

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.*

