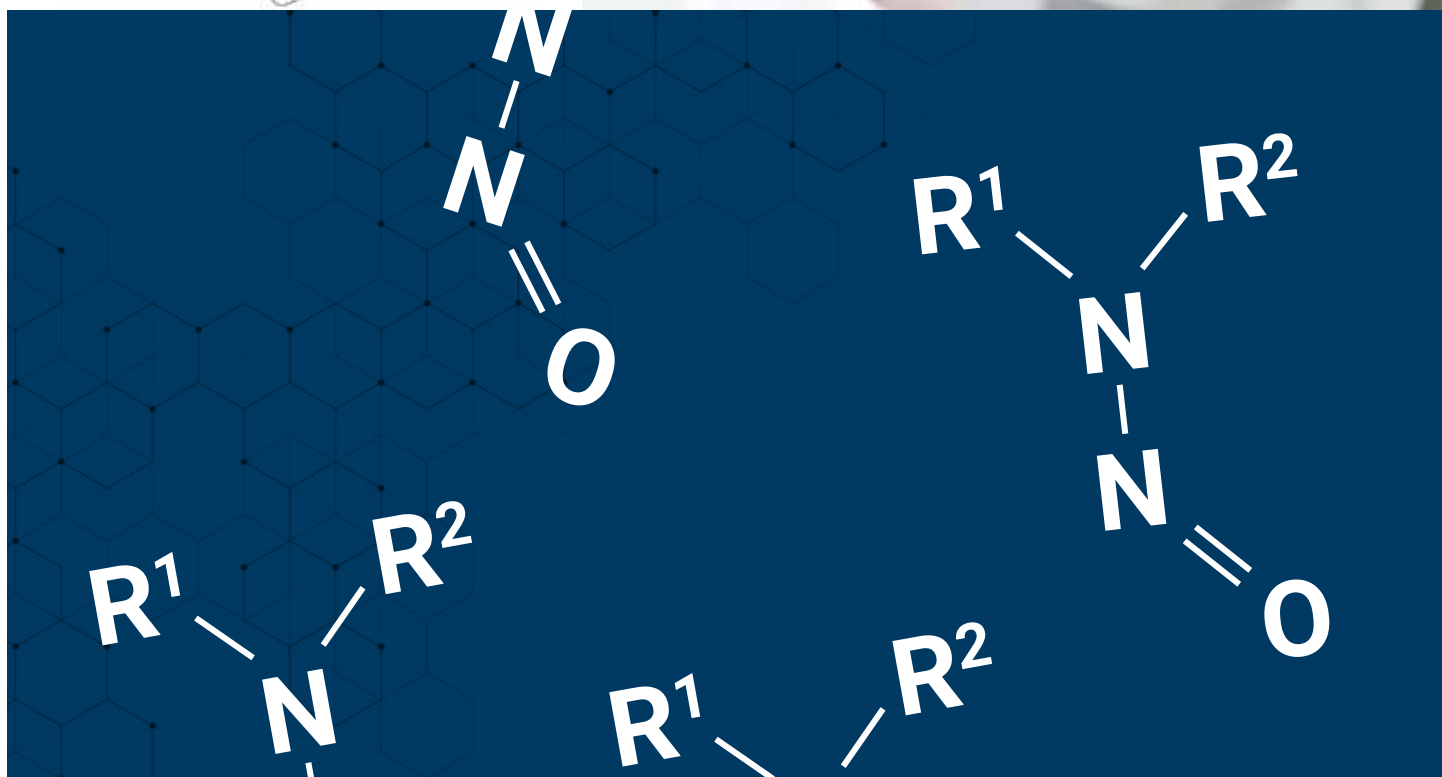


Analyse des nitrosamines dans les produits pharmaceutiques

Utilisation d'un LC/MS/MS triple quadripôle et d'un LC/MS quadripôle à temps de vol
Guide de commande de consommables



