

## Hochempfindliche und robuste UPLC-MS/MS-Quantifizierung von Nitrosaminverunreinigungen in Sartan- und Ranitidin-Arzneimitteln

---

Lindsay Hatch, Mary E. Lame, Dave Higton, Paul D. Rainville, Gordon Fujimoto

Waters Corporation



Dies ist ein Applikationsbericht, der keinen detaillierten Abschnitt zu

Versuchen enthält.

---

## Kurzbeschreibung

Dieser Applikationsbericht zeigt eine hochempfindliche und robuste LC-MS/MS-Quantifizierungsmethode für sechs Nitrosaminverunreinigungen (NDMA, NDEA, NEIPA, NDIPA, NDBA und NMBA) in Lösungen, die Irbesartan, Losartan, Valsartan (Sartane) und Ranitidin-Wirkstoffe enthalten.

### Vorteile

Das Xevo TQ-XS Massenspektrometer ermöglicht in Kombination mit einem ACQUITY UPLC I-Class PLUS System mit einer HSS T3 Trennsäule eine hochempfindliche Quantifizierung von Nitrosaminverunreinigungen in Ranitidin- und Sartan-Wirkstoffen, wobei LLOQ-Werte von 0,1 ng/mL erreicht werden.

---

## Einleitung

N-Nitrosoverbindungen haben eine extrem hohe karzinogene Wirkung, und mehrere Medikamente wurden aufgrund dieser Verunreinigungen zurückgerufen.<sup>1,2</sup> Zur Gewährleistung der Arzneimittelsicherheit müssen Schritte unternommen werden, damit die Ursache für diese Verunreinigungen geklärt und sichergestellt wird, dass sie aus dem endgültigen Arzneimittel entfernt werden. Informationen zur Beurteilung und Bekämpfung dieser krebserregenden Verunreinigungen finden sich in der Leitlinie ICH M7 (R1).<sup>3</sup>

An dieser Stelle wird eine robuste und hochempfindliche LC-MS/MS-Methode zur gleichzeitigen Quantifizierung von sechs Nitrosaminverunreinigungen (NDMA, NDEA, NEIPA, NDIPA, NDBA und NMBA) vorgestellt. Diese Methode liefert LLOQ-Werte von 0,1 ng/mL (3 pg On-Column) in einem linearen dynamischen Bereich von 0,1 – 100 ng/mL.

---

## Versuch

### LC-MS-Bedingungen

## LC-Bedingungen

LC-System:	ACQUITY UPLC I-Class PLUS, FTN mit 50- $\mu$ L- Erweiterungsschleife
Säule:	HSS T3; 1,8 $\mu$ m, 100Å, 2,1 x 100 mm
Säulentemperatur:	40 °C
Probentemp.:	10 °C
Injektionsvolumen:	30 $\mu$ l
Mobile Phase:	A – 5 mM Ammoniumformiat mit 0,1 % Ameisensäure in Wasser B – 5 mM Ammoniumformiat mit 0,1 % Ameisensäure in Methanol
Spüllösungsmittel:	50:50-Gemisch Wasser/Methanol
Waschlösungsmittel:	25:25:25:25-Gemisch IPA/MeOH/ACN/Wasser
Probendiluent:	Wasser

## LC-Gradient:

Zeit (min)	Flussrate%		%	Kurve
	(mL/min)A	B		
Start	0,400	98,0	2,0	Start
0,24	0,400	98,0	2,0	6
4,00	0,400	5,0	95,0	6
4,61	0,400	5,0	95,0	6
5,00	0,400	98,0	2,0	6
7,00	0,400	98,0	2,0	6

#### MS-Bedingungen

Quelle: APCI+

Korona: 0,5 – 1,3  $\mu$ A (system-/nadelspezifisch)

APCI-Sprühkopf-Temp.: 400 °C

Desolvatationsfluss: 1000 L/h

Flussrate Conegas 150 L/h

Datenmanagement: Chromatographiesoftware: MassLynx

Quantifizierungssoftware: TargetLynx XS

Analyte	Parent (m/z)	Daughter (m/z)	Dwell (s)	Cone (V)	Collision (eV)
NDMA	75.1	58.0	0.032	30	10
		43.0	0.032	30	8
		75.1	0.032	30	3
NDEA	103.2	74.9	0.024	30	10
		46.9	0.024	30	14
		103.2	0.024	30	4
NEIPA	117.2	75.0	0.024	20	9
		43.1	0.024	20	13
NDIPA	131.2	89.1	0.024	20	9
		43.2	0.024	20	9
		47.1	0.024	20	12
NMBA	147.1	117.1	0.027	30	5
		44.0	0.027	30	12
		147.1	0.027	30	3
NDBA	159.2	57.1	0.024	30	12
		41.1	0.024	30	13
		103.2	0.024	30	10

