

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Москва – 2022

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Научный руководитель:

Доктор фармацевтических наук, профессор

Раменская Галина Владиславовна

Официальные оппоненты:

Эпштейн Наталья Борисовна, доктор фармацевтических наук, профессор, Обнинский институт атомной энергетики – филиал Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский ядерный университет «Московский инженерно-физический Институт», отделение биотехнологий

Перова Ирина Борисовна, кандидат фармацевтических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи, лаборатория метаболомного и протеомного анализа

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «16» марта 2022 г. В 13:00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.002.01 при ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д.8, стр. 2

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной медицинской библиотеке ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу 119034 г. Москва, Зубовский бул., д. 37/1 и на сайте организации <http://sechenov.ru>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2022 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета ДСУ 208.002.01
доктор фармацевтических наук, профессор

Селиванова Ирина Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 показателям 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, *N*-этил-*N*-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 варианту детектирования 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, *N*-этил-*N*-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 лекарственных препаратах (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, описанные 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 обеспечивающие 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.

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 валсартана, лозартана и ирбесартана 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 результатов исследования

Основные положения и результаты исследований доложены на конференции: Естественные и медицинские науки. Студенческий научный форум. (г. Москва, 2021г.) Апробация работы 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).

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.

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.

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.

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.

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)).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Оборудование: Газовый хроматограф Agilent 7890А с масс-спектрометрическим детектором MSD 5975С; газовый хроматограф Agilent 7890В с масс-спектрометрическим детектором MSD 7010 Triple Quad; установка для отбора паровой фазы Agilent Headspace 7694Е; высокоэффективный жидкостной хроматограф Agilent 1260 Infinity II с масс-спектрометрическим детектором MSD 6460 Triple Quad; высокоэффективный жидкостной хроматограф Agilent 1260 Infinity II с масс-спектрометрическим детектором Sciex 6500 QTRAP; фильтры нитроцеллюлозные 0,45 мкм Merck (Millipore), система водоподготовки Mili-Q; хроматографическая колонка Agilent HP-InnoWAX 30м, 0.32 мм, 0.5 мкм; хроматографическая колонка Poroshell 120 EC-C18, 3.0x50 мм, 2.7 мкм.

Стандартные образцы исследуемых примесей нитрозаминов: *N*-нитрозодиметиламин (НДМА) Supelco, Cat. №48670; *N*-нитрозодиэтиламин (НДЕА) Sigma-Aldrich, Cat. №sc-212252; *N*-нитрозо-4-метиламинобутановая кислота (НМБА) Sigma-Aldrich, Cat. №FN26379; *N*-нитрозоэтилизопропиламин (НЕИПА) Sigma-Aldrich, Cat. №1027167, 30.07.2023.

Фармацевтические субстанции: валсартан (Sigma-Aldrich, Cat. №SML0142; ≥98% (HPLC)); лозартан калия (Sigma-Aldrich, Cat. №61188; analytical standard); ирбесартан (Sigma-Aldrich, Cat. №I2286; ≥98% (HPLC))

Параметры температурного градиента и масс-спектрометрического детектирования при определении примесей НДМА и НДЕА с использованием метода ГХ-МС/МС представлены в таблице 1.

Таблица 1. Параметры температурного градиента и масс-спектрометрического детектирования

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
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

Параметры хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования при определении примесей НДМА, НДЕА, НМБА, НЕИПА с использованием разработанного метода ВЭЖХ-МС/МС представлены в таблице 3.

Таблица 2. Параметры хроматографического градиента и масс-спектрометрического детектирования при определении примесей НДМА, НДЕА, НМБА, НЕИПА с использованием разработанного метода 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			
	Материнский ион	Напряжение на фрагменторе	на	Дочерний ион 1	EI	Дочерний ион 2	EI
NDMA	75.1	30		43.1	17	58.1	13
NMBA	147.1	55		44.2	12	117.1	8
NDEA	103.1	75		75.1	9	29.1	13
NEIPA	117.1	50		47.1	17	75.1	17

Результаты исследования

Оценка исходных методик определения примесей нитрозаминов

В ходе проведения литературного обзора установлено, что методы, способные к точному определению нитрозаминов в ЛС валсартана, лозартана и ирбесартана с необходимой чувствительностью и селективностью, преимущественно представлены масс-спектрометрическим способом детектирования с различными вариантами хроматографического разделения.

Принимая во внимание физико-химические свойства исследуемых нитрозаминов, а именно их летучесть, для экспериментальной отработки были выбраны методики ГХ-МС (прямой ввод) и ГХ-МС (headspace), опубликованные на официальном сайте FDA. Критериями приемлемости исследуемых методик являлась их способность к быстрому и одновременному определению всех искомым нитрозаминов на уровне установленных норм допустимого содержания.

