**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Примеси *N*-нитрозаминов** |  | **ОФС.1.2.2.2.0031** |
|  |  | **Вводится впервые** |

|  |
| --- |
|  |

Методики определения примесей *N*-нитрозаминов в фармацевтических субстанциях синтетического происхождения группы сартана основаны на использовании масс-спектрометрии.

*N*-нитрозамины – это класс органических веществ, молекулы которых содержат алкилнитрозаминогруппу:



Соединения *N*-нитрозаминов классифицируются как вероятные канцерогены для человека. В силу потенциальной токсичности этих примесей рекомендуется применять меры по контролю и ограничению их присутствия в фармацевтических субстанциях.

Целесообразность определения примесей *N*-нитрозаминов в лекарственных препаратах устанавливается на этапе фармацевтической разработки.

Особое значение имеют соединения, приведенные в таблице 1.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Химическое название** | **Структурная формула** | **Брутто-формула** | **Молекулярная масса** |
| *N*-нитрозо-диметиламин  |  | C2H6N2O | 74,082 |
| *N*-нитрозо-диэтиламин  |  | C4H10N2O | 102,135 |
| N-нитрозо-дибутиламин  |  | C8H18N2O | 158,241 |
| *N*-нитрозо-*N*-метил-4-аминобутановая кислота  |  | C5H10N2O3 | 143,145 |
| *N*-нитрозо-диизопропиламин  |  | C6H14N2O | 130,188 |
| *N*-нитрозо-этил-изопропиламин  |  | C5H12N2O | 116,162 |
| *N*-нитрозо-дипропиламин |  | C6H14N2O | 130,188 |
| *N*-нитрозо-метил-фениламин  |  | C7H8N2O | 136,151 |

Нормы содержания примесей *N*-нитрозаминов должны быть приведены в фармакопейной статье. В случае их отсутствия нормы содержания должны быть рассчитаны с использованием значений максимально допустимой суточной дозы примесей указанных веществ (табл. 2).

Таблица 2 – Максимально допустимая суточная доза примесей
*N*-нитрозаминов

|  |  |
| --- | --- |
| **Наименование** **примеси** | **Допустимая суточная доза, нг/сут** |
| *N*-нитрозо-диметиламин (НДМА) | не более 96,0 |
| *N*-нитрозо-диэтиламин (НДЭА) | не более 26,5 |
| *N*-нитрозо-*N*-метил-4-аминобутановая кислота (НМАК) | не более 96,0 |
| *N*-нитрозо-диизопропиламин (НДИПА) | не более 26,5 |
| *N*-нитрозо-этил-изопропиламин (НЭИПА) | не более 26,5 |

К наиболее вероятным причинам образования примесей
*N*-нитрозаминов в лекарственных средствах относятся:

- использование натрия нитрита или других нитрозирующих соединений в синтезе фармацевтической субстанции.

Например:



- использование загрязнённых сырьевых материалов (растворителей, реагентов и катализаторов) в синтезе фармацевтической субстанции;

- регенерация растворителей, реагентов и катализаторов в процессе синтеза;

- использование контаминированных исходных материалов;

- контаминация от перекрёстно протекающих процессов синтеза;

- деградация исходных материалов, промежуточных продуктов или лекарственных веществ, в том числе при хранении;

- использование определенных видов упаковки (например, возможна контаминация лекарственного препарата в его первичной упаковке; в контурной ячейковой упаковке (блистере), так как покрывающая фольга, содержащая нитроцеллюлозный праймер, способна реагировать с аминами в чернилах с образованием нитрозаминов, которые могут быть перенесены в препарат при определенных условиях упаковки).

Определение *N*-нитрозаминов проводят приведёнными ниже методиками или иными методиками, указанными в фармакопейной статье.

**Методика 1**

Методика распространяется на определение семи примесей
*N*-нитрозаминов в валсартане, ирбесартане и лозартане калия: *N*-нитрозо-диметиламина (НДМА), *N*-нитрозо-диэтиламина (НДЭА), *N*-нитрозо-этил-изопропиламина (НЭИПА), *N*-нитрозо-диизопропиламина (НДИПА),
*N*-нитрозо-дибутиламина (НДБА), N-нитрозо-метил-фениламина (НМФА) и *N*-нитрозо-*N*-метил-4-аминобутановой кислоты (НМАК).

