

Método Altamente Selectivo y Sensible para la Cuantificación de Nitrosaminas en Sustancias Farmacológicas en Valsartán

Cuantificación con el sistema SCIEX Triple Quad™ 5500+ LC-MS/MS - QTRAP® Ready acoplado al sistema ExionLC™ AD

Aman Sharma¹, Sandeep Choudhary¹, M Chandrasekar¹, Manoj Pillai¹
SCIEX, India

Valsartán y otros medicamentos relacionados a la familia "sartán" se usan para tratar pacientes con hipertensión (presión arterial alta) y aquellos con insuficiencia cardíaca o que han sufrido un ataque cardíaco. El mecanismo de acción de los "sartanes" es bloquear la acción de la Angiotensina-II, una hormona que contrae los vasos sanguíneos y hace que aumente la presión arterial.

En julio de 2018, la US FDA emitió un aviso de retiro del mercado para una gran cantidad de medicamento genérico usado para el bloqueo del receptor de Angiotensina-II, Valsartán, fabricado en instalaciones de China, debido a la niveles inaceptables de contaminación por el compuesto genotóxico n-nitrosodimetilamina (NDMA). En los siguientes años, se han emitido cientos de retiros de productos farmacéuticos, incluidos muchos lotes del Valsartán, debido a contaminación por nitrosamina. Además de los efectos desconocidos de la exposición del paciente a estas impurezas, no es posible calcular con precisión el costo financiero de estos retiros, los cuales podrían alcanzar los millones de dólares americanos. En esta publicación se describe un método para la detección y cuantificación de seis compuestos de nitrosamina comunes, con la capacidad de poder monitorear de manera robusta y precisa estos contaminantes importantes, a niveles por debajo de los límites establecidos por entidades regulatorias.

La contaminación por nitrosamina puede tener múltiples fuentes. Se ha demostrado que surge del uso involuntario de ingredientes o equipos contaminados, y las nitrosaminas también se pueden formar como productos secundarios de ciertas reacciones químicas sintéticas. En al menos un caso, se pensó que se introdujo NDMA



al cambiar la ruta sintética de valsartán para mejorar la eficiencia de la producción, ver Figura 1.¹

El método analítico descrito aquí es para seis nitrosaminas, consulte la Tabla 1, y puede detectarlas y cuantificarlas con precisión a niveles muy por debajo de los límites actuales requeridos por la FDA en el principio activo ingrediente farmacéutico valsartán (API, por sus siglas en inglés Active Pharmaceutical Ingredient). Esto debería permitir que el método sea útil y aplicable en el futuro cuando los límites establecidos sean reducidos, como lo han discutido las agencias reguladoras.²

Características clave del método cuantitativo dirigido a nitrosamina por LC-MS/MS

- La preparación de la muestra es simple, solo se usó una disolución en metanol.
- La cromatografía optimizada separa las seis impurezas de nitrosamina del valsartán, asegurando una buena sensibilidad en la detección de dichas impurezas.
- El sistema SCIEX Triple Quad 5500+ proporciona la sensibilidad requerida para la detección de las seis impurezas de nitrosamina
- El amplio rango dinámico lineal del sistema garantiza la detección de impurezas de bajo nivel en presencia de altas concentraciones de API

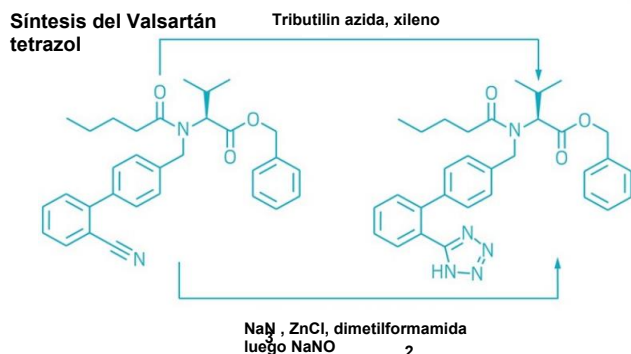


Figura 1. Cambio en la síntesis de Valsartán Tetrazol.

El paso sintético original (reacción superior) usando azida de tributilestaño se cambió a un paso de mayor rendimiento (abajo). El nitrito de sodio forma ácido nitroso en condiciones ácidas y puede reaccionar con DMF residual para formar NDMA.

