

Farmasötik Ürünler ve Ham Maddelerde N-Nitrozaminlerin Oluşum Mekanizması ve Toksisitesi: Sistemik Derleme

Formation Mechanism and Toxicity of N-Nitrosamines in Pharmaceutical Products and Raw Materials: Systematic Review

 Güler Yağmur AKYÜZ^a,  Ela KADIOĞLU^a

^aGazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji ABD, Ankara, Türkiye

ÖZET Geçtiğimiz yıllarda beşeri ilaçlardaki N-nitrozamin safsızlıklarının tespiti küresel düzenleyici kurumların odak noktası hâline gelmiştir. Bunun başlıca nedeni, N-nitrozaminlerin güçlü mutajenik kanserojenler olarak bilinen bir bileşik sınıfı olmasıdır. Düzenleyici kurumlar bu safsızlıkların hastalar üzerindeki etkileri ve olası risklerin tespit edilmesi üzerine bir seri önlem almıştır. Alınan önlemler çoğu ilaç ürününün piyasadan geri çağırılmasıyla sonuçlanmıştır. İlaç ürünlerinde kanserojen safsızlıkların varlığı ürün geri çağırmanın en endişe verici nedenleri arasında yer almaktadır. İlk olarak 2018 yılında bir aktif farmasötik bileşen üreticisinden alınan valsartanda N-nitrozodimetilamin safsızlığının tespitiyle düzenleyici kurumlar ilaçlarda N-nitrozaminlerin varlığından haberdar olmuşlardır. Yapılan çalışmalar sonucunda, düzenleyici kurumlar incelemeyi sadece valsartan ilaçlarını değil diğer anjiyotensin reseptör blokerlerini (sartanlar) kapsayacak şekilde genişletmiştir. Daha sonra başka ilaç ürünleri ranitidin ve metforminde de eşik limitin üzerinde N-nitrozamin safsızlığı tespit edilmiştir. N-nitrozamin safsızlığı içeren ilaçların yalnızca valsartan ve tetrazol içeren anjiyotensin reseptör blokerleri ile sınırlı kalmayıp aynı zamanda ranitidin ve metformin ilaç ürünlerinin de bu duruma dâhil olması piyasadaki diğer ilaçların kullanıma yönelik güvenlik endişelerini artırmıştır. Geçtiğimiz yıllarda meydana gelen bu olaylar serisinin sonucunda ham madde ve ilaç ürünü üreticilerinin yetersiz ve eksik denetlenmesinin nihai ilaç ürünü kalitesi, güvenilirliği ve muhtemelen etkinliğinde nasıl bir olumsuz etkiye neden olduğu ortaya çıkmıştır. Bu derleme, N-nitrozaminlerin kimyasal ve toksikolojik özelliklerini, ilaçlarda N-nitrozamin safsızlıklarının oluşum mekanizmasını ve düzenleyici kurumlarının ilaç ve ham madde üreticilerine uyguladığı yaptırımlar ve oluşturulan yönergelerin ilaç ve ham madde üretim prosedürlerini nasıl etkilediğini anlatmayı amaçlamaktadır.

ABSTRACT In recent years, the determination of N-nitrosamine impurities in human pharmaceuticals have been the focal point of global regulatory agencies. This is mainly because N-nitrosamines are a class of compounds known as potent mutagenic carcinogens. A series of precautions have been taken to identify the effects on patients and potential risks of these impurities by regulatory agencies. These precautions ended up with recalling of most of the pharmaceutical products from the markets. The presence of carcinogenic impurities in pharmaceutical products is amongst the most worrying reasons for product recalls. Regulatory authorities had become aware of the presence of N-nitrosamines in drugs with the determination of N-nitrosodimethylamine impurity in valsartan, which is purchased from an active pharmaceutical ingredient manufacturer in 2018. Regulatory agencies expanded the investigation to cover other angiotensin receptor blockers (sartans) not only valsartan. Afterwards, N-nitrosamine contamination was also determined above the threshold limit in other drug products such as ranitidine and metformin. The fact that determination of N-nitrosamine impurities in drugs are not only limited to angiotensin receptor blockers containing valsartan and tetrazole ring, but also includes ranitidine and metformin drug products, increased the safety concerns for the use of other drugs on the market. As a result of this series of events in the past years, it has been revealed that inadequate and incomplete inspection of raw material and pharmaceutical product manufacturers has had a negative impact on the quality, safety and possibly efficacy of the final drug product. This review aims to explain the chemical and toxicological properties of N-nitrosamines, the mechanism of formation of N-nitrosamine impurities in drugs, and how the sanctions and regulations imposed by regulatory agencies on drug and raw material manufacturers affect drug and raw material production procedures.

Anahtar Kelimeler: Nitrozaminler; ilaç kontaminasyonu; toksisite

Keywords: Nitrosamines; drug contamination; toxicity

İlaç ürünlerinin üretimi ve depolanması sürecinde oluşan safsızlıklar ve bozunma ürünleri, hastaya hiçbir fayda sağlamamakla beraber hastanın sağlığı açısından potansiyel risk oluşturabilirler.¹

Uluslararası düzenleyici otoriteler tarafından oluşturulan kılavuz ilkeler safsızlıkların nasıl kontrol edilebileceğine dair elde edilen yeni bilgilerin dikkate alınmasıyla yıllar içerisinde güncellenmiştir.² Böy-

Correspondence: Güler Yağmur AKYÜZ

Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji ABD, Ankara, Türkiye

E-mail: yagmur787@yahoo.com



Peer review under responsibility of Journal of Literature Pharmacy Sciences.

Received: 10 Nov 2022

Received in revised form: 18 Jan 2023

Accepted: 24 Mar 2023

Available online: 29 Mar 2023

2630-5569 / Copyright © 2023 by Türkiye Klinikleri. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

lece düzenleyici otoriteler tarafından oluşabilecek bir sağlık tehlikesini önlemek adına daha sıkı bir farmakovijilans uygulanmaktadır. Herhangi bir ilaç ürünü ve o ürüne ait aktif farmasötik bileşenin (AFB) stabilitesi ve safsızlık seviyeleri, farmakovijilans çalışmasında değerlendirilen önemli parametrelerdir.³ İlaç ham madde sentezi veya ilaç ürün üretimi ve depolanması sırasında oluşacak bozunma ürünlerinin ve safsızlıkların kontrolünde “riskin tolere edilebilirliği” yaklaşımı temel alınmaktadır. Bu yaklaşım ile safsızlıkların düşük miktarda ve kontrol edilebilir seviyede olması sağlanmaktadır.⁴ Avrupa otoriteleri, birçoğu Uluslararası Harmonizasyon Topluluğunun [International Council for Harmonisation (ICH)] himayesinde bulunan uluslararası düzenleyici otoritelerle birlikte geliştirilmiş, AFB’ler ilaç ürünlerdeki mutajenik safsızlıkları kontrol etmeyi amaçlayan sağlık yönergelerine sahiptir. Buna ek olarak Avrupa Farmakopesi, ilaçların ve içeriklerinin kalitesi için yasal olarak bağlayıcı standartlar ortaya koymaktadır.² N-nitrozamin bileşikler gıdalarda, havada ve suda eser miktarda bulunmasına rağmen 2018 yılına kadar bu bileşiklerin ilaç ürünlerinde mevcut olduğu bilinmiyordu.⁵ Bu nedenle bu N-nitrozamin bileşikler ilaç ürünlerinin safsızlığı olarak kabul edilmemişti. Haziran 2018 tarihinde Valsartan (Zhejiang Huahai Pharmaceuticals, Çin Halk Cumhuriyeti) AFB üreticisi ürettiği valsartan AFB’sinde “genotoksik” potansiyele sahip olabilecek ve daha önce bilinmeyen bir safsızlığın bulunduğu konusunda müşterisi olan ilaç üreticisini bilgilendirmiştir.² Bu safsızlığı N-nitrozodimetilamin (NDMA) olarak tanımlamış ve AFB’deki varlığının ise üretim prosesiyle ilgili olduğunu bildirmiştir. NDMA, hayvanlarda genotoksik ve kanserojen bir ajan olup Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı tarafından olası insan kanserojeni (Grup 2A kanserojen) olarak sınıflandırılmıştır.⁶ N-nitrozaminler, ICH M7(R1) Potansiyel Kanseröjen Riski Sınırlamak İçin İlaçlardaki DNA Reaktif (Mutajenik) Safsızlıkların Değerlendirmesi ve Kontrolü kılavuzunda “endişe grubu” [cohort of concern (CoC)] olarak adlandırılmıştır.⁷ Avrupa Komisyonu [European Commission (EC)] valsartan içeren ilaç ürünlerinde nitrozamin safsızlıklarının fayda-risk etkisinin değerlendirilmesi amacıyla 2001/83/EC sayılı direktifin 31. maddesi kapsamında Beşeri Tıbbi

