

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-180-190>
УДК 615.074; 615.917



Обзорная статья/Review article

Примеси N-нитрозаминов в лекарственных средствах: токсичность, пути образования, методы определения и нормирование (обзор)

П. П. Щетинин^{1*}, С. П. Сенченко¹, К. К. Гордеев¹

1 – ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России), 127051, Россия, г. Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2

*Контактное лицо: Щетинин Петр Павлович. E-mail: schetininpp@expmed.ru

ORCID: П. П. Щетинин – <https://orcid.org/0000-0003-4761-9372>; С. П. Сенченко – <https://orcid.org/0000-0003-0212-3840>; К. К. Гордеев – <https://orcid.org/0000-0002-4856-1320>.

Статья поступила: 30.09.2020. Статья принята в печать: 19.11.2020. Статья опубликована: 24.11.2020

Резюме

Введение. Соединения N-нитрозаминов являются сильнодействующими генотоксическими агентами для млекопитающих, а некоторые из них классифицируются как вероятные канцерогены для человека. Недавно они были обнаружены в препаратах, принадлежащих к фармакологическим группам антагонистов рецепторов ангиотензина II, антагонистов H_1 -гистаминовых рецепторов и в синтетических сахароснижающих средствах. Это стало тревожным знаком в мировой фарминдустрии и запустило каскад международных расследований, призванных определить происхождение данной группы примесей в фармацевтических продуктах и обозначить пути минимизации риска от их присутствия.

Текст. Дан обзор современного состояния проблемы. Представлены основные пути образования N-нитрозаминов в лекарственных средствах на этапах от синтеза фармацевтической субстанции до хранения готового лекарственного препарата. Приведен основной механизм токсического действия данной группы примесей на организм человека. Кроме того, описаны методы экстрагирования и анализа N-нитрозаминов в лекарственных средствах. Показано, что высокоэффективная жидкостная хроматография и газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектором являются «золотым стандартом» определения вышеуказанных контаминантов. Затронуты также основные принципы их нормирования.

Заключение. Приведенные данные дают представление о путях появления N-нитрозаминов в лекарственных средствах, о современных способах их обнаружения и нормирования в мировой практике. В то же самое время поднимается ключевой вопрос о необходимости разработки российских стандартов, регулирующих чистоту лекарственных средств в части присутствия нитрозаминовых примесей. В этом аспекте предлагается воспользоваться имеющимся опытом ведущих фармрегуляторов США и ЕС.

Ключевые слова: примеси лекарственных средств, N-нитроамины, генотоксичные примеси, стандартизация, аналитический метод.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Все авторы принимали участие в анализе материала и обсуждении текста статьи. П. П. Щетинин участвовал в сборе информации, её анализе и в написании текста статьи.

Для цитирования: Щетинин П. П., Сенченко С. П., Гордеев К. К. Примеси N-нитрозаминов в лекарственных средствах: токсичность, пути образования, методы определения и нормирование. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(4):15–20. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-180-190>

N-nitrosamine Impurities in Medicines: Toxicity, Formation Pathways, Methods of Determination, and Limits (Review)

Petr P. Shchetinin^{1*}, Sergey P. Senchenko¹, Konstantin K. Gordeev¹

1 – FSBI «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 8/2, Petrovsky boulevard, Moscow, 127051, Russia

*Corresponding author: Petr P. Shchetinin. E-mail: schetininpp@expmed.ru

ORCID: Petr P. Shchetinin – <https://orcid.org/0000-0003-4761-9372>; Sergey P. Senchenko – <https://orcid.org/0000-0003-0212-3840>; Konstantin K. Gordeev – <https://orcid.org/0000-0002-4856-1320>.

Received: 30.09.2020. Revised: 19.11.2020. Published: 24.11.2020

Abstract

Introduction. N-nitrosamine compounds are potent genotoxic agents in animal species and some are classified as probable human carcinogens. This group of genotoxic impurities was found in drugs such as angiotensin II receptor blockers, histamine H1 receptor antagonists, and synthetic antidiabetic drugs. This discovery caused a flurry of alarm in the global pharmaceutical industry and resulted in a series of international investigations trying to determine root causes of nitrosamine formation in medicinal products and to find ways to minimize risks associated with nitrosamine contamination.

Text. This paper provides an overview of the current state of the problem. It summarises the main pathways of N-nitrosamine formation in medicinal products at the stages from synthesis of active pharmaceutical ingredients to storage of finished pharmaceutical products. The paper describes the main mechanism responsible for the toxic effect of this group of impurities in human body. It also describes methods of extraction and analysis of N-nitrosamines found in medicinal products. It was demonstrated that high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry are a golden standard for the detection of these contaminants. The paper also touches upon the main principles of setting limits for nitrosamine impurities in medicinal products.

© Щетинин П. П., Сенченко С. П., Гордеев К. К., 2020

© Shchetinin P. P., Senchenko S. P., Gordeev K. K., 2020

Conclusion. The data presented give a picture of the root causes of N-nitrosamine formation in medicinal products, as well as current detection and control methods used worldwide. Meanwhile, the paper raises a key issue about the need to develop Russian standards that would control the purity of medicinal products in terms of N-nitrosamine impurities. For that end, it will be necessary to draw on the experience of the leading USA and EU regulatory authorities.

Keywords: drug impurities, N-nitrosamines, genotoxic impurities, standardization, analytical method.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. All the authors took part in the analysis of the material and discussion of the paper. Petr Shchetinin took part in the collection and analysis of data and writing of the paper.

For citation: Shchetinin P. P., Senchenko S. P., Gordeev K. K. N-nitrosamine impurities in medicines: toxicity, formation pathways, methods of determination, and limits. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(4):15–20. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-180-190>

ВВЕДЕНИЕ

N-нитрозамины (НА) представляют собой класс органических азотсодержащих веществ, молекулы которых в своей структуре содержат алкилнитрозаминогруппу ($-\text{N}_2\text{O}-$), ассоциированную с двумя заместителями алкильной, арильной, алкарильной и т. д. природы (рисунок 1).

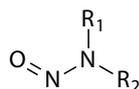


Рисунок 1. Общая структура нитрозаминовых соединений

Figure 1. General structure of N-nitrosamine compounds

В зависимости от структуры молекулы НА представляют собой кристаллический порошок или маслянистую жидкость. Ввиду большого дипольного момента НА умеренно растворимы в водных средах и легко растворимы во многих органических растворителях (дихлорметан, хлороформ, метанол и т. д.). Вещества этой группы также отличаются высокой летучестью и способны перегоняться с водяным паром. Относительная легкость диссоциации N—N связи при термической обработке является общим физическим свойством N-нитрозопроизводных, но требует воздействия высоких температур от 400 до 500 °C [1].

Номенклатура НА чрезвычайно разнообразна и ограничивается лишь числом возможных комбинаций радикалов в структуре молекулы. Однако на сегодняшний день особую актуальность имеют 7 НА соединений, поскольку их удалось выделить из фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов, а также установить их структуру и оценить количественное содержание (рисунок 2) [2].

ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА N-НИТРОЗАМИНОВ

Достоверно установлено, что соединения НА группы являются сильнодействующими генотоксическими агентами для млекопитающих, а неко-

торые из них классифицируются Международным агентством по изучению рака (*International Agency for Research on Cancer*) как вероятные или возможные канцерогены для человека и относятся к группам 2A и 2B. Как было показано, они вызывают мутагенез и канцерогенез у лабораторных животных, что приводит к серии высокоопасных онкологических заболеваний пищевода, желудка, прямой кишки, легких и т. д. [3]. Оценить степень влияния НА соединений на развитие рака у человека в рамках эпидемиологических исследований затруднительно в виду неочевидной взаимосвязи провоцирующего фактора (невозможность отделить от других провоцирующих воздействий на человека) с фактом развития заболевания. Однако имеются данные, свидетельствующие в пользу достоверного увеличения вероятности развития онкологических патологий в отдаленном периоде при систематической нагрузке организма НА в сверхдопустимых количествах [2]. Об этом также говорит и неспецифический механизм воздействия НА на генетический аппарат млекопитающих.

Вследствие метаболической активации НА, опосредованной ферментами семейства цитохромом P450 (α -гидроксилирование), происходит образование нестабильных α -гидроксиметил-N-нитрозаминов, которые, метаболизируясь микросомальной системой окисления, преобразуются в ионы (свободные радикалы) алкил- или арилдиазония (рисунок 3) [4].

Ионы диазония являются крайне высокоактивными, в биологическом смысле, соединениями. Они ответственны за ковалентную модификацию ДНК посредством метилирования нуклеозидов. Метилирование ДНК, как известно, оказывает влияние на непосредственно транскрипцию через изменение эффективности связывания факторов транскрипции с соответствующими участками нуклеиновой кислоты, либо через формирование абсолютно неактивных в транскрипционном отношении ее участков. Наблюдаемое вследствие нитрозаминовой нагрузки гиперметилирование ДНК может опосредованно инициировать химический канцерогенез при накоплении

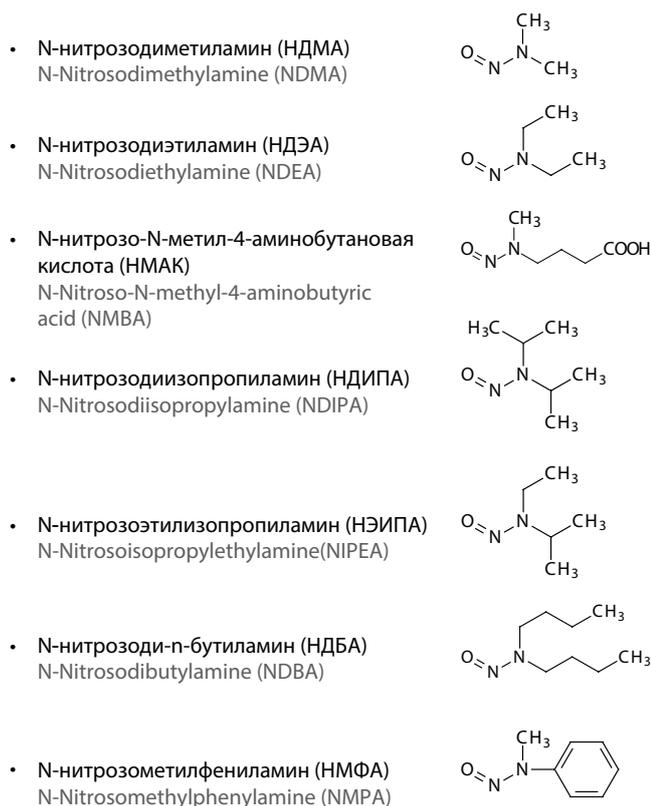


Рисунок 2. N-нитрозамины, обнаруженные в качестве примесей в лекарственных средствах

Figure 2. N-nitrosamines detected as impurities in medicines

критической массы указанных повреждений в генетическом аппарате. На рисунке 4 приведен пример метилирования одного из азотистых оснований в присутствии продукта метаболизма НА [5].

Образующийся побочно аддукт – формальдегид также самостоятельно является генотоксичным соединением и та его часть, которая не подверглась внутриклеточной детоксикации через окисление, еще больше усугубляет повреждение генетического аппарата [6].

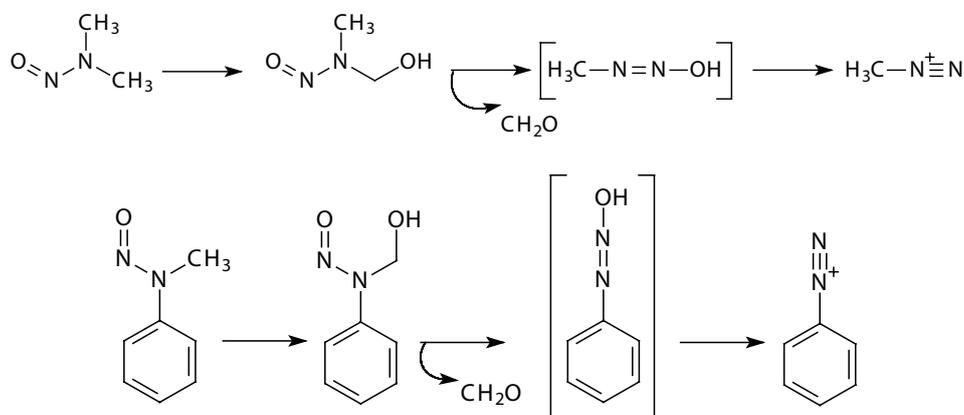


Рисунок 3. Схема метаболизма НДМА (верхняя реакция) и НМФА (нижняя реакция) в организме млекопитающих

Figure 3. Pathways of NDMA (upper reaction) and NMPA (lower reaction) metabolism in mammals

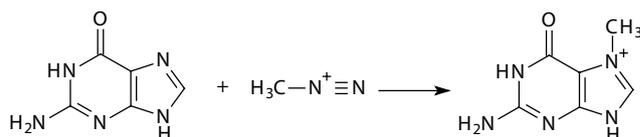


Рисунок 4. Метилирование гуанина под действием иона алкилдиазония

Figure 4. Alkyl diazonium ion methylation of guanine

Органами-мишенями, в первую очередь страдающими от нитрозаминового туморогенеза, являются печень и органы желудочно-кишечного тракта, а также почки и легкие, богатые специфическими пероксидазными ферментами. Кроме того, наблюдается кумуляция НА соединений в печени и их экскреция с желчью, что еще больше увеличивает вероятность малигнизации тканей гепатобилиарной системы [7].

ПУТИ ОБРАЗОВАНИЯ N-НИТРОЗАМИНОВ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВАХ

Группа НА соединений известна около 40 лет. По данным многочисленных научных исследований, НА в различных концентрациях встречаются в продуктах питания (вода, мясная продукция, копчения и т.д.), сигаретах, курительных смесях и т. д. Однако в 2018 г. было впервые акцентировано внимание на присутствие НА в лекарственных препаратах. До этого времени НА не рассматривались как фармацевтические примеси и их обязательный учет не требовался при регистрации лекарственных средств. Данная группа веществ последовательно была обнаружена в препаратах, принадлежащих к фармакологическим группам антагонистов рецепторов ангиотензина II (лозартан, валсартан, ирбесартан, кандесартан, олмесартан, фимасартан), антагонистов h_1 -гистаминовых рецепторов (ранитидин, низатидин), а также в синтетических сахароснижающих средствах (метформин). Необходимо, однако, отметить, что каждая из перечисленных

групп лекарственных средств имела для этого определенные структурные предпосылки. О них будет сказано далее.