Tabelle 2. MRM-Übergänge bei Nitrosaminverunreinigungen

## Ergebnisse und Diskussion

Standardproben, die die sechs Nitrosaminverunreinigungen und vier Arzneistoffe (Ranitidin und Sartane) enthielten, wurden in 20 % Methanol/80 % Wasser aus einer konzentrierten Stammlösung hergestellt, die 1 µg/mL jeder Nitrosaminverunreinigung und ~ 100 µg/mL jedes Arzneistoffs enthielt. Kalibrierstandards (0,05 – 100 ng/mL) wurden durch serielle Verdünnung aus der 1 µg/mL Lösung in Wasser hergestellt und in eine Probensammelplatte mit 96 Wells (Teilenummer 186005837) gegeben. Die Platte wurde unter Verwendung einer vorgeschlitzten Silikon/PTFE-Verschlussmatte mit 96 Wells (Teilenummer 186006332) verschlossen. LC-MS-Bedingungen sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die spezifischen MRM-Übergänge für die zur Analyse verwendeten Nitrosamine und Arzneimittel sind in Tabelle 2 aufgelistet. Die LC-MS/MS-Analyse wurde mit einem Waters Xevo TQ-XS Tandem-Quadrupol-Massenspektrometer durchgeführt, das mit einem ACQUITY UPLC I-Class PLUS System gekoppelt war. Die chromatographische Trennung der Nitrosamine und Arzneistoffe wurde mit einer ACQUITY HSS T3 Säule erreicht, die auf einer früheren Methode basiert.<sup>4</sup>

Aufgrund ihrer einzigartigen polaren Chemie bietet die ACQUITY HSS T3 Säule ein hervorragendes Retentionsvermögen für die Nitrosamine, insbesondere eine sehr hohe Retention des Nitrosamins mit der höchsten Polarität – NDMA (Abbildung 1). Das Xevo TQ-XS MS mit neuer StepWave Ionenführung und IonSABRE APCI-Sprühkopf verbesserte die Ionenprobennahme in der Quelle, sorgte für einen effizienten Ionen transfer und optimierte die Ionisierung. Die MassLynx (v4.2) und TargetLynx XS Chromatographie- und Datenverarbeitungssoftwareprogramme wurden zur Datenerfassung und Quantifizierung verwendet. Dieselben quantitativen Funktionen sind auch in der kompatiblen Waters Lösung MassLynx Security verfügbar. Diese Quantifizierungsleistung ist in Tabelle 3 aufgeführt. Die chromatographische Leistung, die die LLOQ-Werte der sechs Nitrosaminverunreinigungen hervorhebt, ist in Abbildung 2 dargestellt. Mit diesem entwickelten Test wurden LLOQ-Werte von 0,1 ng/mL mit Genauigkeiten und RSD-Werten von  $\leq 15\%$  erreicht, was ihn zu einer hochempfindlichen, genauen und robusten Methode zur Quantifizierung von Nitrosaminverunreinigungen macht.

