

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я
НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ О.О.БОГОМОЛЬЦЯ
ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ

Кафедра аналітичної, фізичної та колоїдної хімії

ВИПУСКНА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
на тему **«ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ МЕТОДІВ ОДНОЧАСНОГО**
ВИЗНАЧЕННЯ ДОМІШОК НІТРОЗАМІНІВ У САРТАНАХ»

Виконала: здобувачка вищої освіти 5 курсу,
групи 10804
напряму підготовки 22 «Охорона здоров'я»
спеціальності 226 «Фармація, промислова
фармація»
освітньої програми «Фармація»
Щирбул Ірина Сергіївна

Керівники: завідувачка кафедри,
кандидатка хімічних наук,
доцентка Зайцева Галина Миколаївна
старша викладачка Лисенко Тетяна Анатоліївна
Рецензент: кандидатка хімічних наук,
доцентка Глушаченко Ольга Олександрівна

Київ – 2025

ЗМІСТ

ВСТУП	4
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	6
1.1. Застосування сартанів у медицині та фармації.....	6
1.2. Контроль та регуляторні вимоги до домішок нітрозамінів у сартанах	10
РОЗДІЛ 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	14
2.1. Вибір об'єкту дослідження	14
2.2. Матеріали та методи дослідження	16
2.3. Методики дослідження.....	19
2.3.1. Методи визначення нітрозамінів рекомендовані мережею офіційних лабораторій контролю лікарських засобів.....	19
2.3.2. Методи визначення нітрозамінів рекомендовані Європейською фармакопеею.....	20
2.3.3. Методи визначення нітрозамінів рекомендовані Агентством по контролю за харчовими продуктами та лікарськими засобами США.....	23
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ	32
3.1. Порівняльний аналіз методів одночасного визначення нітрозамінів за кількістю домішок.....	33
3.2. Порівняльний аналіз методів одночасного визначення нітрозамінів за межою кількісного визначення та відповідністю вимогам Фармакопеї.....	35
3.3. Переваги та обмеження одночасного визначення нітрозамінів	37
ВИСНОВКИ.....	39
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	40
ДОДАТОК	43
SUMMARY	45

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ

NDMA – N-нітрозо-диметіламін

NDEA – N-нітрозо-диетиламін

NDBA – N-нітрозо-дибутиламін

NMBA – N-нітрозо-N-метил-4-аміномасляна кислота

NDIPA – N-нітрозо-диізопропіламін

NEIPA – N-нітрозо-етил-ізопропіламін

NDPA – N-нітрозо-дипропіламін

EMA – Європейське агентство з лікарських засобів

FDA – Агентство по контролю за харчовими продуктами та лікарськими засобами США

ICH – міжнародна рада з питань гармонізації технічних вимог до реєстрації лікарських засобів для людини

LOD – межа виявлення

LOQ – межа кількісного визначення

OMCL – Офіційна лабораторія контролю лікарських засобів

HS- ГХ/МС – газова хроматографія-мас-спектрометрія з хедспейс-аналізом

АФІ – активний фармацевтичний інгредієнт

ВЕРХ/МС/МС – високоефективна рідинна хроматографія з тандемним мас-спектрометричним детектуванням

ВЕРХ-УФ – високоефективна рідинна хроматографія з УФ-детектуванням

ГХ/МС – газова хроматографія-мас-спектрометрія

ГХ/МС/МС – газова хроматографія з тандемною мас-спектрометриєю

РХ/МС/МС – рідинна хроматографія з тандемною мас-спектрометриєю

РХ/МС-HR – рідинна хроматографія з мас-спектрометриєю високої роздільної здатності

РХ/МС-HR(ESI) – рідинна хроматографія з електроспрей-іонізацією та мас-спектрометриєю високої роздільної здатності

УВЕРХ-МС/МС(APCI) – ультровисокоефективна рідинна хроматографічна-тандемна мас-спектрометрія з хімічною іонізацією при атмосферному тиску

ВСТУП

Актуальність теми. Відповідно до керівництва М7 Міжнародної конференції з гармонізації технічних вимог до реєстрації лікарських засобів для людини (ICH), нітрозаміни класифіковані як забруднювачі 1-го класу – найбільш небезпечні для здоров'я людини.

У 2018 році вперше було виявлено наявність нітрозамінових домішок у фармацевтичних препаратах. Першим задокументованим випадком стало виявлення N-нітрозодиметиламіну (NDMA) у субстанції валсартан, що призвело до масового відкликання цього лікарського засобу з ринку. У період з 2018 до середини 2020 року через аналогічне забруднення було відкликано понад 40 партій інших препаратів, що підкреслює необхідність посиленого моніторингу та контролю якості у фармацевтичній сфері. Згідно з Європейською фармакопеею, контролю підлягають сім нітрозамінових домішок.

Одночасне визначення усіх нітрозамінових домішок, які підлягають контролю згідно фармакопеї, у активних фармацевтичних інгредієнтах має низку важливих переваг для лабораторій, зокрема: економія часу та ресурсів, підвищення аналітичної продуктивності, оптимізація витрат на валідацію.

Мета: провести порівняльний аналіз методів одночасного визначення домішок нітрозамінів у сартанах з метою оптимізації контролю даних активних фармацевтичних інгредієнтів.

Завдання дослідження:

1) провести аналіз регуляторних вимог та нормативних документів щодо методів одночасного визначення домішок нітрозамінів у сартанах затвердженими Агентством по контролю за харчовими продуктами та лікарськими засобами США, Європейським директором якості лікарських засобів та охорони здоров'я (Офіційними лабораторіями контролю лікарських засобів та Європейською фармакопеею).

2) здійснити порівняльний аналіз рекомендованих методик за критеріями: кількістю домішок нітрозамінів при їх одночасному визначенні, межею кількісного визначення та відповідністю вимогам нормативних документів.

3) встановити переваги та обмеження методів і обґрунтувати вибір оптимального методу для одночасного визначення домішок нітрозамінів у сартанах.

Методи дослідження: бібліографічний аналіз та аналіз нормативної документації, аналітико-порівняльний метод та метод узагальнення.

Новизна та значення одержаних результатів: пошук та порівняння методів одночасного визначення усіх нітрозамінових домішок, які підлягають контролю згідно фармакопеї, з метою оптимізації та збільшення ефективності контролю .

Апробація результатів дослідження: результатами роботи було опубліковано 1 тезу у збірнику 2-гої Міжнародної науково-практичної конференції “Global trends in science and education”, 10-12 березня 2025 року, Київ, Україна (Додаток 1).

Публікації: Щирбул І. С., Лисенко Т. А. Порівняльний аналіз методів одночасного визначення домішок нітрозамінів у АФІ // Тези доповідей 2-гої Міжнародної науково-практичної конференції “Global trends in science and education”, 10-12 березня 2025 року, Київ, Україна. С.177-180.

Структура роботи: кваліфікаційна робота викладена на 46 сторінках друкованого тексту, містить 8 рисунків, 15 таблиць і складається з вступу, трьох розділів, списку використаних джерел (24 джерел), 2 додатків та анотації.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Застосування сартанів у медицині та фармації

В Україні серцево-судинні захворювання залишаються провідною причиною захворюваності та втрати працездатності населення. За статистикою ДУ «Національний науковий центр «Інститут кардіології імені академіка М.Д. Стражеска», хвороби системи кровообігу посідають одне з перших місць у структурі захворюваності населення України та становлять 40%. Артеріальна гіпертензія є ключовим чинником ризику розвитку ішемічної хвороби серця та цереброваскулярних уражень, що разом становлять 88,1% усіх летальних випадків від хвороб системи кровообігу [1, 2].

За даними Фремінгемського дослідження, у віковій групі 55–65 років імовірність розвитку артеріальної гіпертензії перевищує 90%. Всесвітня організація охорони здоров'я визначає артеріальну гіпертензію як одну з найважливіших потенційно контрольованих причин смертності у світі. Встановлено тісний зв'язок між поширеністю артеріальною гіпертензією і смертністю від інсультів. У західних країнах спостерігається тенденція до зниження частоти та смертності від інсультів, тоді як у країнах Східної Європи ці показники продовжують зростати.

Зниження захворюваності та смертності від серцево-судинних ускладнень залишається пріоритетним завданням терапії пацієнтів із підвищеним артеріальним тиском. Для досягнення контрольованих показників АТ лікарі використовують п'ять основних груп антигіпертензивних засобів: інгібітори АПФ-блокатори рецепторів ангіотензину II, антагоністи кальцію, β -адреноблокатори та діуретики. За даними численних багатоцентрових рандомізованих досліджень, жоден із цих класів не демонструє істотної переваги за силою гіпотензивної дії. Вибір препарату для конкретного пацієнта визначається низкою чинників: наявністю факторів ризику, ураженням органів-мішеней, супутніми захворюваннями (зокрема цукровим діабетом, метаболічним

синдромом), анамнезом реакцій на антигіпертензивні засоби, ризиком лікарських взаємодій і соціально-економічними умовами, включно з вартістю лікування.

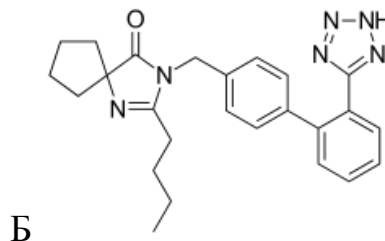
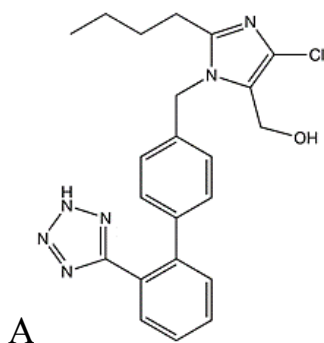
В сучасних уявленнях про механізми розвитку судинних патологій, зокрема артеріальної гіпертензії, значна роль належить ренін-ангіотензин-альдостероновій системі, яка при активації спричиняє судинозвуження та стійке підвищення артеріального тиску [3].

