



Desarrollo de un método analítico mediante HPLC – MS/MS para la determinación de N-nitrosaminas en fármacos

EMPRESA: INFARMADE SL

MÁSTER EN TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS APLICADAS
UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
TARRAGONA 2021

ANA BELLIDO CORREA

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

Tutorizado por:
Evelin Chaves Navarro (Tutora profesional)
Marta Calull Blanch (Tutora académica)

CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN.....	3
1.1.	DETERMINACIÓN ANALÍTICA.....	6
2.	OBJETIVO.....	8
3.	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	8
3.1.	REACTIVOS Y ESTÁNDARES	8
3.2.	TRATAMIENTO DE MUESTRA	9
3.3.	METODOLOGÍA ANALÍTICA	9
4.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	10
4.1.	SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA.....	10
4.2.	ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MS)	11
4.3.	OPTIMIZACIÓN DEL TRATAMIENTO DE MUESTRA	12
4.4.	EFFECTO MATRIZ	14
4.5.	PARÁMETROS PARA LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO.....	17
4.5.1	<i>Selectividad</i>	17
4.5.2	<i>Linealidad</i>	18
4.5.3	<i>Sensibilidad</i>	19
4.5.4	<i>Precisión</i>	19
5.	CONCLUSIONES.....	20
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	20

1. INTRODUCCIÓN

La Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) informó en julio de 2018 de la retirada del mercado de diferentes medicamentos del grupo de los “sartanes” por la presencia de impurezas que no habían sido detectadas anteriormente. Este problema hizo que la Agencia Europea del Medicamento (EMA) abriera un procedimiento de revisión que ha afectado a fármacos que contienen como principio activo candesartán, irbesartán, losartán, olmesartán y valsartán, todos ellos pertenecientes a la familia de los sartanes (también conocidos como antagonistas de los receptores de la angiotensina II). Éstos son empleados para tratar la hipertensión arterial y enfermedades cardíacas o renales. Su actuación en el organismo consiste en bloquear la acción de la angiotensina II, una hormona que contrae los vasos sanguíneos y hace que aumente la presión arterial. Las impurezas detectadas fueron inicialmente N-nitrosodimetilamina (NDMA) y N-nitrosodietilamina (NDEA), que previamente no estaban identificadas en este grupo de medicamentos, no siendo detectables en ensayos rutinarios para expedición de lotes. Sin embargo, están clasificadas como mutagénicas y probablemente carcinogénicas en humanos [1], [2]. Abdel-Tawab, et al. [3] del Laboratorio Central de Farmacéuticos Alemanes realizó un estudio en el que encontraron contenidos de NDMA entre 3,7 y 22,0 µg por comprimido en exámenes aleatorios de productos de valsartán. Desde entonces, también se han identificado otras N-nitrosaminas que están siendo investigadas por organismos reguladores: N-Nitrosodiispropilamina (NDIPA), N-Nitrosoetilisopropilamina (NEIPA), N-Nitrosodibutilamina (NDBA) y N-Nitroso-N-metil-4-aminobutírico (NMBA), entre otras. También se han identificado nitrosaminas en los medicamentos de ranitidina, empleados para tratar la acidez y el reflujo ácido, y en la metformina, empleado en el tratamiento de la diabetes.

Las nitrosaminas son compuestos orgánicos (*Figura 1*) que se originan por la reacción de una amina con nitritos en medio ácido (*Figura 2*), su formación se verá favorecida a temperaturas elevadas. De modo que, las posibles fuentes de contaminación de este tipo de medicamentos provienen, fundamentalmente, del proceso de síntesis. Durante el procesado del API (*Active Pharmaceutical Ingredient*), bajo ciertas condiciones determinadas y la presencia de nitrito de sodio, nitratos u aminas secundarias y terciarias (suelen emplearse como reactivos y solventes durante el proceso de fabricación), pueden formarse nitrosaminas. Además, el reciclado de solventes, reactivos y catalizadores durante sucesivos procesos de manufactura, así como la contaminación cruzada, también pueden suponer un riesgo debido a la presencia de restos de aminas y otros compuestos que favorecen su formación de no ser controlado y correctamente purificado para su reutilización [2], [4].

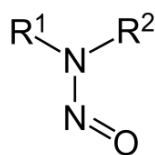


Figura 1. Estructura química general de una nitrosamina.

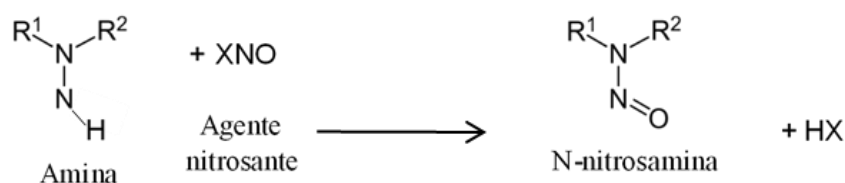


Figura 2. Reacción de formación general de las nitrosaminas.

Las impurezas mutagénicas en los principios activos y en los productos farmacéuticos suponen un riesgo importante para la salud y la seguridad, incluso en pequeñas cantidades, pues pueden dañar el ADN provocando mutaciones y potencialmente cáncer. En la *Figura 3* se muestra una de las posibles reacciones que pueden dar lugar las nitrosaminas, en ella se forma la sal de diazonio. Ésta se conoce como agente alquilante del ADN, es decir, une un grupo alquilo al ADN, modificando la naturaleza de las bases nitrogenadas (mutación) [5].

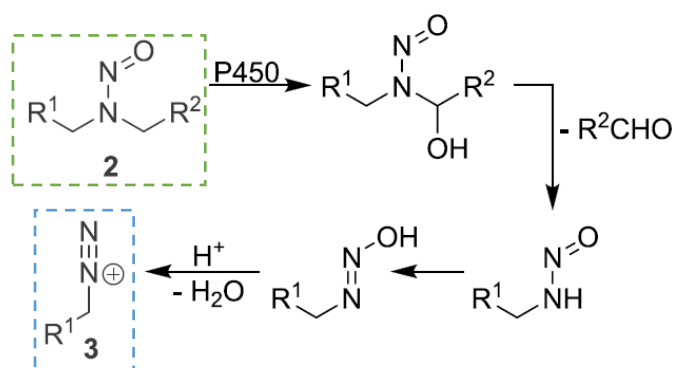


Figura 3. Transformación de una nitrosamina (2) en sal de diazonio (3) mediante hidroxilación enzimática α [5].

Como consecuencia, los fabricantes deberán revisar sus procesos de fabricación e incluir ensayos que detecten a niveles traza la presencia de nitrosaminas, tanto en API como en producto acabado. Se establece un periodo de dos años para la implementación de esta nueva medida de control, lo que pone de manifiesto la necesidad de desarrollar métodos analíticos que permitan la determinación de las nitrosaminas como impurezas. Los límites establecidos a partir de abril de 2021 por la EMA se muestran en la *Tabla 1* para irbesartán, losartán y valsartán [2].

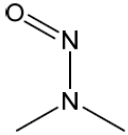
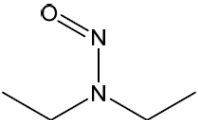
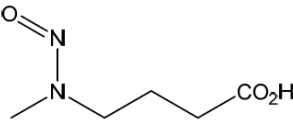
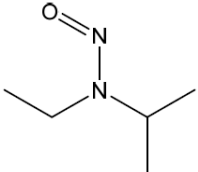
Tabla 1. Límites permitidos en función de la dosis máxima diaria para irbesartán, losartán y valsartán, respectivamente.