Определение проводят методом ВЭЖХ (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография») с использованием масс-спектрометрии (ОФС «Масс-спектрометрия»).

*Подвижная фаза А (ПФА)*. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 10 мл муравьиной кислоты безводной, прибавляют 500 мл воды и доводят объём раствора водой до метки.

*Подвижная фаза Б (ПФБ)*. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 10 мл муравьиной кислоты безводной, прибавляют 500 мл метанола и доводят объём раствора метанолом до метки.

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 5 мл помещают 0,1 г (точная навеска) субстанции, прибавляют 4 мл метанола, интенсивно перемешивают до растворения, доводят объём раствора метанолом до метки и фильтруют через шприцевой мембранный фильтр из поливинилиденфторида с размером пор 0,22 мкм, отбрасывая первый 1 мл фильтрата.

*Стандартный раствор примесей N-нитрозамина.* Готовят раствор фармакопейных стандартных образцов НДМА, НДЭА,НДБА, НМАК, НДИПА, НЭИПА и НМФА в метаноле с концентрацией по 6 нг/мл.

*Раствор для проверки чувствительности хроматографической системы.* Готовят раствор фармакопейных стандартных образцов НДМА, НДЭА,НДБА, НМАК, НДИПА, НЭИПА, НМФА в метаноле с концентрацией по 1 нг/мл.

*Хроматографические условия*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Колонка |  | 100 × 4,6 мм, силикагель пентафторфенилпропильный, эндкепированный, для хроматографии, 2,6 мкм; |
| Температура колонки |  | 40 °С; |
| Температура образца |  | 4 °С; |
| Скорость потока |  | 0,6 мл/мин; |
| Объём пробы |  | 3 мкл. |

*Режим хроматографирования*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время, мин | ПФА, % | ПФБ, % |
| 0–1,5 | 90 | 10 |
| 1,5–7,0 | 90 → 45 | 10 → 55 |
| 7,0–17,0 | 45 | 55 |
| 17,0–17,1 | 45 → 10 | 55 → 90 |
| 17,1–21,0 | 10 | 90 |
| 21,0–21,1 | 10 → 90 | 90 → 10 |
| 21,1–25,0 | 90 | 10 |

*Условия детектирования*

|  |  |
| --- | --- |
| Источник ионизации | электронная ионизация; |
| **Примесь** | **НДМА** | **НМАК** | **НДЭА** | **НЭИПА** | **НДИПА** | **НМФА** | **НДБА** |
| Режим сканирования | SIM | SIM | PRM | SIM | SIM | SIM | PRM |
| Полярность | + | – | + | + | + | + | + |
| Начало-окончание сканирования, мин | 1,0–3,5 | 3,5–5,5 | 5,5–7,0 | 7,0–8,5 | 8,5–10 | 8,5–10 | 13,0–15,5 |
| Величина m/z (PRM) | – | – | 103,0866 | – | – | – | 159,1492 |
| Нормализованная энергия столкновения | – | – | 25 | – | – | – | 20 |
| Диапазон сканирования | m/z74,3–75,8 | m/z 144,3–145,8 | m/z 50,0–114,0 | m/z 116,4–117,9 | m/z 130,4–131,9 | m/z 136,3–137,8 | m/z 50,0–170,0 |
| Микросканирования | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Разрешение | 30000 | 60000 | 30000 | 60000 | 60000 | 60000 | 60000 |
| Автоматический контроль усиления (%) | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 |

Хроматографируют раствор для проверки чувствительности хроматографической системы, стандартный раствор и испытуемый раствор.

*Относительное время удерживания соединений:* НДБА – 1,0 (около, 14,2 мин); НДМА – около 0,20; НМАК – около 0,31, НДЭА – около 0,46; НЭИПА – около 0,57; НДИПА – около 0,66; НМФА – около 0,67.

