



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA



**EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE
NITROSAMINAS EN MEDICAMENTOS PARA EL
TRATAMIENTO DE LA HIPERTENSIÓN DE
LIBRE VENTA EN MÉXICO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN FARMACIA

PRESENTA:

ZAYRA FLORES GARCIA

DIRECTOR DE TESIS

DR. JULIO CÉSAR RIVERA LEYVA

CUERNAVACA, MORELOS

JUNIO 2024

JURADO REVISOR



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

Dirección / Secretaría de Investigación

Jefatura de Posgrado

Cuernavaca, Morelos a 22 de noviembre de 2023
Folio: FF/M/SI/CIP/MF/024/2023

Q.F.B. ZAYRA FLORES GARCÍA
ALUMNA DE MAESTRÍA EN FARMACIA
PRESENTE

Por este medio le informo que el Consejo Interno de Posgrado (CIP), en su Sesión Ordinaria del 22 de noviembre del 2023, designó a los siguientes sinodales como integrantes de la Comisión Revisora de tesis y jurado para la tesis titulada **“Evaluación de los niveles de nitrosaminas en medicamentos para el tratamiento de la hipertensión de libre venta en México”**.

Sinodal		Adscripción
Presidente	Dr. Sergio Alcalá Alcalá ^{NA}	Facultad de Farmacia-UAEM
Secretario	Dra. Adriana Valladares Méndez ^{NA}	Facultad de Farmacia-UAEM
Vocal 1	M. en B. Laura Angélica Rosas Calderón	Laboratorios Lambda Científica, S.A
Suplente 1	Dr. Alberto Marbán González	Centro de Investigaciones Químicas, UAEM
Suplente 2	Dr. Julio César Rivera Leyva ^{NA}	Facultad de Farmacia-UAEM

NA = Núcleo Académico de Posgrado en Farmacia

Se le solicita entregar el manuscrito de tesis para revisión a esta comisión y dar fluidez a los trámites como se indica en el manual de procedimientos.

Nota (Art. 74 RGEP-UAEM): Los sinodales tendrán un plazo máximo de 20 días hábiles contados a partir de la recepción del documento de tesis para entregar los comentarios de la revisión y para emitir un voto aprobatorio o negatorio. En caso de condicionar el voto a la entrega de un documento en el que el tesista deberá solventar lo revisado, este contará con un plazo no mayor a 20 días hábiles, contados a partir de la notificación del primer dictamen emitido, para integrar las correcciones señaladas, una vez fenecido dicho plazo el sinodal emitirá el voto aprobatorio o negatorio que corresponda.

Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente
“Por una humanidad culta
una Universidad de Excelencia”

e-firma UAEM

Dr. Sergio Alcalá Alcalá
Jefe de Posgrado
Facultad de Farmacia

ccp: archivo.

Dr. Sergio Alcalá Alcalá; Dra. Adriana Valladares Méndez; M. en B. Laura Angelica Rosas Calderón; Dr. Alberto Marbán González; Dr. Alberto Marbán González; Dr. Julio César Rivera Leyva.



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023

Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México. C.P. 62209, Edificio 61, ala C, 2° piso.
Tel. (777) 329 7000. Ext. 7986 Jefatura de Posgrado en Farmacia posgrado@uaem.mx

JURADO REVISOR



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

SERGIO ALCALA ALCALA | Fecha:2024-06-17 12:50:36 | FIRMANTE
eY2NqQUkeNYu8vQ1C8qC84jN51e9x9xrSeMA73qmFL9xYA4iShYISdeJLrSxpI5F8b01KrchOMNNZnMRwRBAGFFmSnjEK0YKmHcnfWGT10yu38zsOu/a8VOJbk1DH1o40Q1WrmS6BJRxlBSYsb3CwaiY10I0Mv9kb2JrU5qXikqKpzBIDSbkLzbXMOJx5ZORDpnCkWjyR7dNpFTaozaXZsIQTWo57JiRr3XIA9S1TIBkfuGe0B0ThO25nyZ6OoLKLpZ5RUWYDdJWYVPrfuhJqQCFBw5E+1ak42ZbPWauW7ivg8vFqewj2AIMZYQYsCUCDIDGsnpsETcvW5W18w==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



zKND8XIEb

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/ZQVIBXnfvSd0M0r6HG9hPZIF10kAb4qj>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos por haberme brindado conocimientos valiosos durante mi formación profesional.

A Lambda Científica, por apoyarme durante todo este proceso, por brindarme la oportunidad de implementar el proyecto de nitrosaminas en sus instalaciones y por confiar en mi cada día en el trabajo realizado.

A el Doctor Julio César Rivera Leyva, quién ha sido mi asesor y director de este trabajo. Agradezco por todo su conocimiento compartido y por ser mi guía durante toda esta etapa.

Al MAI. Mauricio Ibarnea Elizalde, quién siempre confió en mi y en mi trabajo, para que en conjunto se pudiera lograr un proyecto de gran importancia en la industria farmacéutica.

A mi jurado el Dr. Sergio Alcalá Alcalá, la Dra. Adriana Valladares Méndez, a la M. en B. Laura Rosas Calderón, al Dr. Alberto Marbán González y al Dr. Julio César Rivera Leyva, quienes dieron su tiempo y su conocimiento durante la revisión de este trabajo.

A CONACyT por el proyecto con CVU: 1188918.

DEDICATORIAS

A Dios, por darme fortaleza y sabiduría para seguir adelante.

A mi madre Nely García, quién ha dado todo para asegurar que siga adelante, quién ha sacrificado muchas cosas con tal de que yo cumpla mis sueños. Por sus consejos, sus regaños, por escucharme y por enseñarme que siempre se puede ser mejor. Gracias por ser mi motor, mi inspiración y mi heroína en la vida.

A Julia Virique, quién ha sido mi soporte en momentos difíciles y mi alegría en momentos agradables, quién siempre ha confiado en mi y me ha motivado a que siga creciendo tanto personal como profesionalmente.

A mis amigos Marianita, Frann y Frida, quiénes han estado conmigo durante todo este proceso de maestría, con quiénes nos escuchamos y apoyamos cada día de esta etapa, y porque sé que este fue el inicio de una bella amistad.

ÍNDICE GENERAL

1. ÍNDICE DE FIGURAS.	9
2. ÍNDICE DE TABLAS.	10
3. ABREVIATURAS.	12
4. RESUMEN.	13
5. INTRODUCCIÓN.	15
5.1. Presión arterial.	16
5.2. Hipertensión Arterial (HTA).	16
5.3. Nitrosaminas en medicamentos para la hipertensión arterial.	17
5.4. Nitrosaminas.	17
5.4.1. Regulación del Contenido de Nitrosaminas.	19
5.4.2. Cuantificación de nitrosaminas.	20
5.5. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).	21
5.6. Cromatografía de líquidos de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS/MS).	22
5.7. Validación de métodos analíticos.	25
5.7.1. Guías para la validación de métodos analíticos.	25
5.8. Parámetros de desempeño en la validación del método analítico.	26
5.8.1. Precisión del sistema.	26
5.8.3. Límite de detección.	27
5.8.4. Límite de cuantificación.	28
5.8.5. Linealidad del método de cuantificación.	28
5.8.6. Exactitud.	29
5.8.7. Repetibilidad.	29
5.8.8. Precisión Intermedia.	30
5.8.9. Robustez.	30
5.8.10. Tolerancia.	31
5.8.11. Especificidad / Selectividad.	31
5.8.12. Estabilidad.	32
6. JUSTIFICACIÓN	33
7. HIPÓTESIS.	34
8. OBJETIVOS	35
8.1. <i>Objetivo General.</i>	35
8.2. <i>Objetivos Particulares.</i>	35
9. DESARROLLO EXPERIMENTAL.	36

9.1. Equipos, instrumentos, materiales en general, reactivos y sustancias de referencia.	36
9.1.1. Materiales en general.	36
9.1.2. Reactivos.	37
9.1.3. Sustancias de referencia.	37
9.2. Desarrollo del método analítico.	37
9.2.1. Detección. Parámetros de detección por espectrometría de masas.	37
9.2.2. Preparación del estándar.	38
9.2.3. Extracción. Preparación de la muestra.	39
9.2.4. Cromatografía. Método analítico mediante UPLC acoplado a espectrometría de masas de triple cuadrupolo.	40
9.2.5. Linealidad del método.	42
9.2.6. Especificidad	43
10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	58
10.1. Desarrollo del método analítico.	58
10.1.1. Parámetros de detección por espectrometría de masas.	58
10.1.2. Preparación de la muestra.	59
10.1.3. Método analítico mediante UPLC acoplado a espectrometría de masas de triple cuadrupolo.	59
10.1.4. Linealidad del sistema	59
10.1.5. Especificidad	63
10.2. Validación del método analítico.	64
10.2.1. Adecuabilidad del sistema.	64
10.2.2. Precisión del sistema.	65
10.2.3. Intervalo Lineal.	66
10.2.4. Intervalo de trabajo (Linealidad del sistema).	71
10.2.5. Especificidad.	76
10.2.6. Exactitud (Recuperación).	84
10.2.7. Linealidad del Método.	85
10.2.8. Límite de detección y límite de cuantificación.	89

10.2.9.	<i>Precisión y exactitud del límite de cuantificación.</i>	91
10.2.10.	<i>Repetibilidad.</i>	92
10.2.11.	<i>Precisión Intermedia.</i>	92
10.2.12.	<i>Sesgo.</i>	95
10.2.13.	<i>Robustez.</i>	96
10.2.14.	<i>Estabilidad del estándar.</i>	97
10.2.15.	<i>Estabilidad de la muestra.</i>	99
10.2.16.	<i>Incertidumbre.</i>	100
10.3.	<i>Cuantificación de Nitrosaminas en productos terminados.</i>	100
11.	<i>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.</i>	102
12.	<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	103
13.	<i>ANEXOS.</i>	106
13.1.	<i>Anexo A. MGA 0612. Determinación de Nitrosaminas en Fármacos y Preparados Farmacéuticos.</i>	106
13.2.	<i>Anexo B. Constancia de Seminario del Posgrado de Farmacia.</i>	111
13.3.	<i>Anexo C. Votos aprobatorios.</i>	113

1. ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Formación de NDMA a partir de N,N-dimetilformamida.....	17
Figura 2. Componentes de un cromatógrafo de líquidos.....	21
Figura 3. Componentes de un espectrometro de masas.....	23
Figura 4. Ionización de espectrometría de masas de triple cuadrupolo.....	24
Figura 5. Esquema general de preparación de estándar.....	39
Figura 6. Esquema general de preparación de la muestra.....	40
Figura 7. Cromatograma tipo de losartán potásico a 50 ng/mL.....	41
Figura 8. Cromatograma tipo de NDMA a 25 ng/mL.....	58
Figura 9. Cromatograma tipo de NDEA a 25 ng/mL.....	58
Figura 10. Linealidad en matriz de NDMA en el desarrollo del método analítico.....	59
Figura 11. Linealidad en matriz de NDEA en el desarrollo del método analítico.....	60
Figura 12. Cromatogramas y espectro de NDMA a 25 ng/mL en materia prima de losartán potásico.....	60
Figura 13. Cromatogramas y espectro de NDEA a 25 ng/mL en materia prima de losartán potásico.....	61
Figura 14. Cromatogramas de blanco en matriz para NDMA.....	63
Figura 15. Cromatogramas de blanco en matriz para NDEA.....	63
Figura 16. Intervalo lineal NDMA (0.8 - 50 ng/mL).....	68
Figura 17. Intervalo lineal NDEA (0.8 - 50 ng/mL).....	71
Figura 18. Intervalo de trabajo NDMA (1 - 25 ng/mL).....	74
Figura 17. Intervalo de trabajo NDEA (1 - 25 ng/mL).....	76
Figura 20. Especificidad. Blanco de reactivos - NDMA.....	77
Figura 21. Especificidad. Blanco de reactivos - NDEA.....	78
Figura 22. Especificidad. Metanol - NDMA.....	78
Figura 23. Especificidad. Metanol - NDEA.....	79
Figura 24. Especificidad. Fase móvil A (ácido fórmico 0.1 % en agua) - NDMA.....	79
Figura 25. Especificidad. Fase móvil A (ácido fórmico 0.1 % en agua) - NDEA.....	80
Figura 26. Especificidad. Fase móvil B (ácido fórmico 0.1 % en metanol) - NDMA.....	80
Figura 27. Especificidad. Fase móvil A (ácido fórmico 0.1 % en metanol) - NDEA.....	81
Figura 28. Especificidad. Solución estándar 2 ng/mL - NDMA.....	81
Figura 29. Especificidad. Solución estándar 2 ng/mL - NDEA.....	82
Figura 30. Especificidad. Materia prima de losartán potásico - NDMA.....	82
Figura 31. Especificidad. Materia prima de losartán potásico - NDEA.....	83
Figura 32. Especificidad. Materia prima de losartán potásico adicionada con nitrosaminas a 2 ng/mL - NDMA.....	83
Figura 33. Especificidad. Materia prima de losartán potásico adicionada con nitrosaminas a 2 ng/mL - NDEA.....	84
Figura 34. Linealidad del método - NDMA (1 - 25 ng/mL).....	87
Figura 35. Linealidad del método - NDEA (1 - 25 ng/mL).....	89

2. ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Ingesta aceptable de cada nitrosamina	19
Tabla 2. Equipos e Instrumentos.	36
Tabla 3. Reactivos.	37
Tabla 4. Materiales de Referencia.	37
Tabla 5. Intervalo de confianza de la NDMA.	62
Tabla 6. Intervalo de confianza de la NDEA.	62
Tabla 7. Resultados de adecuabilidad NDMA.	64
Tabla 8. Resultados de adecuabilidad NDEA.	64
Tabla 9. Resultados de precisión del sistema NDMA	65
Tabla 10. Resultados de precisión del sistema NDEA	65
Tabla 11. Intervalo lineal – NDMA.	66
Tabla 12. Modelo lineal $Y=a+b*X$ NDMA.	67
Tabla 13. Análisis de Varianza – NDMA.	67
Tabla 14. Intervalos de confianza del 95.0% para los estimados de los coeficientes – NDMA.	68
Tabla 15. Intervalo lineal – NDEA.	69
Tabla 16. Modelo Lineal $Y = a + b*X$ – NDEA.	70
Tabla 17. Análisis de Varianza – NDEA .	70
Tabla 18. Intervalos de confianza del 95.0% para los estimados de los coeficientes – NDEA.	71
Tabla 19. Intervalo de trabajo NDMA.	71
Tabla 20. Modelo Lineal: $Y = a + b*X$ – NDMA.	72
Tabla 21. Análisis de Varianza – NDMA.	73
Tabla 22. Intervalos de confianza del 95.0% para los estimados de los coeficientes.	73
Tabla 23. Intervalo de trabajo NDEA.	74
Tabla 24. Modelo Lineal: $Y = a + b*X$ – NDEA.	75
Tabla 25. Análisis de Varianza – NDEA.	75
Tabla 26. Intervalos de confianza del 95.0% para los estimados de los coeficientes – NDEA.	76
Tabla 27. Exactitud (Recuperación).	84
Tabla 28. Linealidad del método NDMA.	85
Tabla 29. Modelo Lineal: $Y = a + b*X$ NDMA.	86
Tabla 30. Análisis de Varianza.	86
Tabla 31. Linealidad del método NDEA.	87
Tabla 32. Modelo Lineal: $Y = a + b*X$ NDEA.	88
Tabla 33. Análisis de Varianza NDEA.	88
Tabla 34. Límite de detección NDMA.	90
Tabla 35. Límite de detección NDEA.	90
Tabla 36. precisión y exactitud del límite de cuantificación NDMA y NDEA.	91
Tabla 37. Repetibilidad NDMA y NDEA.	92
Tabla 38. Reproducibilidad NDMA.	93
Tabla 39. Resumen estadístico Precisión NDMA global.	93

Tabla 40. Reproducibilidad NDEA global.	94
Tabla 41. Resumen estadístico Precisión NDEA global.	95
Tabla 42. Sesgo para NDMA.	95
Tabla 43. Sesgo para NDEA.	96
Tabla 44. Intervalo de confianza para NDMA y NDEA.	96
Tabla 45. Robustez para NDMA.	97
Tabla 46. Robustez para NDEA.	97
Tabla 47. Estabilidad de estándar para NDMA.	98
Tabla 48. Estabilidad de estándar para NDEA.	98
Tabla 49. Estabilidad de muestra para NDMA.	99
Tabla 50. Estabilidad de muestra para NDEA.	100
Tabla 51. Cuantificación de nitrosaminas en producto terminado.	101

3. ABREVIATURAS.

APCI	Ionización química a presión atmosférica
ARA II	Antagonista de los receptores de la angiotensina II
EMA	Entidad Mexicana de Acreditación
ESI	Electrospray
FAB	Ionización por bombardeo de iones de elementos ligeros
FDA	Food and Drug Administration
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
HTA	Hipertensión
IA	Ingesta aceptable
ICH	Conferencia Internacional de Armonización
LC	Límite de cuantificación
LC-HRMS	Cromatografía de líquidos acoplado a espectrometrías de masas de alta resolución
LD	Límite de detección
MALDI	Ionización por láser asistida en matriz
mmHg	Milímetros de mercurio
NDEA	<i>N</i> -nitrosodietilamina
NDIPA	<i>N</i> -nitrosodiisopropilamina
NDMA	<i>N</i> -nitrosodimetilamina
NEIPA	<i>N</i> -nitrosoetilisopropilamina
NMBA	<i>N</i> -nitroso- <i>N</i> -metil-4-aminobutírico
ng	Nanogramo
NO₂	Nitrito
OMS	Organización Mundial de la Salud
UI	Unión Europea
UPLC	Cromatografía de líquidos de ultra alta resolución

4. RESUMEN.

En junio del 2018, se informó a la FDA (Food and Drug Administration) la presencia de NDMA (*N*-nitrosodimetilamina) en medicamentos de valsartán a niveles de concentración por encima de lo recomendado por las entidades regulatorias. De igual manera, se encontraron niveles de nitrosaminas en productos como ranitidina, nizatidina y metformina [1]. Dicho hallazgo, provocó que las regulaciones en todo el mundo buscaran monitorear el nivel de nitrosaminas en todos los medicamentos, principalmente en aquellos que se utilizaban en enfermedades crónicas.

Posteriormente, se detectaron más impurezas de nitrosaminas en medicamentos como lo son: *N*-nitrosodietilamina (NDEA), *N*-nitrosoetilisopropilamina (NEIPA), *N*-nitrosodiisopropilamina (NDIPA) y ácido *N*-nitroso-*N*-metil-4-aminobutírico (NMBA). Derivado de ello, la FDA estableció la ingesta aceptable (IA) para cada nitrosamina en los productos mencionados anteriormente. Los niveles de IA provocaron a su vez que algunos medicamentos se retirarán del mercado como lo fue la ranitidina [2].

Por consiguiente, para poder realizar la cuantificación de las nitrosaminas presentes en los diferentes medicamentos es necesario contar con métodos analíticos que tengan una alta sensibilidad como es la cromatografía de líquidos de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas de triple cuadrupolo (UPLC-MS/MS) debido a que dichos compuestos se encuentran presentes en niveles menores a 25 ng/mL.

En este trabajo de investigación se desarrolló y validó un método analítico para la cuantificación de *N*-nitrosodimetilamina (NDMA) y *N*-nitrosodietilamina (NDEA) en materia prima de losartán potásico.

Para el desarrollo del método analítico se determinaron los parámetros de detección por espectrometría de masas, para la preparación de la muestra, y para el método cromatográfico mediante cromatografía de líquidos de ultra alta resolución. En la validación del método analítico se incluyeron parámetros del sistema como la adecuabilidad, la precisión, el intervalo lineal, el intervalo de trabajo (linealidad del sistema), y parámetros

correspondientes al método analítico propiamente como la especificidad, la exactitud (recuperación), la linealidad, los límites de detección y de cuantificación, la precisión y exactitud del límite de cuantificación, la repetibilidad, la precisión intermedia, el sesgo, la robustez, la estabilidad del estándar, la estabilidad de la muestra e incertidumbre.

Finalmente se realizó la cuantificación de 9 diferentes medicamentos, entre los cuales se incluyeron losartán potásico, metformina, ácido acetilsalicílico, ibuprofeno y naproxeno. En ninguno de los productos evaluados se encontraron niveles de las nitrosaminas NDMA y NDEA, lo cual indicaría que su proceso de fabricación fue adecuado. Sin embargo, es necesario optimizar los métodos para cada matriz evaluada.

5. INTRODUCCIÓN.

La hipertensión es una de las principales causas de muerte y discapacidad en todo el mundo. En 2001, a nivel mundial, aproximadamente el 13.5 % del total de muertes prematuras y el 60 % del total de años de vida ajustados por discapacidad fueron causados por hipertensión. Además, 9.4 millones de personas mueren cada año debido a problemas con la hipertensión. La hipertensión no tratada y no controlada conduce a anomalías funcionales del sistema cardiovascular, que en última instancia dañan los órganos vitales de cuerpo, por ejemplo, corazón, riñones y cerebro. [3].

Para el tratamiento de la hipertensión existen diferentes fármacos antihipertensivos, entre los cuales se encuentran:

- Bloqueadores adrenérgicos.
- Inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina.
- Antagonistas de los receptores de la angiotensina II (ARA-II).
- Bloqueantes de los canales de calcio,
- Alfa-agonistas de acción de acción central y vasodilatadores directos.

Es importante señalar, que los medicamentos antihipertensivos se consumen de manera diaria. Por lo tanto, es de gran importancia asegurar la calidad de vida que tendrán los pacientes al consumir este tipo de medicamentos por periodos largos.

En el 2018 se encontraron niveles de NDMA, (la cual es una molécula con alto potencial cancerígeno) en productos de valsartán. Sin embargo, se detectó que dicha cantidad de nitrosamina podía ser controlada en el proceso de producción, lo que provocó que al hacer ciertos ajustes, su concentración disminuyera [4]. Derivado de esto, se ha buscado internacionalmente reducir los niveles de nitrosaminas en todos los medicamentos en los cuales exista el riesgo de que se formen estas impurezas. Para lograrlo, es necesario desarrollar una metodología analítica que sea capaz de cuantificar nitrosaminas por cada producto.

5.1. Presión arterial.

La presión arterial es la fuerza que ejerce la sangre contra las paredes arteriales. Dicha presión es medida a través de dos consideraciones. La primera es cuando el corazón se contrae y empuja la sangre hacia afuera (presión arterial sistólica) y la segunda es cuando el corazón se relaja y se llena de sangre (presión diastólica). El resultado de la presión arterial se expresa colocando el valor de la presión sistólica sobre la presión diastólica. Los valores de presión arterial normales se consideran en el rango de 120/80, es decir un valor de 120 mmHg para la presión sistólica y 80 mmHg de presión diastólica [5].

Cuando se tienen valores de presión arterial elevados tanto para la presión sistólica y diastólica, se considera Hipertensión Arterial (HTA).

5.2. Hipertensión Arterial (HTA).

La HTA es una forma de trastorno cardiovascular que resulta de una amplia gama de etiologías interconectadas. La HTA no tratada y no controlada conduce a estructuras y anomalías funcionales del sistema cardiovascular, provocando que se dañen órganos vitales como lo son el corazón, riñones y cerebro.

HTA es una de las principales causas de muerte y discapacidad en todo el mundo. En 2001, se registró a nivel mundial un valor de 13.5 % del total de muertes prematuras causadas por hipertensión. Además, 9.4 millones de personas mueren cada año debido a problemas relacionados con la hipertensión [3].

HTA es una enfermedad que muy pocas veces presenta síntomas, y es producida por factores de riesgo como dieta poco saludable, inactividad física y por otros factores metabólicos como obesidad, diabetes y dislipidemias [6].

5.3. Nitrosaminas en medicamentos para la hipertensión arterial.

Para el tratamiento de la HTA existen diferentes fármacos antihipertensivos, entre los cuales se encuentran: bloqueadores adrenérgicos, Inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina, antagonistas de los receptores de la angiotensina II (ARA-II), bloqueantes de los canales de calcio, alfa-agonistas de acción central y vasodilatadores directos.

Los medicamentos tipo antagonistas de los receptores de la angiotensina II (ARA-II). Actúan sobre el sistema renina-angionista-aldosterona aunque de diferente forma, bloqueando la unión de la angiotensina II a los receptores tipo 1 de la angiotensina II [20]. Son de carácter no peptídico y poseen una biodisponibilidad oral aceptable y una duración de acción mantenida. El medicamento más conocido en este tipo es losartán, sin embargo, existen otros como valsartán, ibersartán, aprosartán, candesartán y telmisartán.

En junio del 2018, se informó a la FDA (Food and Drug Administration) la presencia de NDMA (*N*-nitrosodimetilamina) en medicamentos de valsartán a niveles que presentan un riesgo para la salud por su efecto cancerígeno. Por consiguiente, se inició la búsqueda de impurezas de tipo nitrosaminas en este tipo de medicamentos [7].

5.4. Nitrosaminas.

Las nitrosaminas son moléculas que contienen un grupo funcional nitroso y pueden estar presentes en el medio ambiente, la comida, el agua potable y medicamentos.

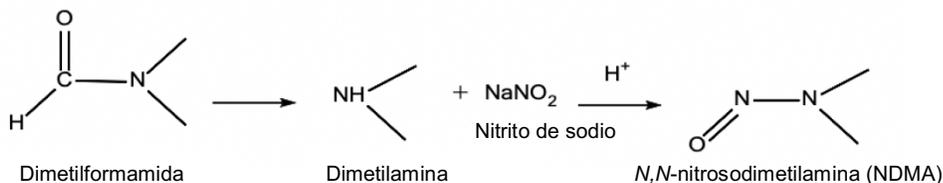


Figura 1. Formación de NDMA a partir de *N,N*-dimetilformamida.

La Figura 1 muestra la formación de las nitrosaminas, la cuál se da de manera general cuando una amina secundaria o terciaria reacciona con sales de nitrito bajo condiciones acidas. La adición de nitrito de sodio se utiliza para destruir los residuos de azidas como parte del proceso de recuperación [8]. Se sabe que la mayoría de los sartanes contienen un anillo tetrazol, para cuya formación se necesita nitrito de sodio.

Los estudios presentados hasta la actualidad indican que una posible causa de la cantidad de nitrosaminas presentes en los medicamentos se debe a que estas se forman a partir de materiales de partida, disolventes, reactivos contaminados y por degradación propia por temperatura. Por ejemplo, *N,N*-dimetilformamida se puede degradar a dimetilamina, la cual reacciona con ácido nitroso para formar NDMA [8].

De acuerdo al Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer de la Organización Mundial de la Salud (OMS) las nitrosaminas son consideradas mutágenas y cancerígenas muy potentes a ciertos niveles, los cuales dependen de la cantidad de dosis que se administra de un medicamento al día.

Derivado de eso, la Unión Europea, tras una evaluación de los medicamentos clasificados como sartanes que podrían contener impurezas de tipo nitrosaminas, pidió a los fabricantes que evaluaran sus procesos de fabricación y que de ser necesarios los modificaran para reducir la presencia de dichas impurezas.

En marzo del 2018 se encontró que la ranitidina presentaba concentraciones de nitrosaminas mayores a lo permitido (96 ng/día) por la ingesta diaria aceptable (IA). Por lo que, de manera general la Unión Europea, Estados Unidos de América y algunos países de Latinoamérica decidieron por precaución retirar o suspender la distribución de todos los productos que tuvieran ranitidina hasta que se demostrara que contienen estas impurezas por debajo de 96 ng/día de NDMA [2].

5.4.1. Regulación del Contenido de Nitrosaminas.

Varios organismos regulatorios han solicitado a las empresas fabricantes realizar una evaluación preventiva ante la posibilidad de que se produzca una contaminación cruzada o la introducción fortuita de aminas y nitritos en sus medicamentos.

Para dicha acción, la Tabla 1 muestra los valores de ingesta aceptables de cada nitrosamina (ng/día) [9].

