

Genotoxische Substanzen in Sartanen

1 Zweck und Anwendungsbereich

Die Prüfvorschrift stellt eine Methode zur Messung von Azidomethylbiphenyl Tetrazole (AZBT) und Azidomethylbiphenyl Carbonitril (AZBC) in Sartanen dar. Die Analyse wird mittels LC-MS/MS durchgeführt.

2 Prinzip der Methode

Homogenisierte Prüfmuster werden in Acetonitril:Wasser 80:20 gelöst. Die gelösten Muster werden für 10 Minuten in ein Ultraschallbad behandelt und anschliessend zentrifugiert. Ein Aliquot des Überstandes wird weiter verdünnt und mit LC-MS/MS gemessen.

3 Angaben zur Validierung

Siehe Validierungsbericht **31_VA_185 Genotoxische Substanzen in Sartanen VA**

4 Grundlagen

- Nicht anwendbar

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
AZBT	Azidomethyl biphenyl tetrazole	Genotoxische Substanz; S-3996
ISTD	Interner Standard	
AZBC	Azidomethyl biphenyl carbonitril	Genotoxische Substanz; S-4019
MK	Messkolben	

6 Mitgeltende Dokumente

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

- **31_VA_185 Genotoxische Substanzen in Sartanen VA**

7 Besondere Hinweise / Sicherheitshinweise

AZBT und AZBC sind potentiell kanzerogen. Es sind entsprechende Schutzmassnahmen zu treffen.

**Unterliegt nicht der Dokumentenlenkung
(OMCL Swissmedic)**

Datum/Visum: 25.06.2021 / i.V. ai

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

8.1 Referenzmaterial

Bezeichnung	Gehalt / Reinheit	S-Nr. LIMS	Herst./Lieferant / Art.-Nr. (z.B.)
Azidomethyl biphenyl tetrazole	98.7 %	S-3996	Toronto Research Chemicals
Azidomethyl biphenyl carbonitrile	99.1 %	S-4019	Chinoin Pharmaceutical and Chemical Works
Azidomethyl biphenyl tetrazole – d4 (Na salt)	96.1 %	S-4130	TLC Pharmaceutical Standards Ltd.
AZBT-Stocklösung 31_PV_179	n/a	S-4048	n/a

8.2 Kontrollmaterial

Nicht anwendbar

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
Milli-Q Wasser	S-2206	OMCL

8.5 Lösungen

Bezeichnung Lösung	Herstellung
AZBT Stock – 1	Ca. 5 mg AZBT in einen 20 mL MK ad 20 mL mit Methanol
AZBT Stock – 2	1 mL AZBT Stock – 1 in einen 10 mL MK ad 10 mL mit Methanol
AZBT Stock – 3	1 mL AZBT Stock – 2 in einen 10 mL MK ad 10 mL mit Methanol
AZBT Stock – 4	1 mL AZBT Stock – 3 in einen 10 mL MK ad 10 mL mit Methanol
AZBC Stock – 1	Ca. 5 mg AZBC in einen 20 mL MK ad 20 mL mit Methanol
AZBC Stock – 2	1 mL AZBC Stock – 1 in einen 10 mL MK ad 10 mL mit Methanol
AZBC Stock – 3	1 mL AZBC Stock – 2 in einen 10 mL MK ad 10 mL mit Methanol
AZBC Stock – 4	1 mL AZBC Stock – 3 in einen 10 mL MK ad 10 mL mit Methanol
AZBT-d4 ISTD Stocklösung	Ca. 5 mg AZBC in einen 50 mL MK ad 50 mL mit Methanol
Diluent 1	1000 mL Acetonitril:Wasser 80:20 + 0.5 mL AZBT-d4 ISTD Stocklösung
Diluent 2	Acetonitril:Wasser 80:20

Um Fehler bei der Einwaage oder der Verdünnung der Lösung auszuschliessen, werden die AZBT Stock – 3 Lösung und die AZBC Stock – 3 Lösung jeweils im Duplikat hergestellt. Von den beiden Stock – 3 Lösungen werden 500 µL in jeweils drei Blankproben gespikt und aufgearbeitet (5 ppm Level). Der Mittelwert des Response der drei gespikten Blankproben darf nicht mehr als 5 % voneinander abweichen. Erst wenn die Lösungen dieses Kriterium erfüllen, dürfen sie für die Analyse von Mustern verwendet werden.

9 Vorgehen

Aus ca. 5 – 10 Tabletten wird ein Mischmuster erstellt. Es wird die Menge Mischmuster eingewogen, welche einer Wirkstoffmenge von 250 mg entspricht. Maximal werden jedoch 1500 mg Fertigprodukt eingewogen. Die Einwaage kann bei Bedarf ohne Einfluss auf die Validität reduziert werden (Minimaleinwaage 30 mg).

Die Einwaage wird mit 10 mL Diluent 1 aufgenommen, kurz gevortext, und 10 min im Ultraschallbad behandelt. Anschliessend wird die Probe 10 min bei 20°C und 10000 g zentrifugiert. Es werden 100 µL des Überstandes in ein Vial transferiert. Es werden 900 µL Diluent 2 dazugegeben und mit LC-MS/MS mit Injektion von 5 µL gemessen.

