

mgr Anna Barbara Witkowska

Analiza związków azoto-organicznych w próbkach farmaceutycznych i przemysłowych ze szczególnym uwzględnieniem nitrozoamin

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie
nauki farmaceutyczne**

Promotor: dr hab. n. farm. Joanna Giebułtowicz

Promotor pomocniczy: dr hab. n. farm. Elżbieta U. Stolarczyk

**Zakład Chemii Leków,
Analizy Farmaceutycznej i Biomedycznej**

Zakład Metod Spektrometrycznych



Projekt badawczy realizowany w ramach programu

„Doktorat wdrożeniowy” DWD/5/0401/2021

**Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego**

Warszawa 2025 rok

Serdeczne podziękowania pragnę złożyć:

*Promotor mojej pracy doktorskiej **Pani dr hab. n. farm. Joannie Giebułtowicz** za możliwość konsultacji, poświęcony czas, wszelkie okazane wsparcie oraz uwagi merytoryczne podczas pisania pracy.*

*Promotor pomocniczej mojej pracy doktorskiej **Pani dr hab. n. farm. Elżbiecie Stolarczyk** za bezcenną pomoc, poświęcony czas, ogromne zaangażowanie oraz wartościowe rady udzielone w trakcie realizacji tej pracy.*

Współautorom publikacji wchodzących w skład rozprawy za współpracę i dzielenie się wiedzą.

Koleżankom i Kolegom z Zakładu Metod Spektrometrycznych Narodowego Instytutu Leków oraz Zespołowi Sekcji Analityki Badawczej Łukasiewicz - IChP za okazane wsparcie i dzielenie się swoim doświadczeniem.

*Kierownikowi Zakładu Bioanalizy i Analizy Leków, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego **Panu prof. dr. hab. n. farm. Piotrowi Wroczyńskiemu** oraz Kierownikowi Zakładu Chemii Leków, Analizy Farmaceutycznej i Biomedycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego **Panu dr. hab. Tomaszowi Pawińskiemu**, za możliwość realizowania pracy doktorskiej.*

Rodzinie, w szczególności mojemu mężowi, za rady i wsparcie.

Spis treści

Wykaz skrótów i symboli	6
Wykaz publikacji stanowiących pracę doktorską	8
Wykaz doniesień zjazdowych dotyczących pracy doktorskiej	9
Streszczenie	11
Abstract	14
1. Wprowadzenie	16
2. Założenia i cel pracy	37
3. Kopie opublikowanych prac wchodzących w skład rozprawy	39
3.1 Publikacja 1 (przeglądowa)	39
3.2 Publikacja 2 (oryginalna)	50
3.3 Publikacja 3 (oryginalna)	62
3.4 Publikacja 4 (oryginalna)	78
4. Podsumowanie i wnioski	99
5. Oświadczenia wszystkich współautorów publikacji	103
5.1 Publikacja 1 (przeglądowa)	103
5.2 Publikacja 2 (oryginalna)	108
5.3 Publikacja 3 (oryginalna)	113
5.4 Publikacja 4 (oryginalna)	118
6. Wykaz innych publikacji naukowych	125
7. Wykaz innych doniesień zjazdowych	127
8. Wykaz innych aktywności naukowych	129

Wykaz skrótów i symboli

NOC- związki azotoorganiczne (ang. Nitrogen-Organic Compounds)

NAs- *N*-nitrozoaminy (ang. *N*-nitrosamines)

NIs- niskocząsteczkowe *N*-nitrozoaminy (ang. low-molecular-weight *N*-nitrosamines)

NDSRIs- nitrozo-pochodne zanieczyszczenia związane z substancją czynną (ang. Nitrosamine Drug Substance-Related Impurities)

NDMA- *N*-nitrozodimetyloamina (ang. *N*-Nitrosodimethylamine)

API- substancja czynna (API, ang. Active Pharmaceutical Ingredient)

Ł-ICHP- Łukasiewicz- Instytut Chemii Przemysłowej

NIL- Narodowy Instytut Leków

EMA- Europejska Agencja Leków (ang. European Medicines Agency)

GC-MS- chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (ang. Gas Chromatography – Mass Spectrometry)

GC-MS/MS- chromatografia gazowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas (ang. Gas Chromatography – Tandem Mass Spectrometry)

LC-MS/MS- chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas (ang. Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry)

ESI- jonizacja metodą elektrorozpylania (ang. Electrospray ionization)

APCI- chemiczna jonizacja pod ciśnieniem atmosferycznym (ang. Atmospheric Pressure Chemical Ionization)

HRMS- spektrometria mas wysokiej rozdzielczości (ang. High-resolution mass spectrometry)

FDA- Agencja Żywności i Leków (ang. Food and Drug Administration)

ICH- Międzynarodowa Rada Harmonizacji Wymagań Technicznych dla Rejestracji Produktów Leczniczych Stosowanych u Ludzi (ang. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use)

DFT- metoda kwantowo-mechaniczna oparta na teorii funkcjonału gęstości (ang. Density Functional Theory)

MNP- 1-metylo-4-nitrozopiperyzyna (ang. 1-Methyl-4-nitrosopiperazine)

AI- dopuszczalne spożycie (ang. Acceptable Intake) – dopuszczalne dzienne spożycie zanieczyszczenia (np. nitrozoaminy), wyrażane w µg/dzień, ustalane na podstawie danych toksykologicznych

AL- dopuszczalny limit (ang. Acceptable Limit) – maksymalny dopuszczalny poziom np. nitrozoaminy w substancji czynnej (API) lub w produkcie leczniczym zwykle wyrażany w µg/g (ppm)

Wykaz skrótów i symboli cd.

SAR- zależność struktura–aktywność (ang. Structure–Activity Relationship) – analiza powiązań pomiędzy strukturą chemiczną a aktywnością biologiczną lub toksykologiczną związku

QSAR- ilościowa zależność struktura–aktywność (ang. Quantitative Structure–Activity Relationship) – metoda matematycznego i komputerowego modelowania zależności pomiędzy strukturą chemiczną a aktywnością biologiczną/toksyczną, stosowana m.in. do przewidywania potencjału mutagennego *N*-nitrozoamin

TD₅₀- mediana dawki toksycznej: dawka wywołująca toksyczny efekt u 50% badanej populacji

EC- badania elektrochemiczne (ang. electrochemistry, electrochemical studies)

Wykaz publikacji stanowiących pracę doktorską:

1) Witkowska, A.B.; Zezula, M.; Glice, M.; Stolarczyk, E.U.;
Nowe aspekty metodyki oznaczania N-nitrozoamin, Przemysł Chemiczny
2021;100(3):230-239.

DOI: 10.15199/62.2021.3.3.

Punkty IF: 0,49.

2) Witkowska, A.B.; Giebułtowicz, J.; Dąbrowska, M.; Stolarczyk, E.U.;
Development of a Sensitive Screening Method for Simultaneous Determination of Nine Genotoxic Nitrosamines in Active Pharmaceutical Ingredients by GC-MS;
International Journal of Molecular Sciences **2022**; 23(20): 1-11.

DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms232012125>

Punkty IF: 5,6.

3) Witkowska, A.B.; Wołczyńska, A.; Lis-Cieplak, A.; Stolarczyk, E.U.
Development and Validation of LC-MS/MS Method for the Determination of 1-Methyl-4-Nitrosopiperazine (MNP) in Multicomponent Products with Rifampicin - Analytical Challenges and Degradation Studies; Molecules **2023**; 28(21):1-15.

DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules28217405>

Punkty IF: 4,2.

4) Witkowska, A.B.; Stolarczyk, K.; Fusaro, M.; Leś, A.; Giebułtowicz, J.;
Stolarczyk, E.U. *Oxidation and Reduction of Hydrazones—Risk Factors Related to the Manufacture and Stability of the Drugs*; International Journal of Molecular Sciences **2025**; 26(9):1-20.

DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms26094295>

Punkty IF: 4,9.

Sumaryczny współczynnik oddziaływania IF: 15,19.

Wykaz doniesień zjazdowych dotyczących pracy doktorskiej:

- Doniesienie zjazdowe nr 1:
Witkowska, A.B.; Giebułtowicz, J.; Dąbrowska, M.; Stolarczyk, E.U.; Development of a Sensitive Screening Method for Simultaneous Determination of Nine Genotoxic Nitrosamines in Active Pharmaceutical Ingredients by GC-MS, ACCORD Interdisciplinary Conference on Drug Research „Synergy of interdisciplinary innovations“
Warszawa, 26-28.05.2022, **sesja plakatowa oraz wystąpienie ustne.**
- Doniesienie zjazdowe nr 2:
Stolarczyk, E.U.; Groman, A.; Zezula, M.; **Witkowska, A.B.**; Application of GC-MS and LC-MS techniques for direct analysis of amines in pharmaceutical substances., ACCORD Interdisciplinary Conference on Drug Research „Synergy of interdisciplinary innovations“
Warszawa, 26-28.05.2022, **sesja plakatowa.**
- Doniesienie zjazdowe nr 3:
Witkowska, A.B.; Stolarczyk, E.U.; Giebułtowicz, J.; Aktualne trendy w badaniu produktów leczniczych - *N*-nitrozoaminy, Aktualne kierunki badań w naukach farmaceutycznych–Forum Młodych **2023**,
Lublin, 02.03.2023, **wystąpienie ustne.**
- Doniesienie zjazdowe nr 4:
Witkowska, A.B.; Wołczyńska, A.; Lis-Cieplak, A.; Stolarczyk, E.U.; Development and validation of a universal LC-MS/MS method for the determination of 1-methyl-4-nitrosopiperazine (MNP) in multicomponent products with rifampicin; 7 Konferencja Polskiego Towarzystwa Spektrometrii Mas,
Warszawa, 04-06.09.2023, **sesja plakatowa.**
- Doniesienie zjazdowe nr 5:
Witkowska, A.B.; Wołczyńska, A.; Stolarczyk, E.U.; Electrochemistry coupled with High Resolution Mass Spectrometry to Study Nitroso- and Oxidation Products of Drugs with Hydrazone Group, ACCORD Interdisciplinary Conference on Drug Sciences “Pharmaceutical innovations across the borders”,

Warszawa, 23-25.05.2024, sesja plakatowa.

- Doniesienie zjazdowe nr 6:
Stolarczyk, E.U.; **Witkowska, A.B.**; Stolarczyk, K.; Fusaro, M; Leś, A.;
Giebułtowicz, J.; Analiza elektrochemiczna API z ugrupowaniem
hydrazonowym – nowe spojrzenie na stabilność i jakość leków, Polska
Konferencja Chemii Analitycznej 2025,
Gdańsk, 01-04.07.2025, sesja plakatowa.

- Doniesienie zjazdowe nr 7:
Witkowska, A.B.; Stolarczyk, E.U.; Opracowanie metody oznaczania
N-nitrozodimetyloaminy w produktach leczniczych z furazydyną, Polska
Konferencja Chemii Analitycznej 2025,
Gdańsk, 01-04.07.2025, sesja plakatowa.

Streszczenie

Związki azotoorganiczne (NOCs) to szeroka grupa związków obejmująca m.in. aminy, związki nitrowe, *N*-nitrozoaminy (NAs) oraz heterocykliczne związki azotowe. Z uwagi na potwierdzoną wysoką toksyczność oraz potencjał genotoksyczny niektórych związków azotoorganicznych, w szczególności *N*-nitrozoamin, ich obecność w środowisku człowieka powinna być ściśle monitorowana i regulowana. W 2018 roku wykrycie *N*-nitrozodimetyloaminy (NDMA) w partii leków zawierających walsartan stało się impulsem do rozpoczęcia globalnych badań i wdrożenia nowych regulacji dotyczących nitrozoaminowych zanieczyszczeń. Od tego czasu rozwój i walidacja nowoczesnych metod analitycznych do oznaczania *N*-nitrozoamin zaczęły pełnić kluczową rolę w systemach zapewniania jakości w produkcji farmaceutycznej, stanowiąc jednocześnie podstawę oceny bezpieczeństwa produktów leczniczych. Wykrywanie *N*-nitrozoamin w różnorodnych matrycach, przy konieczności oznaczania ich na niskich poziomach stężeń (ppb), stanowi wyzwanie dla analityków z całego świata. Analiza ryzyka w zakresie procesów wytwarzania substancji czynnych (API) oraz produktów leczniczych wskazuje dodatkowo na możliwość powstawania nowych *N*-nitrozoamin, dotychczas nieopisanych w piśmiennictwie. Mechanizmy ich powstawania w trakcie syntezy, wytwarzania postaci leków oraz przechowywania substancji czynnych i produktów leczniczych pozostają nadal niewystarczająco poznane, co podkreśla znaczenie dalszych badań w tym obszarze.

Celem niniejszej pracy było: przeprowadzenie analizy ryzyka powstawania *N*-nitrozoamin, opracowanie sposobu przygotowania próbek oraz innowacyjnych metod chromatograficznych oznaczania *N*-nitrozoamin i/lub związków azotoorganicznych, walidacja opracowanych metod chromatograficznych, zbadanie mechanizmów powstawania wybranych *N*-nitrozoamin oraz synteza nowych związków azotoorganicznych.

Prace rozpoczęto od wykonania analizy ryzyka powstawania *N*-nitrozoamin w wybranych API, mającej na celu określenie charakteru zagrożeń związanych z tymi zanieczyszczeniami oraz podjęcie działań ukierunkowanych na kontrolę profilu zanieczyszczeń w produktach leczniczych. Kluczowe znaczenie miało zbadanie mechanizmów tworzenia *N*-nitrozoamin w wybranych API,

umożliwiające przewidywanie i zapobieganie ich powstawaniu poprzez kontrolę prekursorów (NOCs), a nie wyłącznie badanie zawartości powstałych niskocząsteczkowych nitrozoamin (NIs) lub nitrozo-pochodnych substancji czynnych (NDSRIs).

Badania eksperymentalne pozwoliły na opracowanie dwóch metod analitycznych umożliwiających oznaczanie i kontrolę obecności wybranych *N*-nitrozoamin w substancjach czynnych oraz produktach leczniczych. Opracowano i poddano walidacji metodę chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas do jednoczesnego oznaczania dziewięciu genotoksycznych nitrozoamin w trzech substancjach czynnych: cilostazolu, sunitynibie oraz olmesartanie medoksomilu, będących przedmiotem działalności produkcyjnej w Łukasiewicz - Instytucie Chemii Przemysłowej. Następnie w ramach kontroli rynku, poddano walidacji i wdrożono metodę chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas umożliwiającą wykrywanie 1-metylo-4-nitrozopiperyzyny (MNP) w wieloskładnikowych preparatach zawierających ryfampicynę, przy jednoczesnym rozwiązaniu problematyki efektów matrycowych. Dodatkowo przeprowadzono badania stabilności i degradacji produktów leczniczych z ryfampicyną, co pozwoliło lepiej poznać procesy prowadzące do powstawania tego niepożądanego zanieczyszczenia.

Kolejnym etapem prac było elektrochemiczne generowanie zanieczyszczeń w substancjach czynnych zawierających grupę hydrazonową: dantrolenie, nitrofurantoinie, furazydynie oraz nitrofuralu. Zastosowanie systemu ROXY™ EC umożliwiło zbadanie procesów utleniania i redukcji wybranych APIs, a następnie identyfikację aż 17 nowych zanieczyszczeń, która została wsparta obliczeniami kwantowo-chemicznymi (DFT) i analizami *in silico*.

Podsumowując, realizacja pracy pozwoliła na opracowanie i wdrożenie nowoczesnych, czułych i specyficznych metod chromatograficznych sprzężonych ze spektrometrią mas do wykrywania i oznaczania *N*-nitrozoamin i innych związków azotoorganicznych w produktach leczniczych i substancjach czynnych. Opracowane metody pozwoliły ponadto na zbadanie mechanizmów tworzenia profilu zanieczyszczeń wybranych APIs i produktów leczniczych. Wdrożone metody analityczne nie tylko odpowiadają na potrzeby regulacyjne, lecz także stanowią istotny wkład w rozwój wiedzy dotyczącej mechanizmów powstawania

tych związków. Co najważniejsze, podnoszą poziom bezpieczeństwa i jakość produktów leczniczych na polskim i europejskim rynku.

Słowa kluczowe: *związki azotoorganiczne, N-nitrozoaminy (NAs), metody chromatograficzne, spektrometria mas, kontrola jakości, mechanizmy powstawania NAs, bezpieczeństwo lekowe.*

Abstract

Nitrogen-containing organic compounds (NOCs) are a broad class of substances that includes, among others, amines, nitro compounds, *N*-nitrosamines (NAs), and nitrogen-containing heterocycles. Given the confirmed high toxicity and genotoxic potential of certain nitrogen-containing organic compounds—particularly *N*-nitrosamines—their presence in the human environment should be strictly monitored and regulated. In 2018, the detection of *N*-nitrosodimethylamine (NDMA) in batches of valsartan-containing medicines triggered global investigations and the introduction of new regulations concerning nitrosamine impurities. Since then, the development and validation of modern analytical methods for the determination of *N*-nitrosamines has assumed a key role in quality-assurance systems in pharmaceutical manufacturing and has become a foundation for assessing the safety of medicinal products. Detecting *N*-nitrosamines in various matrices at low concentration levels (ppb) remains a challenge for scientists worldwide. Risk assessments of manufacturing processes for active pharmaceutical ingredients (APIs) and medicinal products further indicate the possibility of the formation of new *N*-nitrosamines not yet described in the literature. The mechanisms underlying their formation during synthesis, formulation of dosage forms, and storage of APIs and medicinal products are still insufficiently understood, underscoring the need for further research in this area.

The aim of this work was to: perform a risk assessment for the formation of *N*-nitrosamines; develop sample-preparation approaches and innovative chromatographic methods for determining *N*-nitrosamines and/or nitrogen-containing organic compounds; validate the developed chromatographic methods; investigate the formation mechanisms of selected *N*-nitrosamines; and synthesize new nitrogen-containing organic compounds.

The work began with a risk assessment of *N*-nitrosamine formation in selected APIs to define the nature of the hazards associated with these impurities and to initiate actions aimed at controlling impurity profiles in medicinal products. Of key importance was the investigation of *N*-nitrosamine formation mechanisms in selected APIs, enabling the prediction and prevention of their occurrence by controlling precursors (NOCs), rather than focusing solely on the determination

of the resulting low-molecular-weight nitrosamines (NIs) or nitrosamine drug substance-related impurities (NDSRIs).

Experimental studies led to the development of two analytical methods for the determination and control of selected *N*-nitrosamines in APIs and medicinal products. First, a gas chromatography–mass spectrometry method was developed and validated for the simultaneous determination of nine genotoxic nitrosamines in three APIs—cilostazol, sunitinib, and olmesartan medoxomil—manufactured at the Łukasiewicz – Industrial Chemistry Institute (Ł-ICHP). Subsequently, as part of market surveillance, a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method was validated and implemented to detect 1-methyl-4-nitrosopiperazine (MNP) in multicomponent preparations containing rifampicin, with explicit consideration of matrix effects. In addition, stability and degradation studies of rifampicin-containing medicinal products were carried out to better elucidate the processes leading to this undesired impurity.

The next stage involved the electrochemical generation of impurities in APIs containing a hydrazone group: dantrolene, nitrofurantoin, furazidine, and nitrofurazone. Use of the ROXY™ EC system enabled the investigation of oxidation and reduction processes of the selected APIs, followed by the identification of as many as 17 new impurities, supported by quantum-chemical calculations (DFT) and *in silico* analyses.

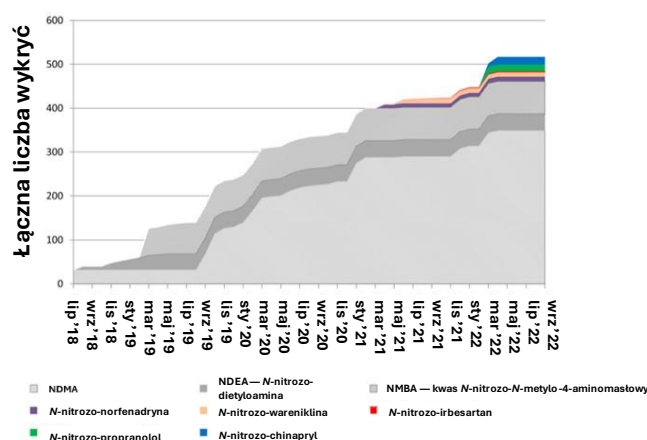
In summary, this work resulted in the development and implementation of modern, sensitive, and specific chromatographic methods coupled to mass spectrometry for the detection and quantification of *N*-nitrosamines and other nitrogen-containing organic compounds in medicinal products and APIs. The methods also enabled investigation of the mechanisms by which impurity profiles form in selected APIs and medicinal products. The implemented analytical methods not only address regulatory requirements but also contribute significantly to the advancement of knowledge on the mechanisms of formation of these compounds. Most importantly, they enhance the safety and quality of medicinal products on the Polish and European markets.

Keywords: *nitrogen-containing organic compounds, nitrosamines (NAs), chromatographic methods, mass spectrometry, quality control, nitrosamine formation mechanisms, pharmaceutical safety.*

1. Wprowadzenie

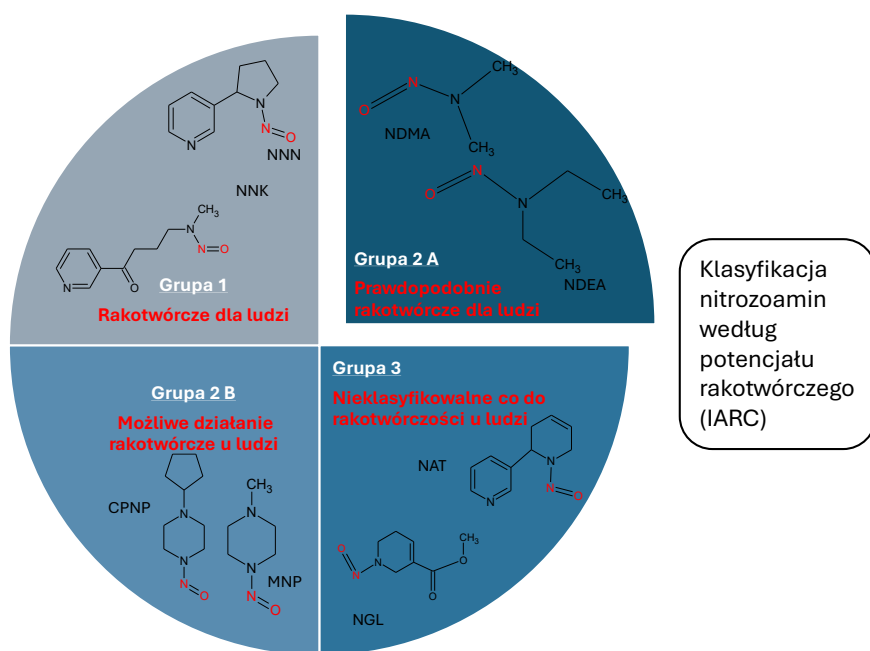
Związki azotoorganiczne (NOCs) to grupa związków organicznych, w których skład wchodzi m.in.: aminy, związki nitrowe, *N*-nitrozoaminy (NAs) oraz heterocykliczne związki azotowe. NAs powszechnie występują w środowisku człowieka: w wodach gruntowych, powierzchniowych, skażonej wodzie pitnej, żywności konserwowanej azotanami, np. w wędlinach, w tabace oraz dymie tytoniowym i są badane przez naukowców od końca lat 50. XX w. [1–5]. Jednakże wykrycie w 2018 r. *N*-nitrozodimetyloaminy (NDMA) w partii produktów farmaceutycznych zawierających walsartan zapoczątkowało największe na skalę światową badania oraz wprowadzenie nowych regulacji dotyczących zawartości *N*-nitrozoamin w produktach leczniczych. Po szeroko zakrojonych badaniach przeprowadzonych przez agencje regulacyjne, w tym Europejską Agencję Leków (EMA), *N*-nitrozoaminy wykryto w różnych innych substancjach czynnych (API) oraz produktach leczniczych, co doprowadziło do nagłego wycofania z rynku produktów leczniczych zawierających substancje czynne należące do grupy sartanów (walsartan, losartan, irbesartan), ranitydyny, nizatydyny, metforminy i wardenikliny, z powodu przekroczenia dopuszczalnych limitów ich zawartości [6,7]. W odpowiedzi wprowadzono nowe wytyczne dotyczące kontroli *N*-nitrozoamin oraz dodano dedykowany rozdział w Farmakopei Europejskiej [8,9]. W połowie 2021 roku, gdy sytuacja na rynku farmaceutycznym związana z NAs wydawała się względnie opanowana, stan rzeczy zmienił się diametralnie wraz z wycofaniem partii produktu leczniczego Chantix (wardeniklina) w USA, Kanadzie i UE ze względu na obecność zanieczyszczenia związanego z nitrozopochodną substancji czynnej - nitrozowardenikliną [10]. Wykazano, że nie tylko niskocząsteczkowe *N*-nitrozoaminy (NIs) mogą stanowić zanieczyszczenia produktów leczniczych; nitrozowaniu mogą ulegać również substancje czynne, zaawansowane produkty pośrednie oraz produkty degradacji zawierające aminy drugorzędowe w swojej strukturze. NDSRIs (nitrosamine drug substance-related impurities) to nitrozozanieczyszczenia powstające w trakcie syntezy, wytwarzania lub przechowywania produktów leczniczych, wykazujące podobieństwo strukturalne do substancji czynnej (API). Od 2021 r. NDSRIs wykrywane są w lekach ze zwiększoną częstotliwością i obecnie stanowią około 10% wszystkich

przypadków wykryć *N*-nitrozoamin, co pokazuje, że kryzys związany z nitrozoaminami w produktach leczniczych wciąż trwa (Rys. 1) [11].



Rysunek 1. Liczba zgłoszonych wykryć dotyczących *N*-nitrozoamin od lipca 2018 r. w USA i Kanadzie [11], obraz wykorzystany na zasadach licencji CC BY-NC.

Ze względu na toksyczność *N*-nitrozoamin ich zawartość w środowisku człowieka musi być rygorystycznie kontrolowana. *N*-nitrozoaminy są klasyfikowane jako znane zanieczyszczenia mutagenne klasy 2, Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (IARC) zaliczyła zaś te zanieczyszczenia do grup 2A (prawdopodobnie rakotwórczych dla ludzi) i 2B (potencjalnie rakotwórczych dla ludzi) [12,13]. Przy czym *N*-nitrozodimetyloamina (NDMA) i *N*-nitrozodietyloamina (NDEA) należą do grupy 2A, podczas gdy inne *N*-nitrozoaminy wykryte w produktach leczniczych są sklasyfikowane jako ludzkie czynniki rakotwórcze grupy 2B (Rys 2). Wytyczna M7 Międzynarodowej Rady Harmonizacji Wymagań Technicznych dla Rejestracji Produktów Leczniczych Stosowanych u Ludzi (ICH) wskazuje, że *N*-nitrozoaminy, aflatoksyny, oraz związki alkilo-azowe są silnie rakotwórczymi i genotoksycznymi zanieczyszczeniami i określa je jako “cohort of concern” [14]. Dla tej grupy substancji nie można rutynowo stosować ogólnej wartości TTC (Threshold of Toxicological Concern) wynoszącej 1,5 µg/dzień; dopuszczalne limity ustala się dla każdego związku oddzielnie.



Rysunek 2. Klasyfikacja toksykologiczna nitrozoamin w APIs według IARC [6].

Aby zaradzić kryzysowi związanemu z nitrozoaminowymi zanieczyszczeniami, najważniejsze międzynarodowe agencje regulacyjne, takie jak EMA i FDA (Food and Drug Administration), wprowadziły rygorystyczne wytyczne dotyczące badania *N*-nitrozoamin, w tym NDSRIs, w procesach produkcyjnych i gotowych produktach leczniczych. FDA wydała w 2019 roku dokument „Control of Nitrosamine Impurities in Human Drugs”, a EMA opublikowała wytyczną „Nitrosamine impurities in human medicines” [15,16]. Agencje regulacyjne zobowiązały posiadaczy pozwolenia na dopuszczenie do obrotu (MAH) do wykonania trzyetapowego schematu postępowania w celu kontrolowania i zapobiegania tworzeniu się *N*-nitrozoamin w API i produktach leczniczych. W kroku pierwszym producenci produktów leczniczych byli zobowiązani wykonać ocenę ryzyka w celu zidentyfikowania substancji czynnych i produktów leczniczych zagrożonych tworzeniem NAs. W drugim etapie wytwórcy produktów leczniczych byli zobligowani do wykonania testów potwierdzających ewentualną obecność *N*-nitrozoamin w substancjach czynnych i produktach leczniczych przy użyciu zaawansowanych technik analitycznych, a następnie do zgłoszenia potwierdzonej obecności NAs do urzędów rejestracyjnych i odbiorców. W ostatnim trzecim etapie MAH mieli za zadanie wprowadzić (jeśli zasadne) zmiany w procesie produkcyjnym oraz kontroli zawartości NAs z wykorzystaniem zwalidowanych metod analitycznych

umożliwiających oznaczenia na niskich poziomach stężeń. Organy regulacyjne ds. kontroli produktów leczniczych określiły także dopuszczalne dzienne limity spożycia dla 214 wykrytych dotąd *N*-nitrozoamin w APIach i produktach leczniczych. Lista *N*-nitrozoamin wraz z ich limitami w produktach leczniczych jest stale aktualizowana w związku z wykrywaniem nowych nitrozopochodnych (ostatnia zmiana 1 sierpnia 2025) (Tabela 1) [17]. Dopuszczalne spożycie (AI, *Acceptable Intake*) dla *N*-nitrozoamin wyznaczone jest zgodnie z podejściem opisanym w wytycznych ICH M7(R2) [14,15]. Jeżeli dla danej *N*-nitrozoaminy istnieją wystarczające dane dotyczące rakotwórczości u zwierząt, obliczana jest wartość TD₅₀ (mediana dawki toksycznej), która następnie służy do wyznaczenia AI. W przypadku braku takich danych wykorzystuje się wyniki badań mutagenności *in vivo*, metody obliczeniowe (SAR / QSAR), zmodyfikowany test Ames oraz ocenę struktury chemicznej i grup funkcyjnych (CPCA, Carcinogenic Potency Categorization Approach) [15,18]. Wartość AI odpowiada zaniedbywalnemu ryzyku zachorowania na nowotwór, oszacowanemu na 1:100 000 w populacji osób narażonych przez całe życie.

Limity dopuszczalne dla danej *N*-nitrozoaminy (AL, *Acceptable Limit*) wyznaczone są na podstawie wartości AI oraz maksymalnej dziennej dawki produktu leczniczego (MDD, *Maximum Daily Dose*):

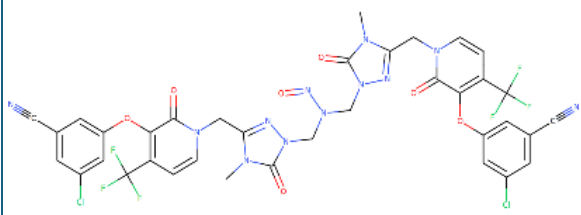
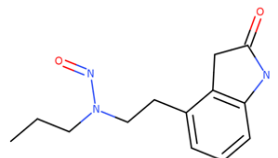
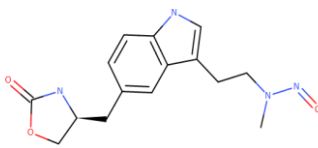
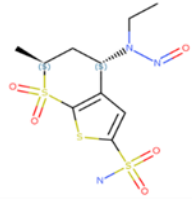
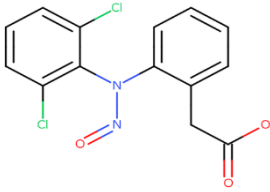
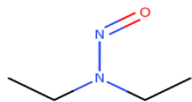
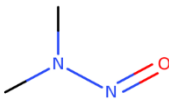
$$AL[ppm] = \frac{AI \left[\frac{\mu g}{dzien} \right]}{MDD \left[\frac{g}{dzien} \right]}$$

gdzie:

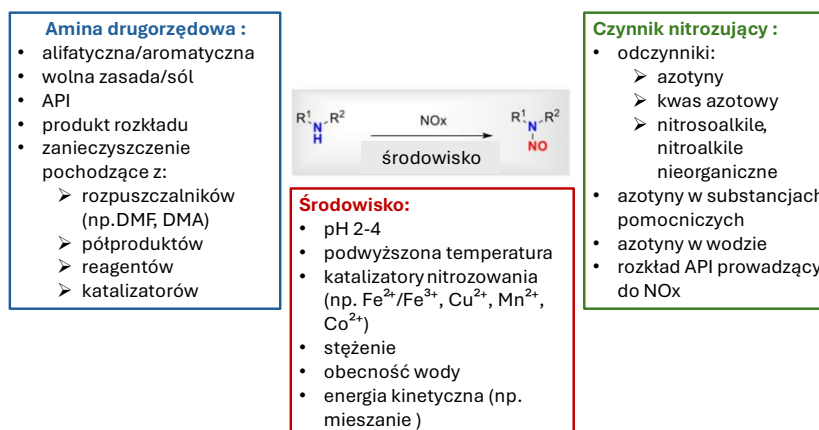
- AI – dopuszczalne spożycie (w µg/dzień),
- MDD – maksymalna dzienna dawka produktu leczniczego (g/dzień),
- AL – dopuszczalny limit dla danej *N*-nitrozoaminy w substancji czynnej lub produkcie leczniczym (µg/g = ppm).

Poziom wyznaczonego limitu jak i sposób jego wyznaczenia w istotny sposób wpływają na opracowanie metod analitycznych i formę przedstawienia wyniku (limit liczony na API lub na produkt leczniczy).

Tabela 1. Dopuszczalne poziomy spożycia (AI) ustalone przez EMA dla przykładowych *N*-nitrozoamin [17].

Struktura	Nazwa	Źródło	AI (ng/dzień)	Data publikacji EMA
	<i>N</i> -nitrozo-dimer dorawiryny	Dorawiryna	1500	01/08/2025
	<i>N</i> -nitrozo-despropyl- ropinirol	Ropinirol	18	15/05/2025
	<i>N</i> -nitrozo-desmetyl- zolmitryptan	Zolmitryptan	18	01/12/2024
	<i>N</i> -nitrozo-dorzolamid	Dorzolamid	1500	15/01/2024
	<i>N</i> -nitrozo-diklofenak	Diklofenak	78000	01/07/2023
	<i>N</i> -nitrosodietyloamina	np. Walsartan, Losartan, Irbesartan	26.5	01/06/2020
	<i>N</i> - nitrosodimetyloamina	np. Ranitydyna, Nizatydyna Metformina	96	01/06/2020

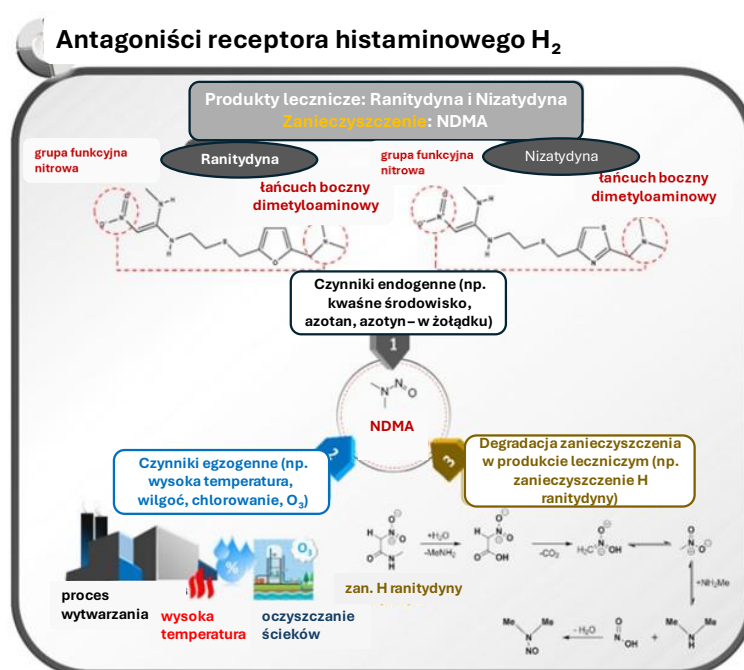
Wspomniana wcześniej ocena ryzyka powstawania NIs i NDSRIs, obliuguje producentów produktów leczniczych do identyfikacji czynników, które mogą prowadzić do powstania *N*-nitrozoamin. NAs powstają najczęściej w wyniku reakcji czynników nitrozujących (takich jak azotyny) z aminami drugorzędowymi [16] (Rys. 3). Natomiast proste trzeciorzędowe alkiloaminy mogą ulegać nitrozowaniu w procesie dealkilacji, który jest znacznie wolniejszy niż nitrozowanie amin drugorzędowych [19].



Rysunek 3. Warunki powstawania *N*-nitrozoamin w substancjach czynnych i produktach leczniczych [16,20].

N-nitrozoaminy mogą tworzyć się z zanieczyszczeń obecnych w surowcach dostarczanych przez producentów, takich jak aminowe związki wyjściowe, półprodukty, rozpuszczalniki (np. DMF), ponownie wykorzystywane rozpuszczalniki (rozsuszczone po regeneracji), reagenty czy odczynniki stosowane w procesach syntezy. W trakcie wytwarzania produktów leczniczych należy szczegółowo analizować m.in. dobór substancji pomocniczych, konserwantów oraz elementów elastomerowych, ponieważ mogą one zawierać azotany i azotyny, a więc sprzyjać powstawaniu *N*-nitrozoamin już w produkcji końcowym. W 2020 roku brytyjska firma Lhasa Limited zainicjowała utworzenie bazy danych podającej poziomy azotynów w substancjach pomocniczych stosowanych w wytwarzaniu produktów leczniczych [21]. Warunki po zakończeniu tego procesu, takie jak poziom wilgotności, pH czy temperatura przechowywania produktów leczniczych, mogą również wpływać na powstawanie zanieczyszczeń, w tym *N*-nitrozoamin, w wyniku procesów degradacyjnych zachodzących w trakcie magazynowania lub transportu. Udokumentowano przypadki, w których obecność

takich czynników sprzyjała powstawaniu *N*-nitrozoamin w produktach leczniczych, m.in. w ranitydynie (Rys. 4). W jej przypadku wykazano, że cząsteczka ranitydyny zawierająca nietypową grupę winylonitrową, może ulegać autooksydacji, prowadząc do uwolnienia jonu azotynowego oraz dimetyloaminy. Następnie, w wyniku konwersji jonu azotynowego do gazowego czynnika nitrozującego – chlorku nitrozyłu (NOCl) – dochodzi do powstania *N*-nitrozodimetyloaminy. Z uwagi na ryzyko takiej degradacji i przekroczenie dopuszczalnych limitów dla zawartości NDMA, ranitydyna została całkowicie wycofana z rynku i nie jest już dostępna dla pacjentów [22].

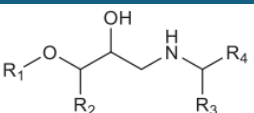
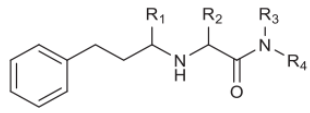
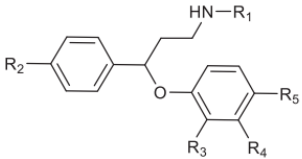
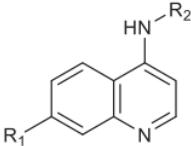


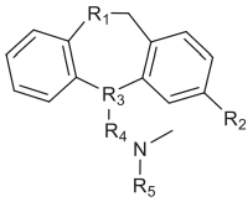
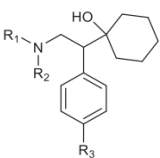
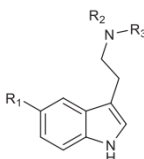
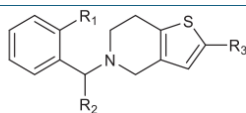
Rysunek 4. Możliwe przyczyny powstawania *N*-nitrozodimetyloaminy (NDMA) w ranitydynie i nizatydynie [23], obraz wykorzystany na zasadach licencji CC BY-NC-ND 4.0.

W ciągu ostatnich dwóch lat, uwaga przesunęła się z niskocząsteczkowych zanieczyszczeń nitrozoaminowych powstających podczas wytwarzania substancji czynnych, na NDSRIs, które powstają głównie w wyniku reakcji grup aminowych obecnych w strukturze substancji czynnej z czynnikami nitrozującymi w trakcie syntezy, formulacji postaci leku i przechowywania produktu leczniczego. Kontrola tych zanieczyszczeń stanowi obecnie duże wyzwanie, ponieważ wrażliwe aminy są istotnymi elementami strukturalnymi wielu API, a brak wystarczającej wiedzy uniemożliwia dokładne przewidywanie ryzyka ich powstawania [24,25]. Ponadto, według badań możliwe jest także utlenianie hydrazonowej grupy funkcyjnej, które

może prowadzić do powstawania NDSRIs [20]. Nadtlutki, które uczestniczą w procesach utleniających, mogą bezpośrednio reagować z produktami degradacji cząsteczek substancji czynnych zawierających grupy hydrazynowe lub hydrazonowe (np. rifampicyna), co prowadzi do powstawania nitrozoamin [26]. Dlatego, niezbędne jest monitorowanie APIs zawierających wrażliwe grupy aminowe, w tym także hydrazynowe i hydrazonowe, które ze względu na swój charakter strukturalny są szczególnie podatne na tworzenie NDSRIs. Przykładowe grupy APIs o podwyższonym ryzyku tworzenia NDSRIs przedstawiono w Tabeli 2.

Tabela 2. Przykładowe szkielety strukturalne APIs o podwyższonym ryzyku tworzenia NDSRIs [27].

