

Analyse von N-Nitrosodimethylamin und N-Nitrosodiethylamin mit dem Agilent 7697A Headspace-Probengeber, 8890/5977 GC/MSD-System

Verunreinigungsanalyse von Sartan-Arzneimitteln
gemäß den Richtlinien der US FDA

Autor

Abbey Fausett
Agilent Technologies, Inc.

Zusammenfassung

Diese Application Note beschreibt den Einsatz des Agilent 8890 GC zur Analyse von Verunreinigungen in sartanhaltigen Produkten nach einer Methode der United States Food and Drug Administration (US FDA). Der Arbeitsablauf umfasst zudem einen Agilent 7697A Headspace-Probengeber und ein 5977 GC/MSD. Die Ergebnisse entsprachen den erwarteten Detektionswerten.

Einführung

Hypertonie, oder Bluthochdruck, betrifft laut Weltgesundheitsorganisation zwischen 35 und 46 % der Erwachsenen über 25 Jahre.¹ Die Erkrankung betrifft über eine Milliarde Menschen weltweit.² Valsartan, Losartan und andere Angiotensin-II-Rezeptorblocker (ARBs) sind eine Art von Medikamenten, die allgemein zur Behandlung von Bluthochdruck verschrieben werden, da sie weltweit verfügbar und relativ preiswert sind. Der Mechanismus von ARBs besteht darin, den Bindungsprozess zwischen Angiotensin II und seinem Rezeptor zu hemmen, eine Gefäßverengung zu verhindern und den Blutdruck effektiv zu senken.³

Im Juli 2018 wurde eine weltweite Rückrufaktion für Valsartan-Produkte aufgrund eines Kontaminationsrisikos angekündigt. Die ursprüngliche Verunreinigung wurde als N-Nitrosodimethylamin (NDMA) identifiziert. Die US-Zulassungsbehörde FDA hat als Richtlinie für Produktionsanlagen ein Verfahren zum Screening von Valsartan-Produkten auf diese wahrscheinlich karzinogenen Verunreinigungen vor dem Inverkehrbringen herausgegeben.⁴ Eine zweite Verunreinigung wurde kurz nach dem Rückruf identifiziert und von der Europäischen Arzneimittelagentur bestätigt.⁵ N-Nitrosodiethylamin (NDEA), wie NDMA, ist als wahrscheinliches Karzinogen eingestuft und soll als Sekundärprodukt bei der Synthese des Tetrazolrings entstehen, der für Pharmazeutika der Sartan-Klasse typisch ist. Mit dieser neuen Verunreinigungsbestätigung und der Verknüpfung mit dem Tetrazolring wurde der anfängliche Rückruf erweitert, um alle Sartane in Produktion einzubeziehen. Nach den Berichten der Europäischen Arzneimittelagentur hat die US-Zulassungsbehörde FDA ein regulatorisches Folgeverfahren geschaffen, um beiden Verunreinigungen in einer einzigen Methode Rechnung zu tragen. Die Modifikationen umfassen eine Änderung des Zubereitungs-Lösungsmittels sowie eine andere GC-Säulenchemie.⁶ Dieses Dokument wurde im Januar 2019 veröffentlicht und legt die Werte für die Quantifizierungsgrenze (LOQ) für

NDMA und NDEA bei 0,10 bzw. 0,05 ppm fest, wobei GC/MS mit Headspace-Probenvorbereitungstechnik verwendet wurde, um sowohl die Arzneistoffsubstanz als auch das Endprodukt zu analysieren. Während das FDA-Verfahren auf einem Agilent 7890A GC durchgeführt wurde, zeigt diese Application Note, dass das Agilent 8890 GC-System die gleiche hervorragende Leistung erbringen kann wie das 7890-System.

