

Определение N-нитрозодиметиламина и N-нитрозодиэтиламина с помощью парофазного пробоотборника Agilent 7697A и системы ГХ-МС Agilent 8890/5977

Определение примесей в лекарственных
препаратах класса сартанов согласно
руководству FDA

Автор

Эбби Фозетт (Abbey Fausett)
Agilent Technologies, Inc.

Аннотация

Эти методические рекомендации описывают определение примесей в лекарственных препаратах класса сартанов по методике Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) с помощью газового хроматографа Agilent 8890. В работе также использовались парофазный пробоотборник Agilent 7697A и ГХ-МСД Agilent 5977. Результаты анализа соответствуют ожидаемым значениям концентрации.

Введение

По данным Всемирной организации здравоохранения, 35–46% взрослого населения от 25 лет и старше страдают от артериальной гипертензии (повышенного артериального давления)¹. Этому диагнозу подвержено более 1 миллиарда человек по всему миру². Для лечения артериальной гипертензии обычно назначают валсартан, лозартан и другие блокаторы рецепторов ангиотензина (БРА), так как эти фармацевтические препараты широко распространены и относительно доступны широкому кругу пациентов. Механизм действия БРА основан на ингибировании процесса связывания ангиотензина II и его рецепторов, что предотвращает сужение сосудов и эффективно снижает кровяное давление³.

В июле 2018 г. препараты валсартана по всему миру были отозваны из продажи из-за риска загрязнения. Примесь была первоначально идентифицирована как N-нитрозодиметиламин (NDMA). FDA разработало процедуру для того, чтобы помочь производителям лекарственных препаратов организовать скрининг препаратов валсартана на эти потенциально канцерогенные примеси перед их выпуском в аптечную сеть⁴. Вторая примесь была найдена вскоре после отзыва, и ее наличие подтвердило Европейское агентство по лекарственным средствам⁵. N-нитрозодиэтиламин (NDEA), как и NDMA, относится к потенциальным канцерогенам и, как считается, образуется в качестве побочного продукта при синтезе тетразольного кольца, общего для всех препаратов класса сартанов. После того как подтвердилось наличие этой новой примеси и была обнаружена ее связь с тетразольным кольцом, первоначальный отзыв был распространен на все производимые сартаны. После отчета Европейского агентства по лекарственным средствам FDA разработало дополнения к нормативной процедуре, которые позволяли определять обе примеси в одном анализе. Изменения включают в себя замену растворителя, применяемого при пробоподготовке, и другую колонку для ГХ⁶. Этот документ был издан в январе 2019 г. и установил предел количественного определения для

NDMA и NDEA на уровне 0,10 и 0,5 млн⁻¹ соответственно. Методика использует ГХ-МС с парофазным пробоотборником и позволяет анализировать как исходную фармацевтическую субстанцию, так и готовые лекарственные препараты. Хотя процедура FDA разработана для ГХ Agilent 7890A, эти методические рекомендации показывают, что система ГХ Agilent 8890 демонстрирует такие же превосходные параметры, что и система 7890.

Экспериментальная часть

Стандарты NDMA и NDEA были приобретены в компании MilliporeSigma (Берлингтон, Массачусетс, США) в неразбавленном виде. Согласно руководству FDA⁶ для их разбавления применяется 1-метил-2-пирролидинон (NMP) чистотой не хуже 99,0%. Однако применение растворителя повышенной чистоты (99,7%, компания MilliporeSigma) привело при следовании указанным параметрам к улучшению разделения определяемых соединений и примесей растворителя. Методика была принята множеством регулирующих органов по всему миру, и они не обязательно будут достаточно гибкими, чтобы разрешить регулировку параметров хроматографии для достижения повышенной степени разделения при использовании для пробоподготовки растворителя невысокой чистоты. Для данных в настоящей работе применялся протокол FDA без отклонений.

Параметры методики приведены в нижеследующих таблицах. Хотя данная работа выполнялась с помощью скоростного термостата ГХ (240 В), он не является обязательным для достижения приведенных результатов. Другой принадлежностью, которая помогает при разработке парофазных методик, является парофазная транспортная линия, которая позволяет вводить как парообразные, так и жидкие пробы с помощью одного и того же испарителя без изменения конфигурации. В табл. 1 перечислены использовавшиеся для анализа расходные материалы. Калибровочные растворы готовились в соответствии с руководством FDA, с одним дополнительным раствором

Параметры методики

Параметры парофазного пробоотборника Agilent 7697A	
Температура термостата	130 °C
Температура в петле	180 °C
Температура транспортной линии	185 °C
Уравновешивание виалы	15 мин
Продолжительность ввода	1 мин
Объем виалы (мл)	20 мл
Встряхивание виалы	Уровень 5
Режим наддува	По умолчанию
Давление наддува	15 psi (1,03 бара)
Режим наполнения петли инжектора	По умолчанию