Klasa APIs	Grupa funkcyjna	Przykłady APIs	Reprezentatywna struktura szkieletowa
Blokery receptorów β-adrenergicznych i β agoniści	amina drugorzędowa	atenolol, bisoprolol, metoprolol, propranolol	
Inhibitory konwertazy angiotensyny	amina drugorzędowa	enalapryl, lisinopryl, ramipryl, quinapryl	
Inhibitory wychwyty zwrotnego serotoniny i noradrenaliny o aryloksypropanamino-wym szkielecie	amina drugorzędowa	duloksetyna, fluoksetyna, paroksetyna	
Aminochinolinowe APIs przeciwmalaryczne	amina drugorzędowa	amodiachina, chlorochina, prymachina	

Trójpierścieniowe APIs przeciwdepresyjne	amina trzeciorzędowa	amoksapina, dezypramina, doksepina, imipramina	
Inhibitory wychwytu zwrotnego serotonininy i noradrenaliny o szkielecie cykloalkanolowo- etylaminowym	amina trzeciorzędowa	deswenlafaksyna, wenlafaksyna	
Tryptany	amina trzeciorzędowa	almotryptan, naratryptan, rizatryptan, sumatryptan	
Tienopirydyny	amina trzeciorzędowa	klopidogrel, prasugrel, tiklopidyna	
APIs zawierające grupę hydrazonową /hydrazynową	hydrazonowa hydrazynowa	prokarbazyna, rifampicyna	$R_1-C=NNH-R_2$

Współcześnie, obok wykrywania i identyfikacji oraz modelowania potencjalnych szlaków powstawania *N*-nitrozoamin, jednym z kluczowych wyzwań dla chemików analityków pozostaje opracowywanie specyficznych i czułych metod oznaczania tych związków w produktach leczniczych oraz substancjach czynnych. Rozwój innowacyjnych procedur analitycznych stanowi istotny element systemów zapewniania jakości zarówno w jednostkach badawczych, jak i w przemyśle farmaceutycznym, mający bezpośredni wpływ na bezpieczeństwo i skuteczność stosowanych produktów. Konieczność prowadzenia oznaczeń w złożonych i zróżnicowanych matrycach, przy jednoczesnym spełnieniu wymogów wykrywania zanieczyszczeń na niskich poziomach stężeń (rzędu ppb i niższych), stwarza istotne wyzwania dla analityków całego świata. Ponadto, wyniki analiz ryzyka związane z procesami syntezy API

wskazują na możliwość występowania nie tylko znanych, lecz również dotychczas niezidentyfikowanych struktur NIs/NDSRIs, co uzasadnia potrzebę wdrażania kompleksowych badań przesiewowych ukierunkowanych na ich wykrywanie i oznaczanie [28–30]. Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (FDA) w 2020 roku jako pierwsza opublikowała ogólny rozdział USP 1469, poświęcony kontroli sześciu *N*-nitrozoamin (NDMA, NDEA, NEIPA, NDIPA, NMBA oraz NDBA) w APIs. W dokumencie tym opisano cztery metody analityczne:

- chromatografię cieczową sprzężoną z wysokorozdzielczą spektrometrią mas (LC-HRMS),
- chromatografię gazową z analizą fazy nadpowierzchniowej sprzężoną z tandemową spektrometrią mas (GC-HS-MS/MS),
- chromatografię cieczową sprzężoną z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS),
- chromatografię gazową sprzężoną z tandemową spektrometrią mas (GC-MS/MS) [31].

Powyższe metody dotyczą wyłącznie oznaczania kilku *N*-nitrozoamin w wybranych sartanach. W 2022 roku Komisja Farmakopei Europejskiej (Ph. Eur.) wprowadziła do monografii nowy rozdział 2.5.42 „*N*-Nitrosamine Impurities”, poświęcony oznaczaniu zanieczyszczeń jakimi są *N*-nitrozoaminy w substancjach czynnych (sartanach) [8]. Z kolei ten rozdział opisuje trzy techniki instrumentalne: A) LC-MS/MS, B) GC-MS oraz C) GC-MS/MS. Procedury A i B zostały zwalidowane jako testy graniczne przeznaczone do potwierdzenia, czy zawartość *N*-nitrozoamin nie przekracza ustalonego limitu 30 ppb, natomiast tylko procedura C ma charakter metody ilościowej. W opisie procedury A zamieszczono również uwagę, iż obecność dimetyloformamidu (DMF) w badanej substancji może zakłócać wykrywanie NDMA. Z tych powodów FDA opracowała metodę LC-HRMS o wysokiej specyficzności, umożliwiającą rozróżnienie NDMA od DMF, które mają bardzo podobną masę monoizotopową i widma fragmentacyjne. W przeciwieństwie do LC-MS/MS, gdzie piki otrzymane w trybie MRM od DMF i NDMA mogą współteluować i powodować interferencje, zastosowanie HRMS lub odpowiednio zoptymalizowanej chromatografii gazowej (GC-MS/MS) pozwala na ich skuteczne rozdzielenie i selektywną analizę [32,33].

Kolejne lata prac pokazały, że przedstawione opisy metod w wymienionych wyżej farmakopealnych monografiach, mogą stanowić punkt wyjścia do analiz, ale nie mogą być metodami dedykowanymi czy też przesiewowymi do innych matryc. Dodatkowo ukierunkowane są one tylko na niskocząsteczkowe *N*-nitrozoaminy. Opracowywanie nowych metod stało się więc koniecznością dla naukowców z całego świata. Nadal najczęściej stosowanymi technikami separacyjnymi w oznaczaniu *N*-nitrozoamin są chromatografia cieczowa (HPLC) oraz chromatografia gazowa (GC), sprzężone ze spektrometrią mas niskiej rozdzielczości (GC-MS, LC-MS/MS, GC-MS/MS) lub wysokiej rozdzielczości (LC-HRMS: Orbitrap, Q-TOF) [28,29]. W literaturze opisano także nieliczne metody wykorzystujące chromatografię nadkrytyczną (SFC-MS/MS), chromatografię cieczową z detektorem UV-VIS, chromatografię gazową z detektorem azotowo-fosforowym (GC-NPD), chemiluminescencyjnym detektorem energii termicznej (TEA), a także elektroforezę kapilarną (CE-MS) połączoną ze spektrometrią mas [34–37]. Schmidtsdorff i inni opracowali metodę SFC-MS/MS umożliwiającą jednoczesne oznaczanie w sartanach (np. walsartanie i losartanie), szerokiej klasy różnych *N*-nitrozoamin na poziomie ppb oraz zanieczyszczeń pokrewnych sartanom, w pojedynczej analizie trwającej krócej niż 20 minut. Pomimo dużego potencjału analitycznego, technika SFC-MS/MS jest obecnie rzadko stosowana w laboratoriach kontroli jakości, głównie z powodu ograniczonej dostępności specjalistycznej aparatury. Zestawienie przykładowych metod wykorzystywanych w badaniu zawartości *N*-nitrozoamin w produktach leczniczych przedstawiono w Tabeli 3.

Tabela 3. Przykłady metod analitycznych, metod ekstrakcji wraz z wyznaczonym LOQ dla *N*-nitrozoamin w produktach leczniczych.

Nazwa produktu leczniczego	Technika	Autor	Przygotowanie próbki / Źródło	Nitrozoamina	LOQ (ppm)	Ref
Wybrane sartany	LC-HRMS	USP (1469)	Rozpuszczanie w metanolu /ESI	NDMA, NDEA, NEIPA, NDIPA, NMBA, NDBA	0,05	[31]
Wybrane sartany	GC-HS-MS/MS	USP (1469)	Rozpuszczenie w 1 mL metanolu i 1 mL acetonitrylu i 100 mg imidazolu/EI	NDMA, NDEA, NEIPA, NDIPA, NMBA, NDBA	0,02	[31]
Wybrane sartany	LC-MS/MS	USP (1469)	Rozpuszczanie w 0,1%FA w wodzie/APCI	NDMA, NDEA, NEIPA, NDIPA, NMBA, NDBA	0,01 i 0,02	[31]
Wybrane sartany	GC-MS/MS	USP (1469)	Rozpuszczanie w 5 mL chlorku metylenu	NDMA, NDEA, NEIPA, NDIPA, NMBA, NDBA	0,005	[31]
Ranitydyna	LC-HRMS	FDA	Nie opisano /ESI lub APCI	NDMA	0,03	[33]
Metformina	LC-HRMS	FDA	Nie opisano /ESI lub APCI	NDMA	0,03	[33]
Chlorochina i hydroksychlorochina	LC-HRMS	FDA	Nie opisano /ESI lub APCI	NDMA, NDEA, NEIPA, NDIPA, NMBA, NDBA	0,02	[33]
Sartany, metformina, ranitydyna, Sitagliptyna i inne	SFC-MS/MS	Schmidtsdorff	Rozpuszczanie w metanolu /ESI	NDMA, NDEA, NDELA, NEIPA, NDIPA, NDPA, NMBA, NMPhA, NPYR, NMOR, NPIP, NDBA, NDPhA, NDCHA, NDiNA, NDBzA	Brak danych	[34]
Produkty lecznicze	HS-SPME-GC-MS/MS	Chang i inni	Roztwór ekstrahujący 90% NaCl, czas inkubacji HeadSpace 1 min, adsorpcja	NDMA, NDEA, NMEA, NEIPA, NDiPA, NDPA, NDiBA, NDBA, NPYR, NMOR,	$5 \cdot 10^{-5}$, $2,5 \cdot 10^{-4}$	[38]

			SPME w 80 °C przez 30 min i desorpcja w 250 °C przez 5 min.	NPIP, NDCHA, NDPhA, NDiNA		
Kwas mefenamowy	LC- MS/MS	Nakka i inni	Rozpuszczenie w 0,1 % FA /ACN (20:80)	<i>N</i> -DPA, <i>N</i> -MFA.	1*10 ⁻⁵	[39]
Wildagliptyna	LC- MS/MS	Kumar i inni	Rozpuszczenie w 5 mL ACN:H2O (1:1)	<i>N</i> -Nitrozo- wildagliptyna	1,46	[40]

LOQ — granica oznaczalności, NDMA — *N*-nitrozodimetyloamina, NDEA — *N*-nitrozodietylamina, NEIPA — *N*-nitrozo-*N*-etyl-*N*-izopropylamina, NDIPA — *N*-nitrozo-diizopropylamina, NDiPA — *N*-nitrozo-diizopropylamina, NMBA — kwas *N*-nitrozo-*N*-metylo-4-aminomasłowy, NDBA — *N*-nitrozo-di-*n*-butylamina, NDiBA — *N*-nitrozo-diizobutylamina, NDELA — *N*-nitrozo-dietanolamina, NDPA — *N*-nitrozo-dipropylamina, NMEA — *N*-nitrozo-metyloetylamina, NPYR — *N*-nitrozo-pirolidyna, NMOR — *N*-nitrozo-morfolina, NPIP — *N*-nitrozo-piperidyna, NDPhA — *N*-nitrozo-difenyloamina, *N*-DPA — *N*-nitrozo-difenyloamina, NMPHA — *N*-nitrozo-metyloanilina, NDCHA — *N*-nitrozo-dicykloheksylamina, NDiNA — *N*-nitrozo-dinaftyloamina, NDBzA — *N*-nitrozo-dibenzylamina, *N*-MFA — *N*-nitrozo-kwas mefenamowy, ESI — jonizacja metodą elektrorozpylania, APCI — chemiczna jonizacja pod ciśnieniem atmosferycznym, EI — jonizacja elektronami

W detekcji MS następuje rozdzielenie jonów w fazie gazowej na podstawie ich stosunku masy do ładunku (m/z) przy użyciu pola elektrycznego i/lub magnetycznego. Analiza wymaga zatem kilku etapów: (i) przeniesienia analitu do fazy gazowej, (ii) jego zjonizowania, (iii) rozdzielenia powstałych jonów (pochodzących zarówno od analitu, jak i od składników matrycy), a następnie (iv) ich detekcji. Ważnym aspektem w analizie *N*-nitrozoamin jest więc wybór odpowiedniej metody jonizacji analitów. Jonizacja za pomocą elektrorozpraszania (ESI) oraz jonizacja chemiczna pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI) to najczęściej stosowane metody jonizacji w oznaczaniu *N*-nitrozoamin metodą LC-MS/MS. W praktyce częściej wybierana jest jonizacja APCI, ze względu na wysoką czułość i mniejsze zakłócenia pochodzące od matrycy. Jednakże NDSRIs oraz inne *N*-nitrozoaminy nielotne lub słabo odparowujące mają ograniczoną zdolność do jonizacji w APCI, co sprawia, że ESI znajduje szersze zastosowanie w przypadku tego typu związków [41]. W technikach GC-MS/(MS), przeznaczonych głównie do analizy lotnych *N*-nitrozoamin, standardowo stosuje się źródło jonizacji elektronowej (EI), zapewniające powtarzalne i dobrze scharakteryzowane widma masowe, co ułatwia identyfikację związków. Oprócz typowej jonizacji przy energii elektronów 70 eV, w niektórych procedurach, wykorzystuje się niższą energię 40 eV [8]. Zastosowanie obniżonej energii jonizacji pozwala ograniczyć nadmierną fragmentację związków, zwiększając intensywność jonów molekularnych, co poprawia stosunek sygnału do szumu dla wybranych *N*-nitrozoamin i może obniżyć granicę oznaczalności w trybie monitorowania wybranych reakcji

(MRM). Jonizacja chemiczna (CI, Chemical Ionization) wykorzystywana jest głównie w analizach środowiskowych, gdzie przykładowo, oznaczana jest NDMA w wodzie [42].

Ze względu na złożoność matrycy produktów leczniczych, wyzwaniem jest skuteczne przeniesienie zarówno substancji czynnej, jak i potencjalnych zanieczyszczeń do roztworu. Kluczowe znaczenie ma zatem dobór odpowiedniego rozpuszczalnika i procedury przygotowania próbki, które mogą stanowić krytyczny etap analizy. Szczególnie trudne jest zapewnienie pełnego rozpuszczenia substancji czynnej i wszystkich analitów docelowych przy jednoczesnym uniknięciu strat wynikających z ich lotności oraz uzyskanie próbki odpowiedniej do dalszej analizy metodami LC-MS/MS i GC-MS/(MS). W wielu metodach opisanych w literaturze, w tym również w Farmakopei Europejskiej, do oznaczania zawartości *N*-nitrozoamin w prostych matrycach zastosowane jest podejście bezpośrednie, polegające na rozpuszczeniu badanego produktu leczniczego w odpowiednim rozpuszczalniku (np. wodzie, metanolu czy chlorku metylenu), a następnie wprowadzeniu otrzymanego roztworu bezpośrednio do źródła jonów [8]. Niezaprzeczną zaletą takich metod jest ich szybkość, łatwość walidacji i niskie koszty. Wadami takich procedur jest natomiast m.in. ryzyko zanieczyszczenia dozownika i spektrometru mas, szczególnie w przypadku metod GC-MS/(MS), a także obecność interferencji pochodzących od złożonej matrycy farmaceutycznej, które mogą istotnie wpływać na czułość i selektywność wykrywania oznaczanych analitów [43]. Dodatkowo, wiele substancji i produktów leczniczych jest bardzo trudno rozpuszczalnych w standardowych rozpuszczalnikach. Z tego względu jednym z kluczowych wyzwań w analizie *N*-nitrozoamin pozostaje także opracowanie skutecznych strategii przygotowania próbek, które pozwolą na rozpuszczenie próbki, selektywne wyodrębnienie analitów, przy jednoczesnym usunięciu substancji zakłócających. Najczęściej stosowanymi technikami przygotowania próbek w analizie *N*-nitrozoamin są:

- Ekstrakcja ciecz–ciecz (LLE, Liquid–Liquid Extraction)
- Ekstrakcja do fazy stałej (SPE, Solid Phase Extraction)

Mikroekstrakcja do fazy stałej (SPME, Solid Phase Microextraction) [29,38,44].

Wady i zalety każdej z tych metod ekstrakcji z przykładami zastosowań do oznaczeń *N*-nitrozoamin w produktach leczniczych zestawiono w Tabeli 4.

Tabela 4. Porównanie technik przygotowania próbek do oznaczania *N*-nitrozoamin w produktach leczniczych.

Technika	Zalety	Wady	Typowe zastosowania	Najczęściej stosowane warianty/metody	Ref
LLE	– prosta w wykonaniu – niskie koszty – odpowiednia dla prostych matryc	– duże zużycie rozpuszczalników – mała selektywność – możliwe straty analitów	Przygotowanie roztworów APIs w analizie GC-MS i LC-MS	Ekstrakcja do dichlorometanu (DCM) z 1 M NaOH;	[8,31]
SPE	– wysoka selektywność – możliwość zateżnienia analitów – dobra powtarzalność	– wysokie koszty sorbentów	Preparaty o złożonej matrycy (np. tabletki, syropy)	Sorbenty C18, HLB(sorbent o równowadze hydrofilowo-lipofilowej), z węgla aktywnego	[44,45]
SPME	– brak rozpuszczalników (technika zgodna z zasadami zielonej chemii) – niskie granice wykrywalności i oznaczalności dla lotnych NAs – możliwość sprzężenia <i>on-line</i> z GC-MS/MS	– ograniczona trwałość włókien – wysokie koszty włókien	Analiza lotnych i półlotnych nitrozoamin w produktach leczniczych i APIs	Najczęściej stosowane włókna: PDMS (polidimetylosiloksan), CAR/PDMS (Carboxen-mikroporowaty węgiel aktywny/PDMS), DVB/CAR/PDMS (divinylbenzen/Carboxen/PDMS)	[37,38]

Podsumowując, opracowanie odpowiedniej, dostosowanej do rodzaju matrycy metody ilościowego oznaczania zawartości takich analitów jak NIs i NDSRIs, stanowi istotne wyzwanie analityczne. Wynika to zarówno z konieczności wykrywania analitów w bardzo niskich stężeniach (rzędu ppb), jak i ze złożoności matryc farmaceutycznych. Odpowiedni dobór strategii przygotowania próbki, w tym rozpuszczenia i ekstrakcji, oraz techniki detekcji i separacji analitów (LC-MS/(MS), LC-HRMS, GC-MS/(MS), SFC-MS/(MS)) są kluczowe dla uzyskania wiarygodnych i powtarzalnych wyników, które zapewnią bezpieczeństwo pacjentom. Opracowane dotychczas metody opisane przez Ph.Eur., USP czy FDA dotyczą tylko wybranych produktów leczniczych np. sartanów. Rośnie natomiast liczba wykrywanych nowych *N*-nitrozoamin w innych produktach leczniczych, dla których metody analityczne nie są dostępne.

Uwzględniając powyższe wyzwania związane z analizą *N*-nitrozoamin w substancjach i produktach leczniczych, kluczowe kierunki działań na najbliższe lata można określić następująco:

- **Opracowanie i walidacja metod analitycznych o niskich granicach wykrywalności i oznaczalności (LOD/LOQ)** dla nowych NDSRIs oraz nowoidentyfikowanych *N*-nitrozoamin, z wykorzystaniem zaawansowanych technik instrumentalnych, takich jak GC-MS/(MS), LC-MS/(MS) czy SFC-MS/(MS). Szczególny nacisk kładzie się na promowanie stosowania wzorców wewnętrznych znakowanych izotopowo, co pozwala skutecznie minimalizować wpływ matrycy oraz zwiększa dokładność i powtarzalność oznaczeń.
- **Synteza i badania stabilności wzorców** nowych *N*-nitrozoamin, a także analogów znakowanych izotopowo.
- **Zbadanie wpływu przygotowania próbki**, na wyniki zawartości *N*-nitrozoamin.
- **Rozwój metod przesiewowych** umożliwiających szybkie wykrywanie *N*-nitrozoamin w produktach leczniczych podczas badań stabilności/stresowych przy użyciu np. metod elektrochemicznych.
- **Zacieśnianie współpracy międzynarodowej**, w tym koordynacja działań europejskich laboratoriów OMCL (*Official Medicines Control Laboratories*) i opracowanie zharmonizowanych wytycznych, aby ujednolicić metody i wymagania dotyczące *N*-nitrozoamin, zapewnić porównywalność wyników oraz szybciej i spójniej reagować na nowe zagrożenia.
- **Zintegrowane podejście do zarządzania ryzykiem**, obejmujące wykorzystanie narzędzi *in silico* i baz danych (np. dotyczących substancji pomocniczych) w celu przewidywania ryzyka powstawania *N*-nitrozoamin już na wczesnych etapach rozwoju produktu leczniczego oraz badanie i przewidywanie mechanizmów ich tworzenia.

Piśmiennictwo

1. Konstantinou, E.; Fotopoulou, F.; Drosos, A.; Dimakopoulou, N.; Zagoriti, Z.; Niarchos, A.; Makrynioti, D.; Kouretas, D.; Farsalinos, K.; Lagoumintzis, G.; et al. Tobacco-Specific Nitrosamines: A Literature Review. *Food and Chemical Toxicology* **2018**, *118*, 198–203, doi:10.1016/j.fct.2018.05.008.
2. Nawrocki, J.; Andrzejewski, P. Nitrosamines and Water. *J Hazard Mater* **2011**, *189*, 1–18, doi:10.1016/j.jhazmat.2011.02.005.
3. Jakszyn, P. Nitrosamine and Related Food Intake and Gastric and Oesophageal Cancer Risk: A Systematic Review of the Epidemiological Evidence. *World J Gastroenterol* **2006**, *12*, 4296, doi:10.3748/wjg.v12.i27.4296.
4. McMahon, N.F.; Brooker, P.G.; Pavey, T.G.; Leveritt, M.D. Nitrate, Nitrite and Nitrosamines in the Global Food Supply. *Crit Rev Food Sci Nutr* **2024**, *64*, 2673–2694, doi:10.1080/10408398.2022.2124949.
5. Sebranek, J.G.; Cassens, R.G. Nitrosamines: A Review. *Journal of Milk and Food Technology* **1973**, *36*, 76–91, doi:10.4315/0022-2747-36.2.76.
6. Bharate, S.S. Critical Analysis of Drug Product Recalls Due to Nitrosamine Impurities. *J Med Chem* **2021**, *64*, 2923–2936, doi:10.1021/acs.jmedchem.0c02120.
7. FDA Recalls, Market Withdrawals, & Safety Alerts Available online: <https://www.fda.gov/safety/recalls-market-withdrawals-safety-alerts> (accessed on 1 September 2025).
8. European Pharmacopoeia 2.5.42. *N-Nitrosamines in Active Substances*; 2022;
9. EMA Questions and Answers for Marketing Authorisation/Applicants on the CHMP Opinion for the Article(3) of Regulation (EC) No 726/2004 Referral on nitrosamine Impurities in Human Medicinal Products Available online: https://www.ema.europa.eu/en/documents/opinion-any-scientific-matter/nitrosamines-emea-h-a53-1490-questions-answers-marketing-authorisation-holders-applicants-chmp-opinion-article-53-regulation-ec-no-726-2004-referral-nitrosamine-impurities-human-medicinal-products_en.pdf (accessed on 3 August 2025).
10. EMA CHAMPIX (Varenicline) - Lots to Be Recalled Due to Presence of Impurity N-Nitroso-Varenicline above the Pfizer Acceptable Daily Intake Limit Available online: https://www.ema.europa.eu/en/documents/dhpc/direct-healthcare-professional-communication-dhpc-champix-varenicline-lots-be-recalled-due-presence-impurity-n-nitroso-varenicline-above-pfizer-acceptable-daily-intake-limit_en.pdf (accessed on 28 September 2025).

11. Schmidtsdorff, S.; Neumann, J.; Schmidt, A.H.; Parr, M.K. Prevalence of Nitrosamine Contaminants in Drug Samples: Has the Crisis Been Overcome? *Arch Pharm (Weinheim)* **2023**, *356*, doi:10.1002/ardp.202200484.
12. WHO N-Nitrosodimethylamine in Drinking-Water Available online: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/wash-documents/wash-chemicals/ndma-2add-feb2008.pdf?sfvrsn=122aa3d3_4 (accessed on 3 August 2025).
13. Beard, J.C.; Swager, T.M. An Organic Chemist's Guide to N-Nitrosamines: Their Structure, Reactivity, and Role as Contaminants. *Journal of Organic Chemistry* **2021**, *86*, 2037–2057, doi:10.1021/acs.joc.0c02774.
14. EMA ICH M7(R2) Guideline on Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk; 2023;
15. FDA Control of Nitrosamine Impurities in Human Drugs Guidance for Industry Pharmaceutical Quality/Manufacturing Standards (CGMP) Revision 2 Available online: <https://www.fda.gov/drugs/guidance-compliance-regulatory-information/guidances-drugs>.
16. EMA Nitrosamine Impurities in Human Medicinal Products Available online: https://www.ema.europa.eu/en/documents/opinion-any-scientific-matter/nitrosamines-emea-h-a53-1490-assessment-report_en.pdf (accessed on 29 July 2025).
17. EMA Acceptable Intakes (AIs) Established for N-Nitrosamines Available online: https://www.ema.europa.eu/system/files/documents/other/nitrosamines-qa_appendix1_excel-ema-rev10-en.xlsx (accessed on 1 September 2025).
18. Thomas, D.N.; Wills, J.W.; Tracey, H.; Baldwin, S.J.; Burman, M.; Williams, A.N.; Harte, D.S.G.; Buckley, R.A.; Lynch, A.M. Ames Test Study Designs for Nitrosamine Mutagenicity Testing: Qualitative and Quantitative Analysis of Key Assay Parameters. *Mutagenesis* **2024**, *39*, 78–95, doi:10.1093/mutage/gead033.
19. Ashworth, I.W.; Dirat, O.; Teasdale, A.; Whiting, M. Potential for the Formation of N -Nitrosamines during the Manufacture of Active Pharmaceutical Ingredients: An Assessment of the Risk Posed by Trace Nitrite in Water. *Org Process Res Dev* **2020**, *24*, 1629–1646, doi:10.1021/acs.oprd.0c00224.
20. Cioc, R.C.; Joyce, C.; Mayr, M.; Bream, R.N. Formation of N -Nitrosamine Drug Substance Related Impurities in Medicines: A Regulatory Perspective on Risk Factors and Mitigation Strategies. *Org Process Res Dev* **2023**, *27*, 1736–1750, doi:10.1021/acs.oprd.3c00153.

21. Boetzel, R.; Schlingemann, J.; Hickert, S.; Korn, C.; Kocks, G.; Luck, B.; Blom, G.; Harrison, M.; François, M.; Allain, L.; et al. A Nitrite Excipient Database: A Useful Tool to Support N-Nitrosamine Risk Assessments for Drug Products. *J Pharm Sci* **2023**, *112*, 1615–1624, doi:10.1016/j.xphs.2022.04.016.
22. Harmon, P. Ranitidine: A Proposed Mechanistic Rationale for NDMA Formation and a Potential Control Strategy. *J Pharm Sci* **2023**, *112*, 1220–1224, doi:10.1016/j.xphs.2022.11.011.
23. Wichitnithad, W.; Nantaphol, S.; Noppakhunsomboon, K.; Rojsitthisak, P. An Update on the Current Status and Prospects of Nitrosation Pathways and Possible Root Causes of Nitrosamine Formation in Various Pharmaceuticals. *Saudi Pharmaceutical Journal* **2023**, *31*, 295–311, doi:10.1016/j.jsps.2022.12.010.
24. Dirat, O.; Urquhart, M.W.; Akehurst, H.; Burns, M.J.; Dobo, K.L.; Harvey, J.; Kuhl, N.; Schlingemann, J.; Tomlin, P.; Wetter, C. Drug Substance and Drug Product Workflows for Quality Risk Management for the Presence of Nitrosamines in Medicines. *Org Process Res Dev* **2025**, *29*, 1538–1553, doi:10.1021/acs.oprd.5c00097.
25. P.R., H.V.; Kandula, D.R.; Gunta, U.; Kumar, G.; Deka, R.; Chiriki, D.S.; Chethan, K.S.; Bannimath, N.; Yadav, T.; Beeraka, N.M.; et al. NDSRIs Crisis in Pharmaceuticals; Insights on Formation Pathways, Root Causes, Risk Management, and Novel Analytical Techniques. *Curr Med Chem* **2024**, *32*, 1065–1081, doi:10.2174/0109298673322023240829081220.
26. Paglialunga, S.; van Haarst, A. The Impact of N-Nitrosamine Impurities on Clinical Drug Development. *J Pharm Sci* **2023**, *112*, 1183–1191, doi:10.1016/j.xphs.2023.01.017.
27. Schlingemann, J.; Burns, M.J.; Ponting, D.J.; Martins Avila, C.; Romero, N.E.; Jaywant, M.A.; Smith, G.F.; Ashworth, I.W.; Simon, S.; Saal, C.; et al. The Landscape of Potential Small and Drug Substance Related Nitrosamines in Pharmaceuticals. *J Pharm Sci* **2023**, *112*, 1287–1304, doi:10.1016/j.xphs.2022.11.013.
28. Manchuri, K.M.; Shaik, M.A.; Gopireddy, V.S.R.; Naziya Sultana; Gogineni, S. Analytical Methodologies to Detect N-Nitrosamine Impurities in Active Pharmaceutical Ingredients, Drug Products and Other Matrices. *Chem Res Toxicol* **2024**, *37*, 1456–1483, doi:10.1021/acs.chemrestox.4c00234.
29. Alsayadi, Y.M.M.A.; Dogra, R.; Arora, V.; Shiven, A. Innovations in the Detection of N-Nitrosamine Impurities in Pharmaceuticals: Analytical and Regulatory Challenges. *Crit Rev Anal Chem* **2025**, 1–26, doi:10.1080/10408347.2025.2512443.

30. Wang, Q.; Liu, Z.; Liu, Y.; Chen, H. Absolute Quantitation of N-Nitrosamines by Coulometric Mass Spectrometry without Using Standards. *J Am Soc Mass Spectrom* **2022**, *33*, 875–884, doi:10.1021/jasms.2c00064.
31. USP (1469) Nitrosamine Impurities Available online: <https://www.usp.org/sites/default/files/usp/document/stakeholder-forum/pnp/highlights-of-1469-nitrosamine-impurities.pdf> (accessed on 28 September 2025).
32. Biopharma, P.&; Dasgupta, S.; Dhyani, V.; Churley, M. Quantification of Nine Nitrosamine Impurities in Sartan Drugs Using an Agilent GC-TQ Available online: <https://www.agilent.com/cs/library/applications/application-method-nitrosamines-sartan-8890-7010b-5994-4618en-agilent.pdf> (accessed on 28 September 2025).
33. FDA LC-HRMS Based Analytical Platform to Determine Nitrosamines in Pharmaceuticals: Modern Analytical Techniques Meet Regulatory Needs Available online: <https://www.fda.gov/science-research/fda-science-forum/lc-hrms-based-analytical-platform-determine-nitrosamines-pharmaceuticals-modern-analytical> (accessed on 28 September 2025).
34. Schmidtsdorff, S.; Schmidt, A.H. Simultaneous Detection of Nitrosamines and Other Sartan-Related Impurities in Active Pharmaceutical Ingredients by Supercritical Fluid Chromatography. *J Pharm Biomed Anal* **2019**, *174*, 151–160, doi:10.1016/j.jpba.2019.04.049.
35. Li, C.; Chen, Z.; Wen, D.; Zhang, J.; Cong, W.; Yu, B.; Liao, Y.; Liu, H. Determination of Tobacco-specific N-nitrosamines in Rabbit Serum by Capillary Zone Electrophoresis and Capillary Electrophoresis-electrospray Ionization-mass Spectrometry with Solid-phase Extraction. *Electrophoresis* **2006**, *27*, 2152–2163, doi:10.1002/elps.200600009.
36. Liu, Y.; Guo, X.; Wang, Z.; Zhang, Q.; Ma, Q.; Lv, Q. Research Progress of N-Nitrosamine Detection Methods: A Review. *Bioanalysis* **2022**, *14*, 1123–1135, doi:10.4155/bio-2022-0091.
37. Germano, A.T.; Micke, G.A.; Vitali, L. A Novel Green HS/SPME-GC/NPD Method for Screening and Quantification of Nitrosamines in Solid Samples: Application to Losartan Tablets. *Talanta* **2026**, *296*, 128514, doi:10.1016/j.talanta.2025.128514.
38. Chang, S.H.; Ho, H.Y.; Chang, C.C.; Zang, C.Z.; Hsu, Y.H.; Lin, M.C.; Tseng, S.H.; Wang, D.Y. Evaluation and Optimization of a HS-SPME-Assisted GC-MS/MS Method for Monitoring Nitrosamine Impurities in Diverse Pharmaceuticals. *J Pharm Biomed Anal* **2022**, *221*, doi:10.1016/j.jpba.2022.115003.
39. Nakka, S.; Katari, N.K.; Muchakayala, S.K.; Jonnalagadda, S.B.; Manabolu Surya, S.B. A Novel LC-TQ-MS/MS Method for Quantifying Mefenamic Acid-NDSRI (N-Nitroso Drug Substance-Related Impurity) in Mefenamic

Acid Tablet and Pediatric Suspension Dosage Forms: A Comparative Study with a Cost-Effective White, Green, and Blue UPLC Method. *RSC Adv* **2025**, *15*, 1957–1969, doi:10.1039/d4ra08425j.

40. Kumar, V.; Balthu, L.; Pepakayala, S.; Lohia, Y.K.; Kathuria, D.; Mathur, P.; Rathod, V.; Sonar, S.; Chourasiya, S.S. N-Nitroso-Vildagliptin, A New N-Nitrosamine Drug Substance Related Impurity (NDSRI) of Vildagliptin-An Antidiabetic Drug: Synthesis, Characterization and Development of Sensitive LC–MS/MS Method. *Chromatographia* **2025**, doi:10.1007/s10337-025-04437-0.
41. Wichitnithad, W.; Nantaphol, S.; Noppakhunsomboon, K.; Thitikornpong, W.; Rojsitthisak, P. Current Status and Prospects of Development of Analytical Methods for Determining Nitrosamine and N-Nitroso Impurities in Pharmaceuticals. *Talanta* **2023**, *254*, 124102, doi:10.1016/j.talanta.2022.124102.
42. Sieira, B.J.; Carpinteiro, I.; Rodil, R.; Quintana, J.B.; Cela, R. Determination of N-Nitrosamines by Gas Chromatography Coupled to Quadrupole–Time-of-Flight Mass Spectrometry in Water Samples. *Separations* **2020**, *7*, 3, doi:10.3390/separations7010003.
43. Lim, H.H.; Oh, Y.S.; Shin, H.S. Determination of N-Nitrosodimethylamine and N-Nitrosomethylethylamine in Drug Substances and Products of Sartans, Metformin and Ranitidine by Precipitation and Solid Phase Extraction and Gas Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* **2020**, *189*, doi:10.1016/j.jpba.2020.113460.
44. Planinšek Parfant, T.; Skube, T.; Roškar, R. A Robust Analytical Method for Simultaneous Quantification of 13 Low-Molecular-Weight N-Nitrosamines in Various Pharmaceuticals Based on Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography Coupled to High-Resolution Mass Spectrometry. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2024**, *192*, doi:10.1016/j.ejps.2023.106633.
45. Yamamoto, E.; Kan-no, H.; Tomita, N.; Ando, D.; Miyazaki, T.; Izutsu, K. Isolation of N-Nitrosodimethylamine from Drug Substances Using Solid-Phase Extraction-Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* **2022**, *210*, 114561, doi:10.1016/j.jpba.2021.114561.

2. Założenia i cel pracy:

Celem nadrzędnym niniejszego doktoratu wdrożeniowego było opracowanie innowacyjnych metod chromatograficznych oznaczania nitrozoamin / związków azotoorganicznych w API / produktach leczniczych, które będą wdrożone w Łukasiewicz-Institut Chemii Przemysłowej (Łukasiewicz-IChP), Narodowym Instytucie Leków (NIL) i/lub EDQM, a także będą stanowiły know-how wprowadzone do oferty usługowej Łukasiewicz-IChP oraz NIL. Harmonogram prac badawczo - wdrożeniowych zakładał:

- ❖ Przegląd piśmiennictwa, wykonanie przeglądu dróg syntezy wybranych API w Ł-IChP i przeprowadzenie analizy ryzyka powstawania *N*-nitrozoamin.
- ❖ Opracowanie innowacyjnych metod chromatograficznych oraz procedur izolacji i wzbogacania analitów, umożliwiających oznaczanie wybranych związków azotoorganicznych, w tym *N*-nitrozoamin.
- ❖ Syntezę nowych związków azotoorganicznych.
- ❖ Walidację opracowanych metod chromatograficznych (GC-MS/(MS) lub LC-MS/(MS)) oznaczania związków azotoorganicznych w tym *N*-nitrozoamin, która będzie obejmowała: specyficzność, linowość, precyzję, odzysk, granicę oznaczalności i wykrywalności oraz elastyczność metody.

Cel zrealizowany został poprzez:

- Analizę ryzyka powstawania *N*-nitrozoamin dla trzech wybranych API produkowanych przez Łukasiewicz-IChP oraz przegląd mechanizmów powstawania nitrozoamin w produktach leczniczych / API, ich właściwości toksykologicznych oraz regulacji prawnych wprowadzonych od 2018 roku przez EMA, FDA i Ph. Eur. Zestawiono również aktualnie techniki analityczne stosowane w oznaczaniu zawartości nitrozoamin w produktach leczniczych, takie jak GC-MS/(MS), LC-MS/(MS), LC-HRMS wraz z metodami przygotowania próbek do badań: LLE, SPE, SPME czy DLLME, wskazując zarówno ich możliwości, jak i ograniczenia (**Publikacja nr 1 oraz doniesienie zjazdowe nr 3**).

- Opracowanie i walidację metody GC-MS do jednoczesnego oznaczania dziewięciu genotoksycznych nitrozoamin w cilostazolu, sunitynibie i olmesartanie medoksomilu produkowanych w Łukasiewicz -IChP (**Publikacja nr 2 oraz doniesienie zjazdowe nr 1**).
- Opracowanie i wdrożenie metody LC-MS/MS do oznaczania 1-metylo-4-nitrozopiperyzyny (MNP) na niskich poziomach stężeń (ppb) w złożonych preparatach z ryfampicyną, uwzględniając problem efektów matrycowych i konieczność odpowiedniej ekstrakcji (**Publikacja nr 3 oraz doniesienie zjazdowe nr 4**).
- Badania stabilności oraz degradacji produktów leczniczych z rifampicyną (**Publikacja nr 3 oraz doniesienie zjazdowe nr 4**).
- Elektrochemiczne generowanie zanieczyszczeń wybranych substancji czynnych z grupą hydrazonową (dantrolen, nitrofurantoina, furazydyna i nitrofural) powstałych w procesie utleniania i redukcji przy użyciu aparatury ROXYTM EC system (**Publikacja nr 4 oraz doniesienie zjazdowe nr 5,6**).
- Identyfikację 17 nowych zanieczyszczeń czterech wybranych API z grupą hydrazonową wspartą obliczeniami kwantowo-chemicznymi (DFT) i analizami *in silico* (**Publikacja nr 4 oraz doniesienie zjazdowe nr 5,6**).

3. Kopie opublikowanych prac wchodzących w skład rozprawy:

3.1 Publikacja 1 (przeglądowa)

Witkowska, A. B.; Zezula M.; Glice M., Stolarczyk E.U., Nowe aspekty metodyki oznaczania *N*-nitrozoamin, Przemysł Chemiczny 2021;100(3):230-239.

New aspects of the methodology of N-nitrosamines determination

Nowe aspekty metodyki oznaczania N-nitrozoamin

DOI: 10.15199/62.2021.3.3

A review, with 63 refs., of recognition of the N-nitrosamines formation mechanisms in various matrices, such as biolog. samples, surface and drinking waters, cosmetics, active substances or pharmaceutical products, and the criteria for detg. them at very low concn. The use of the MS detector and tandem mass detector in HPLC and GC allowed for the development of sensitive methods for the detn. of nitrosamines at a very low level, using appropriate techniques of isolation and enrichment of analytes.

Przedstawiono przegląd literaturowy dotyczący rozpoznania mechanizmów powstawania N-nitrozoamin w różnych matrycach, takich jak próbki biologiczne, wody powierzchniowe i pitne, kosmetyki, substancje czynne lub produkty farmaceutyczne oraz kryteria ich oznaczania na bardzo niskich poziomach stężeń. Zastosowanie detektora spektrometrii mas i tandemowego detektora mas w chromatografii cieczowej i gazowej pozwoliło na opracowanie czułych metod oznaczania nitrozoamin z wykorzystaniem odpowiednich technik wyodrębniania i wzbogacania analitów.

Główne źródła powstawania zanieczyszczeń, jakimi są związki azotoorganiczne to przemysł rafineryjny i petrochemiczny, przemysł wytwarzania tworzyw sztucznych, barwników, antyutleniaczy, materiałów wybuchowych, a także przemysł farmaceutyczny. Do zanieczyszczeń azotoorganicznych należą N-nitrozoaminy, które sklasyfikowano jako prawdopodobne czynniki rakotwórcze i teratogenne dla ludzi i zwierząt. Pierwsze doniesienia o potencjalnym zagrożeniu i toksyczności N-nitrozoamin pojawiły się już w latach 50. XX w.¹⁾, ale to

w lipcu 2018 r. szczególną uwagę zwrócono na tę grupę związków za sprawą N-nitrozodimetyloaminy (NDMA)²⁾. Jej wykrycie w partii produktów farmaceutycznych zawierających walsartan zapoczątkowało największe na skalę światową badania oraz wprowadzenie nowych regulacji dotyczących tej grupy związków. Restrykcyjne spojrzenie na N-nitrozoaminy w przemyśle farmaceutycznym przełożyło się również na inne gałęzie przemysłu. Dlatego opracowanie nowych metod analitycznych stało się istotnym celem kontroli jakości w podmiotach naukowych i przemysłowych, stanowiąc ważny element zapewnienia bezpieczeństwa i skuteczności produktów, a w szczególności leków oraz suplementów diety i żywności specjalnego przeznaczenia. Niestety, konieczność oznaczenia N-nitrozoamin w zróżnicowanych matrycach, takich jak próbki biologiczne, wody powierzchniowe i pitne, kosmetyki, a także substancje czynne i produkty lecznicze, oraz kryteria oznaczania ich na bardzo niskich poziomach stężeń, stanowią duże wyzwanie dla analityków całego świata. Ma to również istotne znaczenie w rozwoju potencjału sektora farmaceutycznego i chemicznego w Polsce.