Experimentelles

Die NDMA- und NDEA-Standards wurden über MilliporeSigma (Burlington, MA, USA) in reiner Form erworben. Die FDA-Richtlinie⁶ verlangt die Verwendung von 1-Methyl-2-pyrrolidinon (NMP) mit einer Mindestreinheit von 99,0 %. Die Verwendung eines Lösungsmittels mit höherer Reinheit (99,7 %, MilliporeSigma) führte jedoch zu einer verbesserten Trennung der Zielsubstanzen von Lösungsmittel-Verunreinigungen, wenn die vorgegebenen Bedingungen eingehalten wurden. Da dieses Analysenverfahren weltweit für weitere Regulierungsbehörden anwendbar ist, kann es vorkommen, dass die chromatographischen Parameter angepasst werden, um eine verbesserte Trennung zu erreichen, wenn Lösungsmittel geringerer Reinheit in der Probenvorbereitung eingesetzt werden. Für die in dieser Auswertung enthaltenen Daten wurde das FDA-Protokoll ohne Abweichung eingehalten.

Die Methodenbedingungen sind in den folgenden Tabellen zusammengefasst. Obwohl diese Arbeit mit einem schnellen GC-Ofen (240 V) durchgeführt wurde, ist diese Option nicht erforderlich, um diese Ergebnisse zu erhalten. Eine weitere Option, die bei der Entwicklung von Headspace-Methoden nützlich ist, ist das Zubehör für die Headspace-Transferlinie, das sowohl Headspace- als auch Flüssigkeitsinjektion am gleichen Einlass ermöglicht, ohne die Konfiguration zu ändern. Tabelle 1 enthält die für die Analyse verwendeten Verbrauchsmaterialien. Die Kalibrierlösungen wurden in Übereinstimmung mit der FDA-Richtlinie hergestellt, mit einem zusätzlichen Punkt bei 1 µg/ml.

Methodenparameter

Parameter des Agilent 7697A Headspace-Probengebers	
Ofentemperatur	130 °C
Schleifentemperatur	180 °C
Transferlinientemperatur	185 °C
Äquilibration der Probenflasche	15 Minuten
Injektionsdauer	1 Minute
Probenflaschengröße (ml)	20 ml
Schütteln der Probenflaschen	Stufe 5
Füllmodus	Standard
Fülldruck	15 psi
Füllmodus der Schleife	Standard

Agilent 8890 GC-Parameter	
Split/Splitless-Einlass	Helium
Temperatur	220 °C
Modus	Split
Splitverhältnis	5:1
Einlassdruck (Anfangsdruck)	7,33 psi
Ofentyp	Schneller 240-V-Ofen
Äquilierungszeit	1 Minute
Temperaturprogramm Ofen	0,5 Minuten bei 40 °C, 20 °C/min bis 160 °C, 10 °C/min bis 240 °C, Halten für 2 Minuten Gesamtzykluszeit: 16,5 Minuten
Säule	Agilent J&W DB-1701, 30 m × 250 µm, 1,0 µm
Modus	Konstanter Fluss
Fluss	1 ml/min

Agilent 5977 GC/MSD-Parameter	
Quellentyp	Extraktor
Quellentemperatur	230 °C
Massenfilter-Modus	Single Ion Monitoring (SIM)
NDMA m/z	74,00
NDEA m/z	102
Linsendurchmesser	6 mm
Temperatur des Quadrupols	150 °C
NDMA Dwell	150
NDEA Dwell	150

Tabelle 1: Für die Analyse verwendete Verbrauchsmaterialien.

Beschreibung	Bestellnummer
Headspace-Probenflaschen (20 ml)	5182-0837
Probenflaschenverschlüsse	5183-4477
GC-Liner	5190-2295
GC Septa	5183-4759
Säule DB-1701	122-0733
Extraktorlinse (6 mm)	G3870-20448

Ergebnisse und Diskussion

Die Trennungen waren ausreichend, und die Zielpeaks sind gut von Lösungsmittel- und Matrixspezies aufgelöst. Abbildung 1 zeigt ein Beispiel für ein Chromatogramm.

Die Retentionszeiten sind mit den in der FDA-Richtlinie festgelegten vereinbar. Die Abbildungen 2A und 2B zeigen Überlagerungen der drei niedrigsten Kalibrierungspunkte (0,025, 0,05 und 0,1 µg) für NDMA und NDEA.