Параметры ГХ Agilent 8890	
Испаритель (с делением потока/ без деления потока)	Гелий
Температура	220 °C
Режим	С делением потока
Коэффициент деления потока	5 : 1
Давление испарителя (начальное)	7,33 psi (0,51 бара)
Тип термостата	240 В – скоростной термостат
Время уравновешивания	1 мин
Программа термостата	40 °C в течение 0,5 мин, 20 °C/мин до 160 °C, 10 °C/мин до 240 °C, удержание в течение 2 мин Полная продолжительность анализа: 16,5 мин
Колонка	Agilent J&W DB-1701, 30 м × 250 мкм, 1,0 мкм
Режим	Постоянный поток
Поток	1 мл/мин

Параметры ГХ-МСД Agilent 5977	
Тип источника	Экстракционная линза
Температура источника	230 °C
Режим детектирования	Мониторинг выбранного иона (SIM)
NDMA, m/z	74,00
NDEA, m/z	102
Диаметр линзы	6 мм
Температура квадрупольного масс-фильтра	150 °C
Продолжительность окна NDMA	150
Продолжительность окна NDEA	150

Табл. 1. Расходные материалы для анализа

Описание	Каталожный номер
Виалы для парофазного анализа (20 мл)	5182-0837
Крышки для виал	5183-4477
Лайнер для ГХ	5190-2295
Септа для ГХ	5183-4759
Колонка DB-1701	122-0733
Экстракционная линза (6 мм)	G3870-20448

концентрацией 1 мкг/мл.

Результаты и их обсуждение

Эксперимент продемонстрировал достаточное разделение, все пики определяемых веществ были хорошо отделены от примесей растворителя

и матрицы. На рис. 1 показан пример хроматограммы.

Времена удерживания соответствовали приведенным в руководстве FDA. На рис. 2A и 2B приведены наложенные друг на друга хроматограммы трех калибровочных растворов NDMA и NDEA самой низкой концентрации (0,025; 0,05 и 0,1 мкг).

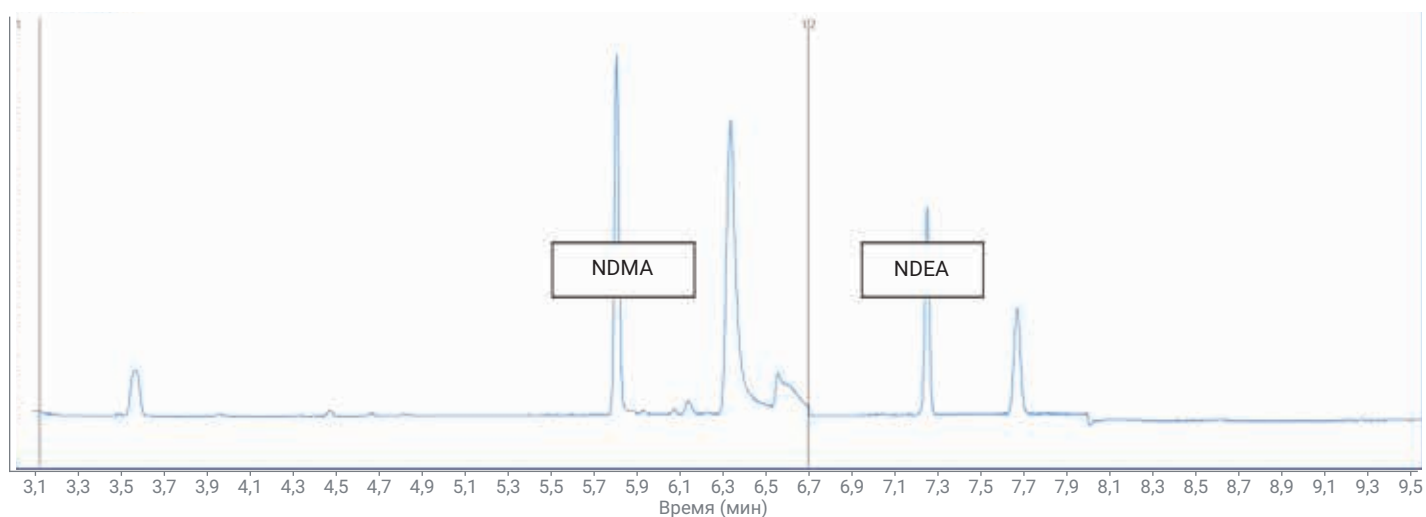


Рис. 1. Хроматограмма выбранного иона стандартной смеси NDMA и NDEA концентрацией 1 мкг в NMP. Время удерживания NDMA – 5,8 мин, NDEA – 7,25 мин

