PVDF фильтр с диаметром пор 0,22 мкм, отбрасывая первую порцию фильтрата.

Испытуемый раствор с добавкой стандарта. В пробирку или химический стакан переносят точную навеску растертой таблеточной массы и добавляют 5,0 мл рабочего раствора НДМА с концентрацией 3,2 нг/мл. Выдерживают на ультразвуковой бане в течение 10 мин, центрифугируют при 10000 об/мин. в течение 5 мин. Надосадочную жидкость фильтруют через PVDF фильтр с диаметром пор 0,22 мкм, отбрасывая первую порцию фильтрата.

Хроматографические условия

Колонка	150 × 3,0 мм, силикагель октадецилсилильный, эндкепированный, для хроматографии (CSH), 2,5 мкм;
Предколонка	5 × 2,1 мм, силикагель октадецилсилильный, эндкепированный, для хроматографии (CSH), 2,5 мкм;
Температура колонки	30 °С;
Температура образца	5 °С;
Скорость потока	0,3 мл/мин;
Объем пробы	20 мкл.

Режим хроматографирования

Время, мин	**ПФА, %**	**ПФБ, %**
0	95	5
6,0	95	5
7,0	10	90
10,0	10	90
10,1	95	5
15,0	95	5

Условия МС/МС

Детектор	Квадрупольно-времяпролетный или сочетание квадруполя и орбитальной ионной

ПРОЕКТ

	ловушки
Режим ионизации	Химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI)
Полярность	Положительная

Параметры режима детектирования

Наименование примеси	**Переходы HRMRM**		**Энергия столкновений, В**	**Время аккумуляции сигнала, сек.**
	Молекулярный ион, m/z	**Экстагируемая m/z в режиме MS2/PRM**		
НДМА	75	43,029-43,032	25	0,1

Хроматографируют метанол, стандартный раствор, испытуемый раствор и испытуемый раствор с добавкой стандарта.

Примечание: стандартный раствор примеси *N*-нитрозодиметиламина вводится каждые 6 анализов испытуемых растворов и испытуемых растворов с добавкой стандарта. После стандартного раствора вводится метанол.

Пригодность хроматографической системы:

На хроматограммах стандартного раствора *относительное стандартное отклонение* площади пика примеси *N*-нитрозодиметиламина должно быть не более 10,0 % после первых 6 введений.

На хроматограммах стандартного раствора *относительное стандартное отклонение* площади пика примеси *N*-нитрозодиметиламина должно быть не более 10,0 % после первых 6 введений, а также промежуточных и закрывающих анализов.

На хроматограммах стандартного раствора *отношение сигнал/шум (S/N)* для пика примеси *N*-нитрозодиметиламина должно быть не менее 10.

Разрешение масс-спектрометрического сигнала для пика m/z 43,030 должно быть не менее 8000 для получения селективного сигнала в присутствии сигналов интерферирующих ионов в спектрах фрагментации иона m/z 75,055

Количество примесей *N*-нитрозодиметиламина в субстанции в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

ПРОЕКТ

$$X = \frac{S_1 \cdot C_0 \cdot G \cdot V \cdot 100}{S_0 \cdot a_1 \cdot L},$$

где: S_1 – площадь пика примеси *N*-нитрозодиметиламина на хроматограмме испытуемого раствора

S_0 – площадь пика примеси *N*-нитрозодиметил-амина на хроматограмме стандартного раствора;

a_1 – навеска таблеточной массы, мг;

G – средняя масса таблеток, мг;

L – доза метформина в таблетке, мг;

C_0 – концентрация стандартного образца примеси *N*-нитрозодиметил -амина, мг/мл;

V – объем разведения испытуемой пробы, мл

9.6. Методика 6

Методика распространяется на определение примесей *N*-нитрозаминов: *N*-нитрозодиметиламина (НДМА), *N*-нитрозодиэтиламина (НДЭА) и *N*-нитрозо-*N*-метил-4-аминобутановой кислоты (НМАК) в готовых лекарственных формах, содержащих лозартан, валсартан, кандесартан, телмисартан, ирбесартан методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ-МС/МС).

Определение проводят методом ВЭЖХ-МС/МС (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», ОФС «Масс-спектрометрия»).

Примечание 1: Для каждого производителя лекарственного средства, данная методика должна быть проверена и валидирована.

Подвижная фаза А (ПФА). В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 1,0 мл муравьиной кислоты безводной, прибавляют 500 мл воды и доводят объем раствора водой до метки.

Подвижная фаза Б (ПФБ). В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 1,0 мл муравьиной кислоты безводной, прибавляют 500 мл метанола и доводят объем раствора метанолом до метки.

Испытуемый раствор. Взвешивают на аналитических весах 20 таблеток. Рассчитывают среднюю массу таблетки по формуле:

$$M=m/20,$$

ПРОЕКТ

где: М-средняя масса таблетки, г

m - навеска 20 таблеток, г.

Таблетки растирают в ступке до получения гомогенного порошка. В пробирку переносят точную навеску растертой таблеточной массы, содержащей:

- около 100 мг действующего вещества (для таблеток, содержащих лозартан);

- около 320 мг действующего вещества (для таблеток, содержащих валсартан);

- около 300 мг действующего вещества (для таблеток, содержащих ирбесартан);

- около 80 мг действующего вещества (для таблеток, содержащих телмисартан) и добавляют 5,0 мл метанола.

Смесь перешивают на шейкере в течение 40 мин, центрифугируют при 4500 об/мин в течение 15 мин. Надосадочную жидкость фильтруют через PVDF фильтр с диаметром пор 0,22 мкм, отбрасывая первую порцию фильтрата. Растворы анализируются в течение 48 часов после приготовления, при условии хранения при температуре не выше + 10 ˚С.