Ürünler Komitesi [The Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP)] tarafından yürütülen bir araştırma başlatmıştır ve bu ürünlerle ilgili pazarlama izinlerinin sürdürülmesi, değiştirilmesi, askıya alınması veya iptal edilmesi konusunda bir öneride bulunmasını istemiştir.⁸ Ayrıca önlem amacıyla bu çalışma yalnızca Zhejiang Huahai AFB’lerini değil, Avrupa Birliğindeki tüm valsartan ilaçlarını kapsamıştır. Ardından Avrupa İlaçlar ve Sağlık Bakımı Kalite Müdürlüğü [The European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM)], Zhejiang Huahai’nin ürettiği valsartana ait Avrupa Farmakopesi monograflarına [A certificate of suitability to the monographs of the European Pharmacopoeia (CEP)] uygunluk sertifikasını askıya almıştır. Böylece bu şirkete ait valsartan ilaç ürünlerinin piyasaya sürülmesi etkin bir şekilde engellenmiştir. CHMP, 31. madde araştırmasını N-nitrozaminlerin nasıl meydana geldiğinin anlaşılmasına yönelik olarak moleküler yapılarında tetrazol grubu içeren tüm sartanları (kandesartan, irbesartan, losartan, olmesartan ve valsartan) kapsayacak şekilde genişletmiştir.⁹ Ortak moleküler yapı olan tetrazol halkası sentezinin bu sartanlarda nitrozamin oluşumuna yol açtığı belirlenmiştir.¹⁰ Araştırmalar ilerlerken, N-nitrozaminlerin sadece Zhejiang Huahai’den alınan valsartan AFB’si ile sınırlı olmadığı doğrulanmıştır. Başka AFB üreticilerine ait farklı sartan ürünlerinde N-nitrozaminlerin varlığı tespit edilmiştir. Daha sonra pioglitazon AFB üreticisi bazı ürün serilerinde NDMA safsızlığına rastlandığı konusunda EDQM’yi bilgilendirmiştir fakat ilgili pioglitazon serilerindeki NDMA seviyelerinin sartanlar için belirlenen ara limitlerin altında olduğu gözlemlenmiştir. Sartan olmayan bir AFB’de de N-nitrozamin varlığı tespit edilmesi endişe uyandırıcı durum olmuştur.¹⁰ EC’nin talebi üzerine Eylül 2019 tarihinde ranitidin içeren ilaç ürünleri için 31. madde araştırması başlatılmış ve bu ürünlerin hem AFB’sinde hem de ilaç ürünlerinde NDMA safsızlığı içerdiği gösterilmiştir. Bu sonuçlar ışığında ranitidin içeren ilaç ürünlerinin eczanelerden geri çağırılması başlatılmıştır.¹⁰ Amerika Bileşik Devleti Gıda ve İlaç İdaresi [U.S. Food and Drug Administration (FDA)] tarafından uygulanan stabilite testi sonucunda oda sıcaklığında saklanan bazı ranitidin ürünlerinde NDMA seviyelerinin kabul edilemez se-

viyelere ulaşabileceği gösterilmiştir. Hızlandırılmış stabilite testi sonucunda ise ürünlerde yüksek NDMA seviyeleri tespit edilmiştir. Bu testin sonucu, saklama koşullarına bağlı olarak NDMA seviyelerinin arttığını göstermiştir.¹¹ Bu sonuçlar eşliğinde tüm ranitidin ürünleri dünya genelinde ilaç pazarından geri çekilmiştir. Singapur hükümeti Kasım 2019 tarihinde metformin ilaç ürünlerinde NDMA safsızlığı kontaminasyonu nedeniyle bazı ürünleri piyasadan geri çekmiştir. Bu durum farklı coğrafyalardaki düzenleyici kurumların inceleme başlatmasına neden olmuştur. FDA bazı örneklerde safsızlıkların kabul edilebilir alım sınırını aşmadığını gözlemlemiş fakat bazı uzun salınlı tabletlerde bu sınırın aşıldığı belirtilmiştir. FDA, 5 şirkete gönüllü olarak metformin ilaç ürünlerini piyasadan çekmesi için çağrıda bulunmuştur.¹² Son olarak Ağustos 2022 tarihinde FDA, Tip 2 diyabet tedavisinde kullanılan sitagliptin ilaç ürünlerinin bazı örneklerinde Nitroso-STG-19 (NTTP olarak bilinen) olan bir N-nitrozamin safsızlığının farkına varmıştır (Şekil 1).¹³

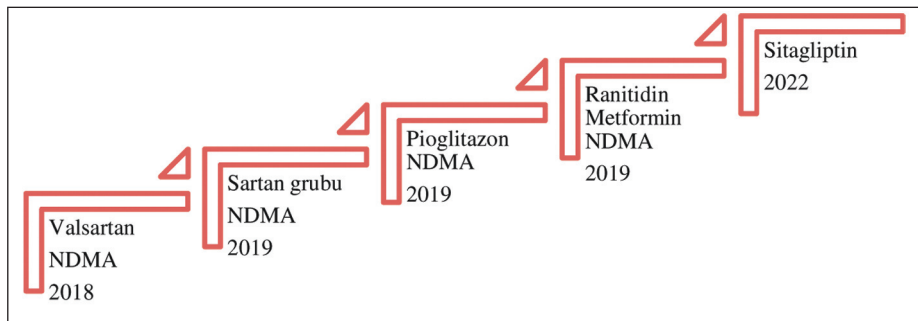
Hâlihazırda onaylanmış ve piyasada mevcut olan ilaç ham maddeleri ve ilaç ürünlerinin geriye dönük yapılan araştırmalarının dışında bu N-nitrozamin safsızlıkları yeni onaylanacak ilaçlar için de artan bir endişe kaynağı olmaktadır. NDMA, ilaç ham maddesi ve ilaç ürünlerinde en sık bildirilen N-nitrozamin safsızlıklarından biridir. Gıda, hava ve sudan kaynaklanan N-nitrozamin maruziyetleri kontrol edilemezken ilaç ürünlerindeki N-nitrozamin safsızlıklarına olan maruz kalımın kontrol edilmesi zorunluluğu vardır. Pazarlama ruhsatı sahipleri [marketing authorisation holder (MAH)] N-nitrozamin safsızlığı kontaminasyonuna ilişkin AFB ve bitmiş

ürünlerde kontrol stratejisi uygulamalıdır. Bu strateji üretim/kontaminasyon riskini en aza indirecek mevcut ve ileriye dönük önlemleri içermelidir. Alınan önlemler üretim sürecinin değiştirilmesi, uygun spesifikasyonların tanımlanması ve uygun yöntemlerin geliştirilmesi, tesis ve ekipmanlara yönelik önlemler, temizlik prosedürleri ve çevresel izlemeyi içerebilir. Ayrıca tedarikçi değişikliği, üretim süreci değişikliği ve ambalaj değişikliği gibi faktörlerin riski nasıl etkiyebileceği konusunda çalışmaların yapılması gerekmektedir.¹⁰

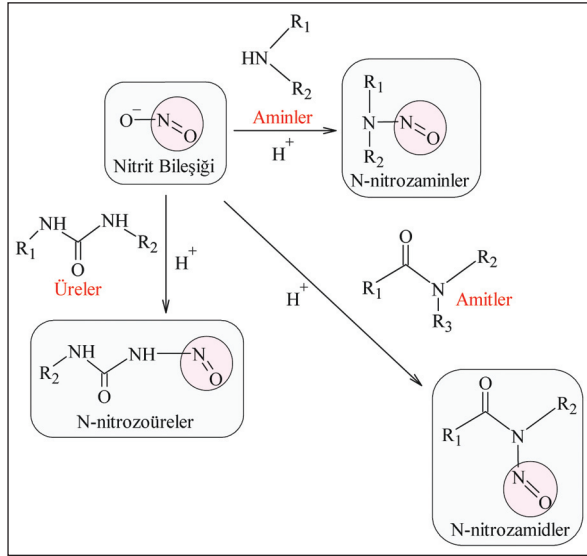
N-NİTROZAMİNLERİN KİMYASI

N-nitrozaminler, üyelerinin çoğunun güçlü kanserojen olduğu, insanların çevre, gıda ve ilaçlardan maruz kaldığı bir bileşik sınıfıdır. N-nitrozaminlerin kimyasını anlamak, bu safsızlıkların ilaç ham madde ve ürünlerinde, önlenmesi ve kontrolü sırasında karşılaşılabilecek zorlukların üstesinden gelinmesi açısından çok büyük bir önem taşımaktadır. N-nitrozaminlerin yapısı ve reaktivitesinin incelenmesi ortaya çıkış yollarını anlamamıza olanak sağlayacaktır.