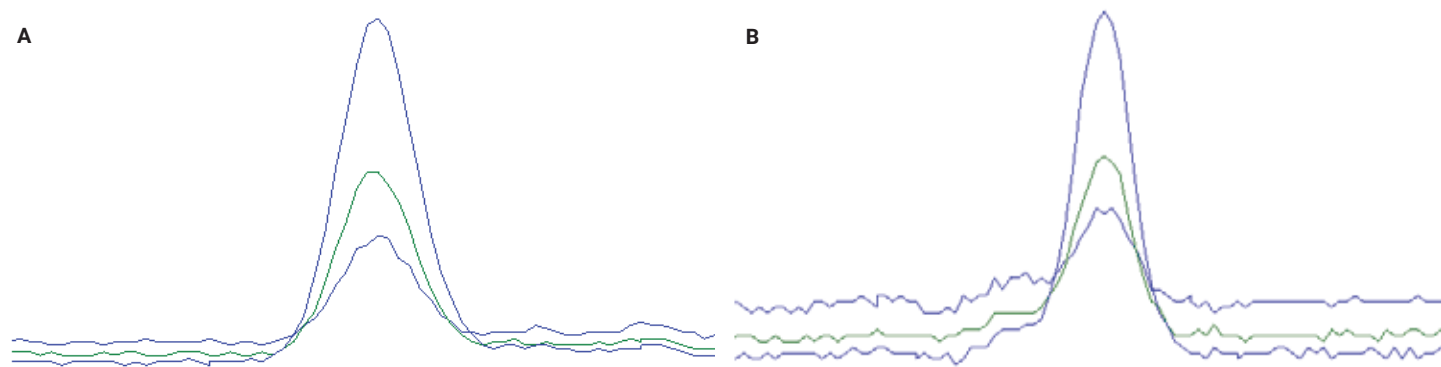


Рис. 2. Наложенные хроматограммы NDMA (A) и NDEA (B) для трех растворов самой низкой концентрации

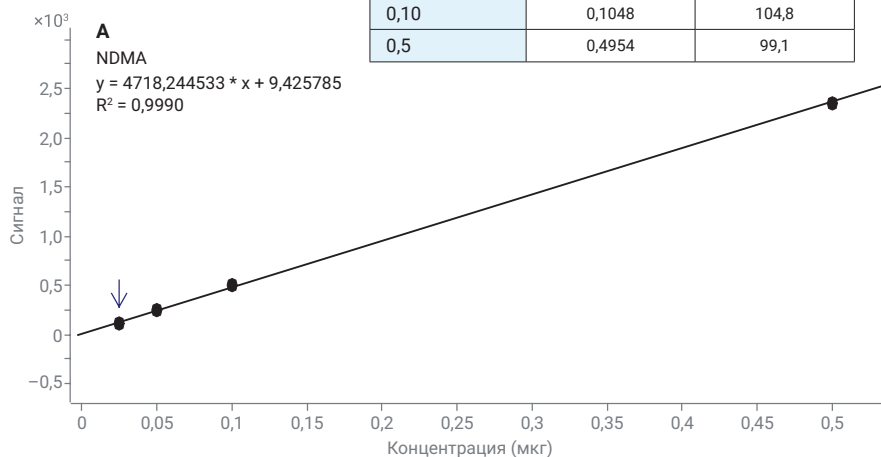
Две калибровочные кривые строились в программе для количественного анализа Agilent MassHunter Quantitative Analysis. Предел количественного определения и предел обнаружения определялись на нижнем конце кривой, для этого результаты количественного анализа сравнивались с калибровочной кривой между точками 0,025 и 0,05 мкг. Линейный диапазон кривой лежит в пределах от 0,025 до 100 мкг, коэффициент линейной корреляции с использованием обратных весовых коэффициентов превосходит 0,995. На рис. 3А и 3В приведена информация о нижнем конце калибровочной кривой, полученной на данном приборе. Предел обнаружения определялся по минимальному количеству вводимого в колонку вещества, для пика которого отношение «сигнал — шум» было не хуже 3 : 1. При калибровке системы по NDMA и NDEA для нижней точки с концентрацией 0,025 мкг это значение было выше.

После построения калибровочных кривых для обоих соединений выполнялось по пять анализов трех стандартов различных концентраций в пределах калибровочной кривой. В табл. 2 приведены результаты оценки воспроизводимости на основе полученных результатов.

Для окончательной оценки параметров методики применялся тест на степень обнаружения в матрице с использованием известной добавки. Два калибровочных стандарта добавлялись каждый в три виалы с 500 мг растворенных таблеток валсартана. Количество добавки выбиралось таким образом, чтобы концентрация была близкой к пределу количественного определения. Перед тестом на степень обнаружения с использованием известной добавки исходный образец анализировался для того, чтобы продемонстрировать отсутствие в нем NDMA и NDEA. Результаты приведены в табл. 3.