Проведенные исследования методики ГХ-МС (прямой ввод) установили, что несмотря на способность методики к одновременному определению 2х нитрозаминов (НДМА, НДЕА) в ЛС валсартана, лозартана и ирбесартана, ее использование в рутинном контроле качества не представляется возможным. Фармацевтические субстанции, в которых проводится определение, являются тяжело летучими соединениями и в описанных условиях анализа оседают в инжекторе, на септе, лайнере, а также задерживаются в хроматографической колонке. Визуально, это проявляется высокоинтенсивным пиком фармацевтической субстанции с приведенным временем удерживания 10,5 мин, свидетельствующим о неполном элюировании валсартана в процессе исходного анализа. (рисунок 1).

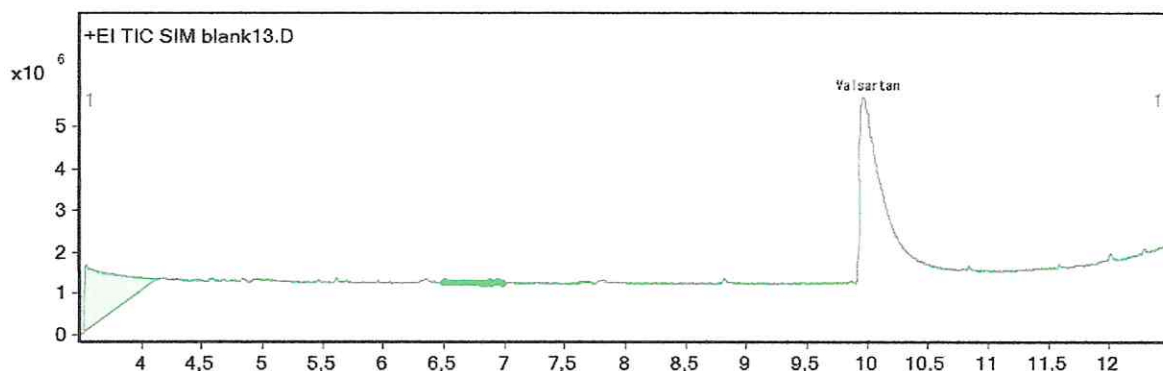


Рисунок 1. Типичная хроматограмма растворителя после анализа испытуемого раствора фармацевтической субстанции валсартана

Высокая концентрация фармацевтической субстанции отрицательно сказывается на применяемом оборудовании и требует проведения регулярной (один раз в 4 инъекции) остановки анализа для замены указанных выше расходников, а также очистки хроматографической колонки.

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.

В ходе проведения исследований методики ГХ-МС (Headspace) были выявлены существенные недостатки, основным из которых являлся предел количественного определения примесей нитрозаминов (НДМА, НДЕА) на уровне установленного норматива (0,15 мкг/мл), что соответствует 0,3 ppm в 500 мг субстанции. Дальнейшая разработка методики, основанной на использовании парофазного пробоотборника, была признана нецелесообразной.

Разработка методики ГХ-МС/МС

Основываясь на данных, полученных в ходе экспериментального исследования исходных методик было установлено, что основными недостатками существующих методов анализа нитрозаминов является их недостаточная чувствительность определения. Решением данной проблемы может являться использование высокочувствительных и селективных методик, основанных на тандемном масс-спектрометрическом определении с различными вариантами хроматографического разделения. Основываясь на физико-химических свойствах нитрозаминов была инициирована разработка методики ГХ-МС/МС, способной к одновременному определению 2х нитрозаминов (НДМА, НДЕА).

Разработка методики ГХ-МС/МС состояла из нескольких этапов. На первом этапе проводили отработку параметров хроматографической системы, а именно подбор условий температурного градиента и колонки таким образом, чтобы исследуемые фармацевтические субстанции и компоненты лекарственных препаратов, а также искомые нитрозамины не мешали проведению анализа. Определение нитрозаминов проводили в режиме SCAN (40-500 а.е.м.) на стандартном растворе примесей нитрозаминов (НДМА, НДЕА) с концентрацией 1 мкг/мл.

После разработки оптимальных параметров хроматографического разделения осуществляли оптимизацию масс-спектрометрического детектирования. В качестве родительских ионов выбирали наиболее интенсивные ионы из масс-спектров исследуемых веществ. Поиск родительских ионов проводили при значениях энергии ячейки соударений равных 10, 15, 20, 40, 50, 60, 70 eV, а поиск дочерних ионов на детекторе MS2 осуществляли в диапазоне от 40 – 200 а.е.м.

В ходе проведения исследований по разработке методики было подтверждено ее соответствие всем заявленным критериям приемлемости. Методика ГХ-МС/МС дает возможность одновременно определять 2 нитрозамина (НДМА, НДЕА) в ЛС валсартана, лозартана и ирбесартана на уровне концентраций 5 нг/мл (в несколько раз ниже установленного норматива).