*Пригодность ВЭЖХ-МС системы*

На хроматограмме стандартного раствора *относительное стандартное отклонение* площади каждого из пиков примесей
*N*-нитрозаминов должно быть не более 20,0 % (6 введений).

На хроматограмме раствора для проверки чувствительности *отношение сигнал/шум (S/N)* для каждого из пиков примесей *N*-нитрозаминов должно быть не менее 10.

*Обработка результатов*

Для количественного определения используются площади пиков целевых ионов с допуском m/z 15 ppm. Ниже перечислены целевые значения *m/z*:

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Примесь** | **НДМА** | **НМАК** | **НДЭА** | **НЭИПА** | **НДИПА** | **НМФА** | **НДБА** |
| Целевое значение *m/z* | 75,0553 | 145,0619 | 75,0553,103,0866 | 117,1022 | 131,1179 | 137,0709 | 57,0704,103,0872,159,1492 |

Примечание – Примеси НМАК и НЭИПА существуют как синконформационный и антиконформационный изомеры из-за ограниченного вращения связи N–N. Эти изомеры в условиях метода разделяются частично. Пик НМАК наблюдается как дублет, для расчёта концентрации НМАК интегрируют оба пика и используют суммарную площадь. Пик НЭИПА может быть как дублетом, так и одиночным пиком с хвостовым плечом. Если конформеры разделяются, для расчёта концентрации НЭИПА интегрируют оба пика и суммируют их площади, если же конформеры разделены не полностью (наблюдается полупик), для расчёта концентрации НЭИПА интегрируют основной пик и полупик как единый.

Содержание каждой из примесей *N*-нитрозаминов в субстанции в процентах (*Х*) вычисляют по формуле:

$$X=\frac{S\_{1}∙С\_{0}∙P}{S\_{0}∙С\_{1}} ,$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S*1 | – | площадь пика каждой из примесей *N*-нитрозаминов на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S*0 | – | площадь пика соответствующей примеси *N*-нитрозаминов на хроматограмме стандартного раствора; |
|  | *С*1 | – | концентрация субстанции в испытуемом рвстворе, нг/мл; |
|  | *С*0 | – | концентрация каждой из примеси НДМА, НДЭА,НДБА, НМАК, НДИПА, НЭИПА и НМФА в стандартном растворе, нг/мл; |
|  | *P* | – | содержание основного вещества в стандартном образце соответствующей примеси, %. |

**Методика 2**

Методика распространяется на определение четырёх примесей
*N*-нитрозаминов в валсартане, ирбесартане, лозартане калия, олмесартане медоксомиле, кандесартане цилексетиле и телмисартане:
*N*-нитрозодиметиламина (НДМА), *N*-нитрозодиэтиламина (НДЭА), нитрозоэтилизопропиламина (НЭИПА) и *N*-нитрозодиизопропиламина (НДИПА).

Определение проводят методом ГХ (парофазный анализ, ОФС «Газовая хроматография») с использованием масс-спектрометрии (ОФС «Масс-спектрометрия»).

*Раствор внутреннего стандарта А.* Готовят раствор *N*-нитрозо-диметиламина-d6 в метаноле с концентрацией 0,4 мкг/мл.

*Раствор внутреннего стандарта Б.* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 2,0 мл раствора внутреннего стандарта А и доводят объём раствора метанолом до метки.

*Испытуемый раствор.* В хроматографический флакон для парофазного анализа помещают 0,2 г (точная навеска) субстанции, 0,1 г имидазола, 1,0 мл раствора внутреннего стандарта Б и 1,0 мл ацетонитрила. Укупоривают пробкой, закрывают крышкой и плотно прижимают их обкаткой.

*Стандартный раствор А.* Готовят раствор фармакопейных стандартных образцов НДМА, НДЭА, НДИПА и НЭИП в метаноле с концентрацией по 0,4 мкг/мл.

*Стандартный раствор Б.* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 2,0 мл стандартного раствора А и 2,0 мл раствора внутреннего стандарта А и доводят объём раствора метанолом до метки.