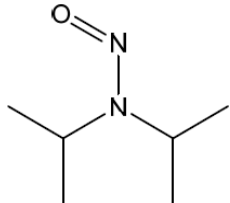
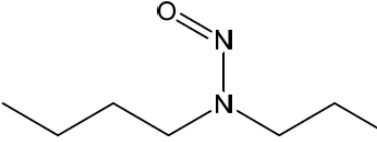
N-nitrosamina (Número CAS)	Activo (dosis máxima diaria)					
	Irbesartán (300 mg)		Losartán (100 mg)		Valsartán (320 mg)	
	ng/día	Límite* (ppm)	ng/día	Límite* (ppm)	ng/día	Límite* (ppm)
NDMA (62-75-9)	96.0	0.32	96.0	0.96	96.0	0.30
NDEA (55-18-5)	26.5	0.09	26.5	0.27	26.5	0.08
NEIPA (16339-04-1)	26.5	0.09	26.5	0.27	26.5	0.08
NDIPA (601-77-4)	26.5	0.09	26.5	0.27	26.5	0.08
NMBA (61445-55-4)	96.0	0.32	96.0	0.96	96.0	0.30
MeNP (16339-07-4)	26.5	0.09	26.5	0.27	26.5	0.08
NDBA (924-16-3)	26.5	0.09	26.5	0.27	26.5	0.08
NMPA (614-00-6)	34.3	0.11	34.3	0.34	34.3	0.11

*La conversión a un límite de especificación en ppm para un medicamento concreto se calcula como el cociente del límite máximo diario (ng) de impureza N-nitrosamina que se puede consumir (basado en estudios con animales), entre la dosis máxima diaria (mg) de producto determinado, tal y como se refleja en el SmPC (summary of product characteristics).

Por otro lado, las nitrosaminas presentan un amplio rango de propiedades fisicoquímicas (polaridad, volatilidad, etc.), de las cuales dependerá el procedimiento analítico requerido para su determinación. En la *Tabla 2* se muestran las estructuras químicas y características principales de las nitrosaminas en estudio.

Tabla 2. Características y propiedades principales de las nitrosaminas en estudio.

Compuesto (fórmula molecular)	Estructura química y nombre común	Peso molecular (g/mol)	Log P	pK _a
NDMA (C ₂ H ₆ N ₂ O)	 N-nitrosodimetilamina	74.082	-0.22	-3.6±0.7
NDEA (C ₄ H ₁₀ N ₂ O)	 N-nitrosodietilamina	102.135	0.49	-3.1±0.7
NMBA (C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃)	 N-Nitroso-N-metil-4-aminobutírico	146.140	-0.28	-3.4±0.7
NEIPA (C ₅ H ₁₂ N ₂ O)	 N-Nitrosoetilisopropilamina	116.220	1.4	-2.9±0.7

NDIPA (C ₆ H ₁₄ N ₂ O)		130.120	1.4	-2.6±0.7
N-Nitrosodiispropilamina				
NDBA (C ₈ H ₁₈ N ₂ O)		158.241	2.45	-3.1±0.7
N-Nitrosodibutilamina				

* Los datos han sido obtenidos de PubChem.

1.1. DETERMINACIÓN ANALÍTICA

La metodología analítica para poder llevar a cabo la determinación de nitrosaminas en producto acabado y/o API requiere de alta selectividad y sensibilidad. El análisis de este tipo de impurezas en fármacos es muy reciente, existiendo un número limitado de fuentes. No obstante, las nitrosaminas han sido estudiadas con anterioridad en otros tipos de matrices, tales como matrices alimentarias y aguas residuales [6], [7], [8].

En la *Tabla 3* se recogen los distintos métodos llevados a cabo hasta ahora por distintas agencias, que cuentan con la sensibilidad necesaria para la determinación de nitrosaminas como impurezas en fármacos.

Tabla 3. Métodos establecidos para la determinación de nitrosaminas en fármacos.

	Agencia	Método analítico	LOD	Compuestos	Ref
1	SWISS MEDIC	GC-MS (Liquid Direct Injection)	0.03 ppm	NDMA, NDEA, NEIPA, NDIPA, NDBA, NMBA	[9]
2	USFDA	GC-MS (Liquid Direct Injection)	0.01 ppm	NDMA, NDEA	[10]
3	USFDA	GC-MS (Head Space Injection)	0.005 ppm (NDMA) 0.02 ppm (NDEA)	NDMA, NDEA	[11]
4	Waters	UPLC-MS/MS	0.1 ng/mL	NDMA, NDEA, NEIPA, NDIPA, NDBA, NMBA	[12]
5	Public Analyst Laboratory (Ireland)	GC-MS (Head Space Injection)	No mencionado	NDMA	[13]
6	FDA U.S. Food & Drug Administration	LC-HRMS	0.05 – 0.32 ng/mL	NDMA, NDEA, NEIPA, NDIPA, NDBA, NMBA	[14]

7	Agilent Technologies	LC-MS/MS (QqQ)	0.025 – 0.1 ng/mL	NDMA, NDEA, NMBA, NEIPA, NDIPA, NDBA, NMEA, NPyR, NPIP, NMPhA, NMIPA, N-tert-butyl-N-ethylnitrosamine	[15]
8	Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis	SFC	0.22 – 4.55 ng/mL	NDMA, NDEA, NMEA, NDPA, NDBA, NDPhA, NPyr, NPip, NMor	[16]

Actualmente, los métodos empleados para la determinación de las nitrosaminas implican técnicas de enriquecimiento que permitan conseguir menores límites de detección. Entre ellas se encuentra la extracción en fase sólida (SPE), microextracción en fase sólida (SPME), SPE dispersiva, cromatografía líquida (LC) y de gases (GC), y análisis cromatográfico con espectrometría de masas (GC-MS, GC-MS/MS, HPLC-MS, HPLC-MS/MS). En general, un método basado en GC-MS tendrá en cuenta el coeficiente de partición y la volatilidad del compuesto a analizar ($\log P$). También deberá considerar la posible degradación térmica que puedan sufrir las nitrosaminas durante el análisis, así como, las reacciones secundarias (favorecidas por alta temperatura) que pueden dar lugar a la formación de impurezas de nitrosaminas. Por otro lado, un método basado en HPLC-MS tendrá en cuenta la hidrofobicidad, afinidad, polaridad y adsorción (pK_a) de las nitrosaminas. Además, debe considerar la posibilidad de falsos positivos que puedan tener lugar en métodos en los que se emplea el agua como solvente ya que, por ejemplo, el NDMA es un subproducto de la desinfección que se forma durante el tratamiento del agua con cloraminas, siendo esta una fuente de contaminación que interfiera su detección. Dada las características y propiedades fisicoquímicas de las nitrosaminas de estudio en este proyecto, la técnica considerada será la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas tandem (HPLC-MS/MS) [17].

Como fuente de ionización, la más empleada es la ionización química en modo positivo. Se podrían emplear otras fuentes de ionización tales como impacto de electrones (EI), pero la fragmentación de las nitrosaminas en este tipo de fuentes proporciona iones más pequeños que podrían estar interferidos por iones de fondo, dificultando su identificación y detección. Por ello, una fuente de ionización de fragmentación suave está recomendada para este tipo de analitos. No obstante, incluso sin fragmentación, las nitrosaminas tienen bajos pesos moleculares y suelen estar interferidas. Este tipo de interferencias iónicas tendrían una solución teórica empleando espectrometría de masas de alta resolución. Empleando HPLC-MS/MS, la detección y cuantificación de las nitrosaminas puede llevarse a cabo mediante ionización química a presión atmosférica (APCI) en modo positivo o ionización por electrospray (ESI). No obstante, existe evidencia de que APCI proporciona una sensibilidad 10 veces mayor. Esto se debe a que, en general, APCI es un método de ionización suave muy adecuado para compuestos polares y relativamente menos polares, térmicamente estables y de

pequeño peso molecular. Además, minimiza el ruido y mejora el rendimiento de la señal [18], [19].

2. OBJETIVO

El objetivo de este proyecto es el desarrollo de un método analítico, empleando cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem (triple cuadrupolo), para la determinación de nitrosaminas como impurezas en sartanes.

