

# Análisis Rápido de Nitrosaminas Genotóxicas por HPLC-MS/MS

**Ensayo Sensible y Robusto con un Sistema SCIEX Triple Quad™ 4500 y el Sistema ExionLC™**

Lihai Guo, Zhimin Long, Xiangyang Leng  
APAC Applications Support Center, China

Las impurezas genotóxicas (GTI) son productos intermedios de reacción o degradados formados durante la síntesis, formulación o almacenamiento del fármaco. Estas impurezas pueden dañar el material genético humano a niveles muy bajos lo que lleva a mutaciones del ADN que pueden contribuir a la tumorigénesis y carcinogenicidad. Debido a las potencias de estos compuestos representan una amenaza para la seguridad de los medicamentos. Para evitar incidentes de retiro a gran escala, como los relacionados con el mesilato de nelfinavir (Viracept) en 2007 o valsartán (Diovan) en 2018, las agencia reguladoras, incluidas la FDA de E.E.U.U. y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), han emitido directrices sobre los límites permitidos de impurezas genotóxicas en productos farmacéuticos para garantizar su seguridad. Estas guías establecen que la exposición a GTI debe estar por debajo del umbral de riesgo toxicológico (TTC por sus siglas en inglés) de 1.5 µg por día.

Las nitrosaminas son algunos de los carcinógenos químicos más potentes y mejor estudiados. Se encuentran comúnmente en granos, carnes curadas, cerveza, tabaco y agua potable, además de ser intermedios en síntesis orgánica. Debido a su potente genotoxicidad, es importante cuantificar con precisión este grupo de compuestos en ingredientes y productos farmacéuticos durante el desarrollo de fármacos. Sin embargo, puede ser un desafío desarrollar un método analítico robusto y sensible para ellos debido a su bajo peso molecular y alta hidrofilia.

Para valsartán con una dosis diaria estándar de 80 mg/día, para estimar la sensibilidad requerida de un ensayo de nitrosamina, se puede usar la siguiente ecuación:

$$\text{Required LLOQ} < \frac{1.5 \mu\text{g allowed nitrosamine}}{0.080 \text{ g daily dose}}$$

$$\text{Required LLOQ} < 18.75 \frac{\mu\text{g}}{\text{g}}$$

En esta publicación, se describe un método para el análisis de ocho compuestos de nitrosamina, con un límite inferior de cuantificación (LLOQ) de 0.05 µg/g en un medicamento que



corresponde a significativamente menos que el TTC para la mayoría de los productos farmacéuticos.

## Características clave del sistema SCIEX Triple Quad 4500 con sistema ExionLC

- El sistema SCIEX Triple Quad 4500 está probado en la industria como un sistema sensible y robusto para la cuantificación.
- El sistema ExionLC combina a la perfección con los espectrómetros de masas SCIEX que proporcionan una solución completa de LC-MS/MS.

## Métodos

**Preparación de la muestra:** Las muestras se prepararon disolviendo el producto farmacéutico final, en este caso, vaciando el contenido de una cápsula de 80 mg, y agregando 40 ml de MeOH: agua 1: 1, llevando la concentración a 2 mg/mL. La mezcla se homogeneizó en un vórtex durante 1 minuto seguido de sonicación en un baño de ultrasonido durante 20 minutos. La solución se dejó sedimentar durante 1 hora a temperatura ambiente y el sobrenadante se transfirió y centrifugó durante 5 minutos a 14k RPM. Alícuotas de la solución se transfirieron a viales de HPLC para análisis por LC-MS/MS. Los estándares de referencia se preparan diluyendo mezclas de los ocho estándares de trabajo de los compuestos en el disolvente de extracción a concentraciones finales de 0.1, 0.2, 1.0, 2.0, 5.0, 10 y 20 ng/mL de cada analito antes de la mezcla y transferencia. El 0.1 ng/mL en el extracto corresponde a 0.05 µg/g en la tableta.