*Стандартный раствор В.* Помещают 1,0 мл стандартного раствора Б во флакон для парофазного анализа, содержащий 0,1 г имидазола и 1,0 мл ацетонитрила. Укупоривают пробкой, закрывают крышкой и плотно прижимают их обкаткой.

*Раствор для проверки чувствительности хроматографической системы А.* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 0,5 мл стандартного раствора А и 2,0 мл раствора внутреннего стандарта А и доводят объём раствора метанолом до метки.

*Раствор для проверки чувствительности хроматографической системы Б.* Во флакон для парофазного анализа, содержащий 0,1 г имидазола и 1,0 мл ацетонитрила, помещают 1,0 мл раствора для проверки чувствительности хроматографической системы А. Укупоривают пробкой, закрывают крышкой и плотно прижимают их обкаткой.

*Контрольный раствор*. В хроматографический флакон помещают около 0,1 г (точная навеска) имидазола, прибавляют 1,0 мл раствора внутреннего стандарта Б и 1,0 мл ацетонитрила. Укупоривают пробкой, закрывают крышкой и плотно прижимают их обкаткой.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | кварцевая капиллярная 30 м × 0,32 мм, покрытая слоем макрогола 20 000,1,0 мкм; |
| Детектор | масс-спектрометрический; |
| Газ-носитель | гелий для хроматографии; |
| Деление потока | 1:1 или 1:3; |
| Скорость потока | 1,8 мл/мин; |
| Температура | колонка | 0–3 мин | 45 °С |
|  |  | 3–10 мин | 45 → 130 °С |
|  |  | 10 мин | 190 → 240 °С |

*Условия парофазного анализа*

|  |  |
| --- | --- |
| Температура уравновешивания | 95–110  °С; |
| Время уравновешивания | 10 мин; |
| Температура петли | 150 °С; |
| Температура линии переноса | 160 °С. |

*Условия детектирования*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Источник ионизации |  | электронная ионизация (EI); |
| Режим детектирования |  | мониторинг реакций заданных ионов (MRM). |

*Переходы сканирования масс и энергии столкновений*

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Наименование примеси** | **Относительное время удерживания**  | **Переходы сканирования масс** | **Энергия столкновений,****эВ** |
| НДМА | около 0,8 | 74 → 4474 → 42 | 415 |
| НДМА-d6 | около 0,8 | 80 → 50 | 5 |
| НДЭА | около 0,9 | 102 → 85,1102 → 56,1 | 615 |
| НЭИПА | около 0,96 | 116 → 99,199 → 44,1 | 69 |
| НДИПА | 1 (около 14 мин) | 130 → 42130 → 43,1 | 1018 |

Хроматографируют контрольный раствор, стандартный раствор В, раствор для проверки чувствительности хроматографической системы Б и испытуемый раствор.

Пригодность ГХ-МС системы

На хроматограмме стандартного раствора В *относительное стандартное отклонение* отношения площади каждого из пиков примесей НДМА, НДЭА НЭИПА и НДИПА к площади пика НДМА-d6 должно быть не более 20 % (6 введений).

На хроматограмме раствора для проверки чувствительности *отношение сигнал/шум (S/N)* для каждого из пиков примесей НДМА, НДЭА НЭИПА и НДИПА должно быть не менее 10.

Содержание каждой из примесей *N*-нитрозаминов в субстанции в процентах (*Х*) вычисляют по формуле:

$$Х=\frac{B\_{1}∙С\_{0}∙P}{B\_{0}∙С\_{1}},$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *B*1 | – | отношение площади пика каждой из примесей *N*-нитрозаминовк площади пика *N*-нитрозодиметиламина-d6 на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *B*0 | – | отношение площади пика каждой из примесей *N*-нитрозаминов к площади пика *N*-нитрозодиметиламина-d6 на хроматограмме стандартного раствора В;  |
|  | *С*1 | – | концентрация субстанции в испытуемом рвстворе, нг/мл; |
|  | *С*0 | – | концентрация каждой из примеси НДМА, НДЭА, НДИПА и НЭИП в стандартном растворе В, нг/мл; |
|  | *P* | – | содержание основного вещества в соответствующем образце примеси, %. |