Lotne związki azotoorganiczne (LZN) charakteryzują się wysoką prężnością par (powyżej 0,01 kPa w temperaturze pokojowej). Zgodnie z definicją Amerykańskiej Agencji Ochrony Środowiska (US EPA) należą do lotnych związków organicznych (LZO)³⁾. Zalicza się do nich aminy (np. tertbutyloamina, diizobutyloamina, anilina, dimetyloanilina, 4-fluoroanilina), związki nitrowe (np. nitrobenzen), N-nitrozoaminy (np. NDMA, N-nitrozodimetyloamina (NDEA), N-nitrozodibutyloamina (NDBA), N-nitrozodifenylloamina (NDPhA), N-nitrozodi-n-propyloamina (NDnPA), N-nitrozometyloetyloamina (NMEA), N-nitrozopirrolidyna (NPYR), N-nitrozopiperidyna (NPIP), N-nitrozomorfolina (NMOR), N-nitrozodimetyloamina (NMBA), N-nitrozodizopropylloamina (NDiPA), N-nitrozoetyloizopropylloamina (NEIPA) oraz heterocykliczne związki azotowe (np. pirol, pirydyna, indol, pirymidyna, pirolidyna). Związki te charakteryzują się dużą toksycznością, trwałością i zdolnością do akumulacji w łańcuchu pokarmowym. Działają one drażniąco na układ oddechowy, skórę,



Mgr Anna B. WITKOWSKA w roku 2009 ukończyła studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Od 2019 r. jest zatrudniona na stanowisku specjalisty w Sieci Badawczej Łukasiewicz – Instytucie Chemii Przemysłowej im. prof. Ignacego Mościckiego w Zespole Analityki Badawczej. W latach 2009–2019 pracowała w Sieci Badawczej Łukasiewicz – Instytucie Farmaceutycznym. Specjalność – spektroskopia, chromatografia gazowa, dyfrakcja laserowa.



Dr inż. Marta ZEŻULA w roku 2002 ukończyła studia na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. W latach 2009–2019 pracowała w Sieci Badawczej Łukasiewicz – Instytucie Farmaceutycznym. Od 2020 r. jest zatrudniona na stanowisku Kierownika Zespołu Analityki Badawczej w Sieci Badawczej Łukasiewicz – Instytucie Chemii Przemysłowej im. prof. Ignacego Mościckiego. Specjalność – chromatografia cieczowa z detekcją UV i MS oraz analiza za pomocą spektroskopii NMR.

blony śluzowe. *N*-nitrozoaminy (NA) zostały sklasyfikowane jako prawdopodobne czynniki rakotwórcze dla ludzi na podstawie badań na zwierzętach. Jako pochodne amin o właściwościach rakotwórczych mogą również działać teratogennie. NDMA i NDEA zaliczane są przez Międzynarodową Agencję Badań nad Rakiem (IARC) do grupy 2A (czyli są w grupie substancji prawdopodobnie kancerogennych dla ludzi)⁴⁾. Podobne stanowisko względem NA ma Unia Europejska, która zalicza te związki do kategorii B2, czyli substancji o domniemanym działaniu rakotwórczym⁵⁾ i jedynie dla tych dwóch nitrozoamin dostępne są pełniejsze dane toksykologiczne. Dla pozostałych NA przyjęte dobowe limity podania, np. z lekami, zostały oparte na ich podobieństwie strukturalnym do NDMA i NDEA²⁾. Niestety, NA obecnie są niemal wszędzie, zarówno w produktach spożywczych, wodzie pitnej, jak i lekach, dlatego też limity ich dopuszczalnej zawartości dla różnych produktów zależą od takich czynników, jak dzienna dawka i częstotliwość spożycia, a ostateczne limity powinny uwzględniać składowe z różnych źródeł.

W przypadku wody NA mogą powstawać na skutek jej chlorowania, jako produkt uboczny stosowania silnych utleniaczy w technologii oczyszczania wody⁶⁾. EPA wyznaczyła dopuszczalny limit NA w wodzie wodociągowej na poziomie 0,4 ng/L⁵⁾. W żywności i napojach wykrywane są jako produkty reakcji azotanu(III) z aminami, które powstają w trakcie obróbki termicznej. Zgodnie z przepisami Amerykańskiej Agencji Leków i Żywności (FDA) NDMA jest jedyną regulowaną nitrozoaminą w piwie o dopuszczalnej wartości granicznej poniżej 5 µg/L. W USA i Chinach wprowadzono także limity w produktach spożywczych (np. limit 10 µg/kg dla wędlin w USA oraz 4 i 7 µg/kg dla ryb w Chinach).

Kolejną dużą grupą produktów, w których wykryto obecność NA są substancje farmaceutyczne. Początek intensywnych działań związanych z wprowadzeniem regulacji i działań kontrolnych to 2018 r., kiedy wykryto obecność NDMA w walsartanie, leku z grupy inhibitorów konwertazy angiotensyny (inhibitor ACE) stosowanych w terapii nadciśnienia tętniczego, zwanych sartanami. Doprowadziło to do wycofania niektórych produktów, dokonania kontroli procesów technologicznych wytwarzania substancji czynnych i produktów leczniczych oraz przeglądu i aktualizacji przepisów regulujących kontrolę NA. Konsekwencją tych działań było ustanowienie nowych wytycznych, a także kontrola i analiza ryzyka powstawania NA w innych substancjach czynnych. Wynikiem tych analiz było wykrycie podobnych zanieczyszczeń w lekach stosowanych w leczeniu zgagi i wrzodów żołądka (ranitydyna) oraz w terapii cukrzycy (metformina). Okazało się więc, że nowe wytyczne nie będą obejmowały tylko sartanów, ale będą dotyczyły szerszej grupy leków. Na podstawie rozporządzenia⁷⁾, w celu zapewnienia posiadaczom pozwoleń na dopuszczenie do obrotu, udzielono wskazówek dotyczących działań kontrolnych. We wrześniu 2019 r. Europejska Agencja Leków (EMA) rozpoczęła przegląd i zmiany wytycznych odnośnie do dopuszczalnych limitów

dla nitrozoamin. Limity te w lekach zostały ustalone przy wykorzystaniu międzynarodowych norm, zgodnie z wytyczną ICH M7 (R1) (Międzynarodowej Rady Harmonizacji Wymagań Technicznych dla Rejestracji Produktów Leczniczych Stosowanych u Ludzi), na podstawie ekspozycji na NA przez całe życie. W tabeli 1 przedstawiono całkowity dzienny limit dla 6 nitrozoamin⁸⁾.

Table 1. Acceptable intake limits for NDMA, NDEA, NMBA, NMPA, NIPEA and NDIPA in drug products

Tabela 1. Dopuszczalne dzienne spożycie wybranych *N*-nitrozoamin w produktach leczniczych

<i>N</i> -Nitrozoamina	Dopuszczalne dzienne spożycie (AI), ng/dzień
NDMA	96,0
NDEA	26,5
NMBA	96,0
NMPA	26,5
NIPEA	26,5
NDIPA	26,5

Biorąc pod uwagę zakres tego problemu oraz ze względu na znaczenie toksykologiczne i szersze spektrum możliwych substancji czynnych, API (*active pharmaceutical ingredient*), które mogą zawierać NA jako zanieczyszczenia, zaproponowano opracowanie i włączenie ogólnego testu dla NA do przyszłych wydań farmakopei. Obecnie taka monografia jest w przygotowaniu⁹⁾. Dlatego zaleca się również ocenę zawartości NA we wszystkich syntetycznych substancjach czynnych^{3, 8)}. W ramach przeglądu wytycznych oraz zważywszy na znaczenie problemu, EMA zwróciła się do posiadaczy pozwoleń na dopuszczenie do obrotu leków o dokonanie przeglądu swoich produktów leczniczych pod kątem możliwej obecności NA i przetestowanie wszystkich podejrzanych surowców i leków. Przegląd procesów produkcyjnych w celu zidentyfikowania i w razie potrzeby zmniejszenia ryzyka obecności NA powinien obejmować: (i) ocenę ryzyka w celu zidentyfikowania substancji czynnych i produktów gotowych zagrożonych tworzeniem się NA np. jako zanieczyszczeń krzyżowych; wyniki należało podać najpóźniej do 1 października 2020 r.; (ii) badania analityczne substancji czynnych i produktów leczniczych, które mogą być narażone na tworzenie NA i zgłoszenie potwierdzonej obecności NA do urzędów rejestracyjnych i odbiorców oraz (iii) wprowadzenie, jeśli zasadne, zmian w procesie produkcyjnym oraz kontroli zawartości NA czuły, zwalidowanymi metodami analitycznymi, stosując się do ustanowionych wytycznych regulacyjnych.

EMA narzuca zakończenie tych przeglądów do 26 września 2022 r. Efekty widoczne są już teraz, ponieważ po przeprowadzeniu analizy ryzyka powstawania NA zostały wprowadzone nowe metody



Mgr Magdalena GLICE w roku 1980 ukończyła studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. W Sieci Badawczej Łukasiewicz w Instytutach Farmaceutycznym, a obecnie w Instytucie Chemii Przemysłowej im. prof. Ignacego Mościckiego pracuje od 1980 r., obecnie na stanowisku głównego specjalisty, pełniąc funkcję kierownika Zespołu Rejestracji oraz Osoby Wykwalifikowanej. Specjalność – spektroskopia w podczerwieni, rejestracja produktów leczniczych.



Dr Elżbieta U. STOLARCZYK w roku 2000 ukończyła studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Stopień doktora nauk farmaceutycznych uzyskała w roku 2009 na Wydziale Farmaceutycznym Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Od 2019 r. jest zatrudniona na stanowisku głównego specjalisty w Sieci Badawczej Łukasiewicz – Instytucie Chemii Przemysłowej im. prof. Ignacego Mościckiego w Zespole Analityki Badawczej. W latach 2000–2019 pracowała w Sieci Badawczej Łukasiewicz – Instytucie Farmaceutycznym jako adiunkt w Zakładzie Analityki Badawczej. Specjalność – analityka substancji farmaceutycznych ze szczególnym uwzględnieniem metod chromatograficznych i spektrometrii mas, nanotechnologia.

* Autor do korespondencji:

Zakład Analityczny, Sieć Badawcza Łukasiewicz – Instytut Chemii Przemysłowej, ul. Rydygiera 8, 01-793 Warszawa, tel. (+48 22) 568-25-81, e-mail: e.stolarczyk@ifarm.eu

Ostatni element analizy ryzyka obejmuje ocenę możliwości bezpośredniej kontaminacji z aparatury, opakowań lub pomieszczeń. Najbezpieczniejsza pod tym względem jest aparatura szklana, emaliowana lub ze stali kwasoodpornej. Ponadto części wymienne, które mają kontakt z substancją, wykonane z teflonu są bezpieczniejsze niż te z gumy, która może zawierać NA²²⁾. Dlatego w celu minimalizacji ryzyka powstania NA należy prowadzić procesy otrzymywania substancji czynnych zgodnie z zasadami GMP, w odpowiednio przystosowanych pomieszczeniach produkcyjnych, na kwalifikowanej aparaturze dopuszczonej do przemysłu farmaceutycznego, z odpowiednimi procedurami mycia, które podlegają walidacji. Dzięki temu ogranicza się możliwości zanieczyszczenia procesu *N*-nitrozoaminami z aparatury i pomieszczeń, ale również ze środowiska, np. z gleby²³⁾ lub ze ścieków.

Biorąc pod uwagę ustalenia wynikające z przeprowadzonej analizy ryzyka, należy ustalić również adekwatną strategię kontroli oraz, jeśli to zasadne, dodać do specyfikacji substancji czynnej lub produktu leczniczego wymagania dotyczące oznaczania NA z docelową wartością graniczną. Limit nie może być jednak wyższy niż dopuszczalna wartość graniczna wynikająca z oceny toksykologicznej rekomendowanej przez ICH. Obecnie wynikiem takich analiz ryzyka jest poszerzony, przede wszystkim na sartany, zakres kontroli NA. Procedury ICH obejmują wszystkie produkty lecznicze zawierające kandesartan, irbesartan, losartan, olmesartan i walsartan. Dyskusja na temat NDMA jako zanieczyszczenia API obejmuje również inne leki, ponieważ możliwe jest powstawanie tej nitrozoaminy również w wyniku utleniania. Dlatego, nawet jeżeli w wyniku analizy ryzyka wykluczy się możliwość tworzenia NA podczas syntezy, to mogą być one zanieczyszczeniami degradacyjnymi leków zawierających

azot w strukturze. Powstawanie NDMA w wyniku utleniania stwierdzono w następujących lekach: aminopirymidyna, amitriptylina, chloramfenicol, chlorpromazyna, diphenhydramine, doksyloamina, erytromycyna, imipramina, metapiryle, oksytetracyklina, promazyna, propoksyfen, trimipramina, tetracyklina. Prekursorami NDMA mogą być również: azytromycyna, karbinoksamina, chlorfenamina, chlorotetracyklina, klarytromycyna, diltiazem, escitalopram, meropenem, metformina, minocyklina, nizatydyna, oleandomycyna, chinuprystyna, roksytromycyna, spiramycyna, ranitydyna, sumatryptan, tramadol, wenlafaksyna. Doniesiono⁸⁾ o kolejnych związkach jako znanych lub podejrzewanych prekursorach NDMA; należą do nich aminopiramina, amitriptylina, azytromycyna, chlorek benzalkoniowy, karbinoksamina, chloramfenikol, chlorfenamina (chlorfeniramina), chlorpromazyna, chlorpromiksen, chlortetracyklina, citalopram, klarytromycyna, klo-mipramina, dimenhydrat, diltiazem, *N,N*-dietylotoluamid (DEET), difenhydramina, doksepina, doksyloamina, erytromycyna, escitalopram, imipramina, meropenem, metylenon, metylometyl, metyloamina, metamforyna, chlorek metylenu, mifepriston, minocyklina, nizatydyna, oleandomycyna, oksytetracyklina, piramidon (dimetyloaminofenazon), promazyna, propoksyfen, chinuprystyna, ranitydyna, roksytromycyna, spiramycyna, sumatryptan, trimipramina, tetracyklina, tramadolina i tetracyklina.

Metody analityczne oznaczania nitrozoamin

Ze względu na wysoką toksyczność oraz negatywne oddziaływanie NA na środowisko i zdrowie, zasadne jest opracowanie metod analitycznych, które umożliwiają oznaczenie tych związków na

Table 2. High performance liquid chromatography for the determination of NOCs in active ingredients and drug products

Tabela 2. Wysokosprawna chromatografia cieczowa w zastosowaniu do oznaczania NA w substancjach aktywnych i produktach leczniczych

Kolumna	Warunki HPLC	LOD/LOQ*, ppb	Próbka/nitrozoamina	Literatura
Luna C8 (150 mm × 2 mm; 5 µm)	elucja gradientowa, faza A: 0,1% HCOOH w wodzie, faza B: 0,1% HCOOH w MeOH, przepływ: 0,4 mL/min, detekcja MS: tryb MRM, źródło jonów: APCI	8,6/28,6	losartan potasu/NMBA	29
XTerra MS C18 (100 mm × 3 mm; 3,5 µm)	elucja gradientowa, faza A: woda, faza B: MeOH, przepływ: 0,4 mL/min, detekcja MS: tryb MRM, źródło jonów: APCI	NDMA 24–148/79–492; NDEA 6–45/19,5–149	losartan potasu, irbesartan, walsartan i produkty lecznicze/NDMA, NDEA	30
Waters HSS-T3 (100 mm × 3 mm; 1,8 µm)	elucja gradientowa, faza A: 0,1% HCOOH w wodzie, faza B: MeOH, detekcja MS: tryb MRM, źródło jonów: APCI	NDMA 50–100/100–200; NDEA 20–40/40–80	irbesartan, losartan, kandesartan, olmesartan i produkty lecznicze/ NDMA, NDEA	31
Waters HSS-T3 (100 mm × 3 mm; 1,8 µm)	elucja gradientowa, faza A: 0,1% HCOOH w wodzie, faza B: MeOH, detekcja MS: tryb MRM, źródło jonów: APCI	80/200	walsartan i produkty lecznicze/NDMA	32
Intersil ODS-3 (250 mm × 4,6 mm; 5 µm)	elucja gradientowa, faza A: H ₂ O: MeOH (8:2 obj.), faza B: H ₂ O: MeOH (25:75 obj.), przepływ: 1 mL/min, detekcja UV: 228 nm	brak danych	walsartan i produkty lecznicze/NDMA	33
Waters HSS-T3 (100 mm × 3 mm; 1,8 µm)	elucja gradientowa, faza A: 0,1% HCOOH w wodzie, faza B: MeOH, detekcja MS: tryb MRM, źródło jonów: APCI	50/120	ranitydyna i produkty lecznicze/NDMA	34

Kolumna	Warunki HPLC	LOD/LOQ*, ppb	Próbka/nitrozoamina	Literatura
Kinetex F5 (100 mm × 4,6 mm; 2,6 μm)	elucja gradientowa, faza A: 0,1% HCOOH w wodzie, faza B: 0,1% HCOOH w MeOH, przepływ: 0,6 mL/min, detekcja HRMS: tryb MRM	NDMA 5/50; NDEA 16/50; NEIPA 3/50; NDIPA 8/50; NDBA 5/50; NMBA 10/50	losartan, walsartan/NDMA, NDEA, NEIPA, NDIPA, NDBA, NMBA	35
Zorbax Eclipse Plus C18 (100 mm × 3 mm; 1,8 μm)	elucja gradientowa, faza A: 0,1% HCOOH w wodzie, faza B: MeOH, przepływ: 0,5 mL/min detekcja MS: tryb MRM, źródło jonów: APCI	NDMA 0,02/0,05; NDEA 0,005/0,01	produkty lecznicze z walsartanem i irbesartanem/NDMA, NDEA	36
Inertsil ODS-3 (150 mm × 4,6 mm; 5 μm)	elucja gradientowa, faza A: 0,1% HCOOH w wodzie, faza B: MeOH, przepływ: 1 mL/min temp. kolumny: 30°C, detekcja UV: 235nm	8,5/28,5	walsartan i produkty lecznicze/NDMA	37
Gemini C18 (150 mm × 4,6 mm; 5 μm)	elucja gradientowa, faza A: 0,1% HCOOH w wodzie, faza B: 0,1% HCOOH w MeOH, przepływ: 0,35 mL/min, detekcja HRMS: tryb SIM, źródło jonów: ESI	LOD: NDMA 4,5; NDEA, NMBA, NEIPA, NDIPA, NDBA 1	produkty lecznicze z sartanami/NDMA, NDEA, NMBA, NEIPA, NDIPA, NDBA	38
XSelect CSH C18 (150 mm × 3,0 mm; 2,5 μm)	elucja gradientowa, faza A: 0,1% HCOOH w wodzie, faza B: 0,1% HCOOH w MeOH, przepływ: 0,3–0,75 mL/min, detekcja MS: tryb PRM, źródło jonów: HRMS	10/30	metformina i produkty lecznicze z metforminą/ NDMA	39
XSelect HSS T3 (150 mm × 3 mm; 3,5 μm)	elucja gradientowa, faza A: 0,1% HCOOH w wodzie, faza B: 0,1% HCOOH w ACN/ MeOH (2/8 obj.), przepływ: 0,6 mL/min, detekcja MS: tryb MRM, źródło jonów: APCI	dla wszystkich analitów 20/50	sartany i produkty lecznicze/ NDMA, NDEA, NDPA, NEIPA, NDIPA, NDELA, NMOR, NPYR, NPIP, NDiPLA, NMBA, NMEA	40
XSelect HSS T3 (100 mm × 4,6 mm; 3,5 μm)	elucja gradientowa, faza A: 0,02% HCOOH w wodzie, faza B: ACN, przepływ: 1 mL/min, detekcja UV: 245nm detekcja MS: tryb SIM, źródło jonów: ESI	LOQ (UV) NDMA, NDEA, NDIPA 10, NMBA, NEIPA, NDBA 20	walsartan i produkty lecznicze/NDMA, NMBA, NDEA, NEIPA, NDIPA, NDBA; ranitydyna/NDMA	41
Viridis HSS C18 SB (100 mm × 3,0 mm; 1,8 μm)	elucja gradientowa, faza A: CO ₂ , faza B: MeOH, przepływ: 1,5 mL/min, detekcja UV: 230 nm, detekcja MS: tryb SRM, źródło jonów: ESI	LOD NDMA 4,55, NDEA 1,58, NMEA 1,81, NDPA 0,24, NDBA 0,34, NDPhA 0,22, NPYR 3,71, NPIP 2,26, NMOR 4,20	walsartan, losartan/NDMA, NDEA, NMEA, NDPA, NDBA, NDPhA, NPYR, NPIP, NMOR	42
Poroshell HPH C18 (100 mm × 2,1 mm; 1,9 μm)	elucja gradientowa, faza A: 0,2% HCOOH w wodzie, faza B: MeOH, przepływ: 0,4 mL/min, detekcja MS: tryb MRM, źródło jonów: APCI	NDMA, NMBA, NDBA 0,05/0,1, NDEA, NEIPA, NDIPA, NMIPA 0,025/0,05, NMEA, NPYR, NMPhA 0,075/0,1, NPIP 0,1/0,15	walsartan, losartan, irbesartan/NDMA, NDEA, NMBA, NEIPA, NDIPA, NDBA, NMEA, NPYR, NPIP, NMPhA, NMIPA	43

MRM (*multiple reaction monitoring*) – tryb monitorowania wybranych produktów reakcji fragmentacji; APCI – jonizacja chemiczna pod ciśnieniem atmosferycznym; HRMS – wysokorozdzielcza spektroskopia mas; *LOD (granica wykrywalności)/LOQ (granica oznaczalności)

Table 3. High performance and ultra performance liquid chromatography for the determination of NOCs in cosmetics, food and water

Tabela 3. Wysokosprawną i ultrasprawną chromatografię cieczową w zastosowaniu do oznaczania NA w produktach kosmetycznych, żywności i wodzie

Kolumna	Warunki HPLC/UHPLC	LOD/LOQ*, ppb	Próbka/nitrozoamina	Literatura
Symmetry C18 (100 mm × 4,6 mm; 5 μm)	elucja gradientowa, faza A: 10 mM NH ₄ OH pH 8,9, faza B: ACN, przepływ: 1 mL/min, detekcja UV	NDMA 480/1616, NDEA 610/2029, NDPA 330/1097, NDBA 460/1550, NPIP 300/1011, NPYR 530/1775, NMEA – brak danych	mięso/NDMA, NMEA, NDEA, NDPA, NDBA, NPIP, NPYR	44
Purospher STAR RP-18 C18 (125 mm × 4 mm; 5 μm)	elucja gradientowa, faza A: 0,1% HCOOH w wodzie, faza B: 0,1% HCOOH w MeOH, przepływ: 0,5 mL/min, detekcja MS: tryb SIM, źródło jonów ESI	NDMA, NMEA 0,7/2, NDEA 1,0/3, NMOR 0,06/0,2, NDELA 0,04/0,12, NPIP 0,2/0,8, NPYR 0,05/0,2	kosmetyki/NDMA, NMEA, NDEA, NMOR, NDELA, NPIP, NPYR	45
Acquity HSS-T3 (100 mm × 2,1 mm; 1,7 μm)	elucja gradientowa, faza A: 0,1% HCOOH w wodzie, faza B: 0,1% HCOOH w MeOH, przepływ: 0,3 mL/min, detekcja MS: tryb MRM, źródło jonów: APCI	brak danych	kosmetyki i środki ochrony osobistej/NDMA, NDEA, NDPA, NDELA, NDBA, NDPYR, NDPIP, NMOR	46
Atlantis T3 C18 (100 mm × 4,6 mm; 5 μm)	elucja gradientowa, faza A: 0,01% HCOOH w wodzie, faza B: 0,01% HCOOH w ACN, przepływ: 0,8 mL/min, detekcja MS: tryb MRM, źródło jonów: APCI	NDMA, NMOR, NPYR, NPIP 0,002/0,01, NMEA 0,005/0,01, NDEA, NDPA 0,001/0,01, NDBA 0,008/0,01	woda pitna/NDMA, NMOR, NMEA, NPYR, NDEA, NPIP, NDPA, NDBA	27
Kinetex C8 (100 mm × 3,0 mm; 2,6 μm)	elucja gradientowa, faza A: 10 mM CH ₃ COONH ₄ i 0,01% CH ₃ COOH w wodzie, faza B: MeOH, przepływ: 0,3 mL/min, detekcja MS: tryb MRM, źródło jonów: ESI	LOD: NDMA 0,25, NMEA 0,27, NPYR 0,72, NDEA 2,06, NPIP 0,78, NMOR 0,17, NDPA 0,26, NDBA 0,14, NDPhA, NAT 0,002, NNN, NAB 0,001, NNK 0,003, NNAL 0,006	woda pitna/NDMA, NMEA, NPYR, NDEA, NPIP, NMOR, NDPA, NDBA, NDPhA, NNN, NAB, NAT, NNK, NNAL	47
Hypersil BDS C18 (200 mm × 4,6 mm; 5 μm)	elucja gradientowa, faza A: 5% ACN w wodzie, faza B: ACN, przepływ: 1 mL/min, detekcja FLD (derywatyzacja), detekcja MS: identyfikacja, źródło jonów: APCI	LOD NPYR 0,0014, NDEA 0,0025, NDPA 0,0013, NDBA 0,0024	żywność/NPYR, NDEA, NDPA, NDBA	28
InertSustain AQ C18 (250 mm × 4,6 mm; 5 μm)	elucja gradientowa, faza: 1 mM bufor fosforanowy z 5% MeOH w wodzie (pH = 6,9), przepływ: 1,5 mL/min, faza: roztwór 0,5 M węglanu i 0,05 mM luminolu (pH = 10), przepływ: 0,5 mL/min, detekcja CL (chemiluminescencja)	brak danych	woda/NDMA, NDEA, NPYR, NDPA, NMOR	48
Hypersil Gold C18 (100 mm × 2,1 mm; 1,9 μm)	elucja gradientowa, faza A: 0,1% HCOOH w wodzie, faza B: ACN, przepływ: 1 mL/min, detekcja MS: źródło jonów: HESI	NDMA 0,2/0,5, NMEA 0,4/1,0, NPYR 0,05/0,2, NDEA 0,15/0,5, NPIP 0,015/0,05, NMOR 0,05/0,2, NDPA, NDBA, NDPhA 0,01/0,05	woda/NPYR, NDEA, NPIP, NMOR, NDPA, NDBA, NDPhA, NDMA, NMEA, NDEA	49

* LOD (granica wykrywalności)/LOQ (granica oznaczalności)

niskich poziomach stężeń. Metody chromatograficzne w połączeniu z odpowiednimi technikami izolacji lub/i wzbogacania analitów mogą zapewnić niskie granice wykrywalności. Do tego celu wykorzystuje się przede wszystkim chromatografię gazową (GC), wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC), a także elektroforezę kapilarną (CE). Oznaczanie NA stwarza wiele problemów ze względu na charakterystyczne właściwości fizykochemiczne, takie jak zasadowość charakter, wysoka polarność, wysoka lotność i rozpuszczalność w wodzie. Ponadto rygorystyczne wymagania dotyczące NA powodują konieczność opracowania bardzo czułych, specyficznych i selektywnych metod analitycznych.

Jedną z technik separacyjnych stosowaną w oznaczaniu NA, zarówno w substancjach farmaceutycznych (walsartan, ranitydyna, metformina), produktach leczniczych, produktach kosmetycznych, żywności, jak i w wodzie jest chromatografia cieczowa (HPLC). W literaturze opisane są w większości metody HPLC z zastosowaniem kolumn o niepolarniej fazie stacjonarnej (powierzchnia żelu krzemionkowego połączona z łańcuchami węglowodorowymi o osiemnastu atomach węgla, C18). Do analizy produktów leczniczych opisano również metody z zastosowaniem kolumn HSS T3, zaprojektowanych w celu zatrzymywania bardzo polarnych związków przez fazę ruchomą o dużej zawartości wody. W opisywanych metodach do rozdzielania NA stosowano elucję gradientową z faz ruchomych, składających się z wody, częściej jednak z dodatkiem kwasu mrówkowego oraz acetonitrylu lub metanolu. Do analizy NA stosowano detekcję fluorescencyjną²⁴), spektrofotometryczną lub detekcję z zastosowaniem spektrometrii mas (MS)^{25, 26}). Ostatnie doniesienia literaturowe wykazują, że NA absorbują światło w niskim zakresie UV i zastosowanie dodatków organicznych do fazy ruchomej może tłumić sygnał i zmniejszać czułość metody, a zastosowanie detekcji MS, pomimo droższej eksploatacji, pozwala opracować metody zdecydowanie bardziej czułe i specyficzne. Szczególnie istotne jest to przy analizach bardzo złożonych matryc, takich jak produkty lecznicze, kosmetyki i żywność. Poza tym detekcja MS pozwala jednocześnie na identyfikację analitu poprzez analizę widma fragmentacyjnego.

Do jonizacji NA stosowano jonizację chemiczną pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI), jak również jonizację przez elektrorozpraszanie (ESI). Wybór trybu jonizacji został dokładnie zbadany w przypadku NA oznaczanych w próbkach żywności i wody^{27, 28}) i zależy od wielu czynników, takich jak rodzaj badanej matrycy, zastosowana kolumna i skład fazy ruchomej.

Zestawienie metod HPLC do oznaczania NA w substancjach farmaceutycznych i produktach leczniczych dla LOD (granicy wykrywalności) i LOQ (granicy oznaczalności) przedstawiono w tabeli 2, a w tabeli 3 zestawiono metody z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej w oznaczaniu NA w kosmetykach, żywności i wodzie.

W oznaczaniu NA za pomocą chromatografii gazowej w próbkach m.in. wody, ścieków, mięsa oraz leków wykorzystywane są zarówno detektory uniwersalne, jak i detektory selektywne. Najczęściej stosowane detektory uniwersalne wykorzystywane do różnorodnych analiz śladowych, zapewniające niskie granice wykrywalności to: spektrometr mas (MS), tandemowy spektrometr mas (MS/MS) oraz spektrometr mas typu kwadrupol-detektor czasu przelotu (Q-TOF)^{6, 50}). Wśród detektorów selektywnych w literaturze^{3, 51, 52}) opisane są oznaczania za pomocą detektora azotowo-fosforowego (NPD), chemiluminescyjnego azotu (CLND) oraz wychwyty elektronów (ECD).

Od 2018 r. w przemyśle farmaceutycznym obserwuje się szybki rozwój metod chromatografii gazowej do oznaczania NA, oparty w szczególności na spektrometrach mas, zapoczątkowany wykryciem NA w lekach z grupy sartanów. W 2019 r. FDA opublikowała metodę *headspace* (HS) GC-MS/MS do oznaczeń czterech NA (NDMA, NDEA, NEIPA oraz NDIPA) w próbkach walsartanu, dla której LOD wynosiło 0,01–0,025 ppm, a LOQ 0,05 ppm⁵³). Równolegle inne organizacje, takie jak Farmakopea Europejska Ph. Eur. (*Pharmeuropa* 32.2.⁹) i amerykańska USP⁵⁴) wydały rekomendację użycia metod z zastosowaniem m.in. GC-MS/MS oraz HS-GC/MS do oznaczeń NA w lekach.

Parr i Joseph⁵⁵) omawiają metody chromatografii gazowej (GC) w oznaczeniach walsartanu oraz innych substancjach czynnych, zwracając szczególną uwagę na wpływ matrycy, sposób przygotowania próbki oraz typ jonizacji, jakim związki mogą być poddane na określonym poziomie wykrywalności NA. Spośród wielu metod przygotowania próbek zawierających NA najpowszechniej stosowane są: ekstrakcja do fazy stałej (SPE), mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej (SPME), ekstrakcja ciecz-ciecz (LLE) oraz destylacja. W najnowszej pracy Giménez-Campillo i współpr.⁵⁶) wykazują wysoką czułość oznaczania NA w ranitydynie za pomocą dyspersyjnej mikroekstrakcji ciecz-ciecz (DLLME) sprzężonej z GC-MS. Otrzymane poziomy LOQ dla opracowanej metody (NDMA 0,021 µg/g, NDEA 0,011 µg/g oraz NDPA 0,0011 µg/g) są niższe od wyników otrzymanych z zastosowaniem metod LC-MS/MS i LC-HRMS, zaproponowanych przez FDA.

Zastosowanie GC/MS w warunkach jonizacji elektronowej (EI) oraz dodatknej jonizacji chemicznej (PCI) jest najczęstsze w analizach zawartości/identyfikacji NA⁵⁷). Dowiedziono także, że wykorzystanie dodatknej jonizacji chemicznej umożliwia otrzymanie lepszej specyficzności w analizach NA, a także często zapewnia większą czułość metody odpowiednią do osiągnięcia limitów detekcji w analizach wody⁵⁸). Jest to istotne, gdyż przemysł farmaceutyczny, a także spożywczy i rafineryjny⁵⁹) są źródłami obecności NA w wodzie i ściekach.

Wymagania dotyczące zawartości NA w wodzie pitnej określone są przez różne kraje w dyrektywach/regulacjach⁴), limit dla NDMA w większości krajów wynosi 10 ng/L. Metody analityczne oparte na detektorach selektywnych GC-NPD i GC-CLND są najczęściej stosowane w analizach ścieków^{52, 60}), w których dopuszczalne stężenie NA jest na wyższym poziomie. Do analiz wody pitnej najpowszechniej stosowane są aparaty GC połączone ze spektrometrami MS oraz MS/MS⁶¹). Połączenie GC/MS z techniką ekstrakcji SPME pozwala na osiągnięcie wartości LOQ na poziomie 0,1–0,8 ng/L w analizach wody pitnej oraz piwa⁶²). Ekstrakcja SPME w połączeniu z HS-GC/MS jest także wykorzystywana w analizach czerwonego mięsa i pozwala na równoczesne oznaczenie zawartości dziewięciu NA (NDMA, NMEA, NDEA, NDPA, NDPA, NPIP, NPYR, NMOR, NDPheA) w badanych próbkach na poziomie LOD w granicach 1,45–3,15 µg/L⁶²).

Obecne trendy oznaczania NA za pomocą GC dążą do opracowywania metod nie tylko selektywnych, taniach oraz efektywnych, ale także przyjaznych środowisku, czego przykładem jest praca Huang i współpr.⁶³), która pokazuje wykorzystanie jonizacji chemicznej GC-CI/MS w połączeniu z ekstrakcją wspomaganą mikrofalami (MAE) oraz D-µ-SPE (mikrosprężona ekstrakcja do fazy stałej) (LOD na poziomie 0,01–0,12 ng/g). Zestawienie metod GC do oznaczania NA przedstawiono w tabeli 4.

Podsumowanie i wnioski

Do czasu przypadkowego zidentyfikowania nitrozoaminy NDMA w walsartanie nie były prowadzone badania w kierunku celowanego wykrywania obecności tych NA w lekach. Ich śladowa zawartość kwalifikowała NA, o ile były wykrywane przez metodę badawczą, jako pojedyncze nieznane zanieczyszczenie, spełniające wymagania ICH. Sytuacja zmieniła się, gdy zidentyfikowano jedno z tych zanieczyszczeń i okazało się, że jego toksyczność jest znana i bardzo wysoka. Dlatego wprowadzono wiele wymagań, które miały wprowadzić monitoring obecności NA w substancjach aktywnych oraz produktach leczniczych i ustalić dla NA bezpieczne limity dobowego spożycia. Po wykryciu NA w grupie sartanów, a następnie w kolejnych grupach leków (m.in. metforminie, ranitydynie, nizatydynie) władze rejestracyjne na całym świecie zaleciły ocenę zawartości NA we wszystkich syntetycznych substancjach czynnych⁵⁸). Dotychczasowe rekomendacje dotyczące limitów wydawane przez EMA uwzględniają maksymalną dawkę leku zażywane przez pacjentów dziennie i zestawiają margines bezpieczeństwa dla ewentualnych NA, mogących dostawać się do organizmu pacjenta wraz ze spożywaną żywnością i wodą. Dlatego bardzo istotne są również próby identyfikacji mechanizmów powstawania N-nitrozoamin.

Table 4. Gas chromatography for determination of NOCs in active pharmaceutical ingredient, drug product, cosmetics, food and water

Tabela 4. Chromatografia gazowa w oznaczaniu nitrozoamin w substancji aktywnej, produktach leczniczych, kosmetycznych, żywności i wodzie

Kolumna	Warunki GC	LOD/LOQ*, ppb	Próbka/nitrozoamina	Literatura
DB-624 (30 m × 0,25 mm; 1,4 μm)	SPME-GC/MS, program temp.: 45°C 2 min, 10°C/min → 90°C (1 min), 15°C/min → 200°C (12 min), 20°C/min → 230°C (1 min); detekcja MS (PCI): tryb SIM	LOQ woda: NDMA 0,0021; NDEA, NMEA 0,0006; NDPA 0,0009; NPYR, NDBA 0,002; NPIP 0,0017; LOQ piwo: NDMA 0,0401; NDEA 0,028; NMEA 0,0309; NDPA 0,020; NPYR 0,0404; NPIP 0,025; NDBA 0,0524	woda i piwo/NDMA, NDEA, NMEA, NDPA, NPYR, NPIP, NDBA	50
DB-1701 (30 m × 0,25 mm; 0,25 μm)	GC-CI/MS, program temp.: 35°C 5,5 min, 15°C/min → 155°C, 40°C/min → 240°C (10 min); detekcja MS (CI)	brak danych	kosmetyki, farmaceutyki/ NDMA, NDEA	6
DB-1701 (30 m × 0,32 mm; 1,0 μm) Supelcowax 10 (60 m × 0,32 mm; 0,25 μm)	GC-NPD, GC-NCD; SPE, CLLE, dozownik: 220°C DB-1701, program temp.: 40°C (1 min), 7°C/min → 150°C/min (3 min), 25°C/min → 250°C (2 min); Supelcowax 1 program temp.: 40°C (1 min), 10°C/min → 250°C/min (5 min)	brak danych (IDL)	woda/NDMA, NMEA, NDEA, NDPA, NMOR, NPYR, NPIP, NDBA	52
DB-Wax GC (30 m × 0,25 mm; 0,5 μm)	GC-MS/MS, program temp.: 70°C 4 min, 20°C/min → 240°C (3,5 min); detekcja MS: tryb SIM	NDMA, NDEA NDIPA, NEIPA 50/25	walsartan (API, produkt leczniczy)/NDMA NDEA, NDIPA, NEIPA	53
Kwarcowa kolumna kapilarna z fazą G16 (30 m × 0,32 mm; 1,0 μm)	HS-GC/MS, program temp.: 45°C 3 min, 10°C/min → 130°C (3 min), 130°C/min → 15°C, 40°C/min, 190°C → 240°C (10 min); detekcja MS (EI): tryb MRM	brak danych	sartany/NDMA, NDEA, NDIPA, NEIPA	54
Kwarcowa kolumna kapilarna z fazą G16 (30 m × 0,25 mm; 1,0 μm)	GC-MS/MS, program temp.: 40°C 0,5 min, 20°C/min → 200°C, 60°C/min → 250°C (3 min); detekcja MS (EI): tryb MRM	brak danych	sartany/NDMA, NDEA, NDIPA, NEIPA, NDBA	54
HP-5MS UI (30 m × 0,25 mm; 0,25 μm)	DLLME-GC/MS, program temp: 50°C 3 min, 20°C/min → 80°C (2 min), 5°C/min → 100°C (2 min), 35°C/min → 280°C (2,36 min); MS (EI): SIM	NDBA 0,35/1,1; NDEA 0,29/0,9; NDMA 6,6/21; NDPhA 0,07/0,21; NDPA 0,37/1,1; NMEA 3,5/11; NMOR 5,3/17; NPIIP 0,47/1,6; NPYR 2,5/8,4	ranitydyna/NDBA, NDEA, NDMA, NDPhA, NDPA, NMEA, NMOR, NPIP, NPYR	56
RTx-5 SIL MS (30 m × 0,25 mm; 1,0 μm)	SPE-GC-MS/MS, program temp: 40°C 3 min, 4°C/min → 130°C, 15°C/min → 220°C; MS (CI)	brak danych (MDL)	woda/NDMA, NDEA, NMEA, NDPA, NPYR, NMOR, NPIP, NDBA	57

Kolumna	Warunki GC	LOD/LOQ*, ppb	Próbka/nitrozoamina	Literatura
VF-17 ms (30 m × 0,25 mm; 0,25 μm)	GC-MS/MS, program temp.: 40°C 1 min, 5°C/min → 80°C, 20°C/min → 280°C (3 min); detekcja MS (PCI): tryb MRM	NDMA 0,0001/0,0004; NMEA 0,0004/0,0013; NDEA 0,001/0,0032; NDPA 0,0009/0,0029; NPYR 0,0004/0,0013; NPIP 0,0005/0,0015; NMOR 0,001/0,0033; NDBA 0,0009/0,0029	ścieki/NDMA, NMEA, NDEA, NDPA, NPYR, NPIP, NMOR, NDBA	58
DB-WAX (30 m × 0,25 mm; 0,25 μm)	HS-SPME-GC/MS, program temp.: 50°C 4 min, 10°C/min → 145°C (6 min), 10°C/min → 160°C (3 min), 10°C/min → 200°C (3 min); detekcja MS (EI)	NDMA 3,15/10,50; NMEA 1,65/5,50; NDEA 2,14/7,13; NDPA 1,97/6,57; NPYR 1,99/6,63; NPIP 2,75/9,17; NMOR 2,46/8,20; NDBA 2,84/9,47; NDPheA 1,45/4,83	czerwone mięso/NDMA, NMEA, NDEA, NDPA, NPYR, NPIP, NMOR, NDBA, NDPheA	62
DB-5MS (30 m × 0,25 mm; 1,0 μm)	D-μ-SPE-GC/MS, program temp.: 40°C 2 min, 6°C/min → 100°C (6 min), 30°C/min → 230°C (1 min); detekcja MS (CI): tryb SIS	NDMA 0,12/0,36; NDPA, NPIP 0,03/0,09; NDBA 0,01/0,03; NPYR NMEA, NDEA 0,06/0,18	produkty mięsne/NDMA, NPYR, NDPA, NPIP, NDBA, NMEA, NDEA	63
VF-624 MS (30 m × 0,25 mm; 1,4 μm)	GC/MS, program temp.: 40°C 0,5 min, 0,5–7,0 min 40°C → 170°C, 7–10,7 min 170°C → 280°C, 10,7–17,0 min 280°C; detekcja MS (EI): tryb SIM	brak danych	walsartan, losartan, olmesartan, candesartan, irbesartan/NDMA, NEMA, NDEA	9
VF-624 MS (30 m × 0,25 mm; 1,4 μm)	GC-MS/MS, program temp.: 40°C 0,5 min, 0,5–2,2 min 40°C → 140°C (2 min), 4,2–6,2 min 140°C → 180°C (0,5 min), 6,7–8,7 min 180°C → 240°C (1,8 min), 10,5–11,5 min 240°C → 280°C (2,5 min); detekcja MS: tryb MRM	brak danych	walsartan, losartan, olmesartan, candesartan, irbesartan/NDMA, NDEA, NDBA, NDIPA, NEiPA, NDPA	9

* LOD (granica wykrywalności)/LOQ (granica oznaczalności), GC-NCD – chromatografia gazowa połączona z azotowym detektorem chemiluminescencyjnym

W związku z wprowadzonymi regulacjami powstała konieczność opracowania i zvalidowania czułych metod analitycznych do oznaczania zawartości *N*-nitrozoamin. Zastosowanie detektorów MS i MS/MS w chromatografii cieczowej i gazowej pozwoliło na opracowanie czułych metod, które pozwalają oznaczać niektóre NA na bardzo niskim poziomie. Ale pomimo zastosowania tak czułego i specyficznego detektora, nie zawsze udaje się przeprowadzić oznaczenie bez odpowiednich technik wyodrębniania i wzbogacania analitów, w celu zwiększenia czułości metod oznaczania. Z uwagi na różnorodność matryc, w których oznaczane są NA jest to poważny problem analityczny, którego rozwiązanie jest wyzwaniem dla przemysłu farmaceutycznego i chemicznego.

