

# Determinazione delle impurezze di nitrosammine utilizzando il sistema LC/MS Ultivo a triplo quadrupolo

Analisi di impurezze genotossiche regolate derivanti dal processo di produzione di farmaci

## **Autori**

Chander Mani e Saikat  
Banerjee  
Agilent Technologies, Inc.

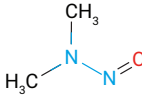
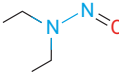
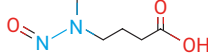
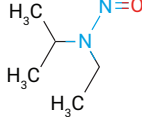
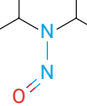
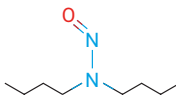
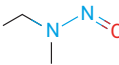
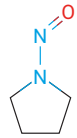
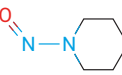
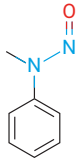
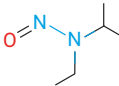
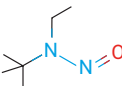
## **Abstract**

Recenti studi mostrano che i farmaci bloccanti il recettore dell'angiotensina II (ARB) contengono impurezze di nitrosammine, delle sostanze cancerogene.<sup>1</sup> Molti di questi prodotti sono pertanto stati ritirati dal mercato, dimostrando la necessità di metodi analitici in grado di rilevare impurezze di nitrosammine problematiche al di sopra dei livelli di concentrazione bersaglio. La presente Nota applicativa descrive il metodo sensibile basato sull'utilizzo del sistema LC/TQ Ultivo Agilent, non solo per le sei nitrosammine elencate dall'agenzia statunitense Food and Drug Administration (FDA), ma anche per la rivelazione simultanea di altre sei impurezze nitrosamminiche potenzialmente mutageniche.

## Introduzione

L'annuncio del ritiro dei farmaci ARB Valsartan, Losartan e Irbesartan ha posto le impurezze N-nitroso al centro dell'attenzione degli enti regolatori, tra cui la FDA e l'Agenzia europea per i medicinali (EMA). Le impurezze di nitrosammine sono dei sottoprodotti che si formano in tracce durante i processi di produzione di tali farmaci. Queste impurezze sono classificate come probabili cancerogeni (ovvero impurezze potenzialmente genotossiche). Il metodo LC/MS descritto nella presente Nota applicativa è stato eseguito su un sistema LC/MS Ultivo a triplo quadrupolo. Presenta un'analisi completa di 12 composti nitrosamminici a limiti di rivelabilità molto bassi. Tutte le impurezze nitrosamminiche hanno un peso molecolare basso, compreso tra 74 e 158. Tra i composti vi sono:

- N-nitrosodimetilammina (NDMA)
- N-nitrosodietilammina (NDEA)
- Acido N-nitroso-4-metil-4-aminobutirrico (NMBA)
- N-nitrosoetilisopropilammina (EIPNA)
- N-nitrosodiisopropilammina (DIPNA)
- N-nitrosodibutilammina (NDBA)
- N-nitrosoetilmetilammina (NMEA)
- N-nitrosopirrolidina (NPyR)
- N-nitrosopiperidina (NPIP)
- N-metil-N-nitrosoanilina (NMPaA)
- N-isopropilmetil nitrosammina (NMIPA)
- N-*tert*-butil-N-etilnitrosammina

Composto nitrosamminico	Struttura chimica
NDMA	
NDEA	
NMBA	
EIPNA	
DIPNA	
NDBA	
NMEA	
NPyR	
NPIP	
NMPaA	
NMIPA	
N- <i>tert</i> -butil-N-etilnitrosammina	

## Condizioni sperimentali

### Prodotti chimici e reagenti

Tutti i 12 standard delle nitrosammine usati nello studio sono stati forniti da PS3 Labs LLP, Hyderabad, TS, India.

I solventi di grado LC/MS come metanolo e acqua sono stati acquistati presso Honeywell. L'acido formico usato per l'analisi è stato acquistato presso Fluka.

### Analisi dei dati

I dati sono stati acquisiti e analizzati utilizzando il software Agilent MassHunter versione 1.1 per il sistema Ultivo. Le transizioni MS/MS sono state ottenute e ottimizzate utilizzando il software di ottimizzazione Optimizer MassHunter Acquisition Agilent per determinare gli ioni precursori e ioni prodotto, voltaggi del fragmentor e energie di collisione ottimali durante l'iniezione di una soluzione pura (di ogni composto singolo a un livello di concentrazione di 1.000 ng/mL, volume di iniezione di 1 µL in modalità Flow Injection).

