

Advanced analytical methods in quality control of drugs

Zaawansowane metody analityczne w kontroli jakości produktów leczniczych



DOI: 10.15199/62.2026.5.1

A review, with 42 refs., of spectroscopic, chromatog., thermal and diffraction methods used for identification of active substances and impurities, characterization of crystal forms as well as detn. of properties and mol. structures of pharmaceuticals. In particular, NMR, HPLC, GC, LC-MS, ICP-MS, XRPD, DSC, TGA, FTIR and Raman spectroscopy methods were taken into consideration. The performance and validation of the methods in accordance with pharmacopoeial requirements and GMP principles, as well as the importance of stability and compatibility studies in the formulation development process were emphasized.

Keywords: drug product, quality control, NMR, LC-MS, GC-MS, XRPD

Przedstawiono rolę zaawansowanych metod analitycznych w zapewnieniu jakości produktów leczniczych w kontekście aktualnych wymagań regulacyjnych. Omówiono zastosowanie technik spektroskopowych, chromatograficznych, termicznych i dyfrakcyjnych (m.in. NMR, HPLC, GC, LC-MS, ICP-MS, XRPD, DSC, TGA, FTIR, Raman) w identyfikacji substancji czynnych, oznaczaniu zanieczyszczeń oraz charakterystyce form krystalicznych. Podkreślono konieczność walidacji metod zgodnie z wymaganiami farmakopealnymi i zasadami GMP, a także znaczenie badań stabilności i kompatybilności w procesie rozwoju formulacji. Wykazano, że nowoczesna analityka farmaceutyczna umożliwia kompleksową ocenę jakości produktu na wszystkich etapach jego cyklu życia.

Słowa kluczowe: produkt leczniczy, kontrola jakości, NMR, LC-MS, GC-MS, XRPD

Współczesny przemysł farmaceutyczny stoi dziś w centrum dynamicznego rozwoju technologicznego oraz rosnących wymagań regulacyjnych, które w istotny sposób determinują podejście do kontroli jakości produktów leczniczych. Wytwarzanie i badanie produktów leczniczych odbywa się zgodnie z wymaganiami określonymi w przepisach prawa farmaceutycznego¹ oraz zasadami Dobrej Praktyki Wytwarzania (GMP)², które implementują wytyczne unijne oraz precyzują obowiązki wytwórców, podmiotów odpowiedzialnych i laboratoriów kontroli jakości. Podstawowe kryteria jakości oraz metody badań substancji czynnych, substancji pomocniczych, materiałów opakowaniowych oraz gotowych form leków określają farmakopee, w szczególności Farmakopea Europejska, stanowiąca punkt odniesienia dla doku-

mentacji rejestracyjnej substancji czynnych i produktów leczniczych³. Uzupełnieniem tych wymagań są liczne przewodniki GMP i wytyczne opracowywane przez instytucje międzynarodowe, m.in. przez ICH, EMA, WHO i FDA, które mają na celu harmonizację standardów jakości oraz zapewnienie spójności procesów kontroli wytwarzania i oceny produktów leczniczych na poziomie globalnym. Istotną rolę w harmonizacji regulacyjnej odgrywa Międzynarodowa Rada Harmonizacji Wymagań Technicznych dla Rejestracji Produktów Leczniczych Stosowanych u Ludzi (ICH), w ramach której opracowano m.in. serię przewodników Q dotyczących jakości⁴, a w szczególności dokumenty dotyczące walidacji metod analitycznych, oceny zanieczyszczeń, stabilności produktów leczniczych, koncepcję *Quality by Design*⁵



Mgr inż. Katarzyna GIBUŁA (ORCID: 0009-0005-4118-1906) w roku 2005 ukończyła studia magisterskie na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. Obecnie pracuje jako starszy specjalista Pionu Badawczego w Sieć Badawcza Łukasiewicz – Instytucie Chemii Przemysłowej imienia Profesora Ignacego Mościckiego w Warszawie. Specjalność – analityka formy leku, opracowywanie i walidacja metod analitycznych oraz analiza rozkładu i wielkości cząstek.



Dr Łukasz JEDYNAK (ORCID: 0000-0001-7714-5898) w 2005 r ukończył studia na Wydziale Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach, uzyskując tytuł zawodowy magistra chemii. W 2010 r. uzyskał stopień doktora nauk chemicznych na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Jest głównym specjalistą Pionu Badawczego w Laboratorium Analityki Farmaceutycznej w Sieć Badawcza Łukasiewicz – Instytucie Chemii Przemysłowej imienia Profesora Ignacego Mościckiego w Warszawie. Specjalność – analityka zanieczyszczeń pierwiastkowych z zastosowaniem techniki ICP-MS, a także opracowywanie metod oznaczania czystości chemicznej i zawartości dla API, surowców i półproduktów z zastosowaniem techniki HPLC.

oraz wymagania dotyczące systemów jakości farmaceutycznej. Ich wdrażanie przez państwa członkowskie UE sprawia, że procesy badawcze i produkcyjne spełniają jednolite, międzynarodowe standardy. W tym kontekście szczególnego znaczenia nabierają zaawansowane techniki analityczne, które stanowią podstawowe narzędzie nie tylko w ocenie jakości produktów leczniczych, lecz także w zapewnieniu zgodności z przepisami farmakopealnymi i GMP. Ze względu na wysokie wymagania dotyczące wiarygodności wyników, stosowane metody analityczne muszą spełniać określone kryteria akceptacji i podlegać walidacji potwierdzającej ich przydatność do zamierzonego zastosowania. Tym samym dane generowane z zastosowaniem tych metod mogą stanowić podstawę do podejmowania decyzji dotyczących jakości, bezpieczeństwa i dopuszczania produktów leczniczych do obrotu. Zastosowanie szerokiego wachlarza zaawansowanych technik analitycznych, takich jak techniki: spektroskopowe, chromatograficzne, analiza termiczna i dyfrakcyjna, pozwala na uzyskanie wielowymiarowego obrazu jakości produktu leczniczego, od identyfikacji surowców, przez monitorowanie procesów wytwarzania, aż po końcową ocenę jego stabilności i bezpieczeństwa. Ich wykorzystanie stanowi dziś fundament systemu zapewnienia jakości w farmacji i jest niezbędne do spełnienia rygorystycznych wymagań regulacyjnych obowiązujących na całym świecie.

Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego w analizie produktów leczniczych

Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) należy do kluczowych technik analitycznych we współczesnej farmacji. Technika ta umożliwia jednoznaczną analizę strukturalną z wykorzystaniem technik jedno- i wielowymiarowych (np. 2D NMR), co pozwala nie tylko na potwierdzenie tożsamości substancji czynnych i szczegółową charakterystykę budowy chemicznej, ale także identyfikację i określanie struktury zanieczyszczeń powstających zarówno na etapie syntezy, jak i w wyniku procesów degradacji w czasie przechowywania. Istotne znaczenie w kontroli jakości zyskują również ilościowe metody NMR (qNMR), pozwalające na dokładne oznaczanie zawartości substancji czynnych oraz organicznych zanie-

czyszczeń, w tym pozostałości rozpuszczalników. Znalazło to odzwierciedlenie w aktualnej wytycznej ICH Q2(R2)⁶, dotyczącej procedur walidacyjnych, dopuszczającej qNMR jako pełnoprawną metodę ilościową w kontroli jakości. Metoda qNMR charakteryzuje się liniowością wynikającą z istoty zjawiska rezonansu magnetycznego⁷, co pozwala na ograniczenie zakresu wymaganych badań walidacyjnych w porównaniu z metodami chromatograficznymi. Dodatkowym atutem tej techniki jest jej status metody pierwotnej⁸, niewymagającej stosowania certyfikowanego wzorca analizowanej substancji, lecz jedynie odpowiedniego wzorca wewnętrznego o sygnale nienakładającym się z widmem analitu. Wyniki uzyskiwane metodą qNMR wykazują dobrą zgodność z rezultatami otrzymanymi technikami referencyjnymi⁹, takimi jak HPLC czy GC, co umożliwia jej pełnoprawne zastosowanie jako metody alternatywnej, zwłaszcza w przypadku związków trudnych do oznaczania, pozbawionych chromoforów lub charakteryzujących się ograniczoną stabilnością. NMR znajduje także zastosowanie w certyfikacji nowych materiałów odniesienia oraz w wyznaczaniu parametrów wykorzystywanych w metodach wtórnych, takich jak współczynniki odpowiedzi stosowane w metodach HPLC¹⁰.