Tabla 1. Ingesta aceptable de cada nitrosamina

Nitrosamina	Ingesta aceptable (ng/día)
NDMA	96.0
NDEA	26.5
NMBA	96.0
NMPA	26.5
NIPEA	26.5
NDIPA	26.5

Es importante mencionar, que estos niveles de ingesta aceptable son válidos únicamente para una nitrosamina, es decir, si se tiene más de una que este identificada en la Tabla 1 y la cantidad total de impurezas por nitrosaminas excede de 26.5 ng/día se tiene que notificar a las autoridades correspondientes.

Para los medicamentos que tienen como dosis diaria máxima 880 mg/día se recomienda un límite de nitrosaminas de 0.03 ppm, lo cual no es más de 26.5 ng/día por lo que el nivel se considera aceptable. Sin embargo, si el producto tiene una dosis diaria máxima superior a los 880 ng/día el límite de máximo de nitrosamina deberá ser 26.5 ng/día [2].

5.4.2. Cuantificación de nitrosaminas.

Derivado de la problemática presentada para este tipo de impurezas, es necesario emplear una metodología analítica que sea capaz de cuantificar las nitrosaminas a los niveles requeridos.

En marzo del 2019, se publicó una metodología por la FDA para la cuantificación de NDMA en ranitina utilizando la técnica de cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (LC-HRMS) en donde se realizó una validación del método basándose en la guía de la Conferencia Internacional de Harmonización (ICH) Q2 (R1) la cual establece los procedimientos a seguir para validación de métodos analíticos. En dicha validación se determinó como límite de detección (LD) 0.32 ng/mL, y como límite de cuantificación 1.0 ng/mL y una linealidad que va de 1.0 – 100 ng/mL [2]

A finales del 2019 la empresa SCIEX publicó un análisis rápido de Nitrosaminas Genotóxicas por HPLC-MS/MS en donde se estableció un límite de cuantificación de 0.1 ng/mL para NDMA [10]

En junio 2020, la Entidad Mexicana de Acreditación (EMA) publicó un artículo de las impurezas de nitrosaminas en productos farmacéuticos para humanos, en donde se menciona que para la técnica analítica LC-MS/MS se tiene como límite de detección de 0.01-0.15 ppm para NDMA y 0.08-0.5 ppm como límite de cuantificación para la misma impureza en cada producto farmacéutico [11].

En diciembre del 2022, la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicano publicó el MGA 0612 “Determinación de Nitrosaminas en fármacos y preparados farmacéuticos” en donde se establecieron 3 metodologías analíticas para cuantificación de 6 nitrosaminas [12].

Como se puede observar, la mayoría de las metodologías analíticas empleadas en la actualidad para la determinación de nitrosaminas utilizan la técnica de cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas.

5.5. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés), es una técnica de separación que se basa en la polaridad y afinidad que tienen los analitos de interés con respecto a una fase móvil y a una fase estacionaria [13].

La Figura 2 muestra los componentes generales que cada equipo de HPLC contiene, entre los cuales se encuentran:

- Frascos para fase móvil.
- Sistema de bombeo.
- Inyector de muestra.
- Columna.
- Detector.
- Computadora.

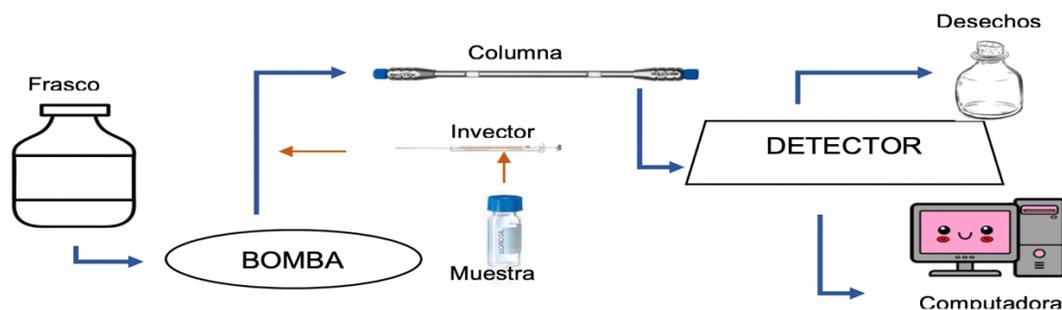


Figura 2. Componentes de un cromatógrafo de líquidos.

La Figura 2 muestra el flujo que lleva la técnica propiamente en donde inicia con el paso de la fase móvil a través de la bomba. Por otro lado, se está inyectando la muestra por medio de un automuestreador y se junta con la fase móvil que viene de la bomba para que ambos sean pasados por una columna cromatográfica. Dicha columna cromatográfica se encarga de realizar la separación de los analitos que han sido inyectados con ayuda de la fase estacionaria que se encuentra dentro de ella y de la fase móvil que viene acompañando la muestra. Esa separación analítica es detectada y registrada en una computadora. Al pasar por el detector el flujo de la fase móvil se va a un reservorio de desechos.

Cómo ya se mencionó anteriormente, la cromatografía de líquidos es una técnica que sirve para la separación, identificación y cuantificación de diferentes analitos. Sin embargo, en el año 2004, dicha tecnología evolucionó a lo que se conoce actualmente como cromatografía de líquidos de ultra alta resolución (UPLC, por sus siglas en inglés).

La evolución de la cromatografía de líquidos de HPLC a UPLC surgió debido a la necesidad de optimizar el tiempo que se requiere en los análisis, la cantidad de muestra a utilizar y buscando alcanzar niveles de sensibilidad más bajos y con mayor eficacia.

Sin embargo, al igual que la técnica por HPLC, se necesita de diferentes detectores para poder realizar las actividades mencionadas anteriormente. Entre los detectores más utilizados se encuentran:

- Detector UV/VIS. Son los que miden la absorción de la luz en la región ultravioleta (UV) o visible (VIS), el cuál es utilizado en aproximadamente el 75 % de las aplicaciones.
- Detector de fotodiodos (PDA) que permite realizar pureza espectral.
- Detector de fluorescencia que ofrece sensibilidad para cuantificar bajas concentraciones de compuestos fluorescentes ya sea de forma natural o a través de una derivatización.
- Detector de índice de refracción ideal para componentes con absorción UV limitada o nula.
- Detector electroquímico altamente selectivo para aminoglucósidos, carbohidratos, neurotransmisores, etc.
- Detector de masas altamente robusto, confiable y con mayor sensibilidad que los demás detectores [14].

5.6. Cromatografía de líquidos de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS/MS).

El acoplamiento del detector de espectrometría de masas a la cromatografía de líquidos permite detectar analitos de interés con mayor sensibilidad a comparación de otros detectores, mayor precisión y sin importar el tiempo de retención que estos tengan, ya que se basa en identificar los analitos por su peso molecular [19].

El fundamento de la espectrometría de masas es la formación de iones a partir de moléculas neutras. En la Figura 3 se muestran los componentes básicos de un espectrometro de masas.



Figura 3. Componentes de un espectrometro de masas.

- Introducción de la muestra.

En los equipos UPLC-MS/MS, la introducción de la muestra se realiza a través del módulo de cromatografía de líquidos.

- Fuente de iones.

Cuando las moléculas se encuentran en el módulo del detector por espectrometría de masas, las moléculas sufren procesos buscando ionizar la muestra. Existen diferentes formas para lograrlo, por ejemplo, se encuentra la ionización por impacto electrónico, ionización química, ionización sobre una superficie a elevada temperatura, ionización por bombardeo de iones de elementos ligeros (FAB), ionización por láser asistida en matriz (MALDI), ionización química a presión atmosférica (APCI) e ionización por electrospray (ESI).

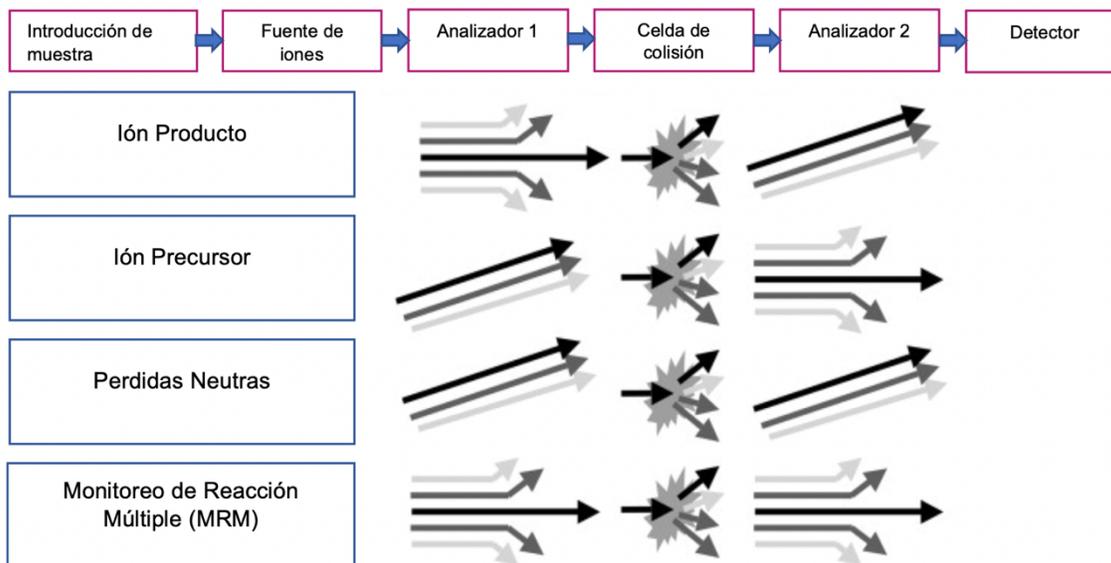


Figura 4. Ionización de espectrometría de masas de triple cuadrupolo.

Para poder analizar los iones originados por la fuente de iones, se tienen dos formas:

- 1) Modo SIM. Las condiciones de detección son fijas de manera que sólo pase un ión con una determinada relación masa/carga (m/z).
- 2) Modo SCAN. La detección se realiza a través de un barrido entre masas de determinado intervalo de la relación masa/carga (m/z).

En la Figura 4 se observa que existen 4 formas diferentes de analizar las masas en un espectrómetro de masas.

- 1) Ión producto: El Analizador 1 esta en modo SIM mientras que el Analizador 2 se encuentra en modo SCAN. De esta forma solo se ve un barrido de diferentes fragmentos provenientes de un ión precursor.

- 2) Ión precursor: El Analizador 1 se encuentra en modo SCAN y el Analizador 2 se encuentra en modo SIM. Se realiza un barrido en un intervalo de m/z y posterior a la celda de colisión se fijan condiciones de manera tal que solo un ión sea analizado.
- 3) Perdidas Neutras: Los dos Analizadores trabajan en modo SCAN. De tal forma se detectan todos los compuestos de la fragmentación obtenida en la celda de colisión.
- 4) Monitoreo de Reacción Múltiple. Ambos analizadores se encuentran en modo SIM. Esta forma es específica debido a que se fijan las condiciones específicas para que sólo un ión salga del Analizador 1 y a su vez del Analizador 2.

5.7. Validación de métodos analíticos.

5.7.1. Guías para la validación de métodos analíticos.

La validación de métodos analíticos de acuerdo con la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos establece que la validación es el proceso que establece mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método, satisfacen los requisitos para su aplicación analítica.

Existen diferentes guías para la validación de métodos analíticos, entre ellas se encuentran:

- Guía de validación de métodos analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos.
- Guía de validación de métodos analíticos de Eurachem.
- Guía de validación de métodos analíticos para un solo laboratorio de IUPAC.
- Guía de validación de métodos analíticos de FDA.
- Guía de validación de métodos analíticos ICH Q2.

Todas las guías de validación establecen los criterios de aceptación que se deberán seguir en todas las pruebas que se evalúan, dependiendo del método analítico que se desea validar, dada las diferencias entre las distintas clasificaciones de métodos analíticos identificados en la ICH Q2 o en la USP. La cuantificación de Nitrosaminas requiere de un método que cuantifique trazas de contaminantes o impurezas de manera específica. Para este trabajo, las principales pruebas de validación del método analítico que se realizan se dividen principalmente en dos componentes:

- 1) Pruebas relacionadas al sistema de medición o sistema analítico.
- 2) Pruebas específicas del método analítico.

Las pruebas para validación del sistema analítico, incluyen la precisión del sistema, linealidad del sistema, los límites de detección y de cuantificación. Las pruebas relacionadas con el desempeño del método analítico incluyen la linealidad del método, la exactitud, la precisión, que a su vez se divide en repetibilidad y precisión intermedia (reproducibilidad), la especificidad, la robustez, la tolerancia y la estabilidad de la muestra[9].

5.8. Parámetros de desempeño en la validación del método analítico.

5.8.1. Precisión del sistema.

La precisión del sistema es la demostración de que existe una semejanza entre los resultados de determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones durante la medición de un analito en específico a una concentración determinada. Para dicha prueba se deberá realizar por lo menos un sextuplicado a la concentración que represente el 100 % de la muestra procesada para su medición en solución. De esta manera, evaluamos la repetibilidad que tenga el analito dentro del método analítico sin importar en este punto la matriz en la que se encuentre posteriormente.

El criterio de aceptación va en función de la concentración del analito en la muestra. Sin embargo, los criterios que se utilizan en este trabajo son los indicados por la Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura (CCAYAC-CR-04), los cuales son:

- % CV \leq 1.5 %, 2.0 % para métodos fisicoquímicos.
- % CV \leq 3.0 % para métodos biológicos
- % CV \leq 10 % a 25 % para impurezas.

5.8.2. Linealidad del sistema.

La linealidad del sistema evalúa la correlación que existe entre la respuesta analítica vs la concentración en solución. Es decir evalúa la respuesta que tiene el analito en el instrumento utilizado y como esta respuesta varía conforme las concentraciones cambian. Se debe preparar por lo menos 5 niveles de concentración, en donde, se recomienda que se evalúen dos niveles por debajo del 100 % y dos niveles por encima de él [13].

Los criterios de aceptación son:

- $r^2 \geq 0.98$.
- El intervalo de confianza de la pendiente (IC (β_1)) de la curva de calibración, no debe incluir el 0.

5.8.3. Límite de detección.

El límite de detección es la concentración mínima en la cuál el analito puede ser detectado, más no cuantificado. Existen diferentes maneras de determinar el límite de detección [13], entre las cuales se encuentran:

- a) Límite de detección con base en curva de calibración y desviación estándar de blancos.
- b) Límite de detección con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión.
- c) Límite de detección con base en la curva de calibración y la desviación estándar de la ordenada al origen.

Para el criterio de aceptación se establece que el límite de detección sea menor a la especificación de la prueba de impurezas límite y que se tenga una relación señal/ruido ≥ 3 .

5.8.4. Límite de cuantificación.

El límite de cuantificación es la concentración mínima a la cual se puede cuantificar un analito con precisión y exactitud. Al igual que en la prueba de límite de detección, existen diferentes formas para la determinación del límite de cuantificación [13], entre las cuales se encuentran:

- a) Límite de cuantificación por relación señal/ruido.
- b) Límite de cuantificación con base en la curva de calibración y la desviación estándar de los blancos.
- c) Límite de cuantificación con base en la curva de calibración basado en la desviación estándar de regresión.
- d) Límite de cuantificación con base en la curva de calibración y la desviación estándar de la ordenada al origen.

Como criterio de aceptación para el límite de cuantificación, se tiene que tenga una relación señal/ruido ≥ 10 .

5.8.5. Linealidad del método de cuantificación.

La linealidad del método evalúa la concordancia que existe entre el valor teórico con el valor real en un intervalo de trabajo determinado en la matriz a trabajar, es decir, cantidad adicionada vs cantidad recuperada considerando la influencia que pueda tener algún excipiente. Para evaluar la linealidad del método se puede realizar por placebos adicionados, en donde se adiciona por lo menos a 3 niveles diferentes, una cantidad diferente de materia prima del principio activo a analizar (método de placebos adicionados) [13].

En caso de no contar con el placebo analítico, se puede realizar con una proporción del producto terminado y con una solución de materia prima o estándar adicionar la cantidad necesaria para llegar a los niveles establecidos en la linealidad (método de producto terminado). Tanto en el método de placebos adicionados como en el de producto terminado se realiza la adición por triplicado en cada punto de la curva.

Entre los parámetros de aceptación se encuentra que el intervalo de recuperación se encuentre entre 98.0 % a 102.0 % para valoración y de 80 % a 120 % para métodos de impurezas.

5.8.6. Exactitud.

La exactitud del método evalúa la concordancia que existe entre el valor teórico con el valor real a la concentración del 100 %. Se realiza por sextuplicado y puede ser mediante el método de placebos adicionados o por producto terminado. Al igual que la linealidad del método, la exactitud busca evaluar la recuperación que se tiene de una muestra, la cual implica evaluar una adecuada extracción del analito.

Los criterios de aceptación considerados para esta prueba son los descritos por la Guía de Validación de Métodos Analíticos por los Químicos Farmacéuticos Biológicos [9]:

- Porcentaje de cantidad recuperada se encuentra entre 98.0 % a 102.0 % para métodos de valoración y de 80 % a 120 % para métodos de impurezas.
- $\% CV \leq 2.0 \%$ para las 6 determinaciones para valoración y $\leq 20.0 \%$ para métodos de impurezas.

5.8.7. Repetibilidad.

Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales de varias determinaciones, cuando el procedimiento se aplica por un mismo analista, utilizando los mismos instrumentos y métodos.

Para dicha prueba se realiza por sextuplicado la preparación de la muestra, tal cual se realiza cuando se analiza el contenido de la misma. Es decir, la evaluación de la muestra problema sin realizar algún tipo de adición de estándar o materia prima [13].

Para esta prueba, la mayoría de las guías recomiendan como criterio de aceptación un:

- $\% CV \leq 2.0 \%$ para las 6 determinaciones para valoración y $\leq 20.0 \%$ para métodos de impurezas.

5.8.8. Precisión Intermedia.

Es la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas en un mismo laboratorio, por diferentes analistas en diferentes días.

Para dicha prueba se realiza por triplicado la preparación de la muestra sin realizar algún tipo de adición de estándar. Se prepara por dos analistas en dos días diferentes [13].

Entre los criterios de aceptación que se encuentran en la mayoría de las guías se tiene:

- $\% CV \leq 2.0 \%$ para las 12 determinaciones para valoración y $\leq 20.0 \%$ para métodos de impurezas.

5.8.9. Robustez.

Es la capacidad del método analítico de mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas, en los parámetros normales de operación del método analítico. Para la robustez se preparan al menos 3 muestras de manera independiente y se evalúan en cada condición que se pretende modificar para la operación del método analítico. Por ejemplo, cambio en la temperatura, tamaño de filtro, pH, velocidad de flujo, % de disolventes empleados, o cualquier otro cambio que sea crítico en la preparación de las muestras [13]. Entre los principales criterios de aceptación se tiene que:

- No exista una diferencia ≥ 2.0 % para cada condición evaluada.
- No exista una diferencia relativa ≥ 20.0 % para cada condición evaluada para métodos de impurezas

5.8.10. Tolerancia.

Es la reproducibilidad del método analítico, cuando es analizado bajo diferentes condiciones de operación y que no dependen del método analítico directamente, sino de cosas ajenas a él como lo son diferente marca de equipo cromatográfico o diferente marca de columna cromatográfica.

Para la tolerancia se preparan al menos 3 muestras de manera independiente y se evalúan

en cada condición que se pretende modificar para la operación del método analítico [13].

Entre los principales criterios de aceptación se tiene que:

- No exista una diferencia ≥ 2.0 % para cada condición evaluada para métodos de valoración.
- No exista una diferencia relativa ≥ 20.0 % para cada condición evaluada para métodos de impurezas.

5.8.11. Especificidad / Selectividad.

Es la capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debido únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra.

Para la evaluación de la especificidad se evalúa que no exista interferencias en las respuestas de los analitos de interés. Para los métodos analíticos indicadores de estabilidad se deberá contar con los productos de degradación del producto a analizar. En caso de no tenerlos, se deberá someter la muestra a diferentes condiciones de estrés forzado para obtenerlos [13].

Para obtener productos de degradación mediante estrés forzado se tienen los siguientes métodos:

- a) Degradación mediante hidrólisis ácida.
- b) Degradación mediante hidrólisis básica.
- c) Degradación mediante fotólisis.
- d) Degradación térmica.
- e) Degradación oxidativa.

5.8.12. Estabilidad.

Para la prueba de estabilidad se deberá establecer las condiciones a las cuales se desea evaluar la estabilidad. Para ello, se fraccionan por lo menos 3 muestras preparadas de manera independiente en las condiciones de estabilidad a las cuales se determinaran los análisis [13].

Las condiciones más comunes a evaluar son a temperatura ambiente y en refrigeración.

Entre los principales criterios de aceptación se tiene que:

- No exista una diferencia ≥ 2.0 % para cada condición evaluada para métodos de valoración.
- No exista una diferencia relativa ≥ 20.0 % para cada condición evaluada para métodos de impurezas

6. JUSTIFICACIÓN

Actualmente existen metodologías que se utilizan como referencia para la cuantificación de nitrosaminas. Sin embargo, en todas estas metodologías se hace énfasis en que siempre se tiene que validar por cada producto a analizar. La importancia de esto radica en buscar métodos que sean específicos y que no se tengan problemas en la detección derivado del proceso de extracción. Aunado a ello, es importante señalar la tecnología analítica que se debe emplear ya que los niveles de concentración permitida para estas impurezas se encuentra al nivel de los ng/día. Para ello, es necesario utilizar tecnologías con alta sensibilidad como lo son la cromatografía de líquidos de ultra alta resolución (UPLC) acoplada a detectores de espectrometría de masas.

Derivado de la problemática planteada, la industria farmacéutica ha buscado en los últimos 4 años tener métodos analíticos para cuantificar las nitrosaminas en sus productos. Para lo cual necesitan al menos un equipo de espectrometría de masas de triple cuadrupolo para alcanzar la sensibilidad requerida. Sin embargo, estos equipos son muy costosos para que solo sean utilizados en uno de sus productos, es por eso, que buscan tercerizar el análisis para reducir los costos y seguir así asegurando la calidad de sus productos.

En este trabajo de tesis, se ha desarrollado y validado un método analítico de nitrosaminas (NDMA y NDEA) para poder acreditarlo y someterlo ante la ema y COFEPRIS, para poder así brindar un servicio de tercero autorizado a las industrias farmacéuticas.

7. HIPÓTESIS.

El método analítico desarrollado y validado para la detección de nitrosaminas (NDMA y NDEA) mediante un cromatógrafo de líquidos de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas de triple cuadrúpolo, será el adecuado y tendrá una confiabilidad para su cuantificación en muestras de materia prima de losartán potásico.

8. OBJETIVOS

8.1. Objetivo General.

Desarrollar y validar un método analítico que utiliza la técnica de cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (MS/MS) para la evaluación de los niveles de nitrosaminas en medicamentos para el tratamiento de la hipertensión.

8.2. Objetivos Particulares.

- 8.2.1.** Desarrollar un método analítico mediante la técnica de LC-MS/MS en materia prima de losartán potásico para determinar los parámetros cromatográficos y de detección adecuados para el análisis de NDMA y NDEA.
- 8.2.2.** Validar un método analítico mediante la técnica de LC-MS/MS en materia prima de losartán potásico que le de confiabilidad para la cuantificación de NDMA y NDEA en materia prima de losartán potásico.
- 8.2.3.** Cuantificar NDMA y NDEA en materia prima de losartán potásico y otros analgésicos de libre venta en México mediante la técnica de LC-MS/MS para la evaluación de los niveles de nitrosaminas en medicamentos de libre venta en México.

9. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

9.1. Equipos, instrumentos, materiales en general, reactivos y sustancias de referencia.

Tabla 2. Equipos e Instrumentos.

EQUIPO/INSTRUMENTO	MARCA	MODELO	SERIE
Balanza analítica	Ohaus	PA214C	B302704410
Centrífuga	Velab	PRO-8M	2105331
Agitador	DLAB	SK-O330-Pro	SC178AB0000426
Micropipeta volumen variable (10-100 μ L)	EPPENDORF	RESEARCH PLUS	N46857K
Micropipeta volumen variable (100-1000 μ L)	EPPENDORF	RESEARCH PLUS	O27320K
Campana de extracción	TECNOLAB	CS-122	TAL-1916-21090- CH-574
Cromatógrafo de Líquidos de Ultra Alta Resolución acoplado a espectrometría de masas de triple cuadrupolo	AGILENT	6495C	SG2047D205.

9.1.1. Materiales en general.

- Viales de 2.0 mL.
- Tubos de plástico para centrifuga de 50 mL marca Sarstedt o equivalente.
- Jeringas de plástico de 5 o 10 mL marca Plastipack o equivalente.
- Filtros CR 0.2 μ m
- Filtros CR 0.45 μ m
- Puntas para micropipeta de 200 y 1000 μ L marca Eppendorf o equivalente.
- Guantes de vinilo.
- Espátulas.
- Reservorios de 500 y 1000 mL.
- Cromatógrafo de líquidos de Ultra Alta Resolución acoplado a espectrometría de masas de triple cuadrupolo.

- Columna C18, 2.1 x 100 mm.

9.1.2. Reactivos.

Tabla 3. Reactivos.

REACTIVO Y/O INSUMO	MARCA	LOTE /NO. DE SERIE	GRADO	FECHA DE CADUCIDAD
Agua	JT Baker	E40W00	HPLC	03/OCT/2026
Agua	Honeywell	ED785	LC-MS	24/FEB/2024
Agua	Honeywell	EG224	LC-MS	25/ENE/2025
Metanol	JT Baker	22A3062007	LC-MS	14/ENE/2024
Metanol	JT Baker	E24W31	HPLC	15/JUN/2027
Metanol	Honeywell	EB835	HPLC	20/NOV/2025
Ácido fórmico	Merck	Z0739902	LC-MS	30/SEP/2024

9.1.3. Sustancias de referencia.

Tabla 4. Materiales de Referencia.

NOMBRE	GRADO	MARCA	LOTE	CONCENTRACIÓN CERTIFICADA	FECHA DE CADUCIDAD
Nitrosamines Standard: Nitrosodimetilamina NDMA, Nitrosodietilamina NDEA	MCR ⁽¹⁾	Agilent	0006709386	1004 ± 5 µg/mL	30/NOV/2024

(1) MCR Material Certificado de Referencia

9.2. Desarrollo del método analítico.

9.2.1. Detección. Parámetros de detección por espectrometría de masas.

Se determinaron los parámetros de detección para mejorar la señal de todos los analitos.

Se determinaron los siguientes parámetros:

- Flujo de gas.
- Nebulizador.

- El estuche del flujo de gas.
- Voltaje del capilar.
- Voltaje del inyector.
- Presión alta del iFunnel.
- Presión baja del iFunnel.

Se utilizaron como base y principal aquellas transiciones que están marcadas en el MGA 0612 Determinación de Nitrosaminas en fármacos y preparados farmacéuticos.

Las transiciones son:

m/z NDMA 75.10 > 43.16

m/z NDEA 102.83 > 75.08

Se determinaron otras transiciones que ayudaran a identificar correctamente las 2 nitrosaminas (NDMA y NDEA).

9.2.2. Preparación del estándar.

Para la preparación de la solución estándar de cuantificación se siguió como base, lo indicado en el MGA 0612 Determinación de Nitrosaminas en fármacos y preparados farmacéuticos.

Para ello se adquirieron estándares de NDMA y NDEA a una concentración de 1.0 mg/mL.

- Se tomó 1.0 mL de la solución estándar de NDMA y NDEA a una concentración de 1.0 mg/mL y se transfirió a un matraz volumétrico de 100 mL. Se llevó a volumen con agua. Esta solución tiene una concentración de 10 µg/mL.
- Se tomó una alícuota de 1.0 mL y se transfirió a un matraz volumétrico de 100 mL, se llevó a volumen con agua y se mezcló. Esta solución tiene una concentración de 100 ng/mL y es considerada como *solución madre*, esta solución es la considerada como solución inicial en el MGA 0612.
- Se tomó una alícuota de 1.0 mL de la solución madre a un matraz volumétrico de 50 mL, se llevó a volumen con agua y se mezcló. Esta solución tiene una concentración de 2 ng/mL.

