

11.0/2.05.42.00

2.5.42

N-Nitrosamine in Wirkstoffen

N-Nitrosamine besitzen häufig mutagene und kancerogene Eigenschaften. 2018 wurde erstmals im Wirkstoff Valsartan eines chinesischen Herstellers das *N*-Nitrosamin *N*-Nitrosodimethylamin (NDMA) entdeckt^{1,2)}, worauf mehrere NDMA-belastete Arzneimittel zurückgerufen wurden. Ursache für das Auftreten von NDMA war eine Umstellung des Synthesewegs für den Tetrazolring des Arzneistoffs unter Verwendung von Natriumazid und Natriumnitrit sowie Dimethylformamid (DMF) als Lösungsmittel. DMF ist nicht stabil. Unter Basenkatalyse bzw. thermischer Belastung bildet sich in geringem Ausmaß Dimethylamin, das an sich kein Problem darstellt. Allerdings kann daraus in Gegenwart von Nitrit in saurer Lösung NDMA entstehen. Kurze Zeit später wurde NDMA auch in weiteren Sartanen mit Tetrazolring nachgewiesen sowie weitere *N*-Nitrosamine, wie z. B. *N*-Nitrosodiethylamin (NDEA) oder *N*-Nitrosodiisopropylamin (NDiPA) in diesen Wirkstoffen gefunden^{3,4)}. In der Folgezeit wurde NDMA auch in Metformin⁵⁻⁸⁾, Ranitidin^{9,10)} und Proglitazon¹¹⁾ sowie 1-Methyl-4-nitrosopiperazin (MNP) in Rifampicin^{12,13)} entdeckt (siehe Abb. 1). Für Übersichtsarbeiten zu *N*-Nitrosaminen in Arzneistoffen siehe auch Lit.^{4,14-16)}.

N-Nitrosamine werden als mutagene Substanzen eingestuft und sind daher entsprechend der Richtlinie M7 *Mutagenic Impurities*¹⁷⁾ des *International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) zu behandeln und zu begrenzen.

Als Konsequenz aus den ersten *N*-Nitrosamin-Funden in Sartanen wurden für die Hersteller von Wirkstoffen und Arzneimitteln Richtlinien und Regularien zur Begrenzung dieser Substanzen von den Zulassungsbehörden wie der *European Medicines Agency* (EMA)^{18,19)} und der *Food and Drug Administration* (FDA)²⁰⁾ erlassen. Die Monographien der Sartane in der Ph. Eur. wurden dahingehend geändert, dass zunächst Grenzwerte für *N*-Nitrosamine aufgeführt wurden. Mit der Ph. Eur. 11.0 wird nun im Abschnitt „Herstellung“ der Monographien auf die Problematik hingewiesen und Hersteller werden verpflichtet, ihren Prozess auf das Risiko der *N*-Nitrosamin-Bildung zu beurteilen sowie die Kontamination zu minimieren und geeignete Kontrollstrategien zu implementieren. Die Allgemeine Methode 2.5.42 dient zur Unterstützung der Hersteller.

N-Nitrosamine entstehen aus sekundären und tertiären Aminen durch Reaktion mit Nitrit in saurer Lösung (siehe Abb. 2). Nitrate können unter reduzierenden Bedingungen als Nitrit-Quelle dienen. Amine werden im Produktionsprozess als Reagenzien in Syntheseschritten eingesetzt oder dienen zum Abfangen von Protonen, die bei Reaktionen freigesetzt werden. Bei unzureichender Aufreinigung können diese in späteren Reaktionsschritten zur Bildung von *N*-Nitrosaminen führen. Ein

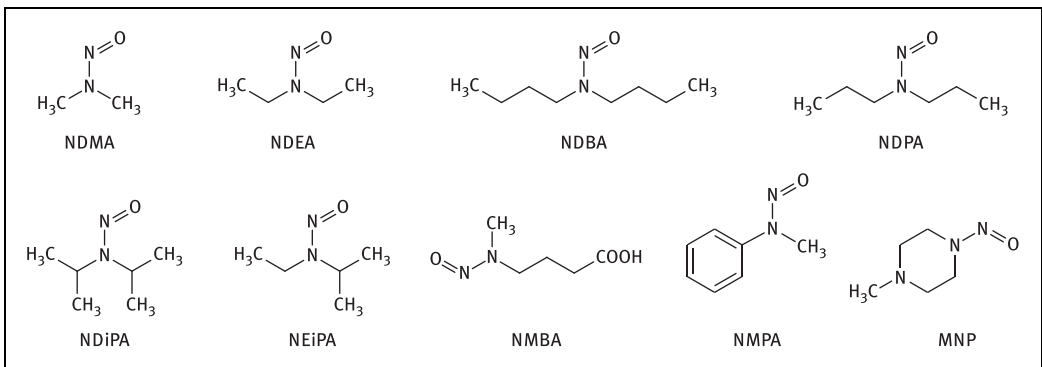


Abb. 1: In Arzneistoffen detektierte *N*-Nitrosamine

Beispiel ist die Synthese von Metformin ausgehend von Dimethylamin und Cyanoguanidin. Dimethylamin-Reste können mit Nitrit aus Hilfsstoffen wie Povidon oder Hypromellose zu NDMA reagieren^{8, 21}). Die Kontamination von Rifampicin mit MNP resultiert vermutlich aus der Reaktion von Nitrit mit dem in der Synthese eingesetzten 1-Amino-4-Methylpiperazin bzw. dessen Oxidation¹³). Die Bildung von NDMA in Valsartan und anderen Sartanen wurde durch die Verwendung von DMF als Lösungsmittel verursacht (s.o.). Das hieraus in geringen Mengen freigesetzte Dimethylamin reagierte mit dem im folgenden Syntheseschritt eingesetzten Nitrit zu NDMA¹). NDMA in Ranitidin entsteht durch die Zersetzung des Wirkstoffs während der Lagerung^{10, 15}). Daher hat das Bundesamt für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) auf Basis eines Beschlusses der EU-Kommission 2021 das vorläufige Ruhen aller Zulassungen Ranitidin-haltiger Arzneimittel angeordnet. Eine Kontamination von Arzneistoffen während der Lagerung konnte auch bei Produkten beobachtet werden, die in Blisterverpackungen mit einer Deckelfolie aus Nitrocellulose gelagert wurden. Die Bildung der Verunreinigungen wurde durch die Reaktion von Nitrocellulose-Abbauprodukten mit niedermolekularen Aminen erklärt, die entweder in der Druckfarbe oder in der Verpackung vorhanden sind, während des Heißversiegelungsprozesses gebildet und auf das Produkt innerhalb des Blisters übertragen wurden²²). Wasser als *N*-Nitrosamin-Quelle aufgrund von Spuren von Nitrit wird zwar auch diskutiert, aber nicht als signifikantes Risiko eingeschätzt²³).