Валидация методики ГХ-МС/МС

Валидацию методики ГХ-МС/МС проводили в соответствии с требованиями ГФ РФ ОФС 1.1.0012.15 Валидация аналитических методик по показателям: специфичность, LOQ, LOD, аналитический диапазон и линейность, правильность, прецизионность.

Специфичность. Специфичность методики подтверждали при проведении анализа модельных смесей и стандартных растворов с концентрацией 100 нг/мл. Полученные результаты продемонстрировали эффективное разделение исследуемых нитрозаминов (НДМА, НДЕА), фармацевтических субстанций и вспомогательных веществ между собой.

Предел количественного определения (LOQ). Предел количественного определения устанавливали с использованием стандартных растворов с концентрациями 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 15 нг/мл. Основным критерием при определении LOQ служил показатель соотношения сигнал:шум (S/N) = 10. Для получения статистически значимого результата исследования проводили в трех параллелях. В результате проведенных исследований предел количественного определения разработанной методики установили на уровне концентрации 5 нг/мл для каждого нитрозамина (НДМА, НДЕА). Причем сигнал шум был незначительно выше 10. Расчетное значение LOQ равнялось 4,76 нг/мл и 4,8 нг/мл для НДМА и НДЕА соответственно. Типичная

хроматограмма стандартного раствора нитрозаминов с концентрацией 5 нг/мл представлена на рисунке 2.

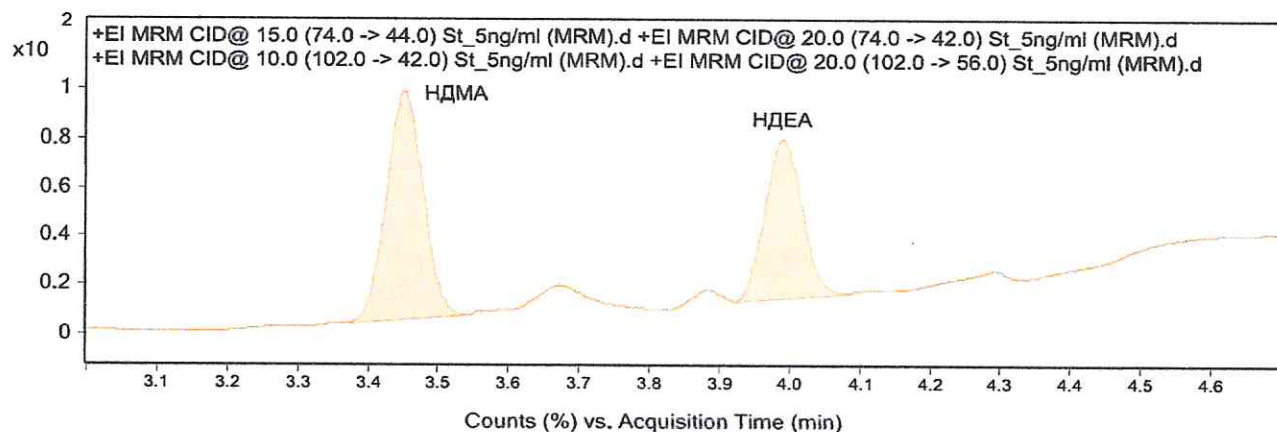


Рисунок 2. Типичная хроматограмма стандартного раствора нитрозаминов с концентрацией 5 нг/мл

Предел обнаружения (LOD). Основным критерием для определения предела обнаружения (LOD) методики являлся показатель соотношения сигнал:шум (S/N) = 3. Данные о полученном соотношении сигнал:шум (S/N) были получены из эксперимента по установлению предела количественного определения. Предел обнаружения установили на уровне концентраций 2,5 нг/мл. Расчетное значение LOD являлось 2,23 и 2,31 нг/мл для HDMA и HDEA соответственно. Типичная хроматограмма стандартного раствора нитрозаминов с концентрацией 2,5 нг/мл представлена на рисунке 3.

