

# Nitroso-Hydrochlorothiazid in verschiedenen Präparaten

## 1 Zweck und Anwendungsbereich

Mit der vorliegenden Methode wird Nitroso-Hydrochlorothiazid (NA-HCT) in verschiedenen Präparaten mittels LC-MS/MS quantifiziert.

## 2 Prinzip der Methode

Verschiedene Präparate werden mit Methanol und Wasser extrahiert und der Gehalt an NA-HCT über eine externe Kalibriergeraden bestimmt. Es werden pro Muster drei Aufarbeitungen hergestellt, wobei zwei der Aufarbeitungen mit NA-HCT gespiket werden. Der berechnete Gehalt des Musters wird mit der mittleren Wiederfindung der beiden gespikten Aufarbeitungen korrigiert. Liegt die mittlere Wiederfindung unterhalb von 50% wird der Gehalt des Musters über eine Standardaddition mit 4 Aufarbeitungen (3-Spikings) bestimmt.

NA-HCT baut sich bei Raumtemperatur in Lösung relativ schnell ab. Alle Lösungen müssen daher im Kühlschrank oder im Autosampler gelagert werden.

## 3 Angaben zur Validierung

Siehe Insitu-Validierung

## 4 Grundlagen

- Methodenentwicklung A-024068

## 5 Definitionen und Abkürzungen

Siehe *Glossar OMCL*

Begriff / Abkürzung	Beschreibung	Ergänzung
MRM	Multiple Reaction Monitoring	Selektives und Sensitives MS Messprinzip
API	Active Pharmaceutical Ingredient	Aktive pharmazeutische Wirkstoffe

## 6 Mitgeltende Dokumente

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

Keine.

## 7 Besondere Hinweise / Sicherheitshinweise

Nitroso-HCT ist potentiell kanzerogen. Es sind entsprechende Schutzmassnahmen zu treffen. NA-HCT ist in Lösung bei Raumtemperatur nicht stabil. Alle RM-Lösungen und Aufarbeitungen müssen im Kühlschrank gelagert werden.

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

### 8.1 Referenzmaterial

Bezeichnung	Gehalt / Reinheit	S-Nr. LIMS	Herst./Lieferant / Art.-Nr. (z.B.)
4-Nitroso Hydrochlorothiazid	Siehe AZ	S-4382	Clearsynth Labs Ltd.

### 8.2 Kontrollmaterial

n.A.

### 8.3 Prüfeinrichtungen und Materialien

Bezeichnung	Info Protokollierung LIMS
LC-MS/MS (z.B. 0524A)	E: Protokollierung bei Ergebnisse S: Protokollierung bei Substanzen
	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
Ammoniumformiat	S-2034	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Milli-Q Wasser	S-2206	OMCL

### 8.5 Lösungen

Bezeichnung Lösung	Herstellung	Haltbarkeit / Lager-Temp.
N-Nitroso HCT-Stock	Ca. 1 mg der Lösung werden in einen 10 mL Messkolben eingewogen und mit MeOH auf 10 mL verdünnt.	7 Tage bei -20°C
N-Nitroso HCT-Dil 1	50 µL der Stock-Lösung werden mit MeOH: H <sub>2</sub> O MilliQ 1:1 ad 20 mL verdünnt	12 h bei 2-8°C
N-Nitroso HCT-Dil 2	1000 µL der Dil 1 Lösung werden mit mit MeOH: H <sub>2</sub> O MilliQ 1:1 ad 10 mL verdünnt.	12 h bei 2-8°C
Diluent	25 mL MeOH werden mit 25 mL H <sub>2</sub> O MilliQ vermischt.	14 Tage bei RT
Eluent A	315 mg Ammoniumformiat werden in einen 500 mL Schottflasche gegeben, mit 500 mL H <sub>2</sub> O MilliQ gelöst und mit 1.0 mL Ameisensäure versetzt.	14 Tage bei RT

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

## 9 Vorgehen

Aus ca. 3 – 5 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 3 Aufarbeitungen hergestellt, wobei zwei davon mit NA-HCT gespikt werden (1 ppm / 2 ppm). Das NA-HCT bei Raumtemperatur nicht stabil ist, müssen die fertigen Aufarbeitungen möglichst schnell in den Autosampler / Kühlschrank.

Die Quantifizierung wird über eine externe Kalibriergerade durchgeführt, wobei der berechnete Wert mit der mittleren Wiederfindung korrigiert wird. Liegt die mittlere Wiederfindung unterhalb von 50%, so muss der Gehalt mit einer Standardaddition mit 4 Aufarbeitungen (3 gespikte Aufarbeitungen) bestimmt werden. Für die Spikings der Standardaddition werden 33%, 66% bzw. 100% der mit der externen Kalibration (korrigiert mit Wiederfindung) bestimmten Konzentration verwendet.