После появления данных об обнаружении НА контаминантов в лекарственных средствах было проведено несколько крупных межгосударственных мультидисциплинарных расследований, которые сегодня дают возможность утверждать, что образование НА в лекарственных средствах возможно в ходе синтеза фармакологически активного или вспомогательного вещества; в процессе деградации фармакологически активного или вспомогательного вещества или некоторыми иными способами.

Как правило, любые процессы, в которых используются нитриты в присутствии вторичных, третичных или четвертичных аминов, потенциально подвержены риску образования примесей НА. Установлено, что НА могут образовываться из аминов в присутствии нитрозирующих агентов (обычно окисленных азотсодержащих соединений) в определенных условиях реакции (рисунок 5) [8].

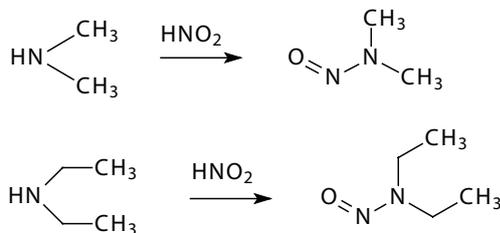


Рисунок 5. Принципиальная схема образования НДМА (верхняя реакция) и НДЭА (нижняя реакция) из вторичных аминов в присутствии азотистой кислоты

Figure 5. Schematic diagram of NDMA (upper reaction) and NDEA (lower reaction) formation from secondary amines in the presence of nitrous acid

Нитрозирующие агенты имеют различную реакционную способность и могут по-разному реагировать с аминами в зависимости, например, от pH реакционной среды и природы растворителя. Пред-

полагается, что реакция протекает за счет различных нитрозирующих соединений, образующихся преимущественно в кислотных условиях.

В случае препаратов группы сартанов, в качестве вероятных нитрозирующих агентов, отвечающих за образование НА, были определены натрия нитрит и, потенциально, азотистая кислота [8]. Известны и другие соединения, которые нитрозируют амины. Например, алкилнитриты, азотистый ангидрид (N_2O_3), тетраоксид диазота (N_2O_4), нитрозила хлорид ($NOCl$) или другие галогениды, нитрозила тиоцианат и нитрозофенол. Некоторые из них используются при производстве фармацевтических субстанций в качестве реактивов, но они также могут быть получены и в виде побочных продуктов синтеза.

Особое место занимает механизм образования НА, в схемах, где азотистая кислота используется для гашения остаточного азида. Натрия азид широко применяется в промышленном химическом синтезе для образования тетразольного кольца (например, у некоторых антагонистов рецепторов ангиотензина II) или введения азидной функциональной группы в молекулу в присутствии аминов-предшественников (рисунок 6). Именно этот механизм ответственен за появление впервые обнаруженных НА примесей в препаратах сартанового ряда.

Амидные растворители, которые подвержены разложению при определенных условиях реакции, являются еще одним источником вторичных аминов. Например, при длительном воздействии высокой температуры N,N-диметилформамид (DMFA) может разлагаться до диметиламина, который способен реагировать с азотистой кислотой с образованием НДМА (рисунок 7) [8].

N-метилпирролидон, N,N-диметилацетамид и N,N-диэтилацетамид также имеют аналогичные пути разложения с образованием вторичных аминов, которые могут реагировать с азотистой кислотой с образованием НА примесей. Вторичные амины также могут присутствовать в качестве примесей в амидных растворителях. Например, диметиламин, который

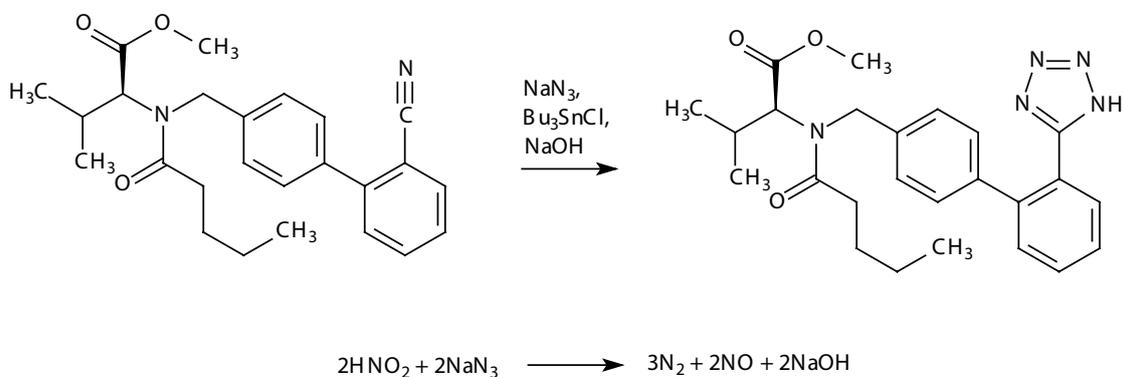


Рисунок 6. Схема синтеза валсартана на этапе образования тетразольного кольца (верхняя реакция) и реакция гашения остаточного азида (нижняя реакция)

Figure 6. Scheme of valsartan synthesis at the stage of tetrazole ring formation (upper reaction) and the reaction of quenching of the residual azide (lower reaction)

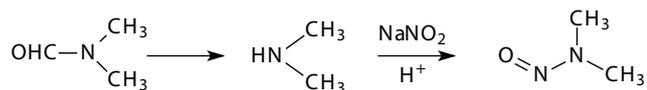


Рисунок 7. Принципиальная схема образования НДМА из ДМФА в присутствии азотистой кислоты

Figure 7. Schematic diagram of NDMA formation from N,N-dimethylformamide in the presence of nitrous acid

может реагировать с азотистой кислотой с образованием НДМА, может присутствовать в качестве примеси в ДМФА.

Этот список источников генерации НА не является исчерпывающим, поскольку аминные реагенты могут использоваться для осуществления широкого диапазона синтетических превращений. По этой причине производителям надлежит оценивать другие реагенты, содержащие функциональные аминогруппы, на предмет потенциального риска образования НА.

Примеси НА могут быть внесены в фармацевтические субстанции также, когда материалы поставщиков, включая исходные материалы и сырье, загрязнены. Например, обнаружено, что загрязнение НА происходило, когда свежие растворители (*o*-ксилол, толуол и хлористый метилен) перемещались между транспортировочными емкостями поставщика и резервуарами хранения покупателя.

Осведомленность о цепочке поставок сырья является важным фактором предотвращения загрязнения. Например, производители фармацевтических субстанций могут не знать о загрязнении НА в сырье или исходных материалах, которые они получили от поставщиков; производитель, чей производственный процесс обычно не подвержен образованию НА, может не осознавать, что материал, полученный от продавца, мог содержать примеси, внесенные во время производства или транспортировки. Лекарственные средства также могут подвергаться риску перекрестного загрязнения, если они производятся на объектах, где примеси НА образуются в других процессах.