Pomimo wysokich kosztów aparatury i eksploatacji, dynamiczny rozwój metod przetwarzania widm i zaawansowanych algorytmów analizy danych sprzyja coraz szerszemu wykorzystaniu NMR w rutynowej praktyce analitycznej. W konsekwencji NMR ma szansę stać się narzędziem o jeszcze szerszym zakresie zastosowań w zintegrowanym systemie oceny jakości produktów leczniczych i pełnić funkcję istotnego uzupełnienia klasycznych metod chromatograficznych i spektroskopowych.

Zastosowanie chromatografii w analizie produktów leczniczych

Chromatografia stanowi jedną z kluczowych technik analitycznych wykorzystywanych w kontroli jakości produktów leczniczych, umożliwiając separację, identyfikację oraz ilościowe oznaczanie składników złożonych mieszanin chemicznych. W analityce farmaceutycznej dominujące znaczenie mają chromatografia cieczowa oraz chromatografia gazowa, które dzięki odmiennym mechanizmom separacji umożliwiają analizę związków o szerokim zakresie właściwości fizykochemicznych.



Dr inż. Maria JEDYNAK (ORCID: 0009-0008-2284-0605) w roku 2002 ukończyła studia na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. W 2007 r. uzyskała stopień doktora nauk chemicznych w dyscyplinie chemia na tej samej uczelni. Od 2007 r. jest związana z laboratoriami badawczymi zajmującymi się analizą farmaceutyczną. Obecnie jest głównym specjalistą Pionu Badawczego w Laboratorium Analityki Farmaceutycznej w Sieci Badawcza Łukasiewicz – Instytucie Chemii Przemysłowej imienia Profesora Ignacego Mościckiego w Warszawie. Specjalność – techniki chromatograficzne (HPLC, GC, GC-MS), walidacje i transfer metod analitycznych, analiza statystyczna dla metod analitycznych, tworzenie dokumentacji systemowej.



Mgr Anna KONEFAŁ (ORCID: 0000-0002-8605-3554) w roku 2020 ukończyła studia magisterskie na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Obecnie kończy studia doktoranckie w dyscyplinie nauki chemiczne w Szkole Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych tej samej uczelni. Obecnie jest starszym specjalistą Pionu Badawczego w Sieci Badawcza Łukasiewicz – Instytucie Chemii Przemysłowej imienia Profesora Ignacego Mościckiego w Warszawie. Specjalność – chemia analityczna, chromatografia gazowa oraz gazowa sprzężona ze spektrometrią mas.

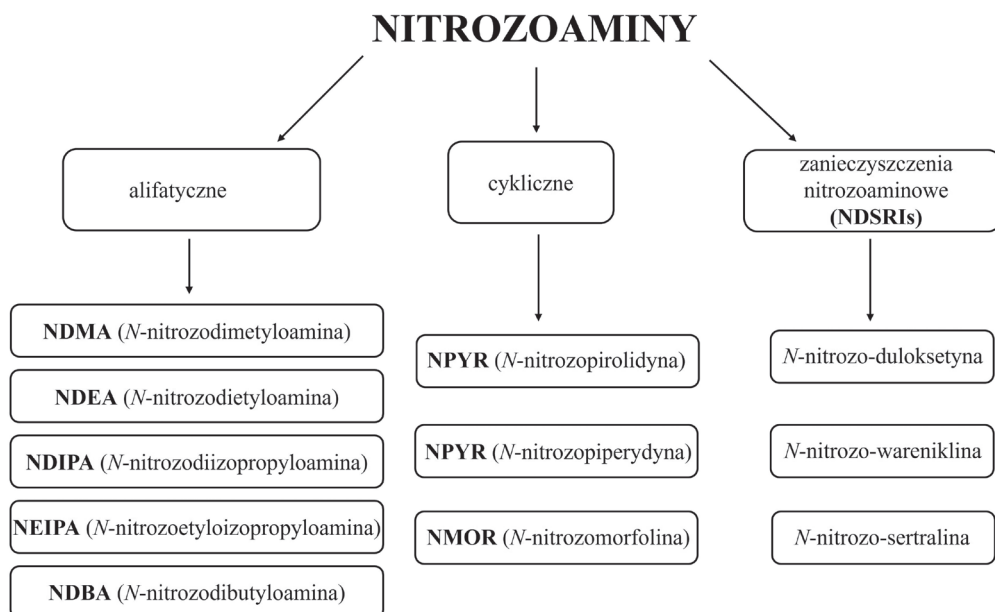


Fig. 1. Classification of nitrosamines²¹⁾

Rys. 1. Klasyfikacja nitrozoamin²¹⁾

Wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją spektrofotometryczną

Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) z detekcją spektrofotometryczną UV-Vis jest standardową techniką stosowaną w laboratoriach analitycznych przemysłu farmaceutycznego na wszystkich etapach cyklu życia produktu leczniczego, od syntezy substancji czynnej (API), poprzez ocenę czystości i profilu zanieczyszczeń oraz badania stabilności, aż po kontrolę jakości gotowej postaci leku. Metoda ta umożliwia monitorowanie przebiegu syntezy substancji czynnej poprzez kontrolę postępu reakcji i identyfikację powstających zanieczyszczeń, wspierając optymalizację procesu technologicznego¹¹⁾. HPLC z detekcją UV-Vis jest również podstawową techniką analizy czystości surowców i półproduktów, a także ilościowego oznaczenia substancji czynnej i zanieczyszczeń w API oraz w gotowym produkcie leczniczym, stosowaną w celu oceny zgodności z wymaganiami specyfikacji jakościowej¹²⁾. Kluczowe znaczenie ma pełna charakterystyka profilu zanieczyszczeń substancji czynnej i produktu leczniczego, co zostało ujęte w wytycznych ICH Q3A¹³⁾ oraz ICH Q3B¹⁴⁾. W badaniach stabilności, prowadzonych zgodnie z wytyczną ICH Q1A¹⁵⁾, metody HPLC stanowią niezbędne narzędzie monitorowania zmian jakościowych zachodzących w warunkach badań przyspieszonych i długoterminowych, w tym powstawania produktów degradacji oraz zmian poziomu zanieczyszczeń.

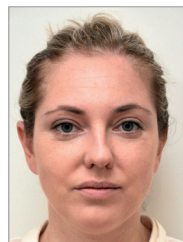
Istotnym obszarem zastosowania wysokosprawnej chromatografii cieczowej są badania farmaceutyczne. Technika HPLC z detekcją UV-Vis umożliwia ilościowe oznaczanie substancji czynnej w badaniach profilu uwalniania z gotowej postaci leku oraz porównanie różnych wariantów formulacji, wspierając ocenę powtarzalności procesu technologicznego i jakości końcowej postaci leku. Kluczowym elementem rozwoju formulacji są również badania kompatybilności API z substancjami pomocniczymi, stanowiące integralną część projektowania postaci leku zgodnie z wytycznymi ICH Q8(R2)⁵⁾ oraz dokumentacją rejestracyjną¹⁶⁾. W badaniach kompatybilności HPLC wykorzystuje się do monitorowania stabilności API, identyfikacji zanieczyszczeń oraz oceny zmian zachodzących wskutek interakcji pomiędzy składnikami formulacji. Połączenie wyników otrzymanych metodami separacyjnymi i fizykochemicznymi umożliwia kompleksową ocenę wpływu tych interakcji na stabilność, biodostępność i możliwość wytworzenia produktu leczniczego.

Chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas

Pomimo szerokiego zakresu zastosowań, wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją UV-Vis nie zawsze zapewnia wystarczającą czułość i selektywność. W takich sytuacjach konieczne jest zastosowanie bardziej zaawansowanych metod detekcji, wśród których szczególną rolę



Dr Marek KUBISZEWSKI (ORCID: 0000-0002-6144-2211) w roku 2000 ukończył studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. W 2006 r. uzyskał stopień doktora nauk chemicznych na tym samym wydziale. Jest głównym specjalistą Pionu Badawczego w Laboratorium Analityki Farmaceutycznej w Sieci Badawcza Łukasiewicz – Instytucji Chemii Przemysłowej imienia Profesora Ignacego Mościckiego w Warszawie. Specjalność – spektroskopia NMR, IR i Ramana.



Dr inż. Elżbieta LIPIEC-ABRAMSKA (ORCID: 0000-0001-8652-2528) w roku 2005 ukończyła studia magisterskie na Wydziale Chemii Politechniki Warszawskiej. W 2011 r. uzyskała stopień doktora nauk chemicznych w dyscyplinie chemia na tej samej uczelni. Jest głównym specjalistą Pionu Badawczego w Laboratorium Analityki Farmaceutycznej w Sieci Badawcza Łukasiewicz – Instytucji Chemii Przemysłowej imienia Profesora Ignacego Mościckiego w Warszawie. Specjalność – techniki sprzężone, chromatografia cieczowa, spektrometria mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie (ICP-MS), tandemowa spektrometria mas (MS/MS), charakterystyka substancji farmaceutycznych wraz z tworzeniem dokumentacji, w tym systemowej.

odgrywa spektrometria mas (MS). MS w połączeniu z technikami separacyjnymi, takimi jak chromatografia cieczowa (LC), jest szeroko stosowana w badaniach farmaceutycznych i biomedycznych z uwagi na wysoką czułość, selektywność i wszechstronność w analizie złożonych mieszanin, a także związków niewykazujących absorpcji w zakresie promieniowania ultrafioletowego i widzialnego. Z tego względu chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (LC-MS) stanowi obecnie kluczowe narzędzie w identyfikacji i charakterystyce zanieczyszczeń i produktów degradacji, do oznaczeń ilościowych zanieczyszczeń nawet w bardzo małych stężeniach, a także w badaniach nad strukturą i tożsamością nowych substancji czynnych¹⁷⁻¹⁹.

Szczególne znaczenia MS nabrała w ocenie *N*-nitrozoamin (rys. 1), jednej z grup zanieczyszczeń objętych kontrolą ICH. Ich obecność w produktach leczniczych, nawet w śladowych ilościach, została uznana za poważne zagrożenie dla bezpieczeństwa pacjentów ze względu na ich potencjał rakotwórczy/mutageny²⁰. Problem zanieczyszczeń typu *N*-nitrozoamin został po raz pierwszy dostrzeżony w 2018 r., po wykryciu w wybranych seriach substancji czynnej walsartan nieidentyfikowanego dotychczas zanieczyszczenia, którym była *N*-nitrozodimetyloamina (NDMA). Europejska Agencja Leków (EMA) podjęła decyzję o czasowym wycofaniu z obrotu produktów leczniczych zawierających tę substancję. W późniejszych badaniach produktów leczniczych nie stwierdzono obecności NDMA lub wykryte ilości były na bardzo niskim poziomie, dlatego substancję czynną ponownie dopuszczono do obrotu, uznając, że przerwanie terapii z jej zastosowaniem niesie większe ryzyko, niż potencjalne zagrożenie onkologiczne wynikające z obecności śladowych ilości zanieczyszczeń²². W konsekwencji tych wydarzeń rozpoczęto działania regulacyjne ukierunkowane na ocenę i kontrolę *N*-nitrozoamin w substancjach czynnych oraz produktach leczniczych. Ze względu na bardzo niskie dopuszczalne poziomy tych związków w substancjach czynnych, wynikające z mechanizmu ich genotoksycznego działania oraz wymagań wytycznej ICH M7(R2)²⁰, konieczne jest stosowanie metod o bardzo wysokiej czułości i selektywności. W odpowiedzi na te wymagania w rutynowych analizach zaczęto stosować metody LC-MS, które umożliwiają identyfikację *N*-nitrozoamin nawet na poziomie części na miliard (ppb). Wraz z identyfikacją bardziej złożonych związków typu NDSRI (*nitrosamine drug substance related impurity*) oraz ich podobieństwem do substancji czynnych, metodą preferowaną stała się chromatografia cieczowa połą-

czona z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS)^{23, 24}, która umożliwia oznaczanie *N*-nitrozoamin i zanieczyszczeń NDSRI na bardzo niskich poziomach oraz zapewnia wysoką selektywność, niezbędną do rozróżniania związków o zbliżonej masie i właściwościach fizykochemicznych. Najbardziej rozpowszechnioną konfiguracją aparaturową stosowaną w analizie produktów farmaceutycznych jest chromatografia cieczowa w odwróconym układzie faz połączona ze spektrometrią mas z jonizacją poprzez elektrorozpraszanie (ESIMS)²⁵. W zależności od właściwości chemicznych analizowanych związków oraz wymagań metodycznych, alternatywnie wykorzystywana jest jonizacja chemiczna pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI), np. do analizy *N*-nitrozoamin o mniejszych masach, charakteryzująca się innym mechanizmem wytwarzania jonów i odmienną efektywnością fragmentacji. Dobór odpowiedniego źródła jonów, parametrów instrumentalnych oraz składu fazy ruchomej ma kluczowe znaczenie dla uzyskania odpowiedniej selektywności, czułości i powtarzalności wyników, a tym samym dla spełnienia kryteriów walidacyjnych metody analitycznej.

Chromatografia gazowa i chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas

Chromatografia gazowa (GC) oraz chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC-MS) stanowią istotne uzupełnienie metod chromatografii cieczowej w kontroli jakości produktów leczniczych, szczególnie w analizie związków lotnych, małowcząsteczkowych oraz substancji niestabilnych w środowisku wodnym. Techniki te znajdują szerokie zastosowanie w oznaczaniu pozostałości rozpuszczalników, zanieczyszczeń procesowych oraz wybranych zanieczyszczeń genotoksycznych obecnych w substancjach czynnych i produktach gotowych. W rutynowej kontroli jakości najczęściej stosowany jest detektor płomieniowo-jonizacyjny (FID), charakteryzujący się szerokim zakresem liniowości i wysoką czułością wobec związków organicznych²⁶. Metody GC-FID stanowią standardowe narzędzie oznaczania pozostałości rozpuszczalników pozostałych po syntezie lub procesach oczyszczania substancji czynnych oraz w gotowych produktach leczniczych²⁷) i umożliwiają jednoczesną analizę wielu rozpuszczalników o zróżnicowanym stopniu ryzyka. Analizy te prowadzone są zgodnie z wymaganiami wytycznych ICH Q3C oraz przepisami farmakopealnymi, które klasyfikują rozpuszczalniki wg ich profilu toksykologicznego i określają dopuszczalne limity ich zawartości^{28, 29}.



