



Développement assisté *in silico* d'une méthode LC-MS/MS pour la détermination de 17 nitrosamines dans une matrice médicamenteuse

SEP 23

28-30 mars 2023

Yue Zhang

Thibault Ziemons

Thomas Van Laethem

Amandine Dispas

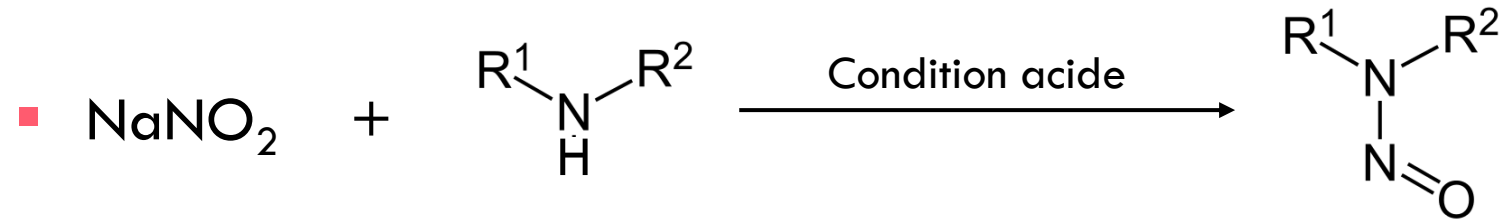
Philippe Hubert

Cédric Hubert

Agenda

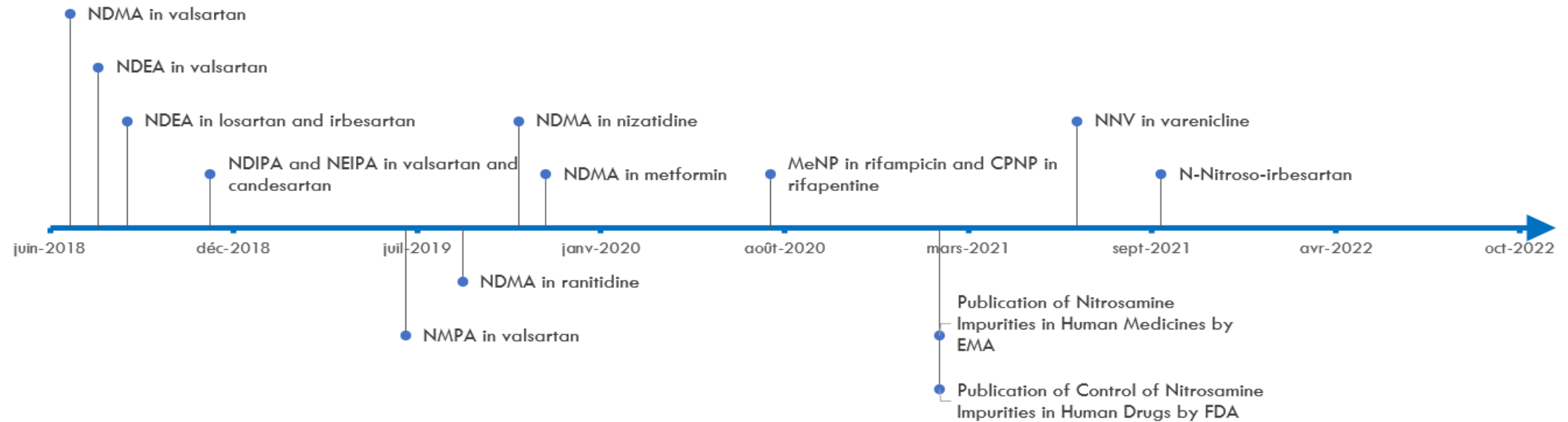
- Introduction
- Matériels et méthodes
- Résultats
- Conclusions

Qu'est-ce qu'une nitrosamine (NA) ?



