

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи

Хорольский Михаил Дмитриевич

**Разработка и валидация методик определения примесей с потенциальной
генотоксичностью при стандартизации фармацевтических субстанций**

14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
доктор фармацевтических наук, профессор
Раменская Галина Владиславовна

Москва – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1. Литературный обзор	11
1.1. Классификация генотоксичных примесей	11
1.2. Генотоксичные примеси нитрозаминов	14
1.3. Механизмы образования примесей группы нитрозаминов в лекарственных средствах	16
1.3.1. Образование примесей в ходе синтеза фармацевтической субстанции	18
1.3.2. Образование примесей нитрозаминов при хранении	22
1.3.3. Иные пути образования нитрозаминов	24
1.4. Механизмы токсического действия нитрозаминов	24
1.5. Методики определения нитрозаминов	28
1.5.1. Определение нитрозаминов в пищевой промышленности	28
1.5.2. Методики определения нитрозаминов в окружающей среде	30
1.5.3. Методики определения нитрозаминов в лекарственных средствах	31
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ	39
Глава 2. Материалы и методы	40
2.1. Реактивы, стандартные образцы и объекты исследования	40
2.2. Оборудование	44
2.3. Приготовление стандартных и испытуемых растворов	45
2.3.1. Приготовление стандартных растворов	45
2.3.2. Приготовление испытуемых растворов	48
2.3.2.1. Приготовление растворов холостых проб	48
2.3.2.2. Приготовление модельных растворов	49
2.4. Аналитические методики	53
2.4.1. Исходные аналитические методики	53
2.4.1.1. Методика ГХ-МС (прямой ввод)	53
2.4.1.2. Методика ГХ-МС (Headspace)	54
2.4.2.1. Методика ГХ-МС/МС (прямой ввод)	55
2.4.2.2. Методика ВЭЖХ-МС/МС	55
Глава 3. Результаты и обсуждение	58
3.1. Методики с моноквадрупольным масс-спектрометрическим детектированием	58
3.1.1. Методика ГХ-МС (прямой ввод)	58
3.1.2. Методика ГХ-МС (Headspace)	63

3.1.3. Выводы о применении методик, основанных на моноквадрупольном масс-спектрометрическом детектировании, к определению нитрозаминов в лекарственных средствах валсартана, лозартана и ирбесартана	66
4. Разработка и валидация методик определения нитрозаминов в лекарственных средствах валсартана, лозартана и ирбесартана методами тандемной масс-спектрометрии.....	67
4.1. Разработка методики ГХ-МС/МС.....	67
4.2. Валидация методики ГХ-МС/МС	69
4.2.1. Специфичность.....	69
4.2.2. Предел количественного определения (LOQ)	70
4.2.3. Предел обнаружения (LOD)	71
4.2.4. Аналитический диапазон и линейность	72
4.2.5. Правильность.....	79
4.2.6. Прецизионность.....	83
4.2.7. Стабильность	83
4.3. Разработка методики ВЭЖХ-МС/МС.....	84
4.4. Валидация методики ВЭЖХ-МС/МС	89
4.4.1. Специфичность.....	89
4.4.2. Определение предела количественного определения (LOQ)	91
4.4.3. Определение предела обнаружения (LOD).....	92
4.4.4. Аналитический диапазон и линейность	93
4.4.5. Правильность.....	106
4.4.6. Прецизионность.....	111
4.4.7. Стабильность	111
5. Определение содержания примесей нитрозаминов в лекарственных препаратах валсартана, лозартана и ирбесартана	112
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ.....	116
Список сокращений и условных обозначений	119
Список литературы	121
Приложение А	133

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

В настоящее время одной из актуальных тенденций в фармацевтической отрасли является развитие точных и современных методов анализа. Это означает, что методы, которые раньше были дорогими, редкими и использовались только в научных исследованиях, начинают постепенно внедряться в лабораторный анализ. Интеграция новых, чувствительных методов анализа, позволяет изменить устоявшиеся подходы к стандартизации лекарственных средств по таким разделам как подлинность, количественное определение и чистота. Так, например, до недавнего времени, контроль содержания примесей в лекарственных средствах проводился с преимущественным использованием таких методов анализа как ВЭЖХ-DAD/ИК, ГХ-ПИД/ПФД. Селективность и чувствительность спектральных и термических детекторов привели к тому, что ключевую роль в определении веществ, стала играть хроматографическая система (время выхода примеси). Новые, внедряемые методы (ГХ-МС, ВЭЖХ-МС) обладают исключительной селективностью и чувствительностью (на уровне ppm), что в тандеме с хроматографическим разделением позволяет детектировать вещества, содержание которых ранее не обнаруживалось. Иными словами, повсеместное использование точных, чувствительных и селективных методов является первым шагом к переходу контроля качества лекарственных средств на новый уровень.

Одним из последних примеров использования новых чувствительных методов в контроле качества лекарственных средств является обнаружение генотоксичных примесей нитрозаминов в лекарственных препаратах валсартана, лозартана и ирбесартана. Ввиду того, что концентрации, в которых эти примеси обнаруживаются в препаратах ранее были трудно определяемыми, проблеме их содержания в лекарственных средствах не уделялось должного внимания.

Основной опасностью генотоксичных примесей нитрозаминов является их способность оказывать токсическое воздействие на организм в очень низких концентрациях (ppm, ppb). Помимо этого, как и остаточные органические растворители, примеси нитрозаминов способны накапливаться в жировой и печеночной тканях, что способствует нанесению постоянного повреждающего воздействия гепатобилиарной системе и возможной малигнизации ее ткани.

Генотоксичные примеси нитрозаминов в лекарственных средствах могут появляться как в процессе синтеза фармацевтической субстанции, так и в процессе деградации основного/вспомогательных веществ. Помимо этого, в научной литературе отсутствует единство в вопросе определения соединений нитрозаминов в фармацевтических субстанциях и лекарственных препаратах. Регуляторные органы развитых стран проводят исследования по

разработке наиболее эффективных и универсальных (способных определять нитрозамины в фармацевтических субстанциях и лекарственных препаратах) методик.

В настоящий момент, большая часть препаратов валсартана, лозартана и ирбесартана Российского фармацевтического рынка производится с использованием загрязненных фармацевтических субстанций, что является обоснованием необходимости проведения мониторинга лекарственных препаратов, находящихся в обращении в Российской Федерации.

Таким образом, разработка и внедрение методик, основанных на новых чувствительных и селективных методах анализа, является актуальной задачей направленной на совершенствование стандартизации и контроля качества лекарственных средств.

Степень разработанности темы исследования

Объектами исследования являются генотоксичные примеси нитрозаминов (N-нитрозодиметиламин, N-нитрозодиэтиламин, N-нитрозоаминомасляная кислота, н-этил-н-изопропилнитрозамин). В литературе представлены данные, описывающие результаты исследования по определению нитрозаминов в различных матрицах, в том числе в фармацевтических субстанциях, однако эти методики зачастую не обладают необходимой чувствительностью, а также различаются условиями хроматографического разделения и используемому методу и не являются универсальными (подходят только для одной фармацевтической субстанции). Помимо этого, в настоящий момент отсутствуют данные по содержанию нитрозаминов в лекарственных препаратах, находящихся в обращении в Российской Федерации.

Цель исследования

Разработать и валидировать методики определения генотоксичных примесей нитрозаминов (N-нитрозодиметиламина, N-нитрозодиэтиламина, N-нитрозоаминомасляной кислоты, н-этил-н-изопропилнитрозамина) методами высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) и газовой хроматографии с тандемной масс-спектрометрией ГХ-МС/МС в фармацевтических субстанциях и лекарственных препаратах валсартана, лозартана, ирбесартана. Провести определение содержания генотоксичных примесей нитрозаминов в ЛП, находящихся в обращении в Российской Федерации и установить их соответствие регламентируемым нормам.

Задачи исследования

1. Оценить методики определения нитрозаминов в лекарственных средствах группы сартанов, описанных в литературе.
2. Экспериментально изучить основные существующие методики определения нитрозаминов в лекарственных средствах валсартана, лозартана и ирбесартана и обосновать оптимальные условия анализа для обеспечения приемлемых валидационных характеристик аналитических методик.
3. Разработать методики определения примесей основных 4х нитрозаминов (НДМА, НДЕА, НМБА, НЕИПА) в фармацевтических субстанциях и лекарственных препаратах “сартанов” методами ВЭЖХ-МС/МС и ГХ-МС/МС.
4. Провести валидацию разработанных методик и доказать их пригодность для контроля лекарственных средств на содержание нитрозаминов.
5. Оценить содержание примесей нитрозаминов в лекарственных средствах валсартана, лозартана и ирбесартана, находящихся в обращении в Российской Федерации, с помощью разработанных методик.

Научная новизна исследования

Разработана и валидирована методика ВЭЖХ-МС/МС, позволяющая одновременно определять 4 примеси нитрозаминов в фармацевтической субстанции и лекарственных препаратах валсартана, лозартана и ирбесартана. Разработана и валидирована методика ГХ-МС/МС, позволяющая одновременно определять 2 примеси нитрозаминов в фармацевтической субстанции и лекарственных препаратах “сартанов”. Показано, что данные методики являются более чувствительными, селективными и воспроизводимыми, по сравнению с методиками, описанными в литературе. Экспериментально подтверждена пригодность разработанной методики для определения содержания примесей 4х нитрозаминов (НДМА, НДЕА, НМБА, НЕИПА) при проведении контроля препаратов валсартана, лозартана и ирбесартана, находящихся в обращении на территории Российской Федерации.

Теоретическая и практическая значимость результатов исследования

С учетом свойств лекарственных средств валсартана, лозартана и ирбесартана и современных подходов к определению в них примесей нитрозаминов обоснован выбор методов ВЭЖХ-МС/МС и ГХ-МС/МС для контроля их содержания в промышленной продукции. Проведена оценка рекомендованных методик определения нитрозаминов в лекарственных

средствах. Разработаны методики ВЭЖХ-МС/МС и ГХ-МС/МС обеспечивающих необходимую чувствительность определения примесей.

Разработанные методики определения нитрозаминов позволяют проводить контроль фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов. Результаты данного исследования служат рекомендательной базой для определения генотоксичных примесей нитрозаминов в вышеуказанных лекарственных средствах. Применение разработанной методики ВЭЖХ-МС/МС позволило провести оценку содержания примесей нитрозаминов в лекарственных средствах валсартана, лозартана и ирбесартана, находящихся в обращении в Российской Федерации. Разработанные методики внедрены в работы Департамента регуляторной деятельности АО “Фармстандарт” и отдела контроля качества ООО “Глобалхимфарм”.

Основные положения, выносимые на защиту

- Обоснование выбора метода ГХ-МС/МС для определения примесей нитрозаминов в лекарственных средствах валсартана, лозартана и ирбесартана
- Обоснование выбора метода ВЭЖХ-МС/МС для определения примесей нитрозаминов в лекарственных средствах валсартана, лозартана и ирбесартана
- Обоснование условий селективного определения 4х нитрозаминов (НДМА, НДЕА, НМБА, НЕИПА) в лекарственных средствах с применением метода ВЭЖХ-МС/МС
- Обоснование условий селективного определения 2х нитрозаминов (НДМА, НДЕА) в лекарственных средствах валсартана, лозартана и ирбесартана с применением метода ГХ-МС/МС
- Результаты валидации разработанных методик определения нитрозаминов в лекарственных средствах валсартана, лозартана и ирбесартана
- Результаты оценки содержания примесей нитрозаминов в лекарственных препаратах валсартана, лозартана и ирбесартана, находящихся в обращении в Российской Федерации, на содержание нитрозаминов

Методология и методы исследования

Методология исследования заключалась в выборе наиболее оптимального метода определения нитрозаминов в фармацевтических субстанциях и лекарственных препаратах с учетом их строения, физико-химических свойств и анализа литературы. В настоящее время, подавляющее большинство существующих методик определения нитрозаминов основывается на хроматографическом разделении с последующим моноквадрупольным масс-спектрометрическим детектированием. В ходе проведенных исследований установлена

недостаточная чувствительность этих методик, что является обоснованием для выбора методов, основанных на тандемном масс-спектрометрическом детектировании. Установление оптимальных параметров ВЭЖХ-МС/МС и ГХ-МС/МС для селективного определения нитрозаминов в лекарственных средствах валсартана, лозартана и ирбесартана осуществлялось с учетом их строения, физико-химических свойств, а также данных, полученных в результате воспроизведения существующих методик. Пригодность разработанных методик для определения примесей нитрозаминов в фармацевтических субстанциях валсартана, лозартана и ирбесартана была доказана их апробацией при контроле промышленной продукции. Полученные результаты статистически обрабатывались с использованием Microsoft Office Excel, SPSS Statistics, Agilent QQQ analysis.

Достоверность научных положений и выводов

Первичные результаты исследований получены с использованием методов ВЭЖХ-МС/МС и ГХ-МС/МС. Достоверность научных положений и выводов подтверждена проведением валидации разработанных методик, в том числе статистической обработкой полученных результатов. Предложенные методики соответствуют всем критериям приемлемости валидационных параметров. Все использованное оборудование имеет свидетельства о поверке.

Апробация работы

Апробация диссертации состоялась 09.06.2021 г. на заседании кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева Института фармации им. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). Основные положения и результаты исследований доложены на конференции: Хорольский М.Д. Экспериментальная апробация методик определения примесей нитрозаминов в фармацевтических субстанциях валсартана, лозартана и ирбесартана. // В сборнике: Естественные и медицинские науки. Студенческий научный форум. сборник статей по материалам XXXIV студенческой международной научно-практической конференции. Москва, 2020. С. 56-60.

Личный вклад автора

Автором лично выполнен выбор научного направления и разработана концепция исследования. Автору принадлежит определяющая роль в проведении экспериментальных исследований, анализе и обобщении полученных результатов. Разработка и валидация методик

ВЭЖХ-МС/МС и ГХ-МС/МС проведена лично автором. Вклад автора является определяющим на всех этапах исследования, включая, постановку задач, а также их реализацию.

Внедрение результатов

Разработанная и валидированная методика ГХ-МС/МС, применяющаяся для определения примесей нитрозаминов (НДМА, НДЕА) в лекарственных средствах валсартана, лозартана и ирбесартана внедрена в рабочий процесс Департамента регуляторной деятельности АО «Фармстандарт» и отдела контроля качества ООО «ГЛОБАЛХИМФАРМ». Разработанная методика ВЭЖХ-МС/МС, применяющаяся для определения примесей нитрозаминов (НДМА, НДЕА, НМБА, НЭИПА) внедрена в рабочий процесс Департамента регуляторной деятельности АО «Фармстандарт» и отдела контроля качества ООО «ГЛОБАЛХИМФАРМ». Акты внедрения представлены в приложении А.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения, изложенные в диссертационной работе, соответствуют паспорту специальности 14.04.02. – Фармацевтическая химия, фармакогнозия, а именно области исследования пунктам 2,3.

Связь исследования с проблемным планом фармацевтических наук

Выполнение диссертационной работы проводилось в рамках плана и в соответствии с направлением научно-исследовательской работы кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А. П. Арзамасцева ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), по теме: «Совершенствование образовательных технологий додипломного и последипломного медицинского и фармацевтического образования». Номер государственной регистрации 01.2.011.68237.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 8 научных работ, отражающих основные результаты диссертации – 5 статей в научных журналах и изданиях, которые включены в Перечень ВАК при Минобрнауки России и международные базы данных (из них 2 статьи в изданиях из Перечня Университета/Перечня ВАК при Минобрнауки России и 3 статьи в журналах, индексируемых в международных базах данных (Scopus, Web of Science, Chemical abstracts)).

Объем и структура диссертации

Работа изложена на 134 страницах машинописного текста, содержит 32 таблицы и 25 рисунков. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальных глав, выводов и списка литературы (116 наименований, из которых 108 наименований на иностранных языках). Полученные результаты статистически обработаны и изложены в таблицах, приведенных в работе.

Глава 1. Литературный обзор

В настоящий момент, одним из основных вопросов современного контроля качества лекарственных средств (ЛС) является определение примесей в фармацевтических субстанциях и лекарственных препаратах. Ведущими мировыми регуляторными органами разрабатываются и модифицируются документы и руководства, описывающие и регламентирующие проведение испытаний, которые следует проводить для подтверждения соответствия ЛС показателю “Родственные примеси”.

По существующей классификации, примеси принято делить на технологические и продукты деградации. Первые образуются в ходе синтеза основного или вспомогательных веществ, а вторые образуются в процессе деградации основного или вспомогательных веществ [1,2]. По классификации международного агентства ИСН существует отдельный класс примесей с потенциальной генотоксичностью. Генотоксичность – это свойство вещества повреждать последовательность нуклеиновых кислот или нарушать процедуру их репликации [3,4]. Основной опасностью генотоксичных примесей является их способность оказывать выраженное негативное действие на организм пациента даже в незначительных количествах (меньше 1 ppm).

1.1. Классификация генотоксичных примесей

Потенциальной генотоксичностью могут обладать следующие вещества: пестициды, остаточные органические растворители, неорганические и органические примеси.

Пестициды – химические соединения для борьбы с сорняками, вредителями и болезнями растений [5]. Пестициды применяются при обработке лекарственных растений, используемого для приготовления лекарственного растительного препарата (ЛРП). Группой пестицидов, относящихся к генотоксичным примесям, являются хлорсодержащие пестициды [6].

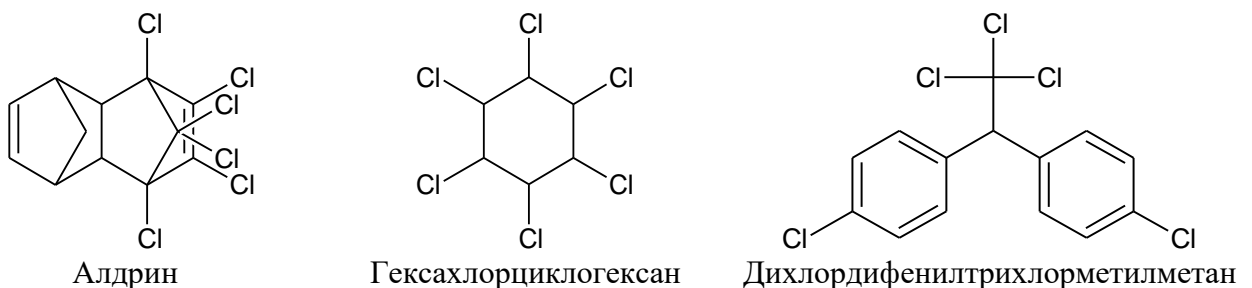
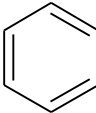
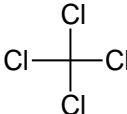
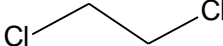

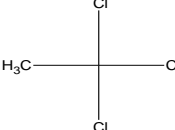


Рисунок 1. Химические формулы хлорсодержащих пестицидов, обладающих генотоксичностью

Остаточные органические растворители используются при производстве фармацевтических субстанций. Классификация остаточных органических растворителей

описана в ведущих мировых фармакопеях и основывается на степени возможного риска для здоровья пациента [7]. Выделяют 3 класса опасности остаточных органических растворителей: 1 класс – генотоксичные растворители, 2 класс – токсичные растворители, не обладающие генотоксичностью, 3 класс – растворители низкой токсичности. Основным международным руководством, регламентирующим требования по нормированию и методам контроля остаточных растворителей в ЛС, является ICH Q3C (R6) [8]. Химические формулы остаточных органических растворителей первого класса токсичности представлены в таблице 1.

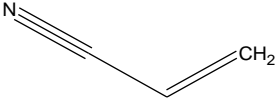
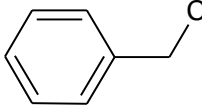
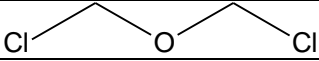
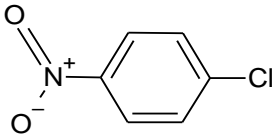
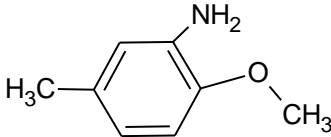
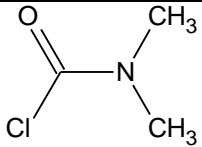
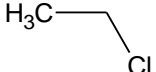
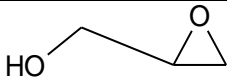
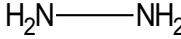
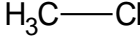
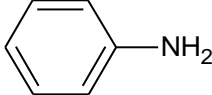
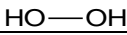
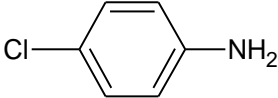
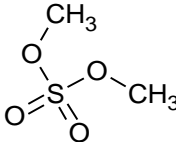
Таблица 1. Остаточные органические растворители первого класса токсичности

Название	Химическая формула
Бензол	
Тетрахлорметан	
Этилен хлорид	
Ацетилен дихлорид	
Трихлорэтан	

К неорганическим генотоксичным примесям принято относить тяжелые металлы. При оценке качества фармацевтических субстанций и ЛП по показателю “тяжелые металлы” определяется содержание свинца (Pb), ртути (Hg), висмута (Bi), сурьмы (Sb), и др. металлов, оказывающих генотоксическое воздействие. В руководстве ICH Q3D, регламентируются подходы к определению и нормированию следующих металлов: мышьяк, кадмий, никель, родий, рутений и ванадий. В руководстве описано, что системное потребление малых концентраций этих металлов, а также разовая токсичная доза, приводят к высокому риску у пациентов [9].

Органические примеси с потенциальной генотоксичностью – являются наиболее разнообразной и многочисленной группой. Перечень, а также подходы к нормированию и определению содержания органических примесей с потенциальной генотоксичностью описаны в руководстве ICH M7 [10]. Перечень органических генотоксичных примесей, химические формулы и их допустимое потребление приведены в таблице 2.

Таблица 2. Органические генотоксичные примеси

Название	Химическая формула	Допустимое потребление мкг/сутки
Акрилонитрил		6
Бензил хлорид		4,1 x 10
Дихлорметилловый эфир		4 x 10 ⁻³
1-хлоро-4-нитробензол		1,17 x 10 ²
p-крезидин		4,5 x 10
Диметилкарбамоил хлорид		5 0,6 при ингаляции поступлении дыхательным путем
Этил хлорид		1,81
Глицидол		4
Гидразин		3,9 x 10 0,2 при поступлении дыхательным путем
Метилхлорид		1,361
Анилин		7,2 x 10 ²
Пероксид водорода		6,8 x 10 ⁴
Хлоранилин		3,4 x 10
Диметил сульфат		1,5

Примеси с потенциальной генотоксичностью являются многочисленной и распространенной группой примесей в ЛС. Помимо этого, эти примеси обладают высокой токсичностью (в десятки раз больше, чем у обычных примесей), могут накапливаться в организме

и приводить к появлению отсроченной токсичности. Несмотря на вышесказанное, генотоксичные примеси остаются малоизученными ввиду отсутствия для большинства из них исследований на людях. Контроль содержания этих веществ в фармацевтических субстанциях и ЛП также сопряжен с рядом трудностей, основные из которых представлены недостаточной чувствительностью и селективностью методов анализа, применяемых в рутинном контроле качества [11].

Одной из известных групп примесей с потенциальной генотоксичностью являются соединения с азаспиро группой. Примером таких примесей является примесь 2-азаспиро [4,5] декан 3-она (примесь А) в габапентине, препарате с антиконвульсивным действием, применяющимся для лечения эпилепсии и нейропатических болей [12, 13]. Указанная примесь хорошо изучена, а ее токсичность и предел допустимого суточного потребления установлены. Определение данной примеси в рутинном контроле качества зачастую проводят с использованием метода ВЭЖХ с УФ детектированием [14, 15]. Тем не менее, существует ряд работ, посвященных определению примеси А в габапентине с использованием высокочувствительных и селективных методов. Так, например, в литературе описана разработка и валидация чувствительного метода определения данной примеси в лекарственных препаратах габапентина с использованием количественного ЯМР [16]. Указанный метод обладает рядом преимуществ и способен определять более низкие концентрации примеси А чем рутинные методы контроля качества.

1.2. Генотоксичные примеси нитрозаминов

В начале 2018 года мировой фармацевтический рынок потрясла новость об обнаружении в препаратах валсартана, содержащих фармацевтическую субстанцию производителя Zhejiang Huahai Pharmaceutical (КНР) завышенных содержаний примеси N-нитрозодиметиламина (НДМА) и N-нитрозодиэтиламина (НДЕА). Поскольку ранее, содержанию данных примесей не уделялось столь пристального внимания, ведущие мировые регуляторные органы FDA и EMA объявили об отзыве лекарственных препаратов валсартана, а также запустили ряд проверок фармацевтического рынка. Основными критериями ЛП, подлежащих контролю, являлась схожесть химических структур, схем синтеза и наличие в исходных реагентах фармацевтической субстанции Zhejiang Huahai Pharmaceutical. В марте 2019 года FDA обнаружило завышенное содержание другой генотоксичной примеси нитрозаминов N-нитрозо-аминобутановой кислоты в ЛП лозартана производства компании Hetero labs (Индия) с последующим отзывом сертификата на фармацевтическую субстанцию [17-21]. По состоянию на 23 сентября 2019 года, в общей сложности отозвано 1159 серий валсартана, лозартана и ирбесартана. Проблема

загрязнения ЛП генотоксичными примесями нитрозаминов затронула не только блокаторы ангиотензиновых рецепторов. 13 сентября 2019 года FDA опубликовало информацию о превышении допустимого содержания нитрозаминов (на основе данных от внешней лаборатории) в препаратах ранитидина, являющегося блокатором H_2 – гистаминовых рецепторов [22]. ЛП ранитидина, содержащие фармацевтическую субстанцию компании Saraca Laboratories Limited (Индия) были в принудительном порядке отозваны ЕМА, а фармацевтические субстанции подвергнуты ряду повторных проверок, по итогу которых, “обвинения” с некоторых заявителей были сняты. Помимо этого, все фармацевтические компании были проинформированы о необходимости провести всестороннее исследование содержания нитрозаминов в ЛС ранитидина, а действие сертификатов было отозвано до получения результатов исследования [23]. В настоящий момент отсутствуют какие-либо данные о возобновлении действия приостановленных сертификатов. Помимо этого, многочисленные исследования, проводящиеся фармацевтическими компаниями и регуляторными органами, выявили завышенные содержания примесей нитрозаминов в метформине [24]. В декабре 2019 года EDQM проинформировал о данной проблеме всех держателей регистрационных удостоверений (РУ). Более подробные действия Европейского регулятора изложены на их официальном сайте в разделе, посвященном проблеме определения примесей нитрозаминов в ЛС [20].

Несмотря на то, что в настоящий момент проводятся всесторонние исследования генотоксичных примесей нитрозаминов, остается не освещенным ряд таких вопросов как:

- Механизмы образования примесей нитрозаминов в фармацевтических субстанциях и ЛП
- Уровень истинной токсичности нитрозаминов (механизм генотоксичности)
- Методология определения нитрозаминов в фармацевтических субстанциях и ЛП

Нитрозамины – класс соединений, содержащих нитрозогруппу при диалкилзамещенной аминогруппе. В фармацевтической отрасли эти соединения могут использоваться как органические растворители. Основными путями образования нитрозаминов являются побочные реакции между компонентами синтеза фармацевтической субстанции или ЛП и деградация основного или вспомогательных веществ при хранении [25-31]. Химические формулы основных генотоксичных примесей группы нитрозаминов приведены на рисунке 2.

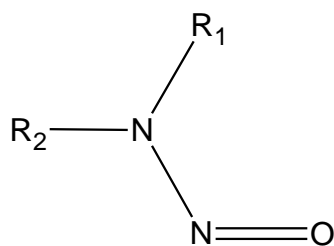


Рисунок 2. Химические формулы основных нитрозаминов и их физико-химические свойства

Таблица 3. Радикалы и физико-химические свойства основных нитрозаминов

Название соединения	R ₁	R ₂	Физико-химические свойства
N-нитрозодиметиламин (НДМА)	CH ₃	CH ₃	Желтая маслянистая жидкость со сладким вкусом. Молекулярная масса 74,08 Хорошо растворим в метаноле, ацетонитриле, воде
N-нитрозодиэтиламин (НДЕА)	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	Бледно-желтая маслянистая жидкость с аминным или ароматическим запахом Молекулярная масса 102,135 Хорошо растворим в метаноле, ацетонитриле, воде
N-нитрозо-4-метил-аминобутановая кислота (НМБА)	CH ₃	C ₃ H ₇ COOH	Желто-белая маслянистая жидкость Молекулярная масса 146,14 Хорошо растворима в ацетонитриле, дихлорметане, метаноле и воде
N-нитрозоэтилизопропиламин (НЭИПА)	C ₂ H ₅	C ₃ H ₇	Белый порошок Молекулярная масса 116,16 Хорошо растворим в ацетонитриле, метаноле, воде

1.3. Механизмы образования примесей группы нитрозаминов в лекарственных средствах

Валсартан, лозартан и ирбесартан – конкурентные блокаторы рецепторов ангиотензина II. Подавляют эффекты ангиотензина II, а также вазоконстрикцию и секрецию альдостерона, тем

самым вызывая стойкий антигипертензивный эффект [32-34]. Данные препараты применяются при артериальной гипертензии и хронической сердечной недостаточности, а также является альтернативой эналаприла (золотой стандарт в лечении вышеуказанных заболеваний) [35]. Химические формулы препаратов валсартана, лозартана, ирбесартана изображены на рисунке 3.

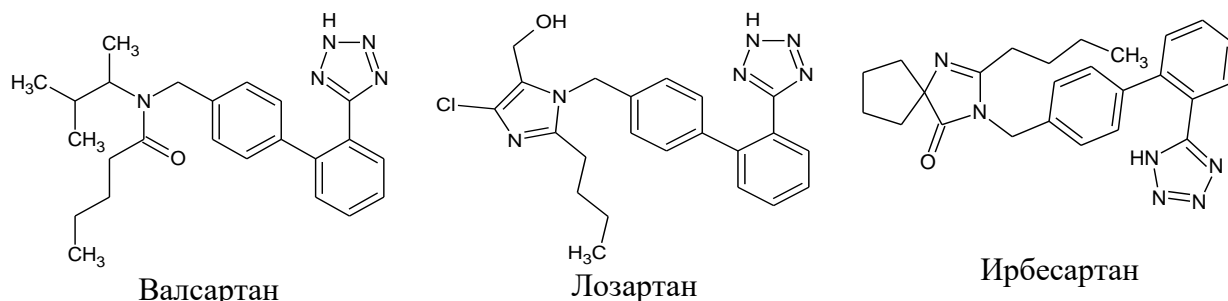


Рисунок 3. Химические формулы препаратов валсартана, лозартана и ирбесартана

Для выявления закономерностей образования генотоксичных примесей нитрозаминов в ЛС валсартана, лозартана и ирбесартана, регуляторным органом ЕС проведены исследования препаратов сартанового ряда на всех стадиях обращения. На основе проведенных исследований было разработано руководство, содержащее информацию об установленных на данный момент способах образования генотоксичных примесей нитрозаминов в ЛС [36]:

- применение нитрита натрия (NaNO_2) и/или других нитрозирующих веществ в ходе производства фармацевтических субстанций (особенно на последних стадиях синтеза);
- плохая очистка сырья;
- восстановление (регенерация) растворителей, реагентов и катализаторов в процессе синтеза;
- использование исходных материалов, которые содержат нитрозамины (ненадлежащий контроль);
- перекрестная контаминация;
- деградация исходных материалов, промежуточных продуктов при получении лекарственного препарата;
- использование определенных видов упаковки (зафиксирована контаминация готового препарата, упакованного в блистер; обоснованием этого являлось взаимодействие фольги, содержащей нитроцеллюлозный праймер с аминами, которые содержались в чернилах).

Все приведенные пути образования нитрозаминов главным образом классифицируются на три группы:

- 1) образование нитрозаминов в ходе синтеза действующего/вспомогательного вещества;
- 2) родственные примеси, образующиеся в процессе деградации действующего/вспомогательного вещества;
- 3) иные пути образования (взаимодействии первичной упаковки препарата и чернил, содержащих амины).

1.3.1. Образование примесей в ходе синтеза фармацевтической субстанции

В настоящий момент, все зафиксированные случаи образования нитрозаминов в ЛП валсартана, лозартана и ирбесартана относятся к первой группе способов (образование нитрозаминов в ходе синтеза действующего вещества). Изменение схемы синтеза (в целях ее оптимизации), замена или введение ранее неиспользуемых реагентов, являются причиной увеличения содержания примеси нитрозаминов. Оптимизация схемы синтеза происходит, как правило, за счет использования более доступных компонентов или сокращения промежуточных стадий синтеза (объединения нескольких этапов в один и т.д.).

Вариант схемы синтеза валсартана, при котором не происходит образования нитрозаминов, заключается в использовании реакции Negishi, основывающейся на сочетании производных арилбромида, например метил-(2S)-2-[[4-бромфенил]-метил](пентаноил)амино}-3-метилбутаноата, и 5-фенил-1-тримил-1H-тетразола. В схеме синтеза, изображенной на рисунке 4, 5-фенил-1-тримил-1H-тетразол получают из бензонитрила [37]. Схема синтеза валсартана представлена на рисунке 4 [38].