Лікування артеріальної гіпертензії потребує ретельно підібраної терапії. На підставі масштабних досліджень доведено, що блокатори рецепторів ангіотензину II (сартани) забезпечують ефективний, стабільний контроль артеріального тиску та мають додаткові плейотропні ефекти.

Блокатори рецепторів ангіотензину II (БРА) – це хімічно різноманітна група препаратів, що реалізують свій ефект шляхом блокування рецепторів ангіотензину II, переважно 1-го типу. Саме ці рецептори опосередковують основні серцево-судинні та нейрогуморальні ефекти ренін-ангіотензин-альдостеронової системи.

Згідно міжнародної класифікації лікарських засобів, БРА належать до групи C09 – препарати, що впливають на РААС, підгрупа SA – антагоністи рецепторів ангіотензину II. Вони поділяються на:

- біфенілтетразоли (лозартан, кандесартан, ірбесартан, ольмесартан)
- біфенілові нететразоли (телмісартан, азілсартан)
- небіфенілові нететразоли (епросартан)
- негетероциклічні БРА (вальсартан).



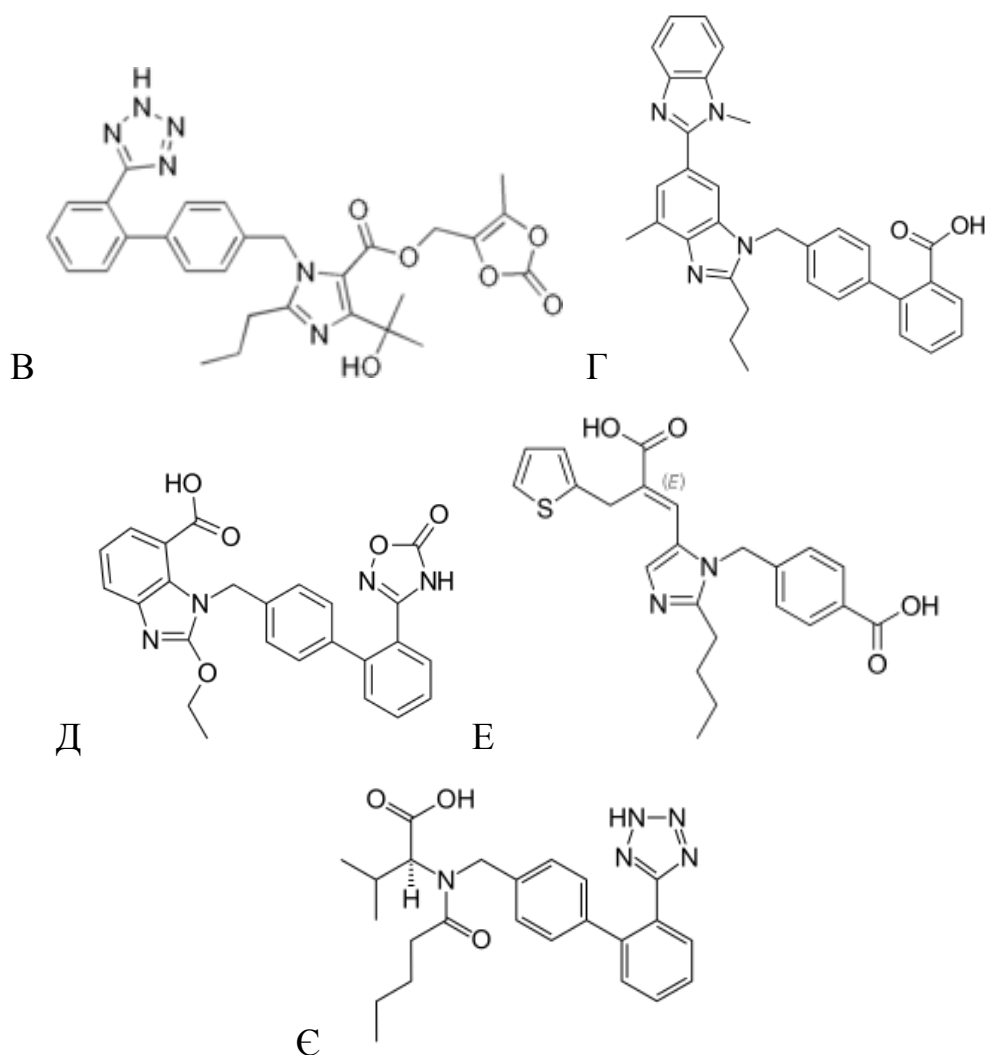


Рис.1.1. Структурні формули сартанів: А – лозартан, Б – ірбесартан, В – ольмезартан, Г – телмісартан, Д – азілсартан, Е – епросартан, Є – вальсартан

Структурні особливості цих препаратів визначають їхню спорідненість до рецепторів і додаткові органопротекторні властивості, що обумовлює різну клінічну ефективність у профілактиці серцево-судинних ускладнень.

За метаболічною поведінкою БРА поділяють на:

- проліки, що потребують перетворення в активні метаболіти (лозартан, кандесартан, ольмезартан, азілсартан),
- активні препарати (телмісартан, ірбесартан, епросартан, вальсартан), які діють безпосередньо [4].

Важливою перевагою сартанів є їхня здатність зменшувати гіпертрофію міокарда та сприяти зворотному розвитку ремоделювання серця – ключових чинників ранніх серцево-судинних ускладнень і смертності. При наявності гіпертрофії лівого шлуночка ризик ішемічної хвороби серця збільшується в 3–5 разів, а серцевої недостатності – у 6–17 разів, незалежно від рівня артеріального тиску.

Окрім того, БРА II ефективні при лікуванні пароксизмів фібриляції передсердь, завдяки впливу на симпато-адреналову систему, варіабельність серцевого ритму та гемодинаміку. Їхнє застосування дозволяє зменшити частоту фібриляцій і пов'язаних з ними інсультів до 49%.

Сартани також уповільнюють прогресування коронарного атеросклерозу й показали переваги над ІАПФ у профілактиці рестенозів після стентування. Нейропротекторний ефект цих препаратів доведений у низці досліджень, де БРА II зменшували прогресування хронічної хвороби нирок, ризик мікроальбумінурії та подовжували додіалізний період у пацієнтів із гіпертензією і діабетом 2 типу.

Окремо варто відзначити, що сартани знижують ризик розвитку діабету 2 типу завдяки активації рецепторів PPAR- γ , покращуючи чутливість тканин до інсуліну, зменшуючи стеатоз печінки та дисліпідемію. Також ці препарати мають церебропротекторну та протизапальну дію, знижуючи рівень прозапальних цитокінів у пацієнтів із гіпертензією та супутнім цукровим діабетом [3].

Отже, серцево-судинні захворювання, зокрема артеріальна гіпертензія, залишаються провідною медичною та соціальною проблемою в Україні. Вибір ефективної антигіпертензивної терапії є критично важливим для профілактики серйозних ускладнень. Блокатори рецепторів ангіотензину II (сартани) займають особливе місце серед сучасних препаратів завдяки стабільному контролю артеріального тиску, сприятливому впливу на структуру серця, здатності знижувати ризик фібриляції передсердь, прогресування атеросклерозу, хронічної хвороби нирок та цукрового діабету 2 типу. Їх багатогранні органопротекторні

властивості та доведена клінічна ефективність визначають перспективність сартанів у терапії пацієнтів із серцево-судинною патологією.

1.2. Контроль та регуляторні вимоги до домішок нітрозамінів у сартанах

N-нітрозаміни – це клас органічних домішок, молекули яких містять нітрозогрупу, включає високоактивні мутагенні речовини, які класифікуються як ймовірні канцерогени для людини. Ця група хімічних сполук налічує більше 300 речовин, 90% з яких мають канцерогенні властивості.

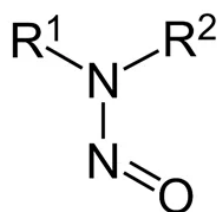


Рис.1.2. Загальна схема хімічної будови нітрозамінів

Відповідно до рекомендацій ICH M7 (R1), вони належать до забруднювачів 1 класу. Крім того, нітрозаміни включені до так званої “cohort of concern” разом з афлатоксинами, азокси-сполуками та діоксинами [5].

Перший випадок виявлення нітрозамінів у лікарських засобах був зареєстрований у 2018 році. Препаратом, контамінованим NDMA (N-нітрозодиметіламін) виявився валсартан, блокатор рецепторів ангіотензину II, що належить до групи споріднених сполук, відомих як сартани, який внаслідок цього був відкликаний з ринку. З 2018 по середину 2020 року були відкликані ще понад 40 партій різних препаратів, переважно групи сартанів.

У вересні 2019 року в ЄС було розпочато другий перегляд за статтею 31, пов'язаний із безпекою лікарських засобів, що містять ранітидин, після повідомлень про перевищення допустимих рівнів NDMA у таблетках ранітидину. Лідером 2020 року з кількості відкликань став метформін, а відкриттям – домішки нових нітрозамінів MNP та CPNP у ріфампіцині та ріфапентині [5, 6].

1 лютого 2019 року Комітет з лікарських засобів для людини (CHMP) Європейського агентства з лікарських засобів (ЕМА) ухвалив рішення, згідно з яким виробники препаратів класу сартанів (блокаторів рецепторів ангіотензину II) повинні переглянути свої виробничі процеси, щоб запобігти утворенню домішок нітрозамінів.