Les impuretés mutagènes dans les API et les produits pharmaceutiques créent un risque pour la santé et la sécurité, même en petites quantités, et constituent donc une source de préoccupation majeure pour les laboratoires pharmaceutiques. Les impuretés mutagènes peuvent endommager l'ADN, entraînant des mutations, voire un cancer. Les efforts visant à prendre en compte et à contrôler la présence d'impuretés mutagènes à l'état de traces sont une priorité pour les régulateurs du monde entier. Par conséquent, la FDA des États-Unis et d'autres organismes de réglementation ont pris des mesures pour traiter le problème des impuretés mutagènes dans les produits pharmaceutiques¹. La détection et la quantification de nitrosamines à l'état de traces dans les API et les produits pharmaceutiques peuvent s'avérer complexes, nécessitant l'utilisation d'outils avancés et sensibles pour satisfaire aux exigences réglementaires.

La liste des API et des produits pharmaceutiques devant faire l'objet d'une détermination des nitrosamines s'est étoffée au-delà des antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II (ARA II ou sartans) et comprend désormais la metformine, un antidiabétique oral, et des antagonistes des récepteurs H2 à l'histamine comme la ranitidine. C'est ce qu'indiquent les récents rappels de metformine par divers organismes de réglementation, dont la FDA des États-Unis, la Direction européenne de la qualité du médicament (EDQM) et la HSA (Health Sciences Authority), en raison de la présence de N-nitrosodiméthylamine (NDMA). Ces impuretés [N-nitrosodiméthylamine (NDMA), N-nitrosodiéthylamine (NDEA), N-nitrosodiiisopropylamine (NDIPA), N-nitrosoéthylisopropylamine (NEIPA) et N-nitrosodibutylamine (NDBA)] sont classées comme cancérigènes humains probables et soupçonnées d'être introduites dans les produits finis suite à des réactions chimiques survenant au cours du procédé de fabrication de l'API.

Ces impuretés peuvent être détectées soit à l'aide d'un GC/MS simple quadripôle (GC/MSD) ou d'un GC/MS/MS triple quadripôle (GC/TQ) (1), soit à l'aide d'un LC/MS/MS triple quadripôle (LC/TQ) ou d'un LC/MS quadripôle à temps de vol (LC/Q-TOF) (2-7). Les méthodes basées sur un LC/MS/MS sont généralement très spécifiques et très sensibles. Pour cette raison, ce type d'instrument a servi de base à la mise au point de méthodes pour détecter et quantifier les impuretés de nitrosamines dans les substances médicamenteuses et les produits pharmaceutiques tels que la metformine, le valsartan, le losartan et l'irbésartan.



Figure 1. De gauche à droite : LC 1260 Infinity II, LC/MS triple quadripôle 6470B, LC/MS Q-TOF iFunnel 6550 et LC/MS triple quadripôle Ultivo.

¹FDA des États-Unis : www.fda.gov/media/131868/download Conseil de l'Europe : www.edqm.eu/en/news/omcls-release-three-methods-determination-ndma-sartans Health Canada : healthycanadians.gc.ca/recall-alert-rappel-avis/hc-sc/2020/72963a-eng.php FDA de Taiwan : www.fda.gov.tw/ENG/siteList.aspx?sid=10360

Choix de la colonne

Le ligand pentafluorophényle (PFP) de la **colonne Agilent InfinityLab Poroshell 120 PFP** utilisée dans la méthode 2 (tableau 1) (8) offre l'avantage d'un mode de séparation orthogonale par rapport aux phases C18. Les phases PFP peuvent séparer des composés en fonction de petites différences de structure, de substitution et d'accès stérique aux groupements polaires. La sélectivité qui en résulte pour les isomères de position, les composés halogénés et les composés polaires est particulièrement utile pour analyser des mélanges complexes. Puisque la NDIPA et la NDPA sont des isomères de position, la colonne InfinityLab Poroshell 120 PFP est idéale pour effectuer cette séparation avec une grande *facilité d'utilisation*.