Für eine Zusammenfassung verschiedener Reaktionswege zur Bildung von *N*-Nitrosoverbindungen siehe Lit.²⁴).

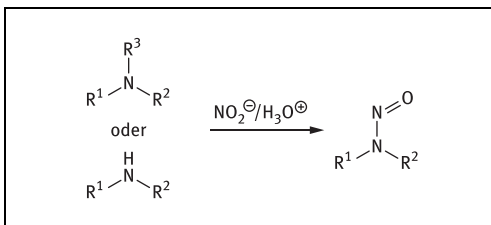


Abb. 2: Bildung von *N*-Nitrosaminen

In der Zwischenzeit wurden auch *N*-Nitrosamine von Arzneistoffen in Fertigarzneimitteln nachge-

wiesen, die in ihrer Struktur einen sekundären Stickstoff aufweisen, z. B. in Vareniclin, Quinapril, Rosagilin oder Orphenadrin^{15, 21}). Die *N*-Nitrosamine waren nicht in den Wirkstoffen enthalten, sondern entstanden erst im Fertigarzneimittel bei der Lagerung. Als Ursache hierfür gelten Spuren von Nitriten in Hilfsstoffen wie beispielsweise Hypromellose, mikrokristalliner Cellulose oder Povidon²¹). Um das Problem verunreinigter Hilfsstoffe in den Griff zu bekommen, wurde eine Hilfsstoff-Datenbank eingerichtet, in welcher der Nitritgehalt einschließlich der Variation von Charge zu Charge unterschiedlicher Hersteller hinterlegt ist²⁵). Zur *N*-Nitrosamin-Problematik in Arzneistoffen siehe auch Lit.^{4, 15, 22}). Das Vorkommen von *N*-Nitrosoverbindungen ist nicht auf Wirkstoffe und Arzneimittel begrenzt, die Substanzen wurden beispielsweise auch in Trinkwasser²⁶) sowie in Lebensmitteln, Kosmetika oder Tabakrauch nachgewiesen^{27, 28}).

Nach den Vorgaben der EMA¹⁸) und FDA²⁰) müssen Hersteller von Wirkstoffen und Fertigarzneimitteln seit 2021 im Rahmen einer Risikoanalyse sowohl den Herstellungsprozess als auch die Produkte einschließlich der Verpackung und Lagerung auf die Bildung von *N*-Nitrosaminen beleuchten. Dabei müssen neben dem Prozess auch weitere Informationen zu Reagenzien, Wirkstoffen, Hilfsstoffen oder Verpackungsmaterialien in Betracht gezogen werden. Hierzu sind chemische Kenntnisse zum Syntheseprozess wie zu Abbaureaktionen unverzichtbar sowohl für die Beurteilung des Risikos als auch zur Beantwortung der Frage, welche *N*-Nitrosamine enthalten sein könnten. Sofern ein Risiko besteht, müssen geeignete Kontrollstrategien entwickelt werden, um die Verunreinigungen zu kontrollieren und auf ein Minimum zu begrenzen. Zur Risikoanalyse der Kontamination mit *N*-Nitrosoverbindungen siehe auch Lit.^{29–31}).

Als mögliche Quellen für die Bildung von *N*-Nitrosoverbindungen kommen in Frage²²):

- die Verwendung von Natriumnitrit oder anderen Nitrosierungsreagenzien in Gegenwart von sekundären und tertiären Aminen während der Synthese;
- die Verwendung von Natriumnitrit oder anderen Nitrosierungsreagenzien in Kombination mit Reagenzien, Lösungsmitteln wie DMF oder Dimethylacetamid sowie Katalysatoren, die zu

sekundären oder tertiären Aminen abgebaut werden können;

- die Verwendung kontaminierter Ausgangsstoffe, Reagenzien und Lösungsmittel;
- die Verwendung kontaminierter zurückgewonnener Reagenzien, Katalysatoren oder Lösungsmittel;
- die Verschleppung von Verunreinigungen zwischen den einzelnen Prozessschritten;
- Abbauprozesse von Ausgangs-, Zwischen- oder Wirkstoffen, auch während der Lagerung;
- die Verwendung kontaminierter Hilfsstoffe;
- die Verwendung bestimmter Verpackungsmaterialien, z. B. Blisterfolien aus Nitrocellulose.

Für weitere mögliche Quellen siehe das EMA-Dokument „Verfahren zur Vermeidung von Nitrosamin-Verunreinigungen in Humanarzneimitteln“⁽¹⁸⁾.

Die Kenntnisse über die Kanzerogenität von *N*-Nitrosaminen sind lückenhaft. Für einige Verbindungen wurde die Kanzerogenität für den Menschen nachgewiesen, z. B. für das im Tabakrauch vorkommende *N*-Nitrosornicotin. Die meisten *N*-Nitrosamine werden aufgrund von Tierversuchsdaten oder In-vitro-Experimenten als für den Menschen „wahrscheinlich krebserregend“ oder „möglicherweise krebserregend“ eingestuft⁽¹⁵⁾, zur toxikologischen Bewertung und Beurteilung der maximal zulässigen täglichen Aufnahmemenge (PDE, permitted daily exposure) der Substanzen siehe auch Lit.^{28, 32–34)}.

Um mutagene oder karzinogene Wirkung zu entfalten, müssen *N*-Nitrosamine durch CYP450-

Enzyme metabolisch aktiviert werden (siehe Abb. 3), da sie unter physiologischen Bedingungen sehr stabil sind^(35–37). *N*-Nitrosamine werden zunächst in α -Position zum Zwischenprodukt **1** hydroxyliert. Dieses zerfällt spontan unter Abspaltung eines Aldehyds zum Diazen **2**, aus dem das Carbenium-Ion **3** entsteht. Sowohl **2** als auch **3** können mit DNA und Proteinen reagieren. Ein alternativer Bildungsweg führt über das *N*-Nitrosamid **4**, das bei physiologischem pH unter Bildung des Diazens **2** zerfällt. Bei *N*-Nitrosaminen mit Alkylsubstituenten mit zwei und mehr C-Atomen wird auch die Bildung reaktiver Diazoniumverbindungen durch CYP450-vermittelte β -Hydroxylierung diskutiert⁽³⁷⁾.

