

Application Note

## Quantificação de UPLC-MS/MS altamente sensível e robusta das impurezas de nitrosamina nos medicamentos sartana e ranitidina

---

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

Waters Corporation



Este é um Resumo de aplicações e, por isso, não inclui uma seção de

experimento detalhada.

---

## Resumo

Este resumo de aplicações demonstra um método de quantificação de LC-MS/MS altamente sensível e robusto para seis impurezas de nitrosamina (NDMA, NDEA, NEIPA, NDIPA, NDBA e NMBA) em soluções contendo os medicamentos irbesartana, losartana, valsartana ("sartanas") e ranitidina.

### Benefícios

O Espectrômetro de massas Xevo TQ-XS, acoplado a um ACQUITY UPLC I-Class PLUS System com uma Coluna HSS T3 para separação, permite uma quantificação altamente sensível das impurezas de nitrosamina em medicamentos ranitidina e sartana, obtendo LLOQs de 0,1 ng/mL.

---

## Introdução

Os compostos N-nitrosos são considerados como tendo um potencial cancerígeno extremamente alto, e vários medicamentos foram recolhidos devido à presença dessas impurezas.<sup>1,2</sup> Para garantir a segurança dos produtos farmacêuticos, devem ser tomadas medidas para entender a origem dessas impurezas e assegurar a remoção delas dos medicamentos finais. É possível encontrar informações sobre como avaliar e controlar essas impurezas cancerígenas na diretriz ICH M7 (R1).<sup>3</sup>

Neste artigo, apresentamos um método de LC-MS/MS altamente sensível e robusto para a quantificação simultânea de seis impurezas de nitrosamina (NDMA, NDEA, NEIPA, NDIPA, NDBA e NMBA). Esse método suporta 0,1 ng/mL de LLOQs (3 pg na coluna) com um intervalo dinâmico linear de 0,1 a 100 ng/mL.

---

## Experimento

### Condições de LC-MS

## Condições de LC

Sistema LC:	ACQUITY UPLC I-Class PLUS, FTN com loop de extensão de 50 $\mu$ L
Coluna:	HSS T3; 1,8 $\mu$ m, 100 Å, 2,1 x 100 mm
Temp. da coluna:	40 °C
Temp. da amostra:	10 °C
Volume de injeção:	30 $\mu$ L
Fase móvel:	A – 5 mM de formiato de amônio com 0,1% de ácido fórmico em água B – 5 mM de formiato de amônio com 0,1% de ácido fórmico em metanol
Solvente de purga:	Água:metanol na proporção 50:50
Solvente de lavagem:	IPA:MeOH:ACN:água na proporção 25:25:25:25
Diluyente das amostras:	Água

## Gradiente de LC:

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	%A	%B	Curva
Inicial	0,400	98,0	2,0	Inicial
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

#### Condições de MS

Fonte:	APCI+
Corona:	0,5-1,3 $\mu$ A (específico ao sistema/pino)
Temp. da probe de APCI:	400 °C
Fluxo de dessolvatação:	1.000 L/h
Fluxo de gás do cone:	150 L/h
Gerenciamento de dados:	Software de cromatografia: MassLynx Software de quantificação: 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

Tabela 2. Transições de MRM das impurezas de nitrosamina

## Resultados e discussão

Foram preparadas amostras padrão contendo as seis impurezas de nitrosamina e quatro medicamentos (ranitidina e "sartanas") a partir de uma solução estoque concentrada com 1 µg/mL de cada impureza de nitrosamina e aproximadamente 100 µg/mL de cada medicamento em 20% de metanol/80% de água. Os padrões de calibração (0,05-100 ng/mL) foram preparados em água por diluição em série a partir da solução de 1 µg/mL e colocados em um plate de coleta de amostras de 96 poços (PN 186005837). O plate foi vedado utilizando um tapete de selagem de 96 poços de silicone/PTFE pre-slit (PN 186006332). As condições de LC-MS são listadas na Tabela 1, e as transições de MRM específicas para as nitrosaminas e os medicamentos utilizados para análise são listadas na Tabela 2. A análise LC-MS/MS foi realizada com um espectrômetro de massas tandem quadrupolo Waters Xevo TQ-XS acoplado a um ACQUITY UPLC I-Class PLUS System. A separação cromatográfica das nitrosaminas e dos medicamentos foi obtida com uma Coluna ACQUITY HSS T3 com base em um método anterior.<sup>4</sup> Devido ao recheio polar exclusivo, a Coluna

