



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

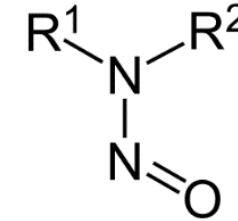
Yue ZHANG

Université de Liège, CIRM, Laboratoire de Chimie Analytique Pharmaceutique



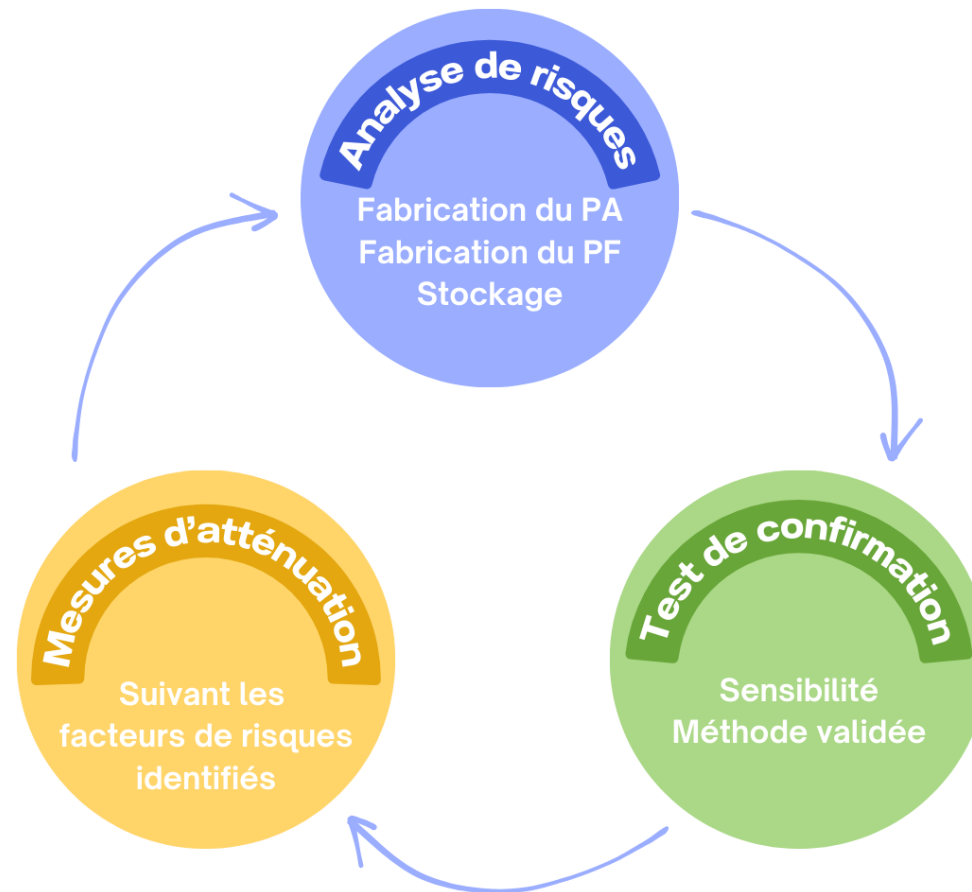
# Nitrosamine ? Qu'est-ce que c'est ?

- 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

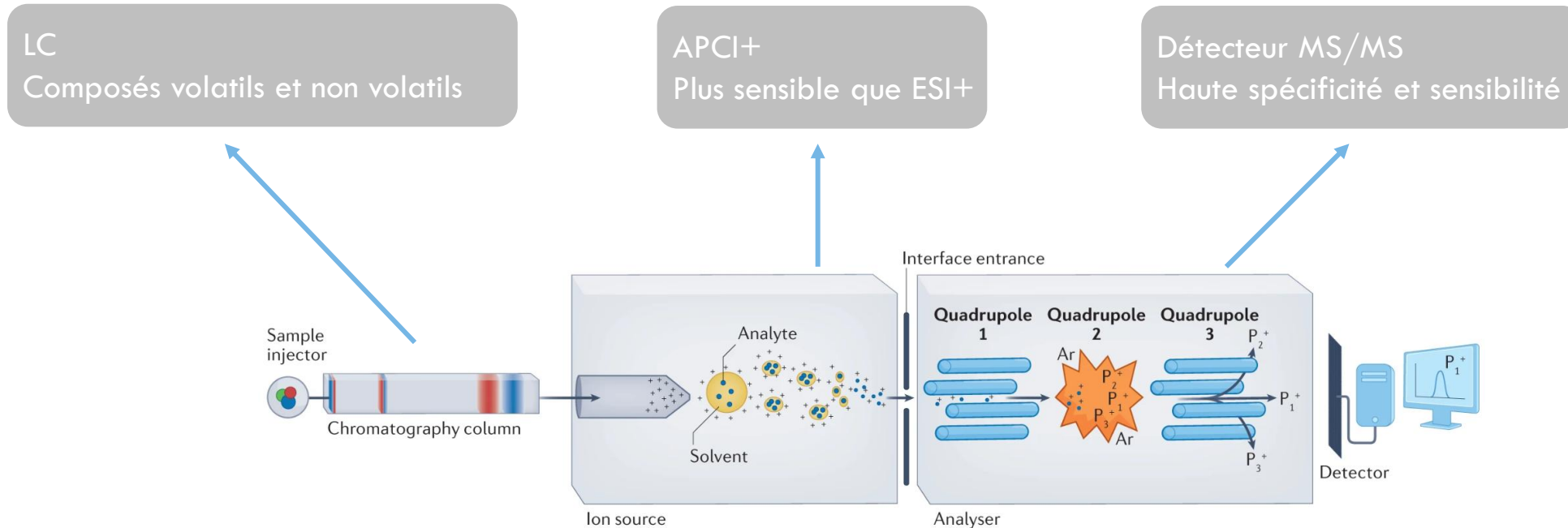


Questions and answers for marketing authorisation holders/applicants on the CHMP Opinion for the Article 5(3) of Regulation (EC) No 726/2004 referral on nitrosamine impurities in human medicinal products, Rev. 21, 2024, EMA.