Das allgemeine Kapitel 2.5.42 wurde neu in die Ph. Eur. 10.6 aufgenommen und in der Ph. Eur. 11.0 wurden geringfügige Korrekturen vorgenommen. In der deutschen Übersetzung wurde der Text vorgezogen und bereits mit dem 3. Nachtrag publiziert. Aufgrund der Übersetzung sind im deutschen Text die mit der Ph. Eur. 11.0 vorgenommenen Korrekturen der englischen Fassung ohne Auswirkung.

Der Text beschreibt drei chromatographische Methoden mit massenspektrometrischer Detektion zur Bestimmung der *N*-Nitrosamine NDMA, NDEA, NDiPA, *N*-Nitrosodipropylamin (NDPA), *N*-Nitrosodibutylamin (NDBA), *N*-Nitrosoethylisopropylamin (NEiPA) und *N*-Nitroso-*N*-methyl-4-aminobuttersäure (NMBA) in Sartan-Arzneistoffen. *N*-Nitroso-Arzneistoffe werden von dem Kapitel nicht abgedeckt. Das Kapitel dient zur Unterstüt-

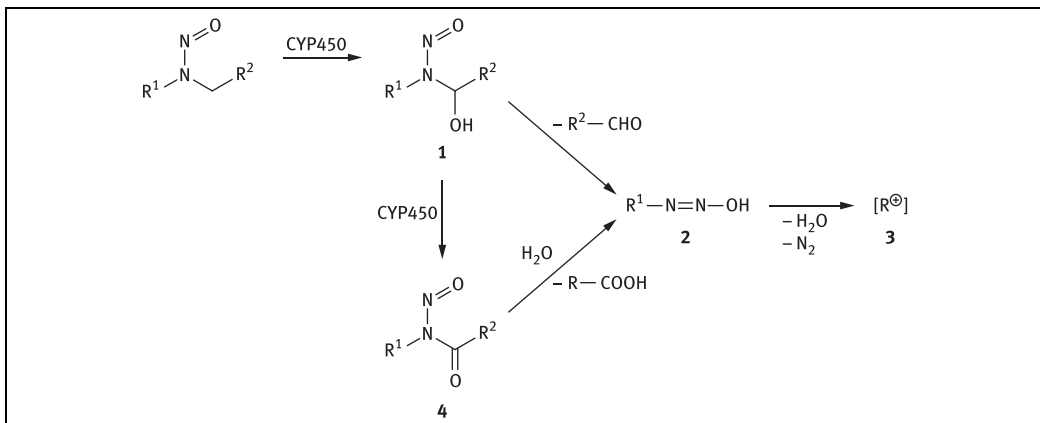


Abb. 3: Metabolismus der *N*-Nitrosamine zu alkylierenden Carbenium-Ionen

zung von Herstellern, sodass die präsentierten Methoden nicht verpflichtend anzuwenden sind, sondern auch andere geeignete Verfahren angewendet werden können, welche die Bestimmung der zulässigen Grenzwerte erlauben.

Das erste Verfahren verwendet HPLC-MS/MS (Methode A), das zweite GC-MS (Methode B) und das dritte GC-MS/MS. Die Methoden A und B wurden als Grenzwertprüfungen (Grenzwert 30 ppb) validiert und die Methode C als quantitatives Verfahren, das nach der Beschreibung aber auch als Grenzwertprüfung eingesetzt werden kann. Die validierten Anwendungen in Bezug auf die jeweiligen Sartane bzw. *N*-Nitrosamine sind in der Tab. 1 (identisch mit der Tab. 2.5.42-1 der Ph. Eur.) zusammengefasst.

Alle Analysemethoden sind primär zur Analytik der Verunreinigungen in der Gruppe der Sartane gedacht und wurden für die Prüfung dieser Wirkstoffe als Reinsubstanzen validiert. Das Arzneibuch weist ausdrücklich darauf hin, dass die Verfahren auch zur Analytik von *N*-Nitrosaminen in Fertigarzneimitteln oder anderen Wirkstoffen (z.B. Metformin oder Proglitazon) verwendet werden können. In diesen Fällen müssen die Methoden aber für diese Anwendung gesondert validiert werden. Ebenso können die Methoden A und B auch zur quantitativen Bestimmung von *N*-Nitrosamin-Verunreinigungen in Sartanen oder anderen Wirkstoffen herangezogen werden, aber auch hierfür ist eine gesonderte Validierung erforderlich.

Methode A (LC-MS/MS)

Die Methode eignet sich zur Grenzwertbestimmung von NDMA, NDEA, NMBA, NEiPA und NDiPA. Vollständig deuteriertes *N*-Nitrosodi-

ethylamin (NDEA-*d*₁₀, CAS-Nr. 1219794-54-3) dient als interner Standard. Die Trennung der Analyte erfolgt an einer C₁₈-Phase mit einem Ameisensäure-Methanol-Gradienten unter Verwendung eines Tripelquadrupol-Massenspektrometers (QQQ-MS) als Detektor, der im Multiple-Reaction-Monitoring(MRM)-Modus betrieben wird. Als Ionisationstechnik wird die chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (*atmospheric pressure chemical ionization*, APCI) eingesetzt. Im ersten Quadrupol werden die durch APCI resultierenden [M+H]⁺-Pseudomolekül-Ionen selektiert und im zweiten Quadrupol mittels sogenannter kollisionsinduzierter Dissoziation (*collision induced dissociation*, CID) fragmentiert und diese Fragment-Ionen im dritten Quadrupol detektiert. Der MRM-Modus wirkt so als doppelter Massenfilter, der Rauschen signifikant unterdrückt und damit die Selektivität und Sensitivität des Verfahrens steigert. Mindestens zwei für eine Substanz charakteristische Fragment-Ionen werden im dritten Quadrupol selektiv erfasst, deren chromatographische Retentionszeit identisch und das Peak-Flächenverhältnis charakteristisch für diesen Analyten im vorliegenden MS-System sind. Dieses Verhältnis kann auch zur Identifizierung einer Substanz herangezogen werden, was von der Ph. Eur. aber nicht genutzt wird. Das Fragment-Ion, das mit höherer Intensität entsteht (Hauptionenübergang), wird zur quantitativen Auswertung herangezogen (*quantifier oder quantifier ion*), das Fragment-Ion mit der geringeren Intensität (Nebenionenübergang) dient neben der Retentionszeit des Peaks zur Identifizierung des Analyten (*qualifier oder qualifier ion*). Für die mit der Ph.-Eur.-Methode A bestimmbar *N*-Nitrosamine sind die Haupt- und Nebenionenübergänge sowie die relative Retention in Tab. 2 zusammengefasst.