**Методика 3**

Методика распространяется на определение пяти примесей
*N*-нитрозаминов в валсартане, ирбесартане и лозартане калия, кандесартане цилексетиле и олмесартане медоксомиле: *N*-нитрозо-диметиламина (НДМА), *N*-нитрозо-диэтиламина (НДЭА), *N*-нитрозо-этил-изопропиламина (НЭИПА), *N*-нитрозо-диизопропиламина (НДИПА) и *N*-нитро-*N*-метил-4-аминобутановой кислоты (НМАК).

Определение проводят методом ВЭЖХ (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография») с использованием масс-спектрометрии (ОФС «Масс-спектрометрия**»**)

*Подвижная фаза А (ПФА).* Муравьиной кислоты раствор 0,1 %.

*Подвижная фаза Б (ПФБ).* Метанол.

*Раствор внутреннего стандарта.* Готовят раствор НДЭА-d10 в метаноле с концентрацией 9,0 нг/мл.

*Испытуемый раствор.* Суспендируют 0,150 г (точная навеска) субстанции в 0,5 мл метанола, прибавляют 0,5 мл раствора внутреннего стандарта, тщательно перемешивают, выдерживают на ультразвуковой бане в течение 15 мин, охлаждают до комнатной температуры, прибавляют 4,0 мл воды, тщательно перемешивают, выдерживают на ультразвуковой бане в течение 15 мин, центрифугируют в течение 5 мин при 3000 g и фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,2 мкм.

*Стандартный раствор примесей N-нитрозаминов.* Готовят раствор фармакопейных стандартных образцов НДМА, НДЭА, НМАК, НДИПА и НЭИПА в метаноле с концентрацией по 500 мкг/мл.В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 0,3 мл полученного раствора и доводят объём раствора метанолом до метки. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,3 мл полученного раствора и доводят объём раствора метанолом до метки.

*Стандартный раствор А.* Суспендируют около 0,15 г (точная навеска) субстанции в 0,5 мл стандартного раствора примесей *N*-нитрозаминов, прибавляют 0,5 мл раствора внутреннего стандарта и тщательно перемешивают в течение 5 мин, выдерживают на ультразвуковой бане в течение 15 мин, охлаждают до комнатной температуры, прибавляют 4,0 мл воды, тщательно перемешивают в течение 5 мин, выдерживают на ультразвуковой бане в течение 15 мин, охлаждают до комнатной температуры и центрифугируют в течение 5 мин при 3000 g и фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,2 мкм.

*Стандартный раствор Б.* Смешивают 0,5 мл стандартного раствора примесей *N*-нитрозаминов и 0,5 мл раствора внутреннего стандарта, тщательно перемешивают в течение 5 мин, выдерживают на ультразвуковой бане в течение 15 мин, охлаждают до комнатной температуры прибавляют 4,0 мл воды, тщательно перемешивают в течение 5 мин, выдерживают на ультразвуковой бане в течение 15 мин, охлаждают до комнатной температуры и центрифугируют в течение 5 мин при 3000 g, фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,2 мкм.

*Хроматографические условия*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Колонка |  | 150 × 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный, эндкепированный для хроматографии, 3,0 мкм; |
| Температура колонки |  | 40 °С; |
| Температура образца |  | 5 °С; |
| Скорость потока |  | 0,5 мл/мин; |
| Объём пробы |  | 20 мкл. |

*Режим хроматографирования*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Время, мин** | **ПФА, %** | **ПФБ, %** |
| 0–1,0 | 80 | 20 |
| 1,0–6,0 | 80 → 55 | 20 → 45 |
| 6,0–14,0 | 55 | 45 |
| 14,0–16,0 | 55 → 5 | 45 → 95 |
| 16,0–35,0 | 5 | 95 |

Детектирование: трёхквадрупольный масс-спектрометр в режиме мониторинга множественных реакций (MRM). Следующие настройки были признаны подходящими и приведены в качестве примера; настройки могут быть скорректированы таким образом, чтобы выполнялись требования пригодности системы.

