

# Nitrosamine mittels GC-MS/MS

## 1 Zweck und Anwendungsbereich

Die Prüfvorschrift dient zur Prüfung auf Nitrosamine mittels GC-MS/MS. Mit der Prüfvorschrift können die folgenden Nitrosamine in einer Konzentration von 15 ppb bestimmt werden:

Substanz	Abkürzung
N-Nitrosodimethylamine	NDMA
N-Nitrosodiethylamine	NDEA
Ethylisopropylnitrosamine	EIPNA
N-Nitroso-di-iso-propylamine	DIPNA
N-Nitroso-di-n-propylamine	DPNA
N-Nitroso-di-n-butylamine	DBNA (nur Gehaltsabschätzung)

Der Fokus der Methode liegt auf der Wirkstoffgruppe der Sartane, weshalb nur Sartan-Präparate (Valsartan, Losartan, Irbesartan, Olmesartan, Candesartan) validiert wurden. Bei anderen API oder Fertigprodukten müssen in-situ Validierungen mit dem Schwerpunkt Extraktion, Spezifität und Bestimmungsgrenze durchgeführt werden. Die Daten werden in der Beilage 31\_PV\_171\_B01 erfasst.

Für DBNA liefert die Methode ungenügende Wiederfindungen. In Falle einer Detektion von DBNA ist eine Quantifizierung über eine Standardaddition nötig (in-situ-Validierung).

## 2 Prinzip der Methode

Extraktion der mit Natronlauge gelösten APIs / Fertigprodukte mit Dichlormethan und anschließender GC-MS/MS Analyse im MRM-Modus.

## 3 Angaben zur Validierung

Siehe Validierungsbericht **31\_VA\_171 Nitrosamine mittels GC-MS/MS**

## 4 Grundlagen

- GC-MS Method for N-Nitrosodiethylamine (NDEA) in Losartan Potassium, Zhejiang Huahai Pharmaceutical (Literatur)

## 5 Definitionen und Abkürzungen

Siehe **Glossar OMCL**

Begriff / Abkürzung	Beschreibung	Ergänzung
API	Active Pharmaceutical Ingredient	Aktive pharmazeutische Wirkstoffe
MK	Messkolben	-
MRM	Multiple Reaction Monitoring	-
ISTD	Interner Standard	EMNA wird als ISTD verwendet.

Unterliegt nicht der Dokumentenlenkung  
(OMCL Swissmedic)  
Datum/Visum: 28.11.2019 / gs

## 6 Besondere Hinweise / Sicherheitshinweise

Nitrosamine sind potentiell kanzerogen. Es sind entsprechende Schutzvorkehrungen zu treffen.

## 7 Referenz- und Kontrollmaterial, Prüfeinrichtungen, Materialien, Chemikalien und Lösungen

### 7.1 Referenzmaterial

Bezeichnung	Gehalt / Reinheit	Herst./Lieferant / Art.-Nr. (z.B.)
N-Nitrosodimethylamine (NDMA)	99.9 %	Sigma / 442687
N-Nitrosoethylmethylamine (EMNA)	98.9 %	LGC / DRE-C15604000
N-Nitrosodiethylamine (NDEA)	97%	Toronto Research Chemicals / N525950
Ethylisopropylnitrosamine (EIPNA)	95%	MuseChem / M079119
N-Nitroso-di-iso-propylamine (DIPNA)	99%	LGC / DRE-C15604700
N-Nitrosodi-n-propylamine (DPNA)	99.9%	Sigma Aldrich / 48554
N-Nitrosodi-n-butylamine (DBNA)	99.8%	Sigma Aldrich / 442685

### 7.2 Kontrollmaterial

Nicht anwendbar

### 7.3 Prüfeinrichtungen und Materialien

Bezeichnung
0662A / GC-MS/MS (Agilent 7890B_7000D)

### 7.4 Chemikalien

Bezeichnung	Herst./Lieferant / Art.-Nr. (z.B.)
Dichlormethan	Merck / 1.06050.1000
Natronlauge 50%	Sigma Aldrich / 415413
Acetonitril	NeoFroxx / LC-5413.1
H <sub>2</sub> O MilliQ	OMCL

