

# Limitenprüfung auf Nitrosamine mittels GC-MS

## 1 Zweck und Anwendungsbereich

Die Methode dient zur Prüfung der zulässigen Limiten von N-Nitrosodimethylamin und N-Nitrosodiethylamin in verschiedenen API. In Abhängigkeit des Prüfmusters kann es zu Koelutionen oder Problemen bei der Phasentrennung kommen. In diesem Fall ist die PV situativ anzupassen (chromatographische Bedingungen) und die Änderungen bezüglich des Einflusses auf die Validität zu beurteilen.

## 2 Prinzip der Methode

Je nach Wirkstoff werden zwei unterschiedliche Probenaufarbeitungen angewendet:

1. Lösen der API in Natronlauge und anschliessender Extraktion mit Dichlormethan
2. Lösen oder suspendieren der API in Dichlormethan

Anschliessend wird die Dichlormethan-Lösung mittels GC-MS im SIM Modus analysiert. Die 1. Probenvorbereitungsart wird z.B. für die Wirkstoffe Valsartan, Losartan und Olmesartan angewendet. Für die Wirkstoffe Irbesartan und Candesartan wird dagegen die 2. Probenvorbereitungsart verwendet.

## 3 Angaben zur Validierung

Siehe Validierungsbericht **31\_VA\_169 Nitrosamine mittels GC-MS VA**

## 4 Grundlagen

- GC-MS Method for N-Nitrosodiethylamine (NDEA) in Losartan Potassium, Zhejiang Huahai Pharmaceutical (Literatur)
- Combined Direct Injection N-Nitrosodimethylamine (NDMA) and N-Nitrosodiethylamine (NDEA) Impurity Assay by GC/MS, FDA (Literatur)

## 5 Definitionen und Abkürzungen

Siehe **Glossar OMCL**

Begriff / Abkürzung	Beschreibung	Ergänzung
API	Active Pharmaceutical Ingredient	Aktive pharmazeutische Wirkstoffe
EMNA	Ethylmethylnitrosamin	Kanzerogen / dient als ISTD
ISTD	Interner Standard	-
MK	Messkolben	-
NDEA	N-Nitrosodiethylamin	Kanzerogen
NDMA	N-Nitrosodimethylamin	Kanzerogen
SIM	Single Ion Monitoring	-

## 6 Mitgeltende Dokumente

Vorgaben siehe **BPM / Prozesse / Hilfsmittel** oder **LIMS / Methoden**

- **31\_VA\_169 Nitrosamine mittels GC-MS VA**

## 7 Besondere Hinweise / Sicherheitshinweise

NDMA, NDEA und EMNA sind potentiell kanzerogen. Es sind entsprechende Schutzvorkehrungen zu treffen.

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

### 8.1 Referenzmaterial

Bezeichnung	Gehalt / Reinheit	S-Nr. LIMS	Herst./Lieferant / Art.-Nr. (z.B.)
EMNA	97%	S-3616	Toronto Research Chemicals / N525950
NDEA	99.9 %	S-3482	Sigma / 442687
NDMA	98.9 %	S-3469	LGC / DRE-C15604000

### 8.2 Kontrollmaterial

Nicht anwendbar

### 8.3 Prüfeinrichtungen und Materialien

Bezeichnung	Info Protokollierung LIMS
HS-GC-MS/FID / 0662A GC-MS/MS (0486A)	E: Protokollierung bei Ergebnisse S: Protokollierung bei Substanzen
	E

### 8.4 Chemikalien

Bezeichnung	S-Nr. LIMS	Herst./Lieferant / Art.-Nr. (z.B.)
Dichlormethan	S-1803	Merck / 1.06050.1000
H <sub>2</sub> O MilliQ	S-2206	OMCL
Methanol	S-1712	AppliChem / 221091.1612
Natronlauge 50 %	S-1900	Sigma Aldrich / 415413

### 8.5 Lösungen

Bezeichnung Lösung	Herstellung
EMNA Stock Lösung	2.5 mg EMNA werden in einen 10 mL MK eingewogen und mit H <sub>2</sub> O MilliQ ad 10 mL verdünnt.
EMNA Dil 1	1000 µL der EMNA Stock-Lösung werden ad 10 mL mit H <sub>2</sub> O MilliQ verdünnt.
EMNA Dil 1 MeOH	100 µL der EMNA Stock-Lösung werden mit MeOH ad 10 mL verdünnt.
1 M NaOH mit + ISTD	26.3 mL NaOH 50 % werde in einen 500 mL MK gegeben und mit H <sub>2</sub> O MilliQ gelöst. Nach der Zugabe von 50 µL EMNA-Dil 1 Lösung wird die Lösung mit H <sub>2</sub> O MilliQ auf 500 mL verdünnt.
DCM + ISTD	200 µL EMNA Dil 1 MeOH werden in einen 100 mL MK pipettiert und mit Dichlormethan auf 100 mL verdünnt.
NDMA Stock-Lösung	5 mg NDMA werden in einen 10 mL MK eingewogen und mit H <sub>2</sub> O MilliQ ad 10 mL verdünnt.
NDMA Lösung 1	200 µL der NDMA Stock-Lösung werden in einen 10 mL MK pipettiert und mit H <sub>2</sub> O MilliQ ad 10 mL verdünnt.