3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.1. REACTIVOS Y ESTÁNDARES

Las soluciones estándar de nitrosaminas se obtuvieron de: N-nitrosodietilamina (NDEA) (TCI Chemicals, América), N-nitrosodimetilamina (NDMA) (Sigma Aldrich, Alemania), ácido n-nitroso-n-metil-4-aminobutírico (NMBA) (LGC Dr. Ehrenstorfer, España), N-nitrosodietilamina deuterada (NDEA-d10), N-nitrosodiisopropilamina (NDIPA), N-nitrosodi-n-butilamina (NDBA), N-etil-n-nitroso-2-propanamina (NEIPA) (TRC, Canadá). Fueron reconstituidas en MeOH para una concentración final según se indica en la *Tabla 3*.

Tabla 4. Soluciones estándar de las nitrosaminas en estudio.

N-Nitrosamina	Casa comercial	Concentración (mg·mL ⁻¹)
NDEA	TCI Chemicals, América	5.00
NDMA	Sigma Aldrich, Alemania	5.00
NMBA	LGC Dr. Ehrenstorfer, España	20.00
NDEA-d10	TRC, Canadá	2.50
NDIPA		6.25
NDBA		25.00
NEIPA		6.25

Se prepara una solución trabajo de patrón interno (NDEA-d10) a una concentración de 9 ng/mL. Por otro lado, se prepara una solución *Stock I* en MeOH que contiene a todas las nitrosaminas a una concentración de 0.018 mg·mL⁻¹. A partir de esta solución, se prepararon seis soluciones mezcla de trabajo en MeOH incluyendo a todas las nitrosaminas a distintas concentraciones: 5, 10, 20, 45, 90 y 180 ng·mL⁻¹ (*Tabla 5*). El MeOH empleado es calidad HPLC-MS con una pureza >99.9%.

Tabla 5. Preparación de las soluciones mezcla de trabajo para las nitrosaminas en estudio a distintas concentraciones.

N-Nitrosamina	Volumen a partir de <i>Stock I</i> (μL)	Matraz (mL)	Concentración (ng·mL ⁻¹)
Stock 0.5	13.9	50	5
Stock 1.0	27.8	50	10
Stock 2.0	55.6	50	20
Stock 4.5	125.0	50	45
Stock 9.0	250.0	50	90
Stock 18.0	500.0	50	180

3.2. TRATAMIENTO DE MUESTRA

Blanco de muestra

Se pesan 930 mg de comprimido triturado (equivalente a 150 mg de activo). A continuación, añadir 0.5 mL de solución trabajo de patrón interno y 0.5 mL de MeOH. Vórtex durante 2 min, sonicar 15 min y agitación mecánica 15 min. Después, añadir 4 mL de agua para cromatografía. Vórtex durante 2 min, sonicar 15 min y agitación mecánica 15 min. Por último, centrifugar a 4000 rpm durante 10 min y filtrar sobrenadante con filtro 0.22µm PP en vial de HPLC.

Muestra dopada

Se pesan 930 mg de comprimido triturado (equivalente a 150 mg de activo). A continuación, añadir 0.5 mL de solución trabajo de patrón interno y 0.5 mL de solución mezcla de trabajo a la concentración correspondiente según *Tabla 4*, preparando un total de 6 muestras dopadas a distinta concentración. Vórtex durante 2 min, sonicar 15 min y agitación mecánica 15 min. Después, añadir 4 mL de agua para cromatografía. Vórtex durante 2 min, sonicar 15 min y agitación mecánica 15 min. Por último, centrifugar a 4000 rpm durante 10 min y filtrar sobrenadante con filtro 0.22µm PP en vial de HPLC.

3.3. METODOLOGÍA ANALÍTICA

Para la separación cromatográfica se emplea una columna GEMINI – NX C18 150x4.6 mm, 3µm. La fase móvil consiste en agua MiliQ con 0.1% de ácido fórmico (solvente A) y metanol (solvente B). Se trabaja en modo gradiente comenzando con un 5%B durante 2 minutos, después aumenta a un 13%B donde se mantiene hasta el minuto 5.50, a partir del cual aumenta a un 80%B hasta el minuto 8, que aumenta al 95%B, donde se mantiene constante hasta el minuto 10. Por último, a partir del minuto 10 disminuye a 5%B, devolviendo el sistema a condiciones iniciales. En la *Tabla 6* se recogen los parámetros establecidos para el análisis por HPLC.

Tabla 6. Parámetros HPLC

Parámetro	Valor		
Instrumentos	Agilent 1290 Infinity Pump (G4220A) Agilent 1290 Multisampler (G4226A) Agilent 1290 Infinity TCC (G1316C)		
Lavado de aguja	MeOH		
Solvente	Agua		
Temperatura del Automuestreador	8°C		
Volumen de inyección	20 µL		
Columna analítica	GEMINI C18 110Å (150X4.6) mm, 3µm		
Fase móvil A	0.1% HCOOH en agua		
Fase móvil B	MeOH		
Flujo	0.5 mL/min		
Gradiente	Tiempo (min)	%A	%B
	0.00	95	5
	2.00	87	13
	5.50	20	80

	8.00	5	95
	10.00	5	95
	12.00	95	5
Stop time	12 min		
Post time	2 min		

Tras la separación cromatográfica, el HPLC se encuentra acoplado a un espectrómetro de masas. El espectrómetro de masas es un triple cuadrupolo (Agilent 6460 Triple Quad LC/MS) con ionización química a presión atmosférica (APCI). En la *Tabla 7* se detallan los parámetros establecidos para la fuente de ionización APCI y espectrómetro de masas (MS).

Tabla 7. Parámetros de la fuente de ionización y espectrómetro de masas.

Parámetro	Valor
Instrumento	Agilent 6460 Triple Quad LC/MS
Fuente de ionización	Atmospheric pressure chemical ionization (APCI)
Modo MS/MS	MRM y SIM
Modo de ionización	Positivo
Temperatura gas desolvantación	300°C
Caudal gas desolvantación	6 L/min
Presión del nebulizador	55 psi
Temperatura de la fuente	350°C
APCI Needle Positive	4µA
Voltaje del capilar (positivo)	3000 V
Resolución MS1/MS2	0.7/0.7 (unit/unit)
Dwell Time	Variable

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1. SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA

Para llevar a cabo la separación cromatográfica, se consideraron dos columnas cromatográficas distintas. Sus características se muestran en la *Tabla 8*.

Tabla 8. Características de las columnas cromatográficas.

	SUNFIRE C18	GEMINI – NX C18
Casa comercial	Waters	Phenomenex
Cantidad de carbono (%C)	16%	14%
Empaquetado	C18	C18
Endcapped	Sí	Sí (TMS)
Forma de la partícula	Esférica	Esférica
Diámetro interno (mm)	4.6	4.6
Longitud (mm)	150	150
Tamaño de partícula (µm)	5	3
Modo de separación	Fase reversa	Fase reversa
Tamaño de poro (Å)	100	110
Actividad del silanol	Baja	Baja (a pH 2.5)
Superficie (m² g⁻¹)	340	375
Rango de pH de trabajo	2.00 – 8.00	1.00 – 12.00

Ambas columnas cuentan con la misma fase estacionaria, sin embargo, otros parámetros tales como la cantidad de carbono, el tamaño de partícula o el tamaño de poro son diferentes. Esto hace que la separación no se igual en ambas columnas, afectando a los tiempos de retención, la anchura de pico e incluso la forma del pico. Estas diferencias se muestran en la *Figura 4*. Se observa como empleando la columna GEMINI-NX C18 los picos quedan mejor separados, hay menor ruido de fondo y son picos más estrechos.