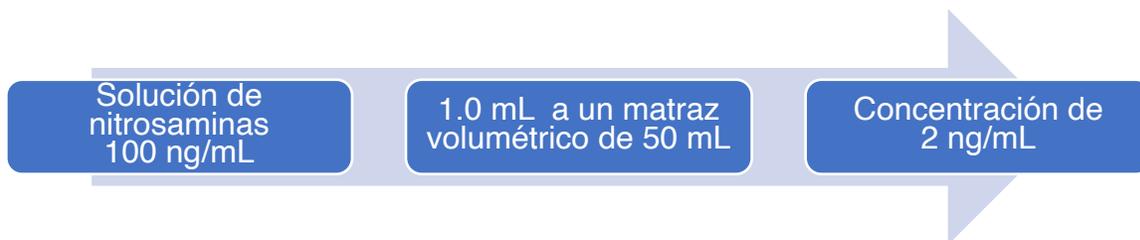


Figura 5. Esquema general de preparación de estándar.

9.2.3. Extracción. Preparación de la muestra.

Para evaluar la extracción de la muestra se utilizó lo indicado en el “MGA 0612 Determinación de Nitrosaminas en fármacos y preparados farmacéuticos”, para las muestras de materia prima de losartán potásico y de producto terminado de metformina, ácido acetilsalicílico, ibuprofeno y naproxeno y está indicado en la Figura 6.

- Se pasaron aproximadamente 100 mg de API (losartán potásico) y se transfirieron a un matraz volumétrico de 5 mL. Se llevó a volumen con agua y se mezcló en vortex durante 1 minuto.
- Se mezcló en un agitador orbital durante 40 minutos a 200 rpm.
- Se centrifugó a 4500 rpm durante 15 minutos.
- Se filtró a través de un acrodisco de celulosa regenerada (RC) de tamaño de poro de 0.45 μm descartando los primeros 2 mililitros del filtrado. Se colocó en viales de cromatografía de líquidos.

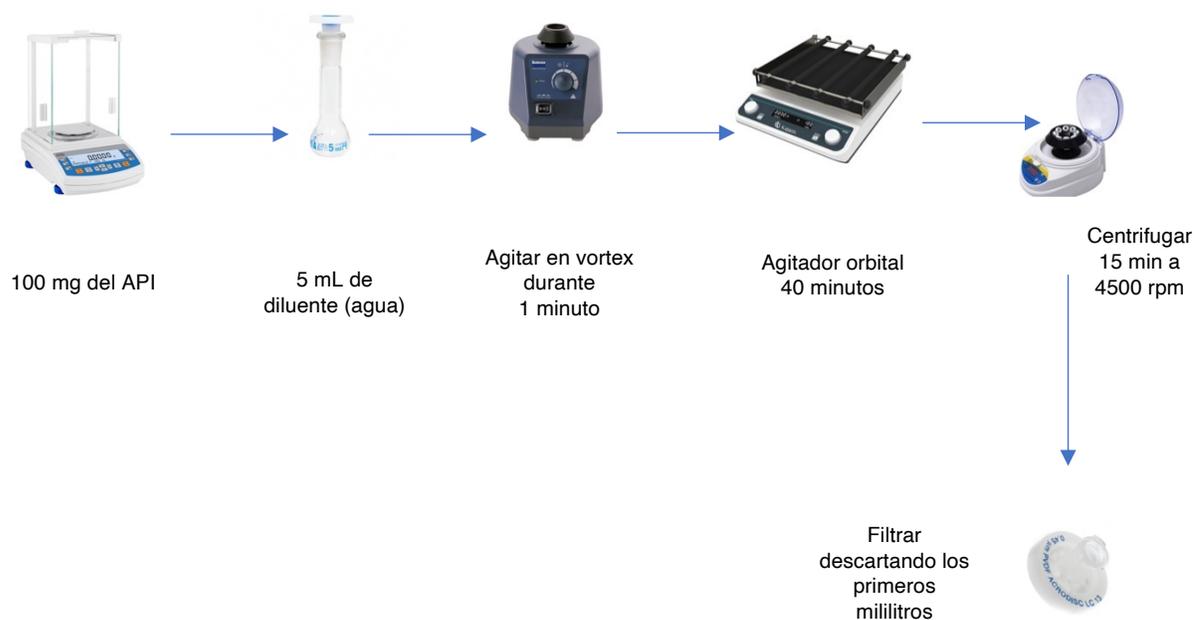


Figura 6. Esquema general de preparación de la muestra.

9.2.4. Cromatografía. Método analítico mediante UPLC acoplado a espectrometría de masas de triple cuadrupolo.

Inicialmente, se probó el gradiente propuesto por el método II del MGA 0612, en donde se encontraron resultados repetibles. Sin embargo, se observaron varios problemas de detección derivado de que la nitrosamina NDMA salía con el frente de elución al utilizarlo o de que la nitrosamina NDEA tenía una coelución con la matriz, provocando que los picos cromatográficos salieran pegados y no se definiera la señal de manera gaussiana. Se propuso realizar diferentes gradientes a fin de mejorar la elución de ambas nitrosaminas.

Es importante mencionar que la matriz a la cuál se cargaron las nitrosaminas fue materia prima de losartán potásico, la cuál de acuerdo al numeral 9.2.3, tiene una concentración aproximada de 20 mg/mL, concentración que es muy elevada para ser inyectada a un cromatógrafo de líquidos acoplado a detector de espectrometría de masas.

A fin de evitar contaminaciones, la mayoría de los espectrometros de masas tienen la opción de que durante cierto tiempo de la corrida analítica manden todo el flujo que viene del cromatógrafo de líquidos a desechos. Por tal motivo, se estableció hacer una dilución hasta tener una concentración de 50 ng/mL de losartán potásico, evaluar su tiempo de retención y ver si era posible poder mandar a desechos el flujo antes de que se detectara el losartán y poder así evitar la contaminación que se tendría por su alta concentración.

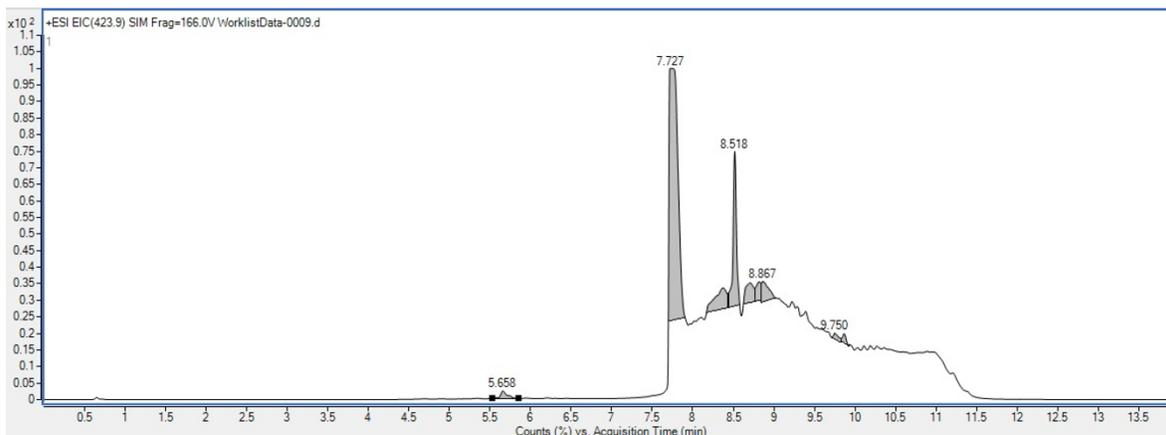


Figura 7. Cromatograma tipo de losartán potásico a 50 ng/mL.

Al visualizar el tiempo de retención de losartán potásico fue posible indicarle al equipo que durante ese periodo de tiempo en lugar de mandarlo al detector, lo envíe a desechos, ya que como se mencionó anteriormente y por solicitud del MGA 0627, el activo se debe inyectar a una concentración de 20 mg/mL.

Se estableció en el equipo que mande todo a desechos a partir del minuto 7 para evitar que se ensuciara el espectrometro.

Una vez definido eso, se buscaron las condiciones cromatográficas adecuadas para obtener picos eficientes para NDMA y NDEA.

9.2.5. Linealidad del método.

Se determinó la linealidad del método en un intervalo de 1 – 25 ng/mL para ambas nitrosaminas utilizando la materia prima adicionada con la solución estándar de NDMA y NDEA. Para la ejecución de la prueba se realizaron los siguientes pasos:

- Se pesaron 18 muestras de 1 g de losartán potásico y se transfirieron a matraces volumétricos de 5 mL. De esas muestras 3 eran para el nivel con concentración de 1 ng/mL, 3 para la concentración de 5 ng/mL, 3 para la concentración de 10 ng/mL, 3 para la concentración de 15 ng/mL, 3 para la concentración de 20 ng/mL y 3 para la concentración de 5 ng/mL.
- Nivel 1 ng/mL. Se adicionó 50 μ L de la solución madre de nitrosaminas (descritas en el numeral 9.2.2) al matraz volumétrico con el losartán potásico, se llevó a volumen con agua y se mezcló.
- Nivel 5 ng/mL. Se adicionó 250 μ L de la solución madre de nitrosaminas (descritas en el numeral 9.2.2) al matraz volumétrico con el losartán potásico, se llevó a volumen con agua y se mezcló.
- Nivel 10 ng/mL. Se adicionó 500 μ L de la solución madre de nitrosaminas (descritas en el numeral 9.2.2) al matraz volumétrico con el losartán potásico, se llevó a volumen con agua y se mezcló.
- Nivel 15 ng/mL. Se adicionó 750 μ L de la solución madre de nitrosaminas (descritas en el numeral 9.2.2) al matraz volumétrico con el losartán potásico, se llevó a volumen con agua y se mezcló.
- Nivel 20 ng/mL. Se adicionó 1.0 mL de la solución madre de nitrosaminas (descritas en el numeral 9.2.2) al matraz volumétrico con el losartán potásico, se llevó a volumen con agua y se mezcló.
- Nivel 25 ng/mL. Se adicionó 1.25 mL de la solución madre de nitrosaminas (descritas en el numeral 9.2.2) al matraz volumétrico con el losartán potásico, se llevó a volumen con agua y se mezcló.
- Se mezcló cada muestra en vortex durante 1 minuto.
- Se mezcló cada muestra en un agitador orbital durante 40 minutos a 200 rpm.
- Se centrifugó cada muestra a 4500 rpm durante 15 minutos.

- Se filtró cada muestra a través de un acrodisco de celulosa regenerada (RC) de tamaño de poro de 0.45 μm descartando los primeros 2 mililitros del filtrado. Se colocó en viales de cromatografía de líquidos.

9.2.6. Especificidad

Se evaluó que no exista interferencia en el blanco con respecto a los analitos evaluados. Para esta prueba se realizaron inyecciones de la solución estándar a 2 ng/mL, solución muestra de losartán potásico, solución muestra de losartán potásico cargada con estándar de NDMA y NDEA a 2 ng/mL, fase móvil A (ácido fórmico al 0.1 % en agua), fase móvil B (ácido fórmico al 0.1 % en metanol) y diluyente (agua).

9.3. Validación del método analítico.

Una vez finalizado el desarrollo del método analítico, se procedió a la validación del mismo utilizando como base los parámetros de validación y criterios de aceptación de la Guía de Validación del Colegio Nacional de Químicos Farmacobiólogos.

9.3.1. Adecuabilidad del sistema.

La adecuabilidad del sistema se realizó mediante la evaluación de 6 lecturas de una solución estándar, es decir, en solución a 2 ng/mL de nitrosaminas (NDMA y NDEA).

- Se tomó una alícuota de 1.0 mL de la solución madre de nitrosaminas (descritas en el numeral 9.2.2) a un matraz volumétrico de 5 mL, se llevó a volumen con agua y se mezcló.
- Se mezcló en vortex durante 1 minuto.
- Se mezcló en un agitador orbital durante 40 minutos a 200 rpm.
- Se centrifugó a 4500 rpm durante 15 minutos.
- Se filtró a través de un acrodisco de celulosa regenerada (RC) de tamaño de poro de

0.45 μm descartando los primeros 2 mililitros del filtrado. Se colocó en un vial de cromatografía de líquidos.

El criterio de aceptación se tomó con base en lo indicado en el MGA 0612 Determinación de nitrosaminas en fármacos y preparados farmacéuticos.

Criterio de aceptación: $\% \text{ CV} \leq 10.0 \%$.

9.3.2. Precisión del sistema.

La precisión del sistema se evaluó mediante la inyección de 6 soluciones preparadas de manera independiente a una concentración de 2 ng/mL de nitrosaminas (NDMA y NDEA) en solución. Esta prueba busca evaluar la repetibilidad de la respuesta analítica de la solución.

- Se tomaron 6 alícuotas de 1.0 mL de la solución madre de nitrosaminas (descritas en el numeral 9.2.2) a matraces volumétricos independientes de 5 mL, se llevaron a volumen con agua y se mezclaron.
- Se mezclaron en vortex durante 1 minuto.
- Se mezclaron en un agitador orbital durante 40 minutos a 200 rpm.
- Se centrifugaron a 4500 rpm durante 15 minutos.
- Se filtraron a través de un acrodisco de celulosa regenerada (RC) de tamaño de poro de 0.45 μm descartando los primeros 2 mililitros del filtrado. Se colocaron en viales de cromatografía de líquidos.

El criterio de aceptación se tomó con base en lo indicado en el MGA 0612 Determinación de nitrosaminas en fármacos y preparados farmacéuticos.

Criterio de aceptación: $\% \text{ CV} \leq 10.0 \%$.

9.3.3. Intervalo lineal.

El intervalo lineal fue evaluado a través de 9 niveles preparados por triplicado a partir de la solución madre de nitrosaminas. Se evaluó un intervalo de concentración de 0.8 – 50 ng/mL de nitrosaminas (NDMA y NDEA).

El criterio de aceptación se tomó con base en la guía de validación de los Químicos Farmacéuticos Biólogos (QFBs) para la prueba de linealidad del sistema.

- Se realizaron 3 muestras en solución para cada nivel (8 niveles) de 0.8 ng/mL, 1 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 15 ng/mL, 20 ng/mL, 25 ng/mL y 50 ng/mL.
 - Nivel 0.8 ng/mL. Se adicionó 40 μ L de la solución madre de nitrosaminas (descritas en el numeral 9.2.2) a un matraz volumétrico de 5 mL, se llevó a volumen con agua y se mezcló.
 - Nivel 1 ng/mL. Se adicionó 50 μ L de la solución madre de nitrosaminas (descritas en el numeral 9.2.2) a un matraz volumétrico de 5 mL, se llevó a volumen con agua y se mezcló..
 - Nivel 5 ng/mL. Se adicionó 250 μ L de la solución madre de nitrosaminas (descritas en el numeral 9.2.2) a un matraz volumétrico de 5 mL, se llevó a volumen con agua y se mezcló.
 - Nivel 10 ng/mL. Se adicionó 500 μ L de la solución madre de nitrosaminas (descritas en el numeral 9.2.2) a un matraz volumétrico de 5 mL, se llevó a volumen con agua y se mezcló.
 - Nivel 15 ng/mL. Se adicionó 750 μ L de la solución madre de nitrosaminas (descritas en el numeral 9.2.2) a un matraz volumétrico de 5 mL, se llevó a volumen con agua y se mezcló.
 - Nivel 20 ng/mL. Se adicionó 1.0 mL de la solución madre de nitrosaminas (descritas en el numeral 9.2.2) a un matraz volumétrico de 5 mL, se llevó a volumen con agua y se mezcló.

- Nivel 25 ng/mL. Se adicionó 1.25 mL de la solución madre de nitrosaminas (descritas en el numeral 9.2.2) a un matraz volumétrico de 5 mL, se llevó a volumen con agua y se mezcló.
- Nivel 50 ng/mL. Se adicionó 2.5 mL de la solución madre de nitrosaminas (descritas en el numeral 9.2.2) a un matraz volumétrico de 5 mL, se llevó a volumen con agua y se mezcló.
- Se mezcló cada muestra en vortex durante 1 minuto.
- Se mezcló cada muestra en un agitador orbital durante 40 minutos a 200 rpm.
- Se centrifugó cada muestra a 4500 rpm durante 15 minutos.
- Se filtró cada muestra a través de un acrodisco de celulosa regenerada (RC) de tamaño de poro de 0.45 μm descartando los primeros 2 mililitros del filtrado. Se colocó en viales de cromatografía de líquidos.

Los criterios de aceptación son de acuerdo a la guía de validación de métodos analíticos del colegio de los QFB's [13]:

- $r^2 \geq 0.98$.
- El intervalo de confianza de la pendiente (IC (β_1)) de la curva de calibración, no debe incluir el 0.

9.3.4. Intervalo de Trabajo (Linealidad del Sistema).

El intervalo de trabajo (linealidad del sistema) se realizó a través de 6 niveles preparados por triplicado cada nivel. El intervalo evaluado fue de 1 – 25 ng/mL de nitrosaminas (NDMA y NDEA). Este criterio es solicitado principalmente por la Entidad Mexicana de Acreditación (EMA) y busca evidenciar que durante el intervalo que trabajes la respuesta es lineal con respecto a la concentración.

El criterio de aceptación se tomó con base en la guía de validación de los Químicos Farmacéuticos Biólogos (QFBs) para la prueba de linealidad del sistema.

- Se realizaron 3 muestras en solución para cada nivel (6 niveles) de 1 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 15 ng/mL, 20 ng/mL y 25 ng/mL.
 - Nivel 1 ng/mL. Se adicionó 50 μ L de la solución madre de nitrosaminas (descritas en el numeral 9.2.2) a un matraz volumétrico de 5 mL, se llevó a volumen con agua y se mezcló.
 - Nivel 5 ng/mL. Se adicionó 250 μ L de la solución madre de nitrosaminas (descritas en el numeral 9.2.2) a un matraz volumétrico de 5 mL, se llevó a volumen con agua y se mezcló.
 - Nivel 10 ng/mL. Se adicionó 500 μ L de la solución madre de nitrosaminas (descritas en el numeral 9.2.2) a un matraz volumétrico de 5 mL, se llevó a volumen con agua y se mezcló.
 - Nivel 15 ng/mL. Se adicionó 750 μ L de la solución madre de nitrosaminas (descritas en el numeral 9.2.2) a un matraz volumétrico de 5 mL, se llevó a volumen con agua y se mezcló.
 - Nivel 20 ng/mL. Se adicionó 1.0 mL de la solución madre de nitrosaminas (descritas en el numeral 9.2.2) a un matraz volumétrico de 5 mL, se llevó a volumen con agua y se mezcló.
 - Nivel 25 ng/mL. Se adicionó 1.25 mL de la solución madre de nitrosaminas (descritas en el numeral 9.2.2) a un matraz volumétrico de 5 mL, se llevó a volumen con agua y se mezcló.
- Se mezcló cada muestra en vortex durante 1 minuto.
- Se mezcló cada muestra en un agitador orbital durante 40 minutos a 200 rpm.
- Se centrifugó cada muestra a 4500 rpm durante 15 minutos.
- Se filtró cada muestra a través de un acrodisco de celulosa regenerada (RC) de tamaño de poro de 0.45 μ m descartando los primeros 2 mililitros del filtrado. Se colocó en viales de cromatografía de líquidos.

Los criterios de aceptación son de acuerdo a la guía de validación de métodos analíticos del colegio de los QFB's [13]:

- $r^2 \geq 0.98$.
- El intervalo de confianza de la pendiente (IC (β_1)) de la curva de calibración, no debe incluir el 0.

9.3.5. Especificidad / Selectividad.

La especificidad se demostró al inyectar los reactivos utilizados en la preparación y análisis de muestras, demostrando que no interfieren en la respuesta analítica de las nitrosaminas.

Se realizaron inyecciones de la solución estándar de Nitrosaminas, solución muestra, solución muestra adicionada, fase móvil A (ácido fórmico al 0.1 % en agua), fase móvil B (ácido fórmico 0.1 % en metanol), agua y metanol.

El criterio de aceptación se tomó con base en la guía de validación de los Químicos Farmacéuticos Biólogos (QFBs) para la prueba de linealidad del sistema.

Los criterios de aceptación son de acuerdo a la guía de validación de métodos analíticos del colegio de los QFB's [13]:

- No se debe observar señal analítica en el tiempo de retención de NDMA y NDEA en la fase móvil A, fase móvil B, agua o metanol.

9.3.6. Exactitud (Recuperación).

La exactitud del método se realizó mediante la evaluación de 6 muestras de materia prima cargadas a 0.064 $\mu\text{g/g}$ de NDMA y 0.0177 $\mu\text{g/g}$ de NDEA. Las cuales equivalen a 12.8 ng/mL de NDMA y 3.54 ng/mL de NDEA.

- Se pesaron 6 muestras de 1 g de losartán potásico y se transfirieron a matraces volumétricos de 5 mL.
- NDMA.

- Se tomó una alícuota de 10 μL de la solución estándar de NDMA a 1 mg/mL y se transfirió a un matraz volumétrico de 100 mL. Esta solución tiene una concentración de 0.1 $\mu\text{g/mL}$.
- Se pesaron 6 muestras de 1 g de losartán potásico y se transfirieron a matraces volumétricos independientes de 5 mL.
- Se adicionó a cada matraz 640 μL de la solución. Esta solución tiene una concentración de 0.064 $\mu\text{g/g}$.
- Se llevó a volumen con agua y se mezcló. Esta solución tiene una concentración aproximada de 12.8 ng/mL.
- NDEA.
 - Se tomó una alícuota de 10 μL de la solución estándar de NDEA a 1 mg/mL y se transfirió a un matraz volumétrico de 100 mL. Esta solución tiene una concentración de 0.1 $\mu\text{g/mL}$.
 - Se pesaron 6 muestras de 1 g de losartán potásico y se transfirieron a matraces volumétricos independientes de 5 mL.
 - Se adicionó a cada matraz 177 μL de la solución. Esta solución tiene una concentración de 0.0177 $\mu\text{g/g}$.
 - Se llevó a volumen con agua y se mezcló. Esta solución tiene una concentración aproximada de 3.54 ng/mL de NDEA.
- Se mezcló cada muestra en vortex durante 1 minuto.
- Se mezcló cada muestra en un agitador orbital durante 40 minutos a 200 rpm.
- Se centrifugó cada muestra a 4500 rpm durante 15 minutos.
- Se filtró cada muestra a través de un acrodisco de celulosa regenerada (RC) de tamaño de poro de 0.45 μm descartando los primeros 2 mililitros del filtrado. Se colocó en viales de cromatografía de líquidos.

Los criterios de aceptación considerados para esta prueba son los descritos por la Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura (CCAYAC-CR-04), los cuales son:

- Porcentaje de cantidad recuperada se encuentra entre 80 % a 120 % para métodos de impurezas.

- % CV \leq 20.0 % para métodos de impurezas.

9.3.7. Linealidad del Método.

La linealidad del método se realizó mediante la preparación de muestras en matriz en un intervalo de 1 – 25 ng/mL preparando curvas por triplicado.

- Se pesaron 18 muestras de 1 g de losartán potásico y se transfirieron a matraces volumétricos de 5 mL. De esas muestras 3 eran para el nivel con concentración de 1 ng/mL, 3 para la concentración de 5 ng/mL, 3 para la concentración de 10 ng/mL, 3 para la concentración de 15 ng/mL, 3 para la concentración de 20 ng/mL y 3 para la concentración de 5 ng/mL.
 - Nivel 1 ng/mL. Se adicionó 50 μ L de la solución madre de nitrosaminas (descritas en el numeral 9.2.2) al matraz volumétrico con el losartán potásico, se llevó a volumen con agua y se mezcló.
 - Nivel 5 ng/mL. Se adicionó 250 μ L de la solución madre de nitrosaminas (descritas en el numeral 9.2.2) al matraz volumétrico con el losartán potásico, se llevó a volumen con agua y se mezcló.
 - Nivel 10 ng/mL. Se adicionó 500 μ L de la solución madre de nitrosaminas (descritas en el numeral 9.2.2) al matraz volumétrico con el losartán potásico, se llevó a volumen con agua y se mezcló.
 - Nivel 15 ng/mL. Se adicionó 750 μ L de la solución madre de nitrosaminas (descritas en el numeral 9.2.2) al matraz volumétrico con el losartán potásico, se llevó a volumen con agua y se mezcló.
 - Nivel 20 ng/mL. Se adicionó 1.0 mL de la solución madre de nitrosaminas (descritas en el numeral 9.2.2) al matraz volumétrico con el losartán potásico, se llevó a volumen con agua y se mezcló.
 - Nivel 25 ng/mL. Se adicionó 1.25 mL de la solución madre de nitrosaminas (descritas en el numeral 9.2.2) al matraz volumétrico con el losartán potásico, se llevó a volumen con agua y se mezcló.
- Se mezcló cada muestra en vortex durante 1 minuto.

- Se mezcló cada muestra en un agitador orbital durante 40 minutos a 200 rpm.
- Se centrifugó cada muestra a 4500 rpm durante 15 minutos.
- Se filtró cada muestra a través de un acrodisco de celulosa regenerada (RC) de tamaño de poro de 0.45 μm descartando los primeros 2 mililitros del filtrado. Se colocó en viales de cromatografía de líquidos.

Los criterios de aceptación considerados para esta prueba son los descritos por la Guía de Validación de Métodos Analíticos por los Químicos Farmacéuticos Biólogos:

- Porcentaje de cantidad recuperada se encuentra entre 80 % a 120 %.
- % CV \leq 20.0 % para métodos de impurezas.

9.3.8. Límite de detección y límite de cuantificación.

Los límites de detección se evaluaron a partir de una curva leída por triplicado para evaluar la concentración mínima detectable que presente una señal/ruido mayor o igual a 3. Para el límite de cuantificación se determina utilizar la concentración de 1 ng/mL, ya que este es la concentración más baja indicada en el MGA 0612 “Determinación de Nitrosaminas en Fármacos y Preparados Farmacéuticos” para ambas nitrosaminas NDMA y NDEA.

Para la curva de la determinación del límite de detección se evaluaron 5 niveles (0.2 ng/mL, 0.3 ng/mL, 0.5 ng/mL, 0.8 ng/mL y 1 ng/mL) y se pesó 1 g de losartán potásico para evaluar cada nivel.

- Nivel 0.2 ng/mL. Se adicionó 10 μL de la solución madre de nitrosaminas (descritas en el numeral 9.2.2) al matraz volumétrico con el losartán potásico, se llevó a volumen con agua y se mezcló.
- Nivel 0.3 ng/mL. Se adicionó 15 μL de la solución madre de nitrosaminas (descritas en el numeral 9.2.2) al matraz volumétrico con el losartán potásico, se llevó a volumen con agua y se mezcló.

- Nivel 0.5 ng/mL. Se adicionó 25 μ L de la solución madre de nitrosaminas (descritas en el numeral 9.2.2) al matraz volumétrico con el losartán potásico, se llevó a volumen con agua y se mezcló.
- Nivel 0.8 ng/mL. Se adicionó 40 μ L de la solución madre de nitrosaminas (descritas en el numeral 9.2.2) al matraz volumétrico con el losartán potásico, se llevó a volumen con agua y se mezcló.
- Nivel 1 ng/mL. Se adicionó 50 μ L de la solución madre de nitrosaminas (descritas en el numeral 9.2.2) al matraz volumétrico con el losartán potásico, se llevó a volumen con agua y se mezcló.
- Se mezcló cada muestra en vortex durante 1 minuto.
- Se mezcló cada muestra en un agitador orbital durante 40 minutos a 200 rpm.
- Se centrifugó cada muestra a 4500 rpm durante 15 minutos.
- Se filtró cada muestra a través de un acrodisco de celulosa regenerada (RC) de tamaño de poro de 0.45 μ m descartando los primeros 2 mililitros del filtrado. Se colocó en viales de cromatografía de líquidos.