- Potentiellement cancérigène
- Risques de formation dans les produits pharmaceutiques
 - Synthèse du principe actif
 - Produit fini
 - Aspects des bonnes pratiques de fabrication

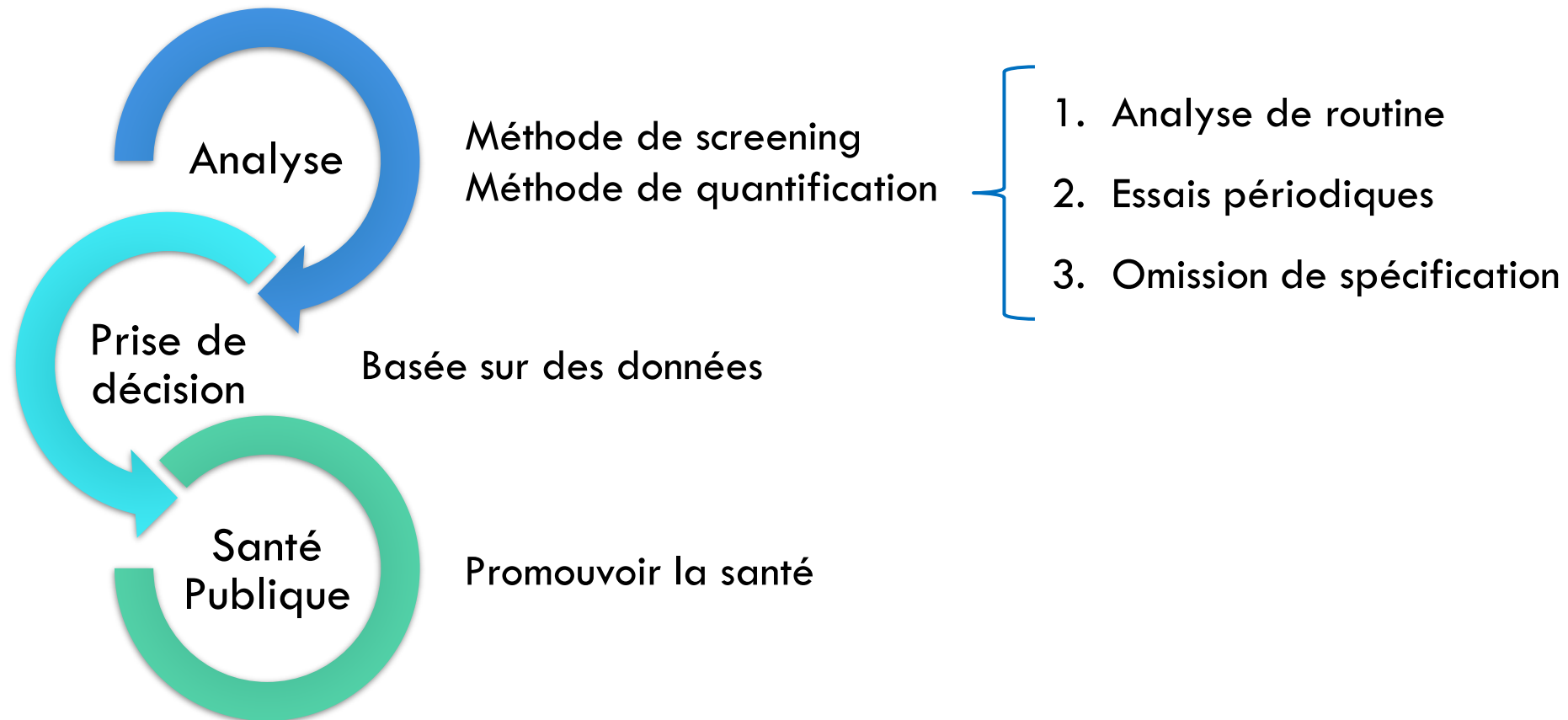
Chronologie des événements majeurs



- Procédure d'investigation selon l'EMA :
 - Evaluation documentaire des risques
 - Test confirmatoire
 - Implémentation des mesures d'atténuation des risques

Etape 2 : Test confirmatoire

- Nécessité de développer et d'implémenter des méthodes très sensibles et spécifiques comme outils d'analyse



Apport admissible journalier des NAs défini par l'EMA

| Nitrosamine | AAJ (ng/jour) | Nitrosamine | AAJ (ng/jour) | Nitrosamine | AAJ (ng/jour) |
|------------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|
| NDMA | 96,0 | NDBA | 26,5 | NNK | 100,0 |
| NDEA | 26,5 | NMOR | 127,0 | NPYR | 1700,0 |
| NEIPA | 26,5 | MeNP | 26,5 | NDPhA | 78000,0 |
| NDIPA | 26,5 | NMPA | 34,3 | NPIP | 1300,0 |
| NDPA | 26,5 | NMPEA | 8,0 | NDELA | 1900,0 |
| NMBA acid | 96,0 | NTHP | 37,0 | | |