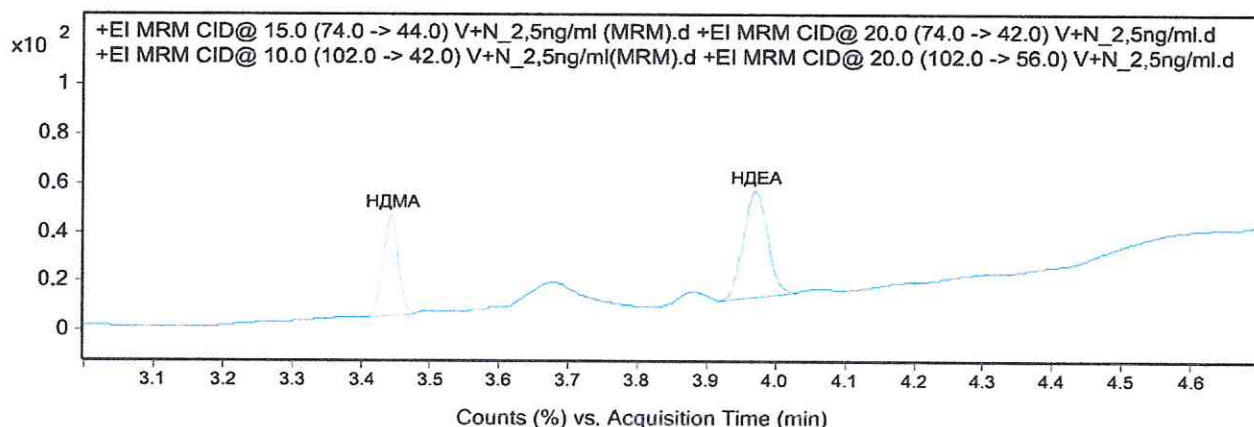


Рисунок 3. Типичная хроматограмма стандартного раствора нитрозаминов с концентрацией 2,5 нг/мл

Аналитический диапазон и линейность. Верхнюю точку аналитического диапазона установили на уровне 0,15 мкг/мл, а нижнюю точку на уровне предела количественного определения методики 5 нг/мл. Определение линейности разработанной методики проводили с использованием модельных смесей таблеток и фармацевтических субстанций с добавлением исследуемых нитрозаминов до получения следующих концентраций: 5; 7,5; 10; 12,5; 25 нг/мл. Определение линейности методики осуществляли построением линейной зависимости вида $y=ax+b$. В качестве значений, применяемых для построения зависимости, использовали средние значения из трех параллельных измерений ($n=3$). В таблице 3 представлены формулы линейных зависимостей и коэффициенты корреляции (r^2) полученные при исследовании модельных смесей таблеток.

Таблица 3. Линейность и корреляционные коэффициенты для модельных смесей таблеток

	Модельная смесь с таблетками валсартана	Модельная смесь с таблетками лозартана	Модельная смесь с таблетками ирбесартана
НДМА	$y = 0,0091x + 0,0089$ $R^2 = 0,9978$	$y = 0,0089x + 0,0003$ $R^2 = 0,9956$	$y = 0,0091x + 0,318$ $R^2 = 0,9941$
НДЕА	$y = 0,0089x - 0,0465$ $R^2 = 0,9987$	$y = 0,0089x + 0,2946$ $R^2 = 0,9971$	$y = 0,0099x - 0,3501$ $R^2 = 0,991$

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, что является хорошим показателем и полностью удовлетворяет заявленным критериям приемлемости.

Правильность. Основным критерием приемлемости по показателю «правильность» методики является диапазон открываемости 80-120% при RSD между параллелями не более 10%. Для проведения исследований по данному валидационному показателю рассчитывали открываемость методики для образцов с концентрациями 5; 7,5; 10 нг/мл. Исследования проводили на трех параллелях ($n=3$). Среднее значение открываемости разработанной методики $E_{sp} = 99,32\%$ при $RSD < 10\%$. Полученное значение удовлетворяет заявленным критериям приемлемости и подтверждает высокую точность методики.

Прецизионность. Рассеяние результатов относительно средней величины оценивали при проведении последовательных инъекций модельных смесей с концентрациями нитрозаминов 5 нг/мл (на уровне LOQ разработанной методики). Основным критерием приемлемости данного показателя являлся RSD менее 10%. Среднее значение RSD для НДМА и НДЕА являлось 6,01% и 5,89% соответственно.

Полученные значения удовлетворяют заявленному критерию приемлемости и свидетельствуют о высокой сходимости валидированной методики.

Разработка методики ВЭЖХ-МС/МС

Поскольку разработанная методика ГХ-МС/МС не охватывает весь спектр определяемых нитрозаминов в ЛС валсартана, лозартана и ирбесартана, было целесообразно разработать методику, основанную 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.

Разработка методики определения нитрозаминов в указанных лекарственных средствах методом ВЭЖХ-МС/МС была разделена на несколько этапов.

На первом этапе осуществляли подбор условий хроматографического разделения и параметров масс-спектрометрического детектирования. Основным требованием на данном этапе разработки являлась возможность методики селективно определять 4 нитрозамина (НДМА, НДЕА, НМБА, НЕИПА) в фармацевтических субстанциях и ЛП валсартана, лозартана и ирбесартана. Помимо этого, хроматографическое разделение должно обеспечивать возможность исключения попадания посторонних веществ (вспомогательные вещества, фармацевтическая субстанция) в масс-спектрометрический детектор.

Для выполнения описанных выше критериев приемлемости был разработан градиент подвижных фаз, описанный в таблице 2. Выбор растворителя и состава подвижной фазы основывался на результатах анализа физико-химических свойств исследуемых нитрозаминов с помощью программ ACDlabs ChemsSketch, 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), а в метанол муравьиная кислота.

