



25 - 27
Mars
2025
Paris

Session 8

Analyse toxicologique

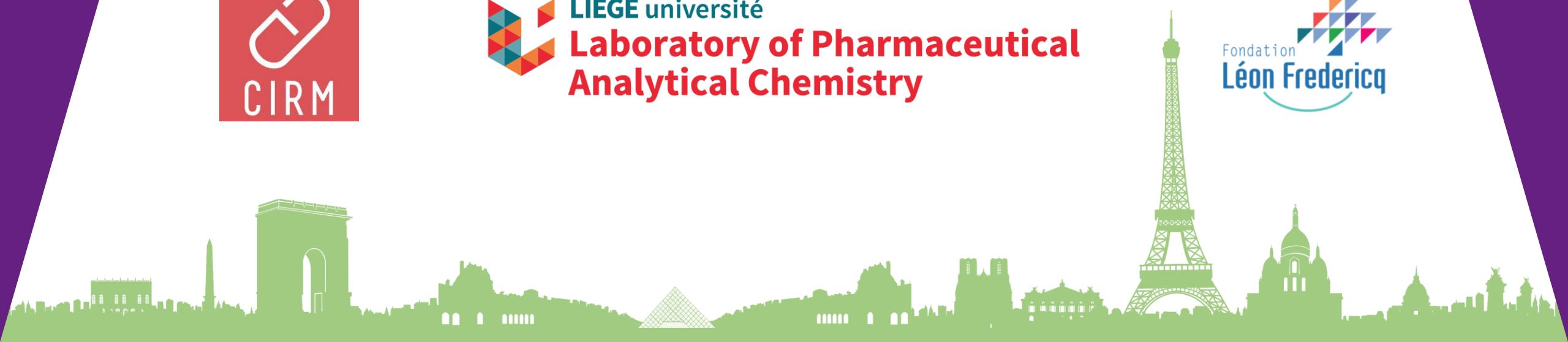


Association
Francophone
Des Sciences
Séparatives

Approche *in silico* flexible pour le développement de méthodes quantitatives des nitrosamines dans un médicament

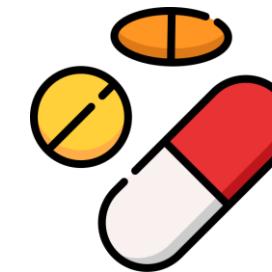
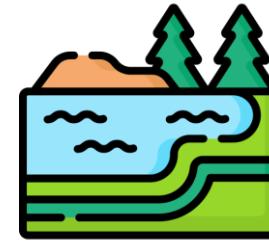
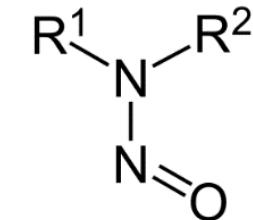
Yue ZHANG

Université de Liège, CIRM, Laboratoire de Chimie Analytique Pharmaceutique



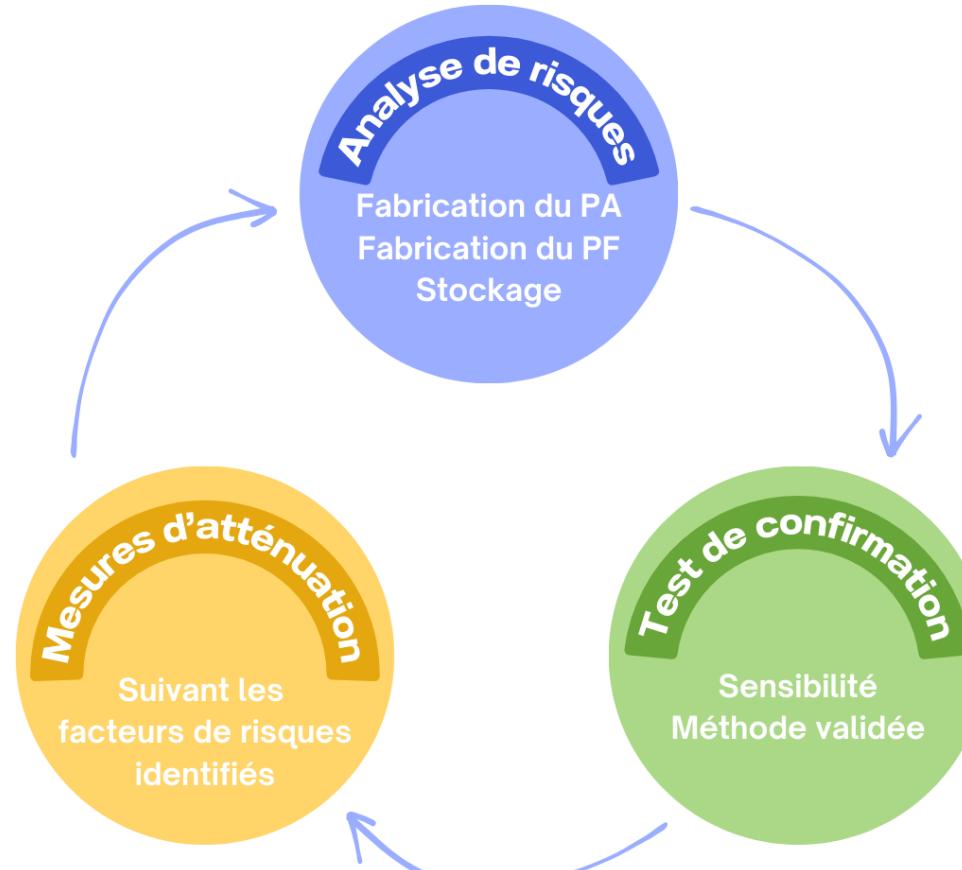
Nitrosamine ? Qu'est-ce que c'est ?

- Potentiellement cancérigène
- Différentes matrices :



- Nitrosamines
 - **Impuretés non spécifiques** : **NDMA, NDEA, NDPA, NDIPA, NEIPA, etc**
 - Impuretés spécifiques à la substance active (NDSRIs) : nitroso-varénicline, nitroso-duloxétine, etc

Procédure d'investigation selon l'EMA et la FDA

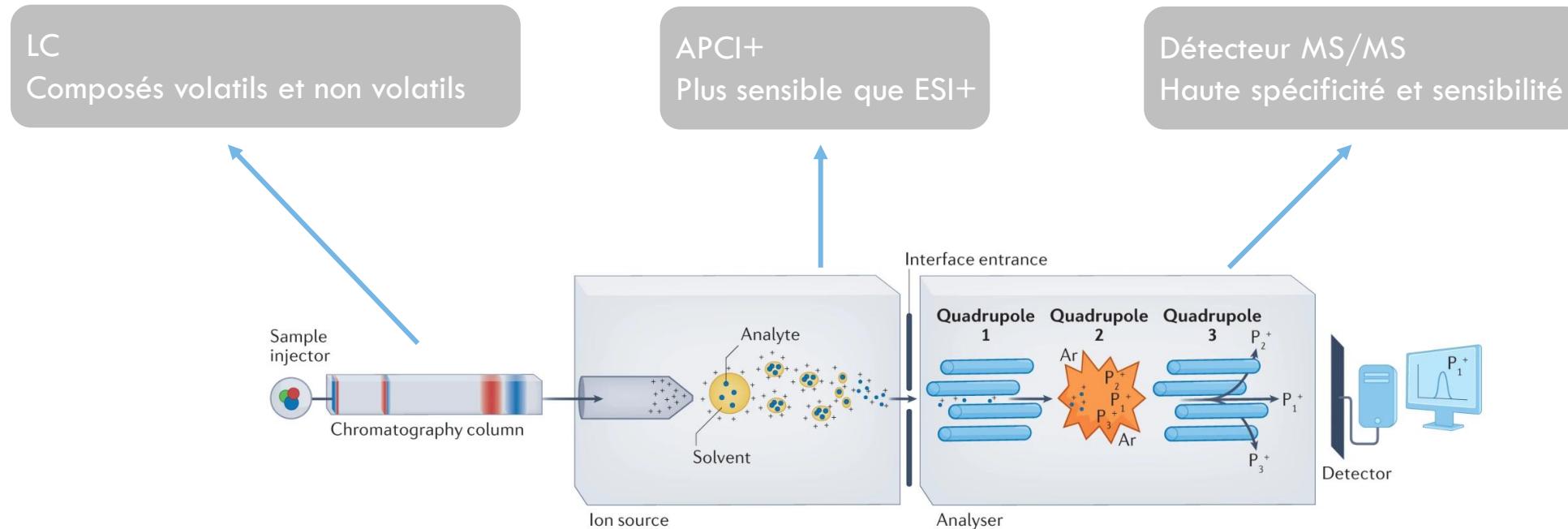


Questions and answers for marketing authorisation holders/applicants on the CHMP Opinion for the Article 5(3) of Regulation (EC) No 726/2004 referral on nitrosamine impurities in human medicinal products, Rev. 21, 2024, EMA.