*Условия МС/МС*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Режим ионизации |  | APCI-положительный; |
| Температура нагревателя |  | 350 °C; |
| Давление в распылителе  |  | 310 кПа; |
| Температура газа:  |  | 300 °C; |
| Расход осушающего газа  |  | 5 л/мин; |
| Ток в короне |  | 6 мкА; |
| Время выдержки |  | 200 мс; |
| Напряжение в капилляре (Vкап): |  | 1,5 кВ; |
| Напряжение ускорения ячейки:  |  | 3 В. |

*Параметры режима MRM*

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Наименование примеси** | **Относительное время удерживания** | **Переходы MRM (m/z)** | **Энергия столкновений, В** | **Напряжение фрагментора, В** |
| НДМА | около 0,6 | 74 → 58(75 → 43) | 1115 | 2015 |
| НМАК | около 0,7 | 147 → 117(147 → 87) | 26 | 4146 |
| НДЭА | около 1 | 103 → 75(103 → 47) | 917 | 2520 |
| НЭИПА | около 1,3 | 117 → 75(117 → 47) | 715 | 5459 |
| НДИПА | около 1,6 | 131 → 89(131 → 47) | 210 | 2025 |
| НДЭА-d10 | 1(около 8,6 мин) | 113 → 81(117 → 75) | 614 | 7681 |

Хроматографируют стандартный раствор Б, стандартный раствор А, испытуемый раствор.

*Пригодность хроматографический системы*

На хроматограмме стандартного раствора Б *относительное стандартное отклонение* отношения площади каждого из пиков примесей НДМА, НДЭА, НМАК, НДИПА и НЭИПА к площади пика НДЭА-d10 должно быть не более 20 % (6 введений).

На хроматограмме стандартного раствора А:

- *отношение сигнал/шум (S/N)* для пика НДМА, соответствующего основному переходу, должно быть не менее 5;

- *отношение сигнал/шум (S/N)* для каждого из пиков примесей НДЭА, НМАК, НДИПА, НЭИПА, соответствующего основному переходу, должно быть не менее 10;

- *отношение сигнал/шум (S/N)* для каждого из пиков примесей НДМА, НДЭА, НМАК, НДИПА, НЭИПА, соответствующего переходу классификатора, должно быть не менее 3.

Рассчитывают отношения площади пика каждой примеси
*N*-нитрозамина к площади пика внутреннего стандарта на хроматограмме испытуемого раствора (B1).

Рассчитывают отношения площади пика каждой примеси
*N*-нитрозамина к площади пика внутреннего стандарта на хроматограмме стандартного раствора А (B0).

Для каждой обнаруженной примеси *N*-нитрозамина отношение В1/В0 должно быть менее 0,50.

Испытание действительно, если соотношение между площадью пика, соответствующего основному переходу, и площадью пика, соответствующего переходу квалификатора, для испытуемого раствора отличается не более чем на 20 % от того же соотношения, рассчитанного для стандартного раствора А.

**Методика 4**

Методика распространяется на определение шести примесей
*N*-нитрозаминов: *N*-нитрозодиметиламина (НДМА), *N*-нитрозодиэтиламина (НДЭА), *N*-нитрозо-этил-изопропиламина (НЭИПА), *N*-нитрозо-диизопропиламина (НДИПА), *N*-нитрозо-дибутиламина (НДБА) и *N*-нитрозо-дипропиламина (НДПА).

Определение проводят методом ГХ (ОФС «Газовая хроматография»). С использование масс-спектрометрии (ОФС «Масс-спектрометрия»)

*Раствор внутреннего стандарта.* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 5 мг (точная навеска) НЭМА(*N*-нитрозо-этилметиламина, 10595-95-6), растворяют в метаноле и доводят объём раствора тем же растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 0,5 мл полученного раствора и доводят объём раствора водой до метки.

