



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Desarrollo de un método analítico por HPLC para
cuantificar N-nitrosodimetilamina (NDMA)**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACEÚTICO BIOLÓGICA

PRESENTA

ALEJANDRA IZANESTLI CAZARES ALANIZ



Ciudad de México

2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Hernández Chacón Juan Carlos**

VOCAL: **Profesora: Gama González Silvia Citlalli**

SECRETARIO: **Profesor: Tapia Mendoza Everardo**

1er SUPLENTE: **Profesor: Sifuentes Vázquez Luis Daniel**

2° SUPLENTE: **Profesor: Díaz Flores Luis Alejandro**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Unidad de Desarrollo Tecnológico (UDT), Instituto de Química (IQ), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

ASESOR DEL TEMA:

M. EN C. EVERARDO TAPIA MENDOZA

SUPERVISOR TÉCNICO:

DRA. CELIA BUSTOS BRITO

SUSTENTANTE:

ALEJANDRA IZANESTLI CAZARES ALANIZ

PRECISIÓN.

Lo que me tranquiliza
es que todo lo que existe,
existe con una precisión absoluta.

Lo que es del tamaño de una cabeza de alfiler
no se desborda en una fracción de milímetro
más allá del tamaño de una cabeza de alfiler.

Todo lo que existe es de una gran exactitud.

La pena es que la mayor parte de lo que existe
con esa exactitud

nos es técnicamente invisible.

Lo bueno es que la verdad nos llega
como un sentido secreto de las cosas.

Nosotros terminamos adivinando, confusos,
la perfección.

-Clarice Lispector

AGRADECIMIENTOS.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química, por darme la oportunidad de ser parte de la máxima casa de estudios y abrirme el camino del conocimiento, la ciencia y el arte, tesoros invaluableles en la vida humana.

Al Instituto de Química por abrirme sus puertas, el cual me permitió continuar con mi formación desarrollando este trabajo. Así mismo, por la beca suministrada por la dependencia de la cual fui beneficiaria.

Quiero agradecer de manera particular a la M. en C. Mayra León Santiago y el Q. Emilio Iturbe Nava del Laboratorio Nacional de Ciencias para la Investigación y Conservación del Patrimonio Cultural LANCIC-IQ-UNAM por su apoyo y conocimientos brindados. Así como a mis compañeros dentro del laboratorio Emiliano, Daniel y Manuel con los cuales compartí este proceso.

Gracias por su apoyo, consejos y conocimiento a la Dra. Celia Bustos Brito, quien fue pieza fundamental para que este trabajo se concluyera de manera exitosa.

Se agradece a la M. en C. Lucía del Carmen Márquez Alonso, a la M. en C. Eréndira García Ríos, M. en C. Lucero Mayra Ríos Ruiz y el Dr. Baldomero Esquivel Rodríguez, por las facilidades suministradas en la compra de insumos y el uso del equipo. Muchas gracias.

Gracias a la profesora Silvia Citlalli Gama González y el profesor Juan Carlos Hernández Chacón por sus contribuciones a este trabajo, y su apoyo para que el proceso fuera ágil y ameno.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES.

Dedico este trabajo a las mujeres de mi vida, a quienes debo tantas cosas que sería imposible enlistarlas todas; ellas cuidaron mi crecimiento con su compañía, paciencia y ejemplo, regalándome las alas que me han permitido volar tan alto como mis sueños. Con su fortaleza me enseñaron a ser fuerte yo también.

Una de ellas es mi hermana Nayeli que me ha brindado su amistad y apoyo inconmensurable, ella ha sido mi ejemplo diario de que la buena voluntad mueve al mundo y que la bondad es una virtud reflejo de la belleza interior que alberga el ser humano, imposible de esconder y que alcanza todos los que están alrededor de ella.

Y por supuesto, a mi mamá Socorro, a quién todo debo y jamás encontraré con qué pagar. Su vida es la muestra de que los milagros existen, que la inteligencia, el amor, la sencillez y el buen ánimo son las luces que brillan sobre cualquier adversidad, por más oscura que esta sea. No cabe duda de que con amor y coraje se forjan los futuros más bellos jamás, y tú me has regalado uno bellissimo. Hoy, terminando la universidad, puedo escribirlo correctamente: “Mamá, tú eres como una flor”.

Agradezco a mi familia. A mi abuelita Socorro que, aunque corto, el tiempo que compartimos en este mundo siempre estará en mi corazón. A todos y cada uno de mis tíos: María Elena, Esther, José Manuel, Ángeles, quienes siempre fueron un amparo en tiempos de necesidad y una mano amiga en tiempos felices. Muy especialmente agradezco a mi padrino José Antonio por ser una figura paterna para mí, inculcándome el gusto por la lectura y la escritura, a Abraham por brindarme la confianza en mí misma como maestro y como tío, a mi tía Tete por cuidarme y compartir conmigo cuando más indefensa estuve, y a mis tíos Miryam y Néstor por darme ánimos durante todo el camino hasta aquí y abrigarme con calidez el alma.

A mis primos César, Erick, Abner, Emiliano y Ramsés, con quienes tengo los recuerdos más maravillosos de la vida, atesoro nuestra niñez con profunda alegría y me complace ver que hoy llegamos juntos hasta esta etapa.

A Samuel, mi amigo, cómplice y compañero. Eres la muestra de que la ternura aún existe en el mundo y que la sensibilidad es un arte que no se opone a la fortaleza. Gracias por brindarme calidez, paz e inspiración en medio de este turbulento mar que es la vida. Te quiero mucho.

Celebro la amistad y agradezco a Eliot, Iván, Daisy, Ceci, Carlos y Marlen por enseñarme que la vida siempre es mejor en compañía de grandes personas como ustedes. De manera especial, quiero agradecer a mi querida amiga Samantha, una mujer a quien admiro profundamente y con quién he tenido la dicha de crecer en cuerpo, mente y espíritu. Gracias por las risas, lagrimas y sueños compartidos, y por todo lo que aún nos falta por vivir.

A mi asesor Everardo, un profesor con vocación y amor por lo que hace; y a quien con profundo respeto hoy también puedo llamar amigo. Mis más sinceros agradecimientos porque, sin saberlo, me impulso a no darme por vencida dentro del maravilloso pero abrumador mundo de la química, a afirmarme con ética y profesionalismo dentro de la ciencia. Muchas gracias por brindarme tu amplio conocimiento, consejos y paciencia al enseñarme; como profesionista y como persona, siempre encontré calidad y calidez. Te estaré eternamente agradecida.

Gracias a todos mis amigos, familia, compañeros y profesores, todos han dejado una huella en mi corazón, pues somos pedazos de personas con las que compartimos y ha sido para mi un honor coincidir con todos ustedes en esta vida que, como diría Calderón de la Barca “toda la vida es sueño, y los sueños, sueños son”.

ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

λ	Longitud de onda
α	Selectividad.
% CV	Porcentaje del coeficiente de variación.
ADN/DNA	Ácido Desoxirribonucleico.
ANOVA	Análisis de varianza.
API	Ingrediente Farmacéuticamente Activo por sus siglas en inglés.
ARBs	Bloqueadores del receptor de Angiotensina II por sus siglas en inglés.
b_0	Ordenada al origen.
b_1	Pendiente.
CL	Cromatografía de Líquidos.
D ₂ O	Agua deuterada.
DCM	Diclorometano.
DMA-HCl	Clorhidrato de dimetilamina.
EMA	Entidad Mexicana de Acreditación
EPA	<i>Environmental Protection Agency.</i>
EURACHEM	Red de organizaciones en Europa con el objetivo de establecer un sistema para la trazabilidad internacional de las mediciones químicas y la promoción de buenas prácticas de calidad.
FDA	<i>Food and Drug Administration.</i>
HBr	Ácido bromhídrico.

HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography.</i>
IARC	<i>International Agency Research on Cancer.</i>
IC	Intervalo de Confianza.
ICI	Intervalo de Confianza Inferior.
ICS	Intervalo de Confianza Superior.
IQ	Instituto de Química.
K₂CrO₄	Cromato de potasio.
K_D	Coeficiente de distribución.
LC	Límite de Cuantificación.
LC-HRMS	Cromatografía de líquidos-Espectrometría de alta resolución por sus siglas en inglés.
LC-MS/MS	Cromatografía de líquidos-Masas Tándem por sus siglas en inglés.
LD	Límite de Detección.
MRC	Materiales de Referencia Certificados.
NaCl	Cloruro de sodio.
NaHCO₃	Bicarbonato de sodio.
NaOH	Hidróxido de sodio.
Ppm	Partes por millón.
r²	Coeficiente de correlación.
RMN-¹H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno.
Rs	Resolución entre dos picos.

Sb₀	Error típico de la ordenada.
S_{y/x}	Error típico.
t_R	Tiempo de retención.
Ua	Unidades de absorbancia.
UDT	Unidad de Desarrollo Tecnológico.
VIM	Vocabulario Internacional de Metrología.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	3
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
1. Objetivo General.....	3
2. Objetivos Particulares.....	3
Capitulo I. ANTECEDENTES	4
1.1. N-nitrosaminas. Caso particular: NDMA.....	4
1.1.1. N-nitrosaminas como impurezas en fármacos y medicamentos.	5
1.1.2. Causas de la presencia de impurezas de N-nitrosaminas en los medicamentos.....	6
1.2. Cromatografía.	10
1.2.1. Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia.	10
1.2.2. Instrumentación de un cromatógrafo de líquidos.	12
a) Fase móvil.	12
1.3. Validación de métodos analíticos.....	16
1.3.1. Parámetros de validación.	17
1.3.2. Selección de los parámetros de desempeño a evaluar en la validación de un método analítico.....	19
Capitulo II. METODOLOGÍA.....	24
2.1. Materiales y equipos.	24
2.1.1. Reactivos.....	24
2.1.2. Preparación de disoluciones.....	24
2.1.3. Equipos.....	25
2.1.4. Instrumentos y aparatos	25
2.2. Desarrollo del método analítico.	26
2.3. Determinación del porcentaje de pureza del material de referencia de clorhidrato de dimetilamina (DMA·HCl) mediante argentometría.	29
2.4. Curva de calibración de DMA·HCl.....	30
2.4.1. Determinación del rendimiento de la reacción de desnitrosación.	31
2.5. Validación del método analítico.....	31
2.5.1. Preparación de la muestra.	31
2.5.2. Protocolo de validación.....	32

Capítulo III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
3.1. Desarrollo del método analítico.....	35
3.2. Determinación del porcentaje de pureza del material de referencia de clorhidrato de dimetilamina (DMA·HCl) mediante argentometría.....	40
3.3. Curva de calibración con la disolución DMA·HCl.....	43
3.3.1. Construcción de la curva de calibración con material de referencia DMA·HCl.....	43
3.3.2. Determinación del rendimiento de la reacción de desnitrosación.....	46
3.4. Validación del método analítico.....	47
3.5. Cuantificación de NDMA en losartán comercial.....	59
Capítulo IV. CONCLUSIONES.....	63
Capítulo V. REFERENCIAS.....	64
ANEXOS. Anexo I. Cromatogramas obtenidos del proceso de desnitrosación de material de referencia de NDMA para el rendimiento de la desnitrosación.....	67
Anexo II. Cromatogramas complementarios asociados a la validación del método analítico.....	68
Anexo III. Espectros de RMN- ¹ H.....	74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. N-nitrosaminas en medicamentos y principios activos. (Food and Drug Administration, 2021)	6
Tabla 2. Fuentes de aminas presentes durante la síntesis del principio activo que favorecen la formación de N-nitrosaminas.	8
Tabla 3. Tipos de Cromatografía de líquidos con base en las propiedades de sus fases.....	11
Tabla 4. Disolventes usualmente empleados, dependiendo de la modalidad de cromatografía.	13
Tabla 5. Fases estacionarias usuales de acuerdo al tipo de cromatografía.....	14
Tabla 6. Detectores empleados en cromatografía de líquidos. (D.A. Skoog, 2015) (Locatelli, Melucci, Carlucci, & Locatelli, 2012)	15
Tabla 7. Clasificación de la derivatización de acuerdo a en dónde se realiza. (Krull & Strong, 2000)	16
Tabla 8. Definiciones del concepto de 'validación' en ISO 9000, ISO/IEC 17025 y la Norma Mexicana de Metrología en Química-Vocabulario (NMX-CH-152-IMNC-2005).	17
Tabla 9. Parámetros a evaluar en la validación dependiendo del tipo método analítico.(Parra-Solis, 2021).....	20
Tabla 10. Parámetros a evaluar en la validación con base en el propósito analítico del método.(Parra-Solis, 2021).....	22
Tabla 11. Condiciones cromatográficas iniciales establecidas para la cuantificación de NDMA por cromatografía de líquidos con detector de fluorescencia.....	27
Tabla 12. Condiciones cromatográficas del método estandarizado.	28
Tabla 13. Protocolo de validación para el método por HPLC para cuantificar N-nitrosodimetilamina (NDMA).....	32
Tabla 14. Normalización de la disolución de nitrato de plata (0.1 mol/L) con cloruro de sodio sólido.	42
Tabla 15. Determinación de la pureza de la DMA·HCl material de referencia por el análisis clásico de argentometría.	43
Tabla 16. Áreas de la curva de calibración de DMA·HCl.	45
Tabla 17. Resultados para la determinación del rendimiento de la reacción de desnitrosación de la NDMA.	46

Tabla 18. Estadísticas de la regresión.	50
Tabla 19. Resumen de los valores y parámetros obtenidos tras el análisis de varianza de una vía, obtenidos tras el análisis de mínimos cuadrados.....	51
Tabla 20. Demostración de correlación significativa.	52
Tabla 21. Resultados de la prueba de Durbin-Watson para residuales.	52
Tabla 22. LD y LC del método en comparación con los requeridos con la FDA para losartán.	53
Tabla 23. Evaluación de la veracidad y repetibilidad del método mediante el porcentaje de recuperación de NDMA en la muestra.....	55
Tabla 24. Coeficientes de variación de la respuesta (repetibilidad del sistema) y % CV y % de recobro de NDMA (repetibilidad del método y precisión intermedia)...	56
Tabla 25. Estudio de análisis de varianza (ANOVA) en los factores estudiados en la precisión intermedia.	57
Tabla 26. Resumen de los resultados de la validación del método estandarizado.	58
Tabla 27. Resultados obtenidos en Excel® para el cálculo de la incertidumbre de la Concentración de NDMA.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras químicas de las N-nitrosaminas. Impurezas potenciales en fármacos y APIs.	1
Figura 2. Estructura general de una nitrosamina. Grupo amino (recuadro azul), grupo nitroso (recuadro verde).	4
Figura 3. Tipos de cromatografía de líquidos de alta eficiencia.	10
Figura 4. Instrumentación de un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Eficiencia. (Castaños, 2015).....	12
Figura 5. Procedimiento de derivatización de NDMA: reacciones de desnitrosación y dansylación; para la curva de calibración de 0.1 a 0.9 ppm.....	26
Figura 6. Normalización de AgNO_3 0.1 mol/L con NaCl como patrón primario.	29
Figura 7. Determinación de la pureza de clorhidrato de DMA mediante argentometría.	30
Figura 8. Preparación de la curva de calibración de DMA·HCl en un intervalo de trabajo de 0.1 ppm a 0.9 ppm.	30
Figura 9. Preparación de muestra para tabletas de losartán 50 mg.	32
Figura 10. Reacciones de (a) dansylación y (b) desnitrosación involucradas en la derivatización de la NDMA.	35
Figura 11. Cromatograma con el primer método propuesto para cuantificar NDMA por HPLC.....	39
Figura 12. Cromatograma con el método estandarizado (columna de 50 mm).....	40
Figura 13. Espectro de RMN- ^1H para DMA·HCl material de referencia marca Sigma-Aldrich.	41
Figura 14. Curva de calibración 20 ppm a 180 ppm.	44
Figura 15. Curva de calibración con coeficiente de correlación (r^2) y la ecuación de línea recta.....	45
Figura 16. Cromatogramas para una curva de calibración de 0.1 a 0.9 ppm con material de referencia de DMA·HCl.	45
Figura 17. Cromatograma asociado al blanco de reactivos.	48
Figura 18. Cromatograma asociado al blanco del método.....	48
Figura 19. Cromatograma de la muestra (losratán).	49
Figura 20. Cromatograma de muestra fortificada con 5.0 μL de una disolución de 0.05 ppm de NDMA.	49
Figura 21. Gráfico de residuales.....	52

INTRODUCCIÓN

En 2018, ocurrió un hallazgo inesperado, en donde se encontraron impurezas de N-nitrosaminas (figura 1) en valsartan, losartan e irbesartan (fármacos bloqueadores de los receptores de Angiotensina II o ARBs), así como ranitidina, metformina, rifapentina y vareniciclina. (Food and Drug Administration, 2021)

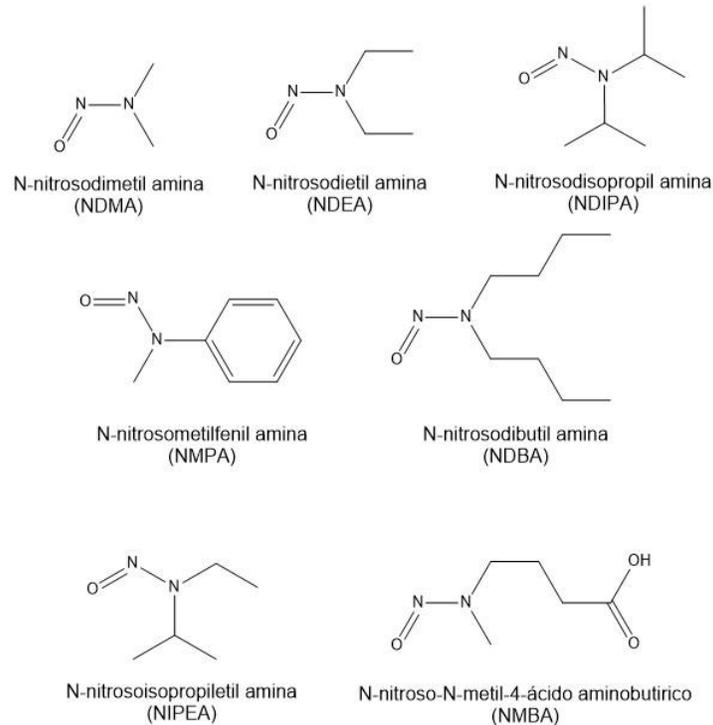


Figura 1. Estructuras químicas de las N-nitrosaminas. Impurezas potenciales en fármacos y APIs.

Por ello, la Food and Drug Administration (FDA) emitió una alerta sanitaria y retiró del mercado los medicamentos contaminados. En dicha alerta se advertía de la presencia de N-nitrosodimetilamina (NDMA), primer impureza detectada en medicamentos como metformina y ranitidina (Food and Drug Administration, 2019), que supone un riesgo para la sociedad por su clasificación como probable carcinogénico en humanos, en el grupo 2A según el Centro Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (International Agency for Research on Cancer, 1978) y grupo 2B por la Agencia de Protección Ambiental (EPA) (World Health Organization, 2017),

además de agente tóxico en humanos y para el medio ambiente. (Mitch, et al., 2003).

En vista de que esta impureza es un subproducto del proceso de síntesis de los ingredientes farmacéuticamente activos (API, por sus siglas en inglés) de diversos medicamentos, se volvió una labor indispensable generar métodos analíticos que permitan detectar y cuantificar N-nitrosaminas oportunamente, previniendo que se encuentren en cantidades que representen un riesgo para la salud de quien los consume. (Food and Drug Administration, 2021)

En consecuencia, la FDA sugiere diversos métodos para cuantificar N-nitrosaminas, dependiendo el medicamento que se quiera analizar. Sin embargo, la mayoría de los métodos consisten un análisis mediante espectrometría de masas de alta resolución con un analizador másico ORBITRAP, lo que requiere una infraestructura muy específica, que permita llegar a un límite de detección adecuado para cuantificar las ínfimas cantidades de N-nitrosaminas contaminantes. (Food and Drug Administration, 2021).

Considerando que en México se cuenta con un número muy limitado de analizadores másicos ORBITRAP que podrían llegar a los límites de detección requeridos por la FDA, la implementación de alguno de estos métodos como un análisis rutinario que las farmacéuticas del país puedan llevar a cabo asiduamente para asegurar la inocuidad de los medicamentos que ponen en el mercado, es poco factible.