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

# Choix de la technique analytique

## ■ RP-UHPLC-(APCI+)-MS/MS

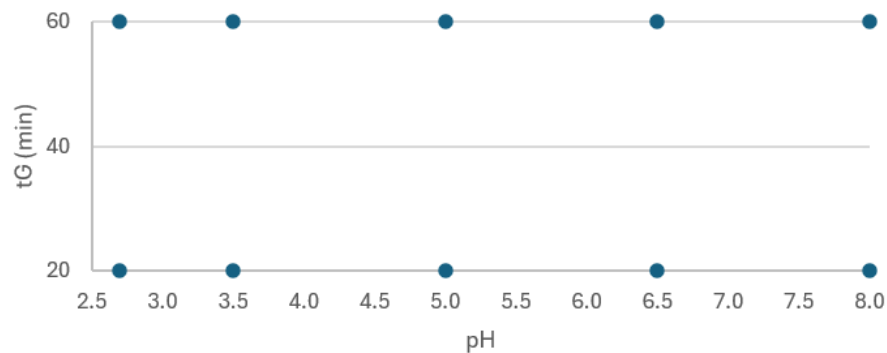


## ■ Défis : 17 nitrosamines en une seule séquence

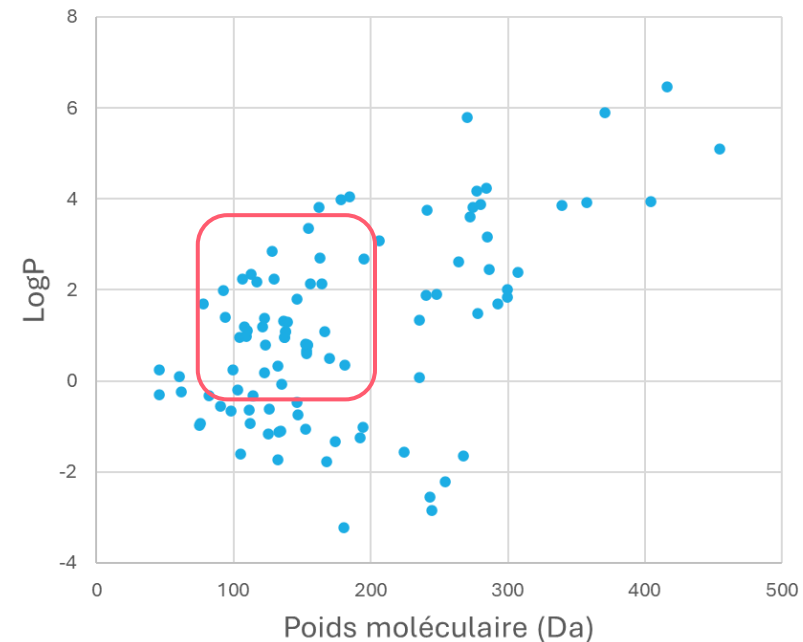
- ✓ Séparation des isobares
- ✓ Effet de matrice
- ✓ Performance quantitative adéquate

# 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



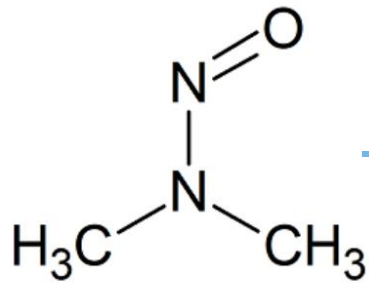
Van Laethem *et al.*, Data Brief 42 (2022) 108017.

Kumari *et al.*, Molecules 28 (2023) 1–17.

Van Laethem *et al.*, Molecules 27 (2022) 8306.

# QSRR – Objectifs

- Molécules connues
  - Ex : NDMA

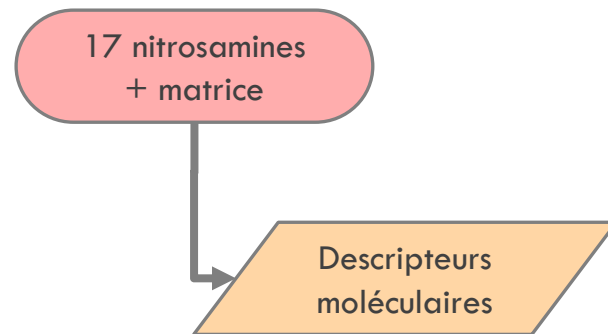


MinAbsEStateIndex  
MinPartialCharge  
NumHAcceptors  
MolLogP  
Atom count  
Etc