Podziękowania

Praca została sfinansowana ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 841343.

Otrzymano: 10-12-2020

LITERATURA

- [1] J.G. Sebranek, R.G. Cassens, *J. Milk Food Technol.* 1973, **36**, 76.
- [2] World Health Organization, Update on Nitrosamine Impurities, 2019.
- [3] P. Makoś, G. Boczkaj, *Camera Separatoria* 2014, **6**, 73; http://dach.ich.uph.edu.pl/cs/download/cs_vol6_no2/cs_2014_73-86.pdf.
- [4] Raport WHO/HSE/AMR/08.03/8, *N-Nitrosodimethylamine in drinking water*, World Health Organization, 2008.
- [5] U.S. Environmental Protection Agency, *Technical Fact Sheet. N-Nitrosodimethylamine (NDMA)*, 2014.
- [6] R. Shen, S.A. Andrews, *Water Res.* 2011, **45**, 944.
- [7] Rozporządzenie (WE) nr 726/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 31 marca 2004 r. ustanawiające wspólnotowe procedury wydawania pozwoleń dla produktów leczniczych stosowanych u ludzi i do celów weterynaryjnych i nadzoru nad nimi oraz ustanawiające Europejską Agencję Leków, *Dz. U. UE L* 136/1.
- [8] EMA/369136/2020, European Medicines Agency, 2020; https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/nitrosamines-emea-h-a53-1490-assessment-report_en.pdf.
- [9] *Pharmeuropa* 32.2, 2020, 5.
- [10] P. Jakszyn, C.-A. Gonzalez, *World J. Gastroenterol.* 2006, **12**, 4296.
- [11] C. Wentrup, C. Mayor, J. Becker, H.J. Lindner, *Tetrahedron* 1985, **41**, 1601.
- [12] K. Rostkowska, K. Zwierz, A. Różański, J. Moniuszko-Jakoniuk, A. Roszczenko, *Polish J. Environ. Stud.* 1998, **7**, 321.
- [13] N. Kunisaki, M. Hayashi, *Appl. Environ. Microbiol.* 1979, **37**, 279.
- [14] Raport EMA/217823, European Medicines Agency, 31, 2019, https://www.ema.europa.eu/en/documents/variation-report/angiotensin-ii-receptor-antagonists-sartans-article-31-referral-chmp-assessment-report_en.pdf.
- [15] Raport EMA/CHMP/668547/2018, European Medicines Agency, 2018.
- [16] World Health Organization, *IARC Monographs programme on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man*, IARC international technical report 77/002, 1977.
- [17] S.H. Yalkowsky, Y. He, P. Jain, *Handbook of aqueous solubility data*, CRC Press, 2016.
- [18] Chempur, Karta charakterystyki substancji chemicznej – sodu azotyn, 2019.
- [19] J. Nawrocki, P. Andrzejewski, *J. Hazard. Mater.* 2011, **189**, 1.
- [20] N.J. Andrzejewski P. Kasprzyk-Hordern, H. Jelen, *Ochr. Środ.* 2007, **29**, 11.
- [21] S.W. Krasner, W.A. Mitch, D.L. McCurry, D. Hanigan, P. Westerhoff, *Water Res.* 2013, **47**, 4433.

- [22] L. Kleps, T. Pysklo, *Elastomery* 2001, **5**, 13.
- [23] W.C. Yang, J. Gan, W. P. Liu, R. Green, *J. Environ. Qual.* 2005, **34**, 336.
- [24] L. Cadenes, J.H. Ayala, V. González, A.M. Afonso, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2002, **25**, 977.
- [25] S. Lindahl, C.B. Gundersen, E. Lundanes, *Environ. Sci. Process. Impacts* 2014, **16**, 1825.
- [26] K.M. Shaik, B. Sarmah, G.S. Wadekar, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 2020, **1**.
- [27] C. Ripollés, E. Pitarch, J.V. Sancho, F.J. López, F. Hernández, *Anal. Chim. Acta* 2011, **702**, 62.
- [28] M. Zhao, G. Li, W. Kong, S. Lu, L. Xia, G. Chen, X. Zhao, Y. Wu, J. You, *Chromatographia* 2016, **79**, 431.
- [29] EDQM, *Losartan potassium. LC-MS/MS method*, https://www.edqm.eu/sites/default/files/de_lgl_losartan_method_parameters_nmba_lcms.pdf.
- [30] EDQM, *LC-MS/MS method for the determination of NDEA and NDMA in valsartan, irbesartan and losartan APIs and finished dosage forms*, https://www.edqm.eu/sites/default/files/medias/fichiers/Sartans/de-by-lc-ms_ls.pdf.
- [31] B. Gütsche, J. Schmalder-ripcke, *Method for the determination of NDMA and NDEA by LC-MS/MS in sartans (drug substance and film coated tablets)*, https://www.edqm.eu/sites/default/files/method_for_the_determination_of_ndma_and_nde_a_by_lc-msms_in_sartans_29-04-2019.pdf.
- [32] O. El-Atma, *Test method for the determination of NDMA by LC/MS/MS in valsartan finished products 1*, <https://www.edqm.eu/sites/default/files/omcl-method-determination-ndma-valsartan-cvua-september2018.pdf>.
- [33] French National Agency for Medicines and Health Products Safety, *Determination of NDMA in valsartan active substances and finished products by HPLC/UV*, <https://www.edqm.eu/sites/default/files/omcl-method-determination-ndma-valsartan-ansm-september2018.pdf>.
- [34] O. el-Atma, J. Schmalder-ripcke, C. Hannes, *Test method for the determination of NDMA by LC-MS/MS in ranitidine drug substance and film coated tablets*, EDQM, 2019, https://www.edqm.eu/sites/default/files/medias/fichiers/OMCL/omcl_cvua_karlsruhe_method_for_determination_of_nitrosamines_in_ranitidine_-_25102019.pdf.
- [35] U.S. Food & Drug Administration, *Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) method for the determination of six nitrosamine impurities in ARB drugs*, <https://www.fda.gov/media/125478/download>.
- [36] C. Sun, C. Lai, *Method development of NDMA and NDEA quantification in sartan drug by LC-MS/MS*, https://www.agilent.com/cs/library/posters/public/Agilent_ASMS_2019_ThP762_Poster.pdf.
- [37] S. Masada, G. Tsuji, R. Arai, N. Uchiyama, Y. Demizu, T. Tsutsumi, Y. Abe, H. Akiyama, T. Hakamatsuka, K.-I. Izutsu, Y. Goda, H. Okuda, *Sci. Rep.* 2019, **9**, 11852.
- [38] Health Sciences Authority, *Identification of six nitrosamine impurities in western medicines by LC-HRMS*, https://www.hsa.gov.sg/docs/default-source/announcements/safety-alerts/identification-of-six-nitrosamine-impurities-in-western-medicines-by-lchrms_v2.pdf.
- [39] U.S. Food & Drug Administration, *Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) method for the determination of NDMA in metformin drug substance and drug product*, <https://www.fda.gov/media/134914/download>.
- [40] S.-H. Chang, C.-C. Chang, L.-J. Wang, W.-C. Chen, S.-Y. Fan, C.-Z. Zang, Y.-H. Hsu, M.-C. Lin, S.-H. Tseng, D.-Y. Wang, *J. Food Drug Anal.* 2020, **28**, 292.
- [41] M. Maziarz, P. Rainville, *Reliable HPLC/UV quantification of nitrosamine impurities in valsartan and ranitidine drug substances*, <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006775en.pdf>.
- [42] S. Schmidtsdorff, A.H. Schmidt, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2019, **174**, 151.
- [43] C. Mani, S. Banerjee, *Determination of nitrosamine impurities using the ultivo triple quadrupole LC/MS*, <https://www.agilent.com/cs/library/applications/application-nitrosamine-impurities-ultivo-triple-quadrupole-lc-ms-5994-1383en-agilent.pdf>.
- [44] M. Al-Kaseem, Z. Al-Assaf, F. Karabeet, *Pharmacol. Pharmacy* 2014, **5**, 298.
- [45] P. Miralles, A. Chisvert, A. Salvador, *J. Sep. Sci.* 2018, **41**, 3143.
- [46] M.J.C. Glover, *A fast efficient method to determine the presence of nitrosamines in cosmetics, personal care, and consumer products*, https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/5664_an_jones_nitrosamines_final.pdf.
- [47] Y. Qian, M. Wu, W. Wang, B. Chen, H. Zheng, S.W. Krasner, S.E. Hruday, X.-F. Li, *Anal. Chem.* 2015, **87**, 1330.
- [48] S.L. Roback, H. Kodamatani, T. Fujioka, M.H. Plumlee, *Environ. Sci. Water Res. Technol.* 2020, **6**, 1106.
- [49] A.D. Ngongang, S.V. Duy, S. Sauvé, *Anal. Methods* 2015, **7**, 5748.
- [50] C.-C. Fan, T.-F. Lin, *Chemosphere* 2018, **200**, 48.
- [51] S.F. Cooper, C. Lemoyne, D. Gauvreau, *J. Anal. Toxicol.* 1987, **11**, 12.
- [52] J. E. Grebel, I.H.H. (Mel) Suffet, *J. Chromatogr. A* 2007, **1175**, 141.
- [53] FDA, *Combined headspace N-nitrosodimethylamine (NDMA), N-nitrosodiethylamine (NDEA), N-nitrosoethylisopropylamine (NEIPA), and N-nitrosodipropylamine (NDIPA) impurity assay by GC-MS/MS*, 2019, <https://www.fda.gov/media/124025/download>.
- [54] <1469> Nitrosamine Impurities, USP-PF, 2020.
- [55] M.K. Parr, J.F. Joseph, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2019, **164**, 536.
- [56] C. Giménez-Campillo, M. Pastor-Belda, N. Campillo, M. Hernández-Córdoba, P. Viñas, *Talanta* 2021, **223**, 121659.
- [57] J.W. Munch, M.V. Bassett, *J. AOAC Int.* 2006, **89**, 486.
- [58] S. Yoon, N. Nakada, H. Tanaka, *Talanta* 2012, **97**, 256.
- [59] T. Dijkmans, M.R. Djokic, K.M. Van Geem, G.B. Marin, *Fuel* 2015, **140**, 398.
- [60] J.E. Grebel, C.C. Young, I.H. (Mel) Suffet, *J. Chromatogr. A* 2006, **1117**, 11.
- [61] A. Yahaya, D. Babatunde, L.W.B. Olaniran, O. Agboola, *Heliyon* 2020, **6**, e03447.
- [62] C. Sun, R. Wang, T. Wang, Q. Li, *Food Chem.* 2020, **310**, 125945.
- [63] M.-C.C. Huang, H.-C.C. Chen, S.-C.C. Fu, W.-H.H. Ding, *Food Chem.* 2013, **138**, 227.

PRENUMERATA PRENUMETATA PRENUMERATA PRENUMERATA PRENUMERATA PRENUMERATA

Prenumeratę „Przemysłu Chemicznego” najłatwiej zamówić przez internet:

www.sigma-not.pl

Roczny koszt prenumeraty w 2021 r. wyniesie **660,00 zł brutto** (8% VAT) + koszt wysyłki 30,00 zł, **prenumerata roczna PLUS** (z dostępem do wersji elektronicznej zeszytów archiwalnych z lat 1993-2020, od 1 marca również do zeszytów z roku 2021) – koszt – **990,00 zł brutto** (w cenie jest koszt wysyłki).

Prenumerata ciągła na 2021 r. (co najmniej na 2 lata 2021 i 2022) kosztuje 10% taniej, prenumerata ciągła PLUS – 891,00 zł brutto (z rabatem 10%). Członkowie Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego mogą kupić roczną prenumeratę „Przemysłu Chemicznego” w specjalnej cenie 330,00 zł brutto (+ koszt wysyłki 30,00 zł). Autorzy, których instytucje sponsorowały druk publikacji w „Przemysle Chemicznym” mogą kupić roczną prenumeratę też w tej cenie.

Konto do opłacania prenumeraty:

BANK PEKAO SA 24 1020 1026 0000 1002 0250 0577

Prenumeratory „Przemysłu Chemicznego” korzystający z prenumeraty PLUS otrzymują w 2021 r. bezpłatny dostęp do internetowej bazy publikacji czasopisma z lat 1986-2020 zawierającej ponad 7200 artykułów naukowych i komentarzy (ponad 36000 stron) a na życzenie również z lat 1976-1985 (baza Redakcji).

Każdy klient, który zamówi zakupi prenumeratę elektroniczną naszego czasopisma na 2021 r., otrzyma do niego dostęp od dnia zaksięgowania już w br., od miesiąca, w którym za nią zapłacił.

Odpowiednie adresy i hasła podaje prenumeratorom Zakład Kolportażu Wydawnictwa SIGMA-NOT Sp. z o.o. ul. Ku Wiśle 7, 00-707 Warszawa,

PRENUMERATA PRENUMETATA PRENUMERATA PRENUMERATA PRENUMERATA PRENUMERATA

3.2 Publikacja 2 (oryginalna)

Witkowska, A.B.; Giebułtowicz, J.; Dąbrowska, M.; Stolarczyk, E.U.; Development of a Sensitive Screening Method for Simultaneous Determination of Nine Genotoxic Nitrosamines in Active Pharmaceutical Ingredients by GC-MS; International Journal of Molecular Sciences 2022; 23(20): 1-11.



Article

Development of a Sensitive Screening Method for Simultaneous Determination of Nine Genotoxic Nitrosamines in Active Pharmaceutical Ingredients by GC-MS

Anna B. Witkowska ^{1,2,*}, Joanna Giebułtowicz ³, Magdalena Dąbrowska ¹ and Elżbieta U. Stolarczyk ^{1,4}

¹ Research Analytics Team, Analytical Department, Łukasiewicz Research Network—Industrial Chemistry Institute, 8 Rydygiera Street, 01-793 Warsaw, Poland

² Department of Bioanalysis and Drugs Analysis, Doctoral School, Medical University of Warsaw, 61 Żwirki i Wigury, 02-091 Warsaw, Poland

³ Department of Bioanalysis and Drugs Analysis, Faculty of Pharmacy, Medical University of Warsaw, 1 Banacha, 02-097 Warsaw, Poland

⁴ Spectrometric Methods Department, National Medicines Institute, Chelmska 30/34, 00-725 Warsaw, Poland

* Correspondence: anna.witkowska@wum.edu.pl



check for
updates

Citation: Witkowska, A.B.; Giebułtowicz, J.; Dąbrowska, M.; Stolarczyk, E.U. Development of a Sensitive Screening Method for Simultaneous Determination of Nine Genotoxic Nitrosamines in Active Pharmaceutical Ingredients by GC-MS. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 12125. <https://doi.org/10.3390/ijms232012125>

Academic Editors: Geoffrey Brown, Enikő Kallay and Andrzej Kutner

Received: 31 August 2022

Accepted: 4 October 2022

Published: 12 October 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: A worldwide crisis with nitrosamine contamination in medical products began in 2018. Therefore, trace-level analysis of nitrosamines is becoming an emerging topic of interest in the field of quality control. A novel GC-MS method with electron ionization and microextraction was developed and validated for simultaneous determination of nine carcinogenic nitrosamines (NDMA, NMEA, NDEA, NDBA, NMOR, NPYR, NPIP, NDPA, and *N*-methyl-np2) in active pharmaceutical ingredients (APIs): cilostazol, sunitinib malate, and olmesartan medoxomil. The method was validated according to the International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) guidelines, demonstrating good linearity in the range of LOQ up to 21.6 ng/mL (120% of specification limit). The limits of detection for the nine nitrosamines were determined to be in the range 0.15–1.00 ng/mL. The developed trace level GC-MS method turned out to be specific, accurate, and precise. The accuracy of all the tested APIs ranged from 94.09% to 111.22% and the precision evaluated by repeatability, intermediate precision, and system precision was $RSD \leq 7.65\%$. Nitrosamines were not detected in cilostazol and sunitinib, whereas in olmesartan medoxomil NDEA was detected at the level of LOQ. The novel protocol was successfully applied for nitrosamines determination in selected APIs and can be used for the routine quality control of APIs under Good Manufacturing Practices rules, ensuring the safety and effectiveness of pharmaceutical products.

Keywords: nitrosamines; gas chromatography–mass spectrometry; active pharmaceutical ingredient; ionization; microextraction; validation

1. Introduction

A worldwide crisis with nitrosamine contamination in medical products began in 2018 [1]. Since then, widespread investigations by regulatory agencies, including the European Medicines Agency (EMA) and United States Food and Drug Administration (US FDA), were undertaken. In drugs such as angiotensin II receptor blockers (ARBs), ranitidine, metformin, rifampin, rifapentine, and, recently, verenicline, *N*-nitrosodimethylamine (NDMA) and other nitrosamines have been detected [2,3]. Nitrosamines are known as probable human carcinogens (IARC 2A group for NDMA), potent genotoxic agents, and “cohort of concern” compounds according to ICH M7 guidance [4,5]. They can form in reaction of amine source (e.g., 2°, 3° amines, amidines, hydrazines) and nitrosating agents (e.g., nitrite in acidic conditions, nitrogen oxide, nitrous acid). According to newly established guidelines, every marketing authorization holder has to identify the risk of nitrosamine formation or cross-contamination in the manufacturing/storage of chemical and biological

medicines. Root causes of nitrosamine impurities in APIs (active pharmaceutical ingredients) and drug products can be manufacturing process related as well as stability of the drug substance/product or excipient compatibility related (Figure 1) [6–8].



Figure 1. Root causes of nitrosamine impurities in APIs and drug products.

The scale of the problem is revealed by the fact that, till now, more than one thousand batches of medical products have been recalled from the market due to the detection of harmful nitrosamines [9].

A large number of studies also resulted in the introduction of new, more restrictive legislation that regulated the concentration of nitrosamines in drug products. Therefore, trace-level analysis of nitrosamines is becoming an emerging topic of interest in the field of quality control. Till now, a wide range of quantitative analytical methods to measure nitrosamine traces in pharmaceuticals have been established, including gas chromatography with single quadrupole or tandem mass spectrometers (GC-MS/MS) with a headspace system or direct injection [10–16], liquid chromatography–tandem mass spectrometers (LC-MS/MS) or high-resolution mass spectrometers [17–20], and liquid chromatography with UV detectors and supercritical fluid chromatography (SFC) [21–23]. Solid-phase extraction (SPE), solid-phase microextraction (SPME), and dispersive liquid–liquid microextraction (DLLME) are also commonly used with GC-MS to produce comparable results of the LOQ (range 0.5–1.5 ppb) to LC-MS/MS [24–26]. Many already established methods are complex and can be applied to only one drug product/API, such as ranitidine and metformin. Our newly established, sensitive analytical screening procedure involving microextraction is fast, simple, environmentally friendly, and with limits of quantitation (LOQs) close to multi-step methods involving SPME or SPE extraction. Moreover GC-MS offers low operational costs, and is commonly used for analysis of volatile impurities in APIs. We demonstrate, for the first time, that our analytical procedure can be successfully applied for various APIs selected for quantitative testing after risk assessment.

2. Results and Discussion

2.1. Risk Assessment

Figure 2 presents the structures of tested APIs and N-nitrosamines examined in this study.

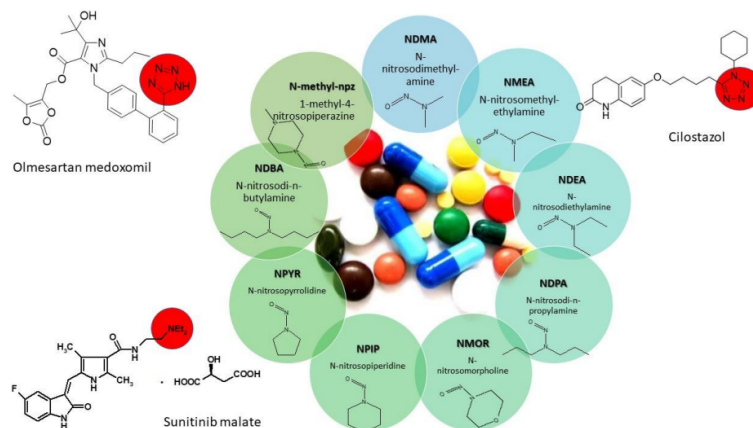


Figure 2. Structures of the APIs and nitrosamines presented in this study. Red circles—types of nitrosamine-related substructures present in APIs.

Since 2019, national regulatory agencies (US FDA, EMA) have obligated every marketing authorization holder to review their manufacturing process in order to identify the risk of nitrosamine formation or cross-contamination and, if necessary, to perform confirmatory testing. Kao et al. [27] in their recent study reported a substructure-based approach as a method for screening and investigating nitrosamines in medical products. According to their work, there are eight substructures present in APIs: DBA (dibutylamine), DEA (diethylamine), DIPA (diisopropylamine), DMA (dimethylamine), IPEA (isopropylethylamine), MPA (methylphenylamine), NMP (N-methyl-2-pyrrolidone), and a tetrazole ring can be suspected to be precursors of nitrosamines. A tetrazole ring is present in the structure of olmesartan medoxomil and cilostazol, while DEA in sunitinib malate (Figure 2). Another risk factor for nitrosamine contamination of sunitinib malate is the use of pyrrolidine in the synthesis. Many suppliers of raw materials for the synthesis of APIs do not provide information about the reagents used in the synthesis, which is why it is so important to selectively check batches with risk elements. Regulatory agencies have implemented analytical methods for sartans, antihistamines, and antidiabetic drugs, but they also continue to test other drug products; so, our new, sensitive screening method for determination of the nine nitrosamines in cilostazol and sunitinib malate is a very useful and suitable tool.

2.2. Method Development

A key parameter in the development of the microextraction method for the samples was optimization of the sample solvent. The solubility studies of olmesartan medoxomil, sunitinib malate, and cilostazol are presented in Supplementary Tables S1–S3. The choice of solvent involved the selection of the medium in which centrifugal extraction of the analytes under study was most efficient. Finally, methanol was chosen as the solvent in which cilostazol, olmesartan medoxomil, and sunitinib malate were slightly soluble. During method development, the centrifuge speed, centrifugation time, and amount of solvent taken for extraction were optimized. The best sensitivity was obtained for a centrifugation speed of 15,000 rpm, time of 10 min, and 250 μ L of solvent. At lower centrifugation speeds and shorter times (5000 rpm, 10,000 rpm, 2 and 5 min), there was no complete extraction of the analytes (Table S4). At longer centrifugation times, no increase in method sensitivity was observed. During the extraction, no evaporation of the solvent in the centrifuge chamber was noticed. From the capillary columns commonly used in the analysis of nitrosamines, such as DB-5 ms, DB-624 ms, and VF-WAXms [28–30], the best chromatographic separation was obtained on the column VF-WAXms (30 m $\times$ 0.32 mm, film thickness of 1.0 μ m). For the quantification analysis on a single quadrupole mass spectrometer, we used electron

ionization in selected ion monitoring mode (SIM) of particular ions, ensuring the highest sensitivity was chosen (see Section 3.2).

2.3. Validation Results

During the development of the method, satisfactory separation of nine nitrosamines was obtained in selected APIs. The standard added to the sample did not cause peaks splitting and the matrix did not affect the result (Figures S1–S27). Figure 3 shows a chromatogram of the standard solution.

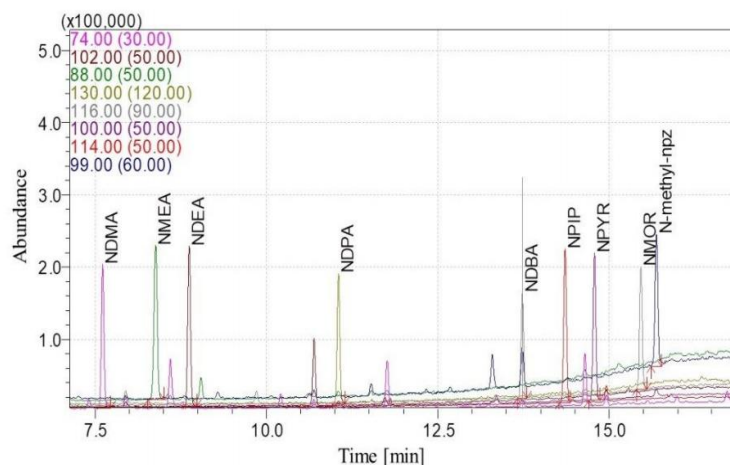


Figure 3. SIM mode chromatogram of the N-nitrosamines standard—18 ng/mL.

Results for linearity, limit of detection (LOD), and LOQ are summarized in Table 1. The determination coefficients (R^2) of the linear regression for the nine nitrosamines were over 0.995, which clearly demonstrates that the method was suitable for quantitative analysis.

Table 1. Validation results for linearity, LOD, and LOQ.

Analyte	Range (ng/mL)	*Y = ax + b ($R^2 \geq 0.990$)	LOD (ng/mL)		LOQ (ng/mL)	
		** t _a ** t _b	S/N ≥ 3	(3.3 $\times$ σ /S)	S/N ≥ 10	(10 $\times$ σ /S)
NDMA	0.45–21.6	Y = 0.0127x + 0.0005 ($R^2 = 0.9996$) 158.53 0.5695	0.15	0.47	0.45	1.43
NMEA	1.5–21.6	Y = 0.0104x + 0.0011 ($R^2 = 0.9997$) 159.85 1.4050	0.50	0.40	1.50	1.20
NDEA	1.0–21.6	Y = 0.0088x + 0.0009 ($R^2 = 0.9997$) 153.81 1.3608	0.30	0.45	1.00	1.37
NDPA	3.0–21.6	Y = 0.0029x + 0.0007 ($R^2 = 0.9988$) 70.521 1.4061	1.00	0.78	3.00	2.38

Table 1. Cont.

Analyte	Range (ng/mL)	*Y = ax + b (R ² ≥ 0.990)	LOD (ng/mL)		LOQ (ng/mL)	
		** t _a ** t _b	S/N ≥ 3	(3.3 × σ/S)	S/N ≥ 10	(10 × σ/S)
NMOR	3.0–21.6	Y = 0.0039x − 0.0002 (R ² = 0.9991) 83.655 0.7650	1.00	0.67	3.00	2.03
NPYR	1.5–21.6	Y = 0.0085x + 0.0007 (R ² = 0.9994) 105.24 0.7193	0.50	0.60	1.50	1.82
NPIP	1.5–21.6	Y = 0.0087x + 0.0005 (R ² = 0.9992) 91.615 0.4482	0.50	0.69	1.50	2.10
NDBA	1.5–21.6	Y = 0.0032x + 0.0002 (R ² = 0.9986) 71.346 0.4260	0.50	0.88	1.5	2.66
N-methyl-npz	1.5–21.6	Y = 0.0065x + 0.0013 (R ² = 0.9996) 137.02 2.2741	0.50	0.46	1.50	1.40

* a—slope; b—y-intercept. ** t_a, t_b—parameters of the Student's *t*-test; t_b = b/S_b, t_a = a/S_a, where S_a—the standard deviation of a, and S_b—the standard deviation of b.

The LODs and LOQs calculated both ways from the linearity and ratio peak/noise height were very similar. LODs were determined to be within the range 0.15–1.00 ppb (Table 2); such low LODs are comparable to the results obtained with GC-MS/MS by Liu et al. [11] (Table S5).

The accuracy of the method was verified at three levels—80%, 100%, and 120%—of the specification limit. The results for accuracy for all tested APIs are summarized in Table 2. The results exhibited that recoveries for all nitrosamines in sunitinib malate ranged from 94.09% to 111.22%, for cilostazol from 95.91% to 104.87%, and for olmesartan medoxomil from 92.20% to 108.72%, respectively.

Method precision was evaluated by repeatability, intermediate precision, and system precision. As summarized in Table 3, this GC-MS method exhibited satisfactory RSD% values for repeatability in all APIs in the range of 0.76–5.75%, and for intermediate precision and system precision in the range of 1.13–7.65% and 1.03–3.65% (area), respectively. Since the acceptance criteria for recovery and precision for all APIs were established for 60–115% and RSD < 21%, all the results meet the criteria according to the Association of Official Analytical Chemists [31].

The robustness of the GC-MS method was evaluated on standard solution to determine the impact on the result in case of small variations in the chromatographic parameters: oven initial column temperature ± 5 °C; first temperature ramp ± 1 °C/min; and gas pressure ± 10%. The robustness results (Table S6) showed that the retention time for all nitrosamines change within a range of ± 1.1 min and the separation of the nitrosamines was not affected.

Table 2. Validation results of the accuracy for sunitinib, cilostazol, and olmesartan medoxomil.

Analyte	Accuracy Mean Recovery 60–115% RSD ≤ 21% (<i>n</i> = 9)		
	Sunitinib Malate	Cilostazol	Olmesartan Medoxomil
NDMA	94.45 1.98	98.26 2.11	104.66 5.68
NMEA	94.09 2.10	99.14 1.78	95.85 4.24
NDEA	97.97 3.57	97.15 2.02	97.34 4.44
NDPA	97.07 5.05	95.91 2.15	92.20 6.50
NMOR	111.22 2.89	97.10 3.66	103.60 5.16
NPYR	95.87 3.82	100.62 3.00	108.72 5.29
NPIP	99.37 5.13	96.66 6.02	ND
NDBA	99.30 6.10	104.87 2.38	102.17 8.98
<i>N</i> -methyl-npz	102.94 7.53	99.90 5.17	ND

ND—not detected.

Table 3. Validation results of precision for sunitinib malate, cilostazol, and olmesartan medoxomil.

Matrix Analyte	Sunitinib		Cilostazol		Olmesartan Medoxomil		System Precision	
	Repeatability RSD (%)	Intermediate Precision RSD (%)	Repeatability RSD (%)	Intermediate Precision RSD (%)	Repeatability RSD (%)	Intermediate Precision RSD (%)	Area Nitrosamine/Area NDMA-d6 RSD (%)	Retention Time RSD (%)
NDMA	2.12	2.05	0.76	1.13	3.07	2.51	1.31	0.03
NMEA	2.25	1.99	1.27	1.42	2.47	2.21	1.08	0.02
NDEA	2.48	3.37	1.10	1.37	3.00	4.04	1.31	0.02
NDPA	3.95	6.26	2.97	2.25	5.75	4.24	1.03	0.01
NMOR	3.18	5.55	2.73	4.49	3.07	3.97	3.52	0.01
NPYR	2.51	5.08	1.77	3.91	2.55	7.50	2.42	0.01
NPIP	3.67	4.06	3.91	4.60	ND	ND	2.01	0.01
NDBA	4.32	6.81	1.68	1.46	4.51	4.71	3.07	0.01
<i>N</i> -methyl-npz	2.22	6.45	5.60	7.65	ND	ND	3.65	0.01

ND—not detected.

Moreover, during validation, the stability of the standard solution and sample solution was investigated. Standard solution stability studies for all nitrosamines in methanol demonstrated that after 24 and 48 h in 25 °C, the RSD% (area) ranged from 0.63 to 4.79%, demonstrating that the standard solution was stable up to 48 h after preparation (Tables S7–S15). Stability of the sample solution of cilostazol, olmesartan medoxomil, and sunitinib malate spiked with nitrosamines at 100% of a specification level was evaluated after 24 h in 25 °C by measuring the peak area quotient of nitrosamines and NDMA-d6. The RSD% for all the nitrosamines in olmesartan medoxomil was in range of 1.36–18.33%, in cilostazol, 0.69–9.14%, and in sunitinib malate, 0.38–10.63%, which indicated the increase

in RSD with time and the necessity of sample solution preparation directly before analysis (Tables S16–S24).

Supplementary Material Table S5 shows the comparison of the results of this publication with various reported GC-MS and GC-MS/MS methods for the detection of N-nitrosamines. The novel GC-MS method with microextraction showed superior results in the validation test compared with other GC-MS and GC-MS/MS methods. The developed method offers several benefits over previously established methodologies, including enhanced sensitivity (LOD below 1 ppb), with no requirements for derivatization and multistep sample preparation (SPE, SPME or DLLEM); a reduction in solvent usage (only 250 µL); and application to a wide variety of APIs. We have also demonstrated that the developed method using a single quadrupole is as good as the method with tandem mass spectrometry.

2.4. Application of the Method for Nitrosamine Determination in Selected APIs

The validated GC-MS method was applied to determine nine nitrosamines in three active pharmaceutical ingredients: cilostazol, sunitinib malate, and olmesartan medoxomil. In cilostazol and sunitinib, no nitrosamines were found. NDEA was detected in olmesartan medoxomil at a concentration of 1.66 ng/mL. Therefore, based on the proposed European Pharmacopoeia Commission limit (30 ppb), the acceptance criteria for nitrosamines in APIs have been met. Olmesartan medoxomil has never been recalled from the market due to detection of nitrosamines beyond acceptable intake limits [2].

3. Materials and Methods

3.1. Materials

Cilostazol (99.8%), sunitinib malate (99.7%), and olmesartan medoxomil (99.7%) were purchased from Pharmaceutical Research Institute (Poland). The nitrosamines mix (containing NDMA, NMEA, NDEA, NDPA, NMOR, NPYR, NPIP, and NDPA) EPA 8270 (Appendix IX), certified reference material; 2000 µg/mL in methanol) was obtained from Sigma-Aldrich (USA). 1-Methyl-4-nitrosopiperazine was obtained from Angene International Limited (London, England). N-Nitrosodimethylamine-d6 (1000 µg/mL in methanol) was purchased from LGC (Kielce, Poland). Methanol LC-MS reagent was obtained from J.T. Baker (Oslo, Norway).

3.2. Equipment and Method

The GC-MS analysis was performed using a Shimadzu gas chromatograph GCMS-QP2010 ULTRA with MS detector. The separation of nitrosamines was performed on a VF-WAXms polyethylene glycol column (30 m × 0.32 mm, film thickness of 1.0 µm) from Agilent Technologies. In the study, centrifuge tubes with a 0.2 µm PVDF filter from Anchem and an M-Science centrifuge from MPW Med. Instruments were used. All the GC-MS method's experimental conditions are presented in Table 4. The ions selected for each nitrosamine for quantification and confirmation are shown in Table 5.

3.3. Standard Solution Preparation

The internal standard (IS) solution (70 ng/mL in methanol) was prepared from the internal stock solution NDMA-d6 (1000 µg/mL in methanol) and diluted with methanol. The nitrosamine intermediate dilution was prepared by dissolving the appropriate amount of the nitrosamines mix (certified reference material) to reach 10 µg/mL of the nitrosamine mix in MeOH. A standard solution of nine nitrosamines at the concentration level of 18.0 ng/mL was prepared from the nitrosamine intermediate dilution in a 10 mL volumetric flask with methanol.

Table 4. GC-MS method experimental conditions.

GC Parameters	
Carrier gas	Helium
Column flow rate	2.1 mL/min
Oven initial temperature	75 °C (hold time: 2 min)
First temperature ramp	9.0 °C/min
Second temperature	200 °C/min (hold time: 2 min)
Second temperature ramp	15.0 °C/min
Final temperature	240 °C (hold time: 3 min)
Pressure	45.5 kPa
Injection mode	Splitless, high-pressure injection 130 kPa
Injection port temperature	150 °C
MS Parameters	
Ion Source Temperature	240
Interface Temperature	240
Acquisition type	SIM
Solvent delay	6.5 min

Table 5. GC-MS SIM for the detected nitrosamines.

Compound	Quantification Ion (<i>m/z</i>)	Confirmation Ion (<i>m/z</i>)
NDMA	74	44
NMEA	88	56
NDEA	102	56
NDPA	130	70
NMOR	116	56
NPYR	100	68
NPIP	114	55
NDBA	116	158, 84
<i>N</i> -methyl-npz	99	100, 56
NDMA-d6	80	50

3.4. Sample Solution Preparation

A total of 150 mg of API was weighed into 2 mL centrifuge tubes with filtration equipment and 250 μ L of the internal standard solution (70 ng/mL NDMA-d6) was added. Then, the solution was centrifuged at 15,000 rpm for 10 min. A clear organic phase was transferred to a sample vial because the selected APIs were practically insoluble in methanol.

3.5. Blank Preparation

The blank solution was prepared as described in Section 3.4., but without addition of the sample.

3.6. Validation of the GC-MS Method

The GC-MS method for the nine nitrosamines in API was validated according to ICH guidelines. The specificity of the method was examined using a blank solution, standard solution, sample solution, and reference solution (sample solution spiked with standard solution at a 100% concentration level of the specified limit).

The calibration curve was prepared in methanol at concentrations from LOQ to 120% (0.45–21.6 ng/mL) of the specified limit for nitrosamines with respect to sample preparation, the internal standard solution was added in a concentration of 70 ng/mL NDMA-d6. The linearity for every nitrosamine was evaluated by linear regression and statistical evaluation. Linearity experiments included the determination coefficient, y-intercept, slope of regression line, and residual sum of squares (Sr). The determination coefficients (R²) of the linear regression for each calibration curve should be ≥ 0.995 .

The accuracy of the method was established on three different concentrations: a sample spiked with nitrosamines at 80%, 100%, and 120% of the specification limit; the acceptance criteria were 60–115% and the precision at each concentration should not exceed $RSD < 21\%$. In 2020, the European Pharmacopoeia Commission adopted a new general chapter for trace-level analysis of nitrosamine impurities where the recommended maximum allowed limit for nitrosamines in active substances was set at 0.03 ppm (30 ppb) [32]; therefore, in the present study, the same limit was implemented.

Limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) were calculated in two different ways: using peak height (S) and noise height (N), where the LOQ was stated as $S/N \geq 10$ and LOD as $S/N \geq 3$, and using linearity parameters such as the standard deviation of the response (σ) and the slope of the curve (S); then, LOD and LOQ were determined from the following equations: $LOD = (3.3 \times \sigma/S)$ and $LOQ = (10 \times \sigma/S)$.

The precision of the method was examined as repeatability, intermediate precision, and system precision. Repeatability for all nitrosamines was obtained from analysis of the six sample solutions. Intermediate precision was assessed as a result of the intra-laboratory variations, i.e., a different day or analyst (the RSD should not exceed 21%), while the difference between the results were tested by statistical Horwitz's test. System precision was evaluated by six replicate injections of the standard solution (calculation—Supplementary Note S1).

