

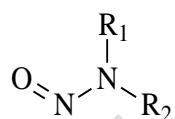
ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

ОФС.1.2.2.0031

ПРИМЕСИ *N*-НИТРОЗАМИНОВ

Общая фармакопейная статья распространяется на методы определения содержания примесей *N*-нитрозаминов в фармацевтических субстанциях и лекарственных препаратах.

N-нитрозамины – класс органических азотсодержащих соединений, молекулы которых содержат в своей структуре нитрозаминогруппу ($\text{R}^1\text{N}(-\text{R}^2)\text{-N}=\text{O}$).



Для контроля примесей *N*-нитрозаминов в фармацевтических субстанциях и лекарственных препаратах используются методы жидкостной и газовой хроматографии с двойным масс-спектрометрическим детектированием (ЖХ-МС/МС и ГХ-МС/МС). ЖХ с масс-спектрометрическим детектором обладает высокой чувствительностью и селективностью. В методиках используется ионизация электрораспылением (electrospray ionization, ESI), ионизация электронным ударом или химическая ионизация при атмосферном давлении (atmospheric pressure chemical ionization, APCI).

С помощью описанных ниже методик можно анализировать следующие *N*-нитрозамины: *N*-нитрозодиметиламин (НДМА), *N*-нитрозо-диэтиламин (НДЭА), *N*-нитрозодибутиламин (НДБА), *N*-нитрозо-*N*-метил-4-аминобутановую кислоту (НМАК), *N*-нитрозодизопропиламин (НДИПА), *N*-нитрозоэтилизопропиламин (НЭИПА) и *N*-нитрозодипропиламин (НДПА).

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

МЕТОДИКА 1 (ЖХ-МС/МС)

Методика распространяется на определение 6 примесей *N*-нитрозаминов в валсартане, ирбесартане, лозартане калия, кандесартане цилексетиле и телмисартане: *N*-нитрозодиметиламина (НДМА), *N*-нитрозодиэтиламина (НДЭА), *N*-нитрозоэтилизопропиламина (НЭИПА), *N*-нитрозодизопропиламина (НДИПА), *N*-нитрозодибутиламина (НДБА) и *N*-нитрозо-*N*-метил-4-аминобутановой кислоты (НМАК).

Жидкостная хроматография (*ОФС «Жидкостная хроматография»*) в сочетании с масс-спектрометрией (*ОФС «Масс-спектрометрия»*).

*Испытуемые растворы и стандартный раствор примесей *N*-нитрозаминов защищают от света.*

Испытуемый раствор (валсартан, лозартан калия). 0,1 г испытуемого образца помещают в пробирку, прибавляют 5,0 мл метанола *P*, интенсивно перемешивают до растворения и фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,20 мкм.

Испытуемый раствор (кандесартана цилексетил, ирбесартан, телмисартан). 0,1 г испытуемого образца помещают в пробирку, прибавляют 5,0 мл метанола *P*, перемешивают на шейкере в течение 40 мин, центрифугируют при 4500 об/мин в течение 15 мин. Надосадочную жидкость фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,20 мкм.

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

Раствор сравнения. Готовят раствор фармакопейных стандартных образцов НДМА, НДЭА, НДБА, НМАК, НДИПА, НЭИПА в метаноле *P* с концентрацией по 1 нг/мл.

Испытуемый раствор (валсартан, лозартан калия) с добавкой стандарта. 0,1 г испытуемого образца помещают в пробирку, прибавляют 5,0 мл стандартного раствора примесей *N*-нитрозаминов, интенсивно

перемешивают до растворения и фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,20 мкм.

Испытуемый раствор (кандесартана цилексетил, ирбесартан, телмисартан) с добавкой стандарта. 0,1 г испытуемого образца помещают в пробирку, прибавляют 5,0 мл стандартного раствора примесей N-нитрозаминов, перемешивают на шейкере в течение 40 мин, центрифугируют при 4500 об/мин в течение 15 мин. Надосадочную жидкость фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,20 мкм.