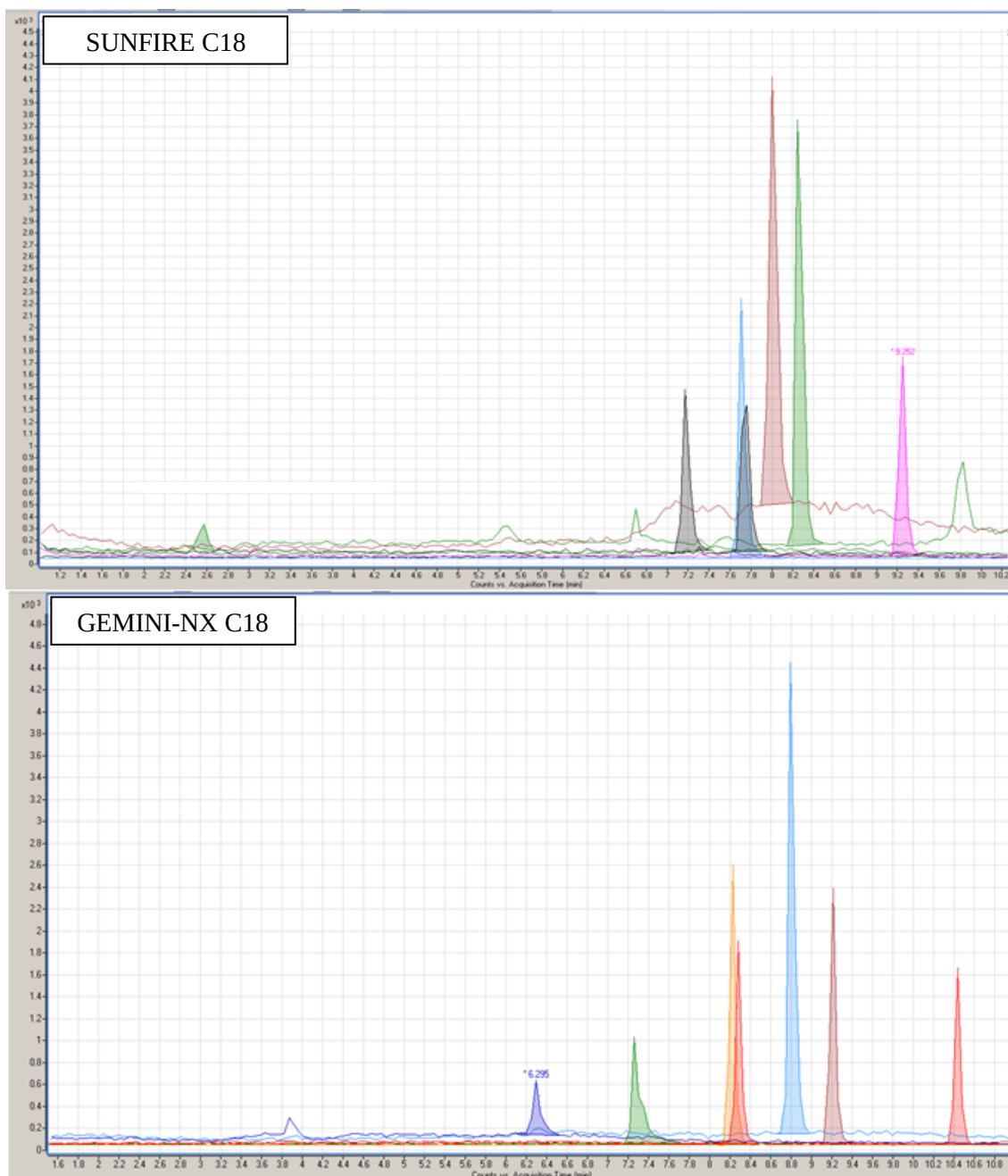


Figura 4. Comparación de ambas columnas para una solución estándar en solvente de concentración 9 ng/mL

4.2. ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MS)

La espectrometría de masas en tándem muestra numerosas ventajas frente a la simple, aumentando la sensibilidad y poder de confirmación de un método analítico. La determinación de nitrosaminas como impurezas requiere de un método con estas

características pues los límites máximos permitidos se establecen a concentraciones muy bajas (*Tabla 1*). En este caso, se trabaja en modo MRM (*multiple reaction monitoring*), seleccionando un ion en el primer cuadrupolo (Q_1) conocido como ion precursor. En presencia de un gas inerte (N_2) y aplicando la energía de colisión óptima, el ion precursor es fragmentado en la celda de colisión (q). El ion fragmento obtenido pasa al segundo cuadrupolo (Q_2) y se denomina ion producto. Este modo de adquisición es el más habitual en ensayos cuantitativos empleando un QqQ, puesto que se consigue minimizar la presencia de interferentes. Se seleccionan dos transiciones por nitrosamina estudiada, una para cuantificación y otra para confirmación.

Para optimizar las condiciones de la espectrometría de masas, el voltaje del cono, las transiciones características y las energías de colisión fueron optimizadas para cada nitrosamina mediante infusión directa de una solución 9 ng/mL en metanol que contiene a todos los analitos. Se selecciona como transición cuantificadora (Q) a la más intensa y la segunda se toma como transición de confirmación (q)¹. Esta información se recoge en la *Tabla 8*.

Tabla 9. Optimización de parámetros MS para la determinación de nitrosaminas.

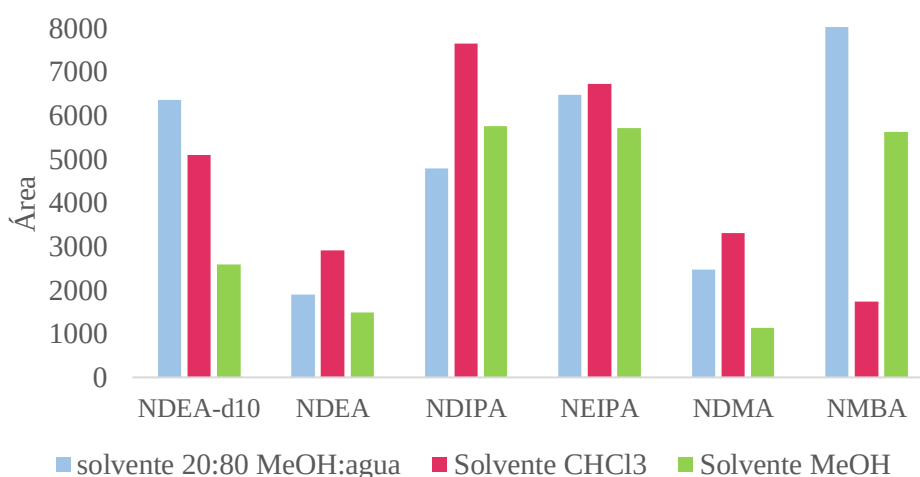
Nitrosamina	t_R (min)	Ion precursor (m/z)	Ion producto (m/z)	Voltaje del cono (V)	Energía de colisión (Ev)
NDMA	6.295	75.1	58.1 (Q)	65	10
			43.1 (q)	65	17
NMBA	7.212	147.1	44.2 (Q)	50	7
			87.2 (q)	50	7
NDEA-d10	8.230	113.1	34.0 (Q)	85	14
			81.0 (q)	85	9
NDEA	8.285	103.1	75.1 (Q)	85	8
			47.1 (q)	85	16
NEIPA	8.794	117.1	75.1 (Q)	70	7
			47.1 (q)	70	15
NDIPA	9.215	131.1	43.1 (Q)	50	7
			89.1 (q)	50	5
NDBA	10.437	159.1	57.2 (Q)	70	7
			41.1 (q)	70	24

4.3. OPTIMIZACIÓN DEL TRATAMIENTO DE MUESTRA

El tratamiento de muestra propuesto para este método consiste en disolver las nitrosaminas en un solvente para posteriormente ser inyectadas en el cromatógrafo. Es conocido que las nitrosaminas son tanto más solubles en disolventes orgánicos, especialmente metanol, cloroformo y diclorometano, también son solubles en agua. No obstante, el principal inconveniente que se presenta para el tratamiento de muestra propuesto es que, junto con las nitrosaminas, para estos solventes, se disuelven otras muchas impurezas que forman parte de los excipientes del comprimido. Éstas son causantes de interferencias que afectan a la determinación de los analitos en estudio.

¹ Exceptuando NDMA, en cuyo caso la señal de mayor área se encuentra interferida y se toma como Q la transición de menor área.