During validation, the stability of the solutions and robustness of the method also were evaluated. The stability of the solutions was established by measuring the peak area quotient of the nitrosamines and NDMA-d6 for the reference solution, with nitrosamines at a 100% concentration level of the specified limit and for a sample solution of API (cilostazol, sunitinib, and olmesartan medoxomil) spiked with nitrosamines at 100% of the specification level (18.0 ng/mL) after 24 h under autosampler conditions ($20^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$). Robustness of the developed method was investigated by injecting the standard solution in different chromatographic conditions: column temperature, $\pm 5^\circ\text{C}$; rate, $\pm 1^\circ\text{C}/\text{min}$; and carrier gas pressure, $\pm 10\%$.

4. Conclusions

A new, sensitive, simple, environmentally friendly method for extracting nine nitrosamines from active pharmaceutical ingredients, using the high-pressure direct injection GC-MS method, was developed in this study. Based on the performed risk evaluation in the manufacturing process, three APIs were examined. This is the first described method for the determination of nitrosamines in cilostazol and sunitinib malate. The implemented GC-MS method for cilostazol and sunitinib malate showed no influence of the manufacturing process on the development of nitrosamine impurities. The quantitative method for each API was validated according to the requirements of the ICH guideline. The validation of the GC-MS method proved that the method was sensitive, accurate, precise, and suitable for nitrosamine determination in multiple APIs. The results obtained during the validation showed that the LOD and LOQ were in the range from 0.15 to 1.00 ng/mL. In conclusion, the presence of nine nitrosamines was determined as below the acceptable intake limits in selected APIs; however, it is necessary to test other APIs containing specific amine substructures in their structures to ensure the safety of the drugs for patients.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms232012125/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, supervision, E.U.S.; methodology, validation, formal analysis, investigation, visualization, A.B.W.; writing—original draft, A.B.W.; writing—review and editing, A.B.W., E.U.S., J.G., M.D.; funding acquisition A.B.W. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The project was financially supported by the Ministry of Science and Higher Education: contract number DWD/5/0401/2021.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The study was supported by the Polish Ministry of Science and Higher Education, statutory grant no. 841343A. The authors would like to thank Marta Zezula for her support in this study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. US Food and Drug Administration. FDA Announces Voluntary Recall of Several Medicines Containing Valsartan Following Detection of an Impurity. Available online: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-announces-voluntary-recall-several-medicines-containing-valsartan-following-detection-impurity> (accessed on 30 August 2022).
2. US Food and Drug Administration. Recalls, Market Withdrawals, & Safety Alerts. Available online: <https://www.fda.gov/safety/recalls-market-withdrawals-safety-alerts> (accessed on 30 August 2022).
3. Tao, X.; Tian, Y.; Liu, W.-H.; Yao, S.; Yin, L. Trace Level Quantification of 4-Methyl-1-Nitrosopiperazin in Rifampicin Capsules by LC-MS/MS. *Front Chem* **2022**, *10*, 834124. [CrossRef] [PubMed]
4. European Medicines Agency; Committee for Medicinal Products for Human Use. *ICH Guideline M7 on Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk-Addendum*; European Medicines Agency: Amsterdam, The Netherlands, 2021; Volume 31.
5. International Agency for Research on Cancer. *IARC Publications Website-Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs*; International Agency for Research on Cancer: Lyon, France, 1987; Volume 1–42.
6. Wu, Y.; Levons, J.; Narang, A.S.; Raghavan, K.; Rao, V.M. Reactive Impurities in Excipients: Profiling, Identification and Mitigation of Drug–Excipient Incompatibility. *AAPS PharmSciTech* **2011**, *12*, 1248–1263. [CrossRef]
7. Yokoo, H.; Yamamoto, E.; Masada, S.; Uchiyama, N.; Tsuji, G.; Hakamatsuka, T.; Demizu, Y.; Izutsu, K.I.; Goda, Y. N-Nitrosodimethylamine (Ndma) Formation from Ranitidine Impurities: Possible Root Causes of the Presence of Ndma in Ranitidine Hydrochloride. *Chem. Pharm. Bull.* **2021**, *69*, 872–876. [CrossRef]
8. Sedlo, I.; Kolonić, T.; Tomić, S. Presence of Nitrosamine Impurities in Medicinal Products. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **2021**, *72*, 1–5. [CrossRef] [PubMed]
9. Bharate, S.S. Critical Analysis of Drug Product Recalls Due to Nitrosamine Impurities. *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 2923–2936. [CrossRef] [PubMed]
10. Parr, M.K.; Joseph, J.F. NDMA Impurity in Valsartan and Other Pharmaceutical Products: Analytical Methods for the Determination of N-Nitrosamines. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2019**, *164*, 536–549. [CrossRef]
11. Liu, J.; Xie, B.; Mai, B.; Cai, Q.; He, R.; Guo, D.; Zhang, Z.; Fan, J.; Zhang, W. Development of a Sensitive and Stable GC-MS/MS Method for Simultaneous Determination of Four N-Nitrosamine Genotoxic Impurities in Sartan Substances. *J. Anal. Sci. Technol.* **2021**, *12*, 3. [CrossRef]
12. US Food and Drug Administration. *Combined Headspace N-Nitrosodimethylamine (NDMA), N-Nitrosodiethylamine (NDEA), N-Nitrosoethylisopropylamine (NEIPA), and N-Nitrosodiisopropylamine (NDIPA) Impurity Assay by GC-MS/MS*; US Food and Drug Administration: Silver Spring, MD, USA, 2019; pp. 1–7.
13. Tsutsumi, T.; Akiyama, H.; Demizu, Y.; Uchiyama, N.; Masada, S.; Tsuji, G.; Arai, R.; Abe, Y.; Hakamatsuka, T.; Izutsu, K.; et al. Analysis of an Impurity, N-Nitrosodimethylamine, in Valsartan Drug Substances and Associated Products Using GC-MS. *Biol. Pharm. Bull.* **2019**, *42*, 547–551. [CrossRef]
14. New OMCL Method for Simultaneous Determination of NDMA and NDEA in Sartan. Available online: <https://www.edqm.eu/documents/52006/71923/Ad-hoc-projects-OMCL-Network-ranitidine.pdf/f775fbf3-705e-ce82-d1e1-8eb3c06002d4?t=1628667875462> (accessed on 30 August 2022).
15. Wichitnithad, W.; Sudtanon, O.; Srisunak, P.; Cheewatanakornkool, K.; Nantaphol, S.; Rojsitthisak, P. Development of a Sensitive Headspace Gas Chromatography–Mass Spectrometry Method for the Simultaneous Determination of Nitrosamines in Losartan Active Pharmaceutical Ingredients. *ACS Omega* **2021**, *6*, 11048–11058. [CrossRef]
16. Lee, D.H.; Hwang, S.H.; Park, S.; Lee, J.; Oh, H.B.; Han, S.B.; Liu, K.-H.; Lee, Y.-M.; Pyo, H.S.; Hong, J. A Solvent-Free Headspace GC/MS Method for Sensitive Screening of N-Nitrosodimethylamine in Drug Products. *Anal. Methods* **2021**, *13*, 3402–3409. [CrossRef] [PubMed]
17. Chang, S.-H.; Chang, C.-C.; Wang, L.-J.; Chen, W.-C.; Fan, S.-Y.; Zang, C.-Z.; Hsu, Y.-H.; Lin, M.-C.; Tseng, S.-H.; Wang, D.-Y. A Multi-Analyte LC-MS/MS Method for Screening and Quantification of Nitrosamines in Sartans. *J. Food Drug Anal.* **2020**, *28*, 292–301. [CrossRef]
18. Yang, J.; Marzan, T.A.; Ye, W.; Sommers, C.D.; Rodriguez, J.D.; Keire, D.A. A Cautionary Tale: Quantitative LC-HRMS Analytical Procedures for the Analysis of N-Nitrosodimethylamine in Metformin. *AAPS J.* **2020**, *22*, 89. [CrossRef]
19. Schmalzer-ripcke, J.; Hannes, C. *Test Method for the Determination of NDMA by LC-MS/MS in Ranitidine Drug Substance and Film Coated Tablets*; EDQM: Strasbourg, France, 2019; pp. 1–7.

20. European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare. LC-MS/MS Method for the Determination of NDEA and NMDA in Valsartan, Irbesartan and Losartan APIs and Finished Dosage Forms. Available online: https://www.edqm.eu/sites/default/files/medias/fichiers/Sartans/de-by-lc-ms_ls.pdf (accessed on 30 August 2022).
21. Schmidtsdorff, S.; Schmidt, A.H. Simultaneous Detection of Nitrosamines and Other Sartan-Related Impurities in Active Pharmaceutical Ingredients by Supercritical Fluid Chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2019**, *174*, 151–160. [CrossRef] [PubMed]
22. French National Agency for Medicines and Health Products Safety. Determination of NDMA in Valsartan Active Substances and Finished Products by HPLC/UV. Available online: <https://www.edqm.eu/sites/default/files/omcl-method-determination-ndma-valsartan-ansm-september2018.pdf> (accessed on 30 August 2022).
23. Maziarz, M.; Rainville, P. Reliable HPLC/UV Quantification of Nitrosamine Impurities in Valsartan and Ranitidine Drug Substances [TECHNOLOGY BRIEF]. Available online: <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006775en.pdf> (accessed on 30 August 2022).
24. Giménez-Campillo, C.; Pastor-Belda, M.; Campillo, N.; Hernández-Córdoba, M.; Viñas, P. Development of a New Methodology for the Determination of N-Nitrosamines Impurities in Ranitidine Pharmaceuticals Using Microextraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Talanta* **2021**, *223*, 121659. [CrossRef] [PubMed]
25. Alshehri, Y.M.; Alghamdi, T.S.; Aldawsari, F.S. HS-SPME-GC-MS as an Alternative Method for NDMA Analysis in Ranitidine Products. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2020**, *191*, 113582. [CrossRef]
26. Lim, H.H.; Oh, Y.S.; Shin, H.S. Determination of N-Nitrosodimethylamine and N-Nitrosomethylethylamine in Drug Substances and Products of Sartans, Metformin and Ranitidine by Precipitation and Solid Phase Extraction and Gas Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2020**, *189*, 113460. [CrossRef]
27. Kao, Y.-T.; Wang, S.-F.; Wu, M.-H.; Her, S.-H.; Yang, Y.-H.; Lee, C.-H.; Lee, H.-F.; Lee, A.-R.; Chang, L.-C.; Pao, L.-H. A Substructure-Based Screening Approach to Uncover N-Nitrosamines in Drug Substances. *J. Food Drug Anal.* **2022**, *30*, 150–162. [CrossRef] [PubMed]
28. Sieira, B.J.; Carpinteiro, I.; Rodil, R.; Quintana, J.B.; Cela, R. Determination of N-Nitrosamines by Gas Chromatography Coupled to Quadrupole–Time-of-Flight Mass Spectrometry in Water Samples. *Separations* **2020**, *7*, 3. [CrossRef]
29. Jurado-Sánchez, B.; Ballesteros, E.; Gallego, M. Comparison of the Sensitivities of Seven N-Nitrosamines in Pre-Screened Waters Using an Automated Preconcentration System and Gas Chromatography with Different Detectors. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1154*, 66–73. [CrossRef] [PubMed]
30. ChaoYe, S.; HongQuan, C.; SaiFeng, P.; Yun, Z. Determination of Nine Nitrosamines in Water by Solid Phase Extraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Environ. Occup. Med.* **2019**, *36*, 1060–1065. [CrossRef]
31. Association of Official Analytical Chemists. *Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements*; Association of Official Analytical Chemists: Rockville, MD, USA, 2016.
32. European Pharmacopoeia. *2.5.42 N-Nitrosamines in Active Substances*; European Pharmacopoeia: Strasbourg, France, 2020.

3.3 Publikacja 3 (oryginalna)

Witkowska, A.B.; Wołczyńska, A.; Lis-Cieplak, A.; Stolarczyk, E.U. Development and Validation of LC-MS/MS Method for the Determination of 1-Methyl-4-Nitrosopiperazine (MNP) in Multicomponent Products with Rifampicin—Analytical Challenges and Degradation Studies; *Molecules* 2023; 28 (21): 115. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules28217405>

Article

Development and Validation of LC-MS/MS Method for the Determination of 1-Methyl-4-Nitrosopiperazine (MNP) in Multicomponent Products with Rifampicin—Analytical Challenges and Degradation Studies

Anna B. Witkowska ^{1,2} , Aleksandra Wołczyńska ¹ , Agnieszka Lis-Cieplak ¹  and Elżbieta U. Stolarczyk ^{1,*}

¹ Spectrometric Methods Department, National Medicines Institute, 30/34 Chelmska, 00-725 Warsaw, Poland; anna.witkowska@wum.edu.pl (A.B.W.); a.wolczynska@nil.gov.pl (A.W.); a.lis@nil.gov.pl (A.L.-C.)

² Department of Drug Chemistry, Doctoral School, Medical University of Warsaw, 61 Zwirki i Wigury, 02-091 Warsaw, Poland

* Correspondence: e.stolarczyk@nil.gov.pl



Citation: Witkowska, A.B.; Wołczyńska, A.; Lis-Cieplak, A.; Stolarczyk, E.U. Development and Validation of LC-MS/MS Method for the Determination of 1-Methyl-4-Nitrosopiperazine (MNP) in Multicomponent Products with Rifampicin—Analytical Challenges and Degradation Studies. *Molecules* **2023**, *28*, 7405. <https://doi.org/10.3390/molecules28217405>

Academic Editors: Ki-Jung Paeng and Jongki Hong

Received: 13 October 2023

Revised: 27 October 2023

Accepted: 30 October 2023

Published: 3 November 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Rifampicin is an essential medicine for treating and preventing tuberculosis (TB). TB is a life-threatening infectious disease and its prevention and treatment are public health imperatives. In the time of a global crisis of nitrosamine contamination of medicinal products, patient safety and a reduction in the number of drug recalls at the same time are crucial. In this work, the LC-MS/MS method was developed for the determination of the 1-methyl-4-nitrosopiperazine (MNP), a genotoxic nitrosamine impurity in various products containing rifampicin at a 5.0 ppm limit level according to Food and Drug Administration (FDA). Extraction with neutralization was necessary due to the matrix and solvent effect associated with the complexity of the rifampicin product. The developed method was validated in accordance with regulatory guidelines. Specificity, accuracy, precision, limit of detection, and limit of quantification parameters were evaluated. The recovery of the MNP was $100.38 \pm 3.24\%$ and the intermediate precision was 2.52%. The contamination of MNP in Rifampicin originates in the manufacturing process of the drug. Furthermore, the results of the forced degradation experiments show that the formation of MNP is possible by two mechanisms: through degradation of rifampicin and the oxidation of 1-amino-4-methyl-piperazine. This article points out that it is necessary to monitor and describe degradation products and the mechanism of degradation of potentially affected active pharmaceutical ingredient (API) with respect to the formation of nitrosamines during stress testing, as it was done in the following work for rifampicin in multicomponent products.

Keywords: genotoxic nitrosamines; trace level analysis; impurity profile; tuberculosis (TB) drug; stress study; degradation mechanism

1. Introduction

Rifampicin (Figure 1A), also referred to as rifampin, belongs to rifamycins—an antimicrobial class of drugs. It is used for the treatment of numerous Gram-positive cocci, including *Mycobacterium tuberculosis*, *Clostridium difficile* and selected Gram-negative bacteria: *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Hemophilus influenzae* infections [1–3]. FDA approved rifampicin as the first rifamycin antibiotic for treating tuberculosis [4]. Other medical indications for rifampicin include leprosy and less common diseases such as osteomyelitis, endocarditis, brain abscess, meningitis, and implant infections [3]. The advantage of rifampicin administration in the treatment of tuberculosis is that it has the potential to reduce the duration of therapy and has a broad antimicrobial effect [2]. High concentration of rifampicin is also well-tolerated by patients due to the rapid metabolism in the liver. This medicine is available for oral and intravenous administration. It is also

highly lipid-soluble, rapidly absorbed, and distributed throughout the body [3]. For active tuberculosis it is often used together with isoniazid (Figure 1B), ethambutol hydrochloride (Figure 1C), and pyrazinamide (Figure 1D). Rifampicin is an extremely important medicine due to the small number of other active substances available for the treatment of tuberculosis. In particular, in times of global crisis of nitrosamine contamination of medicinal products, patient safety and a reduction in the number of drug recalls at the same time are crucial [5]. For that purpose, the content of the impurities, especially those of very probable cancerogenic properties, should be limited as much as possible. Therefore, the drugs should be well tested and their impurity profile should be known. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) M7 guideline indicates that aflatoxins, *N*-nitrosamines (NAs), and alkyl-azo compounds are highly carcinogenic and genotoxic impurities. Hence, they are grouped as a cohort of concern [6]. *N*-nitrosamines are considered potent genotoxic agents based primarily on data from animal models. This is due to the mutagenic effect which can lead to cancer development. *N*-nitrosamines can arise from several sources: may be present in the active pharmaceutical ingredients (APIs) used in final pharmaceutical products (FPPs) fabrication, may be formed during drug synthesis processes, accidentally introduced due to cross-contamination, solvents recovery procedures, or from degradation of drug substances during storage [5,7–10]. It is necessary to note that the formation of NAs impurities can be specific for a certain product or nonspecific. It is important to perform a meticulous analysis of risk evaluations of nitrosamines formation.

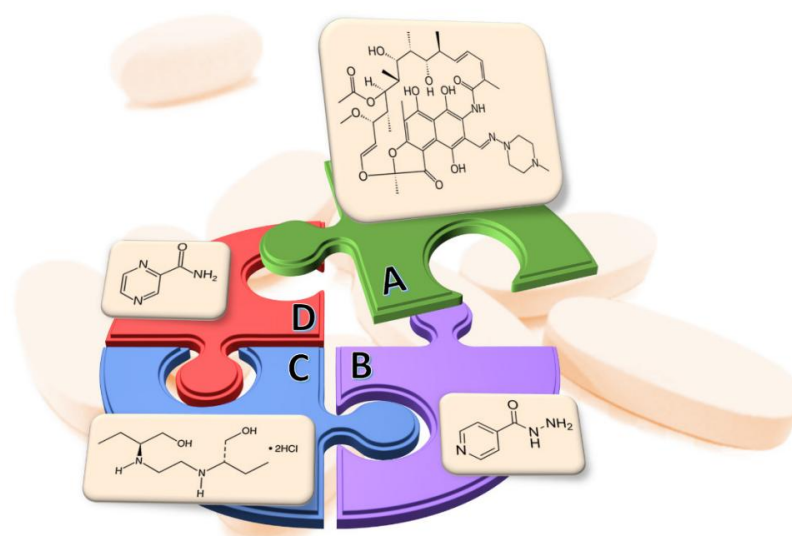


Figure 1. Structures of API included in rifampicin-containing products: (A) rifampicin; (B) isoniazid; (C) ethambutol hydrochloride; (D) pyrazinamide.

In August 2020, the United States Food and Drug Administration (FDA) released information about 1-methyl-4-nitrosopiperazine (MNP) contamination in rifampicin. MNP is an intermediate for the synthesis of two substrates, i.e., 1-methylpiperazine and 1-amino-4-methylpiperazine, which are used for the synthesis of drugs [11]. During the synthesis of 1-amino-4-methylpiperazine, MNP is reduced with zinc powder in acetic acid or with hydrogen using a palladium catalyst [12]. Moreover, 1-amino-4-methylpiperazine constitutes one of the starting materials for the synthesis of rifampin. This amine may be the source of the MNP appearing in the final product of the drug. Is the synthesis route the only source of MNP in rifampicin? Well, no. It was reported that the MNP compound arises from the decomposition of the sample as a result of high temperature [13]. MNP

belongs to the nitrosamine class of compounds, some of which are classified as probable (IARC Group 2A) or possible human carcinogens (IARC Group 2B) [5]. However, the carcinogenicity of MNP contrasts sharply with the strong carcinogenicity of dinitrosopiperazine, for example. This is difficult to explain since the alpha hydrogen atoms are highly reactive, and exchange readily with deuterium in basified D₂O [14]. On the other hand, mononitrosopiperazines are mutagenic in the host-mediated assay, in which, indeed, 1-nitroso-4-methylpiperazine is much more active than dinitrosopiperazine [15]. The explanation might lie in the highly polar nature of the mononitrosopiperazines, both of which are strong bases and, therefore, possibly unable to enter cells. But nitrosonornicotine, which is also a strong base, is an effective carcinogen in rats [16]. It must be concluded that conformational factors, some substituents can greatly increase carcinogenic activity in a nitrosamine molecule, other substituents can reduce carcinogenic activity greatly, or even eliminate it, and polar substituents seem to be particularly effective in accomplishing the latter [17]. Ideally, MNP as a nitrosamine impurity should not be present in medicines. But where the presence of MNP cannot be eliminated entirely, they should be controlled below a level where human cancer risk associated with the exposure is negligible. Manufacturers of rifampicin should expeditiously implement remediation plans to reduce the presence of MNP impurity and should test all batches before drug release to ensure the interim limit of 5 ppm [18]. However, limits of 0.16 ppm (FDA) or 0.67 ppm (European Medicines Agency) are currently under consideration [13,17,19]. Highly sensitive analytical methodologies are necessary not only because of impurity trace determination at the ppb level but also because of the significant and different effects of the matrix on the analytes being determined. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry, both LC-HRMS [20–22] and LC-MS/MS and gas chromatography GC-MS have been widely used for the analysis of NAs [23,24]. By itself, LC or GC with MS detection is very sensitive. However, to develop a sufficiently sensitive and selective analytical method it is necessary to develop a proper sample preparation protocol, which can include solid phase extraction, preparative column chromatography, recrystallization, phase exchanges, and fractional distillation [25–27]. The sample treatment not only enables analyte preconcentration but also removes components of the matrix that may interfere with the analysis protocol. Five methods for the determination of MNP in medicinal products have been described in the literature using LC-MS/MS, SFC-MS/MS, and GC-MS/MS, and various extraction methods, including SALLE and LLE [28–32]. Gas chromatography coupled with mass spectrometry was used for the determination of MNP in cetirizine, amlodipine/bisoprolol, sunitinib, olmesartan and cilostazol [28,31]. Rifampicin, according to the literature and our experimental data (on GC-MS/MS), decomposes at elevated temperatures to MNP, so it was impossible to use the GC-MS/MS method for determination of MNP in rifampicin products. MNP in single-ingredient rifampicin capsules has been analyzed by LC-HRMS and LC-MS/MS [13,22]. The HPLC-MS/MS-based method for the detection of MNP in rifampicin capsules was developed by Tao et al. [13]. This is the de facto method of determining MNP in the API since rifampicin spilled out of the capsule constitutes the examined sample. The 2D-LC-UHPLC-MS/MS method developed by de Souza et al. for monitoring *N*-nitrosamines in rifampicin is also exclusively applicable to APIs [29]. Additionally, Tao et al. suggest that MNP is a thermal degradation product of rifampicin which occurs during forced degradation experiments [13]. Their results suggest that temperature during production and sample storage should be strictly controlled. To our knowledge, methods for determining MNP with stress studies in complex multi-component matrices with rifampicin have not been yet reported in the literature.

Our method, developed and described within this article, can be applied to more complex matrices than rifampicin alone. Pharmaceutical complex formulations, for which sample preparation is important, namely tablets containing rifampicin, isoniazid, pyrazinamide, and ethambutol hydrochloride may be analyzed. Thus, it also provides an answer to the question: Should the risk of presence and determination of 1-methyl-4-nitrosopiperazine (MNP) be considered only for the rifampicin finished products? The development of the

method was a significant challenge due to the notable matrix effect and solvent effect that was observed in particular for the four-component product. Additionally, we observed that in the case of stress testing on rifampicin-containing tablets, it is not only the temperature that elevates the level of MNP. Therefore, we have applied the newly developed analytical method to study the stability of rifampicin-containing products in terms of the formation of the nitrosamine MNP the source of which may be in the degradation main studied API. From our perspective it is necessary to monitor and describe the degradation products and mechanism degradation of potentially affected API concerning nitrosamines formed during stress testing, what we have done for rifampicin in multicomponent products.

2. Results

2.1. Method Development

Due to the high polarity and low molecular weight of MNP, developing an LC-MS methodology was a challenging task. To develop a method for the quantitative analysis of MNP in multicomponent finished products with rifampicin, several analyses were carried out to choose the best column configuration for minimum analysis time with high efficiency and resolution. LC conditions were optimized by screening such columns as Acquity CSH, Kinetex F5, Cosmosil 2.5 HILIC, and Hypersil GOLD Phenyl. The best peak shape of the analyte and shortest analysis time were obtained for the column Purospher® STAR Phenyl.

The important part related to the development of the LC-MS/MS method also concerned the design of a suitable solvent gradient that would allow the MS valve to cut off active substances and placebo for determination of MNP at very low levels without the problems associated with ionization suppression.

Optimization of MS/MS condition was made using Agilent Optimizer (B.07.01) MRM not only for MNP but also for 1-amino-4-methylpiperazine and 1-methylpiperazine compounds were determined for selectivity and stress studies. MNP-d4 was selected as the internal standard.

The most difficult part of optimizing the MNP determination method was to develop a suitable sample preparation method to efficiently extract the MNP into the solution. The first developed method for preparation of the sample for component products 1, 2, and 3 with rifampicin was extraction into 5 mL of methanol, followed by centrifugation and filtration of the supernatant. This method did not work for 4-component products with rifampicin, as a broad peak with low intensity from MNP was observed. The investigation of the pH of multi-component products with rifampicin in aqueous solution showed that one-component products have a pH of 6.45, 2-component products have a pH of 6.63, and 3-component products have a pH of 7.54, while 4-component products have a pH of 4.63. The lower pH of the 4-component solution of the rifampicin product originates from the presence of ethambutol hydrochloride in the product, which caused a matrix effect and solvent effect. The matrix effect was observed in the chromatogram as a loss response for the target analyte and internal standard. Therefore, a second extraction method was developed for the 4-component product with rifampicin to a solution of methanol: water (1:1, *v/v*) with the addition of a base (NaOH). The ratio of water to methanol was optimized to obtain the best possible extraction. The developed method was validated, and its results were compared with the method of extraction into methanol. The results of both methods were presented in Table S1.

2.2. Validation Results

The specificity of the method was verified as described in Section 4.6, no interference was observed in the retention time of MNP, the standard added to the sample did not cause peaks splitting and the matrix did not affect the result (Figures S1–S12). Figures 2 and 3 show chromatograms of standard solution for MNP and MNP-d4, respectively.

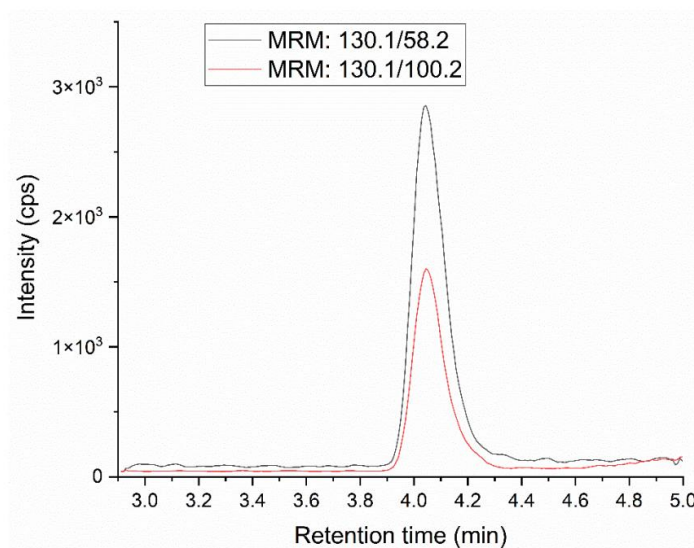


Figure 2. MRM chromatogram of standard solution at 100% concentration level for MNP (130.1 > 100.2 red curve, 130.1 > 58.2 black curve).

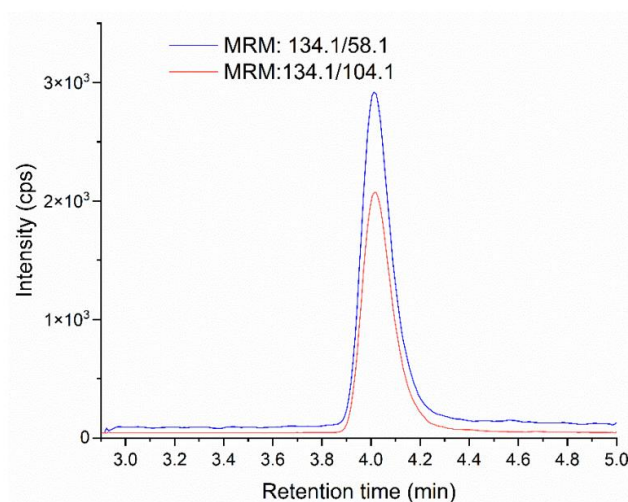


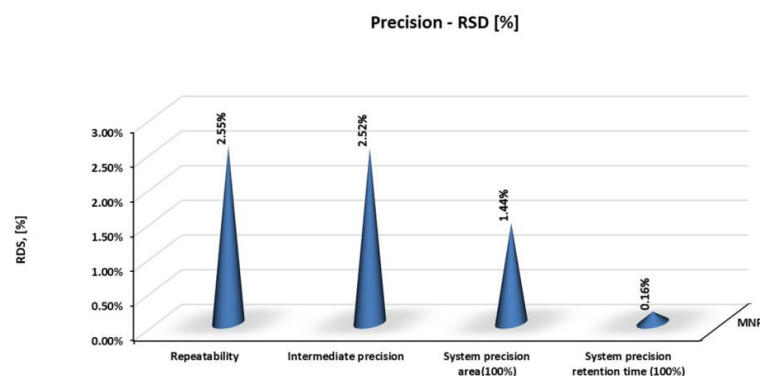
Figure 3. MRM chromatogram of standard solution at 100% concentration level for MNP-d4 (134.1 > 58.1 blue curve, 134.1 > 104.1 red curve).

Results for range, linearity, accuracy, limit of detection (LOD), and limit of quantification (LOQ) were summarized in Table 1. The linearity of the method was evaluated in the concentration range of 0.51–48.62 ng/mL for MNP, and the coefficients of determination R^2 for MNP were ≥ 0.999 , clearly indicating very good detection responses. The method range was established from the LOQ to up to 280% of the specification limit due to the high content of MNP in some of the samples tested. The recoveries for MNP were in the range of $100.38 \pm 3.24\%$ with $RSD = 8.17\%$.

Table 1. Validation results for LC-MS/MS method.

Acceptance Criteria	Results for MNP
Range: LOQ–120% [ng/mL]	0.51–48.62
Linearity	
$R^2 \geq 0.990$	0.9997
a	0.0499
b	0.0096
S_a	0.0003
S_b	0.0074
S_{xy}	0.0152
Accuracy	
Recovery 60–115%	100.38
RSD $\leq 21\%$	8.17
LOD [ng/mL]	0.51
LOQ [ng/mL]	1.52

As demonstrated in Figure 4, method precision for MNP content determination was evaluated by repeatability, intermediate precision, and system precision, with satisfactory RSD values below 2.6%.

**Figure 4.** Results of precision for MNP content in 4-component Rifampicin product.

The LOD and LOQ were calculated both ways from linearity and ratio peak/noise height, the calculations were very similar and are summarized in Table 1. The results for LOD and LOQ were satisfactory and LOQ was (as in acceptance criteria) below 30% of the specification limit. The MRM chromatograms for LOD and LOQ are shown in Figures S13 and S14. The robustness of the LC-MS/MS method was evaluated on the standard solution to determine critical factors that most likely can affect an HPLC separation. The evaluation of method robustness was conducted by applying small variations of chromatographic parameters: column temperature $\pm 5^\circ\text{C}$, autosampler temperature: $\pm 5^\circ\text{C}$, flow rate: $\pm 0.05\text{ mL/min}$, and mobile phase composition: $\pm 2\%$ eluent B. The results (Table S2) confirmed the robustness of the method. The symmetry factor for MNP peak was in the acceptance criteria range of $0.8 \leq A_s \leq 1.5$.

Moreover, during validation stability for reference solution at 100% concentration level, LOQ solution, and sample solution of four-component rifampicin product under autosampler conditions were investigated. RSD% (area quotient MNP/MNP-d4) for reference solution at 100% concentration level after 24 h in 10°C was 0.98%, for LOQ solution after 24 h in 10°C was 5.05%, and for sample solution of four-component rifampicin product after 8 h in 10°C 4.6%, respectively (Tables S3–S5). The research showed the stability of tested solutions over the time period studied.

2.3. Stability and Stress Studies

Figures 5 and 6 show the results of accelerated stability studies performed according to ICH guidelines after 1 and 3 months of storage at 25 °C, 60% RH, and 40 °C, 75% RH, respectively [33]. The MNP content of the 4-component product with rifampicin increased, as confirmed by previous studies for API (30 days) [13].

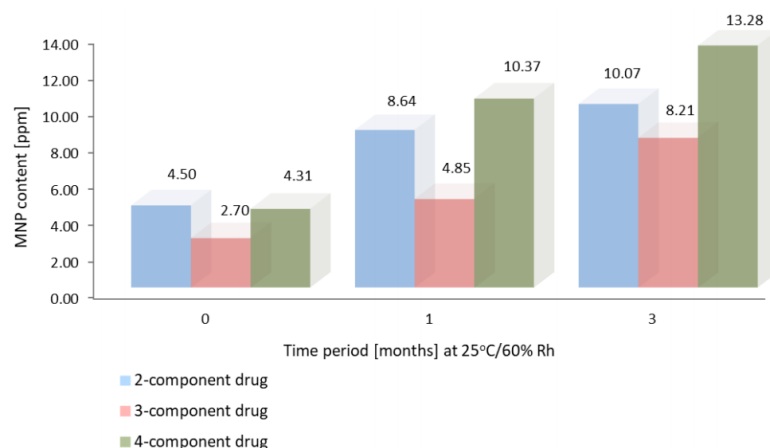


Figure 5. The results of accelerated stability studies (25 °C, 60% RH) for 2, 3, and 4-component Rifampicin products.

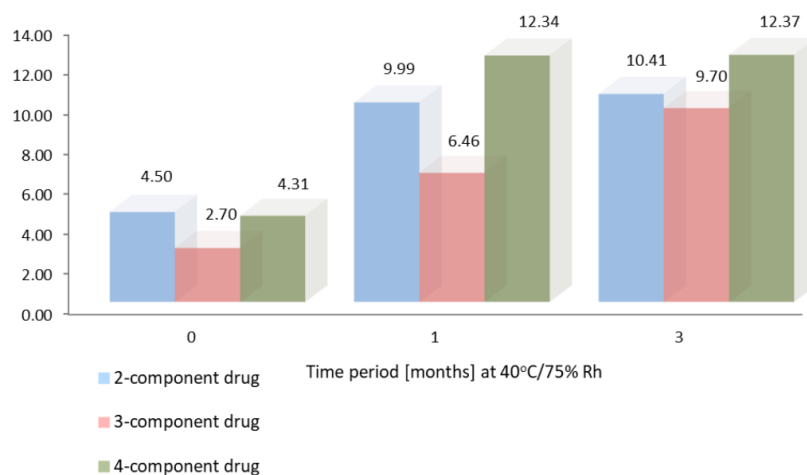


Figure 6. The results of accelerated stability studies (40 °C, 75% RH) for 2, 3, and 4-component Rifampicin products.

The results of the forced degradation studies carried out in accordance with ICH guidelines and publications [33,34] are summarized in Table 2 [33,34]. As reported before a rapid decomposition of rifampicin is observed in acid, alkaline, oxidative and thermal (>70 °C) conditions [35–37]. In our experiments, a significant increase in MNP concentration was observed in an oxidizing environment, as well as in thermal stress that takes place in an airy atmosphere.

Table 2. The results of stress studies for four component Rifampicin product.

Degradation Conditions	MNP Content [ppm]
Control sample (before degradation)	7.07
Alkaline hydrolysis (0.1 M NaOH, 1 h, RT)	7.26
Oxidative degradation (3% H ₂ O ₂ , 1 h, RT)	2920
Thermal stress (80 °C, 24 h, RT)	8.62

For further identification of the mechanism of MNP formation in rifampicin products, additional experiments were performed investigating the presence of both amines: 1-methyl-piperazine and 1-amino-4-methyl-piperazine (4A1MA), and MNP before and after degradation (Table 3). In samples of both API and the 4-component rifampicin drug, the presence of 1-amino-4-methyl-piperazine, which comes from the synthesis pathway, was detected. Compound 1-methyl-piperazine was not found in the samples tested.

Table 3. MNP and 4A1MA content in rifampicin and 4-component rifampicin product after degradation studies.

Stress Conditions	1-Amino-4-Methyl-Piperazine [ppm]	MNP [ppm]
API		
control	0.841	3.146
0.1 HCl, 1 h, 25 °C	3.020	3.648
0.1 HCl, 1 h, 25 °C + 3% H ₂ O ₂	2.821	2601
4-component rifampicin product		
control	10.186	3.871
0.1 HCl, 1 h, 25 °C	20.922	3.616
0.1 HCl, 1 h, 25 °C + 3% H ₂ O ₂	10.494	654

The content of this 1-amino-4-methyl-piperazine increases under acidic conditions due to the fact that rifampicin decomposes to 1-amino-4-methylpiperazine under these conditions, as described in the literature [38]. Next, a hydroxide water addition experiment was performed and oxidation of the amine to MNP was observed (Table 3).

3. Discussion

The developed and validated method was used to assess the presence of MNP in rifampicin multicomponent drugs. In the two-component rifampicin drugs, the MNP content ranged from 3.7 to 4.7 ppm, in the three-component drugs from 2.5 to 2.7 ppm, and in the four-component drugs from 3.9 to 7.5 ppm.

Forced degradation studies are essential to establish the stability of the API/drug product, learn about potential toxic degradation products, and also to develop sensitive analytical methods for stability specification. In our study, stress tests (thermal, oxidative, alkaline and acid hydrolysis) were conducted to investigate the changes in the MNP content in a four-component drug product with rifampicin and to confirm possible mechanisms of the formation of this nitrosamine.

In our experiments, a significant increase in MNP concentration was observed in an oxidizing environment, as well as in thermal stress that takes place in an airy atmosphere. The content of 1-amino-4-methyl-piperazine increases under acidic conditions due to the fact that rifampicin decomposes to 1-amino-4-methylpiperazine under these conditions,

as described in the literature [38]. In acid conditions, the main decomposition product of rifampicin is 3-formyl rifampicin SV and 1-amino-4-methyl-piperazine [35,38,39]. Next, under oxidative conditions, the resulting amine is further oxidized to MNP, the content of which increases. The MNP content does not increase in direct proportion to the decrease in amine content, indicating that simultaneous oxidation of the amine and further degradation of rifampicin is observed. These results were also confirmed using the LC-QTOF method, high-resolution mass spectra, and elemental compositions for MNP and 1-amino-4-methylpiperazine are included in Supplementary Material (Table S6 and Figures S15–S18).

Based on this study, we proposed a mechanism for MNP formation during degradation studies, which is shown in Figure 7.

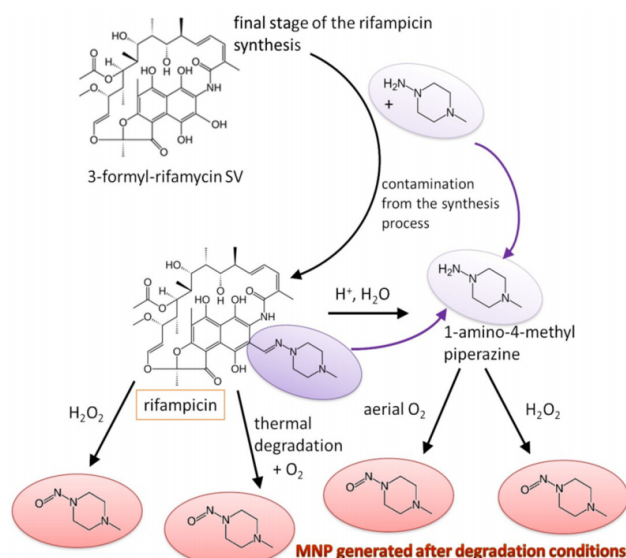


Figure 7. Mechanisms of MNP formation during degradation studies.

Considering the process of the formation of nitrosamines into a drug product, especially a multicomponent one, is quite complex and challenging. The literature indicates that three conditions must be met for nitrosamines to be formed: the presence of a nitrosating agent or its precursor (nitrites), the presence by synthesis of a secondary or tertiary amine (which may be a component of the drug substance), and suitable conditions to allow the reaction to take place, such as elevated temperature, acidic conditions [40–42]. API degradation is another mechanism that can lead to the formation of nitrosamines. In the case of rifampicin, only a temperature effect on MNP formation has previously been suggested [13]. Our study confirmed the effect of temperature on the MNP content in 2, 3, and 4-component products with rifampicin with access to atmospheric oxygen. With increasing storage temperature, humidity and time period, the MNP content of rifampicin drugs increases. The degradation studies described in this thesis revealed two mechanisms for the formation of MNP: the first through the oxidation of 1-amino-4-methylpiperazine (derived from the synthesis route), and the second through rifampicin degradation. As recommended by the FDA and EMA regulations, the amine content of products containing nitrate by synthesis should be strictly controlled and limited. The case of rifampicin clearly demonstrates that the formation of the nitrosamine MNP is also closely related to the presence of residual amine.

We propose a degradation mechanism for the formation of MNP by hydrolysis of a hydrazone of rifampicin to a hydrazine derivative, in this case to 1-amino-4-methylpiperazine. The hydrazine derivative can be oxidized to form an MNP impurity. It should be borne

in mind that hydrazones are stable and hydrolyze in an acidic medium to hydrazine derivatives, while hydrazine derivatives can oxidize to the corresponding nitrosamine impurity. Thus, we propose a two-step mechanism for rifampicin degradation: hydrolysis of the hydrazone followed by oxidation to MNP. It is worth noting that not all of 1-amino-4-methylpiperazine oxidizes to MNP, but the content of MNP increases significantly when the oxidizing agent is added. The second mechanism we propose is different and explains the formation of MNP at elevated temperatures. This is because it is possible that degradation occurs without the breakdown of the hydrazone. On the other hand, in this case, too, an oxidizing agent is needed, so that oxygen can first attach to the rifampicin structure and perhaps then break the bond giving the MNP impurity, or the bond breaks first and oxygen attaches later.