Другим потенциальным источником образования примесей НА является отсутствие оптимизации процесса производства фармацевтической субстанции, когда условия реакции, такие как температура, pH или последовательность добавления реагентов, промежуточных продуктов или растворителей, являются неподходящими или плохо контролируемыми. Документировались многократные случаи, когда условия реакции сильно различались между партиями и даже между разным технологическим оборудованием на одном предприятии для одной и той же фармацевтической субстанции [9].

Интересно, что некоторые готовые лекарственные средства могут подвергаться путям разложения с образованием примесей НА; это потенциально может произойти во время хранения лекарственного препарата, в том числе при нарушении предписан-

ных условий. Например, в случае ранитидина установлены механизмы разложения при хранении, увеличении температуры, а также в среде организма (рисунок 8) [10].

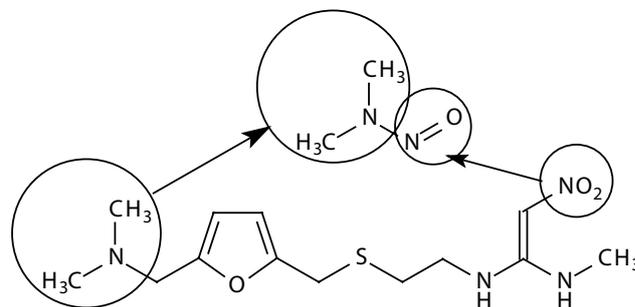


Рисунок 8. Схема «внутреннего» образования НДМА в лекарственном средстве «Ранитидин»

Figure 8. Scheme of «internal» formation of NDMA in the drug «Ranitidine»

В молекуле ранитидина на рисунке 8 выделены участки, которые при разложении препарата способны отщеплять нитрозогруппу и диметиламин. Образовавшиеся соединения могут приводить к образованию НДМА. Идеальные условия для протекания этой реакции может предоставить желудочный сок. В кислой среде желудка возможно их взаимодействие с образованием НА.

Разложение ранитидина, как стало известно, способно также запуститься при ненадлежащем хранении (например, при увеличении температуры). Так, в экспериментальных целях установлено, что даже при краткосрочной экспозиции фармацевтической субстанции при 130 °C уровень НДМА начинает повышаться и в итоге значительно превышает допустимый предел ее потребления. Таким образом, возможно возникновение примесей НА *in situ* [10].

Следовательно, риск образования примесей НА напрямую зависит от структуры молекулы лекарственного средства, поэтому целесообразно выделять соединения с наибольшей вероятностью физико-химической деградации с образованием соединений данного класса. Уровень риска образования НА при хранении предсказуемо максимален для веществ, содержащих амино- и нитрогруппы. Фактические данные по обнаружению НА в фармацевтических субстанциях поддерживают данный тезис [11].

Также к образованию НА может приводить использование определенных материалов упаковки. Контаминация НА соединениями наблюдалась у лекарственных препаратов, упакованных в блистер с покровной фольгой, содержащей нитроцеллюлозу. Было установлено, что НА образуются в процессе термической склейки блистерной упаковки из продуктов деградации нитроцеллюлозы и низкомолекулярных аминов, присутствующих либо в типографской краске, либо в препарате.

Таким образом, спектр реакций, способных привести к генерации НА примесей, весьма широк, но главной из них, вероятно, является все же реакция нитрозирования аминов.

Поскольку на сегодняшний день достоверно показана высокая вероятность образования НА в ходе реакции взаимодействия азотистой кислоты с аминами-предшественниками, то можно предполагать, что потенциально контаминированными могут быть многие лекарственные средства из самых разных фармакотерапевтических групп.

В научной литературе сообщается о значительном числе других фармацевтических субстанций, которые точно или предположительно могут быть контаминированы НА: аминопирамин, амитриптилин, азитромицин, бензалкония хлорид, карабиноксамин, хлорамфеникол, хлорфенамин, хлорпромазин, хлорпротиксен, хлортетрациклин, циталограм, кларитромицин, кломипрамин, дименгидромин, дилтиазем, дифенгидрамин, доксепин, доксиламин, эритромицин, эсциталограм, имипрамин, меропенем, метформин, метапирилен, метилтионина хлорид, мифепристон, миноциклин, низатидин, олеандомицин, окситетрациклин, пирамидон, промазин, пропоксифен, хинупристин, ранитидин, рокситромицин, спирамицин, суматриптан, тримипрамин, тетрациклин, трамадол, венлафаксин и т. д. [12].

Также в химии белков применяются органические азиды, а значит, и химически синтезированные белки тоже становятся кандидатами для более тщательных исследований на предмет возможной контаминации НДМА.

НОРМИРОВАНИЕ ПРИМЕСЕЙ N-НИТРОЗАМИНОВ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВАХ

Как упоминалось выше, НА представляют собой вещества «когорты, вызывающей опасения». Таким образом, теоретический избыточный риск развития онкологических заболеваний при долгосрочном применении лекарственных препаратов, содержащих НА, составляет около 1 случая на 100 тыс. человек. Расчет допустимого поступления НА предполагает ежедневное введение максимальной суточной дозы лекарственного средства в течение всей жизни и основан на подходе, изложенном в руководстве ICH M7 (R1).

Ко всем способам введения применим один и тот же подход к оценке рисков. Корректировки предельных значений, как правило, недопустимы, если различия в зависимости от способа введения не подтверждены специфическими данными.

Для определения предельных значений в случае присутствия более одного НА соединения приемлемыми считаются два подхода, позволяющие не превысить приемлемый уровень риска 1:100000 в соответствии с руководством ICH M7 (R1):

- 1) общее суточное потребление всех идентифицированных НА не должно превышать значения приемлемого поступления наиболее активного идентифицированного НА, или
- 2) общий уровень риска, рассчитанный для всех идентифицированных НА, не должен превышать 1:100000.

С учетом всех имеющихся рекомендаций рассчитаны допустимые пределы содержания НА примесей в лекарственных средствах (таблица 1). Данные нормы принято считать временными в течение ближайших 2 лет. В соответствии с ними производителям надлежит принять меры для количественного определения уровней НА в своих лекарственных средствах и уменьшить или удалить эти примеси при превышении. В противном случае лекарственное средство будет изыматься из оборота соответствующим фармрегулятором.

Таблица 1. Максимально допустимая суточная доза нитрозаминов в лекарственных средствах [13]

Table 1. The maximum permissible daily dose of N-nitrosamine impurities in medicines [13]

Наименование примеси Impurity name	Допустимая суточная доза, нг/сут Acceptable intake, ng/day
НДМА NDMA	≤96,0
НДЭА NDEA	≤26,5
НМАК NMBA	≤96,0
НДИПА NDIPA	≤26,5
НЭИПА NIPEA	≤26,5

Предельное значение содержания НА примесей, выраженное в частях на миллион (ppm), для каждого из лекарственных средств возможно определить расчетным методом. Пример таких расчетов для антагонистов рецепторов ангиотензина II, имеющих тетраольную структуру, исходя из максимальной суточной дозы действующего вещества и допустимой суточной дозы НА, приведен в таблице 2.

Показательным является, то что в одной из ведущих фармакопей мира – Европейской фармакопее, испытание лекарственных средств на НА чистоту упомянуто в крайне ограниченном числе утвержденных монографий (прежде всего, на антагонисты рецепторов ангиотензина II), но даже в них перечислены нормы на немногие N-нитрозосоединения (как правило, НДМА и НДЭА), в то время как остальные остаются без внимания.