При реализованных условиях хроматографического градиента пики фармацевтических субстанций выходят после анализируемых веществ, что позволяет предотвратить их попадание в источник.

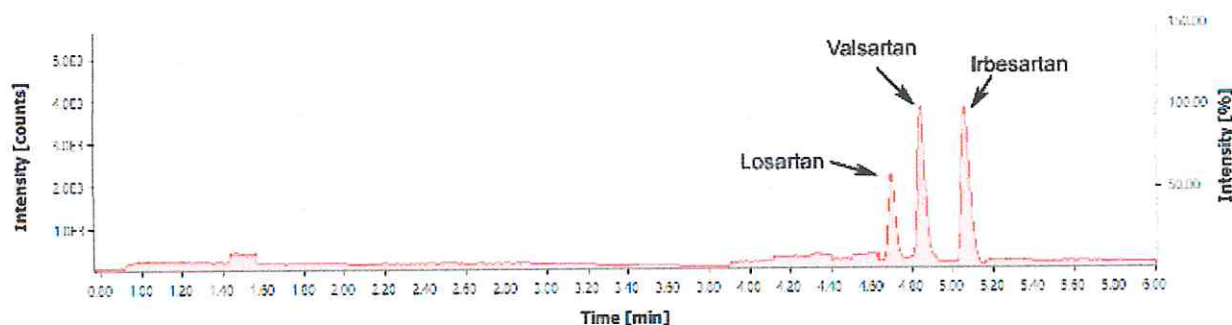


Рисунок 4. Типовая хроматограмма смеси фармацевтических субстанций, приготовленной для отработки условий хроматографического градиента (Условия градиента изменены для демонстрации времени выхода фармацевтических субстанций)

После завершения подбора условий хроматографического градиента и колонки проводили оптимизацию параметров масс-спектрометрического детектирования. Для этого, ранее выбранные родительские ионы использовали в подборе MRM переходов. Далее проводили оптимизацию параметров масс-спектрометрического детектирования с использованием программного обеспечения MassHunter Workstation Software Optimizer.

Подбор и оптимизацию условий масс-спектрометрического детектирования проводили как при ионизации типа электроспрей (ESI), так и химической ионизации (APCI). Подбор условий химической ионизации (APCI) осуществляли оценкой площадей и высот пиков при изменении параметра «ток коронного разряда».

Проведенные исследования выявили, что чувствительность в случае химической ионизации при атмосферном давлении практически в 60 раз выше, чем при использовании ионизации типа «электроспрей». Данная особенность связана с химическим строением нитрозаминов, а именно отсутствием в них легко ионизируемых групп (за исключением НМБА). На рисунке 4 представлены типичные фрагменты хроматограмм стандартных растворов с концентрацией 25 нг/мл и 0,4 нг/мл при определении НДМА с использованием ионизации типа «электроспрей» и химической ионизации при атмосферном давлении (APCI).

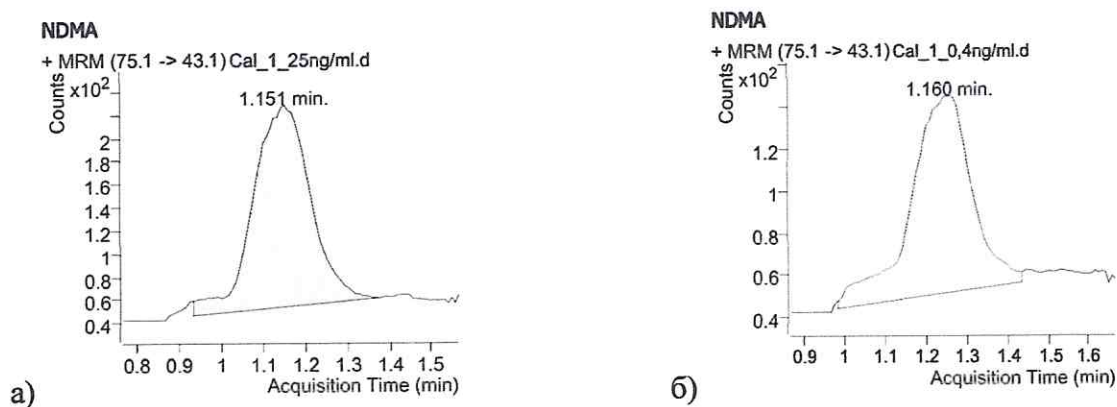


Рисунок 4. Типичные фрагменты хроматограмм стандартных и калибровочных растворов
 а) ионизация электроспреем (ESI) б) химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI)

Валидация методики ВЭЖХ-МС/МС

Валидацию методики ВЭЖХ-МС/МС проводили в соответствии с требованиями ГФ РФ ОФС 1.1.0012.15 Валидация аналитических методик по показателям: специфичность, LOQ, LOD, линейность и аналитический диапазон, правильность, прецизионность.