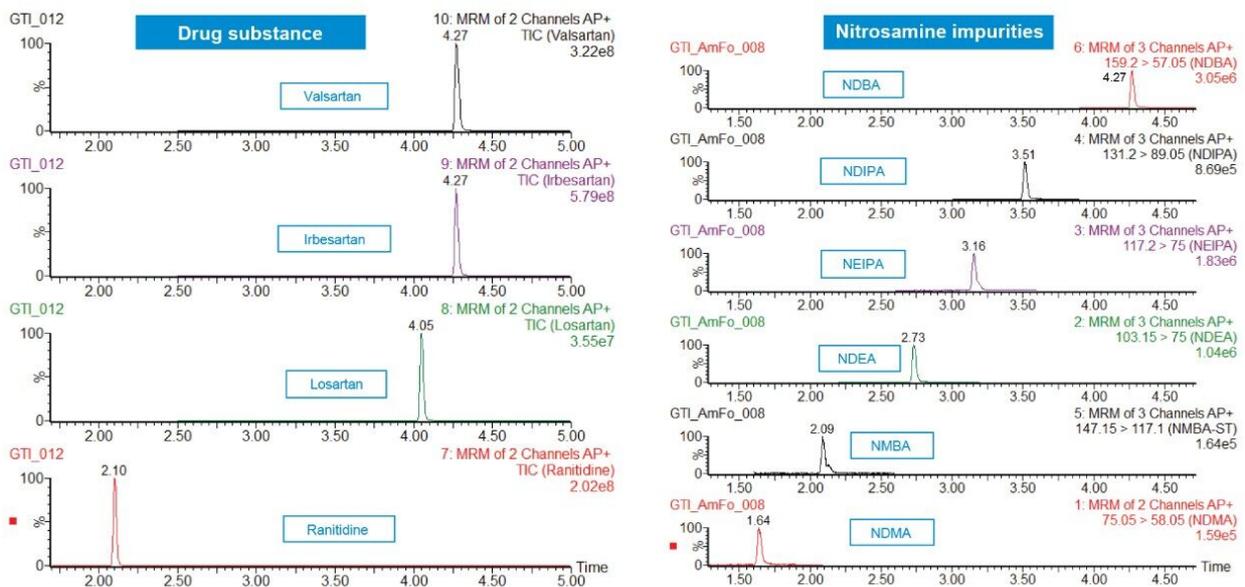


Abbildung 1. Repräsentative Chromatogramme des Arzneistoffs (links) und der Nitrosaminverunreinigungen (rechts) unter Verwendung der ACQUITY HSS T3 1,8  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ , 2,1 x 100 mm Säule.