Tab. 1: Validierter Anwendungsbereich der Ph.-Eur.-Methoden

Wirkstoff	<i>N</i> -Nitrosamin						
	NDMA	NDEA	NDBA	NMBA	NDiPA	NEiPA	NDPA
Candesartancilexetil	A*BC	ABC	C	A	AC	AC	C
Irbesartan	A*BC	ABC	C	A	AC	AC	C
Losartan-Kalium	A*BC	ABC	C	A	AC	AC	C
Olmesartanmedoxomil	A*BC	ABC	C	A	AC	AC	C
Valsartan	A*BC	ABC	C	A	AC	AC	C

* In Gegenwart von DMF in der Prüfsubstanz kann der Nachweis von NDMA beeinträchtigt sein.

Tab. 2: Relative Retention der *N*-Nitrosamine, bezogen auf den internen Standard NEMA-*d*₁₀, und zur Bestimmung nach Methode A verwendete Ionenübergänge

<i>N</i> -Nitrosamin	Relative Retention	Hauptionen- übergang (<i>m/z</i>) (<i>quantifier</i>)	Nebenionen- übergang (<i>m/z</i>) (<i>qualifier</i>)
NDMA	0,6	75 → 58	75 → 43
NDEA	1,0	103 → 75	103 → 47
NMBA	0,7	147 → 117	147 → 87
NEiPA	1,3	117 → 75	117 → 47
NDiPA	1,6	131 → 89	131 → 47
NDEA- <i>d</i> ₁₀	1,0	113 → 81	113 → 34

Zur Bestimmung des Anteils von *N*-Nitrosaminen in der Prüfsubstanz werden die Untersuchungslösung, die Referenzlösung und eine gespikete Untersuchungslösung analysiert, der die *N*-Nitrosamine zugesetzt wurden. Die Referenzlösung enthält jeweils 0,9 ng/ml der *N*-Nitrosamine und des internen Standards. In der Untersuchungslösung befinden sich 30 mg/ml der Prüfsubstanz und 0,9 ng/ml des internen Standards. Der gespikten Untersuchungslösung, die ebenfalls 30 mg/ml der Prüfsubstanz und 0,9 ng/ml des internen Standards enthält, werden die *N*-Nitrosamine in der Endkonzentration 0,9 ng/ml zugesetzt. Formal entspricht das Verhältnis zwischen dem jeweiligen *N*-Nitrosamin und der Prüfsubstanz dem geforderten Grenzwert von 30 ppb. Dieser ergibt sich auch, wenn man für die gespikete Untersuchungslösung die Masse der zugesetzten *N*-Nitrosamine mit der Masse der Prüfsubstanz ins Verhältnis setzt. Die Ph. Eur. versetzt hierbei 150 mg Prüfsubstanz mit jeweils 4,5 ng der *N*-Nitrosamine, was einen rechnerischen Wert von $3 \cdot 10^{-8}$ ergibt, also den Grenzwert von 30 ppb.

Für die Bestimmung der *N*-Nitrosamine wird der Grenzwert nicht über den direkten Vergleich des Verhältnisses der Peakflächen der *N*-Nitrosamine und des internen Standards zwischen Referenzlösung und Untersuchungslösung bestimmt, sondern in Form einer Standardadditionsmethode durch den Vergleich der Peakflächenverhältnisse zwischen der Untersuchungslösung und der gespikten Untersuchungslösung. Durch dieses Vorgehen soll sichergestellt werden, dass auch unterhalb des Grenzwerts vorliegende *N*-Nitrosamine bestimmt werden können. Hierfür wird für die jeweiligen

N-Nitrosamine das Verhältnis der Peakfläche des Fragment-Ions des Hauptübergangs und der Peakfläche des internen Standards in der Untersuchungslösung (R_s) und der gespikten Untersuchungslösung (R_r) berechnet. Anschließend werden die beiden Werte ins Verhältnis gesetzt und R_s/R_r muss kleiner als 0,50 sein, was dem Grenzwert von 30 ppb entspricht. Wäre ein *N*-Nitrosamin in einem dem Grenzwert 30 ppb entsprechenden Anteil in der Prüfsubstanz enthalten, würde dessen Konzentration in der Untersuchungslösung (R_s) 0,9 ng/ml und in der gespikten Untersuchungslösung (R_r) 1,8 ng/ml, sodass ein Wert von 0,50 resultiert:

$$\frac{R_s}{R_r} = \frac{0,9 \text{ ng/ml}}{1,8 \text{ ng/ml}} = 0,50$$

Bei einem Anteil von beispielsweise etwa 27 ppb *N*-Nitrosamin in der Prüfsubstanz werden Konzentrationen von 0,8 ng/ml bzw. 1,7 ng/ml für Untersuchungslösung und gespikete Untersuchungslösung erhalten und somit ein R_s/R_r -Wert von 0,47, während bei einem Anteil von ca. 33 ppb *N*-Nitrosamin in der Prüfsubstanz ($R_s = 1,0$ ng/ml, $R_r = 1,9$ ng/ml) der Wert 0,53 resultiert, was außerhalb des zulässigen Grenzwerts liegt.

Die Systemeignung wird mit Hilfe der Referenzlösung und der gespikten Untersuchungslösung überprüft. Dabei dient die Referenzlösung zur Prüfung der Wiederholpräzision der Peakflächenverhältnisse *N*-Nitrosamin zu internem Standard in Form der relativen Standardabweichung, die maximal 20% betragen darf. Mit der gespikten Untersuchungslösung werden die Signal-Rausch-Verhältnisse für die Fragment-Ionen des Hauptübergangs (*quantifier*) und des Nebenübergangs (*qualifier*) bestimmt. Für das Fragment-Ion des Hauptübergangs muss das Signal-Rausch-Verhältnis im Fall von NDMA mindestens 5 und für die anderen *N*-Nitrosamine mindestens 10 betragen. Die entspricht dem Quantifizierungslimit analytischer Verfahren. Für das Fragment-Ion des Nebenübergangs von NDMA wird ein Signal-Rausch-Verhältnis von mindestens 2 gefordert, für die Ionen der anderen *N*-Nitrosamine muss der Wert mindestens 3 betragen, was dem Detektionslimit entspricht.

Aufgrund der beiden unterschiedlichen Substituenten in NEiPA und NMBA existieren von diesen

Substanzen *E*- und *Z*-Isomere (*cis/trans*-Isomere), von der Ph. Eur. fälschlicherweise als Konformere bezeichnet, die unter den chromatographischen Bedingungen abhängig vom verwendeten Säulenmaterial getrennt werden können. Wird dies beobachtet, sind die Flächen beider Peaks als Summe auszuwerten. Bei unvollständiger Trennung der Isomere können tailende Peaks resultieren, in diesem Fall muss das Tailing in die Integration einbezogen werden.