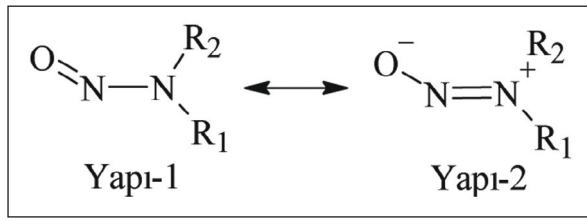
Alkil, alkilaril, aril veya siklik aminlerden türetilen N-nitrozaminler, N-nitrozo bileşikleri olarak bilinen daha büyük bir güçlü kanserojen bileşik grubuna aittir.² N-nitrozo bileşikleri bir aminin nitroz asit, nitrosil türleri, nitrojen oksitler ve nitrit tuzları vb. gibi nitrozlayıcı bir ajanla reaksiyona girmesi sonucu oluşmaktadır.^{14,15} Nitrozlayıcı maddeler sırasıyla aminler, amidler ve ürelerle reaksiyona girdiğinde oluşan 3 ana nitrozo bileşiği N-nitrozaminler, N-nitrozamitler ve N-nitrozoüreleri oluştururlar (Şekil 2).¹⁶



ŞEKİL 1: Nitrozamin safsızlıkları zaman çizelgesi.
NDMA: N-nitrozodimetilamin.



ŞEKİL 2: Nitritlerin aminler, amitler ve üreler ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan N-nitrozo bileşikler.



ŞEKİL 3: N-nitrozaminlerin rezonans yapıları.

Fiziksel özellikleri açısından, N-nitrozaminler, damıtılabilir sıvılar veya kristal katılar olarak izole edilebilen kararlı organik bileşiklerdir.² Nitrozaminler tipik olarak yapı-1 gibi gösterilse de gerçek yapıları ve kimyasal reaktiviteleri; zwitteriyonik rezonansı yapı-2'den büyük ölçüde etkilenir (Şekil 3).¹⁷ N-Nitrozaminler esas olarak Lewis bazları ve hidrojen bağı alıcıları olarak işlev görür.²

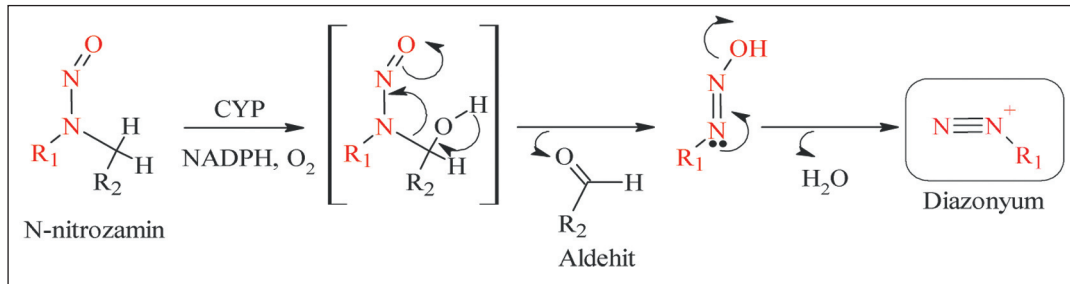
Nitrozlayıcı ajanlar farklı reaktivitelere sahiptir, reaksiyon ortamının pH'sine ve çözücünün doğasına bağlı olarak aminlerle farklı şekilde reaksiyona girebilir. Düşük pH'lerde daha güçlü nitrozlayıcı reaktifler bulunur fakat amin protonlanır yani daha az reaktif hâle gelir. Bu nedenle, etkili nitrozlanma koşulları, aminin hem pH'sine hem de bazlığına bağlıdır. Mekanizmanın, tercihen asidik koşullar altında ilerlediği düşünülmektedir. Nitrozaminlerin üretimi için sodyum nitrit ve ikincil aminler anahtar öncülerdir.¹⁷

N-NİTROZAMİNLERİN METABOLİK AKTİVASYONU

N-nitrozaminlerin kendisi DNA ile reaksiyona girmez, DNA-reaktif bir molekül hâline gelebilmesi için metabolik aktivasyona uğraması gerekmektedir. Buna rağmen N-nitrozaminler risk değerlendirmesinde DNA reaktif bir kanserojen olarak kabul edilirler.¹⁸

Şekil 4'te gösterilen N-nitrozaminlerin oksidatif biyoaktivasyonu şu şekildedir; N-nitrozaminin α -karbonunda meydana gelen α -hidroksilasyon reaksiyonu sonucu bir aldehit açığa çıkar ve diazohidroksit oluşur. Diazohidroksitin, daha fazla ayrışması sonucu elektrofilik N-alkil veya N-aril-diazonyum iyonları meydana gelir. Oluşan bu güçlü alkilleyici diazonyum iyonları, DNA ve proteinler gibi makromoleküllerin nükleofilik bölgelerine atak yaparak katılma ürünleri oluştururlar.^{10,19}

N-nitrozamin türevlerinde oksitlenebilir α -karbonunun mevcudiyeti nitrozaminlerin metabolizmaya bağlı karsinogenitesi için kritik bir gerekliliktir. α -



ŞEKİL 4: N-nitrozaminlerin biyoaktivasyon sonucu DNA ile reaksiyona girebilecek elektrofilik diazonyuma dönüşümü.

CYP: Sitokrom P450; NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat; O₂: Oksijen; H₂O: Su.

Hidroksilasyon reaksiyon mekanizması sterik engel (örneğin dallanma yoluyla), zincir uzunluğu, atom tipleri ve bağ kuvvetlerinin yanı sıra elektrofiliklik gibi küçük yapı farklılıkları nedeniyle değişebilir.²⁰ α -Karbondaki substitüsyonların artmasıyla α -karbon hidrojenlerinin sayısı azalmakta bu da nitrozaminlerin karsinojenik potensinin azalmasına sebep olmaktadır.²¹ Hem elektronik hem de sterik etkiler, metabolizma mekanizmasını kısmen veya tamamen engelleyebilir ve potansiyel olarak alternatif bir metabolizma mekanizmasına neden olabilir, bu da kanserojen etkinin önemli ölçüde azalmasına veya ortadan kaldırılmasına neden olabilir.

İLAÇ HAM MADDE VE ÜRÜNLERİNDE N-NİTROZAMİNLERİN OLUŞUM MEKANİZMALARI

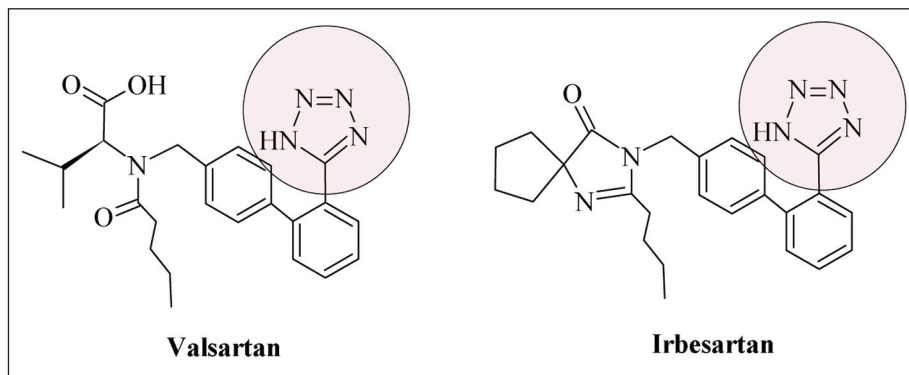
VALSARTAN VE SARTAN GRUBU İLAÇLAR

Valsartan, nitrozamin safsızlıklarının araştırıldığı ilk ilaçtır. Bu çalışmanın ışığında araştırmalar sartan sınıfındaki diğer ilaçları da kapsayacak şekilde genişletilmiştir. N-nitrozamin safsızlıkları, özellikle molekül yapısında tetrazol halkası içeren sartanlarda gözlenmiştir (Şekil 5). 5-substitüe-1H-tetrazollerin oluşumu, organik nitrillerin, inorganik veya organometalik azid reaktifleri ile 1,3-dipolar sikloadisyon (siklizasyon) reaksiyonu sonucunda gerçekleşmektedir.²²