Control of Nitrosamine Impurities in Human Drugs, Guidance for Industry, Rev.2, 2024, FDA.

Choix de la technique analytique

■ RP-UHPLC-(APCI+)-MS/MS

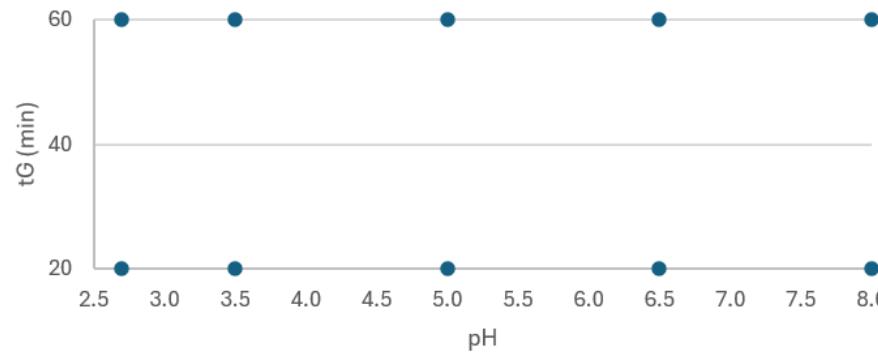


■ Défis : 17 nitrosamines en une seule séquence

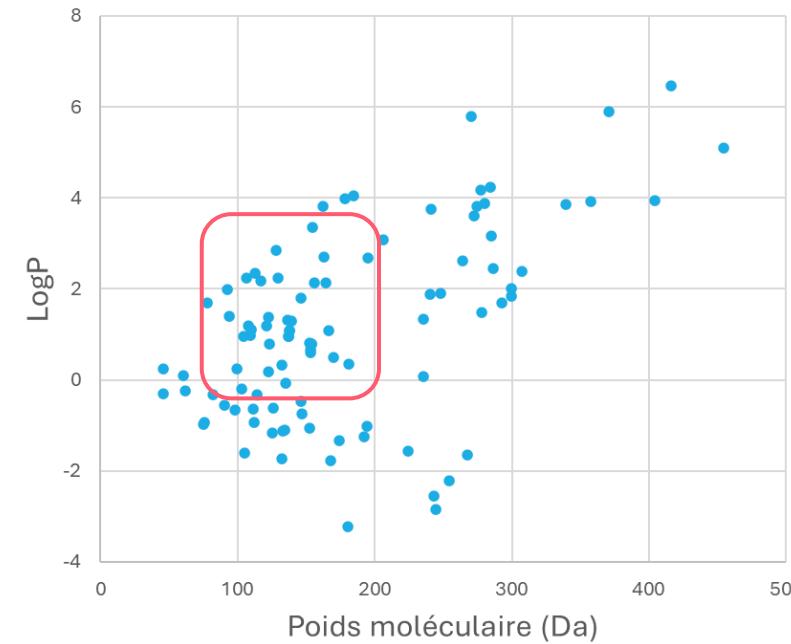
- ✓ Séparation des isobares
- ✓ Effet de matrice
- ✓ Performance quantitative adéquate

QSRR (Relation quantitative structure-rétention)

- Relations mathématiques entre les descripteurs moléculaires et la rétention dans des conditions données
- Développement de modèles
 - 10 conditions analytiques
 - ✓ pH 2,7 – 8,0
 - ✓ tG 20 – 60 min
 - 100 substances actives connues

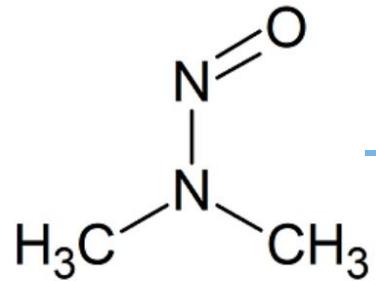


Van Laethem et al., Data Brief 42 (2022) 108017.
 Kumari et al., Molecules 28 (2023) 1–17.
 Van Laethem et al., Molecules 27 (2022) 8306.



QSRR – Objectifs

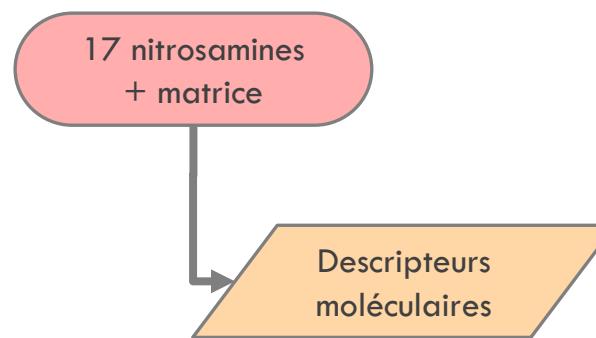
- Molécules connues
 - Ex : NDMA



MinAbsEStateIndex
MinPartialCharge
NumHAcceptors
MolLogP
Atom count
Etc

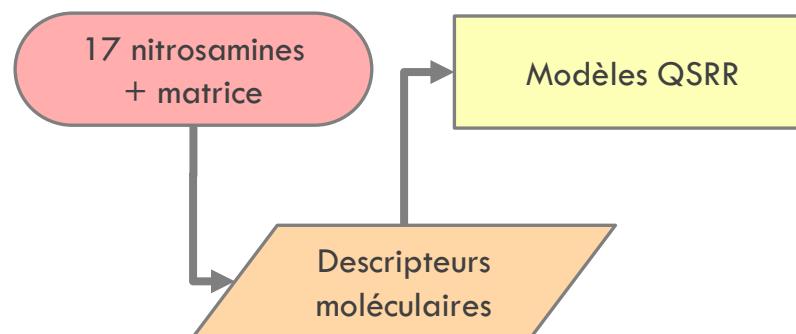
Prédire le TR
Anticiper la séparation

QSRR – Application

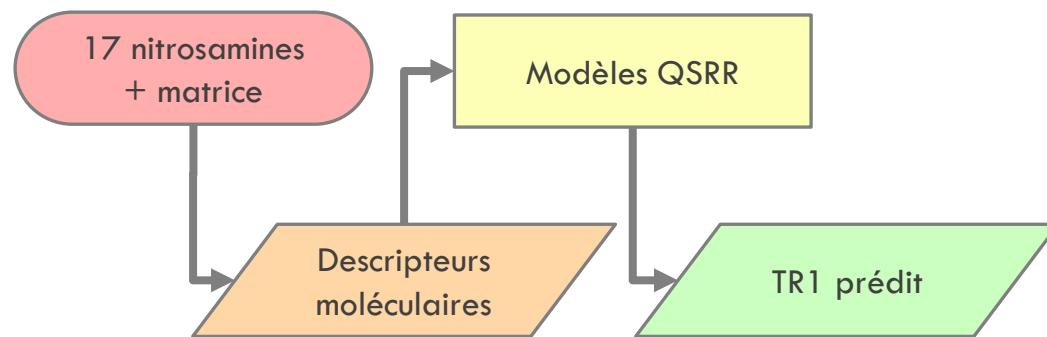


QSRR – Application

- Modèles QSRR construits sur la base de 100 molécules connues acquises sous 10 conditions expérimentales