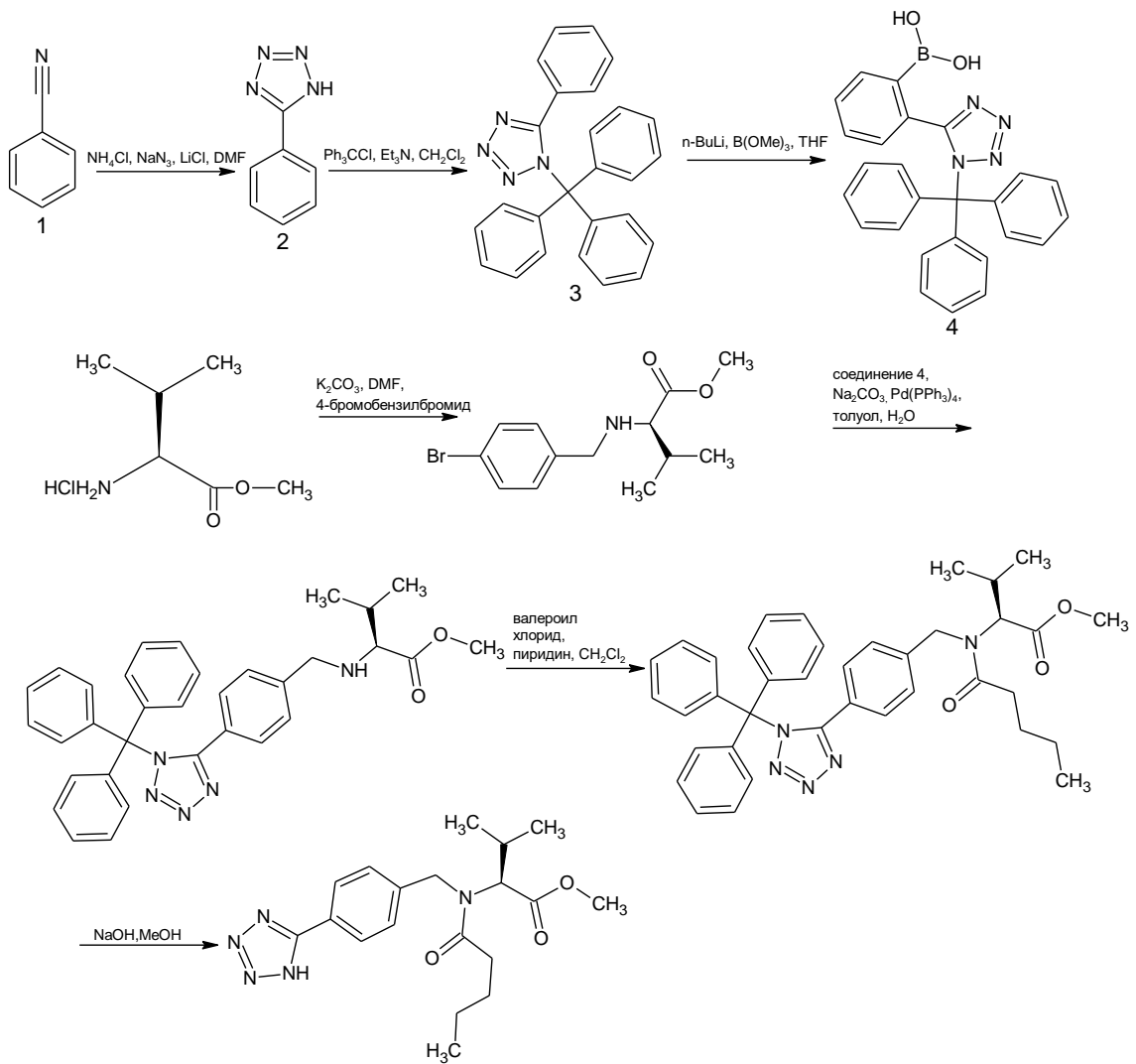


Рисунок 4. Схема синтеза валсартана, основанная на реакции Negishi

При оптимизации схемы синтеза валсартана стадия орто-метилирования 5-фенил-1-тримил-тетразола с N-бутил-литием заменяется на реакцию образования тетразольного кольца с участием азида натрия, трибутил олово хлоридом [39]. Улучшенная схема синтеза валсартана изображена на рисунке 5.

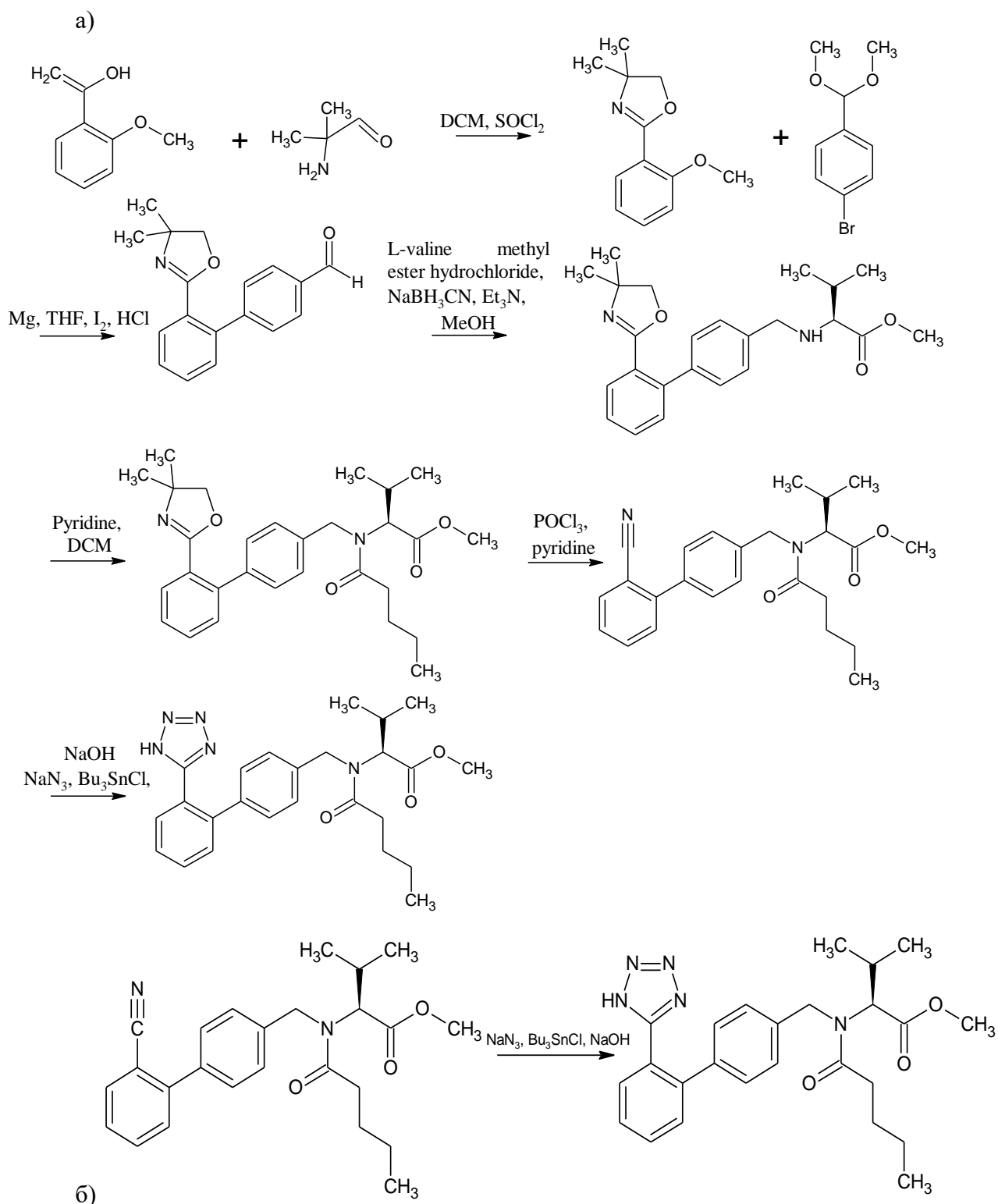


Рисунок 5. а) Улучшенная схема валсартана б) Стадия образования нитрозаминов

Азид натрия, который используется в улучшенной схеме синтеза, является высокотоксичным и канцерогенным веществом. Это означает, что при использовании азид натрия на производстве, должна быть предусмотрена деактивация его остаточных количеств. Деактивация азид натрия как правило проводится добавлением избытка азотистой кислоты [40]. Альтернативным вариантом гашения азид натрия является добавление натрия нитрита [41-43].

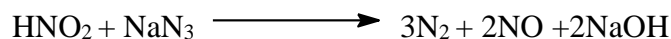
Остаток азотистой кислоты, натрия нитрита, или образующиеся в результате вышеописанной реакции нитрит-ионы могут взаимодействовать с диметиламином (продукт разложения диметилформамина) в кислой среде. Таким образом, образование примеси НДМА, может происходить при одновременном присутствии в реакционной смеси следующих реагентов: нитрит-ионов, диметиламина, азотистой кислоты [44].

Данный вывод также подтверждается отчетом о проведении предварительной оценки [45] ЕМА, согласно статье 31 директивы 2001/83/ЕС, где сказано, что ион нитрозония образуется в результате протонирования натрия нитрита при низких значениях рН. Помимо этого, патентная заявка Китайского производителя Zhejiang Huahai Pharmaceutical, фармацевтическая субстанция которого содержала генотоксичные примеси включает в себя этап гашения азидов азота в среде апротонного растворителя (наиболее предпочтительным из которых является диметилформамид) [46]. Подобные условия теоретически, являются наиболее благоприятными для образования нитрозаминов в ЛС.

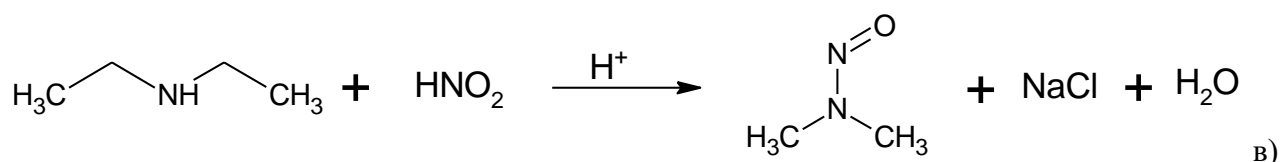
Образование примеси НДЕА в реакционной смеси, обусловлено наличием диэтиламина, который является примесью триэтиламина гидрохлорида (распространенный органический растворитель). При взаимодействии диэтиламина и нитрит ионов в кислой среде происходит образование примеси НДЕА.

Образование НМБА, в свою очередь, происходит в результате гидролиза N-метилпирролидона (растворитель, который может использоваться в синтезе) до 4-метиламинобутирата натрия в щелочных условиях. Дальнейшая реакция между образующимся вторичным амином и азотистой кислотой приводит к образованию НМБА. Реакции образования примесей нитрозаминов изображены на рисунке 6.

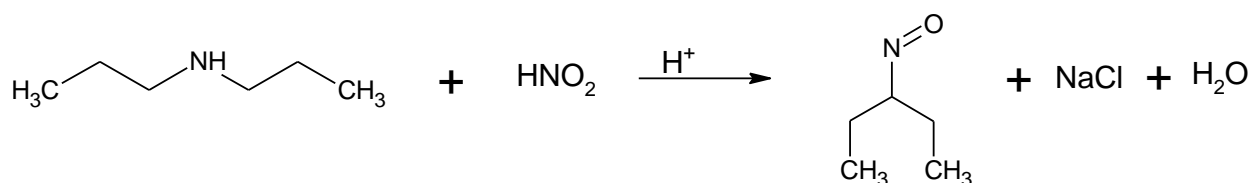
а) Реакция деактивации азидов натрия



б) Механизм образования примеси НДМА



Механизм образования НДЕА



г) Механизм образования НМБА

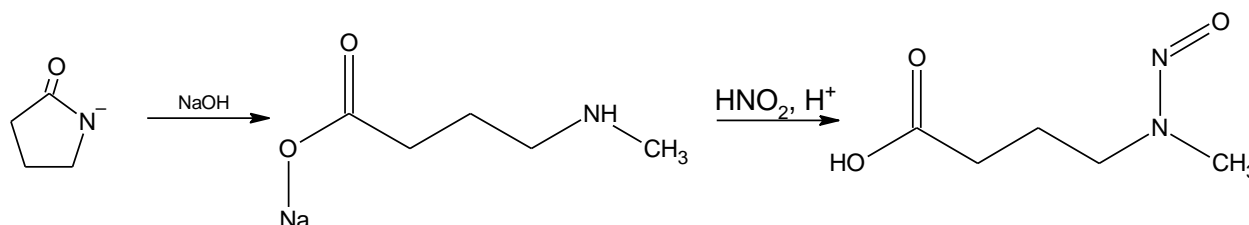


Рисунок 6. Возможный механизм образования описанных нитрозаминов при синтезе фармацевтических субстанций валсартана и лозартана.

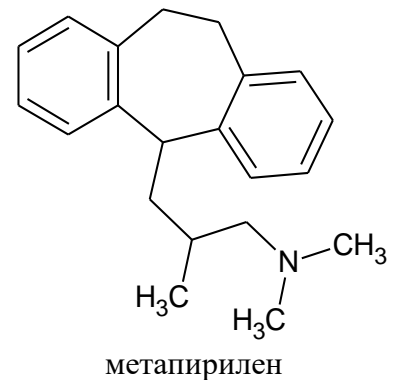
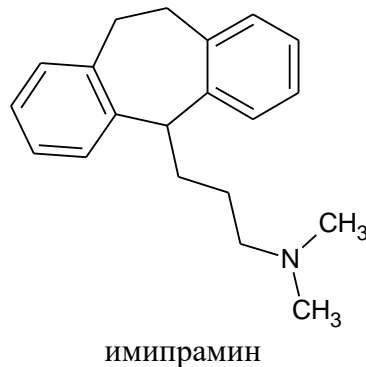
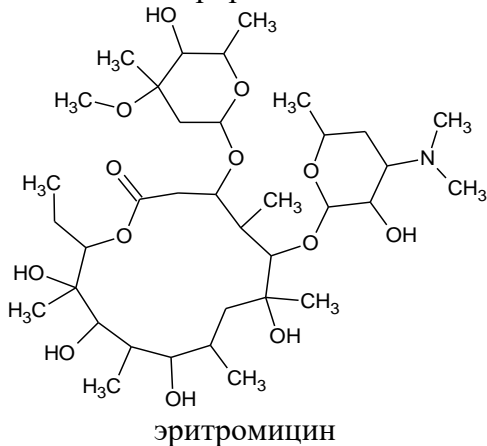
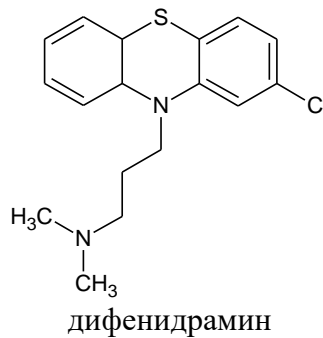
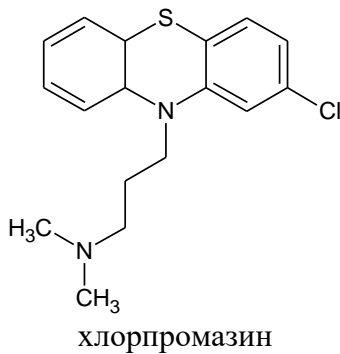
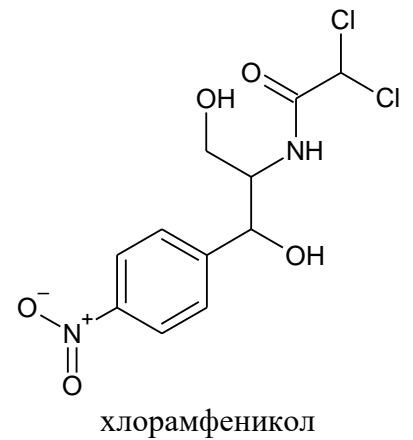
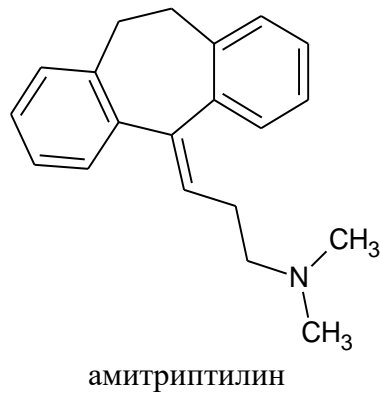
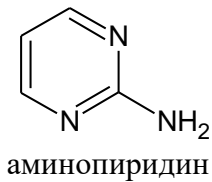
Основными способами предотвращения вышеуказанных механизмов образования нитрозаминов в процессе синтеза теоретически может являться улучшенная очистка от остаточных растворителей (диметилформамид, триэтиламина гидрохлорид, N-метилпирролидон) и/или исключение стадии синтеза тетразольного кольца с использованием азиды натрия.

1.3.2. Образование примесей нитрозаминов при хранении

Генотоксичные примеси нитрозаминов могут образовываться не только в ходе синтеза действующего вещества, но и в результате деградации (разложения) действующего/вспомогательного вещества в процессе хранения препарата. Разработка ЛП включает в себя определение способности препарата образовывать примеси в процессе хранения. Методология проведения тестов стабильности описана в международном руководстве ICH [47]. Помимо этого, в ГФ РФ XIV существует общая фармакопейная статья (ОФС) описывающая принципы хранения ЛП и нормативы содержания таких примесей [48]. Положением, лежащим в основе этих документов, является проведение квалификации (идентификация, количественное определение и проведение исследований по безопасности) неизвестных веществ, обнаруженных в ходе проведения контроля качества и содержащихся в концентрациях, превышающих нормы.

Важной особенностью N-нитрозаминов как примесей, образующихся в процессе деградации основного/вспомогательных веществ, является то, что все существующие руководства относят их к высоко опасным соединениям [10]. Такие соединения должны квалифицироваться при обнаружении в гораздо меньших концентрациях, чем нормативы в руководстве [49].

Риск образования примесей деградации препарата прямо зависит от структуры действующего и вспомогательных веществ. Для определения группы препаратов, теоретически способных образовывать примеси нитрозаминов целесообразно выделить соединения, которые подвержены физико-химической деградации с образованием соединений данного класса. Предсказуемо максимальный уровень риска достигается для веществ, которые содержат амино- (исключая четвертичные амины) и нитрогруппу [50]. Обоснованием данного вывода являются фактические данные об известных случаях образования примесей нитрозаминов в ходе хранения ЛП [51-54]. Структуры молекул всех веществ, перечисленных в этих публикациях, содержат вышеназванные группы и изображены на рисунке 7. [55-60]. Все соединения в указанных публикациях объединяются вышеуказанным утверждением.



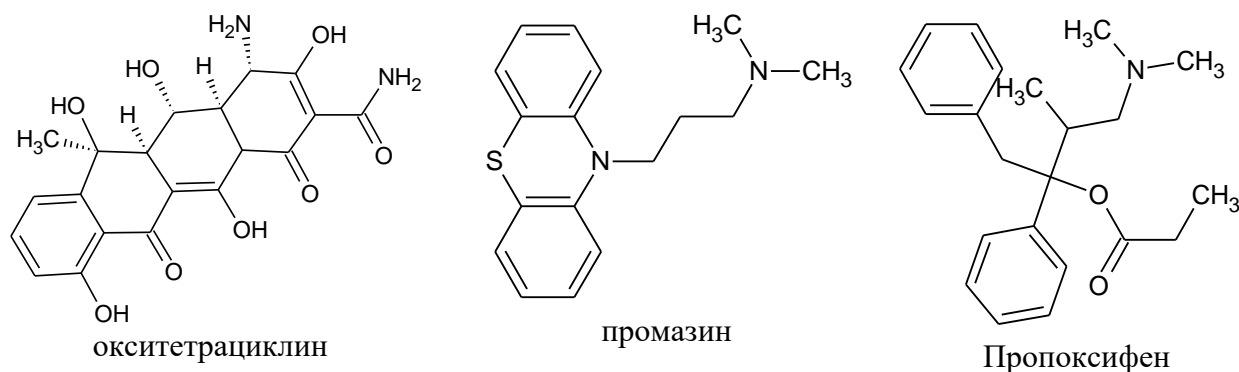


Рисунок 7. Лекарственные препараты, структуры которых способны образовывать нитрозамины при хранении

1.3.3. Иные пути образования нитрозаминов

Такие пути образования нитрозаминов, как реакция между структурным фрагментом нитроцеллюлозы (первичная упаковка препарата) и аминоксодержащими чернилами, являются в большей степени теоретическими и мало осуществимыми в реальной практике. Тем не менее, существует необходимость контролировать любые возможные риски образования нитрозаминов в ЛС. Это связано с тем, что терапия ЛС рассмотренными выше проводится в течение длительного времени (в большинстве случаев до конца жизни) и применяются у ослабленных заболеванием пациентов.

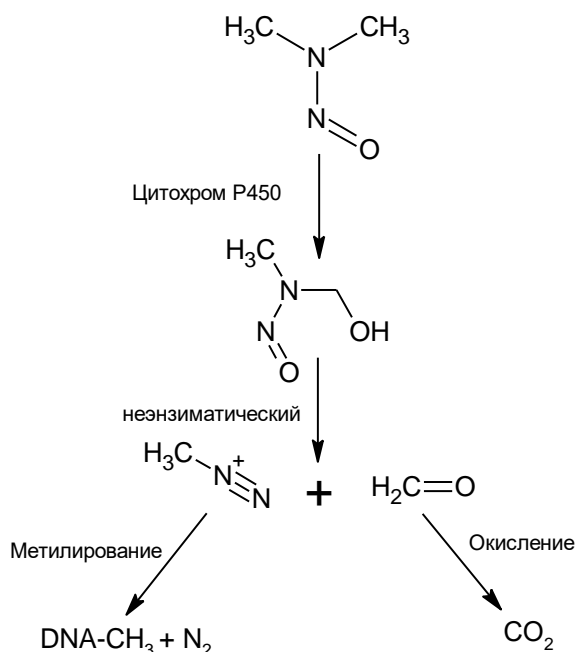
1.4. Механизмы токсического действия нитрозаминов

Одной из основных опасностей генотоксичных примесей N-нитрозопроизводных является их способность оказывать мутагенное и канцерогенное действие (следствие нарушения репликации и структуры ДНК) на организм вне зависимости от поступившей концентрации. Примеси нитрозаминов способны накапливаться в клетках печени, выделяться с желчью и оказывать токсическое действие на гепатобилиарную систему [61, 62]. В настоящий момент точный механизм оказания генотоксичности не установлен, однако в различных источниках сообщается, что нативные соединения нитрозаминов не оказывают гепато- и генотоксического воздействия. Основное токсическое воздействие оказывают метаболиты, образующиеся в ходе летального синтеза. Летальный синтез – процесс образования высокотоксичных соединений из нетоксичных или малотоксичных в ходе метаболизма [63].

Метаболизм нитрозаминов приводит к образованию метилдiazоний иона и формальдегида. Метилдiazоний ион является сильным алкилирующим агентом, способным изменять ДНК, а также нарушать процесс ее репликации. Формальдегид оказывает сильнейшее

гепато-, нейро-, нефротоксическое действие. Механизм генотоксического действия нитрозаминов на примере НДМА представлен на рисунке 8.

а) Метаболизм N-нитрозопроизводных на примере НДМА



б) Метилирование ДНК на примере гуанина

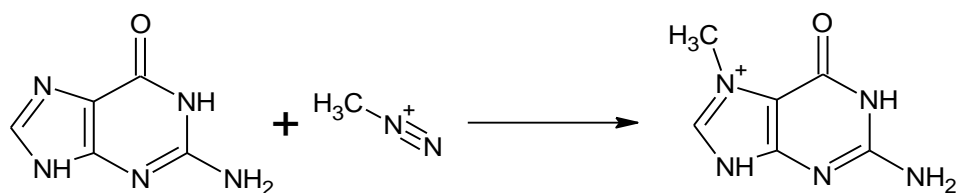


Рисунок 8. Механизм генотоксического действия нитрозаминов

Таким образом, реализация основного механизма генотоксичности происходит за счет взаимодействия иона метилдiazония с нуклеотидами [64]. Гепатотоксическое действие нитрозаминов опосредуется образованием формальдегида [65], а кумуляция нитрозаминов в печени приводит к постоянному повреждающему воздействию и вероятной опухолевой трансформации.

Руководство EPA IRIS относит примеси нитрозаминов к категории 2А, вещества “вероятно канцерогенные для человека” [66]. Термин “вероятно канцерогенные” означает, что токсикологические исследования на людях не проводились ввиду неэтичности, а исследования на животных (стандартный тест на крысах), показали высокую генотоксичность [67-69].

Определение допустимых пределов содержания генотоксичных примесей заключается в оценке соблюдения порога токсикологической значимости (ТТС – Threshold of Toxicological

Concern) в рамках общего подхода, изложенного в ICH [10]. Значение TTC для большинства соединений является 1,5 мкг/сут потребления генотоксической примеси и рассматривается в качестве дополнительного риска (1 на 100000 на протяжении жизни). Основываясь на указанном значении порога, можно вычислить допустимый предел содержания примеси в фармацевтической субстанции для предполагаемой дозы по формуле:

$$\text{ПДК (ppm)} = \frac{\text{TTC} \left(\frac{\text{мкг}}{\text{день}} \text{ на человека} \right)}{\text{доза (г/день)}}$$

ПДК – предельно допустимая концентрация, TTC – порог токсикологической значимости (Threshold of Toxicological Concern)

При расчете на фармацевтическую субстанцию валсартана, при предельной суточной дозе валсартана 320 мг, предел содержания НДМА составляет 4,7 ppm. Тем не менее, в соответствии с рекомендациями ICH M7, нитрозамины относятся к категории соединений “cohort of concern”, потребление которых даже при уровне TTC связано с повышением риска канцерогенеза [10]. Для этих соединений метод определения порога токсикологической значимости неприменим, а оценка их безопасного содержания требует индивидуального подхода (наличие токсикологических исследований).

В настоящий момент, на сайте FDA опубликованы “временные” нормы содержания нитрозаминов в ЛП валсартана, лозартана и ирбесартана. Данные о нормах допустимого потребления FDA приведены в таблице 4 [70].

Таблица 4. Нормы содержания нитрозаминов в ЛП валсартана, лозартана и ирбесартана

ЛП	Макс. сут. доза мг/день	Допуст. потр. НДМА нг/день	Допуст. потр. НДМА (ppm)	Допуст. потр. НДЕА нг/день	Допуст. Потр. НДЕА (ppm)	Допуст. Потр. НМБА (нг/день)	Допуст. Потр. НМБА (ppm)
Валсартан	320	96	0,3	26,5	0,083	96	0,3
Лозартан	100	96	0,96	26,5	0,27	96	0,96
Ирбесартан	300	96	0,32	26,5	0,088	96	0,32

На сайте ЕМА опубликована аналогичная таблица предельных содержаний этих примесей в препаратах за исключением максимального суточного потребления Лозартана = 150 мг/день. При тех же значениях допустимого потребления 96 нг НДМА и 26,5 нг НДЕА предел содержания равен 0,640 и 0,177 ppm соответственно [71].

В отсутствие данных о токсичности нитрозаминов для людей, обоснованием вышеуказанных норм являются исследования токсичности, проводившиеся на клетках животных, бактерий, человека, а также на животных моделях. Так, например, в исследованиях А. Iwaniuk с соавт. было установлено, что НДМА вызывает индукцию апоптоза в человеческих лейкоцитах [72]. Исследования проводились *in vitro*.

Другие исследования описывали потребление самками крыс Wistar содержащей НДМА воды (0,2 – 2,64 ppm) в течение 28 дней, суточное потребление составляло 28 – 372 мкг/кг. Уровни премутагенного ДНК аддукта Об-метилгуанина измеряли в ДНК клеток печени и лейкоцитов крови. Было установлено быстрое накопление аддукта (2-7 дней) и его быстрое исчезновение при прекращении введения [73]. Эти исследования противоречат данным, опубликованным в 1976 г. и описывающим увеличение вероятности индуцирования канцерогенеза при аналогичных концентрациях [74], а также данным, описанным выше.

Существуют также данные, описывающие длительное воздействие низких доз нитрозаминов на клеточную линию ННЗТЗ (мышинные фибробласты). Было установлено увеличенное число разрывов ДНК и частоты микроядер в сравнении с не зараженными клетками и клетками, получившими единичную дозу. Была зафиксирована злокачественная трансформация и однозначно доказана генотоксичность таких нитрозаминов как НДМА и НДЕА [75].

В исследованиях 1997 г. самцам крыс Fischer 344 в возрасте 6 недель внутрибрюшинно вводили однократную дозу от 0,001 до 100 мг/кг. Измеряли уровни ДНК аддукта 8-гидроксигуанина в течение 72 часов после введения. Изучали случайно выбранных крыс на предмет наличия корреляции ДНК аддукта и введенной дозы. Было установлено вовлечение 8-гидроксигуанина в механизм инициации гепатокарциногенеза даже при очень низких уровнях введенных доз [76].

Эффекты гепатотоксичности были исследованы на сирийских золотых хомяках и крысах F344. Выбранные животные демонстрируют повышенную восприимчивость к гепатокарциногенезу, вызванному N-нитрозопроизводными соединениями. Токсические эффекты вводимых доз оценивались с помощью определения одноцепочечных разрывов. Значительный гепатотоксический эффект наблюдался у обоих видов уже через 12-24 ч после введения. Через 3 недели после введения остаточные количества одноцепочечных разрывов наблюдались у хомяков [77].

Единственные данные о токсичности НДМА для людей описаны в документе Toxicological profile for n-nitrosodimethylamine [78]. В документе описывается 3 летальных случая

после перорального воздействия НДМА. Одной из погибших являлась женщина, которая получала неизвестные дозы НДМА на протяжении 2х лет. В публикации, описывающей данный случай, авторы отмечают по крайней мере 4 дозы, каждая из которых примерно равнялась 250 – 300 мг. Вскрытие установило, что причиной смерти являлась печеночная недостаточность. Взрослый мужчина и годовалый мальчик умерли в течение нескольких дней после употребления лимонада, контаминированного неустановленным количеством НДМА. В обоих случаях вскрытие установило кровоизлияние в мозг и печеночную недостаточность.

Таким образом, на данный момент отсутствуют точные данные, описывающие генотоксические эффекты нитрозаминов при их поступлении в маленьких концентрациях. Исследования на животных показывают противоречивые результаты, а подтвержденных данных воздействия нитрозаминов на организм человека очень мало. Помимо этого, реальные токсичные дозы и нормы потребления нитрозаминов людьми не установлены.

1.5. Методики определения нитрозаминов

1.5.1. Определение нитрозаминов в пищевой промышленности

В настоящий момент в мировом научном сообществе нет единства по поводу оптимального метода определения нитрозаминов в различных матрицах. Определение этих генотоксичных примесей в пищевой промышленности, экологических исследованиях, контроле качества ЛС проводится разными методами. Так, например, в методических указаниях по определению N-нитрозаминов в продовольственном сырье и пищевых продуктах основным способом идентификации и полуколичественного определения нитрозаминов является метод тонкослойной хроматографии (ТСХ) с детектированием пятен флюориметрией. Метод основывается на выделении нитрозаминов из навески массой 100-300 г перегонкой с водяным паром, последующем их экстрагировании с помощью хлористого метилена, концентрировании и дериватизации. Заявленный предел чувствительности методики – 1 мкг/кг [79].

В качестве арбитражного метода для контроля пищевых продуктов используется метод газовой хроматографии (ГХ) с хемилюминесцентным детектированием [80]. Сущность метода заключается в предварительном выделении нитрозаминов с использованием перегонки с водяным паром или перегонки в вакууме, экстракции хлористым метиленом из водного дистиллята, концентрировании экстракта и разделении смеси методом ГХ. Количественное определение нитрозаминов проводится методом абсолютной калибровки. Предел чувствительности метода – 0,1 мкг/кг.

Основными преимуществами данных методов является высокая чувствительность определения нитрозаминов в сложной разнородной матрице. Помимо этого, себестоимость проводимых исследований очень низка, а оборудование, используемое в работе, не требует особых навыков оператора. Недостатками методов являются, большая масса анализируемой навески, трудоемкая процедура пробоподготовки (время подготовки проб достигает до 3х часов) и использование токсичных реагентов (хлористый метилен и тд.). Многостадийная процедура пробоподготовки приводит к неизбежным потерям анализируемых веществ, что требует внесения в пробы внутреннего стандарта и в целом, ухудшает открываемость и воспроизводимость методик. Использование больших навесок (100-300 г) – избыточный и трудноосуществимый путь в фармацевтическом анализе, так как себестоимость проб в данном случае, будет неоправданно завышенной.

Несмотря на то, что предел чувствительности описанных выше методов чрезвычайно высок, использование их в фармацевтической отрасли невозможно ввиду описанных выше недостатков. Помимо этого, с развитием лабораторного технического оснащения, разрабатываются методики селективного определения нитрозаминов без использования многостадийной пробоподготовки и дериватизации. Современные методики позволяют проводить точный, эффективный и воспроизводимый анализ нитрозаминов в различных продуктах питания (время проведения анализа ниже в несколько раз) [81-84].

В настоящее время, для определения нитрозаминов в продуктах питания разрабатываются методики с использованием масс-спектрометрических детекторов. Xian Y. И соавт. была разработана методика селективного определения 12 нитрозаминов в вине и пиве с помощью ГХ-МС/МС. Примечательно то, что многие компоненты этих напитков (этанол и др.) также являются легколетучими веществами, которые, при использовании других методов (ТСХ, ГХ с хемолюминисценцией) могли бы мешать определению нитрозаминов. Очистка с использованием натрия гидроксида позволяет предотвратить попадание в источник ионов самых высокомолекулярных компонентов. Предел количественного определения разработанной методики (LOQ) равен 5-1,5 ppb, предел обнаружения находится в диапазоне 1-5 ppb. Корреляционный коэффициент $R^2 = 0,999$ при определении линейности в диапазоне 2-200 мкг/л [85].

Индонезийскими учеными была разработана методика определения нитрозаминов в обработанных мясных продуктах. Методика основывается на использовании ВЭЖХ-МС/МС, что позволяет использовать упрощенную процедуру пробоподготовки. В частности, в данной методике для экстрагирования нитрозаминов необходимо провести гомогенизацию пробы с дальнейшей экстракцией ацетонитрилом. Очистку от матрицы проводят центрифугированием

пробы при 8000 об/мин. Супернатант используется непосредственно для анализа. LOQ данной методики равен 20 нг/мл. Линейность методики определялась в диапазоне от 20 до 500 нг/мл [86].