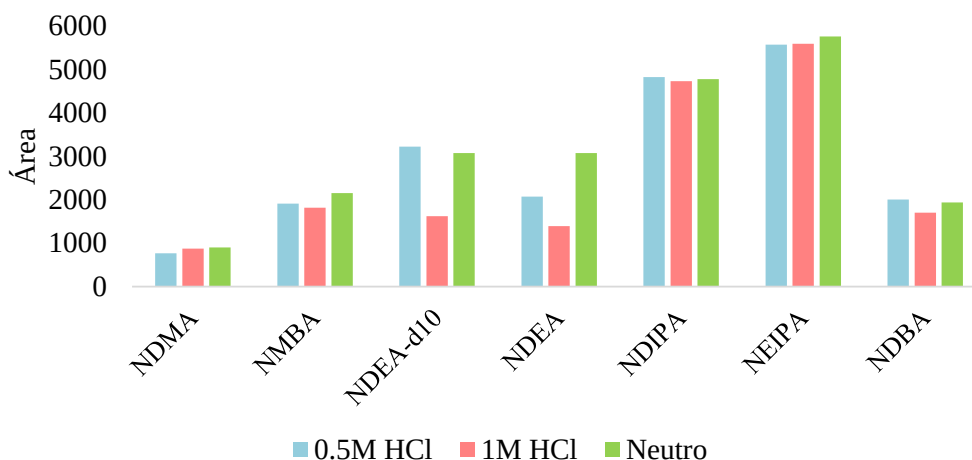
Para seleccionar el solvente más adecuado, se realizan diferentes pruebas. Se evalúa el solvente en función de las respuestas obtenidas. Para ello, se compara una muestra dopada a una concentración de 4.5 ng/mL² preparada en tres solventes diferentes: metanol, cloroformo y metanol:agua (20:80). Esto se muestra en la *Gráfica 3*. Empleando como solvente metanol, se observa menor señal, excepto para NDIPA. El uso de cloroformo proporciona recuperaciones comparables con el solvente metanol:agua (20:80), siendo más altas para NDEA, NDIPA, NEIPA Y NDMA. No obstante, el uso de cloroformo no está recomendado para la espectrometría de masas en análisis de rutina. Por último, el solvente seleccionado es metanol:agua (20:80) para el que la señal de respuesta es significativamente mejor que trabajando con MeOH, excepto para NDIPA en la que la respuesta es menor.



Gráfica 1. Representación de la respuesta obtenida para cada nitrosamina en función del solvente empleado.

Por otro lado, se prepara la fase acuosa a distintos pH y se comprueba cómo afecta al tratamiento de muestra. Para ello, se prepara una muestra dopada a una concentración de 4.5 ng/mL en la que la fase acuosa varía de pH. Los resultados obtenidos se observan en la *Gráfica 4*.

Cambio pH medio



Gráfica 2. Estudio del cambio de pH del medio acuoso en el tratamiento de muestra.

² No se muestran en esta prueba para NDMA por no contar con dicho estándar en el día que se realiza.

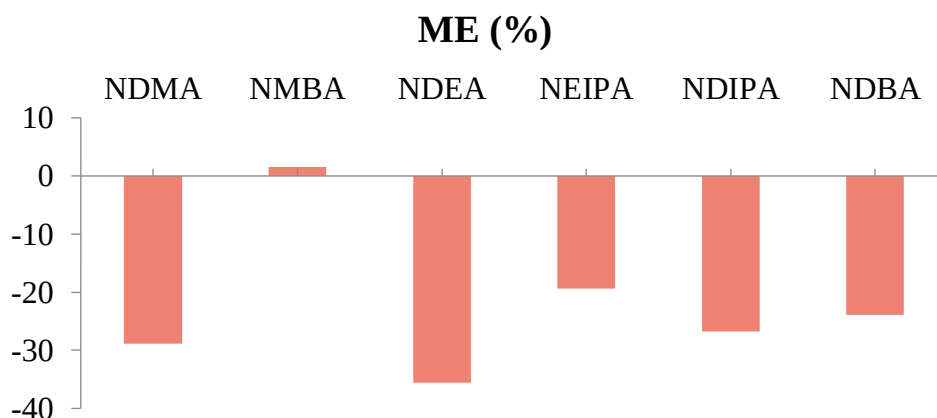
Se concluye que a pH neutro se obtienen mayores áreas para la mayoría de las nitrosaminas. Puesto que la acidificación de la fase acuosa del solvente no supone mejoras significativas, se mantiene a pH neutro.

4.4. EFECTO MATRIZ

El efecto matriz fue evaluado empleando una solución trabajo de referencia preparada en solvente a una concentración de 4.5 ng/mL (C), una muestra dopada a la misma concentración y un blanco de muestra (B), según la *Ecuación 1*.

$$EM (\%) = - \left[100 - \left(\frac{A - B}{C} \right) \cdot 100 \right] \quad (1)$$

Valores de EM < 0 indican supresión iónica, mientras que EM > 0 indica exaltación de la señal. En la *Gráfica 1* se muestran los resultados. Como se observa, en todas las nitrosaminas, a excepción de NMBA, tiene lugar el fenómeno de supresión iónica, esto ocurre cuando, debida a las interferencias presentes en la matriz, la señal del analito se ve inhibida. En el caso de NMBA, el efecto matriz es despreciable.



Gráfica 3. Estudio del efecto matriz.

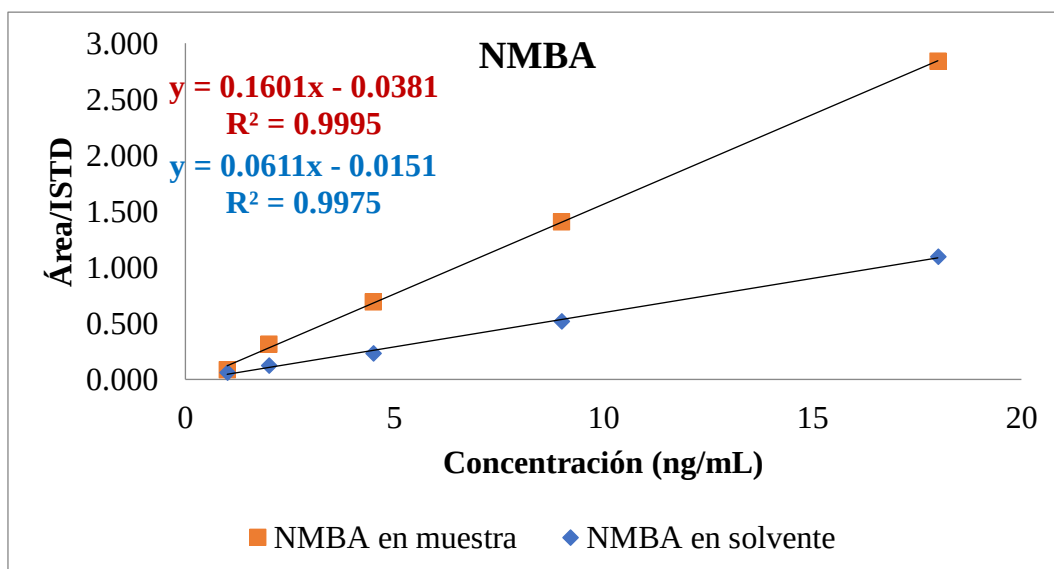
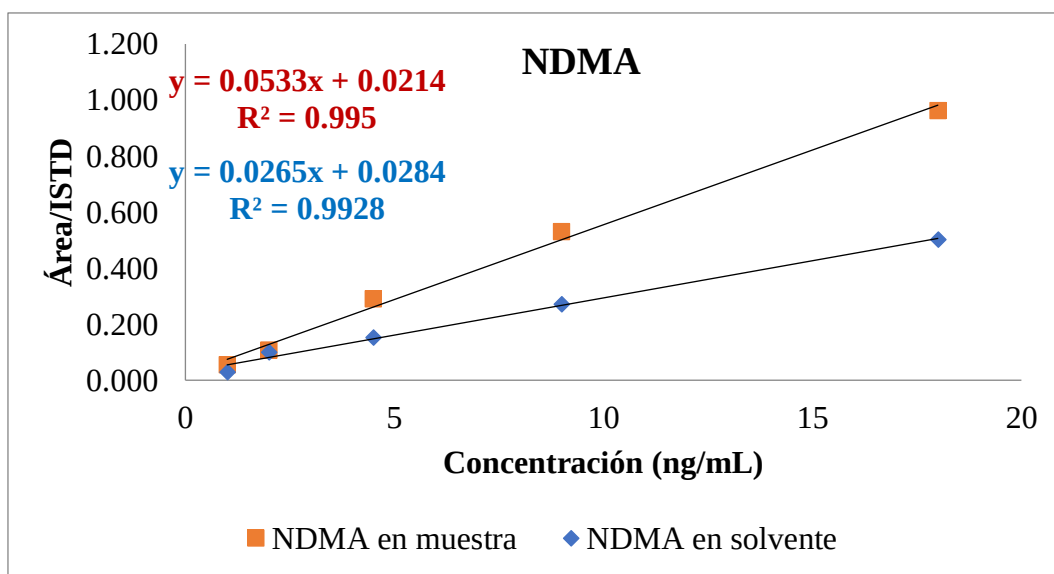
Como criterio de aceptación se establece que el efecto matriz tiene que ser menor o igual a $\pm 20\%$. Tal y como se muestra en la *Tabla 10*, esto no se cumple para NDMA, NDEA, NEIPA y NDBA, siendo necesario trabajar en matriz.