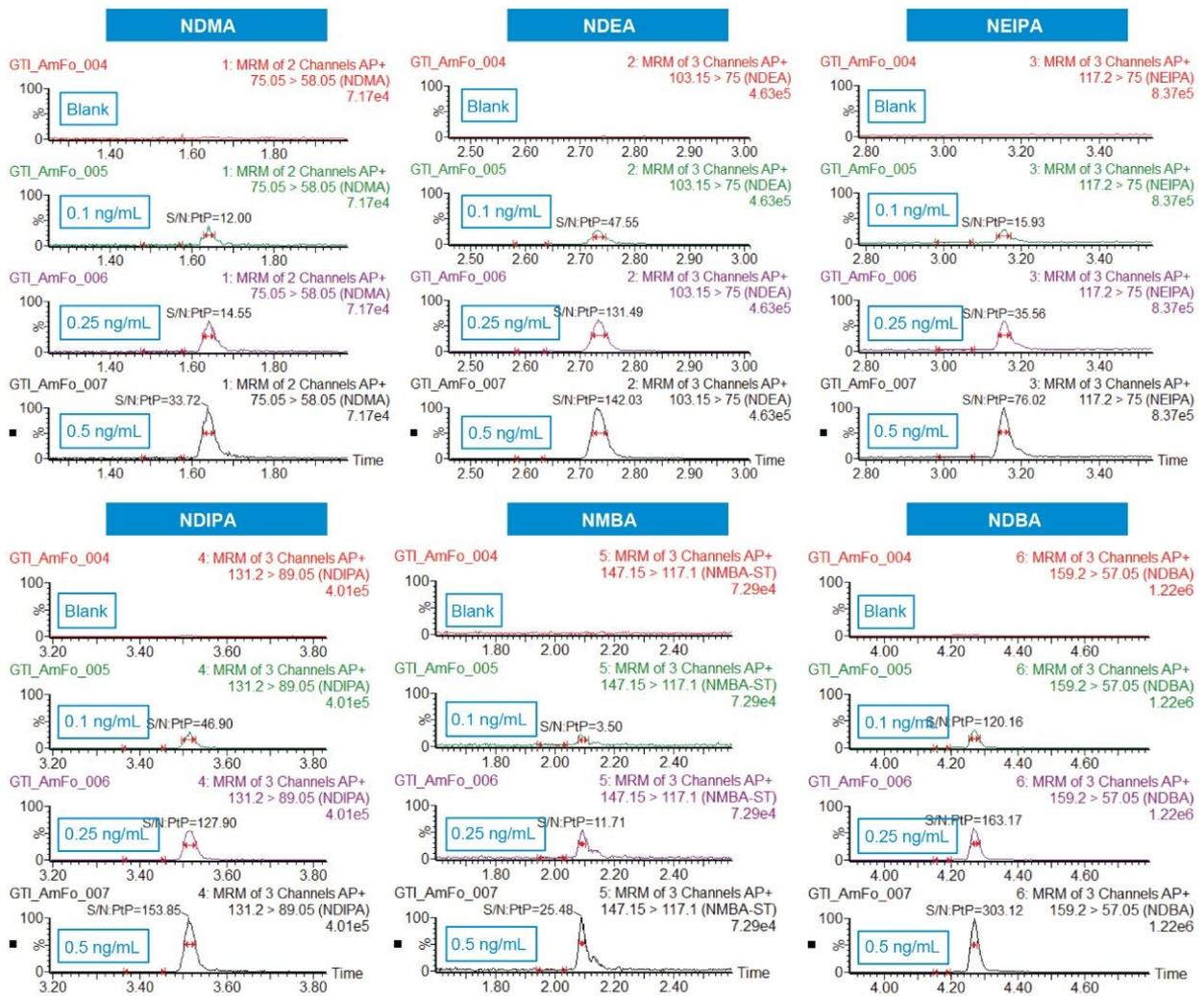


Abbildung 2. Repräsentative Chromatogramme, die eine hohe Empfindlichkeit und Spezifität für die sechs Nitrosaminverunreinigungen aufweisen, wobei Konzentrationsstandards von 0,10, 0,25 und 0,50 ng/mL mit der Blindprobe verglichen werden. Peak-to-Peak (PtP) Signal-Rausch-Werte werden für jeden Nitrosamin-Peak angezeigt.

Nitrosamine Impurity Quantification Performance				
GTI	Std curve range (ng/mL)	Weighting	Linear fit (R <sup>2</sup> )	MRM transition
NDMA	0.1-100	1/x	≥0.99	75.1>58.0
				75.1>43.1
NDEA				103.2>74.9
				103.2>46.9
NDBA				159.2>57.1
				159.2>103.2
NMBA				147.1>117.1
	147.1>44			
NEIPA				117.2>74.9
				117.2>43.1
NDIPA				131.2>89.1
				131.2>47.1

*Tabelle 3. Repräsentative Quantifizierungsleistung für die sechs Nitrosaminverunreinigungen, die ausgezeichnete Empfindlichkeit (LLOQ-Werte ≤ 0,1 ng/mL), Linearität (R<sup>2</sup> > 0,99) und einen hervorragenden dynamischen Bereich (0,1 – 100 ng/mL) aufzeigen*

## Zusammenfassung

Eine einzige UPLC-MS/MS-Methode wurde erfolgreich für die genaue, robuste und hochempfindliche Quantifizierung von sechs Nitrosaminverunreinigungen entwickelt, wobei mit dem ACQUITY UPLC I-Class PLUS und dem Xevo TQ-XS Tandem Quadrupol Massenspektrometer LLOQ-Werte von 0,1 ng/mL erreicht wurden. Die ACQUITY HSS T3 Säule zeigte bei sechs Nitrosaminverunreinigungen ein hervorragendes Retentionsvermögen und eine hohe Selektivität. Diese Methode bietet einen praktischen Ausgangspunkt für die hochempfindliche Quantifizierung von Nitrosaminen oder ähnlichen Verbindungen.

## Literatur

1. <https://www.uspharmacist.com/article/fda-update-on-recent-voluntary-arb-drug-recalls>
2. <https://www.fda.gov/newsevents/press-announcements/statement-alerting-patients-and-health->

careprofessionals- ndma-found-samples-ranitidine

3. ICH M7 R1, Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk, International Conference on Harmonization, März 2018.
4. Maziarz, M.; Naughton, S. Verwendung einer proprietären Polarsäulenchemie zur Trennung von Nitrosaminen in Sartan- und Ranitidin-Wirkstoffen. Waters Kurzvorstellung der Technologie. 720006738DE. 2020.

---

## Empfohlene Produkte

[ACQUITY UPLC I-Class PLUS System <https://www.waters.com/134613317>](https://www.waters.com/134613317)

[Xevo TQ-XS Triple Quadrupol Massenspektrometer <https://www.waters.com/134889751>](https://www.waters.com/134889751)

[MassLynx MS-Software <https://www.waters.com/513662>](https://www.waters.com/513662)

[TargetLynx <https://www.waters.com/513791>](https://www.waters.com/513791)

720006751, Januar 2020