Таким образом, в настоящее время в определении нитрозаминов в пищевой промышленности существует четкая тенденция внедрения новых, высокочувствительных, точных и селективных методов анализа (ГХ-МС/МС, ВЭЖХ-МС/МС). Использование данных методов позволяет значительно упростить процедуру пробоподготовки, а также повысить чувствительность и селективность.

1.5.2. Методики определения нитрозаминов в окружающей среде

В системе растворителей октанол:вода, коэффициент распределения нитрозаминов $\text{Log}_p = -0,37-0,9$ (данные получены с использованием программного обеспечения ChemOffice), что означает хорошую растворимость как в воде, так и в многих органических растворителях. Это свойство позволяет нитрозамину накапливаться в почве, мигрировать с помощью грунтовых вод и заражать окружающую среду. Помимо этого, являясь летучими токсикантами, нитроамины обнаруживаются в воздухе промышленных предприятий по производству пищевой и табачной продукции. Таким образом, актуальной задачей современной экологии является разработка селективных и чувствительных методик определения нитрозаминов в воздухе, почве, и грунтовых водах.

Так, Hong Y. с соавторами [87] разработали метод одновременного количественного определения 9ти нитрозаминов, содержащихся в атмосферных частицах. Методика основывается на выделении нитроаминов с помощью жидкостной экстракции и последующем анализе веществ методом ГХ-МС/МС. Основной особенностью разработанной методики является отсутствие стадии испарения аналита (не применяется парофазный пробоотборник). Было доказано, что исключение данной стадии не влияет на воспроизводимость и открываемость методики $E=92-117\%$, $RSD < 3\%$ для каждого нитроамина соответственно. Методика обладает высокой чувствительностью и селективностью т.е. способна к обнаружению нитроаминов в концентрациях на уровне нг/мл.

Совершенно очевидно, что способность нитроаминов к миграции с помощью грунтовых вод может приводить к заражению поверхностных, подземных, сточных и прочих вод, что в свою очередь приводит к возникновению риска контаминации питьевой воды и дальнейшему попаданию нитроаминов в организм человека. Помимо совершенствования методологии очистки питьевой воды, существует необходимость разработки современных методов ее контроля на предмет содержания нитроаминов.

Так, в исследовании Emel Toruz и соавт. была разработана методика определения НДМА в водных матрицах различного происхождения методом ВЭЖХ-МС/МС, сопряженным с пробоподготовкой, представленной методом твердофазной экстракции [88]. Методика позволяет проводить селективное определение НДМА в воде и обладает высокой чувствительностью и линейностью в диапазоне от 2 нг/л до 100 нг/л. LOQ = 2 нг/л, коэффициент корреляции $R^2=0,995$. Недостатками методики является необходимость долгой и трудоемкой пробоподготовки, невозможность переноса методики на сложные, разнородные матрицы (пищевые продукты, ЛП и др.), а также время, затрачиваемое на анализ.

В другой публикации [89] описывается метод определения НДМА в питьевой воде методом ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии (УВЭЖХ-МС/МС). Разработанная методика характеризуется высоким LOD=20 нг/л а также хорошей открываемостью 96-108 %. Метод прост в исполнении, а анализ занимает менее 8 минут. Недостатками метода является его себестоимость и редко встречаемый вид приборов (Waters TQD).

1.5.3. Методики определения нитрозаминов в лекарственных средствах

До недавнего времени, методики определения нитрозаминов в ЛС отсутствовали. В 2018 году при анализе на остаточные растворители фармацевтической субстанции валсартана регуляторным агентством Германии был обнаружен неидентифицируемый пик примеси. Содержание этого вещества требовало проведения квалификационных испытаний, в результате которых, было установлено завышенное содержание НДМА. Регуляторными органами ведущих стран была инициирована разработка методик точного, селективного определения нитрозаминов в фармацевтических субстанциях.

Менее чем через полгода после обнаружения генотоксичных примесей нитрозаминов в валсартане, FDA опубликовало первую разработанную методику определения примесей НДМА и НДЕА с использованием ГХ-МС. Методика основывается на тандемном масс-спектрометрическом детектировании исследуемых веществ и способна селективно определять НДМА и НДЕА в фармацевтических субстанциях и ЛП.

Таблица 5. Предел обнаружения и количественного определения НДМА и НДЕА с использованием ГХ-МС

Примесь	Фармацевтическая субстанция (ppm)	Лекарственный препарат (ppm)
НДМА	LOD =0,01	LOD=0,015
	LOQ=0,05	LOQ=0,08
НДЕА	LOD=0,01	LOD=0,015
	LOQ=0,03	LOQ=0,04

Основными недостатками данной методики является отсутствие стадии очистки исследуемых веществ от матрицы действующего вещества или ЛП (вспомогательные вещества и действующее вещество), а также высокая концентрация фармацевтической субстанции или ЛП (100 мг/мл), попадающая в прибор [90]. Аномально высокая концентрация фармацевтической субстанции, необходимая для анализа, свидетельствует о плохой чувствительности метода и невозможности обнаружить нитрозамины в нужных концентрациях. Помимо повышения уровня базовой линии высокая концентрация фармацевтической субстанции приводит к ускоренному загрязнению источника ионов, что в свою очередь требует проведения профилактических мер, сопряженных с остановкой прибора на длительное время.

Недостатки вышеописанной методики были признаны существенными, что в дальнейшем привело к разработке и публикации FDA методики ГХ-МС с парофазным пробоотборником (Headspace). Новая разработанная методика определяла НДМА и НДЕА только в фармацевтической субстанции валсартана, однако, позволяла исключить влияние фармацевтической субстанции на анализ и прибор. При использовании Headspace, преимущественная доля валсартана остается в растворе, в то время как исследуемые нитроамины испаряются и насыщают паровую фазу. Недостатками методики является теоретическая потеря детектируемых веществ при неэквивалентном насыщении паровой фазы, что может быть достигнуто недостаточным временем нагревания или др. неверно подобранными условиями. Нельзя так же отрицать, что точность методик с Headspace в сравнении с методиками прямого ввода гораздо хуже. Помимо этого, время анализа методики Headspace в несколько раз больше, чем у методики с прямым вводом, а чувствительность определения нитроаминов остается практически на том же уровне за исключением LOD НДМА = 0,005 ppm (выше в 10 раз) [91].

Инициированные FDA проверки ЛС со схожими структурами ожидаемо привели к обнаружению примесей нитроаминов в лозартане и ирбесартане, а также необходимости

разработки универсальных методик их определения. Так, в апреле 2019 года FDA была опубликована методика селективного определения 5 нитрозаминов (NDMA, NDEA, NEIPA, NDIPA, NDBA) в препаратах валсартана, лозартана и ирбесартана методом ГХ-МС/МС с прямым вводом. Хроматографическая часть методики не претерпела значимых изменений (температурный градиент идентичен методике ГХ-МС с прямым вводом), однако была увеличена чувствительность, что является следствием правильно подобранных условий масс-спектрометрического детектирования. Так, сравнивая LOD и LOQ вышеописанных методик, можно отметить значительное преимущество методики ГХ-МС/МС с прямым вводом, перед описанными ранее методиками [92]. Основными недостатками разработанной методики является высокая концентрация АФС, используемая для анализа, а также невозможность определения примеси NMBA, которая в настоящий момент является обязательной к определению в субстанциях валсартана, лозартана и ирбесартана.

Таблица 6. Сравнение показателей LOD и LOQ у методик FDA

Примесь	LOD и LOQ в субстанции (ppm)	LOD и LOQ в таблетках (ppm)
NDMA	LOD=0,005 LOQ=0,008	LOD=0,002 LOQ=0,008
NDEA	LOD=0,001 LOQ=0,005	LOD=0,002 LOQ=0,008
NEIPA	LOD=0,001 LOQ=0,005	LOD=0,002 LOQ=0,008
NDIPA	LOD=0,001 LOQ=0,005	LOD=0,002 LOQ=0,008
NDBA	LOD=0,010 LOQ=0,025	LOD=0,016 LOQ=0,040

Разработанная FDA методика ГХ-МС/МС (Headspace) способна одновременно определять 5 нитрозаминов (НДМА, НДЕА, НЕИПА, НДИПА) и практически лишена недостатков, присутствующих в ранее описанных методиках. Высокая чувствительность метода позволяет уменьшить концентрацию действующего вещества, попадающую в прибор, а использование тандемной масс-спектрометрии гарантирует достаточную точность и воспроизводимость методики. Основными недостатками методики являются потребность в специально обученных специалистах и редкий тип используемого оборудования. Эти недостатки существенно осложняют перенос описанной методики в рутинный контроль качества ЛС на содержание генотоксичных примесей нитрозаминов [93].

Разработанная FDA методика ВЭЖХ-МС/МС способна селективно определять 6 примесей нитрозаминов в ЛС валсартане, лозартане и ирбесартане. Метод детектирования заключается в использовании масс-спектрометрии высокого разрешения (масс-спектрометр состоит из квадруполя и орбитальной ловушки) [94]. Данные о чувствительности методики отражены в таблице 7.

Таблица 7. Чувствительность методики ВЭЖХ-МС/МС (FDA)

Примесь	НДМА	НДЕА	НЭИПА	НДИПА	НДБА	НМБА
LOD (нг/мл)	0,10	0,32	0,05	0,15	0,10	0,20
(ppm)	0,005	0,016	0,003	0,008	0,005	0,010
LOQ (нг/мл)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
(ppm)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05

Как видно из изложенных выше данных, метод ВЭЖХ-МС/МС обладает чувствительностью, сопоставимой с методом ГХ-МС/МС. Помимо этого, используемые реагенты гораздо чаще используются в лабораторной практике, а сам метод ВЭЖХ является более распространенным в контроле качества ЛС [95-99]. Основным недостатком данной методики ВЭЖХ-МС/МС является необходимость использования хроматографической системы, выдерживающей высокое давление (УВЭЖХ), а также детектирование орбитальной ловушкой, которое используется преимущественно в научных исследованиях. УВЭЖХ с масс-спектрометрией высокого разрешения значительно повышают себестоимость проводимого анализа, что означает невозможность внедрения такой методики в рутинный анализ. В то же время, рост тенденции к обнаружению нитрозаминов в различных ЛС (ранитидин, метформин) подразумевает разработку доступных методов анализа.

Несмотря на то, что разработанные на основе ГХ-МС и ГХ-МС (Headspace) методики значительно дешевле ВЭЖХ-МС/МС, в рекомендациях FDA предпочтение отдается в пользу методов ВЭЖХ. Так, FDA была опубликована методика определения НДМА в ЛС ранитидина методом ВЭЖХ-МС/МС. Данная методика основана на использовании ультравысокоэффективной хроматографической системы и химической ионизации при атмосферном давлении с трехквадрупольной системой масс-спектрометрического детектирования [100]. Основными недостатками данной методики являются плохо подобранные параметры масс-спектрометрического детектирования и хроматографического разделения.

Регуляторным органам европейского союза (EDQM) также был опубликован ряд методик, рекомендованных к определению генотоксичных примесей нитрозаминов в ЛС валсартана,

лозартана и ирбесартана. Методики разрабатывались на базе официальной лаборатории контроля лекарственных средств (Official Medicines Control Laboratories - OMCLs).

Так, одной из опубликованных методик является определение НМБА методом ВЭЖХ-МС/МС на приборе (Sciex Qtrap). Приборы Sciex отличаются от классических масс-спектрометров строением источника (линейная ионная ловушка). Ее активация позволяет увеличить чувствительность и селективность анализа за счет высоких скоростей сканирования и возможности накапливать ионы в течение определенного времени. Опубликованная методика по условиям хроматографического разделения, составу подвижной фазы и другим параметрам анализа мало отличается от условий определения, описанных в методике ВЭЖХ-МС/МС FDA [94]. LOQ заявленной методики составляет 28,6 ppb, а LOD равен 8,6 ppb. Примечательно то, что для увеличения точности в этой методике используется дейтерированный внутренний стандарт НМБА-d3. К недостаткам методики можно отнести отсутствие данных об определении оставшихся основных нитрозаминов (НДМА, НДЕА, НЭИПА) [101].

В другой методике ВЭЖХ-МС/МС, опубликованной EDQM, описывается одновременное определение НДЕА и НДМА в фармацевтической субстанции валсартана, ирбесартана и лозартана. Методика также разработана на приборе Sciex Qtrap, оснащенный линейной ионной ловушкой. Для повышения точности методики используются дейтерированные внутренние стандарты НДМА-d6, НДЕА-d10. LOQ/LOD (НДМА) составили 75/58 ppb для фармацевтической субстанции и 103/75 ppb для лекарственного препарата соответственно. Высокая чувствительность методики в данном случае обосновывается использованием линейной ионной ловушки. К недостаткам метода относится отсутствие одновременного определения большего числа нитрозаминов (НДМА, НЭИПА) [102].

Помимо этого, на сайте EDQM также опубликовано две методики, основанные на методе ВЭЖХ-МС/МС (система квадруполей), сопряженном с химической ионизацией при атмосферном давлении. Первая методика способна количественно определять НДМА в лекарственных препаратах валсартана в диапазоне от 0,1 – 3,0 ppm. LOD=0,08 ppm. Вторая методика определяет НДМА и НДЕА как в фармацевтических субстанциях, так и в лекарственных препаратах сартанового ряда [103, 104].

Таблица 8. Чувствительность методики ВЭЖХ-МС/МС (EDQM)

	НДМА (LOQ/LOD) [ppm]		НДЕА (LOQ/LOD) [ppm]	
	Фарм. субстанция	Лекарственный препарат	Фарм. субстанция	Лекарственный препарат
Валсартан	0,05/0,1	0,05/0,1	0,02/0,04	0,02/0,04
Ирбесартан	0,05/0,1	0,1/0,2	0,02/0,04	0,04/0,08
Лозартан	0,05/0,1	0,1/0,2	0,02/0,04	0,04/0,08
Олмесартан	0,05/0,1	0,1/0,2	0,02/0,04	0,04/0,08
Кандесартан	0,05/0,1	0,1/0,2	0,02/0,04	0,04/0,08

Параметры хроматографического разделения (градиент) этих методик отличаются между собой. В методиках используются внутренние стандарты для улучшения их точности. К недостаткам методик можно отнести отсутствие селективного определения всех основных нитрозаминов.

Ключевым отличием между методиками EDQM и FDA являются разработанные методики селективного определения НДМА и НДЕА в фармацевтических субстанциях препаратов валсартана, лозартана и ирбесартана методом ВЭЖХ-УФ [105,106]. Детектирование проводится при длине волны 228 нм, являющейся неселективной. Заявленная чувствительность методики для различных фармацевтических субстанций незначительно отличается.

Таблица 9. Чувствительность методики ВЭЖХ-УФ

	НДМА (LOQ/LOD) [ppm]	НДЕА (LOQ/LOD) [ppm]
	Фарм. субстанция	Фарм. субстанция
Валсартан	0,04/0,02	0,08/0,04
Ирбесартан	0,04/0,02	0,10/0,05
Лозартан	0,05/0,025	0,09/0,04
Олмесартан	0,25/0,1	0,40/0,10
Кандесартан	0,25/0,1	0,50/0,10

К недостаткам методики также можно отнести плохо подобранный градиент подвижных фаз. Помимо этого, давно установленным фактом является более высокая чувствительность методик с использованием масс-спектрометрии и тандемной масс-спектрометрии, по сравнению с методиками ВЭЖХ-УФ.

Рассматривая методики EDQM, основанные на ГХ, следует отметить, что параметры анализа, описанные в методике ГХ-МС, опубликованной на сайте EDQM незначительно отличаются от параметров FDA. Заявленные чувствительности для НДМА LOQ/LOD = 0,10/0,01 ppm, а для НДЕА LOQ/LOD = 0,080/0,02 ppm соответственно. Методика основана на использовании парофазного пробоотборника (Headspace) [107]. К недостаткам методик EDQM относится невозможность одновременного определения всех нормируемых нитрозаминов.

На официальном сайте EDQM также опубликованы методики определения ГХ-МС (прямой ввод) и ГХ-МС/МС [108,109]. Методика ГХ-МС способна селективно определять НДМА и НДЕА в фармацевтических субстанциях и ЛП валсартана, лозартана и ирбесартана. Чувствительность методики сопоставима с чувствительностью аналогичной методики FDA. Отличием методик ГХ-МС/МС является отсутствие парофазного анализатора в методике EDQM. Заявленная чувствительность методики находится на уровне 15 ppb для каждого нитрозамина (НДМА, НДЕА, НЭИПА). Недостатками методик является невозможность одновременного определения нормируемых нитрозаминов (НДМА, НДЕА, НЭИПА, НМБА).

Таким образом, подавляющее большинство данных, опубликованных EDQM, посвящено селективному определению основных нитрозаминов с использованием новых и чувствительных методов, основанных на масс-спектрометрическом детектировании. Большинство методик EDQM отличается от разработанных FDA наличием в анализе внутреннего стандарта. Использование внутреннего стандарта для повышения точности методики, целесообразно при наличии сложной, многостадийной пробоподготовки (приводящей к потерям вещества). Поскольку стадии экстракции, выпаривания и др. влияющие на точность методики, отсутствуют, использование внутреннего стандарта является необоснованным. Методики определения нитрозаминов методом ВЭЖХ-УФ одновременно способны определять лишь два нитрозамина, характеризуются плохо подобранным градиентом подвижной фазы, занимают длительное время. Выбранная длина волны 228 нм, не является селективной, что снижает чувствительность анализа. Помимо этого, заявленная чувствительность на уровне методов с масс-спектрометрическим детектированием, кажется сомнительной.

В научной литературе также отсутствует единый подход к определению нитрозаминов в фармацевтических субстанциях. Так, существуют данные, описывающие разработанную методику определения НДМА и НДЕА в фармацевтических субстанциях валсартана методом ВЭЖХ-МС/МС с химической ионизацией при атмосферном давлении. Обоснованием выбора метода, являлась недостаточная чувствительность методик, основанных на ГХ-МС. Разработанная методика показала LOQ на уровне 0,00026 ppm для НДМА и 0,00013 ppm для НДЕА соответственно. В публикации также были представлены данные по контролю продуктов,

находящихся в обращении в странах ЕС. Из 152 препаратов был обнаружен 1 загрязненный, что в сумме с препаратами с загрязненной субстанцией является весьма красноречивыми показателями актуальности проблемы [110].

В другой публикации описывается разработка методики определения НДМА в валсартане методом ГХ-МС на приборе Agilent 7890A/5975С. Детектирование проводилось в режиме избранных ионов (Single ion mass – SIM). Помимо этого, для повышения точности методики использовался внутренний стандарт НДМА-d6. Чувствительность разработанной методики составила $LOQ = 0,005$ мкг/мл, а $LOD = 0,001$ мкг/мл соответственно [111]. Основными недостатками описанной методики является невозможность одновременного определения нормируемых нитрозаминов, необходимость использования дорогостоящего внутреннего стандарта НДМА-d6, а также чувствительность определения нитрозаминов на уровне их норматива.

Masada S. с соавт. была разработана методика быстрого и эффективного определения примеси НДМА в фармацевтической субстанции и ЛП валсартана. Разработанная методика основана на ВЭЖХ-УФ с использованием внутреннего стандарта (НДМА-d6) и обладает $LOQ = 0,0285$ мкг/мл и $LOD = 0,0085$ мкг/мл при длине волны 235 нм, также являющейся неселективной. Заявленная чувствительность коррелирует с чувствительностью EDQM в аналогичной методике и находится на уровне определения методами с использованием масс-спектрометрии [21]. Основным недостатком описанной методики является неселективная длина волны и плохая воспроизводимость.

Таким образом, в современной научной литературе представлены различные методы определения нитрозаминов в ЛС валсартана, лозартана и ирбесартана. Подавляющее большинство опубликованных данных описывают определение этих генотоксичных примесей методом ВЭЖХ с различными вариантами детектирования (преимущественно с масс-спектрометрическим детектором). Такой выбор метода обоснован тем, что в настоящий момент ВЭЖХ является наиболее распространенным, востребованным, быстрым и точным видом анализа. Помимо этого, основным способом детектирования, достигающим необходимой чувствительности, является масс-спектрометрия. Актуальной проблемой нынешнего контроля примесей нитрозаминов, является как разрозненность мнений о наиболее целесообразном методе их определения, так и отсутствие универсальных, чувствительных и селективных методик.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ

1. Генотоксичные примеси группы нитрозаминов являются высокотоксичными веществами, достоверно известно экспоненциальное увеличение вероятности индукции канцерогенеза (в результате нарушения структуры и репликации ДНК) при попадании нитрозаминов в организм в дозах больше 1 ppm. В ЛС валсартана, лозартана и ирбесартана, нитрозамины появляются в результате синтеза фармацевтической субстанции, предположительно на одной из последних стадий, в ходе деактивации/гашения азидата натрия. В настоящий момент установленный норматив содержания нитрозаминов в ЛС сартанов находится на уровне концентраций ppm.
2. Методы, способные к точному определению нитрозаминов в ЛС валсартана, лозартана и ирбесартана с необходимой чувствительностью преимущественно представлены масс-спектрометрическим способом детектирования с различными вариантами хроматографического разделения. Причем подавляющее большинство описанных в литературе методик основывалось на тандемной масс-спектрометрии. Данный вывод является обоснованием выбора методов, лежащих в основе разрабатываемых методик.
3. Наиболее перспективными методами анализа нитрозаминов в фармацевтических субстанциях и ЛП являются методы, основанные на жидкостной и газовой хроматографии с различными вариантами масс-спектрометрического детектирования.

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Реактивы, стандартные образцы и объекты исследования

В ходе исследования были использованы следующие реактивы:

- Ацетонитрил (HPLC-grade, Sigma-Aldrich, Cat. №439134 02.2023)
- Метанол (HPLC-grade, Sigma-Aldrich, Cat. №34885)
- Муравьиная кислота (Sigma-Aldrich, Cat. №695076 срок годности, 08.2020)
- Вода очищенная
- Формиат аммония (Supelco, Cat. №70221)
- 1-метил-2-пирролидинон (HPLC-grade, Sigma-Aldrich, Cat. №70458 срок годности: 31.03.2020)

Стандартные образцы исследуемых примесей нитрозаминов:

- N-нитрозодиметиламин (НДМА) Supelco, Cat. №48670;
- N-нитрозодиэтиламин (НДЕА) Sigma-Aldrich, Cat. №sc-212252;
- N-нитро-4-метил-аминобутановая кислота (НМБА) Sigma-Aldrich, Cat. №FN26379;
- N-нитроэтилизопропиламин (НЕИПА) Sigma-Aldrich, Cat. №1027167, 30.07.2023;

Фармацевтические субстанции:

- Валсартан (Sigma-Aldrich, Cat. №SML0142; $\geq 98\%$ (HPLC))
- Лозартан калия (Sigma-Aldrich, Cat. №61188; analytical standard);
- Ирбесартан (Sigma-Aldrich, Cat. №I2286; $\geq 98\%$ (HPLC))

Лекарственные препараты указаны в таблице 10.

Таблица 10. Закупленные лекарственные препараты валсартана, лозартана и ирбесартана, находящиеся в обращении в Российской Федерации

Торговое наименование	Международное непатентованное наименование	Держатель регистрационного удостоверения	Дозировка	Серия	Лекарственная форма	Срок годности	№ РУ
Вальсакор	Валсартан	АО "КРКА, д.д., Ново место"	160 мг	96580418	Таблетки, покрытые пленочной оболочкой	04.2023	ЛСР-004921/08
Диован	Валсартан	Новartis Фарма АГ	160 мг	BCD60	Таблетки, покрытые пленочной оболочкой	02.2021	П N013991/01
Валсартан-СЗ	Валсартан	Непубличное акционерное общество "Северная звезда" (НАО "Северная звезда")	80 мг	50817	Таблетки, покрытые пленочной оболочкой	08.2020	ЛП-004219
Валсартан	Валсартан	Акционерное общество "ВЕРТЕКС" (АО "ВЕРТЕКС")	160 мг	150819	Таблетки, покрытые пленочной оболочкой	07.2022	ЛП-004658
ВАЛСАРТАН	Валсартан	Общество с ограниченной ответственностью "ПРАНАФАРМ" (ООО "ПРАНАФАРМ")	80 мг	25016	Таблетки, покрытые пленочной оболочкой	10.2022	ЛП-004913
Валз	Валсартан	Актавис Групп ПТС ехф	80 мг	470717	Таблетки, покрытые пленочной оболочкой	11.2020	ЛСР-001773/09
Валаар	Валсартан	Акционерное общество "Фармацевтическое предприятие "Оболенское" (АО "ФП "Оболенское")	80 мг	180818	Таблетки, покрытые пленочной оболочкой	09.2021	ЛП-002423

Продолжение таблицы 10

Сартавель	Валсартан	Общество с ограниченной ответственностью "Атолл" (ООО "Атолл")	160 мг	050218	Капсулы	02.2021	ЛП-002327
Лозартан Канон	Лозартан	Закрытое акционерное общество "Канонфарма продакшн" (ЗАО "Канонфарма продакшн")	50 мг	0681019	Таблетки, покрытые пленочной оболочкой	10.2021	ЛП-002356
Лозартан	Лозартан	Общество с ограниченной ответственностью "Атолл" (ООО "Атолл")	50 мг	531019	Таблетки, покрытые пленочной оболочкой	10.2022	ЛП-002220
Лозартан	Лозартан	Общество с ограниченной ответственностью "ПРАНАФАРМ" (ООО "ПРАНАФАРМ")	100 мг	260819	Таблетки, покрытые пленочной оболочкой	09.2022	ЛП-003804
Презартан	Лозартан	Ипка Лабораториз Лимитед	50 мг	BON037015	Таблетки, покрытые пленочной оболочкой	07.2020	ЛП-001315
Вазотенз	Лозартан	Ксантис Фарма Лимитед	12.5 мг	506518	Таблетки, покрытые пленочной оболочкой	07.2021	ЛС-002340
Лозартан-тева	Лозартан	Тева Фармацевтическое предприятие	50 мг	330919	Таблетки, покрытые пленочной оболочкой	09.2022	ЛП-000090

Продолжение таблицы 10

Лозап®	Лозартан	АО "Санофи Россия"	50 мг	2540919	Таблетки, покрытые пленочной оболочкой	08.2021	П N015897/01
Лозарел	Лозартан	Сандоз д.д.	50 мг	HF1293	Таблетки, покрытые пленочной оболочкой	04.2020	16ЛСР- 006796/09
Козаар	Лозартан	Мерк Шарп и Доум Б.В.	100 мг	S028605	Таблетки, покрытые пленочной оболочкой	07.2022	ЛСР- 010617/08
Лориста	Лозартан	Общество с ограниченной ответственностью "КРКА-РУС" (ООО "КРКА-РУС")	50 мг	28260919	Таблетки, покрытые пленочной оболочкой	09.2024	ЛСР- 003722/07
Ирбесартан	Ирбесартан	Общество с ограниченной ответственностью "Атолл" (ООО "Атолл")	150 мг	050519	Таблетки, покрытые пленочной оболочкой	05.2022	ЛП-003987
Апровель	Ирбесартан	Санофи Клир ЭсЭнСи	300 мг	7A642	Таблетки, покрытые пленочной оболочкой	07.2020	ЛП-001260

2.2. Оборудование

Для хроматографического разделения и МС-детектирования использовали:

- Газовый хроматограф Agilent 7890А (детектор MSD 5975С)
- Газовый хроматограф Agilent 7890В (детектор MSD 7010 Triple Quad)
- Установка для отбора паровой фазы Agilent Headspace 7694Е
- Высокоэффективный жидкостной хроматограф Agilent 1260 Infinity II (детектор MSD 6460 Triple Quad)
- Высокоэффективный жидкостной хроматограф Agilent 1260 Infinity II (детектор Sciex 6500 QTRAP)

В качестве вспомогательного оборудования использовались:

- Фильтры нитроцеллюлозные 0,45 мкм Merck (Millipore)
- Система водоподготовки Mili-Q
- Хроматографическая колонка Agilent HP-InnoWAX 30м, 0.32 мм, 0.5мкм
- Хроматографическая колонка Poroshell 120 EC-C18, 3.0x50 мм, 2.7 мкм
- Центрифуга Eppendorf 5810R (14000 об/мин)
- Встряхиватель типа “вортекс” V-1 plus (500-3000 об/мин)
- Весы аналитические Mettler Toledo Analytical Balance ME104/A, №30042957
- Дозатор переменного объема Eppendorf Reference 2: 1 – 1000 мкл (Кат. №4920000083)
- Дозатор переменного объема Eppendorf Reference 2: 10 – 100 мкл (Кат. №4920000059)
- Дозатор переменного объема Eppendorf Reference 2: 2 – 20 мкл (Кат. №4920000032)
- Дозатор переменного объема Eppendorf Reference 2: 20 – 200 мкл (Кат. №4910000093)
- Мерная посуда (класс точности 1й)
- Мерная посуда (класс точности 2й)

2.3. Приготовление стандартных и испытуемых растворов

2.3.1. Приготовление стандартных растворов

Растворитель: метанол.

Исходный раствор стандартного образца НДМА: 10 мг стандартного образца НДМА (точная навеска) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят до метки растворителем, тщательно перемешивают в течение 1 мин (концентрация НДМА: 100 мкг/мл).

Исходный раствор стандартного образца НДЕА: 10 мг стандартного образца НДЕА (точная навеска) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят до метки растворителем, тщательно перемешивают в течение 1 мин (концентрация НДЕА: 100 мкг/мл).

Исходный раствор стандартного образца НМБА: 10 мг стандартного образца НМБА (точная навеска) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят до метки растворителем, тщательно перемешивают в течение 1 мин (концентрация НДМА: 100 мкг/мл).

Исходный раствор стандартного образца НЭИПА: 10 мг стандартного образца НЭИПА (точная навеска) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят до метки растворителем, тщательно перемешивают (концентрация НДМА: 100 мкг/мл).

Приготовление исходного стандартного раствора ГХ (примесей НДМА и НДЕА). В мерную колбу вместимостью 100 мл добавляют около 10 мл растворителя. Добавляют по 1 мл исходного раствора стандартного образца примеси НДМА и НДЕА. Встряхивают с использованием вортекса в течение 1 мин. Доводят до метки растворителем и тщательно перемешивают в течение 1 мин. (концентрация НДМА: 1 мкг/мл, концентрация НДЕА: 1 мкг/мл).

Приготовление исходного стандартного раствора ВЭЖХ (примесей НДМА, НДЕА, НМБА, НЭИПА). В мерную колбу вместимостью 100 мл добавляют около 10 мл растворителя. Добавляют по 1 мл исходного раствора стандартного образца каждой примеси. Встряхивают с использованием вортекса в течение 1 мин. Доводят до метки растворителем и тщательно перемешивают в течение 1 мин. (концентрация НДМА: 1 мкг/мл, концентрация НДЕА: 1 мкг/мл, концентрация НМБА: 1 мкг/мл, концентрация НЭИПА: 1 мкг/мл).

Таблица 11. Приготовление стандартных растворов примесей

Названия раствора	Объем колбы (мл)	Объем аликвоты исходного стандартного раствора ВЭЖХ (мкл)	Объем аликвоты исходного стандартного раствора ГХ (мкл)	Полученная концентрация (нг/мл)
Стандартный раствор 1	10	1000	1000	100
Стандартный раствор 2	10	1200	1200	120
Стандартный раствор 3	10	1500	1500	150
Стандартный раствор 4	10	2000	2000	200
Стандартный раствор 5	10	3000	3000	300
Стандартный раствор 6	10	4000	4000	400
Стандартный раствор 7	10	5000	5000	500
Стандартный раствор 8	10	6000	6000	600
Стандартный раствор 9	10	7000	7000	700
Стандартный раствор 10	10	8000	8000	800
Стандартный раствор 11	10	9000	9000	900
Стандартный раствор 12	10	100	100	10
Стандартный раствор 13	10	125	125	12,5
Стандартный раствор 14	10	150	150	15
Стандартный раствор 15	10	200	200	20
Стандартный раствор 16	10	250	250	25
Стандартный раствор 17	10	300	300	30
Стандартный раствор 18	10	400	400	40
Стандартный раствор 19	10	500	500	50
Стандартный раствор 20	10	600	600	60
Стандартный раствор 21	10	700	700	70

Продолжение таблицы 11

Стандартный раствор 22	10	800	800	80
Стандартный раствор 23	10	900	900	90
Стандартный раствор 24	100	100	100	1
Стандартный раствор 25	100	150	150	1,5
Стандартный раствор 26	100	200	200	2
Стандартный раствор 27	100	250	250	2,5
Стандартный раствор 28	100	300	300	3
Стандартный раствор 29	100	400	400	4
Стандартный раствор 30	100	500	500	5
Стандартный раствор 31	100	600	600	6
Стандартный раствор 32	100	700	700	7
Стандартный раствор 33	100	750	750	7,5
Стандартный раствор 34	100	800	800	8
Стандартный раствор 35	100	900	900	9

Приготовление стандартного калибровочного раствора. В мерную колбу вместимостью 100 мл вносят около 10 мл растворителя. Добавляют по 200 мкл исходных растворов каждой примеси. Встряхивают с использованием вортекса в течение 1 мин. Доводят до метки растворителем и тщательно перемешивают в течение 1 мин. (концентрация НДМА: 0,2 мкг/мл, концентрация НДЕА: 0,2 мкг/мл, концентрация НМБА: 0,2 мкг/мл, концентрация НЭИПА: 0,2 мкг/мл). Приготовление калибровочных растворов указано в таблице 12.