Prédire le TR

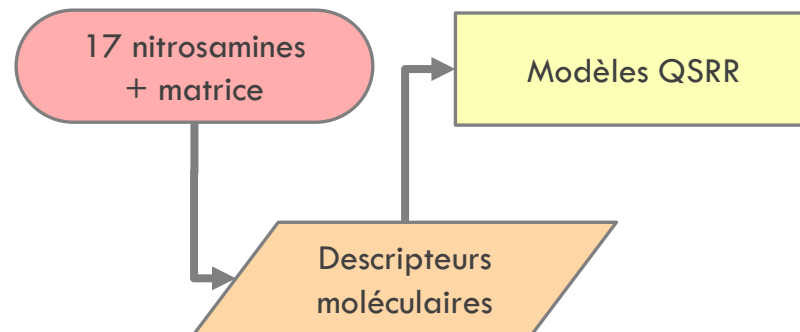
Anticiper la séparation

# QSRR – Application



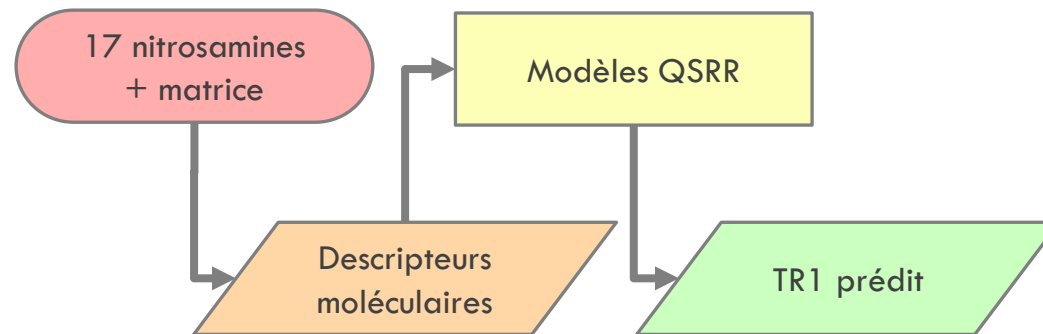
## QSRR – Application

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



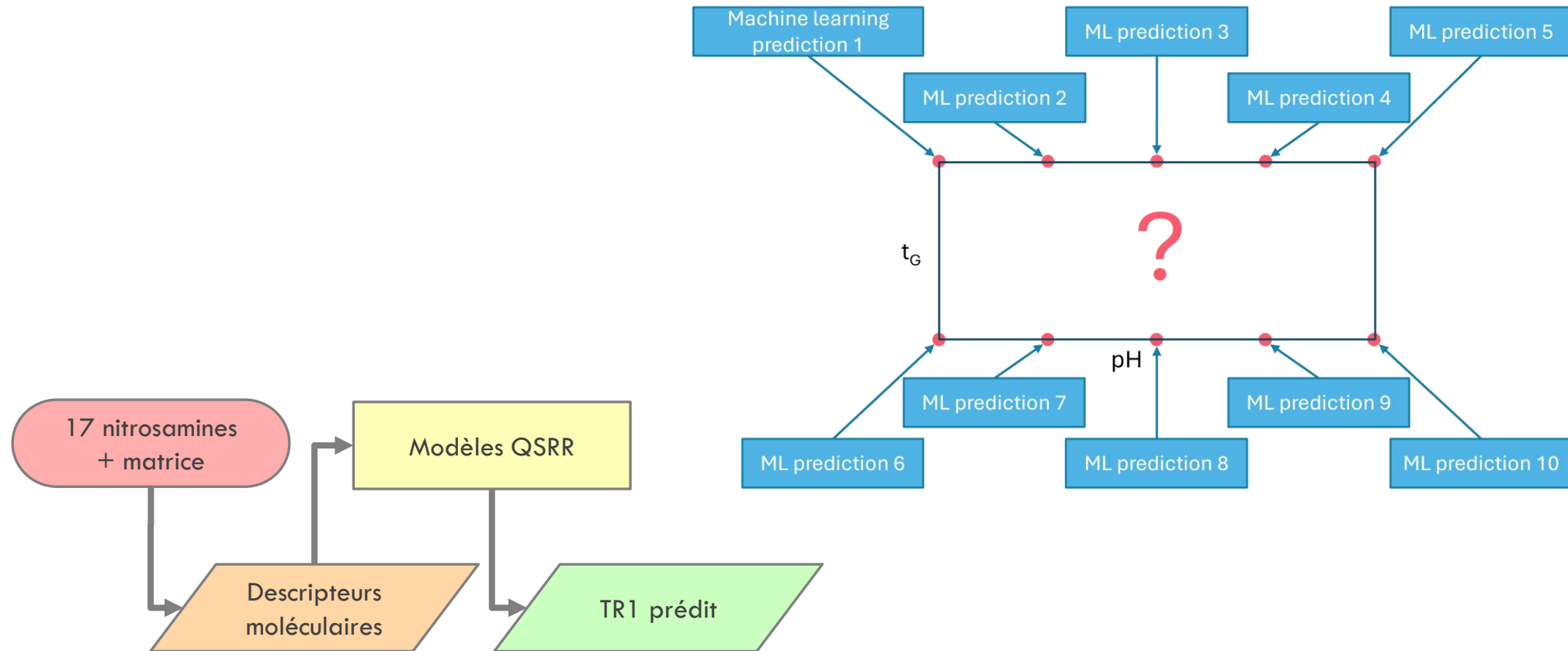


# QSRR – Application

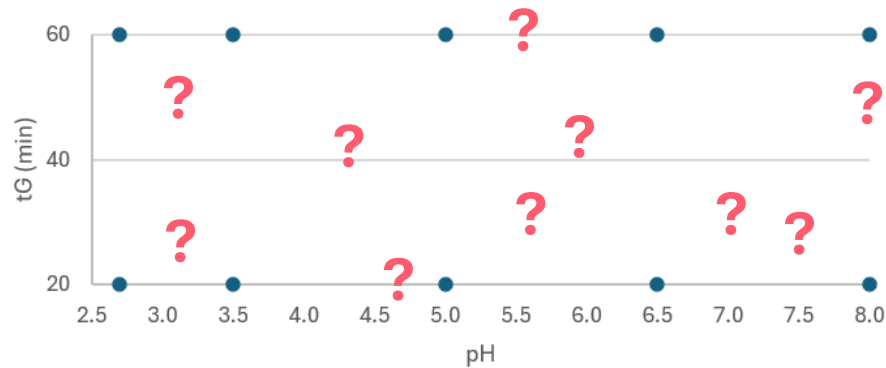


# QSRR – Application

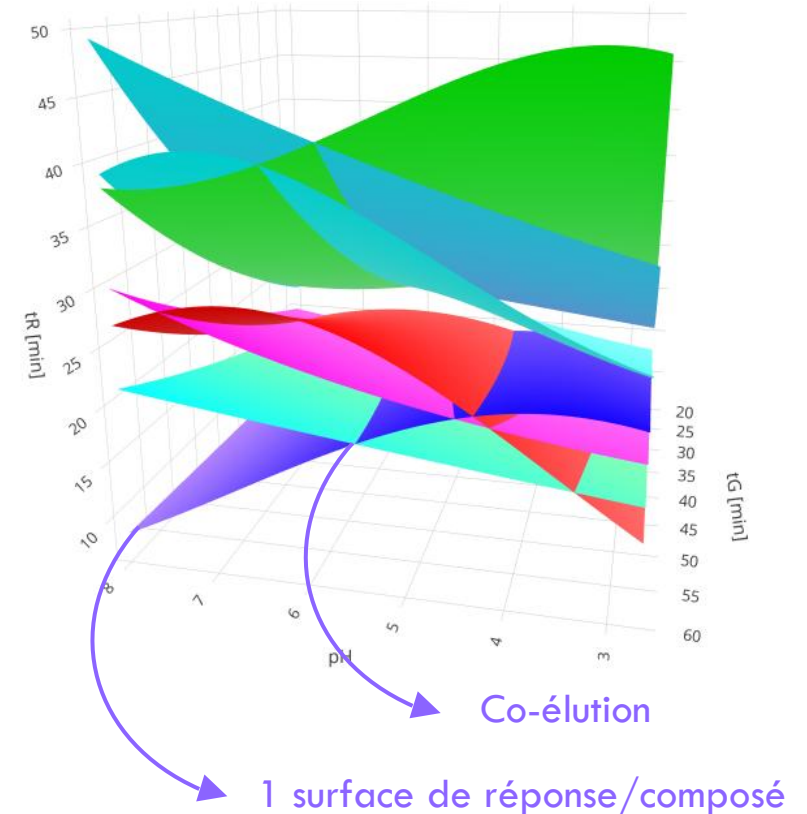
- TR1 prédit aux 10 conditions initialement fixées



# Modèle de surface de réponse (RSM) – Application

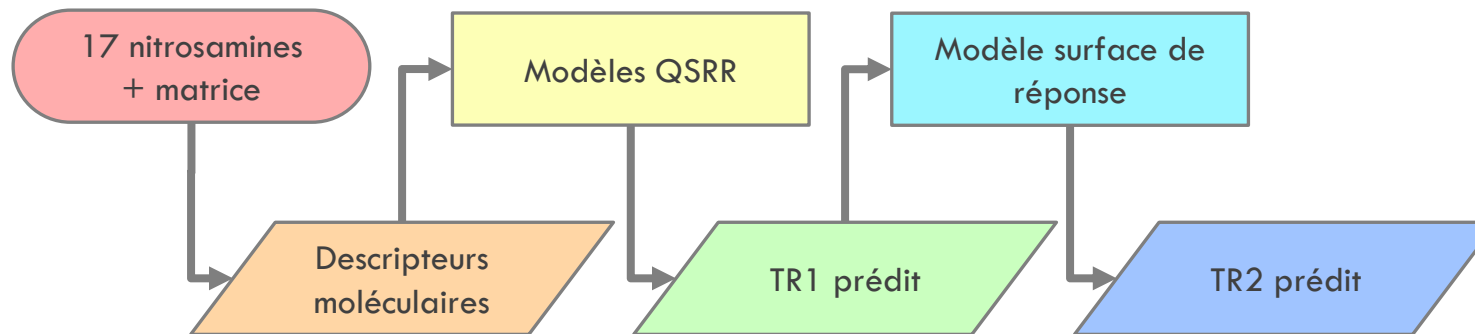


- **Avantages :**
  - Prédire le TR dans l'espace opérationnel
  - Anticiper la séparation

