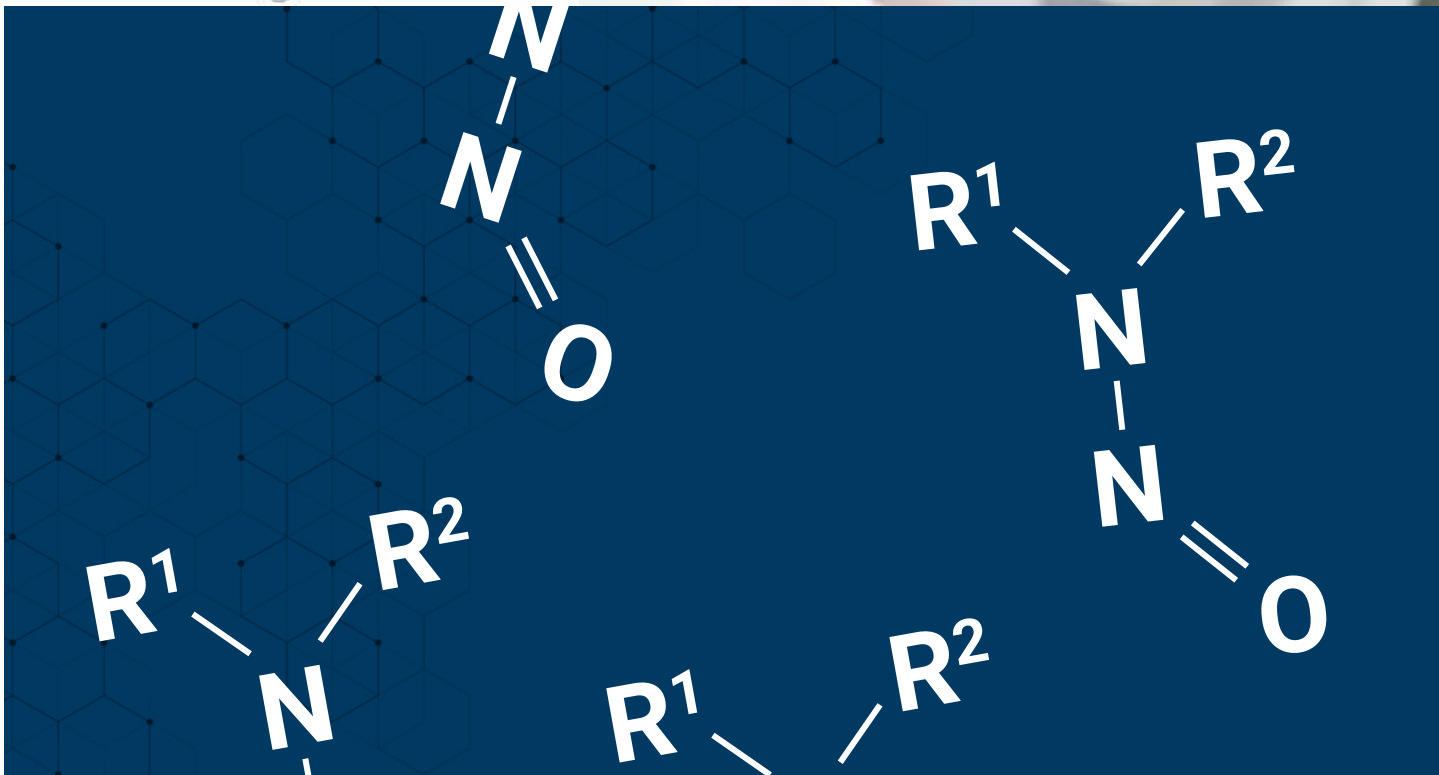


# Análisis de nitrosaminas en fármacos

Utilizando el sistema LC/MS/MS de triple cuadrupolo y LC/MS  
de cuadrupolo tiempo de vuelo

Guía de pedidos para el flujo de trabajo con consumibles



Las impurezas mutagénicas de fármacos e ingredientes farmacéuticos activos suponen un riesgo significativo para la salud y la seguridad (incluso en pequeñas cantidades), por lo que son una importante fuente de preocupación para los laboratorios farmacéuticos. Estas impurezas mutagénicas pueden dañar el ADN, produciendo mutaciones y, potencialmente, cáncer. Los esfuerzos para tratar y controlar la presencia de niveles de trazas de impurezas mutagénicas son de especial preocupación para los organismos de regulación internacionales. Debido a ello, la FDA estadounidense y otros organismos de regulación han adoptado medidas para tratar el problema de las impurezas mutagénicas en los fármacos<sup>1</sup>. La detección y cuantificación de estas trazas de nitrosaminas en fármacos e ingredientes farmacéuticos activos puede resultar difícil, necesiéndose el uso de herramientas avanzadas y sensibles para cumplir los requisitos reglamentarios.