Таблица 12. Приготовление калибровочных растворов

Названия раствора	Объем мерной колбы (мл)	Объем аликвоты стандартного калибровочного раствора (мкл)	Полученная концентрация (нг/мл)
Калибровочный раствор 1	100	100	0,2
Калибровочный раствор 2	100	200	0,4
Калибровочный раствор 3	100	300	0,6
Калибровочный раствор 4	100	400	0,8
Калибровочный раствор 5	100	450	0,9
Калибровочный раствор 6	100	550	1,1

2.3.2. Приготовление испытуемых растворов

2.3.2.1. Приготовление растворов холостых проб

320 мг фармацевтической субстанции валсартана (точная навеска) помещают в центрифужную пробирку. Прибавляют 5 мл метанола. Тщательно перемешивают на вортексе в течение 1 мин и растворяют полученную смесь в ультразвуковой бане в течение 5 мин. Добавляют 5 мл метанола и снова перемешивают в течение 2 мин. Обрабатывают ультразвуком в течение 5 мин. Центрифугируют в течение 7 минут при 3000 об/мин. Супернатант в объеме 2 мл фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм (концентрация валсартана около 32 мг/мл).

100 мг фармацевтической субстанции лозартана калия (точная навеска) помещают в центрифужную пробирку. Прибавляют 5 мл метанола. Тщательно перемешивают на вортексе в течение 1 мин и растворяют полученную смесь в ультразвуковой бане в течение 5 мин. Добавляют 5 мл метанола и снова перемешивают в течение 2 мин. Обрабатывают ультразвуком в течение 5 мин. Центрифугируют в течение 7 минут при 3000 об/мин. Супернатант в объеме 2 мл фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм (концентрация лозартана калия около 10 мг/мл).

300 мг фармацевтической субстанции ирбесартана (точная навеска) помещают в центрифужную пробирку. Прибавляют 5 мл метанола. Тщательно перемешивают на

вortexe в течение 1 мин и растворяют полученную смесь в ультразвуковой бане в течение 5 мин. Добавляют 5 мл метанола и снова перемешивают в течение 2 мин. Обрабатывают ультразвуком в течение 5 мин. Центрифугируют в течение 7 минут при 3000 об/мин. Супернатант в объеме 2 мл фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм (концентрация ирбесартана около 30 мг/мл).

2.3.2.2. Приготовление модельных растворов

Точка линейности №1 (ВЭЖХ-МС/МС)

Навеску фармацевтической субстанции или таблеток, эквивалентную максимальному суточному потреблению ЛПТ таблице 3. (точная навеска) помещают в центрифужную пробирку. Прибавляют 5 мл калибровочного раствора №1. Тщательно перемешивают на vortexe в течение 1 мин и растворяют полученную смесь в ультразвуковой бане в течение 5 мин. Добавляют 5 мл калибровочного раствора №1 и снова перемешивают в течение 2 мин. Обрабатывают ультразвуком в течение 5 мин. Центрифугируют в течение 7 минут при 3000 об/мин. Супернатант в объеме 2 мл фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм (концентрация валсартана около 32 мг/мл, концентрация лозартана около 10 мг/мл, концентрация ирбесартана 30 мг/мл, концентрация примесей 0,4 нг/мл). Проба готовится в трех параллелях для каждой фармацевтической субстанции и каждого ЛПТ.

Точка линейности №2 (ВЭЖХ-МС/МС)

Навеску фармацевтической субстанции или таблеток, эквивалентную максимальному суточному потреблению ЛПТ таблице 3. (точная навеска) помещают в центрифужную пробирку. Прибавляют 5 мл калибровочного раствора №2. Тщательно перемешивают на vortexe в течение 1 мин и растворяют полученную смесь в ультразвуковой бане в течение 5 мин. Добавляют 5 мл калибровочного раствора №2 и снова перемешивают в течение 2 мин. Обрабатывают ультразвуком в течение 5 мин. Центрифугируют в течение 7 минут при 3000 об/мин. Супернатант в объеме 2 мл фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм (концентрация валсартана около 32 мг/мл, концентрация лозартана около 10 мг/мл, концентрация ирбесартана около 30 мг/мл, концентрация примесей 0,6 нг/мл). Проба готовится в трех параллелях для каждой фармацевтической субстанции и каждого ЛПТ.

Точка линейности №3 (ВЭЖХ-МС/МС)

Навеску фармацевтической субстанции или таблеток, эквивалентную максимальному суточному потреблению ЛП таблице 3. (точная навеска) помещают в центрифужную пробирку. Прибавляют 5 мл калибровочного раствора №3. Тщательно перемешивают на вортексе в течение 1 мин и растворяют полученную смесь в ультразвуковой бане в течение 5 мин. Добавляют 5 мл калибровочного раствора №3 и снова перемешивают в течение 2 мин. Обрабатывают ультразвуком в течение 5 мин. Центрифугируют в течение 7 минут при 3000 об/мин. Супернатант в объеме 2 мл фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм (концентрация валсартана около 32 мг/мл, концентрация лозартана около 10 мг/мл, концентрация ирбесартана около 30 мг/мл, концентрация примесей 0,8 нг/мл). Проба готовится в трех параллелях для каждой фармацевтической субстанции и каждого ЛП.

Точка линейности №4 (ВЭЖХ-МС/МС)

Навеску фармацевтической субстанции или таблеток, эквивалентную максимальному суточному потреблению ЛП таблице 3. (точная навеска) помещают в центрифужную пробирку. Прибавляют 5 мл калибровочного раствора №4. Тщательно перемешивают на вортексе в течение 1 мин и растворяют полученную смесь в ультразвуковой бане в течение 5 мин. Добавляют 5 мл калибровочного раствора №4 и снова перемешивают в течение 2 мин. Обрабатывают ультразвуком в течение 5 мин. Центрифугируют в течение 7 минут при 3000 об/мин. Супернатант в объеме 2 мл фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм (концентрация валсартана около 32 мг/мл, концентрация лозартана около 10 мг/мл, концентрация ирбесартана около 30 мг/мл, концентрация примесей 0,9 нг/мл). Проба готовится в трех параллелях для каждой фармацевтической субстанции и каждого ЛП.

Точка линейности №5 (ВЭЖХ-МС/МС)

Навеску фармацевтической субстанции или таблеток, эквивалентную максимальному суточному потреблению ЛП таблице 3. (точная навеска) помещают в центрифужную пробирку. Прибавляют 5 мл калибровочного раствора №5. Тщательно перемешивают на вортексе в течение 1 мин и растворяют полученную смесь в ультразвуковой бане в течение 5 мин. Добавляют 5 мл калибровочного раствора №5 и снова перемешивают в течение 2 мин. Обрабатывают ультразвуком в течение 5 мин. Центрифугируют в течение 7 минут при 3000 об/мин. Супернатант в объеме 2 мл

фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм (концентрация валсартана около 32 мг/мл, концентрация лозартана около 10 мг/мл, концентрация ирбесартана около 30 мг/мл, концентрация примесей 1,1 нг/мл). Проба готовится в трех параллелях для каждой фармацевтической субстанции и каждого ЛП.

Точка линейности №1 (ГХ-МС/МС)

Навеску фармацевтической субстанции или таблеток, эквивалентную максимальному суточному потреблению ЛП таблице 3. (точная навеска) помещают в центрифужную пробирку. Прибавляют 5 мл стандартного раствора 30. Тщательно перемешивают на вортексе в течение 1 мин и растворяют полученную смесь в ультразвуковой бане в течение 5 мин. Добавляют 5 мл стандартного раствора 30 и снова перемешивают в течение 2 мин. Обрабатывают ультразвуком в течение 5 мин. Центрифугируют в течение 7 минут при 3000 об/мин. Супернатант в объеме 2 мл фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм (концентрация валсартана около 32 мг/мл, концентрация лозартана около 10 мг/мл, концентрация ирбесартана около 30 мг/мл, концентрация примесей 5 нг/мл). Проба готовится в трех параллелях для каждой фармацевтической субстанции и каждого ЛП.

Точка линейности №2 (ГХ-МС/МС)

Навеску фармацевтической субстанции или таблеток, эквивалентную максимальному суточному потреблению ЛП таблице 3. (точная навеска) помещают в центрифужную пробирку. Прибавляют 5 мл стандартного раствора 33. Тщательно перемешивают на вортексе в течение 1 мин и растворяют полученную смесь в ультразвуковой бане в течение 5 мин. Добавляют 5 мл стандартного раствора 33 и снова перемешивают в течение 2 мин. Обрабатывают ультразвуком в течение 5 мин. Центрифугируют в течение 7 минут при 3000 об/мин. Супернатант в объеме 2 мл фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм (концентрация валсартана около 32 мг/мл, концентрация лозартана около 10 мг/мл, концентрация ирбесартана 30 мг/мл, концентрация примесей 7,5 нг/мл). Проба готовится в трех параллелях для каждой фармацевтической субстанции и каждого ЛП.

Точка линейности №3 (ГХ-МС/МС)

Навеску фармацевтической субстанции или таблеток, эквивалентную максимальному суточному потреблению ЛП таблице 3. (точная навеска) помещают в центрифужную пробирку. Прибавляют 5 мл стандартного раствора 12. Полученную смесь

тщательно перемешивают с использованием вортекса в течение 1 мин и погружают в ультразвуковую баню до полного растворения на 5 мин. Добавляют 5 мл стандартного раствора 12 и снова перемешивают в течение 2 мин. Обрабатывают ультразвуком в течение 5 мин. Центрифугируют в течение 7 минут при 3000 об/мин. Супернатант в объеме 2 мл фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм (концентрация валсартана около 32 мг/мл, концентрация лозартана около 10 мг/мл, концентрация ирбесартана около 30 мг/мл, концентрация примесей 10 нг/мл). Проба готовится в трех параллелях для каждой фармацевтической субстанции и каждого ЛП.

Точка линейности №4 (ГХ-МС/МС)

Навеску фармацевтической субстанции или таблеток, эквивалентную максимальному суточному потреблению ЛП таблице 3. (точная навеска) помещают в центрифужную пробирку. Прибавляют 5 мл стандартного раствора 13. Тщательно перемешивают на вортексе в течение 1 мин и растворяют полученную смесь в ультразвуковой бане в течение 5 мин. Добавляют 5 мл стандартного раствора 13 и снова перемешивают в течение 2 мин. Обрабатывают ультразвуком в течение 5 мин. Центрифугируют в течение 7 минут при 3000 об/мин. Супернатант в объеме 2 мл фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм (концентрация валсартана около 32 мг/мл, концентрация лозартана 10 мг/мл, концентрация ирбесартана 30 мг/мл, концентрация примесей 12,5 нг/мл). Проба готовится в трех параллелях для каждой фармацевтической субстанции и каждого ЛП.

Точка линейности №5 (ГХ-МС/МС)

Навеску фармацевтической субстанции или таблеток, эквивалентную максимальному суточному потреблению ЛП таблице 3. (точная навеска) помещают в центрифужную пробирку. Прибавляют 5 мл стандартного раствора 16. Полученную смесь тщательно перемешивают с использованием вортекса в течение 1 мин и погружают в ультразвуковую баню до полного растворения на 5 мин. Добавляют 5 мл стандартного раствора 16 и снова перемешивают в течение 2 мин. Обрабатывают ультразвуком в течение 5 мин. Центрифугируют в течение 7 минут при 3000 об/мин. Супернатант в объеме 2 мл фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм (концентрация валсартана около 32 мг/мл, концентрация лозартана около 10 мг/мл, концентрация ирбесартана около 30 мг/мл, концентрация примесей 25 нг/мл). Проба готовится в трех параллелях для каждой фармацевтической субстанции и каждого ЛП.

Испытуемый раствор для определения предела обнаружения (LOD).

Навеску фармацевтической субстанции или таблеток, эквивалентную максимальному суточному потреблению ЛП таблице 3. (точная навеска) помещают в центрифужную пробирку. Прибавляют 5 мл стандартного раствора 27. Тщательно перемешивают на вортексе в течение 1 мин и растворяют полученную смесь в ультразвуковой бане в течение 5 мин. Добавляют 5 мл стандартного раствора 27 и снова перемешивают в течение 2 мин. Обрабатывают ультразвуком в течение 5 мин. Центрифугируют в течение 7 минут при 3000 об/мин. Супернатант в объеме 2 мл фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм (концентрация валсартана около 32 мг/мл, концентрация лозартана около 10 мг/мл, концентрация ирбесартана около 30 мг/мл, концентрация примесей 2,5 нг/мл). Проба готовится в трех параллелях для каждой фармацевтической субстанции и каждого ЛП.

2.4. Аналитические методики

2.4.1. Исходные аналитические методики

2.4.1.1. Методика ГХ-МС (прямой ввод)

Определение примесей НДМА, НДЕА методом ГХ-МС (прямой ввод) проводили в соответствии с указаниями FDA [90]. Колонка – Agilent HP-InnoWAX 30m, 0.32 mm, 0.5 мкм. Параметры анализа указаны в таблице 13.

Таблица 13. Параметры проведения анализа ГХ-МС (прямой ввод)

Параметры температурного градиента			
Шаг	Температура (°C)	Скорость (°C/мин)	Время (мин)
1	45	-	0-1
2	180	15	1-10
3	230	20	10-13,5
Другие параметры проведения анализа			
Температура инжектора			200 °C
Температура вспомогательного элемента			280 °C
Температура источника ионов			230 °C
Температура квадруполя			150 °C
Скорость потока			1,5 мл/мин
Режим работы масс-спектрометра			SIM
Выбранные характеристичные ионы			НДМА – 74 m/z НДЕА – 102 m/z
Деление потока			5:1
Объем инъекции			1,0 мкл

2.4.1.2. Методика ГХ-МС (Headspace)

Определение примесей НДМА, НДЕА методом ГХ-МС (Headspace) проводили в соответствии с указаниями FDA [91]. Колонка – Agilent DB-1701, 30м, 025мм, 1мкм. Параметры анализа ГХ-МС (Headspace) указаны в таблице 14.

Приготовление стандартных и испытуемых растворов проводилось в виалах для парофазного анализатора объемом 20 мл в соответствии с указаниями FDA [91].

Растворитель: 1-метил-2-пирролидинон.

Таблица 14. Параметры проведения анализа ГХ-МС (Headspace)

Параметры температурного градиента			
Шаг	Температура (°C)	Скорость (°C/мин)	Время (мин)
1	40		0 – 0,5
2	160	20	0,5 – 6,5
3	240	10	6,5 – 14,5
4	240		14,5 – 16,5
Другие параметры проведения анализа			
Температура вспомогательного элемента			280 °C
Температура источника ионов			230 °C
Температура квадруполя			150 °C
Скорость потока			1 мл/мин
Режим работы масс-спектрометра			SIM
Выбранные характеристичные ионы			НДМА – 74 m/z НДЕА – 102 m/z
Деление потока			5:1
Задержка растворителя			6 мин
Параметры парофазного анализатора Headspace			
Температура сушильной камеры			130 °C
Температура петли			180 °C
Температура линии переноса			185 °C
Время уравнивания флакона			15 минут
Время отбора пробы			1 минута
Размер флакона			20 мл
Встряхивание флакона			Уровень 5 (71 встряхивание/мин)
Давление заполнения			15 psi
Размер петли			1 мл
Газ носитель			гелий
Объем инъекции			1,0 мкл

2.4.2. Разработанные аналитические методики

2.4.2.1. Методика ГХ-МС/МС (прямой ввод)

Определение примесей НДМА, НДЕА методом ГХ-МС/МС проводили на приборе Agilent 7890В (детектор MSD 7010В Triple Quad) – MRM детекция. Колонка – Agilent HP-InnoWAX 30м, 0.32 мм, 0.5 мкм. Параметры анализа ГХ-МС/МС указаны в таблице 15.

Пробоподготовка стандартных и испытуемых растворов проводилась в соответствии с главой 2.3.

Таблица 15. Параметры анализа ГХ-МС/МС (прямой ввод)

Параметры температурного градиента			
Шаг	Температура (°С)	Скорость (°С/мин)	Время (мин)
1	40		0 – 0.5
2	200	40	0.5 – 4.5
3	250	50	4.5 – 5.0
4	250		5.0 – 6.0
Другие параметры проведения анализа			
Температура вспомогательного элемента			280 °С
Температура источника ионов			250 °С
Температура квадруполя 1			150 °С
Температура квадруполя 2			150 °С
Поток газа в ячейке соударений			1.5 мл/мин
Скорость потока газа носителя			1 мл/мин
Деление потока			10:1
Режим работы масс-спектрометра			MRM
Характеристичные MRM переходы НДМА			74 → 44 CE = 15 V 74 → 42 CE = 20 V
Характеристичные MRM переходы НДЕА			102 → 85 CE = 10 V 102 → 56 CE = 20 V
Временной интервал НДМА			3.3 – 3.7 мин
Временной интервал НДЕА			3.9 – 4.2 мин

2.4.2.2. Методика ВЭЖХ-МС/МС

Определение примесей НДМА, НДЕА, НМБА, НЭИПА проводили с использованием высокоэффективного жидкостного хроматографа Agilent Infinity II (MSD 6460 Triple Quad). Колонка – Agilent poroshell 120 EC-C18, 50 мм, 3.0 мм, 2.7 мкм. Условия проведения анализа указаны в таблице 16.

Пробоподготовка стандартных и испытуемых растворов проводилась в соответствии с главой 2.3.

Таблица 16. Условия проведения анализа ВЭЖХ-МС/МС

Параметры хроматографического разделения		
Время, мин	Элюент А, %	Элюент В, %
0	95	5
0.5	95	5
1	50	50
1.5	5	95
5	5	95
Другие параметры проведения анализа		
Температура колонки		50 °С
Скорость потока		0,4 мл/мин
Режим элюирования		Градиентный
Элюент А		0,1% муравьиной кислоты в воде + формиат аммония 10 мМ
Элюент Б		0,1% муравьиной кислоты в метаноле
Объем инъекции		8 мкл
Время анализа		5 мин
Время уравнивания системы		3,5 мин
Условия масс-спектрометрического детектирования		
Тип источника ионизации		APCI (химическая ионизация при атмосферном давлении)
Температура осушающего газа		350 °С
Температура источника		350 °С
Скорость потока газа		6 л/мин
Давление на небулайзере		40 psi
Напряжение на капилляре		4000 В
Ток коронного разряда		4 мкА
Временной интервал НДМА		0.986 – 1.556 мин
Временной интервал НДЕА		4.082 – 4.284 мин
Временной интервал НМБА		1.845 – 2.711 мин
Временной интервал НЭИПА		4.300 – 4.597 мин

Время выхода и характеристичные MRM переходы определяемых нитрозаминов указаны в таблице 17.

Таблица 17. Время выхода и характеристичные MRM переходы определяемых нитрозаминов

	Время удерживания	Материнский ион	Напряжение на фрагментаторе	Дочерний ион 1	EI	Дочерний ион 2	EI
НДМА	1,168	75.1	30	58.1	13	43.1	17
НМБА	2,190	147.1	55	117.1	8	44.2	12
НДЕА	4,156	103.1	75	75.1	9	29.1	13
НЭИПА	4,380	117.1	50	75.1	17	47.1	17

Глава 3. Результаты и обсуждение

Методики определения нитрозаминов в фармацевтических субстанциях и ЛП валсартана, лозартана и ирбесартана постоянно модифицируются и разрабатываются. Несмотря на это, на сегодняшний день отсутствует общепринятый подход к определению нитрозаминов. Поэтому, в рамках выполнения задачи по выбору наиболее оптимального и целесообразного метода определения нитрозаминов в лабораторном и рутинном анализе ЛС валсартана, лозартана и ирбесартана, нами были выборочно апробированы методики (основанные на хроматографическом разделении с масс-спектрометрическим детектированием).

Критериями отбора методик, подлежащих апробации, являлись результаты проведенного литературного обзора, а именно возможность дальнейшей разработки и адаптации универсальных (способных определять искомые вещества в фармацевтической субстанции и ЛП валсартана, лозартана и ирбесартана) методик определения нитрозаминов.

3.1. Методики с моноквадрольным масс-спектрометрическим детектированием

3.1.1. Методика ГХ-МС (прямой ввод)

Методика ГХ-МС (прямой ввод) отличается простотой воспроизведения (относительно всех апробированных методик). Обоснованием этого утверждения является отсутствие многостадийной пробоподготовки, использования таких вспомогательных элементов как парофазный пробоотборник (HS), а также необходимости использования тройного масс-спектрометрического детектирования для увеличения чувствительности методики.

Оценка методики ГХ-МС (прямой ввод) проводилась в несколько этапов. Поскольку параметры масс-спектрометрического детектирования могут отличаться в зависимости от используемого прибора, на первом этапе проводилось подтверждение описанных условий хроматографического разделения и оптимизация параметров масс-спектрометрического детектирования. Использовались инъекции (1 мкл) стандартного раствора с концентрацией примесей (НДМА, НДЕА) 1 мкг/мл. Для оптимизации параметров масс-спектрометрического детектирования раствор с вышеуказанной концентрацией анализировался в режиме SCAN (диапазон 40 – 600 а.е.м.). Полученные масс-спектры нитрозаминов представлены на рисунке 9. Ионы, обладающие наибольшей

интенсивностью, были использованы для дальнейшего анализа в режиме SIM и описаны в главе.

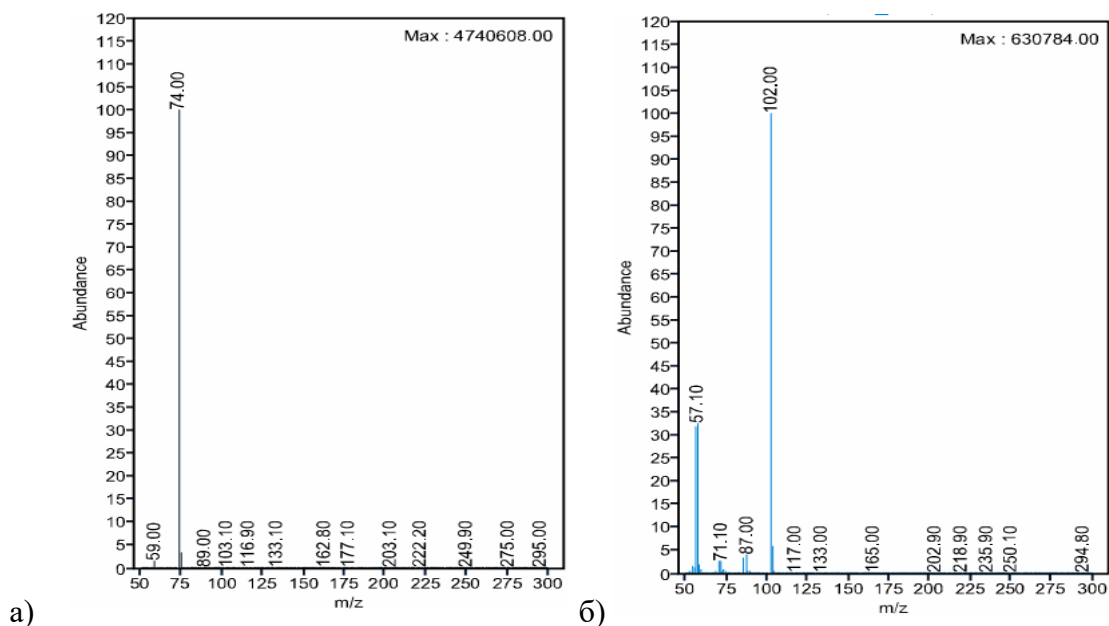


Рисунок 9. Масс-спектры исследуемых нитрозаминов. а – N-нитрозодиметиламин, б – N-нитрозодиэтиламин

Следующим этапом оценки являлось определение специфичности апробируемой методики с помощью анализа стандартных и испытуемых растворов на уровнях концентраций LOD и LOQ апробируемой методики. В месте выхода исследуемых нитрозаминов не зафиксировано наличие посторонних пиков (матрицы фармацевтической субстанции и др.). Фактор асимметрии пиков нитрозаминов приближен к 1, а разрешение более 1,5. Помимо этого, было установлено, что LOD данной методики при использовании параметров анализа, описанных в разделе 2.4.1., является 0,01 мкг/мл, а LOQ равен 0,03 мкг/мл (незначительно ниже норматива) для всех исследуемых нитрозаминов. При этом сигнал:шум при анализе раствора LOD равен 4, а LOQ сигнал шум ($S/N = 13$) Типичные хроматограммы модельных смесей с концентрацией нитрозаминов 0,03 мкг/мл представлены на рисунке 10.

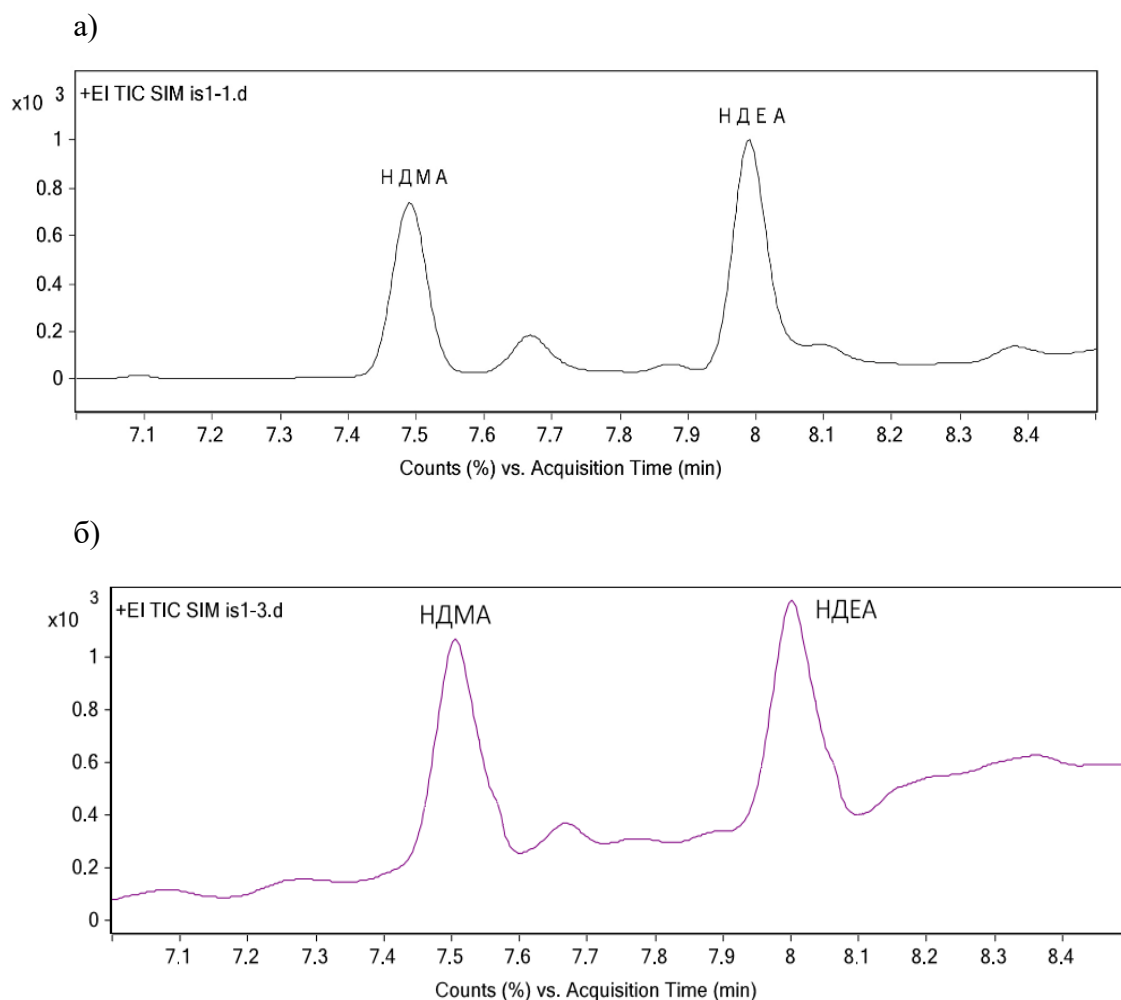


Рисунок 10. Типичные хроматограммы модельных смесей при использовании методики ГХ-МС (прямой ввод). а) Валсартан с добавлением примесей нитрозаминов с концентрацией 0,03 мкг/мл, б) Лозартан с добавлением примесей нитрозаминов с концентрацией 0,03 мкг/мл

После того как была установлена специфичность, чувствительность и способность методики определять нитрозамины в концентрациях, меньше ПДК в фармацевтических субстанциях, были проведены исследования по определению влияния матричного эффекта и расчету линейности.

В ходе проведенных исследований установлено, что высокая концентрация фармацевтической субстанции, содержащейся в холостых пробах и модельных смесях, мешает проведению анализа. Причиной этого являются физико-химические свойства исследуемых фармацевтических субстанций. Являясь тяжелолетучими соединениями, валсартан, лозартан и ирбесартан, в условиях анализа, описанных в разделе 2.4.1., оседают в инжекторе, на септе, лайнере, а также задерживаются в колонке. Визуально, это проявляется высокоинтенсивным пиком фармацевтической субстанции с приведенным временем удерживания 10,5 мин. Таким образом, высокая концентрация фармацевтической

субстанции влияет на проведение анализа. После нескольких инъекций проб, содержащих фармацевтическую субстанцию, становилось невозможным дальнейшее проведение эксперимента ввиду необходимости замены септы, лайнера, а также проведения процедуры очистки иглы инжектора. На рисунке 11 изображена типичная хроматограмма растворителя после проведения анализа испытуемого раствора и замены септы и лайнера. Тем не менее, на рисунке 10-11 видно, что матрица не влияет на определение искомых веществ, т.е. в месте выхода нитрозаминов отсутствуют пики посторонних веществ.

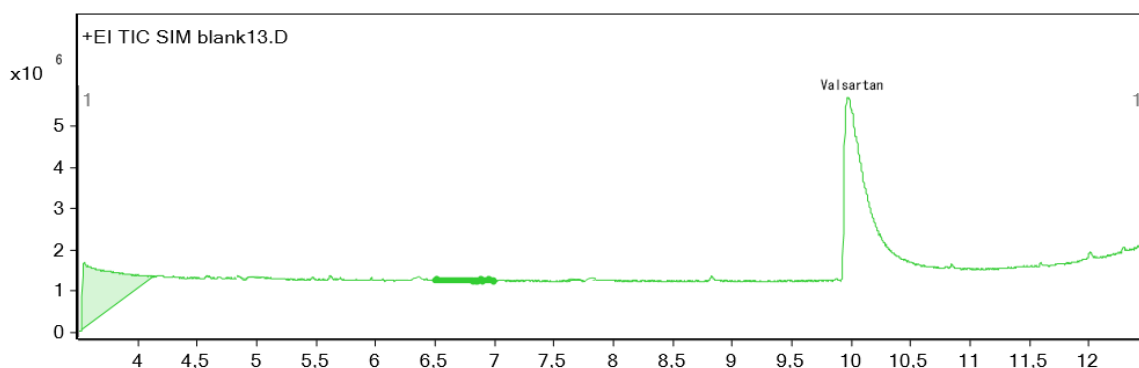


Рисунок 11. Типичная хроматограмма растворителя

Для определения аналитического диапазона, линейности методики и построения калибровочной кривой были выбраны растворы концентраций нитрозаминов 0,03 мкг/мл, 0,06 мкг/мл, 0,09 мкг/мл, 0,12 мкг/мл, 0,15 мкг/мл соответственно. Установление аналитического диапазона проводилось в соответствии с требованиями ГФ РФ [112]. Верхней точкой аналитического диапазона была выбрана концентрация (0,15 мкг мкг/мл), соответствующая максимально 120% от допустимой нормы содержания примеси нитрозаминов в ЛС валсартана, лозартана и ирбесартана. Нижняя точка аналитического диапазона методики установлена на уровне LOQ методики. Приготовление вышеуказанных точек линейности описано в главе 2.3. Построение калибровочной кривой проводилось при помощи обработки данных методом наименьших квадратов с использованием линейной модели. Линейность методики считали приемлемой, если значение $r^2 > 0,99$. Линейность методики изображена на рисунке 12. Полученные средние значения площадей пиков содержатся в таблице 18.

Таблица 18. Средние площади пиков, полученные при анализе образцов методом ГХ-МС

Наименование	Среднее значение площади пика N=3	Концентрация (мкг/мл)
НДМА	7998	0,03
	15647	0,06
	19378	0,09
	26784	0,12
	32758	0,15
НДЕА	7967	0,03
	14187	0,06
	18729	0,09
	27305	0,12
	33200	0,15

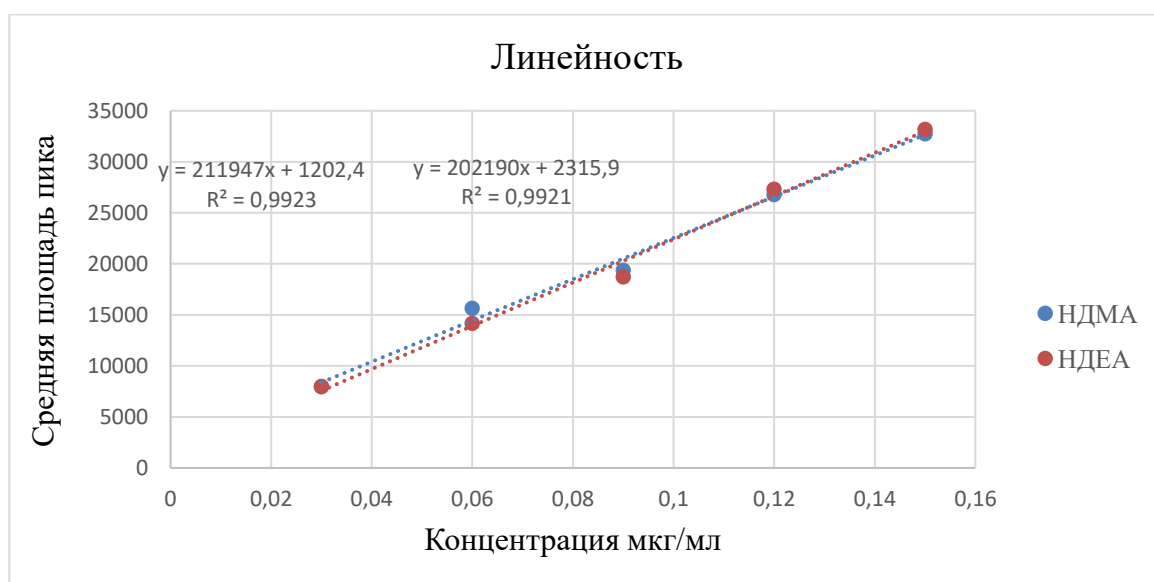


Рисунок 12. Линейность при определении нитрозаминов методом ГХ-МС.