Условия хроматографирования:

– колонка: длиной 0,1 м и внутренним диаметром 4,6 мм, заполненная силикагелем пентафторфенилпропильным, эндкапированным, для хроматографии с размером частиц 2,6 мкм;

– температура колонки: 40 °C;

– подвижные фазы:

– подвижная фаза А: 0,1 % (об/об) раствор муравьиной кислоты Р в воде для хроматографии Р;

– подвижная фаза Б: 0,1 % (об/об) раствор муравьиной кислоты Р в метаноле Р;

– режим градиентного элюирования:

Время (мин)	Подвижная фаза А (% об/об)	Подвижная фаза Б (% об/об)
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

– скорость потока: 0,6 мл/мин;

– детектор: масс-детектор при следующих параметрах настройки:

- ионизация: химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI);
- полярность: положительная;
- детектирование m/z (режим MRM)

Параметры режима мониторинга реакций заданных ионов (MRM)

Наименование примеси	Контролируемые MRM-переходы
НДМА	75,0 → 58,0 (основной)
	75,0 → 43,0 (подтверждающий)
НМАК	147,0 → 117,0 (основной)
	147,0 → 44,0 (подтверждающий)
НДЭА	103,0 → 75,0 (основной)
	103,0 → 47,0 (подтверждающий)
НЭИПА	117,0 → 75,0 (основной)
	117,0 → 43,0 (подтверждающий)
НДИПА	131,0 → 47,0 (основной)
	131,0 → 89,0 (подтверждающий)
НДБА	159,0 → 103,0 (основной)

- температура автоматического пробоотборника: 10 °C;
- объём вводимой пробы: 3 мкл.

Относительное удерживание (время удерживания НДБА – около 13,2 мин): НДМА – около 0,21; НМАК – около 0,33; НДЭА – около 0,48; НЭИПА – около 0,58; НДИПА – около 0,67.

Пригодность хроматографической системы:

- *отношение сигнал/шум 1*: не менее 10 для каждого из пиков примесей *N*-нитрозаминов на хроматограмме раствора сравнения (основной MRM-переход);
- *отношение сигнал/шум 2*: не менее 3 для каждого из пиков примесей *N*-нитрозаминов на хроматограмме раствора сравнения (подтверждающий MRM-переход);
- *повторяемость*: относительное стандартное отклонение не более 20,0 % площади каждого из пиков примесей *N*-нитрозаминов для 6 повторных

вводов стандартного раствора примесей *N*-нитрозаминов (основной MRM-переход).

Расчёт содержания примесей в процентах

Степень извлечения каждой примеси *N*-нитрозамина в испытуемом растворе с добавкой стандарта должна находиться в диапазоне 70,0–130,0 %.

Примечание. Примеси НМАК и НЭИПА существуют как синконформационный и антисимметрический 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 полутик), для расчёта концентрации НЭИПА интегрируют основной пик и полутик как единый.

Содержание каждой из примесей *N*-нитрозаминов в испытуемом образце в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot C_0 \cdot P}{S_0 \cdot C_1}, \quad (1)$$

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;

C_1 – концентрация субстанции в испытуемом растворе, нг/мл;

C_0 – концентрация каждой из примесей НДМА, НДЭА, НДБА, НМАК, НДИПА и НЭИПА в стандартном растворе, нг/мл;

P – содержание основного вещества в фармакопейном стандартном образце соответствующей примеси, %.

МЕТОДИКА 2 (ГХ-МС/МС)

Методика распространяется на определение 4 примесей *N*-нитрозаминов в валсартане, ирбесартане, лозартане калия, кандесартане цилексетиле, олмесартане медоксомиле и телмисартане: *N*-нитрозодиметиламина (НДМА),

N-нитрозодиэтиламина (НДЭА), *N*-нитрозоэтилизопропиламина (НЭИПА) и *N*-нитрозодизопропиламина (НДИПА).

Парофазная газовая хроматография (*ОФС «Газовая хроматография»*) в сочетании с масс-спектрометрией (*ОФС «Масс-спектрометрия»*).

Все растворы защищают от света.

Раствор внутреннего стандарта (а). Готовят раствор *N*-нитрозодиметиламина- d_6 в метаноле *P* с концентрацией 0,4 мкг/мл.

Раствор внутреннего стандарта (б). 2,0 мл раствора внутреннего стандарта (а) доводят метанолом *P* до объёма 50,0 мл.

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

Раствор сравнения (а). Готовят раствор фармакопейных стандартных образцов НДМА, НДЭА, НДИПА и НЭИПА в метаноле *P* с концентрацией по 0,4 мкг/мл.

Раствор сравнения (б). К 2,0 мл раствора сравнения (а) прибавляют 2,0 мл раствора внутреннего стандарта (а) и доводят объём раствора метанолом *P* до 50,0 мл.

Раствор сравнения (в). 1,0 мл раствора сравнения (б) помещают во флакон для парофазного анализа, содержащий 0,1 г имидазола *P* и 1,0 мл ацетонитрила *P*. Укупоривают пробкой, закрывают крышкой и плотно прижимают их обкаткой.

Раствор сравнения (г). К 0,5 мл раствора сравнения (а) прибавляют 2,0 мл раствора внутреннего стандарта (а) и доводят объём раствора метанолом *P* до 50,0 мл.

