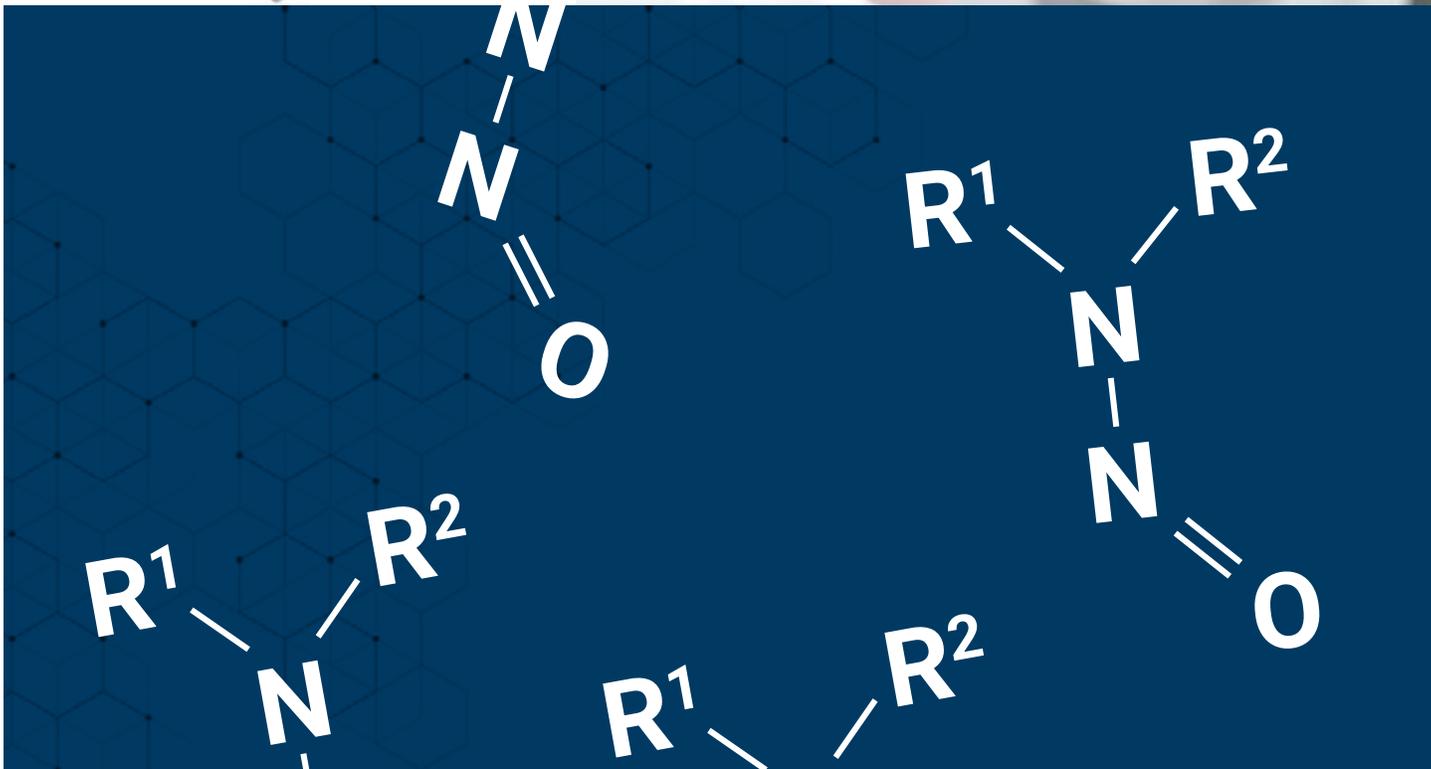


Análise de nitrosaminas em fármacos

Usando o LC/MS/MS triplo quadrupolo e o LC/MS do tipo quadrupolo-tempo de voo
Guia de pedidos para o fluxo de trabalho de consumíveis