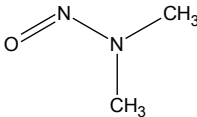
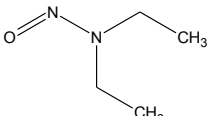
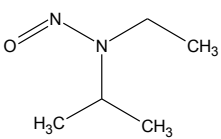
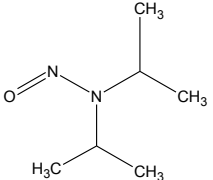
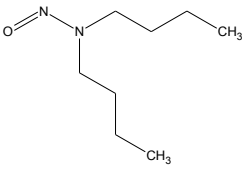
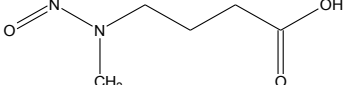
Métodos

Preparación de la muestra: El API fue pesado y disuelto en metanol al agitar por vortex a una concentración de 100 mg/mL.

Cromatografía: Se desarrollo un gradiente para separar todos los analitos en el panel para el API del valsartán para evitar que ocurra cualquier supresión en la ionización, y se incluye un paso de desvío para evitar que grandes cantidades de API contaminen la fuente del espectrómetro de masas. Como ejemplo, un cromatograma se muestra en la Figura 2. Consulte la información suplementaria para más detalle sobre la cromatografía, incluyendo el perfil del gradiente, columna y fases móviles.³

Espectrometría de Masas: El sistema SCIEX Triple Quad™ 5500+ - QTRAP® Ready operado en modo positivo utilizando la ionización química a presión atmosférica, mediante el software Analyst® 1.7.1. Los parámetros MRM para los compuestos de nitrosaminas (DP, EP, CE, CXP) fueron optimizados, así como los parámetros de la fuente. Los detalles pueden encontrarse en la información suplementarias

Tabla 1. Estructuras de los Compuestos de Nitrosamina.

Compuesto	Estructura
nitrosodimetilamina NDMA	
nitrosodietilamina NDEA	
nitrosoetilisopropilamina NEIPA	
nitrosodiisopropilamina NDIPA	
nitrosodibutilamina NDBA	
ácido nitrosometilaminobutírico NMBA	

Preparación del Estándar: Soluciones Stock de 1.0 mg/mL en MeOH se almacenan a 20°C hasta su uso. Soluciones de trabajo estándar se prepararon por dilución en serie del stock en MeOH al 10% en agua para concentraciones de 500 a 0.5 ng/mL. El punto de calibración más bajo corresponde a 0.005 ppm (5 ng/g) con respecto a la solución de prueba.

Procesamiento de Datos: Se utilizó el software Mutliquant™ 3.0.3. para el análisis de los datos. Se utilizó una regresión lineal ponderada de $1/X^2$ para el cálculo de las concentraciones.

2

Resultados

Se dedicó tiempo para optimizar la cromatografía de modo que el API del valsartán se separe de las otras 6 nitrosaminas. Usando el gradiente establecido, se obtiene una buena separación (Figura 2). Debido a la elevada concentración de API, es fundamental lograr la separación de las impurezas para reducir el riesgo de supresión de iones.

La linealidad, la precisión y exactitud se evaluaron como parte de la verificación del método. El recobro en matriz se evaluó en el límite de detección, límite de cuantificación y en el límite de exposición diaria especificado por la FDA (0.03 ppm en API).

La linealidad para los seis compuestos fue buena en el intervalo de nueve puntos de 0.5 a 500 ng/mL, con todos los compuestos mostrando valores de correlación > 0.99 r.

Los datos del recobro y reproducibilidad para los picos de LOD, LLOQ y nivel de especificación en la matriz de valsartán se muestran en la Tabla 2. Vale la pena señalar que, aunque se utilizó API de grado reactivo para este análisis, se encontraron cinco de los seis compuestos de nitrosamina en este panel del API. Debido a esto, se usó la cuantificación por adición de estándar para calcular el recobro.

Tabla 2: Exactitud y precisión del Recobro.