Раствор сравнения (д). Во флакон для парофазного анализа, содержащий 0,1 г имидазола *P* и 1,0 мл ацетонитрила *P*, помещают 1,0 мл раствора сравнения (г). Укупоривают пробкой, закрывают крышкой и плотно прижимают их обкаткой.

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

Условия хроматографирования:

- *колонка*: из плавленого кварца длиной 30 м и внутренним диаметром 0,32 мм, покрытая слоем макрогола 20 000 *P* толщиной 1 мкм;
- *газ-носитель*: гелий для хроматографии *P*;
- *скорость потока*: 1,8 мл/мин;
- *деление потока*: 1:1 или 1:3 (деление потока может быть изменено для улучшения чувствительности);
- *допускается использование условий статической парофазной хроматографии*:
 - *температура уравновешивания*: 95–110 °C;
 - *время уравновешивания*: 10 мин;
 - *температура петли*: 150 °C;
 - *температура линии переноса*: 160 °C;
- *режим изменения температуры*:

Элемент	Время (мин)	Температура (°C)
Колонка	0–3	45
	3–11,5	45→130
	11,5–14,5	130
	14,5–18,5	130→190
	18,5–19,75	190→240
	19,75–29,75	240
Инжектор		150

- *детектор*: масс-детектор при следующих параметрах настройки:
 - ионизация: электронный удар;
 - детектирование m/z (режим MRM)

Переходы сканирования масс и энергии столкновений

Наименование примеси	Переходы сканирования масс	Энергия столкновений, эВ
----------------------	----------------------------	--------------------------

НДМА	74 → 44 74 → 42	4 15
НДМА-d ₆	80 → 50	5
НДЭА	102 → 85,1 102 → 56,1	6 15
НЭИПА	116 → 99,1 116 → 44,1	6 9
НДИПА	130 → 42 130 → 43,1	10 18

– *ввод проб*: контрольный раствор, раствор сравнения (в), раствор сравнения (д) и испытуемый раствор.

Относительное удерживание (время удерживания НДИПА – около 14 мин): НДМА – около 0,8; НДМА-d₆ – около 0,8; НДЭА – около 0,9; НЭИПА – около 0,96.

Пригодность хроматографической системы:

– *отношение сигнал-шум*: не менее 10 для каждого из пиков примесей НДМА, НДЭА, НЭИПА и НДИПА на хроматограмме раствора сравнения (д);
 – *повторяемость*: относительное стандартное отклонение отношения площади каждого из пиков примесей НДМА, НДЭА НЭИПА и НДИПА к площади пика НДМА-d₆ не более 20 % для 6 повторных вводов раствора сравнения (в).

Содержание каждой из примесей *N*-нитрозаминов в испытуемом образце в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot C_0 \cdot P}{S_0 \cdot C_1}, \quad (2)$$

где: *S*₁ – отношение площади пика каждой из примесей *N*-нитрозаминов к площади пика *N*-нитрозодиметиламина-d₆ на хроматограмме испытуемого раствора;

*S*₀ – отношение площади пика каждой из примесей *N*-нитрозаминов к площади пика *N*-нитрозодиметиламина-d₆ на хроматограмме раствора сравнения (в);

*C*₁ – концентрация субстанции в испытуемом растворе, нг/мл;

- C_0 – концентрация каждой из примесей НДМА, НДЭА, НДИПА и НЭИП в растворе сравнения (в), нг/мл;
- P – содержание основного вещества в фармакопейном стандартном образце соответствующей примеси, %.

МЕТОДИКА 3 (ГХ-МС/МС)

Методика распространяется на определение 6 примесей *N*-нитрозаминов в валсартане, ирбесартане, лозартане калия, кандесартане цилексетиле и олмесартане медоксомиле: *N*-нитрозодиметиламина (НДМА), *N*-нитрозодиэтиламина (НДЭА), *N*-нитрозоэтилизопропиламина (НЭИПА), *N*-нитрозодизопропиламина (НДИПА), *N*-нитрозодибутиламина (НДБА) и *N*-нитрозодипропиламина (НДПА).

Газовая хроматография (*ОФС «Газовая хроматография»*) в сочетании с масс-спектрометрией (*ОФС «Масс-спектрометрия»*).

Раствор внутреннего стандарта. 5 мг *N*-нитрозо-этилметиламина P растворяют в метаноле $P3$ и доводят объём раствора тем же растворителем до 10,0 мл. 500 мкл полученного раствора доводят водой для хроматографии P до объёма 10,0 мл.