ACQUITY HSS T3 proporcionou excelente retentividade para as nitrosaminas, em particular a retenção da nitrosamina mais polar, NDMA (Figura 1). O Xevo TQ-XS MS, incluindo uma inédita guia de íons StepWave e uma probe de APCI IonSABRE, melhorou a amostragem de íons na fonte, possibilitou uma transferência de íons eficiente e aprimorou a ionização. Os softwares de processamento cromatográfico e de dados MassLynx (v4.2) e TargetLynx XS foram utilizados para aquisição e quantificação de dados. As mesmas funções quantitativas também estão disponíveis no MassLynx Security, a solução pronta para conformidade da Waters. Esse desempenho de quantificação é destacado na Tabela 3, e o desempenho cromatográfico, que realça os LLOQs das seis impurezas de nitrosamina, é ilustrado na Figura 2. Com esse ensaio desenvolvido, LLOQs de 0,1 ng/mL foram obtidos com exatidões e RSDs  $\leq 15\%$ , demonstrando um método altamente sensível, exato e robusto para quantificação de impurezas de nitrosamina.

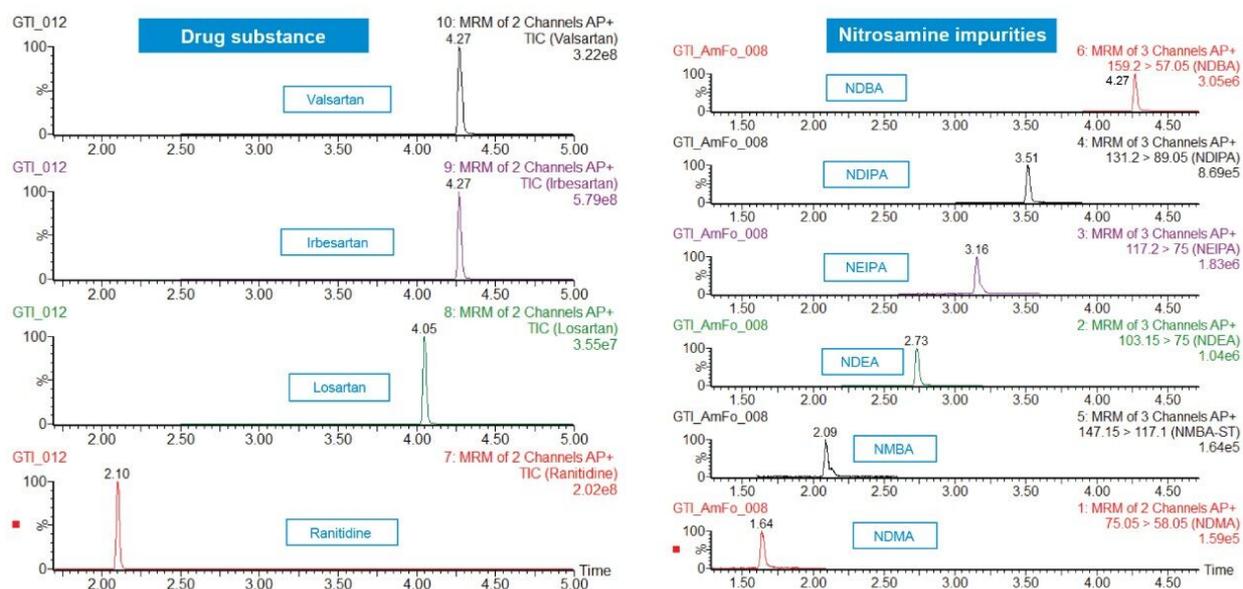


Figura 1. Cromatogramas representativos de medicamentos (à esquerda) e impurezas de nitrosamina (à direita) utilizando a Coluna ACQUITY HSS T3 1,8  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ , 2,1 x 100 mm.

