

Nitrosoduloxetin in Duloxetinpräparaten mit LC-MS

1 Zweck und Anwendungsbereich

Mit der vorliegenden Methode wird Nitrosoduloxetin in verschiedenen Duloxetinpräparaten mittels LC-MS/MS quantifiziert.

2 Prinzip der Methode

Verschiedene Präparate werden mit Acetonitril extrahiert und der Gehalt an Nitrosoduloxetin über eine externe Kalibriergerade bestimmt. Es werden pro Muster zwei Aufarbeitungen hergestellt, wobei eine Aufarbeitung mit Nitrosoduloxetin gespikt wird. Nitrosoduloxetin tritt in nur einem Isomer auf. Zur Kalibration wird die Peakfläche gegen die Konzentration aufgetragen.

3 Angaben zur Validierung

Siehe in-situ Validierung.

4 Grundlagen

- Methodenentwicklung A-026103

5 Definitionen und Abkürzungen

Siehe *Glossar OMCL*

Begriff / Abkürzung	Beschreibung	Ergänzung
MRM	Multiple Reaction Monitoring	Selektives und Sensitives MS Messprinzip

6 Mitgeltende Dokumente

Vorgaben siehe *BPM / Prozesse / Hilfsmittel* oder *LIMS / Methoden*

Keine.

7 Besondere Hinweise / Sicherheitshinweise

Nitrosoduloxetin ist potentiell kanzerogen. Es sind entsprechende Schutzmassnahmen zu treffen.

8 Referenz- und Kontrollmaterial, Prüfeinrichtungen, Materialien, Chemikalien und Lösungen

8.1 Referenzmaterial

Bezeichnung	Gehalt / Reinheit	S-Nr. LIMS	Herst./Lieferant / Art.-Nr. (z.B.)
N-nitroso Duloxetin	0.98	S-4560-001	LGC Standards/Toronto Research Chemicals / 1-MJA-55-7

8.2 Kontrollmaterial

Nicht anwendbar.

8.3 Prüfeinrichtungen und Materialien

Bezeichnung	Info Protokollierung LIMS E: Protokollierung bei Ergebnisse S: Protokollierung bei Substanzen
LC-MS/MS (z.B. MS (AB Sciex QTRAP 5500) / 0524A	E

8.4 Chemikalien

Bezeichnung	S-Nr. LIMS	Herst./Lieferant / Art.-Nr. (z.B.)
Acetonitril	S-2058	AppliChem GmbH / Axon Lab AG / 221881.1611
Methanol	S-1712	AppliChem GmbH / Axon Lab AG / 221091.1612
Ameisensäure	S-2031	Merck / Merck / 253
Milli-Q Wasser	S-2206	OMCL

8.5 Lösungen

Bezeichnung Lösung	Herstellung	Haltbarkeit / Lager-Temp.
Nitrosoduloxetin Stock Lsg	Ca. 1 mg Nitrosoduloxetin wird in ein 1.5 mL HPLC-Vial eingewogen und mit ACN auf 1 mL verdünnt	7 Tage bei -20°C
Nitrosoduloxetin Dil 0	100 µL der Stock-Lösung ad 10 mL ACN in MK	2 Tage bei 2-8°C
Nitrosoduloxetin Dil 1	100 µL der Dil 0 Lösung ad 10 mL ACN in MK	2 Tage bei 2-8°C

Um Fehler bei der Einwaage oder der Verdünnung der Lösung auszuschliessen, werden die Stock- und Dil 0/1/2 Lösungen jeweils im Duplikat (A/B) hergestellt. Zur Kontrolle wird eine Lösung der Kalibriergeraden (ca. 1.5 ppm Level) aus der Herstellung B im Doppel hergestellt und mit der Kalibriergeraden der Herstellung A verglichen. Die berechnete Konzentration der Probe muss $\pm 5\%$ mit der Soll-Konzentration übereinstimmen.

9 Vorgehen

Aus 6 Tabletten wird ein Mischmuster erstellt. Es wird die Menge Mischmuster eingewogen, welche einer Wirkstoffmenge von 3 mg entspricht. Maximal werden jedoch 150 mg Fertigprodukt eingewogen. Pro Muster werden 2 Aufarbeitungen hergestellt, wobei eine mit Nitrosoduloxetin gespikt wird (ca. 3 ppm). Falls ein Messwert ausserhalb der Kalibriergeraden liegt, wird entweder die Einwaage erhöht oder erniedrigt. Die Einwaage wird so verändert, damit der erwartete Messwert innerhalb der Kalibriergeraden liegt.

