

# Analisi della N-nitrosodimetilammina e della N-nitrosodietilammina utilizzando il campionatore per spazio di testa 7697A Agilent, sistema GC/MSD 8890/5977

Analisi di impurezze su medicinali contenenti sartani  
secondo la guida della FDA degli Stati Uniti

## **Autore**

Abbey Fausett  
Agilent Technologies, Inc.

## **Abstract**

La presente Nota Applicativa descrive l'utilizzo del sistema gascromatografico Agilent 8890 destinato all'analisi delle impurezze nei farmaci sartani conformemente al metodo della Food and Drug Administration (US FDA) degli Stati Uniti. Il flusso di lavoro include un campionatore per spazio di testa 7697A Agilent e un GC/MSD 5977. I risultati corrispondono ai valori di rivelazione previsti.

## Introduzione

Secondo l'Organizzazione mondiale della sanità, l'ipertensione, ovvero la pressione alta, colpisce tra il 35 e 46% degli adulti sopra i 25 anni.<sup>1</sup> Tale condizione clinica interessa oltre un miliardo di persone in tutto il mondo.<sup>2</sup> Il valsartan, il losartan e altri bloccanti del recettore per l'angiotensina II (ARB) sono tipi di farmaci comunemente prescritti per trattare l'ipertensione in quanto disponibili a livello mondiale e relativamente economici. Il meccanismo di azione degli ARB consiste nell'inibire il legame tra l'angiotensina II ed il suo recettore, prevenendo la costrizione dei vasi sanguigni e abbassando efficacemente la pressione sanguigna.<sup>3</sup>

Nel luglio del 2018 è stato annunciato il richiamo di medicinali contenenti Valsartan a causa del rischio di contaminazione. Un primo contaminante è stato identificato nella N-nitrosodimetilammina (NDMA). La Food and Drug Administration ha pubblicato una procedura per guidare gli impianti di produzione nello screening di medicinali contenenti valsartan allo scopo di individuare probabili impurezze cancerogene prima della distribuzione.<sup>4</sup> Un secondo contaminante è stato identificato poco dopo il ritiro del prodotto e confermato dall'Agenzia europea dei medicinali.<sup>5</sup> La N-nitrosodietilammina (NDEA), come l'NDMA, è classificata come probabile cancerogeno e si ritiene che sia generato come prodotto secondario durante la sintesi dell'anello tetrazolico comune ai preparati farmaceutici appartenenti alla classe dei sartani. Con la conferma di questa nuova impurezza e il legame con l'anello tetrazolico, il richiamo iniziale è stato ampliato a tutti i farmaci sartani in produzione. A seguito dei report presentati dall'Agenzia europea dei medicinali, la FDA statunitense ha creato una procedura di regolamentazione e di follow-up volta ad utilizzare un unico metodo per il trattamento di entrambi i contaminanti. Le modifiche includono dei cambiamenti nella preparazione del solvente unitamente ad una diversa chimica della colonna GC.<sup>6</sup> Questo documento è stato rilasciato nel gennaio

del 2019 ed ha stabilito dei valori relativi al limite di quantificazione (LOQ) della NDMA e della NDEA, rispettivamente di 0,10 e 0,05 ppm, utilizzando GC/MS con campionamento dello spazio di testa per analizzare sia la sostanza farmacologica che il prodotto finito. Mentre la procedura FDA è stata eseguita su un sistema GC Agilent 7890A, la presente Nota applicativa mostra la capacità del sistema gascromatografico Agilent 8890 di garantire le stesse ottime prestazioni del sistema 7890.

## Condizioni sperimentali

Gli standard NDMA e NDEA sono stati acquistati, allo stato puro, da MilliporeSigma (Burlington, MA, USA). La guida della FDA<sup>6</sup> richiede l'utilizzo dell'1-metil-2-pirrolidone (NMP) avente una purezza minima del 99,0%. Tuttavia, l'uso di un solvente con un grado di purezza superiore (99,7%, MilliporeSigma) ha portato a una migliore risoluzione dei composti target dalle impurezze del solvente qualora vengano soddisfatte le condizioni fornite. Poiché tale analisi può essere applicata ad ulteriori enti regolatori mondiali, vi può essere o meno flessibilità nei parametri cromatografici al fine di ottenere separazioni ottimizzate nel caso in cui solventi con un grado di purezza minore vengano impiegati nella preparazione del campione. Per i dati contenuti all'interno di questa valutazione, il protocollo FDA è stato seguito senza alcuna variazione.