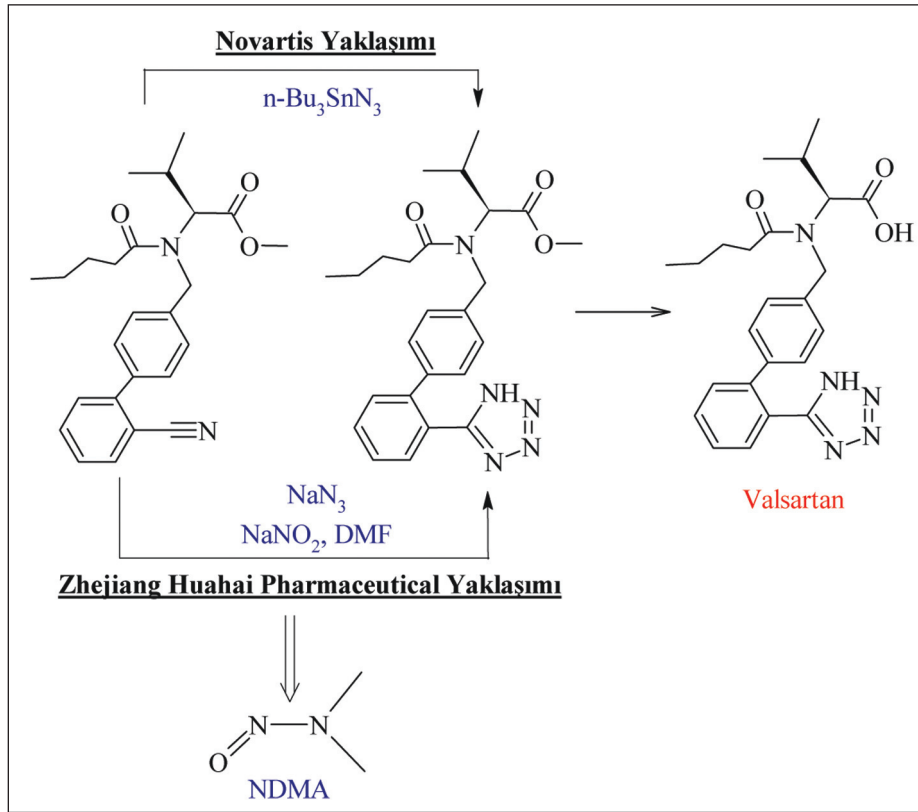
Valsartan molekülünün keşfini yapan Novartis, tetrazol halkasının sentezinde bir nitril ara ürünü ve tributiltin azid ($n\text{-Bu}_3\text{SnN}_3$) kullanmıştır.²³ 2011-2012 yıllarında Novartis'in valsartan patentinin son-

lanmasıyla beraber yüksek pazar talebi nedeniyle bu ilacın jenerik versiyonları üretilmiştir.²³ Zhejiang Huahai Pharmaceutical dâhil olmak üzere birkaç Çin kökenli AFB üreticisi reaksiyon verimini artırmak amaçlı (üretim ölçeğini büyütmek için) tetrazol halkası üretiminde kullanılan tributiltin azidi, sodyum azidle değiştirmiştir (Şekil 6). Böylece Novartis'in uyguladığı sentez yöntemini değiştirmiştir.²⁴⁻²⁶ Üretim sürecindeki bu değişiklik, valsartandaki nitrozaminlerin kaynağıdır. Sartan üretimine yönelik çoğu işlemden, azid reaktifleri fazla miktarda kullanılır ve bu nedenle üreticiler, fazla azid miktarını uzaklaştırmak amacıyla en az eş molar miktarda sodyum nitrit (NaNO_2) kullanmayı seçerler.² Üretimde azidin sönmelenmesi için kullanılan sodyum nitritin asidik koşullar altında nitröz aside dönüşmesi, nitrozasyona yüksek oranda eğilimli aminlerle reaksiyona girmesinin yolunu açmaktadır.

Sartan üretiminde reaksiyonları hızlandırmak ve siklizasyon reaksiyonunun dengesini ürüne kaydırmak için kullanılan, dimetilformamid (DMF), dimetilsülfoksit ve N-metilpirolidon gibi yüksek kaynama noktalı polar aprotik çözücüler, trietilamin (TEA) ve diizopropiletilamin gibi reaksiyon ortamına eklenen bazı yardımcı maddeler, trietilamoniyum hidroklorür (TEA HCl) ve tetrabutilamoniyum bromür gibi reaksiyon hızını artırmak için kullanılan tipik katalizörler N-nitrozamin oluşumunu tetikleyen muhtemel amin kaynaklarıdır.^{27,28} Ortak nitrozalama kaynağı sodyum nitritin bu farklı ikincil ve üçüncül amin kaynaklarıyla reaksiyona girmesi sonucu N-nitrozaminlerin oluşumu meydana gelmektedir.



ŞEKİL 5: Tetrazol halkası içeren bazı sartan molekülleri.



ŞEKİL 6: Novartis ve Zhejiang Huahai Pharmaceutical tarafından kullanılan valsartan sentezi.
 $n\text{-Bu}_3\text{SnN}_3$: Tributiltin azid; NaN_3 : Sodyum azid; NaNO_2 : Sodyum nitrit; DMF: Dimetilformamid.

İrbesartan ilaç ürünlerinde kök neden yine tetrazol halkasının oluşumuyla ilişkilendirilmiş fakat halkanın sentezin hangi aşamasında oluşturulduğu önem kazanmıştır. İrbesartan üretiminde iki ana yaklaşım bulunmaktadır. Bu yaklaşımlar tetrazol halkasının son aşamada eklenmesi veya sentezin ön aşamalarında oluşturulması şeklindedir. Tetrazol halkasının, sentezin ön aşamalarında oluşturulmasıyla N-nitrozamin safsızlığı oluşumunun önüne geçilmesi mümkün olmaktadır.³

Pioglitazon

Pioglitazon vakasında N-nitrozamin oluşumunda muhtemel kök neden, sentezin erken aşamalarında kullanılan sodyum nitritin ilerleyen sentetik aşamalarda kullanılan DMF ile reaksiyona girmesi olarak nitelendirilmiştir. Ayrıca reaksiyonda NDMA safsızlığı içeren DMF kullanımının da olası bir kök neden olabileceği belirtilmiştir. Sartan vakalarının aksine pioglitazondaki N-nitrozamin safsızlığının sentetik son aşamada değil önceki reaksiyon basa-

maklarından taşınma ile meydana geldiği anlaşılmıştır. Diğer bir deyişle farklı sentez basamaklarında kullanılan sodyum nitrit ve DMF'nin safsızlık oluşumunun ana sebebi olduğu bilinmektedir. DMF yerine nitrozlanmayan bir çözücünün kullanılmasıyla nitrozamin safsızlığı oluşumunun önüne geçilebilir. Fakat bu tarz bir üretim geliştirme kapsamlı bir şekilde gerekecektir.²

Ranitidin

Ranitidin ilaç ürünlerinde ilk üretim anında NDMA safsızlığına rastlanmazken, zaman geçtikçe yüksek sıcaklık ve bağıl neme bağlı olarak safsızlığın arttığı gözlenmiştir. Ranitidin ilaç ürünlerindeki N-nitrozamin safsızlığının, proste sentetik bir safsızlık olarak meydana gelmemesi veya üretimde kullanılan kontamine bir kimyasaldan kaynaklanmaması ranitidin vakasını diğer sartan grubu ilaçlardan ayırmaktadır.