Bezeichnung Lösung	Herstellung
NDMA Lösung 1 MeOH	200 µL der NDMA Stock-Lösung werden in einen 10 mL MK pipettiert und mit MeOH ad 10 mL verdünnt.
NDEA Stock-Lösung	5 mg NDEA werden in einen 10 mL MK eingewogen und mit H <sub>2</sub> O MilliQ ad 10 mL verdünnt.
NDEA Lösung 1	200 µL der NDMA Stock-Lösung werden in einen 10 mL MK pipettiert und mit H <sub>2</sub> O MilliQ ad 10 mL verdünnt.
NDEA Lösung 1 MeOH	200 µL der NDMA Stock-Lösung werden in einen 10 mL MK pipettiert und mit MeOH ad 10 mL verdünnt.
Spiking-Lösung (H <sub>2</sub> O oder MeOH)	Aus den beiden verdünnten Lösungen wird eine Spiking-Lösung hergestellt, damit, je nach zu prüfender Limite, ein praktikables Volumen dazu gespikt werden kann.

## 9 Vorgehen

### 9.1 Aufarbeitung

Es stehen zwei Probenaufarbeitungen zur Verfügung, die je nach zu analysierendem API gewählt werden können. Für jedes Prüfmuster wird eine ungespikte und eine mit der Limite von NDMA / NDEA gespikte Aufarbeitung durchgeführt.

#### 1. Lösen in Natronlauge

Es werden ca. 250 mg API in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen eingewogen. Die Differenz der Einwaagen für die gespikte und die ungespikte Aufarbeitung muss < 1 % betragen. Die Einwaage wird mit 10 mL Natronlauge 1 M + ISTD 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 5 min bei ca. 4000 g zentrifugiert. Die wässrige Phase wird entfernt, damit die untere, organische Phase besser entnommen werden kann. Sollte sich bei der Entnahme ein Teil der Feststoffe erneut suspendieren, so wird die abgetrennte organische Phase in einem Eppendorf-Vial erneut kurz zentrifugiert. Die klare organische Phase wird zur Analyse eingesetzt.

#### 2. Lösen / suspendieren in Dichlormethan

500 mg API werden in ein Zentrifugenröhrchen eingewogen. Die Differenz der Einwaagen für die gespikte und die ungespikte Aufarbeitung muss < 1 % betragen. Die Spiking-Probe wird mit der berechneten Menge Spiking-Lösung (ca. 100 µL), die ungespikte Aufarbeitung wird mit derselben Menge Methanol versetzt. Die Einwaage wird mit 5.0 mL DCM + ISTD versetzt und 5 min gut geschüttelt. Die Aufarbeitung wird für 5 min bei mind. 4000 g zentrifugiert. Die Lösung wird in ein Vial abgefüllt und analysiert. Falls keine klare Lösung vorhanden ist, kann ein Teil der Dichlormethan-Phase mittels Einwegspritze und Kanüle entnommen und durch einen Spritzenfilter (0.45 µm) in ein Vial filtriert werden. Die Einwaage kann je nach S/N der Analyten und Verfügbarkeit des Prüfmusters angepasst werden.

Zur Abschätzung der Wiederfindung und des Gehalts (nur zur Information) wird zu Beginn von jeder Sequenz eine 3-Punkte Linearitätsbestimmung (inkl. Blank), die den Bereich der gespikten Analyten in der Analysesequenz abdeckt, durchgeführt. Die Aufarbeitung erfolgt analog den gespikten Prüfmustern, aber ohne Mustereinwaage.

Bei Verhältnissen nahe der Grenze (>0.33 entspricht 50 % der Limite), siehe Kapitel 10.1 *Auswertung*) müssen zusätzliche Analysen durchgeführt werden um sicherzustellen, dass die Limite tatsächlich nicht überschritten wird.

- Zwei weitere ungespikte Aufarbeitungen
- Je eine Aufarbeitung mit 70 % bzw. 130 % der Einwaage der normalen Aufarbeitung
- zwei zusätzliche, mit der Limite gespikte, Aufarbeitung

## 9.2 Beispielsequenz

Nach jeweils drei 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 | 9. M-000002    |
| 2. Blank Extrakt             | 10. M-000002_S |
| 3. Lin 1 80%                 | 11. M-000003   |
| 4. Lin 2 100%                | 12. M-000003_S |
| 5. Lin 3 120%                | 13. DCM Blank  |
| 6. Blank Extrakt             | 14. Lin 2 100% |
| 7. M-000001                  | 15. DCM Blank  |
| 8. M-000001_S                | 16. M-000004   |

## 9.3 Geräteparameter

### GC-Parameter

Säule	VF-624ms, 30 m x 0.25 mm, 1.4 µm			
Trägergas	Helium			
Fluss	1.0 mL / min			
Injektortemperatur	250 °C			
Injektionstechnik	Pulsed Splitless (25 psi for 0.5 min)			
Injektionsvolumen	2.5 µL			
Run Time	17 min			
Ofen-Programm	Start Temp / °C	Heizrate / °C/min	End Temp / °C	Haltezeit / min
	40	0.0	40	0.5
	40	20	170	0
	170	30	280	6.33

