

Определение нитрозаминов в фармацевтической продукции и сырье

Известно более 300 видов нитрозаминов, свыше 90% из которых являются канцерогенными для различных животных. В соответствии с указаниями ICH M7 (R1) такие нитрозамины относятся к 1-му классу загрязнителей. Особая опасность заключается в том, что нитрозамины очень легко формируются в результате взаимодействия вторичных или третичных аминов с анитрозирующим агентом, а нитриты или амины могут содержаться как непреднамеренные загрязняющие вещества в сырье, реагентах и растворителях, используемых в производственных процессах. Это приводит к образованию нитрозаминов в конечных лекарственных продуктах.

Первый случай обнаружения нитрозаминов в лекарственных средствах был зарегистрирован в 2018 г. Препаратом, контаминированным NDMA (N-нитрозодиметиламин), оказался валсартан, который вследствие этого отозвали с рынка.

Результатом мониторинга количества нитрозаминов в лекарственных препаратах стало регулирование их содержания. Согласно со Стратегией Европейской Фармакопеи с апреля 2021 г. нитрозамины должны отсутствовать в лекарственных препаратах. Уровень NDMA или NDEA в активных субстанциях должен быть предельно минимальным, чтобы «не поддаваться количественному измерению». Европейский директорат по качеству лекарственных средств и охране здоровья опубликовал ряд методов, разработанных официальными лабораториями контроля лекарственных средств (OMCL) Общеввропейской сети OMCL (GEON). Ряд рекомендованных методик для определения нитрозаминов в лекарственных препаратах в свою очередь опубликовала и FDA. Рассмотрим основные из них.



Газовый хроматограф Trace 1300 и масс-детектор TSQ™ 9000 с жидкостным инжектированием

Метод газовой хроматографии масс-спектрометрии (ГХ/МС)

Самым простым методом определения нитрозаминов NDMA и NDEA является ГХ/МС с парофазным инжектированием. Эти нитроамины являются летучими соединениями, которые хорошо переходят в паровую фазу. При этом подготовка пробы, необходимой для такого анализа, — самая минимальная из возможных.

Предел количественного определения метода, разработанного с использованием парофазного пробоотборника Thermo Scientific TriPlus 500 HS, газового хроматографа Trace 1310 и одноквадрупольного масс-детектора ISQ™ 7000, составляет 15 ppb для NDMA (LOD 4 ppb) и 30 ppb для NDEA (LOD 9 ppb), что

намного лучше, чем предел количественного определения европейских методик и методик FDA, разработанных на аналогичном оборудовании других производителей. При этом такое решение является наиболее доступным по цене, а парофазный автосамплер TriPlus 500 HS легко расширяется с базовой конфигурации на 12 виал до максимально доступной пропускной способности на 240 образцов. Система также обеспечивает прямое инжектирование в колонку из парофазного сэмплера с высокой прецизионностью и точностью. Кроме того, благодаря запатентованной системе VPI и NeverVent отсутствует необходимость в продувке системы и время обслуживания прибора явля-

ется минимальным (на 98% меньше, чем требуется для аналогичных приборов других производителей). Если перед вами стоит задача определения только двух указанных основных нитрозаминов, решение на базе ГХ/МС ISQ™ 7000 будет оптимальным по соотношению цена-качество и обеспечит чувствительность на уровне последних регуляторных требований.

Метод газовой хроматографии и тандемной масс-спектрометрии (ГХ/МС/МС)

Методы с использованием тандемной масс-спектрометрии обеспечивают две возможности: парофазное инжектирование для наиболее летучих нитрозаминов и прямое жидкостное инжектирование с предварительной подготовкой пробы для более широкого перечня компонентов в одном анализе.

Парофазное инжектирование устраняет сложность матрицы, спо-

собствуя снижению фонового шума и улучшению селективности. При этом время подготовки пробы является минимальным. Компания Thermo Fisher Scientific опубликовала метод определения 4 нитрозаминов (NDMA, NDEA, NDIPA, NEIPA) с помощью масс-детектора TSQ™ 9000 с парофазным пробоотборником TriPlus 500 HS, аналогичный методу 124025 от FDA, но с лимитом количественного определения от 2 до 10 ppb и лимитом детектирования 2 ppb, что в 5 – 20 раз чувствительнее метода FDA, разработанного на аналогичном оборудовании других производителей. Использование запатентованных технологий VPI и NeverVent также обеспечивает минимальное время для замены колонки или обслуживания источника, что в сочетании с непревзойденной емкостью парофазного автосамплера TriPlus 500 HS обеспечивает высокую пропускную способность прибора.

Методы с прямым жидкостным инжектированием сопряжены со значительным влиянием компонентов матрицы, что усложняет методику и требует тщательной подготовки пробы. Опубликованный компанией Thermo Fisher Scientific метод с использованием масс-детектора TSQ™ 9000 с жидкостным инжектированием для 5 нитрозаминов дает лимит количественного определения от 0,5 до 1 ppb и лимит детектирования от 0,2 до 0,5 ppb. Это значительно превышает требования, предъявляемые к максимальному содержанию нитрозаминов и лимитам количественного определения метода.