## 7.5 Lösungen

Bezeichnung Lösung	Herstellung	Haltbarkeit / Lager-Temp.
Nitrosamin-Stocklösungen	Von jedem Nitrosamin werden ca. 5 mg in je einen 10 mL MK eingewogen mit Methanol gelöst und auf 10 mL verdünnt. Von jedem Nitrosamin werden zwei Lösungen (1/2) hergestellt.	14 Tage / 25°C
Nitrosamin Mix 1 / 2	Von jeder Nitrosamin-Lösung 1 werden 200 µL in einen 10 mL Messkolben pipettiert und mit H <sub>2</sub> O MilliQ auf 10 mL verdünnt. Eine gleiche Mixlösung wird aus den Stock-Lösungen 2 hergestellt. Die Lösung 1 wird als 1mL Aliquote bei -20°C gelagert.	14 Tage / -20°C
Spiking Lösung A 1 / 2	300 µL des Nitrosamin Mix 1 werden mit H <sub>2</sub> O MilliQ ad 20 mL verdünnt. Die gleiche Lösung wird aus dem Nitrosamin Mix 2 hergestellt.	14 Tage / 25°C
Spiking Lösung B	300 µL des Nitrosamin Mix 1 werden mit H <sub>2</sub> O MilliQ ad 10 mL verdünnt.	14 Tage / 25°C
ISTD-Stock-Lösung	Ca. 5 mg EMNA werden in einen 10 mL MK eingewogen, mit Methanol gelöst und zur Marke aufgefüllt	14 Tage / 25°C
ISTD-Dil-Lösung	500 µL der ISTD-Stock-Lösung werden mit H <sub>2</sub> O MilliQ ad 10 mL verdünnt.	14 Tage / 25°C
1M NaOH-Lösung (ACN/ISTD)	52.6 mL NaOH 50% werden in einen 1L Messkolben gegeben und mit H <sub>2</sub> O MilliQ gelöst. Zu dieser Lösung werden 100 µL ISTD-Dil-Lösung und 50 mL ACN gegeben. Anschliessend wird die Lösung mit H <sub>2</sub> O MilliQ auf 1L verdünnt.	14 Tage / 25°C

Um Fehler bei der Einwaage oder der Verdünnung der Lösungen auszuschliessen wird die Spiking-Lösungen A im Duplikat hergestellt. Zum Vergleich der beiden Lösungen werden Blank Spikes mit je 200 µL Spiking-Lösung A (1) und Spiking Lösung A (2) hergestellt (Siehe Kapitel 9.1). Beide Lösungen werden jeweils 3-mal analysiert. Die Mittelwerte der Response (Fläche / Konzentration) der beiden 3-fach-Analysen dürfen nicht mehr als 5% voneinander abweichen.

## 8 Vorgehen

### 8.1 Probenaufarbeitung

Aus ca. 10 Tabletten wird ein Mischmuster erstellt. Es wird die Menge Mischmuster in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen eingewogen, die einer Wirkstoffmenge von ca. 250 mg entspricht. Es wird aber max. 1,5 g des Mischmusters eingewogen. Bei API-Mustern werden je 250 mg Wirkstoff eingewogen.

Die Einwaage wird mit 10 mL NaOH-Lösung versetzt und min. 5 min gut geschüttelt bzw. gevortext. Zu dieser Suspension werden 2.0 mL Dichlormethan gegeben und erneut für 5 min geschüttelt bzw. gevortext. Die Suspension wird min. 5 min bei ca. 10000 g zentrifugiert. Die wässrige Phase wird entfernt, damit die untere, organische Phase besser entnommen werden kann.

Für die Spikingprobe wird dieselbe Menge Mischmuster in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen eingewogen, mit Spiking-Lösung entsprechend der Limite (30 ppb im Falle der Sartane) versetzt und mit 10 mL Natronlauge ergänzt, suspendiert und wie oben beschrieben mit Dichlormethan extrahiert.

In jeder Messserie wird eine 3 Punkte-Linearität hergestellt. Die Aufarbeitung erfolgt analog der Musteraufarbeitung mit Spiking ohne Einwaage der Probe. In der Regel werden Konzentration von 50% / 100% / 200% der Limite (15 ppb, 30 ppb und 60 ppb im Falle der Sartane) für die Kalibration verwendet. Der 100% Kalibrationsstandard in wird in regelmässigen (ca. alle 5 Muster) Abständen als Check-Standard erneut analysiert.

Bei Nitrosamingehalten über der Limite müssen zusätzliche Analysen durchgeführt werden um das Resultat zu bestätigen. Dazu wird eine zusätzliche 3-fach Aufarbeitung des Musters durchgeführt. Falls der Nitrosamingehalt ausserhalb des kalibrierten Bereiches liegt, muss die Kalibriergerade entsprechend erweitert werden.

### 8.2 Beispielsequenz

Nach jeweils fünf Prüfmustern (spiked und unspiked) wird eine Blank Injektion gefolgt von der 100 % Linearitätslösung durchgeführt. Je nach Matrixbelastung durch die Prüfmuster können zusätzliche Blanks durchgeführt werden.

Beispiel:

- |                              |                |
|------------------------------|----------------|
| 1. Dichlormethan (DCM) Blank | 13. M-000004   |
| 2. Blank Extrakt             | 14. M-000004_S |
| 3. Lin 1 50%                 | 15. M-000005   |
| 4. Lin 2 100%                | 16. M-000005_S |
| 5. Lin 3 200%                | 17. DCM Blank  |
| 6. Blank Extrakt             | 18. Lin 2 100% |
| 7. M-000001                  | 19. DCM Blank  |
| 8. M-000001_S                | 20. M-000006   |
| 9. M-000002                  | 21. M-000006_S |
| 10. M-000002_S               | 22. M-000007   |
| 11. M-000003                 | 23. M-000007_S |
| 12. M-000003_S               |                |