## Configurazione e parametri LC

Tabella 1. Configurazione e impostazioni UHPLC.

Parametro	Valore
Strumenti	Pompa High Speed Agilent 1290 Infinity II (G7120A) Multicampionatore Agilent 1290 Infinity II (G7167B) Termostato multicolumna Agilent 1290 Infinity II (G7116B)
Lavaggio dell'ago	Metanolo: Acqua: / 80:20
Diluyente del campione	Acqua
Temperatura del multicampionatore	6 °C
Volume di iniezione	40 µL
Colonna analitica	InfinityLab Poroshell HPH C18 Agilent, 2,1 x 100 mm, 1,9 µm (codice 695675-702)
Temperatura della colonna	40 °C
Fase mobile A	acido formico 0,2% in acqua
Fase mobile B	Metanolo
Flusso	0,4 mL/min
Gradiente	Tempo (min) %B 0 1 2 13 5,5 80 8 95 10 95
Tempo finale	10 minuti
Tempo post-analisi	3 minuti

## Configurazione e parametri dello spettrometro di massa a triplo quadrupolo

Tabella 2. Configurazione MS e impostazioni sorgente.

Parametro	Valore
Strumento	Spettrometro di massa Agilent Ultivo a triplo quadrupolo
Sorgente ionica	Ionizzazione chimica a pressione atmosferica (APCI)
Modalità MS/MS	Dynamic MRM (dMRM)
Modalità di ionizzazione	Positiva
Temperatura del Drying Gas	300 °C
Flusso del Drying Gas	6 L/min
Pressione del nebulizzatore	55 psi
Riscaldatore APCI	350 °C
Ago APCI positivo	4 µA
Tensione capillare, positiva	3.000 V
Risoluzione MS1/MS2	0,7/0,7 (unità/unità)
Dwell time	Variabile

## Informazioni composti MS/MS per analiti

**Tabella 3.** Impostazioni MRM dettagliate in modalità dynamic MRM in Ultivo.

Composto	lone precursore (m/z)	lone prodotto (m/z)	Tempo di ritenzione (min)	Finestra tempo di ritenzione (min)	Fragmentor (V)	Energia di collisione (V)	Polarità
NDEA	103,1	75,1	3,484	1,5	85	8	+
NDEA	103,1	47,1	3,484	1,5	85	16	+
NDMA	75,1	58	1,143	1,24	65	10	+
NDMA	75,1	43,1	1,143	1,24	65	17	+
NMBA	147,1	44,2	2,247	1,2	50	7	+
NMBA	147,1	87,2	2,247	1,2	50	7	+
EIPNA	117,1	75,1	4,325	1,0	70	7	+
EIPNA	117,1	47,1	4,325	1,0	70	15	+
DIPNA	131,1	89,1	4,916	1,0	50	5	+
DIPNA	131,1	43,1	4,916	1,0	50	7	+
NDBA	159,1	57,2	6,096	1,0	70	7	+
NDBA	159,1	41,1	6,096	1,0	70	24	+
NMEA	89,1	61,1	2,109	1,37	75	10	+
NMEA	89,1	43,1	2,109	1,37	75	10	+
NPYR	101,1	55,1	2,248	1,43	55	18	+
NPYR	101,1	41	2,248	1,43	55	26	+
NPIP	115,1	69,1	3,809	1,0	85	9	+
NPIP	115,1	41,2	3,809	1,0	85	26	+
NMPhA	137	66,1	5,029	1,32	45	18	+
NMPhA	137	107	5,029	1,32	45	10	+
NMIPA	103,1	61	3,358	1,0	60	8	+
NMIPA	103,1	43	3,358	1,0	60	8	+
N-tert-butil-N-etilnitrosammina	131	75,1	4,897	1,0	40	4	+
N-tert-butil-N-etilnitrosammina	131	57,1	4,897	1,0	40	6	+