**Condiciones Analíticas:** Se utilizaron para el análisis de muestras, un Sistema SCIEX ExionLC y un SCIEX Triple Quad 4500, con una columna de separación HPLC Phenomenex Kinetex F5, 2.5  $\mu$ m, 50 x 2.1 mm.

- Fase móvil A: Agua con 0.1% ácido fórmico v:v
- Fase móvil B: Metanol
- Flujo: 0.5 mL/min
- Temperatura de la columna: 40 °C
- Gradiente LC esta especificado en la tabla 2.

El espectrómetro de masas fue operado en modo MRM positivo usando ionización por APCI.

- Corriente del Nebulizador: 3  $\mu$ A
- Curtain Gas: 30 psi
- GS1: 35 psi
- CAD: 8
- Temp: 350 °C
- Las transiciones MRM se especifican en la Tabla 1.

**Tabla 1. Valores dependiente de compuesto del espectrómetro de masas.** Los potenciales de entrada y salida se establecieron en 10 para todas las transiciones MRM.

Compuesto	Q1	Q2	DP	CE
<i>N-Nitrosodimethylamine (NDMA)</i>	75.1	58.1	40	16
<i>N-Nitrosodiethylamine (NDEA)</i>	103.1	75.0	40	15
<i>N-Nitrosodi-n-propylamine (NDPA)</i>	131.1	89.1	40	20
<i>N-Nitrosodi-n-butylamine (NDBA)</i>	159.1	103.1	40	21
<i>N-Nitrosopyrrolidine (NPYR)</i>	101.1	55.1	40	21
<i>N-Nitrosopiperidine (NPIP)</i>	115.1	69.0	40	28
<i>N-Nitrosomorpholine (NMOR)</i>	117.1	87.1	40	23
<i>N-Nitrosodiethanolamine (NDELA)</i>	135.1	104.1	40	8

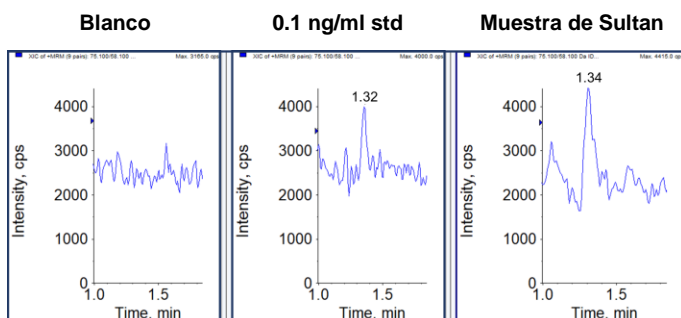


Figura 1. Análisis de Cápsulas de Sultan.

**Tabla 2. Gradiente HPLC.**

Tiempo	Buffer A (%)	Buffer B (%)
0.0	85	15
0.5	85	15
5.0	5	95
5.1	85	15
6.5	85	15

## Resultados

Se evaluaron las propiedades del análisis para garantizar su idoneidad para la adopción para la cuantificación.

## Especificidad

Se disolvió un estándar de referencia de valsartán a 2 mg/mL y se añadió con las disoluciones de trabajo de las ocho nitrosaminas a 0,5 ng/ml, 5,0 ng/mL y 15 ng/mL para obtener disoluciones equivalentes a 0,25, 2,5 y 7,5  $\mu$ g/g de las muestras API. Se preparó una muestra adicional disolviendo una cápsula de Sultan (difenhidramina) a una concentración de 2,0 mg/mL. Las muestras se prepararon como se describe anteriormente y se analizaron por LC-MS/MS. Las respuestas para todas las muestras enriquecidas con nitrosamina fueron lineales, sin interferencias en el blanco. La muestra de sultán mostró una respuesta a la n-nitrosodimetilamina que se cuantificó a 0.2 ng/mL (que se muestra en la Figura 1), el equivalente a 0.1  $\mu$ g/g en el medicamento, que está por debajo del umbral de riesgo toxicológico (TTC).

Ninguno de los otros compuestos se observó en la muestra o el blanco.