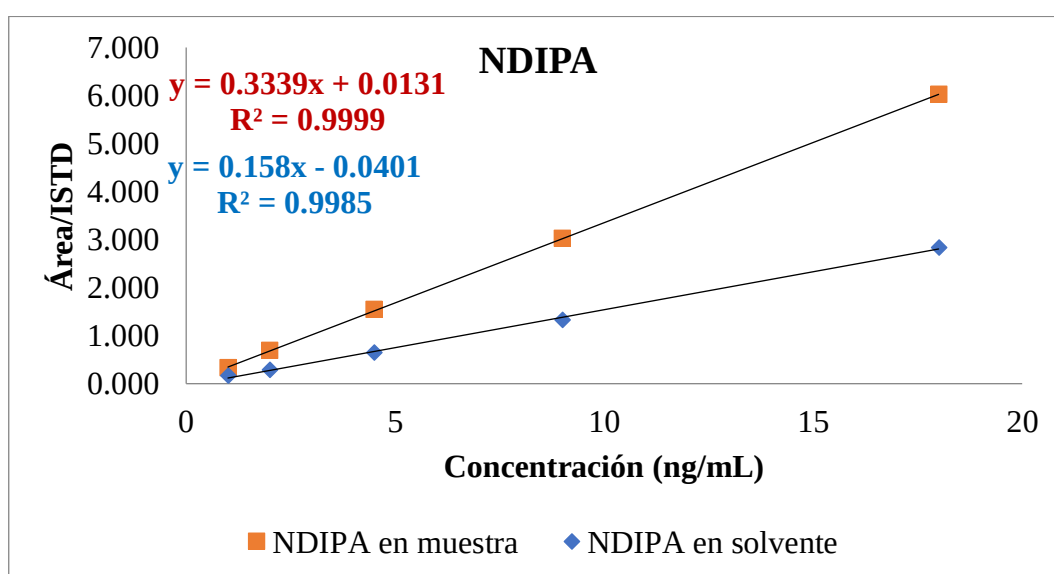
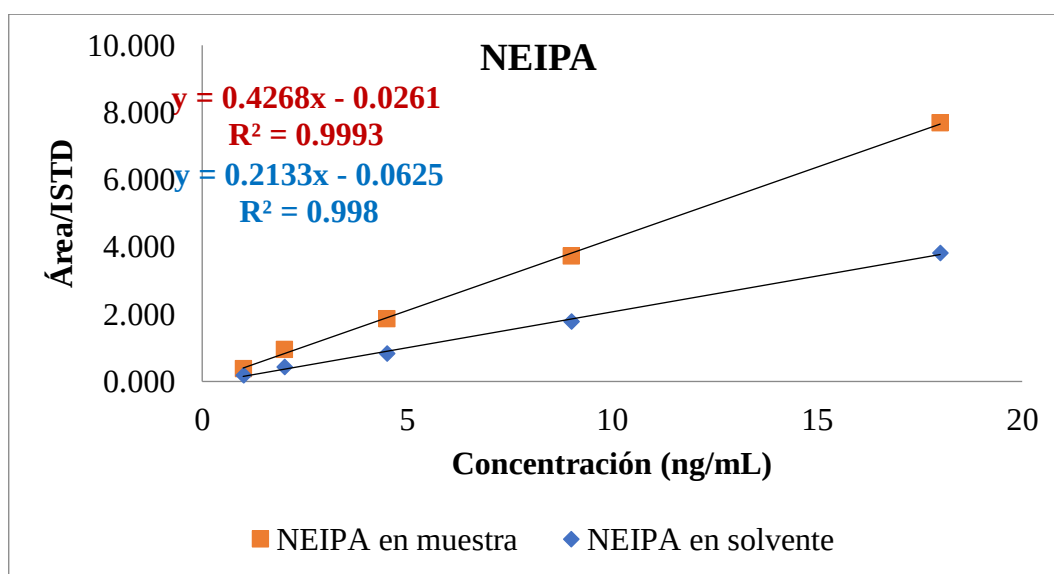
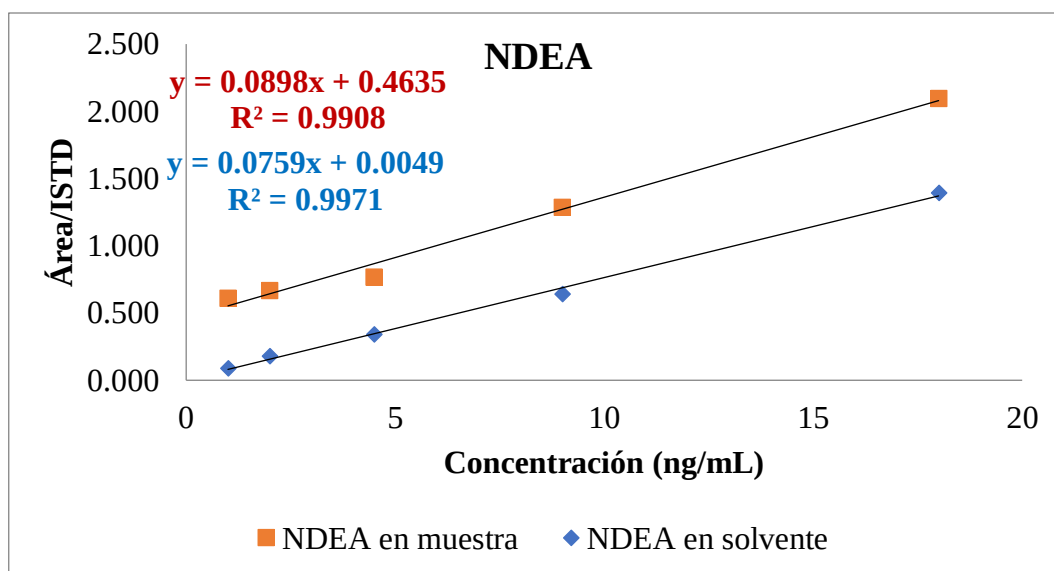
Tabla 10. Estudio del efecto matriz.