Dr Aneta ŁUKOMSKA (ORCID: 0000-0002-3923-765X) w roku 1999 ukończyła studia magisterskie na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. W 2005 r. uzyskała stopień doktora nauk chemicznych na tym samym wydziale. Obecnie jest kierownikiem Laboratorium Analityki Farmaceutycznej w Sieć Badawcza Łukasiewicz – Instytucie Chemii Przemysłowej imienia Profesora Ignacego Mościckiego w Warszawie oraz osobą wykwalifikowaną. Specjalność – chemia analityczna, elektrochemia stosowana, skaningowa mikroskopia elektronowa.



Dr Michał MICHAŁEC (ORCID: 0000-0003-2029-0714) w roku 2013 ukończył studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. W 2024 r. uzyskał stopień doktora nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie chemia na tej samej uczelni. Był asystentem na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, a obecnie jest głównym specjalistą Pionu Badawczego w Laboratorium Analityki Farmaceutycznej w Sieć Badawcza Łukasiewicz – Instytucie Chemii Przemysłowej imienia Profesora Ignacego Mościckiego w Warszawie. Specjalność – przeptywowa chemia analityczna, w szczególności w monitorowanie procesów fizjologicznych i farmaceutycznych.

Jednym z kluczowych elementów analizy GC jest odpowiedni sposób wprowadzenia próbki do układu analitycznego. Oprócz bezpośredniego nastrzyku ciekłej próbki powszechnie stosuje się technikę analizy fazy nadpowierzchniowej (*headspace*), która pozwala na selektywne dozowanie składników lotnych, ograniczenie wpływu matrycy próbki oraz poprawę stabilności i powtarzalności wyników³⁰. W analizie próbek o bardziej złożonej matrycy często stosuje się dodatkowe etapy przygotowania próbki, takie jak ekstrakcja do fazy stałej (SPE) czy mikroekstrakcja do fazy stałej (SPME)³⁰, zwiększające czułość i selektywność oznaczeń.

W przypadkach wymagających jednoznacznej identyfikacji związków oraz bardzo niskich granic wykrywalności stosuje się chromatografię gazową sprzężoną ze spektrometrią mas (GC-MS). Połączenie wysokiej zdolności separacyjnej GC ze spektrometrem mas, wykorzystującym jonizację najczęściej elektronową EI lub chemiczną CI³¹), umożliwia identyfikację analitów na podstawie uzyskanych widm masowych nawet w złożonych matrycach. GC-MS jest szczególnie istotna w oznaczaniu zanieczyszczeń genotoksycznych, m.in. nitrozoamin (np. NDMA lub NDEA), które mogą powstawać jako produkty uboczne podczas syntezy lub degradacji substancji czynnych^{32, 33}).

Metody chromatograficzne stosowane w kontroli jakości produktów leczniczych podlegają walidacji zgodnie z wytycznymi ICH Q2(R2)⁶). Szczególną uwagę zwraca się na parametry, takie jak selektywność, zakres liniowości, dokładność, precyzja oraz granice wykrywalności i oznaczalności, zwłaszcza w analizie zanieczyszczeń obecnych na poziomach śladowych. Dzięki możliwości sprzęgania z zaawansowanymi technikami detekcji oraz komplementarnemu charakterowi, chromatografia cieczowa i gazowa pozostają fundamentem nowoczesnej analityki farmaceutycznej i kluczowym elementem systemu zapewnienia jakości produktów leczniczych.

Analiza zanieczyszczeń pierwiastkowych w produktach leczniczych

Zanieczyszczenia pierwiastkowe stanowią odrębną kategorię nieorganicznych zanieczyszczeń występujących w produktach leczniczych, które mogą pochodzić z katali-

zatorów stosowanych w procesie syntezy substancji czynnych, zanieczyszczonych surowców i substancji pomocniczych lub z materiałów opakowaniowych i aparatury procesowej. Ze względu na brak działania terapeutycznego zanieczyszczeń pierwiastkowych oraz potencjalne ryzyko toksykologiczne, konieczne jest ich dokładne monitorowanie w całym cyklu życia produktu^{34, 35}). Zasady oceny toksyczności potencjalnych zanieczyszczeń pierwiastkowych, ustalania dopuszczalnego dziennego narażenia (PDE) dla poszczególnych pierwiastków oraz zastosowania podejścia opartego na analizie ryzyka do ich kontroli w produktach leczniczych zostały określone w przewodniku ICH Q3D³⁶).

Do oznaczania pierwiastków można stosować m.in. absorpcyjną spektrometrię atomową (ASA) i spektrometrię emisyjną z plazmą indukcyjnie wzbudzoną (ICP-OES). Jednak w oznaczaniu zanieczyszczeń pierwiastkowych najczęściej stosowana jest spektrometria mas z plazmą indukcyjnie wzbudzoną (ICP-MS)³⁷⁻³⁹), charakteryzująca się bardzo wysoką czułością, szerokim zakresem liniowości oraz możliwością jednoczesnego oznaczania wielu pierwiastków przy relatywnie krótkim czasie analizy. Nie jest jednak pozbawiona wad, spośród których wymienić można wysokie koszty zakupu i eksploatacji aparatury oraz występowanie interferencji spektralnych i efektów matrycowych.

Istotnym elementem analizy zanieczyszczeń pierwiastkowych jest odpowiednie przygotowanie próbki do analizy, którego złożoność zależy od składu i postaci badanego materiału i związane jest z koniecznością przeprowadzenia próbki do roztworu. W niektórych przypadkach wystarczające może być rozcieńczenie próbki lub jej rozpuszczenie w roztworach rozcieńczonych kwasów. Najczęściej jednak konieczne jest zastosowanie bardziej zaawansowanych procedur, takich jak mineralizacja próbki wspomagana mikrofalami lub postępowanie kilkuetapowe. Przykładem może być oznaczanie zanieczyszczeń pierwiastkowych w ditlenku tytanu, którego rozтворzenie wymaga użycia znacznej ilości kwasu fluorowodorowego. Zastosowanie tego kwasu wiąże się z koniecznością jego późniejszego usunięcia np. za pomocą kwasu borowodorowego, aby zapobiec uszkodzeniom szklanych elementów układu pomiarowego. Z kolei analiza produktów w kapsułkach żelatynowych może wymagać wstępnej obróbki w celu rozpuszczenia otoczki przed właściwą mineralizacją. W przypadku próbek reaktywnych stosuje się podejście



Mgr Magdalena RUSZCZAK (ORCID: 000-0002-1458-9843) w roku 2009 ukończyła studia magisterskie na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Jest starszym specjalistą Pionu Badawczego w Laboratorium Analityki Farmaceutycznej w Sieci Badawczej Łukasiewicz – Instytucie Chemii Przemysłowej imienia Profesora Ignacego Mościckiego w Warszawie. Zajmuje się opracowaniem i walidacją metod analitycznych wraz z tworzeniem dokumentacji. Specjalność – wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) i rentgenowska dyfrakcja proszkowa (PXRD) w analizie substancji czynnych i produktów leczniczych.



Dr Anna ZEP (ORCID: 0000-0002-0267-4338) w roku 2012 ukończyła studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, gdzie w 2019 r. uzyskała stopień doktora nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie chemia. Jest głównym specjalistą Pionu Badawczego w Laboratorium Analityki Farmaceutycznej w Sieci Badawczej Łukasiewicz – Instytucie Chemii Przemysłowej imienia Profesora Ignacego Mościckiego w Warszawie. Specjalność – dyfrakcja rentgenowska na materiale proszkowym (PXRD), dyfrakcja rentgenowska na monokryształach (SC-XRD), skaningowa kalorymetria różnicowa (DSC), analiza termogravimetryczna (TGA), analiza mikroskopowa, spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), spektroskopia w podczerwieni (FTIR), spektroskopia Ramana.