9.3.9. Precisión y Exactitud del límite de cuantificación.

La precisión y exactitud del límite de cuantificación se evaluó a la concentración de 1 ng/mL, ya que este es la concentración más baja indicada en el MGA 0612 “Determinación de Nitrosaminas en Fármacos y Preparados Farmacéuticos”.

- Se pesó por sextuplicado 1 g de materia prima de losartán potásico y se colocó en matraces independientes de 5 mL.
- Se adicionó 50 μ L de la solución madre de nitrosaminas (descritas en el numeral 9.2.2) al matraz volumétrico con el losartán potásico, se llevó a volumen con agua y se mezcló.
- Se mezcló cada muestra en vortex durante 1 minuto.
- Se mezcló cada muestra en un agitador orbital durante 40 minutos a 200 rpm.
- Se centrifugó cada muestra a 4500 rpm durante 15 minutos.

- Se filtró cada muestra a través de un acrodisco de celulosa regenerada (RC) de tamaño de poro de 0.45 μm descartando los primeros 2 mililitros del filtrado. Se colocó en viales de cromatografía de líquidos.

Los criterios de aceptación considerados para esta prueba son los descritos por la Guía de Validación de Métodos Analíticos por los Químicos Farmacéuticos Biólogos:

- Porcentaje de cantidad recuperada se encuentra entre 80 % a 120 % para el límite de cuantificación.
- $\% \text{ CV} \leq 20.0 \%$ para las 6 determinaciones del límite de cuantificación.

9.3.10. Repetibilidad.

La repetibilidad se evaluó con 6 muestras adicionadas con nitrosaminas a la concentración de 2 ng/mL para NDMA y NDEA.

- Se pesó por sextuplicado 1 g de materia prima de losartán potásico y se colocó en matraces independientes de 5 mL.
- Se adicionó 100 μL de la solución madre de nitrosaminas (descritas en el numeral 9.2.2) al matraz volumétrico con el losartán potásico, se llevó a volumen con agua y se mezcló.
- Se mezcló cada muestra en vortex durante 1 minuto.
- Se mezcló cada muestra en un agitador orbital durante 40 minutos a 200 rpm.
- Se centrifugó cada muestra a 4500 rpm durante 15 minutos.
- Se filtró cada muestra a través de un acrodisco de celulosa regenerada (RC) de tamaño de poro de 0.45 μm descartando los primeros 2 mililitros del filtrado. Se colocó en viales de cromatografía de líquidos.

Los criterios de aceptación considerados para esta prueba son los descritos por la Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura (CCAYAC-CR-04), los cuales son:

- $\% \text{ CV} \leq 20.0 \%$ para las 6 muestras.

9.3.11. Precisión Intermedia.

La precisión intermedia se evaluó con 3 muestras adicionadas a la concentración del estándar de cuantificación de NDMA y NDEA (2 ng/mL) por 3 analistas en 2 días diferentes.

- Se pesó por triplicado por cada analista y por cada día de trabajo 1 g de materia prima de losartán potásico y se colocó en matraces independientes de 5 mL.
- Se adicionó 100 μ L de la solución madre de nitrosaminas (descritas en el numeral 9.2.2) al matraz volumétrico con el losartán potásico, se llevó a volumen con agua y se mezcló.
- Se mezcló cada muestra en vortex durante 1 minuto.
- Se mezcló cada muestra en un agitador orbital durante 40 minutos a 200 rpm.
- Se centrifugó cada muestra a 4500 rpm durante 15 minutos.
- Se filtró cada muestra a través de un acrodisco de celulosa regenerada (RC) de tamaño de poro de 0.45 μ m descartando los primeros 2 mililitros del filtrado. Se colocó en viales de cromatografía de líquidos.

Los criterios de aceptación considerados para esta prueba son los descritos por la Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura (CCAYAC-CR-04), los cuales son:

- % CV \leq 20.0 % para las 6 muestras por cada analista.
- % CV \leq 25.0 % para las 12 muestras globales.

9.3.12. Sesgo.

El sesgo se evaluó con los resultados obtenidos de la exactitud del método al restar la cantidad de nitrosaminas adicionadas menos la cantidad de nitrosaminas recuperadas con los datos de exactitud.

9.3.13. Robustez.

La robustez se evaluó con el tamaño de poro del tipo de filtro de Celulosa Regenerada (RC) utilizando. El filtro cual es utilizado para limpiar en mayor cantidad la muestra previo a su inyección en el equipo. Los tamaños de poro evaluados fueron de 0.2 y 0.45 μm .

- Se peso por sextuplicado 1 g de materia prima de losartán potásico y se colocó en matraces independientes de 5 mL.
- Se adicionó 100 μL de la solución madre de nitrosaminas (descritas en el numeral 9.2.2) al matraz volumétrico con el losartán potásico, se llevó a volumen con agua y se mezcló.
- Se mezcló cada muestra en vortex durante 1 minuto.
- Se mezcló cada muestra en un agitador orbital durante 40 minutos a 200 rpm.
- Se centrifugó cada muestra a 4500 rpm durante 15 minutos.
- Se filtraron 3 muestras a través de un acrodisco de celulosa regenerada (RC) de tamaño de poro de 0.45 μm y 3 muestras a través de un acrodisco de celulosa regenerada (RC) de tamaño de poro de 0.2 μm . En ambos casos se descartaron los primeros 2 mililitros del filtrado. Se colocó en viales de cromatografía de líquidos.

Los criterios de aceptación considerados para esta prueba son los descritos por la Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura (CCAYAC-CR-04), los cuales son:

- Diferencia absoluta ≤ 20.0 % para la condición evaluada para métodos de impurezas.
-

9.3.14. Estabilidad del Estándar.

La estabilidad se evaluó con estándar de nitrosaminas preparado a 2 ng/mL en condiciones de temperatura ambiente y en refrigeración.

- Se tomaron 15 alícuotas de 100 μ L del estándar de cada nitrosamina de NDMA y NDEA y se transfirieron a matraces volumétricos independientes de 100 mL. Esta solución tiene una concentración de 1 μ g/mL.
- Se tomó una alícuota de 100 μ L y se transfirió a un matraz volumétrico de 50 mL de manera independiente. Esta solución tiene una concentración de 2 ng/mL.
- Se evaluaron 3 soluciones preparadas en ese momento y se guardaron 6 soluciones más en refrigeración y 6 soluciones más a temperatura ambiente.
- A las 24 horas se evaluaron 3 muestras de refrigeración y 3 muestras a temperatura ambiente. Posteriormente a las 48 horas se evaluaron otras 3 muestras de refrigeración y 3 muestras a temperatura ambiente.

Los criterios de aceptación considerados para esta prueba son los descritos por la Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura (CCAYAC-CR-04), los cuales son:

- Diferencia absoluta ≤ 20.0 % para la condición evaluada.

9.3.15. Estabilidad de la Muestra.

La estabilidad se evaluó con muestras adicionadas de nitrosaminas a 2 ng/mL en condiciones de temperatura ambiente y en refrigeración.

- Se pesaron 15 muestras de 1 g de materia prima de losartán potásico y se colocó en matraces independientes de 5 mL.
- Se adicionó 100 μ L de la solución madre de nitrosaminas (descritas en el numeral 9.2.2) al matraz volumétrico con el losartán potásico, se llevó a volumen con agua y se mezcló.
- Se mezcló cada muestra en vortex durante 1 minuto.
- Se mezcló cada muestra en un agitador orbital durante 40 minutos a 200 rpm.
- Se centrifugó cada muestra a 4500 rpm durante 15 minutos.

- Se filtró cada muestra a través de un acrodisco de celulosa regenerada (RC) de tamaño de poro de 0.45 μm descartando los primeros 2 mililitros del filtrado. Se colocó en viales de cromatografía de líquidos.
- Se evaluaron 3 soluciones preparadas en ese momento y se guardaron 6 soluciones más en refrigeración y 6 soluciones más a temperatura ambiente.
- A las 24 horas se evaluaron 3 muestras de refrigeración y 3 muestras a temperatura ambiente. Posteriormente a las 48 horas se evaluaron otras 3 muestras de refrigeración y 3 muestras a temperatura ambiente.

Los criterios de aceptación considerados para esta prueba son los descritos por la Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura (CCAYAC-CR-04), los cuales son:

- Diferencia absoluta ≤ 20.0 % para la condición evaluada.

9.3.16. Incertidumbre.

Para la determinación de incertidumbre, se realiza el cálculo para las fuentes que contribuyen en la imedición entre las cuales se encuentra:

- La solución de referencia.
- Variabilidad del método.
- Preparación de la muestra.

Para la solución de referencia se consideró la potencia del estándar, para la de la muestra se consideró la balanza utilizada así como el material volumétrico utilizado para su preparación y la variabilidad del método se evaluó con respecto a los resultados de precisión intermedia ya que está incluye la propia variabilidad de los analistas.

9.4. Cuantificación de muestras de producto terminado.

Finalmente se cuantificaron por duplicado 5 lotes de materia prima de losartán potásico y 1 lote de producto terminado de metformina, ácido acetilsalicílico, ibuprofeno y naproxeno utilizando el método analítico desarrollado y validado.

10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

10.1. Desarrollo del método analítico.

10.1.1. Parámetros de detección por espectrometría de masas.

Para poder definir los parámetros de detección adecuados de ambas nitrosaminas, se evaluó el conteo total de iones (TIC), en donde está establecido por recomendación que aquellos valores de TIC con magnitudes arriba de 1×10^5 significa que ya tienen buena señal analítica con respecto al propio ruido del equipo. De igual manera, se solicita que los picos cromatográficos muestren una forma gaussiana.

La Figura 8 muestra el cromatograma obtenido de la nitrosamina NDMA, en donde se observa que tiene un tiempo de retención de 1.614 minutos y tiene una buena señal con respecto al ruido de toda la matriz.

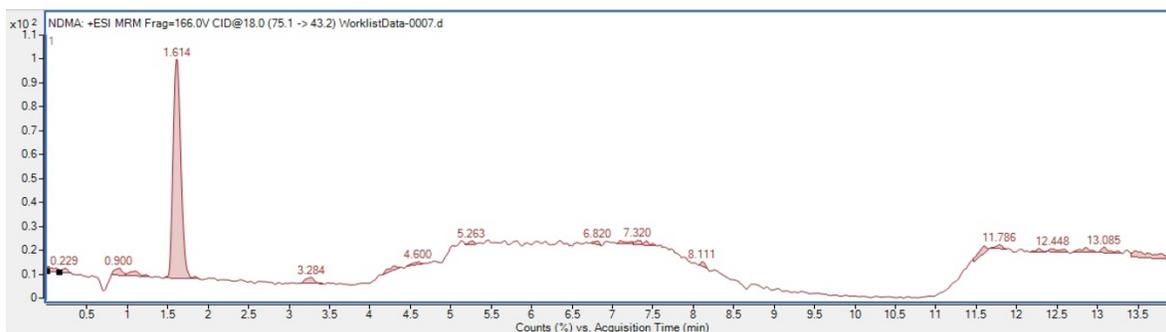


Figura 8. Cromatograma tipo de NDMA a 25 ng/mL.

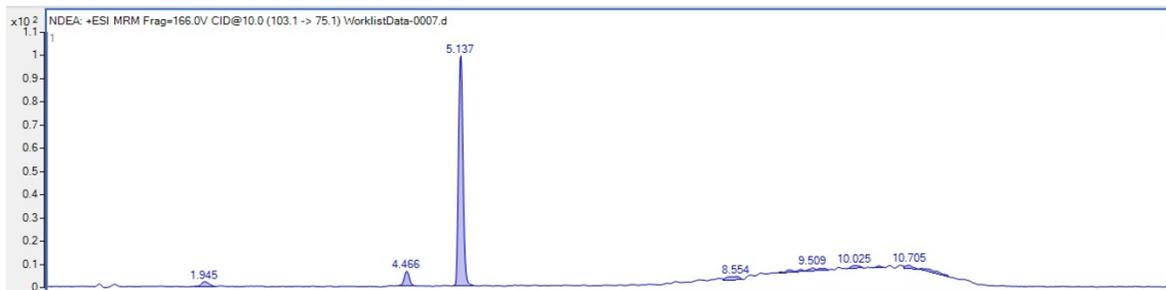


Figura 9. Cromatograma tipo de NDEA a 25 ng/mL.

La Figura 9 muestra el cromatograma correspondiente a la nitrosamina NDEA, en donde se observa que tiene un tiempo de retención de aproximadamente 5.137 minutos, lo cual es de gran utilidad ya que significa que está separado completamente del activo (losartán potásico) y eso a su vez permitió que a partir de los 7 minutos sea posible mandar todo a desechos y evitar que llegue al detector y lo ensucie.

10.1.2. Preparación de la muestra.

La evaluación de la preparación de la muestra conforme a lo indicado en el “MGA 0612 Determinación de Nitrosaminas en fármacos y preparados farmacéuticos” dio resultados satisfactorios ya que se obtuvieron porcentajes de recobro entre 80 – 120 %, lo cual indicó que el método de extracción era adecuado para recuperar las dos nitrosaminas evaluadas.

10.1.3. Método analítico mediante UPLC acoplado a espectrometría de masas de triple cuadrupolo.

Al finalizar las pruebas del desarrollo del método analítico, se encontró un gradiente con tiempo final de corrida de 14 minutos.

10.1.4. Linealidad del sistema

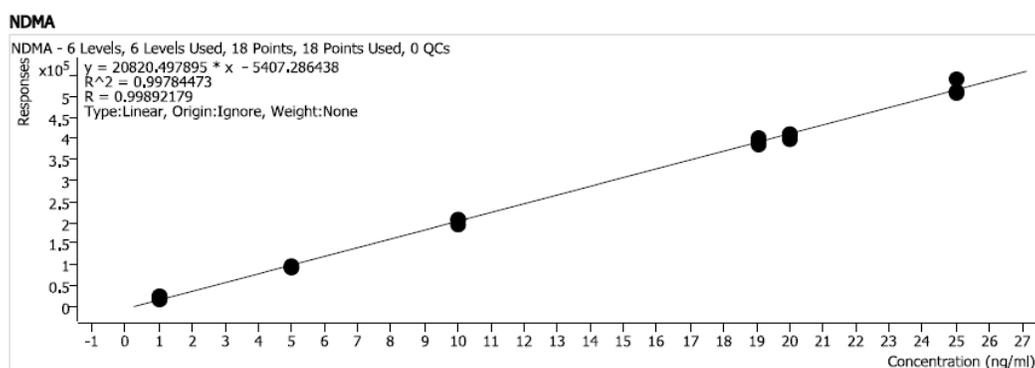


Figura 10. Linealidad en matriz de NDMA en el desarrollo del método analítico.

La Figura 10 muestra los resultados de la linealidad en materia prima de losartán potásico (matriz) cargada con NDMA a concentraciones de 1 – 25 ng/mL. En dicha figura se observa la ecuación de la recta es $y = 20820.497895x - 5407.286438$, tiene una $r^2 = 0.99784473$ y

una $r = 0.99892179$ lo cual indica que existe una correlación entre la concentración adicionada vs respuesta analítica.

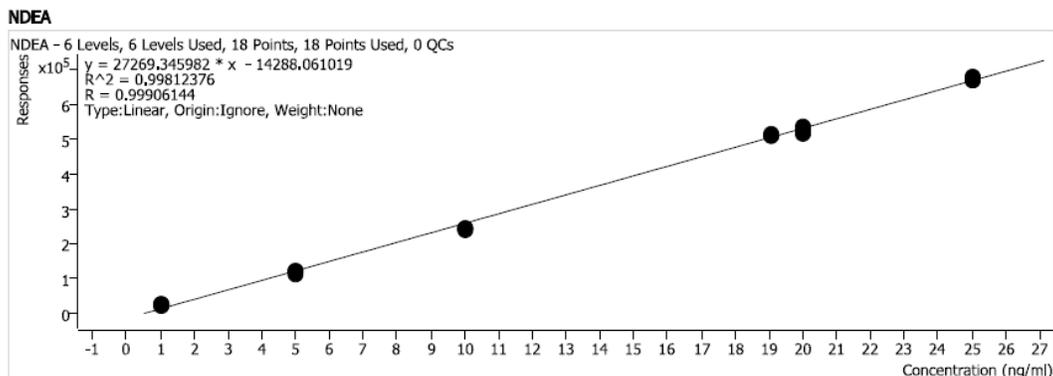


Figura 11. Linealidad en matriz de NDEA en el desarrollo del método analítico.

La Figura 11 muestra los resultados de la linealidad matriz cargada con NDEA a concentraciones de 1 – 25 ng/mL. En dicha figura se observa la ecuación de la recta es $y = 27269.345982x - 14288.061019$, tiene una $r^2 = 0.99812376$ y una $r = 0.99906144$ lo cual indica que existe una correlación entre la concentración adicionada vs respuesta analítica.

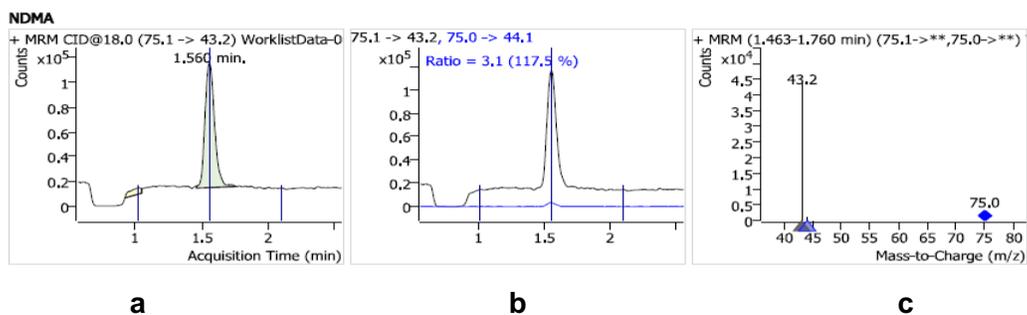


Figura 12. Cromatogramas y espectro de NDMA a 25 ng/mL en materia prima de losartán potásico.

La Figura 12a y la Figura 12b muestra los cromatogramas obtenidos para NDMA a 25 ng/mL en materia prima de losartán potásico. La Figura 12a muestra el transición que cuantifica. 75.1 -> 43.2 y la Figura 12b muestra la transición que confirma que el analito que se está detectando es NDMA con una transición de 75.0 -> 44.1 con una precisión del 117.5 %. Finalmente la Figura 12c muestra el espectro de masas con su respectivos ión padre y el ión hijo que se están monitoreando en la inyección analítica.

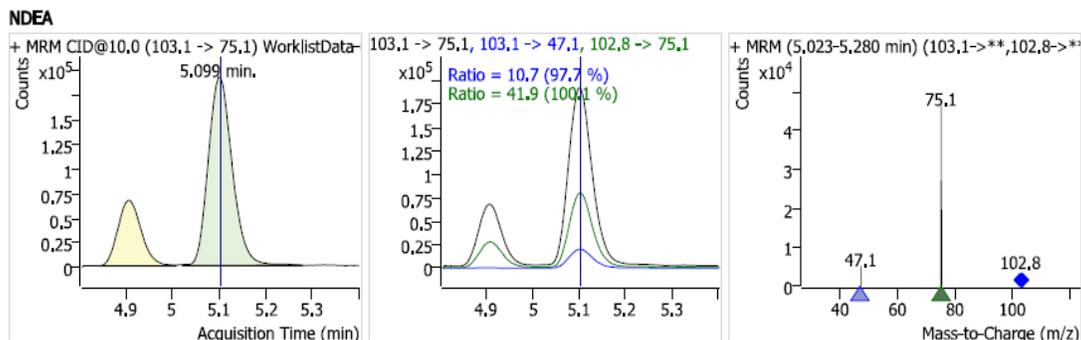


Figura 13. Cromatogramas y espectro de NDEA a 25 ng/mL en materia prima de losartán potásico.

La Figura 13a y la Figura 13b muestra los cromatogramas obtenidos para NDEA a 25 ng/mL en materia prima de losartán potásico. La Figura 13a muestra el transición que cuantifica. 103.1 -> 75.1 y la Figura 13b muestra la transición que confirma que el analito que se está detectando es NDEA con una transición de 103.1 -> 47.1 con una precisión del 97.7 %. Finalmente la Figura 13c muestra el espectro de masas con su respectivos ión padre y el ión hijo que se están monitoreando en la inyección analítica.

Tanto en la Figura 12 como en la Figura 13 se observa que la señal analítica tiene magnitudes en su señales por arriba de 1×10^5 en ambos, lo cual indica que tiene una buena detección con respecto a la señal ruido que tiene el propio instrumento.

Aunado a la evaluación de las señales y la linealidad del sistema, se sacaron los intervalos de confianza de la pendiente para ambas nitrosaminas, obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 5. Intervalo de confianza de la NDMA.

Intervalo de confianza de la pendiente	
b1	20821
rcuad(n)	4.2426
S b1	0.0273
t 0.975,16	2.1200
LS	20821
LI	20820

Tabla 6. Intervalo de confianza de la NDEA.

Intervalo de confianza de la pendiente	
b1	27269
rcuad(n)	4.2426
S b1	0.0273
t 0.975,16	2.1200
LS	27269
LI	27268

El valor de la pendiente muestra la relación que existe entre el eje y con respecto al eje x. Cuando la pendiente es igual a 0 eso significa que sin importar el valor de x, el valor de y siempre será el mismo (la ordenada al origen).

$$Y = mx + b$$

$$Y = (0)x + b$$

$$Y = b$$

Por lo tanto, al obtener intervalos de confianza en los que no se involucre el 0, se demuestra que existe una relación entre la concentración y la respuesta analítica.

Para ambas nitrosaminas se cumplió con dicho criterio ya que la Tabla 5 muestra un intervalo de confianza de la pendiente para NDMA de 20820 – 20821 y la Tabla 6 muestra un intervalo de confianza de la pendiente para NDEA de 27268 – 27269.

10.1.5. Especificidad

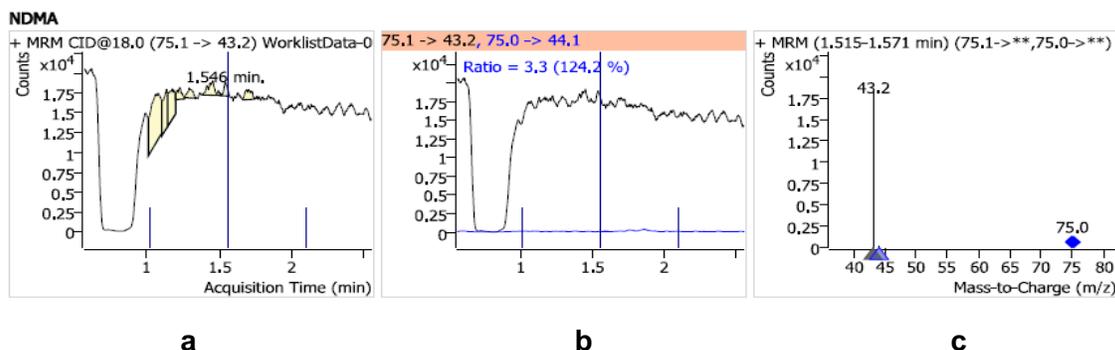


Figura 14. Cromatogramas de blanco en matriz para NDMA.

En la Figura 14a y 14b se observan el ión cuantificador y el ión de confirmación respectivamente de NDMA y la Figura 14c corresponde al espectro de masas que el equipo estuvo monitoreando cuando se realizó la inyección.

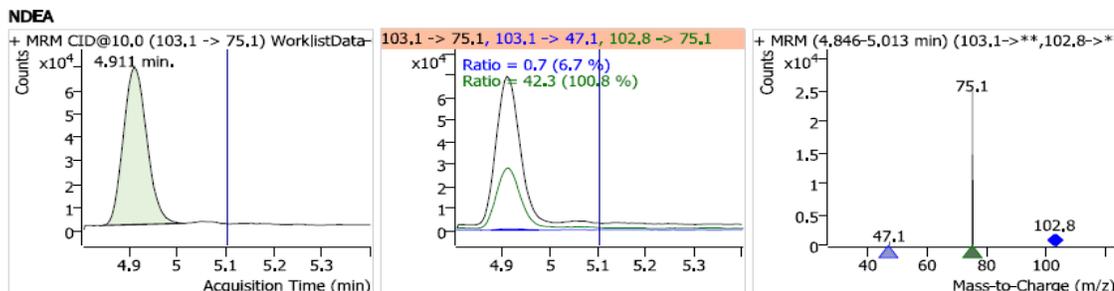


Figura 15. Cromatogramas de blanco en matriz para NDEA.

En la Figura 15a y 15b se observan el ión cuantificador y el ión de confirmación respectivamente de NDEA y la Figura 15c corresponde al espectro de masas que el equipo estuvo monitoreando cuando se realizó la inyección. A diferencia de la Figura 14, se puede observar una señal cromatográfica al tiempo de retención de 4.911. Sin embargo, no coincide con el tiempo de retención de NDEA (5.1 aproximadamente), aunado de que en la Figura 15b se observa que la confirmación del ión es de 6.7 % considerándose como compuestos diferentes.

10.2. Validación del método analítico.

10.2.1. Adecuabilidad del sistema.

Tabla 7 y Tabla 8 se muestran los resultados obtenidos de la prueba de adecuabilidad, donde se observa que los % CV de la respuesta de NDMA y NDEA son menores a 10 %.

Tabla 7. Resultados de adecuabilidad NDMA.

MUESTRA	RESPUESTA NDMA
M1	52410
M2	54106
M3	53659
M4	51960
M5	51129
M6	52068
Promedio	52555.3
% CV	2.13

Tabla 8. Resultados de adecuabilidad NDEA.

MUESTRA	RESPUESTA NDEA
M1	44209
M2	43515
M3	43639
M4	43597
M5	45821
M6	45368
Promedio	44358.2
% CV	2.25

La adecuabilidad del sistema nos demuestra que el equipo cromatográfico funciona adecuadamente, ya que son 6 inyecciones repetidas de un mismo vial. Por lo que la variación que se tuvo de la respuesta analítica es debida únicamente al equipo cromatográfico. El MGA 0612 indica que se permite una variación máxima de 10 %. En la Tabla 7 en la Tabla 8 se observan los valores de % CV de ambos analitos, en donde se cumple con el criterio de aceptación.

10.2.2. Precisión del sistema.

En la Tabla 9 y Tabla 10 se muestran los resultados obtenidos de la prueba de precisión del sistema, donde se observa que los % CV de la respuesta de NDMA y NDEA de las seis soluciones son menores a 10 %.

Tabla 9. Resultados de precisión del sistema NDMA.

MUESTRA	RESPUESTA NDMA
M1	52928
M2	51234
M3	54753
M4	50810
M5	52185
M6	55045
Promedio	52826
% CV	3.35

Tabla 10. Resultados de precisión del sistema NDEA.

MUESTRA	RESPUESTA NDEA (área)
M1	44481
M2	42364
M3	42305
M4	45385
M5	42764
M6	42931
Promedio	43372
% CV	2.92

La precisión del sistema se diferencia de la adecuabilidad porque son preparaciones independientes a una concentración específica. Dicha prueba evalúa la variación de la respuesta analítica propia del activo no la variación que tenga el equipo analítico. Se observa en ambas tablas que el criterio de aceptación se cumple al tener valores menos al 10 %.

10.2.3. Intervalo Lineal.

En la Tabla 11 se muestran los resultados obtenidos para el intervalo lineal de NDMA. Para dicha prueba se analiza la respuesta analítica que se tiene a diferentes concentraciones. Esta prueba fue realizada por triplicado

Tabla 11. Intervalo lineal – NDMA.

CONCENTRACIÓN (ng/mL)	ÁREA
0.8	18967
	17604
	15773
1	21743
	24042
	24541
5	141230
	147561
	139540
10	276635
	269809
	273929
15	431437
	416374
	417299
20	577269
	554532
	554101
25	718908
	721890
	723990

CONCENTRACIÓN (ng/mL)	ÁREA
30	838749
	841935
	851546
50	1452598
	1487473
	1460866

En las Tablas 12 se muestran los resultados de la ecuación de la recta obtenida por medio del programa Statgraphics versión 19.:

$$y = 29256.4x - 12661.8$$

Tabla 12. Modelo lineal $Y = a + b \cdot X$ NDMA.