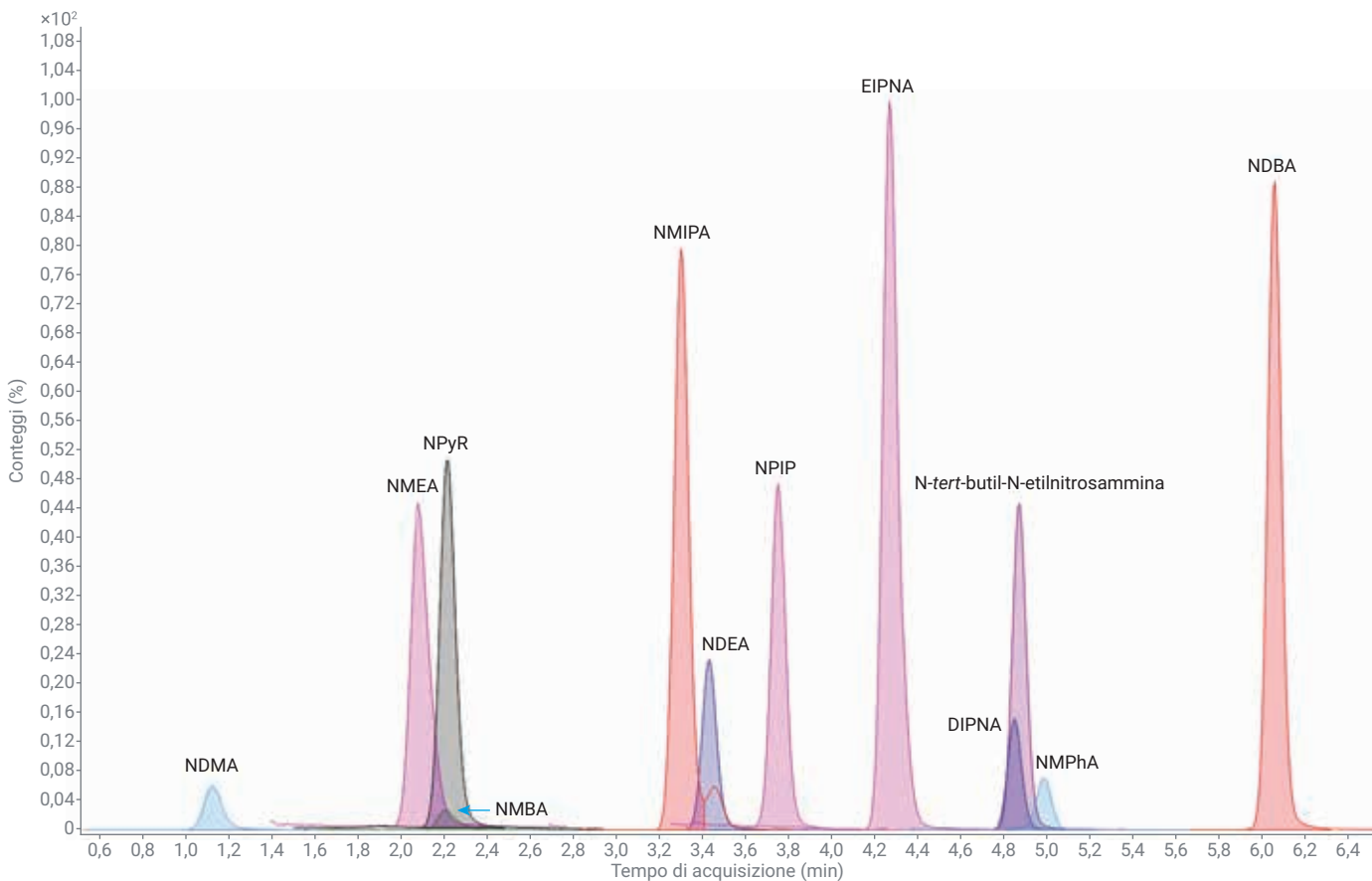
## Risultati e discussione

Le concentrazioni di calibrazione sono comprese tra 0,05 e 100 ng/mL, i cui dettagli sono specificati nella Tabella 4. I valori di  $R^2$  sono maggiori di 0,996 per tutti gli analiti, presentando risposte lineari per l'intero intervallo di concentrazione. La Figura 1 riporta il cromatogramma rappresentativo in dynamic MRM ottenuto con il sistema TQ Ultivo che mostra le eluizioni di tutti i 12 composti nitrosamminici a 10 ng/mL sovrapposte.

**Tabella 4.** Riepilogo dei risultati del sistema TQ Ultivo Agilent. I dati includono rapporto segnale/rumore (S/N), LOQ calcolato, coefficiente di regressione e interpolazione della curva di calibrazione. Per tutti gli standard è stata utilizzata una curva di calibrazione ponderata 1/x.