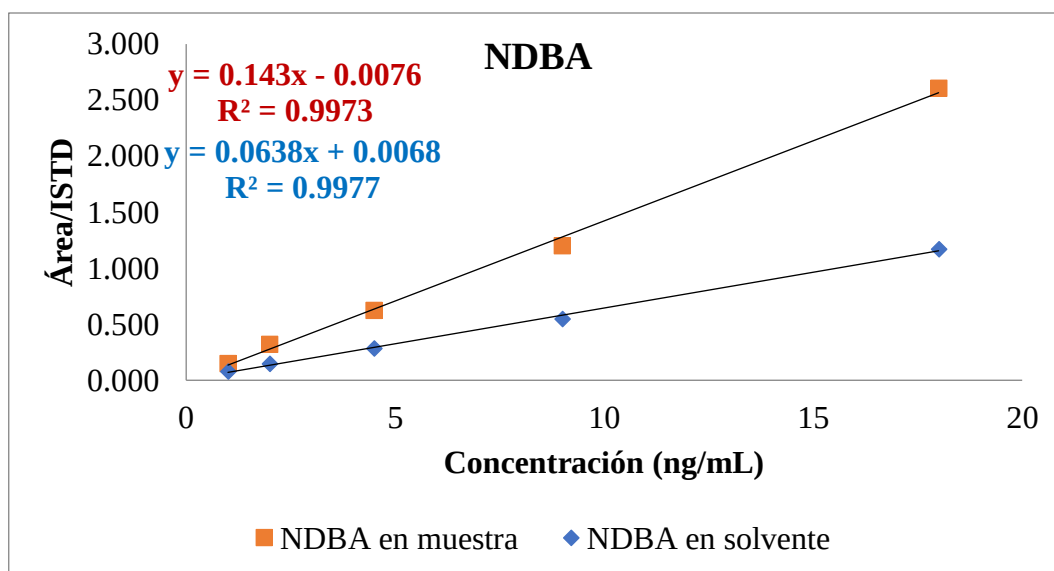
Nitrosamina	ME (%)
NDMA	-35
NMBA	2
NDEA	-24
NEIPA	-24
NDIPA	-18
NDBA	-25

El efecto matriz también puede observarse en la recta de calibrado, debido a las interferencias ocasionadas por la matriz de la muestra, se observan pendientes más acusadas realizando la recta de calibrado en matriz, esto se observa en la *Gráfica 2*. Para su estudio, se preparan:

- Calibrado en solvente: en un matraz de 5 mL se añaden 0.5 mL de solución trabajo de patrón interno preparado en MeOH y 0.5 mL de solución mezcla de trabajo en MeOH a la concentración correspondiente según *Tabla 4*, realizando un total de 5 puntos. Posteriormente, se adicionan 4 mL de agua miliQ y se vortea para una correcta homogenización. Finalmente, se filtra con un filtro 0.22µm PP en un vial para cromatografía. Se prepara del mismo modo un blanco, sustituyendo los 0.5 mL de solución mezcla de trabajo por 0.5 mL de MeOH.
- Calibrado en muestra: se prepara del mismo modo que la muestra dopada y el blanco descrito en el apartado 3.2. *Tratamiento de muestra*.







Gráfica 4. Recta de calibrado preparada en matriz (rojo) y en solvente (azul).

Tras estas pruebas se concluye que el método se desarrolle empleando la técnica de adiciones estándar.

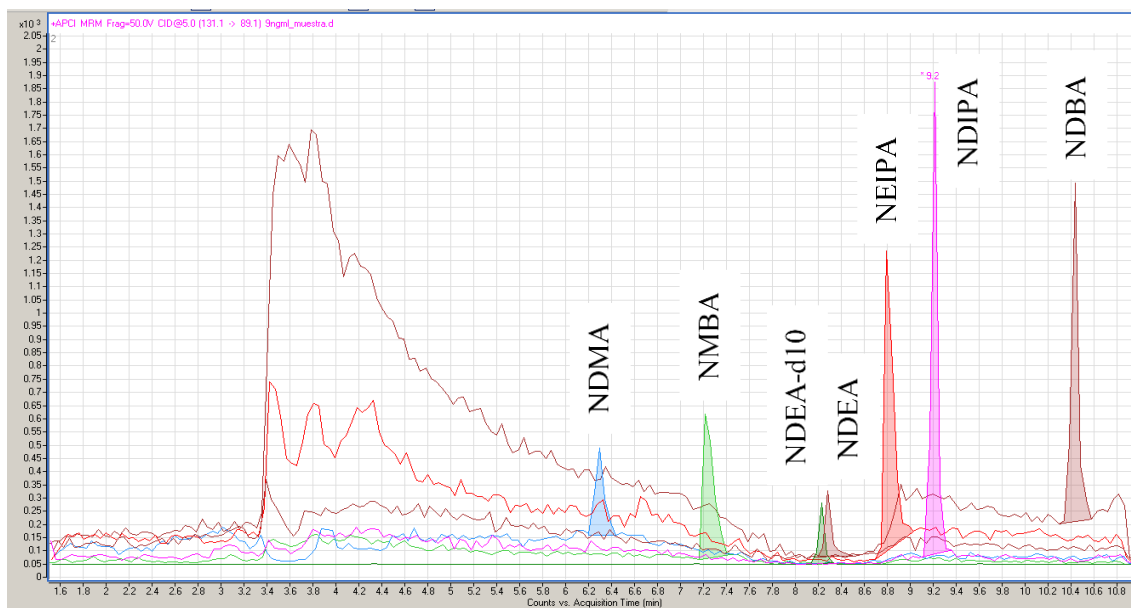
4.5. PARÁMETROS PARA LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO

A continuación, se estudian una serie de parámetros para la validación del método. No obstante, no es una validación definitiva para este procedimiento pues ésta tendría que considerar los niveles de concentración en función de la especificación. De modo que, se estudia el método en términos de selectividad, sensibilidad, precisión y linealidad.

4.5.1 Selectividad

La selectividad de un método es la capacidad que tiene para medir y/o identificar a los analitos de interés de forma inequívoca, sin interferencias de impurezas, productos de degradación, compuestos relacionados, excipientes u otras sustancias presentes en la matriz de la muestra. El estudio de la selectividad del método es de gran importancia previo a su validación pues, en general, las interferencias pueden tener distintos efectos en la determinación del analito, dificultando su identificación y dando lugar a falsos positivos o negativos.

Para estudiar la selectividad del método, se prepara una muestra dopada a una concentración de 9 ng/mL, con el objetivo de verificar que el método es capaz de identificar a las nitrosaminas en estudio, esto se muestra en el *Cromatograma 1*.



Cromatograma 1. Identificación de las nitrosaminas en estudio.

Un estudio completo de la selectividad del método tendría que incluir el cromatograma para el solvente, placebo, principio activo e impurezas por separado. Esto no se realiza pues no se cuenta con este material.

4.5.2 Linealidad

La linealidad de un método es la capacidad que éste tiene para proporcionar resultados directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango de trabajo establecido. Siempre que sea posible, se busca una respuesta de tipo lineal. El rango se define como el intervalo entre la concentración superior e inferior de analito para el cual se ha demostrado correcta precisión, exactitud y linealidad del método descrito. En la cuantificación de impurezas se establece como rango de trabajo desde el límite de cuantificación (LOQ) o desde el 50% de la especificación límite de cada impureza, hasta un 120% de dicha especificación.

Debido al efecto matriz, se realiza la linealidad siguiendo el método de adiciones estándar, empleando como patrón interno NDEA-d10 a una concentración de 9 ng/mL. Se preparan muestras a diferente concentración en un rango desde 0.5 – 18 ng/mL, dentro de este rango establecido se analiza cada concentración por triplicado. Se preparan también muestras no adicionadas (blanco de muestra) para restar la señal de los compuestos presentes en las muestras. El rango de trabajo para las diferentes nitrosaminas viene especificado en la *Tabla 11*. Todas las nitrosaminas presentaron una buena linealidad con $R^2 > 0.99$. Por otro lado, se establece como LOQ el punto más bajo del rango de lineal para cada nitrosamina, para el LOQ estipulado se realiza un estudio de repetibilidad a dicha concentración y se establece un criterio de aceptación que debe cumplir una $RSD \leq 20\%$.

Tabla 11. Linealidad en muestra establecida para las nitrosaminas en estudio y estudio del LOQ.