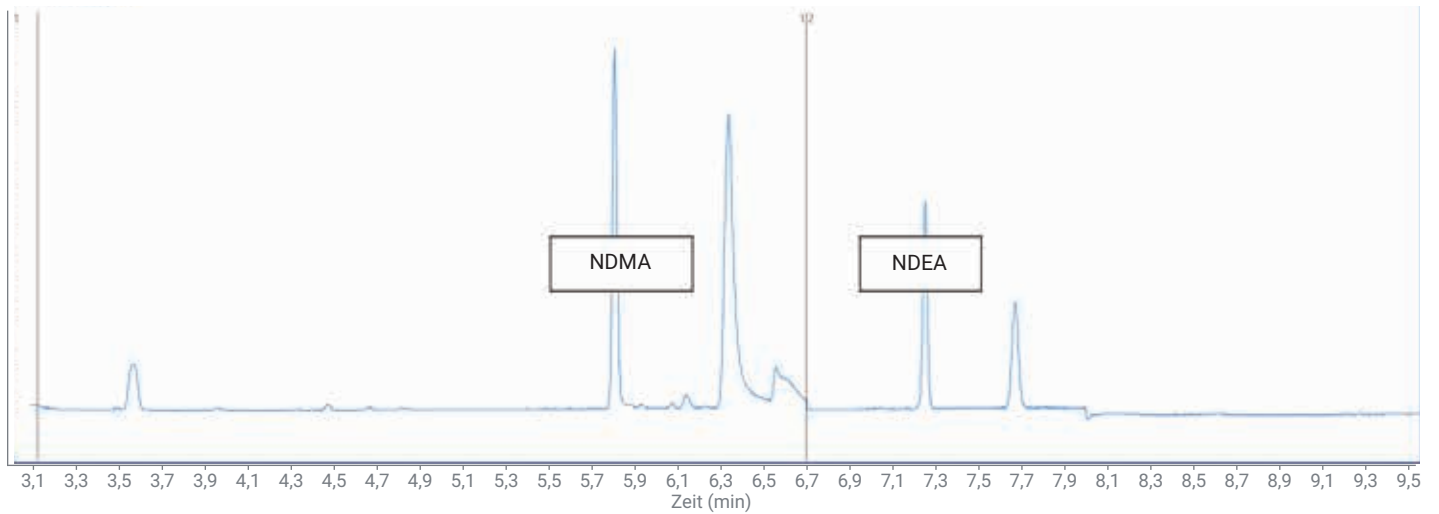


Abbildung 1: Generiertes Chromatogramm im Select-Ion-Modus einer 1-µg-Standardmischung von NDMA und NDEA in NMP. Die NDMA-Retentionszeit beträgt 5,80 Minuten und die NDEA-Retentionszeit 7,25 Minuten.

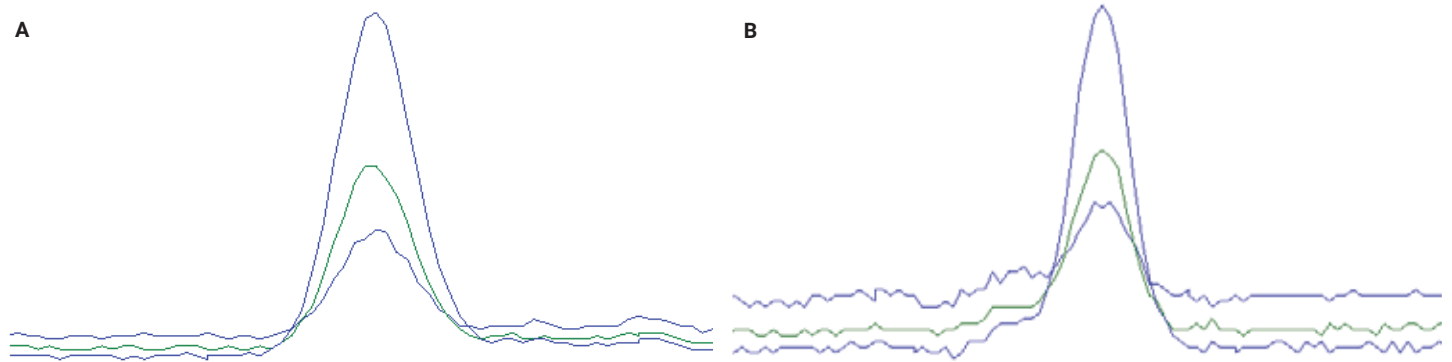


Abbildung 2: Überlagerungen von NDMA (A) und NDEA (B) an drei niedrigsten Kalibrierungspunkten.