La **colonne InfinityLab Poroshell HPH-C18**, qui a été utilisée pour cette analyse dans la méthode 1 (tableau 1) (8), intègre une technologie de particules hybrides qui améliorent *la robustesse sur une large gamme de pH*, augmentant la durée de vie et diminuant les changements de colonne. Néanmoins, lors de l'utilisation de cette colonne, il est essentiel de suivre un solide processus de développement pour assurer la longévité, stabilité et fiabilité des méthodes. Étant donné que la rétention et la sélectivité des composés ionisables peuvent varier de manière importante en fonction du pH, il est désormais courant d'effectuer des analyses à pH faible, moyen et élevé lors du développement des méthodes. En plus d'optimiser les conditions de gradient nécessaires à la séparation des isomères de position NDIPA et NDPA, les paramètres MS/MS de l'instrument doivent également être optimisés pour obtenir une sensibilité maximale.

Configuration et paramètres LC

Tableau 1. Configuration et réglages UHPLC. Pour les détails de la méthode, voir référence 8.

Paramètre	Valeur							
	Méthode 1		Méthode 2					
Instruments	Pompe à haut débit Agilent 1290 Infinity II (G7120A) Multiéchantillonneur Agilent 1290 Infinity II (G7167B) Thermostat multicolonne Agilent 1290 Infinity II (G7116B) Détecteur à barrette de diodes Agilent 1260 Infinity (G1315C)		Pompe à haut débit Agilent 1290 Infinity II (G7120A) Multiéchantillonneur Agilent 1290 Infinity II (G7167B) Thermostat multicolonne Agilent 1290 Infinity II (G7116B) Détecteur à barrette de diodes Agilent 1260 Infinity (G1315C)					
Rinçage de l'aiguille	Méthanol:eau (80:20)		Méthanol:eau (80:20)					
Diluant d'échantillon	Eau:méthanol (95:5)		Méthanol					
Temp. du multiéchantillonneur	10 °C		10 °C					
Volume d'injection	20 µL		5 µL					
Colonne analytique	Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C18, 4,6 × 150 mm, 2,7 µm (réf. 693975-702(T))		Agilent InfinityLab Poroshell 120 PFP, 3,0 × 150 mm, 2,7 µm (réf. 693975-308)					
Temp. de colonne	40 °C		40 °C					
Phase mobile A	Acide formique à 0,1 % dans l'eau		Acide formique à 0,1 % dans l'eau					
Phase mobile B	Acide formique à 0,1 % dans le méthanol		Acide formique à 0,1 % dans le méthanol					
Débit	0,5 mL/min		0,5 mL/min					
Gradient	Temps (min)	% de A	% de B	Débit (mL/min)	Temps (min)	% de A	% de B	Débit (mL/min)
	0	95	5	0,5	0	95	5	0,5
	2	95	5	0,5	3	95	5	0,5
	7	40	60	0,5	14	40	60	0,5
	10	25	75	0,5	17	10	90	0,5
	11	10	90	0,5	19	10	90	0,5
	16,5	10	90	0,5	19,1	95	5	0,5
	16,6	95	5	0,5	22	95	5	0,5
	20,0	95	5	0,5				
	Fin d'analyse	20 minutes		22 minutes				
Longueur d'onde UV	230 nm		230 nm					