Atık suların kloraminleme ile dezenfeksiyonu sonucunda oluşan yan ürünlerden biri de NDMA safsızlığıdır. Bu safsızlığın atık suda nasıl oluştuğunu

araştırmak amacıyla yapılan çalışmalarda, ranitidin ilaç molekülünün bu safsızlığın olası öncüsü olabileceğine dair sonuçlar elde edilmiştir.²⁹ Ranitidin molekülünde yer alan C-S bağının kopmasıyla meydana gelen bozunma ürününün kloramin varlığında oksidasyona uğraması NDMA oluşumunda en çok tercih edilen yoldur (Şekil 7).³⁰ Bu kök neden analizinden yola çıkarak, ilaç üretimi sırasında kullanılan suyun kloraminle kontamine olduğu düşünülmüştür.³¹ Fakat yeni üretilmiş ranitidin ürününde NDMA safsızlığına rastlanmaması temel nedenin bu olmadığını göstermiştir.

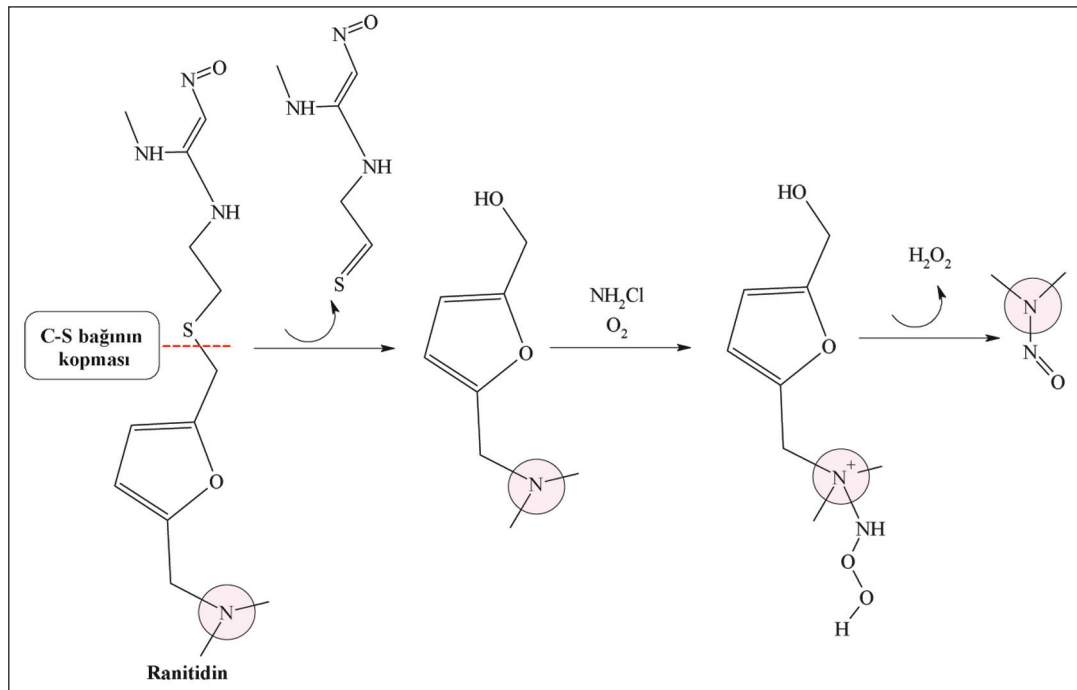
Ranitidin ilaç ürünlerinde NDMA safsızlığının temel nedenini belirlemek için izotopik olarak etiketlenmiş etkin madde ile yapılan çalışmalar, moleküller arası bir reaksiyon sonucunda bu safsızlığın meydana geldiğini göstermiştir ve harici bir nitrozlayıcı ajana ihtiyaç olmadan reaksiyonun gerçekleştiğine dair güçlü kanıtlar sağlamıştır. Bozunma hızını etkileyen faktörlerin ısı, nem ve ranitidin kristal morfolojisi olduğu belirtilmiştir. NDMA oluşum hızı ve kristal morfolojisi değerlendirildiğinde, çubuk (sütun) yapı kristallerin yüzey özellikleri nedeniyle en yavaş oluşum oranına sahip olduğu belirtilmiştir.³¹

Metformin

Metformin hidroklorür, dimetilamin (DMA) hidroklorür ve 2-siyanoguanidinin reaksiyonu sonucu sentezlenmektedir (Şekil 8).

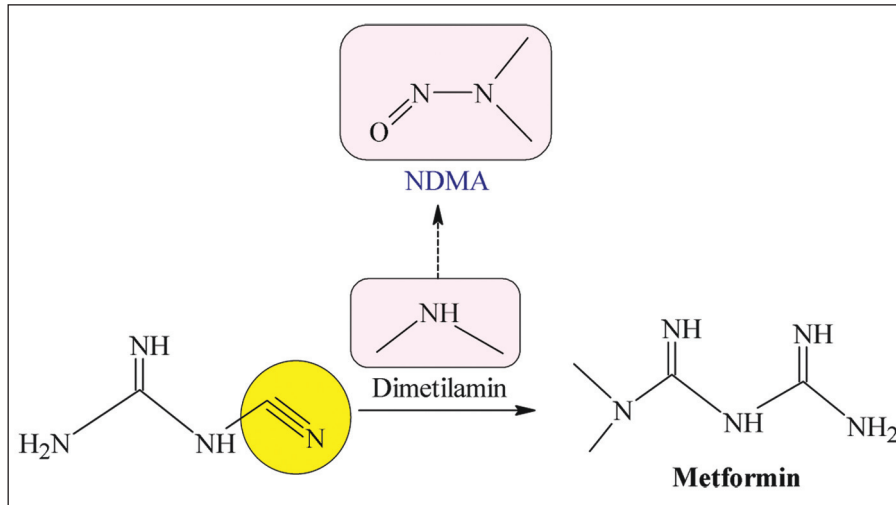
Bitmiş AFB'de eser miktarda bulunan DMA, uygun koşullar altında nitrozlayıcı ajanlarla reaksiyona girerek NDMA'yı oluşturabilir. AFB'deki kalıntı DMA'nın sınırlandırılması NDMA kontrolü için önemli bir faktördür. Metformin ilaç ürünlerinde NDMA kontaminasyonun prekürsörü olarak yalnızca Metformin AFB düşünülse de yapılan araştırmalar bunun öyle olmadığını göstermektedir.³² Özellikle kontaminasyonun metforminin uzun salımlı ürünlerinde daha yüksek seviyelerde gözlenmesi bu safsızlığın kullanılan eksipyanlar ve formülasyondaki aminlerden oluşabileceği fikrini güçlendirmiştir. Belirli koşullar altında, DMA, povidon veya hidroksipropil metil selüloz (hipromelloz) gibi metformin ürünlerinde kullanılan eksipyanlardan gelen nitrit ile reaksiyona giriyor gibi görünmektedir.³³

Metformin ürünlerinde NDMA oluşumu için etkili kontrol stratejilerinin oluşturulmasını sağlamak amacıyla yapılan bir araştırmada, AFB'nin çift kris-



ŞEKİL 7: Ranitidin molekülünün kloramin varlığında N-nitrozodimetilamin safsızlığına dönüşümü.

NH₂Cl: Kloramin; O₂: Oksijen; H₂O₂: Hidrojen peroksit.



ŞEKİL 8: Metformin sentezinde olası N-nitrozodimetilamin oluşum mekanizması.