Impurezas mutagênicas em IFAs e medicamentos representam um risco significativo para a saúde e a segurança, mesmo em pequenas quantidades, e por isso, são uma grande preocupação para os fabricantes de medicamentos. As impurezas mutagênicas podem danificar o DNA, ocasionando mutações e potencialmente câncer. Os esforços para abordar e controlar a presença de resíduos de impurezas mutagênicas são uma grande preocupação para os reguladores a nível mundial. Como resultado, o FDA dos EUA e outras agências reguladoras tomaram medidas para resolver o problema da presença de impurezas mutagênicas em fármacos¹. A detecção e quantificação de nitrosaminas residuais em IFAs e medicamentos pode ser desafiadora, exigindo o uso de ferramentas avançadas e sensíveis para atender aos requisitos regulatórios.

A lista de IFAs e medicamentos para determinação de nitrosamina se ampliou além dos medicamentos Sartan bloqueadores dos receptores da angiotensina II (ARB), e inclui metformina, um medicamento oral para tratar diabetes, e antagonistas do receptor da histamina 2, como a ranitidina. Isso pode ser evidenciado pelas recentes retiradas de metformina do mercado por vários órgãos reguladores, como a Food & Drug Administration (FDA) dos EUA, a Direção Europeia da Qualidade do Medicamento e dos Cuidados de Saúde (EDQM) e a Health Sciences Authority (HSA) devido à presença de N-nitrosodimetilamina (NDMA). Essas impurezas: N-nitrosodimetilamina (NDMA), N-nitrosodietilamina (NDEA), N-nitrosodi-isopropilamina (NDIPA), N-nitrosoetilisopropilamina (NEIPA) e N-nitrosodibutilamina (NDBA) são classificadas como prováveis causadoras de câncer em humanos e acredita-se que estejam presentes nos produtos acabados devido a reações químicas que ocorrem durante o processo de fabricação do IFA.

Essas impurezas podem ser detectadas usando um GC/MS de quadrupolo simples (GC/MSD), um GC/MS/MS triplo quadrupolo (GC/TQ)(1), um LC/MS/MS triplo quadrupolo (LC/TQ) ou um LC/MS do tipo quadrupolo-tempo de voo (LC/Q-TOF) (2-7). Os métodos baseados no LC/MS/MS são geralmente muito específicos e altamente sensíveis. Por esse motivo, serviram de base para o desenvolvimento de métodos para detectar e quantificar impurezas de nitrosamina em fármacos e medicamentos, como metformina, valsartana, losartana e irbesartana.



Figura 1. Da esquerda para a direita: Sistema LC 1260 Infinity II, LC/MS triplo quadrupolo 6470B, LC/MS Q-TOF 6550 iFunnel e LC/MS triplo quadrupolo Ultivo.

¹FDA dos EUA: www.fda.gov/media/131868/download, Conselho da Europa www.edqm.eu/en/news/omcls-release-three-methods-determination-ndma-sartans, Ministério da Saúde do Canadá: 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

Opções de coluna

O ligante pentafluorofenila (PFP) na **coluna InfinityLab Poroshell 120 PFP** usada no Método 2 (Tabela 1) (8) fornece um mecanismo de separação ortogonal com fases estacionárias C18. As fases de PFP podem separar analitos de acordo com pequenas diferenças em estrutura, substituição e acesso estérico a componentes polares. A seletividade resultante para isômeros posicionais, compostos halogenados e analitos polares é especialmente útil ao analisar misturas complexas. Como a NDIPA e a NDPA são isômeros posicionais, a coluna InfinityLab Poroshell 120 PFP é a coluna recomendada ideal para essa separação devido à *facilidade de uso*.

A **coluna InfinityLab Poroshell HPH-C18**, que também foi usada para esta análise no Método 1 (Tabela 1) (8), incorpora tecnologia de partículas híbridas, melhorando a *robustez da partícula em faixas amplas de pH*, permitindo vida útil longa e menos trocas de coluna. No entanto, ao usar esta coluna, um processo robusto de desenvolvimento de método é essencial para fazer com que o método seja duradouro, estável e confiável. Como a retenção e a seletividade de compostos ionizáveis podem sofrer grandes alterações de acordo com a variação de pH, o uso de análises em pH baixo, médio e alto está se tornando uma prática padrão durante o desenvolvimento de métodos. Além de otimizar as condições de gradiente, para conseguir separar os isômeros posicionais NDIPA e NDPA, os parâmetros de MS/MS do instrumento também precisam ser otimizados para maximizar a sensibilidade.