La lista de fármacos e ingredientes farmacéuticos activos para la determinación de nitrosaminas se ha ampliado más allá de los fármacos de sartán bloqueadores de los receptores de angiotensina II (BRA) e incluyen la metformina, un fármaco oral para la diabetes, y los agonistas de los receptores de histamina-2, como la ranitidina. Prueba de ello son las recientes retiradas de metformina por distintos organismos reguladores, como la FDA (Food & Drug Administration) estadounidense, el Directorio Europeo para la Calidad de los Medicamentos (EDQM) y la Health Sciences Authority (HSA) de Singapur, debido a la presencia de N-nitroso-dimetilamina (NDMA). Estas impurezas: N-nitrosodimetilamina (NDMA), N-nitrosodietilamina (NDEA), N-nitrosodiisopropilamina (NDIPA), N-nitrosoetilisopropilamina (NEIPA) y N-nitrosodibutilamina (NDBA) están clasificadas como probables carcinógenos humanos y se considera que se han introducido en los productos finales debido a reacciones químicas que tienen lugar durante el proceso de fabricación de ingredientes farmacéuticos activos.

Estas impurezas se pueden detectar utilizando un sistema GC/MS de cuadrupolo simple (GC/MSD) o GC/MS/MS de triple cuadrupolo (GC/TQ)(1), LC/MS/MS de triple cuadrupolo (LC/TQ) o LC/MS de cuadrupolo tiempo de vuelo (LC/Q-TOF)(2-7). Los métodos basados en LC/MS/MS son generalmente muy específicos y muy sensibles. Por este motivo, han servido como base para el desarrollo de métodos para detectar y cuantificar impurezas de nitrosaminas en ingredientes farmacéuticos activos y en fármacos tales como metformina, valsartán, losartán e irbesartán.



Figura 1. De izquierda a derecha: Sistema LC 1260 Infinity II, LC/MS de triple cuadrupolo 6470B, LC/MS Q-TOF 6550 iFunnel y LC/MS de triple cuadrupolo Ultivo.

<sup>1</sup>FDA de EE. UU.: [www.fda.gov/media/131868/download](http://www.fda.gov/media/131868/download) Consejo de Europa: [www.edqm.eu/en/news/omcls-release-three-methods-determination-ndma-sartans](http://www.edqm.eu/en/news/omcls-release-three-methods-determination-ndma-sartans) Health Canada: [healthycanadians.gc.ca/recall-alert-rappel-avis/hc-sc/2020/72963a-eng.php](http://healthycanadians.gc.ca/recall-alert-rappel-avis/hc-sc/2020/72963a-eng.php) FDA de Taiwán: [www.fda.gov.tw/ENG/siteList.aspx?sid=10360](http://www.fda.gov.tw/ENG/siteList.aspx?sid=10360)