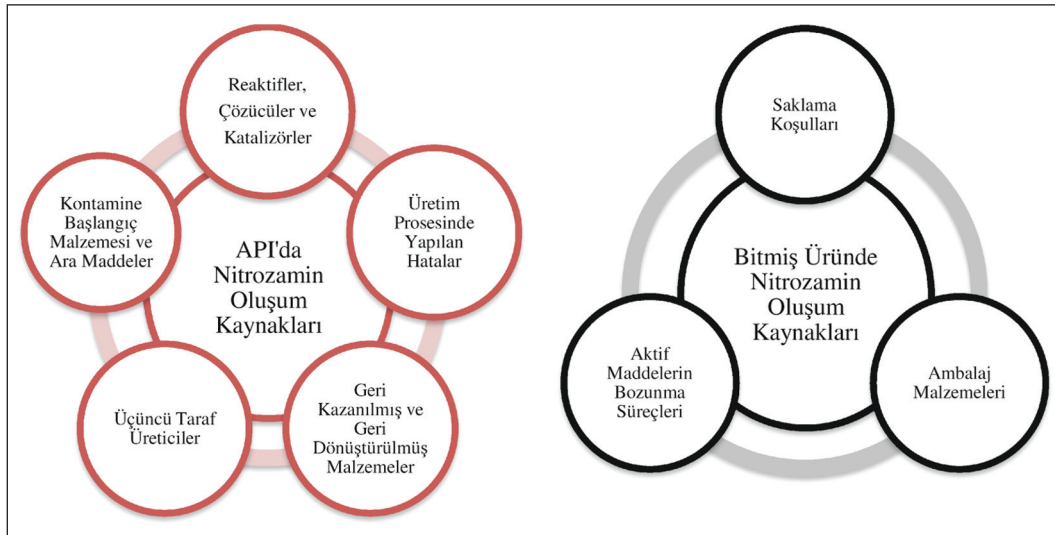
talizasyon yoluyla saflaştırması ile metformin ürünündeki NDMA oluşumunun minimuma indirilebileceği gösterilmiştir. Islak granülasyon işlemi sırasında kullanılan ekspiyantlarda bulunan nitrit/nitrat içeriğinin azaltılmasının önemli olduğu belirtilmiş ve ekspiyant tedarikçisinin değiştirilmesi tavsiye edilmiştir.³⁴ Ekspiyantlardaki değişen nitrit seviyeleri ile NDMA konsantrasyonu arasında bir ilişki olduğu bildirilirken, DMA'nın ise konsantrasyona etkisinin küçük olduğu belirtilmiştir.³³

İLAÇ HAM MADDE VE BİTMİŞ ÜRÜNLERİNDE N-NİTROZAMİNLERİN OLUŞUMU RİSK FAKTÖRLERİ

N-nitrozaminler, bir amin ve bir nitrozlayıcı ajanın uygun koşullar altında reaksiyona girmesi sonucunda meydana gelmektedir. Bugüne kadar ilaç ürünlerinde tespit edilen N-nitrozaminlerin oluşum kaynakları, etkin maddenin üretim süreci ve saklanması veya bitmiş ürün üretimi ve saklanmasıyla ilişkili risk faktörleri olarak gruplandırılmaktadır. Bu risk faktörleri özellikle iyi üretim uygulamaları [good manufacturing practice (GMP)] ile bağlantılıdır.³⁵ N-nitrozamin safsızlıkları için halihazırda tanımlanmış risk faktörleri Şekil 9'da özetlenmiştir. Nitrozamin oluşum kaynakları etkin madde ve bitmiş ürün bazında sınıflandırılmıştır.

N-nitrozaminlerin varlığı, aktif madde üreticilerinin yeterli ürün ve süreç bilgisine sahip olmaması

ve üretim ortamının GMP'ye uyumlu olmamasından kaynaklanmaktadır. Yeterli proses bilgisine sahip olmayan üreticiler, üretim sırasında bu safsızlıkları tanımlayamamakta ve ürünlerini GMP'ye uygun olarak üretirken bu safsızlıkları dikkate almamaktadır. Şikâyetlerin araştırılmaması, spesifikasyon dışı sonuçlar, çözücü geri kazanım işlemlerinin hatalı yapılması, yetersiz temizlik prosedürleri gibi kötü GMP uygulamaları N-nitrozamin safsızlıklarının yayılmasına neden olmaktadır. Daha iyi GMP uyumluluğu adına, kontamine geri dönüştürülmüş çözücülerin kullanılmaması, farklı üretim serileri arasında uygun temizlik prosedürlerinin uygulanması, operasyonel kayıtların düzenli tutulması gibi aksiyonlar N-nitrozamin kontaminasyonu riskini azaltabilir. Başlangıç malzemeleri, ara maddeler, çözücüler, reaktifler ve katalizörler arasındaki safsızlıklara yol açan potansiyel yan reaksiyonların tespit edilmesi ve üretim sürecinin bu yönde geliştirilmesi safsızlıkların önlenmesi açısından önem arz etmektedir. 31. madde araştırmasında AFB'de meydana gelen kontaminasyonun temel nedenleri geri kazanılmış çözücüler ve reaktifler olarak belirlenmiştir.² GMP kuralları kapsamında üretim proseslerinde çözücülerin, geri kazanılması ve geri dönüştürülmesine yaygın olarak izin verilmektedir. Geri kazanılan çözücülerin uygun spesifikasyonları sağlaması şartıyla aynı proseste veya farklı bir proseste kullanılması mümkündür. Fakat genellikle bu geri dönüşüm işlemi işledikleri atığın içeriği hakkında bilgi sahibi



ŞEKİL 9: Aktif madde ve bitmiş üründe nitrozamin oluşum kaynakları.

olmayan üçüncü taraf üreticilere yaptırılmaktadır. Bu yüzden bu tür uygulamalara sıkı kısıtlamalar getirilmesi AFB'lerdeki bilinmeyen safsızlıkların önüne geçilmesi açısından önemlidir. EDQM tarafından askıya alınan sardan CEP'lerinde ölçek bü-yütme faaliyetlerinin bir parçası olarak üretim prosesine NaNO_2 eklenerek AFB üretim sürecinin değiştirilmesi bu nitrit kaynağının başlangıç malzemeleri, ara maddeler, reaktifler, çözücüler, katalizörler olarak kullanılan ikincil veya üçüncül aminlerle reaksiyonuna yol açmış böylece safsızlık oluşumuna öncülük edilmiştir. Nitratlar ve nitritler birçok yardımcı maddede bulunmaktadır. Sodyum nişasta glikolat, kroskarmeloz sodyum, önceden jellatleştirilmiş nişasta, povidon, krosopovidon ve laktoz, eser düzeyde nitrat veya nitrit safsızlıkları taşıyan yardımcı maddelerdir.³⁶ Formülasyon ve saklama koşullarında AFB'lerde veya safsızlık/bozunma ürünlerindeki aminlerin yardımcı maddelerdeki bu nitritlerle reaksiyona girme olasılığı safsızlıklar açısından risk oluşturmaktadır. Yardımcı maddelerdeki nitrit seviyeleri çok düşük olsa bile MAH'lar bitmiş üründe N-nitrozamin safsızlıklarının günlük kabul edilebilir alım değerlerinin üzerine çıkmaması için gerekli önlemleri almalıdır.³⁵ Aktif maddelerin doğal reaktivitesi sonucu veya ekzojen bir nitrozlayıcı ajanın mevcudiyeti ile bozunma sürecine girmesi safsızlıkların oluşumu açısından önem arz etmektedir. Kristal yapısı, kristal davranışı ve

saklama koşullarına (sıcaklık, nem) bağlı olarak meydana gelen bu bozunma aktif ürün ve bitmiş ürün üretim proses ve saklama koşullarında meydana gelebilir. Bu tarz bir bozunmaya örnek olarak ranitidin molekülü verilebilir.¹⁰ Birincil ambalaj malzemesi bileşenleri, bitmiş ilaç ürünlerinde nitrozamin kontaminasyonunun temel nedenlerinden biridir. Nitroselüloz içeren kapak folyolu blisterlerde ısıyla kapatma işlemi sırasında, nitroselülozdan termal olarak nitrojen oksitler üretilir. Bu nitrojen oksitlerin baskı mürekkebinde veya bitmiş üründe bulunan düşük moleküler ağırlıklı aminlerle reaksiyonundan nitrozaminlerin meydana geldiği belirlenmiştir.³⁵ Kapak folyolarını nitroselüloz içermeyen kapak folyoları ile değiştirerek bu temel nedeni ortadan kaldırılması önerilmiştir.

N-NİTROZAMİN SAFSIZLIKLARININ TOKSİSİTESİ VE KONTROLÜ

Avrupa otoritesi, AFB'ler ve bitmiş ürünlerdeki mutajenik safsızlıkları kontrol etmeyi amaçlayan, birçoğu ICH'nin himayesinde bulunan uluslararası düzenleyicilerle birlikte geliştirilmiş sağlam yönergelere sahiptir. Buna ek olarak Avrupa Farmakopesi, ilaçların ve içeriklerinin kalitesi için yasal olarak bağlayıcı standartlar ortaya koyan ana kılavuzlardan birisidir. Avrupa ile birlikte uluslararası paydaşlar tarafından ilaç ham maddesi ve ürünlerinin kalitesine

ilişkin yeni ve gelişen gerekliliklere uyulmasını sağlayan kılavuzlar aşağıdaki gibidir (Tablo 1). Bu düzenleyici kılavuz ilkeler, yıllar içinde elde edilen deneyim ile ve safsızlıkların nasıl kontrol edilebileceğine ilişkin yeni bilgiler dikkate alınarak güncellenmiştir.