Следуя вышесказанному, а также учитывая обширность списка потенциально контаминированных лекарственных средств, по нашему мнению, правильным будет разработка, обсуждение и утверждение общей монографии или общей фармакопейной статьи, которая будет представлять собой логическое смысловое продолжение рекомендаций руководства ICH M7

(R1) о необходимости контроля любого лекарственного средства, в случае если есть основания ожидать появления НА в готовых фармацевтических субстанциях или лекарственных препаратах.

Таблица 2. Рассчитанные предельные значения примесей НДМА и НДЭА в лекарственных средствах антагонистов рецепторов ангиотензина II (пример)

Table 2. Calculated limits for NDMA and NDEA impurities in angiotensin II receptor blockers (example)

Лекарственное средство / максимальная суточная доза Drug/maximum daily dose	НДМА NDMA		НДЭА NDEA	
	Допустимая суточная доза, нг/сут Acceptable intake, ng/day	Предельное значение, ppm Limit value, ppm	Допустимая суточная доза, нг/сут Acceptable intake, ng/day	Предельное значение, ppm Limit value, ppm
Кандесартан / 32 мг Candesartan / 32 mg	≤96,0	3,000	≤26,5	0,820
Ирбесартан / 300 мг Irbesartan / 300 mg	≤96,0	0,320	≤26,5	0,088
Лозартан / 150 мг Losartan / 150 mg	≤96,0	0,640	≤26,5	0,177
Олмесартан / 40 мг Olmesartan / 40 mg	≤96,0	2,400	≤26,5	0,663
Валсартан / 320 мг Valsartan / 320 mg	≤96,0	0,300	≤26,5	0,082

Кроме того, в ближайшем будущем предстоит пересмотреть приведенные временные допустимые пределы содержания НА в лекарственных средствах.

ВЫДЕЛЕНИЕ ПРИМЕСЕЙ N-НИТРОЗАМИНОВ ИЗ ИСПЫТУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Для выделения НА практически используются несколько методов. Первый из них – твердофазная экстракция. В фармацевтической практике этот вариант не нашел широкого распространения и применяется в основном для анализа воды на содержание в ней, в том числе НА контаминантов. Из испытуемого образца аналит сорбируется подходящим сорбентом, в качестве которого чаще всего используется уголь активированный, а затем вымывается с его поверхности подходящим растворителем, который далее используется для определений. Альтернативно может быть применена паровая или вакуумная дистилляция НА, после которой следует жидкость-жидкостная экстракция с использованием растворителей, образующих несмешиваемые фазы. Чаще этот метод применяется как один из этапов подготовки проб при анализе продуктов питания [14].

В фармацевтическом же анализе наиболее часто используется прямая жидкостная экстракция НА из испытуемого образца. Лекарственное средство при

необходимости измельчают, растворяют в метаноле, при необходимости обрабатывают ультразвуком или перемешивают на вортексе, фильтруют через подходящий фильтр и доводят объем раствора водой до необходимой концентрации определяемого вещества. Полученный экстракт анализируют одним из аналитических методов определения.

При проведении любого из видов экстракции важно помнить о том, что применяемые растворители с недостаточной квалификацией чистоты, как было сказано выше, сами могут быть контаминированы НА. Например, дихлорметан (наиболее известный растворитель для жидкость-жидкостной экстракции НА) может в 27–40 % случаев содержать НДМА. Нередко также при использовании в качестве растворителя дистиллированной воды при анализе на НА появлялся интерферирующий пик [15].

При выделении НА (особенно НДМА) необходима предельная осторожность в силу сообщений о зависящей от pH их нестабильности [16] и о фотолизе [17], которые могут привести к занижению реальной концентрации НА. И, напротив, концентрацию НА можно переоценить из-за внутреннего нитрозирования присутствующих в пробе аминов.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ N-НИТРОЗАМИНОВ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВАХ

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) имеет особое значение для фармацевтического анализа лекарственных средств. Она широко и наиболее часто используется для определения примесей в фармацевтических субстанциях и лекарственных препаратах, а также для разделения сложных биологических смесей и композиций природных биологически активных соединений. Этот метод отличается высокой универсальностью и повсеместная распространённость. Для определения НА применяют ВЭЖХ на обращенно-фазовых колонках (главным образом, C8 или C18).

Наиболее доступным, но, в то же самое время, наименее селективным и чувствительным методом определения НА является ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектором (ВЭЖХ-УФ). Первоначально о возможности обнаружении НДМА посредством ВЭЖХ-УФ в диапазоне длин волн 230–233 нм сообщали W. Li и др. [18], и M. Al-Kaseem и др. [19]. Позднее некоторые фармрегуляторы также предложили свои методики. Французское национальное агентство по безопасности лекарственных средств и товаров медицинского назначения (*French National Agency for Medicines and Health Products Safety*) разработали и опубликовали ВЭЖХ-УФ методику определения НДМА и НДЭА в фармацевтических субстанциях валсартана, лозартана, ирбесартана, кандесартана и олмесартана. В методике используется градиентный режим хроматографирования и аналитическая колонка с силикагелем ок-

тадецилсилильным, эндкепированным, $4,6 \times 250$ мм, 5 мкм, детектирование ведется при длине волны 228 нм. Для указанных методик ВЭЖХ-УФ предел количественного определения (LOQ) и предел обнаружения (LOD) составляют соответственно: для НДМА 0,04–0,25 ppm и 0,02–0,1 ppm, для НДЭА 0,08–0,50 ppm и 0,04–0,10 ppm в зависимости от испытуемого лекарственного средства.

Напротив, метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором (ВЭЖХ-МС) обладает высокой чувствительностью и селективностью, но, в то же самое время, требуется оборудование, которое представлено далеко не в каждой аналитической лаборатории. Однако это не помешало методу ВЭЖХ-МС стать одним из представителей «золотого стандарта» в области определения НА примесей в лекарственных средствах. Международными фармрегуляторами предложено не менее 7 методик. В каждой из них используются один из двух методов ионизации – ионизация электрораспылением (ESI) или химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI). Хроматографические условия некоторых методик приведены в таблице 3. В большинстве представленных методик используется внутренний стандарт.

Как видно из представленной таблицы, общепринятые в международной практике методы различаются LOD и LOQ, используемыми аналитическими колонками (сорбент, размер зерна и геометрия), а также способами ионизации аналита. Подвижная фаза в целом стереотипна. Используется градиентный режим элюирования, который призван повысить производительность хроматографической системы.

Первичный анализ приведенных данных очевидно демонстрирует, что чувствительность ВЭЖХ-МС значительно превосходит таковую у ВЭЖХ-УФ. Однако немаловажным остается вопрос аппаратного оснащения некоторых из представленных методик. Например, в методике № 1 (FDA) (таблица 3) разработчики предусматривают использование конкретного оборудования, поскольку все условия оптимизированы под определенную крайне дорогостоящую хромато-масс-спектрометрическую систему, снабженную орбитальной ионной ловушкой (орбитрэпом).

Газовая хроматография (ГХ) также является одним из двух самых распространенных методов, помимо ВЭЖХ-МС. Он оптимально подходит для анализа НА примесей, учитывая их высокую летучесть при нагревании (низкая точка кипения, например у НДМА, около 154 °C) [20]. Однако данным методом нельзя определять НА в лекарственных средствах, образующих НА примеси *in situ* под воздействием высоких температур (например, ранитидин). Для этих целей лучше подойдет ВЭЖХ-МС.