Le condizioni del metodo sono riassunte nelle seguenti tabelle. Nonostante questo lavoro sia stato svolto su un forno GC veloce, questa opzione non è necessaria ai fini dell'ottenimento di tali risultati. Un'ulteriore opzione utile nello sviluppo dei metodi dello spazio di testa è l'accessorio per la transfer line dello spazio di testa, che consente sia lo spazio di testa che la capacità di iniezione del liquido sullo stesso iniettore senza modificarne la configurazione. La Tabella 1 contiene i prodotti di consumo utilizzati nell'esperimento. Le soluzioni di calibrazione sono state preparate in conformità alla guida della FDA, con un punto aggiuntivo preparato a 1 µg/mL.

## Condizioni del metodo

Condizioni del campionatore per spazio di testa Agilent 7697A	
Temperatura del forno	130 °C
Temperatura del loop	180 °C
Temperatura della transfer line	185 °C
Equilibratura del vial	15 minuti
Durata dell'iniezione	1 minuto
Dimensioni dei vial (mL)	20 mL
Agitazione del vial	Livello 5
Modalità di riempimento	Predefinito
Pressione di riempimento	15 psi
Modalità di riempimento del loop	Predefinito

Parametri del GC Agilent 8890	
Iniettore (split/splitless)	Elio
Temperatura	220 °C
Modalità	Split
Rapporto di splittaggio	5:1
Pressione in ingresso (iniziale)	7,33 psi
Tipo di forno	Forno veloce - 240 V
Tempo di equilibratura	1 minuto
Programmatura del forno	40 °C per 0,5 minuti, 20 °C/min fino a 160 °C, 10 °C/min fino a 240 °C, mantenimento per 2 minuti Tempo di analisi: 16,5 minuti
Colonna	Agilent J&W DB-1701, 30 m × 250 µm, 1,0 µm
Modalità	Flusso costante
Flusso	1 mL/min

Condizioni del GC/MSD Agilent 5977	
Tipo sorgente	Extractor
Temperatura sorgente	230 °C
Modalità di acquisizione della massa	Monitoraggio di singoli ioni (SIM)
NDMA m/z	74,00
NDEA m/z	102
Diametro lente	6 mm
Temperatura quadrupolo	150 °C
Dwell NDMA	150
Dwell NDEA	150

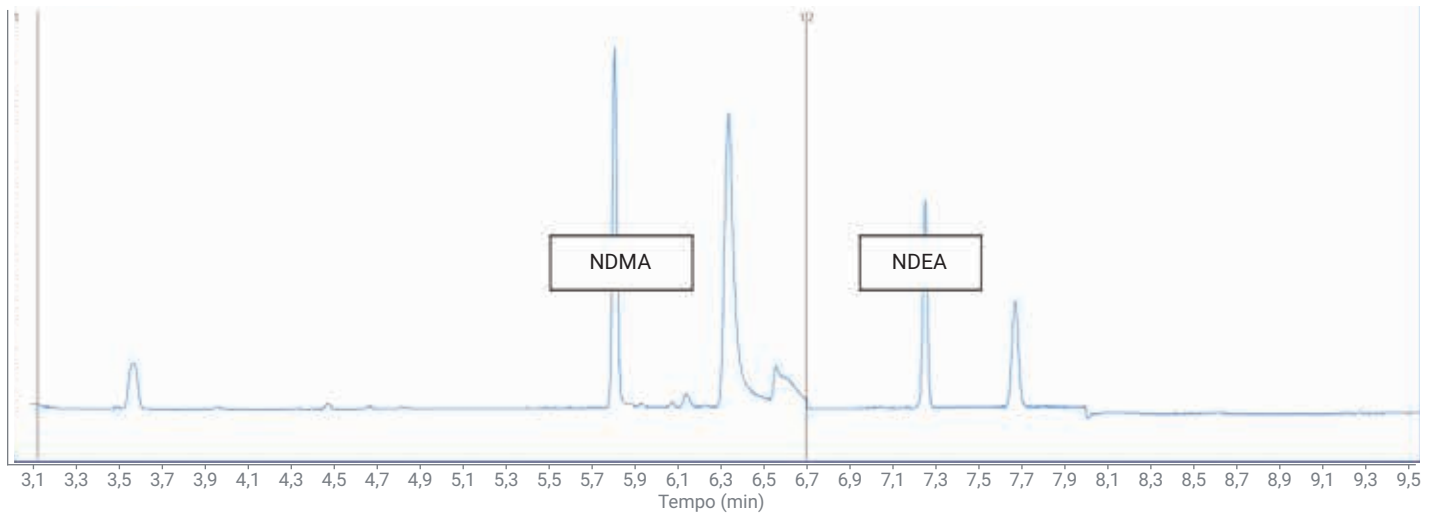
Tabella 1. Prodotti di consumo utilizzati nelle analisi.