Раствор для экстракции. 40,0 г натрия гидроксида P растворяют в 500 мл воды для хроматографии P , прибавляют 100 мкл раствора внутреннего стандарта, 50 мл ацетонитрила $P1$ и доводят объём раствора водой для хроматографии P до 1000 мл.

*Стандартный раствор примесей *N*-нитрозаминов.* Готовят раствор фармакопейных стандартных образцов НДМА, НДЭА, НДБА, НДПА, НДИПА и НЭИПА в метаноле $P3$ с концентрацией по 500 мкг/мл. В мерной колбе 100 мкл полученного раствора доводят водой для хроматографии P до объёма 10,0 мл. 300 мкл полученного раствора доводят водой для хроматографии P до объёма 20,0 мл.

Испытуемый раствор. 250,0 мг испытуемого образца суспензируют в 10,0 мл раствора для экстракции, встряхивают в течение 5 мин, экстрагируют

2,0 мл *метиленхлорида Р1*. Встряхивают в течение 5 мин, центрифугируют в течение 5 мин при 10 000 об/мин. Используют нижний слой (органический).

Испытуемый раствор с добавками. 250,0 мг испытуемого образца суспенсируют в 10,0 мл раствора для экстракции, прибавляют 100 мкл стандартного раствора примесей *N*-нитрозаминов, интенсивно перемешивают в течение 5 мин. Экстрагируют 2,0 мл *метиленхлорида Р1* и встряхивают в течение 5 мин, центрифугируют в течение 5 мин при 10 000 об/мин. Используют нижний слой (органический).

Раствор сравнения (а). К 10,0 мл раствора для экстракции прибавляют 50 мкл стандартного раствора примесей *N*-нитрозаминов, интенсивно перемешивают в течение 5 мин, экстрагируют 2,0 мл *метиленхлорида Р1*. Встряхивают в течение 5 мин, центрифугируют в течение 5 мин при 10 000 об/мин. Используют нижний слой (органический).

Раствор сравнения (б). К 10,0 мл раствора для экстракции прибавляют 100 мкл стандартного раствора примесей *N*-нитрозаминов, интенсивно перемешивают в течение 5 мин, экстрагируют 2,0 мл *метиленхлорида Р1*. Встряхивают в течение 5 мин, центрифугируют в течение 5 мин при 10 000 об/мин. Используют нижний слой (органический).

Раствор сравнения (в). К 10,0 мл раствора для экстракции прибавляют 200 мкл стандартного раствора примесей *N*-нитрозаминов, интенсивно перемешивают в течение 5 мин, экстрагируют 2,0 мл *метиленхлорида Р1*. Встряхивают в течение 5 мин, центрифугируют в течение 5 мин при 10 000 об/мин. Используют нижний слой (органический).

Условия хроматографирования:

- колонка: из плавленого кварца длиной 30 м и внутренним диаметром 0,25 мм, покрытая слоем *цианопропилфенил(б)метил(94)полисилоксана Р* толщиной 1,4 мкм;
- газ-носитель: *гелий для хроматографии Р*;
- скорость потока: 1,3 мл/мин;
- деление потока: без деления, импульсный (pulsed splitness);

- давление: 276 кПа;
- время ввода: 0,5 мин;
- режим изменения температуры:

Элемент	Время (мин)	Температура (°C)
Колонка	0–0,5	40
	0,5–2,2	40→140
	2,2–4,2	140
	4,2–6,2	140→180
	6,2–6,7	180
	6,7–8,7	180→240
	8,7–10,5	240
	10,5–11,5	240→280
	11,5–14,0	280
Инжектор		250
Линия переноса		240

– детектор: тройной квадрупольный масс-спектрометр при следующих параметрах настройки (приведённые параметры могут быть изменены при соблюдении условий пригодности системы):

- ионизация: электронный удар;
- детектирование m/z (режим MRM)
- энергия ионизации: 40 эВ;
- температура источника ионов: 230 °C;
- температура анализатора: 150 °C;
- время выдержки: 200 мс;
- коэффициент усиления: 15;
- газ для соударений: азот для хроматографии P ;
- скорость потока газа для соударений: 1,5 мл/мин.

Переходы сканирования масс и энергии столкновений

Наименование примеси	Переходы сканирования масс	Энергия столкновений, эВ
НДМА	74 → 44 (74 → 42)	5 22
НЭМА	88 → 71 (88 → 42)	5 22

НДЭА	102 → 85 (102 → 56)	3 19
НЭИПА	116 → 99 (116 → 44)	5 14
НДИПА	130 → 88 (130 → 71)	5 14
НДПА	130 → 113 130 → 88	1 1
НДБА	158 → 141 158 → 99	1 7

– *объём вводимой пробы*: по 3 мкл испытуемого раствора с добавками, испытуемого раствора и раствора сравнения (б).