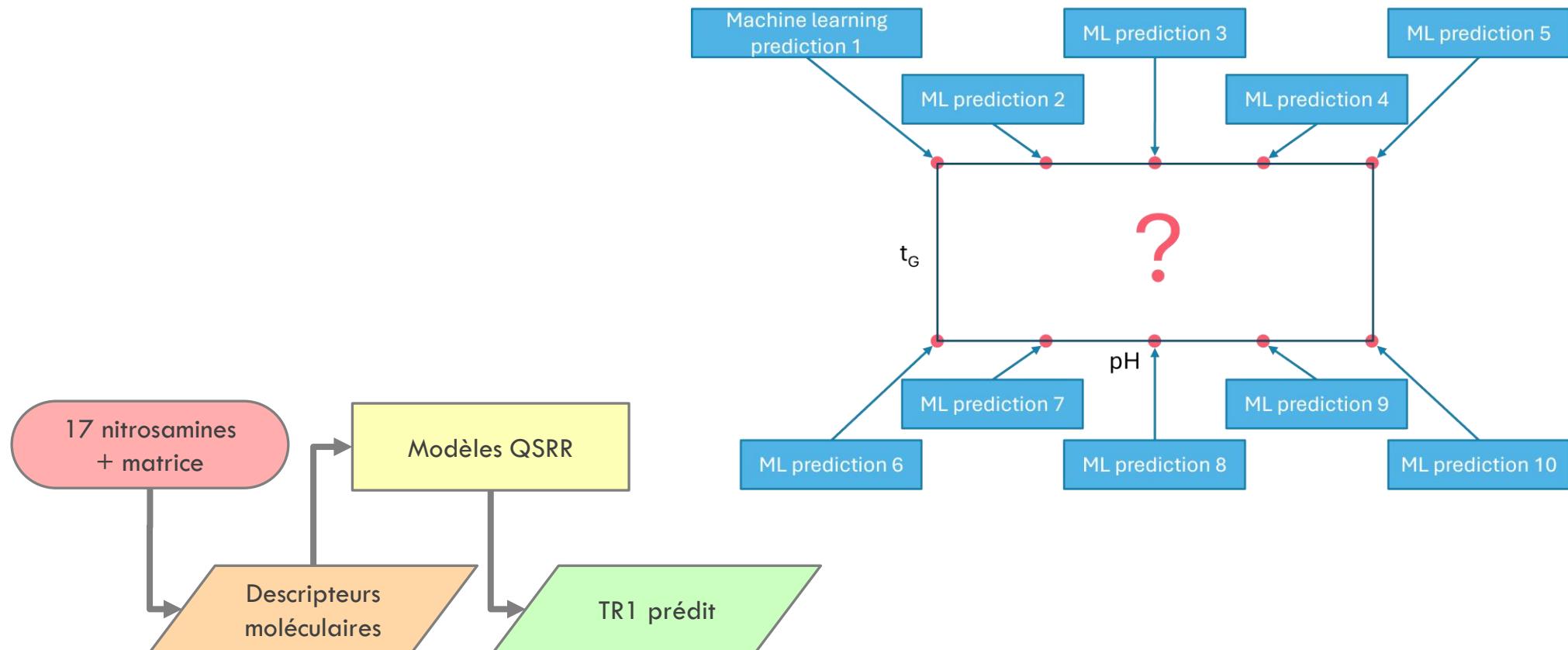


QSRR – Application

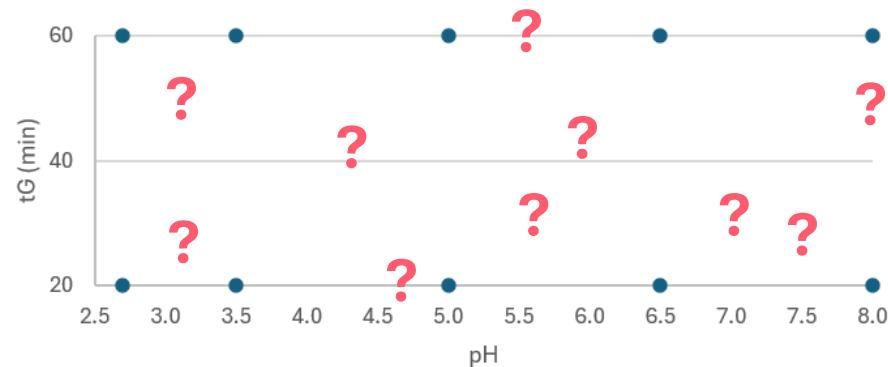


QSRR – Application

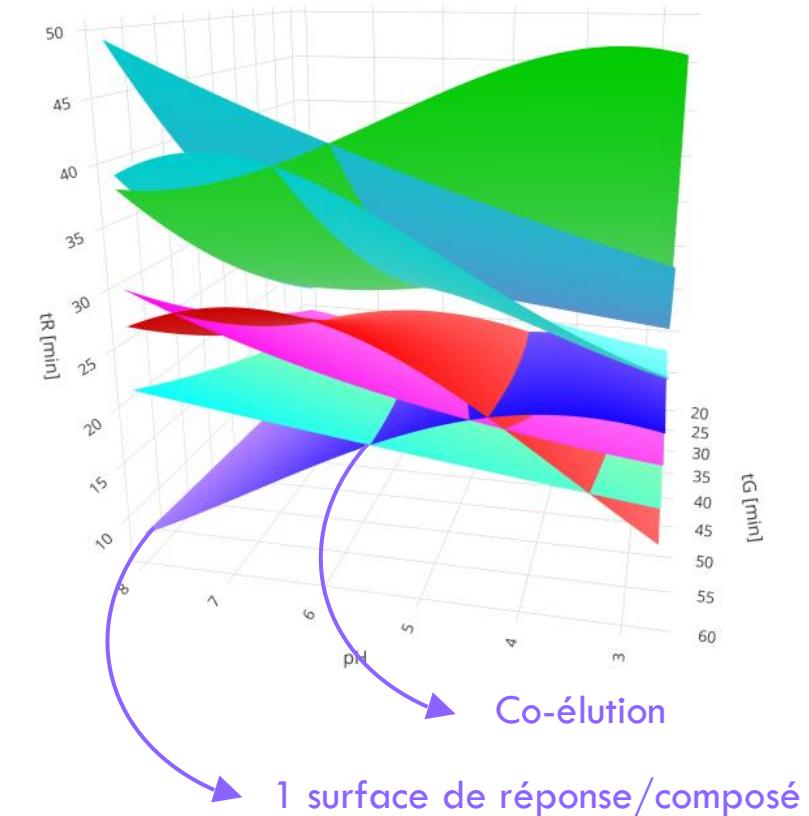
- TR1 prédit aux 10 conditions initialement fixées



Modèle de surface de réponse (RSM) – Application

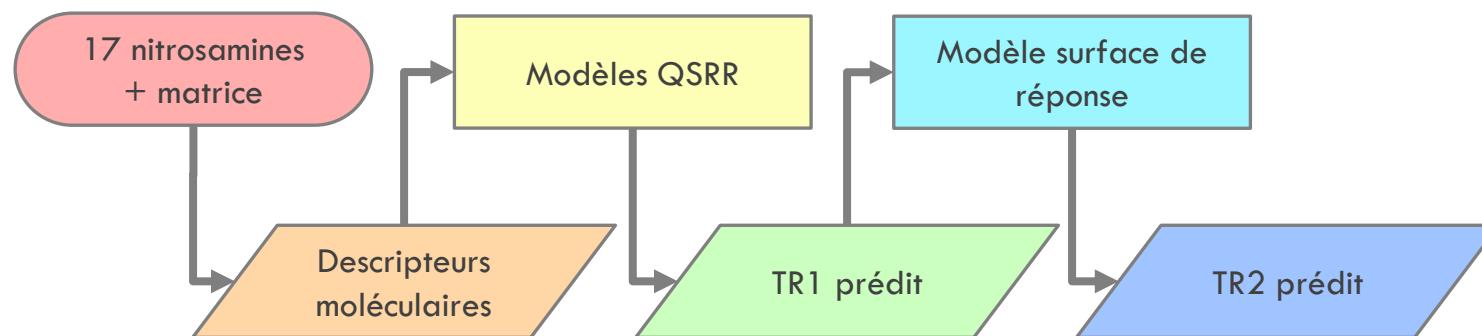


- Avantages :
 - Prédire le TR dans l'espace opérationnel
 - Anticiper la séparation

