

Rápida análise de nitrosaminas genotóxicas por HPLC-MS/MS

Sensível e robusto ensaio utilizando o SCIEX Triple Quad™ 4500 System e o ExionLC™ System

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

Introdução

As impurezas genotóxicas (GTI's) são produtos intermediários reativos ou degradantes formados durante a síntese, formulação ou armazenamento do medicamento. Essas impurezas podem danificar o material genético humano em níveis muito baixos, levando a mutações no DNA que podem contribuir para a tumorigênese e a carcinogenicidade. Por causa da potência desses compostos, eles representam uma ameaça à segurança da medicação. Para evitar incidentes de recall em grande escala, como aqueles envolvendo *nelfinavir mesylate* (Viracept) em 2007, ou *valsartan* (Diovan) em 2018, agências reguladoras, incluindo o FDA dos EUA e a Agência Europeia de Medicamentos (EMA), publicaram diretrizes sobre os limites permitidos de impurezas genotóxicas em produtos farmacêuticos para garantir sua segurança. Estas diretrizes declaram que a exposição a GTIs deve estar abaixo do limite de atenção toxicológica (TTC, Threshold of Toxicological Concern) de 1,5 µg por dia.

As nitrosaminas são alguns dos carcinógenos químicos mais potentes e bem estudados. Eles são comumente encontrados em grãos, carnes curadas, cerveja, tabaco e água potável, além de serem intermediários na síntese orgânica. Devido à sua potente genotoxicidade, é importante quantificar com precisão esse grupo de compostos em ingredientes e produtos farmacêuticos durante o desenvolvimento de medicamentos. No entanto, pode ser um desafio desenvolver um método analítico robusto e sensível para eles, devido a sua baixa massa molecular e alta hidrofobicidade.

Para *valsartan* com uma dose diária padrão de 80 mg/dia, para estimar a sensibilidade necessária de um ensaio de nitrosamina, a equação abaixo pode ser usada:

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

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

Nesta publicação, é descrito um método para a análise de oito nitrosaminas, com um limite inferior de quantificação (LLOQ) de 0,05 µg/g em um fármaco que corresponde a significativamente menos do que o TTC para a maioria dos produtos farmacêuticos.



Principais recursos do SCIEX Triple Quad™ 4500 System com ExionLC™ System

- O SCIEX Triple Quad™ 4500 System é comprovado pela indústria como sensível e robusto instrumento para quantificação
- O ExionLC™ System combina perfeitamente com espectrômetros de massas da SCIEX, fornecendo uma solução LC-MS/MS completa e robusta

Métodos

Preparação da Amostra: As amostras foram preparadas dissolvendo o medicamento final, neste caso, o conteúdo de uma cápsula de 80 mg, esvaziando o conteúdo e adicionando 40 mL de MeOH:Água 1:1, levando a concentração para 2 mg/mL. A mistura foi agitada em vórtice por 1 minuto seguido por sonicação em um sonificador de banho por 20 minutos. A solução foi deixada assentar durante 1 hora à temperatura ambiente e o sobrenadante foi transferido e centrifugado durante 5 minutos a 14k RPM. Alíquotas da solução foram transferidas para frascos de HPLC para análise por LC-MS/MS. Os padrões foram preparados diluindo misturas dos oito padrões de trabalho do composto no solvente de extração para concentrações finais de 0,1, 0,2, 1,0, 2,0, 5,0, 10 e 20 ng/mL de cada analito antes da mistura e transferência. O 0,1 ng/mL no extrato corresponde a 0,05 µg/g no comprimido.

Condições analíticas: O SCIEX ExionLC™ System e SCIEX Triple Quad™ 4500 System foram usados para análise de amostra, com uma coluna de HPLC Phenomenex Kinetex F5, 2,5 µm, 50x2,1 mm para separação.

- Fase móvel A: Água com 0,1% de ácido fórmico por volume
- Fase móvel B: Metanol
- Vazão cromatográfica: 0,5 mL/min
- Temperatura da coluna: 40°C
- O Gradiente está especificado na Tabela 2.

O espectrômetro de massas foi operado no modo MRM positivo utilizando ionização por APCI

- Nebulizer current: 3µA
- Curtain Gas: 30 psi
- GS1: 35 psi
- CAD: 8
- Temp: 350°C

As transições de MRM encontram-se especificadas na Tabela 1.

Tabela 1. Valores de Parâmetros Dependentes do Composto. EP e CXP foram ajustados para 10 V para todas as transições de MRM.

Compound	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 (NPLYR)</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

Tabela 2. Gradiente do HPLC.