* Adres do korespondencji:

Sieć Badawcza Łukasiewicz – Instytut Chemii Przemysłowej im. Profesora Ignacego Mościckiego, ul. Rydygiera 8, 01-197 Warszawa, tel.: 453-056-339, e-mail: magdalena.ruszczak@ichp.lukasiewicz.gov.pl

etapowe, obejmujące wstępne utlenianie nadtlenkiem wodoru, a następnie mineralizację stężonymi kwasami. Technika ICP-MS dzięki swojej czułości, selektywności i możliwości analiz wielopierwiastkowych stanowi podstawowe narzędzie w ocenie jakości materiałów farmaceutycznych w kontekście obecności zanieczyszczeń pierwiastkowych. Jednakże dobór odpowiedniej procedury przygotowania próbki oraz warunków instrumentalnych determinuje zapewnienie wysokiej dokładności i precyzji oznaczeń.

Charakterystyka i kontrola form krystalicznych substancji farmaceutycznych

Struktura krystaliczna substancji farmaceutycznej stanowi jeden z kluczowych czynników determinujących jej właściwości fizykochemiczne, a w konsekwencji jakość, skuteczność oraz bezpieczeństwo stałych postaci leku⁴⁰⁻⁴². Zarówno API, jak i wybrane substancje pomocnicze mogą występować w różnych odmianach polimorficznych, tworzyć hydraty i solваты, a także przyjmować postać amorficzną⁴¹ (rys. 2). Poszczególne polimorfy, mimo identycznego składu chemicznego, mogą wykazywać różne właściwości fizykochemiczne, co bezpośrednio wpływa na parametry technologiczne i biofarmaceutyczne produktu leczniczego⁴². Odmienne upakowanie cząsteczek w sieci krystalicznej, determinujące energię sieci, wpływa na zróżnicowanie właściwości form krystalicznych⁴⁰, w tym rozpuszczalność, szybkość rozpuszczania, higroskopijność, stabilność termiczną i chemiczną, podatność na przemiany fazowe i biodostępność. Przemiany fazowe mogą zachodzić na różnych etapach wytwarzania, takich jak synteza, oczyszczanie, suszenie, granulacja czy tabletkowanie, a także podczas przechowywania. Niekontrolowana transformacja jednej formy w inną może w konsekwencji prowadzić do zmian właściwości produktu, wpływając na jego jakość oraz powtarzalność efektu terapeutycznego. Konieczność identyfikacji występujących odmian krystalicznych oraz odpowiedniej kontroli właściwości strukturalnych substancji czynnej określają wytyczne międzynarodowe, m.in. ICH Q6A¹²) oraz ICH Q8(R2)⁵). Zgodnie z podejściem ICH charakterystyka polimorfów, hydratów, solwatów oraz postaci amorficznej powinna być przeprowadzana z wykorzystaniem odpowiednio zwalidowanych metod analitycznych, umożliwiających jednoznaczną identyfikację struktury oraz monitorowanie potencjalnych przemian fazowych API^{5, 12}).

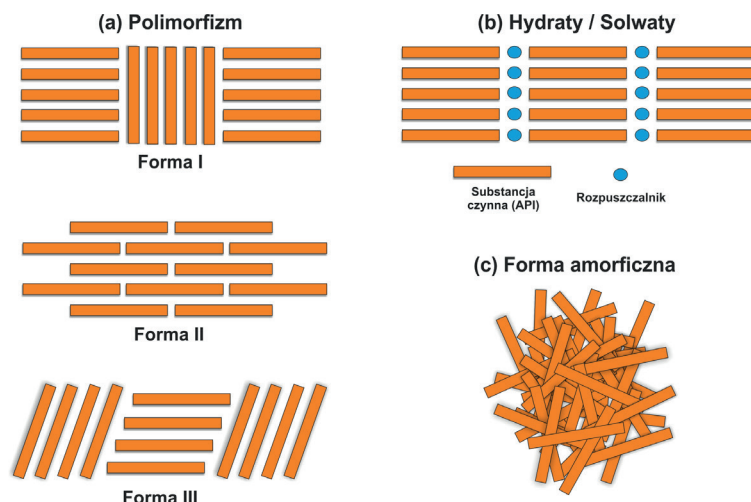


Fig. 2. Crystal structures and the amorphous state of pharmaceutical compounds

Rys. 2. Struktury krystaliczne oraz postać amorficzna substancji farmaceutycznych

Współczesna kontrola jakości formy krystalicznej opiera się na zastosowaniu zaawansowanych metod analitycznych, których komplementarny charakter umożliwia identyfikację, charakterystykę oraz monitorowanie zmian form krystalicznych, co stanowi integralny element systemu zapewnienia jakości i strategii kontroli procesu w przemyśle farmaceutycznym⁴²).

Podstawową metodą charakterystyki struktury krystalicznej substancji farmaceutycznych jest dyfrakcja promieniowania rentgenowskiego. Dyfrakcja rentgenowska na monokryształach (SC-XRD) umożliwia pełne rozwiązanie i ułożenie struktury krystalicznej, w tym jednoznaczne określenie położenia atomów w komórce elementarnej oraz charakteru oddziaływań międzycząsteczkowych. Dane uzyskane z dyfrakcji na monokryształach mogą zostać wykorzystane do wygenerowania teoretycznego dyfraktogramu proszkowego dla danej struktury. Ze względu na wymagania dotyczące jakości monokryształu do pomiaru, technika ta ma ograniczone zastosowanie rutynowe, jednak odgrywa istotną rolę w badaniach rozwojowych. W rutynowej kontroli jakości dominujące znaczenie ma dyfrakcja rentgenowska proszkowa (PXRD lub XRPD), która umożliwia identyfikację form polimorficznych oraz ocenę czystości fazowej substancji w postaci proszku. Otrzymany dyfraktogram proszkowy stanowi swoisty „odcisk palca” danej formy krystalicznej, wynikający z jej parametrów sieciowych i symetrii struktury (rys. 3a). Porównanie dyfraktogramu proszkowego badanej próbki z dyfraktogramem wzorca, symulowanym na podstawie danych z SC-XRD, pozwala jednoznacznie potwierdzić obecność określonej formy krystalicznej. Rozbieżności w położeniu i względnych intensywnościach refleksów lub obecność dodatkowych refleksów, niewystępujących we wzorcu formy pożądanej, wskazują na domieszki np. innej formy polimorficznej lub form krystalicznych w postaci hydratu lub solwatu (rys. 3b).



Dr inż. Marta ZEŻULA (ORCID: 0000-0002-4263-6440) w roku 2002 ukończyła studia magisterskie na Wydziale Chemii Politechniki Warszawskiej. W 2019 r. uzyskała stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauk farmaceutycznych na Wydziale Farmaceutycznym Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Jest Liderem Pionu Badawczego w Laboratorium Analityki Farmaceutycznej w Sieci Badawcza Łukasiewicz – Instytucie Chemii Przemysłowej imienia Profesora Ignacego Mościckiego w Warszawie. Zajmuje się opracowaniem i walidacją metod analitycznych wraz z tworzeniem dokumentacji, w tym systemowej. Specjalność – chromatografia cieczowa, tandemowa spektrometria mas (MS/MS), spektroskopia NMR.