Configuração e parâmetros do LC

Tabela 1. Configuração e parâmetros do UHPLC. Para obter detalhes sobre o método, consulte a Referência 8.

Parâmetro	Valor																																																																					
	Método 1	Método 2																																																																				
Instrumentos	Bomba de alta velocidade 1290 Infinity II Agilent (G7120A) Multisampler 1290 Infinity II Agilent (G7167B) Termostato de múltiplas colunas 1290 Infinity II Agilent (G7116B) Detector de arranjo de diodos 1260 Infinity Agilent (G1315C)	Bomba de alta velocidade 1290 Infinity II Agilent (G7120A) Multisampler 1290 Infinity II Agilent (G7167B) Termostato de múltiplas colunas 1290 Infinity II Agilent (G7116B) Detector de arranjo de diodos 1260 Infinity Agilent (G1315C)																																																																				
Lavagem da agulha	Metanol:água (80:20)	Metanol:água (80:20)																																																																				
Diluyente da amostra	Água:metanol (95:5)	Metanol																																																																				
Temp. do multisampler	10 °C	10 °C																																																																				
Volume de injeção	20 µL	5 µL																																																																				
Coluna analítica	Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C18, 4,6 x 150 mm, 2,7 µm (p/n 693975-702(T))	Agilent InfinityLab Poroshell 120 PFP, 3,0 x 150 mm, 2,7 µm (p/n 693975-308)																																																																				
Temp. da coluna	40 °C	40 °C																																																																				
Fase móvel A	0,1% de ácido fórmico em água	0,1% de ácido fórmico em água																																																																				
Fase móvel B	0,1% de ácido fórmico em metanol	0,1% de ácido fórmico em metanol																																																																				
Vazão	0,5 mL/min	0,5 mL/min																																																																				
Gradiente	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Tempo (min)</th> <th>% A</th> <th>% B</th> <th>Fluxo (mL/min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>95</td><td>5</td><td>0,5</td></tr> <tr><td>2</td><td>95</td><td>5</td><td>0,5</td></tr> <tr><td>7</td><td>40</td><td>60</td><td>0,5</td></tr> <tr><td>10</td><td>25</td><td>75</td><td>0,5</td></tr> <tr><td>11</td><td>10</td><td>90</td><td>0,5</td></tr> <tr><td>16,5</td><td>10</td><td>90</td><td>0,5</td></tr> <tr><td>16,6</td><td>95</td><td>5</td><td>0,5</td></tr> <tr><td>20,0</td><td>95</td><td>5</td><td>0,5</td></tr> </tbody> </table>	Tempo (min)	% A	% B	Fluxo (mL/min)	0	95	5	0,5	2	95	5	0,5	7	40	60	0,5	10	25	75	0,5	11	10	90	0,5	16,5	10	90	0,5	16,6	95	5	0,5	20,0	95	5	0,5	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Tempo (min)</th> <th>% A</th> <th>% B</th> <th>Fluxo (mL/min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>95</td><td>5</td><td>0,5</td></tr> <tr><td>3</td><td>95</td><td>5</td><td>0,5</td></tr> <tr><td>14</td><td>40</td><td>60</td><td>0,5</td></tr> <tr><td>17</td><td>10</td><td>90</td><td>0,5</td></tr> <tr><td>19</td><td>10</td><td>90</td><td>0,5</td></tr> <tr><td>19,1</td><td>95</td><td>5</td><td>0,5</td></tr> <tr><td>22</td><td>95</td><td>5</td><td>0,5</td></tr> </tbody> </table>	Tempo (min)	% A	% B	Fluxo (mL/min)	0	95	5	0,5	3	95	5	0,5	14	40	60	0,5	17	10	90	0,5	19	10	90	0,5	19,1	95	5	0,5	22	95	5	0,5
Tempo (min)	% A	% B	Fluxo (mL/min)																																																																			
0	95	5	0,5																																																																			
2	95	5	0,5																																																																			
7	40	60	0,5																																																																			
10	25	75	0,5																																																																			
11	10	90	0,5																																																																			
16,5	10	90	0,5																																																																			
16,6	95	5	0,5																																																																			
20,0	95	5	0,5																																																																			
Tempo (min)	% A	% B	Fluxo (mL/min)																																																																			
0	95	5	0,5																																																																			
3	95	5	0,5																																																																			
14	40	60	0,5																																																																			
17	10	90	0,5																																																																			
19	10	90	0,5																																																																			
19,1	95	5	0,5																																																																			
22	95	5	0,5																																																																			
Desligamento	20 minutos	22 minutos																																																																				
Comprimento de onda UV	230 nm	230 nm																																																																				