Zur Quantifizierung wird eine Kalibrationsgerade mit 6 Punkten über den Bereich von ca. 1 ng/mL bis ca. 50 ng/mL (ca. 0.3 – 17 ppm) hergestellt. Dabei wird die Peakfläche gegen die Konzentration aufgetragen.

Zur Kontrolle der Geräteperformance wird der Checkstandard (Kalibrierlösung 4 Lösung) in regelmässigen Abständen re-analysiert.

Geräteparameter LC

Säule	Luna 3u Phenyl-Hexyl, 50x2 mm, 3 µm		
Mobile Phase A	Milli-Q Wasser mit 0.1% Ameisensäure		
Mobile Phase B	Acetonitril mit 0.1% Ameisensäure		
Autosampler Temperatur	5°C		
Säulen Temperatur	40°C		
Injektionsvolumen	5 µL		
Fluss	0.3 mL/min		
Gradient	RT/ min	%A	%B
	0	50	50
	1.0	50	50
	4.0	35	65
	4.1	0	100
	4.6	0	100
	4.7	50	50
	7.0	50	50
UV Detektion (optional)	220 nm, 4 nm Bandwidth		

Geräteparameter MS

Quelle	ESI / positive
Scan type	MRM
MRM detection window	Unscheduled
Curtain Gas (CUR)	35
Collision Gas (CAD)	Medium
Temperature (TEM)	300
Ion Source Gas 1 (GS1)	40
Ion Source Gas 2 (GS2)	20
Ion Spray Voltage [IS]	5500
Entrance Potential (EP)	10
Collision Cell Exit Potential (CXP)	13
Declustering Potential (DP)	60

MRM Übergänge

ID	Q1	Q3	CE	Dwell Time [msec]
NA_Duloxetin_Quant	183.1	123.1	14	200
NA_Duloxetin_Qual1	327.0	183.1	9	200
NA_Duloxetin_Qual2	327.0	123.1	24	200

Nitrosoduloxetin eluiert bei der Retentionszeit von 3.53 min.

Diverter Valve

RT	Diverter Valve
0.0	Waste
2.0	MS
5.0	Waste

10 Auswertung und Messunsicherheit

10.1 Auswertung

Zur Bestimmung des Gehalts an Nitrosoduloxetin wird die Fläche der ungespikten Probe mit der Kalibriergeraden (6-Punkte) in die Konzentration umgerechnet.

Zur Berechnung der Wiederfindung wird folgende Formeln verwendet:

$$W = \frac{C_{Bs} - \frac{C_{B0} * E_{Ws}}{E_{W0}}}{C_S} * 100$$

W: Wiederfindung / %

C_{Bs}: Berechnete Konzentration der gespikten Probe / ng/mL

C_{B0}: Berechnete Konzentration der ungespikten Probe / ng/mL

E_{Ws}: Einwaage der gespikten Probe / mg

E_{W0}: Einwaage der ungespikten Probe / mg

C_S: Konzentration des dazugespikten Analyten in der Probe / ng/mL

10.2 Messunsicherheit

Wird im Rahmen der in-situ Validierung berechnet.

11 Protokollierung

Die Anforderungen an die Protokollierung sind in den entsprechenden Prozessvorgaben zu diesem Thema enthalten. Nachfolgend sind, falls erforderlich, PV-spezifische Beschreibungen zur Protokollierung aufgeführt.

„Keine PV-spezifischen Vorgaben erforderlich“

12 Qualitätskontrolle

Zur Qualitätskontrolle werden SST-Kriterien für die Sequenz als auch für jedes Muster definiert.

SST-Kriterien Sequenz

Parameter	Kriterium
Linearität Blank-Spikes (Start der Sequenz)	$r \geq 0.995$
Wiederfindung Check-Standard	70% - 130%

SST-Kriterien Muster

Parameter	Kriterium
Wiederfindung Spiking	70% - 130%
Qualifier ratios	$\pm 25\%$

13 Versionsübersicht

Auf dem Dokument werden die letzten 5 Versionsänderungen ausgewiesen, vorhergehende sind aus der Tabelle zu löschen.

Versions-Nr.:	Anpassung Datum/Visum:	Änderung zur Vorversion:
01		Erstellung