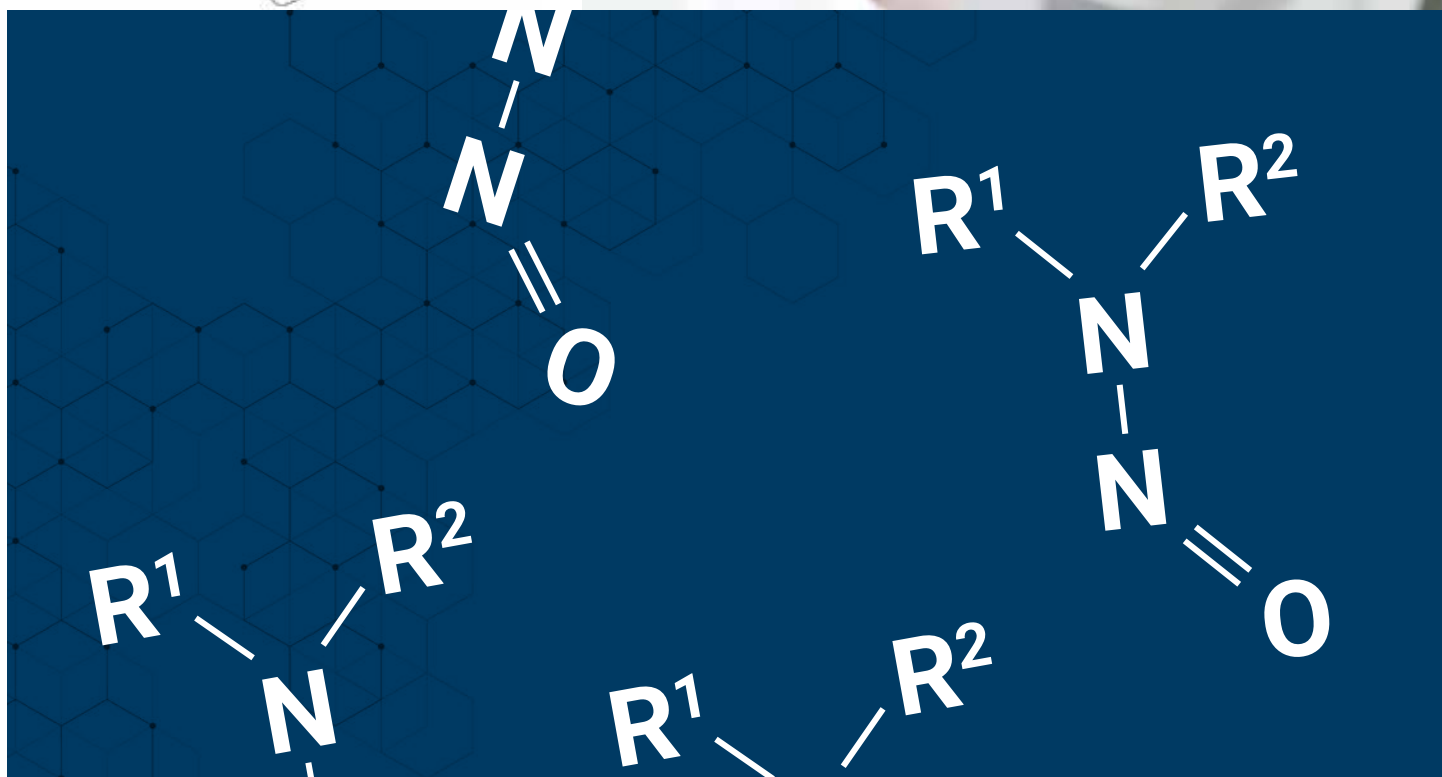


Analisi di nitrosammine nei farmaci

Con il sistema LC/MS/MS a triplo quadrupolo e il sistema LC/MS a quadrupolo time-of-flight

Guida per ordinare prodotti di consumo per il flusso di lavoro



Le impurezze mutagene nei principi attivi farmaceutici e nei farmaci comportano, anche in minime quantità, rischi significativi per la salute e la sicurezza e, pertanto, costituiscono un serio motivo di preoccupazione per i produttori di farmaci. Le impurezze mutagene possono danneggiare il DNA, dando luogo a mutazioni e potenzialmente al cancro. Gli enti regolatori di tutto il mondo guardano con particolare attenzione agli sforzi mirati a trattare e controllare la presenza a livelli di tracce di impurezze mutagene. Di conseguenza, l'FDA degli Stati Uniti e altri enti regolatori si sono mobilitati per affrontare il problema delle impurezze mutagene nei farmaci¹. Rivelazione e quantificazione delle nitrosammine in tracce nei principi attivi farmaceutici e nei farmaci possono essere complesse e richiedere l'uso di strumenti avanzati e sensibili per soddisfare i requisiti normativi.