В открытом доступе представлено не менее 8 методик определения НА примесей методом ГХ-МС. Подробные условия хроматографирования приведены в таблице 4. В большинстве методик также используется внутренний стандарт.

Метод ГХ-МС можно описать большинством характеристик, приведенных для ВЭЖХ-МС. Важнейшее из них то, что сочетание разделения с помощью ГХ и обнаружения с помощью МС-детектора позволяет достичь значений LOD, которые подходят для анализа НА, содержащихся даже в ультраследовых количествах.

Другие методы определения НА также встречаются в научной литературе. Полярография, об успехах которой в определении НА отчитывались первоначально, позже оказалась недостаточно селективной, и, скорее всего, больше не будет применяться для анализа НА [21]. Электрофоретическое разделение также обладает очевидным минусом – сравнительно низкой чувствительностью. Другой метод – колориметрический анализ, основанный на реакции Эйзенбранда – Пройсмана [22, 23]. После обработки НА с помощью НВг в уксусной кислоте образующийся нитрит обнаруживается колориметрически [24]. Он, как и прочие «другие методы», используется в основном с целью грубого скрининга на присутствие группы НА примесей в лекарственном средстве [25].

Следовательно, в настоящее время из-за высокой чувствительности МС-детекторов методы с их использованием остаются наиболее популярным выбором при определении НА. Кроме того, развитие МС-анализаторов еще больше облегчило углубленное изучение НА в сложных матрицах, к которым, безусловно, можно отнести любой лекарственный препарат. Из-за летучести большинства НА наиболее распространенным является анализ ГХ-МС. Вместе с тем ВЭЖХ-МС также обладает хорошими характеристиками селективности и чувствительности. Все прочие методы, вероятно, стоит рассматривать лишь при невозможности использования двух последних.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В обзоре приведены современные данные, относительно токсичности и механизма токсического действия НА. Показано превалирующее значение ионов диазония, генерируемых в ходе метаболизма НА, а также побочного аддукта – формальдегида, которые в совокупности приводят к ковалентной модификации пуриновых оснований ДНК посредством метилирования и последующего нарушения процессов транскрипции с опосредованным канцерогенезом в органах-мишенях. Представлены компромиссные общепринятые подходы к нормированию данной группы примесей на двухлетний переходный период. Приведенные предельные значения содержания НА в лекарственных препаратах, как считается, не способны нанести критического воздействия на организм даже при пожизненном применении последних в высоких терапевтических дозировках. Рассмотрены методы выделения примесей НА из испытуемых образцов и методы их последующего анализа. Продемонстрирован широкий спектр методик от низкоселективных и низкочувствительных до современных, не обладаю-

Таблица 3. Условия хроматографирования в некоторых официально утвержденных фармрегуляторами методиках определения НА (ВЭЖХ-МС)

Table 3. Chromatographic conditions described in some official methods for N-nitrosamine compounds determination (HPLC-MS) approved by regulatory agencies

№	Хроматографическая колонка Chromatographic column	Подвижная фаза (ПФ)/режим элюирования Mobile phase (MP)/elution mode	Режим ионизации Ion source	LOQ/LOD
1	Kinetex 2.6 µm, 100 × 4.6 mm	ПФА: Муравьиной кислоты раствор водный 0,1 % ПФБ: Муравьиной кислоты раствор спиртовой 0,1 % <i>Градиентный режим</i> MP A: 0.1% formic acid in water MP B: 0.1% formic acid in methanol <i>Gradient Mode</i>	ESI	НДМА (NDMA) (0,05/0,005 ppm), НДЭА (NDEA) (0,05/0,016 ppm), НЭИПА (NIPEA) (0,05/0,003 ppm), НДИПА (NDIPA) (0,05/0,008 ppm), НДБА (NDBA) (0,05/0,005 ppm), НМАК (NMBA) (0,05/0,010 ppm)
2	XTerra MS C18 3.5 µm, 100 × 3.0 mm	ПФА: Вода ПФБ: Метанол <i>Градиентный режим</i> MP A: water MP B: methanol <i>Gradient Mode</i>	ESI	НДМА (NDMA) (0,079–0,492/0,024–0,148 ppm), НДЭА (NDEA) (0,0195–0,149/0,082–0,177 ppm)
3	Luna C8(2) 5.0 µm, 150 × 2.0 mm	ПФА: Муравьиной кислоты раствор водный 0,1 % ПФБ: Муравьиной кислоты раствор спиртовой 0,1 % <i>Градиентный режим</i> MP A: 0.1% formic acid in water MP B: 0.1% formic acid in methanol <i>Gradient Mode</i>	ESI	НДМА (NDMA) (0,0286/0,0086 ppm)
4	XSelect HSS 3.5µm, 150 × 3.0 mm	ПФА: Муравьиной кислоты раствор водный 0,1 % ПФБ: Муравьиной кислоты раствор спиртовой 0,1 % <i>Градиентный режим</i> MP A: 0.1% formic acid in water MP B: 0.1% formic acid in methanol <i>Gradient Mode</i>	APCI	НДМА (NDMA) (0.10 / 0,5 ppm), НДЭА (NDEA) (0.10/0,5 ppm)
5	XSelect HSS 3.5µm, 150 × 3.0 mm	ПФА: Муравьиной кислоты раствор водный 0,2 % ПФБ: ацетонитрил метанол 200:1000 <i>Градиентный режим</i> MP A: 0.2% formic acid in water MP B: acetonitrile – methanol 200:1000 <i>Gradient Mode</i>	APCI	НДМА (NDMA) (–/0,05 ppm)
6	Waters HSS-T3 1.8 µm, 100 × 3.0 mm	ПФА: Муравьиной кислоты раствор водный 0,1 % ПФБ: Метанол <i>Градиентный режим</i> MP A: 0.1% formic acid in water MP B: methanol <i>Gradient Mode</i>	APCI	НДМА (NDMA) (0,2/0,08 ppm)

Примечание. Представленные методики приведены в свободном доступе на сайте EDQM: <https://www.edqm.eu/en/ad-hoc-projects-omcl-network>.

Note. The presented methods are freely available on the EDQM website: <https://www.edqm.eu/en/ad-hoc-projects-omcl-network>.

щих такими изъянами, от требующих использования уникального дорогостоящего оборудования до ограничивающихся использованием рутинного оснащения. Каждый из методов отличается от остальных не только спектром определяемых примесей, но также и показателями чувствительности, выраженными LOQ и

LOD. Таким образом, практически любая аналитическая лаборатория способна подобрать для себя наиболее оптимальный вариант из спектра приведенных аналитических методов для обнаружения и количественной оценки нитрозаминов и использовать его для определений.