Испытуемый раствор с добавкой стандарта. В пробирку переносят точную навеску растертой таблеточной массы, содержащей

- около 100 мг действующего вещества (для таблеток, содержащих лозартан);

- около 320 мг действующего вещества (для таблеток, содержащих валсартан);

- около 300 мг действующего вещества (для таблеток, содержащих ирбесартан);

- около 80 мг действующего вещества (для таблеток, содержащих телмисартан) и добавляют 5,0 мл стандартного раствора сравнения с концентрацией НДМА 19,6 нг/мл, концентрацией НДЭА 5,3 нг/мл, концентрацией НМАК 19,6 нг/мл.

ПРОЕКТ

Смесь перемешивают на шейкере в течение 40 мин, центрифугируют при 4500 об/мин. в течение 15 мин. Надосадочную жидкость фильтруют через PVDF фильтр с диаметром пор 0,22 мкм, отбрасывая первую порцию фильтрата. Растворы анализируются в течение 48 часов после приготовления, при условии хранения при температуре не выше + 10 ˚С.

Основной стандартный раствор НДМА с концентрацией 10,0 мкг/мл. В мерную колбу объемом 50 мл добавляют 100 мкл стандартного раствора НДМА с концентрацией 5000 мкг/мл в метаноле, доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают.

Основной стандартный раствор НДЭА с концентрацией 10,0 мкг/мл. В мерную колбу объемом 50 мл добавляют 100 мкл стандартного раствора НДЭА с концентрацией 5000 мкг/мл в метаноле, доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают.

Стандартный раствор НДЭА с концентрацией 100,0 нг/мл. В мерную колбу объемом 50 мл добавляют 0,5 мл основного стандартного раствора НДЭА с концентрацией 10 мкг/мл, доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают.

Стандартный раствор НДМА и НМАК с концентрацией 100,0 нг/мл. В мерную колбу объемом 50 мл добавляют 0,5 мл основного стандартного раствора НДМА с концентрацией 10 мкг/мл, 10 мкл стандартного раствора НМАК с концентрацией 500 мкг/мл в метаноле, доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают.

Стандартный раствор сравнения с концентрацией НДМА 19,6 нг/мл, концентрацией НДЭА 5,3 нг/мл, концентрацией НМАК 19,6 нг/мл. В мерную колбу объемом 100 мл добавляют 19,6 мл основного стандартного раствора НДМА и НМАК с концентрацией 100,0 нг/мл, 5,3 мл основного стандартного раствора НДЭА с концентрацией 100,0 нг/мл, доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают.

Примечание 2: процедура приготовления основных стандартных растворов, стандартных растворов и стандартного раствора сравнения может

ПРОЕКТ

быть скорректирована при использовании в качестве стандартного раствора НДМА, НДЭА, НМАК другой концентрации или субстанций данных веществ.

Примечание 3: Стандартные и испытуемые растворы защищают от воздействия света.

Хроматографические условия

Колонка	100 × 4,6 мм, силикагель пентафторфенилпропильный, эндкепированный, для хроматографии, 2,6 мкм;
Температура колонки	40 °С;
Температура образца	10 °С;
Скорость потока	0,6 мл/мин;
Объем пробы	1 мкл.

Режим хроматографирования

Время, мин	ПФА, %	ПФБ, %
0	90	10
1,5	90	10
7,0	45	55
17,0	45	55
17,1	10	90
21,0	10	90
21,1	90	10
25,0	90	10

Условия МС/МС

Режим ионизации	Химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI)
Полярность	Положительная

Параметры режима MRM

Аналит	Контролируемые MRM-переходы
НДМА	75,0 → 58,0 (основной)
	75,1 → 43,1 (подтверждающий)
НДЭА	103,0 → 75,0 (основной)
	103,0 → 47,0 (подтверждающий)

ПРОЕКТ

НДБА	147,0 → 117,0 (основной)
	147,0→ 44,0 (подтверждающий)

Хроматографируют стандартный раствор сравнения, стандартный раствор сравнения промежуточный, испытуемый раствор, испытуемый раствор с добавкой стандарта и метанол.

Пригодность хроматографической системы

На хроматограмме стандартного раствора

относительное стандартное отклонение площади каждого из пиков примесей *N*-нитрозаминов должно быть не более 20,0 % (6 введений).

На хроматограмме стандартного раствора *относительное стандартное отклонение* площади каждого из пиков примесей *N*-нитрозаминов должно быть не более 20,0 % после первых 6 введений, а также промежуточных и закрывающих анализов.

На хроматограмме раствора для проверки чувствительности *отношение сигнал/шум (S/N)* для каждого из пиков примесей *N*-нитрозаминов должно быть не менее 10.

На хроматограмме раствора (подтверждающий MRM-переход) для проверки чувствительности *отношение сигнал/шум (S/N)* для каждого из пиков примесей *N*-нитрозаминов должно быть не менее 3.

Степень извлечения каждой примеси *N*-нитрозамина в испытуемом растворе с добавкой стандарта должна находиться в диапазоне 70,0 – 130,0%.

Содержание каждой из примесей *N*-нитрозаминов в субстанции в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot C_0 \cdot G \cdot V \cdot 100}{S_0 \cdot a_1 \cdot L},$$

где: S_1 – площадь пика примеси на хроматограмме испытуемого раствора

S_0 – площадь пика примеси на хроматограмме стандартного раствора;

a_1 – навеска таблеточной массы, мг;

G – средняя масса таблеток, мг;

L – доза метформина в таблетке, мг;

ПРОЕКТ

C_0 – концентрация стандартного образца примеси *N*-нитрозодиметил -амина, мг/мл;

V – Объем разведения испытуемой пробы, мл.

ПРОЕКТ