L'elenco di principi attivi farmaceutici e farmaci per i quali è prevista la determinazione delle nitrosammine non comprende più soltanto i sartani bloccanti del recettore per l'angiotensina II (ARB) ma include anche la metformina (un farmaco per il diabete da assumere per via orale) e gli antagonisti del recettore dell'istamina-2 come la ranitidina. Ciò è evidente dai recenti ritiri della metformina ordinati da vari enti regolatori, quali la Food & Drug Administration (FDA) degli Stati Uniti, la Direzione europea della qualità dei medicinali e cura della salute (DEQM) e l'Health Sciences Authority (HSA), a causa della presenza di N-nitroso-dimetilammina (NDMA). Le seguenti impurezze: N-nitrosodimetilammina (NDMA), N-nitrosodietilammina (NDEA), N-nitrosodiiisopropilammina (DIPNA), N-nitrosoetilisopropilammina (EIPNA) ed N-nitrosodibutilammina (NDBA) sono classificate come probabili agenti cancerogeni per l'uomo e si ritiene che siano state introdotte nei prodotti finiti in seguito a reazioni chimiche che avvengono durante il processo di produzione dei principi attivi farmaceutici.

Queste impurezze possono essere rilevate con un sistema GC/MS a singolo quadrupolo (GC/MSD), un sistema GC/MS/MS a triplo quadrupolo (GC/TQ) (1), un sistema LC/MS/MS a triplo quadrupolo (LC/TQ) o un sistema LC/MS a quadrupolo time-of-flight (LC/Q-TOF)(2-7). I metodi basati sui sistemi LC/MS/MS in genere sono molto specifici e molto sensibili. Per questa ragione, sono serviti da punto di partenza per lo sviluppo di metodi mirati a rilevare e quantificare le impurezze nitrosamminiche nelle sostanze e nei prodotti farmaceutici quali la metformina, il valsartan, il losartan e l'irbesartan.



Figura 1. Da sinistra a destra: sistema LC 1260 Infinity II, sistema LC/MS a triplo quadrupolo 6470B, sistema 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS e sistema LC/MS Ultivo a triplo quadrupolo.

¹FDA degli Stati Uniti: www.fda.gov/media/131868/download Consiglio d'Europa: 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 di Taiwan: www.fda.gov.tw/ENG/site/list.aspx?sid=10360

Scelta delle colonne

Il ligando pentafluorofenil (PFP) della **colonna InfinityLab Poroshell 120 PFP** usata nel Metodo 2 (Tabella 1) (8) permette di utilizzare un meccanismo di separazione ortogonale con le fasi stazionarie C18. Le fasi PFP consentono di separare gli analiti in base a lievi differenze di struttura, sostituzione e accesso sterico ai gruppi polari. La selettività risultante nei confronti di isomeri di posizione, composti alogenati e analiti polari è particolarmente utile nel caso delle analisi di miscele complesse. Poiché DIPNA ed NDPA sono isomeri di posizione, la colonna InfinityLab Poroshell 120 PFP è la scelta ideale per questa separazione in considerazione della *facilità d'uso*.

La **colonna InfinityLab Poroshell HPH-C18**, anche utilizzata per questa analisi nel Metodo 1 (Tabella 1) (8), è dotata della tecnologia a particelle ibride che migliora la *robustezza delle particelle in un intervallo di pH più ampio*, prolungando la durata utile delle colonne e riducendo il numero di interventi di sostituzione delle stesse. Se si utilizza questa colonna, tuttavia, è fondamentale che il processo di sviluppo di metodi sia efficace per far sì che il metodo sia stabile, affidabile e di lunga durata. Poiché ritenzione e selettività dei composti ionizzabili possono variare significativamente al variare del pH, una prassi ormai consolidata prevede il ricorso ad analisi a pH basso, intermedio ed elevato nel corso dello sviluppo di metodi. Oltre a ottimizzare le condizioni del gradiente, per separare gli isomeri di posizione DIPNA ed NDPA è necessario ottimizzare anche i parametri MS/MS dello strumento per raggiungere la massima sensibilità.

Configurazione e parametri LC

Tabella 1. Configurazione e impostazioni UHPLC. Fare riferimento alla voce 8 nella bibliografia per ottenere informazioni dettagliate sul metodo.