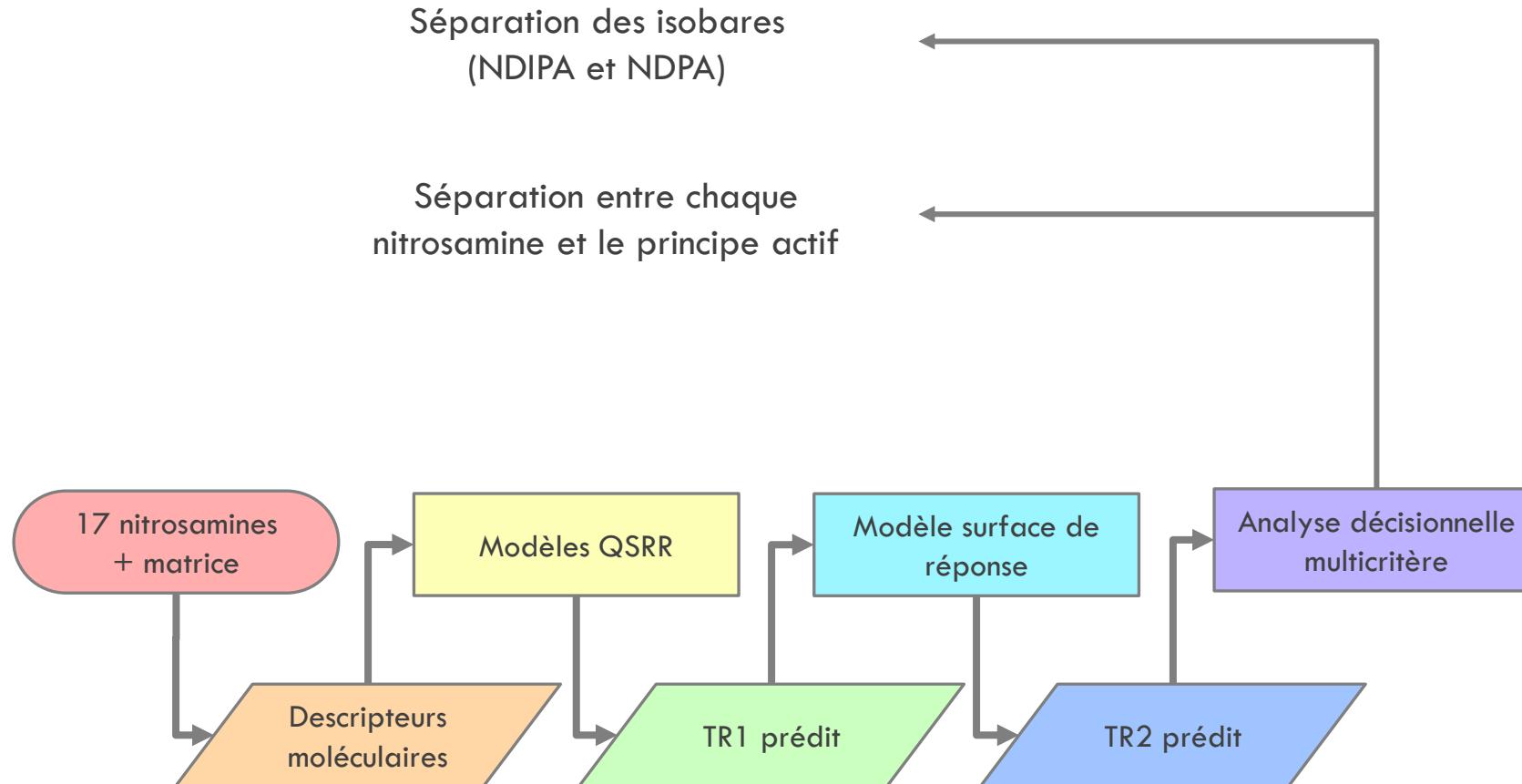


QSRR & RSM – Application

- TR2 prédit : dans l'entièreté de l'espace opérationnel

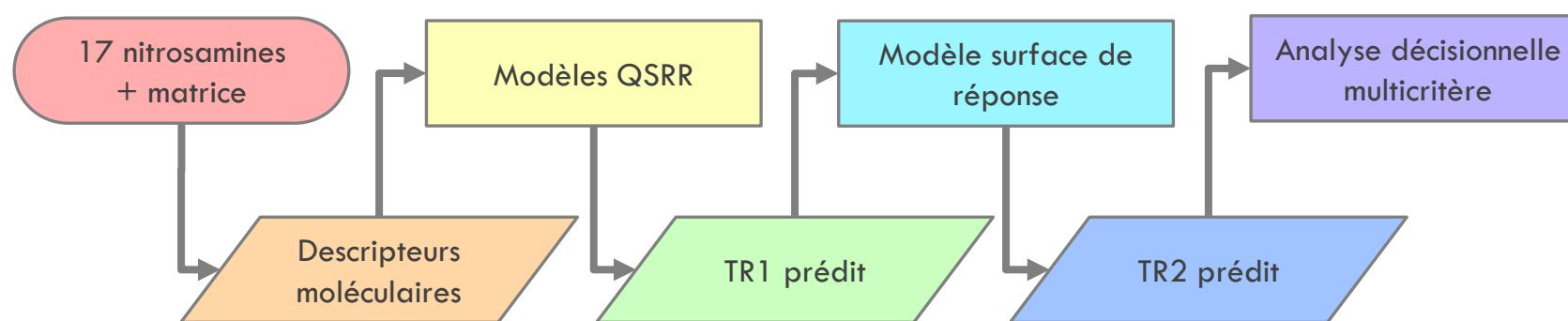
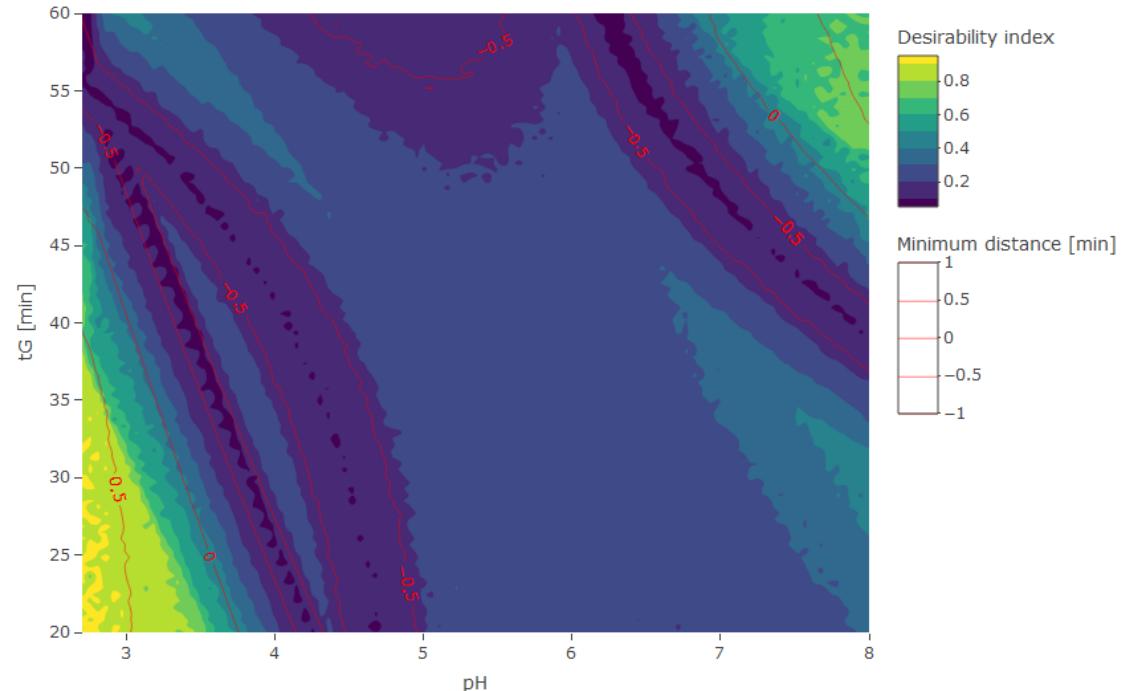