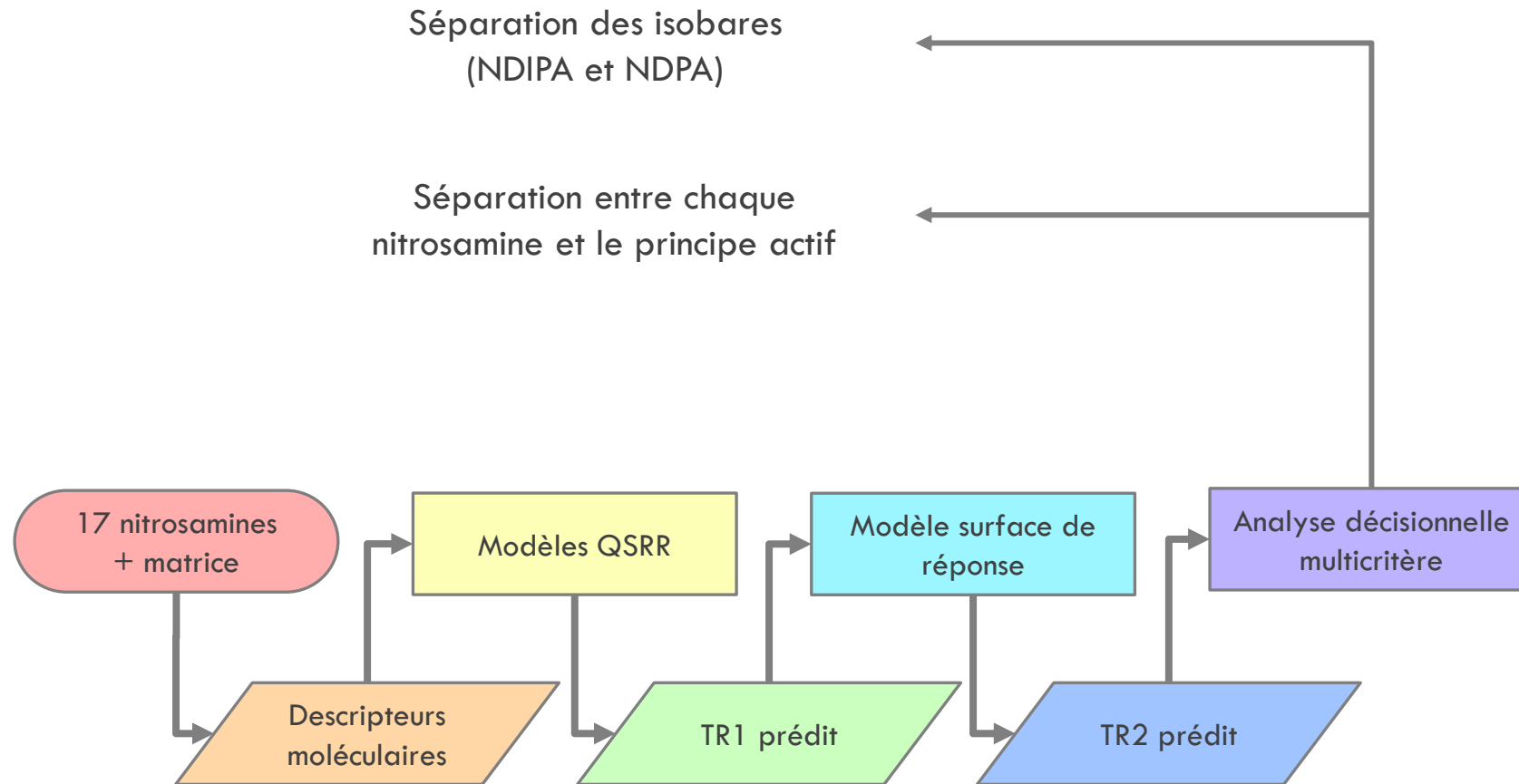


# QSRR & RSM – Application

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

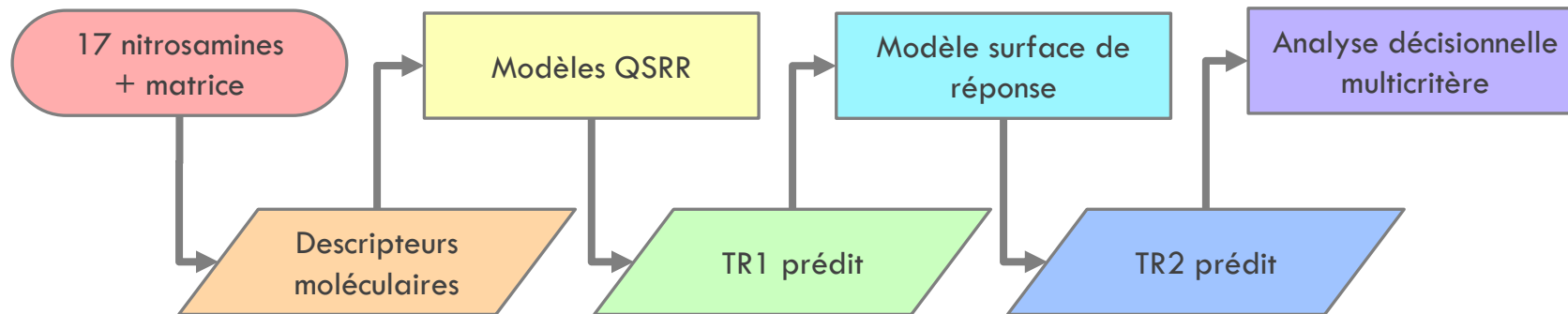
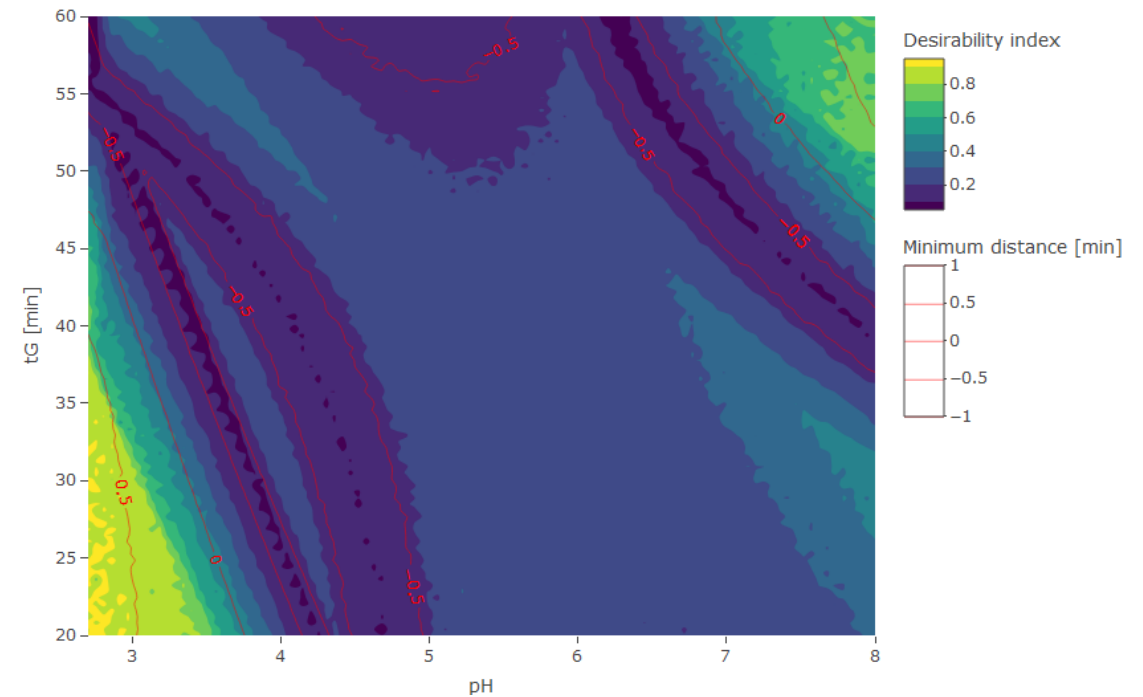