Таблица 4. Условия хроматографирования в некоторых официально утвержденных фармрегуляторами методиках определения НА (ГХ-МС)

Table 4. Chromatographic conditions described in some official methods for N-nitrosamine compounds determination (GC-MS) approved by regulatory agencies

№	Хроматографическая колонка Chromatographic column	Газ-носитель / скорость потока / деление потока Carrier gas / flow rate / split ratio	Режим ионизации (детектирования) Ion source (acquisition Type)	LOQ/LOD
1	VF-WAXms GC 1.0 µm, 30 m × 0.25 mm,	Гелий / 1,0 мл/мин / – Helium / 1,0 ml/min / –	EI	НДМА (NDMA) (0,05/0,01 ppm), НДЭА (NDEA) (0,03/0,01 ppm)
2	Restek Rtx-624 1.8 µm, 30 m × 0.32 mm	Гелий / 1,52 мл/мин / – Helium / 1,52 ml/min / –	EI	НДМА (NDMA) (0,10/0,01 ppm), НДЭА (NDEA) (0,08/0,02 ppm)
3	DB-1701 GC 1.00 µm, 30 m × 0.25 mm	Гелий / 1,0 мл/мин / 5:1 Helium / 1,0 ml/min / 5:1	SIM	НДМА (NDMA) (0,10/0,005 ppm), НДЭА (NDEA) (0,05/0,02 ppm)
4	DB-Wax GC 0.5 µm, 30 m × 0.25 mm	Гелий / 1,0 мл/мин / 5:1 Helium / 1,0 ml/min / 5:1	SIM	НДМА (NDMA) (0,05/0,01 ppm), НДЭА (NDEA) (0,05/0,01 ppm), НЭИПА (NIPEA) (0,05/0,025 ppm), НДИПА (NDIPA) (0,05/0,025 ppm)
5	VF-WAXms GC 1.00 µm, 30 m × 0.25 mm	Гелий / 1,0 мл/мин / – Helium / 1,0 ml/min / –	MRM	НДМА (NDMA) (0,008/0,005 ppm), НДЭА (NDEA) (0,005/0,001 ppm), НЭИПА (NIPEA) (0,005/0,001 ppm), НДИПА (NDIPA) (0,005/0,001 ppm), НДБА (NDBA) (0,025/0,010 ppm)
6	а) VF-624ms 1.4 µm, 30m × 0.25 mm, б) Deactivated Fused Silica, 1.35m × 0.15 mm	а) Гелий / 1,3 мл/мин / – б) Гелий / 1,45 мл/мин / – а) Helium / 1,3 ml/min / – б) Helium / 1,45 ml/min / –	ES	НДМА, НДЭА, НЭИПА, НДИПА и НДБА (NDMA, NDEA, NIPEA, NDIPA and NDBA) (15 ppb/–)

Примечание. Представленные методики приведены в свободном доступе на сайте EDQM: <https://www.edqm.eu/en/ad-hoc-projects-omcl-network>.

Note. The presented methods are freely available on the EDQM website: <https://www.edqm.eu/en/ad-hoc-projects-omcl-network>.

Особый акцент сегодня необходимо сделать на пока еще полном отсутствии в России собственных стандартов качества лекарственных средств в части содержания примесей НА. Безусловно, необходимо разрабатывать такие нормирующие документы, основываясь на уже имеющемся международном позитивном опыте. В противном случае имеющийся нормативный разрыв далее будет усугубляться и самым отрицательным образом сказываться на безопасности лекарственных средств, находящихся в гражданском обороте на территории России.

ЛИТЕРАТУРА

- Perera A. M. A. Chromatographic analysis of the environment, 3rd Ed. United States. 2006.
- Nitrosamine impurities in human medicinal products (Assessment report). The Netherlands: European Medicines Agency. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/nitrosamines-emea-h-a53-1490-assessment-report_en.pdf.
- Magee P. N. Nitrosamines and human cancer: introduction and overview. *European Journal of Cancer Prevention*. 1996;5:7-10.
- George J., Tsuchishima M., Tsutsumi M. Molecular mechanisms in the pathogenesis of N-nitrosodimethylamine induced hepatic fibrosis. *Cell Death and Disease*. 2019;10(18). DOI:10.1038/s41419-018-1272-8.
- Allis J. W., Brown B. L., Simmons J. E., Hatch G. E., McDonald A., House D. E. Methanol potentiation of carbon tetrachloride hepatotoxicity: The central role of cytochrome P450. *Toxicology*. 1996;112(2):131–140. DOI: 10.1016/0300-483x(96)03366-5.
- Kawanishi M., Matsuda T., Yagi T. Genotoxicity of formaldehyde: molecular basis of DNA damage and mutation. *Frontiers Environmental Science*. 2014;2:36. DOI: 10.3389/fenvs.2014.00036.
- Sheweita S. A., El Banna Y. Y., Balbaa M., Abdullah I. A., Hassan H. E. N-nitrosamines induced infertility and hepatotoxicity in male rabbits. *Environmental toxicology*. 2017;32(9):2212–2220. DOI: 10.1002/tox.22436.
- Lessons learnt from presence of N-nitrosamine impurities in sartan medicines (Overview and recommendations). The Netherlands: European Medicines Agency. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/lessons-learnt-presence-n-nitrosamine-impurities-sartan-medicines_en.pdf.