Die Einwaagen werden mit 500 µL Methanol (gekühlt) und dem Spiking versetzt und kurz gevortext. Anschliessend wird mit H<sub>2</sub>O MilliQ (gekühlt) auf 1000 µL zugegebenes Volumen ergänzt. Die Proben werden erneut gevortext und 5 min auf dem Rotationsschüttler extrahiert. Anschliessend werden die Proben kurz (1-2 min) bei ca. 20'000 g zentrifugiert. Ein Aliquot des überstehenden, klaren Lösung wird analysiert.

Zu Beginn einer Sequenz werden Kalibrierlösungen (Blank-Spike 0.75 ng/mL – 30 ng/mL) analysiert. Nach dem Messen jedes Musters (3 Injektionen) wird ein Blank Extrakt injiziert. Nach 12 Musterinjektionen (4 Muster) und am Schluss der Sequenz wird ein 15 ng/mL Blank-Spike Check-Standard gemessen. Vor und nach dem Check-Standard wird ein Blank injiziert. Aufgrund der Instabilität des NA-HCT soll eine Sequenz maximal 8 Muster enthalten.

### Geräteparameter LC

Säule	Kinetex XB-C18, 2.1 x 100 mm, 1.7 µm (S-1668-690)		
Mobile Phase A	Ammoniumformiat Puffer pH 3.0		
Mobile Phase B	Acetonitril		
Autosampler Temperatur	5°C		
Säulen Temperatur	40°C		
Injektionsvolumen	5 µL		
Fluss	0.3 mL/min		
Gradient	RT/ min	%A	%B
	0	90	10
	1.0	90	10
	10	80	20
	12	0	100
	14	0	100
	14.1	90	10
	17	90	10
UV Detektion (optional)	220 nm, 4 nm Bandwidth		

## Geräteparameter MS

Quelle	ESI / negativ
Scan type	MRM
MRM detection window	Unscheduled
Curtain Gas (CUR)	30
Collision Gas (CAD)	Medium
Temperature (TEM)	500
Ion Source Gas 1 (GS1)	40
Ion Source Gas 2 (GS2)	40
Ion Spray Voltage [IS]	-4500
Declustering Potential (DP)	70
Entrance Potential (EP)	10
Collision Cell Exit Potential (CXP)	13

## MRM Übergänge

ID	Q1	Q3	CE	Dwell Time [msec]
NA_HCT_1 (Quant)	325	294	-29	250
NA_HCT_2 (Qual)	325	217	-24	250
NA_HCT_3 (Qual)	325	281	-16	250

## Diverter Valve

RT	Diverter Valve
0.0	Waste
7.0	MS
10.0	Waste

## 10 Auswertung und Messunsicherheit

### 10.1 Auswertung

Zur Bestimmung des Gehalts an NA-HCT wird die Fläche der ungespikten Probe mit der Kalibriergeraden (1/x Gewichtung, 6-Punkte) in die Konzentration umgerechnet. Die berechnete Konzentration wird anschliessend mit der mittleren Wiederfindung der beiden Spiking-Experimente korrigiert.

$$W = \frac{C_{Bs} - \frac{C_{B0} * Ew_s}{Ew_0}}{C_s} * 100$$

W: Wiederfindung / %

C<sub>Bs</sub>: Berechnete Konzentration der gespikten Probe / ng/mL

C<sub>B0</sub>: Berechnete Konzentration der ungespikten Probe / ng/mL

E<sub>w<sub>s</sub></sub>: Einwaage der gespikten Probe / mg

E<sub>w<sub>0</sub></sub>: Einwaage der ungespikten Probe / mg

C<sub>s</sub>: Konzentration des dazugespikten Analyten in der Probe / ng/mL

$$G = \frac{C_{B0} * 2 * 100}{W_1 + W_2}$$

- G: Gehalt in ng/mL  
 C<sub>B0</sub>: Berechnete Konzentration der ungespiketen Probe / ng/mL  
 W<sub>1</sub>: Wiederfindung aus Spiking-Experiment 1  
 W<sub>2</sub>: Wiederfindung aus Spiking-Experiment 2

Liegt die mittlere Wiederfindung  $((W_1 + W_2)/2)$  unterhalb von 50% so muss der Gehalt der Probe über eine Standardaddition bestimmt werden.

## 10.2 Messunsicherheit

Wird im Rahmen der Insitu-Validierung abgeschätzt.

## 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.

Laboraufträge

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)	$r \geq 0.995$

SST-Kriterien Muster

Parameter	Kriterium
Mittlere Wiederfindung	$\geq 50\%$
Korrelation Standardaddition (falls durchgeführt)	$r \geq 0.995$
Qualifier ratios	$\pm 25\%$

## 13 Versionsübersicht

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