QSRR & RSM – Application



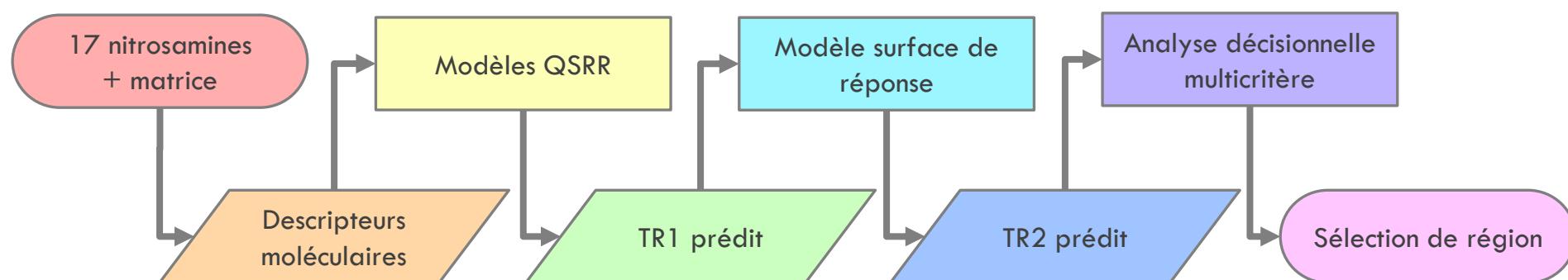
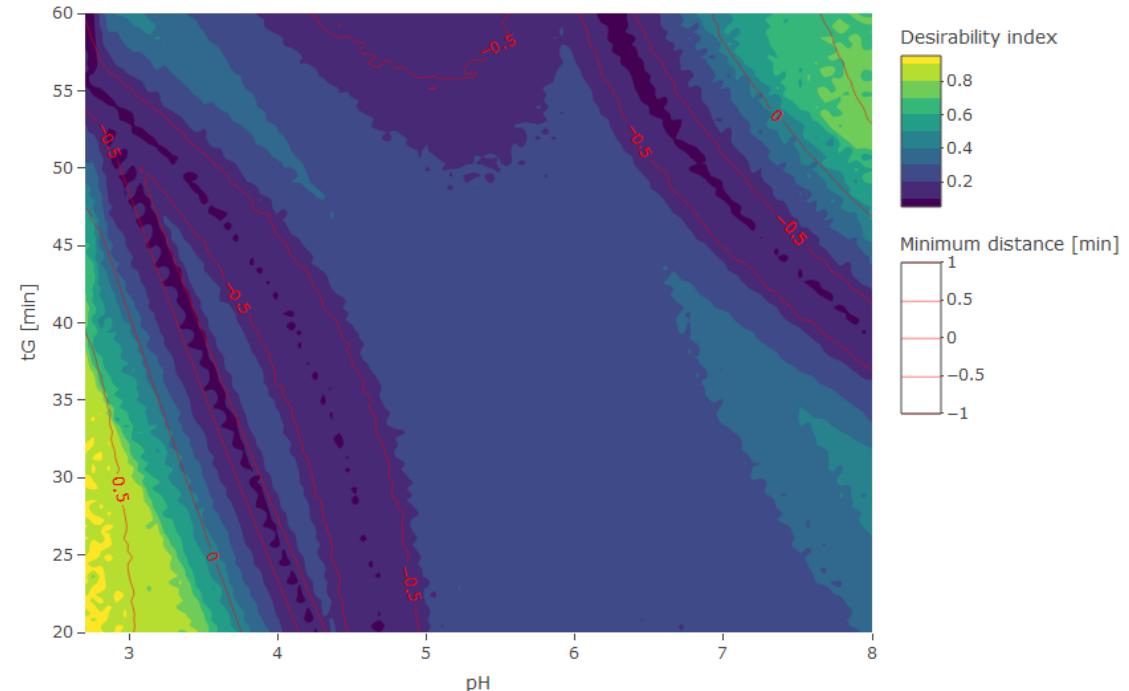
QSRR & RSM – Application

■ Index de désirabilité



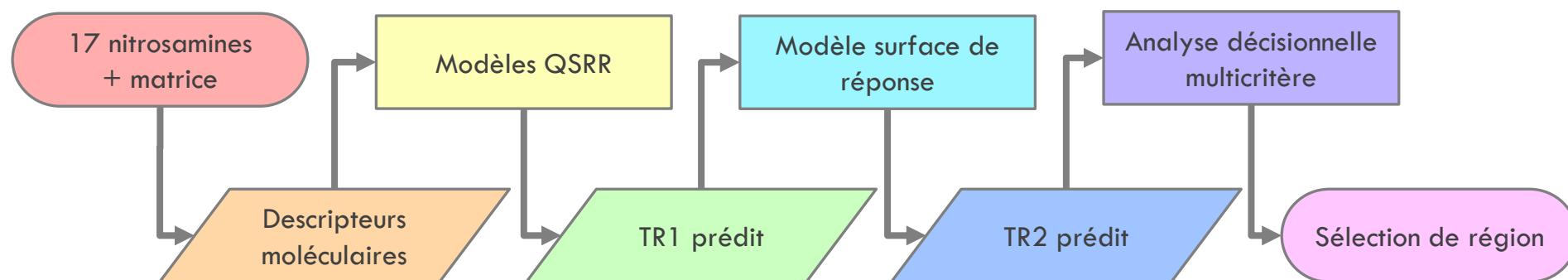
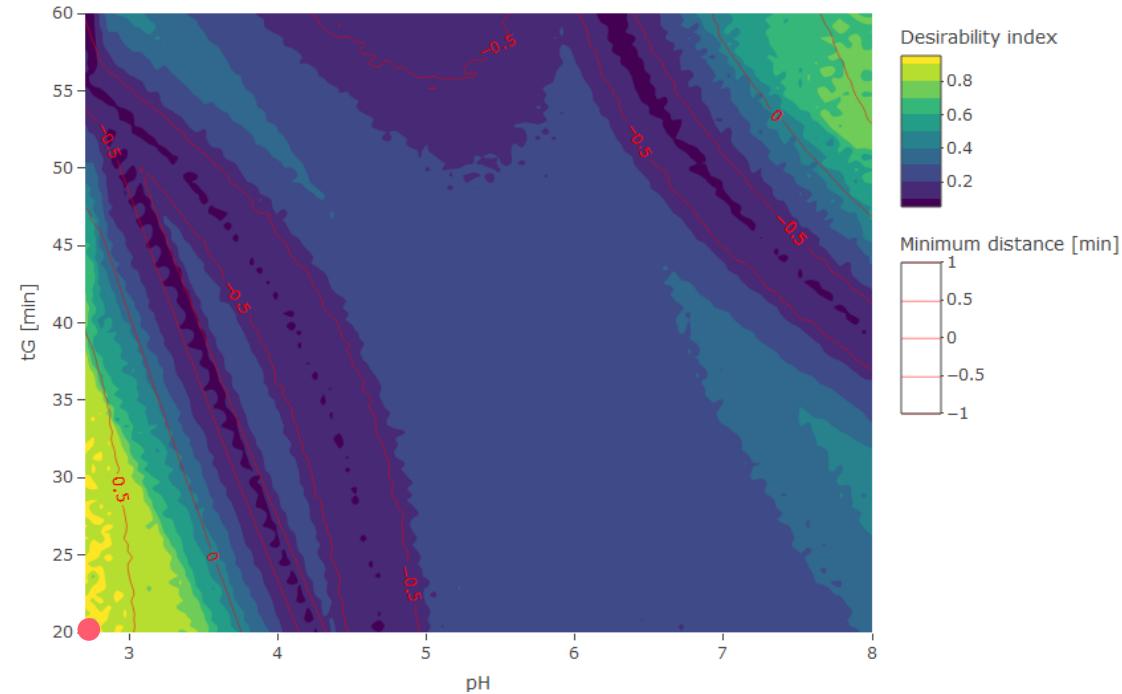
QSRR & RSM – Application