Для внесення необхідних змін у виробництво та впровадження тестувальних методик, здатних виявляти навіть незначні кількості цих домішок, компаніям було надано перехідний період тривалістю два роки. Після завершення цього терміну виробники повинні були довести відсутність нітрозамінів у своїй продукції, щоб зберегти дозвіл на її реалізацію в ЄС.

Ці рекомендації були ухвалені CHMP на підставі аналізу, проведеного ЕМА, щодо виявлення N-нітрозодиметиламіну (NDMA) та N-нітрозодіетиламіну (NDEA) у деяких препаратах сартанів. Обидві сполуки класифікуються як ймовірні канцерогени для людини, оскільки можуть спричиняти розвиток онкологічних захворювань [7].

Моніторинг рівня нітрозамінів у лікарських засобах призвів до посилення регуляторного контролю за їхнім вмістом та визначення тимчасових граничних рівнів добової дози для окремих домішок, зазначених у табл. 1.1.

Основні домішки, що контролюються: N-нітрозо-диметиламін (NDMA), N-нітрозо-діетиламін (NDEA), N-нітрозо-дибутиламін (NDBA), N-нітрозо-N-метил-4-аміномасляна кислота (NMBA); N-нітрозо-діізопропіламін (NDIPA), N-нітрозо-етил-ізопропіламін (NEIPA) та N-нітрозо-дипропіламін (NDPA) [5].

Таблиця 1.1 Тимчасові значення добової дози окремих домішок

Скорочення	Хімічна назва	Добова доза
NDMA	N-нітрозо-диметиламін	96,0 мкг/день
NDEA	N-нітрозо-диетиламін	26,5 мкг/день
NDBA	N-нітрозо-дибутиламін	26,5 мкг/день
NMBA	N-нітрозо-N-метил-4-аміномасляна кислота	96,0 мкг/день
NDIPA	N-нітрозо-диізопропіламін	26,5 мкг/день
NEIPA	N-нітрозо-етил-ізопропіламін	26,5 мкг/день
NDPA	N-нітрозо-дипропіламін	26,5 мкг/день

Зазначені ліміти діють лише у випадку, якщо лікарський засіб містить один нітрозамін. У разі виявлення кількох домішок із таблиці та перевищення їхньої сумарної кількості понад 26,5 нг/день, необхідно повідомити про це регуляторні органи.

Після завершення перехідного періоду фармацевтичні препарати не повинні містити нітрозаміни. З 1 квітня 2021 року рівні NDMA або NDEA у активних субстанціях мають бути нижчими за межу кількісного визначення (LOQ).

Відповідно до галузевого керівництва FDA, виробники активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ) та готових лікарських засобів повинні використовувати аналітичні методи з $LOQ \leq 0,03$ ppm. Однак слід враховувати, що, наприклад, для метформіну після розведення препарату у розчиннику та підготовки зразка кінцева концентрація NDMA у віалі не повинна перевищувати 1,6 ppb. Це значно посилює вимоги до чутливості методик аналізу готових лікарських форм. Водночас аналогічні розрахунки для сировини та розчинників свідчать про менш жорсткі вимоги до межі виявлення [5].

Отже, нітрозаміни становлять серйозну загрозу для здоров'я людини через свої мутагенні та канцерогенні властивості. Їхня наявність у лікарських засобах

спричинила масштабні відкликання препаратів та посилення регуляторного контролю з боку міжнародних органів, таких як ЕМА та FDA.

Зокрема, було встановлено тимчасові добові ліміти для найнебезпечніших нітрозамінів, а також вимоги до вдосконалення виробничих процесів з метою запобігання їхньому утворенню. Виробники зобов'язані впровадити високочутливі методи аналізу, аби забезпечити безпеку лікарських засобів.

РОЗДІЛ 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

2.1. Вибір об'єкту дослідження

N-нітрозодиметиламін – жовта масляниста рідина зі слабким характерним запахом. Температура кипіння 151-153 °С.

Молекулярна формула: $C_2H_6N_2O$.

Молекулярна маса: 74,08 г/моль.

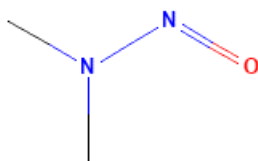


Рис.2.1. Структурна формула *N*-нітрозодиметиламіну

Розчинність у воді - більше або дорівнює 100 мг/мл при 23-25°С. Розчинний у спирті, ефірі, всіх поширених органічних розчинниках і в ліпідах.

Максимальні значення ультрафіолетового поглинання: розчинник - петролевий ефір (232 нм, 351 нм, 374 нм), етанол (231 нм, 346 нм), вода (230 нм, 332 нм) [8].

N-нітрозодиметиламін – це нітрозамін, який є *N*-етилетанаміном, заміщеним нітрозогрупою при *N*-атомі. Прозора рідина злегка жовтого кольору. Температура кипіння 175-177 °С.

Молекулярна формула: $C_4H_{10}N_2O$.

Молекулярна маса: 102,14 г/моль.

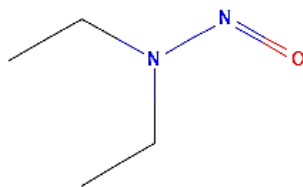


Рис.2.2. Структурна формула *N*-нітрозодіетиламіну

Розчинність у воді – більше або дорівнює 100 мг/мл при 23-25°С. Розчинний в етанолі, етиловому ефірі, малорозчинний у хлороформі.

Максимальні значення ультрафіолетового поглинання: розчинник – петролевий ефір (233 нм, 366 нм, 378 нм); етанол (233 нм, 350 нм); вода (230 нм, 340 нм) [9].

N-нітрозодибутиламін – блідо-жовта масляниста рідина. Температура кипіння 235 °С.

Молекулярна формула: $C_8H_{18}N_2O$.

Молекулярна маса: 158,24 г/моль.

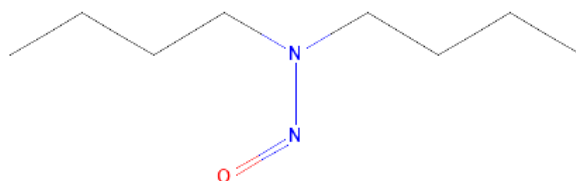


Рис.2.3. Структурна формула *N*-нітрозодибутиламіну

Розчинність у воді складає $1,27 \times 10^{-3}$ мг/л при 24 °С. Золь у воді 0,12%, розчинний у органічних розчинниках та рослинних оліях.

Максимальні значення ультрафіолетового поглинання: розчинник - вода (230 нм, 347 нм) [10].

N-нітрозодиметил-4-аміномасляна кислота є нітрозаміном, який має метил і 3-карбоксипропіл замісники. Це монокарбонова кислота і нітрозамін.

Молекулярна формула: $C_5H_{10}N_2O_3$.

Молекулярна маса: 146,14 г/моль [11].

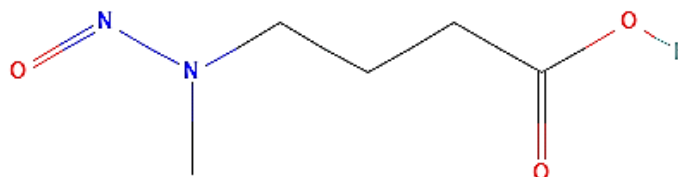


Рис.2.4. Структурна формула *N*-нітрозодиметил-4-аміномасляної кислоти

N-нітрозодипропіламін – це нітрозамін, який є імінодіацетоном, заміщеним нітрозогрупою при N-атомі. Є нітрозаміном і кетоном.

Молекулярна формула: $C_6H_{10}N_2O_3$.

Молекулярна маса: 158,16 г/моль [12].

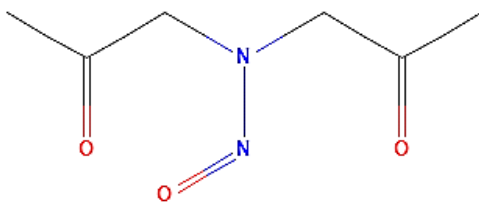


Рис.2.5. Структурна формула N-нітрозо-дипропіламіну

У ході аналізу фізико-хімічних властивостей та структурної будови п'яти нітрозамінів – N-нітрозодиметиламіну, N-нітрозодіетиламіну, N-нітрозодибутиламіну, N-нітрозо-N-метил-4-аміномасляної кислоти та N-нітрозодипропіламіну – встановлено їхню високу розчинність у воді та органічних розчинниках, характерні значення ультрафіолетового поглинання та молекулярні маси. Отримані дані дозволяють обґрунтувати вибір цих сполук як об'єктів контролю в лікарських засобах, зокрема через їхню токсикологічну небезпеку та можливість накопичення в продуктах синтезу фармацевтичних субстанцій.

2.2. Матеріали та методи дослідження

У роботі були використані такі методи теоретичного дослідження, як: бібліографічний аналіз, аналіз нормативної документації, аналітико-порівняльний метод та метод узагальнення.

Бібліографічний аналіз – це метод теоретичного дослідження, що передбачає систематичний пошук, добір, вивчення та критичне опрацювання наукових джерел з метою узагальнення наявних знань з певної теми. Він є фундаментальним етапом будь-якого наукового дослідження, оскільки дозволяє досліднику:

- Ознайомитися з актуальним станом проблеми, з'ясувати, які питання вже вивчені, а які потребують подальшого дослідження.
- Виявити основні тенденції, суперечності та перспективні напрями у досліджуваній галузі.

- Зібрати та порівняти думки різних авторів, визначити провідні концепції, методики, підходи.
- Сформувати теоретичну та фактологічну основу для власного дослідження.

Метод передбачає опрацювання джерел різного характеру – наукових статей, дисертацій, аналітичних оглядів, монографій, офіційних документів, фармакопей, нормативних актів тощо [13].