Es por ello que en la Unidad de Desarrollo Tecnológico (UDT-IQ-UNAM) se pretende desarrollar y validar un método alternativo mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) empleando el detector de fluorescencia para cuantificar N-nitrosodimetilamina. Dicha impureza se seleccionó porque fue la primera detectada en ranitidina y porque está presente en la mayoría de los medicamentos contaminados con N-nitrosaminas. Con la perspectiva de que, al emplear instrumentación que se encuentra al alcance de laboratorios analíticos y farmacéuticos, sustituyendo un espectrómetro de masas con un detector de fluorescencia, se facilita el proceso de análisis; lo que culminaría en el

aseguramiento de la inocuidad de los medicamentos consumidos por la sociedad mexicana.

Por lo que en el Instituto de Química se pretende ofertar el método a desarrollar, para la cuantificación de NDMA, dentro del catálogo de servicios privados que ofrece para la industria química.

OBJETIVOS

1. Objetivo General.

Desarrollar y validar un método analítico alternativo a los propuestos por la *Food and Drug Administration*, empleando Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia con detector de fluorescencia, para cuantificar N-nitrosodimetilamina (NDMA) en losartán, con el fin de ofertar el método como servicio a la industria química.

2. Objetivos Particulares.

- Desarrollar y estandarizar un método analítico para cuantificar N-nitrosodimetilamina usando cromatografía de líquidos de alta eficiencia con detector de fluorescencia.
- Establecer las condiciones adecuadas para la preparación de la muestra.
- Realizar la validación del método con el fin de demostrar la confiabilidad de los resultados para demostrar que puede ser un método de análisis alternativo al propuesto por la FDA.
- Ofrecer dentro del catálogo de análisis del Instituto de Química un nuevo método de cuantificación de NDMA.

Capítulo I. ANTECEDENTES

1.1. N-nitrosaminas. Caso particular: NDMA.

El término N-nitrosaminas o nitrosaminas describe una clase de compuestos cuya estructura química tiene un grupo nitroso unido a un grupo amino (figura 2). Estos compuestos se forman mediante una reacción de nitrosación (Williams, 2004) entre aminas secundarias, terciarias o cuaternarias, y ácido nitroso, proveniente de sales de nitrito bajo condiciones ácidas.

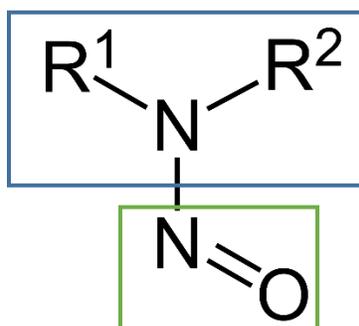


Figura 2. Estructura general de una nitrosamina. Grupo amino (recuadro azul), grupo nitroso (recuadro verde).

Dentro de las N-nitrosaminas hay una que es de especial interés, la N-nitrosodimetilamina (NDMA), ya que existen pruebas concluyentes de que es un potente carcinógeno en animales de experimentación. Se sabe que el mecanismo por el que la NDMA produce cáncer implica la biotransformación por parte de las enzimas microsómicas del hígado, generando el ion metildiazonio. Este metabolito reactivo forma aductos con el ADN, la mayoría de las pruebas apuntan a la O⁶-metilguanina-DNA-metiltransferasa como el probable agente carcinógeno proximal. (World Health Organization, 2008)

También existen numerosas pruebas de que la NDMA es genotóxica tanto *in vivo* como *in vitro*. La activación por parte de las fracciones microsómicas hepáticas S9 es necesaria para un resultado positivo *in vitro*. La reciente observación de que las fracciones S9 humanas son mucho más activas en la promoción de la genotoxicidad en la prueba de Ames que las fracciones S9 de rata, sugiere que los

humanos pueden ser especialmente sensibles a la carcinogenicidad de la NDMA. Los resultados apoyan la hipótesis de que el consumo de NDMA se asocia principalmente con el cáncer gástrico o colon rectal. (World Health Organization, 2008)

1.1.1. N-nitrosaminas como impurezas en fármacos y medicamentos.

Debido a su potencial carcinogénico en humanos y a la genotoxicidad, probada en animales, asociada a las nitrosaminas, es de suma importancia controlar los niveles a los que los humanos son expuestos a través del consumo de las mismas, asegurando que están presentes por debajo de un nivel tal que habría un riesgo insignificante de cáncer humano asociado con su exposición. Por ello la FDA publicó límites aceptables para estas impurezas en medicamentos, considerando que la principal fuente de exposición puede ser por el consumo de éstos.

En la tabla 1 se presentan las siete nitrosaminas que pueden estar presentes en medicamentos. Sin embargo, experimentalmente al día de hoy solo cinco de ellas han sido detectadas en los medicamentos de circulación mundial. Cabe destacar que el consumo aceptable presentado en la tabla es válido si solo se encuentra una nitrosamina presente; en caso de presentarse más de una, la suma no debe exceder los 26.5 ng/día.

Tabla 1. N-nitrosaminas en medicamentos y principios activos. (Food and Drug Administration, 2021)

Impureza	Nombre	Consumo aceptable (IA) (ng/día)	
NDMA	N-nitrosodimetilamina	96	Detectadas en APIs o medicamentos.
NDEA	N-nitrosodietilamina	26.5	
NMBA	Ácido N-nitroso-N-metil-4-aminobutanoico	96	
NIPEA	N-nitrosoisopropiletilamina	26.5	
NDIPA	N-nitrosodiisopropilamina	26.5	
NDBA	N-nitrosodibutilamina	No reportado	Presencia teórica. Aún no detectadas.
NMPA	N-nitrosometilfenilamina	26.5	

1.1.2. Causas de la presencia de impurezas de N-nitrosaminas en los medicamentos.

Como ya se describió con anterioridad la formación de nitrosaminas es posible en presencia de aminas secundarias, terciarias o cuaternarias y sales de nitrito, en condiciones de reacción ácida, propiciando una reacción de nitrosación (Fiddler, 1972); con esta información se puede inferir que la presencia de estas impurezas es multifactorial y existen diferentes momentos durante el proceso de fabricación de un medicamento en los que se dan las condiciones adecuadas para llevar a cabo la formación de N-nitrosaminas. A continuación, analizaremos los puntos de los procesos en los que se pueden introducir las impurezas que reaccionan para generar nitrosaminas.

En primer lugar, se enlistan las fuentes de nitrito.

- Materias primas que contienen nitrato, como el nitrato de potasio.
- Empleo de nitritos como reactivos en algún paso de reacción. A pesar de las operaciones de purificación, no se puede descartar la transferencia a las etapas siguientes.
- Contaminación de excipientes a nivel de trazas con nitritos. Lo que puede conducir a la formación de impurezas de nitrosamina en los productos farmacéuticos durante el proceso de la formulación del producto y el período de almacenamiento de la vida útil. (Food and Drug Administration, 2021)

Se debe tener en cuenta que las impurezas de nitritos varían entre los lotes de materias primas, excipientes y proveedores. La cantidad de impureza que puede tolerarse depende del proceso y debe ser determinada por cada fabricante. (Food and Drug Administration, 2009)

En segundo lugar se presenta (tabla 2) el tipo de amina y las fuentes de donde puede provenir; nuevamente, la FDA destaca que la cantidad de impurezas de aminas que depende de cada proceso y debe ser determinado por cada fabricante. (Food and Drug Administration, 2009)

Tabla 2. Fuentes de aminos presentes durante la síntesis del principio activo que favorecen la formación de N-nitrosaminas.

	Amina secundaria.	Amina terciaria.	Amina cuaternaria.
API o degradantes del API	X	X	X
Productos intermedios	X	X	X
Materiales de partida	X	X	X
Catalizadores	X	X	X
Disolventes amídicos degradados	X		
Impurezas en disolventes de amidas	X		
Degradación de aminos terciarias.	X		
Impurezas de la desalquilación de aminos cuaternarias.	X	X	

La tabla anterior no es exhaustiva, ya que los reactivos constituidos por grupos amino pueden utilizarse como intermediarios en una amplia gama de transformaciones sintéticas. El deber de los fabricantes es evaluar otros reactivos que contengan grupos funcionales de aminas para detectar el riesgo potencial de formación de nitrosaminas. (Food and Drug Administration, 2021)

Por último se presentan otras posibles fuentes de contaminación, las cuales pueden ser por la inserción directa de nitrosaminas en el producto final, por el empleo de insumos contaminados, incluidos los materiales de partida y las materias primas. A continuación, se enlistan aquellas que la FDA ha observado. (Food and Drug Administration, 2021)

- Agua potable. Nitritos y nitrosaminas pueden estar presentes.
- Degradación de APIs. Algunos productos farmacéuticos pueden sufrir vías de degradación que formen impurezas de nitrosamina; por ejemplo, durante el almacenamiento del producto.
- Contaminación de disolventes. Se encontró contaminación desde los proveedores en disolventes como *orto*-xileno, tolueno y diclorometano. La cual pudo ocurrir durante la transferencia entre recipientes de almacenamiento.
- Uso de disolventes comunes. Cuando se recuperan disolventes de un proceso previo para emplearse en una nueva síntesis o producción de medicamentos.
- Contaminación cruzada. Los materiales de partida o los productos intermedios subcontratados se fabrican en lugares donde se producen impurezas de nitrosamina en otros procesos. Por lo que, el conocimiento de la cadena de suministro de materias primas es un factor importante para prevenir la contaminación.

Los productores de APIs pueden no ser conscientes de la contaminación por nitrosaminas en las materias primas o materiales de partida que han obtenido de los proveedores; un productor cuyo proceso de fabricación no es normalmente susceptible de formación de nitrosaminas puede no darse cuenta de que el

material obtenido del proveedor puede haber tenido impurezas introducidas durante la producción o el transporte. (Food and Drug Administration, 2021)

1.2. Cromatografía.

La cromatografía es un método físico de separación en el que los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una de las cuales es fija (fase estacionaria) mientras que la otra (la fase móvil) se mueve en una dirección definida. Las técnicas cromatográficas pueden ser clasificadas en función del estado de agregación de la fase estacionaria. (IUPAC, 1997)

1.2.1. Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia.

La cromatografía de líquidos (CL) es una técnica de separación llevada a cabo entre la fase móvil, que es líquida, y la fase estacionaria, donde se separan de la muestra el, o los analitos de interés mediante equilibrios de distribución entre ambas fases. Hoy en día, existe una forma moderna de CL, conocida por su acrónimo en inglés, significa *High-Performance (or High-Pressure) Liquid Chromatography* (HPLC), en la cual se usan columnas con un menor tamaño de partícula a través de las cuales se bombea la fase móvil a alta presión, permitiendo mayor eficiencia en la separación. (Dong, 2019)

Ahora bien, el HPLC se divide en varios tipos de acuerdo a los mecanismos mediante los cuales ocurre la separación, en la figura 3 se citan los más comunes.

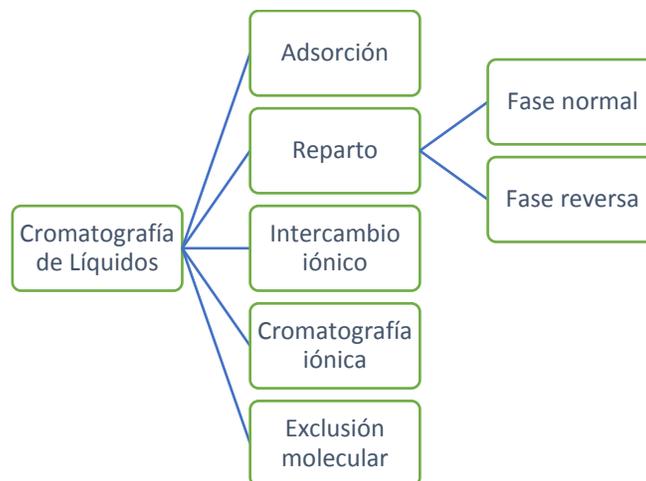


Figura 3. Tipos de cromatografía de líquidos de alta eficiencia.

Es de especial interés para este trabajo el HPLC de reparto, que se fundamenta en las diferencias de la afinidad de los componentes de la muestra entre las fases móvil y estacionaria (IUPAC, 1997),

Esta afinidad es descrita para cada analito por su coeficiente de distribución (K_D).

$$K_D = \frac{[A_{FE}]}{[A_{FM}]}$$

$[A_{FE}]$: Concentración del analito en la fase estacionaria

$[A_{FM}]$: Concentración del analito en la fase móvil

Dicho coeficiente aplica para cualquier forma de cromatografía de reparto, incluyendo cualquier fase móvil o estacionaria (sólidas o líquidas). Además, cabe destacar que se trata de un coeficiente y no de una constante puesto que el proceso cromatográfico es dinámico y no se lleva a cabo al equilibrio. (Barth, 2018)

Ahora bien, como se puede apreciar en el esquema de la figura 3, existen dos modalidades de HPLC de reparto, de acuerdo a polaridad de la fase estacionaria dentro de la columna. En la tabla 3, se presenta la fase móvil a emplearse y el tipo de funcionalización en la columna, que le da nombre a la fase de la cromatografía.

Tabla 3. Tipos de Cromatografía de líquidos con base en las propiedades de sus fases.

Cromatografía	Fase estacionaria	Fase móvil
Fase Normal	Polar	No Polar
Fase Reversa	No Polar	Polar

1.2.2. Instrumentación de un cromatógrafo de líquidos.

En la figura 4 se presenta la instrumentación correspondiente a un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia; y posteriormente se detallan los aspectos más relevantes de cada una de las partes que componen estos equipos.

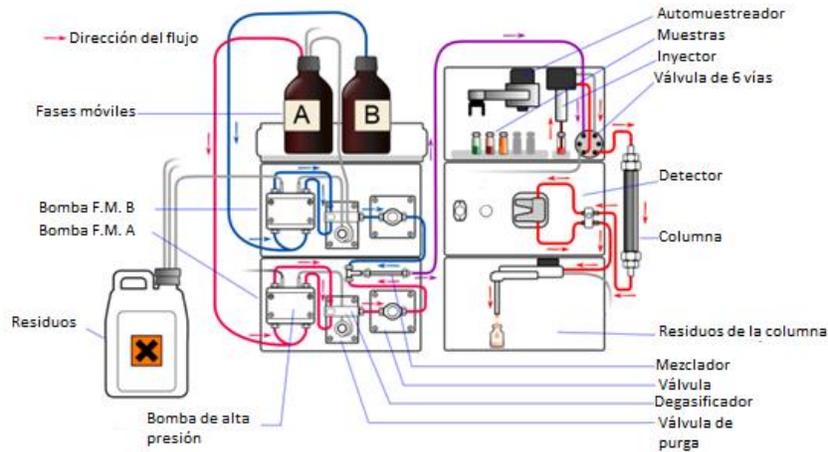


Figura 4. Instrumentación de un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Eficiencia.
(Castaños, 2015)

a) Fase móvil.

En CL la fase móvil es un líquido que fluye a través de una columna que contiene a la fase estacionaria. Existen dos sistemas de bombeo según la composición de la fase móvil:

- Isocrático. La composición de la fase móvil no se modifica durante el análisis.
- Gradiente. La composición de la fase móvil se modifica durante el análisis para ir aumentando su fuerza eluyente.

La “fuerza del disolvente” o la “fuerza eluyente” es una medida de la energía de adsorción del disolvente, tomando como referencia el sistema pentano-sílice pura, al que se le asigna el valor de cero, y nos indica la facilidad del disolvente para formar puentes de hidrógeno con los analitos de interés, la cual depende de su constante dieléctrica o de su momento dipolar. (Tapia-Mendoza, 2021)

En la tabla 4, se presentan ejemplos de las fases móviles usualmente usadas en cada modalidad HPLC de reparto.

Tabla 4. Disolventes usualmente empleados, dependiendo de la modalidad de cromatografía.

Fase Normal	Fase Reversa
<i>n</i> -hexano	Metanol
Cloruro de metileno	Acetonitrilo
Cloroformo	Tetrahidrofurano
Acetato de etilo	Agua

b) Columnas.

Cuando se habla de cromatografía de reparto, en HPLC, las columnas son tramos de tubos rectos de acero inoxidable, en donde se encuentra la fase estacionaria. La función de la columna es retener a los analitos con base en la afinidad que presenten hacia la fase estacionaria. (Christian, 2009)

Dicha fase estacionaria está enlazada covalentemente a sílice, es decir, la columna está empacada con sílice, la cual se funcionaliza uniéndose covalentemente moléculas de interés, mediante un enlace siloxano, para la separación cromatográfica.

En la tabla 5, se presentan algunos ejemplos de fases estacionarias, de acuerdo a la modalidad de cromatografía de reparto que se emplea.

Tabla 5. Fases estacionarias usuales de acuerdo al tipo de cromatografía.

Fase Normal	Fase Reversa
Siloxano funcionalizado con algún grupo polar. Orden de polaridad: ciano< dimetilamino< diol<amino	Siloxano funcionalizado con algún grupo no polar. Orden de polaridad: Fenilo>n-octilo (C8)>n-octadecilo (C18)

c) Detectores.

La función del detector es registrar a los analitos de acuerdo con su respuesta fisicoquímica, por lo que el detector usado depende de la naturaleza química de los analitos. En HPLC se requieren detectores capaces de producir una respuesta con cantidades de analito a nivel de trazas o ultra trazas, del orden de microgramos a nanogramos. En la tabla 6 se presentan algunos ejemplos de los diferentes detectores y se muestran algunas características de relevancia para el analista al momento de escoger el detector más adecuado para el analito.

Tabla 6. Detectores empleados en cromatografía de líquidos. (D.A. Skoog, 2015)
(Locatelli, Melucci, Carlucci, & Locatelli, 2012)

Detector	Selectividad	Límite de detección.	Clasificación	Consideraciones especiales.
Índice de refracción	Universal	10 ng-1 µg	No destructivo Diferencial	No uso con gradiente
UV-vis	Moléculas con enlaces π conjugados	1 pg-1ng	No destructivo Directo	Sí uso con gradiente Posible derivatización pre-columna
Conductividad	Compuestos iónicos	100 pg-1 ng	No destructivo Diferencial	No uso con gradiente
Fluorescencia	Moléculas con capacidad de fluorescer	10 fg-10 pg	No destructivo Directo	Sí uso con gradiente Posible derivatización pre-columna
Electroquímico	Sustancias electroactivas	100 fg- 1 ng	Destructivo Diferencial	No uso con gradiente

1.2.3. Derivatización.

La derivatización involucra un cambio químico del analito, a un producto que será más útil para mejorar el análisis de cuantificación y/o detección del analito original. Este proceso requiere de la optimización de parámetros como pH, temperatura, disolvente, tiempo, etc. (Krull & Strong, 2000)

Este proceso puede realizarse antes (derivatización pre-columna) o después (derivatización post-columna) (IUPAC, 1997). También se puede clasificar dependiendo de si se realiza en continuo con el análisis cromatográfico (*online*) o no (*offline*). En la tabla 7 se muestra en qué momentos, dentro de un proceso analítico, se puede realizar la derivatización.

Tabla 7. Clasificación de la derivatización de acuerdo a en dónde se realiza. (Krull & Strong, 2000)

Modo	Secuencia de la reacción
Pre-columna, <i>offline</i>	Derivatización <i>fuera</i> del CL-inyección-separación-detección
Pre-columna, <i>online</i>	Derivatización <i>dentro</i> del CL-inyección-separación-detección
Post-columna, <i>offline</i>	Inyección-separación-derivatización <i>fuera</i> del CL-detección
Post-columna, <i>online</i>	Inyección-separación-derivatización <i>dentro</i> del CL -detección

1.3. Validación de métodos analíticos.

Aunque existen diferentes definiciones de validación, la red de organizaciones en Europa con el objetivo de establecer un sistema para la trazabilidad internacional

de las mediciones químicas y la promoción de buenas prácticas de calidad (EURACHEM) la define como “el proceso para definir un requisito analítico, y la confirmación de que cuenta con capacidades consistentes con las aplicaciones requeridas.” (EURACHEM, 2016). A continuación, en la tabla 8, se presentan otras definiciones de validación reportadas en documentos internacionales.

Tabla 8. Definiciones del concepto de ‘validación’ en ISO 9000, ISO/IEC 17025 y la Norma Mexicana de Metrología en Química-Vocabulario (NMX-CH-152-IMNC-2005).

Documento	Definición
ISO 9000 9ª edición	Confirmación, a través de la aportación de evidencia objetiva, de que se han cumplido los requisitos para un uso o aplicación específico previsto.
ISO/IEC 17025	Confirmación, a través del examen y aportación de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto.
NMX-CH-152-IMNC-2005	Confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos del método para una utilización o aplicación específica prevista.

Independientemente de la definición, es importante destacar que la importancia de la validación radica en que se genera confianza en los resultados que sean obtenidos con el método validado.