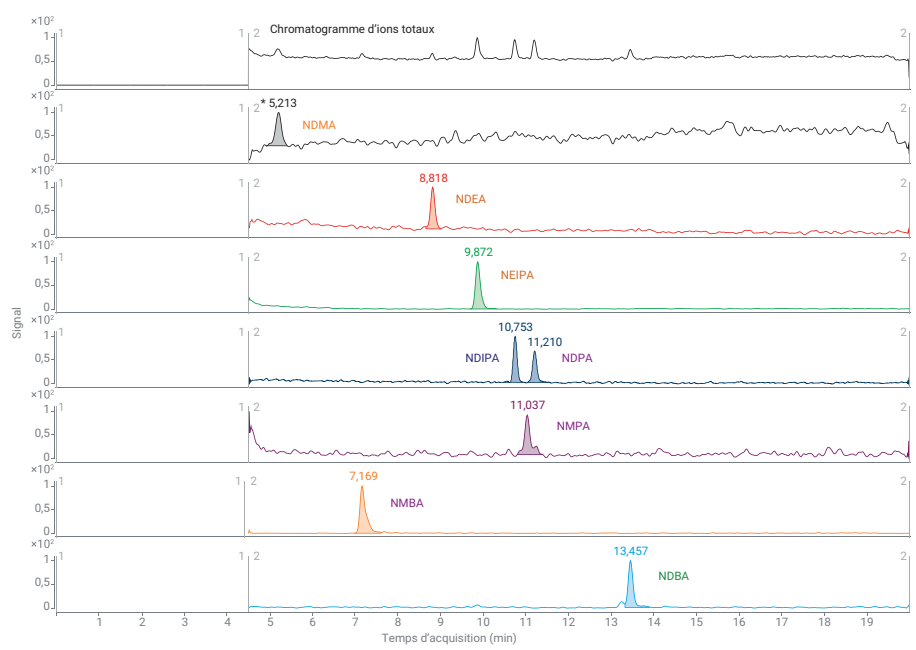


Figure 2. Chromatogramme MRM représentatif de toutes les impuretés de nitrosamines à 0,5 ng/mL obtenu suivant la méthode 1 (pour les détails de la méthode, voir référence 8).

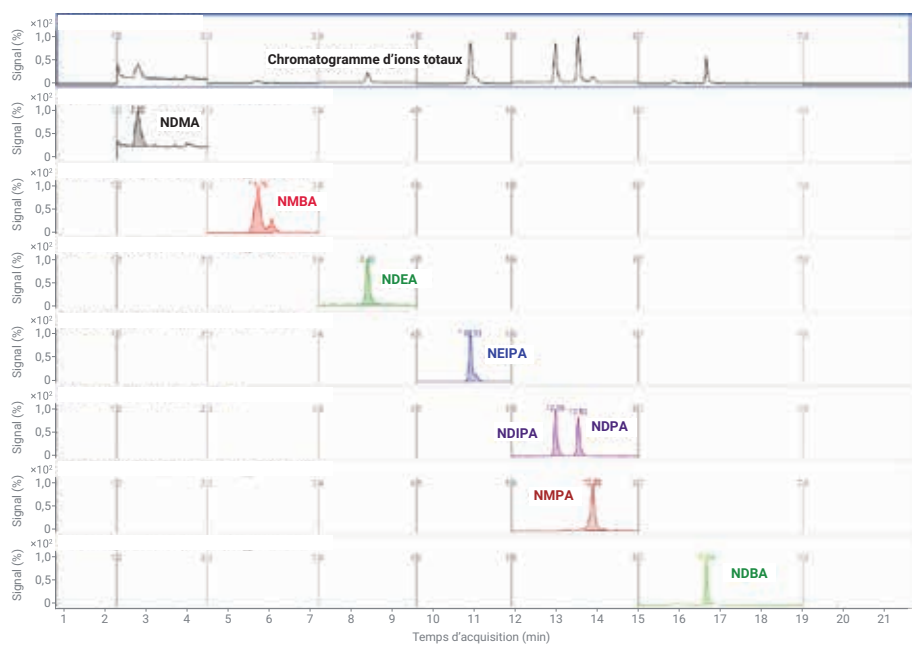


Figure 3. Chromatogramme MRM des huit impuretés de nitrosamines à 3 ng/mL obtenu suivant la méthode 2 (pour les détails de la méthode, voir référence 8).

Pour sélectionner et commander facilement

Ce guide contient des recommandations pour les produits Agilent utilisés dans cette analyse afin de vous permettre de trouver rapidement les produits que vous recherchez. Cliquez sur le lien MaListe* ci-dessous pour ajouter des articles dans la liste de vos « Produits favoris » dans la boutique en ligne d'Agilent. Ensuite, indiquez la quantité souhaitée pour les produits dont vous avez besoin. Votre liste d'articles sera disponible dans la rubrique « Produits favoris » pour faciliter vos futures commandes.