## Opciones para las columnas

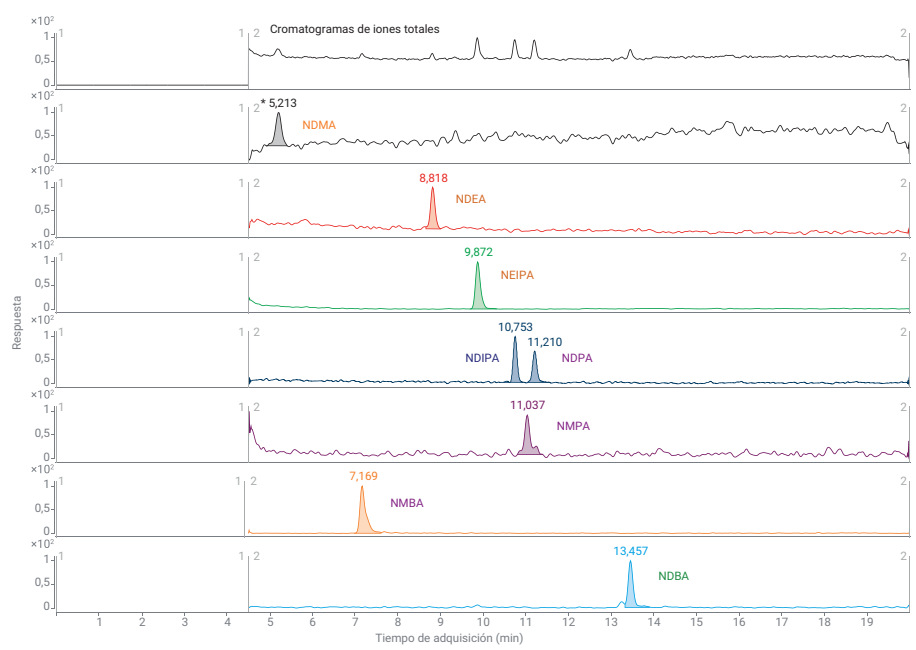
El ligando pentafluorofenil (PFP) de la **columna InfinityLab Poroshell 120 PFP** usada en el Método 2 (Tabla 1) (8) aporta un mecanismo de separación ortogonal con las fases C18. Las fases PFP permiten separar analitos en función de pequeñas diferencias de estructura, sustitución y acceso estérico de las fracciones polares. La selectividad resultante para isómeros posicionales, compuestos halogenados y analitos polares resulta especialmente útil a la hora de analizar mezclas complejas. Dado que NDIPA y NDPA son isómeros posicionales, InfinityLab Poroshell 120 PFP es la columna recomendada ideal para esta separación por su *facilidad de uso*.

La columna **InfinityLab Poroshell HPH-C18**, que también se ha usado para este análisis en el Método 1 (Tabla 1) (8) incorpora una tecnología híbrida de partícula que mejora la *robustez general de la partícula a un pH ampliado*, lo que permite vidas útiles prolongadas y menos cambios de columna. Sin embargo, cuando se use esta columna, resulta crucial disponer de un proceso de desarrollo de métodos robusto para garantizar que los métodos sean duraderos, estables y fiables. Dado que la retención y la selectividad de los compuestos ionizables pueden variar notablemente en función del pH, la realización de análisis con valores de pH bajos, medios y altos se está convirtiendo en una práctica habitual durante el desarrollo de métodos. Además de la optimización de las condiciones del gradiente, y con el fin de conseguir la separación entre los isómeros posicionales NDIPA y NDPA, también es necesario optimizar los parámetros de MS/MS del instrumento para conseguir la máxima sensibilidad.