# QSRR & RSM – Application



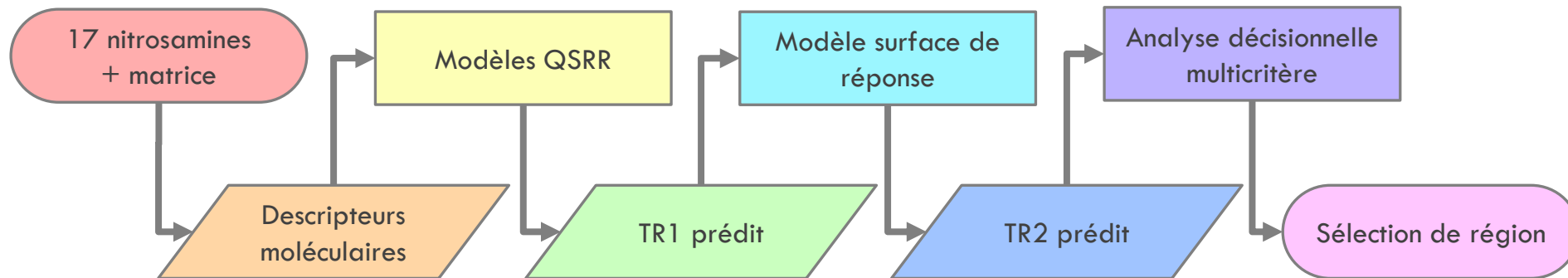
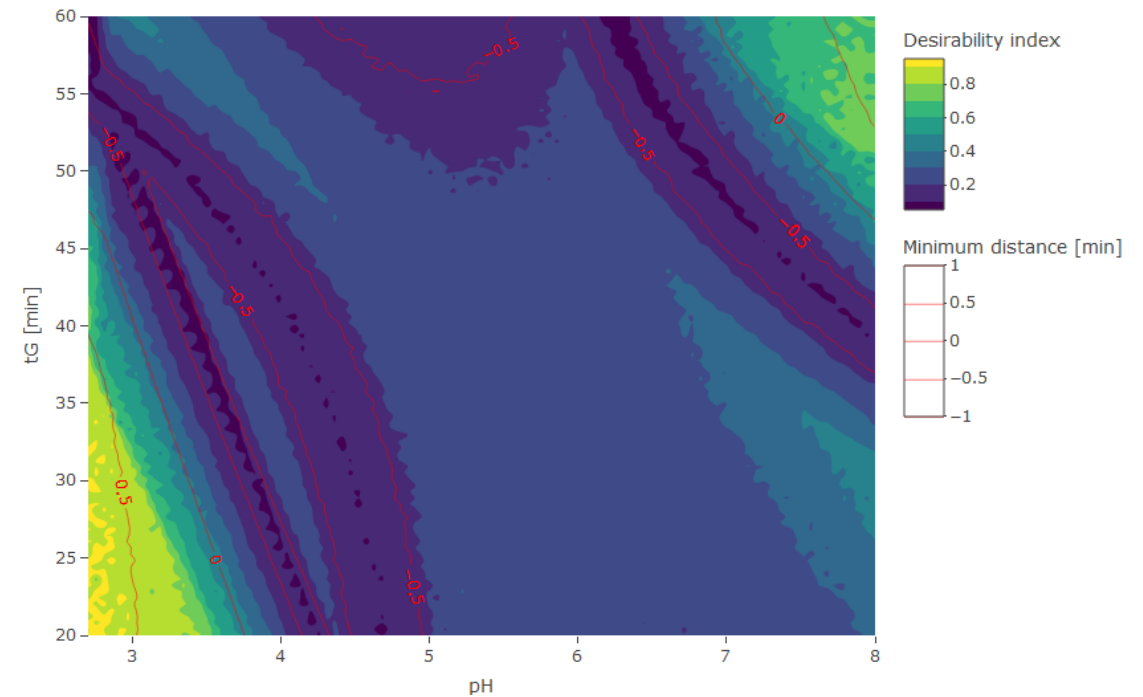
# QSRR & RSM – Application

## ■ Index de désirabilité



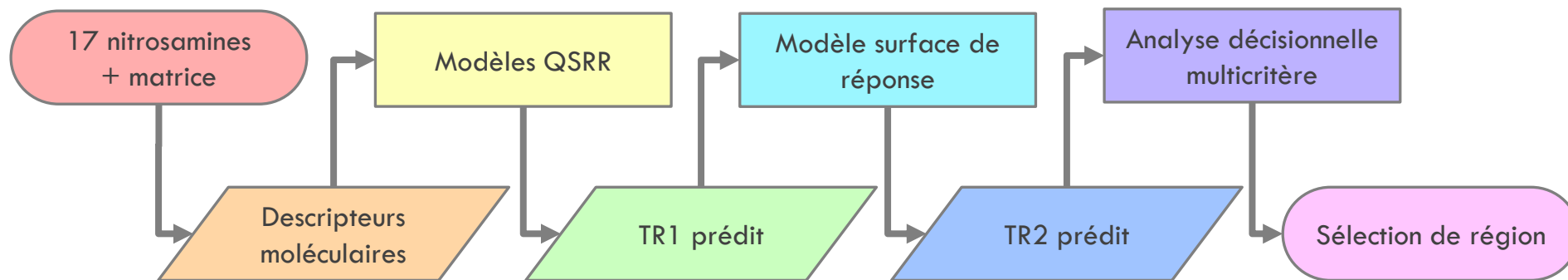
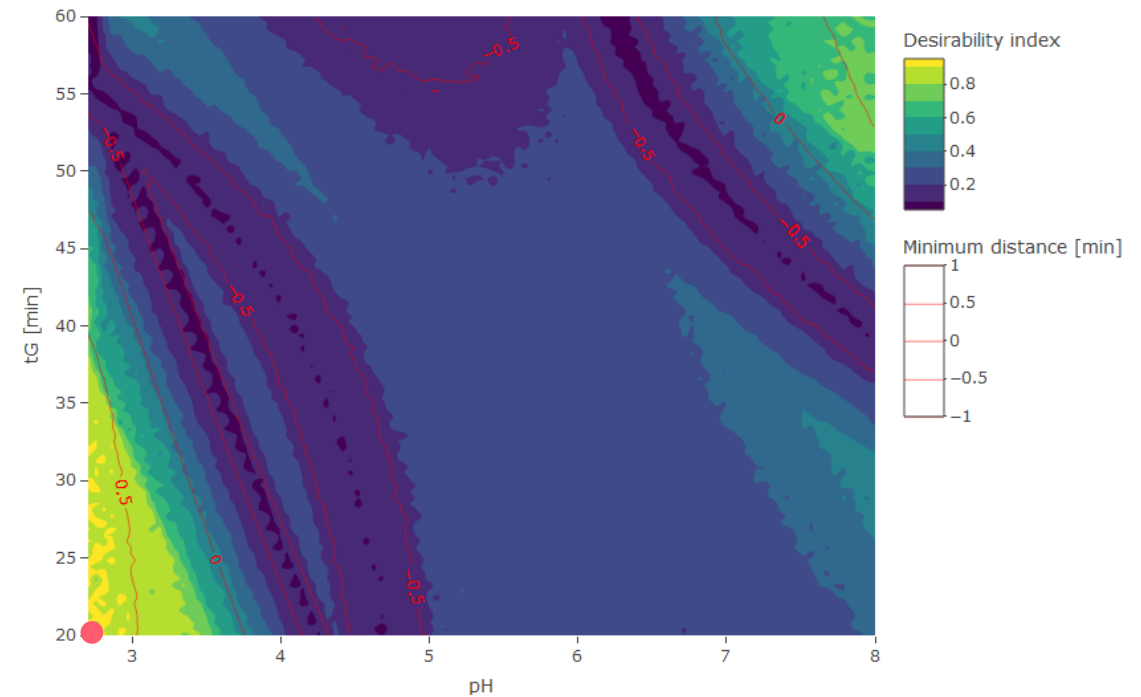
# QSRR & RSM – Application