Die Bestimmung von NDMA mit diesem Verfahren ist in Gegenwart von Resten des Lösungsmittels DMF in der Prüfsubstanz nur eingeschränkt möglich, da DMF ebenfalls ein Fragment-Ion mit $m/z = 58$ bildet, das mit dem Fragment-Ion des Hauptionenübergangs von NDMA interferiert.

Mit analogen HPLC-MS/MS-Verfahren sind auch weitere *N*-Nitrosamine bestimmbar^{38, 39}, siehe weiterhin auch Lit.^{4, 40, 41}.

Methode B (GC-MS)

Das beschriebene GC-MS-Verfahren eignet sich zur Grenzwertbestimmung von NDMA und NDEA; *N*-Nitrosoethylmethylamin (NEMA) dient als interner Standard. Hierzu werden die *N*-Nitrosamine je nach Wirkstoff mit leicht unterschiedlichen Extraktionsverfahren isoliert und mittels Kapillar-GC unter Verwendung einer niedrig- bis mittelpolaren Cyanopropylphenyl (6%) methyl (94%) polysiloxan-Phase mit einem Quadrupol-Massenspektrometer als Detektor, der im Single-Ion-Monitoring (SIM)-Modus betrieben wird, analysiert. Ionisation erfolgt durch Elektronenstoßionisation, detektiert werden die radikalischen Molekül-Ionen, M^{\oplus} , für NDMA (relative Retention 0,9) $m/z = 74$, NDEA (relative Retention 1,1) $m/z = 102$ und NEMA $m/z = 88$. Extraktionsverfahren 1 ist für Valsartan, Losartan und Olmesartanmedoxomil anzuwenden. Der Arzneistoff wird in wässriger NaOH, die den internen Standard enthält, suspendiert und mit Dichlormethan extrahiert. Die Dichlormethan-Phase wird nach Filtration durch einen Membranfilter analysiert. Beim für Candesartancilexetil und Irbesartan zu verwendenden Extraktionsverfahren 2 wird der Wirkstoff mit einem geringen Volumen Dichlormethan, das den internen Standard enthält, und Methanol extrahiert und der Überstand nach Filtration durch einen Membranfilter untersucht.

Beim Extraktionsverfahren 1 werden für die Herstellung der gespikten Untersuchungslösung 250 mg Prüfsubstanz 7,5 ng des jeweiligen *N*-Nitrosamins zugesetzt, beim Extraktionsverfahren 2 werden 500 mg Prüfsubstanz mit 15 ng *N*-Nitrosamin versetzt. Beides entspricht einem Anteil von 30 ppb für jede Verunreinigung. Die Auswertung der Daten erfolgt analog zu Methode A anhand des Verhältnisses R_s/R_r , resultierend aus den Peakflächenverhältnissen für die Hauptionenübergänge *N*-Nitrosamin/interner Standard in der Untersuchungslösung (R_s) und der gespikten Untersuchungslösung (R_r). Dieses muss kleiner als 0,50 sein.

Analog zur Methode A wird die Systemeignung anhand der Wiederholpräzision für die *N*-Nitrosamine in der Referenzlösung (RSD < 20%) sowie des Signal-Rausch-Verhältnisses der Peaks der *N*-Nitrosamine in der gespikten Untersuchungslösung (mindestens 10) überprüft. Für eine Zusammenfassung weiterer (Headspace-)GC-MS-Verfahren siehe Lit.^{4, 42}.

Methode C (GC-MS/MS)

Mit dem Verfahren können NDMA, NDEA, NEIPA, NDIPA, NDPA und NDBA analysiert werden. Interner Standard ist wie bei Methode B NEMA. Die stationäre Phase ist ebenso wie bei Methode B eine Cyanopropylphenyl (6%) methyl (94%) polysiloxan-Phase, allerdings wird ein anderer Temperaturgradient sowie eine andere Flussrate des Trägergases Helium eingesetzt. Die Ionisation erfolgt durch Elektronenstoßionisation, der Detektor ist ein Triplequadrupol-Massenspektrometer, das im MRM-Modus betrieben wird. Die relative Retention sowie die Haupt- und Nebenionenübergänge für die *N*-Nitrosamine für dieses Verfahren sind in Tab. 3 zusammengefasst. Bei Elektronenstoßionisation entstehen energiereiche radikalische Molekül-Kationen, M^{\oplus} , der *N*-Nitrosamine, die ein anderes Fragmentierungsverhalten zeigen als die beim relativ milden Ionisierungsverfahren der APCI gebildeten Pseudomolekül-Ionen des Typs $[M+H]^{\oplus}$. Daher werden bei Methode A und Methode C unterschiedliche Fragment-Ionen analysiert. Hier stört auch die Anwesenheit von DMF nicht, da das zur Quantifizierung von NDMA genutzte Fragment-Ion mit $m/z = 44$ verschieden von den Fragment-Ionen des Lösungsmittels ist.

Tab. 3: Relative Retention der *N*-Nitrosamine, bezogen auf den internen Standard NEMA, und zur Bestimmung nach Methode C verwendete Ionenübergänge

<i>N</i> -Nitrosamin	Relative Retention	Hauptionen- übergang (<i>m/z</i>) (quantifier)	Nebenionen- übergang (<i>m/z</i>) (qualifier)
NDMA	0,9	74 → 44	74 → 42
NDEA	1,1	102 → 85	102 → 56
NEiPA	1,3	116 → 99	116 → 44
NDiPA	1,4	130 → 88	130 → 71
NDPA	1,5	130 → 113	131 → 88
NDBA	1,8	158 → 141	158 → 99
NEMA	1,0	88 → 71	88 → 42

Die Systemeignung wird anhand der Wiederholpräzision für die *N*-Nitrosamine in der Referenzlösung (RSD < 20%) sowie der Signal-Rausch-Verhältnisse der Peaks für die jeweiligen Hauptübergänge (> 10) und Nebenübergänge (> 3) der *N*-Nitrosamine in der gespikten Untersuchungslösung überprüft.

Wird das Verfahren als Grenzwertmethode verwendet, berechnet sich dieser aus dem Verhältnis R_s/R_r , resultierend aus den Peakflächenverhältnissen für die Hauptionenübergänge *N*-Nitrosamin/interner Standard in der Untersuchungslösung (R_s) und der gespikten Untersuchungslösung (R_r). Der Wert muss kleiner als 0,05 sein. Zur Herstellung der gespikten Untersuchungslösung werden 250 mg Prüfsubstanz mit 7,5 ng des jeweiligen *N*-Nitrosamins versetzt, woraus sich der Grenzwert von 30 ppb ergibt.