1.3.1. Parámetros de validación.

Según la Entidad Mexicana de Acreditación (EMA) cuando se habla de parámetros de validación o parámetros de desempeño, se refiere a las propiedades, características o capacidades cuantificables del método que indican su grado de calidad. (EMA, 2008). A continuación se enlistan dichos parámetros de validación:

- **Selectividad o especificidad.** Capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés. (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México A. C., S/A)
- **Límite de detección (LD).** Concentración mínima del analito que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada. (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México A. C., S/A)
- **Límite de cuantificación (LC).** Concentración mínima del analito que se puede determinar con precisión y veracidad aceptables. (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México A. C., S/A)
- **Veracidad.** Una expresión de la proximidad de la media de un número infinito de resultados (producidos con el método) a un valor de referencia. Por lo general, esta evaluación se evalúa cuantitativamente en términos del sesgo. (EURACHEM, 2016)
 - Sesgo, se basa en la comparación de la media de los resultados del método candidato con un valor de referencia adecuado. Existen tres enfoques generales:
 - a) Análisis de materiales de referencia certificados (MRC).
 - b) Experimentos de recuperación utilizando muestras adicionadas o placebos fortificados.
 - c) Comparación con resultados obtenidos mediante otro método validado.
- **Precisión.** Es una medida de cuan cerca están los resultados entre sí (EURACHEM, 2016). Se evalúa a tres niveles para determinar la variabilidad típica en las repeticiones.
 - **Repetibilidad:** supone dar la más pequeña variación en los resultados, es una medida de la variabilidad en los resultados cuando una medición se lleva a cabo por un solo analista utilizando el mismo equipo en un corto plazo de tiempo; ésta a la vez se divide en dos: repetibilidad del sistema y método.
 - **Precisión intermedia:** es una estimación de la variación en los resultados cuando las mediciones se realizan en un solo laboratorio, pero en condiciones que son más variables que las condiciones de

repetibilidad. Por ejemplo, cambio en el analista, día instrumento, etcétera.

- **Reproducibilidad:** supone dar la mayor variación en los resultados, es una medida de la variabilidad en los resultados entre laboratorios.
- **Robustez.** Capacidad que tiene un método analítico para permanecer no afectado por pequeñas variaciones premeditadas en las características del método. La robustez proporciona una indicación de la fiabilidad del método durante su uso normal. (EURACHEM, 2016)
- **Intervalo de trabajo.** Concentraciones incluidas entre la concentración superior e inferior del analito (incluyendo éstas), para las cuales se ha demostrado que el método es preciso, veraz y lineal. (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México A. C., S/A)
 - **Linealidad.** Habilidad para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por una transformación matemática, son proporcionales a la concentración del analito. (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México A. C., S/A)
 - **Sensibilidad analítica.** Variación de la respuesta del instrumento que corresponde a una variación de la magnitud medida. (EURACHEM, 2016)

Es importante resaltar que la validación del método va estrechamente ligada al desarrollo del mismo, puesto que varios de los parámetros de desempeño que se reportan en un informe de validación son evaluados simultáneamente durante el desarrollo del método.

1.3.2. Selección de los parámetros de desempeño a evaluar en la validación de un método analítico.

Ahora que conocemos qué es una validación, su importancia y los parámetros de desempeño asociados a la misma; es necesario conocer qué métodos son los que deben validarse. Un método debe ser validado cuando es necesario demostrar que sus características de desempeño son adecuadas para el uso previsto. Como se indica en el apartado 5.4.5.2 de la norma (ISO/IEC 17025, 2005) el laboratorio debe validar:

- Métodos no normalizados.
- Métodos diseñados/desarrollados por el laboratorio
- Métodos normalizados usados fuera de su ámbito de aplicación
- Ampliaciones o modificaciones de métodos normalizados.

Es importante destacar que no siempre se evalúan todos los parámetros de desempeño, existen dos formas principales que guían al analista acerca de cuáles son los parámetros mínimos obligatorios que deberán ser tomados en cuenta en la validación.

La primera forma consiste en clasificar el método en función de su naturaleza normativa. Existen 5 diferentes clasificaciones con base en este criterio, los parámetros a evaluar para este caso se presentan en la tabla 9.

Tabla 9. Parámetros a evaluar en la validación dependiendo del tipo método analítico.(Parra-Solis, 2021)

Tipo de método	Parámetros de interés
Uso de método normalizado.	Veracidad y precisión.
Uso de método normalizado, pero con diferente matriz.	Selectividad, precisión, veracidad, límite de detección.
Establecido pero no probado.	La mayoría.
De la bibliografía sin referencia a parámetros de desempeño.	La mayoría.
Método desde cero.	Todos.

La segunda manera que está reportada en la literatura para seleccionar los parámetros a estudiar en la validación, consiste también en una clasificación del

método, pero esta clasificación es en función del propósito del método. Para ello se han propuesto cuatro categorías que son presentadas a continuación. (Parra-Solis, 2021)

- Categoría I. Procedimientos analíticos para cuantificar un compuesto mayoritario.
- Categoría II. Procedimientos analíticos para cuantificar impurezas. (cuantitativo e impurezas límite)
- Categoría III. Procedimientos analíticos para determinar características fisicoquímicas (por ejemplo, perfiles de disolución).
- Categoría IV. Procedimientos analíticos para realizar pruebas de identificación.

Una vez asignado el método en una categoría, en la tabla 10 se pueden observar los parámetros que deben ser evaluados de acuerdo a esta clasificación.

Tabla 10. Parámetros a evaluar en la validación con base en el propósito analítico del método.(Parra-Solis, 2021)

Parámetro de desempeño	Categoría I	Categoría II (Cuantitativo)	Categoría II (impurezas límite)	Categoría III	Categoría IV
Selectividad	Sí	Sí	No (Puede ser requerido)	No	Sí
Veracidad	Sí	Sí	Sí	No	No
Linealidad	Sí	Sí	No	No	No
Precisión	Sí	Sí	No	Sí	No
Límite de cuantificación	Sí	Sí	No	No	No
Límite de detección	No	Sí	Sí	No	No
Robustez	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí

Si bien hasta el momento se ha destacado la información previa que se requiere conocer respecto a la validación de métodos analíticos, un estudio de validación aporta un valor agregado al laboratorio que lo realiza al proporcionar una mayor

confianza en sus resultados, ya que permite elucidar las etapas críticas del proceso, así como conocimiento sólido y experiencia en los detalles prácticos.

Esto tiene una repercusión directa en diferentes ámbitos político-sociales, dependiendo de la aplicación del método desarrollado, lo que nos deja claro que como laboratorio se debe asegurar la consistencia en los resultados, haciendo una medición correcta y siendo capaces de demostrar que el resultado es confiable. (EURACHEM, 2016).

Capítulo II. METODOLOGÍA.

2.1. Materiales y equipos.

2.1.1. Reactivos

- Acetona grado cromatográfico marca J.T Baker.
- Acetonitrilo grado cromatográfico marca J. T Baker.
- Ácido acético glacial marca Sigma-Aldrich.
- Ácido bromhídrico 33 % en ácido acético marca Sigma-Aldrich.
- Agua desionizada obtenida de un desionizador marca Millipore modelo WaterPro BT.
- Agua deuterada (D_2O) con grado de deuteración del 99.8 % marca Cambridge Isotope Laboratories Inc.
- Cloruro de dansylo pureza del 99 % marca Sigma-Aldrich.
- Cloruro de sodio pureza 99.5 % marca Sigma- Aldrich.
- Cromato de potasio pureza 99 % marca Sigma-Aldrich.
- Diclorometano grado cromatográfico marca J.T Baker.
- Clorhidrato de dimetilamina material de referencia pureza reportada 99 % marca Aldrich Chemical Company Inc.
- Hidróxido de sodio 99 % marca Sigma-Aldrich.
- Nitrato de plata pureza 99 % marca Merck.
- N-nitrosodimetilamina (NDMA) material de referencia marca Sigma-Aldrich.

2.1.2. Preparación de disoluciones

- $AgNO_3$ 0.1 mol/L. Se pesaron 1.7 g de nitrato de plata se trasvasaron a un matraz y se agregaron 100 mL de agua. Esta disolución se normalizó posteriormente.
- Cloruro de dansylo 0.5 mg/mL. Se pesaron 12.5 mg de cloruro de dansylo se trasvasaron cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25.0 mL, se llevó a línea de aforo con acetona y se cubrió con aluminio.
- $NaHCO_3$ 0.5 mol/L. Se pesó 1.05 g de $NaHCO_3$ se disolvió en cantidad mínima de agua y se trasvasó a un matraz volumétrico de 25.0 mL, llevándolo a línea de aforo con agua.

- NaOH 1 mol/L. Se pesó aproximadamente 1.0 g de NaOH, éste se disolvió en cantidad mínima de agua y se llevó a un volumen de 25 mL con agua
- NDMA stock (1 mg/mL). Se midieron 10.0 µL de NDMA con una micropipeta, colocándolos en un matraz volumétrico de 5.0 mL y llevándolo a la línea de aforo con diclorometano (DCM). Posteriormente, se tomó 1.0 mL de la disolución del matraz con una micropipeta y se trasvasó a un matraz de 2.0 mL llevándolo a línea de aforo con DCM.
- NDMA stock (0.05 mg/mL). Se midieron 10.0 µL de NDMA con una micropipeta calibrada, colocándolos en un matraz volumétrico de 5.0 mL y llevándolo a la línea de aforo con DCM. Posteriormente, se tomaron 50.0 µL de la disolución del matraz con otra micropipeta y se trasvasó a un matraz de 2.0 mL llevándolo a línea de aforo con DCM.
- Reactivo de desnitrosación (HBr 3.3 % m/v). En una campana de extracción, se tomó 1.0 mL de HBr 33 % m/v en ácido acético glacial y se colocó en un matraz volumétrico de 10.0 mL llevándolo a la línea de aforo con ácido acético glacial y se cubrió con aluminio.
- Solución indicadora de K₂CrO₄. Se pesó 12.9 mg de cromato de potasio y se llevó a 50 mL con agua.

2.1.3. Equipos

- Cromatógrafo de líquidos con automuestreador y detector de fluorescencia marca Agilent Technologies, 1260 Infinity. Software: OpenLab® 64.
- Equipo de Resonancia Magnética Nuclear RMN-¹H marca Bruker Avance III HD 400 MHz. Software: MestReNova x64.

2.1.4. Instrumentos y aparatos

- Balanza analítica marca Mettler Toledo con capacidad de 220 g y exactitud de 0.1 mg, modelo AND GH-202.
- Bureta de 30.0 mL.
- Matraces volumétricos de 25.0 mL.
- Matraz Erlenmeyer de 500 mL.
- Matraz volumétrico de 2.0 mL.
- Matraz volumétrico de 5.0 mL.

- Micropipeta de 100-1000 μL .
- Micropipeta de 10-100 μL .
- Pipetas Pasteur.
- Vasos de precipitados de 25, 50 y 100 mL.
- Viales ámbar con tapón 1.5 mL.
- Viales transparentes con tapón 10 mL.

2.2. Desarrollo del método analítico.

El método descrito en este trabajo se realizó con base en tres artículos. El procedimiento para la desnitrosación y dansylación de la NDMA fue recuperado del artículo *“High-performance liquid chromatography with fluorescence detection for aqueous analysis of nanogram level N-nitrosodimethylamine”*. Las condiciones cromatográficas iniciales así como las técnicas instrumentales se basaron en los artículos *“Liquid Chromatography-High resolution Spectrometry (LC-HRMS) Method for determination of NDMA in ranitidine drug substance and drug product”* y *“Liquid Chromatography-Tandem mass (LC-MS/MS) Method for determination of NDMA in ranitidine drug substance and drug product”*.

Partiendo de la disolución del material de referencia de NDMA de concentración 1.0 mg/mL, se realizó una derivatización, siguiendo el procedimiento que se presenta en la figura 5. Posteriormente, se analizó bajo las condiciones cromatográficas iniciales, las cuales son presentadas en la tabla 11.

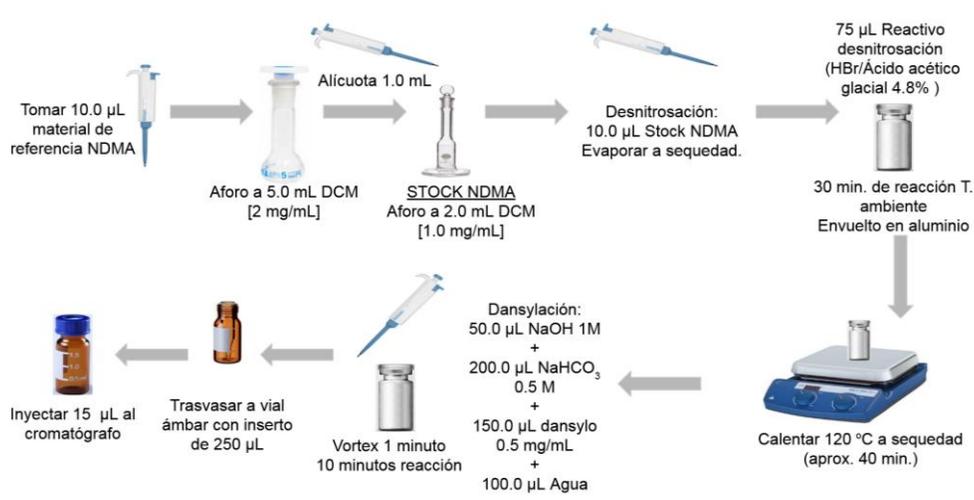


Figura 5. Procedimiento de derivatización de NDMA: reacciones de desnitrosación y dansylación; para la curva de calibración de 0.1 a 0.9 ppm.

Tabla 11. Condiciones cromatográficas iniciales establecidas para la cuantificación de NDMA por cromatografía de líquidos con detector de fluorescencia.

Columna	C-18 150 mm x 4.6 mm x 3.0 μ m.		
Temperatura	40 °C		
Flujo	1 mL/min		
Fase móvil A	Acetonitrilo		
Fase móvil B	Agua		
Gradiente	Tiempo (min)	% A	% B
	0	20	80
	5	20	80
	20	100	0
Volumen de inyección.	15 μ L		
Detector fluorescencia	$\lambda_{\text{excitación}} = 340 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{emisión}} = 530 \text{ nm}$		

Una vez analizados los resultados de la detección de NDMA, con el método cromatográfico presentado previamente, se realizó otro experimento modificando la concentración de la disolución de NDMA a un valor de 0.05 mg/mL, manteniendo las condiciones de derivatización (desnitrosación y dansylación) ya

descritas (figura 5), y modificando las condiciones cromatográficas; se modificó el gradiente de elución, la columna utilizada y el volumen de inyección para establecer el método estandarizado. Las condiciones establecidas se muestran en la tabla 12 y fueron utilizadas en todos los análisis posteriores.

Tabla 12. Condiciones cromatográficas del método estandarizado.

Columna	C-18 50 mm x 2.7 mm x 3.0 μ m.		
Temperatura	40 °C		
Flujo	1 mL/min		
Fase móvil A	Acetonitrilo		
Fase móvil B	Agua		
Gradiente	Tiempo (min)	% A	% B
	0	10	90
	3	10	90
	10	100	0
Volumen de inyección.	100 μ L		
Detector fluorescencia	$\lambda_{\text{excitación}} = 340 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{emisión}} = 530 \text{ nm}$		

2.3. Determinación del porcentaje de pureza del material de referencia de clorhidrato de dimetilamina ($\text{DMA}\cdot\text{HCl}$) mediante argentometría.

El material de referencia con el que se realizará la trazabilidad del método es clorhidrato de dimetilamina ($\text{DMA}\cdot\text{HCl}$), sin embargo, la venta de dicho material de referencia es muy controlada por lo que no fue posible comprar un reactivo nuevo. En su lugar, se empleó un estándar de clorhidrato de dimetilamina almacenado en el Instituto de Química por varios años; por lo que primero se confirmó su identidad con RMN^{-1}H y después se determinó la pureza del estándar, mediante una argentometría.

Previo a la titulación de la muestra, se normalizó la disolución de nitrato de plata 0.1 mol/L , empleando como patrón primario NaCl sólido y seco. El análisis se realizó mediante el procedimiento que se presenta en la figura 6 por cuatruplicado.

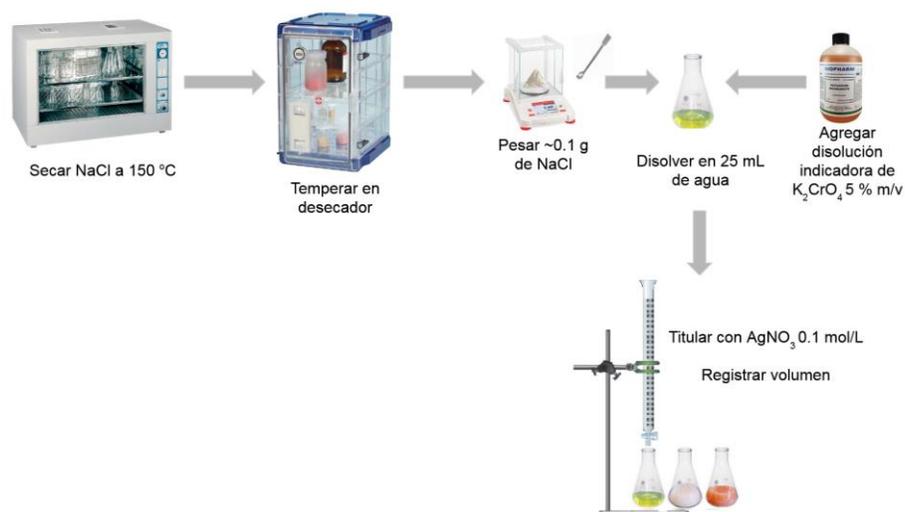


Figura 6. Normalización de AgNO_3 0.1 mol/L con NaCl como patrón primario.

Una vez normalizada la disolución de nitrato de plata 0.1 mol/L , se determinó el porcentaje de pureza del $\text{DMA}\cdot\text{HCl}$ mediante argentometría, por triplicado, empleando el nitrato de plata normalizado y como disolución indicadora cromato de potasio al 5 \% m/v . Este método clásico por volumetría, nos permite cuantificar la cantidad de cloruros presentes en la muestra, los cuales se encuentran en proporción 1:1 respecto a la dimetilamina. El procedimiento se esquematiza en la figura 7.

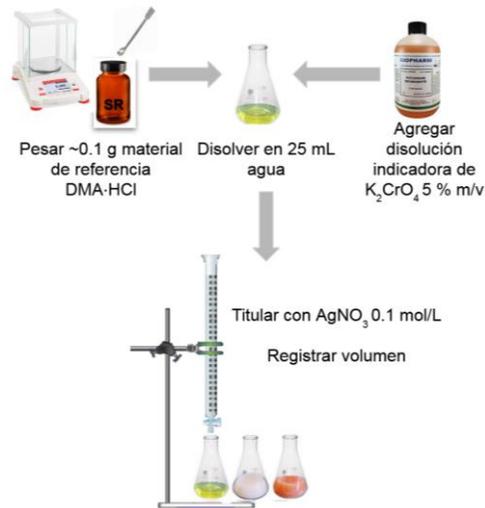


Figura 7. Determinación de la pureza de clorhidrato de DMA mediante argentometría.

2.4. Curva de calibración de DMA-HCl.

Con el material de referencia de DMA-HCl y empleando el método cromatográfico estandarizado, se realizó una primera curva de calibración, en un intervalo de concentraciones de 20 ppm a 180 ppm.

Posteriormente, se trazó una segunda curva en un intervalo de 0.1 ppm a 0.9 ppm la cual se realizó por triplicado, obteniendo 3 curvas de calibración en el mismo intervalo de manera independiente. El procedimiento empleado se muestra en la figura 8.