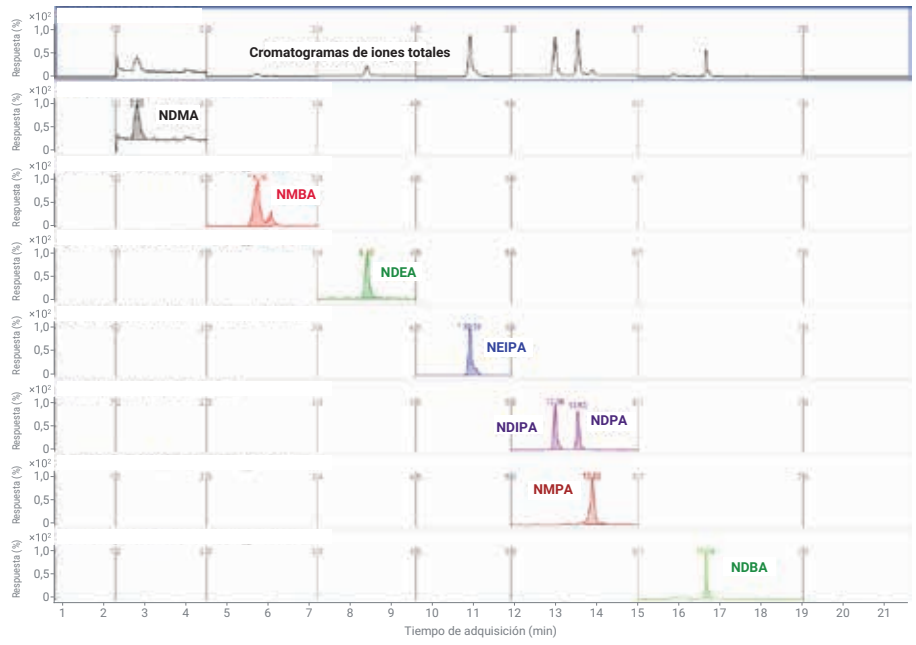
## Configuración y parámetros de LC

**Tabla 1.** Configuración y parámetros de UHPLC. Para conocer los detalles del método, consulte la Referencia 8.

Parámetro	Valor							
	Método 1	Método 2						
Instrumentos	Bomba de alta velocidad Agilent 1290 Infinity II (G7120A) Muestreador múltiple Agilent 1290 Infinity II (G7167B) Termostato multicolumna Agilent 1290 Infinity II (G7116B) Detector de diodo array Agilent 1260 Infinity (G1315C)	Bomba de alta velocidad Agilent 1290 Infinity II (G7120A) Muestreador múltiple Agilent 1290 Infinity II (G7167B) Termostato multicolumna Agilent 1290 Infinity II (G7116B) Detector de diodo array Agilent 1260 Infinity (G1315C)						
Lavado de la aguja	Metanol: agua (80:20)	Metanol: agua (80:20)						
Diluyente de la muestra	Agua: metanol (95:5)	Metanol						
Temp. del muestreador múltiple	10 °C	10 °C						
Volumen de inyección	20 µl	5 µl						
Columna analítica	Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C18, 4,6 × 150 mm, 2,7 µm (ref. 693975-702(T))	Agilent InfinityLab Poroshell 120 PFP 3,0 × 150 mm, 2,7 µm (ref. 693975-308)						
Temp. columna	40 °C	40 °C						
Fase móvil A	Ácido fórmico al 0,1 % en agua	Ácido fórmico al 0,1 % en agua						
Fase móvil B	Ácido fórmico al 0,1 % en metanol	Ácido fórmico al 0,1 % en metanol						
Flujo	0,5 ml/min	0,5 ml/min						
Gradiente	<b>Tiempo (min)</b>	<b>% A</b>	<b>% B</b>	<b>Flujo (ml/min)</b>	<b>Tiempo (min)</b>	<b>% A</b>	<b>% B</b>	<b>Flujo (ml/min)</b>
	0	95	5	0,5	0	95	5	0,5
	2	95	5	0,5	3	95	5	0,5
	7	40	60	0,5	14	40	60	0,5
	10	25	75	0,5	17	10	90	0,5
	11	10	90	0,5	19	10	90	0,5
	16,5	10	90	0,5	19,1	95	5	0,5
	16,6	95	5	0,5	22	95	5	0,5
	20,0	95	5	0,5				
	Tiempo de parada	20 minutos			22 minutos			
Longitud de onda UV	230 nm			230 nm				



**Figura 2.** Cromatograma MRM representativo de todas las impurezas de nitrosaminas a 0,5 ng/ml usando el Método 1 (Para conocer los detalles del método, consulte la Referencia 8).



**Figura 3.** Cromatograma MRM representativo de las ocho impurezas de nitrosaminas a 3 ng/ml usando el Método 2 (Para conocer los detalles del método, consulte la Referencia 8).

## Sencilla selección e información para pedidos

En esta guía se ofrecen recomendaciones para productos de Agilent usados en este análisis, de modo que pueda encontrar rápidamente lo que busca. Haga clic en el vínculo Mi lista\* en el encabezado siguiente para añadir los elementos a su lista "Productos favoritos" de la tienda en línea de Agilent. Después, introduzca las cantidades que necesita de cada producto. Su lista permanecerá guardada en "Productos favoritos" para que pueda usarla para futuros pedidos.