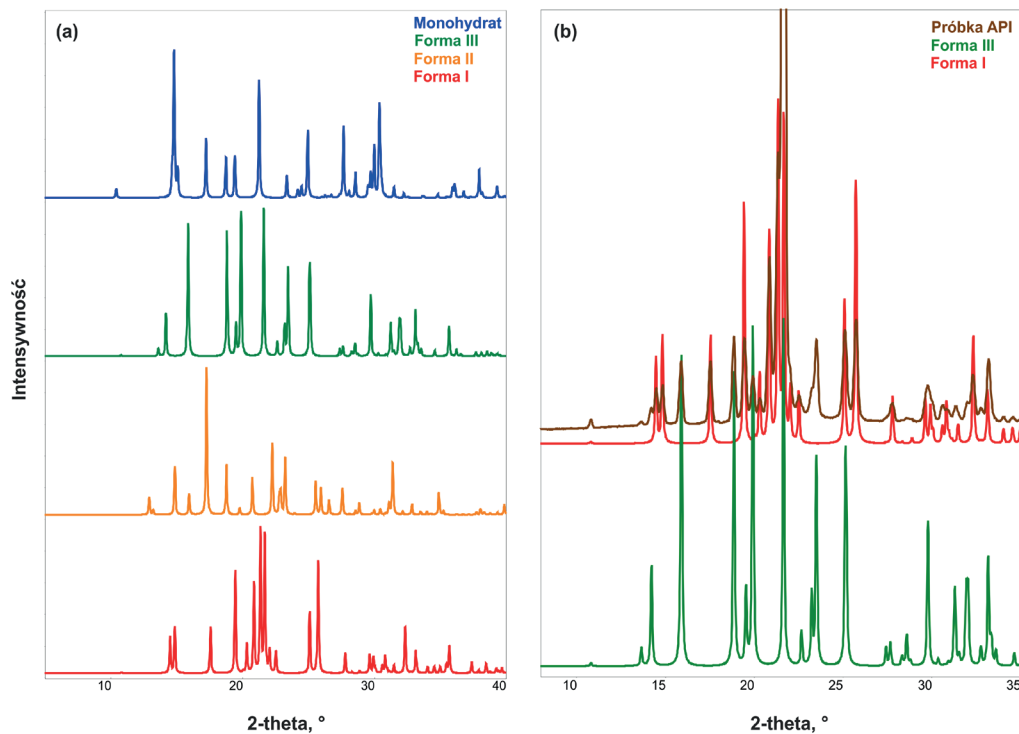


Fig. 3. (a) Comparison of theoretical powder X-ray diffractograms of different polymorphic forms and the monohydrate of the active pharmaceutical ingredient; (b) Comparison of the XRPD diffractograms of the tested API sample with the reference form I and form III. The analyzed sample consists mainly of form I with a detectable admixture of form III

Rys. 3. (a) Porównanie teoretycznych dyfraktogramów proszkowych różnych form polimorficznych oraz monohydratu substancji czynnej; (b) Porównanie dyfraktogramów proszkowych badanej próbki substancji czynnej (API) z dyfraktogramem wzorca formy I oraz formy III. Na dyfraktogramie substancji badanej oprócz obecności formy I widoczna jest domieszka formy III

Uzupełnieniem dyfrakcji rentgenowskiej w badaniach strukturalnych są techniki analizy termicznej. Skaningowa kalorymetria różnicowa (DSC) stosowana jest do badania przemian termicznych zachodzących w substancjach chemicznych, w tym w substancjach API. Metoda ta umożliwia wyznaczenie temperatur charakterystycznych oraz zmian entalpii towarzyszących przejściom fazowym (topnienie, krystalizacja, przemiany polimorficzne), które rejestrowane są w postaci charakterystycznych sygnałów na krzywej DSC. Technika ma zastosowanie w analizie polimorfizmu. Poszczególne formy polimorficzne tej samej substancji różnią się zazwyczaj temperaturą topnienia oraz entalpią topnienia, co umożliwia ich rozróżnienie (rys. 4). DSC pozwala także na wykrycie przemian fazowych zachodzących przed topnieniem, co może świadczyć o występowaniu polimorfizmu temperaturowego. Analiza przebiegu krzywej DSC umożliwia również ocenę czystości substancji, o ile zanieczyszczenia nie tworzą z nią mieszanin eutektycznych, ponieważ obecność zanieczyszczeń prowadzi zwykle do obniżenia temperatury topnienia oraz poszerzenia zakresu topnienia. Technika ta jest ponadto użyteczna do kontroli procesów dehydratacji lub desolwatacji, które widoczne są na krzywych DSC jako endotermiczne efekty cieplne poprzedzające topnienie, często połączone ze zmianą struktury krystalicznej.

Istotną rolę w identyfikacji hydratów i solwatów odgrywa także analiza termogravimetryczna (TGA), która jest stosowana do badania zmian masy substancji w funkcji temperatury lub czasu. Analiza przebiegu uzyskanej krzywej TG umożliwia identyfikację procesów przebiegających ze zmianą masy, takich jak parowanie, sublimacja, dehydratacja, desolwatacja, rozkład termiczny oraz reakcje utleniania i redukcji. Procesy dehydratacji i desolwatacji widoczne są na krzywych TG jako wyraźne, etapowe ubytki masy odpowiadające ilości cząsteczek rozpuszczalnika wbudowanych w strukturę krystaliczną. Znajduje ona również zastosowanie w wykrywaniu i ilościowej ocenie rozpuszczalników reszkowych oraz ocenie stabilności termicznej substancji, co jest szczególnie istotne w kontekście opra-

cowywania warunków suszenia, przechowywania oraz przetwarzania substancji farmaceutycznych.

Integralnym elementem charakterystyki postaci stałej są techniki spektroskopowe. Spektroskopia w podczerwieni (FTIR) oraz spektroskopia Ramana dostarczają informacji o budowie cząsteczkowej i oddziaływaniach międzycząsteczkowych poprzez analizę drgań molekularnych, dzięki czemu umożliwiają różnicowanie polimorfów, hydratów oraz solwatów tej samej substancji czynnej. Odmienne upakowanie cząsteczek w sieci krystalicznej oraz różnice w układzie wiązań wodorowych i innych oddziaływań międzycząsteczkowych prowadzą do subtelnych, lecz mierzalnych zmian w położeniu, intensywności i kształcie pasm. W rezultacie każda forma krystaliczna charakteryzuje się swoistym widmem FTIR oraz widmem Ramana, które mogą pełnić funkcję „odcisku palca” struktury stałej. Spektroskopia FTIR jest szczególnie przydatna w wykrywaniu obecności wody w strukturze krystalicznej oraz monitorowaniu procesów dehydratacji. Ograniczeniem klasycznej analizy FTIR jest jednak silna absorpcja promieniowania podczerwonego przez wodę, co utrudnia analizę roztworów wodnych. W takich przypadkach szczególnie przydatna jest spektroskopia Ramana, która umożliwia analizę substancji w roztworach wodnych, zawiesinach oraz w trakcie procesów krystalizacji prowadzonych w środowisku wodnym,

Kontrola wielkości cząstek substancji farmaceutycznych

Szczególne znaczenie w kontroli jakości ma analiza rozkładu wielkości cząstek. Parametr ten wpływa bezpośrednio na właściwości sypania proszku, zdolność do mieszania, podatność na prasowanie oraz jednolitość zawartości w gotowej postaci leku. Wielkość cząstek ma również istotny wpływ na szybkość rozpuszczania substancji czynnej, a tym samym na jej dostępność biologiczną.