Аналіз нормативної документації – це теоретичний метод наукового дослідження, що полягає у вивченні, систематизації та критичному осмисленні офіційних регламентуючих документів, які регулюють певну сферу діяльності. Такий аналіз дозволяє встановити вимоги, стандарти, правила, порядок дій, що діють на момент дослідження, а також виявити прогалини, суперечності чи потребу в їх актуалізації.

Основні етапи:

- збір нормативних джерел (закони, постанови, накази, стандарти, методики, фармакопей тощо);
- їх систематизація за темою дослідження;
- вивчення змісту та структури;
- порівняння різних нормативних актів;
- виявлення спільного, відмінного та змін у чинному регулюванні;
- формулювання висновків щодо впливу норм на досліджувану проблему.

Цей метод широко використовується у фармацевтичних, медичних, юридичних та соціальних дослідженнях [14].

Аналітико-порівняльний метод – це один із фундаментальних теоретичних методів наукового дослідження, який передбачає зіставлення, аналіз та узагальнення властивостей, характеристик, структур чи функцій різних об'єктів, явищ, методик або теоретичних положень. Завдяки цьому методу можна виявити подібності та відмінності, сильні та слабкі сторони досліджуваних об'єктів, що

дозволяє обґрунтувати вибір оптимального рішення або сформулювати наукові висновки.

Основні етапи аналітико-порівняльного методу: збір та систематизація інформації про досліджувані об'єкти; аналіз їхніх властивостей та характеристик; порівняння за визначеними критеріями; інтерпретація отриманих даних та формулювання висновків.

Цей метод є особливо корисним у фармацевтичних, біомедичних і соціогуманітарних дослідженнях для порівняння ефективності методів, лікарських засобів, технік або нормативних підходів [15, 16].

Метод узагальнення – це класичний теоретичний метод наукового дослідження, який полягає в логічному об'єднанні окремих фактів, результатів спостережень, експериментів, даних літературних джерел у єдину цілісну систему знань. Завдяки узагальненню виділяють спільні закономірності, принципи, тенденції, що дозволяє формувати наукові концепції, гіпотези або висновки.

Основні етапи використання методу: збір та систематизація інформації; виділення істотних ознак та властивостей об'єктів дослідження; встановлення взаємозв'язків між ними; логічне об'єднання даних у загальні теоретичні положення.

Метод узагальнення є незамінним на завершальному етапі наукової роботи для підведення підсумків, формування висновків і рекомендацій [15, 16].

У даному дослідженні було застосовано комплекс теоретичних методів – бібліографічний аналіз, аналіз нормативної документації, аналітико-порівняльний метод та метод узагальнення, що дозволило ґрунтовно вивчити проблему, систематизувати наукові й регуляторні джерела, порівняти різні підходи та узагальнити отримані дані для формування обґрунтованих висновків. Застосування цих методів забезпечило цілісне теоретичне підґрунтя для подальших практичних досліджень у межах обраної тематики.

2.3. Методики дослідження

2.3.1. Методи визначення нітрозамінів рекомендовані мережею офіційних лабораторій контролю лікарських засобів

З 2018 року міжнародні організації активно працюють над розробкою точних і чутливих методів визначення нітрозамінів у фармацевтичній продукції. На сьогодні Європейський директорат з якості лікарських засобів та охорони здоров'я оприлюднив низку методик, розроблених Офіційними лабораторіями контролю лікарських засобів (OMCL) та Європейською фармакопесю [5].

У табл. 2.1 наведено методики контролю, рекомендовані мережею OMCL, із зазначенням нітрозамінів, які визначаються, та меж кількісного визначення для кожного методу.

Таблиця 2.1 Методики контролю, опубліковані OMCL

Метод	Нітрозаміни	LOQ
Газова хроматографія-мас-спектрометрія з хедспейс-аналізом	NDMA, NDEA	100 ppb NDMA 80 ppb NDEA
Рідинна хроматографія з тандемним мас-спектрометричним детектуванням	NDMA, NDEA	79-492ppb NDMA 19,5-149ppb NDEA
Ультровисокоєфективна рідинна хроматографічна тандемна мас-спектрометрія з хімічною іонізацією при атмосферному тиску	NDMA, NDEA	100-200ppb NDMA 40-80 ppb NDEA
Високоєфективна рідинна хроматографія з УФ-детектуванням	NDMA, NDEA	40-250ppb NDMA 80-500 ppb NDEA
Газова хроматографія з тандемним мас-спектрометричним детектуванням	NDMA, NDEA, EIPNA, DIPNA , DPNA, DBNA	15 ppb

Як можна зауважити, більшість методів вже не відповідають вимогам з чутливо.

2.3.2. Методи визначення нітрозамінів рекомендовані Європейською фармакопеею

Згідно з Європейською фармакопеею, контролю підлягають сім нітрозамінових домішок: N-нітрозодиметиламін (NDMA), N-нітрозодіетиламін (NDEA), N-нітрозодибутиламін (NDBA), N-нітрозозо-N-метил-4-аміномасляна кислота (NMBA), N-нітрозодіізопропіламін (NDIPA), N-нітрозоетил-ізопропіламін (NEIPA) та N-нітрозодипропіламін (NDPA). Гранична чутливість аналізу становить менше 30 ppb.

Для їхнього визначення використовують такі методи: газова хроматографія-мас-спектрометрія (ГХ/МС), газова хроматографія з тандемною мас-спектрометрією (ГХ/МС/МС) та високорідинна рідинна хроматографія з тандемним мас-спектрометричним детектуванням (ВЕРХ/МС/МС). Однак жоден із них не охоплює всі можливі нітрозаміни. Найбільшу кількість домішок (6) визначає метод ГХ/МС/МС, тоді як ВЕРХ/МС/МС дозволяє аналізувати 5 видів домішок. Метод ГХ/МС використовується лише для виявлення NDMA та NDEA [5].

У табл. 2.2 узагальнено аналітичні методики, рекомендовані Європейською фармакопеею, із зазначенням нітрозамінів, які визначаються, та LOQ для кожного методу.

Метод газової хроматографії-мас-спектрометрії (ГХ/МС). Найпростішим способом визначення двох основних нітрозамінів, NDMA та NDEA, є газова хроматографія-мас-спектрометрія (ГХ/МС) із парофазним інжектуванням. Обидві сполуки мають високу леткість, що дозволяє їм ефективно переходити у парову фазу, а пробопідготовка для цього методу є мінімальною.

Таблиця 2.2 Методики контролю, рекомендовані Європейською Фармакопеею

Метод	Нітрозаміни	LOQ
Газова хроматографія-мас-спектрометрія	NDMA, NDEA	15 ppb NDMA, 30 ppb NDEA
Газова хроматографія з тандемною мас-спектрометрією (парофазне інжектування)	NDMA, NDEA, NDIPA, NEIPA	2–10 ppb
Високорідинна рідинна хроматографія з тандемним мас-спектрометричним детектуванням	NDMA, NDEA, NDIPA, NEIPA, NMBA	0,25–1 ppb
Газова хроматографія з тандемною мас-спектрометрією (рідинне інжектування)	NDMA, NDEA, NDIPA, NEIPA, NDBA, NDPA	0,5–1 ppb

Метод, розроблений із використанням парофазного пробовідбірника Thermo Scientific TriPlus 500 HS, газового хроматографа Trace 1310 та одноквадрупольного мас-детектора ISQ™ 7000, забезпечує межу кількісного визначення 15 ppb для NDMA (LOD – 4 ppb) та 30 ppb для NDEA (LOD – 9 ppb). Це значно перевищує чутливість європейських та FDA-методик, розроблених на аналогічному обладнанні інших виробників [5].

Метод газової хроматографії та тандемної мас-спектрометрії (ГХ/МС/МС).

Розглядаючи методи з тандемною мас-спектрометрією, можна виділити два підходи:

Парофазне інжектування – оптимальне для аналізу найбільш летких нітрозамінів, що мінімізує вплив матриці, знижує фоновий шум та підвищує селективність.

Пряме рідинне інжектування – дозволяє одночасно визначати ширший спектр нітрозамінів, але потребує складнішої пробопідготовки.

Парофазний метод забезпечує мінімальну підготовку зразка. Компанія Thermo Scientific представила метод для чотирьох нітрозамінів (NDMA, NDEA, NDIPA, NEIPA) з використанням мас-детектора TSQ™ 9000 та парофазного пробовідбірника TriPlus 500 HS. Він є аналогічним методиці FDA (№124025), але забезпечує значно нижчий ліміт кількісного визначення (2–10 ppb) і ліміт детектування 2 ppb, що робить його в 5–20 разів чутливішим за методи FDA на аналогічному обладнанні інших виробників.

Методи прямого рідинного інжектування стикаються з більшим впливом матриці, що ускладнює аналіз і потребує ретельної підготовки проби. Метод, розроблений Thermo на TSQ™ 9000 для п'яти нітрозамінів, має ліміт кількісного визначення 0,5–1 ppb та ліміт детектування 0,2–0,5 ppb, що значно перевищує регуляторні вимоги [5].

Метод високоефективної хрідинної хроматографії з тандемним мас-спектрометричним детектуванням (ВЕРХ/МС/МС). Межа кількісного визначення (LOQ) для NDMA – одного з найлеткіших і найскладніших для аналізу рідинною хроматографією компонентів – на найменш чутливому з сучасних тандемних квадрупольних мас-детекторів Thermo становить 0,3 мкг/кг. У свою чергу, опубліковані користувачами з Індії та Кореї методики дозволяють визначати 6 та 11 нітрозамінів в одному аналізі, забезпечуючи чутливість від 0,25 до 1 ppb, що значно перевищує показники аналогічних методів на обладнанні інших виробників.