Es wird eine externe Kalibration mit mindestens 3 Punkten durchgeführt. Wenn möglich, soll die Linearität Kalibrationspunkte mit 10%, 100% und 200% des entsprechenden Grenzwertes enthalten. Die Kalibrationspunkte können bei Bedarf angepasst werden. Der tiefste Kalibrationspunkt darf nicht unterhalb des entsprechenden LOQs liegen.

Von jeder Probe wird eine Zweifachaufarbeitung durchgeführt. Eine dieser Aufarbeitungen wird mit 50% des Grenzwertes des entsprechenden Sartans gespikt.

Bei Proben mit einem Gehalt ab 80% der Limite kann, wenn z.B. von MKA gewünscht, eine Dreifachaufarbeitung erfolgen. Zusätzlich wird dann eine vierte Aufarbeitung zur Bestimmung der Wiederfindung mit einem Spiking von ca. 50% des erhaltenen Wertes aus der Erstanalyse aufgearbeitet. Wenn Muster erhöhte Konzentrationen aufweisen, kann die Kalibration entsprechend erweitert, beziehungsweise die Einwaage reduziert werden.

Nach dem Messen jedes Musters wird ein Blank Extrakt injiziert. Nach 20 Messungen und am Schluss der Sequenz wird der Kalibrationspunkt entsprechend dem Grenzwert als Check-Standard gemessen. Vor und nach dem Check-Standard wird ein Blank injiziert.

Falls bei einem Präparat unerwartete Störpeaks auftreten, kann in Absprache mit AV die Prüfvorschrift dahin angepasst werden, den Störpeak chromatographisch abzutrennen bzw. in der Probenaufarbeitung zu entfernen. In diesem Fall ist eine in-situ Validierung der angepassten Prüfvorschrift erforderlich.

Geräteparameter LC

Säule	InfinityLab Poroshell 120 PFP, 3.0 x 100 mm, 2.7 µm		
Mobile Phase A	Milli-Q Wasser mit 0.1% Ameisensäure		
Mobile Phase B	Acetonitril:Milli-Q Wasser 95:5 (v/v) mit 0.1% Ameisensäure		
Autosampler Temperatur	15°C		
Säulen Temperatur	40°C		
Injektionsvolumen	5 µL		
Fluss	0.4 mL/min		
Gradient	RT/ min	%A	%B
	0	60	40
	0.1	60	40

	5.5	60	40
	12	0	100
	14	0	100
	14.01	60	40
	18.00	60	40
UV Detektion (optional)	220 nm, 4 nm Bandwidth		

Geräteparameter MS

Quelle	ESI / positive
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)	50
Ion Spray Voltage [IS]	5500
Declustering Potential (DP)	61
Entrance Potential (EP)	10
Collision Cell Exit Potential (CXP)	12

MRM Übergänge

ID	Q1	Q3	CE	Dwell Time [msec]
AZBT – 1	277.986	234.90	11	50
AZBT – 2	277.986	207.0	19	50
AZBT-d4 – 1	282.023	239.083	11	25
AZBT-d4 – 2	282.023	211.023	19	25
AZBC – 1	207.000	151.000	46	50
AZBC – 2	192.000	165.000	30	50

Diverter Valve

RT	Diverter Valve
0.1	Waste
4.4	MS
5.8	Waste
8.4	MS
9.6	Waste

10 Auswertung und Messunsicherheit

10.1 Auswertung

Bei AZBT werden die Verhältnisse der Peakflächen der Standardlösungen zu denen des internen Standards gegen die Konzentration der Standardlösungen aufgetragen. Bei AZBC werden die Peakflächen der Standardlösungen gegen die Konzentration der Standardlösungen aufgetragen. Dazu wird eine lineare Regression erstellt. Die Lineare Regression wird mit einer 1/x Gewichtung berechnet, um die Varianzinhomogenität über den kalibrierten Bereich zu kompensieren. Anhand dieser wird die Konzentration der Prüfmuster errechnet. Anhand der gespikten Probe wird die Wiederfindung berechnet. Die berechnete Wiederfindung in der gespikten Probe muss zwischen 70% und 130% liegen.

$$\text{Wiederfindung}\% = \frac{C_{sp} - C_0}{C_s} * 100$$

C_{sp} : Konzentration der gespikten Probe [ng/mL]

C_0 : Konzentration der ungespikten Probe [ng/mL]

C_s : zur Probe gespikte Konzentration [ng/mL]

Wird ein Gehalt über 80% der Limite nachgewiesen, kann der Befund durch eine zusätzliche Dreifachaufarbeitung bestätigt werden. In diesem Fall, wird der Mittelwert der Dreifachaufarbeitung als Resultat ausgewiesen.

10.2 Messunsicherheit

Die Messunsicherheit wurde im Rahmen der Validierung bestimmt und beträgt 20%.

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.

Werte unter 10% des Grenzwert bzw. unter dem LOQ werden im LIMS als «< (entsprechender Wert)» ausgewiesen. Werte grösser als 200 % des Grenzwertes werden im LIMS als «> (entsprechender Wert)» ausgewiesen.

12 Qualitätskontrolle

- Keine signifikant störenden Signale in der Blank-Aufarbeitung
- Keine signifikant störende Koelution in den gespikten Musteraufarbeitungen
- Korrelation der Kalibriergeraden $r > 0.995$
- Check-Standards und gespikte Proben weisen eine Wiederfindung von 70% – 130%

13 Versionsübersicht

Versions-Nr.:	Anpassung Datum/Visum:	Änderung zur Vorversion:
01	24.06.2021/meu	Ersterstellung