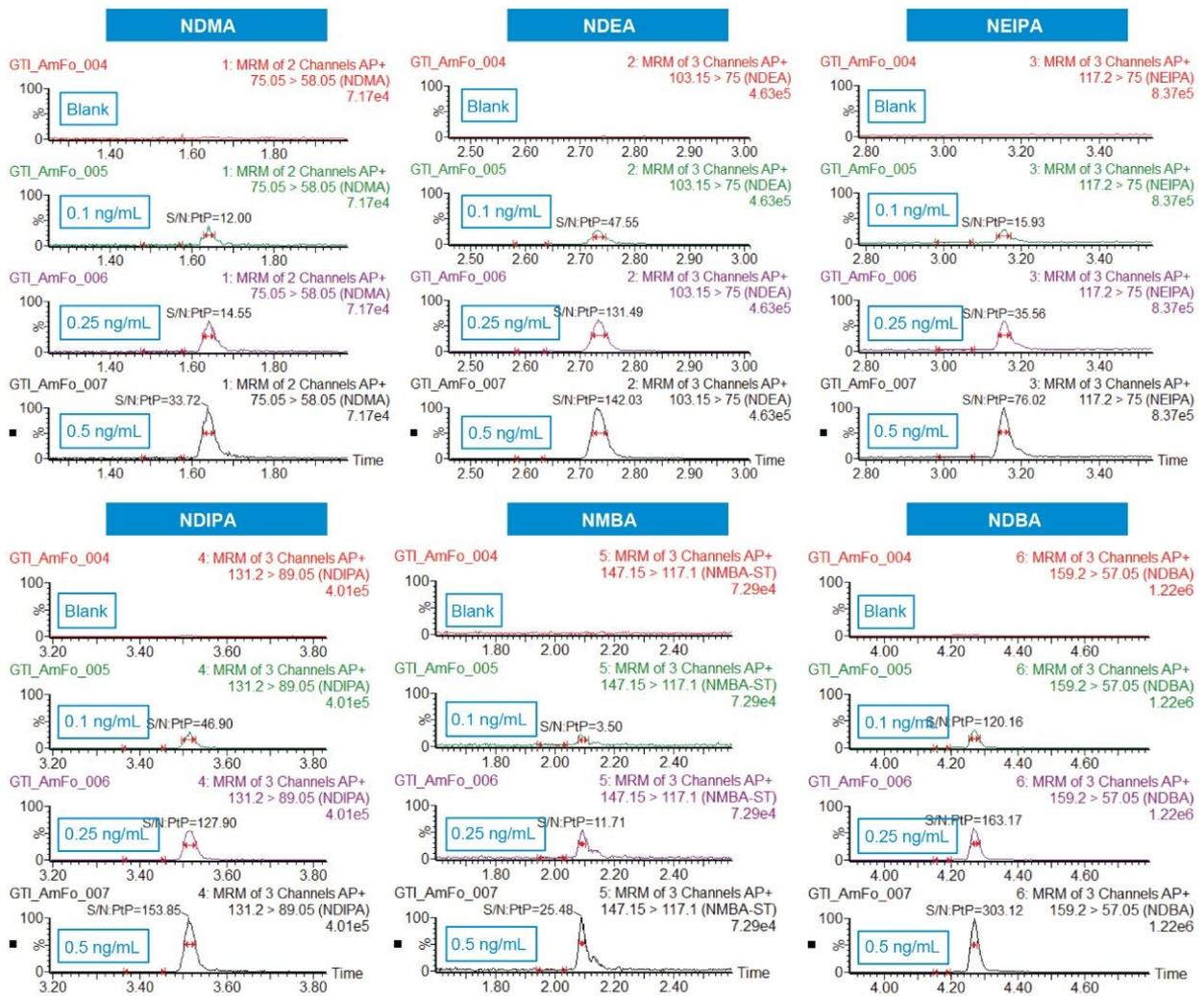


Figura 2. Cromatogramas representativos que demonstram alta sensibilidade e especificidade para as seis impurezas de nitrosamina, comparando os padrões de concentração 0,10, 0,25 e 0,50 ng/mL ao branco. Os valores de sinal-ruído entre picos (PtP) são mostrados para cada pico de nitrosamina.

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

Tabela 3. Desempenho representativo da quantificação para as seis impurezas de nitrosamina demonstrando excelente sensibilidade (LLOQs ≤ 0,1 ng/mL), linearidade (R<sup>2</sup> > 0,99) e intervalo dinâmico (0,1-100 ng/mL)

## Conclusão

Um único método de UPLC-MS/MS foi desenvolvido com êxito para a quantificação exata, robusta e altamente sensível de seis impurezas de nitrosamina, obtendo LLOQs de 0,1 ng/mL com o ACQUITY UPLC I-Class PLUS e o espectrômetro de massas tandem quadrupolo Xevo TQ-XS. A Coluna ACQUITY HSS T3 proporcionou excelente retentividade e seletividade para as seis impurezas de nitrosamina. Esse método oferece um ponto de partida prático para quantificação de alta sensibilidade de nitrosaminas ou compostos similares.

## Referências

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, Março de 2018.
4. Maziarz, M.; Naughton, S. Use of a proprietary polar column chemistry for the separation of nitrosamines in sartan and ranitidine drug substances. Resumo tecnológico da Waters. 720006738EN. 2020.

---

## Produtos em destaque

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

[Espectrometria de Massas triplo quadrupolo Xevo TQ-XS <https://www.waters.com/134889751>](https://www.waters.com/134889751)

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

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

720006751, janeiro de 2020