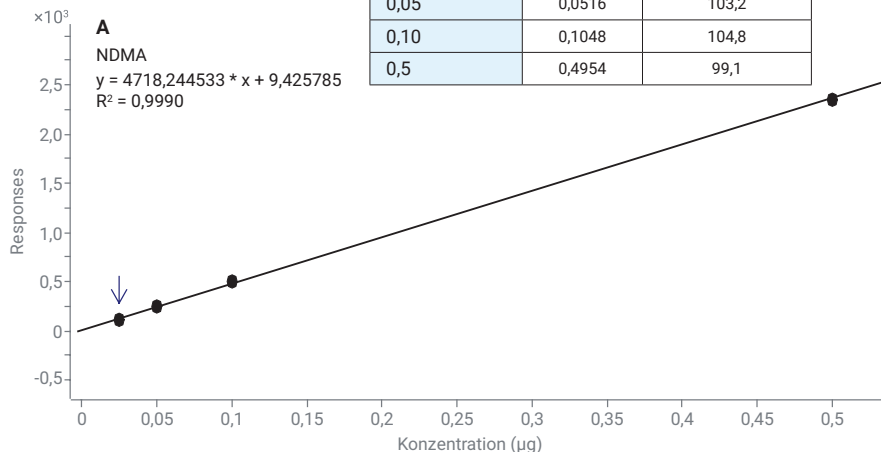
Zwei Kalibrierungskurven wurden mit der Agilent MassHunter Quantitative Analysis-Software erstellt. Da die Studien zur LOQ- und Nachweisgrenze (LOD) am unteren Ende der Kurve durchgeführt wurden, wurden die quantitativen Ergebnisse gegen eine Kalibrierungskurve zwischen 0,025- und 0,5-µg-Standards verarbeitet. Der gesamte Bereich der Kurve erstreckt sich von 0,025 bis 100 µg mit einer linearen Korrelation von besser als 0,995 bei inverser Gewichtung. Die Abbildungen 3A und 3B zeigen die Informationen über die Kalibrierungskurve bei niedrigen Konzentrationen, die mit diesem Gerät erhalten wurden. LOD ist definiert durch das Erfassen der kleinsten auf die Säule injizierten Menge, die mindestens ein Signal-Rauschen-Verhältnis von 3:1 aufweist. Bei NDMA- und NDEA-Kalibrierungen überschritt der niedrigste Punkt von 0,025 µg diese Vorgabe.

Nach dem Erstellen von Kalibrierungskurven für jede Verbindung wurden fünf Replikatstandards auf drei Konzentrationsniveaus im Bereich der Kurve analysiert. In Tabelle 2 sind die Ergebnisse dieser Auswertung der Reproduzierbarkeit zusammengefasst.

Die abschließende Auswertung der Methodenleistung war ein Spike- und Wiederfindungstest in Matrix. Die beiden niedrigsten Kalibrierungsstandards wurden in drei Probengefäße mit jeweils 500 mg gelösten Valsartan-Arzneitabletten gegeben, um auf die genannten LOQs abzielen. Eine Chargenprobe wurde analysiert, um nicht nachgewiesene Substanzen für NDMA- und NDEA-Verbindungen vor dem Spike- und Wiederfindungstest zu zeigen. Tabelle 3 enthält die Ergebnisse

NDMA-Kalibrierungsstatistiken

Standardmenge (µg)	Gefundene Menge (µg)	% Wiedergefunden
0,025	0,0235	92,9
0,05	0,0516	103,2
0,10	0,1048	104,8
0,5	0,4954	99,1



NDEA-Kalibrierungsstatistiken

Standardmenge (µg)	Gefundene Menge (µg)	% Wiedergefunden
0,025	0,0240	96,0
0,05	0,0499	99,8
0,10	0,1050	105,0
0,5	0,4961	99,2