- Control of Nitrosamine Impurities in Human Drugs (Guidance for Industry). USA: U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. 2020. Available at: <https://www.fda.gov/media/141720/download>.
- Shen R., Andrews S. A. Formation of NDMA from ranitidine and sumatriptan: the role of pH. *Water research*. 2013;47(2):802–810. DOI: 10.1016/j.watres.2012.11.004.
- Хоролюцкий М. Д., Чапленко А. А., Власов А. М., Масленникова Н. В., Раменская Г. В. Примеси нитрозаминов в лекарственных препаратах: пути образования и механизмы токсического действия. *Медицина*. 2019;7(4):12–24. DOI: 10.29234/2308-9113-2019-7-4-12-24.
- Parr M. K., Joseph J. F. NDMA impurity in valsartan and other pharmaceutical products: Analytical methods for the determination of N-nitrosamines. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2019;164:536–549. DOI:10.1016/j.jpba.2018.11.010.
- Information Note Nitrosamine impurities. Switzerland: WHO. Available at: https://www.who.int/medicines/publications/drugalerts/InformationNote_Nitrosamine-impurities/en/.
- Shaik K. M., Sarmah B., Wadekar G. S., Kumar P. Regulatory updates and analytical methodologies for nitrosamine impurities detection in sartans, ranitidine, nizatidine, and metformin along with sample preparation techniques. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 2020:1–19. DOI: 10.1080/10408347.2020.1788375.
- Dawson B. A., Lawrence R. C. Analysis of selected drug formulations for volatile nitrosamines. *Journal – Association of Official Analytical Chemists*. 1987;70:554–556.
- Grebel J. E., Young C. C., Suffet I.H. Solid-phase microextraction of N-nitrosamines. *Journal of Chromatography A*. 2006;1117(1):11–18. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.03.044.
- Roux J. L., Gallard H., Croue J. P., Papot S., Deborde M. NDMA formation by chloramination of ranitidine: kinetics and mechanism. *Environmental Science and Technology*. 2012;46(20):11095–11103. DOI: 10.1021/es3023094.
- Li W., Chen N., Zhao Y., Guo W., Muhammd N., Zhu Y., Huang Z. Online coupling of tandem liquid-phase extraction with HPLC-UV for the determination of trace N-nitrosamines in food products. *Analytical Methods*. 2018;10:1733–1739. DOI: 10.1039/C8AY00014J.
- Al-Kaseem M., Al-Assaf Z., Karabeet F., A rapid validated RP-HPLC method for the determination of seven volatile N-nitrosamines in meat. *Pharmacology and pharmacy*. 2014;5:298–308. DOI: 10.4236/pp.2014.53037.
- Cowley E. G., Partington J. R. Dielectric polarization. The dipole moments of some nitrosoamines, p-nitrosophenol, ethylaniline, hydrazobenzene and benzaldehyde phenylhydrazone. *Journal of the Chemical Society*. 1933:1255–1257.
- Fiddler W. The occurrence and determination of N-nitroso compounds. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1975;3(31):352–360. DOI: 10.1016/0041-008X(75)90256-2.
- Telling G. The determination of N-nitrosamines in foods and cosmetics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 1982;1:277–280.
- Eisenbrand G., Preussmann R. A new method for the colorimetric determination of nitrosamines after cleavage of the N-nitroso-group with hydrogen bromide in glacial acetic acid. *Arzneimittel-forschung*. 1970;10(20):1512–1517.
- Ceh L., Ender F. A sensitive method for the colorimetric determination of volatile nitrosamines in food products and air. *Food and cosmetics toxicology*. 1978;2(16):117–121.
- Roback S.L., Kodamatani H., Fujioka T., Plumlee M.H. Validation of a novel direct-injection chemiluminescence-based method for N-nitrosamine analysis in advanced-treated recycled water, drinking water, and wastewater. *Environmental Science: Water Research & Technology*. 2020; 4(6): 1106–1115. DOI: 10.1039/C9EW00943D.
- Allis J. W., Brown B. L., Simmons J. E., Hatch G. E., McDonald A., House D. E. Methanol potentiation of carbon tetrachloride hepatotoxicity: The central role of cytochrome P450. *Toxicology*. 1996;112(2):131–140. DOI: 10.1016/0300-483x(96)03366-5.
- Kawanishi M., Matsuda T., Yagi T. Genotoxicity of formaldehyde: molecular basis of DNA damage and mutation. *Frontiers Environmental Science*. 2014;2:36. DOI: 10.3389/fenvs.2014.00036.
- Sheweita S. A., El Banna Y. Y., Balbaa M., Abdullah I. A., Hassan H. E. N-nitrosamines induced infertility and hepatotoxicity in male rabbits. *Environmental toxicology*. 2017;32(9):2212–2220. DOI: 10.1002/tox.22436.
- Lessons learnt from presence of N-nitrosamine impurities in sartan medicines (Overview and recommendations). The Netherlands: European Medicines Agency. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/lessons-learnt-presence-n-nitrosamine-impurities-sartan-medicines_en.pdf.
- Control of Nitrosamine Impurities in Human Drugs (Guidance for Industry). USA: U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. 2020. Available at: <https://www.fda.gov/media/141720/download>.
- Shen R., Andrews S. A. Formation of NDMA from ranitidine and sumatriptan: the role of pH. *Water research*. 2013;47(2):802–810. DOI: 10.1016/j.watres.2012.11.004.
- Khorolskiy M.D., Chaplenko A.A., Vlasov A.M., Maslennikova N. V., Ramenskaya G. V. Nitrosamine impurities in drugs: pathways of formation and mechanisms of toxic action. *Medicina*. 2019;7(9):12–24. DOI: 10.29234/2308-9113-2019-7-4-12-24. (In Russ.).
- Parr M. K., Joseph J. F. NDMA impurity in valsartan and other pharmaceutical products: Analytical methods for the determination of N-nitrosamines. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2019;164:536–549. DOI:10.1016/j.jpba.2018.11.010.
- Information Note Nitrosamine impurities. Switzerland: WHO. Available at: https://www.who.int/medicines/publications/drugalerts/InformationNote_Nitrosamine-impurities/en/.
- Shaik K. M., Sarmah B., Wadekar G. S., Kumar P. Regulatory updates and analytical methodologies for nitrosamine impurities detection in sartans, ranitidine, nizatidine, and metformin along with sample preparation techniques. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 2020:1–19. DOI: 10.1080/10408347.2020.1788375.
- Dawson B. A., Lawrence R. C. Analysis of selected drug formulations for volatile nitrosamines. *Journal – Association of Official Analytical Chemists*. 1987;70:554–556.
- Grebel J. E., Young C. C., Suffet I.H. Solid-phase microextraction of N-nitrosamines. *Journal of Chromatography A*. 2006;1117(1):11–18. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.03.044.
- Roux J. L., Gallard H., Croue J. P., Papot S., Deborde M. NDMA formation by chloramination of ranitidine: kinetics and mechanism. *Environmental Science and Technology*. 2012;46(20):11095–11103. DOI: 10.1021/es3023094.
- Li W., Chen N., Zhao Y., Guo W., Muhammd N., Zhu Y., Huang Z. Online coupling of tandem liquid-phase extraction with HPLC-UV for the determination of trace N-nitrosamines in food products. *Analytical Methods*. 2018;10:1733–1739. DOI: 10.1039/C8AY00014J.
- Al-Kaseem M., Al-Assaf Z., Karabeet F., A rapid validated RP-HPLC method for the determination of seven volatile N-nitrosamines in meat. *Pharmacology and pharmacy*. 2014;5:298–308. DOI: 10.4236/pp.2014.53037.
- Cowley E. G., Partington J. R. Dielectric polarization. The dipole moments of some nitrosoamines, p-nitrosophenol, ethylaniline, hydrazobenzene and benzaldehyde phenylhydrazone. *Journal of the Chemical Society*. 1933:1255–1257.
- Fiddler W. The occurrence and determination of N-nitroso compounds. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1975;3(31):352–360. DOI: 10.1016/0041-008X(75)90256-2.
- Telling G. The determination of N-nitrosamines in foods and cosmetics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 1982;1:277–280.
- Eisenbrand G., Preussmann R. A new method for the colorimetric determination of nitrosamines after cleavage of the N-nitroso-group with hydrogen bromide in glacial acetic acid. *Arzneimittel-forschung*. 1970;10(20):1512–1517.
- Ceh L., Ender F. A sensitive method for the colorimetric determination of volatile nitrosamines in food products and air. *Food and cosmetics toxicology*. 1978;2(16):117–121.
- Roback S.L., Kodamatani H., Fujioka T., Plumlee M.H. Validation of a novel direct-injection chemiluminescence-based method for N-nitrosamine analysis in advanced-treated recycled water, drinking water, and wastewater. *Environmental Science: Water Research & Technology*. 2020; 4(6): 1106–1115. DOI: 10.1039/C9EW00943D.

REFERENCES

- Perera A. M. A. Chromatographic analysis of the environment, 3rd Ed. United States. 2006.
- Nitrosamine impurities in human medicinal products (Assessment report). The Netherlands: European Medicines Agency. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/nitrosamines-emea-h-a53-1490-assessment-report_en.pdf.
- Magee P. N. Nitrosamines and human cancer: introduction and overview. *European Journal of Cancer Prevention*. 1996;5:7–10.
- George J., Tsuchishima M., Tsutsumi M. Molecular mechanisms in the pathogenesis of N-nitrosodimethylamine induced hepatic fibrosis. *Cell Death and Disease*. 2019;10(18). DOI:10.1038/s41419-018-1272-8.