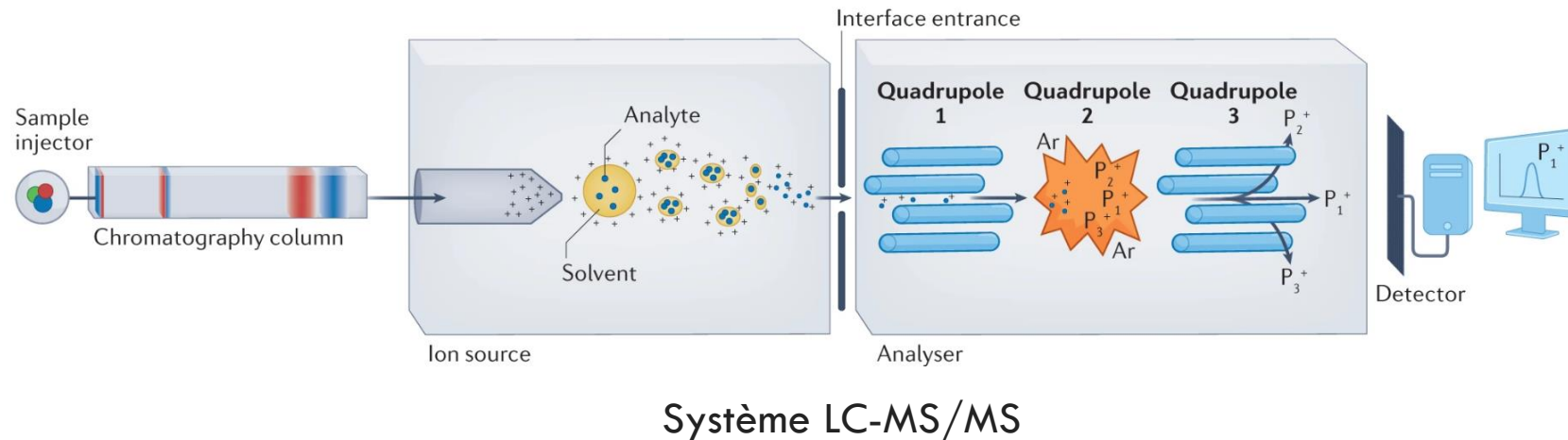
- *Limite de spécification (ppm) = $\frac{\text{Apport admissible journalier (ng/jour)}}{\text{Dose maximale journalière (mg/jour)}}$*
- Quelles sont les exigences de la (des) méthode(s) d'analyse ?
 - Contrôle de routine : LLOQ \leq limite de spécification
 - Essais périodiques : LLOQ \leq 30 % de la limite de spécification
 - Omission d'une spécification : LLOQ \leq 10 % de la limite de spécification



Objectif

Choix de la technique analytique

- RPLC-MS/MS
 - LC : séparation des molécules volatiles et non volatiles
 - Détecteur MS/MS : haute sensibilité et spécificité basée sur la fragmentation