Специфичность. Специфичность методики подтверждали, используя модельных смесей и стандартных растворов с концентрацией 1,1 нг/мл. Полученные результаты продемонстрировали эффективное разделение исследуемых нитрозаминов (НДМА, НДЕА, НЕИПА, НМБА), фармацевтических субстанций и вспомогательных веществ между собой. Хроматограмма модельных смесей валсартана, лозартана и ирбесартана с добавлением нитрозаминов изображена на рисунке 5.

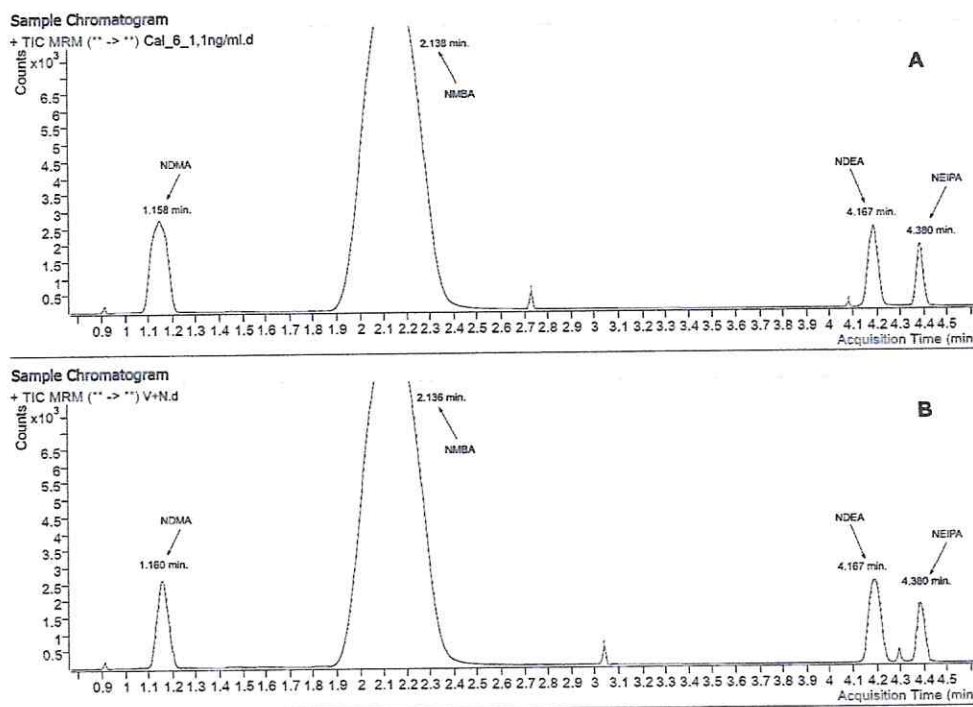


Рисунок 5. Хроматограмма стандартного образца и модельной смеси валсартана с концентрациями нитрозаминов 1,1 нг/мл. Для лозартана и ирбесартана получены аналогичные результаты.

Предел количественного определения (LOQ). Предел количественного определения устанавливали с использованием стандартных растворов с концентрациями 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,1 нг/мл. Основным критерием приемлемости при определении LOQ служил показатель соотношения сигнал:шум (S/N) = 10. Для получения статистически значимого результата анализ

каждой концентрации проводили в трех параллелях. В результате проведенных исследований предел количественного определения методики был установлен на уровне концентрации 0,4 нг/мл для каждого нитрозамина (НДМА, НДЕА, НЕИПА, НМБА).