Für die Verwendung als quantitative Bestimmungsmethode lässt die Ph. Eur. drei Referenzlösungen zur Kalibrierung herstellen. Hierfür werden 10 ml Extraktionslösung (die 2,5 ng/ml des internen Standards enthält) mit 50, 100 und 200 µl der *N*-Nitrosamin-Spikelösung, die 75 ng/ml jedes *N*-Nitrosamins enthält, versetzt und mit 2 ml Dichlormethan extrahiert. Unter der Annahme einer quantitativen Extraktion resultieren die Konzentrationen der drei Referenzlösungen von 1,875 ng/ml, 3,75 ng/ml und 7,5 ng/ml. Zur Herstellung der Untersuchungslösung werden 250 mg Prüfsubstanz in 10 ml Extraktionslösung suspendiert und ebenfalls mit 2 ml Dichlormethan extrahiert. Auch wenn sich die Prüfsubstanzen nicht im Lösungsmittelgemisch lösen, erhält man einen theoretischen

Wert von 125 mg/ml bezogen auf 2 ml Dichlormethan, sodass der durch die Kalibriergerade abgedeckte Bereich 15 bis 60 ppb der Verunreinigungen entspricht. Die Konzentration der *N*-Nitrosamine in der Prüfsubstanz wird aus der Kalibriergeraden ermittelt. Die erhaltenen Werte werden nur als zuverlässig angesehen, wenn das Verhältnis der Peakflächen für den Hauptionenübergang und den Nebenionenübergang der jeweiligen *N*-Nitrosamine für die Untersuchungslösung innerhalb von ± 20% der für die gespikte Untersuchungslösung bestimmten Peakflächenverhältnisse liegen, und die für die gespikte Untersuchungslösung berechneten Wiederfindungsraten der Verunreinigungen müssen zwischen 70 und 130% liegen. Für weitere GC-MS/MS-Verfahren siehe Lit.^{4, 42–44}).

Die Bestimmung von *N*-Nitrosaminen in Arzneistoffen ist auch mit der sub/superkritischen Fluidchromatographie (SFC) möglich^{45, 46}. Ein Verfahren zur Quantifizierung von *N*-Nitrosaminen ohne die Notwendigkeit von Referenzstandards mittels coulometrischer Massenspektrometrie ist beschrieben⁴⁷.

Die USP führt den Text [1469] „Nitrosamine Impurities“ auf, der ebenfalls als Reaktion auf die Anwesenheit von *N*-Nitrosaminen in Sartanen eingeführt wurde. Der Text enthält wie das allgemeine Kapitel der Ph. Eur. Angaben zu analytischen Verfahren, ist aber grundsätzlich anders aufgebaut als das Ph.-Eur.-Kapitel. Generell gelten USP-Kapitel mit Nummern kleiner als 1000 in den USA als verbindlich anwendbar, wenn in einer Monographie, einem anderen anwendbaren allgemeinen Kapitel oder in allgemeinen Hinweisen auf sie Bezug genommen wird. Texte mit Nummern größer als 1000 werden als nicht verpflichtend angesehen, sie enthalten Informationen oder allgemeine Beschreibungen. So verweist auch keine der USP-Monographien der Sartane oder deren Fertigarzneimittel auf eine Prüfung auf *N*-Nitrosamine, während in den Ph.-Eur.-Monographien der Wirkstoffe in dem Abschnitt „Herstellung“ verpflichtend auf eine Prüfung auf *N*-Nitrosamine als mögliche Verunreinigungen und deren Begrenzung hingewiesen wird.

Der USP-Text soll Grundsätze eines wissenschaftlichen, Risiko-basierten Ansatzes zur Kontrolle von *N*-Nitrosamin-Verunreinigungen in Wirkstoffen und Fertigarzneimitteln erläutern. Ziel ist die

Etablierung von Strategien, um diese Verunreinigungen zu eliminieren oder zumindest zu verringern bzw. die Leistungsmerkmale analytischer Verfahren zu deren Monitoring zu etablieren.

Die USP listet im Prinzip die gleichen *N*-Nitrosamine wie die Ph. Eur. auf, mit der Ausnahme, dass statt NDPA *N*-Nitrosomethylphenylamin (NMPA) aufgeführt ist. Als mögliche Quellen für die Bildung der Verunreinigungen nennt die USP Reaktionsbedingungen bei der Produktion, aufgrund derer aus dem Arzneistoff bzw. Synthesintermediaten *N*-Nitrosamine resultieren können. Als weitere Ursachen werden die Zersetzung von Lösungsmitteln, Verunreinigungen in Ausgangsmaterialien, Reagenzien und Lösungsmitteln einschließlich Wasser genannt. Weiterhin kommen für Fertigpräparate (verunreinigte) Hilfsstoffe, Verpackungsmaterial oder die Bedingungen bei der Herstellung der pharmazeutischen Formulierung in Frage. Mögliche Ursachen sollten durch einen Risiko-basierten Ansatz identifiziert werden. Beispiele für mögliche Quellen und die damit verbundenen Risiken sind in einer Tabelle zusammengestellt. Als Ergebnis sollte anschließend eine adäquate Kontrollstrategie entwickelt und etabliert werden, um die *N*-Nitrosamin-Belastung der Patientinnen und Patienten durch Arzneimittel so weit wie möglich zu reduzieren. Im Gegensatz zur Ph. Eur. wird kein absoluter Grenzwert für Wirkstoffe gefordert wie der Grenzwert von 30 ppb im Falle der Sartane, sondern die USP orientiert sich an den als maximal akzeptabel angenommenen Werten für die Aufnahme von *N*-Nitrosaminen, die in der FDA-Leitlinie „*Control of Nitrosamine Impurities in Human Drugs, Guidance for Industry*“ festgelegt sind²⁰⁾. Danach beträgt der Maximalwert für NDMA und NMBA 96 ng/Tag und für die anderen *N*-Nitrosamine 26,5 ng/Tag, sofern nur eine der Verunreinigungen im Wirkstoff enthalten ist. Wird mehr als ein *N*-Nitrosamin nachgewiesen, liegt der Maximalwert automatisch bei 26,5 ng/Tag. Da-

durch ergeben sich für die einzelnen Arzneistoffe und Fertigarzneimittel als Funktion der jeweiligen Tageshöchstdosis unterschiedliche Grenzwerte für die Wirkstoffe. Die Angabe des Anteils der Verunreinigungen erfolgt in µg *N*-Nitrosamin pro g Wirkstoff (µg/g, ppm). Beträgt beispielsweise die Tageshöchstdosis eines Arzneistoffs 1000 mg, darf dieser mit maximal 0,096 µg/g NDMA oder NMBA bzw. mit maximal 0,0265 µg/g der anderen *N*-Nitrosamine kontaminiert sein. Bei einer Tageshöchstdosis vom 250 mg Substanz liegen die Grenzwerte bei maximal 0,384 µg/g bzw. 0,106 µg/g, bei einer Tageshöchstdosis von 50 mg bei maximal 1,920 µg bzw. 0,53 µg *N*-Nitrosamin pro g Wirkstoff.