Développement assisté *in-silico* des conditions LC

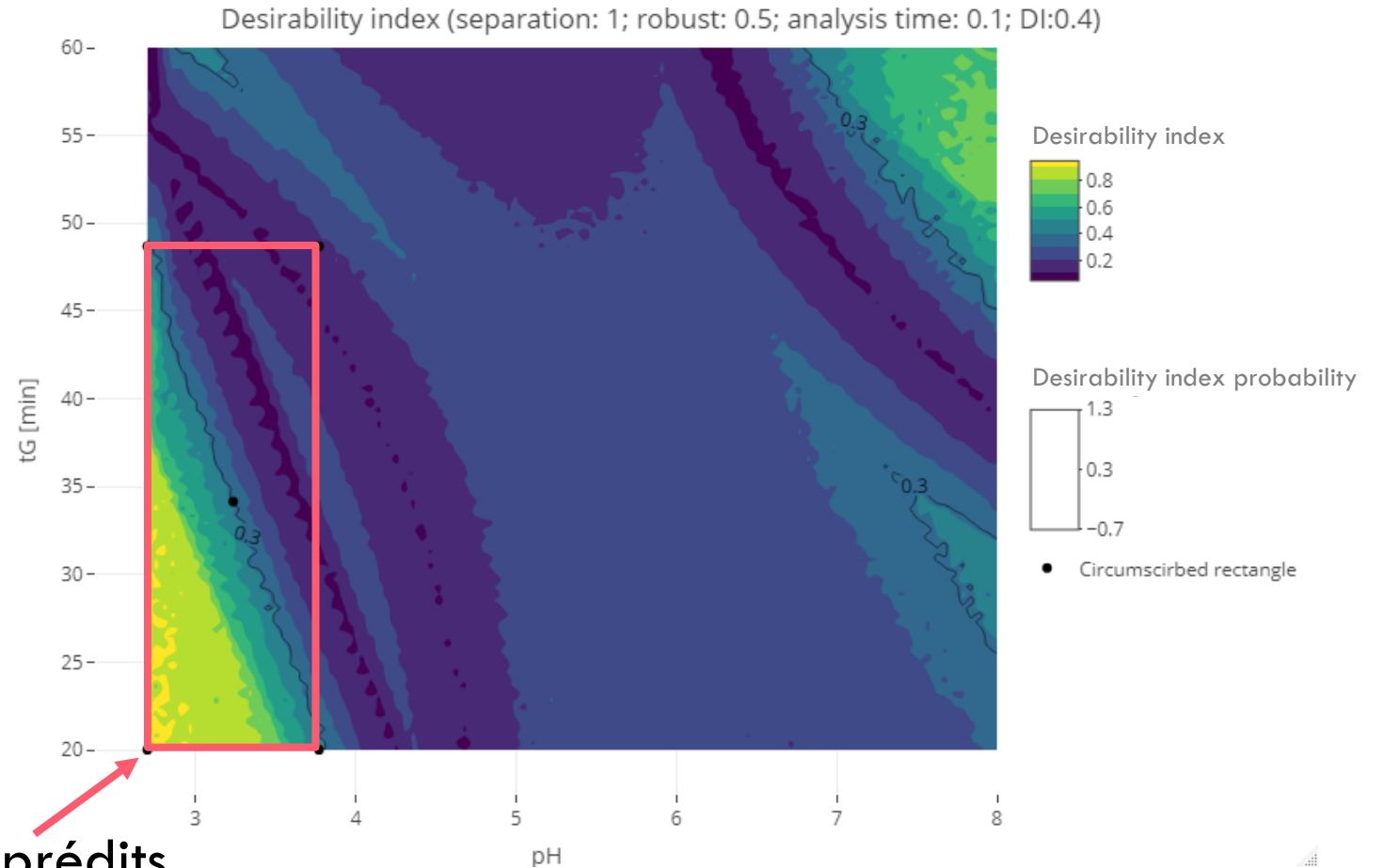
■ Projet EOS

Modèle QSRR

Modèle de surface
de réponse

Graphique d'index
de désirabilité

Rectangle circonscrit



■ Paramètres LC optimaux prédits

- pH 2,7
- tG 20,0 min

Méthode LC

- Phase stationnaire : Acquity HSS T3 Premier, 100 X 2,1 mm (1,8 µm)
- Phase mobile
 - Eau + 0,1% acide formique, **pH 2.7**
 - MeOH + 0,1% acide formique

Gradient

| Temps (min) | Débit (mL/min) | %A | %B |
|-------------|----------------|-------|------|
| Initial | 0,400 | 100,0 | 0,0 |
| 1,00 | 0,400 | 100,0 | 0,0 |
| 10,90 | 0,400 | 5,0 | 95,0 |
| 13,50 | 0,400 | 5,0 | 95,0 |
| 13,60 | 0,400 | 100,0 | 0,0 |
| 17,00 | 0,400 | 100,0 | 0,0 |

tG (temps de gradient))

Transfert géométrique
 Colonne HPLC 20,0 min → Colonne UHPLC 9,90 min

- Volume d'injection : 10 µL
- T° colonne : 45°C
- T° autosampler : 10°C



Acquity® Premier

Méthode MS/MS optimisée

- Mode d'ionisation : APCI +
- Courant corona : 1,5 μ A
- Débits de gaz
 - Désolvatation : 950 L/h
 - Nébuliseur : 250 L/h
 - Cône : 250 L/h
 - Collision : 0,15 mL/min
- T° source : 120°C
- T° sonde APCI : 150°C ou 250°C
- Voltage du cône : propre à chaque composé
- Energie de collision : composé- et fragment-dépendante