Technikami analitycznymi stosowanymi w badaniach rozkładu wielkości cząstek są automatyczna analiza mikroskopowa, dyfrakcja laserowa oraz dynamiczne rozpraszanie światła (DLS). Metody te reprezentują trzy odmienne podejścia do oceny parametrów rozkładu wielkości cząstek. Automatyczna analiza mikroskopowa opiera się na cyfrowej analizie obrazu, umożliwiając bezpośrednią obserwację pojedynczych cząstek, pomiar ich rzeczywistych wymiarów geometrycznych oraz ocenę parametrów morfologicznych, takich jak sferyczność, wydłużenie oraz stosunek szerokości do długości (*aspect ratio*). Metoda ta pozwala na wyznaczenie rozkładów liczbowych i objętościowych, a także identyfikację aglomeratów oraz zanieczyszczeń. Dyfrakcja laserowa bazuje na zależności między kątem rozproszenia

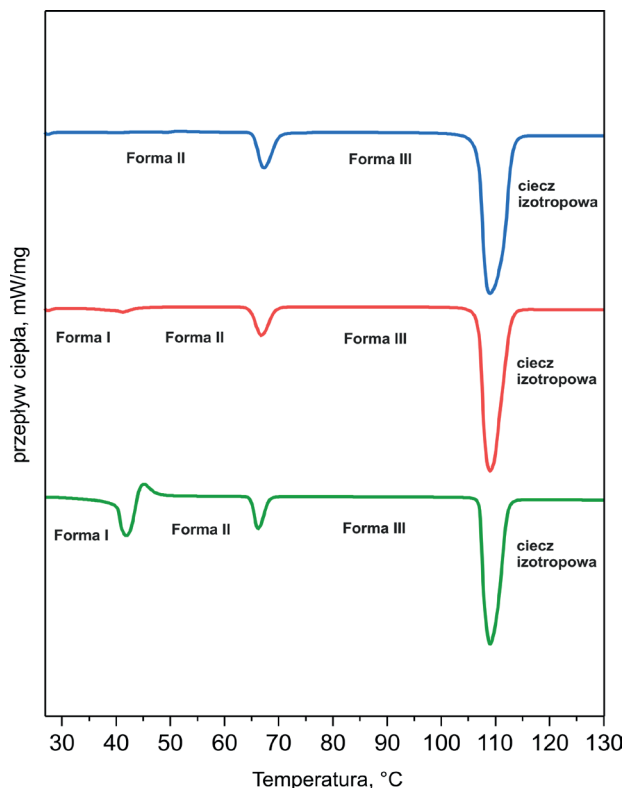


Fig. 4. Comparison of DSC curves of the active pharmaceutical ingredient exhibiting temperature-dependent polymorphism: green – DSC curve of the sample containing pure form I; red – DSC curve of the sample containing a mixture of form I and form II; blue – DSC curve of the sample containing pure form II

Rys. 4. Porównanie krzywych DSC substancji czynnej wykazującej polimorfizm temperaturowy: kolor zielony – krzywa DSC dla próbki zawierającej czystą formę I; kolor czerwony – krzywa DSC dla próbki zawierającej mieszaninę formy I oraz formy II; kolor niebieski – krzywa DSC dla próbki zawierającej czystą formę II

ponieważ woda wykazuje niski współczynnik rozpraszania ramanowskiego. Techniki te stanowią szybkie i nieniszczące narzędzia rutynowej kontroli tożsamości oraz monitorowania zmian strukturalnych substancji farmaceutycznych w trakcie wytwarzania i przechowywania.

Techniki mikroskopowe stanowią dodatkowe narzędzie wspomagające charakterystykę form krystalicznych. Umożliwiają bezpośrednią ocenę morfologii cząstek, pokroju kryształów oraz rozkładu wielkości cząstek. Parametry te należą do kluczowych cech fizykochemicznych wpływających na właściwości technologiczne i biofarmaceutyczne substancji czynnej. W praktyce farmaceutycznej najczęściej wykorzystuje się mikroskopię optyczną (w tym mikroskopię w świetle spolaryzowanym) oraz mikroskopię elektronową (SEM). Różne formy polimorficzne tej samej substancji mogą, choć nie zawsze, wykazywać odmienny pokrój kryształów, wynikający z różnic w budowie i symetrii sieci krystalicznej oraz szybkości wzrostu poszczególnych ścian krystalicznych (rys. 5). Należy jednak podkreślić, że podobieństwo morfologii nie wyklucza różnic strukturalnych, dlatego techniki mikroskopowe mają charakter wspomagający i wymagają korelacji z wynikami metod dyfrakcyjnych oraz spektroskopowych.

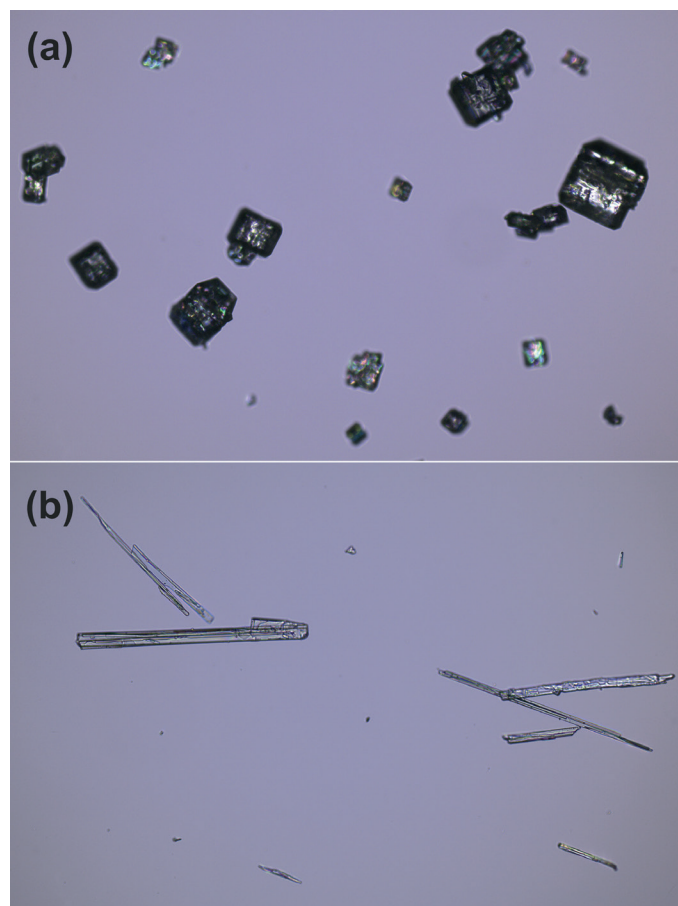


Fig. 5. Different crystal morphologies observed for polymorphic forms of the same compound: (a) a cubic habit (b) a needle-like habit

Rys. 5. Odmienne pokrój kryształów dla różnych form polimorficznych tej samej substancji (a) pokrój kubiczny (b) pokrój igielkowy

światła a wielkością cząstek i umożliwia szybki pomiar rozkładu wielkości w szerokim zakresie, od frakcji mikrometrycznych do kilku milimetrów, zarówno dla próbek stałych, jak i zawiesin. DLS dostarcza informacji o hydrodynamicznej średnicy cząstek w zawieszynie, wyznaczanej na podstawie dynamiki ruchów Browna, co czyni tę metodę szczególnie użyteczną w badaniach nanocząstek i układów koloidalnych. Należy jednak podkreślić, że zarówno dyfrakcja laserowa, jak i dynamiczne rozpraszanie światła zakładają w modelach obliczeniowych kulisty kształt cząstek, podczas gdy analiza mikroskopowa pozwala na bezpośrednią ocenę cząstek o nieregularnej morfologii. W praktyce metody te stanowią zatem narzędzia komplementarne.