Nitrosamina	Rango lineal (ppm)	LOQ (ppm)	RSD (%) ≤ 20
NDMA	0.013 – 0.12	0.013	15
NMBA	0.013 – 0.12	0.013	19
NDEA	0.007 – 0.12	0.007	16
NEIPA	0.007 – 0.12	0.007	10
NDIPA	0.007 – 0.12	0.007	11
NDBA	0.007 – 0.12	0.007	11

4.5.3 Sensibilidad

La sensibilidad de un método se define como la capacidad que tiene para detectar pequeñas concentraciones de analito. Está relacionada con el límite de detección (LOD, *limit of detection*), que es la cantidad mínima de analito que puede ser detectada, aunque no necesariamente cuantificada con precisión y exactitud. Un método analítico, por lo general, será tanto más sensible cuanto menores valores de LOD pueda proporcionar. La sensibilidad requerida por un método dependerá de la aplicación para el que éste se desarrolle.

En este caso, el límite de detección es evaluado experimentalmente inyectando por triplicado una muestra dopada a concentración 0.5 y 1 ng/mL. El criterio de aceptación será que cada nitrosamina tiene que ser detectada con una relación señal ruido (s/n) menor o igual a 3 para el LOD establecido. De este modo, NDBA, NDEA, NDIPA, NEIPA y NDBA presentan un LOD 0.003 ppm, mientras que NDMA presenta un LOD 0.007 ppm.

4.5.4 Precisión

La precisión de un método expresa el grado de dispersión existente entre distintas medidas a partir de una misma muestra bajo unas condiciones determinadas. El estudio de la precisión del método tiene como objetivo conocer la variabilidad que presenta el ensayo debido a errores aleatorios. En este caso, se estudia la precisión en términos de repetibilidad.

La repetibilidad se expresa como el coeficiente de variación de una serie de medidas (desviación estándar relativa, RSD). Uno de los factores que más afecta a la repetibilidad del método es la concentración de analito. Cuando se trabaja a concentración más alta, por ejemplo, en el análisis de principio activo, se aceptan valores de coeficientes más bajos. Sin embargo, en análisis de impurezas, como en este caso, en el que las concentraciones son más bajas, se aceptan coeficientes de variación mayores. Por otro lado, también se estudia lo que se denomina repetibilidad instrumental. Este parámetro estudia únicamente la variabilidad debida al instrumento.¹

En el análisis de impurezas, se estudia la repetibilidad a la concentración del límite especificado. En este caso se establece como concentración 4.5 ng/mL. Para ello, se preparan 6 muestras dopadas a dicha concentración, de este modo se estudia la repetibilidad del método. Para estudiar la repetibilidad instrumental, se inyecta 6 veces un mismo vial de una de las muestras dopadas. La estimación de la repetibilidad se realiza con el cálculo del coeficiente de variación (RSD) de las respuestas obtenidas. Para la repetibilidad del método, se establece como criterio de aceptación una $RSD \leq 15\%$ para la transición de cuantificación (Q), mientras que la repetibilidad

instrumental requiere una $RSD \leq 10\%$. Los resultados del estudio de la repetibilidad del método se recogen en la *Tabla 12*. Como se observa, todas las impurezas cumplen con el requerimiento establecido.

Tabla 12. Estudio de la repetibilidad del método.

Nitrosamina	RSD (%)	
	R	r
NDMA	8	8
NMBA	7	5
NDEA	11	6
NEIPA	3	4
NDIPA	4	4
NDBA	8	5

¹R: repetibilidad, ²r: repetibilidad instrumental

5. CONCLUSIONES

En este proyecto se ha desarrollado un método para la determinación de nitrosaminas en sartanes mediante HPLC – MS/MS. El procedimiento descrito muestra límites de detección entre 0.003 – 0.007 ppm y límites de cuantificación entre 0.007 – 0.013 ppm.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios AEMPS, “Presencia de nitrosaminas en los medicamentos denominados ‘sartanes’. conclusión de la revisión de la agencia europea de medicamentos.” *Minist. SANIDAD, Consum. Y BIENESTAR Soc. Agencia Española Medicam. y Prod. Sanit.*, pp. 1–5, 2019.
- [2] European Medicines Agency (EMA), “Questions and answers for marketing authorisation holders/applicants on the CHMP Opinion for the Article 5(3) of Regulation (EC) No 726/2004 referral on nitrosamine impurities in human medicinal products,” vol. 5, no. 726, 2021.
- [3] J. M. und J. W. Mona Abdel-Tawab, Rebecca Gröner, Thomas Kopp, “Valsartan: ZL findet NDMA in Tabletten,” *PZ – Pharm. Zeitung*, 2018.
- [4] European Medicines Agency, “Information on nitrosamines for marketing authorisation holders,” *Ema/189634/2019*, vol. 31, no. September, 2019.
- [5] J. C. Beard and T. M. Swager, “An Organic Chemist ’ s Guide to N - Nitrosamines: Their Structure, Reactivity, and Role as Contaminants,” 2021.
- [6] E. De Mey, H. De Maere, H. Paelinck, and I. Fraeye, “Volatile N-nitrosamines in meat products: Potential precursors, influence of processing, and mitigation strategies,” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 57, no. 13, pp. 2909–2923, 2017.
- [7] C. Ripollés, E. Pitarch, J. V. Sancho, F. J. López, and F. Hernández, “Determination of eight nitrosamines in water at the ngL-1 levels by liquid

- chromatography coupled to atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 702, no. 1, pp. 62–71, 2011.
- [8] L. Zhou *et al.*, “Determination of kepone in water by liquid chromatography-tandem mass spectrometry,” *Chinese J. Chromatogr. (Se Pu)*, vol. 32, no. 3, pp. 211–215, 2014.
 - [9] SwissMedic OMCL, “Nitrosamines by GC-MS / MS,” pp. 1–7, 2019.
 - [10] US food & drugs administrations, “Combine d Direct Injection N-Nitrosodimethylamine (NDMA) and N- Nitrosodiethylamine (NDEA) Impurity Assay by,” *Usfda*, no. 551271, pp. 1–6, 2018.
 - [11] U.S. Food & Drug Administration, “Combined N-nitrosodimethylamine (NDMA) and N-Nitrosodiethylamine (NDEA) impurity assay by GC/MS-Headspace,” pp. 1–7, 2019.
 - [12] L. Hatch, M. E. Lame, D. Higton, P. D. Rainville, and G. Fujimoto, “Método UPLC-MS / MS altamente sensible y robusto para la cuantificación de nitrosaminas a nivel de impurezas en los principios activos del grupo ‘ sartanes ’ y ranitidina,” 2020.
 - [13] I. Public Analyst’s Laboratory, Galway, “Determination of NDMA (HS-GC-MS) Method 3/30 Issue No.1,” 2018, no. 1.
 - [14] U.S. Food & Drug Administration, “Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) method for the determination of six nitrosamine impurities in ARB drugs,” *Fda*, no. July 2018, pp. 1–12, 2019.
 - [15] Agilent Technologies, “Determination of Nitrosamine Impurities Using the Ultivo Triple Quadrupole LC / MS Detection of regulated genotoxic impurities from the,” pp. 1–8, 2021.
 - [16] S. Schmidtsdorff and A. H. Schmidt, “Simultaneous detection of nitrosamines and other sartan-related impurities in active pharmaceutical ingredients by supercritical fluid chromatography,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 174, pp. 151–160, 2019.
 - [17] D. . A. . S. Devi, “Analytical Challenges and Solutions for determination of Nitrosamine impurities by GC-MS,” *LAURUS LABS Ltd.*, 2019.
 - [18] J. H. Lee, S. U. Lee, and J. E. Oh, “Analysis of nine nitrosamines in water by combining automated solid-phase extraction with high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation tandem mass spectrometry,” *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, vol. 93, no. 12, pp. 1261–1273, 2013.
 - [19] M. T. Lame and L. Hatch, “High Sensitivity Quantitation of Nitrosamine Genotoxic Impurities : LC-MS Analysis of Ranitidine Drug Product using the Waters ACQUITY UPLC I-Class / Xevo TQ-XS,” *Waters - Appl. note*, 2019.