Линейность методики была признана удовлетворительной, значение коэффициента корреляции $r^2 > 0,99$.

По итогу проведенных исследований, определение нитрозаминов в ЛС методом ГХ-МС было признано нецелесообразным. В основе этого утверждения лежит невозможность внедрения данного метода в рутинный анализ из-за необходимости постоянной приостановки анализа для проведения работ по очистке шприца, длительного прогрева колонки, а также замены септы и лайнера.

Оптимальным решением данной проблемы может служить использование парофазного пробоотборника. При проведении анализа методом (Headspace), в паровой

фазе преимущественно будут содержаться только летучие соединения, в то время как нелетучие сартаны будут оставаться в растворе.

3.1.2. Методика ГХ-МС (Headspace)

Для того, чтобы определить целесообразность использования методик, основанных на использовании парофазного пробоотборника, для определения генотоксичных примесей нитрозаминов в ЛС валсартана, лозартана и ирбесартана, нами была апробирована методика, представленная на сайте FDA [84].

Приготовление стандартных и испытуемых растворов проводилось согласно указаниям главы 2.3., а условия проведения анализа соответствовали методике FDA [84] и условиям, описанным в разделе 2.4.2.. В ходе эксперимента проводилось определение примесей (НДМА и НДЕА). Несмотря на то, что в методике FDA отсутствуют данные по определению примеси НДЕА, нами было принято решение о ее модификации путем определения примеси НДЕА для проведения наиболее точной сравнительной оценки.

Для того, чтобы избежать влияния парофазного анализатора на анализ, на первом этапе эксперимента проводилось проверка указанных параметров масс-спектрического детектирования и подтверждение условий хроматографического разделения на стандартном растворе примесей с концентрацией 1 мкг/мл, приготовление которого описано в разделе 2.3.1. Для повышения чувствительности, селективности и воспроизводимости методики, все дальнейшие исследования проводились в режиме SIM (наиболее интенсивные ионы были выбраны в качестве характеристичных). Выбранные характеристичные ионы совпадают с представленными на сайте FDA и описанными в разделе 3.1.1.

При оценке специфичности методики мы столкнулись с проблемой идентификации определяемых нитрозаминов. Методика, описанная на сайте FDA и основанная на использовании режима детектирования целевых ионов (SIM), являлась трудновоспроизводимой. Визуально на хроматограммах это отображалось наложением ионов друг на друга, крайне низкими интенсивностями и показателями S/N. Показатели сигнал шум и площади пиков изображены в таблице 18. На рисунке 13 приведена типичная хроматограмма раствора примесей нитрозаминов с концентрацией 1 мкг/мл.

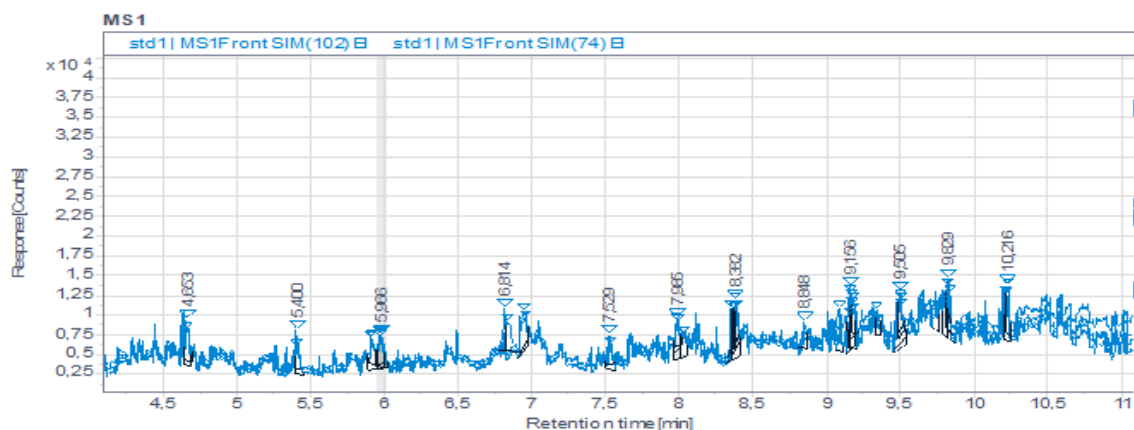


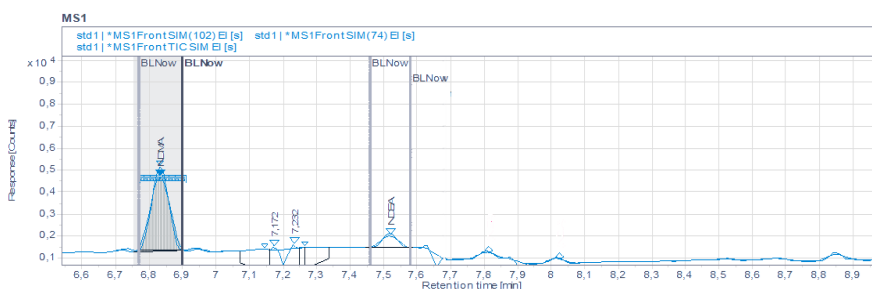
Рисунок 13. Типичная хроматограмма раствора примесей нитрозаминов с концентрацией 1 мкг/мл

Для решения данной проблемы (увеличения чувствительности и воспроизводимости методики), нами была предпринята попытка модернизации методики с использованием временных переходов/интервалов. При использовании временных переходов/интервалов, методика FDA соответствует заявленным показателям чувствительности и легко воспроизводится.

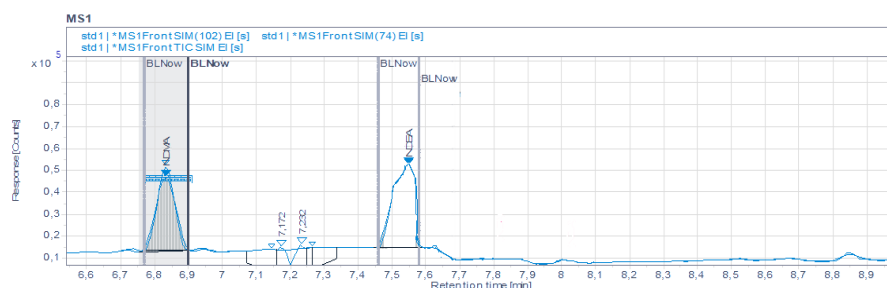
Специфичность методики оценивалась с помощью анализа модельных смесей и стандартных растворов. В месте выхода нитрозаминов отсутствуют пики посторонних соединений, фактор асимметрии пиков искомым веществ приближен к 1, а разрешение между пиками $R_s > 1,5$. На хроматограммах холостых и модельных смесей присутствует пик фармацевтической субстанции валсартана, однако оседания ее на септе, лайнере и в игле не происходит. Хроматографическая колонка очищается после одной инъекции растворителя в условиях описанной методики.

Стандартные растворы примесей нитрозаминов использовались для определения LOQ и LOD апробируемой методики. В ходе проведенных исследований было установлено, что LOD анализируемых соединений находится на уровне 0,025 мкг/мл, а LOQ равен 0,15 мкг/мл. Данные показатели значительно хуже, чем в апробированной методике ГХ-МС (прямой ввод), что весьма вероятно, связано с потерями искомым соединений в процессе перевода их в паровую фазу. На рисунке 14 изображены типичные хроматограммы калибровочных растворов с концентрациями 0,025 мкг/мл и 0,15 мкг/мл. Концентрация 0,15 мкг/мл соответствует содержанию 0,3 ppm в 500 мг фармацевтической субстанции, что свидетельствует о недостаточной чувствительности методики и предельном принципе ее работы. Это означает, что при понижении норматива (данные проведенных

токсикологических исследований), определение нитрозаминов в фармацевтической субстанции валсартана с использованием данной методики, будет невозможно.



а)



б)

Рисунок 14. Типичные хроматограммы стандартных растворов (ГХ-МС/МС)
а) концентрация НДМА и НДЕА 0,025 мкг/мл, б) концентрация НДМА и НДЕА 0,15 мкг/мл

Аналитический диапазон и линейность методики не анализировались, так как в данной методике нижняя точка аналитического диапазона соответствует пределу количественного определения методики (LOQ) и равняется 0,15 мкг/мл, что соответствует 0,3 ppm в 500 мг субстанции. После установления предела количественного определения на уровне нормы, дальнейшая исследования по апробации методики не проводились.

Таким образом, по итогу проведенных исследований дальнейшая проработка методики, основанной на парофазном анализе признана нецелесообразной. Работа на пределе чувствительности метода является серьезным недостатком. Обоснованием данного утверждения является невозможность определения необходимых количеств нитрозаминов при изменении норматива их содержания в ЛП валсартана, лозартана и ирбесартана. Помимо этого, анализ паровой фазы не позволяет полностью избавиться от пика фармацевтической субстанции.

3.1.3. Выводы о применении методик, основанных на моноквадрупольном масс-спектрометрическом детектировании, к определению нитрозаминов в лекарственных средствах валсартана, лозартана и ирбесартана

Проведенная оценка методик, основанных на одноквадрупольном масс-спектрометрическом детектировании, показала их недостаточную чувствительность. Так, для достижения нужной чувствительности методики ГХ-МС (прямой ввод) необходимо использовать большую массу навески, что негативно сказывается на проведении анализа. Основной проблемой такого анализа является его приостановка для очистки септы, лайнера и отмывки шприца. Методика ГХ-МС (Headspace) хоть и лишена этих недостатков, показывает гораздо худшие показатели чувствительности и селективности (рисунке 14). Так, чувствительность 0,15 мкг/мл при определении нитрозаминов в ЛП валсартана является предельной. Это означает невозможность применения данного методического подхода для анализа нитрозаминов в ЛС сартанов при изменении действующего (временного) норматива, размещенного на официальных сайтах FDA и EMA.

Одним из способов достижения необходимой чувствительности анализа нитрозаминов в ЛС является использование тандемной масс-спектрометрии. В настоящее время активно разрабатываются методики ГХ-МС/МС и ВЭЖХ-МС/МС. В подавляющем большинстве публикаций, описывающих определение нитрозаминов в ЛС сартанов, используются вышеуказанные методы.

В настоящее время, ведущими мировыми регуляторными органами (FDA, EMA) опубликованы различные методики определения нитрозаминов, основанные на тандемном масс-спектрометрическом детектировании. Согласно опубликованным данным, методики ГХ-МС/МС и ВЭЖХ-МС/МС демонстрируют гораздо более высокие показатели чувствительности, селективности, точности и воспроизводимости.

Основываясь на всем вышесказанном, нами было принято решение о разработке универсальных методик определения нитрозаминов в ЛС валсартана, лозартана и ирбесартана, основанных на тандемном масс-спектрометрическом детектировании.

4. Разработка и валидация методик определения нитрозаминов в лекарственных средствах валсартана, лозартана и ирбесартана методами тандемной масс-спектрометрии

4.1. Разработка методики ГХ-МС/МС.

Для достижения максимальной эффективности, а также в рамках общего подхода к разработке методик, были установлены следующие критерии приемлемости хроматографической системы.

Одним из основных параметров хроматографической системы, характеризующей ее эффективность, является число теоретических тарелок. Как известно, число теоретических тарелок зависит от множества параметров, среди которых принято выделять следующие: природа анализируемого вещества, объем инъекции, концентрация, колонка, температура, состав подвижной фазы/газа носителя. Таким образом, методика считалась достаточно эффективной при числе теоретических тарелок $n > 20000$ для каждого из определяемых веществ [112].

Другим важным параметром эффективности хроматографической системы является фактор асимметрии пика. Критерием приемлемости разрабатываемой методики являлся фактор асимметрии, максимально приближенный к 1, иначе говоря, лежащий в диапазоне от 0,8 – 1,2 [112].

Одним из основных критериев эффективности разрабатываемой методики является разрешение $R_s > 1,5$, описывающее способность хроматографической системы разделять пики искомых веществ. В случае неполного разделения искомых веществ к разрабатываемой методике применяется критерий приемлемости соотношения максимум/минимум [112].

Подбор условий температурного градиента и оптимизация параметров хроматографического разделения (температура инжектора, температура вспомогательного элемента и др.) проводились с использованием стандартного раствора примесей нитрозаминов (НДМА, НДЕА) с концентрацией 1 мкг/мл. На первоначальном этапе анализ проводился в режиме SCAN (40 – 500 а.е.м.). Масс-спектры исследуемых нитрозаминов представлены на рисунке 16.

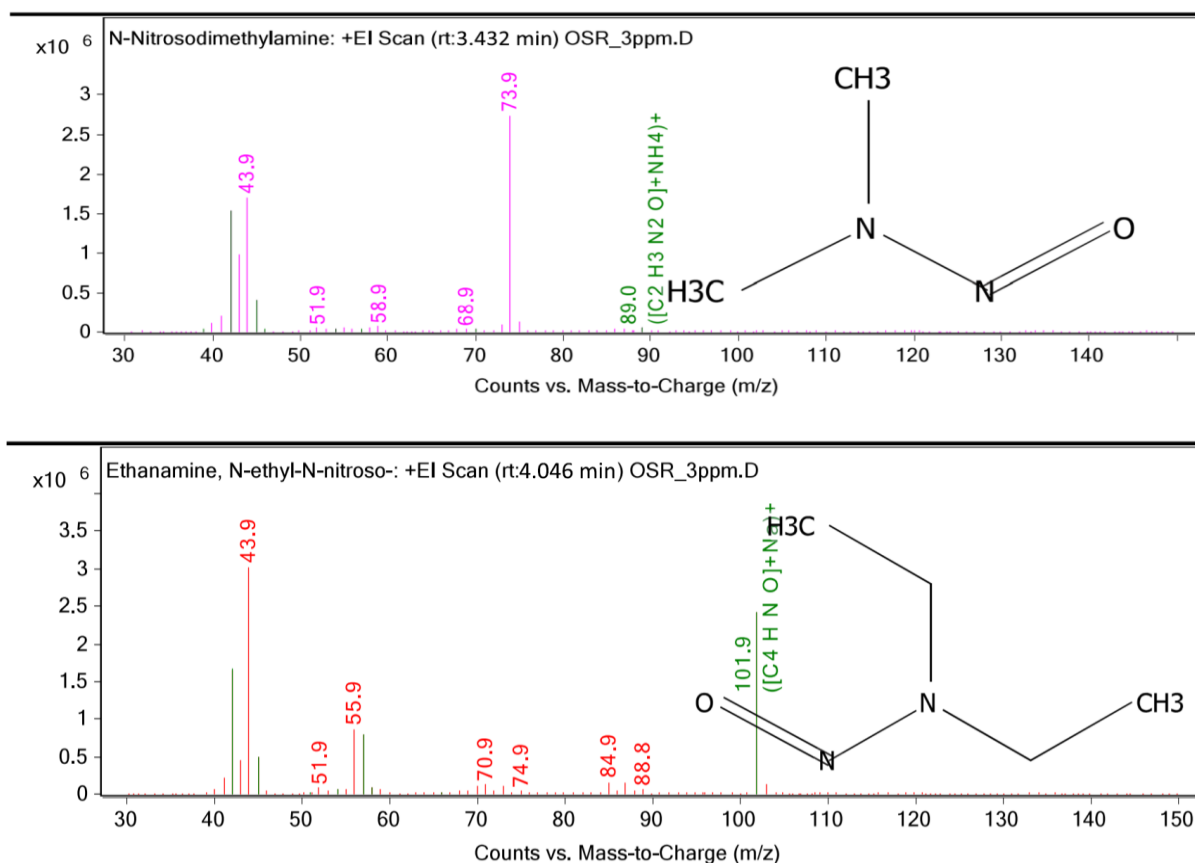


Рисунок 16. Масс-спектры исследуемых нитрозаминов (НДМА, НДЕА)

Отработка параметров температурного градиента, представленного в главе 2.4.2., проводилась с использованием стандартного раствора примесей нитрозаминов (НДМА, НДЕА) с концентрацией 1 мкг/мл. Растворы анализировали в режиме поиска дочерних ионов. В качестве родительских были выбраны наиболее интенсивные ионы, изображенные на рисунке 16. Поиск дочерних ионов проводился при значениях энергии ячейки соударений равных 10, 15, 20, 40, 50, 60, 70 eV. Поиск дочерних ионов на детекторе MS2 проводился в диапазоне от 40 – 200 а.е.м. MRM переходы, соответствующие пикам с наибольшими высотами и площадями, были выбраны в качестве характеристичных и описаны в разделе 2.5.1.

Чувствительность методики определялась на стандартных растворах (ГХ) с концентрациями 500 нг/мл, 200 нг/мл, 100 нг/мл, 50 нг/мл, 20 нг/мл, 10 нг/мл, 8 нг/мл, 6 нг/мл, 5 нг/мл, 4 нг/мл, 2,5 нг/мл, 2 нг/мл, 1 нг/мл. LOQ разработанной методики находился на уровне 5 нг/мл. На рисунке 17 изображена типичная хроматограмма стандартного раствора с концентрацией исследуемых нитрозаминов 5 нг/мл.

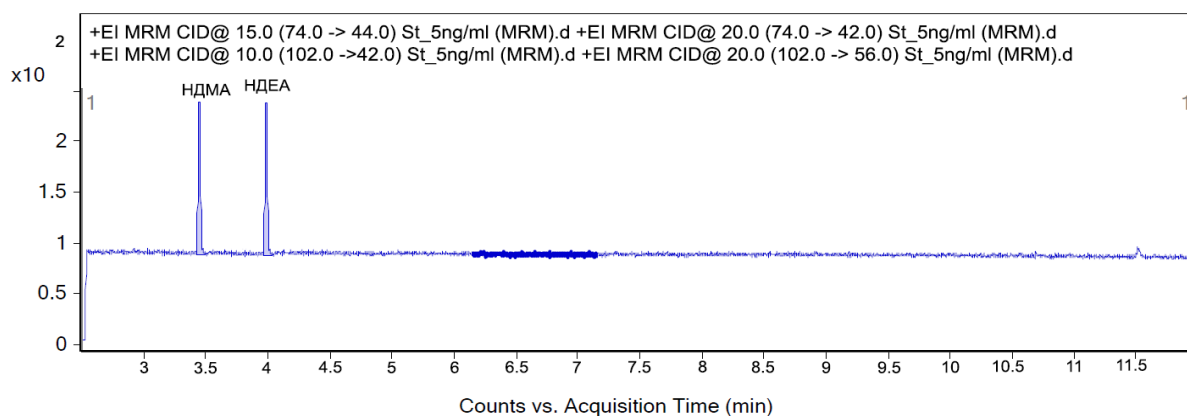


Рисунок 17. Типичная хроматограмма стандартного раствора примесей (ГХ) с концентрацией 5 нг/мл

Таким образом, в ходе проведения эксперимента было показано, что разработанная методика обладает всеми необходимыми свойствами для определения нитрозаминов в ЛС валсартана, лозартана и ирбесартана [113].

4.2. Валидация методики ГХ-МС/МС

4.2.1. Специфичность

Специфичность методики подтверждалась результатами анализа модельных смесей и стандартных растворов с концентрацией 100 нг/мл. HDMA и HDEA эффективно разделяются между собой. Фармацевтические субстанции/действующие вещества, вспомогательные вещества и растворитель не мешают определению нитрозаминов. Типичная хроматограмма стандартного раствора (ГХ) представлена на рисунке 18.

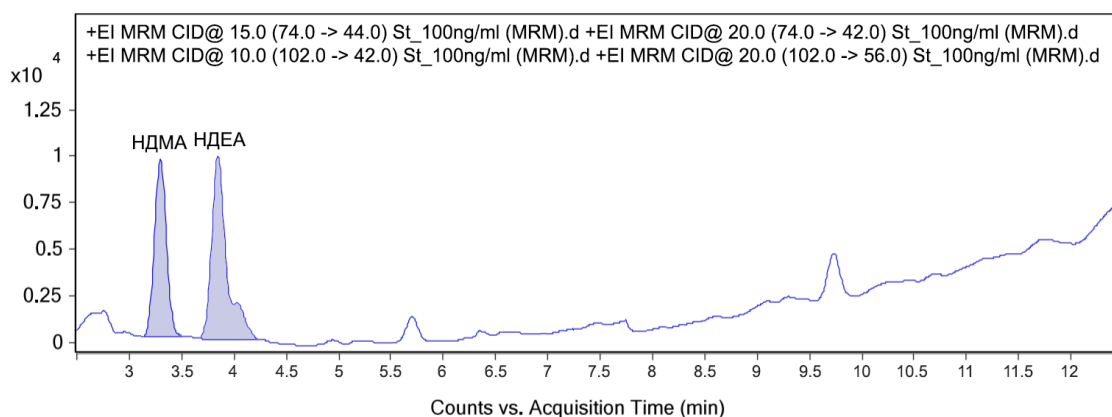


Рисунок 18. Типичная хроматограмма модельной смеси валсартана и стандартного раствора (ГХ) с концентрацией нитрозаминов 100 нг/мл

4.2.2. Предел количественного определения (LOQ)

После стабилизации хроматографической системы инжектировали 1 мкл растворителя (метанол). Процедура повторялась до получения ровной базовой линии и отсутствии флуктуаций. Инжектировали стандартные растворы с концентрациями нитрозаминов, указанными в главе 2.3. Определяли показатель сигнал:шум (S/N). Критерием приемлемости являлся $(S/N) = 10$. В зависимости от значения (S/N) использовали заранее приготовленные стандартные растворы до получения значения сигнал:шум $(S/N) = 10$ для каждого нитрозамина (НДМА, НДЕА). Измерения проводились в трех параллелях. Было установлено, что $S/N = 10$ на уровне концентраций 5 нг/мл. Приготовление растворов для определения LOQ описано в главе 2.4.3. Данные площадей пиков и параметра сигнал:шум представлены в таблице 19. Расчет значения предела количественного определения проводили с использованием следующей формулы:

$$LOQ = 10 * S/b$$

S – стандартное отклонение аналитического сигнала;

b – коэффициент чувствительности, представляющий собой отношение аналитического сигнала к определяемой величине.

Таблица 19. Данные площадей пиков и параметра сигнал:шум стандартного раствора с концентрацией 5 нг/мл

Наименование	Среднее значение площади пика в фармацевтических субстанциях N=3	Среднее значение площади пика в ЛП N=3	Предел количественного определения (нг/мл)
НДМА	487	502	4,76
	560	547	
	548	449	
НДЕА	491	502	4,8
	526	474	
	566	424	

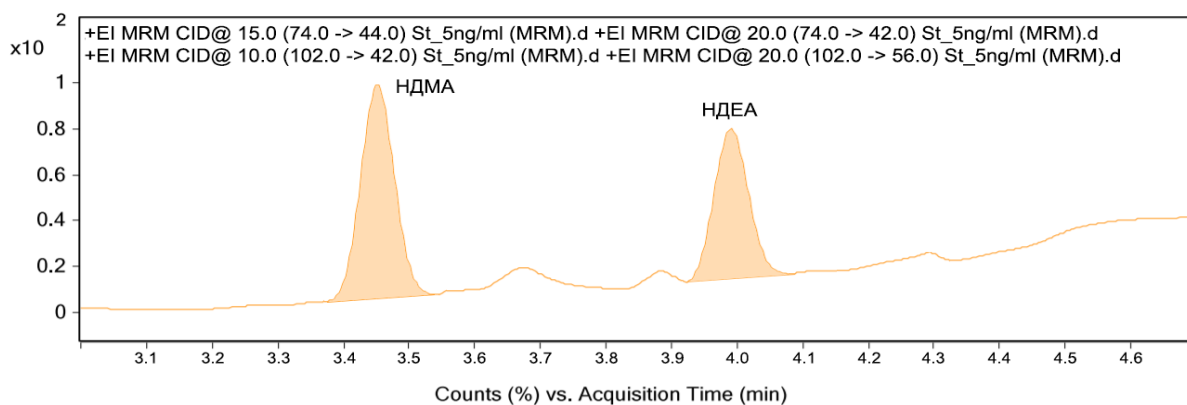


Рисунок 19. Типичная хроматограмма раствора, соответствующего точке линейности 1 (5 нг/мл)

4.2.3. Предел обнаружения (LOD)

Критерием приемлемости методики по показателю предел обнаружения (LOD) является $S/N = 3$. В зависимости от значения (S/N) использовали приготовленные в соответствии с указаниями раздела 2.3.1. стандартные растворы до получения значения сигнал:шум (S/N) = 3 для каждого нитрозамина (HDMA, HDEA). Измерения проводились в трех параллелях. Было установлено, что $S/N = 3$ на уровне концентраций 2,5 нг/мл. Приготовление растворов для определения LOD описано в главе 2.4.3. Расчет значения предела количественного определения проводили с использованием следующей формулы:

$$LOD = 3,3 * S/b$$

S – стандартное отклонение аналитического сигнала;

b – коэффициент чувствительности, представляющий собой отношение аналитического сигнала к определяемой величине (тангенс угла наклона калибровочной кривой).

Таблица 20. Средние площади пиков при концентрации примесей 2,5 нг/мл в фармацевтических субстанциях и таблетках

Наименование	Среднее значение площади пика в фармацевтических субстанциях N=3	Среднее значение площади пика в ЛП N=3	Предел обнаружения (нг/мл)
НДМА	267	284	2,23
	232	276	
	278	261	
НДЕА	265	245	2,31
	284	224	
	246	213	

4.2.4. Аналитический диапазон и линейность

После стабилизации хроматографической системы, инжестировали 1 мкл растворителя (метанол). Процедуру повторяли до получения ровной базовой линии и отсутствия флуктуаций.

Верхней точкой аналитического диапазона методики было выбрано значение 0,15 мкг/мл равное максимально допустимому содержанию примеси в таблетках фармацевтических субстанций валсартана, лозартана и ирбесартана.

Для определения линейности методики ГХ-МС/МС проводили последовательный анализ модельных смесей фармацевтических субстанций и модельных смесей ЛП с концентрациями, указанными в главе 4.1. Приготовление модельных смесей описано в главе 2.3. Строили линейную зависимость вида $y = ax + b$. В качестве точек использовали среднее значение из трех проведенных измерений для каждой концентрации.

Основным критерием приемлемости для данного валидационного показателя являлось значение корреляционного коэффициента $r^2 > 0,99$. Данные площадей пиков, уравнение регрессии, а также значения корреляционных коэффициентов изображены в таблице 21.

Таблица 21. Линейность разработанной методики ГХ-МС/МС

Фармацевтическая субстанция Валсартана					Фармацевтическая субстанция Лозартана			
Наименование	Площадь пика	Средняя площадь N=3	Концентрация примеси (нг/мл)	Уравнение регрессии и R ²	Площади пиков	Средняя площадь N=3	Концентрация примеси (нг/мл)	Уравнение регрессии и R ²
НДМА	461	487,33	5	$y = 0,0088x + 0,3986$ $R^2 = 0,9984$	617	560,00	5	$y = 0,0091x + 0,0389$ $R^2 = 0,9981$
	490				459			
	511				604			
	761	806,66	7,5		880	860,67	7,5	
	795				804			
	864				898			
	1117	1152,33	10		1056	1093,00	10	
	1144				1058			
	1196				1165			
	1354	1381,67	12,5		1302	1314,33	12,5	
	1382				1326			
	1409				1315			
	2847	2791,00	25		2756	2771,67	25	
	2697				2832			
	2829				2727			

Продолжение таблицы 21

НДЕА	536	491,67	5	$y = 0,0092x + 0,106$ $R^2 = 0,9989$	467	526,33	5		
	471				585				
	468				527				
	836	825,67	7,5		751	803,00	7,5		
	744				776				
	897				882				
	1040	1091,00	10		1152	1159,00	10		
	1179				1191				
	1054				1134				
	1365	1374,67	12,5		1335	1358,33	12,5		
	1433				1307				
	1326				1433				
	2678	2695,33	25		2894	2794,67	25		$y = 0,0088x + 0,2582$ $R^2 = 0,9986$
	2749				2678				
	2659				2812				
	461				617				
	490				459				

Продолжение таблицы 21

Фармацевтическая субстанция Ирбесартана					Таблетки Валсартана			
Наименование	Площадь пика	Средняя площадь N=3	Концентрация примеси (нг/мл)	Уравнение регрессии и R ²	Площади пиков	Средняя площадь N=3	Концентрация примеси (нг/мл)	Уравнение регрессии и R ²
НДМА	586	548,67	5	$y = 0,0093x - 0,3631$ $R^2 = 0,9991$	503	502,67	5	$y = 0,0091x + 0,0089$ $R^2 = 0,9978$
	554				462			
	506				543			
	878	840,67	7,5		757	816,67	7,5	
	864				798			
	780				895			
	1125	1150,33	10		1136	1149,00	10	
	1148				1173			
	1178				1138			
	1321	1404,67	12,5		1305	1411,33	12,5	
	1383				1467			
	1510				1462			
	2759	2718,00	25		2696	2726,67	25	
	2687				2770			
	2708				2714			

Продолжение таблицы 21

НДЕА	618	566,67	5	$y = 0,0089x - 0,0465$ $R^2 = 0,9987$	463	500,00	5	$y = 0,0087x + 0,4777$ $R^2 = 0,9989$
	560				470			
	522				567			
	757	843,00	7,5		762	794,00	7,5	
	913				762			
	859				858			
	1177	1183,67	10		1190	1150,33	10	
	1175				1042			
	1199				1219			
	1321	1378,33	12,5		1370	1381,33	12,5	
	1389				1461			
	1425				1313			
	2842	2829,67	25		2852	2816,00	25	
	2822				2724			
	2825				2872			

Продолжение таблицы 21

Таблетки Лозартана					Таблетки Ирбесартана			
Наименование	Площадь пика	Средняя площадь N=3	Концентрация примеси (нг/мл)	Уравнение регрессии и R ²	Площади пиков	Средняя площадь N=3	Концентрация примеси (нг/мл)	Уравнение регрессии и R ²
НДМА	455	480,67	5	y = 0,0089x + 0,0003 R ² = 0,9956	395	424,67	5	y = 0,0091x + 0,318 R ² = 0,9941
	452				396			
	535				483			
	838	871,00	7,5		915	831,33	7,5	
	930				754			
	845				825			
	1239	1194,33	10		1134	1106,00	10	
	1201				1116			
	1143				1068			
	1396	1319,33	12,5		1387	1408,00	12,5	
	1258				1415			
	1304				1422			
	2905	2819,00	25		2767	2680,33	25	
	2897				2579			
	2655				2695			

Продолжение таблицы 21

НДЕА	445	474,00	5	$y = 0,0089x + 0,2946$ $R^2 = 0,9971$	498	449,67	5	$y = 0,0099x - 0,3501$ $R^2 = 0,991$
	466				439			
	511				412			
	783	802,33	7,5		728	794,33	7,5	
	758				738			
	866				917			
	1082	1111,67	10		1146	1121,33	10	
	1141				1084			
	1112				1134			
	1308	1431,33	12,5		1350	1369,67	12,5	
	1480				1325			
	1506				1434			
	2792	2730,33	25		2512	2505,00	25	
	2677				2570			
	2722				2433			

Разработанная методика ГХ-МС/МС обладает хорошими показателями линейности при определении нитрозаминов в фармацевтических субстанциях и ЛП валсартана, лозартана и ирбесартана. Корреляционный коэффициент R^2 в среднем не ниже 0,99 является хорошим показателем и полностью удовлетворяет заявленным критериям приемлемости.

4.2.5. Правильность

Главным критерием приемлемости методики по показателю «Правильность» для примесей, согласно ГФ РФ является диапазон открываемости (Recovery) 80 – 120 % при RSD между параллелями не более 10% [112]. После стабилизации хроматографической системы инжескировали растворитель. Процедуру повторяли до получения ровной базовой линии и отсутствия пиков посторонних веществ. Расчет открываемости выполнялся по следующей формуле:

$$E = \frac{\text{Найдено (нг/мл)} * 100\%}{\text{Введено (нг/мл)}}$$

Открываемость рассчитывалась для образцов с концентрациями 5 нг/мл, 7,5 нг/мл, 10 нг/мл. Полученные значения открываемости представлены в таблице 22.