Podsumowanie

Kompleksowe zastosowanie różnych metod analitycznych stanowi podstawę zapewnienia jakości produktów leczniczych oraz spełnienia wymagań Farmakopei, zasad Dobrej Praktyki Wytwarzania i wytycznych ICH. Szczególne znaczenie mają techniki chromatograficzne, takie jak HPLC, UHPLC i GC, a także układy hybrydowe sprzężone ze spektrometrią mas (LC-MS, GC-MS), które umożliwiają identyfikację oraz ilościowe oznaczanie zanieczyszczeń organicznych i produktów degradacji z wysoką czułością, selektywnością i powtarzalnością. Uzupełniające metody spektroskopowe, obejmujące FTIR, spektroskopię Ramana i NMR oraz techniki analizy termicznej i dyfrakcyjnej (DSC, TGA, XRPD), dostarczają kluczowych informacji o strukturze, właściwościach fizykochemicznych i stabilności substancji czynnych, substancji pomocniczych i gotowych produktów leczniczych. Zintegrowane wykorzystanie tych metod umożliwia pełną charakterystykę materiałów farmaceutycznych na wszystkich etapach cyklu życia produktu, od kontroli jakości surowców i nadzorowania procesów wytwarzania, aż po ocenę zmian jakościowych i stabilności podczas przechowywania. Kluczowym elementem zapewnienia wiarygodności danych jest walidacja procedur analitycznych zgodnie z wymaganiami ICH Q2, która potwierdza ich przydatność do zamierzonego celu oraz gwarantuje rzetelność uzyskiwanych wyników. W efekcie nowoczesny zestaw narzędzi analitycznych tworzy spójny, wielowymiarowy system nadzoru jakości, umożliwiający precyzyjne monitorowanie profilu zanieczyszczeń, właściwości fizykochemicznych oraz stabilności produktów leczniczych, co stanowi kluczowy element bezpieczeństwa terapii i zgodności regulacyjnej.

Otrzymano: 03-03-2026

Zrecenzowano: 08-03-2026

Zaakceptowano: 10-03-2026

Opublikowano: 25-05-2026

LITERATURA

- [1] Ustawa Prawo farmaceutyczne, *Dz.U.* 2001, nr 126, poz. 1381.
- [2] Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 9 listopada 2015 r. w sprawie wymagań Dobrej Praktyki Wytwarzania, *Dz.U.* 2022, poz. 1273 z późn. zm.

- [3] M. Sznitowska, *Farmacja stosowana. Technologia postaci leku*, PZWL, Warszawa 2017.
- [4] <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>.
- [5] ICH Quality Guidelines: Q8(R2), Pharmaceutical development, 2009.
- [6] ICH Quality Guidelines: Q2(R2), Validation of analytical procedures, 2023.
- [7] E. Drevet Mulard, V. Gilard, S. Balayssac, G.J.P. Rautureau, *Molecules* 2025, **30**, nr 8, 1838.
- [8] United States Pharmacopeia, Stimuli to the Revision Process: Quantitative Nuclear Magnetic Resonance, 2017.
- [9] Y. Xie, D. Zheng, T. Yang, Z. Zhang, W. Xu, H. Liu, W. Li, *Molecules* 2023, **28**, nr 2, 765.
- [10] C. Ma, Y. Liu, Q. Xu, G.I. Giancaspro, S. Tan, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2022, **212**, 114618.
- [11] M. Puchalska, J. Zagrodzka, E. Czerniec-Michalik, M. Zezula, J. Chmiel, W. Luniewski, B. Zagrodzki, *Przem. Chem.* 2012, **91**, nr 3, 358.
- [12] ICH Quality Guidelines: Q6A, Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products, 1999.
- [13] ICH Quality Guidelines: Q3A(R2), Impurities in new Drug Substances, 2006.
- [14] ICH Quality Guidelines: Q3B(R2), Impurities in new Drug Products, 2006.
- [15] ICH Quality Guidelines: Q1A(R2), Stability testing of New Drug Substances and Products, 2003.
- [16] ICH Multidisciplinary Guidelines: M4(R4), Organisation of the Common Technical Document for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2016.
- [17] S.B. Ombase, R.B. Pandhare, K.D. Nagrale, M.S. Charde, R.D. Chakole, *IJNRD* 2023, **8**, nr 8, 574.
- [18] M. Khalikova, J. Jires, O. Horacek, M. Dousa, R. Kucera, L. Novakova, *Mass Spectrom Rev.* 2024, **43**, 560.
- [19] Ch. Gu, B. Lin, J. Pease, N. Chetwyn, P. Yehl, *Am. Pharm. Rev.* 2015, **18**, 1. <http://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/179230-Mass-Spectrometry-in-Small-Molecule-Drug-Development/>.
- [20] ICH Multidisciplinary Guidelines: M7(R2), Guideline on assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk, 2023.
- [21] <https://www.medicinesforeurope.com/wp-content/uploads/2023/10/Review-of-Nitrosamine-drug-substance-related-impurities-in-Pharma-report.pdf>.
- [22] EMA/526934/2019 Report, Lessons learnt from presence of N-nitrosoamine impurities in Spartan medicines, 2020.
- [23] Active Pharmaceutical Ingredients Committee (APIC), Nitrosamine risk management: guidance for API Manufacturers, 2025.
- [24] K.M. Manchuri, M.A. Shalik, V.S.R. Gopireddy, N. Sultana, S. Gogineni, *Chem. Res. Toxicol.* 2024, **37**, nr 9, 1456.
- [25] M. Beccaria, D. Cabooter, *Analyst* 2020, **145**, nr 4, 1129.
- [26] C.F. Poole, *Gas chromatography*, Elsevier, 2021.
- [27] M. Kapil, S. Lata, *IJPRR* 2013, **2**, nr 10, 25.
- [28] ICH Quality Guidelines: Q3C(R9), Impurities: Guideline for Residual Solvents, 2024.
- [29] United States Pharmacopeia, General Chapter, (467) Residual Solvents. USP-NF. Rockville, MD: United States Pharmacopeia.
- [30] C.C. Camarasu, M. Mezei-Szűts, G.B. Varga, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1998, **18**, 4.
- [31] R.I. Reed, *Modern aspects of mass spectrometry*, Plenum Press, 1968.
- [32] EMA/369136/2020 Assessment report, Nitrosamine impurities in human medicinal products, 2020.
- [33] J. Liu, B. Xie, B. Mai, Q. Cai, R. He, D. Guo, Z. Zhang, J. Fan, W. Zhang, *J. Anal. Sci. Technol.* 2021, **12**, 1.
- [34] European Pharmacopoeia (Ph. Eur.), Determination of elemental impurities, Chapter 2.4.20, Council of Europe, Strasbourg 2019.
- [35] European Pharmacopoeia (Ph. Eur.), Inductively coupled plasma-mass spectrometry, Chapter 2.2.58, Council of Europe, Strasbourg 2008.
- [36] ICH guideline Q3D (R2) on elemental impurities, EMA/CHMP/ICH/353369/2013 Committee for Medicinal Products for Human Use, 2022.
- [37] A.C.M. Aleluia, M. de Souza Nascimento, A.M.P. dos Santos, W.N.L. dos Santos, A. de Freitas Santos Junior, S.L.C. Ferreira, *Spectrochim. Acta B At. Spectrosc.* 2023, **205**, 1
- [38] D.N. Reddy, A.J. Al-Rajab, G.R. Reddy, [w:] *Drug discovery. Concepts to market* (red. V. Bobbarala), IntechOpen, 2018.
- [39] J.S. Barin, P.A. Mello, M.F. Mesko, F.A. Duarte, E.M.M. Flores, *Anal. Bioanal. Chem.* 2016, **408**, 4457.
- [40] J. Bernstein, *Polymorphism in molecular crystals*, Oxford University Press, 2002.
- [41] H.G. Brittain, *Polymorphism in pharmaceutical solids*, Informa Healthcare, 2009.
- [42] R. Hilfiker (ed.), *Polymorphism in the pharmaceutical industry*, Wiley-VCH, 2006. ISBN:9783527311460.