Относительное удерживание (время удерживания НЭМА – около 5,5 мин): НДМА – около 0,9; НДЭА – около 1,1; НЭИПА – около 1,3; НДИПА – около 1,4; НДПА – около 1,5; НДБА – около 1,8.

Пригодность хроматографической системы:

- *повторяемость*: используют основные MRM-переходы, относительное стандартное отклонение отношения площади каждого из пиков примесей *N*-нитрозаминов к площади пика внутреннего стандарта не более 20 % для 6 повторных вводов раствора сравнения (б);
- *отношение сигнал/шум 1*: не менее 10 для каждого из пиков примесей *N*-нитрозаминов на хроматограмме испытуемого раствора с добавками (основной MRM-переход);
- *отношение сигнал/шум 2*: не менее 3 для каждого из пиков примесей *N*-нитрозаминов на хроматограмме испытуемого раствора с добавками (подтверждающий MRM-переход).

Пределы содержания примесей: используют основные MRM-переходы.

Для испытуемого раствора рассчитывают отношения площади пика каждой примеси *N*-нитрозамина к площади пика внутреннего стандарта (R_s).

Для испытуемого раствора с добавками рассчитывают отношения площади пика каждой примеси *N*-нитрозамина к площади пика внутреннего стандарта (R_r).

Для каждого *N*-нитрозамина отношение значений R_s к R_r должно быть менее 0,5.

Отношение площади пика, соответствующего основному переходу, к площади пика, соответствующего подтверждающему переходу, для испытуемого раствора не должно отличаться от того же отношения для раствора с добавками более чем на 20 %.

В случае, когда метод 3 используется для количественного определения, вводят по 3 мкл испытуемого раствора с добавками, испытуемого раствора и растворов сравнения (а), (б) и (в).

Пригодность хроматографической системы:

- *повторяемость:* используют основные MRM-переходы, относительное стандартное отклонение отношения площади каждого из пиков примесей *N*-нитрозаминов к площади пика внутреннего стандарта не более 20 % для 6 повторных вводов раствора сравнения (б);
- *отношение сигнал/шум 1:* не менее 10 для каждого из пиков примесей *N*-нитрозаминов на хроматограмме раствора сравнения (а) (основной MRM-переход);
- *отношение сигнал/шум 2:* не менее 3 для каждого из пиков примесей *N*-нитрозаминов на хроматограмме раствора сравнения (а) (подтверждающий MRM-переход).

Расчёт содержания примесей: 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 растворов сравнения (а), (б) и (в). По полученной калибровочной кривой определяют концентрацию *N*-нитрозамина в испытуемом растворе.

Отношение площади пика, соответствующего основному переходу, к площади пика, соответствующего подтверждающему переходу, 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 %.

МЕТОДИКА 4 (ЖХ-МС/МС)

Методика распространяется на определение примеси *N*-нитрозодиметиламина (НДМА) в фармацевтической субстанции метформина гидрохлорида.

Жидкостная хроматография (*ОФС «Жидкостная хроматография»*) в сочетании с масс-спектрометрией (*ОФС «Масс-спектрометрия»*).

*Испытуемые растворы и стандартный раствор примеси *N*-нитрозамина защищают от света.*

*Стандартный раствор примеси *N*-нитрозодиметиламина.* Готовят раствор фармакопейного стандартного образца НДМА в метаноле *P* с концентрацией 3 нг/мл.

Испытуемый раствор. 0,5 г испытуемого образца помещают в пробирку, прибавляют 5,0 мл метанола *P*. Смесь перемешивают на шейкере в течение 40 мин, центрифугируют при 4500 об/мин в течение 15 мин. Надосадочную жидкость фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,20 мкм.

Испытуемый раствор с добавкой стандарта. 0,5 г испытуемого образца помещают в пробирку, прибавляют 5,0 мл стандартного раствора примеси *N*-нитрозодиметиламина. Смесь перемешивают на шейкере в течение 40 мин, центрифугируют при 4500 об/мин в течение 15 мин. Надосадочную жидкость фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,20 мкм.