## Rango Dinámico Lineal

Las disoluciones del estándar de trabajo se prepararon por dilución en serie de la disolución stock primaria en la disolución tampón de muestra a 0.1, 0.2, 1.0, 5.0, 10 y 20 ng/mL.

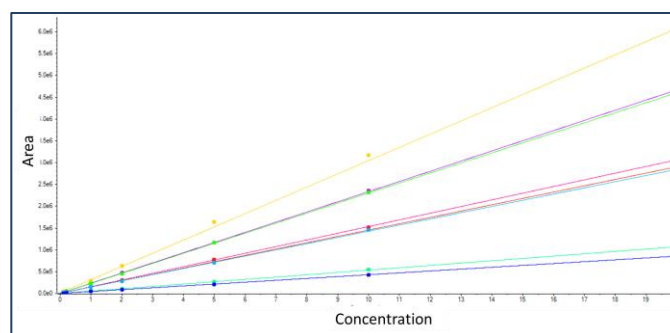
Como se puede observar en la Figura 2, la respuesta para los ocho compuestos es lineal en el rango de calibración.

**Tabla 3. Recobro y Reproducibilidad para Controles de Calidad (QC).**

Compuesto	0.5 ng/mL		5.0 ng/mL		15.0 ng/mL	
	% Recobro	% RSD	% Recobro	% RSD	% Recobro	% RSD
NDMA	92.9	2.34	90.4	2.68	89.5	1.44
NDEA	104.4	2.31	108.5	1.22	109.8	1.06
NDPA	100.0	2.67	104.6	2.91	104.5	2.78
NDBA	102.2	2.37	99.9	2,34	98.4	2.26
NPYR	106.2	2.68	111.1	1.84	112.0	0.69
NPIP	101.7	3.49	105.9	2.03	106.0	0.61
NMOR	96.2	3.75	99.2	3.33	100.1	1.31
NDELA	100.6	4.42	92.3	4.12	95.9	1.37

## Recuperación y Reproducibilidad

La recuperación y la reproducibilidad se evaluaron para los Controles de Calidad (QC) descritas en la sección de Especificidad. La recuperación de los ocho compuestos en los tres niveles de Control de Calidad cayó entre 89.5% y 112.0%, con %RSD (n = 6 en cada nivel) entre 0.61% y 4.42%. Los datos se resumen en la Tabla 3. El % RSD (n = 6) se evaluó en el LLOQ (0.1 ng/mL), para los ocho compuestos que cayeron entre 1.53% y 2.48%, se resume en la Tabla 4.

**Figura 2. Curvas de Calibración para las Ocho Nitrosaminas Compounds.**

## Resumen

En esta publicación, se ha descrito un método LC-MS/MS de 6.5 minutos para la cuantificación de ocho compuestos de nitrosamina en el producto farmacéutico final utilizando el sistema SCIEX Triple Quad 4500 en conjunto con un sistema ExionLC. Los resultados demuestran una buena especificidad, con un rango dinámico lineal de 0.1 a 20 ng/mL (coeficiente de correlación > 0.998). El LLOQ de 0.1 ng/mL es equivalente a 0.05 µg/g de impureza en el medicamento, lo cual es menor al umbral de riesgo toxicológica (TTC) definido por EMEA y USFDA.

**Tabla 4. Reproducibilidad LLOQ.**

Compuesto	%RSD (n=6)	Compuesto	%RSD (n=6)
NDMA	2.11	NPYR	1.67
NDEA	1.53	NPIP	1.91
NDPA	2.48	NMOR	1.78
NDBA	1.62	NDELA	1.62

The SCIEX clinical diagnostic portfolio is For In Vitro Diagnostic Use. Rx Only. Product(s) not available in all countries. For information on availability, please contact your local sales representative or refer to <https://sciex.com/diagnostics>. All other products are For Research Use Only. Not for use in Diagnostic Procedures.

Trademarks and/or registered trademarks mentioned herein, including associated logos, are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners in the United States and/or certain other countries.

© 2020 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-9127-A. AB SCIEX™ is being used under license.