Composto	TQ Ultivo Agilent					
	LOD (ng/mL)	LOD (S/N)	LOQ (ng/mL)	LOQ (S/N)	$R^2$	Linearità (ng/mL)
NDMA	0,05	9,74	0,1	13,49	0,997	Tra 0,05 e 100
NDEA	0,025	22,68	0,05	53,82	0,998	Tra 0,025 e 100
NMBA	0,05	23,88	0,1	31,18	0,998	Tra 0,05 e 100
EIPNA	0,025	57,37	0,05	69,67	0,999	Tra 0,025 e 100
DIPNA	0,025	15,72	0,05	45,18	0,998	Tra 0,025 e 100
NDBA	0,05	225,18	0,1	323,11	0,999	Tra 0,025 e 100
NMEA	0,075	7,84	0,1	12,10	0,999	Tra 0,1 e 100
NPYR	0,075	30,02	0,1	41,72	0,999	Tra 0,1 e 100
NPIP	0,1	11,60	0,15	14,11	0,998	Tra 0,15 e 100
NMPHa	0,075	29,58	0,1	45,34	0,994	Tra 0,075 e 100
NMIPA	0,025	42,17	0,05	208,86	0,996	Tra 0,025 e 100
N-tert-butil-N-etilnitrosammina	0,075	54,92	0,1	81,62	0,999	Tra 0,075 e 100

\* S/N è stato calcolato usando l'algoritmo Auto-RMS, riferimento del rumore selezionato come campione utilizzando il software MassHunter Quantitative Agilent 10.



**Figura 1.** Cromatogramma sovrapposto dei tracciati in dynamic MRM che mostra l'eluizione di 12 composti nitrosamminici.

### Accuratezza e riproducibilità

Le curve di calibrazione per ciascuno dei 12 composti dimostrano un tasso di accuratezza entro il 20% del limite di concentrazione previsto al limite di quantificazione (LOQ). I limiti di rivelabilità, i limiti di quantificazione e le statistiche calcolate sono mostrati per l'intervallo di calibrazione lineare

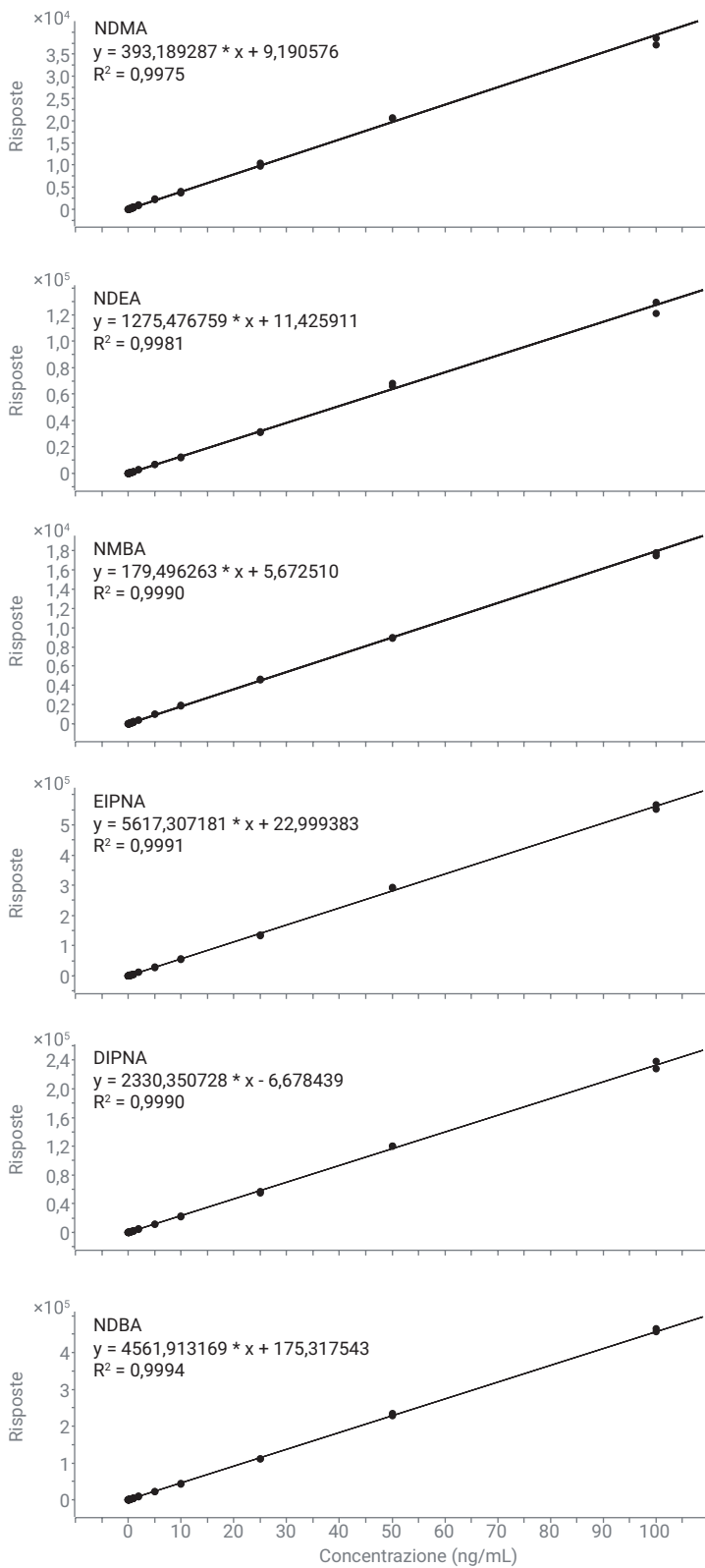
misurato fornito nella Tabella 4, dimostrando riproducibilità per tutti i punti di calibrazione con CV <15%. La Tabella 5 mostra un riassunto dettagliato di accuratezza e riproducibilità dei risultati a differenti livelli di concentrazione. La Figura 2 mostra le curve di calibrazione rappresentative generate con il sistema LC/TQ Ultivo.