Условия хроматографирования:

– колонка: длиной 0,15 м и внутренним диаметром 3,0 мм, заполненная силикагелем бифенильным, эндкапированным, для хроматографии с размером частиц 2,6 мкм;

– температура колонки: 40 °C;

– подвижные фазы:

- подвижная фаза А: 0,1 % (об/об) раствор муравьиной кислоты Р в воде для хроматографии Р;
- подвижная фаза Б: 0,1 % (об/об) раствор муравьиной кислоты Р в метаноле Р;
- режим градиентного элюирования:

Время (мин)	Подвижная фаза А (% об/об)	Подвижная фаза Б (% об/об)
0–3,0	95	5
3,0–5,0	95→90	5→10
5,0–6,0	90→40	10→60
6,0–10,0	40	60
10,0–13,0	40→20	60→80
13,0–13,1	20→0	80→100
13,1–15,0	0	100
15,0–15,1	0→95	100→5
15,1–18,0	95	5

- скорость потока: 0,4 мл/мин;
- детектор: квадрупольно-времяпролётный или сочетание квадруполя и орбитальной ионной ловушки при следующих параметрах настройки:
 - ионизация: химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI);
 - полярность: положительная;
 - детектирование m/z (режим HRMRM)

Параметры режима детектирования N-нитрозодиметиламина

Наименование примеси	Переходы мониторинга реакций заданных ионов высокого разрешения (HRMRM*)			Энергия столкновений, В
	Молекулярный ион, m/z	Экстрагируемая m/z в режиме MS2/PRM	Ширина изоляции (XIC), m/z	
НДМА	75	43,029	± 0,004	25

*HRMRM – high-resolution multiple reaction monitoring.

- температура автоматического пробоотборника: 15 °C;
- объём вводимой пробы: 3 мкл.

Пригодность хроматографической системы (стандартный раствор примеси N-нитрозодиметиламина):

- *отношение сигнал/шум*: не менее 10 для пика примеси N-нитрозодиметиламина;
- *повторяемость*: относительное стандартное отклонение не более 20,0 % площади пика примеси N-нитрозодиметиламина для 6 повторных вводов стандартного раствора примеси N-нитрозодиметиламина.

Расчёт содержания примеси в процентах

Степень извлечения примеси N-нитрозодиметиламина в испытуемом растворе с добавкой стандарта должна находиться в диапазоне 70,0–130,0 %.

Содержание примеси N-нитрозодиметиламина в испытуемом образце в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot C_0 \cdot P}{S_0 \cdot C_1}, \quad (3)$$

где: S_1 – площадь пика примеси N-нитрозодиметиламина на хроматограмме испытуемого раствора;

S_0 – площадь пика примеси N-нитрозодиметиламина на хроматограмме стандартного раствора;

C_1 – концентрация субстанции в испытуемом растворе, нг/мл;

C_0 – концентрация фармакопейного стандартного образца примеси N-нитрозодиметиламина, нг/мл;

P – содержание основного вещества в фармакопейном стандартном образце примеси N-нитрозодиметиламина, %.

МЕТОДИКА 5 (ЖХ-МС/МС)

Методика распространяется на определение примеси N-нитрозодиметиламина (НДМА) в лекарственных препаратах, содержащих фармацевтическую субстанцию метформина, в форме таблеток, покрытых оболочкой.

Жидкостная хроматография (*ОФС «Жидкостная хроматография»*) в сочетании с масс-спектрометрией (*ОФС «Масс-спектрометрия»*).

Испытуемые растворы и растворы сравнения защищают от света.

Раствор сравнения (а). 0,1 мл стандартного раствора НДМА 5000 мкг/мл в метаноле *P* доводят метанолом *P* до объема 100,0 мл.

Раствор сравнения (б). 2,0 мл раствора сравнения (а) доводят водой *P* до объема 100,0 мл. 3,2 мл полученного раствора доводят метанолом *P* до объема 100,0 мл. Раствор используют свежеприготовленным.

Испытуемый раствор. Взвешивают на аналитических весах 20 таблеток. Рассчитывают среднюю массу таблетки по формуле:

$$M=m/20, \quad (4)$$

где: *M* – средняя масса таблетки, г;

m – навеска 20 таблеток, г.

Таблетки растирают в ступке до получения гомогенного порошка. В пробирку или химический стакан переносят точную навеску растертой таблеточной массы, прибавляют 5,0 мл воды *P*. Выдерживают на ультразвуковой бане в течение 10 мин, центрифугируют при 10 000 об/мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,22 мкм.

Испытуемый раствор с добавкой стандарта. В пробирку или химический стакан переносят точную навеску растертой таблеточной массы и прибавляют 5,0 мл раствора сравнения (б). Выдерживают на ультразвуковой бане в течение 10 мин, центрифугируют при 10 000 об/мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,22 мкм.