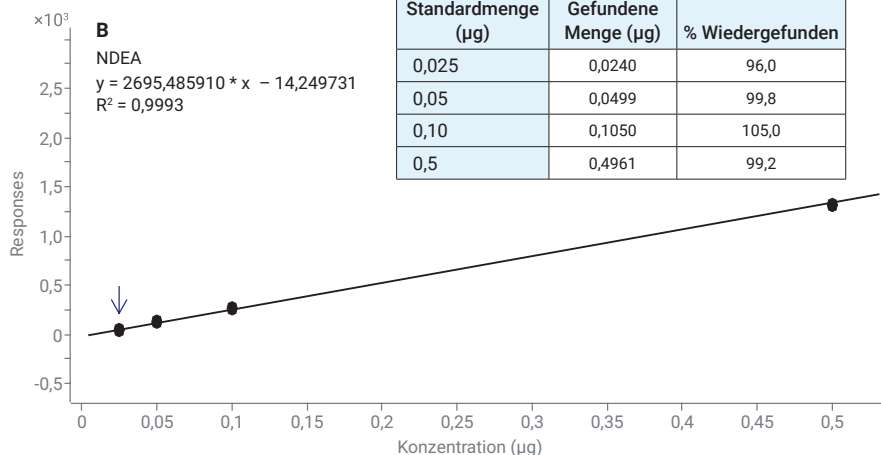


Abbildung 3: Lineare Regression, bestimmt für den unteren Kalibrierungsbereich und Genauigkeit der Kalibrierungsstandards nach der Verarbeitung gegen die Kalibrierungskurve.

Tabelle 2: Statistik zur Reproduzierbarkeit der Standards (n = 5).

	0,025-µg-Standard		0,05-µg-Standard		0,1-µg-Standard	
	NDMA	NDEA	NDMA	NDEA	NDMA	NDEA
Durchschnittlich gefundene Menge	0,0249	0,0248	0,0518	0,0506	0,1012	0,0988
% RSD	4,95	2,89	6,24	0,7	2,65	4,07

Tabelle 3: LOQ-Bestimmungen aus drei Replikatproben für NDMA- und NDEA-Zielsubstanzen.

	Ziel-LOQ	Durchschnittliche Wiederfindung	Durchschnittliche Wiederfindung
	1 ppm	0,05 ppm	0,10 ppm
NDMA	0,10	0,056	0,11
NDEA	0,05	0,057	0,11

Schlussfolgerung

Das Agilent 8890 GC führt die Tradition von robuster und reproduzierbarer Leistung fort, die für die sichere Untersuchung von Arzneimitteln erforderlich ist. Das 8890 GC in Verbindung mit dem Agilent 7697A Headspace-Probengeber und einem Agilent 5977 GC/MSD erfüllen die FDA-Richtlinien und erwarteten Nachweiswerte für die kritische Analyse von Verunreinigungen in sartanhaltigen Produkten.

Literatur

1. Global Health Observatory (GHO) data. https://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/blood_pressure_prevalence_text/en/ – Zugriff am 17. Juni 2019.
2. <http://www.bloodpressureuk.org/mediacentre/Newsreleases/1billionpeopleworldwidenowhavehighbloodpressure>.
3. Barreras, A.; Gurk-Turner, C. Angiotensin II Receptor Blockers. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* **2003**, *16*(1), 123–126. doi:10.1080/08998280.2003.11927893.
4. GC/MS Headspace Method for Detection of NDMA in Valsartan Drug Substance and Drug Products. *U.S. Food and Drug Administration*, FY18-176-DPA-S.
5. European Medicines Agency Report of NDEA.
6. Combined N-Nitrosodimethylamine (NDMA) and N-Nitrosodiethylamine (NDEA) Impurity Assay by GC/MS Headspace. *U.S. Food and Drug Administration*, FY19-005-DPA-S.

www.agilent.com/chem

Änderungen vorbehalten.

© Agilent Technologies, Inc. 2019
Gedruckt in den USA, 11. September 2019
5994-1132DEE