■ Index de désirabilité

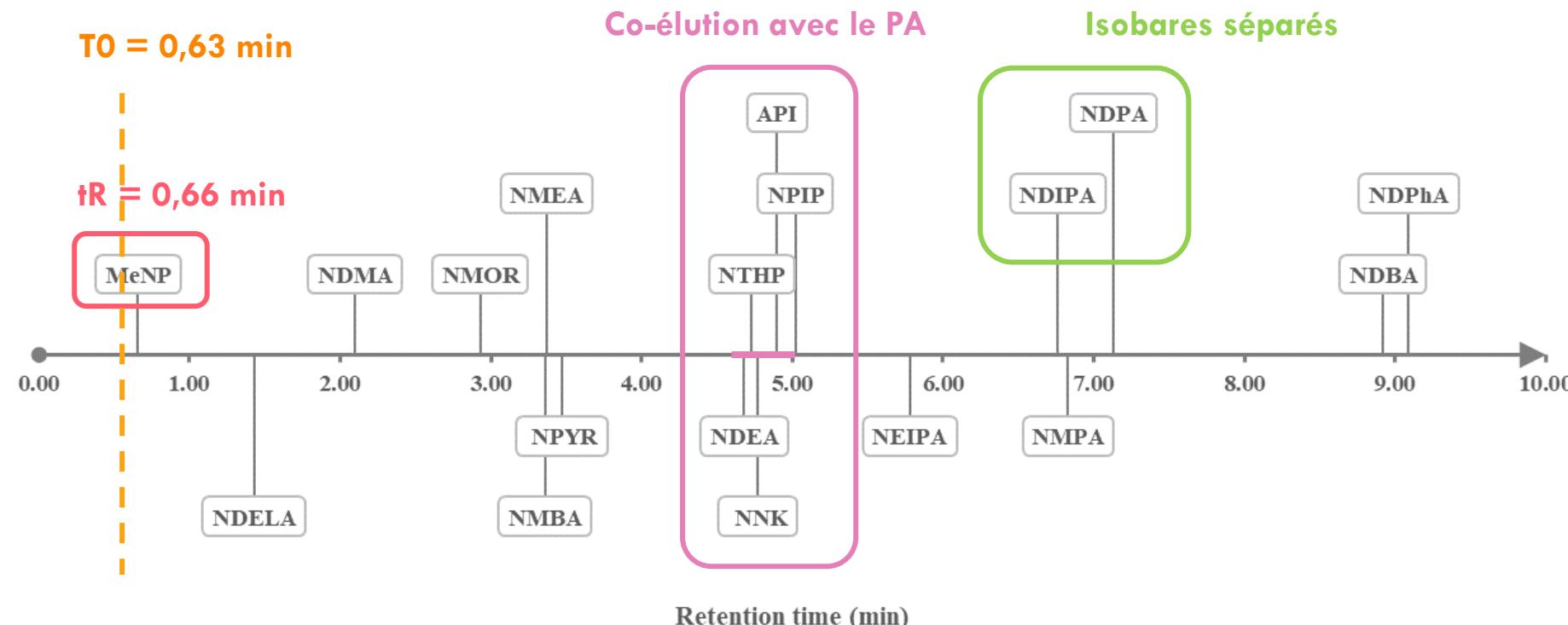


QSRR & RSM – Application

- Index de désirabilité
- Conditions prédites
 - pH 2,7 / tG 20 min



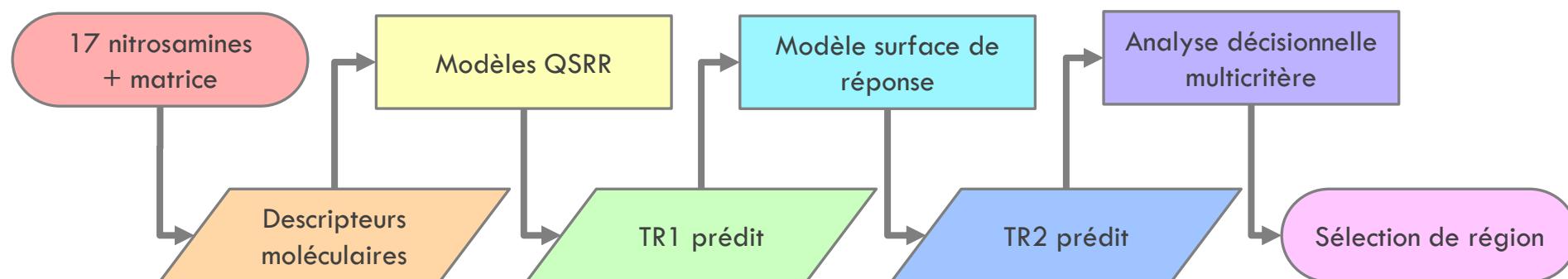
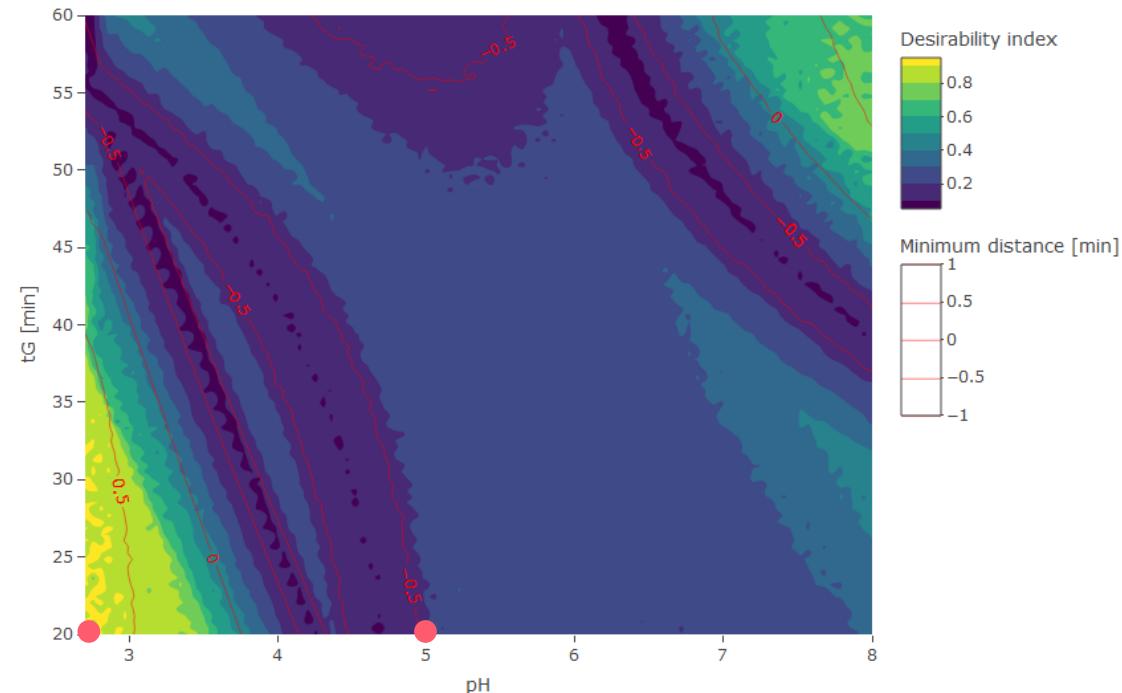
Vérification expérimentale (pH 2,7 / tG 20 min)



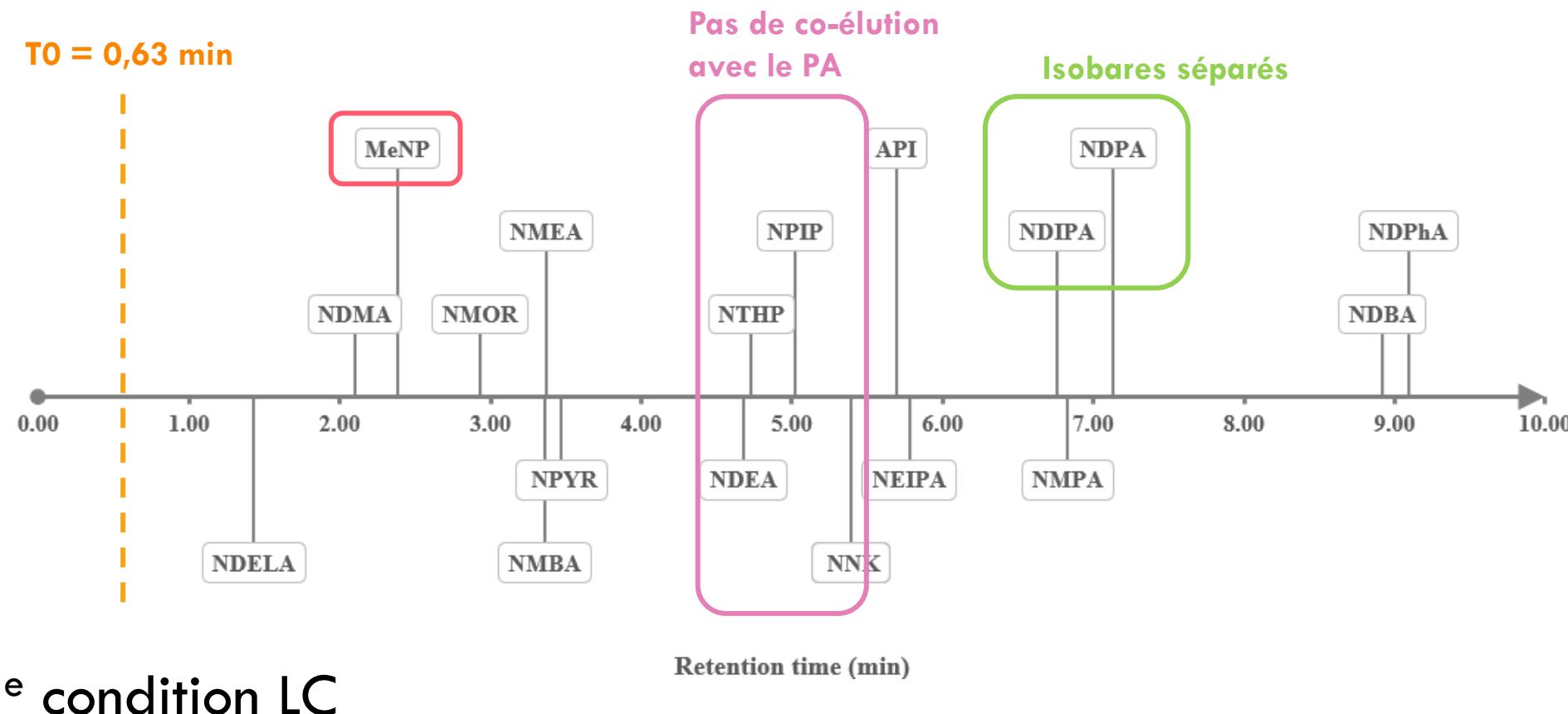
- 1^e condition LC

QSRR & RSM – Application

- Index de désirabilité
- Conditions prédites
 - pH 2,7 / tG 20 min
 - pH 5,0 / tG 20 min