Таблица 22. Значения открываемости, полученные при валидации методики ГХ-МС/МС

Фармацевтическая субстанция Валсартана										
	Калибровка	Модельные смеси	Е %	Калибровка	Модельные смеси	Е %	Калибровка	Модельные смеси	Е%	Еср
	LOQ (5 нг/мл)			7,5 нг/мл			10 нг/мл			
НДМА	488	533	109	826	914	110	1069	1068	99	102,27
	497	561	112	840	914	108	1060	1040	98	
	537	549	102	901	871	96	1041	1081	103	
НДЕА	483	501	103	853	840	98	1117	1189	106	
	516	457	88	746	754	101	1162	1181	101	
	464	563	121	826	765	92	1116	1057	94	
Фармацевтическая субстанция Лозартана										
	Калибровка	Модельные смеси	Е %	Калибровка	Модельные смеси	Е %	Калибровка	Модельные смеси	Е%	Еср
	LOQ (5 нг/мл)			7,5 нг/мл			10 нг/мл			
НДМА	572	605	105	744	780	104	1057	1055	99	99,78
	570	579	101	839	899	107	1138	1138	100	
	573	609	106	726	794	109	1178	1182	100	
НДЕА	491	515	104	906	890	98	1130	1061	93	
	577	531	92	735	729	99	1091	1042	95	
	607	568	93	805	830	103	1178	1043	88	
Фармацевтическая субстанция Ирбесартана										
	Калибровка	Модельные смеси	Е %	Калибровка	Модельные смеси	Е %	Калибровка	Модельные смеси	Е%	Еср
	LOQ (5 нг/мл)			7,5 нг/мл			10 нг/мл			
НДМА	455	471	103	860	907	105	1088	1044	95	97,94
	590	486	82	790	755	95	1166	1075	92	
	610	480	78	836	755	90	1156	1058	91	

Продолжение таблицы 22

НДЕА	612	571	93	767	917	119	1058	1155	109	
	466	523	112	856	818	95	1128	1167	103	
	450	486	108	842	773	91	1166	1195	102	
Таблетки Валсартана										
	Калибровка	Модельные смеси	Е %	Калибровка	Модельные смеси	Е %	Калибровка	Модельные смеси	Е%	Еср
	LOQ (5 нг/мл)			7,5 нг/мл			10 нг/мл			
НДМА	602	473	78	787	813	103	1107	1087	98	
	477	517	108	776	826	106	1121	1181	105	
	474	480	101	740	843	113	1113	1154	103	
НДЕА	611	520	85	724	786	108	1144	1106	96	
	522	608	116	870	834	95	1132	1189	105	
	595	575	96	801	771	96	1103	1085	98	100,55
Таблетки Лозартана										
	Калибровка	Модельные смеси	Е %	Калибровка	Модельные смеси	Е %	Калибровка	Модельные смеси	Е%	Еср
	LOQ (5 нг/мл)			7,5 нг/мл			10 нг/мл			
НДМА	600	613	102	737	853	115	1044	1147	109	
	575	517	89	873	891	102	1106	1069	96	
	539	567	105	722	733	101	1194	1199	100	
НДЕА	523	613	117	737	889	120	1060	1043	98	
	583	596	102	824	728	88	1153	1132	98	
	549	614	111	875	834	95	1077	1063	98	102,55

Продолжение таблицы 22

Таблетки Ирбесартана										
	Калибровка	Модельные смеси	Е %	Калибровка	Модельные смеси	Е %	Калибровка	Модельные смеси	Е%	Еср
	LOQ (5 нг/мл)			7,5 нг/мл			10 нг/мл			
НДМА	550	559	101	819	885	108	1189	1184	99	101,11
	540	488	90	741	801	108	1058	1044	98	
	484	495	102	766	909	118	1134	1172	103	
	522	548	104	887	829	93	1083	1199	110	
НДЕА	590	556	94	725	742	102	1109	1081	97	
	596	560	93	731	729	99	1104	1122	101	

Как видно из таблицы 22 среднее значение открываемости E_{sp} находится в допустимых пределах, а $RSD < 10\%$. Данные показатели не только соответствуют всем заявленным критериям приемлемости, а также являются следствием высокой точности разработанной методики.

4.2.6. Прецизионность

Прецизионность методики — это параметр, который характеризует рассеяние результатов относительно средней величины. Мерой прецизионности является RSD достаточно большой выборки генеральной совокупности. При проведении оценки прецизионности данной методики оценивали сходимость получаемых результатов.

Сходимость оценивали последовательными инъекциями модельных смесей с концентрацией нитрозаминов 5 нг/мл (на уровне LOQ разработанной методики). Критерием приемлемости являлся RSD менее 10%. Результаты анализа отображены в таблице 23.

Таблица 23. Сходимость результатов при проведении последовательных инъекций модельных смесей с концентрациями 5 нг/мл

Повтор		1	2	3	4	5	6	RSD%
Наименование								
НДМА	Площадь	485	542	514	499	487	561	6,01
НДЕА	пика	555	513	526	517	471	484	5,89

4.2.7. Стабильность

Для определения стабильности использовали стандартные растворы нитрозаминов и модельные смеси фармацевтических субстанций валсартана, лозартана и ирбесартана. В качестве растворов сравнения использовались свежеприготовленные растворы модельных смесей с аналогичной концентрацией нитрозаминов, а также свежеприготовленные стандартные растворы. Модельные смеси и стандартные растворы хранили в темном месте при комнатной температуре в течение двух суток после приготовления. Стабильность аналитов в модельных смесях определялась в пяти параллельных экспериментах. Главным критерием приемлемости стабильности исследуемых стандартных растворов являлось сохранение концентрации примесей нитрозаминов в диапазоне от 95 – 105 %. Результаты стабильности изображены в таблице 24.

Таблица 24. Стабильность стандартных растворов

Средняя площадь пика N=5 для каждого испытуемого			Открываемость [112] Е%				
Свежеприготовленный раствор 10 нг/мл		Стандарт ный раствор					
НДМА	1223	1191	97,38				
НДЕА	1267	1235	97,47				
Модельные смеси фармацевтических субстанций Средняя площадь пика N=5 для каждого испытуемого							
Свежеприготовленный раствор 10 нг/мл				Тест раствор			Е%
	Вал- сар- тан	Лозар- тан	Ирбе- сартан	Валсар- тан	Лозар- тан	Ирбе- сартан	
НДМА	1256	1213	1252	1241	1230	1198	98,63
НДЕА	1287	1257	1311	1260	1237	1279	97,96

В результате проведенного исследования стабильности было установлено, что калибровочные растворы и модельные смеси сохраняют приготовленную концентрацию в течение двух суток при хранении в защищенном от света месте и комнатной температуре.

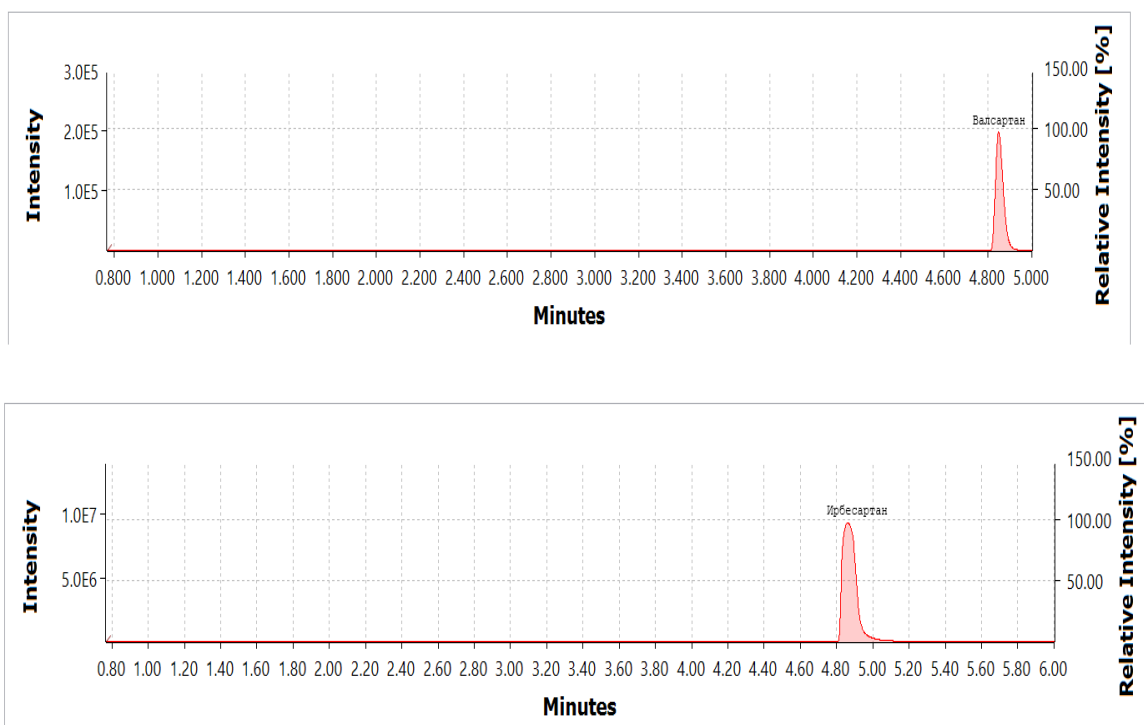
Таким образом, данные, представленные в таблице 24 полностью удовлетворяют заявленным критериям приемлемости. Хранение стандартных растворов в темном месте в течение 2х дней не повлекло за собой значительного (более 3%) снижения концентраций, что свидетельствует о стабильности исследуемых веществ. Такой результат также коррелирует с физико-химическими свойствами нитрозаминов (стабильные соединения) [37].

4.3. Разработка методики ВЭЖХ-МС/МС.

Поскольку разработанная методика ГХ-МС/МС не охватывает весь спектр определяемых нитрозаминов в ЛС валсартана, лозартана и ирбесартана, было принято решение об инициации разработки методики, основанной на ВЭЖХ. Основными

поставленными задачами при разработке методики ВЭЖХ-МС/МС являлась ее более высокая чувствительность по сравнению с ГХ-МС/МС и существующими методиками, а также ее высокая универсальность, т.е. способность к селективному определению исследуемых нитрозаминов как в фармацевтических субстанциях, так и в ЛП валсартана, лозартана и ирбесартана.

Таким образом, разработка методики определения нитрозаминов в фармацевтических субстанциях и ЛП валсартана, лозартана и ирбесартана методом ВЭЖХ-МС/МС является одним из важнейших этапов проведенной работы. Подбор условий хроматографического разделения и параметров масс-спектрометрического детектирования определяет возможность методики детектировать нитрозамины в необходимых концентрациях. Критерии приемлемости методики соответствуют критериям, описанным в главе 4.1. Важной составляющей разрабатываемой методики являлся подбор условий хроматографического разделения таким образом, чтобы исключить попадание пиков соединений, сопутствующих нитрозамину (фармацевтическая субстанция, вспомогательные вещества), в масс-спектрометрический детектор. При реализованных условиях хроматографического градиента пики фармацевтических субстанций выходят после анализируемых веществ, что позволяет предотвратить их попадание в источник. Хроматограммы холостых проб представлены на рисунке 23.



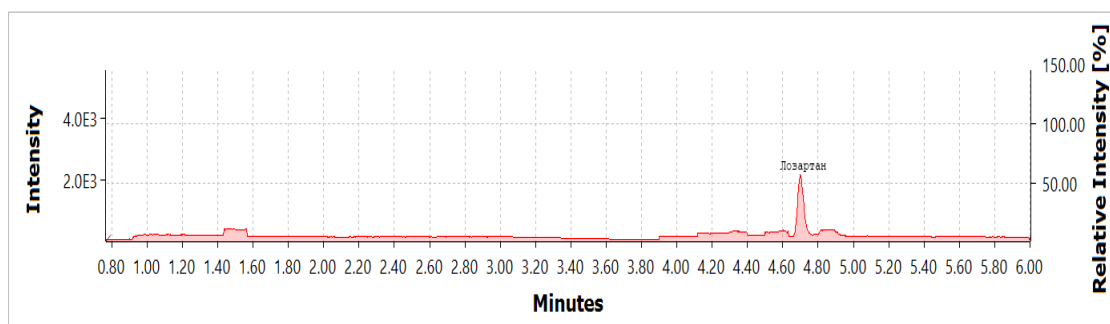


Рисунок 20. Типичные хроматограммы холостых проб 2.3.2.1.¹

Определяющим показателем разработанной методики является ее чувствительность. Соотношение сигнал:шум на уровне концентраций LOD разработанной методики согласно ГФ РФ должно составлять не менее 3:1. Соотношение сигнал:шум на уровне концентраций LOQ разработанной методики согласно ГФ РФ должно составлять не менее 10:1 [112].

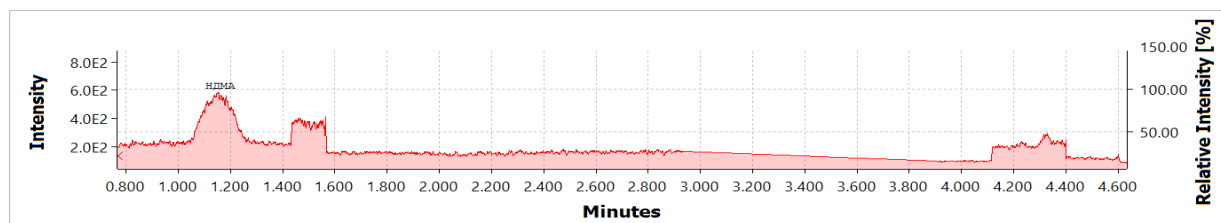
Разработка методики идентификации и количественного определения нитрозаминов проводилась с использованием прибора Agilent Infinity II + Agilent Triple Quad 6460. Параметры проведения анализа указаны в разделе 2.4.4. Разработка условий хроматографического разделения проводилась на стандартных растворах примесей с концентрациями 1 мкг/мл. На первоначальном этапе разработки методики исследуемые стандартные растворы анализировались в режиме SCAN (40 – 500 а.е.м.). Наиболее интенсивные ионы были выбраны в качестве родительских ионов для MRM (Multiple reaction monitoring – множественный мониторинг реакций) переходов. Дальнейшая разработка методики проводилась в MRM режиме.

Для выполнения описанных выше критериев приемлемости был разработан градиент подвижной фазы, описанный в разделе 2.4.4. Выбор растворителя и состава подвижной фазы основывался на результатах анализа физико-химических свойств исследуемых нитрозаминов с помощью программ ACDlabs Chemskech, Chemdraw 18.0. Так, для наилучшего разделения нитрозаминов, был выбран метанол в качестве растворителя. Состав подвижной фазы: метанол, вода. Для улучшения ионизации, в воду, входящую в состав подвижной фазы, была добавлена муравьиная кислота (концентрация в подвижной фазе 0,1 %) и формиат аммония (концентрация 10 ммоль/л). В ходе подбора состава подвижной фазы для улучшения ионизации в метанол также была добавлена

¹ Исходные файлы хроматограмм на рисунке 22-23 обработаны с использованием программного обеспечения Lablicate.

муравьиная кислота до достижения указанной выше концентрации. Хроматограммы с различными подвижными фазами представлены на рисунке 24.

а)



б)

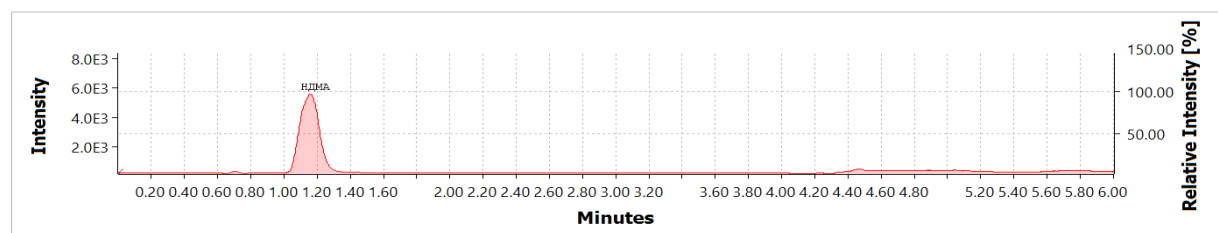


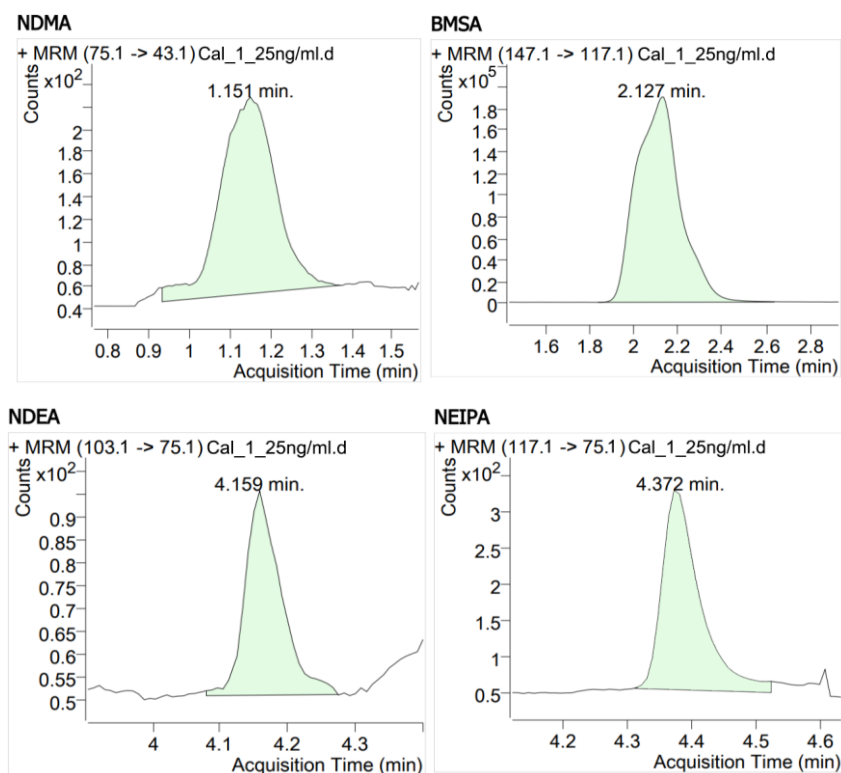
Рисунок 21. Типичные хроматограммы стандартного раствора НДМА (ВЭЖХ-МС/МС) с концентрацией 1 мкг/мл а) хроматограмма с составом подвижной фазы метанол:вода с добавлением муравьиной кислоты б) хроматограмма с составом подвижной фазы метанол:вода с добавлением муравьиной кислоты и формиата аммония

Как видно из рисунка 21 на хроматограмме б, форма, площадь и высота пика значительно выше, чем на хроматограмме а, что свидетельствует о лучшей ионизации.

После завершения подбора условий и параметров хроматографического разделения проводилась оптимизация параметров масс-спектрометрического детектирования. Для этого, выбранные ранее родительские ионы использовали в подборе оптимальных MRM переходов. Стандартный раствор (НДМА, НДЕА, НМБА, НЭИПА) с концентрацией 1 мкг/мл анализировали многократно, меняя напряжение на фрагментере и энергии соударений. Наибольшие высоты и площади пиков были зафиксированы при условиях анализа, описанных в разделе 2.4.4. Помимо этого, для достижения максимальной эффективности тандемного масс-спектрометрического детектирования, анализировали стандартный раствор нитрозаминов с концентрацией 1 мкг/мл с использованием программного обеспечения MassHunter Workstation Software Optimizer. Подбор и оптимизация условий масс-спектрометрического детектирования проводились как при ионизации электроспреем (ESI), так и химической ионизации (APCI). Подбор условий химической ионизации (APCI) проводился оценкой площадей и высот пиков при изменении параметра “ток коронного разряда”.

Для определения чувствительности методики проводился последовательный анализ стандартных растворов (ВЭЖХ) и калибровочных растворов примесей с концентрациями 500 нг/мл, 200 нг/мл, 100 нг/мл, 50 нг/мл, 25 нг/мл, 10 нг/мл, 8 нг/мл, 6 нг/мл, 4 нг/мл, 2 нг/мл, 1 нг/мл, 0,4 нг/мл, 0,2 нг/мл. При анализе образцов с использованием ESI установлен LOQ на уровне концентраций 20 нг/мл. При анализе образцов с использованием APCI установлен LOQ на уровне концентраций 0,4 нг/мл. LOD разработанной методики при анализе образцов с использованием APCI равен 0,2 нг/мл. Более подробно определение LOQ и LOD разработанной методики описано в разделах 4.4.2. и 4.4.3. Фрагменты хроматограмм с использованием различных источников ионизации представлены на рисунке 22.

a)



б)

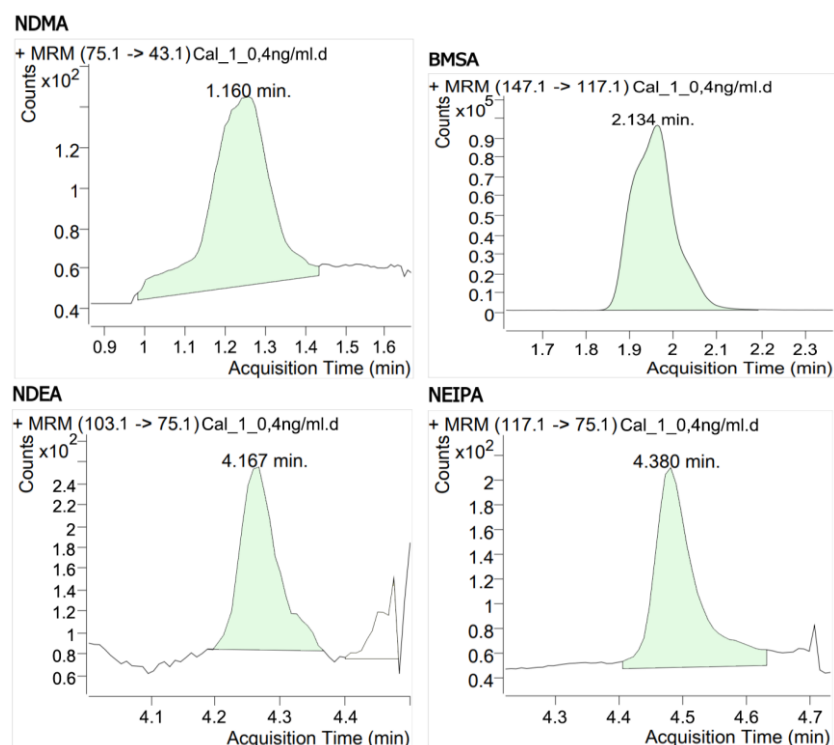


Рисунок 22. Типичные фрагменты хроматограмм стандартных и калибровочных растворов а) ионизация электроспреем (ESI) б) химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI)

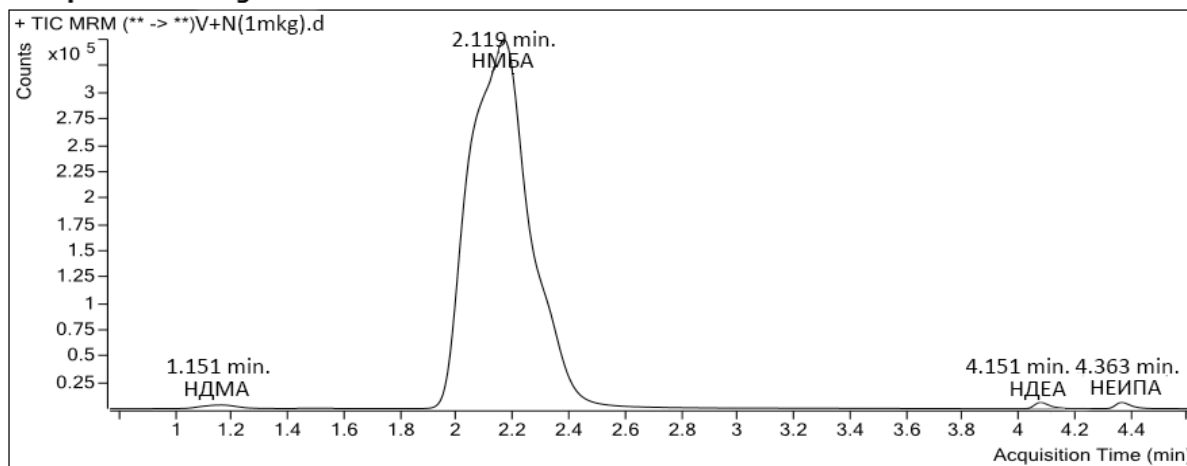
Разработанная методика ВЭЖХ-МС/МС (APCI) обладает всеми необходимыми свойствами для идентификации и количественного определения нитрозаминов в ЛС сартанов.

4.4. Валидация методики ВЭЖХ-МС/МС

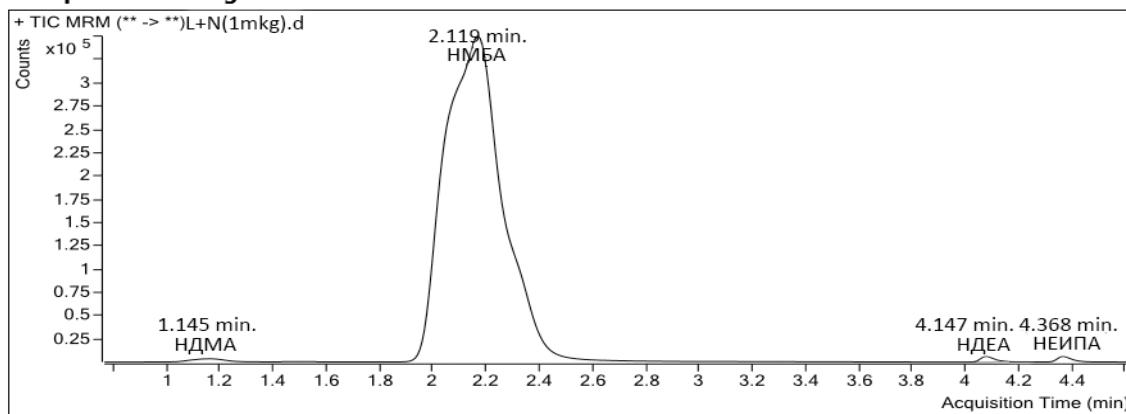
4.4.1. Специфичность

Специфичность методики подтверждалась анализом стандартного раствора примесей нитрозаминов (НДМА, НДЕА, НМБА, НЭИПА) в концентрации 1 мкг/мл и анализом модельных смесей с аналогичной концентрацией нитрозаминов. Критерием приемлемости являлось отсутствие посторонних пиков во время выхода пиков искомым нитрозаминов. Растворитель и фармацевтическая субстанция/ЛП не должны влиять на проведение анализа. На рисунке 23 изображены типичные хроматограммы модельных смесей с концентрациями нитрозаминов 1 мкг/мл.

a)

Sample Chromatogram

б)

Sample Chromatogram

в)

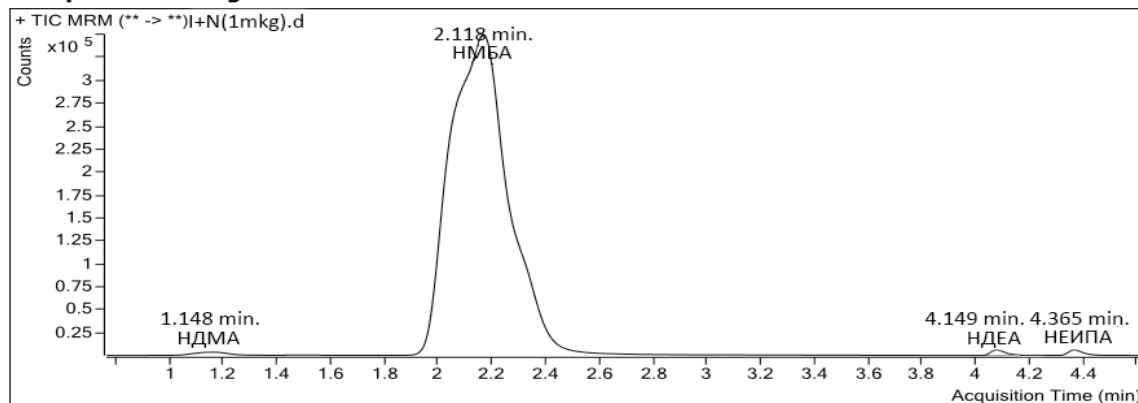
Sample Chromatogram

Рисунок 23. Типичные хроматограммы модельных смесей валсартана (а), лозартана (б) и ирбесартана (в) с добавлением нитрозаминов (HDMA, HDEA, NMB, HEIPA) с концентрациями 1 мкг/мл

4.4.2. Определение предела количественного определения (LOQ)

Анализировали стандартные растворы примесей нитрозаминов в концентрациях, указанных в главе 3.3. Предел количественного определения (LOQ) определялся с помощью измерения показателя сигнал:шум (S/N). Критерием приемлемости являлся показатель $(S/N) \geq 10$. Установленный предел количественного определения 0,4 нг/мл. На рисунке 27 изображена типичная хроматограмма стандартного раствора с концентрацией нитрозаминов (НДМА, НДЕА, НМБА, НЭИПА) 0,4 нг/мл. Примесь НМБА имеет гораздо более высокий коэффициент ионизации (в 1000 раз), нежели примеси НДМА, НДЕА и НЭИПА. Поскольку главной задачей являлась разработка унифицированной (способной одновременно определять четыре примеси нитрозаминов) методики, истинная чувствительность методики по данной примеси не определялась. LOQ методики для примеси НМБА был установлен на уровне 0,4 нг/мл. Расчет предела количественного определения проводился по формуле, указанной в разделе 4.2.2. В таблице 25. описаны данные, полученные при анализе растворов с концентрациями 0,4 нг/мл, а также полученный предел количественного определения.

Таблица 25. Данные площадей пиков, полученные при анализе растворов с концентрациями 0,4 нг/мл

Наименование	Среднее значение площади пика в фармацевтических субстанциях N=3	Среднее значение площади пика в ЛП N=3	Предел количественного определения (нг/мл)
НДМА	9240	8066	0,386
	9136	8240	
	9327	8136	
НДЕА	9540	8144	0,388
	9636	8258	
	9727	8219	
НМБА	121408	121540	0,4
	121080	121438	
	121055	121528	
НЭИПА	9253	8039	0,389
	9049	8212	
	9098	8165	

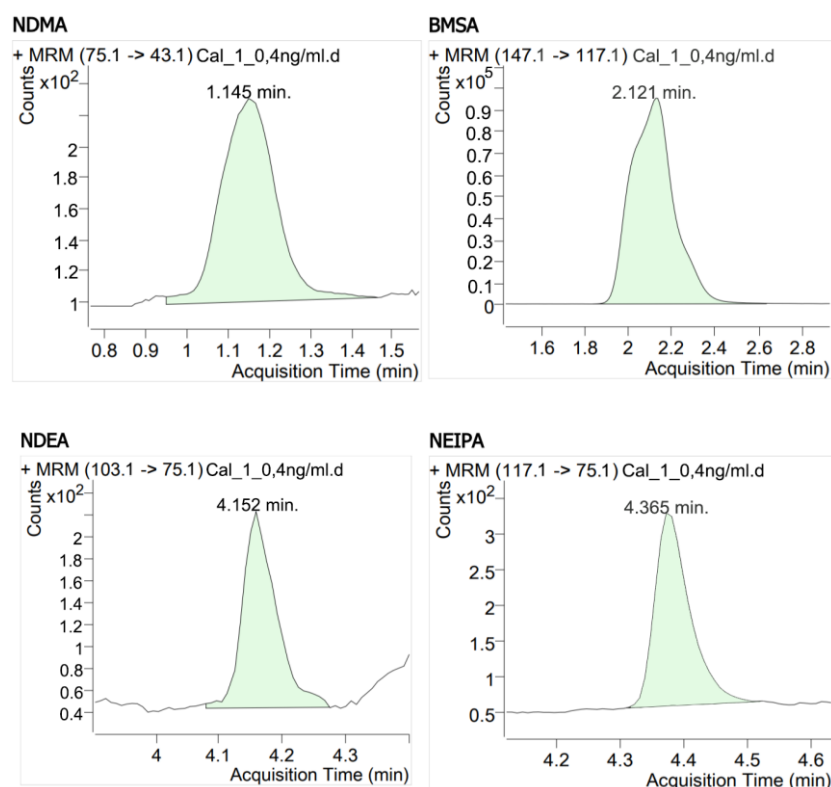


Рисунок 24. Типичные фрагменты хроматограмм калибровочного раствора с концентрацией 0,4 нг/мл

4.4.3. Определение предела обнаружения (LOD)

После стабилизации давления в хроматографической системе анализировали 5 мкл растворителя (метанол). Процедуру проводили до получения ровной базовой линии и отсутствия посторонних пиков. Для определения предела обнаружения (LOD) анализировали стандартные растворы с концентрациями нитрозаминов, указанными в главах. Оценку предела обнаружения (LOD) проводили с помощью измерения показателя сигнал:шум (S/N). Критерием приемлемости являлся $(S/N) \geq 3$. Предел обнаружения примеси НМБА был установлен на уровне 0,2 нг/мл. Предел обнаружения рассчитывался по формуле, представленной ранее в разделе 4.2.3. В таблице 26 описаны данные, при анализе растворов с концентрациями 0,2 нг/мл.

Таблица 26. Данные площадей пиков, полученные при анализе растворов с концентрациями 0,2 нг/мл

Наименование	Среднее значение площади пика в фармацевтических субстанциях N=3	Среднее значение площади пика в ЛП N=3	Предел обнаружения (нг/мл)
НДМА	4847	3989	0,187
	4709	4069	
	4884	4361	
НДЕА	4686	4062	0,189
	4960	4205	
	4855	4137	
НМБА	60988	59368	0,2
	61062	60821	
	60957	61819	
НЭИПА	4958	4690	0,188
	4988	4368	
	4723	4292	

4.4.4. Аналитический диапазон и линейность

После стабилизации давления в хроматографической системе, инжектировали 5 мкл растворителя (метанол). Процедуру повторяли до получения ровной базовой линии и отсутствии флуктуаций. Верхней точкой аналитического диапазона методики была выбрана концентрация 0,15 мкг/мл, соответствующая максимально допустимому содержанию примеси в фармацевтических субстанциях валсартана, лозартана и ирбесартана. Нижняя точка аналитического диапазона была установлена на уровне 0,4 нг/мл – LOQ разработанной методики. Для определения линейности методики ВЭЖХ-МС/МС проводили последовательный анализ модельных смесей фармацевтических субстанций и модельных смесей ЛП с концентрациями, указанными в главе 2.3. Приготовление модельных смесей описано в главе 2.3. Строили линейную зависимость вида $y = ax + b$. В качестве точек выбирали среднее значение из проведенных трех измерений. Данные определения линейности изображены в таблице 27.

