

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ N-НИТРОЗОДИМЕТИЛАМИНА В СУБСТАНЦИИ ВАЛСАРТАН
МЕТОДОМ ГХ-МС/МС-ИЭ**

Густылева Л.К.*, Шачнева М.Д., Кессених Е.Д., Савельева Е.И., Радилов А.С.

ФГУП «Научно-исследовательский институт

гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России

188663 Ленинградская область, Всеволожский район, г.п. Кузьмолловский,

ст. Капитолово, корп. № 93

**E-mail: gustyleva@mail.ru*

Резюме: Предложена процедура обнаружения и идентификации N-нитрозодиметиламина (НДМА) в порошковых фармацевтических субстанциях методом газовой хроматографии – тандемной масс-спектрометрии (ГХ-МС/МС) при ионизации электронами. Отбор пробы проводили из равновесного пара над сухим образцом субстанции методом твердофазной микроэкстракции (ТФМЭ). Предел обнаружения НДМА составляет 1 мкг/кг, что в 50 раз ниже предела обнаружения, установленного официальной методикой FDA (50 мкг/кг). Разработанная процедура была апробирована при анализе 5-ти образцов субстанции валсарсан из разных партий. Примесь НДМА была идентифицирована во всех исследованных образцах. Ориентировочные концентрации оценены в пределах 3 – 30 мкг/кг.

Ключевые слова: N-нитрозодиметиламин, валсарсан, газовая хроматография, тандемная масс-спектрометрия, твердофазная микроэкстракция.

**DETERMINATION OF N-NITROSODIMETHYLAMINE IN VALSARTAN DRUG
SUBSTANCE BY GC-MS/MS-EI**

L.K. Gustyleva*, M.D. Shachneva, E.D. Kessenikh, E.I. Savelieva and A.S. Radilov

Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology Federal State

Unitary Enterprise, Federal Medical Biological Agency of Russia

Build. 93, Kapitolovo Station, g/p Kuz'molovsky, Vsevolozhsky District, 188663 Leningrad

Region, Russian Federation

**E-mail: gustyleva@mail.ru*

Abstract: A procedure has been proposed for the detection and identification of N-nitrosodimethylamine (NDMA) in powder pharmaceutical substances by gas chromatography - tandem mass-spectrometry (GC-MS/MS) with electron ionization. Sampling was carried out from the headspace over a dry sample of substance using the method of solid-phase

microextraction (SPME). The detection limit for NDMA is 1 µg/kg, which is 50 times lower than the detection limit established by the official FDA method (50 µg/kg). The developed procedure was tested in the analysis of 5 samples of the substance valsartan from different batches. NDMA impurity was identified in all samples studied. Concentrations estimated between 3 and 30 µg/kg.

Key words: N-nitrosodimethylamine, valsartan, gas chromatography, tandem mass-spectrometry, solid-phase microextraction.

Введение

В июле 2018 г. с европейского фармацевтического рынка был отозван ряд лекарственных препаратов, в состав которых входит активная фармацевтическая субстанция (АФС) валсартан. Известно, что загрязнение субстанции N-нитрозодиметиламином (НДМА) происходит в результате использования растворителя диметилформамида в процессе производства. На заключительной стадии синтеза из диметилформамида образуется диметиламин, который, в свою очередь, является источником образования НДМА [1]. Содержание НДМА в субстанциях одного из производителей (Китай), согласно данным работы [2], находилось на уровне 60 мг/кг. Позднее выяснилось, что субстанции других производителей (Индия) также содержат НДМА, но на более низких уровнях концентраций [3].

В 2019 г. Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) в открытом доступе была представлена обновленная версия методики определения НДМА в АФС и готовых лекарственных формах валсартана [4]. Согласно методике FDA, навеску субстанции или измельченных таблеток растворяют либо суспендируют в диметилформамиде, пробу отбирают из равновесного пара и анализируют методом ГХ-МС в режиме селективного ионного мониторинга (m/z 74) с использованием капиллярной колонки с неподвижной фазой DB-WAX. Достижимый предел обнаружения составляет 0,05 мг/кг. Если в пищевых продуктах, питьевой воде и напитках достигаемые пределы обнаружения НДМА должны отвечать установленным безопасным уровням, то в фармацевтической продукции присутствие такого опасного канцерогена как НДМА, рассматривается как абсолютно недопустимое. С этих позиций существует потребность в разработке как можно более чувствительных методик определения НДМА в фармацевтической продукции. Поскольку факт обнаружения НДМА в субстанциях и готовых лекарственных формах становится предметом расследования и влечет за собой финансовые и репутационные потери фармацевтических

компаний, к надежности идентификации НДМА предъявляются повышенные требования, что оправдывает дополнительные ресурсные затраты при проведении анализа.