Условия хроматографирования:

– предколонка: длиной 0,005 м и внутренним диаметром 2,1 мм, заполненная силикагелем для хроматографии октадецилсилильным, эндкапированным *P* с размером частиц 2,5 мкм;

– колонка: длиной 0,15 м и внутренним диаметром 3,0 мм, заполненная силикагелем для хроматографии октадецилсилильным, эндкапированным *P* с размером частиц 2,5 мкм;

- температура колонки: 30 °C;
- подвижные фазы:
 - подвижная фаза А: 0,1 % (об/об) раствор муравьиной кислоты Р в воде для хроматографии Р;
 - подвижная фаза Б: метанол Р;
- режим градиентного элюирования:

Время (мин)	Подвижная фаза А (%) об/об)	Подвижная фаза Б (%) об/об)
0–6,0	95	5
6,0–7,0	95→10	5→90
7,0–10,0	10	90
10,0–10,1	10→95	90→5
10,1–15,0	95	5

- скорость потока: 0,3 мл/мин;
- детектор: квадрупольно-времяпролётный или сочетание квадруполя и орбитальной ионной ловушки при следующих параметрах настройки:
 - ионизация: химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI);
 - полярность: положительная;
 - детектирование m/z (режим HRMRM)

Параметры режима детектирования N-нитрозодиметиламина

Наименование примеси	Переходы мониторинга реакций заданных ионов высокого разрешения (HRMRM)		Энергия столкновений, В	Время аккумуляции сигнала, с
	Молекулярный ион, m/z	Экстрагируемая m/z в режиме MS2/PRM		
НДМА	75	43,029–43,032	25	0,1

- температура автоматического пробоотборника: 5 °C;

– *объём вводимой пробы*: по 20 мкл раствора сравнения (б), испытуемого раствора и испытуемого раствора с добавкой стандарта.

Пригодность хроматографической системы (раствор сравнения (б)):

- *отношение сигнал/шум*: не менее 10 для пика примеси *N*-нитрозодиметиламина;
- *повторяемость*: относительное стандартное отклонение не более 10,0 % площади пика примеси *N*-нитрозодиметиламина для 6 повторных вводов раствора сравнения (б).

Разрешение масс-спектрометрического сигнала для пика *m/z* 43,030 должно быть не менее 8000 для получения селективного сигнала в присутствии сигналов интерферирующих ионов в спектрах фрагментации иона *m/z* 75,055.

Расчёт содержания примеси в процентах

Содержание примеси *N*-нитрозодиметиламина в таблетках в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot C_0 \cdot G \cdot V \cdot 100}{S_0 \cdot a_1 \cdot L}, \quad (5)$$

где: S_1 – площадь пика примеси *N*-нитрозодиметиламина на хроматограмме испытуемого раствора;

S_0 – площадь пика примеси *N*-нитрозодиметиламина на хроматограмме раствора сравнения (б);

a_1 – навеска таблеточной массы, мг;

G – средняя масса таблеток, мг;

L – содержание метформина в таблетке, мг;

C_0 – концентрация фармакопейного стандартного образца примеси *N*-нитрозодиметиламина, мг/мл;

V – объём разведения испытуемой пробы, мл.

МЕТОДИКА 6 (ЖХ-МС/МС)

Методика распространяется на определение 3 примесей *N*-нитрозаминов в лекарственных препаратах, содержащих валсартан, ирбесартан, кандесартан, лозартан, телмисартан: *N*-нитрозодиметиламина (НДМА), *N*-

нитрозодиэтиламина (НДЭА) и *N*-нитрозо-*N*-метил-4-аминобутановой кислоты (НМАК).

Жидкостная хроматография (*ОФС «Жидкостная хроматография»*) в сочетании с масс-спектрометрией (*ОФС «Масс-спектрометрия»*).

Испытуемые растворы и растворы сравнения защищают от света.

Испытуемый раствор. Взвешивают на аналитических весах 20 таблеток. Рассчитывают среднюю массу таблетки по формуле (4).

Таблетки растирают в ступке до получения гомогенного порошка. В пробирку переносят точную навеску растёртой таблеточной массы, содержащей:

- около 100 мг действующего вещества (для таблеток, содержащих лозартан);
- около 320 мг действующего вещества (для таблеток, содержащих валсартан);
- около 300 мг действующего вещества (для таблеток, содержащих ирбесартан);
- около 80 мг действующего вещества (для таблеток, содержащих телмисартан) и прибавляют 5,0 мл метанола *P*.

Смесь перемешивают на шейкере в течение 40 мин, центрифугируют при 4500 об/мин в течение 15 мин. Надосадочную жидкость фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,22 мкм. Растворы анализируют в течение 48 ч после приготовления, при условии хранения при температуре не выше 10 °С.