Haga clic en [Mi lista](#) para descargar todos los artículos de esta tabla a su lista Productos favoritos

Descripción del producto	Referencia
<b>Patrones de nitrosaminas y disolventes</b>	
Patrones de nitrosaminas (en cloruro de metileno)	<a href="#">US-113N-1</a>
Metanol ultrapuro para LC/MS InfinityLab	<a href="#">5191-4497</a>
Agua ultrapura para LC/MS InfinityLab	<a href="#">5191-4498</a>
Ácido fórmico, 5 ml	<a href="#">G2453-85060</a>
<b>Nitrosamina - Preparación de muestras</b>	
Tubos de centrifuga de 15 ml y tapas, 50/paq.	<a href="#">5610-2039</a>
Econofiltro Captiva, membrana de PVDF, 13 mm de diámetro, 0,2 µm de tamaño de poro, 1.000/paq.	<a href="#">5190-5261</a>
Filtro de jeringa Captiva Premium, membrana de PES, 15 mm de diámetro, 0,2 µm de tamaño de poro, 100/paq. (certificado para LC/MS)	<a href="#">5190-5096<sup>1</sup></a>
Filtro de jeringa Captiva Premium, membrana de nylon, 15 mm de diámetro, 0,2 µm de tamaño de poro, 100/paq. (certificado para HPLC)	<a href="#">5190-5088<sup>2</sup></a>
Jeringa desechable Captiva, 5 ml, 100/paq.	<a href="#">9301-6476</a>
Jeringa desechable Captiva, 10 ml, 100/paq.	<a href="#">9301-6474</a>
<b>Nitrosamina - Columna para LC</b>	
InfinityLab Poroshell 120 PFP, 3,0 × 150 mm, 2,7 µm (recomendada)	<a href="#">693975-308</a>
Precolumna InfinityLab Poroshell 120 PFP, 3,0 mm, 2,7 µm (recomendada)	<a href="#">823750-915</a>
InfinityLab Poroshell HPH-C18, 4,6 × 150 mm, 2,7 µm	<a href="#">693975-702</a>
InfinityLab Poroshell HPH-C18, 4,6 mm, 2,7 µm, precolumna para UHPLC, 3/paq.	<a href="#">820750-922</a>
<b>Nitrosamina - Consumibles para LC</b>	
Conjunto de conexión rápida InfinityLab, 0,12 x 105 mm, para conexión de inyector de la columna en UHPLC	<a href="#">5067-5957</a>
Conjunto de conexión rápida InfinityLab, 0,17 x 105 mm, para conexión de inyector de la columna en UHPLC	<a href="#">5067-6166</a>
Conector de giro rápido InfinityLab, para salida de la columna	<a href="#">5067-5966</a>
Capilar de giro rápido, 0,12 x 280 mm, para la conexión de la columna al detector	<a href="#">5500-1191</a>
Kit de tapa de residuos Stay Safe GL45 con 4 puertos y depósito de residuos de 6 l	<a href="#">5043-1221</a>
Filtro de carbón con lector de tiempo para el depósito de residuos	<a href="#">5043-1193</a>
Kit de iniciación de tapas de disolvente InfinityLab Stay Safe	<a href="#">5043-1222</a>
Filtro de entrada de disolvente de acero inoxidable, tamaño de poro de 10 µm	<a href="#">01018-60025</a>
El dispositivo de filtrado de disolvente InfinityLab incluye embudo de vidrio, 250 ml, base de vidrio de soporte de membrana, matraz de vidrio, 1 l y abrazadera de aluminio	<a href="#">5191-6776<sup>3</sup></a>
Membrana de celulosa regenerada de 47 mm, 0,20 µm, 100/paq.	<a href="#">5191-4340<sup>3</sup></a>



Nitrosaminas - Viales y tapones	
Vial, tapón de rosca, ámbar, zona de escritura, certificado, 2 ml, 100/paq. Tamaño del vial: 12 x 32 mm (tapón de 12 mm)	<a href="#">5182-0716</a>
Tapón, de rosca, verde, de PTFE/silicona prerranurado, 100/paq. Tamaño del tapón: 12 mm	<a href="#">5183-2077</a>
Inserto de vial, 250 µl, vidrio desactivado con pies de polímero, 100/paq 5	<a href="#">5181-8872</a>
Nitrosaminas - Consumibles para MS	
Kit de repuesto de agujas APCI	<a href="#">G1946-68704</a>
Aguja APCI	<a href="#">G1960-20030</a>
Capilar, intercambio rápido, 0,6 mm	<a href="#">G1960-80060</a>



\* ¿Es la primera vez que utiliza "Mi lista"? Se le pedirá que introduzca su dirección de correo electrónico para verificar la cuenta. Si ya tiene cuenta de Agilent, podrá iniciar sesión. Si no tiene una cuenta registrada de Agilent, deberá [registrarse para solicitar una](#). Esta característica solo es válida en países que tengan habilitado el comercio electrónico. Todos los artículos se pueden pedir también a través de sus canales habituales de venta y distribución.