**Tabella 5.** Accuratezza e riproducibilità per differenti livelli di concentrazione in LC/TQ Ultivo Agilent (n = 3).

Concentrazione (ng/mL)	NDMA		NDEA		NMBA		EIPNA		DIPNA		NDBA	
	Media	CV	Media	CV	Media	CV	Media	CV	Media	CV	Media	CV
0,1	95,53	5,63	96,23	5,78	84,73	0,00	96,37	5,82	107,9	9,01	99,63	6,47
0,25	102,47	2,79	98,53	4,77	95,53	4,31	101,43	5,16	101,6	3,59	105,53	3,60
0,5	100,00	2,68	98,53	2,15	105,67	1,15	95,30	3,15	95,30	1,06	95,77	2,07
1,0	104,27	4,70	99,47	1,22	105,67	1,80	98,47	4,59	97,63	3,88	95,77	2,39

Concentrazione (ng/mL)	NMEA		NPyR		NPIP*		NMPHA		NMIPA		N-tert-butil-N-etilnitrosammina	
	Media	CV	Media	CV	Media	CV	Media	CV	Media	CV	Media	CV
0,1	110,97	7,27	97,7	6,56	112,27	4,52	100,6	8,81	105,23	2,58	105,27	4,56
0,25	105,1	5,64	103,63	6,66	101,43	4,79	106,43	6,59	107,5	7,97	106,47	5,27
0,5	91,87	6,20	96,20	3,19	93,07	5,83	84,40	3,35	90,50	5,61	96,77	0,26
1,0	93,80	5,39	99,97	2,36	102,67	0,79	108,03	2,25	100,23	2,94	94,83	1,10

\* Per NPIP, la prima concentrazione è 0,15 ng/mL, non 0,1 ng/mL.



**Figura 2.** Curve di calibrazione rappresentative ottenute con LC/TQ Ultivo Agilent per i composti osservati sull'intero cromatogramma. Per tutte le curve di calibrazione è stato utilizzato un fattore di ponderazione 1/x.

## Conclusione

Il sistema LC/MS Ultivo Agilent a triplo quadrupolo è in grado di analizzare impurezze di nitrosammine a bassi livelli di concentrazione come richiesto dai requisiti normativi. Questa Nota applicativa dimostra la sensibilità del sistema LC/TQ Ultivo nella rivelazione di certe impurezze di nitrosammine a bassi livelli di concentrazione. Il metodo può essere utilizzato nella quantificazione di tali impurezze in prodotti farmaceutici ARB differenti che presentano delle alterazioni nelle condizioni cromatografiche, secondo il profilo di eluizione del farmaco.

## Bibliografia

1. <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-updates-and-press-announcements-angiotensin-ii-receptor-blocker-arb-recalls-valsartan-losartan>
2. Documento di orientamento della FDA: Development and validation of a RapidFire-MS/MS method for screening of nitrosamine impurities.
3. Documento di orientamento della FDA: Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) method for the determination of six nitrosamine impurities in ARB drugs.

## Ringraziamenti

Ringraziamo vivamente PS3 Labs LLP, Hyderabad, TS, India per averci fornito gli standard delle nitrosammine.

[www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)

Le informazioni fornite possono variare senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2019  
Stampato negli Stati Uniti, 20 settembre 2019  
5994-1383ITE