Испытуемый раствор с добавкой стандарта. В пробирку переносят точную навеску растёртой таблеточной массы, содержащей:

- около 100 мг действующего вещества (для таблеток, содержащих лозартан);
- около 320 мг действующего вещества (для таблеток, содержащих валсартан);

- около 300 мг действующего вещества (для таблеток, содержащих ирбесартан);
- около 80 мг действующего вещества (для таблеток, содержащих телмисартан) и прибавляют 5,0 мл раствора сравнения (д).

Смесь перемешивают на шейкере в течение 40 мин, центрифугируют при 4500 об/мин в течение 15 мин. Надосадочную жидкость фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,22 мкм. Растворы анализируют в течение 48 ч после приготовления, при условии хранения при температуре не выше 10 °С.

Раствор сравнения (а). 100 мкл стандартного раствора НДМА 5000 мкг/мл в метаноле *P* доводят метанолом *P* до объёма 50,0 мл.

Раствор сравнения (б). 100 мкл стандартного раствора НДЭА 5000 мкг/мл в метаноле *P* доводят метанолом *P* до объёма 50,0 мл.

Раствор сравнения (в). 0,5 мл раствора сравнения (б) доводят метанолом *P* до объёма 50,0 мл.

Раствор сравнения (г). К 0,5 мл раствора сравнения (а) прибавляют 10 мкл стандартного раствора НМАК 500 мкг/мл в метаноле *P* и доводят объём раствора метанолом *P* до 50,0 мл.

Раствор сравнения (д). К 19,6 мл раствора сравнения (г) прибавляют 5,3 мл раствора сравнения (в) и доводят объём раствора метанолом *P* до 100,0 мл.

Раствор сравнения (е). 5,0 мл раствора сравнения (д) доводят метанолом *P* до объёма 10,0 мл.

Условия хроматографирования:

- колонка: длиной 0,1 м и внутренним диаметром 4,6 мм, заполненная силикагелем пентафторфенилпропильным, эндкапированным, для хроматографии с размером частиц 2,6 мкм;
- температура колонки: 40 °С;
- подвижные фазы:
 - подвижная фаза А: 0,1 % (об/об) раствор муравьиной кислоты *P* в воде для хроматографии *P*;

- подвижная фаза Б: 0,1 % (об/об) раствор муравьиной кислоты Р в метаноле Р;
- режим градиентного элюирования:

Время (мин)	Подвижная фаза А (%) об/об)	Подвижная фаза Б (%) об/об)
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

- скорость потока: 0,6 мл/мин;
- детектор: масс-детектор при следующих параметрах настройки:
 - ионизация: химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI);
 - полярность: положительная;
 - детектирование m/z (режим MRM)

Параметры режима мониторинга реакций заданных ионов (MRM)

Наименование примеси	Контролируемые MRM-переходы
НДМА	75,0 → 58,0 (основной)
	75,0 → 43,1 (подтверждающий)
НМАК	147,0 → 117,0 (основной)
	147,0 → 44,0 (подтверждающий)
НДЭА	103,0→75,0 (основной)
	103,0→47,0 (подтверждающий)

- температура автоматического пробоотборника: 10 °C;
- объём вводимой пробы: по 1 мкл растворов сравнения (д), (е), испытуемого раствора и испытуемого раствора с добавкой стандарта.

Пригодность хроматографической системы:

- *отношение сигнал/шум 1*: не менее 10 для каждого из пиков примесей *N*-нитрозаминов на хроматограмме раствора сравнения (е) (основной MRM-переход);
- *отношение сигнал/шум 2*: не менее 3 для каждого из пиков примесей *N*-нитрозаминов на хроматограмме раствора сравнения (е) (подтверждающий MRM-переход);
- *повторяемость*: относительное стандартное отклонение не более 20,0 % площади каждого из пиков примесей *N*-нитрозаминов для 6 повторных вводов раствора сравнения (д) (основной MRM-переход).

Расчёт содержания примесей в процентах

Степень извлечения каждой примеси *N*-нитрозамина в испытуемом растворе с добавкой стандарта должна находиться в диапазоне 70,0–130,0 %.

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

$$X = \frac{S_1 \cdot C_0 \cdot G \cdot V \cdot 100}{S_0 \cdot a_1 \cdot L}, \quad (6)$$

где: S_1 – площадь пика примеси на хроматограмме испытуемого раствора;

S_0 – площадь пика примеси на хроматограмме раствора сравнения (д);

a_1 – навеска таблеточной массы, мг;

G – средняя масса таблеток, мг;

L – содержание действующего вещества в таблетке, мг;

C_0 – концентрация фармакопейного стандартного образца примеси *N*-нитрозодиметиламина, мг/мл;

V – объём разведения испытуемой пробы, мл.