The temperature-induced degradation of rifampicin to MNP can also be inhibited if there is no access to oxygen and humidity from the air. We conclude that both oxygen, humidity, and acidic conditions can degrade rifampicin to MNP. Consider the fact that ethambutol hydrochloride added to rifampicin products is a hydrochloride and can be a source of such hydrolysis.

4. Materials and Methods

4.1. Materials

The standards 1-Methyl-4-nitrosopiperazine and 1-Methyl-4-nitrosopiperazine-d4 were obtained from TRC (North York, ON, Canada). Methanol hypergrade for LC-MS LiChrosolv[®], hydrogen peroxide 30% (Perhydrol[™], Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), hydrochloric acid 37% and sodium hydroxide were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). LC-MS grade water was purchased from Fisher Scientific (Hampton, NH, USA). Rifampicin and rifampicin finished medical products were acquired from several Marketing authorization holders (MAHs).

4.2. Equipment and Methods

The LC-MS/MS analysis was performed using 1290 LC (Agilent, Santa Clara, CA, USA) coupled with a 6460 Agilent triple quadrupole mass spectrometer with a Jetstream electrospray source. For LC analysis Purospher[®] STAR Phenyl (10 mm × 2.1 mm × 2.0 µm) column from Merck (Darmstadt, Germany) was used. All LC-MS/MS method experimental conditions are presented in Table 4. The MRM ion pair for MNP and MNP-d4 with optimized parameters are listed in Table 5, the MS monitoring time was 2.9 to 5 min.

The key results for stress studies were also confirmed on a MaXis 4G high-resolution, mass-accuracy mass spectrometer (Bruker Daltonic, Bremen, Germany) with a time-of-flight (TOF) analyzer coupled to an Ultimate 3000 ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany) to obtain a high-resolution mass spectrum and confirm the chemical formula. HPLC experimental conditions were the same as in the LC-MS/MS method.

4.3. Standard Solution Preparation

The MNP-d4 internal standard (IS) solution (1 µg/mL in methanol) was prepared from the internal stock solution MNP-d4 (5000 µg/mL in methanol). The MNP intermediate dilution was prepared by dissolving appropriate amounts of MNP certified reference material to reach 0.1 µg/mL of MNP in MeOH.

4.4. Sample Solution Preparation

135 mg of rifampicin four-component product (10 tablets thoroughly grated) was weighed into a 15 mL centrifuge tube and 100 µL of the internal standard solution, 2.4 mL of methanol, 2.35 mL of water and 150 µL 1 M NaOH (neutralization) were added. The mixture was vortex 1 min at 2000 rpm and then centrifuged by 10,000 × g rpm for 5 min. The supernatant was filtered through a 0.2 µm PTFE Whatman Mini-UniPrep[™] filter (Cytiva, Global Life Sciences Solutions Operations UK Ltd., Little Chalfont, Buckinghamshire, UK).

Table 4. LC-MS/MS method experimental conditions.

LC Parameters			
Mobile phase A	10 mM ammoniu formate pH = 9		
Mobile phase B	Methanol		
	Time, min	Eluent A, %	Eluent B, %
Gradient elution program:	0	90	10
	2.0	90	10
	5.0	5	95
	7.0	5	95
	7.2	90	10
	10.0	90	10
Column temperature	35 °C		
Autosampler temperature	10 °C		
Flow rate	0.3 mL/min		
Injection volume	5 µL		
MS parameters			
Gas temperature	350 °C		
Gas flow	11 L/min		
Nebulizer	50 psi		
Sheath gas temperature	350 °C		
Sheath gas flow	12 L/min		
Capillary	3000 V		
Nozzle Voltage	500 V		
Fragmentor	40		

Table 5. LC-MS/MS MRM transitions list.

Analyte Name	RT (min)	Precursor Ion	Fragmentor (V)	Product Ion 1	CE 1 (V)	Product Ion 2	CE 2 (V)
MNP	3.985	130.1	40	100.2	10	58.2	18
MNP-d4	3.944	134.1	70	104.1	8	58.1	24

4.5. Blank Preparation

The blank solution was prepared as described in Section 4.4, but without the addition of the sample.

4.6. Validation of the LC-MS/MS Method

The LC-MS/MS method validation for MNP content determination in rifampicin multi-component products was performed according to ICH guidelines on the following parameters: specificity, linearity, range, accuracy, repeatability, intermediate precision, robustness, stability of solutions, quantitation limit, and detection limit.

The specificity of the method was examined using blank solution, standard solution at 100% concentration level, sample solution of drug product, sample solution spiked with standard solution of MNP at 100% concentration level, 1-methyl-piperazine solution and 1-amino-4-methyl-piperazine solution (100 ng/mL) (Figures S1–S12). The calibration curve was prepared (from MNP intermediate dilution) at concentrations from LOQ to 280% (0.5–48.6 ng/mL) of the specified limit for MNP with respect to sample preparation due to high MNP content in the sample. The internal standard solution MNP-d4 was added at a concentration of 20 ng/mL. Slope a , intercept b and coefficient of determination R^2 and standard deviation S_a , S_b , S_{xy} were established as parameters characterizing the linearity. The accuracy of the method was evaluated at samples spiked with MNP at 80%, 100% and 120% of specification limit—9 sample solutions (triplicate independent preparations for solutions at each level). The acceptance criteria were: 60–115% and the precision at

each concentration should not exceed $RSD < 21\%$ according to the Association of Official Analytical Chemists [43].

The precision of the method was determined as repeatable—analysis of six sample solutions with intermediate precision—intra-laboratory variations, i.e., different day and analyst and system precision—six replicate injections of the standard solution. Acceptance criteria for the precision of the method were as follows: RSD should not exceed 21% , and the results should pass the Horwitz statistical test.

LOD and LOQ were calculated in two different ways. One with the Agilent software (B.07.00) using the signal-to-noise (S/N) ratio, where LOQ was defined as $S/N \geq 10$ and LOD as $S/N \geq 3$ and using linearity parameters: standard deviation of the response (σ) and slope of the curve (S), where $LOD = (3.3 \times \sigma/S)$ and $LOQ = (10 \times \sigma/S)$.

The robustness of the developed method was tested by injecting a standard solution after applying minor changes in chromatographic parameters: column temperature $\pm 5^\circ\text{C}$, autosampler temperature $\pm 5^\circ\text{C}$, flow rate $\pm 0.05\text{ mL/min}$ and mobile phase composition ($\pm 2\%$ of eluent B). The symmetry factor for the MNP peak and the resolution during this study were verified.

The stability of the solutions was evaluated by measuring the peak area quotient of MNP and MNP-d4 for reference solution at 100% concentration level (24 h, 10°C), LOQ solution (24 h, 10°C) and sample solution of Rifampicin product (four-component, 8 h, 10°C). The peak area mean Standard Deviation (SD) and Relative Standard Deviation ($RSD\%$) for each solution were calculated.

4.7. Stress Studies

The forced degradation test solutions (0.1 M NaOH , 0.1 M HCl , $3\% \text{ H}_2\text{O}_2$) were prepared as follows: 135 mg of sample was weighed into a 15 mL centrifuge tube, 2.5 mL of $0.1\text{ M NaOH}/0.1\text{ M HCl}/3\% \text{ H}_2\text{O}_2$ solution was added and stirred for 1 h. The sample was neutralized. Then, 2.4 mL of methanol and 100 μL of the MNP-d4 internal standard solution were added. The tube was capped, vortexed for 1 min at 2000 rpm and the solution was centrifuged at $10,000 \times g$ rpm for 5 min. The supernatant was filtered through a $0.2\text{ }\mu\text{m}$ PTFE Whatman Mini-UniPrep™ filter.

The thermal stress study at 80°C , 24 h was prepared as described in Section 4.4, but the sample was first placed on a Petri dish in an oven for 24 h at 80°C .

5. Conclusions

The LC-MS/MS method was developed for the determination of MNP—a genotoxic nitrosamine impurity in two-, three-, and four-component drug products (rifampicin/isoniazid/pyrazinamide/ethambutol hydrochloride). In the case of the four-component product, an effect of the matrix/solvent was observed, which required the development of appropriate sample preparation for analyte extraction. The method of quantitative determination of MNP was validated to ensure its appropriate use with a Limit Of Detection (LOD) of 0.15 ppm in two- and three- and four-component medicines. The developed method was successfully applied to the analysis of rifampicin products from various manufacturers, providing the first detailed insight into MNP contamination. The study has demonstrated various levels and sources of MNP: as an impurity from the synthesis pathway and as a degradation product of rifampicin. MNP formation in medical products with rifampicin was found to be time, temperature, and degradation environment (0.1 M HCl , $3\% \text{ H}_2\text{O}_2$) dependent. Additional degradation experiments that can explain the origin of MNP impurity were conducted and the mechanism of this impurity formation was discussed. It was emphasized that the content of 1-amino-4-methyl-piperazine should be reduced and strictly controlled due to the possibility of its oxidation to MNP. A much more serious mechanism appears to be that of direct oxidation of rifampicin and its degradation to MNP. Work to elucidate this mechanism continues in our laboratory.

The developed method is intended to provide implementers with insight into where MNP contamination is coming from, and how the identification and quantification of MNP in multicomponent rifampicin products may impact the safety of medical products.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/molecules28217405/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, supervision, methodology, E.U.S.; methodology, validation, formal analysis, investigation, visualization, A.B.W.; formal analysis, A.W.; visualization, A.L.-C.; writing—original draft, A.B.W. and E.U.S.; writing—review and editing, A.B.W., A.L.-C. and E.U.S.; funding acquisition, A.W. and E.U.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The project was financially supported by the Polish Ministry of Health: subvention No. 10/2023.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: Anna Witkowska would like to thank the Ministry of Science and Higher Education: contract number DWD/5/0401/2021. The authors would like to thank Michał Odrowąż-Sypniewski for his support in this study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Potential Dangers of Nitrosamines in Rifampin and Rifapentine. Available online: <https://www.adamsonlab.com/potential-dangers-of-nitrosamines-in-rifampin-and-rifapentine/> (accessed on 13 May 2021).
2. Grobbelaar, M.; Louw, G.E.; Sampson, S.L.; van Helden, P.D.; Donald, P.R.; Warren, R.M. Evolution of Rifampicin Treatment for Tuberculosis. *Infect. Genet. Evol.* **2019**, *74*, 103937. [CrossRef] [PubMed]
3. Beloor Suresh, A.; Rosani, A.; Wadhwa, R. *Rifampin*; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2023.
4. Alfarisi, O.; Alghamdi, W.A.; Al-Shaer, M.H.; Dooley, K.E.; Peloquin, C.A. Rifampin vs. Rifapentine: What Is the Preferred Rifamycin for Tuberculosis? *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* **2017**, *10*, 1027–1036. [CrossRef] [PubMed]
5. Bharate, S.S. Critical Analysis of Drug Product Recalls Due to Nitrosamine Impurities. *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 2923–2936. [CrossRef] [PubMed]
6. Committee for Medicinal Products for Human Use. ICH M7(R2) Guideline on Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk; European Medicines Agency: Amsterdam, The Netherlands, 2023. Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m7-assessment-control-dna-reactive-mutagenic-impurities-pharmaceuticals-limit-potential> (accessed on 29 October 2023).
7. Akkaraju, H.; Tatia, R.; Mane, S.S.; Khade, A.B.; Dengale, S.J. A Comprehensive Review of Sources of Nitrosamine Contamination of Pharmaceutical Substances and Products. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2023**, *139*, 105355. [CrossRef]
8. Cioc, R.C.; Joyce, C.; Mayr, M.; Bream, R.N. Formation of N-Nitrosamine Drug Substance Related Impurities in Medicines: A Regulatory Perspective on Risk Factors and Mitigation Strategies. *Org. Process. Res. Dev.* **2023**, *27*, 1736–1750. [CrossRef]
9. Sedlo, I.; Kolonić, T.; Tomić, S. Presence of Nitrosamine Impurities in Medicinal Products. *Arch. Ind. Hyg. Toxicol.* **2021**, *72*, 1–5. [CrossRef]
10. Tuesuwan, B.; Vongsutilers, V. Nitrosamine Contamination in Pharmaceuticals: Threat, Impact, and Control. *J. Pharm. Sci.* **2021**, *110*, 3118–3128. [CrossRef]
11. Pettersson, S.; Pérez-Nueno, V.I.; Ros-Blanco, L.; de La Bellacasa, R.P.; Rabal, M.O.; Batllori, X.; Clotet, B.; Clotet-Codina, I.; Armand-Ugón, M.; Esté, J.; et al. Discovery of Novel Non-Cyclam Polynitrogenated CXCR4 Coreceptor Inhibitors. *ChemMedChem* **2008**, *3*, 1549–1557. [CrossRef]
12. Charushnikov, K.A.; Sulimov, S.G.; Petrov, A.Y.; Nesterova, E.M.; Kuteliya, A.V.; Feklistova, V.F.; Vetrova, V.A. Method of Preparing 1-Nitroso-4-Methylpiperazine RU2095355C1. 2017. Available online: <https://patents.google.com/patent/RU2095355C1/en> (accessed on 29 October 2023).
13. Tao, X.; Tian, Y.; Liu, W.H.; Yao, S.; Yin, L. Trace Level Quantification of 4-Methyl-1-Nitrosopiperazine in Rifampicin Capsules by LC-MS/MS. *Front. Chem.* **2022**, *10*, 834124. [CrossRef]
14. Keefer, L.K.; Fodor, C.H. Facile Hydrogen Isotope Exchange as Evidence for an α -Nitrosamino Carbanion. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 5747–5748. [CrossRef]
15. Zeiger, E.; Legator, M.S.; Lijinsky, W. Mutagenicity of N-Nitrosopiperazines for Salmonella Typhimurium in the Host-Mediated Assay. *Cancer Res.* **1972**, *32*, 1598–1599. [PubMed]

16. Hoffmann, D.; Raineri, R.; Hecht, S.S.; Maronpot, R.; Wynder, E.L. A Study of Tobacco Carcinogenesis. XIV. Effects of N'-Nitrosomonicotine and N'-Nitrosonanabasine in Rats 2. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **1975**, *55*, 977–981. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. European Medicines Agency Appendix 1 to Questions and Answers for Marketing Authorisation Holders/Applicants on the CHMP Opinion for the Article 5(3) of Regulation (EC) No 726/2004 Referral on Nitrosamine Impurities in Human Medicinal Products; Acceptable Intakes Established for N-Nitrosamines. Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/appendix-1-acceptable-intakes-established-n-nitrosamines.pdf> (accessed on 24 October 2023).
18. Paglialunga, S.; van Haarst, A. The Impact of N-Nitrosamine Impurities on Clinical Drug Development. *J. Pharm. Sci.* **2023**, *112*, 1183–1191. [\[CrossRef\]](#)
19. FDA. Laboratory Analysis of Rifampin/Rifapentine Products. Available online: <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/laboratory-analysis-rifampinrifapentine-products> (accessed on 29 August 2023).
20. Scherf-Clavel, O.; Kinzig, M.; Besa, A.; Schreiber, A.; Bidmon, C.; Abdel-Tawab, M.; Wohlfart, J.; Sörgel, F.; Holzgrabe, U. The Contamination of Valsartan and Other Sartans, Part 2: Untargeted Screening Reveals Contamination with Amides Additionally to Known Nitrosamine Impurities. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2019**, *172*, 278–284. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
21. Yang, J.; Marzan, T.A.; Ye, W.; Sommers, C.D.; Rodriguez, J.D.; Keire, D.A. A Cautionary Tale: Quantitative LC-HRMS Analytical Procedures for the Analysis of N-Nitrosodimethylamine in Metformin. *AAPS J.* **2020**, *22*, 89. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. FDA. Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry (LC-ESI-HRMS) Method for the Determination of MNP in Rifampin and CPNP in Rifapentine Drug Substance and Drug Product. Available online: <https://www.fda.gov/media/142092/download> (accessed on 29 August 2023).
23. Wichitnithad, W.; Sudtanon, O.; Srisunak, P.; Cheewatanakornkool, K.; Nantaphol, S.; Rojsithisak, P. Development of a Sensitive Headspace Gas Chromatography–Mass Spectrometry Method for the Simultaneous Determination of Nitrosamines in Losartan Active Pharmaceutical Ingredients. *ACS Omega* **2021**, *6*, 11048–11058. [\[CrossRef\]](#)
24. Giménez-Campillo, C.; Pastor-Belda, M.; Campillo, N.; Hernández-Córdoba, M.; Viñas, P. Development of a New Methodology for the Determination of N-Nitrosamines Impurities in Ranitidine Pharmaceuticals Using Microextraction and Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Talanta* **2021**, *223*, 121659. [\[CrossRef\]](#)
25. Schülé, A.; Ates, C.; Palacio, M.; Stofferis, J.; Delatinne, J.-P.; Martin, B.; Lloyd, S. Monitoring and Control of Genotoxic Impurity Acetamide in the Synthesis of Zaurategrast Sulfate. *Org. Process. Res. Dev.* **2010**, *14*, 1008–1014. [\[CrossRef\]](#)
26. Kecili, R.; Billing, J.; Leeman, M.; Nivhede, D.; Sellergren, B.; Rees, A.; Yilmaz, E. Selective Scavenging of the Genotoxic Impurity Methyl P-Toluenesulfonate from Pharmaceutical Formulations. *Sep. Purif. Technol.* **2013**, *103*, 173–179. [\[CrossRef\]](#)
27. Székely, G.; Bandarra, J.; Heggie, W.; Ferreira, F.C.; Sellergren, B. Design, Preparation and Characterization of Novel Molecularly Imprinted Polymers for Removal of Potentially Genotoxic 1,3-Diisopropylurea from API Solutions. *Sep. Purif. Technol.* **2012**, *86*, 190–198. [\[CrossRef\]](#)
28. Witkowska, A.B.; Giebułtowicz, J.; Dąbrowska, M.; Stolarczyk, E.U. Development of a Sensitive Screening Method for Simultaneous Determination of Nine Genotoxic Nitrosamines in Active Pharmaceutical Ingredients by GC-MS. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 12125. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. de Souza, G.F.P.; Araujo Vieira Matos, M.F.; de Castro Aglio, T.; Salles, A.G.; Rath, S. A Comprehensive LC-UHPLC-MS/MS Method for the Monitoring of N-Nitrosamines in Lipophilic Drugs: A Case Study with Rifampicin. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2023**, *236*, 115685. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
30. Luo, F.; Liu, Y.; Xie, Y.; Hou, W.; Zhang, L.; Zhang, Z. Simultaneous Determination of 13 Nitrosamine Impurities in Biological Medicines Using Salting-out Liquid-Liquid Extraction Coupled with Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2022**, *218*, 114867. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
31. Kalauz, A.; Tiringier, K.V.; Horváth, V.; Kapui, I. Simultaneous Determination of Low Molecular Weight Nitrosamines in Pharmaceutical Products by Fast Gas Chromatography Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2023**, *1708*, 464323. [\[CrossRef\]](#)
32. Schmidtsdorff, S.; Neumann, J.; Schmidt, A.H.; Parr, M.K. Analytical Lifecycle Management for Comprehensive and Universal Nitrosamine Analysis in Various Pharmaceutical Formulations by Supercritical Fluid Chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2021**, *197*, 113960. [\[CrossRef\]](#)
33. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. *ICH Topic Q 1 A (R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products Step 5 Note for Guidance on Stability Testing: Stability Testing of New Drug Substances and Products*; European Medicines Agency: Amsterdam, The Netherlands, 2003. Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q1a-r2-stability-testing-new-drug-substances-drug-products-scientific-guideline> (accessed on 29 October 2023).
34. Blessy, M.; Patel, R.D.; Prajapati, P.N.; Agrawal, Y.K. Development of Forced Degradation and Stability Indicating Studies of Drugs—A Review. *J. Pharm. Anal.* **2014**, *4*, 159–165. [\[CrossRef\]](#)
35. Gallo, G.G.; Radaelli, P. Rifampin. In *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 1976; Volume 5, pp. 467–513. [\[CrossRef\]](#)
36. Alves, R.; Reis, T.V.d.S.; Silva, L.C.C.d.; Storpirtis, S.; Mercuri, L.P.; Matos, J.d.R. Thermal Behavior and Decomposition Kinetics of Rifampicin Polymorphs under Isothermal and Non-Isothermal Conditions. *Braz. J. Pharm. Sci.* **2010**, *46*, 343–351. [\[CrossRef\]](#)
37. Swamy, N.; Basavaiah, K.; Vamsikrishna, P. Stability-Indicating HPLC Determination of Rifampicin in Bulk Drug and Dosage Form. *Pharm. Chem. J.* **2019**, *53*, 580–588. [\[CrossRef\]](#)

38. Mwila, C.; Walker, R.B. Improved Stability of Rifampicin in the Presence of Gastric-resistant Isoniazid Microspheres in Acidic Media. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 234. [CrossRef]
39. Beard, J.C.; Swager, T.M. An Organic Chemist's Guide to N-Nitrosamines: Their Structure, Reactivity, and Role as Contaminants. *J. Org. Chem.* **2021**, *86*, 2037–2057. [CrossRef]
40. Bayne, A.-C.V.; Misić, Z.; Stemmler, R.T.; Wittner, M.; Frerichs, M.; Bird, J.K.; Besheer, A. N-Nitrosamine Mitigation with Nitrite Scavengers in Oral Pharmaceutical Drug Products. *J. Pharm. Sci.* **2023**, *112*, 1794–1800. [CrossRef] [PubMed]
41. Moser, J.; Ashworth, I.W.; Harris, L.; Hillier, M.C.; Nanda, K.K.; Scrivens, G. N-Nitrosamine Formation in Pharmaceutical Solid Drug Products: Experimental Observations. *J. Pharm. Sci.* **2023**, *112*, 1255–1267. [CrossRef] [PubMed]
42. Horne, S.; Vera, M.D.; Nagavelli, L.R.; Sayeed, V.A.; Heckman, L.; Johnson, D.; Berger, D.; Yip, Y.Y.; Krahn, C.L.; Sizukusa, L.O.; et al. Regulatory Experiences with Root Causes and Risk Factors for Nitrosamine Impurities in Pharmaceuticals. *J. Pharm. Sci.* **2023**, *112*, 1166–1182. [CrossRef] [PubMed]
43. Association of Official Analytical Chemists Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. Available online: https://www.aoac.org/wp-content/uploads/2019/08/app_f.pdf (accessed on 24 October 2023).

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

3.4 Publikacja 4 (oryginalna)

Witkowska, A.B.; Stolarczyk, K.; Fusaro, M.; Leś, A.; Giebułtowicz, J.; Stolarczyk, E.U. Oxidation and Reduction of Hydrazones—Risk Factors Related to the Manufacture and Stability of the Drugs; *International Journal of Molecular Sciences* 2025; 26(9):1-20. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms26094295>



Article

Oxidation and Reduction of Hydrazones—Risk Factors Related to the Manufacture and Stability of the Drugs

Anna B. Witkowska ^{1,2} , Krzysztof Stolarczyk ³ , Massimo Fusaro ³, Andrzej Leś ³ , Joanna Giebułtowicz ² and Elżbieta U. Stolarczyk ^{1,*}

¹ Spectrometric Methods Department, National Medicines Institute, Chelmska 30/34, 00-725 Warsaw, Poland; a.witkowska@nil.gov.pl

² Department of Drug Chemistry, Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Medical University of Warsaw, 61 Żwirki i Wigury, 02-091 Warsaw, Poland; j.giebułtowicz@wum.edu.pl

³ Faculty of Chemistry, University of Warsaw, 1 Pasteura Street, 02-093 Warsaw, Poland; kstolar@chem.uw.edu.pl (K.S.); maxitp@gmail.com (M.F.); ales@chem.uw.edu.pl (A.L.)

* Correspondence: e.stolarczyk@nil.gov.pl

Abstract: This study aimed to evaluate the use of electrochemistry to generate the oxidation and reduction products of active pharmaceutical ingredients (APIs) with a hydrazone group, including dantrolene, nitrofurantoin, furazidine, and nitrofur. In the first step, cyclic voltammetry was employed to assess the electroactivity of these compounds. In the second step, the transformation products of selected APIs following electrochemical oxidation and reduction were analyzed using the ROXY EC System equipped with a μ -PrepCell™ 2.0, coupled with a high-resolution Q-TOF mass spectrometer. The identification of transformation products was based on accurate mass, isotopic distribution, and fragmentation pattern. Seventeen API impurities were identified in this study, contributing to insights into drug stability and potential risks associated with their manufacture. Experimental findings were supported by the quantum mechanical DFT calculations of the molecular energies. In addition, using commercially available in silico software, the predicted metabolic products were compared with those obtained by experimental methods. The electrochemical approach proved useful as a test for determining the stability of compounds, the detection of new impurities and structure determination using high-resolution mass spectrometry.

Keywords: oxidation; reduction; stability; electrochemistry; DFT; in silico methods



Academic Editor: Josef Jampilek

Received: 30 March 2025

Revised: 24 April 2025

Accepted: 28 April 2025

Published: 1 May 2025

Citation: Witkowska, A.B.; Stolarczyk, K.; Fusaro, M.; Leś, A.; Giebułtowicz, J.; Stolarczyk, E.U. Oxidation and Reduction of Hydrazones—Risk Factors Related to the Manufacture and Stability of the Drugs. *Int. J. Mol. Sci.* **2025**, *26*, 4295. <https://doi.org/10.3390/ijms26094295>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Knowledge of drug degradation and metabolism pathways is essential to ensure the safety and efficacy of drug therapy for patients. The global crisis related to the contamination of medical products with carcinogenic *N*-nitrosamines and nitrosamine drug substance-related impurities (NDSRIs), ongoing since 2018, has highlighted the urgent need to develop new methods to predict potentially toxic drug impurities and to control them using appropriate techniques [1]. Bringing a drug product to the market requires extensive stability studies to confirm its quality, safety, efficacy, and stated shelf life. It is of paramount importance to predict as early as possible what may occur during the lifetime of a pharmaceutical product, as this information can significantly shape product development strategies [2]. Electrochemistry has been effectively utilized to replicate the drug metabolism processes typically mediated by cytochrome P450 enzymes. This is accomplished through a series of reactions simulated using electrochemical methods [3–5]. Examples of metabolic reactions mimicked by electrochemical approaches include O-dealkylation [6], dehydrogenation [7],

benzyl hydroxylation [8], N,S-oxidation [9], N-dealkylation [10], aromatic ring hydroxylation [11], allylic and aliphatic hydroxylation, and hydroxylation [12]. Electrochemistry (EC) is a rapidly evolving analytical tool in the field of predicting drug oxidation/reduction and degradation products, thereby aiding in the assessment of drug stability. Predicting drug degradation by EC-MS can help identify new, potentially concerning impurities such as nitroso-compounds [13]. Over the past four decades, the applications of EC-MS have expanded significantly.

Recent advancements in combining electrochemistry with mass spectrometry include studies on the following:

- drug metabolism [4,12,14];
- characterization of the reducing potencies of antioxidants [15];
- synthesis of pharmaceutical oxidation products [16];
- peptide, protein, and nucleotide research [17–19];
- hydrogen/deuterium exchange [20];
- prediction of transformation products in the environment [21];
- investigation of the oxidative stability of drugs [22,23].

The processes that occur in living organisms are fundamentally redox reactions involving oxidation and reduction. In EC-MS, the substances can be oxidized or reduced on the surface of a working electrode depending on the potential applied voltage, making this technique a promising tool for mimicking oxidative Phase I and even conjugative Phase II metabolism. EC studies can be conducted in two modes, which are online and offline. The online mode enables the detection of both stable and short-lived species thanks to the direct connection of the electrochemical cell to the mass spectrometer, while in offline mode, oxidation/reduction products and intermediates are collected and analyzed later [3] (Figure S1).

Various types of electrochemical reactors are employed in EC-MS research, with the most common being amperometric thin-layer cells and wall-jet electrochemical cells. Coulometric flow-through cells measure changes in generated potential, whereas amperometric cells measure the generated current [13]. Increasing attention is also being given to microfluidics and microchips [24,25]. Each electrochemical reactor is equipped with the following three electrodes: a reference electrode, an auxiliary electrode (AUX), and a working electrode (glassy carbon, titanium, platinum, gold or boron-doped diamond). The boron-doped diamond (BDD) electrode is particularly valued for its exceptional stability in aggressive environments and chemical inertness [26].

Over time, a wide variety of systems incorporating EC have been employed in research, the most popular currently being the coupling of electrochemistry with mass spectrometry (mainly high-resolution-HR), capillary electrophoresis with MS, and liquid chromatography with MS [17]. High-resolution mass spectrometry is the optimal choice for determining the exact masses of compounds generated in the EC flow cell and fragmentation patterns, facilitating the prediction of oxidation and reduction product structures. The electrospray ionization (ESI) source is the most commonly used in EC-HRMS coupling, offering high sensitivity and reliability at low flow rates [27–31].

As previously mentioned, EC-MS coupling has been applied in numerous contexts, yet no studies to date have explored the stability of drugs with hydrazone groups. The oxidation and reduction of hydrazones, hydrazides, and hydrazine-type compounds can lead to the formation of hazardous impurities [32–34], underscoring the urgent need to monitor the oxidation and reduction products of drugs containing a hydrazone group as part of risk analysis for their manufacture and stability. Electrochemistry has already been established as a tool for oxidative and reductive stress testing, proving to be a faster alternative that does not require strong oxidants [2]. Understanding how oxidative stress

affects a drug enables the determination of optimal storage conditions (e.g., temperature, humidity, light exposure) to maximize shelf life and prevent premature degradation. Oxidative degradation can produce byproducts that may be toxic or cause unwanted side effects. Understanding these pathways helps identify and mitigate potential risks to patients.

Our research is focused on impurities that may form following the oxidation/reduction of active pharmaceutical ingredients (APIs) with a hydrazone group, such as dantrolene, nitrofurantoin, furazidone, and nitrofur (nitrofurazone) (Figure 1).

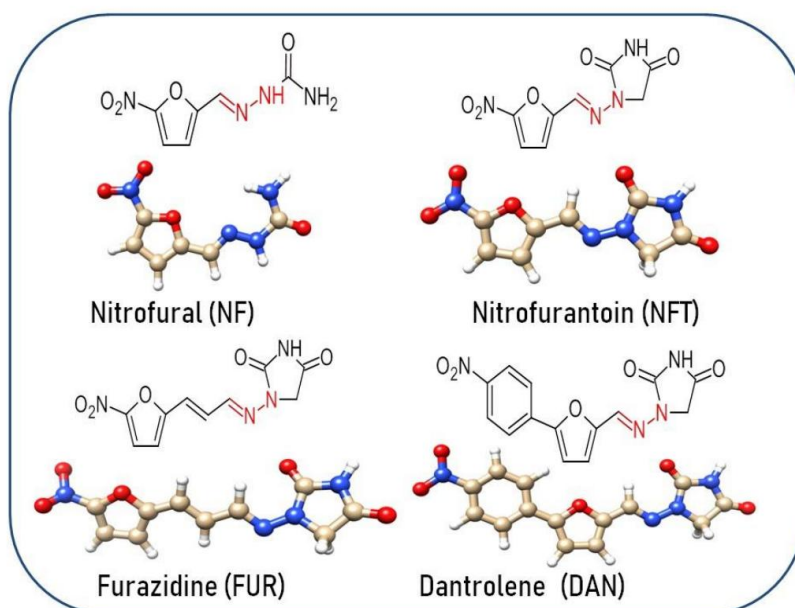


Figure 1. Structure of selected APIs for study.

The process of mineralization of nitrofur in water in the presence of chloride ions by electrochemical treatment has been previously studied by Kuznetsov et al. [35]. In this study, complete electrochemical destruction of nitrofur was achieved on BDD anodes after 30 min of treatment, and during that process, four oxidation products were identified, which were inter alia dichloro-derivatives of nitrofur. In the literature, one oxidation metabolite of nitrofur is known, which is 4-hydroxynitrofurazone, while the main product of its metabolism is semicarbazide, formed after reduction by azoreductase, and hydroxylamine is also produced [36–38]. For nitrofurantoin, one impurity is known following 4-hydroxylation, and reduction by nitroreductase may occur during metabolism, with the primary metabolite being 1-aminohydantoin [39,40]. For furazidone and dantrolene, oxidation and reduction products have not yet been investigated using EC-MS. Experimental data on the reduction and oxidation products of furazidone are not available in the literature. Dantrolene is metabolized to 5-hydroxydantrolene and may also undergo the reduction of its phenyl nitro group to aminodantrolene [41,42].

Due to the limited knowledge about the degradation products of APIs containing a hydrazone group, we aimed to apply a comprehensive approach using EC-MS-QTOF, DFT, and in silico metabolite simulations to identify novel API impurities. The EC-MS-QTOF combination employed provided rapid, reliable, and detailed structural information on drug metabolites and impurities. DFT calculations and in silico metabolite simulations further confirmed and complemented the electrochemical findings.

2. Results and Discussion

Electrochemistry has been applied to the pharmaceutical stability testing of DAN, FUR, NF, and NFT—active pharmaceutical ingredients—as model substances with hydrazone groups, with results compared to *in silico* predictions. Compounds with nitrogenous fragments in their structure can be a source of dangerous impurities and, therefore, should be studied and controlled. The ICH M7 guideline designates N-nitroso and alkyl-azoxy compounds, alongside aflatoxin-like substances, as a “cohort of concern” due to their potential mutagenic and carcinogenic risks [43].

Initial studies were conducted using electrochemical methods. This study also aimed to investigate whether the coupling of EC-HR/MS is a useful tool to quickly and easily elucidate degradation products and estimate drug stability for drugs with hydrazone group. Additionally, degradation products predicted using commercially available *in silico* software were compared to those obtained from the electrochemical methods.

2.1. Electrochemical Measurements

As a first step, electrochemical tests were performed to investigate whether the tested compounds are electroactive. The study using cyclic voltammetry was performed using a GCE electrode in the presence of furazidine (FUR), dantrolene (DAN), nitrofurantoin (NF), and nitrofurantoin (NFT) in deoxygenated solutions of acetonitrile and ammonium formate.

The first studies were performed in the potential range from 0 V to -1.5 V in the deoxygenated basic electrolyte solution. On the voltammetric curve (Figure 2A) recorded using the GCE electrode in the ACN/ammonium formate solution pH 7.4, no signals were observed in the potential range tested. In the deoxygenated solution of 1 mM FUR, a peak was observed on the voltammetric curve recorded in the solution at a potential of -0.635 V with a current value of -52.5 μ A; for 1 mM of DAN, there was a peak at a potential of -0.666 V with a current value of -23.7 μ A; for 1 mM of NF, there were peaks at potentials of -0.627 V with a current value of -41.2 μ A and -0.925 V with a current value of -41.8 μ A; and for 1 mM of NFT, there was a peak at a potential of -0.607 V with a current value of -34.8 μ A and a peak at a potential of -0.851 V with a current value of -38.5 μ A. All processes were irreversible.

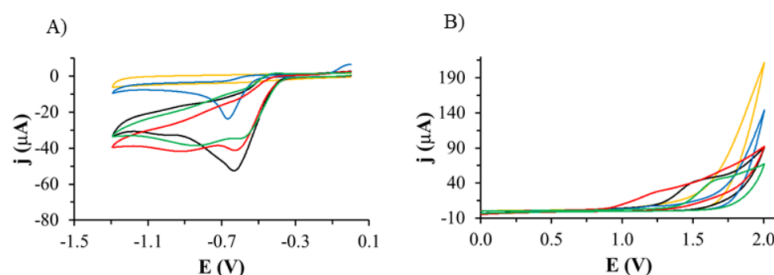


Figure 2. Cyclic voltammetric curves recorded using the GCE electrode in the range of potential: (A) from 0 V to -1.3 V and (B) from 0 V to 2.0 V in ACN/ammonium formate solution with a pH of 7.4 (yellow curve) containing 1 mM of FUR (black curve), 1 mM of DAN (blue curve), 1 mM of NF (red curve), and 1 mM of NFT (green curve), scan rate of 0.1 V/s.

Then, the tests were performed in the potential range from 0 V to 2.0 V in the basic electrolyte solution without the active substance (Figure 2B). No signals were observed on the voltammetric curves recorded in this potential range. In the solution containing 1 mM of FUR, a peak was observed on the voltammetric curve at a potential of 1.551 V with a current value of 41.5 μ A; for 1 mM of DAN, there was a peak at a potential of 1.306 V with a current value of 16.6 μ A; for 1 mM of NF, there was a peak at a potential of 1.222 V with

a current value of 24.5 μ A; and for 1 mM of NFT, a peak was observed at a potential of 1.732 V with a current value of 61.6 μ A. All processes were irreversible.

All the compounds tested are electrochemically active, as they undergo both oxidation and reduction in the potential ranges tested. This is manifested by the presence of corresponding peaks on the recorded voltammetric curves. This is consistent with the literature, where the presence of signals on the voltammetric curves recorded in aqueous solutions is related to the presence of easily reducible nitro groups in the structure of their molecules [44–48].

The electroreduction mechanisms of these compounds are quite complex and involve several electrochemical steps. Ultimately, this leads to the formation of a hydroxylamine derivative (RNHOH) or an amine (RNH₂). The electrochemical reduction processes of these compounds depend on both the electrode material and the pH of the solution. As a result of oxidation, intermediate oxidation products such as dimer, trimer, or polymers can be formed. Oxidative polycondensation reactions very often occur with these types of compounds [35].

Cyclic voltammetry cannot identify the structure of oxidation or reduction products; therefore, for the next part of the work, the ROXY system coupled with MS was used.

2.2. Electrochemical Measurements ROXY-QTOF

The ROXY electrochemical reactor cell (EC) was used to generate reduction and oxidation API impurities. Measurements were made at different potentials (from 0.0 V to 2.0 V for oxidation, from 0.0 V to −2.0 V for reduction). Selected compounds were subjected to electrochemical degradation, and the differences in resulting products were analyzed. Figures 3–6 show ion chromatograms (MS spectra) recorded at oxidation potentials for DAN, FUR, NF, and NFT, respectively. Figures 7–10 show ion chromatograms (MS spectra) recorded at reduction potentials for DAN, FUR, NF, and NFT, respectively. A total of seven impurities under oxidation conditions and ten impurities under reduction conditions were obtained and identified. The APIs themselves were used as templates for the interpretation of the unknown structures of products formed during electrochemical degradation. Many product ions were observed in the HR-MS/MS spectra of the pseudomolecular ions of DAN, FUR, NF, and NFT (Figures S2–S5). These data were used to propose the structures and fragmentation pathways for the detected impurities. The proposed structures of certain identified impurities are supported by the literature [35–42].

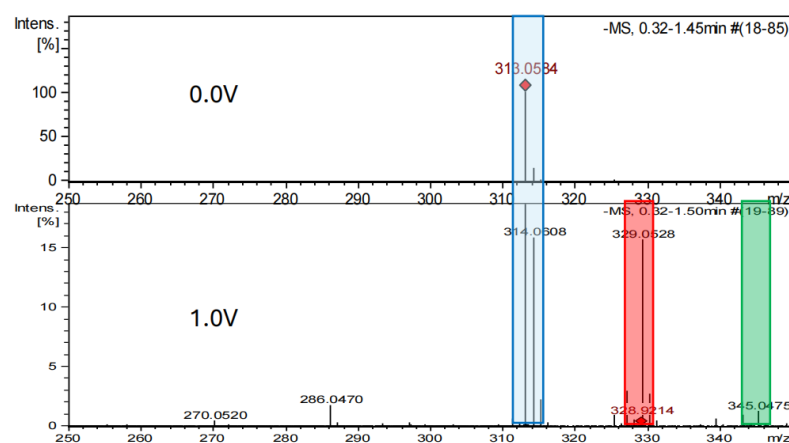


Figure 3. Comparison of ESI-MS spectra of oxidation products of dantrolene at 0.0 V and 1.0 V. Blue—dantrolene, red—DAN-Imp1-Ox, and green—DAN-Imp2-Ox.

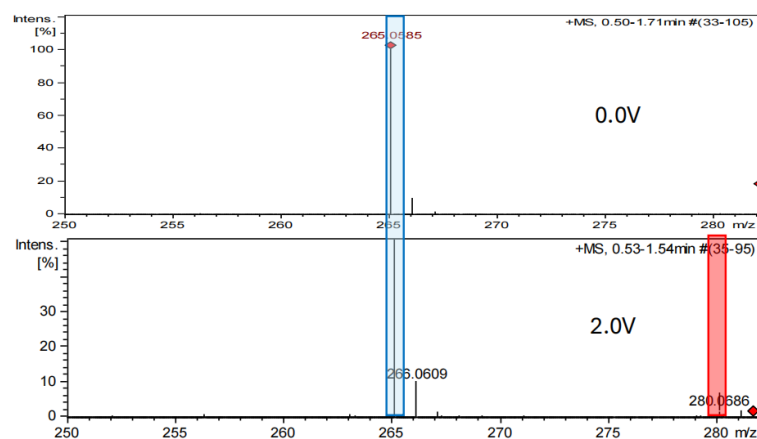


Figure 4. Comparison of ESI-MS spectra of oxidation products of furazidine at 0.0 V and 2.0 V. Blue—furazidine, and red—FUR-Imp1-Ox.