### MS-Parameter

Ion Source	EI
Source Temperatur	230 °C
Quad Temperatur	150 °C
Fixed Electron Energy	70.3 eV
Acquisition Type	SIM
Solvent Delay	5 min
Trace Ion Detection	True
Gain Factor	5
SIM Segment 1 (NDMA)	Start Time 5 min, m/z 74, Dwell Time: 300
SIM Segment 2 (EMNA)	Start Time 6.3 min, m/z 88, Dwell Time: 300
SIM Segment 3 (NDEA)	Start Time 7.0 min, m/z 102, Dwell Time: 300

Die Methode wird über das Retention Time Locking (RTL) auf EMNA (ISTD) gelockt. Nach jeder Neuinstallation der Säule muss die Methode gelockt werden (EMNA 6.745 min). Wird eine neue Säule eingebaut, ist eine RTL-Kalibration (5 Injektion des Blank Extrakts bei folgenden Gasflüssen durchzuführen:

RTL Calibration Run	Flow / mL/min
1	0.8
2	0.9
3	1.0
4	1.1
5	1.2

## 10 Auswertung und Messunsicherheit

### 10.1 Auswertung

Zur Beurteilung des Prüfmusters werden die Peakflächen für NDMA und NDEA in der ungespiketen und gespikten Aufarbeitung verglichen. Ist das Verhältnis der Peakflächen kleiner als die Grenze von 0.50, so wird die Limite von NDMA und NDEA nicht überschritten (Unbedenklichkeitsschwelle).

Peakfläche(unsiked) / Peakfläche(spiked) < 0.50

Bei Verhältnissen nahe der Grenze (>0.33 entspricht 50 % der Limite) müssen zusätzliche Analysen durchgeführt werden um sicherzustellen, dass die Limite tatsächlich nicht überschritten wird.

Die Auswertung der zusätzlichen Experimente erfolgt nach folgendem Vorgehen.

#### Prüfung der Extraktion der Nitrosamine

Aus den ungespikten Probenaufarbeitung wird eine lineare Regression zwischen den Einwaagen und den Peakflächen berechnet. Ist der Korrelationskoeffizient  $r < 0.95$  funktioniert die Extraktion nicht mehr richtig und muss mit kleineren Einwaagen wiederholt werden. Liegt das Verhältnis spiked/unsiked bereits über 0.5, so kann auf die Reanalyse mit kleineren Einwaagen verzichtet werden, da trotz unvollständiger Extraktion die Limite bereits überschritten wird.

#### Prüfung der Limite

Die Peakflächen der beiden Aufarbeitungen von spiked und unsiked werden jeweils gemittelt und das Verhältnis gemäss der Formel Peakfläche(unsiked) / Peakfläche(spiked) berechnet. Die Einzelwerte dürfen nicht mehr als 10 % vom Mittelwert abweichen.

Für die finale Beurteilung der Probe wird nur die Mehrfachaufarbeitung verwendet. Die erste Analyse dient zur groben Abschätzung.

#### Bestimmung der Wiederfindung und Abschätzung des Gehalts (nur zur Information)

Über die 3-Punkte Linearität wird die Wiederfindung in der gespikten Probe berechnet. Liegt die Wiederfindung im Bereich von 80 % - 120 % kann über die 3-Punkte Linearität der Gehalt der Analyten abgeschätzt werden. Liegt die Wiederfindung ausserhalb dieser Limite, so liegen nicht vernachlässigbare Matrixeffekte vor und der Gehalt muss bei Bedarf über eine Standardaddition abgeschätzt werden.

### 10.2 Messunsicherheit

Entfällt für eine Limitenprüfung bzw. Gehaltsabschätzung (zur Information).

## 11 Protokollierung

Die Anforderungen an die Protokollierung sind in den entsprechenden Prozessvorgaben zu diesem Thema enthalten. Nachfolgend sind, falls erforderlich, PV-spezifische Beschreibungen zur Protokollierung aufgeführt.

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** „> {Limite} ppb,“ protokolliert. Die Gehaltsabschätzung wird nur falls vorhanden und vom Kunden gewünscht im **LIMS** unter Bemerkungen eingetragen.

Beispiele:

> 30 ppb NDMA

> 30 ppb NDEA

## 12 Qualitätskontrolle

- Keine signifikant störenden Signale in der Blank-Aufarbeitung
- Keine signifikant störende Koelution in den gespickten Probenaufarbeitungen
- RT für NDMA ca. 5.9 min, RT für EMNA ca. 6.7, RT für NDEA ca. 7.4 min
- S/N der gespickten Aufarbeitung mind. 10 für beide Signale (NDMA / NDEA)

## 13 Versionsübersicht

Versions-Nr.:	Anpassung Datum/Visum:	Änderung zur Vorversion:
01	10.07.2019/mes	Erstellung