Для оптимального визначення NDMA рекомендованим є використання хімічної іонізації за атмосферного тиску (APCI), яка забезпечує в середньому

втричі вищу чутливість, ніж стандартна електроспрей-іонізація (ESI). Для інших нітрозамінів вибір типу іонізації не є критичним.

Метод ВЕРХ/МС/МС є необхідним у разі аналізу NMBA, оскільки його фізико-хімічні властивості унеможливають ефективне визначення за допомогою газової хроматографії. Натомість для решти нітрозамінів, які підлягають контролю відповідно до нової фармакопейної статті, можна застосовувати ГХ/МС/МС методику [5].

2.3.3. Методи визначення нітрозамінів рекомендовані Агентством по контролю за харчовими продуктами та лікарськими засобами США

Агентство по контролю за харчовими продуктами та лікарськими засобами США (FDA) в свою чергу опублікувало низку рекомендованих методик для визначення нітрозамінів у фармацевтичних препаратах, наведених у табл. 2.3 [5].

Таблиця 2.3 Методики контролю нітрозамінів, рекомендовані FDA

Метод	Нітрозаміни	LOQ
Метод газової хроматографії з хедспейс-аналізом та тандемною мас-спектрометрією [20]	NDMA, NDEA, NDIPA, NEIPA	50 ppb
Метод газової хроматографії з тандемною мас-спектрометрією [21]	NDMA, NDEA, NDIPA, NEIPA, NDBA	1-40 ppb (5-13 для NDMA і NDEA)
Метод рідинної хроматографії з тандемною мас-спектрометрією [22]	NDMA, NDEA, NEIPA, NDIPA, NDBA, NMBA	100-5000 ppb
Метод рідинної хроматографії з мас-спектрометрією високої роздільної здатності [23]	NDMA, NDEA, NEIPA, NDIPA, NDBA, NMBA	50 ppb

Метод	Нітрозаміни	LOQ
Метод рідинної хроматографії з електроспрей-іонізацією та мас-спектрометрією високої роздільної здатності [24]	NDMA, NDEA, NEIPA, NDIPA, NDPA, NMPA, NDBA, NMBA	5-20 ppb

Метод рідинної хроматографії з тандемною мас-спектрометрією. Було розроблено новий метод рідинної хроматографії з тандемною мас-спектрометрією (RapidFire-MS/MS) для одночасного кількісного визначення N-нітрозодиметиламін (NDMA), N-нітрозодіетиламін (NDEA), N-нітрозоетилізопропіламін (NEIPA), N-нітрозодіізопропіламін (NDIPA), N-нітрозодибутиламін (NDBA), N-нітрозо-N-метил-4-аміномасляна кислота (NMBA) у субстанції лосартані калію. Цей метод можна адаптувати для кількісного визначення зазначених нітрозамінових домішок в інших активних фармацевтичних інгредієнтах та препаратах групи «сартанів» [22].

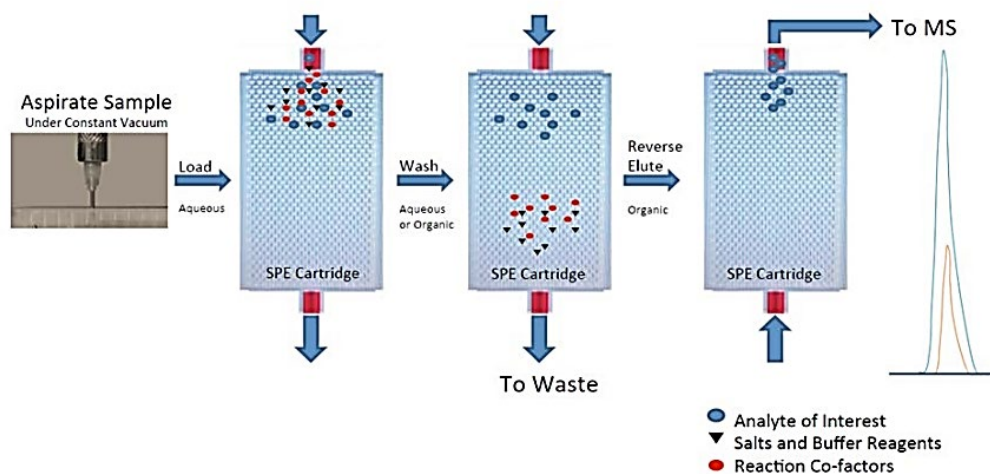


Рис.2.6. Схема методу RapidFire-MS/MS

Підготовка змішаного стандартного розчину: приготувати змішаний стандартний розчин у метанолі з концентрацією 1 мг /мл домішки нітрозоамінів.

Підготовка зразків: зразки лозартану калію екстрагували у співвідношенні 1:5 з етиловим ацетатом шляхом ультразвукової обробки у водяній бані протягом

30 хвилин. Далі зразки центрифугували при 13000 об/хв протягом 10 хвилин. Отримані супернатанти висушували у вакуумі, після чого їх розводили у 10-кратному об'ємі води та змішували у співвідношенні 1:1 з розчином внутрішніх стандартів. Зразки завантажували на картридж для твердофазної екстракції (SPE) з графітовим вуглецем, використовуючи 0,1% мурашину кислоту у воді (насос 1, швидкість потоку 1,5 мл/хв). Десорбцію проводили 0,1% мурашиною кислотою в метанолі (насос 3, швидкість потоку 1 мл/хв). Часові параметри процесу:

Аспірація – 600 мс

Завантаження/промивка – 2000 мс

Елюювання – 7000 мс

Повторне рівноваження – 2000 мс

Повний час аналізу для кожного зразка становив 11,6 секунд [22].

У табл. 2.4 наведено параметри мас-спектрометрії, використані для аналізу у позитивному та негативному режимах іонізації.

Таблиця 2.4 Умови мас-спектрометрії

Параметр	Значення (+)	Значення (-)
Температура газу (°C)	250	250
Потік газу (л/хв)	13	13
Небулізатор (psi)	60	60
Обігрівач газової оболонки	375	375
Потік газової оболонки	11	11
Капіляр (V)	1500	0
Зарядна напруга (V)	500	0

Межі виявлення та межі кількісного визначення наведені у табл. 2.5.

Таблиця 2.5. Результати визначення LOD та LOQ

	NDMA	NDEA	NEIPA	NDIPA	NDBA	NMBA
LOQ, ppm	25	50	0,1	0,25	0,1	0,1
LOD, ppm	10	25	0,05	0,1	0,05	0,05

Метод рідинної хроматографії з мас-спектрометрією високої роздільної здатності. Метод рідинної хроматографії з мас-спектрометрією високої роздільної здатності (LC-HRMS) призначений для кількісного визначення шести нітрозамінових домішок у лікарській субстанції лозартану: N-нітрозодиметиламін (NDMA), N-нітрозодіетиламін (NDEA), N-нітрозоетилізопропіламін (NEIPA), N-нітрозодіізопропіламін (NDIPA), N-нітрозодибутиламін (NDBA), N-нітрузо-N-метил-4-аміномасляна кислота (NMBA).

Шість нітрозамінових домішок (NDMA, NDEA, NEIPA, NDIPA, NDBA та NMBA) розділяються між собою та від лозартану методом реверс-фазової хроматографії та виявляються високочутливим мас-спектрометром високої роздільної здатності (HRAM). Висока чутливість детектування досягається шляхом моніторингу точних значень m/z протонованих або депротонованих іонів домішок чи їхніх фрагментів.

Кількісний аналіз здійснюється шляхом порівняння площі піка домішки в екстрагованих іонних хроматограмах проби зі стандартним зразком у розчині зовнішнього калібрування, що містить референтні стандарти для шести домішок [23].

Матеріали: Референтні стандарти для NDMA, NDEA, NEIPA, NDIPA, NDBA та NMBA; Мурашина кислота; Метанол; Вода; 2-пропанол

Обладнання: Система HPLC або UHPLC з термостатованим автосамплером і колонним відсіком; Гібридний квадруполь-орбітальний мас-спектрометр Q Exactive™ або Q Exactive™ HF-X (ThermoFisher Scientific); HPLC-колонка: Kinetex® 2.6 μm F5 100 Å, 100 x 4.6 мм (Phenomenex, Part No. 00D-4723-E0);

Аналітичні ваги; Вортекс-змішувач; Скляні центрифужні пробірки (15 мл); Механічний шейкер з маятниковим рухом; Шприцеві фільтри PVDF 0,22 мкм; Центрифуга; Флакони для HPLC [23].

Підготовка рухомої фази:

- Рухома фаза А (0,1% мурашина кислота у воді): змішати мурашину кислоту з водою у співвідношенні 1:1000
- Рухома фаза В (0,1% мурашина кислота в метанолі): змішати мурашину кислоту з метанолом у співвідношенні 1:1000

Підготовка змішаного стандартного розчину: приготувати змішаний стандартний розчин у метанолі з концентраціями нітрозамінів NDMA, NDEA, NEIPA, NDIPA та NDBA 100 нг/мл і NMBA - 200 нг/мл [23].

Підготовка стандартного розчину: перенести 1,0 мл змішаного стандартного розчину у мірну колбу на 50 мл та довести об'єм метанолом.

Підготовка зразка лікарської субстанції: точно зважити 100 мг лікарської субстанції у скляну центрифужну пробірку (15 мл), додати 5,0 мл метанолу та змішати розчин на вортекс-змішувачі до повного розчинення.

У табл. 2.6 наведено хроматографічні умови аналізу методом рідинної хроматографії з мас-спектрометрією високої роздільної здатності.