	Estimado de	Error	Estadístico	
Parámetro	Mínimos Cuadrados	Estándar	T	Valor-P
Intercepto	-12661.8	3973.22	-3.18678	0.0038
Pendiente	29256.4	172.466	169.636	0.0000

Tabla 13. Análisis de Varianza – NDMA.

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	5.25075E12	1	5.25075E12	28776.35	0.0000
Residuo	4.56169E9	25	1.82468E8		
Falta de Ajuste	3.23287E9	7	4.61838E8	6.26	0.0008
Error Puro	1.32882E9	18	7.38233E7		
Total (Corr.)	5.25531E12	26			

Coefficiente de correlación = 0.999566

R-Cuadrada = 99.9132 por ciento

En la Tabla 13 se muestran los resultados del análisis de varianza que se realizó para NDMA, en donde se observa que el valor de P es menor a 0.05, por lo que se aceptaría la hipótesis alterna en donde dice que al menos una media es diferente al resto. Lo cuál tiene sentido y demuestra la linealidad ya que cada concentración tiene una respuesta diferente.

Finalmente, en la Tabla 14 se muestran los resultados obtenidos para el intervalo de confianza de la pendiente (28901.2 – 29611.6), en donde se demuestra que no incluye el cero y que existe una correlación entre la concentración y el área obtenida para NDMA.

Tabla 14. Intervalos de confianza del 95.0% para los estimados de los coeficientes – NDMA.

Parámetro	Estimado	Error Estándar	Límite Inferior	Límite Superior
CONSTANTE	-12661.8	3973.22	-20844.8	-4478.76
PENDIENTE	29256.4	172.466	28901.2	29611.6

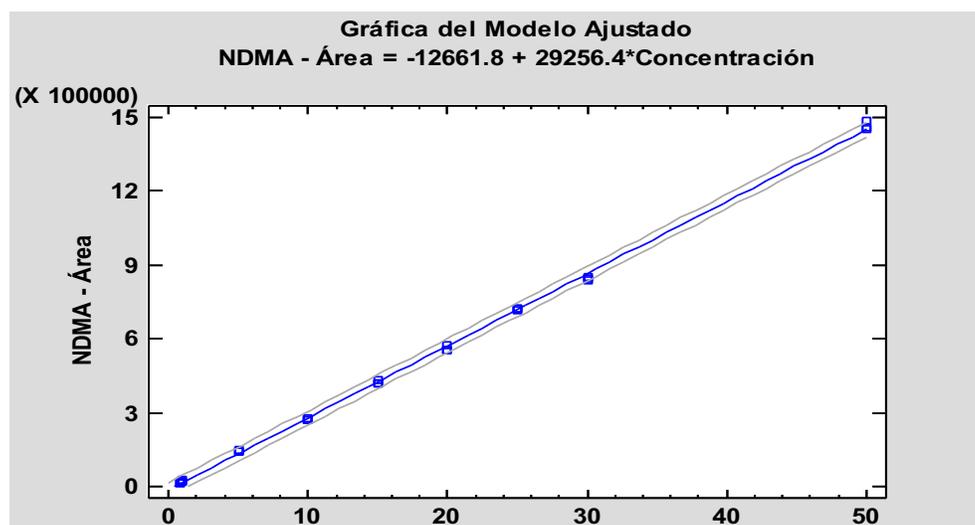


Figura 16. Intervalo lineal NDMA (0.8 - 50 ng/mL).

En la Figura 16 se observa el comportamiento gráfico de NDMA para las 3 curvas que se realizaron en donde se tiene en el eje de las x las concentraciones que van de 0.8 – 50 ng/mL y en el eje y se tiene la respuesta analítica (área) a esas concentraciones.

En la Tabla 15 se muestran los resultados obtenidos para NDEA en cuanto a área con respecto a la concentración evaluada.

Tabla 15. Intervalo lineal – NDEA.

CONCENTRACIÓN (ng/mL)	ÁREA
0.8	22332
	25490
	21404
1	24756
	24798
	29791
5	109327
	119292
	124294
10	241436
	232189
	239250
15	341892
	358078
	356528
20	472901
	479549
	468412
25	609147
	606005
	604705
30	718451
	731962
	724430
50	1278801
	1278838
	1280977

En las Tablas 16 se muestran los resultados de la ecuación de la recta obtenida por medio del programa Statgraphics versión 19.:

$$y = 25295.2x - 13845.4$$

Tabla 16. Modelo Lineal $Y = a + b \cdot X - NDEA$.

	Estimado de	Error	Estadístico	
Parámetro	Mínimos Cuadrados	Estándar	T	Valor-P
Intercepto	-13845.4	5182.0	-2.67182	0.0131
Pendiente	25295.2	224.935	112.456	0.0000

Tabla 17. Análisis de Varianza – NDEA.

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	3.92515E12	1	3.92515E12	12646.26	0.0000
Residuo	7.7595E9	25	3.1038E8		
Falta de Ajuste	7.2432E9	7	1.03474E9	36.07	0.0000
Error Puro	5.163E8	18	2.86834E7		
Total (Corr.)	3.9329E12	26			

Coeficiente de correlación = 0.999013

R-Cuadrada = 99.8027 por ciento

En la Tabla 17 se muestran los resultados del análisis de varianza que se realizó para NDEA, en donde se observa que el valor de P es menor a 0.05, por lo que se aceptaría la hipótesis alterna en donde dice que al menos una media es diferente al resto. Lo cuál tiene sentido y demuestra la linealidad ya que cada concentración tiene una respuesta diferente.

Finalmente, en la Tabla 18 se muestran los resultados obtenidos para el intervalo de confianza de la pendiente (24831.9 – 25758.5), en donde se demuestra que no incluye el cero y que existe una correlación entre la concentración y el área obtenida para NDEA.

Tabla 18. Intervalos de confianza del 95.0% para los estimados de los coeficientes – NDEA.

Parámetro	Estimado	Error Estándar	Límite Inferior	Límite Superior
INTERCEPTO	-13845.4	5182.0	-24517.9	-3172.83
PENDIENTE	25295.2	224.935	24831.9	25758.5

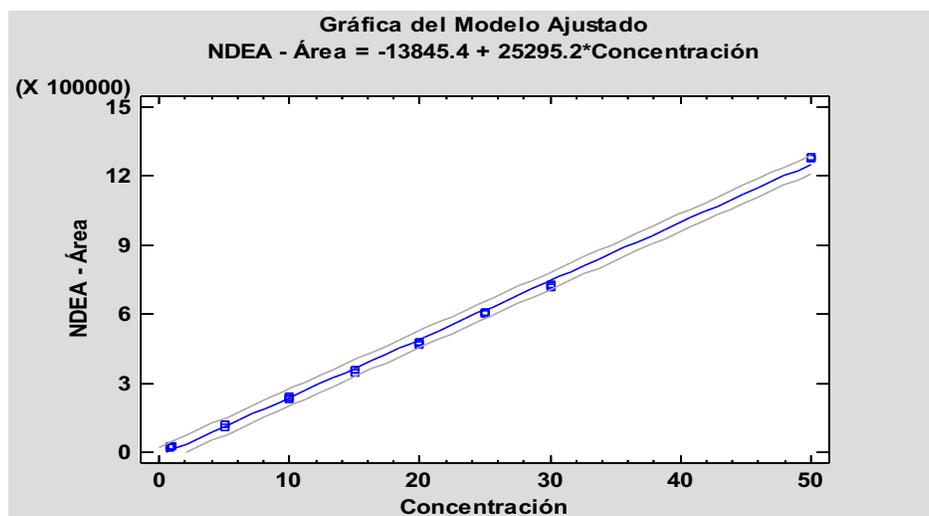


Figura 17. Intervalo lineal NDEA (0.8 – 50 ng/mL).

En la Figura 17 se observa el comportamiento de las concentraciones con respecto a su área para NDEA en las 3 curvas realizadas.

10.2.4. Intervalo de trabajo (Linealidad del sistema).

En la Tabla 19 se muestran los resultados obtenidos del intervalo de trabajo, que a diferencia del intervalo lineal, este demuestra solo el rango en el que se espera que se encuentren las concentraciones de nitrosaminas de losartán potásico.

Tabla 19. Intervalo de trabajo NDMA.

CONCENTRACIÓN (ng/mL)	ÁREA
1	21743
	24042

CONCENTRACIÓN (ng/mL)	ÁREA
	24541
5	141230
	147561
	139540
10	276635
	269809
	273929
15	431437
	416374
	417299
20	577269
	554532
	554101
25	718908
	721890
	723990

En la Tabla 20, se muestran los resultados obtenidos de la ecuación de la recta obtenida por medio del programa Statgraphics versión 19.:

$$y = 28808.3x - 7414.19$$

Tabla 20. Modelo Lineal: $Y = a + b \cdot X - \text{NDMA}$.

	Estimado de	Error	Estadístico	
Parámetro	Mínimos Cuadrados	Estándar	T	Valor-P
Intercepto	-7414.19	3801.86	-1.95015	0.0689
Pendiente	28808.3	251.051	114.751	0.0000

En la Tabla 21 se muestran los resultados del análisis de varianza que se realizó para NDMA, en donde se observa que el valor de P es menor a 0.05, por lo que se aceptaría la hipótesis alterna en donde dice que al menos una media es diferente al resto. Lo cuál tiene sentido y demuestra la linealidad ya que cada concentración tiene una respuesta diferente.

Tabla 21. Análisis de Varianza – NDMA.

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	1.0291E12	1	1.0291E12	13167.70	0.0000
Residuo	1.25045E9	16	7.81531E7		
Falta de Ajuste	6.79715E8	4	1.69929E8	3.57	0.0385
Error Puro	5.70734E8	12	4.75612E7		
Total (Corr.)	1.03035E12	17			

Coefficiente de correlación = 0.999393

R-Cuadrada = 99.8786 porciento

Finalmente, en la Tabla 22 se muestran los resultados obtenidos para el intervalo de confianza de la pendiente (28276.1 – 29340.5), en donde se demuestra que no incluye el cero y que existe una correlación entre la concentración y el área obtenida para NDMA.

Tabla 22. Intervalos de confianza del 95.0% para los estimados de los coeficientes.

Parámetro	Estimado	Error Estándar	Límite Inferior	Límite Superior
INTERCEPTO	-7414.19	3801.86	-15473.8	645.401
PENDIENTE	28808.3	251.051	28276.1	29340.5

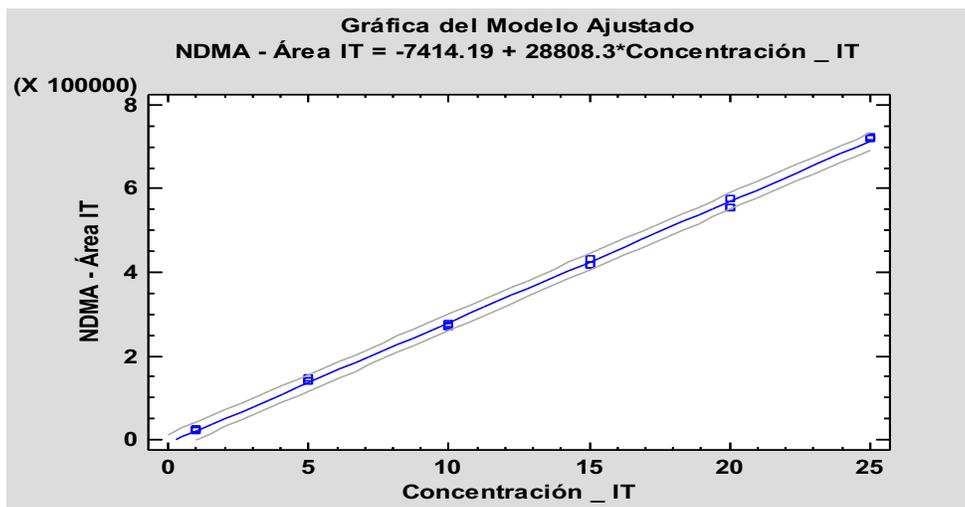


Figura 18. Intervalo de trabajo NDMA (1 – 25 ng/mL).

En la Figura 18 se observa el comportamiento gráfico de las concentraciones de 1 – 25 ng/mL con respecto a la respuesta analítica (área) del intervalo de trabajo que está marcado por el MGA 0612.

En la Tabla 23 se muestran los resultados obtenidos del intervalo de trabajo para NDEA.

Tabla 23. Intervalo de trabajo NDEA.

CONCENTRACIÓN (ng/mL)	ÁREA
1	24756
	24798
	29791
5	109327
	119292
	124294
10	241436
	232189
	239250
15	341892
	358078

CONCENTRACIÓN (ng/mL)	ÁREA
	356528
20	472901
	479549
	468412
25	609147
	606005
	604705

En la Tabla 24, se muestran los resultados obtenidos de la ecuación de la recta obtenida por medio del programa Statgraphics versión 19.:

$$y = 24030.1x - 2028.87$$

Tabla 24. Modelo Lineal: $Y = a + b \cdot X - NDEA$.

	Estimado de	Error	Estadístico	
Parámetro	Mínimos Cuadrados	Estándar	T	Valor-P
Intercepto	-2028.87	3137.59	-0.646634	0.5270
Pendiente	24030.1	207.187	115.983	0.0000

En la Tabla 25 se muestran los resultados del análisis de varianza que se realizó para NDEA, en donde se observa que el valor de P es menor a 0.05, por lo que se aceptaría la hipótesis alterna en donde dice que mínimo una media es diferente al resto. Lo cuál tiene sentido y demuestra la linealidad ya que cada concentración tiene una respuesta diferente.

Tabla 25. Análisis de Varianza – NDEA.

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	7.16034E11	1	7.16034E11	13452.01	0.0000
Residuo	8.51661E8	16	5.32288E7		
Falta de Ajuste	4.39317E8	4	1.09829E8	3.20	0.0427
Error Puro	4.12345E8	12	3.4362E7		

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Total (Corr.)	7.16886E11	17			

Coefficiente de correlación = 0.999406

R-Cuadrada = 99.8812 por ciento

Tabla 26. Intervalos de confianza del 95.0% para los estimados de los coeficientes – NDEA.

Parámetro	Estimado	Error Estándar	Límite Inferior	Límite Superior
CONSTANTE	-2028.87	3137.59	-8680.28	4622.53
PENDIENTE	24030.1	207.187	23590.9	24469.3

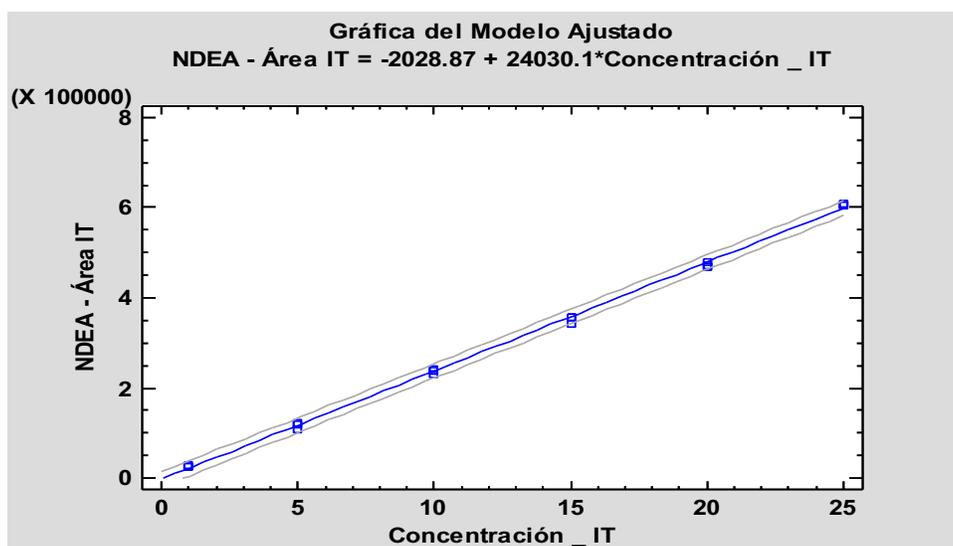


Figura 19. Intervalo de trabajo NDEA (1 – 25 ng/mL).

10.2.5. Especificidad.

Para demostrar que el método es específico se realizaron inyecciones de la solución estándar de Nitrosaminas, solución muestra, solución muestra adicionada, fase móvil A (ácido fórmico al 0.1 %), fase móvil B (ácido fórmico 0.1 % en metanol), agua 100 % y metanol 100 %. Estas inyecciones se realizaron debido a que se debe demostrar que no existe otro analito que interfiera en la cuantificación de NDMA y NDEA. Es por eso, que se

debe evaluar cada solución que este en contacto con las muestras, desde el diluyente para su extracción como la fase móvil para su análisis. Aunado a esas soluciones, fue importante realizar las inyecciones de muestras adicionadas con nitrosaminas para demostrar que existe una respuesta analítica. A continuación se presentan las Figuras obtenidas para esta prueba.

En la Figura 20 se muestra un blanco de reactivos para NDMA que corresponde a 100 % de agua, ya que este fue el diluyente que se utilizó para la extracción de las nitrosaminas. En las Figuras 20a y 20b se observan los cromatogramas obtenidos para el ión que cuantifica y el ión que confirma, en donde no se observa ninguna señal cromatográfica indicando así que el blanco de reactivos no tiene presencia de algún componente que pudiera interferir en la detección y cuantificación de NDMA. Finalmente la Figura 20c muestra el espectro de masas que se ha solicitado al equipo analítico que monitoree para la detección de tal nitrosamina.

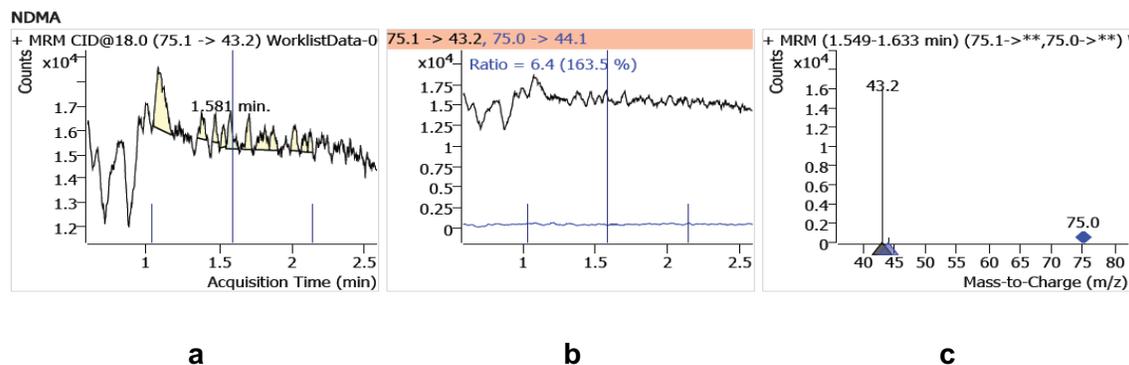


Figura 20. Especificidad. Blanco de reactivos – NDMA.

En la Figura 21 se muestra un blanco de reactivos pero para la nitrosamina NDEA. En las Figuras 21a y 21b se observan los cromatogramas obtenidos para el ión que cuantifica y el ión que confirma, en donde no se observa ninguna señal cromatográfica indicando así que el blanco de reactivos no tiene presencia de algún componente que pudiera interferir en la detección y cuantificación de NDEA. Finalmente la Figura 21c muestra el espectro de masas que se ha solicitado al equipo analítico que monitoree para la detección de tal nitrosamina.

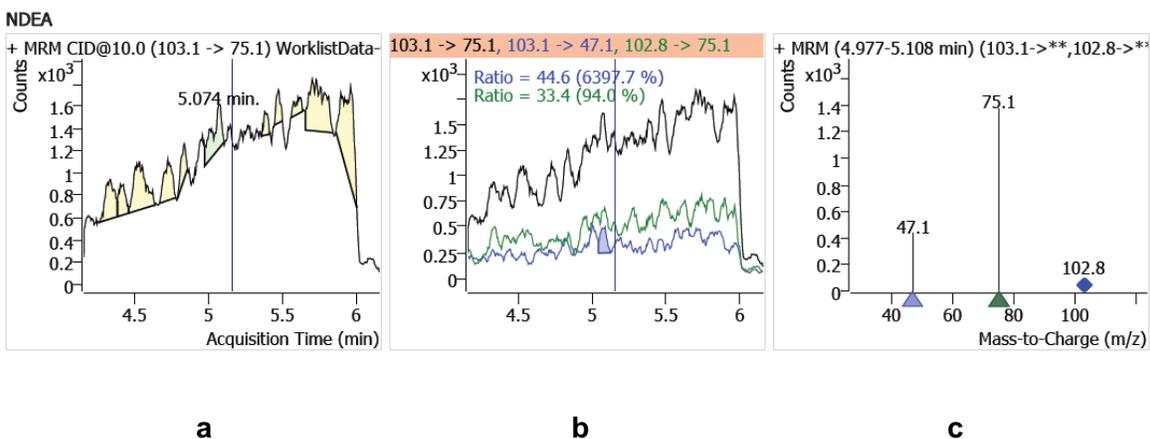


Figura 21. Especificidad. Blanco de reactivos – NDEA.

Las Figuras 22 y 23 muestran la inyección del reactivo metanol para el análisis de NDMA y NDEA respectivamente. En donde el metanol se utilizó como fase móvil B. En ambas Figuras se puede observar que no existe una interferencia en el tiempo de retención de las dos nitrosaminas que se buscan monitorear y que está definido por el espectro de masas indicado en el inciso c de cada Figura.

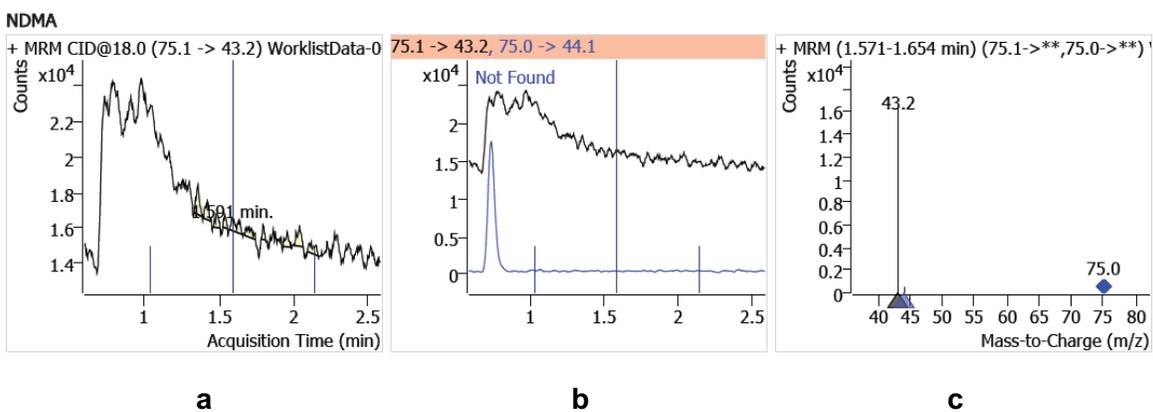


Figura 22. Especificidad. Metanol – NDMA.

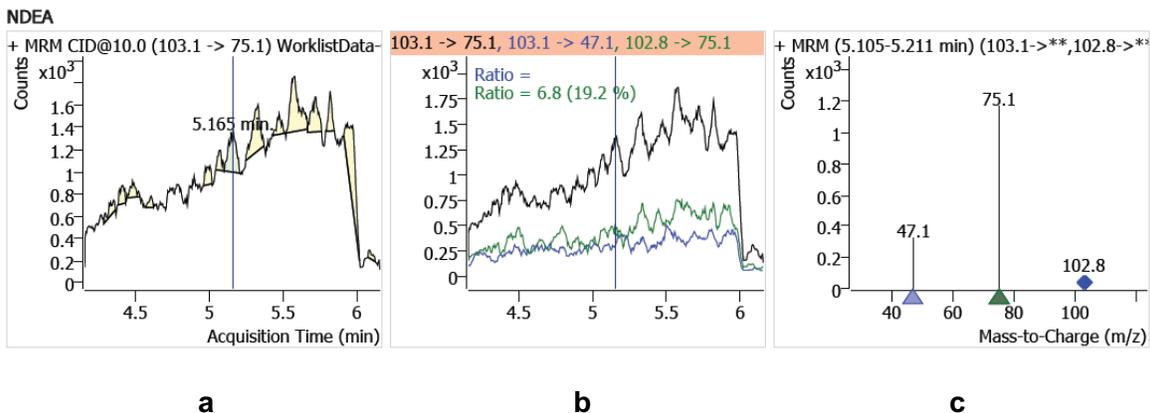


Figura 23. Especificidad. Metanol – NDEA.

En las Figuras 24 y 25 se observa la inyección correspondiente a la Fase Móvil A (ácido fórmico 0.1 % en agua). En donde no se observa ninguna señal cromatográfica, indicando así que no existe alguna interferencia para la detección y cuantificación de las nitrosaminas.

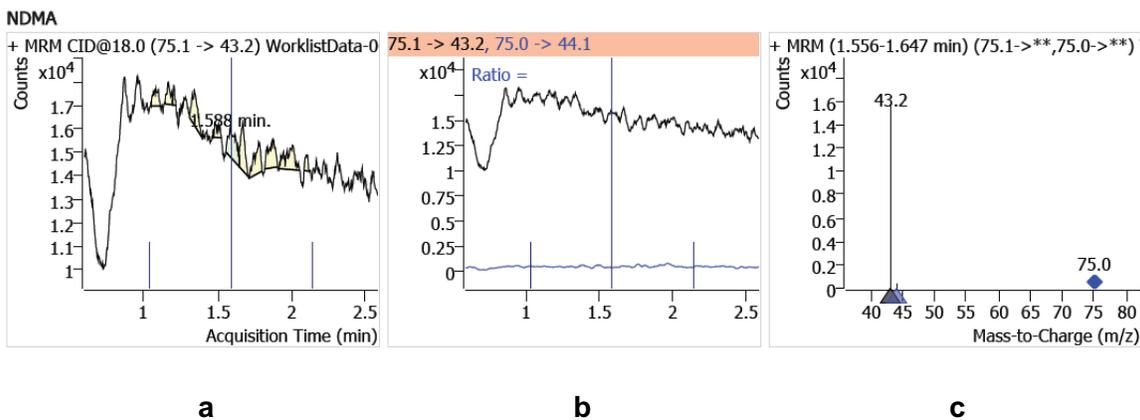


Figura 24. Especificidad. Fase móvil A (ácido fórmico 0.1 % en agua) – NDMA.

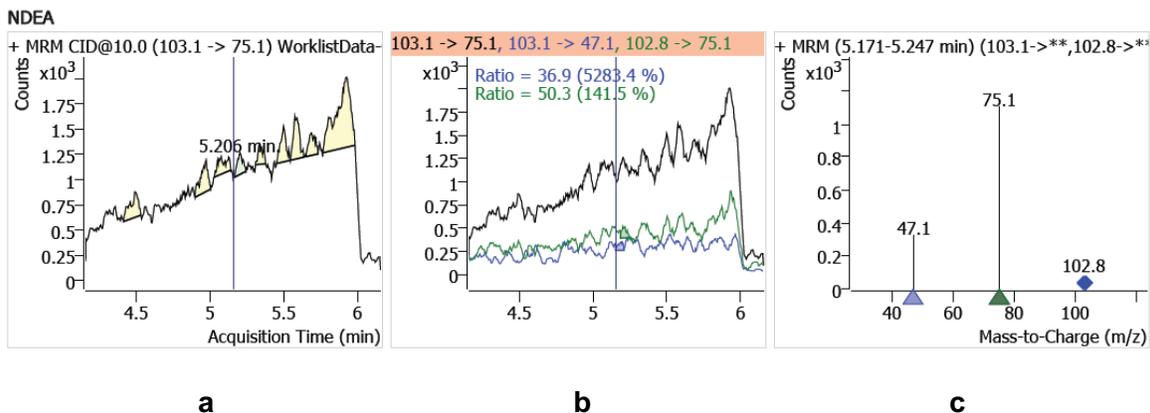


Figura 25. Especificidad. Fase móvil A (ácido fórmico 0.1 % en agua) – NDEA.