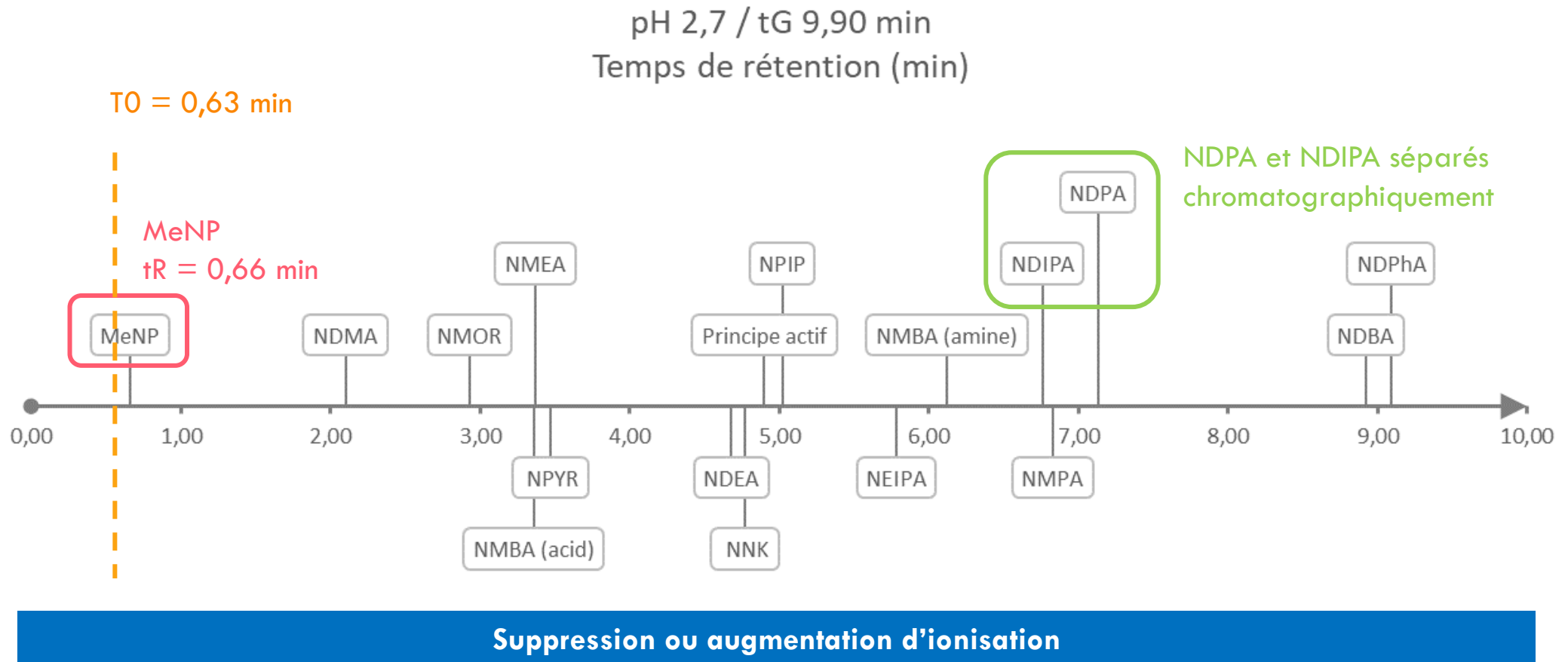


Xevo® TQ-Absolute

Matières

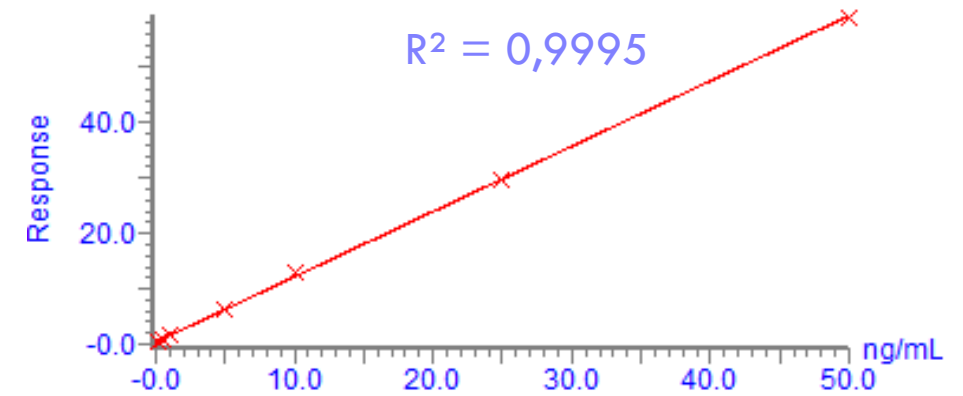
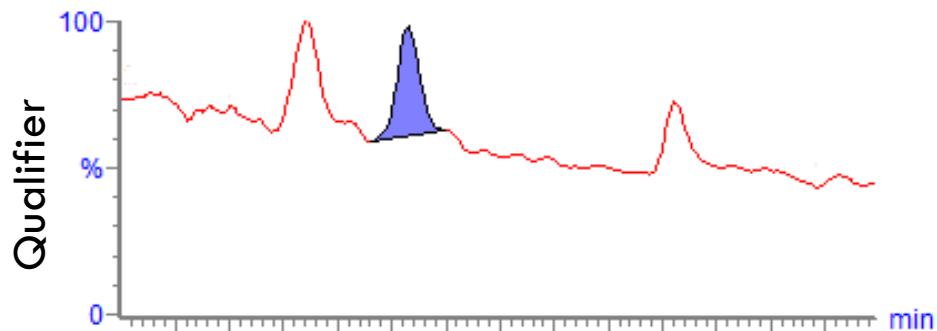
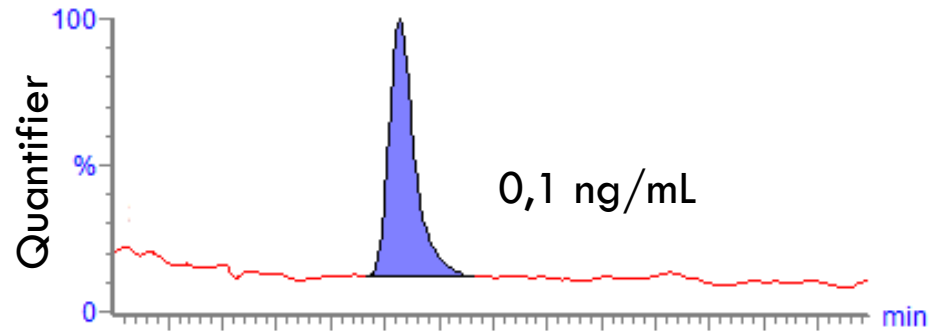
- Solvants et additifs de grade ULC-MS
- 17 impuretés de nitrosamine
 - 2 transitions de masse monitorées par analyte : un quantifier et un qualifier
- 9 standards internes marqués par des isotopes
 - Couvrir toute la plage de temps de rétention
 - Compenser la variabilité lors de la préparation d'échantillons
 - Compenser les variations d'ionisation