Средства улучшения чувствительности и расширения перечня нитрозаминов, которые определяют с помощью метода ГХ/МС/МС, включают использование:

- 1) твердофазного экстрагирования (ТФЭ);



Трехквadrупольный масс-спектрометр TSQ™ Quantis

- 2) SPME (твёрдофазного микроэкстрагирования);
- 3) дисперсивного твёрдофазного экстрагирования (dTFE);
- 4) более мягкой ионизации (для ионизации электронным ударом (ЭИ) и небольших молекул возможна фрагментация до небольших ионов, определению которых может мешать фоновый шум).

При этом использование твёрдофазного микроэкстрагирования (SPME) легко автоматизируется с помощью автоматического роботизированного сэмплера TriPlus RSH, что уменьшает влияние человеческого фактора на качество подготовки образцов, повышает чувствительность и обеспечивает непревыденную воспроизводимость анализа.

Метод жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием

При проведении жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием для количественного определения минимальных количеств контаминантов тщательная подготовка проб является обязательной. На масс-спектрометрических детекторах производства компании Thermo Fisher Scientific разработан метод, включающий только 4 этапа подготовки пробы: измельчение таблетки, экстрагирование путем встряхивания в водном растворе, центрифугирование и фильтрование образца. LOQ метода определения NDMA (летучего и сложного для жидкостной хроматографии компонента) на самом простом из современной линейки тандемных квадрупольных масс-детекторов Thermo Fisher Scientific составляет 0,3 мкг/кг. ВЭЖХ/МС/МС-метод анализа является обязательным, если одним из компонентов, которые необходимо определять, является NMBA. Учитывая физико-химические свойства указанного нитрозамина, выявлять его с проведением газовой хроматографии не рекомендовано. Для всех остальных нитрозаминов, которые

контролируют в соответствии с новой фармакопейной статьей, можно использовать методику ГХ/МС/МС.

Метод жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием высокого разрешения на приборе типа орбитальная ионная ловушка

Источником нитрозаминов чаще всего являются АФИ. Каждый препарат имеет свои свойства, влияющие на эффективность подготовки пробы. Кроме того, готовые лекарственные препараты – достаточно сложная матрица, содержащая большое количество компонентов, которые мешают при проведении анализа. Иногда нитрозамины выходят почти одновременно с пиком АФИ, иногда мешающие пики интерференций искажают количественные результаты определения нитрозаминов. Использование масс-спектрометрии высокого разрешения позволяет эффективно разделять нитрозамины от АФИ или интерференций даже в наиболее сложных образцах. Уникальный дизайн орбитальной ловушки обеспечивает чувствительность не ниже, чем у тандемных квадрупольных детекторов, что делает Orbitrap идеальным выбором для типов анализа, требующих одновременно сверхэффективного разделения и достижения чувствительности на уровне нанограммов.

Метод, опубликованный на модели Orbitrap Exploris 120, которая была анонсирована в 2020 г., обеспечивает эффективное разделение 7 нитрозаминов в концентрации 0,1 нг/мл с RSD по трем инъекциям от 0 до 3,36%. Использование масс-детекторов высокого разрешения типа Orbitrap – оптимальный выбор для мультикомпонентного анализа с высокой чувствительностью для сложных матриц. В соответствии с методиками FDA с помощью этого метода можно выявлять все 7 нитрозаминов, контролируемых в соответствии с текущими регуляторными требованиями. Это единственный метод, опубликован-

ный для определения 7 нитрозаминов в лекарственных препаратах в целом, без «привязки» к их конкретному типу.

Программное обеспечение для сбора и обработки результатов

Любая фармацевтическая лаборатория сталкивается с тем, что у каждого производителя для трехквадрупольного детектирования разработано отдельное программное обеспечение, которое прекрасно справляется со сложными алгоритмами обработки данных и создания масс-спектрометрических методик, но не соответствует нормативным требованиям, предъявляемым к программному обеспечению. Более того, полноценное подключение таких детекторов, управление ими, хранение методик и обработка результатов в сетевых системах, обеспечивающих целостность данных в фармацевтических лабораториях, на данный момент не представляются возможными.

Компания Thermo Fisher Scientific разработала программное обеспечение, в полной мере соответствующее всем нормативным требованиям, которое одновременно в состоянии управлять сложными масс-спектрометрическими детекторами. Оно одинаково эффективно и безопасно управляет и хранит данные обычных хроматографов и тандемных масс-детекторов. ■



Контактная информация:

«АЛТ Украина Лтд»
бизнес-часть здания ТРЦ «КОМОД»
Киев, ул. митрополита Андрея
Шептицкого (бывшая
Луначарского), 4
Тел.: +38 044 492-72-70
(многоканальный)