Die USP führt insgesamt 4 Analysenverfahren – zwei HPLC-MS- und zwei GC-MS-Methoden – auf, die für die jeweiligen Sartan-Wirkstoffe etabliert wurden (Tab. 4). Der Anwender muss diese aber unter Berücksichtigung des spezifischen Analysenmaterials, z. B. dessen Löslichkeit oder der Extraktionseffizienz der *N*-Nitrosamine, nach anerkannten Regeln validieren. Bei der Probenvorbereitung oder auch für die Analyse muss sichergestellt sein, dass *N*-Nitrosamine nicht als Artefakte resultieren. Beispielsweise kann NDMA aus Dimethylamin als Verunreinigung aus dem Produktionsprozess in Gegenwart von Nitrit und Säuren besonders bei der GC-Analyse gebildet werden. Ebenso können hohe Konzentrationen eines Arzneistoffs mit einer Dimethylaminogruppe in Gegenwart nitrosierender Reagenzien im Injektor eines GC-Instruments zur Bildung von NDMA führen.

Die USP-Methode 1 beschreibt ein HPLC-Verfahren unter Verwendung eines hochauflösenden Massenspektrometers (HPLC-HRMS, *high resolution mass spectrometry*) zur Bestimmung von NDMA, NDEA, NDiPA, NEiPA, NMBA, NMPA und NDBA in Valsartan, Irbesartan und Losartan-

Tab. 4: Anwendungsbereich der Analysenverfahren der USP

Wirkstoff	NDMA	NDEA	NDiPA	NEiPA	NMBA	NMPA	NDBA
Valsartan	1,2,3,4	1,2,3,4	1,2,3,4	1,2,3,4	1,3	1,4	1,3,4
Irbesartan	1,2	1,2	1,2	1,2	1,3	1	1,3
Losartan-Kalium	1,2,3,4	1,2,3,4	1,2,3,4	1,2,3,4	1,3	1,4	1,3,4
Olmesartanmedoxomil	2,3	2,3	2,3	2,3	3	-	3
Candesartancilexetil	2,3,4	2,3,4	2,3,4	2,3,4	3	4	3,4
Telmisartan	2,3	2,3	2,3	2,3	3	-	3

Kalium. Die chromatographische Trennung der *N*-Nitrosamine erfolgt an einer Pentafluorophenyl-Phase mit einem Wasser-Methanol-Gradienten, wobei beide Lösungsmittel 0,1% Ameisensäure enthalten. Als Ionisationsverfahren wird die ESI eingesetzt, die im positiven Modus zur Bildung von $[M+H]^+$ -Ionen in der Ionenquelle führt. Je nach Analyt wird das Massenspektrometer im SIM-Modus (NDMA, NMBA, NEiPA, NDiPA, NMPA) oder im Parallel-Reaction-Monitoring (PRM)-Modus (NDEA, NDBA) betrieben, wobei für NMBA im negativen Modus (Messung von $[M-H]^-$ -Ionen) gemessen wird, während für alle anderen *N*-Nitrosamine der positive Modus verwendet wird. Ein interner Standard wird nicht eingesetzt.

Die USP-Methode 2 kann zur Analyse von NDMA, NDEA, NDiPA und NEiPA in Valsartan, Irbesartan, Losartan-Kalium Olmesartanmedoxomil, Candesartancilexetil und Telmisartan eingesetzt werden. Es handelt sich dabei um ein Head-Space-GC-Verfahren mit Tandem-massenspektrometrischer Detektion (GC-MS/MS). NDMA- d_6 dient als interner Standard. Die Proben werden aus dem Gasraum über auf 95 bis 110°C aufgeheizte Lösungen der Substanzen in Acetonitril, welche zusätzlich die Base Imidazol enthalten, gezogen. Die chromatographische Trennung erfolgt an einer Polyethylenglycol-Phase mit einem durchschnittlichen Molekülmasse von 15000 mit Helium als Trägergas. Als Ionisationsverfahren dient die Elektronenstoßionisation, der Hauptionenübergang wird zur quantitativen Bestimmung genutzt.

Die USP-Methode 3 ist ein HPLC-MS/MS-Verfahren zur Bestimmung von NDMA, NDEA, NDiPA, NEiPA, NMBA und NDBA in Valsartan, Losartan-Kalium, Olmesartanmedoxomil, Candesartancilexetil und Telmisartan. Zur chromatographischen Trennung wird eine C_{18} -Säule mit einem Gradienten von 0,1%iger wässriger Ameisensäure und 0,1% Ameisensäure in Methanol verwendet. Das Massenspektrometer ist ein Tripelquadrupol-MS, das im MRM-Modus betrieben wird. Die USP lässt für jedes *N*-Nitrosamin eine Kalibriergerade über fünf Konzentrationsstufen erstellen, die

entsprechend der erwarteten *N*-Nitrosamin-Konzentration aus einer Tabelle von neun Konzentrationsstufen zwischen 0,66 bis 59,4 ng/ml für NDEA und 1,33 bis 90 ng/ml für die übrigen *N*-Nitrosamine auszuwählen sind. Als interne Standards kommen vier deuterierte *N*-Nitrosamine zum Einsatz, NDMA- d_6 , NDEA- d_{10} (für NDEA, NEiPA und NDiPA), NMBA- d_3 , NDBA- d_{18} .

Die USP-Methode 4 beschreibt ein GC-MS/MS-Verfahren für NDMA, NDEA, NDiPA, NEiPA, NMPA und NDBA in Valsartan, Losartan-Kalium und Candesartancilexetil unter Verwendung einer Polyethylenglycol-Phase mit einer durchschnittlichen Molekülmasse von 15000 als stationäre Phase mit Helium als Trägergas. Die Ionisation erfolgt mittels Elektronenstoßionisation, das Tripelquadrupol-MS als Detektor wird im MRM-Modus betrieben. Unter Verwendung von ^{13}C - und Deuterium-markiertem NDMA (NDMA- $C_{13}d_6$, im Handel auch als NDMA- $C_{13}d_6$ bezeichnet) wird für die *N*-Nitrosamine eine Kalibriergerade über fünf Konzentrationsstufen erstellt, wobei diese aus einer Tabelle von acht Konzentrationsstufen zwischen 0,5 bis 15 ng/ml in Abhängigkeit von der zu erwartenden *N*-Nitrosamin-Konzentration ausgewählt werden sollen.