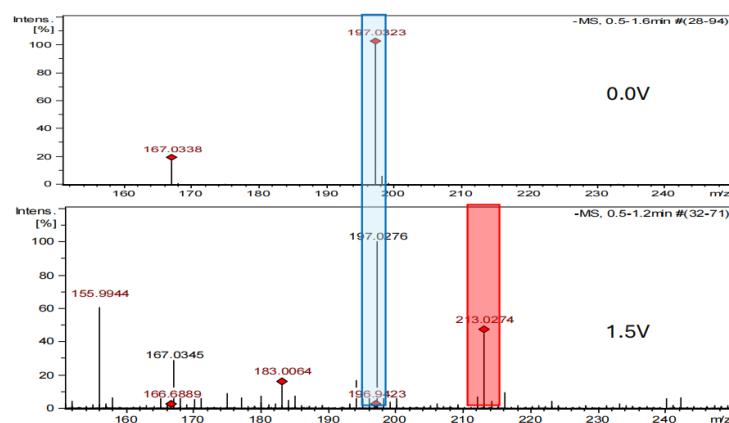


Figure 5. Comparison of ESI-MS spectra of oxidation products of nitrofur at 0.0 V and 1.5 V. Blue—nitrofur, and red—NF-Imp1-Ox.

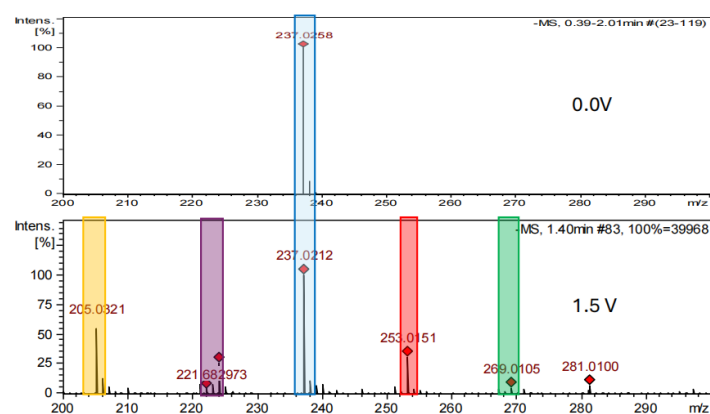


Figure 6. Comparison of ESI-MS spectra of oxidation products of nitrofurantoin at 0.0 V and 1.5 V. Blue—nitrofurantoin, red—NFT-Imp1-OX, purple—NFT-Imp2-OX, green—NFT-Imp3-OX, and yellow—degradation impurity.

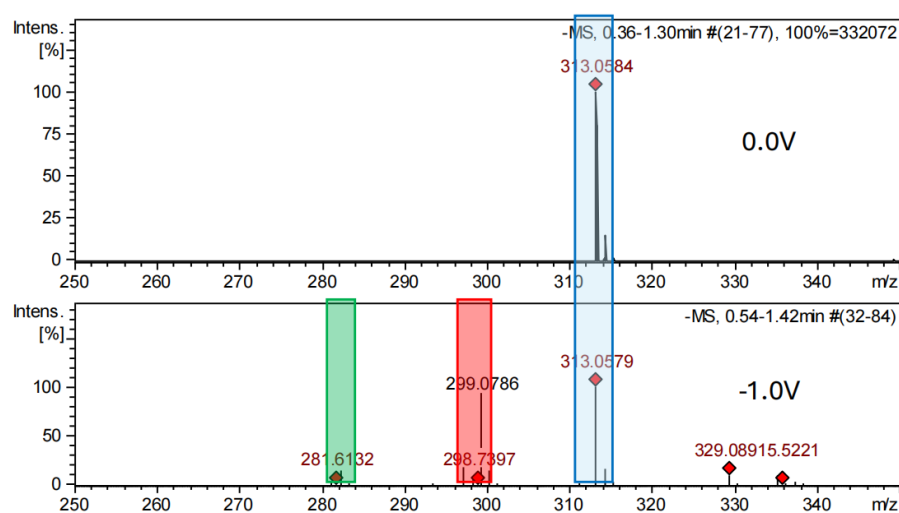


Figure 7. Comparison of ESI-MS spectra of reduction products of dantrolene at 0.0 V and −1.0 V. Blue—dantrolene, red—DAN-Imp1-RED, and green—DAN-Imp2-RED.

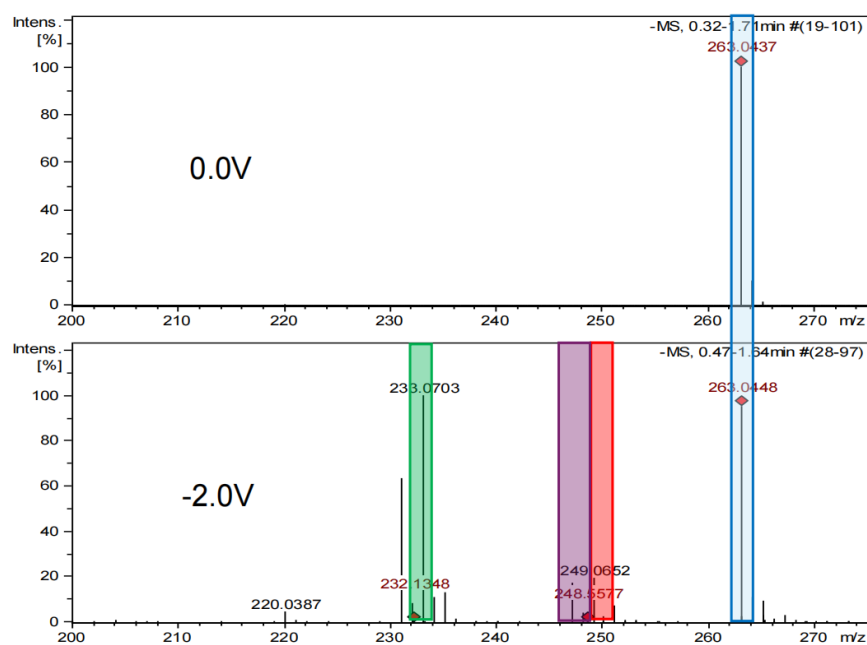


Figure 8. Comparison of ESI-MS spectra of furazidine's reduction products at 0.0 V and −2.0 V. Blue—furazidine, green—FUR-Imp1-RED, purple—FUR-Imp2-RED, and red—FUR-Imp3-RED.

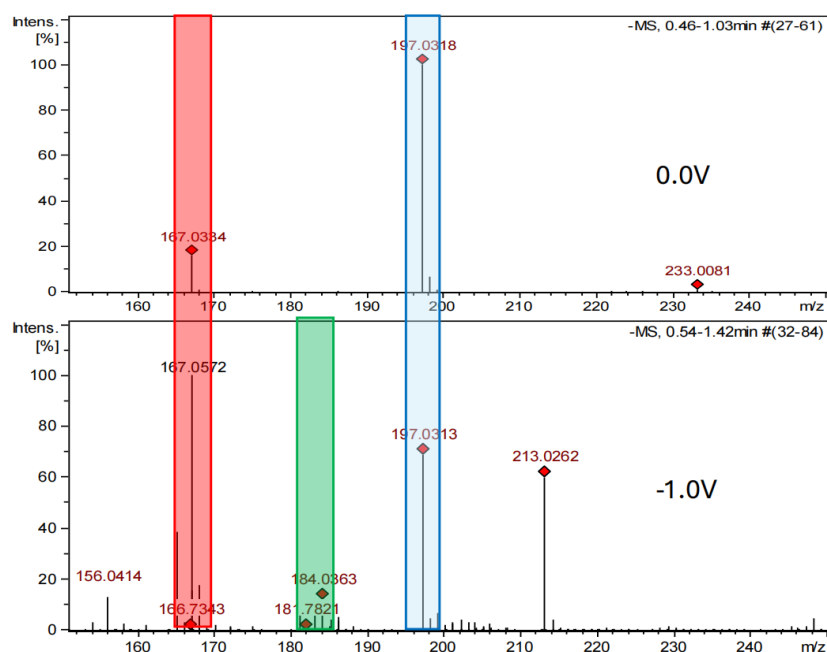


Figure 9. Comparison of ESI-MS spectra of nitrofural's reduction products at 0.0 V and -1.0 V. Blue—nitrofural, red—NF-Imp1-RED, and green—NF-Imp2-RED.

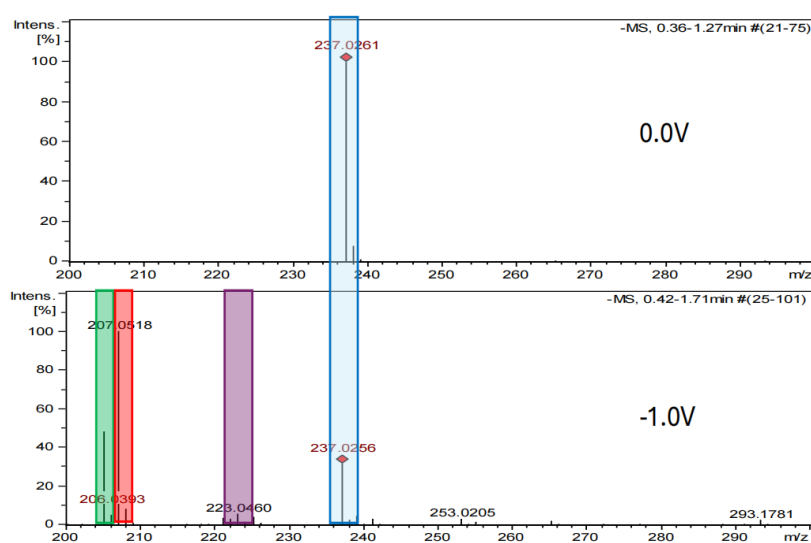


Figure 10. Comparison of ESI-MS spectra of nitrofurantoin's reduction products at 0.0 V and -1.0 V. Blue—nitrofurantoin, red—NFT-Imp1-RED, green—NFT-Imp2-RED, and purple—NFT-Imp3-RED.

2.2.1. Electrochemical Oxidation

The formation of the API electrochemical oxidation products was monitored by ESI-Q-TOF. The results are summarized in Table 1, and the proposed structures are

shown in Figures 11–14. APIs, without being subjected to oxidation, were analyzed as a control sample.

Table 1. Summary of the main oxidation product of four tested APIs.

Compound	MW	Molecular Formula	Initial Conditions	Suggested Transformation	EC	In Silico	DFT Gibbs Energy [kcal/mol]
Dantrolene (DAN)	314.253	C₁₄H₁₀N₄O₅	-	-	-	-	-
Dantrolene impurities							
DAN-Imp1-Ox(A)	330.252	C ₁₄ H ₁₀ N ₄ O ₆	pH 7.4, +1.0	+O	✓	X	−52
DAN-Imp1-Ox(B)					X	✓	−47
DAN-Imp2-Ox	346.252	C ₁₄ H ₁₀ N ₄ O ₇	pH 7.4, +1.2 V	+2O	✓	X	−98
Furazidine (FUR)	264.194	C₁₀H₈N₄O₅	-	-	-	-	-
Furazidine impurities							
FUR-Imp1-Ox(A)	280.194	C ₁₀ H ₈ N ₄ O ₆	pH 7.4, +2.0 V	+O	X	✓	−47
FUR-Imp1-Ox(B)					✓	X	−9
Nitrofural (NF)	198.136	C₆H₆N₄O₄	-	-	-	-	-
Nitrofural impurities							
NF-Imp1-Ox	214.136	C ₆ H ₅ N ₄ O ₅	pH 7.4, +1.5	+O	✓	X	−54
Nitrofurantoin (NFT)	238.157	C₈H₆N₄O₅	-	-	-	-	-
Nitrofurantoin impurities							
NFT-Imp1-Ox	254.156	C ₈ H ₆ N ₄ O ₆	pH 7.4, +0.8 V	+O	✓	✓	−47
NFT-Imp2-Ox	225.158	C ₈ H ₇ N ₃ O ₅	pH 7.4, +1.0 V	-N+H	✓	X	−190
NFT-Imp3-Ox	270.156	C ₈ H ₆ N ₄ O ₇	pH 7.4, +1.2 V	+2O	✓	X	−100

EC—electrochemistry; MetabolitePredict—in silico; MW—molecular weight.

After electrochemical oxidation, two dantrolene oxidation products not previously described in the literature were detected, which were DAN-Imp1-Ox and DAN-Imp2-Ox. The HRMS analysis of MS spectra showed deprotonated molecular ion peaks at m/z 329.0528 $[M-H]^-$ and m/z 345.0475 $[M-H]^-$, corresponding to the molecular formulas C₁₄H₁₀N₄O₆ and C₁₄H₁₀N₄O₇, respectively. DAN-Imp1-Ox may be identified with two isomeric structures denoted as DAN-Imp1-Ox(A) and DAN-Imp1-Ox(B). With the DFT calculations, it was estimated that there was a small ΔG difference of 5 kcal/mol between the A- and B-isomers, pointing to isomer A as a preferable structure. According to the literature, a dantrolene metabolite has been identified as 5-hydroxydantrolene, formed by the oxidation of the hydantoin ring, which is also confirmed by our in silico studies. However, in our electrochemical studies, based on the fragmentation obtained, oxidation occurs also at the aliphatic residue [35]. It was observed that, under these experimental conditions, an applied voltage of 1.0 V was the optimal potential for generating DAN-Imp1-Ox, and 1.2 V was optimal for DAN-Imp2-Ox. Figures S6 and S7 display the MS2 spectra of dantrolene's impurities, while Figures S23 and S24 present the structures of characteristic fragments, confirming their identification.

HRMS analysis of MS spectra of the oxidized furazidine solution at 2.0 V showed one new, previously unreported oxidation product, FUR-Imp1-Ox. The MS spectrum showed a protonated molecular ion peak at m/z 280.0686 $[M+H]^+$, corresponding to the molecular formula C₁₀H₈N₄O₆. The FUR-Imp1-Ox(A) structure has a lower Gibbs energy and is observed as a predicted metabolite. However, the MS2 spectrum (Figure S8) of this impurity

and the structures of the characteristic fragments (Figure S25) confirm the identification of the FUR-Imp1-OX(B) structure.

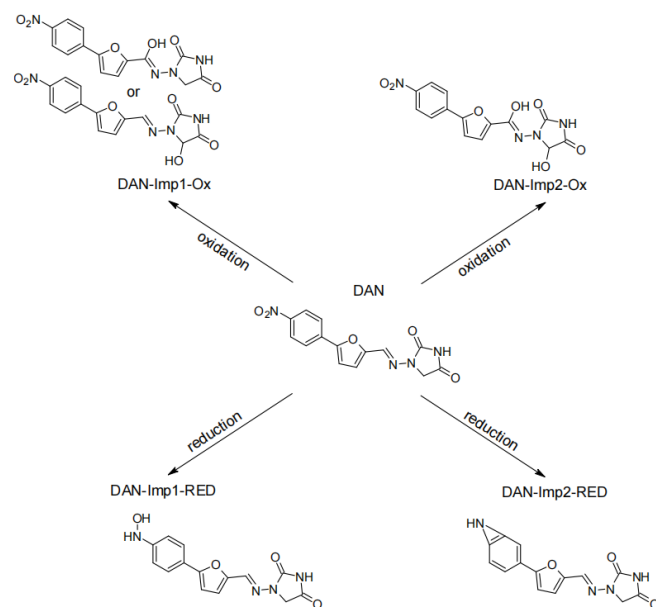


Figure 11. Proposed degradation products of DAN.

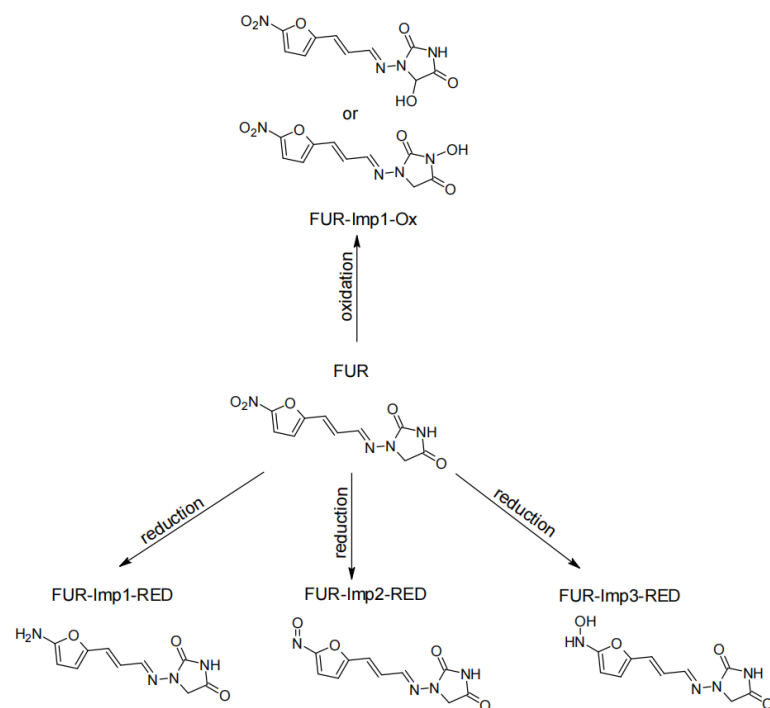


Figure 12. Proposed degradation products of FUR.

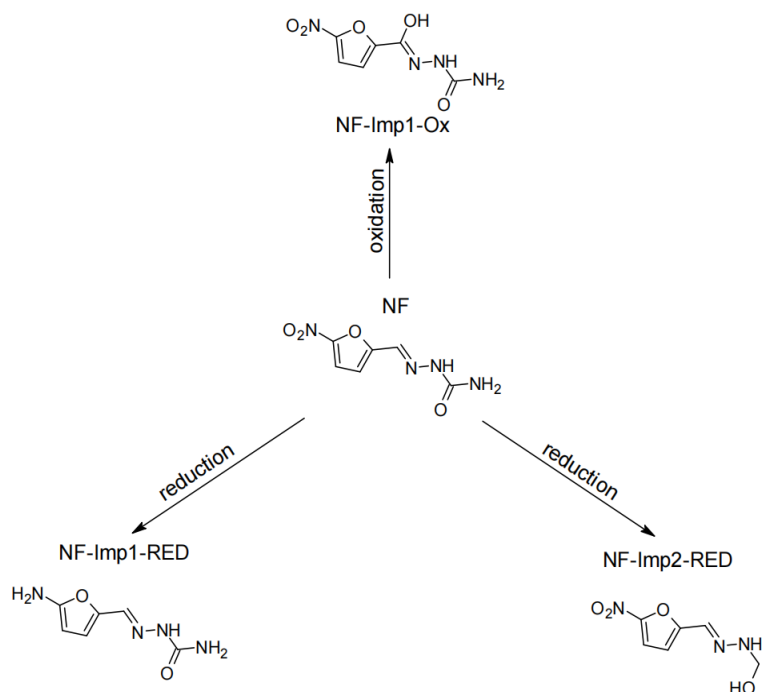


Figure 13. Proposed degradation products of NF.

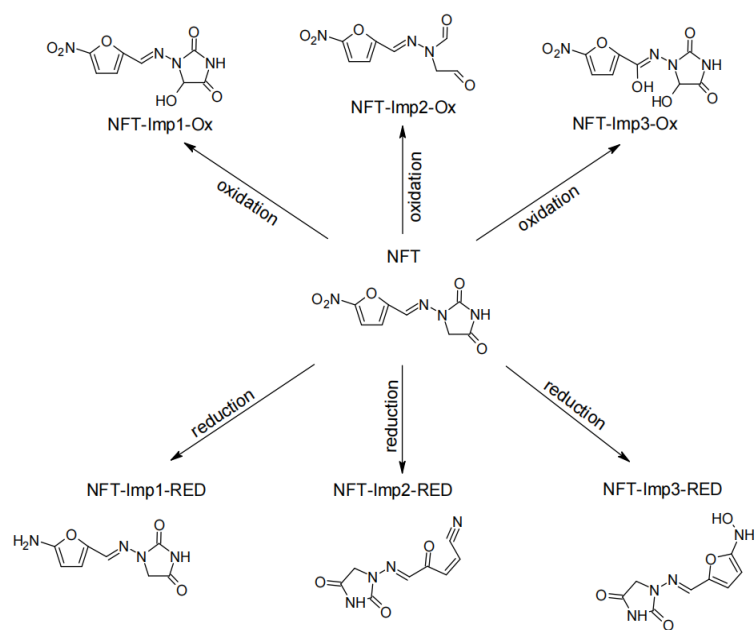


Figure 14. Proposed degradation products of NFT.

In the case of nitrofurazone, oxidation of the sample at 0.7 V led to the formation of one previously unknown oxidative degradation product, which was NF-Imp1-Ox. The HRMS analysis of MS spectra showed a deprotonated molecular $[M-H]^-$ ion at m/z 213.0274,

corresponding to the molecular formula $C_6H_5N_4O_5$. Figure S9 presents the MS2 spectrum of this impurity, while Figure S26 provides the structures of characteristic fragments, confirming their identification. In nitrofural, electrochemical oxidation occurs at the carbon of the aliphatic chain.

After the electrochemical oxidation reaction of nitrofurantoin, the following three new degradation products were detected: NFT-Imp1-Ox, NFT-Imp2-Ox and NFT-Imp3-Ox. MS spectra showed that, at 800 mV, the first hydroxylation product was formed (oxidation in hydantoin ring) with a molecular ion peak at m/z 253.0226 $[M-H]^-$; at 1.2 V, dioxidation occurs: m/z 269.0177 $[M-H]^-$. The oxidation of nitrofurantoin also proceeded with the opening of the imidazolidine-2,4-dione ring: an ion peak at m/z 223.0323 $[M-H]^-$. Figures S10–S12 display the MS2 spectra of nitrofurantoin's impurities, while Figures S27–S29 present the structures of characteristic fragments, confirming their identification.

A comparison of the oxidation products obtained by the electrochemical method and the metabolites predicted in silico is summarized in Table 1.

2.2.2. Electrochemical Reduction

The reduction of dantrolene, nitrofurazone, nitrofurantoin, and furazidine may involve different mechanisms and conditions described in the literature, with nitro reduction being the most likely metabolic process. The results of the electrochemical reduction of the studied APIs are summarized in Table 2, and proposed structures are presented in Figures 11–14.

Table 2. Summary of the main reduction products of four tested APIs.

Compound	MW	Molecular Formula	Conditions	Suggested Transformation	EC	In Silico	DFT Gibbs Energy [kcal/mol]
Dantrolene (DAN)	314.253	$C_{14}H_{10}N_4O_5$	-	-	-	-	-
Dantrolene impurities							
DAN-Imp1-RED	300.270	$C_{14}H_{12}N_4O_4$	pH 7.4, -0.7 V	+2H -O	✓	✓	−239
DAN-Imp2-RED	282.259	$C_{14}H_{10}N_4O_3$	pH 7.4, -0.7 V	-2O	✓	X	−204
Furazidine (FUR)	264.194	$C_{10}H_8N_4O_5$	-	-	-	-	-
Furazidine impurities							
FUR-Imp1-RED	234.211	$C_{10}H_{10}N_4O_3$	pH 7.4, -0.7 V	+2H -2O	✓	✓	−398
FUR-Imp2-RED	248.195	$C_{10}H_8N_4O_4$	pH 7.4, -0.7 V	-O	✓	X	−128
FUR-Imp3-RED	250.211	$C_{10}H_{10}N_4O_4$	pH 7.4, -0.9 V	+2H -O	✓	✓	−242
Nitrofural (NF)	198.136	$C_6H_6N_4O_4$	-	-	-	-	-
Nitrofural impurities							
NF-Imp1-RED	168.153	$C_6H_8N_4O_2$	pH 7.4, -1.0 V	+2H -2O	✓	✓	−399
NF-Imp2-RED	185.137	$C_6H_7N_3O_4$	pH 7.4, -0.7 V	+H -N	✓	X	−179
Nitrofurantoin (NFT)	238.157	$C_8H_6N_4O_5$	-	-	-	-	-
Nitrofurantoin impurities							
NFT-Imp1-RED	208.174	$C_8H_8N_4O_3$	pH 7.4, -1.0 V	+2H -2O	✓	✓	−400
NFT-Imp2-RED	206.158	$C_8H_6N_4O_3$	pH 7.4, -0.7 V	-2O	✓	X	−286
NFT-Imp3-RED	224.174	$C_8H_8N_4O_4$	pH 7.4, -1.0 V	+2H -O	✓	✓	−244

EC—electrochemistry; MetabolitePredict—in silico; MW—molecular weight.

The HRMS analysis of dantrolene spectra after electrochemical reduction indicated the two degradation products, DAN-Imp1-RED and DAN-Imp2-RED, with molecular ion peaks at m/z 299.0785 $[M-H]^-$ and m/z 282.0758 $[M-H]^-$. Figures S13 and S14 display the MS2 spectra of these impurities, while Figures S30 and S31 present the structures of characteristic fragments, confirming their identification. MS spectra of the dantrolene sample,

measured at negative potentials from 0 to -2 V, showed the formation of hydroxylamine, previously described in the literature [41,42], and the new reduction impurity.

The HRMS analysis of furazidine spectra after electrochemical reduction also indicated the reduction of nitro groups. The following three new degradation products were observed: FUR-Imp1-RED (at -0.7 V), FUR-Imp2-RED (at -0.7 V), and FUR-Imp3-RED (at -0.9 V), with molecular ion peaks at m/z 249.0657 $[M-H]^-$, m/z 247.0476 $[M-H]^-$, and m/z 233.0703 $[M-H]^-$. Figures S15–S17 illustrate the MS2 spectra for these impurities, while Figures S32–S34 present the structures of characteristic fragments, confirming their identification.

In the case of nitrofurazone, the detection of two products with m/z 184.0363 and m/z 167.0572 in electrochemical reduction experiments led to the identification of an amine (NF-Imp1-RED), which is formed at a potential of -1.0 V and a hydroxylamine known from the literature (NF-Imp2-RED), which is formed at a potential of -0.7 V (Figures S18 and S19). Figures S35 and S36 present the structures of characteristic fragments, confirming their identification.

The formation of three degradation products was confirmed in the nitrofurantoin reduction studies. HR-MS spectra showed that the highest-intensity impurity, NFT-Imp1-RED, is an amine formed at a potential of -1.0 V, with m/z 207.0518. According to our study, the reduction of nitrofurantoin also involves the opening of the nitrofurane ring (-0.7 V), m/z 205.0366. At a reduction potential of -1.0 V, a hydroxylamine, NFT-Imp3-RED with m/z 223.0460, is also formed. Figures S20–S22 illustrate the MS2 spectra of nitrofurantoin's impurities, while Figures S37–S39 present the structures of characteristic fragments, confirming their identification.

The electrochemical studies are consistent with the metabolism of nitroreductases reported in the literature.

A comparison of the reduction products obtained by the electrochemical method and the metabolites predicted *in silico* is summarized in Table 2.

2.3. Quantum Mechanical DFT Calculations

The optimized molecular structures were obtained with the Gaussian G16 software, Revision A.03 [49] using the density functional theory (DFT) with the B3LYP/6-311++G(d,p) function and optimization with the Berny algorithm until positive harmonic frequencies were obtained. The Gibbs Free Energy (in kcal/mol) was used as the metric for comparing the relative stabilities of the investigated structures (the ΔG values in Tables 1 and 2). The details of the calculations are presented in the Supplementary Information, see the Tables S1 and S2.

An analysis of the Gibbs Free Energy differences assigned to the hypothetical stoichiometric reaction leads to the following observations.

2.3.1. Oxidation

Oxidation seems to be a regioselective addition of mono or dioxygen addition to the molecular structure. The most preferred position for the mono-oxygen addition is the -CH-residue between the nitrogen atom and the furan ring. Subsequent oxygen additions occur at various positions, such as other -CH- or NH- residues. The following observations of the ΔG values can be made:

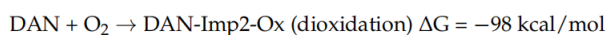
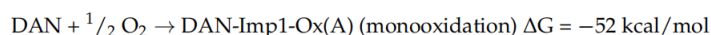
For NFT, the monooxidation of NFT is resolved to be the structure NFT-Imp1-Ox with a $\Delta G = -47$ kcal/mol. The dioxidation of NFT is identified as the structure NFT-Imp3-Ox and corresponds well with a $\Delta G = -100$ kcal/mol, i.e., the most negative value among ΔG values of other di-oxygenated structures.

The monooxidation of DAN is resolved to be the structure DAN-Imp1-Ox, and its $\Delta G = -52$ kcal/mol is the most negative value among the two monooxidized structures investigated theoretically. The dioxidation of DAN occurs at the sites observed in the monooxidation, i.e., at the $-\text{CH}_2-$ residue of the imidazolidinedione ring and at the $-\text{CH}=\text{N}-$ fragment of the hydrazone linker.

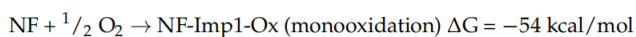
The monooxidation of NF is resolved to be the structure NF-Imp1-Ox, and its $\Delta G = -54$ kcal/mol is the most negative value among the three monooxidized structures investigated theoretically.

The monooxidation of FUR is resolved to be the structure FUR-Imp1-Ox based on two structural proposals. The second structural proposal corresponds to $\Delta G = -9$ kcal/mol, also known as the less energetically favorable among the five structures considered theoretically. The most energy advantageous is the first structural proposal, for which the energy is $\Delta G = -47$ kcal/mol.

Compounds oxidize either at the carbon in the aliphatic ring or in the five-membered ring at the carbon. Whereby, in DAN, the first oxidation goes to the carbon in the aliphatic and the second to the ring. In NF, the first oxidation also goes to the carbon in the aliphatic chain. There is no second oxidation. One can comment on this effect, i.e., the double oxidation of DAN and monooxidation of NF, with a comparison of the hypothetical stoichiometric reactions, and the corresponding Free Energy output (ΔG) can be predicted theoretically as follows:



The monooxidation of DAN occurs at the aliphatic residue. In the dioxidation process, the second oxygen atom is located at the imidazolidine-2,4-dione residue. The negative ΔG values suggest that both reactions should occur spontaneously. In the case of NF, only monooxidation is observed. The corresponding hypothetical reaction is as follows:



However, dioxidation should not occur due to unfavorable ΔG values for the oxygen atom insertion into the imidazolidine-2,4-dione residue of $\Delta G = -18$ kcal/mol (at the imino nitrogen) and $\Delta G = -7$ kcal/mol (at the amino nitrogen). Taking the above observations into account, one can elucidate the reason for the lack of double oxidation in NF, and consequently, its greater resistance to oxidation compared to DAN, which should be less resistant. According to the scheme for FUR, we should consider two monooxidized structures of FUR, i.e., FUR-Imp1-Ox with the OH group attached to the carbon atom of the $-\text{CH}_2-$ residue and to the nitrogen atom located between two oxygen atoms. According to the calculated ΔG values (-51 kcal/mol and -9 kcal/mol, respectively), the second structure is less likely.

2.3.2. Reduction

The reduction reactions seem to follow a variety of paths, as a rule leading to a degradation of the parental (initial) molecule. The stoichiometric reactions suggest that, in the reduction process, 1–6 electrons are exchanged. The stoichiometric reaction does not incorporate details of the molecular mechanism of the reduction reaction. One can only expect that the more electrons that are exchanged, the more complex the reaction, e.g., multistep reactions, should occur. A tentative generalization based on our empirical and theoretical data suggests preserving the entire structure of the parent molecule. An exception is the case of the NFT-Imp2-Ox structure, where NFT oxidation results in the

opening of the imidazolidinedione ring. This may provide another argument supporting our belief in the low stability of the parent NFT molecule. In contrast to oxidation, the reduction reaction leads to the degradation of the parent molecules, splitting them into various smaller fragments.

An analysis of the hypothetical ΔG (reaction) is shown as follows. Let us schematically describe the molecular structure of the parent molecules as follows:

NF (nitrofural): (nitrofuran residue) – (–C=N–) – (formamide residue)

NFT (nitrofurantoin): (nitrofuran residue) – (–C=N–) – (imidazolidinedione residue)

FUR (furazidine): (nitrofuran residue) – (–C=C–C=N–) – (imidazolidinedione residue)

DAN (dantrolene): (nitrophenyl-nitrofuran residue) – (–C=N–) – (imidazolidinedione residue).

The degradation of the parent molecules occurs at each molecular fragment described above, depending on the experimental conditions and a particular molecular structure of the parent molecule. The manner in which specific degradation under reductive conditions occurs can be interpreted with the theoretically calculated ΔG (reaction).

The estimated ΔG (reaction) of a series of stoichiometric hypothetical reductive reactions falls within the [–400, –11] kcal/mol interval. We believe that the more negative the ΔG , the more likely the corresponding degradation of the parent molecules. Following this reasoning, we predict that, based on the ΔG (reaction) in the [–400, –300] kcal/mol range, one should expect the following degradation paths:

- NF (nitrofural) undergoes first the NO_2 - group reduction up to the amino $-\text{NH}_2$ group.
- NFT (nitrofurantoin): here, reduction of the NO_2 group to the $-\text{NH}_2$ group becomes the most probable degradation path.
- FUR (furazidine): here too, the reduction of the NO_2 group to the $-\text{NH}_2$ group becomes the most probable degradation path.
- DAN (dantrolene): the degradation of the NO_2 group to $-\text{NH}-\text{OH}$ or $=\text{NH}$ residues becomes the most likely path. Here, the reduction does not terminate at the $-\text{NH}_2$ group.

It is suggested that these paths correspond to the exchange of six electrons. It is also expected that the molecular mechanism of such degradation is much more complicated than that visualized in a simple six-electron hypothetical stoichiometric reaction.

The reduction of the DAN, FUR, NF, and NFT compounds generally yields amino- or hydroxylamino derivatives (the $-\text{NO}_2$ residue reduction). Moreover, in one of the NFT derivatives, degradation results in the opening of the furan ring and the formation of the CN triple bond.

By reviewing the ΔG values of the corresponding hypothetical reduction reactions, one cannot identify any outliers because all the investigated structures have similar ΔG values, of about –50 kcal/mol per one hydrogen atom added. Details are given in the Supplementary Materials, Table S1 and S2.

3. Materials and Methods

3.1. Chemicals

Acetonitrile for LC/MS, methanol for LC/MS, ammonium formate for LC/MS, ammonia solution, formic acid for LC/MS, and dimethyl sulfoxide were purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

3.2. Electrochemical Measurements

Electrochemical studies were performed using an Autolab potentiostat (Eco Chemie BV, Utrecht, The Netherlands), which was controlled by a computer with GPES software, version 4.9. A three-electrode system placed in a glass measuring vessel was used in

these studies. This system consisted of a reference electrode, a saturated silver/silver chloride electrode with saturated KCl (Ag/AgCl, KCl_{sat}), a platinum plate, which acted as an auxiliary electrode, and a working electrode, a glassy carbon electrode with a surface area of 0.071 cm² (GCE, BASi[®], Kent Avenue, West Lafayette, IN, USA). The solutions in which all three electrodes were immersed were deoxygenated by passing argon (99.5% purity, Air Products, Kielce, Poland) for 20 min before the measurements. During the measurements, gas was passed over the solution. Measurements were carried out at an ambient temperature of approximately 22 ± 2 °C.

3.3. EC/ESI-HRMS Measurements

Electrochemical oxidation and reduction were performed using the ROXY[™] EC system (AntecScientific, Zoeterwoude, The Netherlands) [50]. The ROXY[™] EC System (Figure S40) includes the ROXY potentiostat equipped with a μ -PrepCell[™] 2.0, infusion pump (HARVARD APPARATUS, Holliston, MA, USA), and a glass syringe (5.0 mL, HAMILTON Co., Reno, NV, USA). The ROXY EC System is controlled by Antec Dialogue software, version 2.0.0.81. The μ -PrepCell[™] 2.0, equipped with a Magic Damond (BBD) working electrode, an auxiliary (AUX) electrode (inert polymeric inlet block), and a HyREF[™] reference electrode, was used for the generation of degradation and metabolism impurities. The experiments were operated at a flow rate of 50 μ L/min at room temperature and a potential range for oxidation from 0 to 2.0 V and for reduction from 0 to −2.0 V. DAN, FUR, NF, and NFT (Figure 2) were dissolved in 20 mM of aqueous ammonium formate solution (pH = 7.4) and ACN (50:50 *v/v*). The final concentration of APIs was 100 μ g/mL.

The EC cell was connected to the ESI-MS-HR: Maxis 4G time-of-flight mass analyzer (Bruker, Bremen, Germany). The QTOF system was controlled by MAXIS software, Compass 1.3, control version 3.0 and data processing DataAnalysis software, version 4.0 SP3. The HR-MS runs were performed in positive or negative mode depending on the API used with the following parameters: nebulizer 0.4 bar, dry gas 4 L/min, dry temperature 180 °C, capillary +2800 V, and end plate −500 V. For EC/HRMS coupling, a mass range from 50 to 1000 *m/z* was used. The mass spectrometer was tuned before any measurements, and sum formulas were calculated for the resulting measured ion masses. The molecular patterns were determined with a high degree of precision, keeping the mass error below 5 ppm and the isotopic pattern deviation, known as mSigma, below 30. The mSigma value is a measure of how well the theoretical isotopic pattern matches the observed pattern for a given mass peak. It includes the standard deviation of both masses and intensities of all isotopic peaks. For the hybrid mass spectrometer, the precursor ion of the tested compound was selected using the quadrupole analyzer, and the product ions were analyzed using a TOF analyzer.

Structure elucidation was facilitated using ACD/Labs MS Fragmenter software, version 2023.2.0.

3.4. DFT Calculations

All the calculations were performed on the HPC cluster in the Interdisciplinary Centre for Mathematical and Computational Modelling at the University of Warsaw, Poland.

The model reactions of the reduction/oxidation (red/ox) processes were assumed to proceed from a known initial step (Reactants) up to the deduced final step (Products) without considering any intermediate transition structures or reactions. In this way, we assumed that the model reaction can proceed spontaneously when the difference between the Product Gibbs Free Energy and the Reactant Gibbs Free Energy becomes negative.

3.5. In Silico Prediction of Metabolism

In silico predictions were performed using Bruker Daltonics software (version 2.0; Germany). The MetabolitePredict (version 2.0; Bruker Daltonics, Bremen, Germany) is a computational algorithm that predicts the most likely metabolic transformations of the compound related to phase I reactions in the liver. Moreover, it provides the structure of the metabolites, formed with a ranking derived from the site of metabolism predictions, with exact molecular weight (MW).

4. Conclusions

Pharmaceutical compounds such as dantrolene, nitrofurantoin, furazidine, and nitrofurazone were investigated electrochemically to determine their electroactivity and to generate degradation products. Oxidation and reduction products were predicted and supported by a computational approach that included an in silico method and a quantum mechanical DFT calculation of their molecular energies. Seventeen degradation impurities were identified using the QTOF technique, and most of these products were also confirmed by computational methods. The electrochemical technique has generated a large number of structurally related products and has proven effective in producing new, not previously reported, degradative impurities, the toxicity of which is worth considering. Additionally, electrochemistry allows us to understand the stability of a drug product with hydrazone groups. In electrochemical oxidation studies, nitrofurantoin proved to be the most unstable, forming degradable impurities at a potential from +0.7 V, while furazidine proved to be the most stable, with an oxidation product formed at +2.0 V. For all hydrazone-containing drugs tested, the stability of reducing potentials was similar, with degradation impurities formed from −0.7 V. Examination of the stability towards oxidation of the carbon neighboring the hydrazone group indicates that compounds such as dantrolene and nitrofurantoin may be more susceptible to the hydrolysis of the hydrazone and the formation of amines or hydroxylamines, which can be oxidized to nitrosamines under the right conditions. The present research becomes essential in the design of methodology applied to protecting patient safety and developing robust products. The research conducted also determines the conditions under which electrochemical synthesis of the newly identified impurities will be possible. This work continues to focus on the detection of low-molecular-weight nitrosamines.