Vérification expérimentale (pH 5,0 / tG 20 min)



RP-UHPLC



Acquity® Premier
UPLC® (Waters)

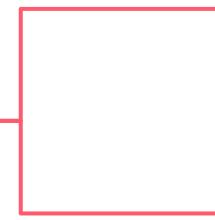
Phase mobile 1 : pH 2,7 (AF 0,1%)
NDMA, NDPA, NDIPA, NEIPA, NDBA, NPYR, NMEA, NMOR, NMBA, NMPA
et NDPhA

Phase mobile 2 : pH 5,0 (AcAm 10 mM)
MeNP, NPIP, NTHP, NNK, NDEA et NDELA

(APCI+)-MS/MS



Xevo® TQ-Absolute
(Waters)



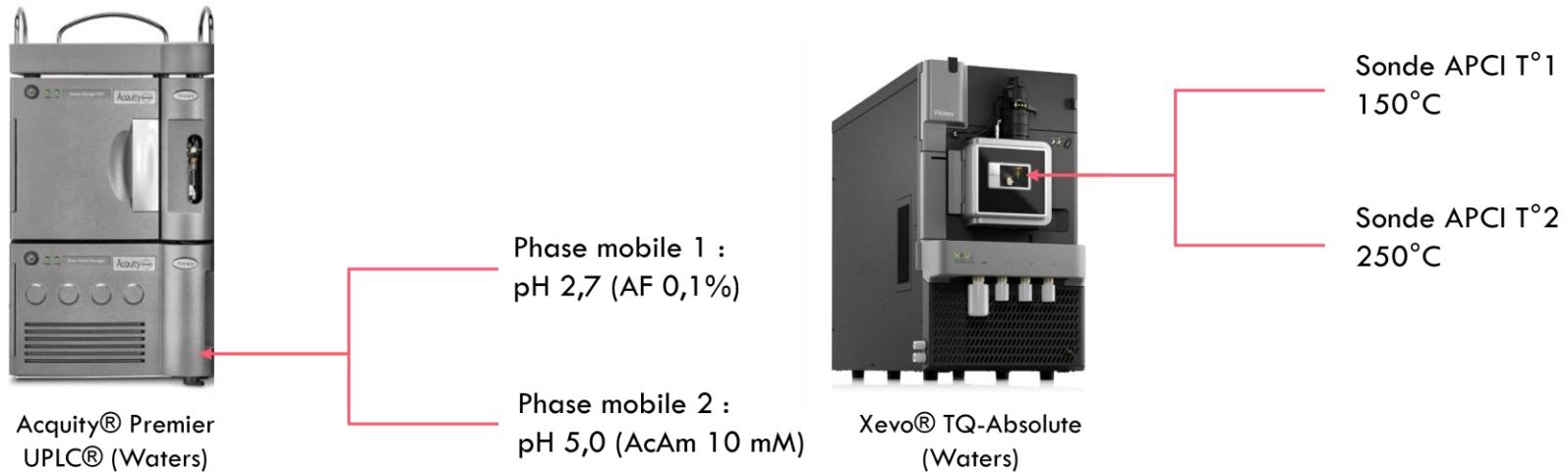
Sonde APCI T°1 : 150°C

NDMA, NDPA, NDIPA, NEIPA, NDBA, NPYR, NMEA, MeNP, NDEA, NTHP, NPIP et NDELA

Sonde APCI T°2 : 250°C

NMOR, NMBA, NDPHA, NNK et NMPA

RP-UHPLC-(APCI+)-MS/MS



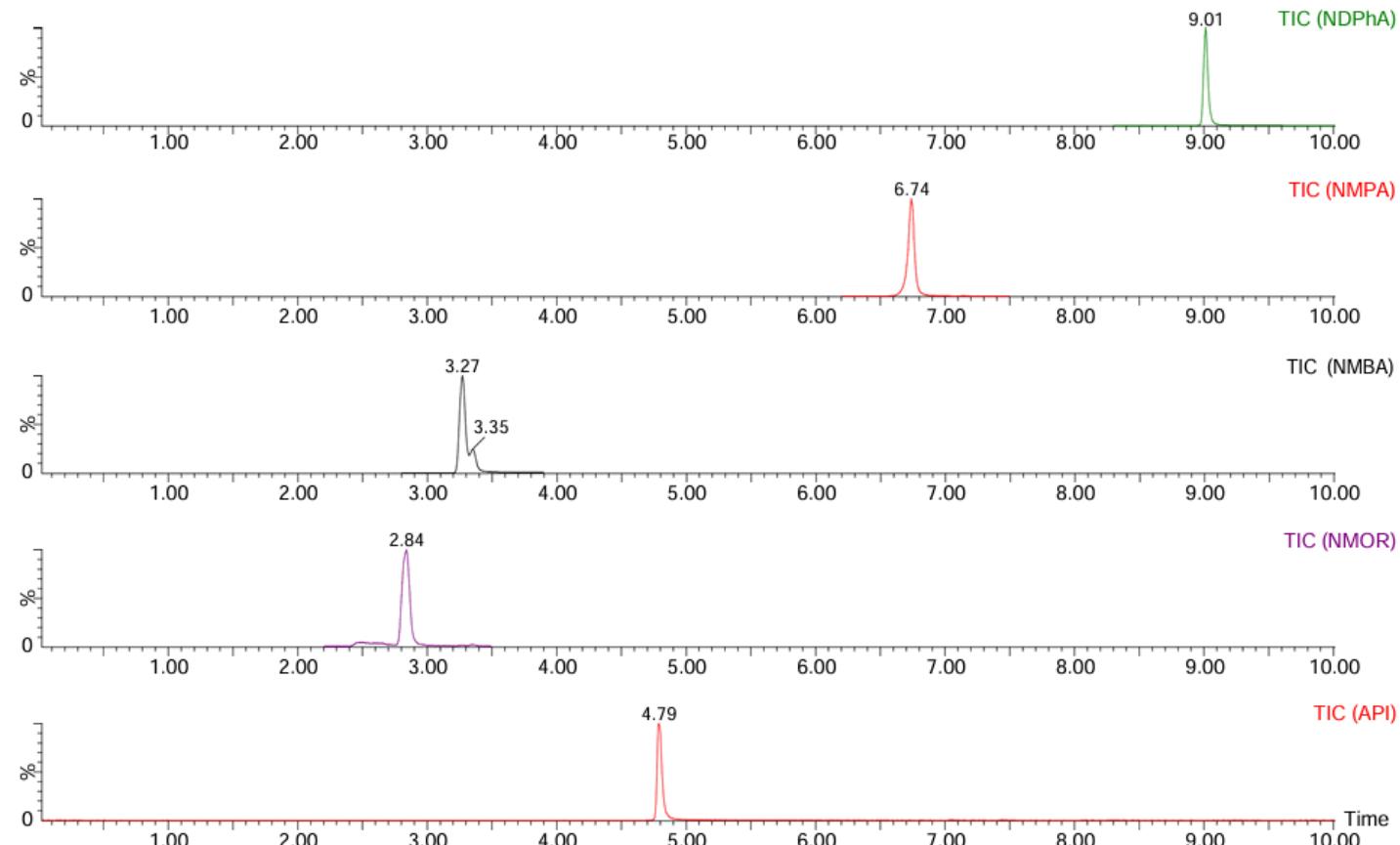
- ✓ Condition 1 : pH 2,7 / 250°C / tG 20 min
NMOR, NMBA, NDPHA et NMPA
- ✓ Condition 2 : pH 2,7 / 150°C / tG 20 min
NDMA, NDPA, NDIPA, NEIPA, NPYR, NMEA et NDBA
- ✓ Condition 3 : pH 5,0 / 150°C / tG 20 min
MeNP, NPIP, NTHP, NNK, NDEA et NDELA