Статистические данные калибровки NDMA

Количество стандарта (мкг)	Найденное количество (мкг)	Степень обнаружения, %
0,025	0,0235	92,9
0,05	0,0516	103,2
0,10	0,1048	104,8
0,5	0,4954	99,1



Статистические данные калибровки NDEA

Количество стандарта (мкг)	Найденное количество (мкг)	Степень обнаружения, %
0,025	0,0240	96,0
0,05	0,0499	99,8
0,10	0,1050	105,0
0,5	0,4961	99,2

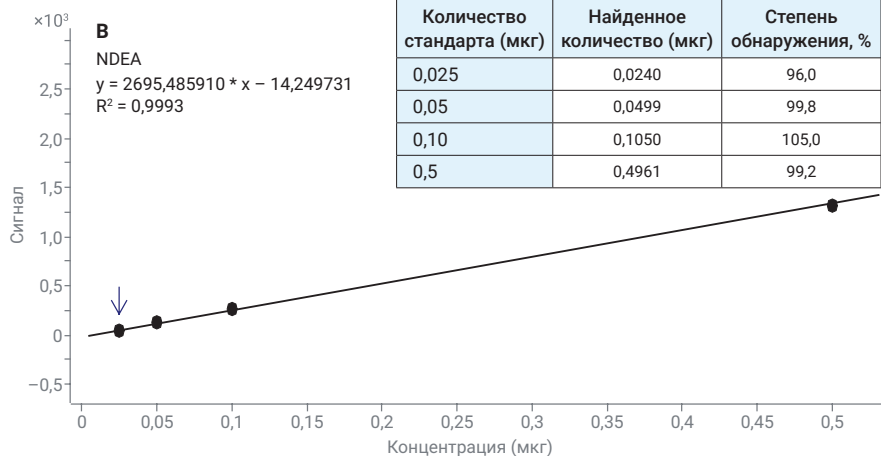


Рис. 3. После обработки калибровочной кривой с помощью линейной регрессии находилась точность определения концентрации калибровочных стандартов в нижней части кривой

Табл. 2. Статистические данные по воспроизводимости стандартов (n = 5)

	Стандарт 0,025 мкг		Стандарт 0,05 мкг		Стандарт 0,1 мкг	
	NDMA	NDEA	NDMA	NDEA	NDMA	NDEA
Среднее обнаруженное количество	0,0249	0,0248	0,0518	0,0506	0,1012	0,0988
ОСО, %	4,95	2,89	6,24	0,7	2,65	4,07

Табл. 3. Расчет предела количественного определения NDMA и NDEA из трех повторений

	Необходимый предел количественного определения	Средняя степень обнаружения	Средняя степень обнаружения
	1 млн ⁻¹	0,05 млн ⁻¹	0,10 млн ⁻¹
NDMA	0,10	0,056	0,11
NDEA	0,05	0,057	0,11

Выводы

ГХ Agilent 8890 демонстрирует преимущество надежности и воспроизводимости, которые нужны для надежного скрининга лекарственных препаратов. ГХ Agilent 8890 с парофазным пробоотборником Agilent 7697A и ГХ-МСД Agilent 5977 соответствует требованиям директив FDA и демонстрирует пределы обнаружения, необходимые для критически важного определения примесей в лекарственных препаратах класса сартанов.

Литература

1. Данные Глобальной обсерватории здравоохранения (GHO). https://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/blood_pressure_prevalence_text/en/ (по состоянию на 17 июня 2019 г.).
2. <http://www.bloodpressureuk.org/mediacentre/Newsreleases/1billionpeopleworldwidenowhavehighbloodpressure>.
3. Barreras, A.; Gurk-Turner, C. Angiotensin II Receptor Blockers. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* **2003**, *16* (1), 123–126. doi:10.1080/08998280.2003.11927893.
4. GC/MS Headspace Method for Detection of NDMA in Valsartan Drug Substance and Drug Products. *U.S. Food and Drug Administration*, FY18-176-DPA-S.
5. Отчет Европейского агентства по лекарственным средствам по NDEA.
6. Combined N-Nitrosodimethylamine (NDMA) and N-Nitrosodiethylamine (NDEA) Impurity Assay by GC/MS Headspace. *U.S. Food and Drug Administration*, FY19-005-DPA-S.

www.agilent.com/chem

Информация в этом документе может быть изменена без уведомления.

© Agilent Technologies, Inc., 2019
Напечатано в США 11 сентября 2019 г.
5994-1132RU