Cliquez sur [MaListe](#) pour télécharger tous les articles de ce tableau dans la liste de vos Produits favoris

Description du produit	Référence
Étalons de nitrosamines et solvants	
Étalons de nitrosamines (dans le chlorure de méthylène)	US-113N-1
MeOH InfinityLab Ultrapure LCMS	5191-4497
Eau InfinityLab Ultrapure LCMS	5191-4498
Acide formique, 5 mL	G2453-85060
Nitrosamine – Préparation d'échantillons	
Tubes à centrifugeuse de 15 mL avec bouchons, 50/pqt	5610-2039
Filtre économique Captiva Econofilter, membrane en PVDF, diamètre 13 mm, porosité 0,2 µm, 1 000/pqt	5190-5261
Filtre seringue Captiva Premium, membrane en PES, diamètre 15 mm, porosité 0,2 µm, 100/pqt (certifié LC/MS)	5190-5096¹
Filtre seringue Captiva Premium, membrane en nylon, diamètre 15 mm, porosité 0,2 µm, 100/pqt (certifié HPLC)	5190-5088²
Seringue jetable Captiva, 5 mL, 100/pqt	9301-6476
Seringue jetable Captiva, 10 mL, 100/pqt	9301-6474
Nitrosamine – Colonne LC	
InfinityLab Poroshell 120 PFP, 3,0 × 150 mm, 2,7 µm (recommandée)	693975-308
InfinityLab Poroshell 120 PFP, colonne de garde, 3,0 mm, 2,7 µm (recommandée)	823750-915
InfinityLab Poroshell HPH-C18, 4,6 × 150 mm, 2,7 µm	693975-702
InfinityLab Poroshell HPH-C18, 4,6 mm, 2,7 µm, garde UHPLC, 3/pqt	820750-922
Nitrosamine – Consommables LC	
Ensemble raccord rapide Quick Connect InfinityLab, 0,12 × 105 mm, pour raccord d'injecteur de colonne sur UHPLC	5067-5957
Ensemble raccord rapide Quick Connect InfinityLab, 0,17 × 105 mm, pour raccord d'injecteur de colonne sur UHPLC	5067-6166
Raccord rapide Quick Turn InfinityLab, pour sortie de colonne	5067-5966
Capillaire Quick Turn, 0,12 × 280 mm, pour le raccord de la colonne au détecteur	5500-1191
Kit de bouchon Stay Safe GL45 pour déchets avec 4 ports et bidon de 6 L pour collecte des déchets	5043-1221
Filtre à charbon avec indicateur de date pour récipient à déchets	5043-1193
Bouchon Stay Safe InfinityLab, kit de démarrage	5043-1222
Filtre d'entrée de solvant en inox, porosité 10 µm	01018-60025
Ensemble filtration de solvants InfinityLab comprenant entonnoir en verre (250 mL), support de membrane en verre, fiole en verre (1 L) et pince en aluminium	5191-6776³
Membrane en cellulose régénérée, 47 mm, 0,20 µm, 100/pqt	5191-4340³



Nitrosamines – Flacons et capsules	
Flacon, à visser, ambré, avec plage d'écriture, certifié, 2 mL, 100/pqt. Taille de flacon : 12 x 32 mm (capsule de 12 mm)	5182-0716
Capsule, à visser, verte, silicone/PTFE prépercé, 100/pqt. Taille de capsule : 12 mm	5183-2077
Insert de flacon, 250 µL, en verre désactivé avec pieds en polymère, 100/pqt 5	5181-8872
Nitrosamines – Consommables MS	
Kit de remplacement d'aiguille d'ionisation chimique à pression atmosphérique	G1946-68704
Aiguille d'ionisation chimique à pression atmosphérique	G1960-20030
Capillaire, changement rapide, 0,6 mm	G1960-80060



* C'est la première fois que vous utilisez « MaListe » ? Vous serez invité à entrer votre adresse e-mail pour la vérification de votre compte. Si vous possédez déjà un compte Agilent, vous pourrez vous y connecter. Dans le cas contraire, vous devrez vous inscrire pour en créer un. Cette fonctionnalité est valide uniquement dans les pays où le commerce en ligne est disponible. Tous les articles peuvent aussi être commandés auprès de vos circuits de vente et de distribution habituels.