Parametro	Valore							
	Metodo 1		Metodo 2					
Strumenti	Pompa High Speed Agilent 1290 Infinity II (G7120A) Multicampionatore Agilent 1290 Infinity II (G7167B) Termostato multicolonna Agilent 1290 Infinity II (G7116B) Rivelatore a serie di diodi Agilent 1260 Infinity (G1315C)		Pompa High Speed Agilent 1290 Infinity II (G7120A) Multicampionatore Agilent 1290 Infinity II (G7167B) Termostato multicolonna Agilent 1290 Infinity II (G7116B) Rivelatore a serie di diodi Agilent 1260 Infinity (G1315C)					
Lavaggio dell'ago	Metanolo:acqua (80:20)		Metanolo:acqua (80:20)					
Diluyente del campione	Acqua:metanolo (95:5)		Metanolo					
Temp. multi-campionatore	10 °C		10 °C					
Volume di iniezione	20 µL		5 µL					
Colonna analitica	Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C18, 4,6 x 150 mm, 2,7 µm (codice 693975-702(T))		Agilent InfinityLab Poroshell 120 PFP, 3,0 x 150 mm, 2,7 µm (codice 693975-308)					
Temp. della colonna	40 °C		40 °C					
Fase mobile A	Acido formico 0,1% in acqua		Acido formico 0,1% in acqua					
Fase mobile B	Acido formico 0,1% in metanolo		Acido formico 0,1% in metanolo					
Flusso	0,5 mL/min		0,5 mL/min					
Gradiente	Tempo (min)	% A	% B	Flusso (mL/min)	Tempo (min)	% A	% B	Flusso (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				
	Tempo finale	20 minuti		22 minuti				
Lunghezza d'onda UV	230 nm		230 nm					

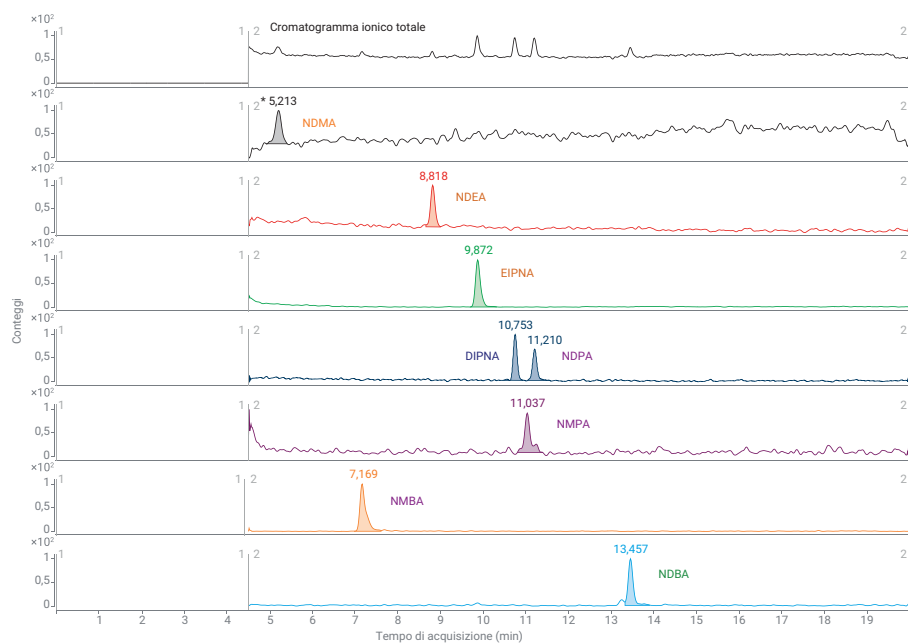


Figura 2. Cromatogramma MRM rappresentativo di tutte le impurezze nitrosamminiche a 0,5 ng/mL utilizzando il Metodo 1 (fare riferimento alla voce 8 nella bibliografia per ottenere informazioni dettagliate sul metodo).