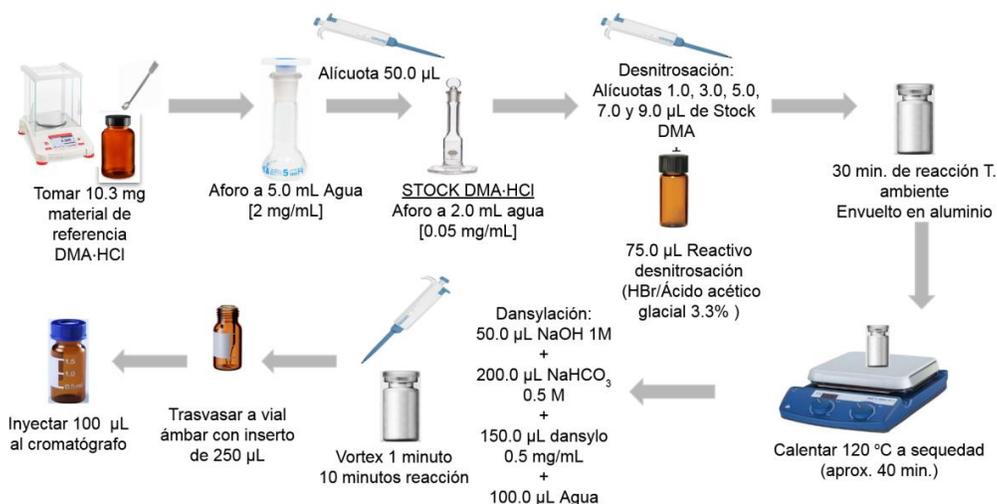


Figura 8. Preparación de la curva de calibración de DMA-HCl en un intervalo de trabajo de 0.1 ppm a 0.9 ppm.

2.4.1. Determinación del rendimiento de la reacción de desnitrosación.

Considerando que en el artículo de donde se tomó el procedimiento de derivatización no se reporta el rendimiento de la reacción de desnitrosación, se procedió a realizar el análisis del punto intermedio de la curva de calibración (0.5 ppm), con la disolución de NDMA (0.05 mg/mL); es decir, tomando 5.0 μ L de ésta y siguiendo el mismo procedimiento presentado en la figura 8. El procedimiento se realizó por cuadruplicado.

Con las áreas obtenidas y el modelo matemático de la curva de calibración obtenida en el intervalo de 0.1 ppm a 0.9 ppm se realizó la interpolación, con el fin de conocer el porcentaje de NDMA que se transforma en DMA durante la reacción de desnitrosación.

2.5. Validación del método analítico.

2.5.1. Preparación de la muestra.

La validación del método requiere que se analice al menos una muestra real, para lo cual se seleccionó al azar una marca comercial de tabletas de losartán. Se obtuvieron tres lotes diferentes de tabletas marca Punab® de Wermar *pharmaceuticals*, los distintos lotes de tabletas se juntaron, se molieron y se mezclaron para su análisis.

En la figura 9, se esquematiza el procedimiento de preparación de muestra adaptado del artículo "*Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS) Method for the Determination of Six Nitrosamine Impurities in ARB Drugs*" de la FDA.

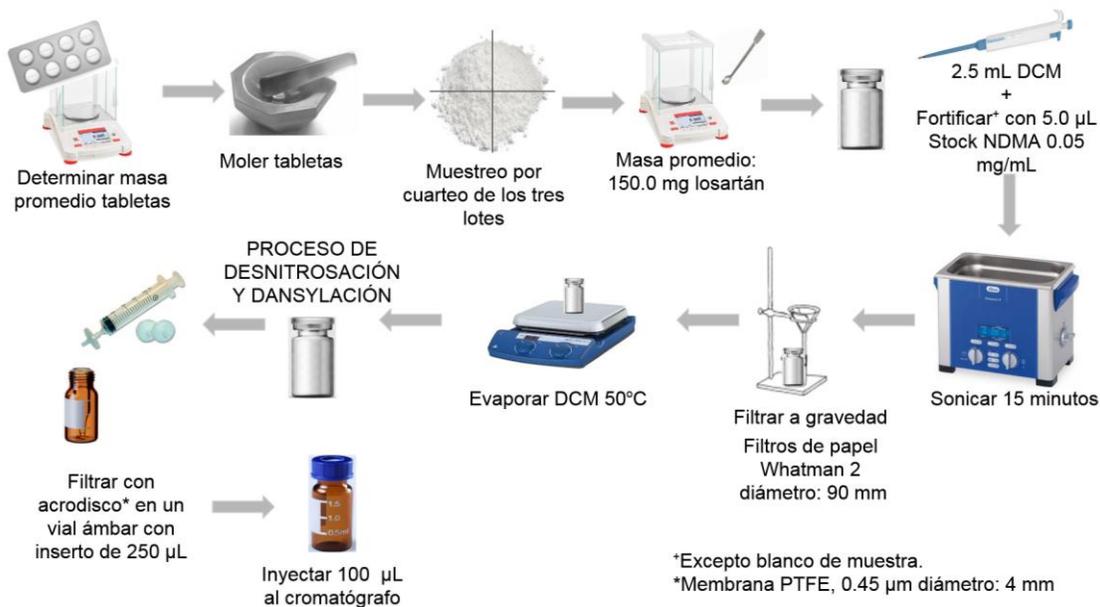


Figura 9. Preparación de muestra para tabletas de losartán 50 mg.

2.5.2. Protocolo de validación.

Se procedió a realizar la validación conforme al protocolo que se presenta en la tabla 13.

Tabla 13. Protocolo de validación para el método por HPLC para cuantificar N-nitrosodimetilamina (NDMA).

Parámetro	Metodología	Criterio de aceptación
Selectividad	<p>Obtener:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Cromatograma de NDMA. 2. Blanco de reactivo de proceso. 3. Cromatograma de la muestra. 4. Cromatograma de la muestra fortalecida (nivel central) una vez. 	Demostrar que la respuesta es libre de interferencias y se conoce.

Parámetro	Metodología	Criterio de aceptación
Repetibilidad del sistema	Inyectar por quintuplicado punto intermedio 0.5 ppm (una misma preparación) de DMA-HCl. Analizar conforme el método de análisis.	% CV \leq 2 % del área obtenida.
Linealidad	Preparar 5 niveles de concentración (0.1 ppm, 0.3 ppm, 0.5 ppm, 0.7 ppm y 0.9 ppm) partiendo de DMA 0.05 mg/L y procesar conforme al método de análisis.	Calcular b_1 , b_0 , $r^2 \geq 0.98$, IC de pendiente no incluya a cero y no observar tendencia en residuales (Durbin Watson).
Límite de detección	Preparar 5 niveles de concentración (0.1 ppm, 0.3 ppm, 0.5 ppm, 0.7 ppm y 0.9 ppm) partiendo de DMA 0.05 mg/L y procesar conforme al método de análisis.	Mismos criterios que linealidad. Que el valor obtenido sea igual o menos al requerido por la FDA.
Límite de cuantificación	Preparar 5 niveles de concentración (0.1 ppm, 0.3 ppm, 0.5 ppm, 0.7 ppm y 0.9 ppm) partiendo de DMA 0.05 mg/L y procesar conforme al método de análisis.	Mismos criterios que linealidad. Que el valor obtenido sea igual o menos al requerido por la FDA.

Parámetro	Metodología	Criterio de aceptación
Veracidad	Fortificar seis muestras independientes con 5.0 µL de NDMA 0.05 mg/mL. (0.5 ppm, punto central). Y analizar conforme método de análisis.	Reportar como % de recuperación. $\left(\frac{\text{Concentración}_{\text{interpolación}}}{\text{Concentración}_{\text{adicionada}}} \times 100 \right)$ Estimar sesgo e intervalos de confianza para el % de recuperación.
Repetibilidad del método		% CV ≤ 5 % del porcentaje de recuperación.
Precisión intermedia	Analizar por triplicado muestras adicionadas al mismo nivel que la veracidad y proceder con el método de análisis en dos días diferentes y por dos analistas.	% CV ≤ 5 % del porcentaje de recuperación. Mediante ANOVA, demostrar que no existen diferencias estadísticamente significativas entre analistas y días de análisis.

Capítulo III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1. Desarrollo del método analítico.

El método analítico se desarrolló con base en el artículo “*High-performance liquid chromatography with fluorescence detection for aqueous analysis of nanogram level N-nitrosodimethylamine*”, para lo cual se determinaron las cantidades iniciales de los reactivos a emplear, realizando los cálculos para determinar la relación en número de mol de la NDMA material de referencia con cada uno de los reactivos empleados en el artículo; para posteriormente ajustarlos a los reactivos con los que se cuenta en la Unidad de Desarrollo Tecnológico (UDT) del Instituto de química (IQ). Los cálculos se presentan a continuación.

Las ecuaciones químicas que representan el proceso se muestran a continuación en la figura 10.

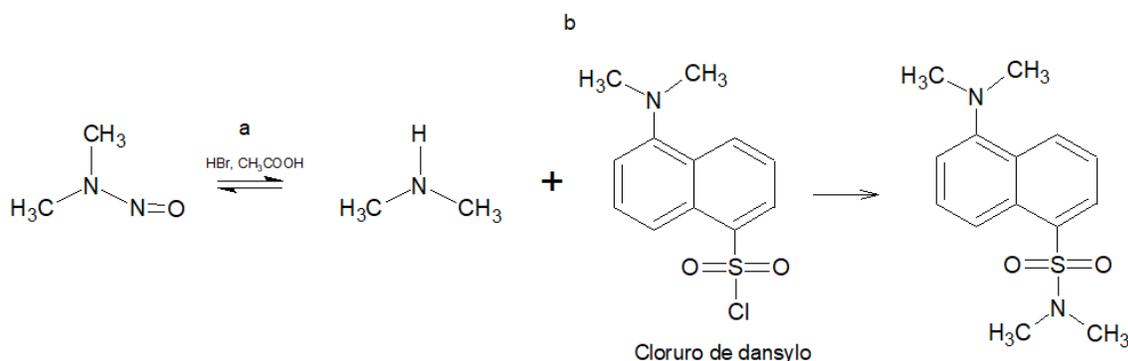


Figura 10. Reacciones de (a) dansylación y (b) desnitrosación involucradas en la derivatización de la NDMA.

A. Reactivo de desnitrosación.

Los autores del artículo menciona emplean 10 μL de reactivo desnitrosante (4.8 % m/v), los cuales reaccionan con 100 μL de la disolución de NDMA concentración 1 mg/mL.

- Cantidad de mol de HBr

$$\frac{4.8 \text{ g HBr}}{100 \text{ mL disolución}} \times \frac{1 \text{ mol HBr}}{80.9 \text{ g HBr}} \times \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} = 0.6 \frac{\text{mol}}{\text{L}} \text{HBr}$$

$$10 \mu\text{L} \times \frac{0.6 \text{ mol HBr}}{1000 \text{ mL disolución}} \times \frac{1 \text{ mL}}{1000 \mu\text{L}} = 6 \times 10^{-6} \text{ mol HBr}$$

- Cantidad de mol de NDMA

$$100 \mu\text{L} \times \frac{1 \text{ mg NDMA}}{1 \text{ mL disolución}} \times \frac{1 \text{ g NDMA}}{1000 \text{ mg NDMA}} \times \frac{1 \text{ mol NDMA}}{74.08 \text{ g NDMA}} \times \frac{1 \text{ mL}}{1000 \mu\text{L}}$$

$$= 1.35 \times 10^{-6} \text{ mol NDMA}$$

- Relación molar en la reacción de desnitrosación.

$$\frac{6 \times 10^{-6} \text{ mol HBr}}{1.35 \times 10^{-6} \text{ mol NDMA}} = 4.4 \text{ mol de HBr por cada mol NDMA}$$

Experimentalmente, en el laboratorio se empleó HBr 33 % m/v

- Cantidad de mol de HBr

$$\frac{33 \text{ g HBr}}{100 \text{ mL disolución}} \times \frac{1 \text{ mol HBr}}{80.9 \text{ g HBr}} \times \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} = 4.08 \frac{\text{mol}}{\text{L}} \text{ HBr}$$

Por simplicidad experimental se plantea hacer la misma dilución que en el artículo:

$$C_2 = \frac{(1.0 \text{ mL})(4.08 \text{ mol/L HBr})}{10.0 \text{ mL}} = 0.41 \text{ mol/L HBr}$$

Partiendo de que tenemos que guardar la relación estequiométrica 4.4:1 como en el artículo, se calcula el volumen a emplear de dicha disolución.

$$6 \times 10^{-6} \text{ mol HBr} \times \frac{1000 \text{ mL}}{0.408 \text{ mol HBr}} \times \frac{1000 \text{ microL}}{1 \text{ mL}} = 14.7 \text{ microL} = 15 \mu\text{L}$$

Se comenzaron los primeros experimentos empleando 15 μL de reactivo de desnitrosación. Sin embargo, experimentalmente se observó que, al ser un volumen tan pequeño, este no cubría la superficie del vial en donde se tenía la NDMA, lo que hacía imposible asegurar que estuviera en contacto con la NDMA, aún después de usar el vortex para homogeneizar. Así, se incrementó el volumen a emplear hasta que se encontró que 75 μL cubrían perfectamente la superficie.

Calculando la relación estequiometría con el nuevo volumen del reactivo de desnitrosación, se tiene una relación aproximada de 22:1 HBr:NDMA, lo cual asegura que el reactivo derivatizante esté en exceso.

$$75 \mu\text{L} \times \frac{0.41 \text{ mol}}{1000 \text{ mL disolución}} \times \frac{1 \text{ mL}}{1000 \mu\text{L}} = 3 \times 10^{-5} \text{ mol HBr}$$

$$\frac{3 \times 10^{-5} \text{ mol HBr}}{1.35 \times 10^{-6} \text{ mol NDMA}} = 22.2 \text{ mol de HBr por cada mol NDMA}$$

B. Reacción de dansylación.

Para esta reacción los autores emplean 150 μL de la disolución de Cloruro de Dansylo 0.5 mg/mL y 10 μL de una disolución de DMA al 40 % m/v. Bajo estas condiciones, las proporciones de DMA y derivatizante empleados serían las siguientes:

- Cantidad de mol de dansylo usadas en el artículo.

$$150 \mu\text{L} \times \frac{0.5 \text{ mg dansylo}}{1000 \mu\text{L disolución}} \times \frac{1 \text{ g dansylo}}{1000 \text{ mg dansylo}} \times \frac{1 \text{ mol dansylo}}{269.7 \text{ g dansylo}} \\ = 2.8 \times 10^{-7} \text{ mol de dansylo}$$

- Cantidad de mol de DMA en el artículo.

$$10 \mu\text{L} \times \frac{40 \text{ g DMA}}{100 \text{ mL disolución}} \times \frac{1 \text{ mol DMA}}{45 \text{ g DMA}} \times \frac{1 \text{ mL}}{1000 \mu\text{L}} = 8.8 \times 10^{-5} \text{ mol DMA}$$

- Relación molar en la reacción de dansylación.

$$\frac{8.8 \times 10^{-5} \text{ mol DMA}}{2.8 \times 10^{-7} \text{ mol dansylo}} = 314 \text{ mol de DMA por cada mol de dansylo}$$

El resultado anterior, no tiene sentido, puesto que se sabe que el reactivo derivatizante se debe encontrar siempre en exceso.

Por lo tanto, se tienen dos supuestos:

- a) El volumen de DMA (10 μL) 40 % m/v reportado en el artículo está errado y se usa un volumen mucho menor, o

- b) La cantidad empleada de la disolución estándar de NDMA (1 mg/mL) no son 100 μL , sino 10 μL , de acuerdo a los cálculos mostrados con anterioridad.

Para resolverlo, se optó por aceptar la segunda hipótesis. El artículo comete un error al reportar que se usaron 10 μL de una disolución de DMA al 40 % m/v, en su lugar se tuvo la hipótesis de que se usan 10 μL de una disolución de DMA al 1 mg/mL, misma concentración que la disolución de NDMA para la dansylación; esto es porque los autores del trabajo suponen una desnitrosación con un rendimiento cercano al 100% y, dado que la reacción de desnitrosación es de estequiometría 1:1 entre productos y reactivos, los mol de NDMA deben ser iguales a los mol de DMA.

- Suponiendo que se emplean 10 μL una disolución de concentración 1 mg/mL de DMA.

$$10 \mu\text{L} \times \frac{1 \text{ mg DMA}}{1 \text{ mL disolución}} \times \frac{1 \text{ g DMA}}{1000 \text{ mg DMA}} \times \frac{1 \text{ mol DMA}}{45 \text{ g DMA}} \times \frac{1 \text{ mL}}{1000 \mu\text{L}}$$

$$= 2.8 \times 10^{-7} \text{ mol DMA}$$

- Relación molar en la reacción de dansylación.

$$\frac{2.8 \times 10^{-7} \text{ mol dansylo}}{2.2 \times 10^{-7} \text{ mol DMA}} = 1.3 \text{ mol de dansylo por cada mol de DMA}$$

Este es un resultado es más factible y, al aceptar el segundo supuesto, se recalcula la relación molar en la desnitrosación.

- Cantidad de mol de NDMA 0.05 mg/mL

$$10 \mu\text{L} \times \frac{1.0 \text{ mg NDMA}}{1 \text{ mL disolución}} \times \frac{1 \text{ g NDMA}}{1000 \text{ mg NDMA}} \times \frac{1 \text{ mol NDMA}}{74.08 \text{ g NDMA}} \times \frac{1 \text{ mL}}{1000 \mu\text{L}}$$

$$= 1.35 \times 10^{-7} \text{ mol NDMA}$$

$$\frac{3 \times 10^{-5} \text{ mol HBr}}{1.35 \times 10^{-7} \text{ mol NDMA}} = 222.2 \text{ mol de HBr por cada mol NDMA}$$

De esta manera se establecieron las cantidades definitivas a emplear en ambas reacciones, asegurando que el reactivo limitante en todo momento sea la NDMA.

En la figura 11 se presenta el primer cromatograma obtenido usando las condiciones cromatográficas iniciales (tabla 11), derivatizando el material de referencia de NDMA.

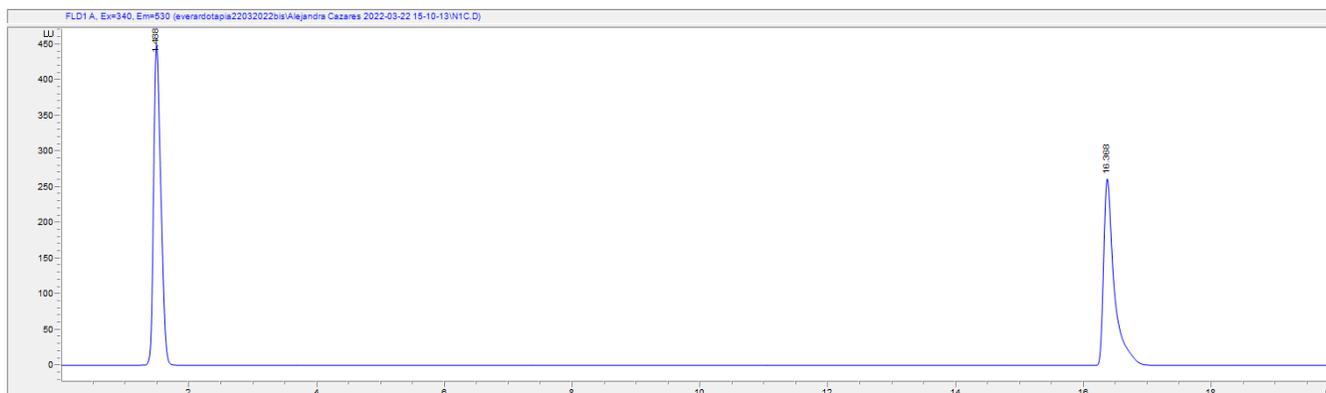


Figura 11. Cromatograma con el primer método propuesto para cuantificar NDMA por HPLC.

Se observa que el tiempo de retención (t_R) del analito es de 16.38 minutos, un pico bien resuelto, ligeramente coleado, pero con un tiempo de análisis largo.

Dado que este tiempo de análisis no es lo deseable para un método que se pretende emplear de forma rutinaria, se acortó el tiempo de análisis cambiando la columna de 150 mm por una de 50 mm, modificando también el gradiente de elución en la corrida cromatográfica. Además, para disminuir el coleo del pico se decidió disminuir la concentración del stock de NDMA de 1.0 mg/mL a 0.05 mg/mL; dado que la nueva concentración es dos órdenes de magnitud más pequeña y previendo que con tan poca cantidad de NDMA no se llegue a los límites de detección deseados, el volumen de inyección se cambió de 15 μ L a 100 μ L.



Figura 12. Cromatograma con el método estandarizado (columna de 50 mm).

En la figura 12 se observa el cromatograma del nuevo método, en el cual se reduce considerablemente el tiempo de análisis con una duración de 10 minutos. Se observa un pico con un $t_r = 7.043$ minutos, bien resuelto y ligeramente coleado.

3.2. Determinación del porcentaje de pureza del material de referencia de clorhidrato de dimetilamina (DMA-HCl) mediante argentometría.

Debido a que el material de referencia DMA-HCl había estado almacenado un largo tiempo, fue necesario determinar su identidad y pureza.

En la figura 13 se muestra el espectro de RMN-¹H obtenido, con su respectivo análisis para el clorhidrato de dimetilamina.