1. Con un rendimiento similar al de PVDF, esta membrana presenta una baja unión de proteínas y resulta ideal para el análisis de proteínas. Está disponible en un tamaño de paquete más pequeño (100/paq.) y está certificada para LC/MS.
2. Ideal para las necesidades de filtración generales. No debe emplearse para el análisis de proteínas. Está disponible en un tamaño de paquete más pequeño (100/paq.) y está certificada para HPLC.
3. El conjunto de filtrado de disolvente y las membranas de filtro asociadas no se recomiendan para su uso con los disolventes ultrapuros InfinityLab para LC/MS.

## Referencias

1. Nitrosamines analysis in pharmaceuticals using single quadrupole GC/MS and triple quadrupole GC/MS/MS: Consumables workflow ordering guide, publicación de Agilent ([5994-2979EN](#))
2. Nitrosamine Impurities Application Guide – Confidently detect and quantify mutagenic impurities in APIs and Drug Products ([5994-2393EN](#))
3. Determination of a Genotoxic NDMA Impurity Using the High-Resolution Agilent 6546 LC/Q-TOF in Ranitidine Drug Substance and Drug Products ([5994-1626EN](#))
4. Simultaneous Determination of Eight Nitrosamine Impurities in Metformin Using the Agilent 6470 Triple Quadrupole LC/MS ([5994-2286EN](#))
5. Determination of Nitrosamine Impurities Using the Ultivo Triple Quadrupole LC/MS ([5994-1383EN](#))
6. Determination of NDMA Impurity in Ranitidine Using the Agilent 6470 Triple Quadrupole LC/MS ([5994-1668EN](#))
7. Determination of Nitrosamine Impurities Using the High-Resolution Agilent 6546 LC/Q-TOF ([5994-1372EN](#))
8. Simultaneous Determination of Eight Nitrosamine Impurities in Metformin Extended-Release Tablets Using the Agilent 6470 Triple Quadrupole LC/MS ([5994-2533EN](#))

## Patrones químicos de Agilent

¿Busca patrones de alta calidad para otras aplicaciones? [Busque en nuestro catálogo de 5000 patrones químicos](#) para encontrar el mejor patrón para su método, aplicación o flujo de trabajo. ¿No encuentra el patrón adecuado en el catálogo? Nuestro sitio web también tiene una herramienta automatizada para calcular un presupuesto para patrones personalizados, que le ayudará a desarrollar el patrón adecuado para sus necesidades.

## Herramienta de selección para LC de Agilent

¿Busca la columna para LC más adecuada para sus aplicaciones? Utilice la [herramienta de selección de columnas para LC](#) de Agilent para seleccionar la columna para LC óptima.

## Agilent CrossLab: conocimientos reales, resultados reales

CrossLab es algo más que un sistema de instrumentos: integra servicios, consumibles y gestión de recursos para todo el laboratorio. De este modo, su laboratorio puede mejorar la eficacia, optimizar el funcionamiento, aumentar el tiempo de actividad de los instrumentos, desarrollar las habilidades de los usuarios y mucho más.

Para obtener más información acerca de Agilent CrossLab y conocer ejemplos de casos en los que se han conseguido grandes resultados, visite **[www.agilent.com/crosslab](http://www.agilent.com/crosslab)**

Encuentre un centro de atención al cliente de Agilent en su país: **[www.agilent.com/chem/contactus](http://www.agilent.com/chem/contactus)**

Obtenga respuestas a sus preguntas técnicas y acceda a recursos en la Comunidad Agilent: **[community.agilent.com](http://community.agilent.com)**.

España

**901 11 68 90**

**[customercare\\_spain@agilent.com](mailto:customercare_spain@agilent.com)**

Europa

**[info\\_agilent@agilent.com](mailto:info_agilent@agilent.com)**

Asia-Pacífico

**[inquiry\\_lsca@agilent.com](mailto:inquiry_lsca@agilent.com)**

Esta información está sujeta a cambios sin previo aviso.

RA44239.5764236111

© Agilent Technologies, Inc. 2021  
Publicado en EE. UU. el 10 de marzo de 2021  
5994-2977ES