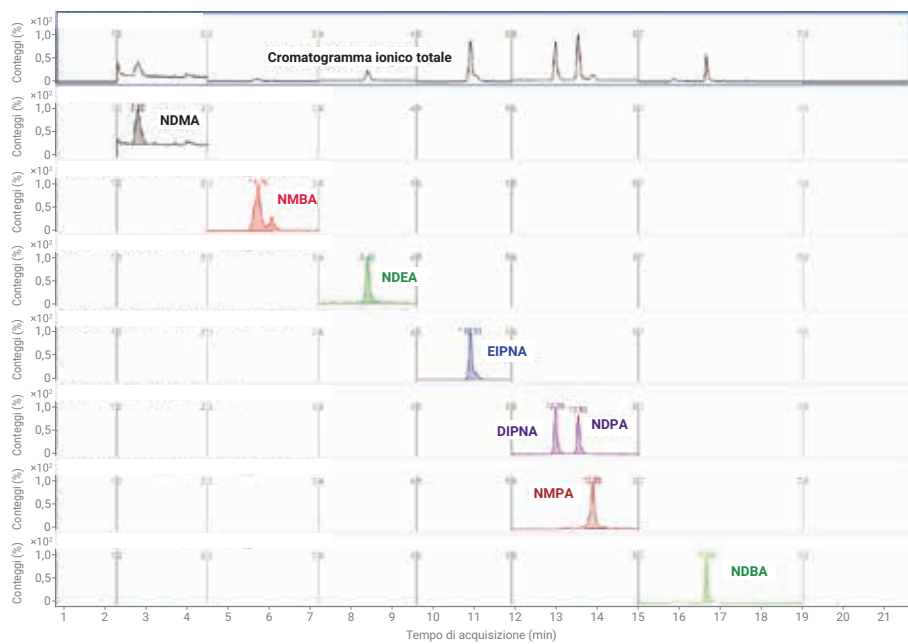


Figura 3. Cromatogramma MRM rappresentativo di tutte le otto impurezze nitrosamminiche a 3 ng/mL utilizzando il Metodo 2 (fare riferimento alla voce 8 nella bibliografia per ottenere informazioni dettagliate sul metodo).

Semplicità di scelta grazie alle informazioni per gli ordini

Questa guida fornisce indicazioni sui prodotti Agilent utilizzati in questa analisi per permetterti di trovare rapidamente ciò che stai cercando. Fai clic sul collegamento "Il mio elenco"* nell'intestazione che segue per aggiungere articoli al tuo elenco "Prodotti preferiti" in Agilent Online Store. Inserisci quindi le quantità per i prodotti di cui hai bisogno. L'elenco rimarrà tra i "Prodotti preferiti" in modo che tu possa disporre per gli ordini futuri.

Fai clic su [Il mio elenco](#) per scaricare tutti gli articoli della tabella nel tuo elenco **Prodotti preferiti**

Descrizione del prodotto	Codice
Standard di nitrosammine e solventi	
Standard di nitrosammine (in cloruro di metilene)	US-113N-1
Metanolo ultra puro per LC/MS InfinityLab	5191-4497
Acqua ultra pura per LC/MS InfinityLab	5191-4498
Acido formico, 5 mL	G2453-85060
Nitrosammine - preparazione del campione	
Tappi e tubi per centrifuga da 15 mL, 50/conf.	5610-2039
Econofilter Captiva, membrana in PVDF, diametro 13 mm, dimensioni pori 0,2 µm, 1.000/conf.	5190-5261
Filtri per siringa Captiva Premium, membrana in PES, diametro 15 mm, dimensione pori 0,2 µm, 100/conf. (certificazione LC/MS)	5190-5096¹
Filtri per siringa Captiva Premium, membrana in nylon, diametro 15 mm, dimensione pori 0,2 µm, 100/conf. (certificazione HPLC)	5190-5088²
Siringa monouso Captiva, 5 mL, 100/conf.	9301-6476
Siringa monouso Captiva, 10 mL, 100/conf.	9301-6474
Nitrosammine - colonna per LC	
InfinityLab Poroshell 120 PFP, 3,0 x 150 mm, 2,7 µm (consigliata)	693975-308
Precolonna InfinityLab Poroshell 120 PFP, 3,0 mm, 2,7 µm (consigliata)	823750-915
InfinityLab Poroshell HPH-C18, 4,6 x 150 mm, 2,7 µm	693975-702
Precolonna UHPLC InfinityLab Poroshell HPH-C18, 4,6 mm, 2,7 µm, 3/conf.	820750-922
Nitrosammine - prodotti di consumo per LC	
Gruppo InfinityLab Quick Connect, 0,12 x 105 mm, per collegamento all'ingresso colonna su UHPLC	5067-5957
Gruppo InfinityLab Quick Connect, 0,17 x 105 mm, per collegamento all'ingresso colonna su UHPLC	5067-6166
Raccordo Quick Turn InfinityLab, per uscita colonna	5067-5966
Capillare Quick Turn da 0,12 x 280 mm, per collegamento da colonna a rivelatore	5500-1191
Kit di tappo di scarico Stay Safe GL45 con 4 porte e contenitore di scarico da 6 L	5043-1221
Filtro a carbone con striscia time strip per contenitore di scarico	5043-1193
Tappo Stay Safe InfinityLab, kit di avvio	5043-1222
Filtro solvente in ingresso in acciaio inossidabile, dimensione pori 10 µm	01018-60025
Gruppo di filtrazione del solvente InfinityLab, include imbuto in vetro, 250 mL, base in vetro del supporto della membrana, matraccio in vetro da 1 L e morsetto in alluminio	5191-6776³
Membrana in cellulosa rigenerata, 47 mm, 0,20 µm, 100/conf.	5191-4340³