Таблиця 2.6. Умови хроматографії

Колонка	Kinetex® 2.6 µm F5 100 Å, 100 x 4.6 mm (Phenomenex, Part No. 00D-4723-E0)		
Температура колонки	40°C		
Швидкість потоку	0,6 мл/хв		
Об'єм ін'єкції	3 мкл		
Температура автосамплера	4-8°C		
Промивання голки	80:20, метанол:вода з 0,1% мурашиної кислоти		
Граденти	Час, хв	A%	B%
	0	90	10

	1,5	90	10
	7,0	45	55
	17,0	45	55
	17,1	10	90
	21,0	10	90
	21,1	90	10
	25,0	90	10

Основні параметри мас-спектрометрії, що використовувалися для детектування нітрозамінів подано у табл. 2.7.

Таблиця 2.7 Умови мас-спектрометрії

Швидкість потоку захисного газу	55 умовних одиниць
Швидкість потоку допоміжного газу	15 умовних одиниць
Швидкість потоку газу-очисника	0 умовних одиниць
Напруга розпилення	3,5 кВ
Температура капіляра	400°C
Температура нагрівача допоміжного газу	350°C

Межі виявлення, межі кількісного визначення та діапазон методу наведені у табл. 2.8:

Таблиця 2.8 Результати визначення LOD, LOQ та діапазону методу

Нітрозамін	LOD (нг/мл)	LOD (ppm)	LOQ (нг/мл)	LOQ (ppm)	Діапазон (нг/мл)	Діапазон (ppm)
NDMA	0.10	0.005	1.0	0.05	1.0 - 100	0.05 – 5.0
NDEA	0.32	0.016	1.0	0.05	1.0 - 100	0.05 – 5.0
NEIPA	0.05	0.003	1.0	0.05	1.0 - 100	0.05 – 5.0
NDIPA	0.15	0.008	1.0	0.05	1.0 - 100	0.05 – 5.0
NDBA	0.10	0.005	1.0	0.05	1.0 - 100	0.05 – 5.0
NMBA	0.20	0.010	1.0	0.05	1.0 - 200	0.05 – 10.0

Метод рідинної хроматографії з електроспрей-іонізацією та мас-спектрометрією високої роздільної здатності. Метод рідинної хроматографії з електроспрей-іонізацією та мас-спектрометрією високої роздільної здатності (LC-ESI-HRMS) був розроблений для кількісного визначення восьми нітрозамінових домішок у АФІ валсартан: N-нітрозодиметиламін (NDMA), N-нітрозодіетиламін (NDEA), N-етил-N-нітрозо-2-пропанамін (NEIPA), N-нітрозодіізопропіламін (NDIPA), N-нітрозоді-n-пропіламін (NDPA), N-нітрозометилфеніламін (NMPA), N-нітрозоді-n-бутіламін (NDBA), N-нітрозо-N-метил-4-аміномасляна кислота (NMBA).

Вісім нітрозамінових домішок (NDMA, NDEA, NEIPA, NDIPA, NDPA, NMPA, NDBA, NMBA) відокремлюються один від одного та від валсартану методом зворотнофазової хроматографії та виявляються за допомогою високорозрешного мас-спектрометра (HRAM). Висока чутливість досягається шляхом моніторингу точних значень m/z протонованих або депротонованих іонів домішок або їхніх фрагментів [24].

Кількісний аналіз здійснюється шляхом порівняння площі піку домішки в екстрагованих іонних хроматограмах зразків зі стандартом у зовнішньому калібраційному розчині, що містить референтні стандарти для восьми домішок.

Матеріали: Референтні стандарти NDMA, NDEA, NEIPA, NDIPA, NDPA, NMPA, NDBA, NMBA; Мурашина кислота, Метанол; Вода.

Обладнання: HPLC або UHPLC система з термостатованим автозавантажувачем і термостатованим колонковим відсіком; Q Exactive™ гібридний квадрупольно-орбітарний мас-спектрометр (ThermoFisher Scientific); HPLC-колонка: Phenomenex Kinetex® 2.6 μm Biphenyl 100 Å, 150 x 3.0 мм (Part No. 00F-4622-Y0); Аналітичні ваги; Вортекс-міксер; Скляні центрифужні пробірки (15 мл); Шейкер із механічним обертанням; Шприцеві фільтри PVDF 0.22 мкм; Центрифуга; Флакони для HPLC [24].

Підготовка рухомих фаз:

Рухома фаза А (0.1% мурашина кислота у воді): змішати мурашину кислоту та воду у співвідношенні 1:1000

Рухома фаза В (0.1% мурашина кислота в метанолі): змішати мурашину кислоту та метанол у співвідношенні 1:1000

Підготовка змішаного стандартного розчину: приготувати змішаний стандартний розчин у метанолі з концентрацією нітрозамінів 100 нг/мл [24].

Підготовка стандартного розчину: перенести 0,75 мл змішаного стандартного розчину у мірну колбу на 25 мл і довести об'єм метанолом.

Підготовка зразка АФІ: точно зважити 400 мг лікарської речовини та перенести в скляну центрифужну пробірку (15 мл), додати 4,0 мл метанолу та змішати за допомогою вортекс-міксер, струшувати пробу протягом 40 хвилин на механічному шейкері. Після екстракції центрифугувати пробу 15 хвилин при 4500 об/хв, відфільтрувати супернатант через шприцевий фільтр 0.22 мкм, відкинути перші 1 мл фільтрату. Перенести профільтрований зразок у флакон для HPLC для подальшого аналізу [24]. У табл. 2.9 наведено хроматографічні умови аналізу методом рідинної хроматографії з електроспрей-іонізацією та мас-спектрометрією високої роздільної здатності.

Таблиця 2.9 Умови хроматографії

Колонка	Phenomenex Kinetex® 2.6 µm Biphenyl 100 Å, 150 x 3.0 мм (Part No. 00F-4622-Y0)		
Температура колонки	40°C		
Швидкість потоку	0,4 мл/хв		
Об'єм ін'єкції	3 мкл		
Промивання голки	80:20, метанол:вода з 0,1% мурашиної кислоти		
Граденти	Час, хв	А%	В%
	0	95	5
	3,0	95	5
	5,0	90	10
	6,0	40	60

	10,0	40	60
	13,0	20	80
	13,1	0	100
	15,0	0	100
	15,1	95	5
	18,0	95	5

Основні параметри мас-спектрометрії, що використовувалися для детектування нітрозамінів подано у табл. 2.10.

Таблиця 2.10 Умови мас-спектрометрії

Швидкість потоку захисного газу	55 умовних одиниць
Швидкість потоку допоміжного газу	15 умовних одиниць
Швидкість потоку газу-очисника	0 умовних одиниць
Напруга розпилення	3,5 кВ
Температура капіляра	400°C
Температура нагрівача допоміжного газу	350°C

Межа виявлення, межа кількісного визначення та діапазон методу наведені у табл. 2.11.

Таблиця 2.11 Результати визначення LOD, LOQ та діапазону методу

Домішка	LOD (нг/мл)	LOD (ppm)	LOQ (нг/мл)	LOQ (ppm)	Діапазон (нг/мл)	Діапазон (ppm)
NDMA	0.5	0.005	1.0	0.01	1.0 – 10	0.01 – 0.1
NDEA	0.2	0.002	2.0	0.02	2.0 – 10	0.02 – 0.1
NEIPA	0.3	0.003	2.0	0.02	2.0 – 10	0.02 – 0.1
NDIPA	0.1	0.001	2.0	0.02	2.0 – 10	0.02 – 0.1
NDPA	0.1	0.001	0.5	0.005	0.5 – 10	0.005 – 0.1
NMPA	0.1	0.001	0.5	0.005	0.5 – 10	0.005 – 0.1
NDBA	0.1	0.001	0.5	0.005	0.5 – 10	0.005 – 0.1
NMBA	0.2	0.002	0.5	0.005	0.5 – 10	0.005 – 0.1

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Одночасне визначення усіх нітрозамінових домішок, які підлягають контролю згідно фармакопеї, у активних фармацевтичних інгредієнтах має низку важливих переваг для лабораторій контролю якості:

Економія часу та ресурсів – виконання одного комплексного аналізу замість кількох окремих значно скорочує час дослідження та кількість необхідних реагентів і витратних матеріалів.

Підвищення аналітичної продуктивності – дозволяє обробити більше зразків за одиницю часу без втрати якості результатів.

Зменшення ризику похибок – мінімізується ймовірність людських помилок, які можуть виникати під час багаторазового приготування проб та виконання кількох окремих методик.

Забезпечення повного контролю відповідності вимогам фармакопеї – одночасний аналіз усіх регламентованих нітрозамінів гарантує, що жодна критично небезпечна домішка не буде пропущена.

Оптимізація витрат на валідацію – потреба валідувати один комбінований метод замість кількох окремих спрощує та здешевлює процедуру впровадження у лабораторну практику.

Спрощення документації та звітності – об'єднаний звіт за одним аналітичним методом значно полегшує аудит та внутрішній контроль якості.

Таким чином, впровадження такого підходу підвищує ефективність фармацевтичного контролю, знижує експлуатаційні витрати лабораторій та покращує безпеку готових лікарських засобів.

Отже, на основі описаних методів можна виділити наступні переваги та недоліки для кожної групи.

3.1. Порівняльний аналіз методів одночасного визначення нітрозамінів за кількістю домішок

У табл. 3.1 наведено порівняльний аналіз можливостей різних аналітичних методів, що застосовуються офіційними регуляторними органами (OMCL, Ph. Eur., FDA), щодо кількості та видів нітрозамінових домішок, які можуть бути виявлені за допомогою відповідних методик.