*Раствор для экстракции.* В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 40,0 мг натрия гидроксида, растворяют в 500 мл воды, прибавляют 100 мкл раствора внутреннего стандарта и 50 мл ацетонитрила и доводят объём раствора водой до метки.

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 0,25 г (точная навеска) субстанции, суспендируют в растворе для экстракции и доводят объём раствора тем же растворителем до метки, встряхивают в течение 5 мин, экстрагируют 2 мл метиленхлорида, встряхивая в течение 5 мин и центрифугируя в течение 5 мин при10 000 g. Для анализа используют нижний слой (органический).

*Стандартный раствор примесей N-нитрозаминов.* Готовят раствор фармакопейных стандартных образцов НДМА, НДЭА, НДБА, НДПА, НДИПА и НЭИПА в метаноле с концентрацией по 500 мкг/мл. В мерную колбу10 мл помещают 100 мкл полученного раствора и доводят объём раствора водой до метки. В мерную колбу вместимостью 20 мл помещают 0,3 мл полученного раствора и доводят объём раствора водой до метки.

*Испытуемый раствор с добавками.* Суспендируют 0,25 г субстанции в 10 мл раствора для экстракции, прибавляют 0,1 мл стандартного раствора примесей *N*-нитрозаминов, интенсивно перемешивают в течение 5 мин, экстрагируют с помощью 2 мл метиленхлорида и встряхивают в течение 5 мин, центрифугируют в течение 5 мин при 10 000 g. Для анализа используют нижний слой (органический).

*Стандартный раствор А.* К10 мл раствора для экстракции прибавляют 50 мкл стандартного раствора примесей *N*-нитрозаминов, интенсивно перемешивают в течение 5 мин, экстрагируют 2,0 мл метиленхлорида и встряхивают в течение 5 мин, центрифугируют в течение 5 мин при 10 000 g. Для анализа используют нижний слой (органический).

*Стандартный раствор Б.* К 10 мл раствора для экстракции прибавляют 100 мкл стандартный раствор примесей *N*-нитрозаминов, интенсивно перемешивают в течение 5 мин, экстрагируют 2,0 мл метиленхлорида и встряхивают в течение 5 мин, центрифугируют в течение 5 мин при 10 000 g. Для анализа используют нижний слой (органический).

*Стандартный раствор В.* К 10 мл раствора для экстракции прибавляют 200 мкл стандартного раствора примесей *N*-нитрозаминов, интенсивно перемешивают в течение 5 мин, экстрагируют 2,0 мл метиленхлорида и встряхивают в течение 5 мин, центрифугируют в течение 5 мин при 10 000 g. Для анализа используют нижний слой (органический).

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | кварцевая капиллярная 30 м × 0,25 мм, покрытая слоем поли(цианопропилфенил)(6)(метил)(94)силоксана,1,4 мкм; |
| Детектор | масс-спектрометрический; |
| Газ-носитель | гелий для хроматографии; |
| Скорость потока | 1,3 мл/мин; |
| Объём пробы | 3 мкл; |
| Температура | колонка | 0–0,5 мин | 40 °С |
|  |  | 0,5–2,2 мин | 40 → 140 °С |
|  |  | 2,2–4,2 мин | 140 °С |
|  |  | 4,2–6,2 мин | 140 → 180 °С |
|  |  | 6,2–6,7 мин | 180 °С |
|  |  | 6,7–8,7 мин | 180 → 240 °С |
|  |  | 8,7–10,5 | 240 °С |
|  |  | 10,5–11,5 | 240 → 280 °С |
|  |  | 11,5–14,0 | 280 °С |
|  | Инжектор |  | 250 °С |
|  | Линия переноса |  | 240 |

*Условия детектирования*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Источник ионизации |  | электронная ионизация; |
| Режим детектирования |  | мониторинг реакций заданных ионов (MRM); |
| Температура источников ионов |  | 230 °С; |
| Температура квадруполя |  | 150 °С; |
| Энергия электронов |  | 40 эВ; |
| Задержка растворителя |  | 4,5 мин; |
| Коэффициент усиления |  | 15 |
| Газ для соударений |  | азот; |
| Скорость потока газа для соударений |  | 1,5 мл/мин; |
| Газ для охлаждения |  | гелий. |