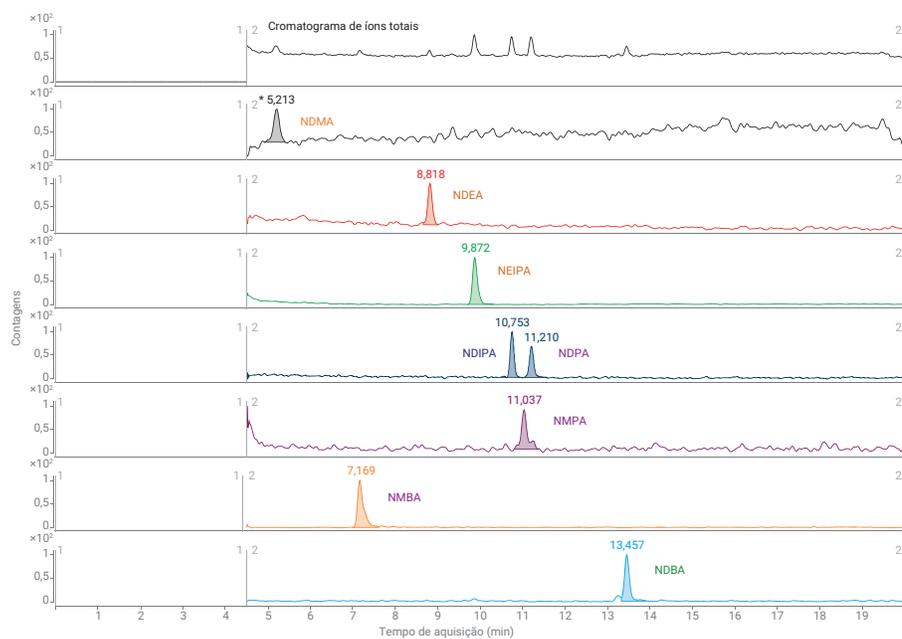


Figura 2. Cromatograma MRM representativo de todas as impurezas de nitrosamina a 0,5 ng/mL usando o Método 1 (para detalhes do método, consulte a Referência 8).