В России в настоящее время методик определения НДМА в субстанциях и готовых лекарственных формах не существует.

Для повышения чувствительности и селективности анализа мы решили отказаться от применения растворителя. Проба из равновесного пара над порошком субстанции или таблетки отбирается на микроволокно, на котором происходит концентрирование НДМА. После достижения равновесия проводится термодесорбция НДМА в хроматографическую колонку в инжекторе газового хроматографа. Ключевым фактором при оптимизации процедуры ТФМЭ является правильный выбор микроволокна. Анализ опыта применения ТФМЭ для определения нитрозаминов в воде и пищевых продуктах показал, что все типы микроволокон для ТФМЭ были неоднократно опробованы исследователями. При отборе проб из равновесного пара наилучшие результаты были получены с использованием комбинированного микроволокна DVB/Carboxen/PDMS [5]. В этой же работе были показаны преимущества тандемной масс-спектрометрии, позволяющие повысить селективность анализа и надежность идентификации НДМА в объектах окружающей среды.

Целью настоящей работы являлось использование преимуществ метода ГХ-МС/МС в сочетании с ТФМЭ из равновесного пара для разработки высокочувствительной и надежной процедуры идентификации НДМА в порошковых субстанциях и готовых лекарственных формах и исследование с помощью разработанной методики образцов субстанции валтарсан на содержание НДМА.

Материалы и методы

Исследование состава равновесного пара над образцами субстанции проводили на газовом хроматомасс-спектрометре фирмы Agilent модели 7890А с масс-селективным детектором с тройным квадруполом GC/MS Triple Quad 7000. Хроматографическое разделение компонентов проводили на колонке HP-5MS: 60 м × 0,250 мм × 0,25 мкм. Условия хроматографического разделения и масс-селективного детектирования представлены в таблицах 1, 2.

Таблица 1

Условия хроматографического разделения

Режим работы инжектора	без деления потока
Температура инжектора	270 °С

Газ-носитель	гелий
Объем вводимой пробы	1 мкл
Объёмная скорость газа-носителя через колонку	1 мл/мин
Температурная программа термостата колонки	40 °С (3 мин)– 10 °С/мин – 280 °С

Таблица 2

Условия масс-селективного детектирования

Температура источника ионов	200 °С
Температура интерфейса	280 °С
Режим ионизации	электронный удар, 70 эВ
Режим детектирования	Мониторинг множественных реакций (ММР)

Перед анализом проводили концентрирование N-нитрозодиметиламина из равновесного пара над образцами субстанции валсартан методом твердофазной микроэкстракции (ТФМЭ) на микроволокно 50/30 μm DVB/Carboxen/PDMS Stable Flex. Перед проведением концентрирования микроволокно кондиционировали в течение 1 ч в инжекторе хроматографа при температуре 270 °С. Навеску каждой субстанции массой 1 г помещали в виалу для ТФМЭ и проводили термостатирование пробы в течение 1 ч при температуре 50 °С. После этого прокалывали септу в крышке виалы, вводили микроволокно в равновесную паровую фазу над пробой и концентрировали компоненты паровой фазы на микроволокно в течение 1 ч при температуре 50 °С. Термодесорбцию уловленных компонентов с микроволокна в хроматографическую колонку осуществляли в горячем (270 °С) инжекторе газового хроматографа.

В качестве образца сравнения использовали ГСО 8836-2006.

Результаты и их обсуждение

Для получения масс-спектра и выбора характеристичных ионов НДМА был проанализирован стандартный водный раствор N-нитрозодиметиламина (ГСО 8836-2006) в режиме сканирования по полному ионному току в диапазоне массовых чисел m/z 40-200. Экспериментально полученный масс-спектр ГСО НДМА полностью совпадал с масс-спектром, приведенным в электронной библиотеке масс-спектров NIST 14. По полученному масс-спектру были определены наиболее интенсивные ионы и подобраны характеристичные ММР-переходы для НДМА: 74→44 и 74→42.

Концентрирование НДМА на микроволокно из паровой фазы над субстанцией валсартан проводили по описанной выше процедуре. В результате ГХ-МС/МС анализа во

Материалы научно-практической конференции «Актуальные вопросы токсикологии и фармакологии»
Санкт-Петербург, 23-24 мая 2019 г.

всех исследованных образцах был идентифицирован НДМА. Концентрации НДМА в субстанциях была оценена методом добавки заведомых количеств НДМА в водном растворе к точным навескам исследуемых образцов субстанций. Концентрации НДМА в субстанциях составляли от 3 до 30 мкг/кг. Предел обнаружения НДМА с помощью разработанной методики, оцененный путем внесения заданных количеств НДМА в 1 г субстанции, заведомо его не содержащей, составил 1 мкг/кг порошка.