## ■ Index de désirabilité



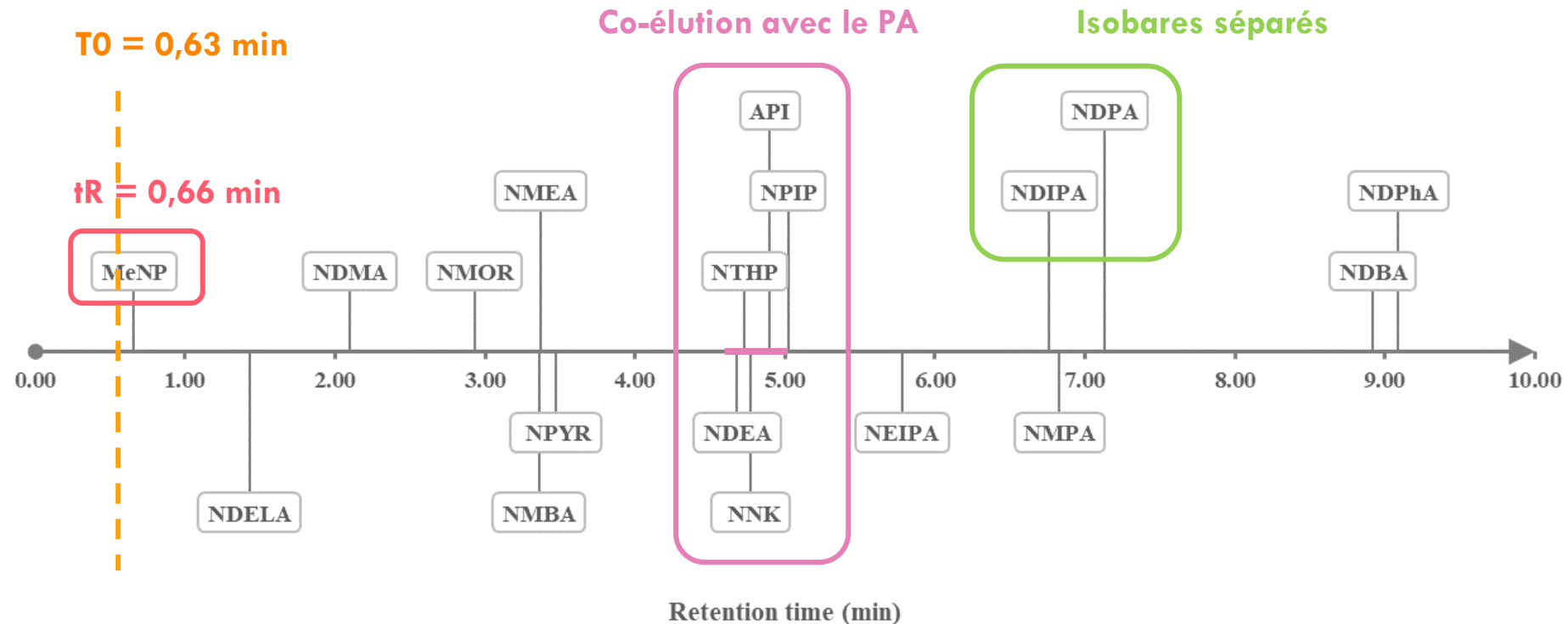
# QSRR & RSM – Application

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





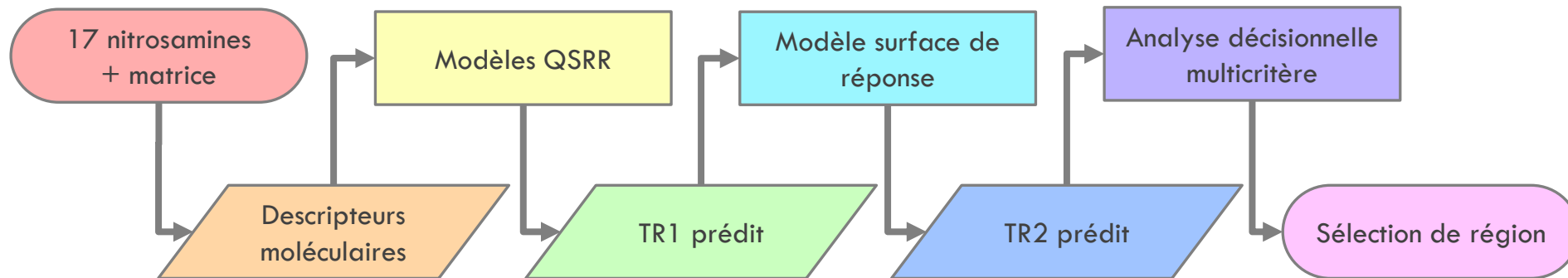
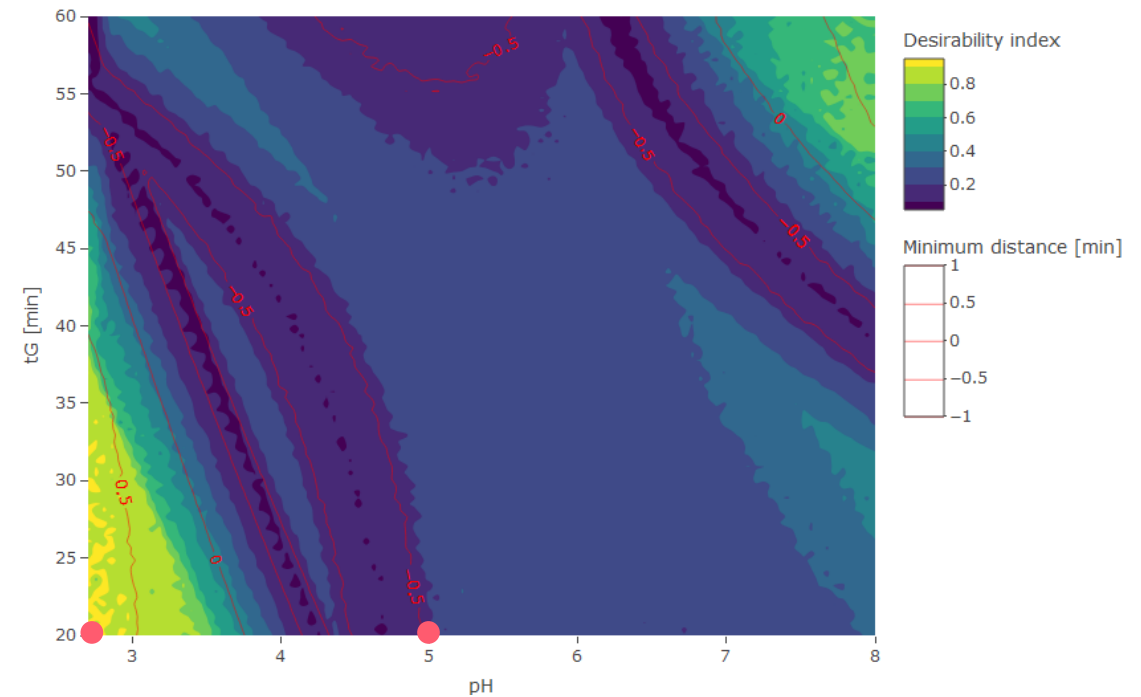
# Vérification expérimentale (pH 2,7 / tG 20 min)



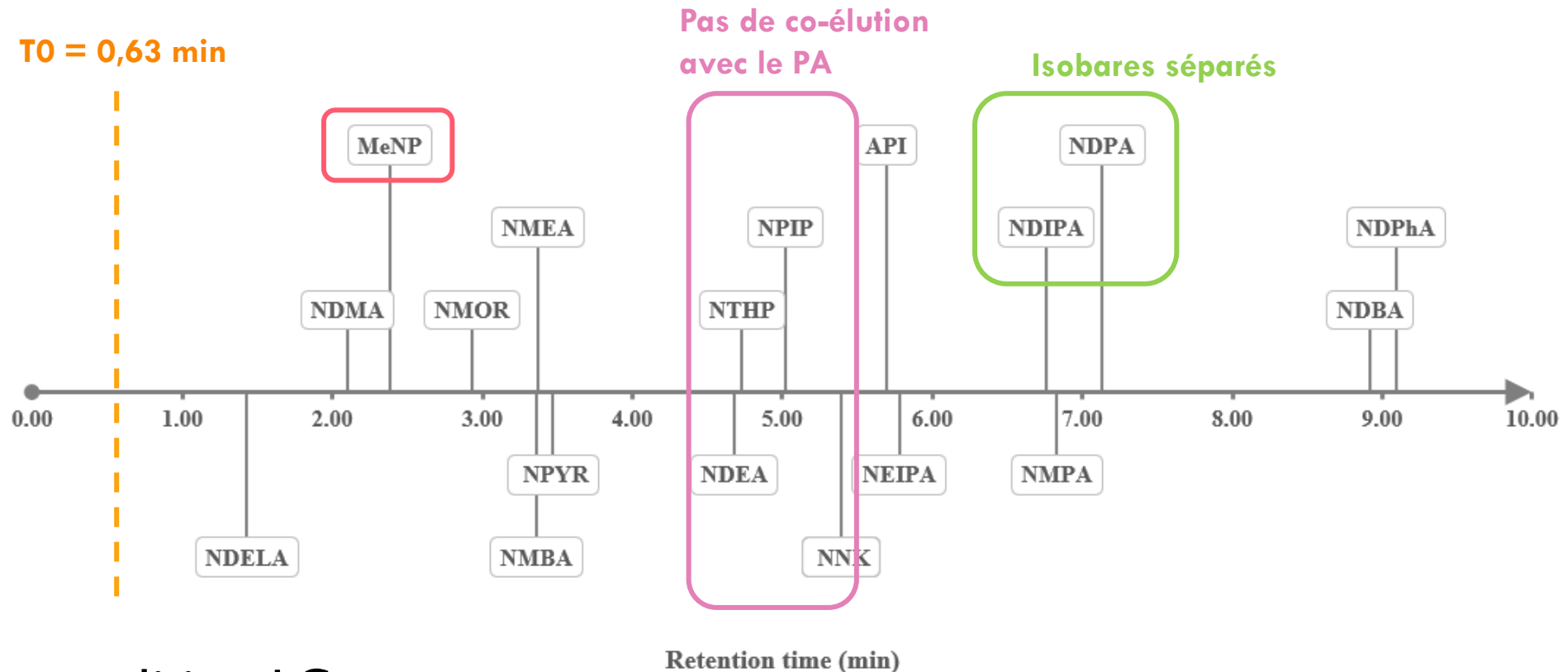
- 1<sup>e</sup> condition LC

# 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)



- 2<sup>e</sup> condition LC

# 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



Acquity® Premier  
UPLC® (Waters)

Phase mobile 1 :  
pH 2,7 (AF 0,1%)

Phase mobile 2 :  
pH 5,0 (AcAm 10 mM)



Xevo® TQ-Absolute  
(Waters)