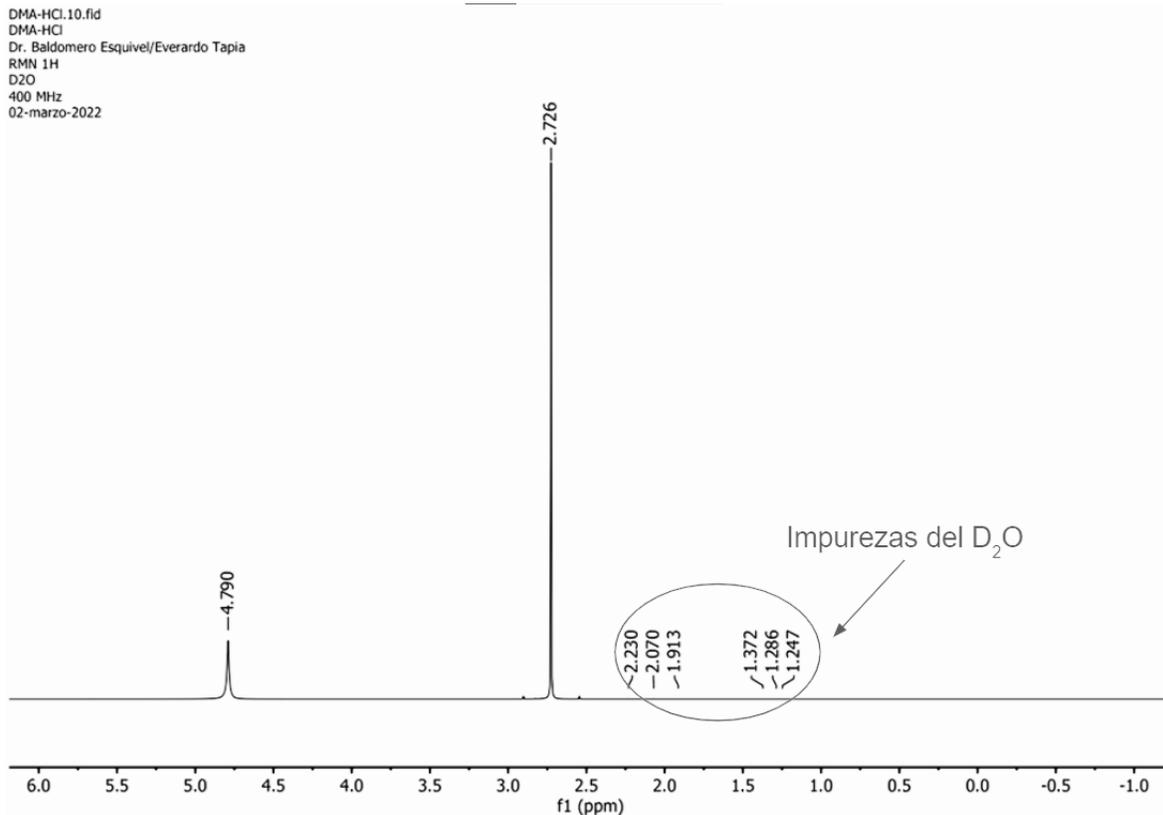


Figura 13. Espectro de RMN- H^1 para DMA-HCl material de referencia marca Sigma-Aldrich.

En la figura 13 se observa que el material referencia se encuentra puro y corresponde a la especie que debe ser. Se muestra una señal con un desplazamiento químico de 4.79 ppm que corresponde a la señal residual del disolvente (D_2O) y otra señal en 2.75 ppm, en gran abundancia, correspondiente a los metilos simétricos de la dimetilamina. Se corroboró que las señales encerradas en el círculo sin impurezas del agua deuterada, que fue el disolvente en el análisis, comparando el espectro de la muestra con el del blanco de disolvente (anexo III).

Una vez confirmada la identidad del material de referencia, se determinó su grado de pureza mediante una valoración con nitrato de plata 0.1 mol/L normalizada con cloruro de sodio sólido. Los resultados de la normalización se muestran en la tabla 14.

Tabla 14. Normalización de la disolución de nitrato de plata (0.1 mol/L) con cloruro de sodio sólido.

Masa (g) NaCl	Volumen (mL) AgNO ₃	Concentración AgNO ₃ (mol/L)
0.1043	17.3	0.1032
0.1011	16.5	0.1048
0.1001	16.6	0.1032
0.1035	16.6	0.1066
	Concentración	0.1044

A continuación se muestra un ejemplo del cálculo que se realizó para determinar la concentración de AgNO₃ para cada masa de NaCl. La concentración nominal es el promedio de los cuatro experimentos individuales.

$$0.1043 \text{ g NaCl} \times \frac{1 \text{ mol NaCl}}{58.44 \text{ g NaCl}} \times \frac{1 \text{ mol AgNO}_3}{1 \text{ mol NaCl}} \times \frac{1}{17.3 \text{ mL AgNO}_3} \times \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}}$$

$$= 0.1032 \frac{\text{mol}}{\text{L}} \text{ de AgNO}_3$$

Una vez determinada la concentración nominal de la disolución de nitrato de plata, se tituló por triplicado el material de referencia (DMA·HCl). Los resultados de la esta volumetría se muestran en la tabla 15.

Tabla 15. Determinación de la pureza de la DMA·HCl material de referencia por el análisis clásico de argentometría.

Masa (g) DMA·HCl	Volumen (mL) AgNO ₃	Pureza (%)
0.1610	18.7	98.87
0.1505	17.1	96.72
0.1554	17.5	95.86
	Pureza	97.15

A continuación se presenta un ejemplo de la forma en que se calculó la pureza de la DMA·HCl en cada experimento. Cabe destacar que la pureza final es el promedio de los tres experimentos individuales.

$$18.7 \text{ mL AgNO}_3 \times \frac{0.1044 \text{ mol AgNO}_3}{1000 \text{ mL}} \times \frac{1 \text{ mol DMA} \cdot \text{HCl}}{1 \text{ mol AgNO}_3} \times \frac{81.54 \text{ g DMA} \cdot \text{HCl}}{1 \text{ mol DMA} \cdot \text{HCl}} \times \frac{100\%}{0.1505} = 98.87 \%$$

Una vez que se determinó la pureza de la DMA·HCl, se procedió a realizar la curva de calibración correspondiente.

3.3. Curva de calibración con la disolución DMA·HCl.

3.3.1. Construcción de la curva de calibración con material de referencia DMA·HCl.

A continuación, en la figura 14, se presentan los resultados obtenidos de la curva de calibración determinada en un intervalo de concentraciones de 20 ppm a 180 ppm.

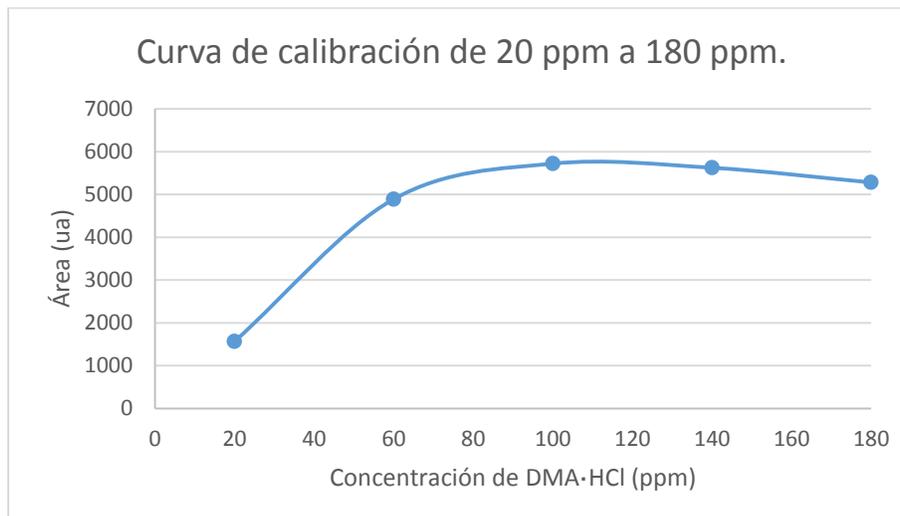


Figura 14. Curva de calibración 20 ppm a 180 ppm.

En la gráfica se observa un aplanamiento de la curva desde 80 ppm, lo que es indicativo de la saturación del detector, es decir, se sale del intervalo dinámico, por lo que se planteó y realizó una nueva curva de calibración a niveles más bajos de concentración, esto fue de 0.1 ppm a 0.9 ppm del DMA·HCl y se realizó por triplicado.

A continuación, en la tabla 16 se presentan los resultados de las áreas obtenidas por triplicado para cada nivel de concentración en la nueva curva de calibración planteada; aunado a ello se presenta en la figura 15 el gráfico y la ecuación obtenida tras aplicar mínimos cuadrados a dichas respuestas. Además, en la figura 16, se muestra el conjunto de los cromatogramas obtenidos para cada nivel de concentración de DMA·HCl.

Tabla 16. Áreas de la curva de calibración de DMA·HCl.

Concentración (ppm)	Área (ua)
0.1	52.8
0.1	54.6
0.1	51.4
0.3	77.9
0.3	81.4
0.3	82
0.5	110.4
0.5	102.4
0.5	103
0.7	126.1
0.7	122.8
0.7	125.4
0.9	150
0.9	155.1
0.9	146.3

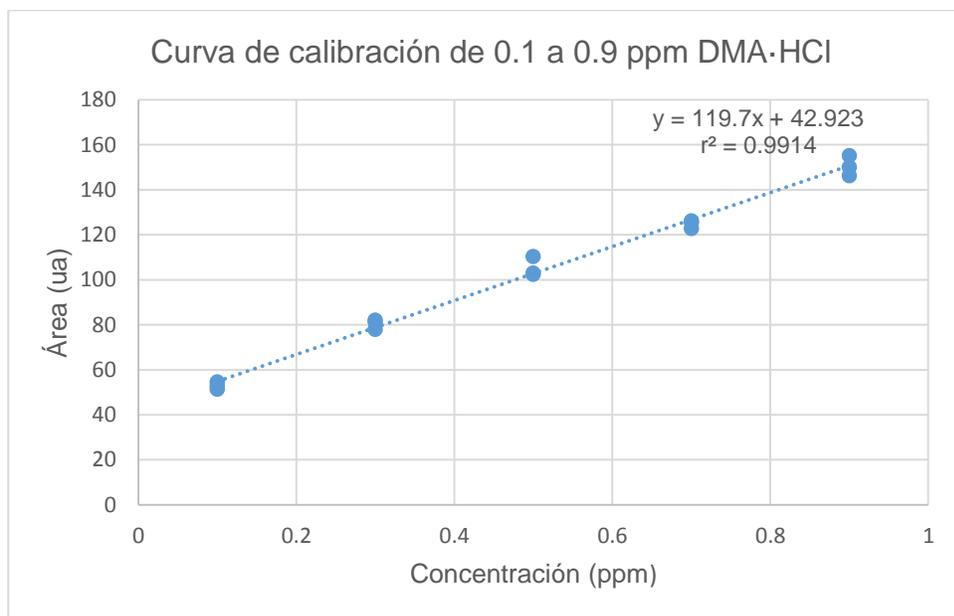


Figura 15. Curva de calibración con coeficiente de correlación (r^2) y la ecuación de línea recta.

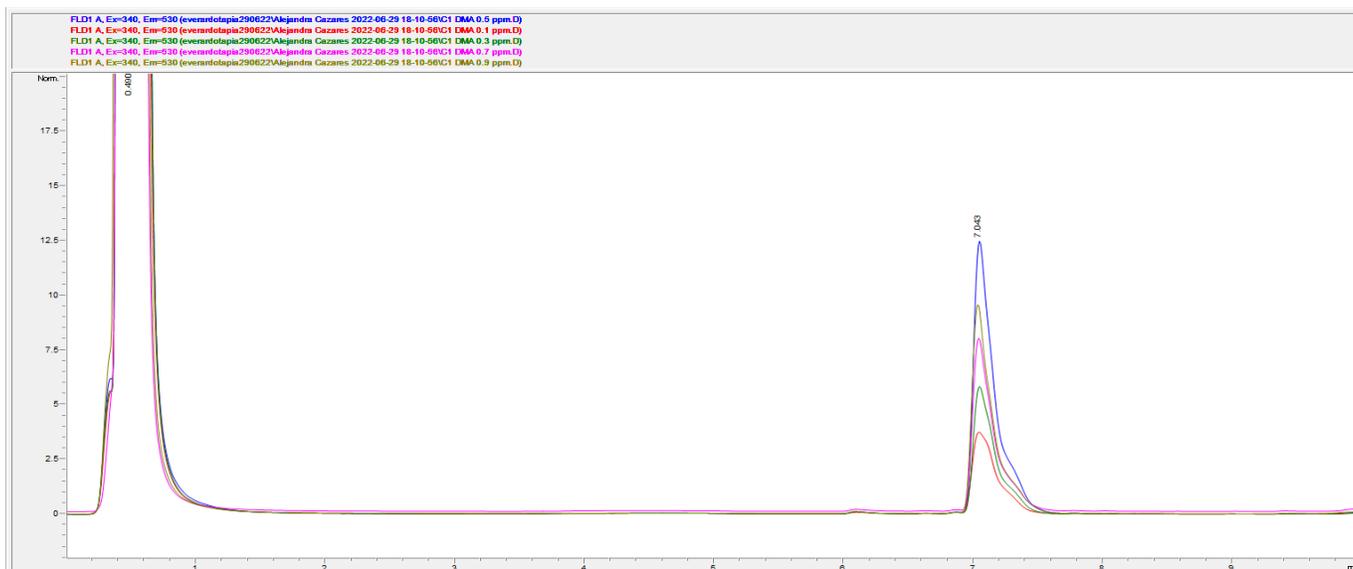


Figura 16. Cromatogramas para una curva de calibración de 0.1 a 0.9 ppm con material de referencia de DMA·HCl.

3.3.2. Determinación del rendimiento de la reacción de desnitrosación.

En vista de que la reacción de desnitrosación es una reacción que involucra pasos en equilibrio, se decidió verificar que las condiciones propuestas por el artículo efectivamente dieran un buen porcentaje de desnitrosación, corroborando que esta reacción tuviera la suficiente cuantitatividad para realizar un análisis cuantitativo de la NDMA. Para la reacción de dansylación ya ha sido reportado que la derivatización con este fluoróforo es una reacción cuantitativa, que inclusive se usa para diversas aplicaciones a nivel de análisis.

La determinación del rendimiento de la desnitrosación se llevó a cabo de manera indirecta, midiendo con el detector de fluorescencia, la respuesta del producto desnitrosado y dansylado.

Los resultados de la concentración obtenida para las inyecciones del material de referencia de NDMA (punto intermedio de la curva de calibración) con el modelo matemático obtenido se muestran en la tabla 17.

Tabla 17. Resultados para la determinación del rendimiento de la reacción de desnitrosación de la NDMA.

Concentración inyectada NDMA (ppm)	Área del producto dansylado	Concentración obtenida de la interpolación con la ecuación de la línea recta (ppm)	Rendimiento desnitrosación (%)
0.5	105.664	0.524152047	104.8304094
	99.487	0.472548037	94.50960735
	100.166	0.478220551	95.64411028
		Rendimiento total	98.32804233

A continuación se presenta el algoritmo de los cálculos, que se usaron para determinar el rendimiento de la reacción.

- Despejando concentración en ppm (x) de la regresión lineal (interpolación)

$$x = \frac{y - 42.923}{119.7}$$

- Decodificando la ecuación

$$\text{Concentración (ppm)} = \frac{\text{Área (ua)} - 42.923 \text{ ua}}{119.7 \frac{\text{ua}}{\text{ppm}}}$$

- Sustituyendo el área obtenida

$$\text{Concentración (ppm)} = \frac{105.664 \text{ ua} - 42.923 \text{ ua}}{119.7 \frac{\text{ua}}{\text{ppm}}} = 0.524 \text{ ppm}$$

- % Desnitrosación

$$\% \text{ desnitro} = 0.524 \times \frac{100\%}{0.5 \text{ ppm}} = 104.83 \%$$

Como podemos observar la reacción de desnitrosación se lleva a cabo de forma completa, ya que los equilibrios involucrados en la reacción de desnitrosación se desplazan principalmente hacia los productos bajo estas condiciones.

3.4. Validación del método analítico.

A continuación se presentan los resultados obtenidos de la evaluación de cada parámetro de desempeño, para el método presentado en este trabajo.

a) Selectividad.

De las figuras 17 a 20 se muestran los cromatogramas con los que se demostró la selectividad del método.



Figura 17. Cromatograma asociado al blanco de reactivos.



Figura 18. Cromatograma asociado al blanco del método.

En los cromatogramas de blanco de reactivos (figura 17) y blanco del método (figura 18), solo se observa el pico correspondiente al reactivo derivatizante, la ausencia de más picos indica que ningún reactivo está contaminado con algún compuesto fluorescente y, al no observar señal en el tiempo de retención correspondiente a la NDMA, la impureza no se introduce por error en ningún paso del método y el sistema cromatográfico está libre de interferentes.

Por otro lado, en el cromatograma asociado al blanco de la muestra (figura 19) se observa un pico con un $t_R=7.07$ min y un área de 101.42 ua por lo que la muestra contiene la impureza NDMA.

Puesto que no se cuenta con un placebo analítico, se fortifica la muestra. Al agregar una cantidad conocida del analito de interés, cuya concentración resultante se encuentre dentro del intervalo dinámico de la curva de calibración, el

área del pico correspondiente al tiempo t_R del analito deberá aumentar de manera proporcional a la cantidad agregada.

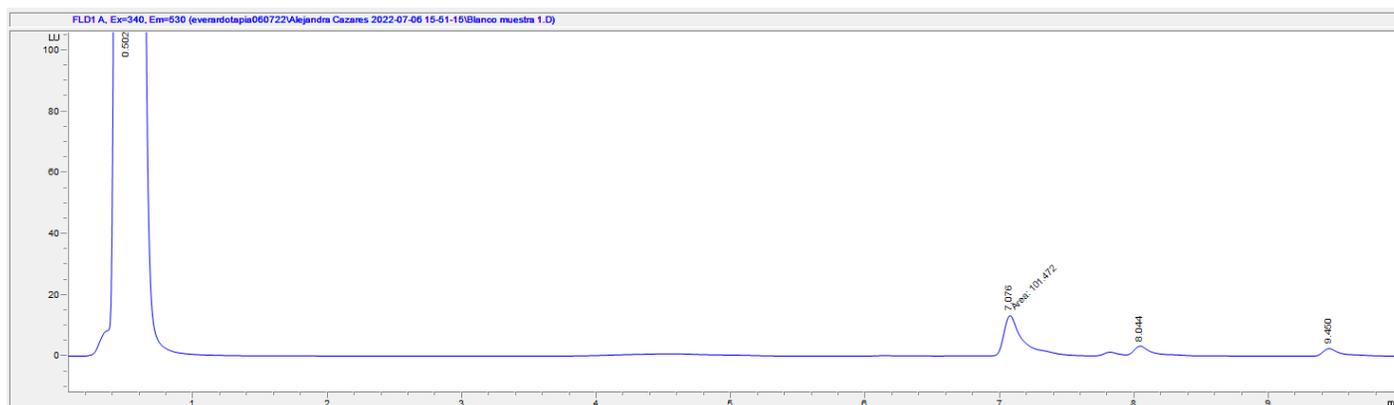


Figura 19. Cromatograma de la muestra (losratán).

En la figura 20 se muestra el cromatograma en donde se observa la NDMA con un $t_R = 7.044$ min y un área de 204.11 ua, como se esperaba el área del pico de interés aumentó. Además, en los cromatogramas donde está involucrada la muestra, se observan otros dos picos que, aunque no se puede conocer a qué sustancia pertenecen, es posible que sean otras N-nitrosaminas presentes en la muestra y en el estándar de NDMA.



Figura 20. Cromatograma de muestra fortificada con 5.0 μL de una disolución de 0.05 ppm de NDMA.