Організація OMCL (Official Medicines Control Laboratories) у своїх протоколах використовує низку методів, зокрема HS-ГХ/МС, РХ/МС/МС, УВЕРХ-МС/МС (з АРСІ-іонізацією), ВЕРХ-УФ та ГХ/МС/МС. Перші чотири методи дозволяють виявити лише дві домішки – NDMA (N-нітрозодиметиламін) та NDEA (N-нітрозоетиламіламін). Натомість ГХ/МС/МС значно розширює спектр детекції до шести сполук, додаючи EIPNA, DIPNA, DPNA та DBNA, що робить цей метод більш інформативним.

Європейська Фармакопея (Ph. Eur.) також застосовує кілька варіантів газової та рідинної хроматографії з мас-спектрометрією. Стандартна ГХ/МС-методика дозволяє виявити лише NDMA та NDEA, тоді як використання ГХ/МС/МС з парофазним інжектуванням розширює список до чотирьох домішок, включаючи NDIPA та NEIPA. Найбільш ефективним є ГХ/МС/МС з рідинним інжектуванням, що дає змогу виявити шість домішок, зокрема також NDBA та NDPA. Метод ВЕРХ/МС/МС, згідно з Ph. Eur., також має високу ефективність і дозволяє виявляти п'ять домішок, включаючи NMBA.

FDA застосовує найширший спектр методів, що охоплює як HS-ГХ/МС/МС, так і високороздільну мас-спектрометрію (HRMS). Стандартні методи, як-от HS-ГХ/МС/МС та ГХ/МС/МС, дозволяють виявити 4–5 домішок, тоді як РХ/МС-HR та РХ/МС/МС вже охоплюють 6 речовин. Найбільш чутливим та всеохопним є метод РХ/МС-HR з електроспрей-іонізацією (ESI), який забезпечує виявлення 8 нітрозамінів, включаючи рідше зустрічаємі сполуки, як-от NDPA, NMPA, та NMBA.

Таблиця 3.1 Порівняння методів одночасного визначення нітрозамінів за кількістю домішок

Джерело	Метод	Кількість домішок	Домішки
OMCL	HS-ГХ/МС	2	NDMA, NDEA
	PX/МС/МС	2	NDMA, NDEA
	УВЕРХ-МС/МС(АРСІ)	2	NDMA, NDEA
	ВЕРХ-УФ	2	NDMA, NDEA
	ГХ/МС/МС	6	NDMA, NDEA, EIPNA, DIPNA, DPNA, DBNA
Ph. Eur.	ГХ/МС	2	NDMA, NDEA
	ГХ/МС/МС (парофазне інжектування)	4	NDMA, NDEA, NDIPA, NEIPA
	ВЕРХ/МС/МС	5	NDMA, NDEA, NDIPA, NEIPA, NMBA
	ГХ/МС/МС (рідинне інжектування)	6	NDMA, NDEA, NDIPA, NEIPA, NDBA, NDPA
FDA	HS- ГХ/МС/МС	4	NDMA, NDEA, NDIPA, NEIPA
	ГХ/МС/МС	5	NDMA, NDEA, NDIPA, NEIPA, NDBA
	PX/МС-HR	6	NDMA, NDEA, NEIPA, NDIPA, NDBA, NMBA
	PX/МС/МС	6	NDMA, NDEA, NEIPA, NDIPA, NDBA, NMBA
	PX/МС-HR(ESI)	8	NDMA, NDEA, NEIPA, NDIPA, NDPA, NMPA, NDBA, NMBA

Загалом, найбільшу кількість домішок (до 8) виявляють методи рідинної хроматографії з високороздільною мас-спектрометрією (особливо з ESI), що свідчить про їх високу селективність і придатність для поглибленого аналізу домішок. У той час як газова хроматографія з мас-спектрометрією (у тому числі з парофазним інжектуванням) також залишається високоефективним інструментом для рутинного аналізу 4–6 основних нітрозамінів.

Ці дані підкреслюють необхідність вибору методики з урахуванням мети аналізу: для базового контролю – достатньо методів з детекцією NDMA та NDEA, тоді як для поглибленої оцінки безпечності та відповідності нормативам – доцільно використовувати високочутливі методи PX/MC-HR або GX/MC/MC.

3.2. Порівняльний аналіз методів одночасного визначення нітрозамінів за межою кількісного визначення та відповідністю вимогам Фармакопеї

У табл. 3.2 представлено порівняння LOQ різних аналітичних методів, що використовуються основними регуляторними органами – OMCL, Ph. Eur. та FDA – з висновком щодо відповідності фармакопейним вимогам. Згідно з Європейською фармакопеею, прийнятним вважається метод, у якому LOQ не перевищує 30 ppb.

Серед методів, рекомендованих OMCL, лише два відповідають цим критеріям – PX/MC/MC (19–492 ppb), коли LOQ перебуває в нижньому діапазоні, та GX/MC/MC (15 ppb). Інші методи, зокрема HS-GX/MC, UVERX-MC/MC (APCI) та VERX-УФ, демонструють значно вищі межі кількісного визначення ($LOQ > 30$ ppb) і, відповідно, не відповідають фармакопейним вимогам, що обмежує їх застосування в офіційному контролі якості.

Ph. Eur. пропонує методики, які повністю відповідають встановленим нормативам, з LOQ у діапазоні 0.25–30 ppb. Особливо чутливими є VERX/MC/MC (0.25–1 ppb) та GX/MC/MC з парофазним (2–10 ppb) або рідинним інжектуванням (0.5–1 ppb), що забезпечує високу точність і достовірність результатів при аналізі слідів нітрозамінів.

Таблиця 3.2. Порівняння методів одночасного визначення нітрозамінів за відповідністю вимогам Фармакопеї

Джерело	Метод	LOQ (ppb)	Відповідність вимогам Фармакопеї (LOQ <30ppb)
OMCL	HS-ГХ/МС	80-100	Не відповідає
	PX/МС/МС	19-492	Відповідає
	УВЕРХ- МС/МС(APCI)	100-200	Не відповідає
	ВЕРХ-УФ	40-500	Не відповідає
	ГХ/МС/МС	15	Відповідає
Ph. Eur.	ГХ/МС	15-30	Відповідає
	ГХ/МС/МС (парофазне інжектування)	2–10	Відповідає
	ВЕРХ/МС/МС	0.25–1	Відповідає
	ГХ/МС/МС (рідинне інжектування)	0.5–1	Відповідає
FDA	HS- ГХ/МС/МС	50	Не відповідає
	ГХ/МС/МС	1–40	Відповідає
	PX/МС-HR	50	Не відповідає
	PX/МС/МС	100–5000	Не відповідає
	PX/МС-HR(ESI)	5–20	Відповідає

FDA використовує широкий спектр методів із різним рівнем чутливості. Серед них лише ГХ/МС/МС (1–40 ppb) та PX/МС-HR (ESI) (5–20 ppb) мають LOQ, який може відповідати вимогам, тоді як інші методики, такі як HS-ГХ/МС/МС (50 ppb), PX/МС-HR (50 ppb) та особливо PX/МС/МС (100–5000 ppb), не відповідають фармакопейному порогу.

Таким чином, для забезпечення відповідності аналітичних досліджень вимогам Європейської фармакопеї, доцільно надавати перевагу методам з найнижчими значеннями LOQ, зокрема ГХ/МС/МС (Ph. Eur.) та ВЕРХ/МС/МС,

які забезпечують надійний контроль навіть при слідових кількостях нітрозамінів. Методи з LOQ вище 30 ppb можуть використовуватися для попереднього скринінгу, проте не рекомендовані для офіційної кваліфікації зразків.

3.3. Переваги та обмеження одночасного визначення нітрозамінів

Методи OMCL (Європейська мережа офіційних лабораторій контролю лікарських засобів)

Переваги: стандартизований підхід до вимірювання NDMA і NDEA, просте обладнання у порівнянні з іншими групами методів.

Недоліки: обмежена чутливість (у багатьох методів LOQ > 30 ppb), обмежена кількість нітрозамінів, що підлягають виявленню, застарілі підходи, не відповідають сучасним вимогам EMA/FDA.

Методи Європейської фармакопеї

Переваги: висока чутливість (LOQ від 0,25 до 10 ppb), висока точність і відтворюваність, затверджено на європейському рівні.

Недоліки: жодна методика не охоплює одночасно всі 7 нітрозамінів, потреба в спеціалізованому обладнанні (MS/MS, APCI, ESI), складна пробопідготовка.

Методи FDA (Агентство по контролю за харчовими продуктами та лікарськими засобами США)

Переваги: найширше покриття нітрозамінів (до 8-9 одночасно), висока чутливість (LOQ до 0.1 ppb), універсальність для різних АФІ, актуальність до найновіших вимог регуляторів.

Недоліки: методики складні у валідації, висока вартість обладнання, складна пробопідготовка, потреба в висококваліфікованому персоналі.

Порівняльний аналіз методів одночасного визначення нітрозамінів представлений у табл. 3.3.

Таблиця 3.3 Переваги та обмеження одночасного визначення нітрозамінів

Джерело	Переваги	Недоліки
OMCL	• Стандартизований підхід до NDMA і NDEA • Просте, доступне обладнання	• Більшість методів мають LOQ > 30 ppb • Виявляється лише 1–2 нітрозаміни • Застарілі підходи • Не відповідають сучасним вимогам EMA/FDA
Ph. Eur	• Висока чутливість (LOQ 0,25–10 ppb) • Висока точність і відтворюваність • Затвердження на європейському рівні	• Не охоплює всі 7 нітрозамінів одночасно • Потреба у спеціалізованому обладнанні (MS/MS, APCI, ESI) • Складна пробопідготовка
FDA	• Найширше покриття нітрозамінів (до 8–9 одночасно) • Висока чутливість (до 0.1 ppb) • Універсальність для різних АФІ • Сучасність методів	• Складність валідації • Висока вартість обладнання • Складна пробопідготовка • Потреба у висококваліфікованому персоналі

Ці результати свідчать, що при виборі методики варто враховувати як кількість нітрозамінів, що підлягають контролю, так і чутливість методу, його відповідність регуляторним вимогам і наявне лабораторне обладнання. Для рутинного аналізу NDMA/NDEA в умовах типової лабораторії підходять ГХ/МС методи OMCL. Для найвищої чутливості та охопленню широкого спектра домішок оптимальними є методи PX/MC-HR(ESI) та RapidFire- MC/MC від FDA. Для офіційного аналізу згідно з європейськими вимогами найбільш доцільні методи ГХ/МС/МС та ВЕРХ/МС/МС Європейської фармакопеї.