En las Figuras 26 y 27 se observa la inyección correspondiente a la Fase Móvil B (ácido fórmico 0.1 % en metanol). En donde no se observa ninguna señal cromatográfica, indicando así que no existe alguna interferencia para la detección y cuantificación de las nitrosaminas.

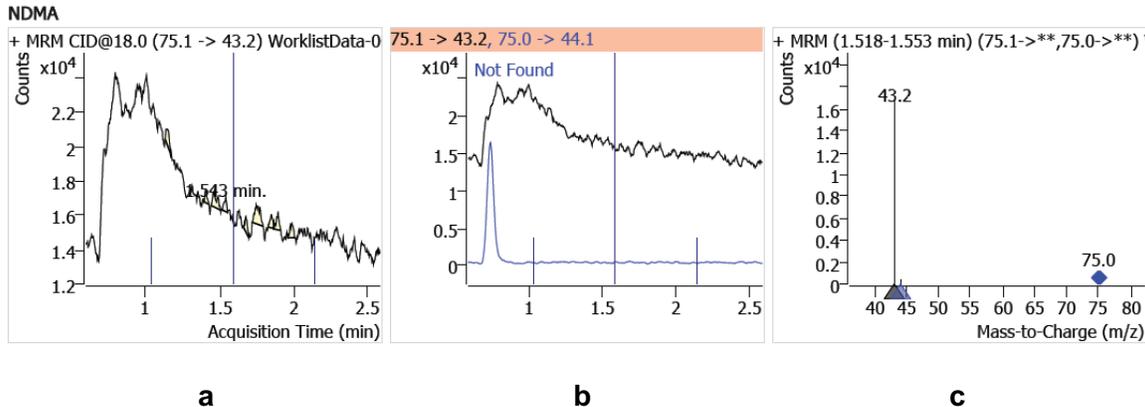


Figura 26. Especificidad. Fase móvil B (ácido fórmico 0.1 % en metanol) – NDMA.

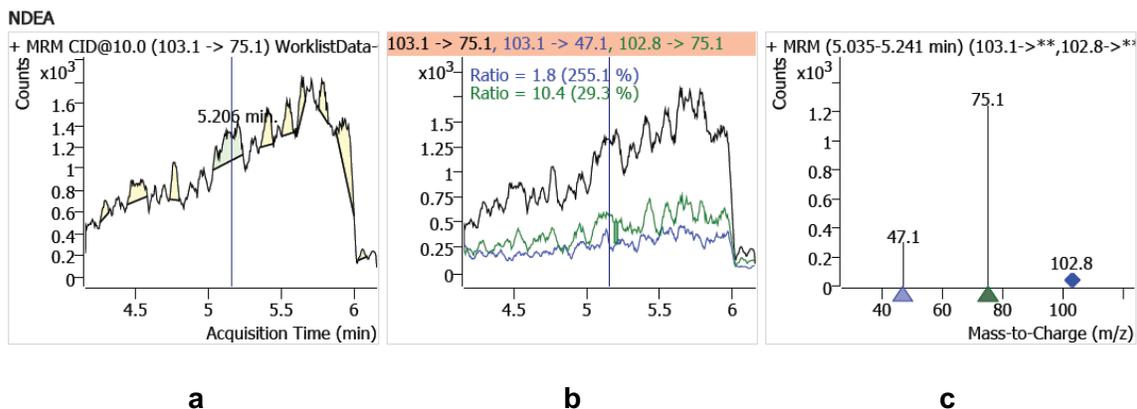


Figura 27. Especificidad. Fase móvil A (ácido fórmico 0.1 % en metanol) – NDEA.

Las Figuras 28 y 29 muestran la inyección de la solución estándar a 2 ng/mL para cada nitrosamina (NDMA y NDEA). Se observa en la Figura a el ión cuantificador para cada una, en la Figura b se observa el ión que confirma el analito que se está detectando y finalmente se observa la fragmentación de cada molécula en la Figura c.

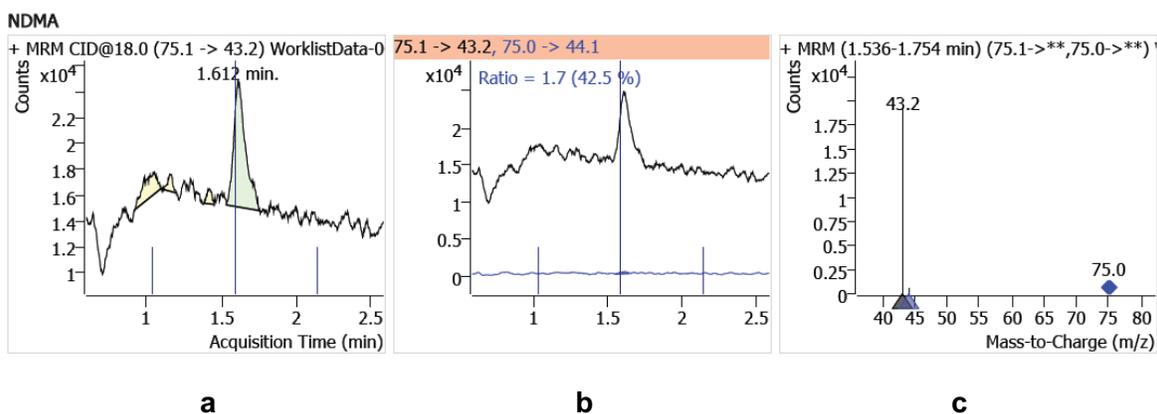


Figura 28. Especificidad. Solución estándar 2 ng/mL – NDMA.

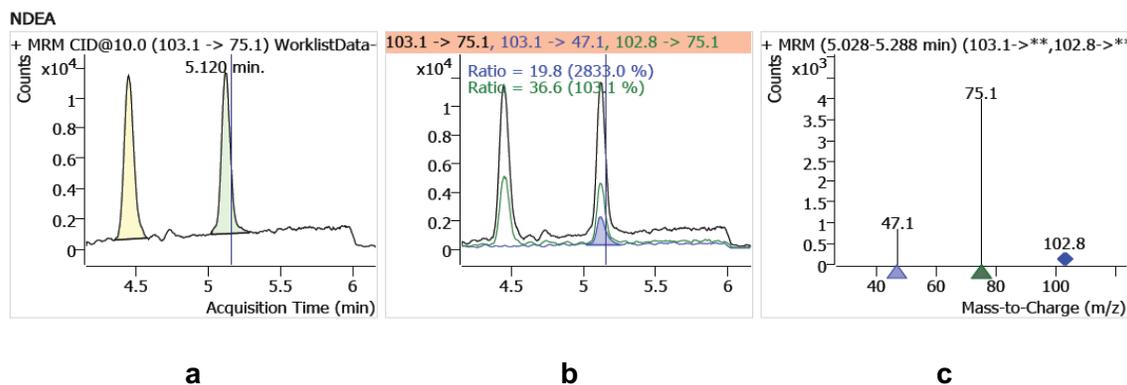


Figura 29. Especificidad. Solución estándar 2 ng/mL – NDEA.

Las Figuras 30 y 31 muestran la inyección correspondiente a la materia prima que se utilizó para hacer toda la validación del método analítico. Para NDMA no se observa ninguna señal cromatográfica, sin embargo, para NDEA se observa una señal al tiempo de retención de 4.941. NDEA tiene tiempo de retención de 5.1 minutos, por lo que la señal cromatográfica que se visualiza no corresponde a la nitrosamina, sino a otro compuesto que tiene dentro de su fragmentación la misma relación m/z que NDEA. Aunado de que el % de confirmación es bajo con un 74.4 %.

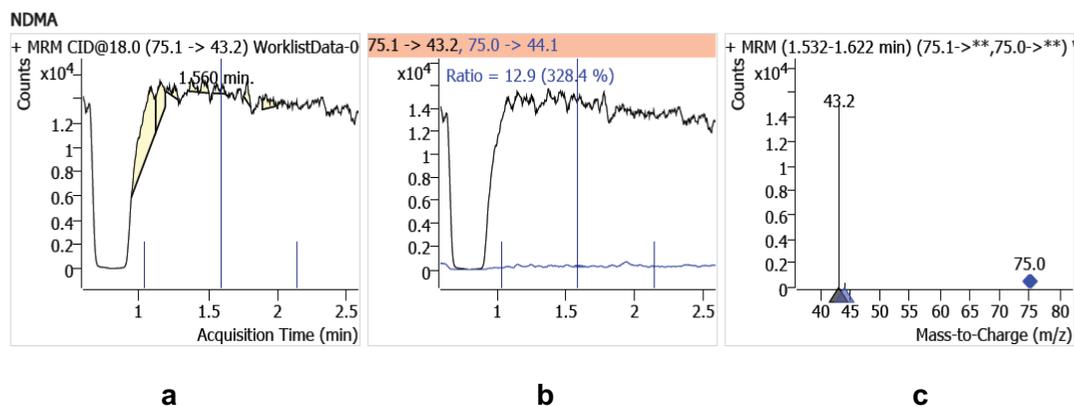


Figura 30. Especificidad. Materia prima de losartán potásico – NDMA.

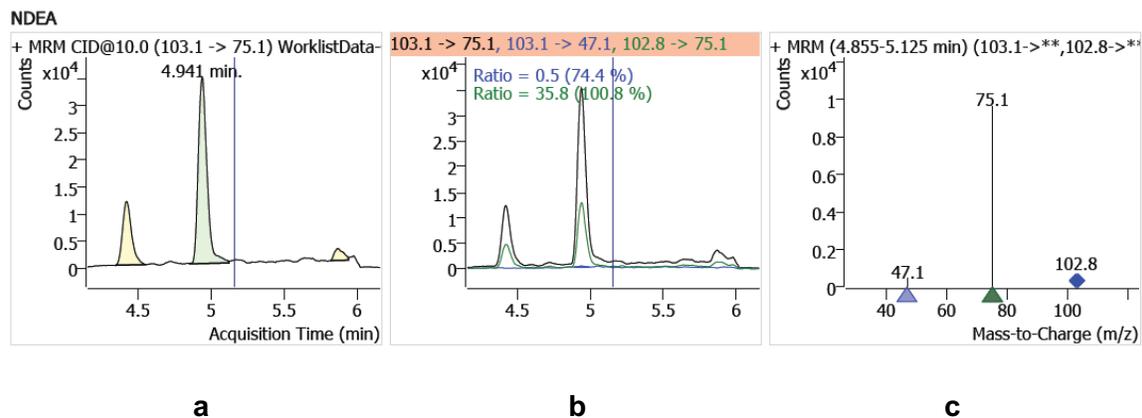


Figura 31. Especificidad. Materia prima de losartán potásico – NDEA.

Finalmente, las Figuras 32 y 33 muestran la materia prima de losartán potásico adicionado con 2 ng/mL de cada una de las nitrosaminas. Para NDEA se observa que la señal cromatográfica del tiempo de retención de 4.9, no impacta en la detección de la nitrosamina.

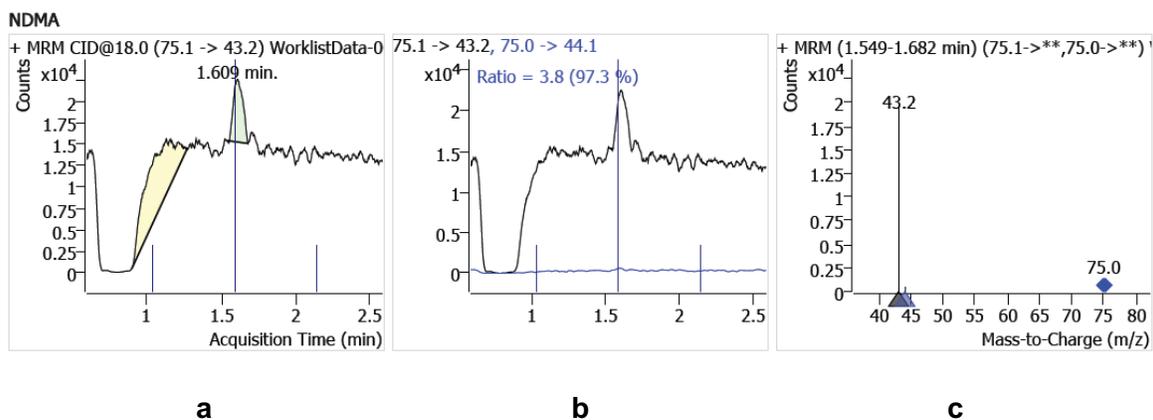


Figura 32. Especificidad. Materia prima de losartán potásico adicionada con nitrosaminas a 2 ng/mL – NDMA.

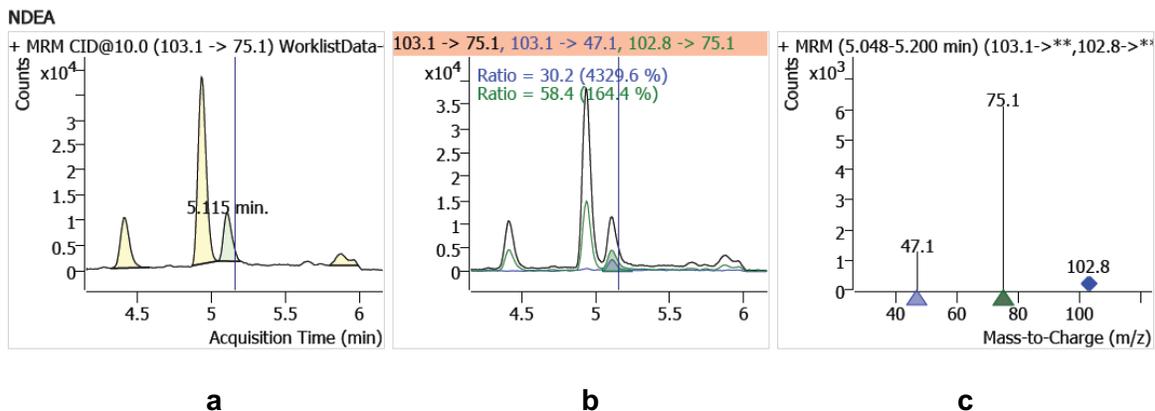


Figura 33. Especificidad. Materia prima de losartán potásico adicionada con nitrosaminas a 2 ng/mL – NDEA.

10.2.6. Exactitud (Recuperación).

En la Tabla 27 se muestran los resultados obtenidos de la prueba de exactitud, donde se observa que el porcentaje de recobro se encuentra entre el 80 y 120 % y el % CV de las 6 determinaciones es menor de 20 %. Para calcular la concentración recuperada, fue necesario determinar un factor de extracción para cada nitrosamina al comparar las pendientes de la linealidad del método y la de la linealidad del sistema.

Tabla 27. Exactitud (Recuperación).

Exactitud NDMA (%)	Exactitud NDEA (%)	Factor de extracción NDMA	Factor de extracción NDEA	Exactitud corregida (%)	Exactitud corregida (%)
76.4	85.5	1.4	1.19	106.960	101.745
69.3	77.5			97.020	92.225
71.7	87.8			100.380	104.482
75.2	93.0			105.280	110.670
75.4	68.4			105.560	81.396
70.6	86.9			98.840	103.411
Promedio				102.3	99.0
% CV				4.0	10.6

10.2.7. Linealidad del Método.

En la Tabla 28 se muestran los resultados obtenidos en la linealidad del método, en donde se evalúa la cantidad que se recupera a diferentes niveles de concentración. Con el factor de extracción se calculó la concentración recuperada, en donde se observó que todos los niveles se encontraron dentro de los límites de 80 – 120 % cumpliendo con el criterio de aceptación.

Tabla 28. Linealidad del método NDMA.

Concentración adicionada (ng/mL)	Recobro (%)	Factor de extracción	Recobro corregido (%)	Concentración recuperada (ng/mL)	% CV
1	72.2	1.40	101.08	1.01080	6.25
	72.5		101.50	1.01500	
	64.8		90.72	0.90720	
5	68.4		95.76	4.78800	10.19
	75.1		105.14	5.25700	
	61.2		85.68	4.28400	
10	79.2		110.88	11.08800	4.32
	73.2		102.48	10.24800	
	78.7		110.18	11.01800	
15	78.3		109.62	16.44300	5.38
	72.5		101.50	15.22500	
	70.7		98.98	14.84700	
20	75.7		105.98	21.19600	3.40
	71.1		99.54	19.90800	
	71.8		100.52	20.10400	
25	75.5		105.70	26.42500	4.31
	71.4		99.96	24.99000	
	69.4		97.16	24.29000	

En la Tabla 29, se muestran los resultados obtenidos de la ecuación de la recta obtenida por medio del programa Statgraphics versión 19.:

$$y = 1.01672x + 0.0683892$$

Tabla 29. Modelo Lineal: $Y = a + b \cdot X$ NDMA.

	Estimado de	Error	Estadístico	
Parámetro	Mínimos Cuadrados	Estándar	T	Valor-P
Intercepto	0.0683892	0.290381	0.235516	0.8168
Pendiente	1.01672	0.0191749	53.0236	0.0000

En la Tabla 30 se muestran los resultados del análisis de varianza que se realizó para NDMA, en donde se observa que el valor de P es menor a 0.05, por lo que se aceptaría la hipótesis alterna en donde dice que mínimo una media es diferente al resto. Lo cuál tiene sentido y demuestra la linealidad ya que cada concentración tiene una respuesta diferente.

Tabla 30. Análisis de Varianza.

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	1281.82	1	1281.82	2811.50	0.0000
Residuo	7.29473	16	0.455921		
Falta de Ajuste	1.65561	4	0.413902	0.88	0.5040
Error Puro	5.63913	12	0.469927		
Total (Corr.)	1289.12	17			

Coefficiente de correlación = 0.997167

R-Cuadrada = 99.4341 por ciento

En la Figura 34 se observa la representación gráfica de la linealidad del método, en donde el eje x indica la concentración adicionada y el eje y la concentración recuperada. Se realizó por triplicado cada linealidad.

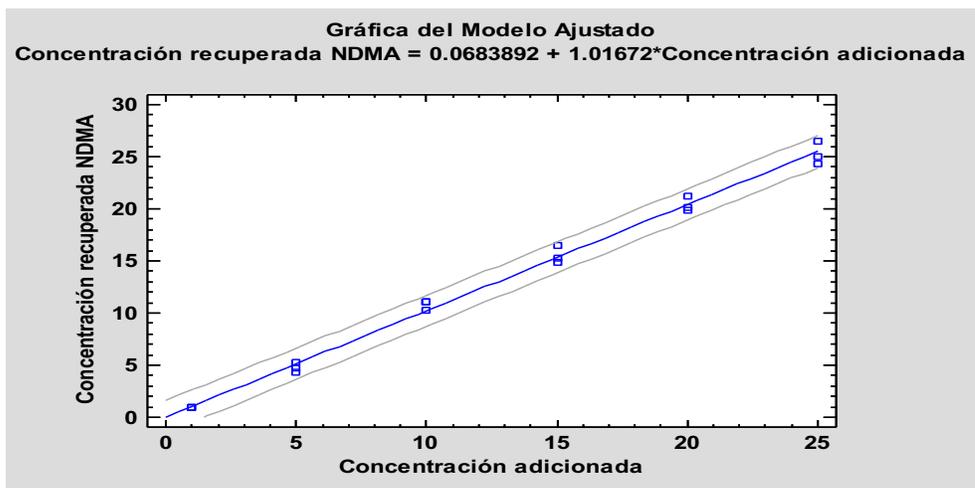


Figura 34. Linealidad del método – NDMA (1 – 25 ng/mL).

En la Tabla 31 se muestran los resultados obtenidos en la linealidad del método para NDEA, en donde se observó que todos los niveles se encontraron dentro de los límites de 80 – 120 % cumpliendo con el criterio de aceptación.

Tabla 31. Linealidad del método NDEA.

Concentración adicionada	Recobro (%)	Factor de extracción	Recobro corregido (%)	Concentración Recuperada (ng/mL)	% CV
1	69.0	1.19	82.110	0.82110	14.66
	92.3		109.837	1.09837	
	78.5		93.415	0.93415	
5	86.0		102.340	5.11700	6.79
	76.2		90.678	4.53390	
	77.1		91.749	4.58745	
10	84.6		100.674	10.06740	5.13
	78.7		93.653	9.36530	
	76.7		91.273	9.12730	
15	81.7	97.223	14.58340	2.92	
	77.4	92.106	13.81590		
	78.1	92.939	13.94080		

20	80.5		95.795	19.15900	0.50
	80.2		95.438	19.08760	
	81.0		96.390	19.27800	
25	81.6		97.104	24.27600	1.66
	82.9		98.651	24.66270	
	80.2		95.438	23.85950	

En la Tabla 32, se muestran los resultados obtenidos de la ecuación de la recta obtenida por medio del programa Statgraphics versión 19.:

$$y = 0.96764x - 0.128155$$

Tabla 32. Modelo Lineal: $Y = a + b \cdot X$ NDEA.

	Estimado de	Error	Estadístico	
Parámetro	Mínimos Cuadrados	Estándar	T	Valor-P
Intercepto	-0.128155	0.144391	-0.887555	0.3879
Pendiente	0.96764	0.00953472	101.486	0.0000

En la Tabla 33 se muestran los resultados del análisis de varianza que se realizó para NDEA, en donde se observa que el valor de P es menor a 0.05, por lo que se aceptaría la hipótesis alterna en donde dice que mínimo una media es diferente al resto. Lo cuál tiene sentido y demuestra la linealidad ya que cada concentración tiene una respuesta diferente.

Tabla 33. Análisis de Varianza NDEA.

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	1161.04	1	1161.04	10299.39	0.0000
Residuo	1.80367	16	0.112729		
Falta de Ajuste	0.398754	4	0.0996885	0.85	0.5196
Error Puro	1.40492	12	0.117076		
Total (Corr.)	1162.85	17			

Coefficiente de correlación = 0.999224

R-Cuadrada = 99.8449 por ciento

En la Figura 35 se observa la representación gráfica de la linealidad del método, en donde el eje x indica la concentración adicionada y el eje y la concentración recuperada. Se realizó por triplicado cada linealidad.

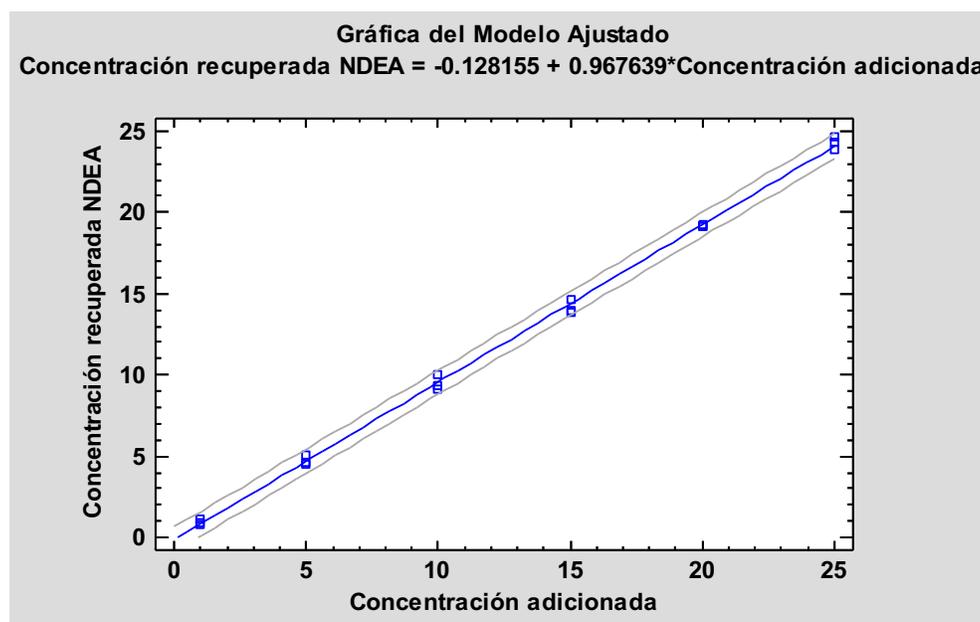


Figura 35. Linealidad del método – NDEA (1 – 25 ng/mL).

10.2.8. Límite de detección y límite de cuantificación.

En la Tabla 34 se muestran los resultados obtenidos del límite de detección para NDMA, en la cual se puede observar que la relación señal/ruido (s/n) es mayor a 3 en el punto de 0.5 ng/mL, definiéndose esta concentración como la del límite de detección, ya que con esta relación es posible visualizar un pico cromatográfico. De lo contrario no se distinguiría la señal confundiendo con el propio ruido del equipo.

En la Tabla 35 se muestran los resultados obtenidos para el límite de detección de NDEA, en la cual se puede observar que la relación señal/ruido (s/n) para NDEA es mayor a 3 en el punto de 0.2 ng/mL, definiéndose esta concentración como la del límite de detección.

El límite de cuantificación se establece como concentración la de 1 ng/mL, ya que es la mínima concentración que solicita el MGA 0612.

Tabla 34. Límite de detección NDMA.

Muestra	S/N
SET 2 ppb	104.11
SET 2 ppb	114.60
SET 2 ppb	117.86
SET 2 ppb	16.27
SET 2 ppb	104.10
SET 2 ppb	30.46
LD_LC_0.2 ppb_1	113.48
LD_LC_0.2 ppb_2	134.67
LD_LC_0.2 ppb_3	104.03
LD_LC_0.3 ppb_1	5.20
LD_LC_0.3 ppb_2	1.53
LD_LC_0.3 ppb_3	31.93
SET 2 ppb	17.15
LD_LC_0.5 ppb_1	57.02
LD_LC_0.5 ppb_2	60.48
LD_LC_0.5 ppb_3	29.15
LD_LC_0.8 ppb_1	237.99
LD_LC_0.8 ppb_2	85.84
LD_LC_0.8 ppb_3	83.39
SET 2 ppb	14.33
LD_LC_1 ppb_1	12.73
LD_LC_1 ppb_2	136.65
LD_LC_1 ppb_3	119.49
SET 2 ppb	22.43
SET 2 ppb	23.08
SET 2 ppb	32.36
Blanco	37.84

Tabla 35. Límite de detección NDEA.

Muestra	S/N
SET 2 ppb	535.94
SET 2 ppb	561.10
SET 2 ppb	365.29
SET 2 ppb	1304.97

Muestra	S/N
SET 2 ppb	1963.91
SET 2 ppb	506.87
LD_LC_0.2 ppb_1	180.41
LD_LC_0.2 ppb_2	151.22
LD_LC_0.2 ppb_3	299.65
LD_LC_0.3 ppb_1	2167.59
LD_LC_0.3 ppb_2	104.04
LD_LC_0.3 ppb_3	126.55
SET 2 ppb	627.50
LD_LC_0.5 ppb_1	109.78
LD_LC_0.5 ppb_2	98.38
LD_LC_0.5 ppb_3	157.04
LD_LC_0.8 ppb_1	358.60
LD_LC_0.8 ppb_2	282.08
LD_LC_0.8 ppb_3	320.70
SET 2 ppb	844.56
LD_LC_1 ppb_1	200.44

10.2.9. Precisión y exactitud del límite de cuantificación.

En la Tabla 36 se muestran los resultados obtenidos de la precisión y exactitud del límite de cuantificación (1 ng/mL) para NDMA y NDEA, la prueba cumple con el porcentaje de recobro entre 80 – 120 % y % CV de las 6 muestras \leq 20 %.

Tabla 36. precisión y exactitud del límite de cuantificación NDMA y NDEA.