Таблица 27. Значения площадей пиков, уравнения регрессии и корреляционные коэффициенты (R^2) для нитрозаминов в фармацевтических субстанциях и ЛП

Фармацевтическая субстанция Валсартана					Фармацевтическая субстанция Лозартана			
Наименование	Значения площадей пиков	Средняя площадь N=3	Концентрация примеси (нг/мл)	Уравнение регрессии и R^2	Значения площадей пиков	Средняя площадь N=3	Концентрация примеси (нг/мл)	Уравнение регрессии и R^2
НДМА	9282	9198	0,4	$y = 0,0004x + 0,0004$ $R^2 = 0,9985$	9081	9230	0,4	$y = 0,0004x - 0,0435$ $R^2 = 0,9989$
	9189				9256			
	9123				9354			
	14484	14355	0,6		14330	14316	0,6	
	14160				14188			
	14421				14432			
	18377	18439	0,8		18447	18591	0,8	
	18509				18660			
	18432				18666			
	21341	21201	0,9		21193	21224	0,9	
	21072				21212			
	21192				21267			
	25670	25645	1,1		25699	25540	1,1	
	25581				25593			
	25686				25330			

Продолжение таблицы 27

НДЕА	9174	9244	0,4	$y = 0,0004x - 0,0853$ $R^2 = 0,998$	9322	9213	0,4	$y = 0,0004x + 0,0166$ $R^2 = 0,9992$
	9309				9216			
	9251				9103			
	14538	14498	0,6		14069	14123	0,6	
	14412				14146			
	14544				14156			
	18489	18529	0,8		18367	18372	0,8	
	18521				18496			
	18577				18253			
	21182	21266	0,9		21140	21107	0,9	
	21326				21129			
	21290				21053			
	25588	25543	1,1		25436	25547	1,1	
	25600				25530			
	25442				25675			

Продолжение таблицы 27

НМБА	121473	121428	0,4	$y = 3E-05x + 0,1197$ $R^2 = 0,9989$	121221	121310	0,4	$y = 3E-05x - 0,0175$ $R^2 = 0,9977$
	121479				121401			
	121333				121309			
	180070	180336	0,6		181903	181957	0,6	
	180071				182011			
	180867				181959			
	238809	238598	0,8		240631	240589	0,8	
	240316				240558			
	236669				240580			
	276744	276278	0,9		263629	263736	0,9	
	276538				263847			
	275552				263733			
	336982	335991	1,1		333937	333991	1,1	
	336916				334163			
	334077				333873			

Продолжение таблицы 27

НЭИПА	9338	9294	0,4	$y = 0,0004x - 0,0285$ $R^2 = 0,9989$	9161	9195	0,4	$y = 0,0004x + 0,0166$ $R^2 = 0,9992$
	9241				9310			
	9303				9114			
	14345	14302	0,6		14381	14289	0,6	
	14116				14312			
	14446				14174			
	18651	18491	0,8		18263	18418	0,8	
	18318				18438			
	18505				18554			
	21347	21281	0,9		21112	21192	0,9	
	21386				21239			
	21110				21226			
	25697	25655	1,1		25661	25496	1,1	
	25656				25475			
	25612				25354			

Продолжение таблицы 27

Фармацевтическая субстанция Ирбесартана					Таблетки Валсартана			
Наименование	Значения площадей пиков	Средняя площадь N=3	Концентрация примеси (нг/мл)	Уравнение регрессии и R ²	Значения площадей пиков	Средняя площадь N=3	Концентрация примеси (нг/мл)	Уравнение регрессии и R ²
НДМА	8340	8610	0,4	$y = 0,0004x + 0,2845$ $R^2 = 0,9974$	8141	8161	0,4	$y = 0,0004x + 0,4944$ $R^2 = 0,9945$
	8851				8244			
	8641				8098			
	14095	14196	0,6		14359	14314	0,6	
	14045				14457			
	14448				14127			
	18679	18546	0,8		18487	18351	0,8	
	18602				18258			
	18357				18308			
	21109	21203	0,9		21083	21190	0,9	
	21340				21222			
	21162				21267			
	25540	25508	1,1		25522	25541	1,1	
	25522				25648			
	25463				25455			

Продолжение таблицы 27

НДЕА	8110	8116	0,4	$y = 0,0004x + 0,5694$ $R^2 = 0,9962$	8115	8182	0,4	$y = 0,0004x + 0,4799$ $R^2 = 0,9946$
	8047				8147			
	8191				8285			
	14035	14137	0,6		14387	14339	0,6	
	14156				14089			
	14221				14543			
	18350	18430	0,8		18657	18556	0,8	
	18255				18590			
	18687				18422			
	21159	21156	0,9		21201	21237	0,9	
	21203				21114			
	21106				21397			
	25704	25663	1,1		25651	25569	1,1	
	25634				25513			
	25652				25544			

Продолжение таблицы 27

НМБА	101355	101232	0,4	$y = 3E-05x + 0,7113$ $R^2 = 0,9941$	119102	118881	0,4	$y = 3E-05x - 0,0719$ $R^2 = 0,9958$
	101241				119086			
	101100				118455			
	182042	182072	0,6		192049	192673	0,6	
	182093				193874			
	182083				192097			
	240335	240370	0,8		240963	240612	0,8	
	240281				240838			
	240495				240035			
	263785	263610	0,9		273785	273753	0,9	
	263516				273726			
	263529				273749			
	333871	333987	1,1		334118	334137	1,1	
	334116				334143			
	333975				334150			

Продолжение таблицы 27

НЭИПА	8257	8170	0,4	$y = 0,0004x + 0,4605$ $R^2 = 0,994$	8230	8166	0,4	$y = 0,0004x + 0,5286$ $R^2 = 0,9956$
	8026				8074			
	8228				8194			
	14470	14347	0,6		14332	14191	0,6	
	14344				14201			
	14227				14041			
	18288	18356	0,8		18536	18417	0,8	
	18504				18365			
	18276				18350			
	21168	21148	0,9		21116	21256	0,9	
	21112				21330			
	21166				21322			
	25533	25453	1,1		25566	25595	1,1	
	25520				25507			
	25307				25712			

Продолжение таблицы 27

Таблетки Лозартана					Таблетки Ирбесартана			
Наименование	Значения площадей пиков	Средняя площадь N=3	Концентрация примеси (нг/мл)	Уравнение регрессии и R ²	Значения площадей пиков	Средняя площадь N=3	Концентрация примеси (нг/мл)	Уравнение регрессии и R ²
НДМА	9262	9184	0,4	$y = 0,0004x - 0,0425$ $R^2 = 0,9978$	8290	8205	0,4	$y = 0,0004x + 0,459$ $R^2 = 0,9946$
	9006				8245			
	9284				8082			
	14492	14479	0,6		14427	14292	0,6	
	14440				14304			
	14506				14147			
	18250	18420	0,8		18524	18524	0,8	
	18488				18476			
	18524				18573			
	21198	21186	0,9		21221	21247	0,9	
	21258				21159			
	21104				21361			
	25448	25570	1,1		25307	25477	1,1	
	25555				25438			
	25708				25688			

Продолжение таблицы 27

НДЕА	9084	9182	0,4	$y = 0,0004x - 0,0732$ $R^2 = 0,9982$	9161	9192	0,4	$y = 0,0004x - 0,0595$ $R^2 = 0,9986$
	9249				9247			
	9215				9169			
	14543	14437	0,6		14549	14419	0,6	
	14453				14259			
	14315				14449			
	18574	18537	0,8		18659	18621	0,8	
	18698				18655			
	18341				18551			
	21109	21168	0,9		21216	21136	0,9	
	21307				21099			
	21089				21093			
	25574	25456	1,1		25462	25533	1,1	
	25376				25464			
	25420				25673			

Продолжение таблицы 27

НМБА	118370	117597	0,4	$y = 3E-05x + 0,0779$ $R^2 = 0,9987$	121357	121303	0,4	$y = 3E-05x - 0,0162$ $R^2 = 0,9977$
	119024				121314			
	115398				121240			
	185833	186291	0,6		182015	181972	0,6	
	186021				181967			
	187020				181936			
	240844	240731	0,8		240906	240753	0,8	
	240535				240760			
	240814				240595			
	273848	273756	0,9		264083	263857	0,9	
	273604				263672			
	273817				263817			
	333989	333930	1,1		333961	334053	1,1	
	333889				334087			
	333913				334112			

Продолжение таблицы 27

НЭИПА	9129	9159	0,4	$y = 0,0004x + 0,0679$ $R^2 = 0,9986$	9341	9348	0,4	$y = 0,0004x - 0,066$ $R^2 = 0,9985$
	9102				9356			
	9247				9348			
	14300	14197	0,6		14100	14241	0,6	
	14197				14474			
	14095				14150			
	18359	18299	0,8		18348	18368	0,8	
	18302				18542			
	18236				18214			
	21239	21191	0,9		21139	21298	0,9	
	21071				21389			
	21263				21366			
	25675	25653	1,1		25377	25532	1,1	
	25657				25581			
	25628				25640			

Так, данные линейности, представленные выше, полностью соответствуют всем заявленным критериям приемлемости. Линейность при определении нитрозаминов в ЛП в среднем незначительно хуже, чем при определении в фармацевтической субстанции, что весьма ожидаемо, ввиду высокого шума матрицы ЛП.

4.4.5. Правильность

Главным критерием приемлемости методики по показателю правильность для примесей, согласно общей фармакопейной статье “Валидация аналитических методик” является диапазон открываемости (Recovery) 80 – 120 % [105]. RSD между параллелями должен быть не более 10%. Для определения открываемости после стабилизации хроматографической системы инжесктировали раствор растворитель. Процедуру повторяли до получения ровной базовой линии и отсутствия пиков посторонних веществ. Расчет открываемости выполнялся по формуле, представленной в разделе 4.2.5.

Открываемость считалась в образцах с концентрациями 0,4 нг/мл, 0,6 нг/мл, 0,8 нг/мл. Значения открываемости представлены в таблице 28.

Таблица 28. Значения открываемости, полученные при валидации методики ВЭЖХ-МС/МС

Фармацевтическая субстанция Валсартана										
	Калибровка	Модельные смеси	Е%	Калибровка	Модельные смеси	Е%	Калибровка	Модельные смеси	Е%	Еср
Концентрация	LOQ (0,4 нг/мл)			0,6 нг/мл			0,8 нг/мл			
НДМА	9150	9152	100,02	14092	14372	101,99	18591	18222	98,02	100,45
	9115	9082	99,63	14245	14123	99,14	18351	18523	100,94	
	9045	9286	102,66	14139	14379	101,70	18583	18575	99,96	
НДЕА	9044	9059	100,16	14093	14519	103,02	18289	18637	101,90	100,42
	9172	9159	99,85	14251	14509	101,81	18624	18458	99,11	
	9029	9195	101,83	14480	14282	98,63	18668	18203	97,51	
НМБА	121265	121265	100,00	182042	181983	99,97	240437	240250	99,92	99,9
	121093	121081	99,99	181876	182081	100,11	240523	240863	100,14	
	121556	121149	99,67	181880	182019	100,08	240275	240186	99,96	
НЭИПА	9062	9136	100,82	14174	14423	101,76	18418	18329	99,52	100,25
	9116	9017	98,91	14328	14511	101,28	18553	18294	98,60	
	9153	9284	101,43	14254	14207	99,67	18292	18352	100,33	
Фармацевтическая субстанция Лозартана										
	Калибровка	Модельные смеси	Е%	Калибровка	Модельные смеси	Е%	Калибровка	Модельные смеси	Е%	Еср
	LOQ (0,4 нг/мл)			0,6 нг/мл			0,8 нг/мл			
НДМА	9328	9287	99,56	14147	14288	101,00	18666	18635	99,83	99,68
	9324	9273	99,45	14417	14487	100,49	18530	18488	99,77	
	9061	9041	99,78	14342	14087	98,22	18554	18378	99,05	
НДЕА	9213	9333	101,30	14487	14150	97,67	18277	18600	101,77	100,34
	9044	9338	103,25	14316	14507	101,33	18465	18305	99,13	
	9156	9108	99,48	14169	14127	99,70	18662	18558	99,44	

Продолжение таблицы 28

НМБА	121412	121411	100,00	182009	182018	100,00	240694	240390	99,87	99,96
	121530	121018	99,58	182035	182076	100,02	240188	240239	100,02	
	121164	121425	100,22	182012	181960	99,97	240605	240525	99,97	
НЭИПА	9354	9110	97,39	14396	14117	98,06	18458	18700	101,31	99,76
	9149	9129	99,78	14361	14170	98,67	18226	18634	102,24	
	9225	9032	97,91	14037	14465	103,05	18597	18491	99,43	
Фармацевтическая субстанция Ирбесартана										
	Калибровка	Модельные смеси	Е%	Калибровка	Модельные смеси	Е%	Калибровка	Модельные смеси	Е%	Еср
	LOQ (0,4 нг/мл)			0,6 нг/мл			0,8 нг/мл			
НДМА	9121	9264	101,57	14444	14121	97,76	18583	18396	98,99	100,30
	9069	9267	102,18	14129	14525	102,80	18510	18230	98,49	
	9023	9114	101,01	14332	14233	99,31	18457	18572	100,62	
НДЕА	9129	9169	100,44	14444	14279	98,86	18509	18222	98,45	100,01
	9274	9318	100,47	14111	14072	99,72	18248	18337	100,49	
	9166	9071	98,96	14087	14487	102,84	18646	18634	99,94	
НМБА	121055	121021	99,97	182027	181800	99,88	239034	237573	99,39	99,77
	121446	121077	99,70	182047	181895	99,92	238497	237698	99,67	
	121269	121164	99,91	181894	181926	100,02	241908	240762	99,53	
НЭИПА	9027	9055	100,31	14528	14160	97,47	18434	18526	100,50	99,72
	9158	9243	100,93	14039	14191	101,08	18608	18404	98,9037	
	9278	9126	98,36	14369	14335	99,76	18338	18382	100,24	

Продолжение таблицы 28

Таблетки Валсартана										
	Калибровка	Модельные смеси	Е%	Калибровка	Модельные смеси	Е%	Калибровка	Модельные смеси	Е%	Еср
	LOQ (0,4 нг/мл)			0,6 нг/мл			0,8 нг/мл			
НДМА	9304	9229	99,19	14364	14410	100,32	18691	18429	98,60	99,84
	9103	9350	102,71	14324	14069	98,22	18261	18233	99,85	
	9193	9330	101,49	14349	14089	98,19	18450	18463	100,07	
НДЕА	9114	9047	99,26	14278	14281	100,02	18393	18491	100,53	99,44
	9056	9013	99,53	14223	14150	99,49	18689	18428	98,60	
	9098	9037	99,33	14224	14172	99,63	18567	18313	98,63	
НМБА	121020	121189	100,14	181874	181911	100,02	240964	240931	99,99	99,93
	121137	121129	99,99	182059	181934	99,93	240884	240013	99,64	
	121425	121340	99,93	182031	181972	99,97	240714	240322	99,84	
НЭИПА	9300	9252	99,48	14313	14539	101,58	18461	18561	100,54	101,09
	9007	9001	99,93	14114	14471	102,53	18318	18582	101,44	
	9204	9356	101,65	14248	14452	101,43	18375	18600	101,22	
Таблетки Лозартана										
	Калибровка	Модельные смеси	Е%	Калибровка	Модельные смеси	Е%	Калибровка	Модельные смеси	Е%	Еср
	LOQ (0,4 нг/мл)			0,6 нг/мл			0,8 нг/мл			
НДМА	9023	9162	101,54	14250	14511	101,83	18280	18490	101,15	100,94
	9268	9129	98,50	14050	14546	103,53	18259	18343	100,46	
	9053	9202	101,65	14473	14273	98,62	18353	18580	101,24	

Продолжение таблицы 28

НДЕА	9080	9228	101,63	14268	14400	100,93	18586	18234	98,11	100,08
	9166	9180	100,15	14449	14140	97,86	18454	18696	101,31	
	9277	9233	99,53	14059	14107	100,34	18299	18469	100,93	
НМБА	121184	121469	100,24	181979	181924	99,97	240591	240488	99,96	99,98
	121530	121550	100,02	182028	181815	99,88	240447	240775	100,14	
	121515	121171	99,72	181835	181938	100,06	240895	240728	99,93	
НЭИПА	9281	9110	98,16	14180	14126	99,62	18258	18319	100,33	99,71
	9157	9246	100,97	14275	14512	101,66	18686	18527	99,15	
	9104	9010	98,97	14434	14091	97,62	18435	18617	100,99	
Таблетки Ирбесартана										
	Калибровка	Модельные смеси	Е%	Калибровка	Модельные смеси	Е%	Калибровка	Модельные смеси	Е%	Еср
	LOQ (0,4 нг/мл)			0,6 нг/мл			0,8 нг/мл			
НДМА	9239	9035	97,79	14123	14324	101,42	18400	18530	100,71	99,67
	9243	9334	100,98	14213	14129	99,41	18650	18501	99,20	
	9204	9208	100,04	14209	14075	99,06	18651	18371	98,50	
НДЕА	9157	9193	100,39	14083	14520	103,10	18673	18369	98,37	100,37
	9088	9081	99,92	14339	14077	98,17	18301	18600	101,63	
	9149	9127	99,76	14425	14513	100,61	18271	18526	101,40	
НМБА	121469	121242	99,81	181935	181911	99,99	240325	240085	99,90	100,02
	121279	121393	100,09	182095	181840	99,86	240058	240921	100,36	
	121199	121171	99,98	181891	182061	100,09	240516	240886	100,15	
НЭИПА	9290	9016	97,05	14052	14509	103,25	18591	18210	97,95	99,97
	9334	9233	98,92	14396	14371	99,83	18462	18609	100,80	
	9210	9328	101,28	14184	14113	99,50	18345	18573	101,24	

Таким образом, данные, приведенные в таблице 28 соответствуют критериям приемлемости. Все полученные значения открываемости находятся в диапазоне критерия приемлемости 80 – 120 %, а $RSD \leq 10\%$.

4.4.6. Прецизионность

Для определения прецизионности разработанной ВЭЖХ-МС/МС методики проводили оценку результатов сходимости. Для проведения испытания использовались модельные смеси с концентрациями исследуемых нитрозаминов 0,2 нг/мл. Главным критерием приемлемости методики при оценке сходимости являлся $RSD \leq 10\%$.

Таблица 29. Оценка прецизионности методики ВЭЖХ-МС/МС

Повтор Наименование		1	2	3	4	5	6	RSD%
НДМА	Площадь пика	4990	4836	4957	4903	4769	4752	2,01
НДЕА		4724	4871	4686	4985	4708	4693	2,56
НМБА		58854	59844	58026	60996	59899	58854	1,76
НЭИПА		4864	4973	4705	4724	4829	4948	2,29

Таким образом, из таблицы 29 следует, что при оценке показателя сходимости $RSD \leq 10$. Данный показатель удовлетворяет заявленному критерию приемлемости, что свидетельствует о высокой точности и воспроизводимости разработанной методики.

4.4.7. Стабильность

Для определения стабильности калибровочных растворов использовали стандартные растворы нитрозаминов с концентрацией 1,1 нг/мл и свежеприготовленные стандартные растворы с аналогичной концентрацией. Растворы хранили в темном месте при комнатной температуре в течение двух дней после приготовления. В качестве раствора сравнения использовали свежеприготовленный калибровочный раствор. Главным критерием приемлемости для показателя стабильности калибровочных растворов являлось сохранение концентрации примесей в диапазоне от 95 – 105 %.

Для определения стабильности модельных смесей использовали модельные смеси валсартана, лозартана и ирбесартана с добавлением нитрозаминов до получения концентрации 1,1 нг/мл и свежеприготовленные модельные смеси с аналогичной концентрацией. Растворы хранили в темном месте при комнатной температуре в течение

двух дней после приготовления. В качестве раствора сравнения использовали свежеприготовленный раствор модельной смеси. Главным критерием приемлемости для показателя стабильность модельных смесей являлось сохранение концентрации примесей нитрозаминов в диапазоне от 95 – 105 %.

Таблица 30. Стабильность калибровочных растворов и модельных смесей

Калибровочные растворы							
Средняя площадь пика N=5 для каждого испытуемого				E%			
Свежеприготовленный раствор 1,1 нг/мл			Тест раствор				
НДМА	25637		24725				96,4
НДЕА	25449		24287				95,4
НМБА	333812		320163				95,9
НЭИПА	25501		24962				97,8
Модельные смеси Средняя площадь пика N=5 для каждого испытуемого							
Свежеприготовленный раствор			Тест раствор			E%	
	Валсартан	Лозартан	Ирбесартан	Валсартан	Лозартан	Ирбесартан	
НДМА	25331	25366	24598	23867	24479	23393	95,5
НДЕА	25304	25239	25428	24501	23472	24721	95,68
НМБА	328674	328975	329313	318645	319783	317576	96,86
НЭИПА	24987	25654	25697	24127	23723	24879	95,28

В результате проведенного исследования стабильности было установлено, что калибровочные растворы и модельные смеси сохраняют приготовленную концентрацию в течение двух суток при хранении в защищенном от света месте и комнатной температуре.

5. Определение содержания примесей нитрозаминов в лекарственных препаратах валсартана, лозартана и ирбесартана

В последнее время, проблема содержания нитрозаминов в фармацевтических субстанциях и ЛП является очень актуальной. Обоснованием этого является отсутствие данных о фактическом содержании примесей нитрозаминов в ЛП. В настоящий момент в обращении находится большое количество препаратов, для которых характерен высокий риск образования примесей нитрозаминов. В различных странах мира проводятся исследования различных ЛП на предмет содержания примесей нитрозаминов, по итогам которых принимаются решения об отзыве и приостановке обращения ЛП. Помимо этого,

часто обнаруживаются новые препараты, содержанию в которых нитрозаминов ранее не уделялось пристального внимания.

В РФ, согласно данным Росздравнадзора, из оборота была изъята 561 серия ЛП валсартана, лозартана и ирбесартана, однако до сих пор отсутствуют данные по содержанию нитрозаминов в ЛП разных производителей [114].

Для проведения контроля ЛП, нами были закуплены препараты с действующими веществами валсартан, лозартан и ирбесартан. Препараты закупались в соответствии с наличием действующих регистрационных удостоверений (РУ). Данные о действующих РУ размещены на сайте Государственный реестр лекарственных средств (ГРЛС). Подробная информация о препаратах представлена в главе 2.1. Пробы ЛП для анализа готовились согласно методике представленной в разделе 2.2. Для получения статистически значимого результата пробы готовились в трех параллелях, при получении положительного результата (определении нитрозаминов) анализ проводился повторно на свежеприготовленных образцах. Контроль образцов проводился с помощью разработанной методики ВЭЖХ-МС/МС. Данная методика была выбрана по причине наибольшей чувствительности, а также способности одновременного определения 4х нитрозаминов (НДМА, НДЕА, НМБА, НЕИПА). Параметры проведения анализа соответствуют главе 2.5.2.. Результаты определения представлены в таблице 31.

Таблица 31. Результаты проведенного определения нитрозаминов в ЛП валсартана, лозартана и ирбесартана. Номер ЛП соответствует номеру из таблицы 9

Название ЛП	№ хроматограммы	Уровень содержания нитрозаминов ppm	Норма содержания ppm
Вальсакор	Мон-1	0,0025	0,3
Диован	Мон-2	ниже предела обнаружения	0,3
Валсартан-СЗ	Мон-3	0,0062	0,3
Валсартан	Мон-4	ниже предела обнаружения	0,3
ВАЛСАРТАН	Мон-5	ниже предела обнаружения	0,3
Валз	Мон-6	ниже предела обнаружения	0,3
Валаар	Мон-7	ниже предела обнаружения	0,3
Сартавель	Мон-8	ниже предела обнаружения	0,3
Лозартан Канон	Мон-9	ниже предела обнаружения	0,96

Продолжение таблицы 31

Лозартан	Мон-10	ниже предела обнаружения	0,96
Лозартан	Мон-11	ниже предела обнаружения	0,96
Презартан	Мон-12	ниже предела обнаружения	0,96
Вазотенз	Мон-13	ниже предела обнаружения	0,96
Лозартан-тева	Мон-14	ниже предела обнаружения	0,96
Лозап®	Мон-15	0,005	0,96
Лозарел	Мон-16	ниже предела обнаружения	0,96
Козаар	Мон-17	ниже предела обнаружения	0,96
Лориста	Мон-18	ниже предела обнаружения	0,96
Ирбесартан	Мон-19	ниже предела обнаружения	0,32
Апровель	Мон-20	0,0013	0,32

В результате проведенного исследования, были обнаружены незначительные концентрации (в несколько раз меньше предельно допустимой концентрации) нитрозаминов в следующих препаратах таблица 32.

Таблица 32. Результаты исследований по определению содержания нитрозаминов в ЛП валсартана, лозартана и ирбесартана

Препарат	Производство	Номер РУ	Хроматограмма
Вальсакор	АО “КРКА, д.д., Ново место”	ЛСР-004921/08	Рисунок 29 – а
Валсартан-СЗ	НАО “Северная звезда”	ЛП-004219	Рисунок 29 – б
Лозап®	АО “Санофи Россия”	П N015897/01	Рисунок 29 – в,г
Апровель	Санофи Клир ЭсЭнСи	ЛП-001260	Рисунок 29 – д

На рисунке 31 представлены хроматограммы ЛП, в которых были обнаружены нитроамины.

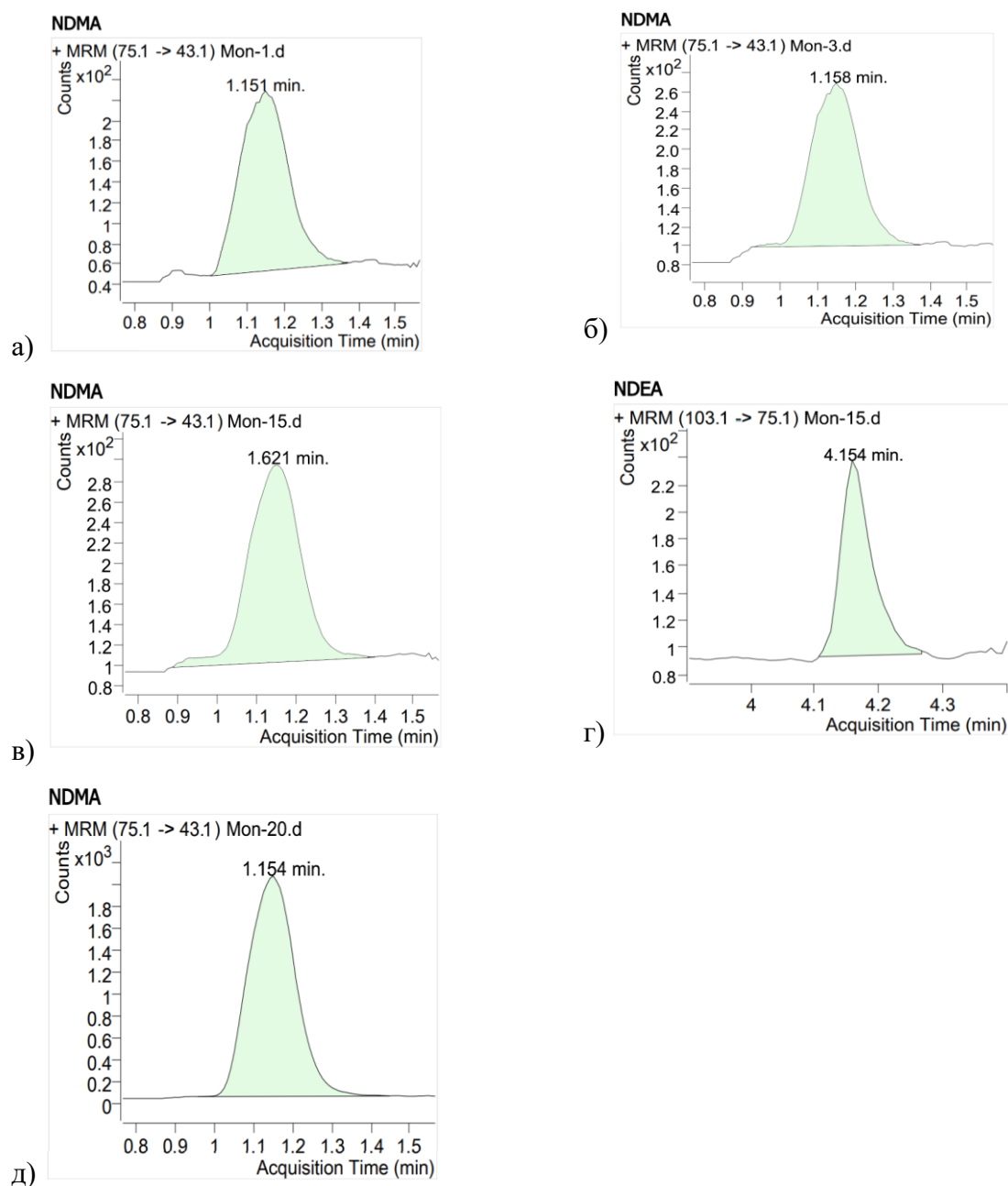


Рисунок 25. Хроматограммы ЛП, в которых были обнаружены нитрозамины. а) Содержание НДМА в ЛП “Вальсакор”, б) Содержание НДМА в ЛП “Валсартан-С3”, в) Содержание НДМА в ЛП “Лозап”, г) Содержание НДЕА в ЛП “Лозап”, Содержание НДМА в ЛП “Апровель”

Таким образом, в результате проведенного исследования двадцати ЛП валсартана, лозартана и ирбесартана, находящихся в обращении в РФ в настоящий момент, в 4х были обнаружены генотоксичные примеси нитрозаминов в количествах, не превышающих предельно допустимое содержание. Помимо этого, экспериментально подтверждена возможность использования разработанной методики ВЭЖХ-МС/МС для количественного определения НДМА, НДЕА, НМБА, НЭИПА в промышленной продукции [115, 116].

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. В результате информационно-аналитического исследования литературных данных, посвященных генотоксичным примесям нитрозаминов, были рассмотрены основные подходы к определению генотоксичных примесей в лекарственных препаратах валсартана, лозартана и ирбесартана. В результате проведенного исследования установлено, что согласно литературным данным, для определения нитрозаминов целесообразно использовать методики, основанные на масс-спектрометрическом способе детектирования (ГХ-МС, ВЭЖХ-МС).
2. Проведено экспериментальное исследование существующих методик определения нитрозаминов в фармацевтических субстанциях и лекарственных препаратах валсартана, лозартана и ирбесартана с использованием метода ГХ-МС (прямой ввод) ГХ-МС (headspace). Основным недостатком методики ГХ-МС (прямой ввод) является засорение септы, лайнера и колонки высокой концентрацией фармацевтической субстанции. Основным недостатком методики ГХ-МС (headspace) является низкая чувствительность (0,3 ppm) на уровне установленного норматива для НДМА и НДЕА.
3. Разработаны универсальные, высокочувствительные и селективные методики определения примесей нитрозаминов в лекарственных средствах валсартана, лозартана и ирбесартана с использованием методов высокоэффективной жидкостной хроматографии и газовой хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС и ГХ-МС/МС) отличающиеся от существующих высокой чувствительностью (LOQ=0,4 нг/мл, 5 нг/мл для ВЭЖХ-МС/МС и ГХ-МС/МС соответственно) и способностью определять нитрозамины как в фармацевтических субстанциях, так и в лекарственных препаратах. Помимо этого, методика ВЭЖХ-МС/МС определяет все нормируемые в настоящий момент нитроамины (НДМА, НДЕА, НМБА, НЭИПА).
4. Разработанные методики валидированы по таким характеристикам как специфичность, линейность, правильность, прецизионность, предел количественного определения, предел обнаружения, стабильность. Предел количественного определения у методик ГХ-МС/МС и ВЭЖХ-МС/МС установлен на уровне 5 нг/мл и 0,4 нг/мл соответственно. Корреляционный коэффициент разработанных методик $r^2 > 0,99$, что соответствует общепринятым критериям приемлемости по показателю линейность. RSD методик находился в пределах 10%, что свидетельствует о высокой прецизионности.

5. С применением разработанных методик проведено определение содержания примесей нитрозаминов в лекарственных препаратах валсартана, лозартана и ирбесартана, находящихся в обращении в Российской Федерации. Установлены незначительные содержания примесей нитрозаминов в препаратах: «Вальсакор», «Валсартан-СЗ», «Лозап», «Апровель». Обнаруженные концентрации значительно ниже (в 100 раз) установленного норматива на содержание нитрозаминов в лекарственных средствах.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Разработанные универсальные методики определения генотоксичных примесей нитрозаминов в лекарственных средствах могут быть использованы в контроле качества лекарственных средств валсартана, лозартана и ирбесартана на всех стадиях обращения.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Разработанные универсальные методики открывают возможность проведения дальнейших исследований в направлении совершенствования методов контроля качества лекарственных средств и повышения уровня их стандартизации. Предложенные подходы к определению низких концентраций примесей с применением методик тандемной масс-спектрометрии могут быть использованы в исследованиях других лекарственных средств на предмет содержания генотоксичных примесей нитрозаминов.

ВНЕДРЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработанные методики определения примесей нитрозаминов в лекарственных препаратах группы сартанов ВЭЖХ-МС/МС и ГХ-МС/МС в работу Департамента регуляторной деятельности фармацевтической компании АО «Фармстандарт» и отдела контроля качества ООО «Глобалхимфарм». Акт внедрения см. приложение А.