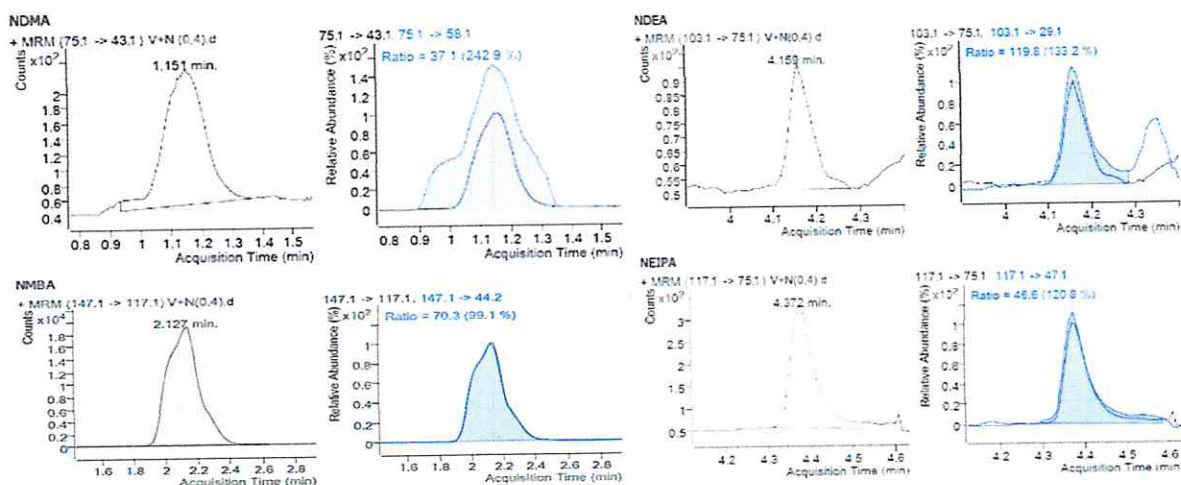


Рисунок 6. Фрагменты типичной хроматограммы модельной смеси фармацевтической субстанции валсартана с добавлением нитрозаминов в концентрации 0,4 нг/мл

Предел обнаружения (LOD). Основным критерием приемлемости для определения предела обнаружения (LOD) разработанной методики являлся показатель соотношения сигнал:шум (S/N) = 3. Данные о соотношении сигнал:шум (S/N) были получены из эксперимента по установлению предела количественного определения (LOQ). Предел обнаружения был установлен на уровне концентраций 0,2 нг/мл. Расчетное значение LOD равно 0,187; 0,189; 0,2; 0,188 нг/мл для (НДМА, НДЕА, НМБА, НЭИПА). Следует отметить, что истинная чувствительность методики в отношении примеси НМБА значительно (практически в 1000 раз) выше, чем для примесей (НДМА, НДЕА, НЭИПА). Истинный предел количественного определения методики ВЭЖХ-МС/МС в отношении примеси НМБА не устанавливался.

Аналитический диапазон и линейность. Верхнюю точку аналитического диапазона установили на уровне 0,15 мкг/мл, а нижнюю точку на уровне предела количественного определения методики 0,4 нг/мл. Определение линейности разработанной методики проводили с использованием модельных смесей таблеток и фармацевтических субстанций с добавлением исследуемых нитрозаминов до получения следующих концентраций: 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,1 нг/мл. Определение линейности проводили построением линейной зависимости вида $y=ax+b$. В качестве значений, применяемых для построения зависимости, использовали средние значения

из трех параллельных измерений. Линейность и корреляционные коэффициенты для модельных смесей таблеток представлены в таблице 4.

Таблица 4. Линейность и корреляционные коэффициенты для модельных смесей таблеток.

	Модельная смесь таблеток Валсартана	Модельная смесь таблеток Лозартана	Модельная смесь таблеток Ирбесартана
	Линейная зависимость и корреляционный коэффициент.		
НДМА	$y = 0,0004x + 0,4944$ $R^2 = 0,9945$	$y = 0,0004x - 0,0425$ $R^2 = 0,9978$	$y = 0,0004x + 0,459$ $R^2 = 0,9946$
НДЕА	$y = 0,0004x + 0,4799$ $R^2 = 0,9946$	$y = 0,0004x - 0,0732$ $R^2 = 0,9982$	$y = 0,0004x - 0,0595$ $R^2 = 0,9986$
НМБА	$y = 3 \cdot 10^{-5}x - 0,0719$ $R^2 = 0,9958$	$y = 3 \cdot 10^{-5}x + 0,0779$ $R^2 = 0,9987$	$y = 3 \cdot 10^{-5}x - 0,0162$ $R^2 = 0,9977$
НЭИПА	$y = 0,0004x + 0,5286$ $R^2 = 0,9956$	$y = 0,0004x + 0,0679$ $R^2 = 0,9986$	$y = 0,0004x - 0,066$ $R^2 = 0,9985$

Правильность. Основным критерием приемлемости методики по показателю «правильность» был определен диапазон открываемости 80-120% при RSD между параллелями не более 10%. Для проведения исследований по данному валидационному показателю рассчитывали открываемость методики для образцов с концентрациями 5; 7,5; 10 нг/мл. Анализ проводили на трех параллелях. Среднее значение открываемости разработанной методики установлено: $E_{sp} = 99,72\%$ при $RSD < 10\%$.

Разработанная методика ВЭЖХ-МС/МС соответствует заявленному критерию приемлемости и демонстрирует высокую точность определения нитрозаминов.

Прецизионность. Рассеяние результатов относительно средней величины оценивали с использованием модельных смесей с концентрациями нитрозаминов 0,4 нг/мл (на уровне LOQ разработанной методики). Основным критерием приемлемости данного показателя был установлен RSD менее 10%. Среднее значение RSD для НДМА, НДЕА, НЕИПА, НМБА являлось 2,01; 2,56; 1,76; 2,29 % соответственно. Полученные значения полностью удовлетворяют заявленному критерию приемлемости и свидетельствуют о высокой сходимости разработанной методики.

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

Разработанная методика ВЭЖХ-МС/МС была использована при проведении исследования лекарственных препаратов, находящихся в обращении в Российской Федерации на предмет содержания примесей нитрозаминов (НДМА, НДЕА, НЕИПА, НМБА).