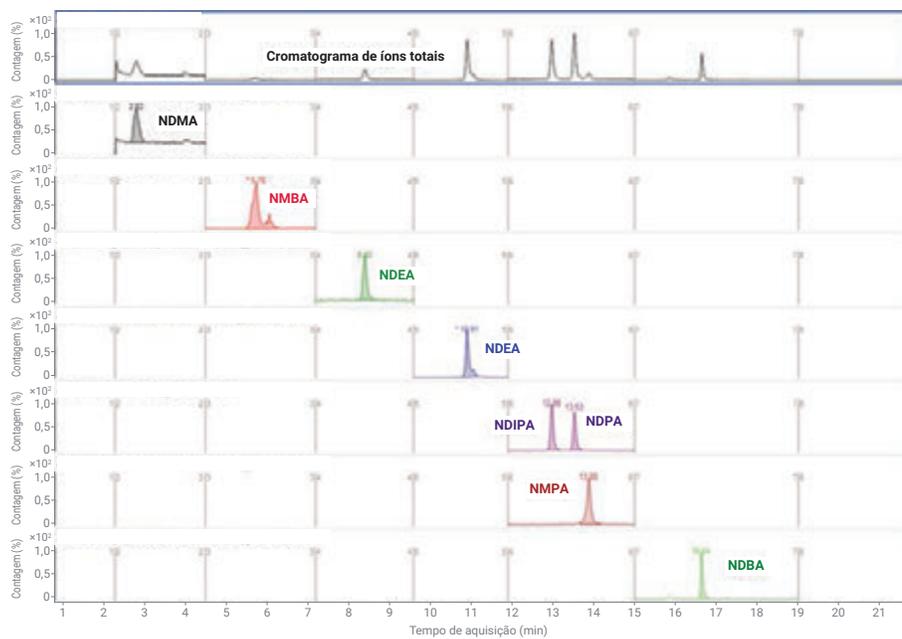


Figura 3. Cromatograma MRM representativo de todas as oito impurezas de nitrosamina a 3 ng/mL usando o Método 2 (para detalhes do método, consulte a Referência 8).

Fácil seleção e informações para pedidos

Este guia fornece recomendações para produtos Agilent usados nesta análise, para que você possa encontrar o que procura de forma rápida. Clique no link MyList* no cabeçalho abaixo para adicionar os itens à sua lista de "Produtos favoritos" na Agilent store. Em seguida, insira as quantidades dos produtos necessários. A sua lista permanecerá em "Produtos favoritos" para uso em pedidos futuros.

Clique em [MyList](#) para baixar todos os itens desta tabela para sua lista de produtos favoritos

Descrição do produto	Part Number
Solventes e padrões de nitrosamina	
Padrões de nitrosamina (em cloreto de metileno)	US-113N-1
Metanol ultrapuro InfinityLab para LCMS	5191-4497
Água ultrapura InfinityLab para LCMS	5191-4498
Ácido fórmico, 5 mL	G2453-85060
Nitrosamina - Preparo de amostras	
Tubo de centrifuga de 15 mL e tampas, 50/pacote	5610-2039
Econofilter Captiva, membrana PVDF, diâmetro de 13 mm, medida de poro de 0,2 µm, 1.000/pacote	5190-5261
Membrana de PES para filtro de seringa Captiva Premium, diâmetro de 15 mm, medida de poro de 0,2 µm, 100/pacote (certificado para LCMS)	5190-5096¹
Membrana de nylon para filtro de seringa Captiva Premium, diâmetro de 15 mm, medida de poro de 0,2 µm, 100/pacote (certificado para HPLC)	5190-5088²
Seringa descartável Captiva, 5 mL, 100/pacote	9301-6476
Seringa descartável Captiva, 10 mL, 100/pacote	9301-6474
Nitrosamina - Coluna para LC	
InfinityLab Poroshell 120 PFP, 3,0 x 150 mm, 2,7 µm (recomendado)	693975-308
Coluna de guarda InfinityLab Poroshell 120 PFP, 3,0 mm, 2,7 µm (recomendado)	823750-915
InfinityLab Poroshell HPH-C18, 4,6 x 150 mm, 2,7 µm	693975-702
InfinityLab Poroshell HPH-C18, 4,6 mm, 2,7 µm, guarda UHPLC, 3/pacote	820750-922
Nitrosamina - Consumíveis para LC	
Conjunto de troca rápida InfinityLab, 0,12 x 105 mm, para conexão do injetor da coluna no UHPLC	5067-5957
Conjunto de troca rápida InfinityLab, 0,17 x 105 mm, para conexão do injetor da coluna no UHPLC	5067-6166
Conexão InfinityLab, Quick Turn para saída da coluna	5067-5966
Capilar Quick Turn 0,12 x 280 mm, para conexão da coluna ao detector	5500-1191
Kit de tampas para recipiente de resíduos Stay Safe GL45 com 4 portas e recipiente de resíduos de 6 L	5043-1221
Filtro de carvão com faixa sinalizadora de tempo de uso para recipiente de resíduos	5043-1193
Tampa InfinityLab de segurança "Stay Safe", kit inicial	5043-1222
Filtro do injetor de solvente de aço inoxidável, medida de poro de 10 µm	01018-60025
O conjunto de filtração de solvente InfinityLab inclui funil de vidro, 250 mL, base de vidro para suporte de membrana, frasco de vidro, 1 L e grampo de alumínio	5191-6776³
Membrana de celulose regenerada 47 mm, 0,20 µm 100/pacote	5191-4340³