Nitrosammine - vial e tappi	
Vial, chiusura a vite, ambrato, etichetta scrivibile, certificato, 2 mL, 100/conf. Dimensioni del vial: 12 x 32 mm (tappo 12 mm)	5182-0716
Tappo, a vite, verde, pre-inciso in PTFE/silicone, 100/conf. Dimensione tappo: 12 mm	5183-2077
Inserito per vial, 250 µL, vetro disattivato con supporto polimerico, 100/conf.	5181-8872
Nitrosammine - prodotti di consumo per MS	
Kit di ricambio ago APCI	G1946-68704
Ago APCI	G1960-20030
Capillare, Fast Switching, 0,6 mm	G1960-80060



* È la prima volta che utilizzi "Il mio elenco"? In questo caso ti verrà richiesto di inserire il tuo indirizzo e-mail per la verifica dell'account. Se sei titolare di un account Agilent esistente, potrai eseguire l'accesso. Se ancora non disponi di un account Agilent registrato, dovrai [registrarne uno](#). Questa funzione è disponibile soltanto nei paesi in cui è abilitato l'e-commerce. Tutti gli articoli possono essere ordinati anche tramite i normali canali di vendita e distribuzione.

1. Con prestazioni simili al PVDF, questa membrana presenta un basso assorbimento di proteine ed è ideale per l'analisi delle proteine. Disponibile in confezione con meno unità (100/conf.) e dotata di certificazione LC/MS.
2. Ideale per le esigenze di filtrazione generica. Non deve essere usata per l'analisi delle proteine. Disponibile in confezione con meno unità (100/conf.) e dotata di certificazione HPLC.
3. Il gruppo di filtrazione del solvente e le relative membrane dei filtri non sono consigliati per l'uso con i solventi ultra puri per LC/MS InfinityLab.

Bibliografia

1. Nitrosamines analysis in pharmaceuticals using single quadrupole GC/MS and triple quadrupole GC/MS/MS: Consumables workflow ordering guide, pubblicazione Agilent ([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](#))

Standard chimici Agilent

Sei alla ricerca di standard di alta qualità per altre applicazioni? [Consulta il catalogo Agilent di 5000 standard chimici](#) per trovare lo standard ottimale per l'uso con un metodo, un'applicazione o un flusso di lavoro specifici. Non riesci a trovare lo standard giusto nel catalogo? Sul sito web Agilent è disponibile uno strumento automatizzato per l'offerta di standard personalizzati che ti aiuta a sviluppare lo standard in linea con le tue esigenze.

Strumento di selezione LC Agilent

Cerchi la colonna per LC più adatta alle tue applicazioni? Usa lo [strumento di selezione di colonne per LC](#) Agilent per selezionare la colonna ottimale per LC.

Agilent CrossLab: competenza reale, risultati concreti

CrossLab va oltre la strumentazione per fornirti servizi, prodotti di consumo e gestione delle risorse del laboratorio. Il tuo laboratorio può così migliorare l'efficienza, ottimizzare le operazioni, aumentare il tempo di operatività degli strumenti, sviluppare competenze degli utilizzatori e molto altro ancora.

Maggiori informazioni su Agilent CrossLab, oltre a esempi pratici che si traducono in ottimi risultati, sono disponibili all'indirizzo

www.agilent.com/crosslab

Per trovare un centro assistenza clienti Agilent nel tuo Paese:

www.agilent.com/chem/contactus

Ottieni risposte alle tue domande di natura tecnica e accedi alle risorse nell'Agilent Community:

community.agilent.com

Italia

numero verde 800 012 575

customercare_italy@agilent.com

Europa

info_agilent@agilent.com

Asia Pacifica

inquiry_lsca@agilent.com

Le informazioni fornite possono variare senza preavviso.

RA44239.5764236111

© Agilent Technologies, Inc. 2021
Pubblicato negli Stati Uniti, 10 marzo 2021
5994-2977ITE

Agilent
CrossLab
From Insight to Outcome

 **Agilent**
Trusted Answers