İlaç maddelerinin sentezi, reaktif kimyasalların, reaktiflerin, çözücülerin, katalizörlerin ve diğer yardımcıların kullanımını içermektedir. Kimyasal sentez veya sonraki bir bozunmanın bir sonucu olarak, tüm ilaç maddelerinde ve ilişkili ilaç ürünlerinde safsızlıklar bulunmaktadır: Yeni ilaç maddelerindeki safsızlıklar [impurities in new drug substances (ICH Q3A(R2))] ve yeni ilaç ürünlerindeki safsızlıklar [impurities in new drug products (ICH Q3B (R2))] kalite kılavuzları safsızlıkların çoğu için kalifikasyon ve kontrolleri için rehberlik sağlarken, DNA reaktif olan safsızlıklar için sınırlı rehberlik sağlamaktadır.²

N-nitrozamin safsızlıkları, ilaç ham madde ve ürünlerinde mutajenik safsızlıkların tanımlanması, sınıflandırılması, nitelendirilmesi ve kontrolüne yönelik hazırlanmış olan ICH M7(R1) kılavuzuna göre değerlendirilmektedir. ICH M7(R1), yeni ilaç maddeleri ve yeni ilaç ürünlerinin klinik geliştirme ve sonraki pazar uygulamalarında kullanılan bir kılavuzdur.³⁷ Bu kılavuzun odak noktası, doğrudan DNA hasarına neden olma potansiyeline sahip, düşük seviyelerde mutasyona yol açarak kansere neden olan DNA reak-

tif maddelerdir. Toksikolojik endişe eşiği [threshold of toxicological concern (TTC)] kavramı, karsinojenlik ve diğer toksik etkiler açısından ihmal edilebilir bir risk teşkil eden ve üzerinde herhangi bir çalışma yapılmamış bir kimyasal için kabul edilebilir alım miktarını [acceptable intake (AI)] tanımlamak için geliştirilmiştir. Fakat bazı yapısal gruplara sahip kimyasalların TTC değerinin altında bile alımı önemli bir karsinojenik risk potansiyeli oluşturmaktadır. Bu yapısal gruplardan Aflatoksin benzeri, N-nitrozo ve alkil-azoksi bileşikler, yüksek potensli mutajenik karsinojenler “CoC” olarak adlandırılmıştır. Bu kimyasallar için maddeye özgü risk değerlendirmesi uygulanmaktadır. N-nitrozo bileşik grubuna ait NDMA da “CoC” olarak tanımlanmıştır. Bu tür mutajenik safsızlıklar için bileşiğe özgü karsinojenlik verilerinden yararlanılarak özel bir AI değerinin türetilmesi gerekmektedir. ICH M7 (R1), TTC konseptinin CoC safsızlıkları için geçerli olmadığını belirtir ve 1,5 µg/günlük jenerik TTC eşik değerinin uygulanmasını kabul etmez. ICH M7(R1)’e göre ihmal edilebilir karsinojen risk oluşturması beklenen mutajenik safsızlıkların seviyelerini belirlemek için teorik olarak 100.000’de 1 aşırı onkogen risk referans değer olarak belirlenmiştir. 2001/83/EC sayılı direktifin 31. maddesi kapsamında sartanlar için yapılan çalışmalarda deney hayvanı toksikoloji verilerinin ekstrapolasyonuna dayalı olarak NDMA için geçici limitlerin uygulanmasına karar verilmiştir.¹⁸ Deney hayvanı verilerinden elde edilen tüm insan riski tahminleri daha yüksek bir deney hayvanı dozundan çok daha düşük bir doza teorik doğrusal ekstrapolasyona dayanmaktadır. Deney hayvanı kanser çalışmalarından hesaplanan TD₅₀ değerleri hareket noktası olarak kullanılmıştır. Kanseri çalışmalarında TD₅₀ değerleri için Karsinojenik Potens Veritabanı [Carcinogenic Potency Database (CPDB)] iyi bilinen ve kabul edilen bir kaynaktır. CPDB veritabanında N-nitrozaminler için yapılmış tüm sıçan çalışmaları kullanılarak hesaplanan harmonik ortalama TD₅₀, NDMA için 96 µg/kg/gün’dür. Kanseri için aşırı risk düzeyine yönelik ekstrapolasyon, teorik olarak TD₅₀’yi 50.000’e (%50 veya 0,5x100.000) bölerek 1:100.000 riske neden olan doza doğrusal geri ekstrapolasyon ile gerçekleştirilir. NDMA için bu, 1,92 ng/kg/gün dozuna karşılık gelir. Vücut ağırlığı 50 kg olan bir kişi için bu AI seviyesi

TABLO 1: İlaç ham maddesi ve ürünleri üretiminde kullanılan kılavuzlar.

Kılavuz	Kapsamı
Avrupa Farmakopesi (İlaç Kullanımına Yönelik Maddeler)	Yasal olarak bağlayıcı genel kalite gereklilikleri
EMA Aktif Maddelerin Kimyası Kılavuzu (2017)	Kalite dosyalarında gerekli bilgiler
ICH Q11 (2013)	AFB’ler için üretim süreçlerinin geliştirilmesi
ICH Q3A (R2) (2006)	AFB’lerdeki safsızlıklar
ICH Q3B (R2) (2006)	Bitmiş ürünlerdeki safsızlıklar
ICH Q3C (R8) (2021)	Kalıntı solvanlar
ICH Q3D (R1) (2019)	Elementel safsızlıklar
ICH M7 (R1) (2018)	Mutajenik safsızlıkların kontrolü
ICH Q7 (2000)	AFB’ler için iyi üretim uygulaması
ICH Q9 (2006)	Kalite risk yönetimi
ICH Q10 (2014)	Farmasötik kalite sistemi

Kalite Kılavuzları [Quality Guidelines (Q)]; Multidisipliner Kılavuzlar [Multidisciplinary Guidelines (M)]; Revizyon [Revision (R)]; AFB: Aktif farmasötik bileşeni.

96 ng/gün (50x1,92 ng) ile sonuçlanacaktır.¹⁰ Bu sınırlar, yalnızca bir ilaç ürünüde tek bir N-nitrozamin içeriyorsa geçerlidir. Belirli bir bitmiş üründe (veya AFB'sinde) birden fazla N-nitrozamin tanımlanır, tespit edilen tüm N-nitrozaminlerin toplamının toplam risk seviyesinin 100.000 yaşam süresi riskinde 1'i geçmemesi sağlanmalıdır.

Yeni nitrozaminlerin tespiti için ise 2 senaryo öngörülmektedir.³⁵

■ N-nitrozaminler, maddeye özgü yeterli deney hayvanı karsinojenite verileriyle tanımlanır, TD₅₀ hesaplanmalı ve ICH M7(R1) kılavuzunda önerildiği gibi ömür boyu maruziyet için maddeye özgü bir limit elde etmek için kullanılmalıdır.

■ N-nitrozaminler, ICH M7(R1) kılavuzunda tavsiye edildiği gibi ömür boyu maruziyet için bir maddeye özel limit üretmek için yeterli veri yoksa:

-18 ng/gün nitrozaminler için sınıfa özel bir TTC (Bu değer, karsinojenite veri tabanı Lhasa'dan türetilmiştir) varsayılan seçenek olarak kullanılabilir.

-Kabul edilebilir bir alım limiti elde etmek için yapı-aktivite ilişkisi değerlendirmelerine dayalı bir yaklaşım, uygun şekilde gerekçelendirildiği takdirde kabul edilebilir.

SONUÇ

N-nitrozaminler, insanların gıda, içme suyu, tütün dumanı ve kozmetik ürünler gibi bilinen çeşitli kaynaklardan maruz kalabileceği karsinojenlerdir. Ancak, 2018 yılına kadar beşerî tıbbi ürünlerde bu safsızlıkların varlıkları bilinmezken ilk olarak valsartan AFB'sinde tespit edilmiştir. Daha sonra yapısında tetrazol grubu içeren sartan grubu ilaçları ve farklı tera-

pötik etkiye sahip ilaçlarda bu safsızlıklar tespit edilmiş, araştırmalar geniş bir alana yayılmıştır. Toplum sağlığı açısından bu konunun ciddiyetle ele alınması önemlidir. Bu nedenle MAH'lar, aktif maddeleri ve bitmiş ürünleri için N-nitrozaminlere ilişkin, herhangi bir nitrozamin ile üretim/kontaminasyon riskini en aza indirmek için mevcut ve ileriye dönük önlemleri içermesi gereken bir kontrol stratejisi uygulamalı ve kılavuz ICH M7(R1)'de tanımlanan ilkelere dayalı olarak beşerî tıbbi ürünlerde N-nitrozaminlerin varlığı mümkün olduğu kadar azaltmalıdır.