### 8.3 Geräteparameter

#### GC-Parameter

Säule 1 (Inlet → EPC)	VF-624ms, 30m, 0.25 mm ID, 1.4 µm Film			
Säule 2 (EPC → MS)	Deactivated Fused Silica, 1.35m, 0.15 mm ID.			
Trägergas	Helium			
Fluss Säule 1	1.3 mL/min / Post run -1.57 mL/min			
Fluss Säule 2	1.45 mL/min / Post run 5.34 mL			
Injektortemperatur	250 °C			
Injektionsvolumen	3.0 µL (Draw Speed 75 µL/min, Viskosität Delay 7s)			
Pulse Pressure	40 psi für 0.5 min			
Purge Time	60 mL/min at 0.5 min			
Gas Saver	20 mL/min after 1.5 min			
Liner	Splitless, single taper with wool (Agilent 5183-4694)			
Ofen-Programm	Start Temp / °C	Heizrate / °C/min	End Temp / °C	Haltezeit / min
	40	0	40	0.5
	40	60	140	2
	140	20	180	0.5
	180	30	240	1.8
Post Run Ofen	280°C für 2.5 min			
Transfer Line	240°C			

#### MS-Parameter

Ion Source	Extractor Source
Source Temperatur	230°C
Quad Temperatur	150°C (beide)
Fixed Electron Energy	40 eV
Acquisition Type	MRM
Solvent Delay	4.5 min
Gain Factor	15
Collision Gas	Stickstoff / 1.5 mL/min
Quench Gas	Helium / 2.25 mL/min

## MRM Transitionen

Substanz	Q1	Resolution	Q2	Resolution	RT / min	RT Delta left	RT Delta Right	Dwell Time	CE
NDMA	74	Unit	44.1	Unit	4.766	0.25	0.25	199	5
NDMA	74	Unit	42.1	Unit	4.766	0.25	0.25	199	22
ENMA	87.9	Unit	71	Unit	5.509	0.4	0.4	199	5
ENMA	87.9	Unit	42.1	Unit	5.509	0.4	0.4	199	22
NDEA	102	Unit	85.1	Unit	6.201	0.25	0.25	199	3
NDEA	102	Unit	56	Unit	6.201	0.25	0.25	199	19
EIPNA	115.9	Unit	99.1	Unit	6.881	0.25	0.25	199	5
EIPNA	115.9	Unit	44.1	Unit	6.881	0.25	0.25	199	14
DIPNA	129.9	Unit	88.1	Unit	7.472	0.25	0.25	199	5
DIPNA	129.9	Unit	71	Unit	7.472	0.25	0.25	199	14
DPNA	129.9	Unit	113.1	Unit	7.999	0.25	0.25	199	1
DPNA	129.9	Unit	88	Unit	7.999	0.25	0.25	199	1
DBNA	157.9	Unit	141	Unit	9.67	0.25	0.25	199	1
DBNA	157.9	Unit	99.1	Unit	9.67	0.25	0.25	199	7

Durch die hohe Matrixlast bei einigen Proben (z.B. Candesartan) empfiehlt es sich den Liner und das Inlet nach grösseren Messserien oder bei Abnahme der Leistungsfähigkeit der Methode auszutauschen bzw. zu reinigen.

## 9 Auswertung

Für die Berechnung der Kalibriergeraden werden die Verhältnisse der Analytpeakflächen zur ISTD Peakfläche gegen die Konzentrationen der Analyten aufgetragen.

Mit den Resultaten der Proben werden die Analytkonzentrationen in der Probe und in der gespikten Probe berechnet. Die Berechnete Wiederfindung in der gespikten Probe muss zwischen 70% und 130% liegen.

Wird ein Nitrosamingehalt oberhalb der Limite nachgewiesen, so wird der Befund durch eine zusätzliche 3-fach Aufarbeitung bestätigt. Als finales Ergebnis wird der Mittelwert der 3-fach Aufarbeitung im LIMS eingetragen

Bei schlechten Wiederfindungen wird die Gehaltsbestimmung über eine Standardaddition durchgeführt. Die Standardaddition muss in-situ validiert werden.

## 10 Protokollierung

Wird die Limite von einem Prüfmuster nicht überschritten, so wird im **LIMS** „< {Limite} ppb“ protokolliert.

Beispiele:

< 30 ppb NDMA

< 30 ppb NDEA

Wird die Limite von einem Prüfmuster überschritten, so wird im **LIMS** „XX ppb“ protokolliert. Die Messunsicherheit wird in diesen Fällen berechnet und ausgewiesen.

Beispiele:

50 ppb NDMA

80 ppb NDEA

## 11 Qualitätskontrolle

- Keine signifikant störenden Signale in der Blank-Aufarbeitung
- Keine signifikant störende Koelution in den gespickten Musteraufarbeitungen
- S/N der gespickten Aufarbeitung mind. 10 für alle gespickten Nitrosamine
- Korrelation der Kalibriergeraden  $r > 0.995$
- Der 100% Check-Standard muss eine Wiederfindung von 70% – 130% aufweisen.
- Quantifier / Qualifier Ratios müssen mit den Werten der Standardlösungen verglichen werden.

## 12 Versionsübersicht

Versions-Nr.:	Anpassung Datum/Visum:	Änderung zur Vorversion:
01	19.11.2019 / cma	Erstellung für Öffentlichkeit