Nitrosaminas - Vials e tampas	
Vial, rosqueável, âmbar, área para identificação, certificado, 2 mL, 100/pacote Tamanho do vial: 12 x 32 mm (tampa de 12 mm)	5182-0716
Tampa, rosqueável, verde, PTFE/silicone pré-cortado, 100/pacote Tamanho da tampa: 12 mm	5183-2077
Insert de vial, 250 µL, vidro desativado com suporte de polímero, 100/pacote 5	5181-8872
Nitrosaminas - Consumíveis para MS	
Kit de reposição da agulha do APCI	G1946-68704
Agulha do APCI	G1960-20030
Capilar, troca rápida, 0,6 mm	G1960-80060



* Está usando o "MyList" pela primeira vez? Você deverá inserir o seu endereço de e-mail para verificar a conta. Caso tenha uma conta Agilent, poderá fazer login. Se não tiver uma conta Agilent registrada, é necessário se [registrar para obter uma](#). Esse recurso é válido apenas em países habilitados para comércio eletrônico. Todos os itens também podem ser solicitados através dos canais regulares de vendas e distribuidores.

1. Com desempenho semelhante ao PVDF, esta membrana tem baixa ligação de proteínas e é ideal para análise de proteínas. Disponível em um pacote menor (100/pacote) e é certificada para LC/MS.
2. Ideal para necessidades gerais de filtração. Não deve ser usada para analisar proteínas. Disponível em um pacote menor (100/pacote) e é certificada para HPLC.
3. Conjunto de filtração de solvente e membranas de filtro associadas não são recomendados para uso com solventes ultrapuros InfinityLab para LC/MS.

Referências

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

Padrões químicos Agilent

Está procurando padrões de alta qualidade para aplicações adicionais? [Busque em nosso catálogo de 5.000 padrões químicos](#) para encontrar o melhor padrão para o seu método, aplicação ou fluxo de trabalho. Não consegue encontrar o catálogo de padrões certo? Nosso site também possui uma ferramenta de cotação de padrões personalizada e automatizada, que irá ajudá-lo a desenvolver um padrão que atende às suas necessidades.

Ferramenta de seleção para sistema de LC Agilent

Está procurando a coluna LC mais adequada para suas aplicações? Use a [ferramenta de seleção de colunas para LC](#) Agilent para selecionar a coluna de LC ideal.

Agilent CrossLab: Visão real, resultados reais

O CrossLab vai além da instrumentação para trazer serviços, consumíveis e gerenciamento de recursos em todo o laboratório. Assim, seu laboratório pode melhorar a eficiência, otimizar as operações, aumentar o tempo de atividade dos instrumentos, desenvolver as habilidades dos usuários e muito mais.

Saiba mais sobre o Agilent CrossLab e veja exemplos de ideias para obtenção de ótimos resultados, no site

www.agilent.com/crosslab

Encontre um centro de atendimento ao cliente da Agilent no seu país:

www.agilent.com/chem/contactus

Obtenha respostas para as suas dúvidas técnicas e acesse recursos na comunidade Agilent:

community.agilent.com

Brasil

0800 7281405

chem_vendas@agilent.com

Europa

info_agilent@agilent.com

Ásia e Pacífico

inquiry_lsca@agilent.com

Estas informações estão sujeitas a alterações sem aviso prévio.

RA44239.5764236111

© Agilent Technologies, Inc. 2021
Publicado nos EUA, 10 de março de 2021
5994-2977PTBR

Agilent
CrossLab
From Insight to Outcome

 **Agilent**
Trusted Answers