A continuación se presentan los cálculos de los parámetros cromatográficos selectividad (α) y resolución (R_s) para el pico de la NDMA y el pico adyacente ($t_r=7.802$ min.).

$$t_{R1(\text{NDMA})} = 7.044 \text{ min}$$

$$t_{R2(\text{desconocido})} = 7.802 \text{ min}$$

Selectividad

Resolución entre dos picos

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_m}{t_{R1} - t_m} = \frac{t_{R2}}{t_{R1}}$$

$$\alpha = \frac{7.802 \text{ min}}{7.044 \text{ min}} = 1.107$$

$$R_s = \frac{0.545(t_{R2} - t_{R1})}{W_{1/2} - W_{2/2}} = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{W_{b1} + W_{b2}}$$

$$R_s = \frac{2(7.802 \text{ min} - 7.044 \text{ min})}{0.3532 \text{ min} + 0.225 \text{ min}} = 2.62$$

Observando los valores obtenidos al calcular estos parámetros cromatográficos se concluye que el método es selectivo, por lo que se conoce la respuesta del analito respecto a los componentes de la muestra, y esta respuesta es libre de interferentes, ya que el pico de la NDMA posee una buena selectividad (mayor a 1) y una buena resolución (mayor a 1.5), respecto al interferente más cercano.

b) Linealidad.

Para evaluar este parámetro, se realizó el análisis de datos por mínimos cuadrados para obtener la ecuación matemática que modelará cómo se comporta la respuesta en términos de concentraciones ascendentes del material de referencia (DMA-HCl). En las tablas 18 y 19 se observa el resumen de datos obtenidos por la hoja de cálculo Excel®.

Tabla 18. Estadísticas de la regresión.

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0.995693
Coefficiente de determinación r^2	0.991404
Error típico ($S_{y/x}$)	3.386413
Observaciones	15

Tabla 19. Resumen de los valores y parámetros obtenidos tras el análisis de varianza de una vía, obtenidos tras el análisis de mínimos cuadrados.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
		Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
	Regresión	1	17193.71	17193.71	1499.30376	8.1513E-15
	Residuos	13	149.0813	11.46779		
	Total	14	17342.79			
	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción (ua)	42.92333	1.77585	24.17058	3.4398E-12	39.08684243	46.75982
Pendiente (ua/ppm)	119.7	3.091358	38.72084	8.1513E-15	113.0215266	126.3785

Con este análisis de regresión y correlación se obtienen las siguientes conclusiones:

1. $r=0.9957$ y $r^2=0.9907$, son valores cercanos a uno, por lo tanto el modelo matemático: $y = 119.7x + 42.923$, es adecuado. Al realizar la prueba de hipótesis t para el coeficiente de determinación se demuestra que al aceptar la hipótesis alternativa la correlación es significativa (tabla 20).
2. Como en el análisis de varianza, $F_{\text{calculada}} > F_{\text{crítica}}$, se acepta H_1 . Por lo que la regresión es significativa.
3. Al inspeccionar el gráfico de residuales (figura 21). Se nota que no hay una tendencia en el gráfico (figura 21). Esto se demostró mediante el estadístico de prueba Durbin-Watson (tabla 21). Como $D_{\text{stat}} > 0.05$ no existe una correlación entre los residuos. Lo que indica que el modelo lineal está libre

de error sistemático, ya que lo que no explica el modelo es atribuido al error aleatorio.

Tabla 20. Demostración de correlación significativa.

Coeficiente de correlación múltiple (r)		0.995693
Coeficiente de determinación (r ²)		0.991404
t crítica*	2.160369	(g.l.=15-2)
n	15	
t calculada de la r**		38.72084
Como t _{calculada} > t _{crítica} entonces r correlaciona significativamente.		

*De la tabla de la distribución t de student al 95 % de confianza con 13 grados de libertad (n-2).

$$** t = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \text{ (Miller \& Miller, 2002)}$$

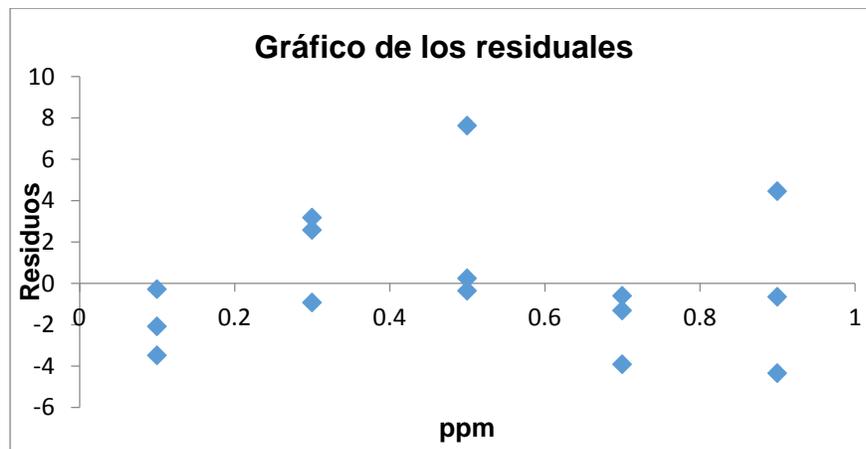


Figura 21. Gráfico de residuales.

Tabla 21. Resultados de la prueba de Durbin-Watson para residuales.

Durbin-Watson Test ¹	
Alpha	0.05
D-stat	1.60406668
D-lower	1.07697
D-upper	1.36054
Significativo	no

¹La prueba se realizó empleando el complemento de Excel® *Real Statistics*.

Para efectos de la validación, el estudio de la linealidad demuestra que $r^2 \geq 0.98$ (criterio de aceptación), intervalo de confianza (IC) de la pendiente no incluye a cero y no hay tendencia en los residuales, por lo que se asegura que los resultados obtenidos usando el modelo matemático $y = 119.7x + 42.923$, son proporcionales a la concentración del analito.

Finalmente, asociado al parámetro de linealidad, se reporta la sensibilidad del método, dada por la pendiente (m), que es de 119.7 ua/ppm.

c) Límite de detección (LD) y de cuantificación (LC).

Para la estimación de los límites de detección y cuantificación se emplearon los datos de la regresión lineal, según lo indica la Guía de validación de métodos analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México A.C., con base en curva de calibración y desviación estándar de la ordenada al origen. En la tabla 22 se muestran los resultados obtenidos, así como los límites requeridos por la FDA para cuantificar NDMA en losartán, para fines de comparación.

Tabla 22. LD y LC del método en comparación con los requeridos con la FDA para losartán.

Calculados del método.		Requeridos por la FDA
LD	0.04895827 ppm	0.10 ppm
$3.3 * \frac{Sb_0}{b_1}$		
LC	0.1483584 ppm	1.0 ppm
$10 * \frac{Sb_0}{b_1}$		
Sb_0 : Error típico de la ordenada	1.7758501 ua	
b_1 : Pendiente	119.7 ua/ppm	

El método desarrollado en la UDT no solo cumple con los límites que requiere la FDA, también se logran LD y LC menores a los reportados para el método de HPLC acoplado a masas que recomienda la misma.

A continuación se presenta un ejemplo del algoritmo de cálculo para obtener los límites de detección y cuantificación de la NDMA respecto a la muestra.

$$\begin{aligned} LC: 0.15 \text{ ppm NDMA} &= 0.15 \frac{\text{ng}}{\text{mL}} \text{ NDMA} = \frac{0.15 \text{ ng NDMA}}{1000 \mu\text{L}} \times \frac{500 \mu\text{L}}{0.15 \text{ g tableta losartán}} \\ &= 0.5 \frac{\text{ng NDMA}}{\text{g tableta}} \end{aligned}$$

- LD: 0.16 ng NDMA / g tableta
- LC: 0.5 ng NDMA / g tableta

d) Veracidad.

Al no contar con un blanco de matriz (placebo), ni material de referencia certificado, se evaluó la veracidad como % de recuperación en muestras fortificadas al nivel central (0.5 ppm) de la curva de calibración. En la tabla 23 se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 23. Evaluación de la veracidad y repetibilidad del método mediante el porcentaje de recuperación de NDMA en la muestra.

Muestra sin fortificar (área)	Muestra fortificada (área)	Promedio áreas de muestras sin fortificar	Diferencia de respuestas (áreas)	Resultado interpolación (ppm)	Concentración adicionada (ppm)	% Recuperación	Sesgo
101.472	205.937	103.4398	102.4973	0.49769632	0.5	99.5392648	0.46
103.577	203.577		100.1373	0.47798037		95.5960735	4.40
105.5	208.446		105.0063	0.51865706		103.731412	-3.73
103.21	204.116		100.6763	0.48248329		96.4966583	3.50
	208.027		104.5873	0.51515664		103.031328	-3.03
	205.226		101.7863	0.49175647		98.3512949	1.65
Promedio (\bar{x})						99.457672	
Desviación estándar (desv. stdr)						3.34503048	
$t_{crítica}^1$						2.57058184	
n						6	
ICI ²						95.9472778	
ICS ³						102.968066	
Repetibilidad del método						%CV	3.36327044

¹De la tabla de la distribución t de student al 95 % de confianza con 5 grados de libertad.

$${}^2 ICI = \frac{\bar{x} - (t_{crítica} * desv. stdr.)}{\sqrt{n}} \quad {}^3 ICS = \frac{\bar{x} + (t_{crítica} * desv. stdr.)}{\sqrt{n}}$$

Para la evaluación de la veracidad, el intervalo de confianza para el porcentaje de recuperación incluye a 100, por tanto el sesgo no es significativo; por lo que la variabilidad observada en el sesgo es debida al error aleatorio, y estadísticamente el promedio del porcentaje de recuperación es 100 %, de tal manera que se tiene la evidencia objetiva de que el método cuantifica de manera veraz.

e) Precisión.

En este trabajo, la precisión se estimó con el % CV para repetibilidad del sistema, repetibilidad del método y precisión intermedia. En la tabla 24 se resumen los resultados.

Tabla 24. Coeficientes de variación de la respuesta (repetibilidad del sistema) y % CV y % de recobro de NDMA (repetibilidad del método y precisión intermedia).

	Repetibilidad del sistema	Repetibilidad del método	Precisión intermedia
% CV	1.47	3.36	2.28

i) Repetibilidad del sistema.

Al inyectar por quintuplicado sólo una preparación del punto intermedio de la curva (0.5 ppm) del DMA·HCl, se calculó el % CV del área obtenida para cada inyección. Al tener % CV menor a 2 %, cumple con el criterio para este parámetro.

ii) Repetibilidad del método.

Con la misma experimentación de la veracidad se evaluó la repetibilidad del método estimando el % CV para porcentaje de recuperación, el valor obtenido es menor al 5 % aceptado, por lo que se cumple con el criterio para este parámetro.

iii) Precisión intermedia.

Al igual que en la veracidad, por la carencia de placebos, se determinó el % recuperación de NDMA en muestras fortificadas que al término de la preparación de la muestra equivale a una concentración de 0.5 ppm, por dos analistas y en dos días distintos.

El valor obtenido para el % CV global del porcentaje de recuperación es menor a 5 por lo que se cumple con los criterios para este parámetro.

Adicionalmente, se realizó un estudio ANOVA de dos vías en Excel® con el fin de demostrar que la variabilidad por los analistas y diferentes días (estudio inter e intra día) no afectan de manera significativa el resultado.

Tabla 25. Estudio de análisis de varianza (ANOVA) en los factores estudiados en la precisión intermedia.

ANOVA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Analista	1.209373	1	1.209373	0.19901686	0.667343	5.317655
Día	5.182919	1	5.182919	0.8529119	0.38274	5.317655
Interacción	3.502304	1	3.502304	0.57634646	0.469524	5.317655
Dentro del grupo	48.61388	8	6.076735			
Total	58.50847	11				

Como se puede observar en la tabla 25, el valor de $F_{\text{calculada}} < F_{\text{crítica}}$ entre analistas y días por lo que se concluye que la variabilidad no es estadísticamente significativa en ninguno de los dos factores y, por lo tanto, es debida al error aleatorio. Respecto a la interacción entre los factores, la $F_{\text{calculada}} < F_{\text{crítica}}$, por lo que los factores son independientes entre sí. Con esto se tiene evidencia objetiva de que el método cuantifica de manera precisa.

En vista de que el método cumple con los criterios de veracidad y precisión, el método presentado en este trabajo cuantifica de manera exacta.

f) Resultados globales de la validación.

Los resultados antes presentados para cada parámetro de la validación se encuentran resumidos en la tabla 26.

Tabla 26. Resumen de los resultados de la validación del método estandarizado.

Desarrollo de un método analítico por HPLC para cuantificar N-nitrosodimetilamina (NDMA)			
<p><i>Guía de validación de métodos analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México A. C. (S/A). La adecuación al uso de los métodos analíticos. Una guía de laboratorio para Validación de Métodos y Temas Relacionados de la EURACHEM. (2016).</i></p>			
<p>Límite de detección (LD) ≤ 0.1 ppm y límite de cuantificación (LC) ≤ 1.0 ppm para losartán, según el método propuesto por la FDA.</p>			
<p>Diciembre, 2021-Julio, 2022. Analista 1 (Principal) Analista 2 (Precisión intermedia)</p>			
Parámetro	Valor obtenido	Criterio de aceptación	Veredicto
Selectividad	Respuesta debida únicamente al analito de interés ($t_R=7.04$ minutos)	Demostrar que podemos distinguir la respuesta	<i>Cumple</i>
Repetibilidad del sistema	% CV = 1.47	% CV ≤ 2 %	<i>Cumple</i>
Linealidad	$y = 119.7x + 42.923$ $r^2 = 0.99$ IC no incluye a cero [0.1 ppm -0.9 ppm]	$r^2 \geq 0.98$ IC de la pendiente no incluya a cero y no observar tendencia en residuales	<i>Cumple</i>
Límite de detección	0.05 ppm (0.16 ng NDMA/g tableta)	0.1 ppm (0.32 ng NDMA/g tableta)	<i>Cumple</i>
Límite de cuantificación	0.15 ppm (0.5 ng NDMA/g tableta)	1.0 ppm (3.2 ng NDMA/g tableta)	<i>Cumple</i>
Veracidad	Recobro=99.465 % IC _{recobro} 96-103 %	IC incluye al 100 %	<i>Cumple</i>
Repetibilidad del método	% CV = 3.36 %	% CV ≤ 5 %	
Precisión intermedia	% CV = 2.28 % y factores no significativos.	% CV ≤ 5 % y factores no significativos.	<i>Cumple</i>
<p><i>El método es adecuado para su propósito</i> (Se verificó con el software OpenLab®, que todas las señales fueran estadísticamente distintas del ruido del equipo, es decir, las señales son 3.3 veces mayor en altura respecto al ruido)</p>			

3.5. Cuantificación de NDMA en losartán comercial.

Es importante destacar que en las tabletas de losartán Punab® de Wermar *pharmaceuticals* analizadas con el método presentado y validado sí fue detectada la impureza de NDMA. Esto se observa en la figura 19, al haber un área de 101.472 ua asociada al tiempo de retención cercano a 7.01 minutos, que es el tiempo de retención para NDMA.

Con este resultado se realizó la cuantificación de la impureza y su incertidumbre asociada, los cálculos se muestran a continuación.

- Cálculo de la cantidad de NDMA por cantidad de tableta en las muestras de losartán comercial interpolando en la curva de calibración de 0.1 ppm a 0.9 ppm.

$$\text{Concentración 1 NDMA (ppm)} = C_{NDMA} = \frac{101.472 \text{ ua} - 42.923 \text{ ua}}{119.7 \frac{\text{ua}}{\text{ppm}}} = 0.489 \text{ ppm}$$

$$0.489 \frac{\text{ng}}{\text{mL}} \text{ NDMA} = \frac{0.489 \text{ ng NDMA}}{1000 \mu\text{L}} = 0.000489 \text{ ng NDMA}/\mu\text{L}$$

$$\text{Concentración 2 NDMA (ppm)} = C_{NDMA} = \frac{103.577 \text{ ua} - 42.923 \text{ ua}}{119.7 \frac{\text{ua}}{\text{ppm}}} = 0.507 \text{ ppm}$$

$$0.507 \frac{\text{ng}}{\text{mL}} \text{ NDMA} = \frac{0.507 \text{ ng NDMA}}{1000 \mu\text{L}} = 0.000507 \text{ ng NDMA}/\mu\text{L}$$

$$\text{Concentración 3 NDMA (ppm)} = C_{NDMA} = \frac{105.50 \text{ ua} - 42.923 \text{ ua}}{119.7 \frac{\text{ua}}{\text{ppm}}} = 0.523 \text{ ppm}$$

$$0.523 \frac{\text{ng}}{\text{mL}} \text{ NDMA} = \frac{0.523 \text{ ng NDMA}}{1000 \mu\text{L}} = 0.000523 \text{ ng NDMA}/\mu\text{L}$$

$$\text{Concentración 4 NDMA (ppm)} = C_{NDMA} = \frac{103.21 \text{ ua} - 42.923 \text{ ua}}{119.7 \frac{\text{ua}}{\text{ppm}}} = 0.504 \text{ ppm}$$

$$0.504 \frac{\text{ng}}{\text{mL}} \text{ NDMA} = \frac{0.504 \text{ ng NDMA}}{1000 \mu\text{L}} = 0.000504 \text{ ng NDMA}/\mu\text{L}$$

Promedio concentración (ppm): 0.506 ppm

- Modelo matemático para el mensurando.

$$\frac{ng \text{ NDMA}}{g \text{ tableta}} = x \frac{\text{Concentración NDMA (ng/}\mu\text{L) Volumen final (}\mu\text{L)}}{\text{masa tableta losartán (g)}}$$

- Sustituyendo para calcular el valor del mensurando para cada muestra.

$$0.000489 \text{ ng NDMA/}\mu\text{L}x \frac{500 \mu\text{L}}{0.15 \text{ g tableta losartán}} = 1.63 \frac{\text{ng NDMA}}{\text{g tableta}}$$

$$0.000507 \text{ ng NDMA/}\mu\text{L}x \frac{500 \mu\text{L}}{0.15 \text{ g tableta losartán}} = 1.69 \frac{\text{ng NDMA}}{\text{g tableta}}$$

$$0.000523 \text{ ng NDMA/}\mu\text{L}x \frac{500 \mu\text{L}}{0.15 \text{ g tableta losartán}} = 1.74 \frac{\text{ng NDMA}}{\text{g tableta}}$$

$$0.000504 \text{ ng NDMA/}\mu\text{L}x \frac{500 \mu\text{L}}{0.15 \text{ g tableta losartán}} = 1.68 \frac{\text{ng NDMA}}{\text{g tableta}}$$

$$\text{Promedio del mensurando: } 1.685 \frac{\text{ng NDMA}}{\text{g tableta}}$$

- Algoritmo del cálculo de la incertidumbre del mesurando.

$$u\left(\frac{\text{ng NDMA}}{\text{g tableta}}\right) = \sqrt{\left(\frac{u C_{\text{NDMA}}}{C_{\text{NDMA}}}\right)^2 + \left(\frac{u V_{\text{NaOH}}}{V_{\text{NaOH}}}\right)^2 + \left(\frac{u V_{\text{NaHCO}_3}}{V_{\text{NaHCO}_3}}\right)^2 + \left(\frac{u V_{\text{Dansylo}}}{V_{\text{Dansylo}}}\right)^2 + \left(\frac{u V_{\text{Agua}}}{V_{\text{Agua}}}\right)^2 + \left(\frac{u m_{\text{tableta}}}{m_{\text{tableta}}}\right)^2}$$

Para calcular la incertidumbre del mensurando, primero hay que determinar la incertidumbre de la concentración de NDMA, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$u_{C_{\text{NDMA}}} = \frac{u(L)}{m} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{p} + \frac{(A_{\text{NDMA}} - \bar{A})^2}{m^2 \sum_{i=1}^n (C_i - C_{\text{promedio}})^2}}$$

Donde:

u(L): Incertidumbre de la respuesta estimada con la curva. Error medio de la ordenada en el ajuste línea = 1.77585 ua

m: Pendiente = 119.7 ua/ppm

n: Número de repeticiones de la muestra = 4

p: Número de datos en la curva de calibración = 15

A: Área de la muestra = 105.50 ua

\bar{A}_{NDMA} : Promedio de las áreas en la curva de calibración = 102.7733 ua

Ci: Concentración del estándar en la curva de calibración

$C_{promedio}$: Promedio de las concentraciones de los estándares en la curva de calibración = 0.5 ppm

Tabla 27. Resultados obtenidos en Excel® para el cálculo de la incertidumbre de la Concentración de NDMA.