Límite de cuantificación NDMA (%)	Límite de cuantificación NDEA (%)	Factor de extracción NDMA	Factor de extracción NDEA	LC Corregido NDMA (%)	LC Corregido NDEA (%)
81.3	84.3	1.40	1.19	113.8	100.3
80.2	86.3			112.3	102.7
82.7	81.1			115.8	96.5
72.0	91.3			100.8	108.6
76.2	79.8			106.7	95.0
75.0	72.0			105.0	85.7

Límite de cuantificación NDMA (%)	Límite de cuantificación NDEA (%)	Factor de extracción NDMA	Factor de extracción NDEA	LC Corregido NDMA (%)	LC Corregido NDEA (%)
Promedio				109.1	98.1
% CV				5.3	7.9

10.2.10. Repetibilidad.

En la Tabla 37 se muestran los resultados obtenidos para NDMA y NDEA, se observa que el % CV de las 6 muestras fue menor de ≤ 20 %.

Tabla 37. Repetibilidad NDMA y NDEA.

Repetibilidad NDMA (%)	Repetibilidad NDEA (%)	Factor de extracción NDMA	Factor de extracción NDEA	Repetibilidad corregida (%)	Repetibilidad corregida (%)
72.4	98.9	1.40	1.19	101.4	117.7
66.6	98.9			93.2	117.7
71.0	86.9			99.4	103.4
65.0	100.1			91.0	119.1
61.0	96.1			85.4	114.4
64.7	72.5			90.6	86.3
Promedio				93.5	109.8
% CV				6.4	11.7

10.2.11. Precisión Intermedia.

En la Tabla 38 se muestran los resultados obtenidos para NDMA de los 3 analistas involucrados. Se puede observar que el % CV de las 6 muestras de cada analista es menor del 20 %. En la

Tabla 39 se muestra el % CV de las muestras globales, el cual es menor a 25 %.

Tabla 38. Reproducibilidad NDMA.

Analista / Día	Repetibilidad NDMA (%)	Factor de extracción NDMA	Repetibilidad corregida NDMA (%)	% CV
A1D1-M1	72.4	1.4	101.4	5.8
A1D1-M2	66.6	1.4	93.2	
A1D1-M3	71.0	1.4	99.4	
A1D2-M1	71.0	1.4	99.4	
A1D2-M2	75.3	1.4	105.4	
A1D2-M3	64.1	1.4	89.7	
A2D1-M1	69.1	1.4	96.7	7.0
A2D1-M2	75.8	1.4	106.1	
A2D1-M3	75.9	1.4	106.3	
A2D2-M1	79.0	1.4	110.6	
A2D2-M2	71.0	1.4	99.4	
A2D2-M3	83.7	1.4	117.2	
A3D1-M1	65.3	1.4	91.4	7.5
A3D1-M2	69.1	1.4	96.7	
A3D1-M3	73.6	1.4	103.0	
A3D2-M1	78.9	1.4	110.5	
A3D2-M2	79.3	1.4	111.0	
A3D2-M3	73.8	1.4	103.3	

Tabla 39. Resumen estadístico Precisión NDMA global.

Recuento	18
Promedio	102.27
Desviación Estándar	7.35911
Coefficiente de Variación	7.19577%
Mínimo	89.74
Máximo	117.18
Rango	27.44
Sesgo Estandarizado	0.251544
Curtosis Estandarizada	-0.346458

De igual manera, en la **¡Error! La autoreferencia al marcador no es válida.** se muestran los resultados obtenidos para NDEA de los 3 analistas involucrados. Se puede observar que el % CV de las 6 muestras de cada analista es menor del 20 %, en la

Tabla 41 se muestra el % CV de las muestras globales, el cual es menor a 25 %.

Tabla 40. Reproducibilidad NDEA global.

Analista / Día	Repetibilidad NDEA (%)	Factor de extracción NDEA	Repetibilidad corregida NDEA (%)	% CV
A1D1-M1	98.9	1.2	117.7	6.1
A1D1-M2	98.9	1.2	117.7	
A1D1-M3	86.9	1.2	103.4	
A1D2-M1	86.2	1.2	102.6	
A1D2-M2	90.9	1.2	108.2	
A1D2-M3	90.5	1.2	107.7	
A2D1-M1	99.1	1.2	117.9	9.4
A2D1-M2	79.0	1.2	94.0	
A2D1-M3	78.5	1.2	93.4	
A2D2-M1	93.0	1.2	110.7	
A2D2-M2	93.3	1.2	111.0	
A2D2-M3	89.8	1.2	106.9	
A3D1-M1	72.1	1.2	85.8	9.9
A3D1-M2	83.3	1.2	99.1	
A3D1-M3	78.0	1.2	92.8	
A3D2-M1	95.9	1.2	114.1	
A3D2-M2	82.0	1.2	97.6	
A3D2-M3	88.5	1.2	105.3	

Tabla 41. Resumen estadístico Precisión NDEA global.

Recuento	18
Promedio	104.773
Desviación Estándar	9.48952
Coefficiente de Variación	9.05723%
Mínimo	85.799
Máximo	117.929
Rango	32.13
Sesgo Estandarizado	-0.521369
Curtosis Estandarizada	-0.621482

10.2.12. Sesgo.

El sesgo se evaluó con los resultados obtenidos de la exactitud del método al restar la cantidad de nitrosaminas adicionadas menos la cantidad de nitrosaminas recuperada..

Tabla 42. Sesgo para NDMA.

Concentración adicionada (ng/mL)	Concentración recuperada (ng/mL)	Sesgo (ng/mL)
12.8	13.69088	0.89088
	12.41856	0.38144
	12.84864	0.04864
	13.47584	0.67584
	13.51168	0.71168
	12.65152	0.14848

Tabla 43. Sesgo para NDEA.

Concentración adicionada (ng/mL)	Concentración recuperada (ng/mL)	Sesgo (ng/mL)
3.53	3.6017730	0.0617730
	3.2647650	0.2752350
	3.6986628	0.1586628
	3.9177180	0.3777180
	2.8814184	0.6585816
	3.6607494	0.1207494

En la Tabla 44 se muestran los resultados obtenidos de sesgo para NDMA y NDEA, el intervalo de confianza del porcentaje de recuperación incluye el 100 % con un nivel de confianza del 95 %.

Tabla 44. Intervalo de confianza para NDMA y NDEA.

NDMA	98.0194 % - 100.6610 %
NDEA	87.9912 % - 109.985 %

10.2.13. Robustez.

En la Tabla 45 se observan los resultados correspondientes a la prueba de robustez, en donde se demostró que el tamaño de poro no tiene un efecto en la determinación, ya que al comparar los valores del % de recobro utilizando un tamaño de filtro de 0.2 μm vs uno de 0.45 μm se obtuvo una diferencia absoluta del 5.2 %, teniendo un criterio de aceptación para la prueba de hasta un 20 %.

Tabla 45. Robustez para NDMA.

Recobro RC 0.2 µm (%)	Recobro RC 0.45 µm (%)	Factor de extracción	Recobro RC 0.2 µm (%)	Recobro RC 0.45 µm (%)
68.0	71.2	1.40	95.2	99.7
73.7	75.0		103.2	105.0
66.6	73.3		93.2	102.6
Promedio			97.2	102.4
Diferencia absoluta				5.2

De igual manera, en la Tabla 46 se observan una diferencia absoluta del 3.1 %, cumpliendo la prueba de robustez para la nitrosamina NDEA.

Tabla 46. Robustez para NDEA.

Recobro RC 0.2 µm (%)	Recobro RC 0.45 µm (%)	Factor de extracción	Recobro RC 0.2 µm (%)	Recobro RC 0.45 µm (%)
73.9	71.5	1.19	87.9	85.1
78.9	82.6		93.9	98.3
70.7	77.1		84.1	91.7
Promedio			88.6	91.7
Diferencia absoluta				3.1

10.2.14. Estabilidad del estándar.

En la Tabla 47 se muestran los resultados de estabilidad de la nitrosamina NDMA y a los 3 y 7 días en condición de temperatura ambiente y refrigeración respectivamente.

Se puede apreciar que la diferencia absoluta a los 3 días es ≤ 20 % para cada condición evaluada.

La estabilidad de 7 días se cumple para la diferencia absoluta a temperatura ambiente, sin embargo, no se recomienda analizar más allá de 3 días ya que se encuentra en el límite de que deje de cumplir con un valor de 16.6 %. Para la estabilidad en refrigeración se

cumple con la diferencia absoluta, pero el % del estándar sale del intervalo de 80 – 120 %. De manera tal que se recomienda en el método analítico el no usar la solución estándar para NDMA más allá de 3 días.

Tabla 47. Estabilidad de estándar para NDMA.

Muestra	Tiempo 0 Inicial %	Tiempo 1 (3 días)		Tiempo 2 (7 días)	
		Temperatura ambiente %	Refrigeración %	Temperatura ambiente %	Refrigeración %
M1	104.3	87.4	102.9	81.7	90.8
M2	100.9	103.6	92.2	82.7	76.4
M3	107.9	100.9	98.3	99.1	86.3
Promedio	104.4	97.3	97.8	87.8	84.5
Diferencia absoluta		7.1	6.6	16.6	19.9

En la Tabla 48 se muestran los resultados de estabilidad de la nitrosamina NDEA tanto a temperatura ambiente y refrigeración a los 3 y 7 días respectivamente, donde se aprecia que la diferencia absoluta a los 3 días es ≤ 20 % para cada condición evaluada.

La estabilidad de 7 días se cumple por la diferencia absoluta a temperatura ambiente, sin embargo, no se recomienda analizar más allá de 3 días ya que al igual que para NDMA, el valor se encuentra en el límite con un 19.9 %. Finalmente la estabilidad de 7 días en refrigeración no se cumple con la diferencia absoluta y el % del estándar sale del intervalo de 80 – 120 %. Por lo tanto, la solución estándar para NDEA es estable en un periodo máximo de 3 días.

Tabla 48. Estabilidad de estándar para NDEA.

Muestra	Tiempo 0 Inicial %	Tiempo 1 (3 días)		Tiempo 2 (7 días)	
		Temperatura ambiente %	Refrigeración %	Temperatura ambiente %	Refrigeración %
M1	105.0	100.5	97.4	83.6	79.1

M2	100.0	87.3	93.8	80.2	77.9
M3	99.9	97.7	87.3	81.2	76.6
Promedio	101.6	95.2	92.8	81.7	77.9
Diferencia absoluta		6.4	8.8	19.9	23.7

10.2.15. Estabilidad de la muestra.

Tabla 49 se demuestra la estabilidad de la muestra para la nitrosamina de NDMA a un tiempo máximo de 3 días a temperatura ambiente y en refrigeración ya que la diferencia absoluta a un periodo de 7 días sobrepasa el 20 % permitido para ambas temperaturas (temperatura ambiente y en refrigeración).

Tabla 49. Estabilidad de muestra para NDMA.

Muestra	Tiempo 0 Inicial %	Tiempo 1 (3 días)		Tiempo 2 (7 días)	
		Temperatura ambiente %	Refrigeración %	Temperatura ambiente %	Refrigeración %
M1	72.4	72.3	79.8	114.0	104.6
M2	66.6	73.0	68.3	109.1	103.6
M3	71.0	79.1	77.2	111.6	108.3
Factor de extracción = 1.40					
M1	101.4	101.2	111.7	159.6	146.4
M2	93.2	102.2	95.6	152.7	145.0
M3	99.4	110.7	108.1	156.2	151.6
Promedio	98.0	104.7	105.1	156.2	147.7
Diferencia absoluta		6.7	7.1	58.2	49.7

En la

Tabla 50 se demuestra la estabilidad de la muestra para la nitrosamina de NDEA a un tiempo máximo de 3 días a temperatura ambiente y en refrigeración, ya que al igual que para NDMA, el valor de la diferencia absoluta a los 7 días sobrepasa el límite permisible que es 20 %.

Tabla 50. Estabilidad de muestra para NDEA.

Muestra	Tiempo 0 Inicial %	Tiempo 1 (3 días)		Tiempo 2 (7 días)	
		Temperatura ambiente %	Refrigeración %	Temperatura ambiente %	Refrigeración %
		M1	98.9	85.1	83.4
M2	98.9	88.0	83.8	110.2	117.3
M3	86.9	88.9	81.0	106.6	119.5
Factor de extracción = 1.19					
M1	117.7	101.3	99.2	140.7	130.1
M2	117.7	104.7	99.7	131.1	139.6
M3	103.4	105.8	96.4	126.9	142.2
Promedio	112.9	103.9	98.4	132.9	137.3
Diferencia absoluta		9.0	14.5	20.0	24.4

10.2.16. Incertidumbre.

La incertidumbre se determinó en función de diferentes variables, como lo fueron los estándares utilizados, las balanzas, la propia variabilidad del método, de los analistas, de los equipos y del material volumétrico utilizado. En donde se obtuvo para NDMA es de ± 0.32 ng/mL y para NDEA es de ± 0.38 ng/mL.

10.3. Cuantificación de Nitrosaminas en productos terminados.

Posterior a la validación del método analítico, éste se retó para cuantificar nitrosaminas en muestras de producto terminado de losartán potásico. Para ello, se adquirieron 5 diferentes marcas y lotes de tabletas de losartán potásico de 50 mg. Aunado a ello, se decidió evaluar si había presencia de nitrosaminas en otros medicamentos como lo son: metformina, ácido acetilsalicílico, ibuprofeno y naproxeno.

Tabla 51. Cuantificación de nitrosaminas en producto terminado.

Medicamento	Muestra	NDMA	NDEA
Losartán potásico	Lote 1 Muestra 1	No detectado	No detectado
	Lote 1 Muestra 2	No detectado	No detectado
	Lote 2 Muestra 1	No detectado	No detectado
	Lote 2 Muestra 2	No detectado	No detectado
	Lote 3 Muestra 1	No detectado	No detectado
	Lote 3 Muestra 2	No detectado	No detectado
	Lote 4 Muestra 1	No detectado	No detectado
	Lote 4 Muestra 2	No detectado	No detectado
	Lote 5 Muestra 1	No detectado	No detectado
	Lote 5 Muestra 2	No detectado	No detectado
Metformina	Lote 1 Muestra 1	No detectado	No detectado
	Lote 1 Muestra 2	No detectado	No detectado
Ácido acetilsalicílico	Lote 1 Muestra 1	No detectado	No detectado
	Lote 1 Muestra 2	No detectado	No detectado
Ibuprofeno	Lote 1 Muestra 1	No detectado	No detectado
	Lote 1 Muestra 2	No detectado	No detectado
Naproxeno	Lote 1 Muestra 1	No detectado	No detectado
	Lote 1 Muestra 2	No detectado	No detectado

En la cuantificación de muestras de producto terminado se observó que no existe detección de las nitrosaminas consideradas (NDMA y NDEA). Sin embargo, no es posible aún determinar que estos medicamentos no cuentan con esas nitrosaminas, ya que el método analítico fue exclusivamente validado para losartán potásico y no sabemos si en otra matriz tenga un efecto matriz que evite la detección de alguna nitrosamina.

11. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.

Se obtuvo un método analítico que es capaz de cuantificar *N*-nitrosodimetilmina (NDMA) y *N*-nitrosodietilamina (NDEA), utilizando como base el método analítico indicado en la monografía analítica 0612 Determinación de nitrosaminas en fármacos y preparados farmacéuticos de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos Edición 13.1.

El método analítico antes mencionado fue modificado de manera interna para obtener mejores señales de las dos nitrosaminas evaluadas, ya que los parámetros de detección indicados en el MGA no corresponden al equipo utilizado en esta validación. Aunado a ello los parámetros cromatográficos fueron modificados a fin de separar adecuadamente el activo (losartán potásico) de las impurezas para poder obtener una mejor respuesta de ellas.

Se realizó la validación completa del método analítico siguiendo los lineamientos establecidos por la guía de validación de métodos analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, en donde se obtuvo cumplimiento en todos los parámetros de validación. Por lo tanto, se demuestra que el método analítico es preciso y exacto para la cuantificación de NDMA y NDEA en materia prima de losartán potásico.

De igual manera se realizó la cuantificación de 10 muestras para producto terminado de losartán potásico, 2 para metformina, 2 para ácido acetilsalicílico, 2 para ibuprofeno y 2 para ibuprofeno, en donde no se observó ninguna de las nitrosaminas evaluadas. Dicho hallazgo, refleja buenas prácticas de manufactura dentro de sus procesos en cuanto a la posible formación de nitrosaminas.

Mundialmente, es importante realizar un análisis de riesgo para evaluar la formación de las nitrosaminas y cuáles son las que se formarían durante el proceso de síntesis. Derivado de eso, se necesitará evaluar cada método analítico con su matriz, a fin de obtener resultados confiables.

12. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Robinson J., (2023) Addressing the saga of nitrosamine contamination in drugs. Chemistry World. <https://www.chemistryworld.com/news/addressing-the-saga-of-nitrosamine-contamination-in-drugs/4018123.article>.
- [2] Food and Drug Administration (FDA). (2021). Control of Nitrosamine Impurities in Human Drugs.
- [3] Hasan M, Sutradhar I, Akter T, Das Gupta R, Joshi H, Haider MR, et. al. (2018) Prevalence and determinants of hypertension among adult population in Nepal: Dara Demographic and health Survey 2016. Plos One 13(5): e0198028. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198028>.
- [4] Mansouri I., Botton J., Semenzato L., (2022). *N*-Nitrosodimethylamine- contaminated valsartan and risk of cancer: A nationwide study of million valsartan users. Journal of the American Health Association.
- [5] Instituto Nacional Sobre el Envejecimiento (NIA). (2021). High Blood Pressure and Older Adults. <https://www.nia.nih.gov/health/high-blood-pressure-and-older-adults>.
- [6] Campos N, Hernández L, Flores A, Gómez E, Barquera S. (2019). Prevalencia, diagnóstico y control de hipertensión arterial en adultos mexicanos en condición de vulnerabilidad. Resultados de la Ensanut 100k. Salud Publica Mex. 61:888-897. <https://doi.org.10.21149/10574>.
- [7] Badri S., Rani J., (2023). Review on different types of detectors used in chromatography techniques. UPI Journal of Pharmaceutical Medical and Health Sciences.
- [8] Organización Mundial de la Salud OMS. (2019). Actualización sobre las impurezas de nitrosaminas. <https://www.who.int/es/news/item/20-11-2019-information-note-nitrosamine-impurities>.

- [9] Committee for Medicinal Products for Human Use (2020), página https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/nitrosamines-emea-h-a53-1490-assessment-report_en.pdf.
- [10] SCIEEX. (2019). Análisis rápido de nitrosaminas genotóxicas por HPLC-MS/MS.
- [11] European Medicines Agency (EMA). (2020). Nitrosamines impurities in human medicinal products.
- [12] Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos edición 13.1 (2023). MGA 0612. Determinación de Nitrosaminas en fármacos y preparados farmacéuticos.
- [13] Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C. (2002). Guía de validación de métodos analíticos.
- [14] Waters Technology. (2021). Determination of Nitrosamine Impurities in Losartan Potassium Drug Substance and Drug Product using the Xevo TQ-S micro and Atlantis Premier BEH C18 Ax Column.
- [15] NMX-EC-17025-IMNC-2018. (2018). Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.
- [16] NMX-CC-9001-IMNC-2015. (2015). Sistema de gestión de calidad. Requisitos. Numeral 8.1 y 8.
- [17] USP-NF 2023, Farmacopea de los Estados Unidos. (2023). Número 1. Capítulo <1469> Impurezas de Nitrosaminas.
- [18] Agilent Technologies. (2020). Determination of Nitrosamines in Active Pharmaceutical Ingredients Application Note.

[19] Agilent Technologies. (2020). Nitrosamines Impurities Application Guide. Confidently Detect and Quantify Mutagenic Impurities in APIs and Drug Products.

[20] Agilent Technologies. (2020). Simultaneous Determination of Eight Nitrosamine Impurities in Metformin Using the Agilent 6470 Triple Quadrupole LC/MS.. Application Note.

[21] Waters Technology. (2019). Highly Sensitive and Robust UPLC-MS/MS Quantification of Nitrosamine Impurities in Sartan and Ranitidine Drug Substances.

[22] Jaimes M., Burgos R., (2009). Los antagonistas de los receptores de la angionsina II a la luz de los estudios de mayor impacto. Rev. Medica La Paz.

[23] Monteiro M., Condé P., Santana T., (2023) Investigation of carcinogenic impurities of N-Nitrosamines in sartan pharmaceutical marked in Brazil: Development and Validation of method based on high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry.

[24] Park J., Seo J., Lee J., Kwon H., (2015) Distribution of seven N-Nitrosamines in food. Toxicology research. Official Journey of Korean Society of Toxicology.

[25] Dattatraya J., Nikhil S., (2022). A review on nitrosamine impurities presents in drugs. Pharmaceutical Resonance.

[26] Schlingemann J., Burns M., Ponting D., Simon S., (2023) The landscape of potential small and drug substance related nitrosamines in pharmaceuticals. Journal of pharmaceutical sciences.

13. ANEXOS.

13.1. Anexo A. MGA 0612. Determinación de Nitrosaminas en Fármacos y Preparados Farmacéuticos.

con precaución 1 mL de peróxido de hidrógeno al 30 %, resbalándolo por las paredes del matraz.

Precaución: no adicionar el peróxido de hidrógeno durante la digestión.

Calentar el matraz hasta que la mezcla adquiera coloración azul claro y los lados del matraz se encuentren libres de material carbonoso. Adicionar cuidadosamente 70 mL de agua a la mezcla y enfriar en baño de hielo de tal manera que forme una capa bajo la solución ácida, conectar el matraz al aparato de destilación y a través de un embudo agregar 30 mL de solución de hidróxido de sodio (2 en 5) fría, lavar el embudo con 10 mL de agua e inmediatamente efectuar la destilación, teniendo la precaución de que el aparato quede bien ajustado. Destilar de 80 mL a 100 mL, dentro de un matraz Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 15 mL de solución de ácido bórico (1 en 25), tres gotas de SI de rojo de metilo-azul de metileno y suficiente agua para cubrir el extremo del tubo del refrigerante. Al terminar la destilación, retirar el matraz recipiente y lavar el extremo del tubo del refrigerante con una pequeña cantidad de agua y titular el destilado con SV de ácido sulfúrico 0.01 N. Cuando el contenido de nitrógeno de la muestra tomada es mayor de 2 a 3 mg titular el destilado con SV de ácido sulfúrico 0.02 N, calculando que el volumen gastado sea por lo menos de 15 mL.

Cálculos. Hacer la corrección necesaria con el valor obtenido en la titulación del blanco de reactivos.

Si la titulación se efectúa con solución de ácido sulfúrico 0.01 N, calcular considerando que cada mililitro de solución de ácido sulfúrico 0.01 N equivale a 140.1 µg de nitrógeno.

Si la titulación se efectúa con solución de ácido sulfúrico 0.02 N, calcular considerando que cada mililitro de solución de ácido sulfúrico 0.02 N, equivale a 280.2 µg de nitrógeno.

Interpretación. El valor resultante del nitrógeno cuantificado, está dentro de los límites de la monografía específica del producto correspondiente.

MGA 0612. DETERMINACIÓN DE NITROSAMINAS EN FÁRMACOS Y PREPARADOS FARMACÉUTICOS

Las nitrosaminas son un grupo de moléculas con potencial efecto cancerígeno, que tienen la estructura química de un grupo nitro unido a una amina (R₁N-(R₂)-N=O), y que resultan de la reacción en medio ácido del grupo nitro (ácido nítrico o sales de nitritos) con aminas primarias, secundarias y terciarias, así como también con las sales de amonio cuaternarias.

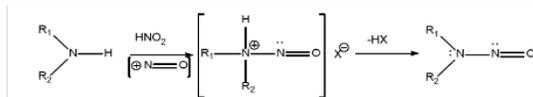


Figura 0612.1.

Estas moléculas no son tóxicas por sí mismas, pero en las células de mamíferos sufren de un proceso metabólico que conduce a la formación de las sales de diazonio, altamente reactivas con el material genético celular. Esta condición biológica significa un riesgo para la salud humana y obliga a evaluar la presencia de estas moléculas a un valor límite con base en la dosis administrada en un preparado farmacéutico. Lo anterior implica realizar un análisis previo del riesgo de su presencia en el fármaco o en el preparado farmacéutico, identificar las principales fuentes de formación de nitrosaminas, las cuales son:

- Durante la síntesis del principio activo, donde se vea involucrado un grupo amino y ácido nítrico o sales de nitritos. De tal forma que, mientras más compleja sea la estructura molecular del fármaco, mayor será la diversidad de nitrosaminas que potencialmente se pueden formar.
- En el reciclaje de algunos disolventes durante los procesos de purificación, que se hayan contaminado previamente.
- En la adición de azida de sodio como conservador en materias primas a granel.
- Durante los procesos de acondicionamiento con materiales plásticos termo-modelados, donde el calor generado y el contacto del preparado farmacéutico con el empaque primario puede generar la interacción fármaco-polímero

Por tanto, se debe considerar que durante un tratamiento farmacoterapéutico convencional, un individuo podrá estar expuesto a la ingesta de nitrosaminas aportadas por diferentes fármacos, y que el consumo total podría ser aditivo y tóxico para el organismo.

Este método general tiene por objetivo la identificación y cuantificación del mayor número de nitrosaminas nuevas o no reportadas (véase *tabla 0612.1*), por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas triple cuadrupolo (LC-MS/MS) con una resolución de masa mayor a 25 000 y una exactitud de masa menor que 15 ppm. Además, se describen las condiciones de separación, identificación y cuantificación que podrá ser empleado en cualquier muestra siempre y cuando el proceso de extracción sea estudiado y validado previamente.

Las condiciones analíticas propuestas en el presente MGA mediante los *métodos I y II* son el punto de partida para la implementación de la técnica analítica finalmente empleada, y podrán ser optimizadas y en todos los casos validada por cada laboratorio que realice el análisis; dando alcance a las matrices diversas (todas las posibles mezclas de aditivos en cada preparado, así como a la interacción con su envase o empaque). Lo anterior, debido a la naturaleza compleja de la detección por espectrometría de masas y a la composición y características de la muestra a analizar.

Tabla 0612.1.

Nombre común y químico	Acrónimo	No. CAS	Estructura	Fórmula química	Peso molecular
Nitrosodimetilamina <i>N</i> -Metil- <i>N</i> -nitrosometanamina	NDMA	62-75-9		C ₂ H ₆ N ₂ O	74.08
Nitrosodietilamina <i>N</i> -Etil- <i>N</i> -nitrosoetanamina	NDEA	55-18-5		C ₄ H ₁₀ N ₂ O	102.14
Nitroso-diisopropilamina <i>N</i> -isopropil- <i>N</i> -nitrosoisopropilamina	NDIPA	601-77-4		C ₆ H ₁₄ N ₂ O	130.19
Nitrosoetilisopropilamina <i>N</i> -Butil- <i>N</i> -nitroso-1-btanamina	NEIPA	16339-04-1		C ₅ H ₁₂ N ₂ O	116.16
Nitrosodibutilamina <i>N</i> -Butil- <i>N</i> -nitroso-1-butanamina	NDBA	924-16-3		C ₈ H ₁₈ N ₂ O	158.25
Nitrosometilaminobutírica Ácido <i>N</i> -nitroso- <i>N</i> -metil-4-aminobutírico	NMBA	61445-55-4		C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	146.15

Los límites permitidos de nitrosaminas estarán especificados en la monografía individual de cada fármaco y preparado farmacéutico con potencial riesgo de contener estas moléculas; a especificación deberá estar basada en la ingesta diaria permitida de las mismas, de acuerdo con el esquema terapéutico establecido para cada medicamento. La *tabla 0612.2* muestra los límites que se ha determinado son aceptables de ingesta por día para distintas nitrosaminas.

Tabla 0612.2. Límites aceptables de ingesta para NMDA, NDEA, NDIPA, NEIPA, NDBA y NMBA en fármacos y preparados farmacéuticos.

Nitrosamina	Límites de ingesta aceptable (ng/día)
NDMA	96
NDEA	26.5
NDIPA	96
NEIPA	26.5
NDBA	26.5
NMBA	26.5

¹ El límite de ingesta diaria a un compuesto como NMDA, NDEA, NDIPA, NEIPA, NDBA y NMBA que se aproxima a un riesgo de cáncer de 1:100 000 después de 70 años de exposición.