Для проведения контроля ЛП были закуплены препараты с действующими веществами валсартан, лозартан и ирбесартан. Препараты закупались в соответствии с наличием действующих РУ. Данные о действующих РУ размещены на сайте ГРЛС.

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. Полученные результаты исследований представлены в таблице 5.

Таблица 5. Содержание нитрозаминов в исследованных ЛП валсартана, лозартана и ирбесартана, находящихся в обращении в РФ.

Препарат	Производство	Номер РУ	Уровень содержания нитрозаминов ppm
Вальсакор	АО "КРКА, д.д., Ново место"	ЛСР-004921/08	0,0025
Валсартан-СЗ	НАО "Северная звезда"	ЛП-004219	0,0062
Лозап®	АО "Санофи Россия"	П N015897/01	0,005
Апровель	Санофи Клир ЭсЭнСи	ЛП-001260	0,0013

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 tandemным 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 нитроаминов в лекарственных средствах.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Разработанные универсальные методики определения генотоксичных примесей нитроаминов 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 tandemной масс-

спектрометрии могут быть использованы в исследованиях других лекарственных средств на предмет содержания генотоксичных примесей нитрозаминов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **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 [и др.] / **М.Д. Хорольский, А.А. Чапленко, А.М. Власов [и др.]** // Медицина. – 2019. – Т. 7. – № 4. – С.12-24. [ВАК]
2. **Ананьина О.В., Хорольский М.Д., Раменская Г.В., Жуков Е.А., Масленникова Н.В.** Определение генотоксичных примесей в фармацевтических субстанциях / **О.В. Ананьина, М.Д. Хорольский, Г.В. Раменская [и др.]** // Фармация. – 2020. – Т.69. – №7. – С. 10-16. [ВАК]
3. **Хорольский М.Д., Власов А.М., Родионова Г.М., Недков И.В., Масленникова Н.В., Раменская Г.В.** Оценка фармакопейных методик пробоподготовки при определении остаточных количеств пестицидов в лекарственном растительном сырье плодов укропа пахучего / **М.Д. Хорольский, А.М. Власов, Г.М. Родионова [и др.]** // Естественные и технические науки. – 2020. – №8 (146). – С.89-94. [Chemical abstracts, ВАК]
4. **Хорольский М.Д., Ананьина О.В., Чапленко А.А., Недков И.В., Масленникова Н.В., Раменская Г.В.** Сравнительная оценка подходов определения примеси п-нитрозодиметиламина в фармацевтической субстанции валсартан методом газовой хроматографии с использованием масс-спектрометрического детектирования / **М.Д. Хорольский, О.В. Ананьина, А.А. Чапленко [и др.]** // Химико-фармацевтический журнал. – 2019. – Т. 53. – №8 – С. 88-93. [Scopus, ВАК]
5. **Nataliya E. Kuz'mina, Sergey V. Moiseev, Mikhail D. Khorolskiy and Anna I. Lutceva.** Development and Validation of 2-Azaspiro [4,5] Decan-3-One (Impurity A) in Gabapentin Determination Method Using qNMR Spectroscopy // *Molecules*. – 2021. – 26(6). – 1656. doi: 10.3390/molecules26061656 [Scopus]
6. **Хорольский М.Д.** Разработка и валидация методики определения генотоксичных примесей нитрозаминов в фармацевтических субстанциях валсартана, лозартана и ирбесартана методом ГХ-МС/МС / **М.Д. Хорольский** // Сборник: Современная медицина: новые подходы и актуальные исследования. сборник статей по материалам XLIII международной научно-практической конференции. – Москва. – 2020. – С. 96-103.
7. **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.

8. Хорольский М.Д. Экспериментальная апробация методик определения примесей нитрозаминов в фармацевтических субстанциях валсартана, лозартана и ирбесартана. / М.Д. Хорольский // Сборник: Естественные и медицинские науки. Студенческий научный форум. сборник статей по материалам XXXIV студенческой международной научно-практической конференции. – Москва. – 2020. – С. 56-60

Список используемых сокращений

ВЭЖХ-МС/МС - Высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектированием;

ГХ-МС/МС – газовая хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектированием;

ГФ РФ – Государственная Фармакопея Российской Федерации;

ГРЛС – Государственный реестр лекарственных средств

MRM –;

НДМА – *N*-нитрозодиметиламин;

НДЕА – *N*-нитрозодиэтиламин;

НЕИПА – *N*-этил-*N*-изопропилнитрозамин;

НМБА - *N*-нитрозо-4-метиламинобутановая кислота;

РУ – регистрационное удостоверение

LOQ – Limit of Quantitation (Предел количественного определения);

LOD – Limit of Detection (Предел обнаружения);

APCI – химическая ионизация при атмосферном давлении;

RSD – относительное стандартное отклонение