Analito	LOD 0.005 ppm n=6		LLOQ 0.01 ppm n=6		Nivel Espectro 0.03 ppm n=6	
	%CV	Precisión	%CV	Precisión	%CV	Precisión
NDMA	9.41	104.5	2.96	94.3	3.78	95.6
NMBA	8.08	106.9	5.38	100.9	3.22	97.3
NDEA	6.58	104.7	0.94	103.1	3.41	100.2
NEIPA	4.45	95.5	1.61	96.8	2.57	102.4
NDIPA	6.73	102.3	6.17	90.3	3.82	82.8
NDBA	9.69	94.5	9.15	100.8	3.18	97.8

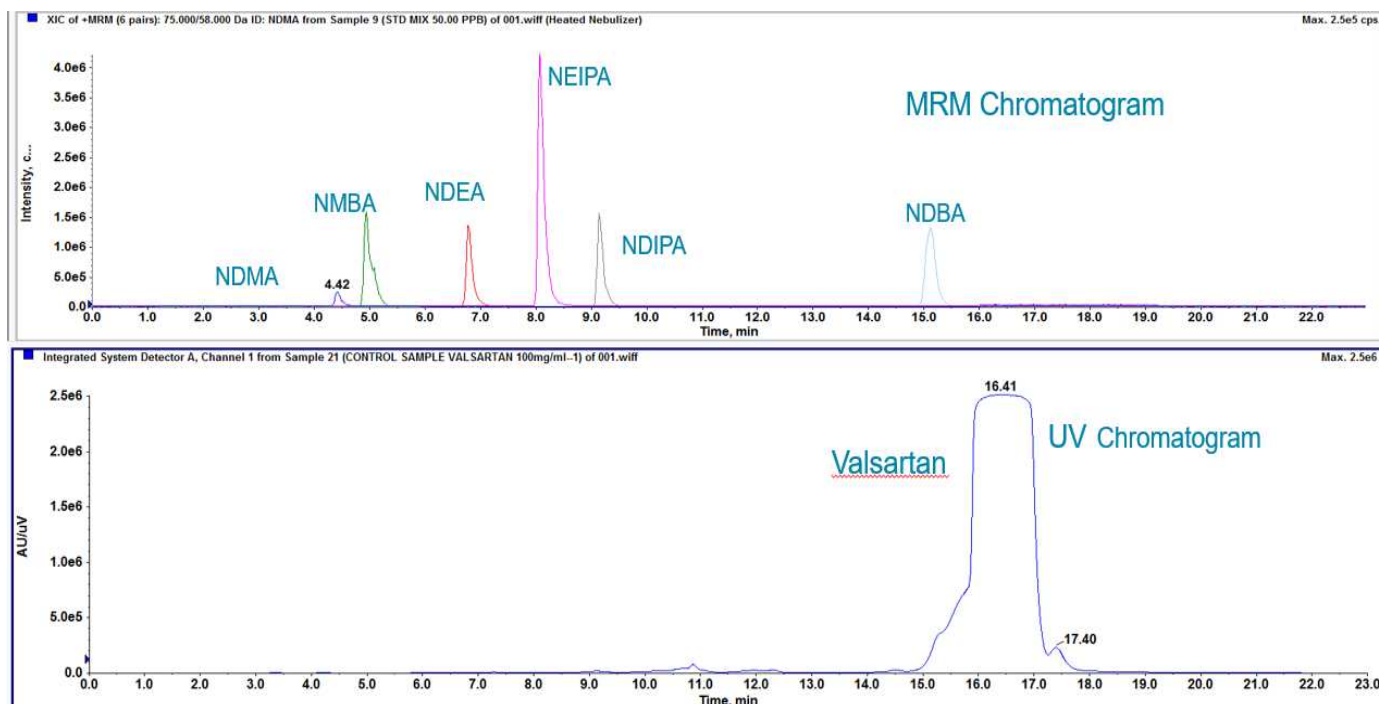


Figura 2. Cromatograma de Ejemplo. Cromatogramas de iones extraídos para los 6 estándares de nitrosaminas (arriba) a 50 ng/mL junto con su cromatograma UV mostrando la elución del valsartán (abajo).

Conclusiones

El método descrito aquí es capaz de detectar y cuantificar con precisión las seis nitrosaminas en el API del Valsartán a niveles muy por debajo de las especificaciones actuales por la FDA. La implementación de este método en el sistema SCIEX Triple Quad 5500+ - QTRAP Ready permitirá el monitoreo de los seis compuestos de nitrosamina listados para ayudar a asegurar menos retiros de productos costosos y una exposición innecesaria del paciente a estos compuestos genotóxicos.

Referencias

1. American Chemical Society, C&EN news, "A side reaction may have led to impurities found in valsartan heart drugs", Published online, Feb 19, 2019.
2. www.fda.gov
3. [Download Supplementary Information](#)

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 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. Related to RUO-MKT-02-11212-A. AB SCIEX™ is being used under license.