Finansal Kaynak

Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından, tıbbi alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.

Çıkar Çatışması

Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.

Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: Güler Yağmur Akyüz, Ela Kadioğlu; **Tasarım:** Güler Yağmur Akyüz, Ela Kadioğlu; **Denetleme/Danışmanlık:** Ela Kadioğlu; **Veri Toplama ve/veya İşleme:** Güler Yağmur Akyüz, Ela Kadioğlu; **Analiz ve/veya Yorum:** Güler Yağmur Akyüz, Ela Kadioğlu; **Kaynak Taraması:** Güler Yağmur Akyüz, Ela Kadioğlu; **Makalenin Yazımı:** Güler Yağmur Akyüz, Ela Kadioğlu; **Eleştirel İnceleme:** Ela Kadioğlu; **Kaynaklar ve Fon Sağlama:** Güler Yağmur Akyüz, Ela Kadioğlu; **Malzemeler:** Güler Yağmur Akyüz, Ela Kadioğlu.

KAYNAKLAR

1. European Medicines Agency (EMA). Guideline on setting specifications for related impurities in antibiotics. [Link]
2. European Medicines Agency (EMA). Lessons learnt from presence of N-nitrosamine impurities in sartan medicines. [Link]
3. Bharate SS. Critical analysis of drug product recalls due to nitrosamine impurities. J Med Chem. 2021;64(6):2923-36. [Crossref] [PubMed]
4. Boudier F, Slavin D, Lofstedt RE. The Tolerability of Risk: A New Framework for Risk Management. 1st ed. USA: Routledge; 2009.
5. Keszei AP, Goldbohm RA, Schouten LJ, Jakszyn P, van den Brandt PA. Dietary N-nitroso compounds, endogenous nitrosation, and the risk of esophageal and gastric cancer subtypes in the Netherlands Cohort Study. Am J Clin Nutr. 2013;97(1):135-46. [Crossref] [PubMed]
6. World Health Organization [Internet]. Information note nitrosamine impurities, update on nitrosamine impurities. Cited: 07 July 2023. Available from: [Link]
7. European Medicines Agency. ICH guideline M7(R1) on assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk. [Link]
8. European Commission. Notification to the CHMP/EMA secretariat of a referral under article 31 of directive 2001/83/EC 05. July 2018. [Link]

9. European Medicines Agency (EMA). Referral under Article 31 of directive 2001/83/EC on the presence of N-nitrosamines in some valsartan-containing medicinal products-extension of scope. [\[Link\]](#)
10. European Medicines Agency (EMA). Nitrosamine impurities in human medicinal products. [\[Link\]](#)
11. United States Food and Drug Administration [Internet]. Control of Nitrosamine Impurities in Human Drugs. Cited: 07 July 2023. Available from: [\[Link\]](#)
12. Doshi C, Malayandi R, Namjoshi G, Kadam P, Mule D. Nitrosodimethylamine impurities in metformin drug products: physician insight. *J Diabetol* 2021;12(2):120-7. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. United States Food and Drug Administration [Internet]. FDA works to avoid shortage of sitagliptin following detection of nitrosamine impurity. Cited: 07 July 2023. Available from: [\[Link\]](#)
14. Challis BC. Nutrition and nitrosamine formation. *Proc Nutr Soc.* 1985;44(1):95-100. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Gushgari AJ, Halden RU. Critical review of major sources of human exposure to N-nitrosamines. *Chemosphere.* 2018;210:1124-36. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Mirvish SS. Formation of N-nitroso compounds: chemistry, kinetics, and in vivo occurrence. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1975;31(3):325-51. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Beard JC, Swager TM. An organic chemist's guide to n-nitrosamines: their structure, reactivity, and role as contaminants. *J Org Chem.* 2021;86(3):2037-57. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[PMC\]](#)
18. European Medicines Agency (EMA). Referral under Article 31 of Directive 2001/83/EC angiotensin-II-receptor antagonists (sartans) containing a tetrazole group. [\[Link\]](#)
19. Dobo KL, Kenyon MO, Dirat O, Engel M, Fleetwood A, Martin M, et al. Practical and science-based strategy for establishing acceptable intakes for drug product n-nitrosamine impurities. *Chem Res Toxicol.* 2022;35(3):475-89. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[PMC\]](#)
20. Glowienke S, Onken U, Elhajouji A, Muthusamy S, Sangana R, Martus HJ, et al. Genotoxicity evaluation of a valsartan-related complex N-nitroso-impurity. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2022;134:105245. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
21. Cross KP, Ponting DJ. Developing structure-activity relationships for n-nitrosamine activity. *Comput Toxicol.* 2021;20:100186. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[PMC\]](#)
22. Benson FR. The chemistry of the tetrazoles. *Chem Rev.* 1947;41(1):1-61. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Buhlmayer P, Ostermayer F, Schmidlin T. Acyl compounds. U.S. Pat. 5399578 A; Novartis Pharmaceuticals, 1995-3-21. [\[Link\]](#)
24. Xiaohui Z, Xiaoren Z, Yuanxun Z, Peng D, Peng W, Jinsheng L, et al. A kind of synthetic method of valsartan. CN Pat. 108752285 A; Zhejiang Huahai Pharmaceutical, 2018-12-09. [\[Link\]](#)
25. Jiang Z, Yan Y, Wenfeng W. Valsartan synthesis method. CN Pat. 101362728 B; Beijing Secco Pharmaceutical, 2011-07-20. [\[Link\]](#)
26. Xiaodong W, Jilong G, Yongrui T. Improved process for synthesizing xieshatan. CN Pat. 1317485 A; Changzhou Siyao Pharmaceutical, 2000-04-07. [\[Link\]](#)
27. Herr RJ. 5-Substituted-1H-tetrazoles as carboxylic acid isosteres: medicinal chemistry and synthetic methods. *Bioorg Med Chem.* 2002;10(11):3379-93. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Himo F, Demko ZP, Noodleman L, Sharpless KB. Why is tetrazole formation by addition of azide to organic nitriles catalyzed by zinc(II) salts? *J Am Chem Soc.* 2003;125(33):9983-7. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Shen R, Andrews SA. Demonstration of 20 pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) as nitrosamine precursors during chloramine disinfection. *Water Res.* 2011;45(2):944-52. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
30. Tuesuwan B, Vongsutilers V. Nitrosamine contamination in pharmaceuticals: threat, impact, and control. *J Pharm Sci.* 2021;110(9):3118-28. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
31. King FJ, Searle AD, Urquhart MW. Ranitidine-investigations into the root cause for the presence of N Nitroso N,N dimethylamine in ranitidine hydrochloride drug substances and associated drug products. *Organic Process Research & Development.* 2020;24(12):2915-26. [\[Crossref\]](#)
32. Nasr NEH, Metwaly MG, Ahmed EO, Fares AR, ElMeshad AN. Investigating the root cause of N-nitrosodimethylamine formation in metformin pharmaceutical products. *Expert Opin Drug Saf.* 2021;20(7):855-62. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Keire DA, Bream R, Wollein U, Schmalder-Ripcke J, Burchardt A, Conti M, et al. International regulatory collaboration on the analysis of nitrosamines in metformin-containing medicines. *AAPS J.* 2022;24(3):56. Erratum in: *AAPS J.* 2022;24(4):84. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Schlingemann J, Boucley C, Hickert S, Bourasseau L, Walker M, Celdran C, et al. Avoiding N-nitrosodimethylamine formation in metformin pharmaceuticals by limiting dimethylamine and nitrite. *Int J Pharm.* 2022;620:121740. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. European Medicine Agency (EMA). 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. [\[Link\]](#)
36. Wu Y, Levons J, Narang AS, Raghavan K, Rao VM. Reactive impurities in excipients: profiling, identification and mitigation of drug-excipient incompatibility. *AAPS PharmSciTech.* 2011;12(4):1248-63. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[PMC\]](#)
37. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk. 2017. [\[Link\]](#)