Time	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

As propriedades da análise foram avaliadas para garantir sua adequação para adoção para quantificação.

Especificidade

Um padrão de *valsartan* foi dissolvido para 2 mg/mL e adicionado com soluções de trabalho das oito nitrosaminas a 0,5 ng/mL, 5,0 ng/mL e 15 ng/mL para fazer soluções equivalentes a 0,25, 2,5 e 7,5 µg/g de amostras API. Uma amostra adicional foi preparada dissolvendo uma cápsula de *Sultan* (*diphenhydramine*) a uma concentração de 2,0 mg/mL. As amostras foram então preparadas conforme descrito e analisadas por LC-MS/MS. As respostas para todas as amostras com adição de nitrosamina foram lineares, sem interferências no branco. A amostra de *Sultan* mostrou resposta para *n-nitrosodimethylamine* quantificada a 0,2 ng/mL (mostrado na Figura 1 abaixo), o equivalente a 0,1 µg/g no medicamento - que está abaixo do limite de atenção toxicológica.

Nenhum dos outros compostos foram observados na amostra, ou no branco.

Faixa Dinâmica Linear

As soluções padrão de trabalho foram preparadas em série por diluição no tampão de diluição da amostra, a partir da solução estoque primária a 0,1, 0,2, 1,0, 5,0, 10 e 20 ng/mL.

Conforme visto na Figura 2 abaixo, a resposta para todos os oito compostos é linear ao longo do intervalo de calibração.

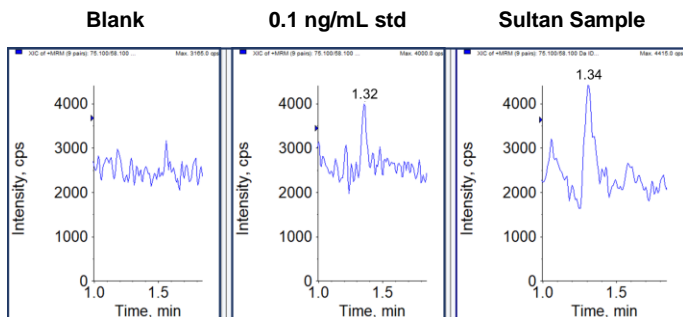


Figura 1. Análise da Cápsula de Sultan

Tabela 3. Recuperação do Controle de Qualidade (QC) e Reprodutibilidade

Compound	0,5 ng/mL		5,0 ng/mL		15,0 ng/mL	
	% Recovery	% RSD	% Recovery	% RSD	% Recovery	% 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

Recuperação e Reprodutibilidade

A recuperação e a reprodutibilidade foram avaliadas para as amostras de QC descritas na seção Especificidade. A recuperação de todos os oito compostos nos três níveis de QC se posicionou entre 89,5% e 112,0%, com RSD% (n = 6 em cada nível) entre 0,61% e 4,42%. Os dados estão resumidos na Tabela 3. O RSD% (n = 6) foi avaliado no LLOQ (0,1 ng/mL) e para os oito compostos que caíram entre 1,53% e 2,48%, está resumido na Tabela 4.

Sumário

Nesta publicação, um método LC-MS/MS de 6,5 minutos foi descrito para a quantificação de oito nitrosaminas no produto final do fármaco utilizando o sistema SCIEX Triple Quad™ 4500 System acoplado a um ExionLC™ System. Os resultados demonstram boa especificidade, com faixa dinâmica linear de 0,1 a 20 ng/mL (coeficiente de correlação > 0,998). O LLOQ de 0,1 ng/mL é equivalente a 0,05 ug/g de impureza no medicamento, sendo inferior ao limite de atenção toxicológica definido pela EMEA e USFDA.

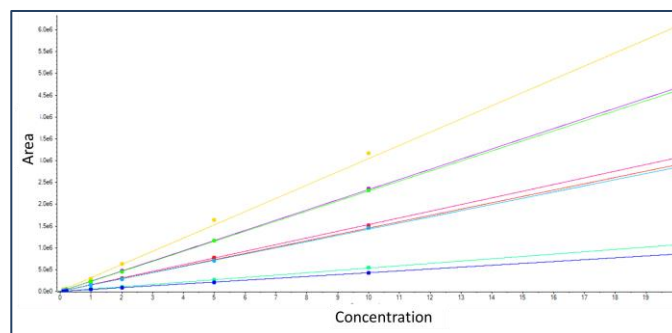


Figura 2. Curvas de calibração para oito nitrosaminas.

Tabela 4. Reprodutibilidade de LLOQ.

Compound	%RSD (n=6)	Compound	%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