Estándar	Concentración (ppm)	$(C_i - C_{promedio})^2$	Area
1	0.1	0.16	52.8
2	0.1	0.16	54.6
3	0.1	0.16	51.4
4	0.3	0.04	77.9
5	0.3	0.04	81.4
6	0.3	0.04	82
7	0.5	0	110.4
8	0.5	0	102.4
9	0.5	0	103
10	0.7	0.04	126.1
11	0.7	0.04	122.8
12	0.7	0.04	125.4
13	0.9	0.16	150
14	0.9	0.16	155.1
15	0.9	0.16	146.3
	Promedio	Suma	Promedio
	0.5	1.2	102.773333

- Sustituyendo en la ecuación de la incertidumbre asociada la concentración de NDMA.

$$u_{C_{NDMA}} = \frac{1.77585 \text{ ua}}{119.7 \text{ ua/ppm}} \sqrt{\frac{1}{15} + \frac{1}{4} + \frac{(105.50 \text{ ua} - 102.7733 \text{ ua})^2}{14 \cdot 328.09 \text{ ua}^2/\text{ppm}^2 \times 1.2 \text{ ppm}^2}}$$

$$u_{C_{NDMA}} = 0.00835 \text{ ppm}$$

- Sustituyendo en la ecuación de la incertidumbre de la regresión con K=2.

$$u\left(\frac{\text{ng NDMA}}{\text{g tableta}}\right) = \sqrt{\left(\frac{0.00835 \text{ ppm}}{0.506 \text{ ppm NDMA}}\right)^2 + \left(\frac{0.12 \mu\text{L}}{50.0 \mu\text{L}_{\text{NaOH}}}\right)^2 + \left(\frac{0.6 \mu\text{L}}{200.0 \mu\text{L}_{\text{NaHCO}_3}\right)^2 + \left(\frac{0.6 \mu\text{L}}{150.0 \mu\text{L}_{\text{Dansylol}}}\right)^2 + \left(\frac{0.15 \mu\text{L}}{100.0 \mu\text{L}_{\text{Agua}}}\right)^2 + \left(\frac{0.0001 \text{ g}}{0.15 \text{ g tableta}}\right)^2}$$

$$= 0.017 \text{ ng} \frac{\text{NDMA}}{\text{g}} \text{ tableta}$$

Nota: Las incertidumbres asociadas a los volúmenes de las alícuotas fueron tomados del certificado de las micropipetas.

Por lo que la cantidad de NDMA contenido en la muestra es:

$$1.63 \pm 0.02 \text{ ng/g tableta } k=2$$

Para conocer si los consumidores de este medicamento están expuestos a dosis significativas, se debe tomar en cuenta la pauta farmacológica a la que están sometidos los pacientes para saber si deben considerarse en riesgo.

El losartán tiene una pauta farmacológica general de entre 50 mg a 100 mg diarios (IBM Micromedex, 2022), en casi todas las patologías que se tratan con él, siendo la más usual hipertensión arterial.

Las tabletas que se analizaron son de 50 mg de losartán, por lo que los cálculos para conocer la cantidad de NDMA consumida por día se harán partiendo de la premisa de que se consumen dos tabletas diarias, la más alta dosis de losartán. Los cálculos se muestran a continuación.

$$2 \text{ tabletas} \times \frac{0.15 \text{ g tableta}}{1 \text{ tableta}} \times \frac{1.63 \text{ ng de NDMA}}{\text{g tableta}} = 0.49 \text{ ng de NDMA al día}$$

En la tabla 1 de este trabajo, se presentó el consumo aceptable de nitrosaminas, en donde se observa que la cantidad máxima aceptable de NDMA es de 96 ng al día. Por lo que al compararla con el resultado del análisis de la muestra, el losartán comercial analizado cumple con los requerimientos de la FDA para esta impureza y la cantidad que contiene es inocua para la salud.

Capítulo IV. CONCLUSIONES.

- I. Se desarrolló un método analítico, empleando Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia con detector de fluorescencia, alternativo al propuesto por la FDA para cuantificar N-nitrosodimetilamina (NDMA) en tabletas de losartán.
- II. La preparación de muestra, la derivatización y el análisis por HPLC con detector de fluorescencia forman parte de una metodología asequible y que puede implementarse en cualquier laboratorio del país.
- III. Las reacciones de desnitrosación y dansylación, propias de la derivatización pre-columna son cuantitativas.
- IV. Con el método analítico propuesto (HPLC-fluorescencia) se obtuvieron límites de detección y cuantificación inferiores a los reportados con el método, empleando HPLC-MS, propuesto por la FDA.
- V. El método analítico cumplió exitosamente con todos los parámetros de la validación, por lo que el método es adecuado para su propósito.
- VI. El medicamento, que conteniendo losartán como principio farmacéuticamente activo, presenta la impureza de NDMA en una cantidad menor al límite permitido por la FDA, por lo que es apto para el consumo.
- VII. La Unidad de Desarrollo Tecnológico del Instituto de Química podrá ofertar este método de análisis dentro de su catálogo de servicios.

Capítulo V. REFERENCIAS.

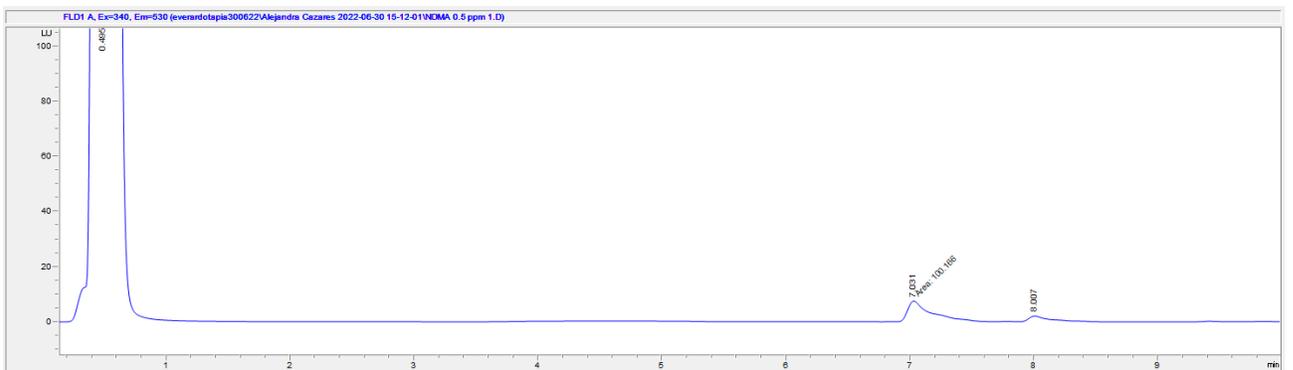
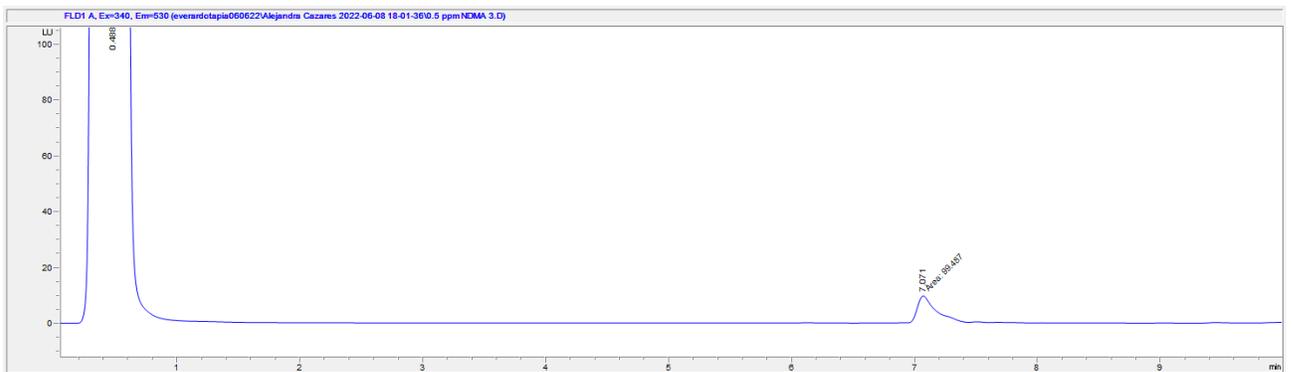
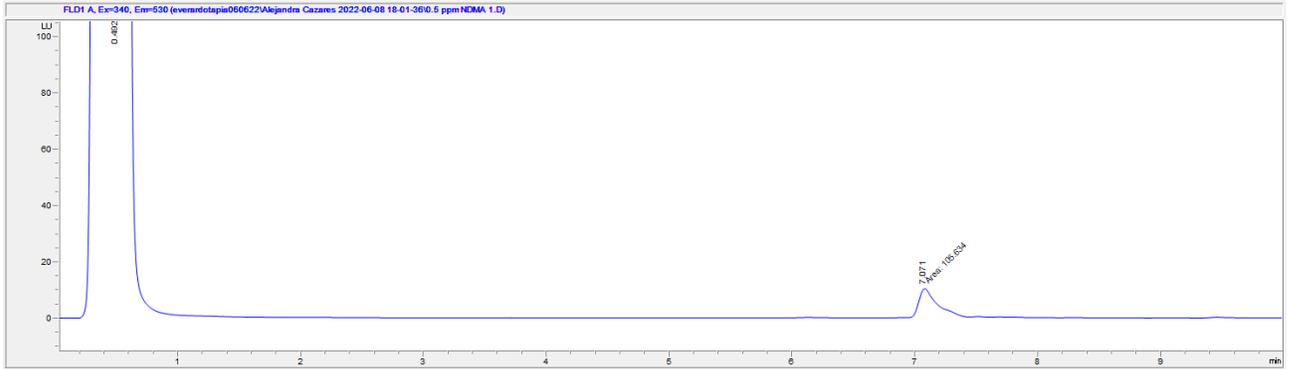
- Barth, H. G. (2018). Chromatography Fundamentals, Part I: Thermodynamics of Liquid Chromatography: The Distribution Coefficient. LCGC North America, 36(3), 200-202.
- Castaños, E. (2015, agosto 10). Instrumentación en HPLC. Cienciadelux. Retrieved from <https://cienciadelux.com/2015/08/10/instrumentacion-en-hplc/>
- Cha W., P. (2006). High-performance liquid chromatography with fluorescence detection for aqueous analysis of nanogram level N-nitrosodimethylamine. Analytica Chimica Acta, 566, 109-116.
- Christian, G. D. (2009). Química Analítica (6^o ed.). México: McGrawHill.
- Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México A. C. (S/A). Guía de validación de métodos analíticos.
- D.A. Skoog, D. W. (2015). Fundamentos de química analítica. México: Cengage learning.
- Dong, M. W. (2019). HPLC and UHPLC for practicing scientists (2nd edition ed.). New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- EMA. (2008). Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico.
- EURACHEM. (2016). La adecuación al uso de los métodos analíticos. Una guía de laboratorio para Validación de Métodos y Temas Relacionados.
- Fiddler, W. J. (1972). Formation of N-nitrosodimethylamine from naturally occurring quaternary ammonium compounds and tertiary amines. Nature(236), 307.
- Food & Drug Administration. (2019). Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS) Method for the Determination of NDMA in Ranitidine Drug Substance and Drug Product. U.S. Food & Drug Administration.
- Food and Drug Administration. (2009). Q10 Pharmaceutical Quality System. Guidance for industry.

- Food and drug administration. (2019). Liquid Chromatography-High resolution Spectrometry (LC-HRMS) Method for determination of NDMA in ranitidine drug substance and drug product. U.S. Food & Drug administration .
- Food and drug administration. (2019). Liquid Chromatography-Tandem mass Spectrometry (LC-MS/MS) Method for determination of NDMA in ranitidine drug substance and drug product. U.S. Food & Drug Administration.
- Food and Drug Administration. (2019). Statement alerting patients and health care professionals of NDMA found in samples of ranitidine. Retrieved from <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/statement-alerting-patients-and-health-care-professionals-ndma-found-samples-ranitidine>
- Food and Drug Administration. (2021, 11 18). Retrieved from Information about Nitrosamine Impurities in Medications: <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/information-about-nitrosamine-impurities-medications>
- Food and Drug Administration. (2021). Control of Nitrosamine Impurities in Human Drugs. Guidance for Industry. Center for Drug Evaluation and Research (CDER).
- Food and Drug Administration. (2021). Information about Nitrosamine Impurities in Medications. Retrieved from <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/information-about-nitrosamine-impurities-medications>
- Food and Drug Administration. (2019). Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS) Method for the. FDA Updates and Press Announcements on Angiotensin II Receptor Blocker (ARB) Recalls (Valsartan, Losartan, and Irbesartan).
- International Agency for Research on Cancer. (1978). IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans - Some N-Nitroso Compounds. Lyon.
- ISO/IEC 17025. (2005). General requirements for the competence of testing and calibration.
- IUPAC. (1997). Nomenclature for Chromatography. IUPAC recommendations. Pure & Applied Chemistry, 65(4), 819-872. Retrieved from <http://publications.iupac.org/pac/1993/pdf/6504x0819.pdf>

- Krull, I., & Strong, R. (2000). Chromatography: Liquid. Derivatización. (I. D.Wilson, Ed.) Encyclopedia of Separation Science. Academic Press., 583-591. doi:<https://doi.org/10.1016/B0-12-226770-2/00351-3>.
- Locatelli, M., Melucci, D., Carlucci, G., & Locatelli, C. (2012). Recent HPLC strategies to improve sensitivity and selectivity for the analysis of complex matrices. Instrumentation science and Technology. doi:DOI: 10.1080/10739149.2011.651668
- Mitch, W., Sharp, J., Trussel, R., Valentine, R., Alváres-Cohen, L., & Sedlak, D. (2003). N-nitrosodimethylamine (NDMA) as a drinking water contaminant: a review. Environmental Engineering Science, 20, 398-404.
- Organización Mundial de la Salud. (2019). Actualización sobre las impurezas de nitrosaminas. Nota informativa de la OMS. Retrieved from https://www.who.int/medicines/publications/drugalerts/Information_Nitr osamine-impurities_Nov2019_ESP.PDF
- Parra-Solis, P. (2021). Tesina. Análisis comparativo de dos guías de validación: la adecuación al uso de los métodos analíticos (guía EURACHEM) vs guía de validación de métodos analíticos (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C.). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Tapia-Mendoza, E. (2021). Cromatografía de líquidos de alta eficiencia. Intituto de Química.
- Williams, D. (2004). Nitrosation Reactions and the Chemistry of Nitric Oxide. In D. Williams, Nitrosation Reactions and the Chemistry of Nitric Oxide (pp. 57-74). Amsterdam: Elsevier. Retrieved from <https://search-ebscobost-com.pbidi.unam.mx:2443/login.aspx?direct=true&db=cat02025a&AN=lib.MX001001032289&lang=es&site=eds-live>.
- World Health Organization. (2008). N-Nitrosodimethylamine. Guidelines for Drinking-Water Quality. Retrieved from https://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/ndmasummary_2ndadd.pdf
- World Health Organization. (2017). Guidelines for Drinking-water Quality.

ANEXOS.

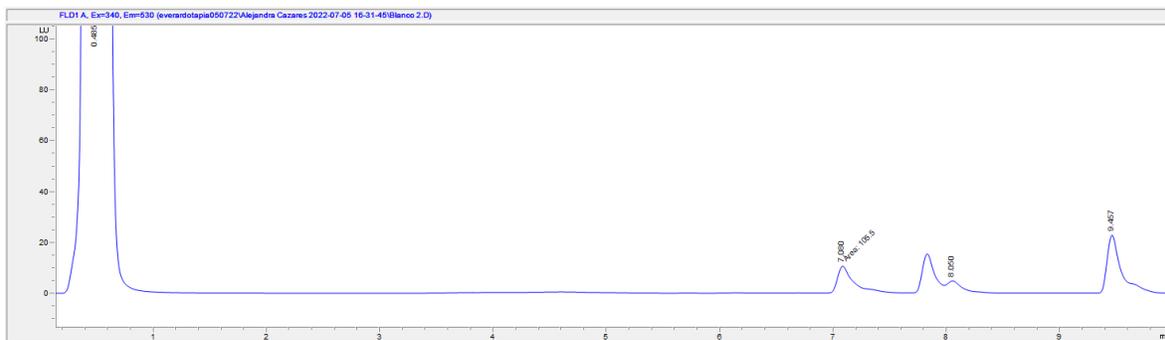
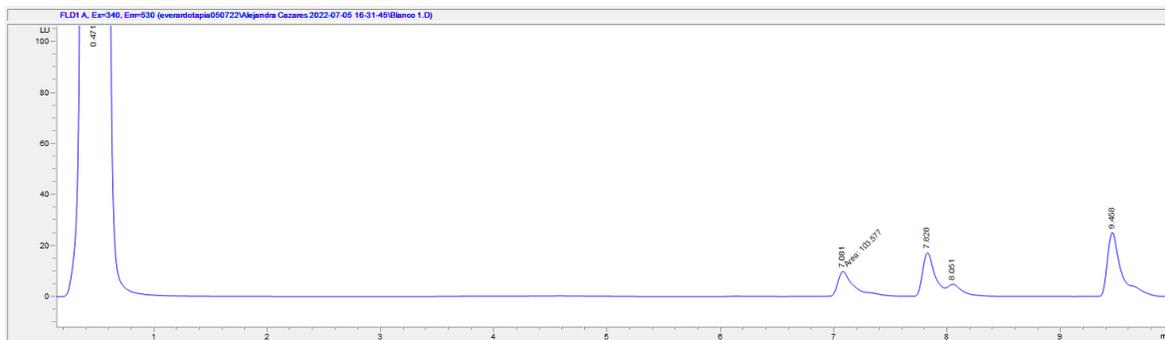
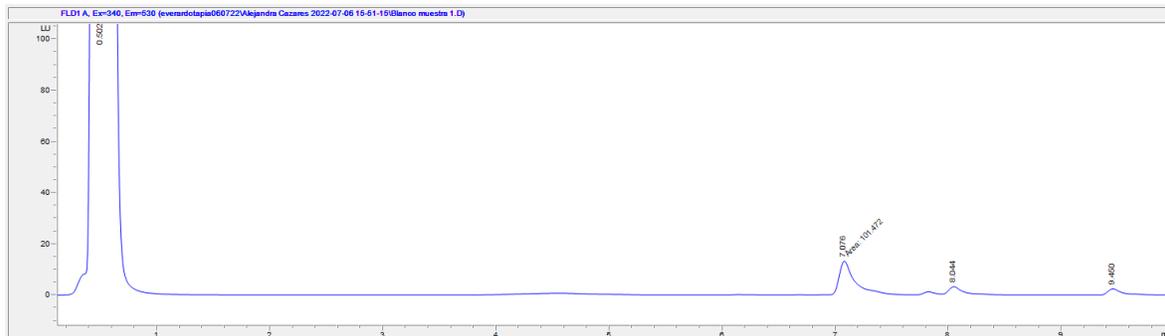
Anexo I. Cromatogramas obtenidos del proceso de desnitrosación de material de referencia de NDMA para el rendimiento de la desnitrosación.



Anexo II. Cromatogramas complementarios asociados a la validación del método analítico.

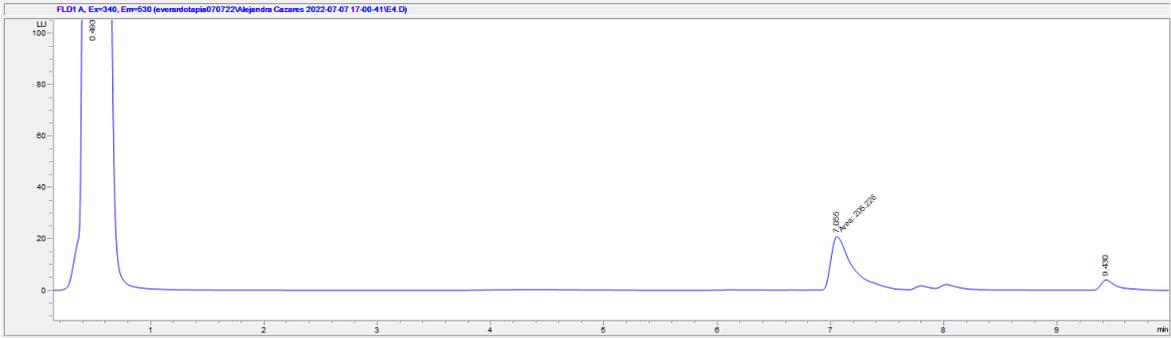
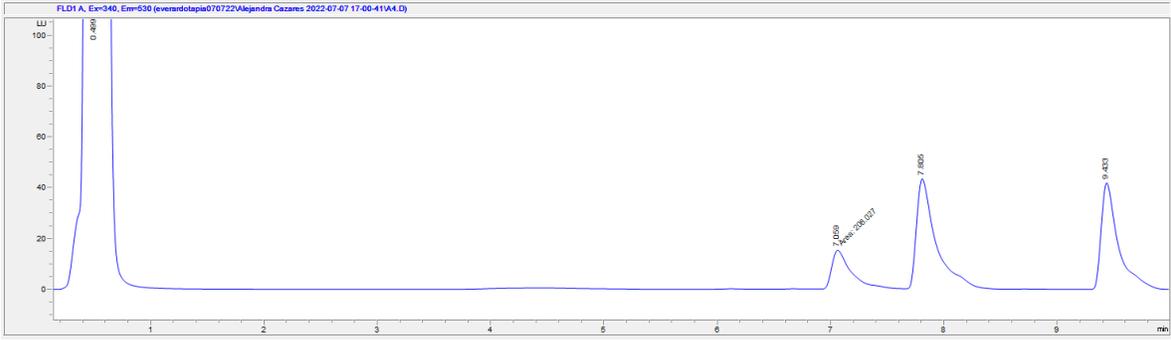
Veracidad y repetibilidad del método.