Alle Methoden sind als quantitative Verfahren vorgesehen. Die USP weist ausdrücklich darauf hin, dass im gegenwärtigen Text [1469] keine Grenzwertbestimmung aufgeführt ist. Es werden aber Hinweise gegeben, wie man vorgehen kann, um die Methoden für eine Grenzwertbestimmung zu nutzen. Hierfür beschreibt die USP analog zur Ph. Eur. eine Untersuchungslösung und eine gespikete Untersuchungslösung, die zur Ermittlung des Grenzwerts über die Flächenverhältnisse des jeweiligen *N*-Nitrosamins (bezogen auf den internen Standard) in den beiden Lösungen herangezogen werden. Das Akzeptanzkriterium für den Quotienten R_s/R_r beträgt nach der USP 0,5, wodurch auch Werte von 0,54 akzeptabel wären, was für die Ph. Eur. mit dem Wert von 0,50 ausgeschlossen ist.

G. Scriba

Literatur

1) H. Buschmann, U. Holzgrabe, Dtsch. Apoth. Ztg. 158, 2898–2902 (2018). 2) D. J. Snodin, D. P. Elder,

Regul. Toxicol. Pharmacol. 103, 625–629 (2019). 3) F. Sörgel et al., J. Pharm. Biomed. Anal. 172, 395–405 (2019). 4) K. M. Shaik et al., Crit. Rev. Anal. Chem. 52, 53–71 (2022). 5) J. Jires et al., J. Pharm. Biomed.

- Anal. 195, 113877 (2021). 6) M. Fritzsche et al., Eur. J. Pharm. Sci. 168, 106026 (2022). 7) D. A. Keire et al., AAPS J. 24, 56 (2022). 8) N. E. Hussein Nasr et al., Expert Opin. Drug Saf. 20, 855–862 (2021). 9) Y. Abe et al., Chem. Pharm. Bull. 68, 1008–1012 (2020). 10) F. J. King, A. D. Searle, M. W. Urquhart, Org. Process Res. Dev. 24, 2915–2926 (2020). 11) H. Buschmann, U. Holzgrabe, D. Jung, Dtsch. Apoth. Ztg. 159, 1866–1874 (2019). 12) X. Tao et al., Front. Chem. 10, 834124 (2022). 13) J. Wohlfahrt et al., J. Pharm. Biomed. Anal. 203, 114205 (2021). 14) EMA/369136/2020 Nitrosamine impurities in human products (2020). 15) S. S. Bharate, J. Med. Chem. 64, 2923–2936 (2021). 16) B. Tuesuwan, V. Vongsutilers, J. Pharm. Sci. 110, 3118–3128 (2021). 17) M7 Guideline Mutagenic Impurities, www.ich.org/page/multidisciplinary-guidelines. 18) EMA/409815/2020 Rev.11, Questions and Answers for Marketing Authorisation Holders/Applicants on the CHMP Opinion for the Article 5(3) of Regulation (EC) N 726/2006 Referral on Nitrosamine Impurities in Human Medicinal Products (29.7.2022). 19) R. Ruepp et al., Front. Med. 8, 782536 (2021). 20) Control of Nitrosamine Impurities in Human Drugs, Guidance for Industry, Revision 1, Food and Drug Administration, Silver Spring 2021. 21) U. Holzgrabe, Dtsch. Apoth. Ztg. 162, 2070–2075 (2022). 22) M. Veit, Pharm. Ind. 83, 345–358 (2021). 23) I. W. Ashworth et al., Org. Process Res. Dev. 24, 1629–1646 (2020). 24) R. Lopez-Rodriguez et al., Org. Process Res. Dev. 24, 1558–1585 (2020). 25) R. Boetzel et al., J. Pharm. Sci. (2022), <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2022.04.016>. 26) B. J. Sieira et al., Separations 7, 3 (2020). 27) R. A. Scanlan, P. Issenberg, CRC Crit. Rev. Food Technol. 5, 357–402 (1975). 28) A. I. Gushgari, R. U. Halden, Chemosphere 210, 1124–1136 (2018). 29) D. P. Elder, G. E. Johnson, D. J. Sodin, J. Pharm. Sci. 110, 2311–2328 (2021). 30) S. Schmidtsdorff et al., Arch. Pharm. Biomed. Anal. 189, 113425 (2020). 31) A. Leistner et al., J. Pharm. Biomed. Anal. 189, 113425 (2020). 32) A. Thresher et al., Regul. Toxicol. Pharmacol. 116, 104749 (2020). 33) G. E. Johnson, Environ. Mol. Mutagen. 62, 293–305 (2021). 34) K. L. Dobo et al., Chem. Res. Toxicol. 35, 475–489 (2022). 35) R. Montesano, J. Hall, Nitrosamine Metabolism and Carcinogenesis, in E. H. Y. Chu, W. M. Generoso (Herausg.), Mutation, Cancer and Malformation, S. 447–464, Springer, Boston 1984. 36) S. Veena, S. Tashmi, Int. J. Toxicol. Pharmacol. Res. 6, 86–96 (2014). 37) Y. Li, S. S. Hecht, Int. J. Mol. Sci. 23, 4559 (2022). 38) S.-H. Chang et al., J. Food Drug Anal. 28, 292–301 (2020). 39) M. James, T. Edge, LCGC Europe 34, 267–276 (2021). 40) M. K. Parr, J. F. Joseph, J. Pharm. Biomed. Anal. 164, 536–549 (2019). 41) R. Gonzalez et al., Microchem. J. 179, 107402 (2022). 42) J. Zheng et al., AAPS J. 24, 23 (2022). 43) J. Liu et al., J. Anal. Sci. Toxicol. 12, 3 (2021). 44) H.-H. Lim, Y.-S. Oh, H.-S. Shin, J. Pharm. Biomed. Anal. 189, 113460 (2020). 45) S. Schmidtsdorff, A. H. Schmidt, J. Pharm. Biomed. Anal. 124, 151–160 (2019). 46) S. Schmidtsdorff et al., J. Pharm. Biomed. Anal. 197, 113960 (2021). 47) Q. Wang et al., J. Am. Soc. Mass Spectrom. 33, 875–884 (2022).