² La conversión del límite de ingesta diaria en ppm varía según el producto y se calcula con base en la dosis máxima diaria (MDD) de un medicamento, como se refleja en la etiqueta del medicamento (ppm = AI (ng) / MDD (mg)).

La cuantificación de nitrosaminas en las muestras de análisis está basada en la comparación puntual contra una preparación de referencia inyectada al sistema cromatográfico de manera repetida. Para tal fin, cada laboratorio deberá validar la linealidad del método en un intervalo de cuantificación de 1 a 25 ng/mL, empleando una fuente de ionización por electro-spray en modo positivo, considerando las relaciones masa/carga de los iones precursores y los iones fragmento de acuerdo con la *tabla 0612.3*, ajustar el ancho de pico espectral a 0.75 uma para evitar confusión con los isóbaros, y permitir la integración total de los picos cromatográficos que presenten hombros o coleo debido a la presencia de los conformeros en algunas nitrosaminas.

Tabla 0612.3.

Impureza	NDMA	NMBA	NDEA	NEIPA	NDIPA	NDBA
m/z ⁺	75.10 > 43.16	147.10 > 117.00	102.83 > 75.08	117.10 > 75.10	131.11 > 47.00	159.14 > 57.20

MÉTODO I. Determinación de nitrosaminas en metformina y bloqueadores de receptor a Angiotensina-2 (*sartanes*) por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a espectrometría de masas triple cuadrupolo.

El presente método tiene por objetivo la cuantificación de NMDA, NDEA, NEIPA, NDIPA, NDBA y NMBA tanto en la materia prima de los fármacos, como en los preparados farmacéuticos correspondientes en la forma de sus productos terminados.

Fase móvil

Solución A. Mezcla de ácido fórmico:Agua (1:1 000).

Solución B. Mezcla de ácido fórmico:Metanol (1:1 000).

Nota: Para la solución B, se puede utilizar otro disolvente como el acetonitrilo que iguale o mejore la separación de los picos cromatográficos.

Realizar el análisis cromatográfico empleando el gradiente de elución descrito en la *tabla 0612.4*.

Tabla 0612.4.

Tiempo (min)	Solución A (%)	Solución B (%)
0	90	10
1.5	90	10
7.0	45	55
17.0	45	55
17.1	10	90
21.0	10	90
21.1	90	10
25.0	90	10

Diluyente y Blanco de reactivos. Metanol grado espectrométrico, o algún otro disolvente grado espectrométrico en el cual las nitrosaminas sean solubles.

Solución de lavado de la jeringa del inyector. Mezcla de metanol: agua (80:20) con ácido fórmico al 0.1 % (v/v).

Solución madre de referencia. Preparar la solución madre de la mezcla de nitrosaminas a partir de los estándares comerciales disponibles, en el volumen adecuado de diluyente a fin de obtener las siguientes concentraciones indicadas en la siguiente tabla:

Tabla 0612.5. Mezcla de estándares (solución madre)

Nitrosamina	Concentración (ng/mL)
NDMA	100
NDEA	100
NEIPA	100
NDIPA	100
NDBA	100
NMBA	200

Preparación de la solución de referencia de trabajo.

Transferir exactamente una alícuota de 1.0 mL de la solución madre a un matraz volumétrico de 50 mL y llevar al aforo, preparar diariamente.

Preparación de la muestra. Tomar el peso equivalente de 100 mg de principio activo en polvo o triturar una cantidad apropiada de tabletas de manera que al disolver su contenido en 5 mL de diluyente se obtenga una concentración final de 20 mg/mL, mezclar por un minuto usando un mezclador tipo vórtice. Agitar la muestra durante 40 min con un agitador mecánico y centrifugar por 15 min a 4500 rpm. Filtrar el sobrenadante a través de filtro de jeringa con membrana de 0.22 µm, se debe verificar que el filtro sea compatible con el diluyente empleado, descartar los primeros mililitros y colocar en un vial para cromatografía.

Condiciones del equipo. Columna de 3.0 mm × 15 cm, empacada con L1 de 2.5 µm. Temperatura de la columna de 40 °C. Velocidad de flujo de 0.6 mL/min y la temperatura de las muestras mantenerlas a 8 °C.

Nota: los parámetros de operación como las temperaturas del capilar y gases de soporte se debe ajustar a la marca del equipo y condiciones del laboratorio.

Procedimiento. Inyectar al cromatógrafo no menos de 5 muestras de la preparación de referencia; el coeficiente de variación para cada una de las nitrosaminas no debe ser mayor que 10.0 %.

Una vez cumplida la aptitud del sistema, inyectar al cromatógrafo por separado, la preparación de referencia de la mezcla de estándares en un volumen adecuado y posteriormente la preparación de la muestra.

Las áreas de cada uno de los picos cromatográficos extraídos de los correspondientes canales de las relaciones masa/carga se utilizan para la cuantificación de las correspondientes nitrosaminas. Es importante considerar que, dependiendo del tipo de columna cromatográfica de fase reversa empleada, tanto la NMBA como la NEIPA pueden aparecer como picos dobles, debido a la presencia de conformeros *syn* y *anti*, los cuales deberán ser integrados como un solo pico.

Calcular la concentración de las diferentes impurezas empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Nitrosamina ng/mg (ppm)} = (A_m/A_{ref})(C_{ref}C_m)$$

Donde:

A_m = Área del pico de nitrosamina en la muestra

A_{Sref} = Área promedio ($n = 6$) del correspondiente pico de nitrosamina en 6 inyecciones consecutivas de la solución de la mezcla de los estándares.

C_{Sref} = Concentración de la nitrosamina correspondiente en la solución de mezcla de estándares (ng/mL).

C_m = Concentración nominal del principio activo, en miligramos por mililitro (alrededor de 20 mg/mL).

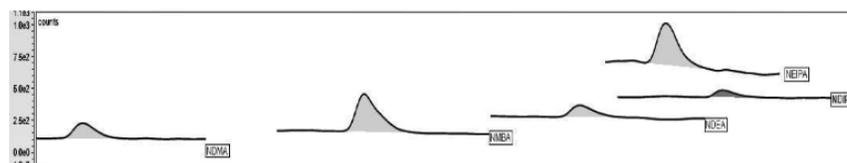


Figura 0612.2. Cromatograma ejemplo correspondiente a la elución de la mezcla de estándares de nitrosaminas.

Método II. Determinación de las nitrosaminas en metformina y bloqueadores de receptor a Angiotensina-2 (*sartanes*) por *cromatografía de líquidos de ultra-alta resolución acoplado a espectrometría de masas triple cuadrupolo*.

Las condiciones de preparación de las soluciones de referencia y preparación de la muestra, así como las consideraciones para la cuantificación son las mismas que en el *método 1*.

Fase móvil

Solución A. Mezcla de ácido fórmico: Agua (1:1 000).

Solución B. Mezcla de ácido fórmico: Acetonitrilo (1:1 000).

Realizar el análisis cromatográfico de manera isocrática, empleando una mezcla 90:10 (v/v) de solución A y solución B, o utilizar una mezcla de solución A y solución B que permita la separación de picos.

Solución de lavado de la jeringa del inyector. Mezcla de metanol: agua (80:20) con ácido fórmico al 0.1 % (v/v).

Solución de purga de las líneas del equipo: Metanol 100 %.

Condiciones del equipo. Columna de 2.1 mm × 10 cm, empacada con L1 de 1.7 µm. Temperatura de la columna de 30 °C. Velocidad de flujo de 0.3 mL/min y la temperatura de las muestras mantenerlas a 20 °C.

Nota: Para la solución B, se puede utilizar otro disolvente como el acetonitrilo que iguale o mejore la separación de los picos cromatográficos.

Procedimiento. Inyectar al cromatógrafo no menos de 5 muestras de la preparación de referencia; el coeficiente de variación no debe ser mayor que 10.0 %.

Una vez cumplida la aptitud del sistema, inyectar al cromatógrafo por separado, volúmenes iguales de la preparación de referencia y posteriormente de la preparación de referencia.

Realizar el análisis cromatográfico empleando el gradiente de elución descrito en la *tabla 0612.6*.

Tabla 0612.6.

Tiempo (min)	Solución A (%)	Solución B (%)
0	90	10
5.0	90	10
6.0	10	90
9.0	10	90
9.1	90	10
14.0	90	10

Calcular las partes por millón de cada una de las posibles nitrosaminas encontradas en la porción de polvo o tabletas tomada, de manera idéntica al *Método I*.

Método III. Determinación de nitrosaminas en ranitidina por *cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a espectrometría de masas triple cuadrupolo*, empleando una *fuerza de ionización APCI en modo positivo*, considerando las *relaciones masa/carga de los iones precursores y los iones fragmento cuantificable y confirmatorio*.

Método III. Determinación de nitrosaminas en ranitidina por *cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a espectrometría de masas triple cuadrupolo*, empleando una *fuerza de ionización APCI en modo positivo*, considerando las *relaciones masa/carga de los iones precursores y los iones fragmento cuantificable y confirmatorio*.

Fase móvil

Solución A. Mezcla de ácido fórmico: Agua (1:2 000). Medir 250 µL de ácido fórmico y depositar en un matraz volumétrico de 500 mL, llevar a volumen con agua grado espectrométrico.

Solución B. Mezcla de ácido fórmico: Metanol (1:2000). Medir 125 µL de ácido fórmico y depositar en un matraz volumétrico de 250 mL, llevar a volumen con metanol grado espectrométrico.

Diluyente y blanco de reactivos. Metanol grado espectrométrico, o algún otro disolvente grado espectrométrico en el cual las nitrosaminas sean solubles. Mezclar 980 mL de agua de alta pureza grado reactivo con 20 mL de metanol grado espectrométrico.

Solución de lavado de la jeringa del inyector. Medir 500 mL de metanol grado cromatográfico y mezclar con 500 mL de agua de alta pureza grado reactivo.

Solución madre de referencia. Preparar la solución madre de la mezcla de nitrosaminas a partir de los estándares comerciales disponibles.

Solución estándar de NDMA 2.00 mg/mL. Diluir una alícuota del estándar equivalente a 5 mg en metanol grado espectrométrico y llevar a un volumen de 2.5 mL, tomar en cuenta la pureza y presentación del estándar.

Solución estándar de NDEA 2.00 mg/mL. Diluir una alícuota del estándar equivalente a 5 mg en metanol grado espectrométrico y llevar a un volumen de 2.5 mL, tomar en cuenta la pureza y presentación del estándar.

Solución estándar de NEIPA 6.25 mg/mL. Disolver 25 mg de estándar en 4 mL de metanol grado espectrométrico, tomar en cuenta la pureza y presentación del estándar.

Solución estándar de NDIPA 12.50 mg/mL. Disolver 50 mg de estándar en 4 mL de metanol grado espectrométrico, tomar en cuenta la pureza y presentación del estándar.

Solución estándar de NDIPA 200 µg/mL. Tomar una alícuota de 160 µL de la disolución de estándar NDIPA de la concentración de 12.50 mg/mL y llevar a volumen de 10 mL con solución diluyente.

Preparar la mezcla de estándares como se indica a continuación y llevar a aforo con el volumen adecuado de diluyente a fin de obtener las concentraciones indicadas en la siguiente *tabla*:

Tabla 0612.7.

Mezcla de estándares	Concentración (mg/mL)	µL	Volumen final (mL)	Concentración (mg/mL)	Concentración final (ng/mL)
NDMA	2.00	100	100	0.0020	2 000
NDEA	2.00	100		0.0020	2 000
NEIPA	6.25	32		0.0020	2 000
NDIPA	0.20	1 000		0.0020	2 000

Soluciones de calibración. Tomar las alícuotas necesarias de la mezcla de estándares preparada en la *tabla 0612.7* y llevar a aforo con diluyente, para obtener las concentraciones de calibración indicadas en la siguiente tabla:

Tabla 0612.8. Estándares de calibración (Curva de Calibración)

Nivel de Calibración	Concentración de NDMA, NDEA, NEIPA, NDIPA (ng/mL)
1	1.0
2	3.0
3	8.0
4	20.0
5	50.0
6	80.0
7	100.0
8	150.0

Solución de purga de las líneas del equipo. Mezclar 980 mL de agua de alta pureza grado reactivo con 20 mL de metanol grado espectrométrico.

Condiciones del equipo. Columna de 2.1 mm × 10 cm, empacada con L1 de 1.8 μm. Temperatura de la columna de 35 °C y flujo de 0.4 mL/min y la temperatura de las muestras mantenerlas a 15 °C.

Procedimiento. Inyectar al cromatógrafo no menos de 5 muestras (7 μL) de la preparación de referencia y registrar los picos respuesta; el coeficiente de variación no debe ser mayor que 10.0 %. Una vez cumplida la aptitud del sistema, inyectar al cromatógrafo por separado, volúmenes iguales de cada una de las soluciones de referencia de calibración y posteriormente de la preparación de la muestra preparada como se indica en la monografía.

Tabla 0612.9.

Tiempo (min)	Solución A (%)	Solución B (%)
Inicial	98.0	2.0
2.30	98.0	2.0
8.00	70.0	30.0
13.50	70.0	30.0
14.00	95.0	5.0
16.00	95.0	5.0
16.50	98.0	2.0
20.00	98.0	2.0

Calcular la concentración de las diferentes impurezas empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Nitrosaminas (ppm (ng/mg))} = \left[\frac{C_{\text{nitrosamina}}}{(PM/V_{\text{solvente}})} \right]$$

Donde:

$C_{\text{nitrosamina}}$ = Concentración de nitrosamina en ng/m calculada por el equipo.

PM : Peso equivalente de ranitidina en el polvo de producto terminado o materia prima de ranitidina.

V_{solvente} = Volumen de agua utilizado para disolver la muestra.

MGA 0621. OSMOLALIDAD Y OSMOLARIDAD

La osmolalidad es una forma de expresar la concentración de una solución, asociada a una de las propiedades coligativas de las soluciones, la presión osmótica. La presión osmótica es la fuerza motriz que tiende a equilibrar los niveles de disolvente

entre dos soluciones de diferente concentración separadas por una membrana semipermeable (impermeable a los solutos y únicamente permeable al disolvente, en el caso de sistemas biológicos dicho disolvente es agua).

La osmolalidad es una función de las partículas en solución. Una partícula puede ser una molécula, un ion o una especie agregada (por ejemplo un dímero); por tanto, las especies que al momento de disolverse se disocian (iones) contribuyen en mayor forma a la osmolalidad, comparadas con aquellas que no se disocian.

Por ejemplo, 1 mol de NaCl al ser disuelto contribuye con 1 mol de Na^+ + 1 mol de Cl^- , 1 mol de MgCl_2 aporta 1 mol de Mg^{2+} + 2 moles de Cl^- , en tanto que un mol de glucosa en solución aporta únicamente 1 mol de soluto.

Al ser la presión osmótica una función directa de los solutos en una solución, esta se puede calcular mediante la siguiente fórmula:

$$\Pi = (\rho RT/100) \sum \sum v_i m_i \phi_{mi}$$

Donde:

Π = Presión osmótica.

ρ = Densidad del solvente a la temperatura T.

T = Temperatura en escala absoluta.

R = Constante universal de los gases.

v_i = Número de partículas formadas por la disociación de una molécula del *i*-ésimo soluto.

m_i = Molalidad del *i*-ésimo soluto.

ϕ_{mi} = Coeficiente molal osmótico del *i*-ésimo soluto.

Y el término que implica la sumatoria de los efectos de los solutos:

$$\sum v_i m_i \phi_{mi}$$

es la osmolalidad (ξ), la cual es expresada en Osmol/kg de solución, o usando una subunidad, los mOsmol/kg.

La osmolalidad del plasma sanguíneo, está en función principalmente de la cantidad de cloruro de sodio, glucosa y proteínas (albúmina) disueltas, y oscila entre 0.281 a 0.310 Osmol/kg (281 a 310 mOsmol/kg); y lo más parecido a esta es la osmolalidad exhibida por una solución al 0.9 % de cloruro de sodio (solución fisiológica) de 308 mOsmol/kg.

Cuando se formula una forma farmacéutica para administración endovenosa u oftálmica, es muy importante homologar la osmolalidad de la solución para hacerla isotónica al plasma, y evitar con ello eventos de hemólisis o dolor. La osmolalidad es un parámetro experimentalmente determinable y la osmolaridad se obtiene mediante un cálculo teórico de la aportación a la presión osmótica de cada una de las especies en solución.

Las unidades de concentración osmolar generalmente son expresadas en miliosmoles (mOsmol) de soluto por litro de solución. En términos generales, el peso de un Osmol es la masa molecular de una sustancia expresada en gramos, dividida entre el número de iones o especies químicas (n) que se forman en la solución. En las soluciones ideales, por ejemplo, n=1 para la glucosa, n=2 para cloruro de sodio o sulfato de magnesio, n=3 para cloruro de calcio y n=4 para citrato de sodio.

La concentración osmótica ideal puede ser calculada empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración osmolar } \left(\frac{\text{mOsmol}}{\text{L}} \right) = \sum \left[\frac{\text{Masa de la sustancia (g/L)}}{\text{Masa molecular (g)}} (\text{Número de especies})(1000) \right]$$

Al incrementarse la concentración de soluto, la interacción entre las partículas del mismo se aumenta también y los valores de osmolaridad real disminuyen con respecto a los valores ideales.

13.2. Anexo B. Constancia de Seminario del Posgrado de Farmacia.



La Facultad de Farmacia de la
Universidad Autónoma del Estado de Morelos
a través de la
Jefatura de Posgrado en Farmacia



Hace constar que la:

Q. Layra Flores García

**Participó como ponente en el Seminario del Posgrado
en Farmacia con la conferencia titulada:**

*“Cuantificación de Nitrosaminas por Cromatografía de
Líquidos de Alta Resolución acoplada a espectrometría
de masas”*

Cuernavaca, Morelos, a 27 de noviembre de 2023

e-firma UAEM

Dra. Judith González Christen
Directora
Facultad de Farmacia

e-firma UAEM

Dr. Sergio Alcalá Alcalá
Jefe de Posgrado
Facultad de Farmacia



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JUDITH GONZALEZ CHRISTEN | Fecha:2023-11-26 23:02:19 | Firmante

CsUJZz+48KEQH+e5vsHamh257qmEalg2Yxmi7x43AIXzm37LatGz+ZVLpsyVik0MAJmXEX13vZWBTcp3fK1QLkMPTbjS0UGWgPihMQJnFuowavjotPumU6hZLaZSuWWhsN9AglFUmh5yf81UxtghkNUnohqV5KLDd+vLPZuoygeclNYiVpYkQhBI5Fqx74c0SSPxU18/R6RvbKgyxa8cDa6+M870AZiOfms1hOwJsrVAtqaFvuDhB2SizqGk8leCi5ZwR6as+9hY0j1deaj+cHCG0hVnpwVRWm5cs7gkQdKBVxEd7trM+LB+Pv/PvVdC4v3FPWdPY9mQ==

SERGIO ALCALA ALCALA | Fecha:2023-11-27 09:16:28 | Firmante

XQvIusWkVzoneqHEI9e6SC2MUprhcLH71bMT4jrNvZ5AgFOV753E5xF9EAIUCnsoTEFP1OnVbrXMFHQI9yQ00MdlHlg6U1CGGGU3H+4aED8wEVft++p4kRi24hkaPFE37bjcXIQTNJm10mdDJA9J07hICSwIcFwuBHBjJfBwusTSSW1k6H4dWcxZL431+W8rF1mqSuT7RVLxnM0cCkCSH8pY9e4qXRp9iH5cngVvYhlexyHpEaakoVW0YbAPj9YLMdxPybaafYqwDml1a/S4g5OIPeOPV8iddiESTx16PT8YtQ/KXHB5320oxrEOI460IKAUHFHxeMg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



6RMwTibJx

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/a6wNZulZXa11mJLlqPAYoNjk0Tz7ARZU>

13.3. Anexo C. Votos aprobatorios.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

Secretaría de Investigación

Jefatura de Posgrado

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Zayra Flores García

Título de la tesis: “EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE NITROSAMINAS EN MEDICAMENTOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA HIPERTENSIÓN DE LIBRE VENTA EN MÉXICO”

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia

Miembro del jurado:

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Sí se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

Dr. Sergio Alcalá Alcalá

Firma del miembro del jurado

13/Junio/2024

Fecha



Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209, Edificio C, Tercer piso,
Facultad de Farmacia, Tel. (777) 329 701 1, 329 70, 00, Ext. 7986 / posgrado_ff@uaem.mx

UAEM
RECTORÍA
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

SERGIO ALCALA ALCALA | Fecha:2024-06-14 13:55:08 | FIRMANTE

RindUTVjwdwDxwsVZQY5Qi8cvk7BYy69EUrvessew0aRgWC/CipnBQmK+jvUJRRhKoBzcP5b3P2g3IPGjzeupEIPHaZsRWngmAA57IRsUtl/yTDLiWoNYORBtXgC+7RSKx1fHwXY6EbfvfhjuSisuc9IL7bL3SZ/yahaS/uh39hbidjLZ79Q89s+4pnhavBCyh4GMOFANq2oSokWkuxau686Z7dcyFyd1b4SzaskyQciZQSFPCotUEFY6xiBO63XJ/zHdeVUuLl6uixLZNzhbyXT1R0UIXMit+88ZKHfur6p3MZkUkLUbi+EJbcy1r7GBLQo1Zg1LnjECxGXig==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[DxT8ByfVu](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/QRh79zy8Om1sxls402ixIP1NL7NhUoTP>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

Secretaría de Investigación

Jefatura de Posgrado

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Zayra Flores García

Título de la tesis: “EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE NITROSAMINAS EN MEDICAMENTOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA HIPERTENSIÓN DE LIBRE VENTA EN MÉXICO”

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia

Miembro del jurado:

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Sí se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

Dra. Adriana Valladares Méndez

Firma del miembro del jurado

13/Junio/2024

Fecha



Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209, Edificio C, Tercer piso,
Facultad de Farmacia, Tel. (777) 329 701 1, 329 70, 00, Ext. 7986 / posgrado_ff@uaem.mx

UAEM
RECTORÍA
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ADRIANA VALLADARES MENDEZ | Fecha:2024-06-14 10:50:53 | FIRMANTE

MGKdITJw5VxUueTKHLkSBpuflCjD0t+zk0JrED5nTmehhWWhbP7cKxr9dCp8qRx/2+ch2LciRMCIm5lvazTL5kHKgNLnJED+5muhxUNTO+W5+J05XVOkM7yJtHY0srMQMSeaqyqblEmWBIEhxnKdcXlih2xN4EQfOEihQlzQldhJ6gjDUubGXwKumwWIKBTq8PMInjTM1b1YRJVL+EW/7Ke/TD4ojlamZJ0S9S6UXFRMGKxz4V0vaXpZgZmKfzuzSD1GVgtqpkMd0M7j8K8Na+EgpNUd2nUd28ZEYwl/zF1MtpmEsLwt24nEoucwD30QK41I4T7rOZ47ieDDgA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[c21JbkATd](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/d5CmvM76JBxAXCrG1WkmDyuZ1EMzH2me>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

Secretaría de Investigación

Jefatura de Posgrado

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Zayra Flores García

Título de la tesis: “EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE NITROSAMINAS EN MEDICAMENTOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA HIPERTENSIÓN DE LIBRE VENTA EN MÉXICO”

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia

Miembro del jurado:

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Sí se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

M. en Biotecnología Laura Rosas Calderón

Firma del miembro del jurado

13/Junio/2024

Fecha



Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209, Edificio C, Tercer piso,
Facultad de Farmacia, Tel. (777) 329 701 1, 329 70, 00, Ext. 7986 / posgrado_ff@uaem.mx

UAEM
RECTORÍA
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

LAURA ANGÉLICA ROSAS CALDERÓN | Fecha:2024-06-17 20:06:05 | FIRMANTE

Alpg0fnvjOOCsG344W7BeD9ClhDrjBnnlwi0momm/S3LkDqb25ugQY1gD3CMxtTB2JWxouExTxkQyN0NV4RIINA+igHPyu4i6TOs4a29y+GSxPM/su/ICaJ9du6SzJUhxfBh6LOxG
BYm1nJFNpDFFGwrDypPZj2jcRWrs7yknCF1R9KPck+1jD9IA8pDFj8DYKO00IBfWzUIE/wDEdXzeC17CYNkVjICyYfjQ8qsB/2/rVifRdFXsEfbQzIqjxdpiu3zNrEH8Y7X5RqHuS
VqOecd4MrtcgJ8ENJRH9DeVhwUJ3UNtNSfEFxQocioLXM+JwE/9U97gFTEIsNIQ==



Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

[8ikOpY9mE](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/L1ZcJgoyjtHqB2s7uZUK33B3f1q11SM9>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

Secretaría de Investigación

Jefatura de Posgrado

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Zayra Flores García

Título de la tesis: "EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE NITROSAMINAS EN MEDICAMENTOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA HIPERTENSIÓN DE LIBRE VENTA EN MÉXICO"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia

Miembro del jurado:

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:
La tesis:

Sí se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

Dr. Alberto Marbán González

Firma del miembro del jurado

13/Junio/2024

Fecha



Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209, Edificio C, Tercer piso,
Facultad de Farmacia, Tel. (777) 329 701 1, 329 70, 00, Ext. 7986 / posgrado_ff@uaem.mx

UAEM
RECTORÍA
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ALBERTO MARBÁN GONZÁLEZ | Fecha: 2024-06-16 22:45:11 | FIRMANTE

SSTL4JDJcQ2T16P0IBKqSovGzhZx7AkXfk35Ue2QEtsIi9Sw0JEqsNPnCeJh8SUbr6f54K26G9uG8aYeRoAOgaRLd+TebY8KI5XNDqyd+2+bHzQ1ztu3OdWArp/a/LyXfdPIJrhYI
Cw41Y8voEx/TGn8gr4SvKGJ9CLTybH/5YU2hPF8kGBht3K+CNEzi/7XVeRtRm1s0scShXNVIDH5i6Pzqwu4HWVd2WKCPZChPdWPW0HUedhFEzgz2mGsxYQZJr9g/nU/gXOR
M7c02S5TqFeNuFGCE1MR3mbJkdFPPV+k7snPTO6zQmrS+nqXs/8fx6PzTjWZ/mzKICgOX9g==



Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

7BSlrKyJ1

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/R9n2EhUYLoZ7nsh1YNZmCOnrz1oGkkV6>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

Secretaría de Investigación

Jefatura de Posgrado

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Zayra Flores García

Título de la tesis: “EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE NITROSAMINAS EN MEDICAMENTOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA HIPERTENSIÓN DE LIBRE VENTA EN MÉXICO”

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia

Miembro del jurado:

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Sí se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

Dr. Julio César Rivera Leyva

Firma del miembro del jurado

13/Junio/2024

Fecha



Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209, Edificio C, Tercer piso,
Facultad de Farmacia, Tel. (777) 329 701 1, 329 70, 00, Ext. 7986 / posgrado_ff@uaem.mx

UAEM
RECTORÍA
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JULIO CESAR RIVERA LEYVA | Fecha:2024-06-14 11:43:45 | FIRMANTE

ByUkbgV/rQoTCV+Yx0v2Pq4BIQ3fy8u31lij3i+hc7RvGRkibYCNZi7Dqon+kD3mnNMqAeJmylVdq+aqiaL5v0s1ThuJi6uj8/LPM5ZKXF56pij6yXvernosq5H4IWat7CM1ahTPk+1EEi
c2MFRXHRLINHIDfi+jTnwwwS6uXO++gfqCZxPAXITBIX+g0zL/Dm9g321Y1npLWU1Wub4euZqAxQ3mT3VUynurxeAwypW9px0J+ppRSQAe3uPESdBGPFwFPOq98QIKY12xAh
N+ih5BWWVNZ/AKzVnVgR91ALexbrObYpsFUJG53lbWUCGJ92/g9dHWPYRiYpHKU1TQ==



Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

E7IGvBaur

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/kZS2C478QFTC0yKASz0T9BBz2xoi1HDO>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029