Analyse de 17 nitrosamines en une seule séquence

RP-UHPLC-(APCI+)-MS/MS

✓ Condition 1 : pH 2,7 / 250°C / tG 20 min

NMOR, NMBA, NDPHA et NMPA séparées du principe actif

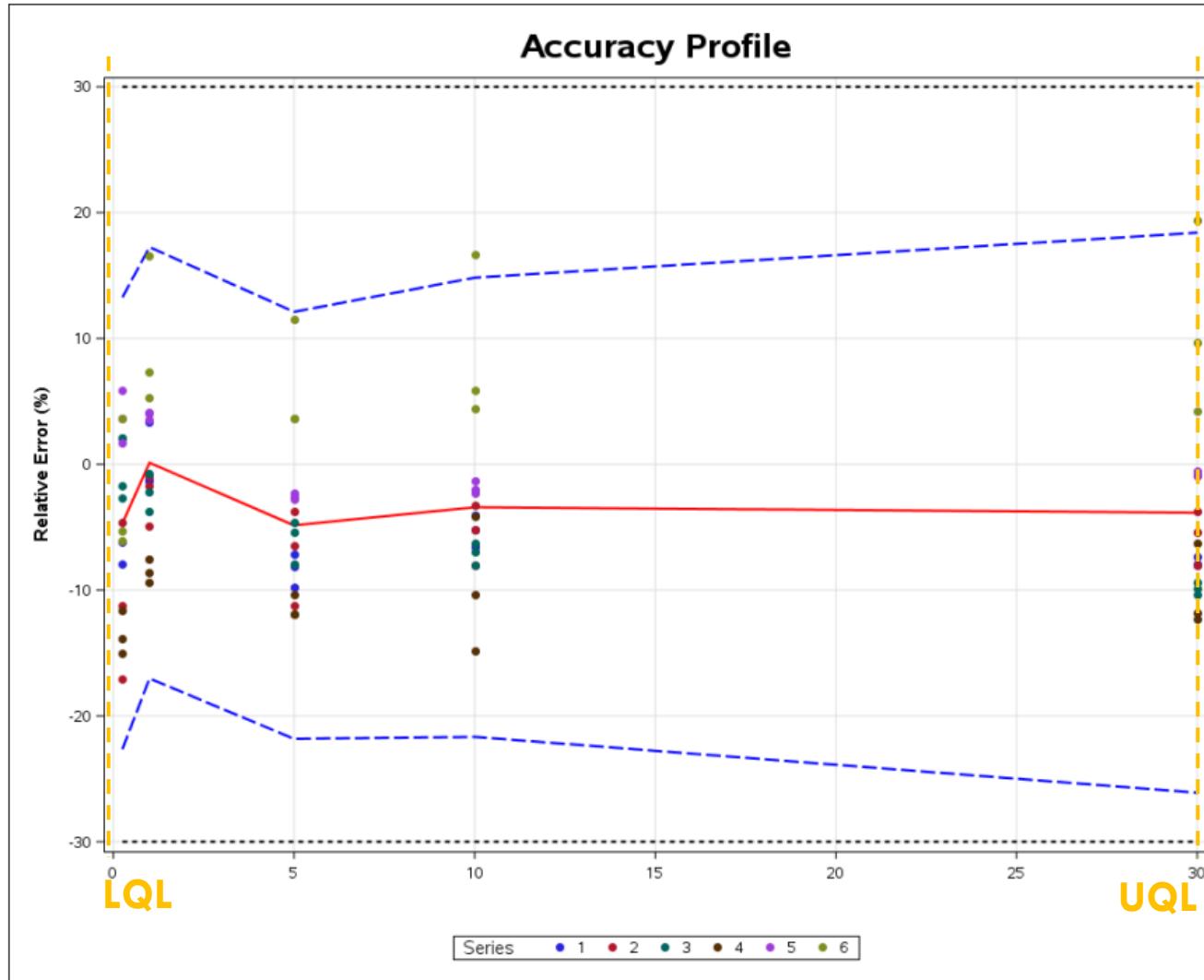


Validation – ICH Q2(R2)

■ Essai limite quantitatif

- Sélectivité / spécificité
- Intervalle de dosage
 - ✓ Fonction de réponse
 - ✓ Linéarité
 - ✓ Limites basses : limite de détection & limite de quantification
- Approche combinée
 - ✓ Profil d'erreur totale

NMBA (régression linéaire passant par 0 et niveau 3)



Limite de détection :
0,02 ng/mL

Intervalle de dosage validé :
0,25 – 30 ng/mL

..... Limite d'acceptation : 70 – 130%
- - - - - Intervalle de tolérance : 95%
— Biais

Messages-clé

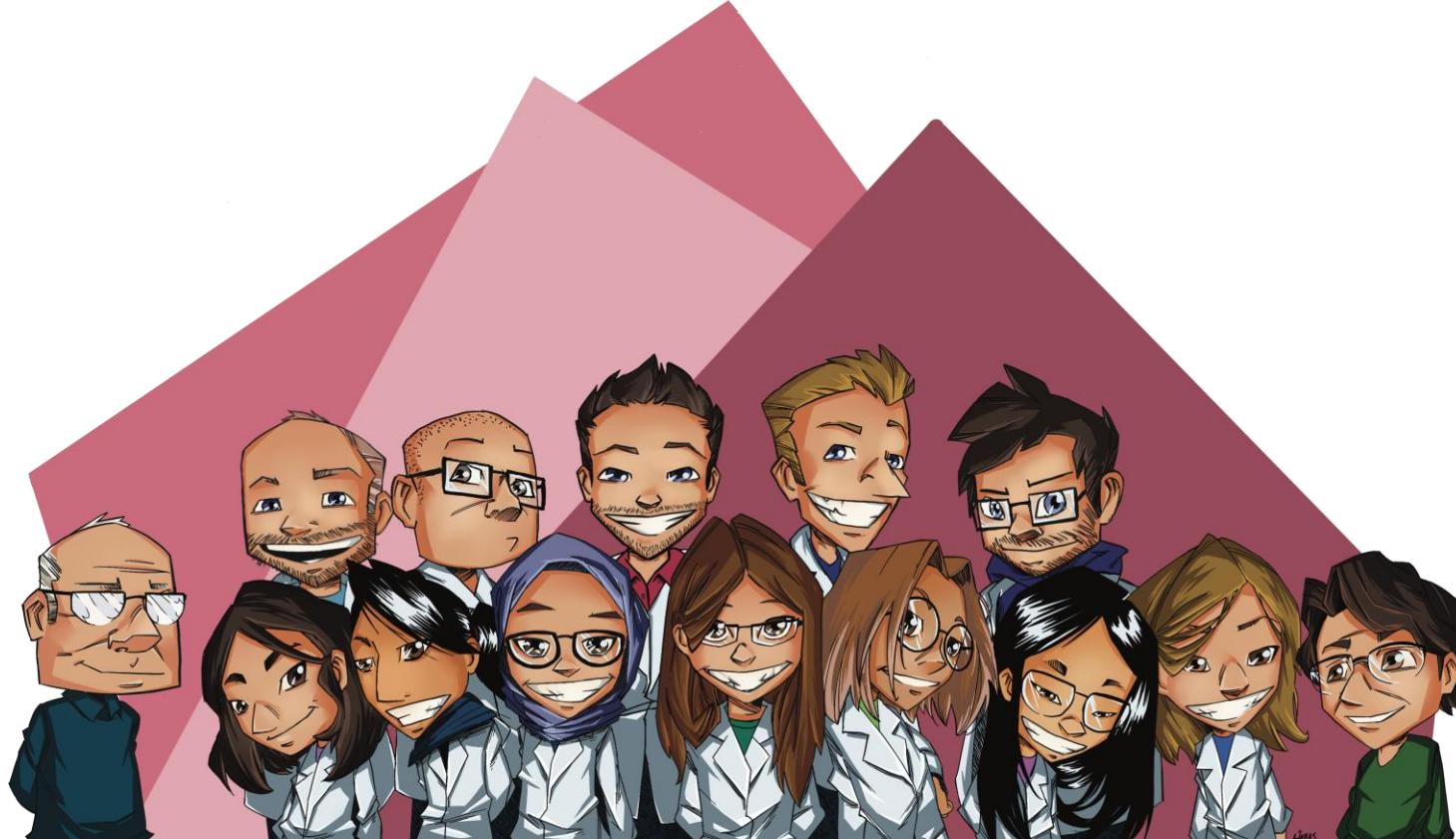
- Approche QSRR facilite le développement de méthodes LC
 - Séparation des isobares
 - Gestion de l'effet de matrice
 - 17 nitrosamines en une seule séquence
- Méthodes validées
 - Spécifiques, sensibles, exactes
 - Limites de détection et de quantification d'au moins 0,02 ng/mL et 1 ng/mL

→ Perspectives : étendre la stratégie *in silico*

- Autres médicaments
- Nouvelles nitrosamines génériques et spécifiques aux substances actives



LIÈGE université
**Laboratory of Pharmaceutical
Analytical Chemistry**



CIRM ULiège