Supplementary Materials: The supporting information can be downloaded at the following: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms26094295/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, E.U.S. and A.B.W.; supervision, E.U.S.; formal analysis, investigation, visualization, A.B.W., K.S., A.L. and M.F.; methodology, A.B.W., E.U.S., K.S. and A.L.; writing—original draft, A.B.W., E.U.S., K.S., A.L. and M.F.; writing—review and editing, A.B.W., E.U.S., J.G., K.S., A.L. and M.F.; funding acquisition, E.U.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This project was financially supported by the Polish Ministry of Science and Higher Education: subvention No. 10/2025.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The original contributions presented in this study are included in the article and Supplementary Materials. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

Acknowledgments: Anna Witkowska would like to thank the Ministry of Science and Higher Education: contract number DWD/5/0401/2021. The authors would like to thank Aleksandra Wolczyńska for her support in this study. The calculations were performed at the Interdisciplinary

Centre for Mathematical and Computational Modeling of the University of Warsaw (ICM UW), computer grant G18-6, which is kindly acknowledged for allocating facilities and computer time.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

- Vikram, H.P.R.; Kumar, T.P.; Kumar, G.; Beeraka, N.M.; Deka, R.; Suhail, S.M.; Jat, S.; Bannimath, N.; Padmanabhan, G.; Chandan, R.S.; et al. Nitrosamines Crisis in Pharmaceuticals—Insights on Toxicological Implications, Root Causes and Risk Assessment: A Systematic Review. *J. Pharm. Anal.* **2024**, *14*, 100919. [\[CrossRef\]](#)
- Torres, S.; Brown, R.; Szucs, R.; Hawkins, J.M.; Zelesky, T.; Scrivens, G.; Pettman, A.; Taylor, M.R. The Application of Electrochemistry to Pharmaceutical Stability Testing—Comparison with in Silico Prediction and Chemical Forced Degradation Approaches. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2015**, *115*, 487–501. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Jahn, S.; Karst, U. Electrochemistry Coupled to (Liquid Chromatography/) Mass Spectrometry—Current State and Future Perspectives. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1259*, 16–49. [\[CrossRef\]](#)
- Baumann, A.; Karst, U. Online Electrochemistry/Mass Spectrometry in Drug Metabolism Studies: Principles and Applications. *Expert. Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2010**, *6*, 715–731. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Jurva, U.; Wikström, H.V.; Weidolf, L.; Bruins, A.P. Comparison between Electrochemistry/Mass Spectrometry and Cytochrome P450 Catalyzed Oxidation Reactions. *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* **2003**, *17*, 800–810. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Lohmann, W.; Karst, U. Electrochemistry Meets Enzymes: Instrumental on-Line Simulation of Oxidative and Conjugative Metabolism Reactions of Toremifene. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *394*, 1341–1348. [\[CrossRef\]](#)
- Jahn, S.; Baumann, A.; Roscher, J.; Hense, K.; Zazzaroni, R.; Karst, U. Investigation of the Biotransformation Pathway of Verapamil Using Electrochemistry/Liquid Chromatography/Mass Spectrometry—A Comparative Study with Liver Cell Microsomes. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 9210–9220. [\[CrossRef\]](#)
- Johansson, T.; Weidolf, L.; Jurva, U. Mimicry of Phase I Drug Metabolism—Novel Methods for Metabolite Characterization and Synthesis. *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* **2007**, *21*, 2323–2331. [\[CrossRef\]](#)
- Blankert, B.; Hayen, H.; van Leeuwen, S.M.; Karst, U.; Bodoki, E.; Lotrean, S.; Sandulescu, R.; Diez, N.M.; Dominguez, O.; Arcos, J.; et al. Electrochemical, Chemical and Enzymatic Oxidations of Phenothiazines. *Electroanalysis* **2005**, *17*, 1501–1510. [\[CrossRef\]](#)
- Lohmann, W.; Karst, U. Generation and Identification of Reactive Metabolites by Electrochemistry and Immobilized Enzymes Coupled On-Line to Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 6831–6839. [\[CrossRef\]](#)
- van Leeuwen, S.M.; Hayen, H.; Karst, U. Liquid Chromatography–Electrochemistry–Mass Spectrometry of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *378*, 917–925. [\[CrossRef\]](#)
- Baumann, A.; Lohmann, W.; Schubert, B.; Oberacher, H.; Karst, U. Metabolic Studies of Tetrazepam Based on Electrochemical Simulation in Comparison to in Vivo and in Vitro Methods. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 3192–3198. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Portychová, L.; Schug, K.A. Instrumentation and Applications of Electrochemistry Coupled to Mass Spectrometry for Studying Xenobiotic Metabolism: A Review. *Anal. Chim. Acta* **2017**, *993*, 1–21. [\[CrossRef\]](#)
- Jurva, U.; Weidolf, L. Electrochemical Generation of Drug Metabolites with Applications in Drug Discovery and Development. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2015**, *70*, 92–99. [\[CrossRef\]](#)
- Plattner, S.; Erb, R.; Chervet, J.P.; Oberacher, H. Studying the Reducing Potencies of Antioxidants with the Electrochemistry Inherently Present in Electrospray Ionization–Mass Spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406*, 213–224. [\[CrossRef\]](#)
- Torres, S.; Brown, R.; Szucs, R.; Hawkins, J.M.; Scrivens, G.; Pettman, A.; Kraus, D.; Taylor, M.R. Rapid Synthesis of Pharmaceutical Oxidation Products Using Electrochemistry: A Systematic Study of N-Dealkylation Reactions of Fesoterodine Using a Commercially Available Synthesis Cell. *Org. Process Res. Dev.* **2015**, *19*, 1596–1603. [\[CrossRef\]](#)
- Permentier, H.; Bruins, A.; Bischoff, R. Electrochemistry–Mass Spectrometry in Drug Metabolism and Protein Research. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2008**, *8*, 46–56. [\[CrossRef\]](#)
- Zheng, Q.; Zhang, H.; Wu, S.; Chen, H. Probing Protein 3D Structures and Conformational Changes Using Electrochemistry-Assisted Isotope Labeling Cross-Linking Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **2016**, *27*, 864–875. [\[CrossRef\]](#)
- Büter, L.; Frensemeier, L.M.; Vogel, M.; Karst, U. Dual Reductive/Oxidative Electrochemistry/Liquid Chromatography/Mass Spectrometry: Towards Peptide and Protein Modification, Separation and Identification. *J. Chromatogr. A* **2017**, *1479*, 153–160. [\[CrossRef\]](#)
- Mysling, S.; Salbo, R.; Ploug, M.; Jørgensen, T.J.D. Electrochemical Reduction of Disulfide-Containing Proteins for Hydrogen/Deuterium Exchange Monitored by Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 340–345. [\[CrossRef\]](#)
- Faber, H.; Lütze, H.; Lareo, P.L.; Frensemeier, L.; Vogel, M.; Schmidt, T.C.; Karst, U. Liquid Chromatography/Mass Spectrometry to Study Oxidative Degradation of Environmentally Relevant Pharmaceuticals by Electrochemistry and Ozonation. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1343*, 152–159. [\[CrossRef\]](#)

22. Kučerová, P.; Skopalová, J.; Kučera, L.; Táborský, J.; Švecová, H.; Lemr, K.; Cankař, P.; Barták, P. Electrochemical Oxidation of 5-Hydroxymethyl Tolterodine and Identification of Its Oxidation Products Using Liquid Chromatography and Mass Spectrometry. *Electrochim. Acta* **2016**, *215*, 617–625. [CrossRef]
23. Šelešiovská, R.; Hloboňová, F.; Skopalová, J.; Cankař, P.; Janíková, L.; Chýlková, J. Electrochemical Oxidation of Anti-Inflammatory Drug Meloxicam and Its Determination Using Boron Doped Diamond Electrode. *J. Electroanal. Chem.* **2020**, *858*, 113758. [CrossRef]
24. Nowak, P.; Woźniakiewicz, M.; Kościelniak, P. Simulation of Drug Metabolism. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2014**, *59*, 42–49. [CrossRef]
25. Özkan, S.A. LC with Electrochemical Detection. Recent Application to Pharmaceuticals and Biological Fluids. *Chromatographia* **2007**, *66*, 3–13. [CrossRef]
26. Karst, U.B.A.W. Electrochemistry and LC–MS for Metabolite Generation and Identification: Tools, Technologies and Trends. *LCGC Europe* **2010**, *23*, 8–16.
27. Pretty, J.R.; Deng, H.; Goeringer, D.E.; Van Berkel, G.J. Electrochemically Modulated Preconcentration and Matrix Elimination for Organic Analytes Coupled On-Line with Electrospray Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 2066–2074. [CrossRef]
28. Mielczarek, P.; Smoluch, M.; Kotlinska, J.H.; Labuz, K.; Gotszalk, T.; Babij, M.; Suder, P.; Silberring, J. Electrochemical Generation of Selegiline Metabolites Coupled to Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1389*, 96–103. [CrossRef] [PubMed]
29. Knoche, L.; Lisec, J.; Koch, M. Analysis of Electrochemical and Liver Microsomal Transformation Products of Lasalocid by LC/HRMS. *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* **2022**, *36*, e9349. [CrossRef]
30. Kotthoff, L.; Lisec, J.; Schwerdtle, T.; Koch, M. Prediction of Transformation Products of Monensin by Electrochemistry Compared to Microsomal Assay and Hydrolysis. *Molecules* **2019**, *24*, 2732. [CrossRef]
31. Potęga, A.; Żelaszczyk, D.; Mazerska, Z. Electrochemical Simulation of Metabolism for Antitumor-Active Imidazoacridinone C-1311 and in Silico Prediction of Drug Metabolic Reactions. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2019**, *169*, 269–278. [CrossRef]
32. López-Rodríguez, R.; McManus, J.A.; Murphy, N.S.; Ott, M.A.; Burns, M.J. Pathways for N-Nitroso Compound Formation: Secondary Amines and Beyond. *Org. Process Res. Dev.* **2020**, *24*, 1558–1585. [CrossRef]
33. Lunn, G.; Sansone, E.B.; Andrews, A.W. Aerial Oxidation of Hydrazines to Nitrosamines. *Environ. Mol. Mutagen.* **1991**, *17*, 59–62. [CrossRef] [PubMed]
34. Dong, M.; Liu, Y.D.; Zhong, R. NDMA Formation Mechanisms from Typical Hydrazines and Hydrazones during Ozonation: A Computational Study. *J. Hazard. Mater.* **2019**, *366*, 370–377. [CrossRef] [PubMed]
35. Kuznetsov, V.V.; Ivantsova, N.A.; Kuzin, E.N.; Pirogov, A.V.; Mezhev, Y.O.; Filatova, E.A.; Averina, Y.M. Study of the Process of Electrochemical Oxidation of Active Pharmaceutical Substances on the Example of Nitrofurazone ((2E)-2-[(5-Nitro-2-Furyl)methylene]hydrazine Carboxamide). *Water* **2023**, *15*, 3370. [CrossRef]
36. O’Keeffe, M.; Christodoulidou, A.; Nebbia, C. Presence of Nitrofurans and Their Metabolites in Gelatine. *EFSA J.* **2021**, *19*, e06881. [CrossRef] [PubMed]
37. Ryan, A.; Kaplan, E.; Laurieri, N.; Lowe, E.; Sim, E. Activation of Nitrofurazone by Azoreductases: Multiple Activities in One Enzyme. *Sci. Rep.* **2011**, *1*, 63. [CrossRef]
38. Streeter, A.J.; Krueger, T.R.; Hoener, B.A. Oxidative Metabolites of 5-Nitrofurans. *Pharmacology* **1988**, *36*, 283–288. [CrossRef]
39. Hall, B.S.; Bot, C.; Wilkinson, S.R. Nifurtimox Activation by Trypanosomal Type I Nitroreductases Generates Cytotoxic Nitrile Metabolites. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 13088–13095. [CrossRef]
40. Jonen, H.G. Reductive and Oxidative Metabolism of Nitrofurantoin in Rat Liver. *Naunyn-Schmiedeberg’s Arch. Pharmacol.* **1980**, *315*, 167–175. [CrossRef]
41. Amano, T.; Fukami, T.; Ogiso, T.; Hirose, D.; Jones, J.P.; Taniguchi, T.; Nakajima, M. Identification of Enzymes Responsible for Dantrolene Metabolism in the Human Liver: A Clue to Uncover the Cause of Liver Injury. *Biochem. Pharmacol.* **2018**, *151*, 69–78. [CrossRef] [PubMed]
42. Ellis, K.O.; Wessels, F.L. Muscle Relaxant Properties of the Identified Metabolites of Dantrolene. *Naunyn-Schmiedeberg’s Arch. Pharmacol.* **1978**, *301*, 237–240. [CrossRef]
43. European Medical Agency Committee for Medicinal Products for Human Use. ICH M7(R2) Guideline on Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk. 2023. Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m7-assessment-control-dna-reactive-mutagenic-impurities-pharmaceuticals-limit-potential-carcinogenic-risk-scientific-guideline> (accessed on 1 March 2025).
44. Ragab, M.A.A.; Korany, M.A.; Galal, S.M.; Ahmed, A.R. Voltammetric Analysis of Dantrolene and Its Active Metabolite with Indomethacin in Rat Plasma. *Bioanalysis* **2019**, *11*, 73–84. [CrossRef] [PubMed]
45. Ghoneim, E.M. Electroreduction of the Muscle Relaxant Drug Dantrolene Sodium at the Mercury Electrode and Its Determination in Bulk Form and Pharmaceutical Formulation. *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, *55*, 1483–1488. [CrossRef] [PubMed]
46. Balamurugan, M.; Alagumalai, K.; Chen, T.-W.; Chen, S.-M.; Liu, X.; Selvaganapathy, M. Simultaneous Electrochemical Determination of Nitrofurantoin and Nifedipine with Assistance of Needle-Shaped Perovskite Structure: Barium Stannate Fabricated Glassy Carbon Electrode. *Microchimica Acta* **2021**, *188*, 19. [CrossRef]

47. Rahi, A.; Sattarahmady, N.; Dehdari Vais, R.; Heli, H. Sonoelectrodeposition of Gold Nanorods at a Gold Surface—Application for Electrocatalytic Reduction and Determination of Nitrofurazone. *Sens. Actuators B Chem.* **2015**, *210*, 96–102. [CrossRef]
48. Brito, C.L.; Ferreira, E.I.; La-Scalea, M.A. Application of Multi-Walled Carbon Nanotubes Functionalized with Hemin to Evaluate the Electrochemical Behavior of Nitrofurazone in Aqueous Media. *Electrochim. Acta* **2023**, *459*, 142486. [CrossRef]
49. Frisch, M.J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G.A.; Nakatsuji, H.; et al. *Gaussian 16, Revision A.03*; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, USA, 2016; Available online: <https://gaussian.com> (accessed on 1 March 2025).
50. Stolarczyk, E.U.; Strzempek, W.; Łaszczyńska, M.; Leś, A.; Menaszek, E.; Stolarczyk, K. Thiogenistein—Antioxidant Chemistry, Antitumor Activity, and Structure Elucidation of New Oxidation Products. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 7816. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

4. Podsumowanie i wnioski

- Po wykonaniu przeglądu piśmiennictwa i analizy ryzyka powstawania *N*-nitrozoamin w trzech wybranych API produkowanych w Ł-ICHP opracowano nową metodę chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS) z użyciem mikroekstrakcji. Opracowana metoda pozwala na jednoczesne oznaczanie dziewięciu kancerogennych *N*-nitrozoamin w cilostazolu, sunitynibie i olmesartanie medoksomilu. Metodę zoptymalizowano pod względem prędkości wirowania, czasu wirowania, objętości rozpuszczalnika użytego do ekstrakcji i warunków rozdzielania chromatograficznego, a następnie poddano walidacji zgodnie z wytycznymi ICH. Otrzymane granice wykrywalności (0,15–1,00 ng/mL) i wysokie współczynniki determinacji ($R^2 > 0,995$) potwierdziły zdolność metody do wykrywania *N*-nitrozoamin na niskich poziomach stężeń i jej liniowość w badanym zakresie. Walidacja wykazała wysoką dokładność (94–111%) oraz precyzję ($RSD \leq 7,65\%$) metody. W substancji cilostazol i sunitynib nie wykryto zanieczyszczeń, a w substancji olmesartan medoksomilu wykryto NDEA. Zaproponowana procedura jest szybka, przyjazna środowisku i odpowiednia do rutynowej kontroli jakości API w warunkach Dobrej Praktyki Wytwarzania (GMP).
- Do kontroli produktów leczniczych z polskiego rynku farmaceutycznego, w Narodowym Instytucie Leków oraz na potrzeby EDQM, opracowano metodę LC-MS/MS umożliwiającą oznaczanie 1-metylo-4-nitrozopiperyzyny (MNP) w złożonych preparatach z ryfampicyną. Rozwój metody uwzględniał kontrolę wpływu matrycy i opracowanie wydajnej ekstrakcji. Opracowana metoda została poddana walidacji zgodnie z wytycznymi regulacyjnymi ICH. Oceniono parametry takie jak: specyficzność, dokładność, precyzja, granica wykrywalności oraz granica oznaczalności. Odzysk MNP wyniósł $100,4 \pm 3,24\%$, a precyzja pośrednia – 2,6%. Badania stabilności i badania stresowe wykazały, że MNP powstaje zarówno poprzez utlenianie 1-amino-4-metylopiperyzyny, jak i w wyniku rozkładu ryfampicyny w warunkach stresu oksydacyjnego i termicznego. Zaproponowano mechanizm powstawania MNP w oparciu o hydrolizę hydrazonu i dalsze utlenianie produktów degradacji ryfampicyny.
- Powyższe wyniki stały się podstawą do kontynuowania badań nad produktami leczniczymi zawierającymi układ hydrazonowy. Wykonano badania

nad stabilnością wybranych APIs zawierających grupę hydrazonową, ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmów ich utleniania i redukcji. Do analizy wykorzystano aparaturę ROXYTM EC system połączony z wysokorozdzielczą spektrometrią mas typu QTOF, co pozwoliło na jednoznaczną identyfikację produktów degradacji na podstawie dokładnej masy i widm fragmentacyjnych. Przebadano cztery substancje czynne: dantrolen, nitrofurantoinę, furazydynę i nitrofural, wykazując ich znaczną elektroaktywność i tendencję do tworzenia potencjalnie niebezpiecznych produktów degradacji. Łącznie zidentyfikowano siedem produktów utleniania i dziesięć produktów redukcji, w tym nowe zanieczyszczenia nieopisane dotychczas w piśmiennictwie. Uzyskane wyniki eksperymentalne wsparto obliczeniami kwantowo-mechanicznymi (DFT). Ponadto, z wykorzystaniem komercyjnie dostępnego oprogramowania *in silico*, porównano przewidywane produkty metaboliczne z tymi uzyskanymi metodami eksperymentalnymi. Połączenie elektrochemii z wysokorozdzielczą spektrometrią mas okazało się użyteczne jako narzędzie do oceny stabilności związków, wykrywania nowych zanieczyszczeń oraz określania ich struktury.

- Wdrożenia metod potwierdzają poniżej zamieszczone dokumenty:

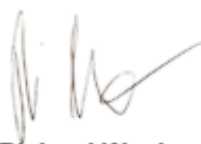
Intergovernmental Committees and Networks Department (ICND)

PZ/PH/2025-03200L
RW/bs

Strasbourg, 4 August 2025

To whom it may concern

This is to confirm that Ms. Anna Witkowska actively participates in the work of the Mutagenic Contaminants OMCL Testing Group, the 2025 Nitrosamines CAP Surveillance Programme, and in the implementation of analytical methods for the control of nitrosamines in medicinal products under CAP procedures.



Dr. Richard Wanko

Head of the Market Surveillance Section

 Łukasiewicz Industrial Chemistry Institute	VALIDATION REPORT		SOP/NJ/44-01 Attachment no. 2	
	Title: Nitrosamines content determination in APIs by GCMS method		RAN/BAB/01/22	
			Copy:	
			Page:	1/168
	Issue: 1		Date:	

Authorization	Name, surname	Position	Signature	Date
Author	Anna Witkowska	Specialist of Team of Analytical Research		15.04.2022
Checked by	Elżbieta Stolarczyk	Main specialist of Team of Analytical Research		15.04.2022
Accepted by	Marta Zezula	Head of Team of Analytical Research		15.04.2022

5. Oświadczenia wszystkich współautorów publikacji

5.1. Publikacja 1 (przeglądowa)

Witkowska, A. B.; Zezula, M.; Glice, M.; Stolarczyk, E.U.; Nowe aspekty metodyki oznaczania *N*-nitrozoamin, *Przemysł Chemiczny* 2021;100(3):230-239.

Warszawa 16.09.2025 ✓
(miejscowość, data)

Anna Barbara Witkowska
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Nowe aspekty metodyki oznaczania N-nitrozoamin”, (Przemysł Chemiczny 2021;100(3):230-239) oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: **przegląd piśmiennictwa, wyciągnięcie wniosków, redagowanie i korekta manuskryptu.**

Mój wkład procentowy w przygotowaniu publikacji określłam jako 50%.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Anny Witkowskiej.

Anna Witkowska

(podpis oświadczającego)

Nasrady 05.08.2025.....
(miejscowość, data)

Elżbieta Urszula Stolarczyk
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Nowe aspekty metodyki oznaczania *N*-nitrozoamin”, (Przemysł Chemiczny 2021;100(3):230-239) oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: **opracowanie koncepcji, przegląd piśmiennictwa, wyciągnięcie wniosków, redagowanie i korekta manuskryptu, prowadzenie korespondencji z redakcją.**

Mój wkład procentowy w przygotowaniu publikacji określłam jako 48%.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Anny Witkowskiej.

.....
(podpis oświadczającego)

Warszawa 16.09.2025
(miejscowość, data)

Marta Zezula
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Nowe aspekty metodyki oznaczania *N*-nitrozoamin”, (Przemysł Chemiczny 2021;100(3):230-239) oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: **korekta manuskryptu**.

Mój wkład procentowy w przygotowaniu publikacji określám jako 1%.

Jednocześnie wyrażám zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Anny Witkowskiej.

Marta Zezula
(podpis oświadczającego)

Włocławek, 17.09.2025.
(miejscowość, data)

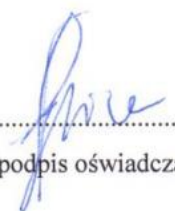
Magdalena Glice
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Nowe aspekty metodyki oznaczania *N*-nitrozoamin”, (Przemysł Chemiczny 2021;100(3):230-239) oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: **korekta manuskryptu.**

Mój wkład procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 1%.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Anny Witkowskiej.


.....
(podpis oświadczającego)

5.2. Publikacja 2 (oryginalna)

Witkowska, A.B.; Giebułtowicz, J.; Dąbrowska, M.; Stolarczyk, E.U.; Development of a Sensitive Screening Method for Simultaneous Determination of Nine Genotoxic Nitrosamines in Active Pharmaceutical Ingredients by GC-MS; International Journal of Molecular Sciences 2022; 23(20): 1-11.

Warszawa 16.09.2025
(miejscowość, data)

Anna Barbara Witkowska
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „*Development of a Sensitive Screening Method for Simultaneous Determination of Nine Genotoxic Nitrosamines in Active Pharmaceutical Ingredients by GC-MS*”(International Journal of Molecular Sciences **2022**; 23(20): 1-11) oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: **opracowanie koncepcji badań, opracowanie metodyki badań, przegląd piśmiennictwa, analiza wyników, interpretacja wyników, wyciągnięcie wniosków, redagowanie i korekta manuskryptu, prowadzenie korespondencji z redakcją.**

Mój wkład procentowy w przygotowaniu publikacji określłam jako 70%.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Anny Witkowskiej.

Anna Witkowska
(podpis oświadczającego)

Nasza, dn. 05.08.2025
(miejscowość, data)

Elżbieta Urszula Stolarczyk
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „*Development of a Sensitive Screening Method for Simultaneous Determination of Nine Genotoxic Nitrosamines in Active Pharmaceutical Ingredients by GC-MS*”(International Journal of Molecular Sciences **2022**; 23(20): 1-11) oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: **opracowanie koncepcji badań, opracowanie metodyki badań, nadzór nad przebiegiem badania, analiza wyników, redagowanie i korekta manuskryptu.**

Mój wkład procentowy w przygotowaniu publikacji określám jako 24%.

Jednocześnie wyrażám zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Anny Witkowskiej.


(podpis oświadczającego)

Warszawa 08.09.2025
(miejscowość, data)

Magdalena Dąbrowska
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „*Development of a Sensitive Screening Method for Simultaneous Determination of Nine Genotoxic Nitrosamines in Active Pharmaceutical Ingredients by GC-MS*”(International Journal of Molecular Sciences **2022**; 23(20): 1-11) oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: **korekta manuskryptu.**

Mój wkład procentowy w przygotowaniu publikacji określłam jako 1%.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Anny Witkowskiej.

Magdalena Dąbrowska
(podpis oświadczającego)

Warszawa, 16.09.2025 r
(miejscowość, data)

Joanna Giebułtowicz
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „*Development of a Sensitive Screening Method for Simultaneous Determination of Nine Genotoxic Nitrosamines in Active Pharmaceutical Ingredients by GC-MS*”(International Journal of Molecular Sciences **2022**; 23(20): 1-11) oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: **korekta manuskryptu.**

Mój wkład procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5%.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Anny Witkowskiej.



.....
(podpis oświadczającego)

5.3. Publikacja 3 (oryginalna)

Witkowska, A.B.; Wołczyńska, A.; Lis-Cieplak, A.; Stolarczyk, E.U.,
Development and Validation of LC-MS/MS Method for the Determination of
1-Methyl-4-Nitrosopiperazine (MNP) in Multicomponent Products with
Rifampicin—Analytical Challenges and Degradation Studies; *Molecules* 2023;
28(21):1-15. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules28217405>

Warszawa, 16.09.2025
(miejscowość, data)

Anna Barbara Witkowska
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „*Development and Validation of LC-MS/MS Method for the Determination of 1-Methyl-4-Nitrosopiperazine (MNP) in Multicomponent Products with Rifampicin—Analytical Challenges and Degradation Studies*” (*Molecules* **2023**; 28(21):1-15) oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: **opracowanie koncepcji badań, opracowanie metodyki badań, przegląd piśmiennictwa, analiza wyników, interpretacja wyników, wyciągnięcie wniosków, redagowanie i korekta manuskryptu.**

Mój wkład procentowy w przygotowaniu publikacji określám jako 70%.

Jednocześnie wyrażám zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Anny Witkowskiej.

Anna Witkowska
(podpis oświadczającego)

Ramzusa, 05.09.2025r.
(miejscowość, data)

Aleksandra Wołczyńska
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „*Development and Validation of LC-MS/MS Method for the Determination of 1-Methyl-4-Nitrosopiperazine (MNP) in Multicomponent Products with Rifampicin—Analytical Challenges and Degradation Studies*” (*Molecules* **2023**; 28(21):1-15) oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: **korekta manuskryptu.**

Mój wkład procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5%.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Anny Witkowskiej.

Aleksandra Wołczyńska
(podpis oświadczającego)

Warszawa, 04.09.2025r.
(miejscowość, data)

Agnieszka Lis-Cieplak
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „*Development and Validation of LC-MS/MS Method for the Determination of 1-Methyl-4-Nitrosopiperazine (MNP) in Multicomponent Products with Rifampicin—Analytical Challenges and Degradation Studies*” (*Molecules* **2023**; 28(21):1-15) oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: **ilustrowanie i korekta manuskryptu.**

Mój wkład procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5%.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Anny Witkowskiej.

Agnieszka Lis-Cieplak
(podpis oświadczającego)

Warszawa, dn. 05.08.2025
(miejscowość, data)

Elżbieta Urszula Stolarczyk
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „*Development and Validation of LC-MS/MS Method for the Determination of 1-Methyl-4-Nitrosopiperazine (MNP) in Multicomponent Products with Rifampicin—Analytical Challenges and Degradation Studies*” (*Molecules* **2023**; 28(21):1-15) oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: **opracowanie koncepcji badań, przegląd piśmiennictwa, interpretacja wyników, wyciągnięcie wniosków, redagowanie, korekta manuskryptu i prowadzenie korespondencji z redakcją.**

Mój wkład procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 20%.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Anny Witkowskiej.

.....
(podpis oświadczającego)

5.4. Publikacja 4 (oryginalna)

Witkowska, A.B.; Stolarczyk, K.; Fusaro, M.; Leś, A.; Giebułtowski, J.; Stolarczyk, E.U., Oxidation and Reduction of Hydrazones—Risk Factors Related to the Manufacture and Stability of the Drugs; International Journal of Molecular Sciences 2025; 26(9):1-20. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms26094295>

Warszawa, 16.09.2025
(miejscowość, data)

Anna Barbara Witkowska
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „*Oxidation and Reduction of Hydrazones—Risk Factors Related to the Manufacture and Stability of the Drugs*” (International Journal of Molecular Sciences **2025**; 26(9):1-20) oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: **opracowanie metodyki badań, przegląd piśmiennictwa, analiza wyników, interpretacja wyników, wyciągnięcie wniosków, redagowanie i korekta manuskryptu.**

Mój wkład procentowy w przygotowaniu publikacji określłam jako 40%.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Anny Witkowskiej.

Anna Witkowska
(podpis oświadczającego)

Libiszano, dn. 16.08.2025
(miejscowość, data)

Elżbieta Urszula Stolarczyk
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „*Oxidation and Reduction of Hydrazones—Risk Factors Related to the Manufacture and Stability of the Drugs*” (International Journal of Molecular Sciences **2025**; 26(9):1-20) oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: **opracowanie koncepcji badań, opracowanie metodyki badań, przegląd piśmiennictwa, analiza wyników, interpretacja wyników, wyciągnięcie wniosków, redagowanie, korekta manuskryptu oraz prowadzenie korespondencji z redakcją.**

Mój wkład procentowy w przygotowaniu publikacji określłam jako 38%.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Anny Witkowskiej.


.....
(podpis oświadczającego)

Warszawa, 16.09.2025 r
(miejscowość, data)

Joanna Giebułtowicz
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „*Oxidation and Reduction of Hydrazones—Risk Factors Related to the Manufacture and Stability of the Drugs*” (International Journal of Molecular Sciences **2025**; 26(9):1-20) oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: **redagowanie, korekta manuskryptu.**

Mój wkład procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 2%.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Anny Witkowskiej.



.....
(podpis oświadczającego)

Wojciech... 06.09.2015
(miejscowość, data)

Krzysztof Stolarczyk
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „*Oxidation and Reduction of Hydrazones—Risk Factors Related to the Manufacture and Stability of the Drugs*” (International Journal of Molecular Sciences **2025**; 26(9):1-20) oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: **opracowanie metodyki części badań, przegląd piśmiennictwa, analiza wyników, interpretacja wyników, wyciągnięcie wniosków, redagowanie i korekta manuskryptu.**

Mój wkład procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 10%.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Anny Witkowskiej.

Wojciech... Stolarczyk
(podpis oświadczającego)

Warszawa, 04.09.2025 r.
(miejscowość, data)

Prof. dr hab. Andrzej Leś
Profesor emerytowany
Wydział Chemii
Uniwersytet Warszawski

(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „*Oxidation and Reduction of Hydrazones—Risk Factors Related to the Manufacture and Stability of the Drugs*” (International Journal of Molecular Sciences **2025**; 26(9):1-20) oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: **przeprowadzenie części badań, interpretacja wyników, redagowanie i korekta manuskryptu.**

Mój wkład procentowy w przygotowaniu publikacji określłam jako 5%.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Anny Witkowskiej.



.....
(podpis oświadczającego)

Genova, 2025-09-16
(miejscowość, data)

Massimo Fusaro
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „*Oxidation and Reduction of Hydrazones—Risk Factors Related to the Manufacture and Stability of the Drugs*” (International Journal of Molecular Sciences **2025**; 26(9):1-20) oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: **przeprowadzenie części badań i korekta manuskryptu.**

Mój wkład procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5%.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Anny Witkowskiej.



(podpis oświadczającego)

6. Wykaz innych publikacji naukowych

- 1) Witkowska, A.; Biedrzycka, M.; Izdebski, R.; Literacka, E.; Urbanowicz, P.; Deforet, F.; Carrière, R.; Robin, F.; Stolarczyk, E.U.; Lemoine, J.; Gniadkowski, M.; Assessment of an LC coupled with tandem MS (LC-MS/MS) tool in the detection of antimicrobial resistance mechanisms in Enterobacterales , *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2025, djaf339, <https://doi.org/10.1093/jac/dkaf339>
- 2) Stolarczyk, E.U.; Strzempek, W.; Muszyńska, M.; Kubiszewski, M.; Witkowska, A.B.; Trzcińska, K.; Wojdasiewicz, P.; Stolarczyk, K. Preparation of Diosgenin-Functionalized Gold Nanoparticles: From Synthesis to Antitumor Activities. *Int. J. Mol. Sci.* 2025, 26, 1088. <https://doi.org/10.3390/ijms2603108>
- 3) Stolarczyk, E.U.; Groman, A.; Zezula, M.; Witkowska, A.; Application of GC-MS and LC-MS techniques for direct analysis of amines in pharmaceutical substances. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 2022, 79 (5), 603-613 DOI: 10.32383/appdr/15608
- 4) Łaszczyńska, M.; Witkowska, A., Studies of phase transitions in the aripiprazole solid dosage form. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2016, 117, 298-303. DOI: 10.1016/j.jpba.2015.09.004.
- 5) Łaszczyńska, M.; Trzcińska, K.; Witkowska, A.; Ciesielska, A.; Badowska-Rosłonek, K.; Kuziak, K., Structural and Physicochemical Studies of Olopatadine Hydrochloride Conformational Polymorphs. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2016, 105, (8), 2419-2426. DOI: 10.1016/j.xphs.2016.05.031
- 6) Łaszczyńska, M.; Trzcińska, K.; Witkowska, A.; Ciesielska, A.; Badowska-Rosłonek, K.; Kuziak, K., Structural and Physicochemical Studies of Olopatadine Hydrochloride Conformational Polymorphs. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2016, 105, (8), 2419-2426. DOI: 10.1016/j.xphs.2016.05.031
- 7) Łaszczyńska, M.; Trzcińska, K.; Witkowska, A.; Ciesielska, A.; Badowska-Rosłonek, K.; Kuziak, K., Structural and Physicochemical Studies of Olopatadine Hydrochloride Conformational Polymorphs. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2016, 105, (8), 2419-2426. DOI: 10.1016/j.xphs.2016.05.031

- 8) Łaszczyński, M.; Trzcińska, K.; Witkowska, A.; Lipiec-Abramska, E.; Szczepek, W. J., Phase transition studies of dutasteride crystalline forms. *CrystEngComm* 2015, 17, (11), 2346-2352. DOI: 10.1016/j.jpba.2015.09.004
- 9) Łaszczyński, M.; Kubiszewski, M.; Jedyński, Ł.; Kaczmarska, M.; Kaczmarek, Ł.; Łuniewski, W.; Gabarski, K.; Witkowska, A.; Kuziak, K.; Malińska, M., Identification and Physicochemical Characteristics of Temozolomide Process-Related Impurities. *Molecules* 2013, 18, (12), 15344-15356. DOI: 10.3390/molecules181215344
- 10) Łaszczyński, M.; Trzcińska, K.; Filip, K.; Szyrowska, A.; Mucha, M.; Krzeczyński, P., Stability studies of capecitabine. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 2011, 105, (3), 1015-1021. DOI: 10.1007/s10973-011-1351-x
- 11) Filip, K.; Bańkowski, K.; Sidoryk, K.; Zagrodzka, J.; Łaszczyński, M.; Trzcińska, K.; Szyrowska, A.; Cmochoń, P.; Maruszak, W., Physicochemical characterization of ezetimibe and its impurities. *Journal of Molecular Structure* 2011, 991, (1), 162-170. DOI: 10.1016/j.molstruc.2011.02.020
- 12) Filip, K.; Bańkowski, K.; Sidoryk, K.; Zagrodzka, J.; Łaszczyński, M.; Trzcińska, K.; Szyrowska, A.; Cmochoń, P.; Maruszak, W., Physicochemical characterization of ezetimibe and its impurities. *Journal of Molecular Structure* 2011, 991, (1), 162-170. DOI: 10.1016/j.molstruc.2011.02.020
- 13) Jackowski, K.; Makulski, W.; Szyrowska, A.; Antusek, A.; Jaszunski, M.; Juselius, J., NMR shielding constants in BF₃ and magnetic dipole moments of B-11 and B-10 nuclei. *J. Chem. Phys.* 2009, 130, (4), 5. DOI: 10.1063/1.3065670
- 14) Jackowski, K.; Makulski, W.; Szyrowska, A.; Antušek, A.; Jaszuński, M., Temperature dependence of the 1J(11B19F) spin-spin coupling in BF₃ molecule. *Magnetic Resonance in Chemistry* 2009, 47, (10), 857-861. DOI: 10.1002/mrc.2484
- 15) Bodziachowska-Panfil, M.; Groman, A.; Kubiszewski, M.; Stopa, A.; Witkowska, A.; Szczepek, W. J.; Wady i zalety syntez etabonianu loteprednolu, *Przemysł Chemiczny* 2012, 91(3):296-301
- 16) Łaszczyński, M.; Witkowska, A.B.; Trzcińska, K.; Kubiszewski, M.; Kuziak, K. Analiza wodzionów substancji czynnych, *Przemysł Chemiczny* 2012, 91(3):333-341

7. Wykaz innych doniesień zjazdowych

1. Doniesienie zjazdowe nr A1

Stolarczyk, E.U.; **Witkowska, A.B.**; Kryczyk-Poprawa, A.; Dorożyński, P.; Elektrochemiczna degradacja benzofenonu-3 w roztworach wodnych przy zastosowaniu aparatury ROXY - identyfikacja produktów pośrednich za pomocą techniki QTOF, 67. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Wrocław, 22-26.09.2025, sesja plakatowa

2. Doniesienie zjazdowe nr A2

Lis-Cieplak, A.; **Witkowska, A.B.**; Stolarczyk, E. U.; Opracowanie metody oznaczania alkaloidów pirolizydynowych w produktach zielonych po ekstrakcji nadkrytycznej, Polska Konferencja Chemii Analitycznej 2025, Gdańsk, 01-04.07.2025, sesja plakatowa

3. Doniesienie zjazdowe nr A3

Witkowska, A.B.; Stolarczyk, E.U.; Izdebski, R.; Urbanowicz, P.; Literacka, E.; Żabicka, D.; Gniadkowski, M.; Deforet, F.; Carriere, R.; Lemoine, J.; Antibiotic resistance profiling within 1 hour using LC-MS/MS – implementation of the IDAREMS technology in Poland; 7 Konferencja Polskiego Towarzystwa Spektrometrii Mas, Warszawa, 4-6.09.2023, sesja plakatowa

4. Doniesienie zjazdowe nr A4

Michalak, O.; Gruza, M.M.; Łaszczyk, M.; **Witkowska, A.B.**; Trzcińska, K.; Bujak, I.; Cmoch, P., Otrzymywanie i charakterystyka fizykochemiczna zanieczyszczeń oraz półproduktu soli disodowej pemetreksedu, leku przeciwnowotworowego, X Multidyscyplinarna Konferencja Nauki o Leku, Korytnica, 15-19.05.2016, sesja plakatowa

5. Doniesienie zjazdowe nr A5

Łaszczyk, M.; Trzcińska, K.; **Witkowska, A.B.**; Ciesielska, A.; Badowska – Rosłonek, K.; Polimorfizm konformacyjny chlorowodoru olopatadyny, 57 Konwersatorium Krystalograficzne, Wrocław, 25-26.06.2015, sesja plakatowa

6. Doniesienie zjazdowe nr A6

Witkowska, A. B.; Łaszczyk, M.; Trzcińska, K.; Lipiec-Abramska, E.; Szczeppek, W. J.; Charakterystyka form polimorficznych dutasterydu; IX Multidyscyplinarna Konferencja Nauki o Leku, Korytnica, 12-14.05.2014, sesja plakatowa

7. Doniesienie zjazdowe nr A7

Michalak, O.; Jateczak, K.; **Witkowska, A.B.**; Łaszczyńska, M., Pucko, W., Bujak, I., Groman, A., Otrzymywanie i charakterystyka fizykochemiczna form krystalicznych oraz postaci amorficznej soli disodowej pemetreksedu; IX Multidyscyplinarna Konferencja Nauki o Leku, Korytnica, 12-14.05.2014, sesja plakatowa

8. Doniesienie zjazdowe nr A8

Trzcińska, K.; Łaszczyńska, M.; **Witkowska, A.B.**; Krzeczyński, P.; Łuniewski, W.; Badania rentgenostrukturalne i charakterystyka fizykochemiczna monotosylanu lapatynibu, 55 Konwersatorium Krystalograficzne, Wrocław, 27-28.06. 2013, sesja plakatowa

9. Doniesienie zjazdowe nr A9

Łaszczyńska, M.; **Witkowska, A.B.**; Kuźniak, K.; Cmochoń, P.; Filip, K., Gruza, M., Jateczak, K. , Koziak, K.; Gryniewicz, G., Physicochemical characterization of diacetone analog of protoescigenin; Euroanalysis Warszawa, 25-29.08.2013, sesja plakatowa

8. Wykaz innych aktywności naukowych

- członek Mutagenic Contaminants OMCL Testing Group under the European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM) – udział w międzynarodowej współpracy w zakresie regulacji dotyczących analiz *N*-nitrozoamin w produktach leczniczych, analizy produktów z rynku europejskiego (2022 – obecnie).
- „Zastosowanie spektrometrii mas do badania profili zanieczyszczeń w substancjach i produktach farmaceutycznych”; Zajęcia praktyczne dla studentów - farmacja analityczna (WUM) 17-04-2024.
- Zajęcia pokazowe z różnych technik analitycznych na zlecenie KW Policji w Lublinie dla 40 ekspertów z Policji i ze Straży Granicznej z Polski, Rumunii, Bułgarii, Niemiec, Hiszpanii, Estonii i Królestwa Niderlandów. "Narkotyki pod kontrolą - zwiększenie zdolności europejskich organów ścigania do walki z przestępczością narkotykową", "Drugs under control-enhancing European law enforcement capacity drug trafficking crime" 28-29-09-2023.
- wykład: BALTIC STATES MEETING (Spotkanie krajów bałtyckich Litwa, Łotwa, Estonia i Polska) „Nitrosamines and medical cannabis” Paweł Pawłowski, Anna Witkowska 26-27.11.2024, Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych.
- główny wykonawca w projekcie IDAREMS - JPI-EC-AMR Call 2019 grant „Concomitant IDentification and Antibiotic RESistance profile of bacteria in one hour with an adaptive targeted single Mass Spectrometry analysis”, Polski tytuł NCN: ”Jednoczesna identyfikacja i profilowanie antybiotykooporności bakterii w ciągu 1 godziny z wykorzystaniem celowanej spektrometrii mas”, 2021-2025.

Wyjazdy naukowe:

- Analytical Sciences Institute, Lyon, Francja – 4-16.12.2022

Udział w projekcie IDAREMS - JPI-EC-AMR Call 2019 grant „Concomitant IDentification and Antibiotic REsistance profile of bacteria in one hour with an adaptive targeted single Mass Spectrometry analysis”; badania i szkolenie.

- Swissmedic, Berno, Szwajcaria – 6-7.11.2023

Szkolenie EDQM dla członków grupy roboczej EDQM nitrosamine workgroup.