Séparation LC



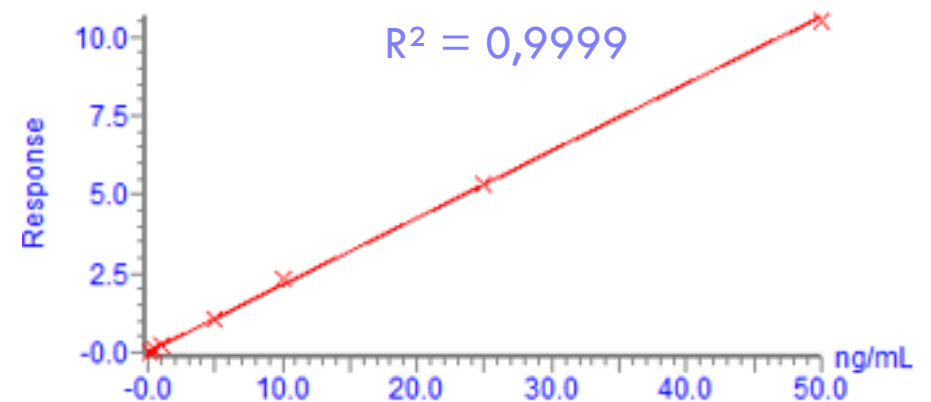
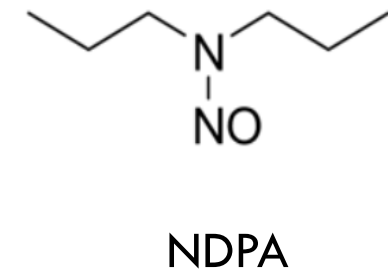
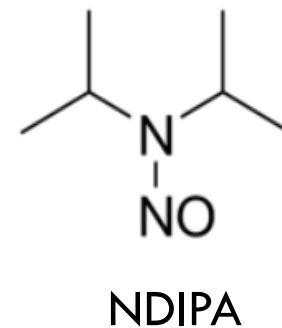
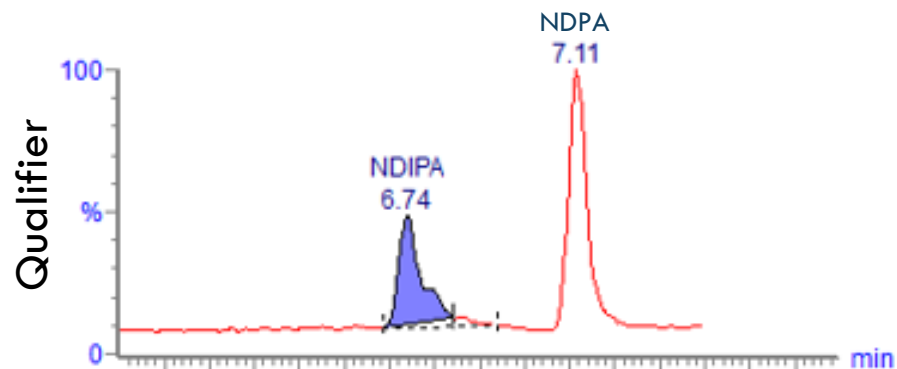
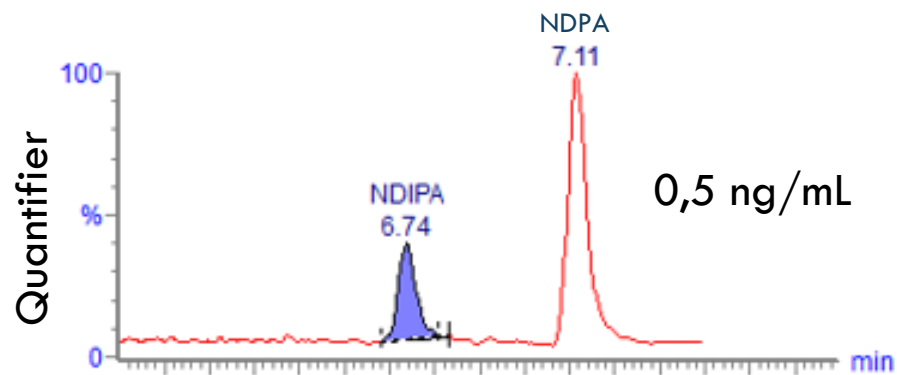
Nitrosamine prédominante