1. Offrant des performances semblables au PVDF et présentant une faible absorption des protéines, cette membrane est idéale pour l'analyse des protéines. Disponible en plus petit nombre (100/pqt), elle est certifiée LC/MS.
2. Idéale pour les tâches de filtration usuelles. Ne doit pas être utilisée pour l'analyse des protéines. Disponible en plus petit nombre (100/pqt), elle est certifiée HPLC.
3. L'ensemble filtration de solvants et les membranes filtrantes associées ne sont pas recommandés pour une utilisation avec les solvants InfinityLab Ultrapure LC/MS.

Références

1. Nitrosamines analysis in pharmaceuticals using single quadrupole GC/MS and triple quadrupole GC/MS/MS: Consumables workflow ordering guide, Agilent publication ([5994-2979EN](#))
2. Nitrosamine Impurities Application Guide – Confidently detect and quantify mutagenic impurities in APIs and Drug Products ([5994-2393EN](#))
3. Determination of a Genotoxic NDMA Impurity Using the High-Resolution Agilent 6546 LC/Q-TOF in Ranitidine Drug Substance and Drug Products ([5994-1626EN](#))
4. Simultaneous Determination of Eight Nitrosamine Impurities in Metformin Using the Agilent 6470 Triple Quadrupole LC/MS ([5994-2286EN](#))
5. Determination of Nitrosamine Impurities Using the Ultivo Triple Quadrupole LC/MS ([5994-1383EN](#))
6. Determination of NDMA Impurity in Ranitidine Using the Agilent 6470 Triple Quadrupole LC/MS ([5994-1668EN](#))
7. Determination of Nitrosamine Impurities Using the High-Resolution Agilent 6546 LC/Q-TOF ([5994-1372EN](#))
8. Simultaneous Determination of Eight Nitrosamine Impurities in Metformin Extended-Release Tablets Using the Agilent 6470 Triple Quadrupole LC/MS ([5994-2533EN](#))

Étalons chimiques Agilent

Vous cherchez des étalons de haute qualité pour d'autres applications ? [Parcourez notre catalogue de 5 000 étalons chimiques](#) afin de trouver le meilleur étalon pour votre méthode ou application. Vous ne trouvez pas le bon étalon dans le catalogue ? Notre site web dispose également d'un outil d'établissement de devis pour les étalons à façon, afin de vous permettre de développer l'étalon répondant à vos besoins.

Outil de sélection LC Agilent

Vous cherchez une colonne LC adaptée à vos applications ? Utilisez [l'outil de sélection de colonne LC](#) pour choisir la colonne LC optimale.

Agilent CrossLab : une expertise réelle pour des résultats concrets

CrossLab va bien au-delà de l'instrumentation pour vous proposer des services, des consommables et une gestion des ressources à l'échelle du laboratoire, afin que vous puissiez améliorer l'efficacité, optimiser le fonctionnement, augmenter la disponibilité des instruments et développer les compétences des utilisateurs de votre laboratoire.

Pour en savoir plus sur
Agilent CrossLab et voir des exemples
d'excellents résultats obtenus grâce
aux conseils d'experts, rendez-vous sur

www.agilent.com/crosslab

Pour trouver un centre de service
client Agilent dans votre pays,
rendez-vous sur :

www.agilent.com/chem/contactus

Pour obtenir les réponses
à vos questions techniques
et accéder à des ressources
dans la communauté Agilent :

community.agilent.com

France

0810 446 446

customercare_france@agilent.com

États-Unis et Canada

agilent_inquiries@agilent.com

Europe

info_agilent@agilent.com

Asie et Pacifique

inquiry_lsca@agilent.com

Ces informations peuvent être modifiées sans préavis.

RA44239.5764236111

© Agilent Technologies, Inc. 2021
Publié aux États-Unis, le 10 mars 2021
5994-2977FR