*Переходы сканирования масс и энергии столкновений*

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Компонент** | **Относительное время удерживания** | **Переходы сканирования масс** | **Энергия столкновений,****эВ** |
| НДМА | около 0,9 | 74 → 44(74 → 42) | 522 |
| НЭМА | 1 (около 5,50 мин) | 88 → 71 | 5 |
| НДЭА | около 1,1 | 102 → 85(102 → 56) | 319 |
| НЭИПА | около 1,3 | 116 → 99(116 → 44) | 514 |
| НДИПА | около 1,4 | 130 → 88(130 → 71) | 514 |
| НДПА | около 1,5 | 130 → 113130 → 88 | 11 |
| НДБА | около 1,8 | 158 → 141158 → 99 | 17 |

Хроматографируют стандартный раствор А, стандартный раствор Б, стандартный раствор В и испытуемый раствор.

Пригодность ГХ-МС системы

*Пригодность хроматографический системы*

На хроматограмме стандартного раствора Б *относительное стандартное отклонение* отношения площади каждого из пиков примесей НДМА, НДЭА, НДБА, НДПА, НДИПА и НЭИПА к площади пика внутреннего стандарта должно быть не более 20 % (6 введений).

На хроматограмме испытуемого раствора с добавками:

- *отношение сигнал/шум (S/N)* для каждого из пиков примесей НДМА, НДЭА, НДБА, НДПА, НДИПА и НЭИПА, соответствующего основному переходу, должно быть не менее 10;

- *отношение сигнал/шум (S/N)* для каждого из пиков примесей НДМА, НДЭА, НДБА, НДПА, НДИПА и НЭИПА, соответствующего переходу квалификатора, должно быть не менее 3.

Для расчёта содержания используют основные MRM-переходы.

Рассчитывают отношения площади пика каждой примеси
*N*-нитрозамина к площади пика внутреннего стандарта на хроматограмме испытуемого раствора (B1).

Рассчитывают отношения площади пика каждой примеси
*N*-нитрозамина к площади пика внутреннего стандарта на хроматограммеиспытуемого раствора с добавками (B0).

Для каждой обнаруженной примеси *N*-нитрозамина отношение В1/В0 должно быть менее 0,50.

Испытание действительно, если соотношение между площадью пика, соответствующего основному переходу, и площадью пика, соответствующего квалификационному переходу, для испытуемого раствора отличается не более чем на 20 % от того же соотношения, рассчитанного для раствора с добавками.

Для расчёта содержания используют основные MRM-переходы.

*Количественное определение примесей*

Хроматографируют по 3 мкл раствора с добавками, испытуемого раствора и стандартных растворов А, Б и В.

*Пригодность хроматографической системы*

Для каждого *N*-нитрозамина:

- *относительное стандартное отклонение* отношения площади пика каждого нитрозамина к площади пика внутреннего стандарта на хроматограмме стандартного раствора Б не должно превышать 20 %
(6 введений);

- *отношение сигнал/шум (S/N)* для пика, соответствующего основному переходу, должно быть не менее 10;

- *отношение сигнал/шум (S/N)* для пика, соответствующего переходу квалификатора, должно быть не менее 3.

Расчёт: используют основные MRM-переходы.

Строят калибровочную кривую зависимости отношения площади пика каждого *N*-нитрозамина к площади пика внутреннего стандарта в зависимости от концентрации *N*-нитрозамина на хроматограммах стандартных растворов А, Б и В. По полученной калибровочной кривой определяют концентрацию *N*-нитрозамина в испытуемом растворе.

*Пригодность системы:*

- отношение площади пика, соответствующего основному переходу, к площади пика, соответствующего переходу квалификатора, для испытуемого раствора не должно отличаться от того же отношения для раствора с добавками более чем на 20 %;

- рассчитанное извлечение для всех растворов с добавками должно составлять от 70 до 130 %.