Sonde APCI T°1 :  
150°C

Sonde APCI T°2 :  
250°C

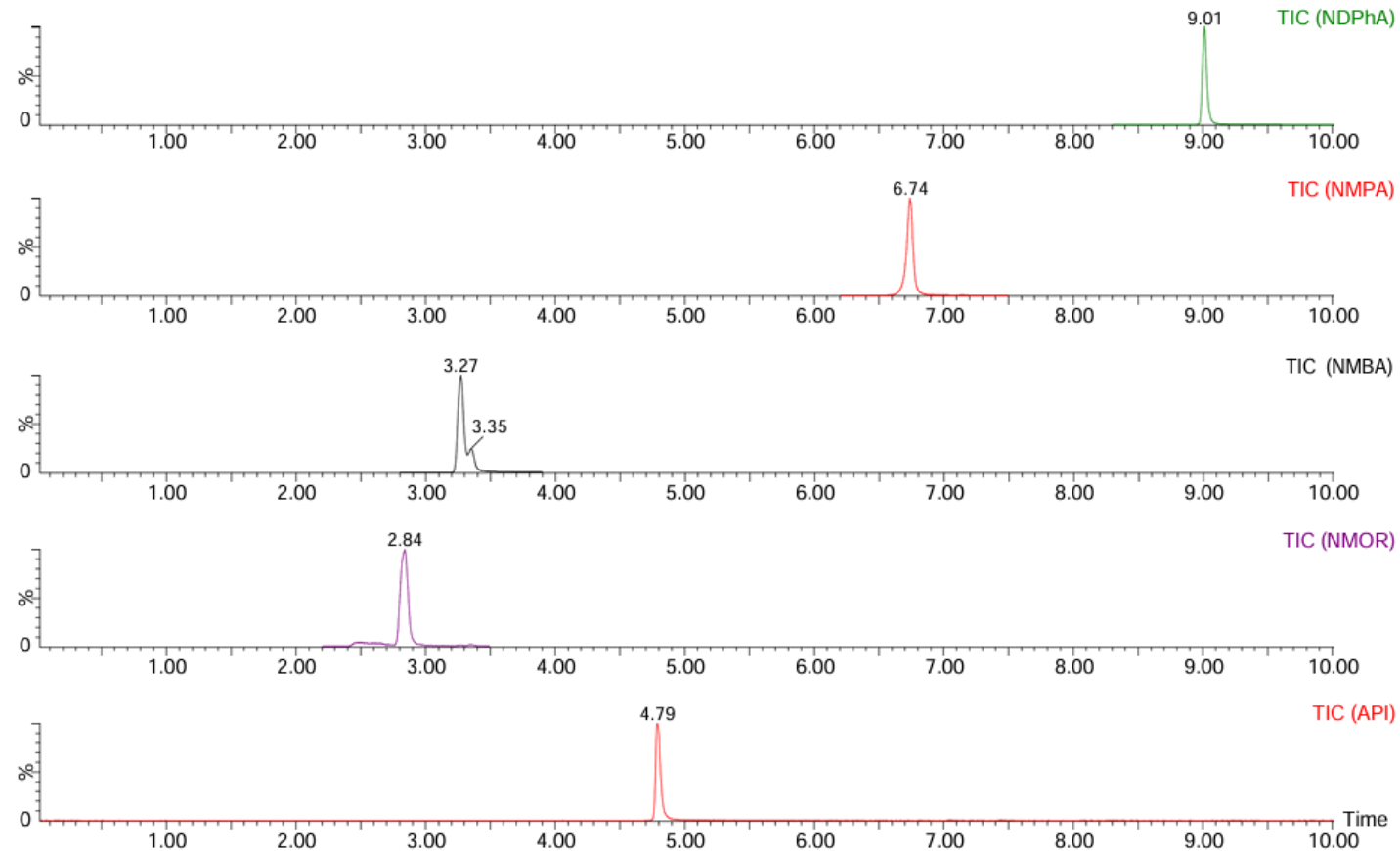
- ✓ Condition 1 : pH 2,7 / 250°C / tG 20 min  
NMOR, NMBA, NDPhA et NMPA
- ✓ Condition 2 : pH 2,7 / 150°C / tG 20 min  
NDMA, NDPA, NDIPA, NEIPA, NPYR, NMEA et NDBA
- ✓ Condition 3 : pH 5,0 / 150°C / tG 20 min  
MeNP, NPIP, NTHP, NNK, NDEA et NDELA

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



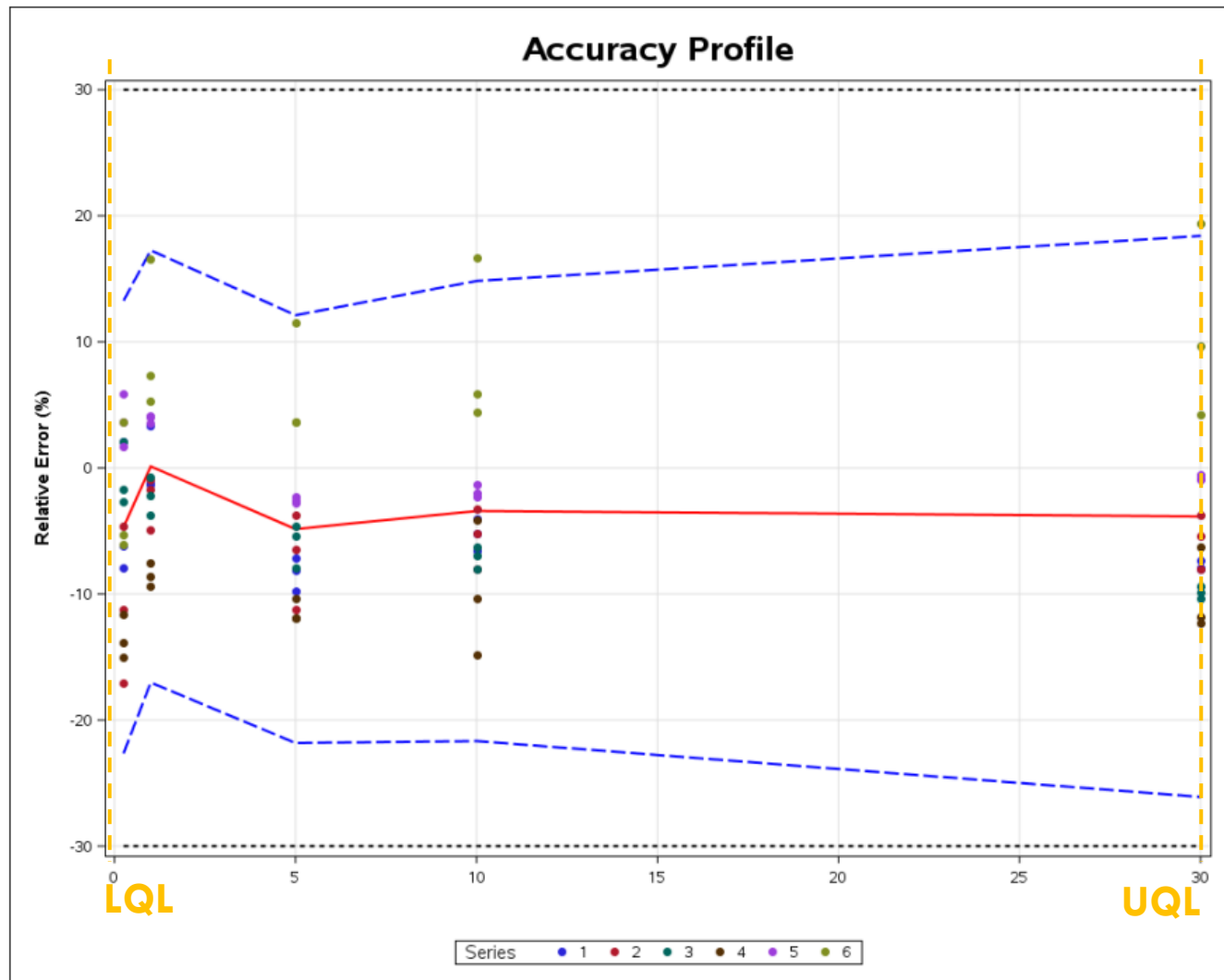
# Validation – ICH Q2(R2)

## ■ 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