Список сокращений и условных обозначений

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

УВЭЖХ – ультравысокоэффективная жидкостная хроматография

ГХ – газовая хроматография

УФ – ультрафиолет

DAD – диодно-матричный детектор

ИК – инфракрасная спектроскопия

ПИД – пламенно ионизационный детектор

ПФД – пламенно фотометрический детектор

МС – масс-спектрометрия

МС/МС – тандемная масс-спектрометрия

ЛС – лекарственное средство

ЛРП – лекарственный растительный препарат

ЛП – лекарственный препарат

FDA – Food and Drug Administration (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов)

EMA – European Medicinal Agency (Европейское агентство лекарственных средств)

РУ – регистрационное удостоверение

НДМА – N-нитрозодиметиламин

НДЕА – N-нитрозодиэтиламин

НМБА (BMSA) – N-нитрозо-4-метил-аминобутановая кислота

НЕИПА - N-нитрозоэтилизопропиламин

ОФС – общая фармакопейная статья

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ICH – The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (Международная конференция по гармонизации

технических требований к регистрации фармацевтических продуктов, предназначенных для применения человеком)

ПДК – предельно допустимая концентрация

ТТС – порог токсикологической значимости

ТСХ – тонкослойная хроматография

LOQ – Limit of Quantitation (Предел количественного определения)

LOD – Limit of Detection (Предел обнаружения)

EDQM – European Directorate for the Quality of Medicines (Европейский директорат по качеству лекарственных средств для здравоохранения)

HS – headspace (установка для проведения парофазного анализа)

ГФ РФ – Государственная фармакопея Российской Федерации

ESI – электроспрей

APCI – хеоимонизация

RSD – относительное стандартное отклонение

ГРЛС – Государственный реестр лекарственных средств

MRM - множественный контроль реакций

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

Список литературы

1. Pifferi G. Drug impurities: problems and regulations / G Pifferi, A Mannucci. // *Boll Chim Farm.* – 1999. – №138(10). – P.500-507.
2. Kaṭny M. Impurities in Drug Products and Active Pharmaceutical Ingredients / M Kaṭny, M Frankowski. // *Crit Rev Anal Chem.* – 2017. – №47(3). – P.187–193.
3. Galloway SM. International regulatory requirements for genotoxicity testing for pharmaceuticals used in human medicine, and their impurities and metabolites / SM Galloway // *Environ Mol Mutagen.* – 2017. – №58(5). – P.296–324.
4. Stammberger I. / I Stammberger, A Czich, K Braun. // *Drug Discovery and Evaluation: Safety and Pharmacokinetic Assays.* – 2013. – P.1297–1315.
5. Weiss B. Pesticides / B Weiss, S Amler, R.W. Amler // *Pediatrics.* – 2004. – №113. – P.1030-1036.
6. Bolognesi C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies / C Bolognesi. // *Mutat Res.* – 2003. – №543(3). – P.251–272.
7. Monograph 467. Residual solvents. [Электронный ресурс] // USP-NF Online. URL: <https://www.uspnf.com/> (Дата обращения: 14.04.2020)
8. Committee for Human Medicinal Products ICH guideline Q3C (R6) on impurities: guideline for residual solvents. [Электронный ресурс] // EMA/CHMP/ICH/82260/2006. URL: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q3c-r6-residual-solvents> (дата обращения 11.02.2020)
9. Committee for Human Medicinal Products ICH guideline Q3D (R1) on elemental impurities. [Электронный ресурс] // EMA/CHMP/ICH/353369/2013. URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use_en-32.pdf (дата обращения 11.02.2020)
10. Committee for Human Medicinal Products ICH guideline M7(R1) on assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk. [Электронный ресурс] // EMA/CHMP/ICH/83812/2013. URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use_en-32.pdf (дата обращения: 11.02.2020)
11. Хорольский М.Д. Сравнительная оценка подходов определения примеси N-нитрозодиметиламина в фармацевтической субстанции валсартан методом газовой хроматографии с использованием масс-спектрометрического детектирования / М.Д.

- Хорольский, О.В. Ананьина, А.А. Чапленко, И.В. Недков, Н.В. Масленникова, Г.В. Раменская // *Химико-фармацевтический журнал*. – 2019. – Т.53, №8., 53-58 с..
12. Nguyen HQ, Stamatis SD, Kirsch LE. A Novel Method for Assessing Drug Degradation Product Safety Using Physiologically-Based Pharmacokinetic Models and Stochastic Risk Assessment / HQ Nguyen, SD Stamatis, LE Kirsch // *J Pharm Sci*. 2015. -№104(9). - P.3101-3119.
 13. Bruni J. Gabapentin / J Bruni // *Can J Neurol Sci*. -1996. -№23(4). -P.10-12.
 14. Gabapentin. [Электронный ресурс]. // USP-NF. URL: <https://www.uspnf.com/> (Дата обращения: 20.11.2019)
 15. Gabapentin [Электронный ресурс]. // Eur. Pharm. 10.0. URL: <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph-eur-10th-edition> (Дата обращения: 20.11.2019)
 16. Nataliya E. Kuz'mina. Development and Validation of 2-Azaspiro [4,5] Decan-3-One (Impurity A) in Gabapentin Determination Method Using qNMR Spectroscopy / Nataliya E. Kuz'mina, Sergey V. Moiseev, Mikhail D. Khorolskiy, Annd I. Lutceva. // *Molecules*. 2021. №26(6). -P.1656.
 17. Kumar T. A Simple and Direct LC-MS Method for Determination of Genotoxic Impurity Hydroxylamine in Pharmaceutical compounds / T. Kumar, M Ramya, V Srinivasan, N Xavier. // *J Chromatogr Sci*. – 2017. – №55(7). -P.683-689.
 18. Reddy A.V.B. Identification, control strategies, and analytical approaches for the determination of potential genotoxic impurities in pharmaceuticals: A comprehensive review / A.V.B. Reddy, J Jaafar, K Umar, Z.A. Majid, A.B. Aris, J Talib. // *Journal of Separation Science*. – 2015. – №38(5). – P. 764–779.
 19. FDA Updates and Press Announcements on Angiotensin II Receptor Blocker (ARB) Recalls (Valsartan, Losartan, and Irbesartan) [Электронный ресурс]. // FDA. URL: <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-updates-and-pressannouncements-angiotensin-ii-receptor-blocker-arb-recalls-valsartan-losartan> (Дата обращения: 20.11.2019)
 20. The EDQM's response to nitrosamine contamination [Электронный ресурс]. // EDQM. URL: <https://www.edqm.eu/en/edqms-response-nitrosamine-contamination> (Дата обращения: 14.04.2020)
 21. Masada S., Tsuji G., Arai R., Uchiyama N., Demizu Y., Tsutsumi T. Rapid and efficient high-performance liquid chromatography analysis of N-nitrosodimethylamine impurity in

- valsartan drug substance and its products / S Masada, G Tsuji, R Arai, N Uchiyama, Y Demizu, T Tsutsumi // *Scientific Reports*. – 2019. – №9(1).
22. Laboratory analysis of ranitidine and nizatidine products [Электронный ресурс]. // FDA. URL: <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/laboratory-tests-ranitidine> (Дата обращения: 14.04.2020)
23. FDA Updates and Press Announcements on NDMA in Zantac (ranitidine) [Электронный ресурс] // FDA. URL: <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-updates-and-press-announcements-ndma-zantac-ranitidine> (Дата обращения: 14.04.2020)
24. FDA Updates and Press Announcements on NDMA in Metformin [Электронный ресурс]. // FDA. URL: <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-updates-and-press-announcements-ndma-metformin> (Дата обращения: 14.04.2020)
25. Brown JL. N-Nitrosamines / JL Brown // *Occup Med*. – 1999. -№14(4). – P.839-848.
26. Breider F. Formation of N-nitrosamines by micelle-catalysed nitrosation of aliphatic secondary amines / F Breider, I Salihu, U von Gunten // *Environ Sci Process Impacts*. – 2018. – №20(10). – P.1479-1487.
27. Arikawa, Y., Wyman, P. E. E., Warren E. // *United States Patent*. – 1977. – №19(11).
28. Koszucka A. Thermal processing food-related toxicants: a review / A Koszucka, A Nowak. // *Crit Rev Food Sci Nutr*. – 2019. – №59(22). – P.3579-3596.
29. Al Bulushi I. Biogenic amines in fish: roles in intoxication, spoilage, and nitrosamine formation--a review / I Al Bulushi, S Poole, HC Deeth, GA Dykes. // *Crit Rev Food Sci Nutr*. – 2009. -№49(4). – P.369-377.
30. De Mey E. Volatile N-nitrosamines in meat products: Potential precursors, influence of processing, and mitigation strategies / E De Mey, H De Maere, H Paelinck, I Fraeye. // *Crit Rev Food Sci Nutr*. – 2017. – Vol.57, №13. – P.2909-2923.
31. Herrmann SS. Formation and mitigation of N-nitrosamines in nitrite preserved cooked sausages / SS Herrmann, K Granby, L Duedahl-Olesen // *Food Chem*. – 2015. – №174. – P.516–526.
32. Ardiana F. Valsartan / F Ardiana, Suciati, G Indrayanto // *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol*. – 2015. – №40. – P.431-493.
33. Al-Majed AR. Losartan: Comprehensive Profile / AR Al-Majed, E Assiri, NY Khalil, HA Abdel-Aziz // *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol*. – 2015. – №40. – P.159–194.
34. Taguchi I. Irbesartan, an angiotensin receptor blocker, exhibits metabolic, anti-inflammatory and antioxidative effects in patients with high-risk hypertension / I Taguchi, S Toyoda, K Takano // *Hypertens Res*. – 2013. – №36(7). – P.608–613.

35. Bernardez-Pereira S, Ramires FJA, de Melo RFT, Pereira-Barretto AC. Was the Enalapril Dose Too Low in the PARADIGM-HF Trial? / S Bernardez-Pereira, FJA Ramires, RFT de Melo, AC Pereira-Barretto // *Cardiol Rev.* – 2018. – №26(4), P.196-200.
36. Questions and answers on "Information on nitrosamines for marketing authorisation holders." [Электронный ресурс]. // EMA. URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/nitrosamines-emea-h-a53-1490-questions-answers-information-nitrosamines-marketing-authorisation_en.pdf Accessed: 11.02.2020
37. Roh, J., Vávrová, K., & Hrabálek, A. Synthesis and Functionalization of 5-Substituted Tetrazoles / J Roh, K Vávrová, A Hrabálek. // *European Journal of Organic Chemistry.* – 2012. – №31. – P.6101-6118.
38. Zhang C. X. A simple and efficient synthesis of the valsartan / C.X. Zhang, G.J. Zheng, F. Q. Bi, Y.L. Li // *Chinese Chemical Letters.* – 2008. – №19(7). – P.759–761.
39. Ghosh S., Kumar A. S., Soundararajan R., Mehta G. N. Improved Synthesis of Valsartan via Nucleophilic Aromatic Substitution on Aryloxazoline / S. Ghosh, A.S. Kumar, R. Soundararajan, G.N. Mehta // *Synthetic Communications.* -2009. – №39(21). – P.3880–3887.
40. Committee on Prudent Practices for Handling, Storage, and Disposal of Chemicals in Laboratories, Board on Chemical Sciences and Technology, Commission on Physical Sciences, Mathematics, and Applications, National Research Council. Prudent practices in the laboratory: handling and disposal of chemicals. // National Academy Press. -1995.
41. Zou, Y. Yang, W. Wang. Synthesis of Valsartan / Zou J, Yang Y, Wang W. // Beijing Second Pharmaceutical Co., Ltd., Peop. Rep. - China. – 2009. p.8.
42. Jain S. Process for the Production of Sartans With High Purity / S Jain, R.S. Shekhawat, A.K. Tyagi // Jubilant Life Sciences Limited. - India. – 2012. - p.51.
43. Wang Y. Process for Preparation of Valsartan / Y. Wang, G. Zheng, G. Cai, B. Chen, H. Li. // Zhejiang Hisun Pharmaceutical Co., Ltd., Peop. Rep. -China. -2009. -p. 11.
44. Хорольский М.Д., Чапленко А.А., Власов А.М., Масленникова Н.В., Раменская Г.В. Примеси нитрозаминов в лекарственных препаратах: пути образования и механизмы токсического действия / М.Д. Хорольский, А.А. Чапленко, А.М. Власов, Н.В. Масленникова, Г.В. Раменская // *Медицина.* – 2019. – Т.7, №4. – С.12-24
45. CHMP Overall rapporteur's preliminary assessment report [Электронный ресурс]. // CHMP. URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/variation-report/pritor-h-c-210-ws-0254-epar-assessment-report-variation_en.pdf (Дата обращения: 14.04.2020)

46. Xiaoren Z. Improved Method for Preparing Tetrazole for Valsartan / Z. Xiaoren, S. Nianping, Z. Wenling, W. Peng // Zhejiang Huahai Pharmaceutical Co., Ltd. -2014. – p.11.
47. ICH Topic Q1A (R2) Stability Testing of new Drug Substances and Products [Электронный ресурс]. // ICH. URL: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q1a-r2-stability-testing-new-drug-substances-drug-products> (Дата обращения: 14.04.2020)
48. XIV ОФС.1.1.0009.15 Сроки годности лекарственных средств. [Электронный ресурс]. // Государственная Фармакопея Российской Федерации. URL: femb.ru (дата обращения 14.04.2020)
49. ICH Q3B (R2) Impurities in new drug products [Электронный ресурс]. // ICH. URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-3-b-r2-impurities-new-drug-products-step-5_en.pdf (Дата обращения: 14.04.2020)
50. Wang X. Effect of oxidation on amine-based pharmaceutical degradation and N-Nitrosodimethylamine formation / X Wang, H Yang, B Zhou, X Wang, Y Xie // Water Research. -2015. – №87. – P.403-411.
51. Juan L. Characterization of seven psychoactive pharmaceuticals as N-nitrosodimethylamine precursors during free chlorine and chlorine dioxide chlorination processes / L Juan, L Na // Journal of Chemical Technology & Biotechnology. – 2018. – №94(1). P. 53-62.
52. Shen R. Demonstration of 20 pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) as nitrosamine precursors during chloramine disinfection / R Shen, S.A. Andrews // Water Research. -2011. – №45(2). – P.944-952.
53. Parr M.K. NDMA Impurity in Valsartan and other Pharmaceutical Products: Analytical Methods for the Determination of N-Nitrosamines / M.K. Parr, J.F. Joseph // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2018. – №164. – P.536-549.
54. Shen R. Demonstration of 20 pharmaceuticals and personalcare products (PPCPs) as nitrosamine precursors during chloraminedisinfection / R Shen, S.A. Andrews // Water Res. – 2011. -№45. – P.944–952.
55. Leavey-Roback S.L. Veterinary antibiotics used inanimal agriculture as NDMA precursors / S.L. Leavey-Roback, S.W. Krasner, I.M. Suffet, // Chemosphere. – 2016. – №164. – P.330-338.
56. Lv J. Characterization of seven psychoactive pharmaceuticals asN-nitrosodimethylamine precursors during free chlorine and chlorinedioxide chlorination processes / J Lv, N Li // J. Chem. Technol. Biotechnol. – 2018. – №94(1). – P.53-62.
57. Lv J. Characterization of N-nitrosodimethylamine formationfrom the ozonation of ranitidine / J Lv, L Wang, Li Y // J. Environ. Sci. (China). – 2017. – №58. – P.116-126.

58. Zhang A. Characterization of pharmaceuticals and personal care products as N-nitrosodimethylamine precursors during disinfection processes using free chlorine and chlorine dioxide / A. Zhang, Y Li, Y Song, J Lv, J Yang. // *J. Hazard. Mater.* – 2014. – №276. – P.499–509.
59. Wang X. Effect of oxidation on amine-based pharmaceutical degradation and N-Nitrosodimethylamine formation / X. Wang, H. Yang, B. Zhou, X. Wang, Y. Xie. // *Water Res.* – 2015. – №87. – P.403–411.
60. Hanigan D. LC/QTOF-MS fragmentation of N-nitrosodimethylamine precursors in drinking water supplies is predictable and aids their identification / D Hanigan, I Ferrer, E.M. Thurman, P Herckes, P Westerhoff. // *J. Hazard. Mater.* – 2017. – №323. – P.18-25.
61. Sheweita S.A. N-nitrosamines induced infertility and hepatotoxicity in male rabbits / S.A. Sheweita, Y.Y. El Banna, M Balbaa, I.A. Abdullah, H.E. Hassan // *Environ. Toxicol.* – 2017. – №(32)9. – P.2212-2220.
62. Sharma V. Attenuation of N-nitrosodimethylamine induced hepatotoxicity by *Operculina turpethum* in Swiss Albino mice / V. Sharma, M Singh. // *Iran J Basic Med Sci.* – 2014. – Vol.17, №1. – P.73–80.
63. Zhang X. Mulholland, A. J. Multiscale analysis of enantioselectivity in enzyme-catalysed “lethal synthesis” using projector-based embedding / X Zhang, S.J. Bennie, M.W. van der Kamp, D.R. Glowacki, F.R. Manby, A.J. Mulholland // *Royal Society Open Science.* – 2018. – №5(2).
64. Allis J.W. Methanol potentiation of carbon tetrachloride hepatotoxicity: The central role of cytochrome P450 / J.W. Allis, B.L. Brown, J.E. Simmons, G.E. Hatch, A. McDonald, D.E. House // *Toxicology.* – 1996. – №112(2). – P.131-140.
65. Madden J.W. Dimethylnitrosamine-induced hepatic cirrhosis: a new canine model of an ancient human disease / J.W. Madden, P.M. Gertman, E.E. Peacock // *Surgery.* – 1970. – №68(1). – P.260-268
66. Integrated Risk Information System (IRIS) U.S. Environmental Protection Agency. Chemical Assessment Summary. National Center for Environment Assessment. // EU. URL: https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/subst/0045_summary.pdf (Дата обращения: 22.11.2019)
67. Jablonski J. The influence of very low doses of N-nitrosodimethylamine (NDMA) on the apoptosis of rat neutrophils in vivo. The role of reactive oxygen species / J Jablonski, E Jablonska, M Chojnowski // *Toxicology.* – 2001. – №165(1). – P.65-74.

68. Peto R. Effects on 4080 rats of chronic ingestion of N-nitrosodiethylamine or N-nitrosodimethylamine: a detailed dose-response study / R Peto, R Gray, P Brantom, P Grasso. // *Cancer Res.* – 1991. – №51(23). – P.6415-6451.
69. Souliotis V. L., Henneman J. R., Reed C. D., Chhabra S. K., Diwan B. A., Anderson L. DNA adducts and liver DNA replication in rats during chronic exposure to N-nitrosodimethylamine (NDMA) and their relationships to the dose-dependence of NDMA hepatocarcinogenesis / V.L. Souliotis, J.R. Henneman, C.D. Reed, S.K. Chhabra, B. W. Diwan, L. Anderson. // *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* – 2002. – №500(1). – P.75–87.
70. FDA updates table of interim limits for nitrosamine impurities in ARBs [Электронный ресурс]. // FDA. URL: <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-updates-and-press-announcements-angiotensin-ii-receptor-blocker-arb-recalls-valsartan-losartan> (Дата обращения: 14.04.2020)
71. Temporary interim limits for NMBA, DIPNA and EIPNA impurities in sartan blood pressure medicines [Электронный ресурс]. // EMA. URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/temporary-interim-limits-nmba-dipna-eipna-impurities-sartan-blood-pressure-medicines_en.pdf (Дата обращения: 12.02.2020)
72. Iwaniuk A. N-nitrosodimethylamine (NDMA) induced apoptosis dependent on Fas/FasL complex in human leukocytes / A Iwaniuk, K Grubczak, W Ratajczak-Wrona, M Garley, K Nowak, E Jabłońska. // *Hum Exp Toxicol.* – 2019. – №38(5). – P.578–587.
73. Souliotis VL. Dosimetry of O6-methylguanine in rat DNA after low-dose, chronic exposure to N-nitrosodimethylamine (NDMA) / VL Souliotis, S Chhabra, LM Anderson, SA Kyrtopoulos. Implications for the mechanism of NDMA hepatocarcinogenesis // *Carcinogenesis.* – 1995. №16(10). – P.2381-2387.
74. Peto R. Effects on 4080 rats of chronic ingestion of N-nitrosodiethylamine or N-nitrosodimethylamine: a detailed dose-response study / R Peto, R Gray, P Brantom, P Grasso. // *Cancer Res.* – 1991. – №51. – P.6415-6451.
75. Wang HY. Genotoxicity of a Low-Dose Nitrosamine Mixture as Drinking Water Disinfection Byproducts in NIH3T3 Cells / HY Wang, M Qin, L Dong, JY Lv, X Wang // *Int J Med Sci.* – 2017. – №14(10). – P.961-969.
76. Nakae D. Involvement of 8-hydroxyguanine formation in the initiation of rat liver carcinogenesis by low dose levels of N-nitrosodiethylamine / D Nakae, Y Kobayashi, H Akai, N Andoh, H Satoh, K Ohashi. // *Cancer Res.* – 1997. – №57(7). – P.1281-1287.

77. Jorquera R. DNA single-strand breaks and toxicity induced by 4-(methyl-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone or N-nitrosodimethylamine in hamster and rat liver / R Jorquera, A Castonguay, HM Schuller // *Carcinogenesis*. – 1994. – №15(2). – P.389-394.
78. TOXICOLOGICAL PROFILE FOR N-NITROSODIMETHYLAMINE. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) U.S. Public Health Service In collaboration with U.S. Environmental Protection Agency (EPA) [Электронный ресурс]. // ASTDR. URL: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp141.pdf> (Дата обращения: 14.04.2020)
79. Определение летучих N-нитрозаминов в продовольственном сырье и пищевых продуктах [Электронный ресурс]. // МУК 4.4.1.011-93. URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200031689> (дата обращения: 20.11.2019).
80. Lu S, Wu D, Li G, Lv Z, Gong P, Xia L. Facile and sensitive determination of N-nitrosamines in food samples by high-performance liquid chromatography via combining fluorescent labeling with dispersive liquid-liquid microextraction / S Lu, D Wu, G Li, Z Lv, P Gong, L Xia // *Food Chem*. – 2017. – №234. – P.408–415.
81. Sannino A. Bolzoni L. GC/CI-MS/MS method for the identification and quantification of volatile N-nitrosamines in meat products / A. Sannino, L Bolzoni // *Food Chem*. – 2013. – №141(4). – P.3925-3930.
82. Loukotková L. A simple and highly sensitive UPLC-ESI-MS/MS method for the simultaneous quantification of nicotine, cotinine, and the tobacco-specific carcinogens N'-nitrosonornicotine and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in serum samples / L Loukotková, LC VonTungeln, M Vanlandingham, GG da Costa // *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. – 2018. – №1072. – P.229-234.
83. Kühne F. N-nitrosamines migrating from food contact materials into food simulants: analysis and quantification by means of HPLC-APCI-MS/MS / F Kühne, O Kappenstein, S Straßgütl, F Weese, J Weyer, K Pfaff // *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. – 2018. – №35(4). – P.792–805.
84. Lehotay SJ. Analysis of Nitrosamines in Cooked Bacon by QuEChERS Sample Preparation and Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry with Backflushing / SJ Lehotay, Y Sapozhnikova, L Han, JJ Johnston // *J Agric Food Chem*. – 2015. – №63(47). – P.10341–10351.
85. Xian Y. Ice-bath assisted sodium hydroxide purification coupled with GC–MS/MS analysis for simultaneous quantification of ethyl carbamate and 12 N-nitrosoamines in yellow rice wine and beer / Y Xian, Y Wu, H Dong, M Liang, B Wang, L Wang // *Food Chemistry*. – 2019. – №300.

86. Cintya H. Analysis of Nitrosamines in Processed Meat Products in Medan City by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry / H Cintya, J Silalahi, EL Putra, R Siburian // Open Access Maced J Med Sci. – 2019. №7(8). – P.1382-1387.
87. Hong Y. Simple quantification method for N-nitrosamines in atmospheric particulates based on facile pretreatment and GC-MS/MS / Y Hong, KH Kim, BI Sang, H Kim // Environ Pollut. -2017. – №226. – P.324-334.
88. Topuz E. Practical LC-MS/MS Method for the Detection of NDMA at Nanogram per Liter Concentrations in Multiple Water Matrices / E. Topuz E, E. Aydin, E. Pehlivanoglu-Mantas // Water Air Soil Pollut. – 2012. – №223. – P. 5793-5802.
89. Wang W. Determination of N-nitrosodimethylamine in drinking water by UPLC-MS/MS / W Wang, J Hu, J Yu, M Yang. // Journal of Environmental Sciences. – 2010. – №22(10). – P.1508-1512.
90. Combined Direct Injection N-Nitrosodimethylamine (NDMA) and NNitrosodiethylamine (NDEA) Impurity Assay by GC/MS [Электронный ресурс]. // URL: <https://www.fda.gov/media/117807/download> (дата обращения 14.04.2020)
91. GC/MS Headspace Method for Detection of NDMA in Valsartan Drug Substance and Drug Products [Электронный ресурс]. // FDA. URL: <https://www.fda.gov/media/115965/download> (Дата обращения: 14.04.2020)
92. Combined Direct Injection N-Nitrosodimethylamine (NDMA), N-Nitrosodiethylamine (NDEA), N-Nitrosoethylisopropylamine (NEIPA), N-Nitrosodiisopropylamine (NDIPA), and N-Nitrosodibutylamine (NDBA) Impurity Assay by GC-MS/MS [Электронный ресурс]. // FDA. URL: <https://www.fda.gov/media/123409/download> (Дата обращения: 14.04.2020)
93. Combined Headspace N-Nitrosodimethylamine (NDMA), N-Nitrosodiethylamine (NDEA), N-Nitrosoethylisopropylamine (NEIPA), and N-Nitrosodiisopropylamine (NDIPA) Impurity Assay by GC-MS/MS [Электронный ресурс]. // FDA. URL: <https://www.fda.gov/media/124025/download> (Дата обращения: 14.04.2020)
94. Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS) Method for the Determination of Six Nitrosamine Impurities in ARB Drugs [Электронный ресурс]. FDA. URL: <https://www.fda.gov/media/125478/download> (Дата обращения: 14.04.2020)
95. Nikolin B. High performance liquid chromatography in pharmaceutical analyses / B Nikolin, B Imamović, S Medanhodžić-Vuk, M Sober // Bosn J Basic Med Sci. – 2004. – №4(2). – P.5-9.

96. Levin S. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) in the Pharmaceutical Analysis / S Levin // *Pharmaceutical Sciences Encyclopedia*. – 2010.
97. Erni F. Use of high-performance liquid chromatography in the pharmaceutical industry / F Erni // *Journal of Chromatography A*. – 1990. – №507. – P.141-149.
98. Guillarme D. New insights in pharmaceutical analysis / D Guillarme, J Schappler, J Bocard, JL Veuthey, S Rudaz // *Chimia (Aarau)*. – 2012. – №66(5). – P.330-334.
99. Tassi M. Advances in native high-performance liquid chromatography and intact mass spectrometry for the characterization of biopharmaceutical products / M Tassi, J De Vos, S Chatterjee, F Sobott, J Bones, S Eeltink // *J Sep Sci*. – 2018. – №41(1). – P.125–144.
100. Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) Method for the Determination of NDMA in Ranitidine Drug Substance and Solid Dosage Drug Product // [Электронный ресурс]. FDA. URL: <https://www.fda.gov/media/131868/download> (Дата обращения: 14.04.2020)
101. LC-MS/MS Method '190321_NMBA_APCI_POS_waste' (Shimadzu HPLC + Sciex QTrap 5500) [Электронный ресурс]. // EDQM. URL: https://www.edqm.eu/sites/default/files/de_lgl_losartan_method_parameters_nmiba_lcms.pdf (Дата обращения: 14.04.2020)
102. LC-MS/MS Method for the determination of NDEA and NMDA in Valsartan, Irbesartan and Losartan APIs and finished dosage forms (developed on a AB Sciex QTrap 5500) [Электронный ресурс] // EDQM. URL: https://www.edqm.eu/sites/default/files/medias/fichiers/Sartans/de-by-lc-ms_ls.pdf (Дата обращения: 14.04.2020)
103. Method for the determination of NDMA and NDEA by LC-MS/MS in Sartans (drug substance and film coated tablets) [Электронный ресурс]. // EDQM. URL: https://www.edqm.eu/sites/default/files/method_for_the_determination_of_ndma_and_nde_a_by_lc-msms_in_sartans_29-04-2019.pdf (Дата обращения: 14.04.2020)
104. Test method for the determination of NDMA by LC/MS/MS in Valsartan finished products [Электронный ресурс] // EDQM. URL: <https://www.edqm.eu/sites/default/files/omcl-method-determination-ndma-valsartan-cvua-september2018.pdf> (Дата обращения: 14.04.2020)
105. Determination of NDMA and NDEA in SARTAN drug substances by HPLC/UV [Электронный ресурс] // EDQM. URL: https://www.edqm.eu/sites/default/files/method_19a041601_ndma_and_nde_a_in_sartan_by_hplc-uv_-_ansm.pdf (Дата обращения: 14.04.2020)

106. Determination of NDMA in valsartan active substances and finished products by HPLC/UV [Электронный ресурс] // EDQM. URL: <https://www.edqm.eu/sites/default/files/omcl-method-determination-ndma-valsartan-ansm-september2018.pdf> (Дата обращения: 14.04.2020)
107. GC-MS Method for the determination of NDMA and NDEA in Sartan (Valsartan, Losartan, Candesartan, Irbesartan, Olmesartan) APIs (developed on a Shimadzu GC-MS QP 2020plus) [Электронный ресурс] // EDQM. URL: <https://www.edqm.eu/sites/default/files/medias/fichiers/Sartans/de-by-gc-ms.pdf> (Дата обращения: 14.04.2020)
108. Nitrosamines by GC-MS/MS. [Электронный ресурс] // EDQM. URL: https://www.edqm.eu/sites/default/files/medias/fichiers/OMCL/omcl_31_pv_171_nitrosamine_by_gc_ms_ms.pdf (Дата обращения: 12.04.2020)
109. Limit-test of NDMA and NDEA in Sartans by GC-MS (Liquid-direct-injection) [Электронный ресурс] // EDQM. URL: https://www.edqm.eu/sites/default/files/31_pv_163_nitrosamine_in_sartans_en_draft_swissmedic_v2.pdf (Дата обращения: 14.04.2020)
110. Sörgel F. The contamination of valsartan and other sartans, part 1: New findings. / F Sörgel, M Kinzig, M Abdel-Tawab, C Bidmon, A Schreiber, S Ermel. // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2019.
111. Tsutsumi T. Analysis of an impurity, N-nitrosodimethylamine, in valsartan drug substances and associated products using GC-MS / T tsutsumi, H Akiyama, Y Demizu, N Uchiyama, S Masada, G Tsuji // Biological and Pharmaceutical Bulletin. – 2019. – № 42(4). – P.547-551.
112. Валидация аналитических методик [Электронный ресурс]. // Государственная фармакопея Российской Федерации. URL: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php> (Дата обращения: 14.04.2020)
113. Хорольский М.Д. Разработка и валидация методики определения генотоксичных примесей нитрозаминов в фармацевтических субстанциях лозарта и ирбесартана методом ГХ-МС/МС // В сборнике: Современная медицина: новые подходы и актуальные исследования. Сборник статей по материалам XLIII международной научно-практической конференции. Москва. – 2020. – С. 96-103.
114. В связи с распространением в СМИ недостоверной информации о качестве препаратов из группы «сартанов», Росздравнадзор заявляет следующее

[Электронный ресурс] // Государственная фармакопея Российской Федерации. URL: <https://www.roszdravnadzor.ru/news/17556> (Дата обращения: 14.04.2020)

115. Хорольский М.Д., Власов А.М., Масленникова Н.В., Раменская Г.В. Определение содержания нитрозаминов в лекарственных препаратах валсартана, лозартана и ирбесартана находящихся в обращении в Российской Федерации / М.Д. Хорольский, А.М. Власов, Н.В. Масленникова [и др.] // Вестник современных исследований. – 2020. - №8-1 (38). – С.64-69.
116. Хорольский М.Д. Экспериментальная апробация методик определения примесей нитрозаминов в фармацевтических субстанциях валсартана, лозартана и ирбесартана // В сборнике: Естественные и медицинские науки. Студенческий научный форум. Сборник статей по материалам XXXIV студенческой международной научно-практической конференции. – Москва. – 2020 – С. 56-60.

Приложение А

Акты внедрения



АО «Фармстандарт»
141700, Россия,
Московская область, г. Долгопрудный
Лихачевский проезд, д. 5 «Б»
тел./факс: (495) 970-00-30/32
e-mail: info@pharmstd.ru
ИНН 02741 10679
ОГРН 1060274031047

АКТ

о внедрении результатов диссертации Хорольского Михаила Дмитриевича
в рабочий процесс Департамента регуляторной деятельности АО «Фармстандарт».

Мы, нижеподписавшиеся, подтверждаем, что основные научные положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации

Хорольского Михаила Дмитриевича

(фамилия, имя, отчество)

на тему: «Разработка и валидация методик определения примесей с потенциальной генотоксичностью при стандартизации фармацевтических субстанций»

(название диссертации)

внедрены в рабочий процесс Департамента регуляторной деятельности Акционерного общества «Фармстандарт» и используются при разработке методов контроля качества выпускаемых препаратов на производственных площадках ГК Фармстандарт.

Директор по
регуляторным и
медицинским вопросам

(название должности)



(подпись)

Власов А.М.



Общество с ограниченной ответственностью "ГЛОБАЛХИМФАРМ"
 143405, Московская обл., Красногорский р-он, г. Красногорск,
 Ильинское шоссе, д. 1А, офис 32,2 С
 Обособленное подразделение: 141707, Московская обл., г. Долгопрудный,
 Лихачевский проезд, д. 7, строение 39
 ИНН 5024155443 КПП 502401001

АКТ

О внедрении результатов диссертации Хорольского Михаила Дмитриевича
 в рабочий процесс отдела контроля качества ООО «ГЛОБАЛХИМФАРМ»

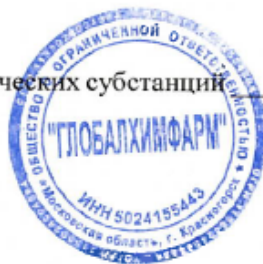
Мы, нижеподписавшиеся, подтверждаем, что основные научные
 положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации

Хорольского Михаил Дмитриевича

на тему: «Разработка и валидация методик определения примесей с потенциальной
 генотоксичностью при стандартизации фармацевтических субстанций»

внедрены в рабочий процесс отдела контроля качества ООО
 «ГЛОБАЛХИМФАРМ»

Руководитель службы
 разработки и валидации
 методов анализа фармацевтических субстанций



Сидякин С.С.

Сидякин С.С.