Подтверждение идентификации N-нитрозодиметиламина в образцах субстанции валсартан также проводили методом добавки образца состава.

На рисунке представлены ГХ-МС/МС хроматограммы (по ММР-переходу 74→44) исследованной субстанции валсартан и субстанции валсартан с внесением 50 нг НДМА в 1 г субстанции.

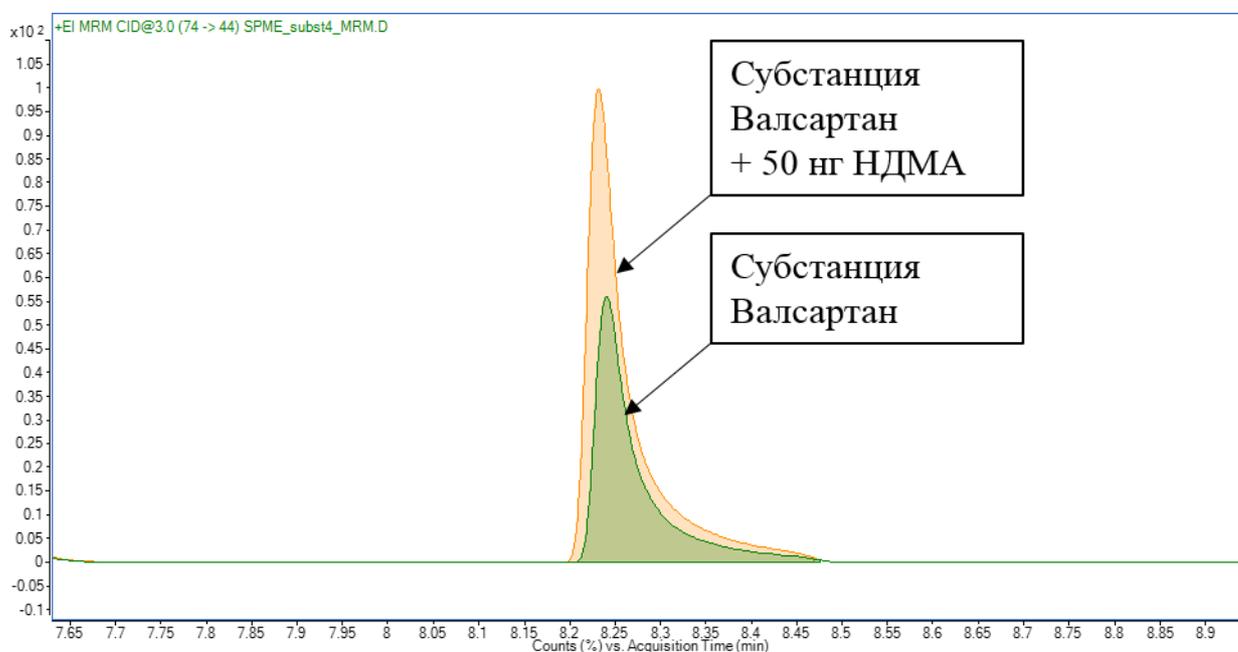


Рисунок – ГХ-МС/МС-ИЭ-хроматограмма субстанции №4 и субстанции №4 с внесением 50 нг НДМА

Рисунок иллюстрирует результат анализа субстанции валсартан, содержащей ориентировочно 0,02 мкг/кг (20 нг/г) НДМА и образца этой же субстанции после внесения 50 нг/г НДМА. Метод добавки позволяет провести оценку содержания НДМА в субстанции и позволяет получить дополнительное подтверждение надежности идентификации этой высокотоксичной примеси в фармацевтической продукции.

Заключение

Разработана методика идентификации микроколичеств N-нитрозодиметиламина в субстанции валсартан методом ГХ-МС/МС в сочетании с ТФМЭ из равновесного пара. Методика может быть применена при контроле безопасности фармацевтической продукции.

Список литературы

1. H. Buschmann, U. Holzgrabe. NDMA in valsartan // *Apoth.* 2018. – V.158. – P. 22–26.
2. M. Abdel-Tawab, R. Gröner, T. Kopp, J. Meins, J. Wübert. ZL findet NDMA in Tabletten // *Pharmazeutische Zeitung.* 2018. – V. 30. – P. 14–16.
3. M. Kr. Parra, J. F. Josepha. NDMA impurity in valsartan and other pharmaceutical products: Analytical methods for the determination of N-nitrosamine // *J. Pharm. Biomed. A.* 2019. – V. 164. – P. 536–549.
4. URL: <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/DrugSafety/UCM623198.pdf>
5. A. Llop, F. Borrull, E. Pocurull. Fully automated determination of N-nitrosamines in environmental waters by headspace solid-phase microextraction followed by GC-MS-MS // *J. Sep. Sci.* 2010. – V. 33. – P. 3692–3700.