Muestra.



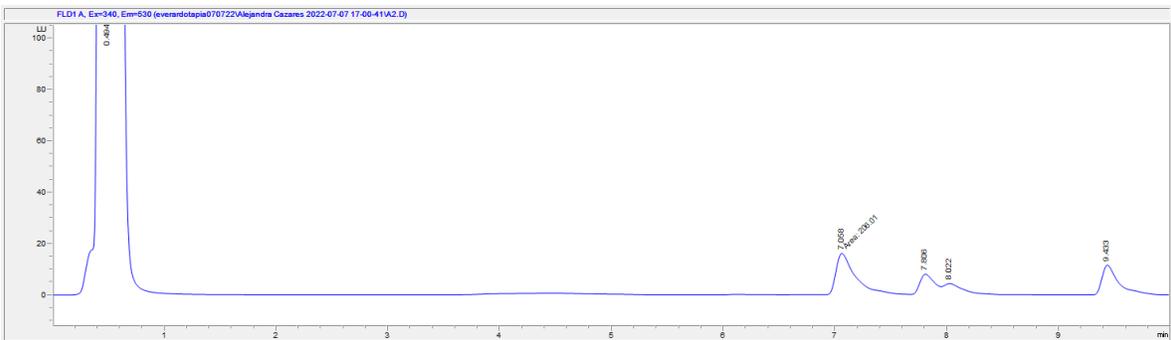
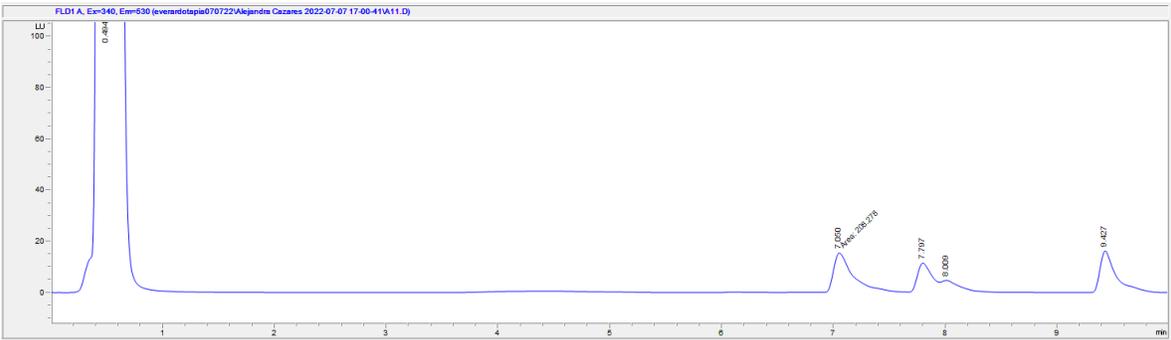
Muestras fortificadas con 5.0 µL de una disolución de concentración 0.05 mg/mL NDMA material de referencia para una concentración final de 0.5 ppm.

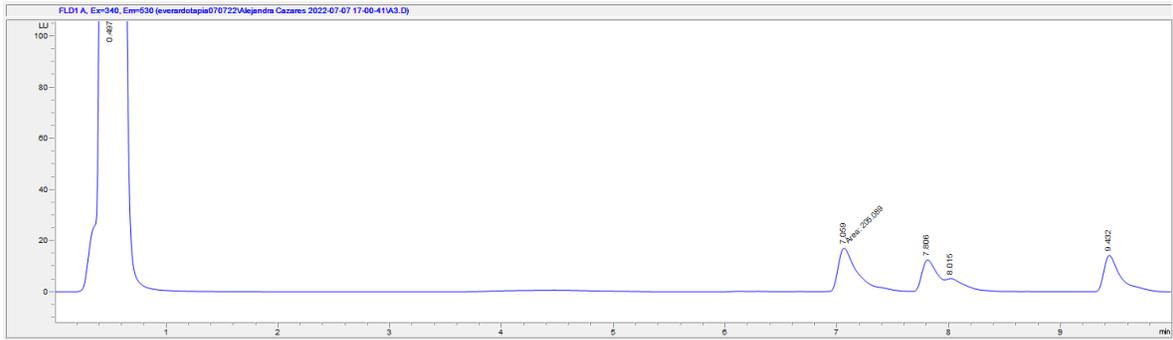




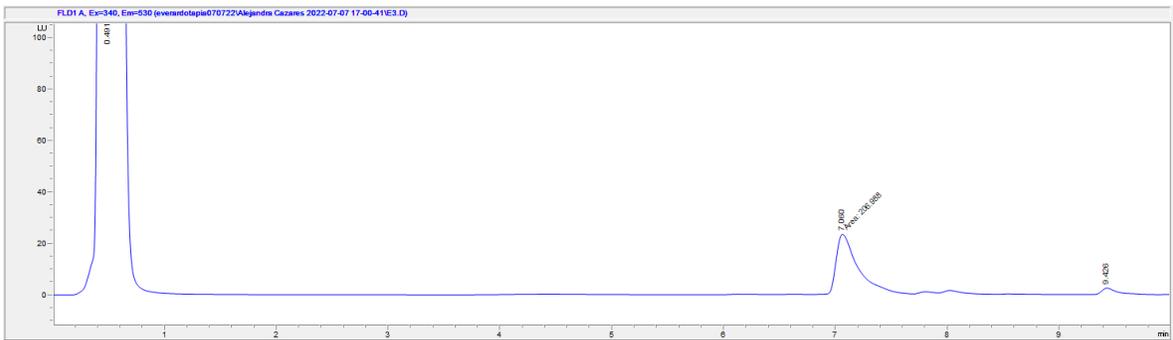
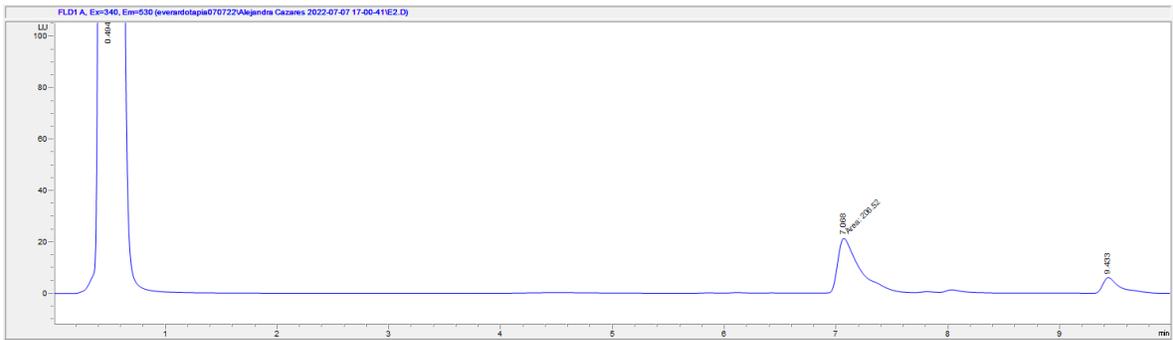
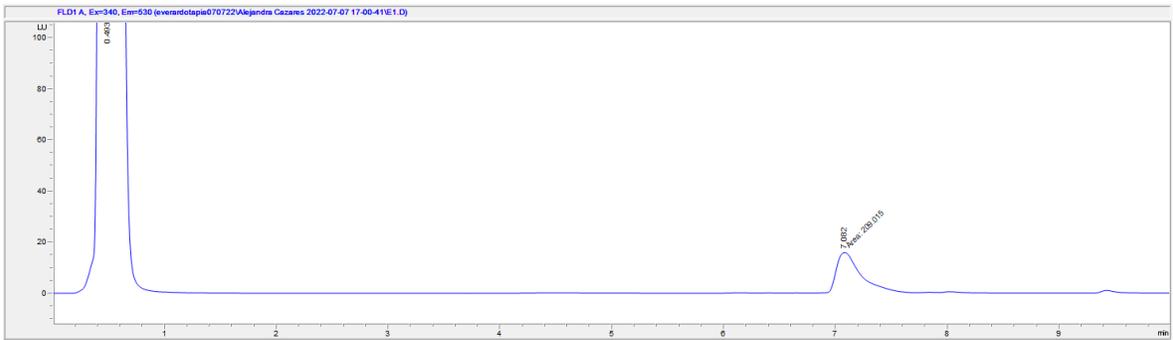
Precisión intermedia.

Analista 1, día 1.

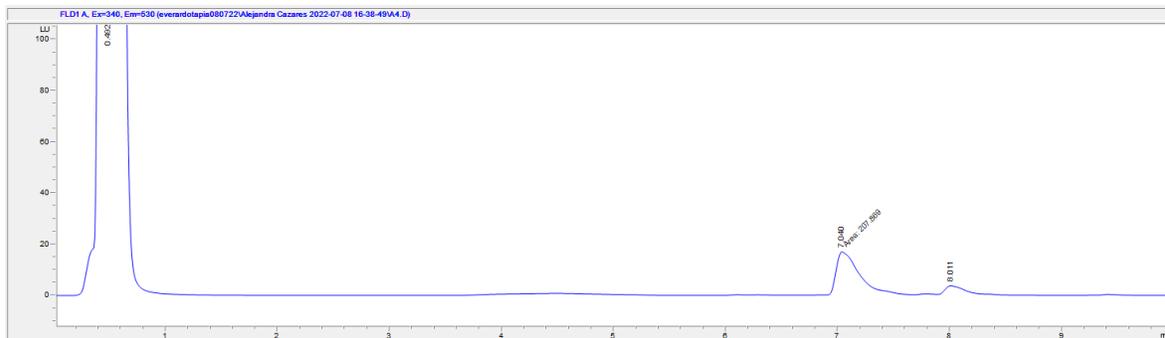
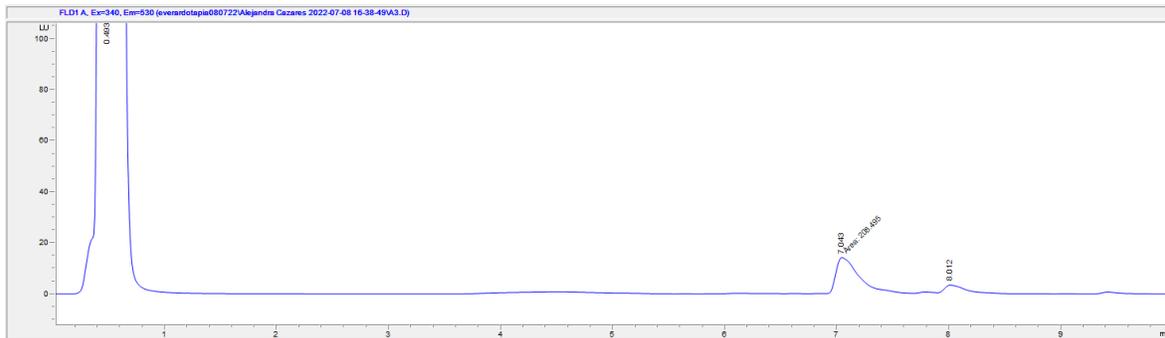
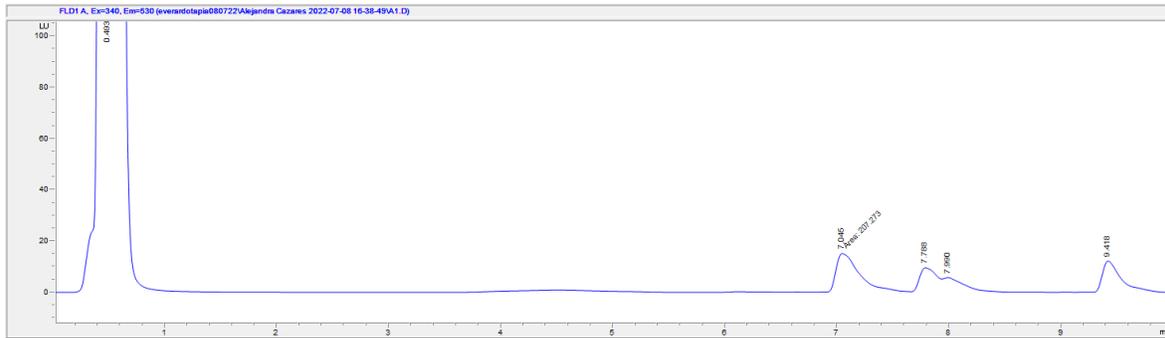




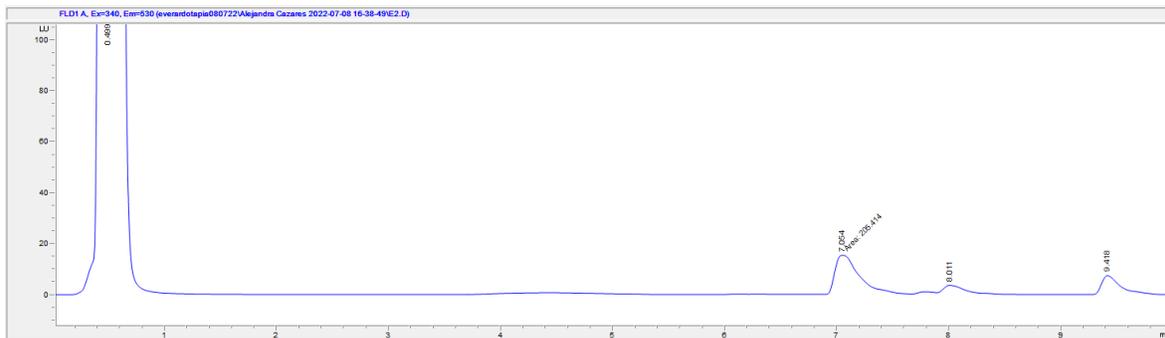
Analista 2, día 1.

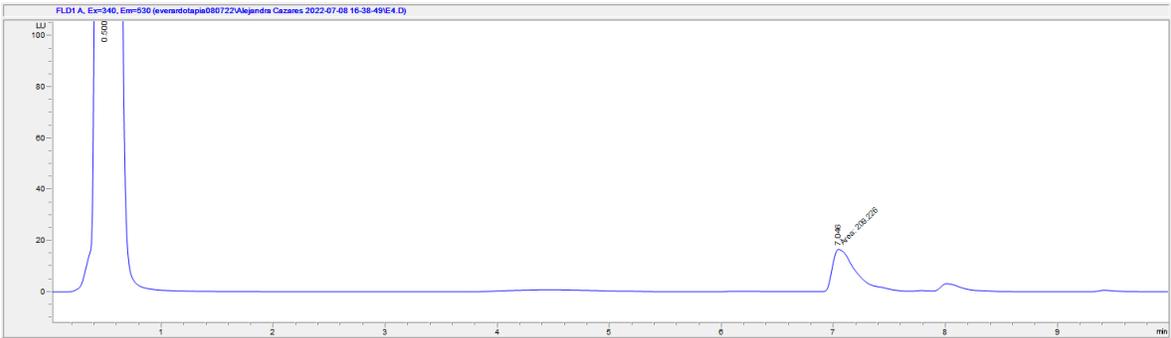
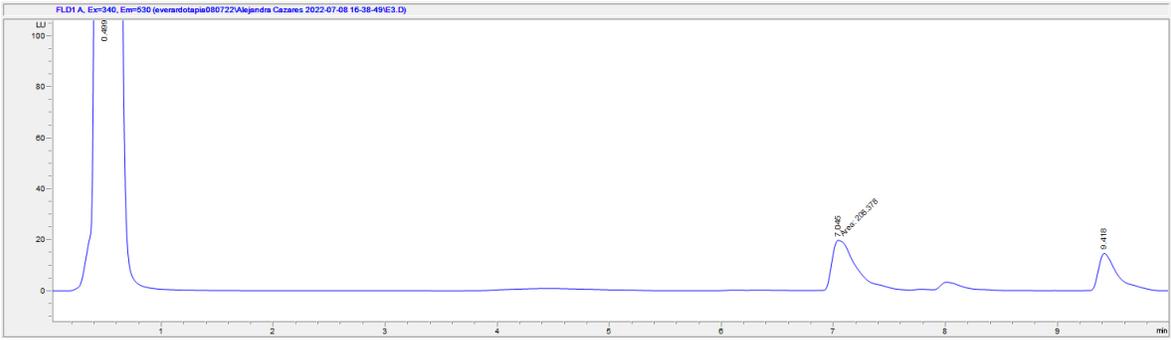


Analista 1, día 2.



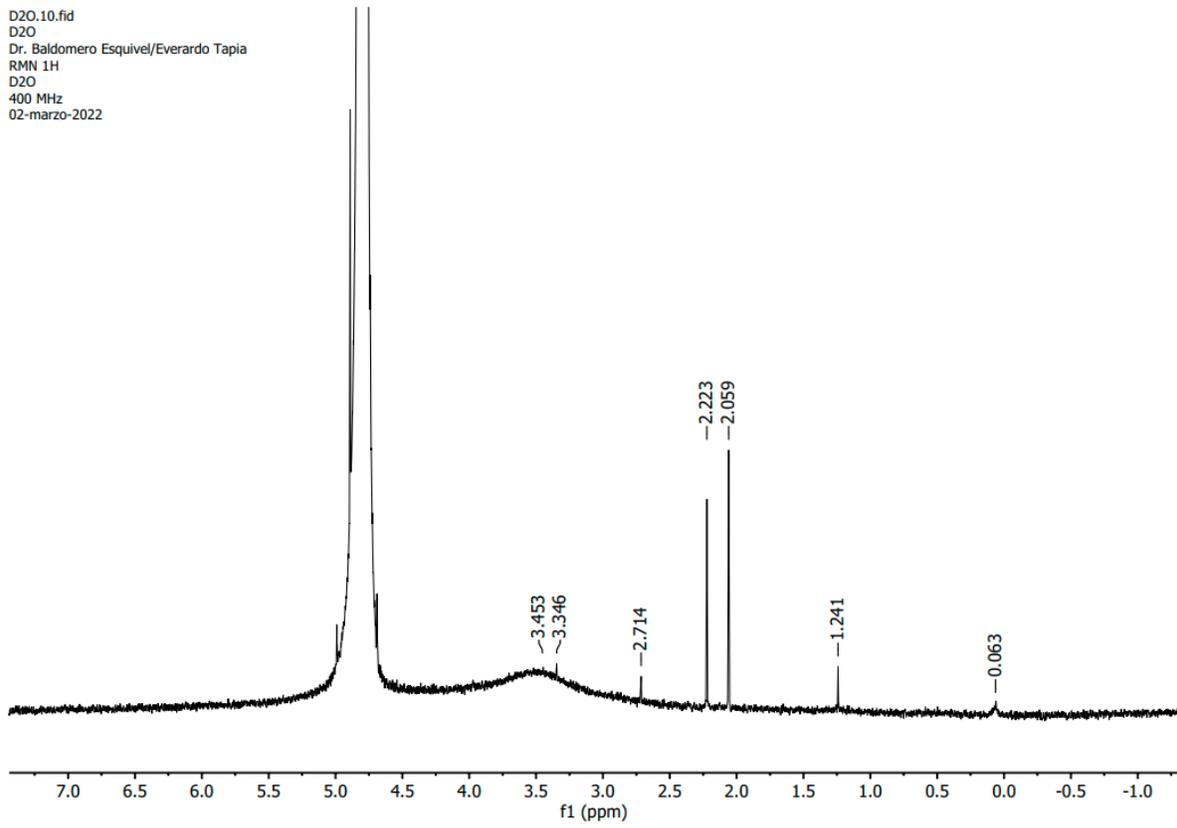
Analista 2, día 2.





Anexo III. Espectros de RMN-¹H.

D2O.10.fid
D2O
Dr. Baldomero Esquivel/Everardo Tapia
RMN 1H
D2O
400 MHz
02-marzo-2022



DMA-HCl.10.fid
DMA-HCl
Dr. Baldomero Esquivel/Everardo Tapia
RMN 1H
D2O
400 MHz
02-marzo-2022