Descrizione	Codice
Vial per spazio di testa (20 mL)	5182-0837
Tappi dei vial	5183-4477
Liner GC	5190-2295
Setti GC	5183-4759
Colonna DB-1701	122-0733
Lente di estrazione (6 mm)	G3870-20448

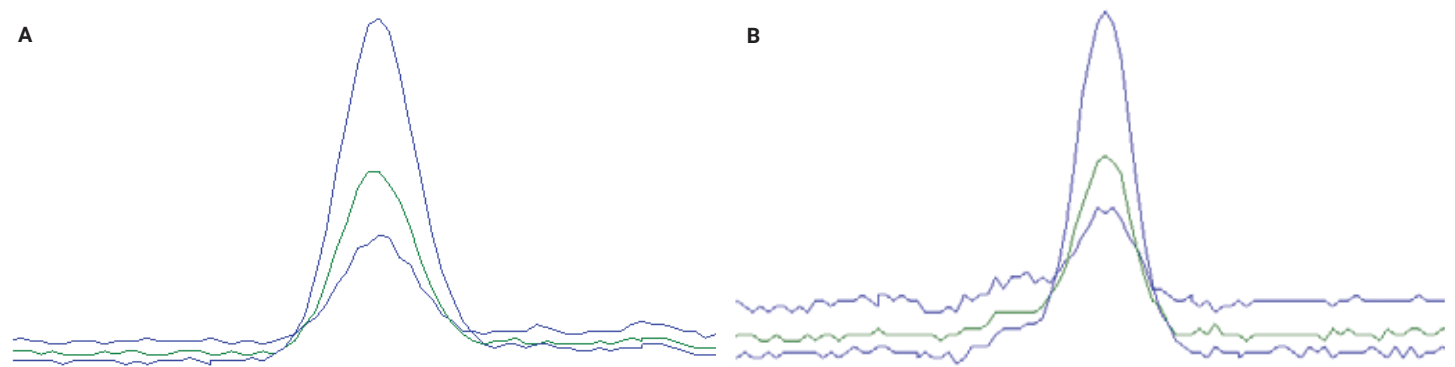
## Risultati e discussione

Le separazioni sono risultate sufficienti e i picchi di target ben risolti dalle sostanze presenti nel solvente e nella matrice. La Figura 1 mostra un esempio di cromatogramma.

I tempi di ritenzione corrispondono a quelli forniti nella normativa della FDA. Le Figure 2A e 2B mostrano delle sovrapposizioni dei tre punti di calibrazione più bassi (0,025, 0,05, e 0,1 µg) per NDMA e NDEA.



**Figura 1.** Cromatogramma generato in modalità SIM di una miscela standard da 1 µg di NDMA e NDEA in NMP. Il tempo di ritenzione della NDMA è di 5,80 minuti, mentre quello della NDEA di 7,25 minuti.