ВИСНОВКИ

1. На основі аналізу регуляторних вимоги та нормативних документів щодо методів одночасного визначення домішок нітрозамінів у сартанах, рекомендованих Агентством по контролю за харчовими продуктами та лікарськими засобами США, Європейським директором якості лікарських засобів та охорони здоров'я, з'ясовано умови виконання рекомендованих методик.

2. У результаті порівняльного аналізу методик за критеріями: кількістю домішок нітрозамінів при їх одночасному визначенні, межею кількісного визначення та відповідністю вимогам нормативних документів встановлено, що методи, рекомендовані Європейською фармакопеею та Агентством по контролю за харчовими продуктами та лікарськими засобами США, забезпечують вищу чутливість, точність, відтворюваність та максимальну кількість одночасно визначуваних нітрозамінів в одному аналізі.

3. За результатами порівняння переваг та обмежень методів одночасного визначення домішок нітрозамінів у сартанах встановлено, що найвищу чутливість і здатність визначати максимальну кількість нітрозамінів демонструє методика рідинної хроматографії з електроспрей-іонізацією та мас-спектрометрією високої роздільної здатності, рекомендована Агентством по контролю за харчовими продуктами та лікарськими засобами США.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Яковлева О.О., Кириченко О.В. Фармакокінетичні та фармакодинамічні особливості окремих представників класу сартанів. *Раціональна фармакотерапія*. 2011, Т. 18, №1. С. 60-64.
2. Жарикова Ю.В. Артеріальна гіпертензія: ефективність сартанів. Український медичний часопис: веб-сайт. URL: <https://umj.com.ua/uk/novyna-194001-arterialna-gipertenziya-efektivnist-sartaniv>.
3. Мерецький В.М. Застосування блокаторів рецепторів ангіотензину II в лікуванні артеріально гіпертензії. *Здобутки клінічної і експериментальної медицини*. 2015, № 1. С.98-101.
4. Іванов В.П. Блокатори рецепторів до ангіотензину II: аспекти клінічного застосування в терапевтичній практиці. Український медичний часопис: веб-сайт. URL: <https://umj.com.ua/uk/publikatsia-53845-blokatori-receptoriv-do-angiotenzinu-ii-aspekti-klinichnogo-zastosuvannya-v-terapevtichnij-praktici>.
5. Визначення нітрозамінів у фармацевтичній продукції та сировині: веб-сайт. URL: <https://alt.ua/blog/vyznachennya-nitrozaminiv>.
6. Cioc R. C., Joyce C., Mayr M., Bream R. N. Formation of n-nitrosamine drug substance related impurities in medicines: a regulatory perspective on risk factors and mitigation strategies. *Org. Process Res. Dev.* 2023, №27. P. 1736–1750.
7. Комітет з лікарських засобів ЕМА рекомендує виробникам сартанів переглянути виробничі процеси. Аптека.ua: веб-сайт. URL: <https://www.apteka.ua/article/491133>.
8. N-Nitrosodimethylamine. PubChem: веб-сайт. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6124>.
9. Diethylnitrosamine. PubChem: веб-сайт. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5921>.

10. N-Nitrosodibutylamine. PubChem: веб-сайт. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/13542#section=LC-MS>.
11. 4-(N-nitroso-N-methylamino)butyric acid. PubChem: веб-сайт. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/43659>.
12. Nitrosobis(2-oxopropyl)amine. PubChem: веб-сайт. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/43371#section=Other-MS>.
13. Важинський С.Е., Щербак Т.І. Методика та організація наукових досліджень. – Суми: СумДПУ імені А.С. Макаренка, 2016. – 260 с.
14. Добронравова І.С., Руденко О.В., Сидоренко Л.І. та ін. Методологія та організація наукових досліджень: навч. посіб. – К.: ВПЦ "Київський університет", 2018. – 607 с.
15. Гриньова В. М. Методологія наукових досліджень: навчальний посібник. – Харків: ХНАДУ, 2018. – 212 с.
16. Гончарук Т.В. Основи наукових досліджень: навч. посіб. – Тернопіль, 2014. – 272 с.
17. U.S. Food and Drug Administration. Combined N-Nitrosodimethylamine (NDMA) and N-Nitrosodiethylamine (NDEA) Impurity Assay by GC/MS-Headspace: веб-сайт. URL: <https://www.fda.gov/media/117843/download>.
18. U.S. Food and Drug Administration. Combined Direct Injection N-Nitrosodimethylamine (NDMA) and N-Nitrosodiethylamine (NDEA) Impurity Assay by GC/MS: веб-сайт. URL: <https://www.fda.gov/media/117807/download>.
19. U.S. Food and Drug Administration. 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: веб-сайт. URL: <https://www.fda.gov/media/123409/download>.
20. U.S. Food and Drug Administration. Combined Headspace N-Nitrosodimethylamine (NDMA), N-Nitrosodiethylamine (NDEA), N-

Nitrosoethylisopropylamine (NEIPA), and N-Nitrosodiisopropylamine (NDIPA) Impurity Assay by GC-MS/MS: веб-сайт. URL: <https://www.fda.gov/media/124025/download>.

21. U.S. Food and Drug Administration. 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: веб-сайт. URL: <https://www.fda.gov/media/123409/download>.

22. U.S. Food and Drug Administration. Development and validation of a RapidFire-MS/MS method for screening of nitrosamine carcinogen impurities N-Nitrosodimethylamine (NDMA), N-Nitrosodiethylamine (NDEA), N-Nitrosoethylisopropylamine (NEIPA), N-Nitrosodiisopropylamine (NDIPA), N-Nitrosodibutylamine (NDBA) and N-Nitroso-N-methyl-4-aminobutyric acid (NMBA) in ARB drugs: веб-сайт. URL: <https://www.fda.gov/media/125477/download>.

23. U.S. Food and Drug Administration. Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS) Method for the Determination of Six Nitrosamine Impurities in ARB Drugs: веб-сайт. URL: <https://www.fda.gov/media/125478/download>.

24. U.S. Food and Drug Administration. Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-High Resolution Mass Spectrometry (LC-ESI-HRMS) Method for the Determination of Nitrosamine Impurities in Metformin Drug Substance and Drug Product: веб-сайт. URL: <https://www.fda.gov/media/138617/download>.

Типи хроматографів



Газовий хроматографу Trace 1310 з одноквадрупольним мас-детектором ISQ™ 7000



Газовий хроматограф Trace 1310 з мас-детектором TSQ™ 9000 та парофазним пробовідбірником TriPlus 500 HS



Рідинний хроматограф з тандемним квадрупольним мас-детектором Thermo



SUMMARY

Shchyrbul Iryna

Topic: “Comparative analysis of methods for simultaneous determination of nitrosamine impurities in sartans”

Department of analytical, physical and colloid chemistry

Scientific supervisor: Zaitseva Galyna, Lysenko Tetiana

Keywords: N-Nitrosamines, sartans, OMCL, European Pharmacopoeia, FDA, chromatography, mass spectrometry.

Introduction. N-Nitrosamines are highly active mutagenic substances, most of which exhibit carcinogenic properties. Due to their potential hazard, nitrosamines are subject to strict regulatory control in pharmaceuticals. In 2019, the European Medicines Agency (EMA) mandated sartan manufacturers to review their manufacturing processes to prevent nitrosamine formation. A two-year transition period was established, after which companies were required to demonstrate the absence of nitrosamines in their products.

Materials and methods. Bibliographic analysis and regulatory documentation review, analytical-comparative method, and generalization method for the simultaneous determination of nitrosamine impurities in sartans.

Results. Manufacturers are required to use highly sensitive analytical methods to detect even minimal concentrations of nitrosamines. Since 2018, extensive efforts have been made to develop analytical methods for detecting nitrosamines in pharmaceuticals. However, many existing methods no longer meet modern regulatory sensitivity requirements.

Seven major nitrosamines are subject to regulatory control, and analytical methods must have a sensitivity below 30 ppb. The most sensitive techniques include gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The GC-MS/MS method

allows for the detection of up to six nitrosamines, while LC-MS/MS detects five. The GC-MS method is used exclusively for the analysis of NDMA and NDEA.

The FDA has developed several nitrosamine testing methods with varying sensitivity levels and coverage of different impurities. The most sensitive method is based on high-resolution mass spectrometry (LC-ESI-HRMS method), which can detect up to eight nitrosamines. High-resolution mass spectrometry allows for the effective separation of nitrosamines from active pharmaceutical ingredients (APIs) and other contaminants, even in complex matrices.

Conclusions. A comparative analysis of methods for the simultaneous control of nitrosamine impurities in sartans has been conducted. The methods recommended by the European Pharmacopoeia and the FDA are more advanced, sensitive, and comprehensive than most OMCL methods. The highest sensitivity and ability to detect the maximum number of nitrosamines is demonstrated by the liquid chromatography method with electrospray ionization and high-resolution mass spectrometry, as recommended by the FDA.