- Molécule sensible



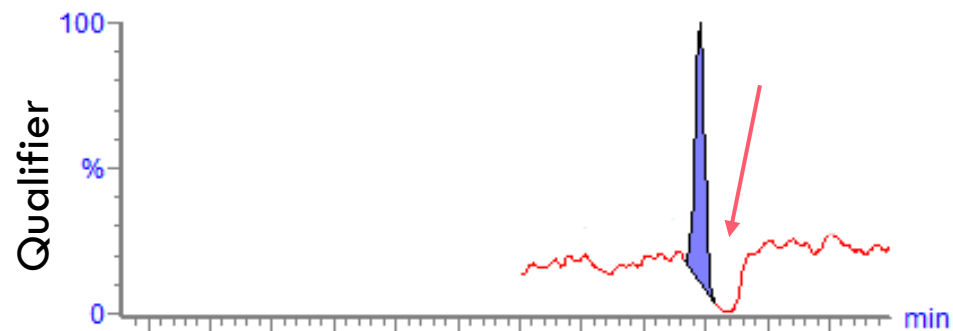
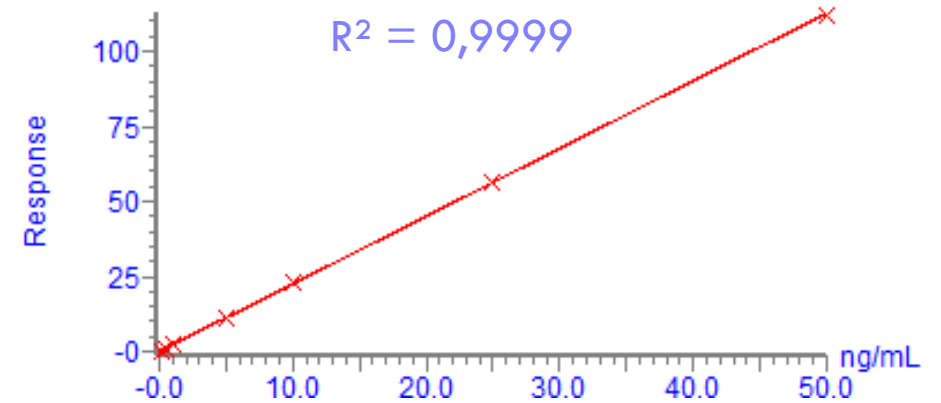
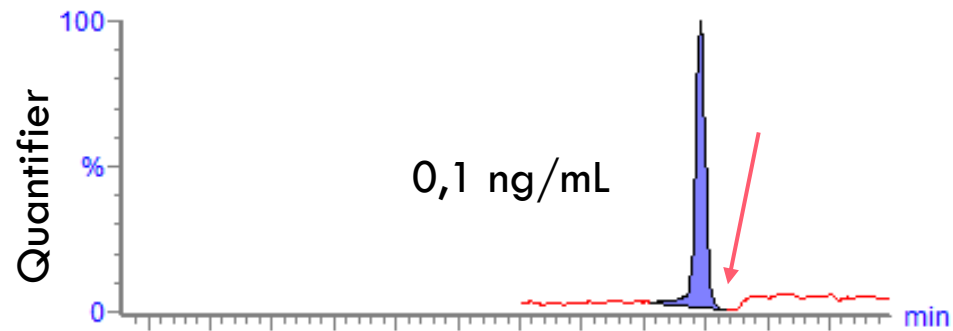
NDIPA – N-nitrosodiisopropylamine NDPA – N-nitrosodipropylamine

- Distinction impossible entre NDIPA et NDPA malgré la spécificité MS/MS
- Couple isobarique séparé par LC



Nitrosamine proche de la zone de suppression d'ionisation

- Proche de la zone de suppression d'ionisation



LLoQ requise et estimée pour chaque NA

| Nitrosamine | LLoQ requise* (ng/mL) | LLoQ estimée (ng/mL) | Rapport S/N (Ph. Eur.) |
|------------------|-----------------------|----------------------|------------------------|
| NDMA | 1,536 | 0,500 | 24 |
| NDEA | 0,424 | < 0,500 | 29 |
| NEIPA | 0,424 | 0,100 | 48 |
| NDIPA | 0,424 | 0,100 | 70 |
| NDPA | 0,424 | 0,100 | 24 |
| NMBA acid | 1,536 | 0,100 | 45 |
| NDBA | 0,424 | 0,100 | 123 |
| NMOR | 2,032 | 0,100 | 138 |
| NMPA | 0,549 | 0,100 | 197 |
| NPIP | 20,800 | 0,500 | 43 |
| NTHP | 0,592 | 0,100 | 11 |
| NNK | 1,600 | 0,100 | 184 |
| NPYR | 27,200 | 0,500 | 32 |
| NDPhA | 1248,000 | 0,100 | 139 |

*LLoQ requise : calculée en tenant compte d'un facteur de 10% et de la préparation de l'échantillon

Conclusions

- Bonne linéarité de réponse de 0,1 ng/mL à 50 ng/mL dans la matrice dopée
- Certaines nitrosamines sont proches de la zone de suppression d'ionisation
 - montrent toujours une bonne linéarité de réponse dans la zone de concentration de travail
 - ajuster le pH de la phase mobile A à pH 5,0 pour modifier le tR du principe actif
- NDEA : LLoQ estimée supérieure à LLoQ requise (0,500 ng/mL > 0,424 ng/mL)
 - fixer le point de calibration le plus bas à 0,25 ng/mL
- Validation



Merci

POUR VOTRE ATTENTION