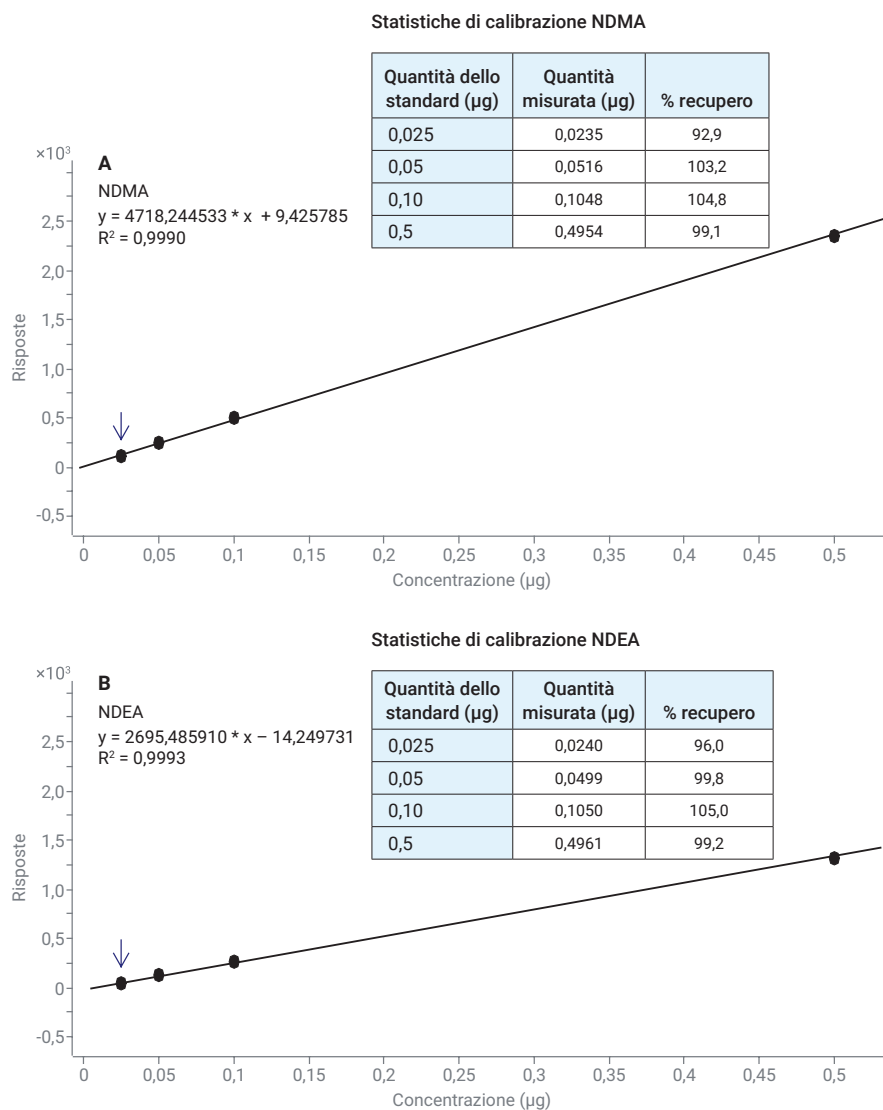


**Figura 2.** Sovrapposizioni di NDMA (A) e NDEA (B) sui tre punti di calibrazione più bassi.

Sono state generate due curve di calibrazione utilizzando il software di analisi quantitativa Agilent MassHunter. Considerando che gli studi sul limite di quantificazione (LOQ) e sul limite di rilevazione (LOD) sono stati condotti sull'estremità inferiore della curva, i risultati quantitativi sono stati elaborati rispetto ad una curva di calibrazione tra standard di 0,025 e 0,5 µg. La curva dell'intero intervallo si estende da 0,025 a 100 µg con una correlazione lineare superiore a 0,995 con ponderazione inversa. Le Figure 3A e 3B mostrano le informazioni sulla curva di calibrazione a basso livello relative a questo strumento. Il limite di rivelazione viene definito registrando la quantità minima iniettata sulla colonna avente un rapporto segnale-rumore di almeno 3:1. Nelle calibrazioni NDMA e NDEA, il punto più basso di 0,025 µg ha superato questa impostazione.

Dopo aver generato curve di calibrazione per ogni composto, sono stati analizzati cinque standard di replicati a tre livelli all'interno della curva. Nella Tabella 2 vengono riportati i risultati della suddetta valutazione di riproducibilità.

La valutazione finale sull'efficienza del metodo consiste in un test di aggiunta e recupero in matrice. I due standard di calibrazione più bassi sono stati aggiunti in tre vial, ciascuno dei quali conteneva 500 mg di compresse di valsartan disciolte, destinate ai LOQ citati. Un campione di un lotto è stato analizzato al fine di identificare gli elementi non rilevati per i composti NDMA e NDEA prima del test di aggiunta e di recupero. I risultati sono riportati nella Tabella 3.



**Figura 3.** Regressione lineare determinata per l'intervallo di calibrazione a basso livello e precisione degli standard di calibrazione dopo l'elaborazione rispetto alla curva di calibrazione.

**Tabella 2.** Statistiche per la riproducibilità degli standard (n = 5).

	0,025 µg Standard		0,05 µg Standard		0,1 µg Standard	
	NDMA	NDEA	NDMA	NDEA	NDMA	NDEA
Quantità media presente	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

**Tabella 3.** Accertamenti LOQ di tre campioni replicati per composti target NDMA e NDEA.

	Limite di quantificazione target	Recupero medio	Recupero medio
	1 ppm	0,05 ppm	0,10 ppm
NDMA	0,10	0,056	0,11
NDEA	0,05	0,057	0,11

## Conclusione

Il sistema GC Agilent 8890 aumenta il livello di prestazioni solide e riproducibili necessarie per uno screening sicuro di prodotti farmaceutici. Il sistema GC Agilent 8890 associato al campionatore per spazio di testa Agilent 7697A e a un GC/MSD Agilent 5977 è conforme alle direttive della FDA e ai valori di sensibilità previsti per l'analisi critica delle impurezze nei sartani.

## Bibliografia

1. Global Health Observatory (GHO) data. [https://www.who.int/gho/ncd/risk\\_factors/blood\\_pressure\\_prevalence\\_text/en/](https://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/blood_pressure_prevalence_text/en/) - Consultato il 17 giugno 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](http://www.agilent.com/chem)

Le informazioni fornite possono variare senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2019  
Stampato negli Stati Uniti, 11 settembre 2019  
5994-1132ITE

