

**Desarrollo y validación de un método LC-HESI MS/MS
para detectar y cuantificar N-nitrosaminas en Valsartán**

**Development and validation of a LC-HESI MS/MS
method to detect and quantify N-nitrosamines in Valsartan**

Carlos Andrés Reina-Velasco ¹
Universidad Politécnica Estatal del Carchi - Ecuador
carlosreinave@gmail.com

Carlos Alberto Brito-Dumancela ²
Universidad Central del Ecuador - Ecuador
carlosbrito.sc@hotmail.com

doi.org/10.33386/593dp.2024.6.2667

V9-N6 (nov-dic) 2024, pp 204-213 | Recibido: 18 de julio del 2024 - Aceptado: 20 de agosto del 2024 (2 ronda rev.)

1 ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-2632-4822>

2 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7371-5141>

Descargar para Mendeley y Zotero

RESUMEN

En la industria farmacéutica, la detección de N-nitrosaminas es esencial debido a su potencial carcinogénico. En el presente estudio, se desarrolló y validó un método LC-HESI-MS/MS robusto, eficiente y sensible para detectar y cuantificar simultáneamente 5 N-nitrosaminas (N-nitrosodietilamina, N-nitrosoetilisopropilamina, N-nitrosodiisopropilamina, N-nitrosodibutilamina y ácido N-nitrosometilaminobutírico) en Valsartán, un ingrediente activo de la familia de los Sartanes. Se desarrolló un método para la separación cromatográfica utilizando una columna Accuore C18 (2,6 μm , 150 x 3 mm) con elución en gradiente empleando ácido fórmico al 0,1% en agua (fase móvil A) y metanol (fase móvil B). Los límites de detección y cuantificación de las N-nitrosaminas oscilaron entre 0,0337 y 0,0628 ng/mL y 0,1022 y 0,2370 ng/mL, respectivamente, demostrando la alta sensibilidad y capacidad cuantitativa del método. La recuperación de las N-nitrosaminas se situó entre 70% y 130%, y la repetibilidad y precisión intermedia tuvieron coeficientes de variación menores al 10%, los mismos que fueron evaluados en un comprimido que contiene 3 principios activos farmacéuticos (Amlodipino, Hidroclorotiazida y Valsartán). Las curvas de calibración se construyeron en un rango de 1,0 a 15,0 ng/mL, obteniendo coeficientes de determinación (R^2) mayores a 0,995. La estadística jugó un papel crucial en este estudio, ya que confirmó la precisión, exactitud y fiabilidad del método mediante análisis de varianza, estudios de linealidad y la construcción de intervalos de confianza. El método propuesto es adecuado para el análisis preciso y confiable de N-nitrosaminas en Valsartán, contribuyendo a asegurar la calidad y seguridad de productos farmacéuticos.

Palabras claves: validación, n-nitrosaminas, cromatografía líquida, espectrometría de masas, valsartán

ABSTRACT

In the pharmaceutical industry, the detection of N-nitrosamines is essential due to their carcinogenic potential. In the present study, a robust, efficient and sensitive LC-HESI-MS/MS method was developed and validated to simultaneously detect and quantify 5 N-nitrosamines (N-nitrosodiethylamine, N-nitrosoethylisopropylamine, N-nitrosodiisopropylamine, N-nitrosodibutylamine and N-nitrosomethylaminobutyric acid) in Valsartan, an active ingredient of the Sartan family. A method for chromatographic separation was developed using an Accuore C18 column (2.6 μm , 150 x 3 mm) with gradient elution employing 0.1% formic acid in water (mobile phase A) and methanol (mobile phase B). The limits of detection and quantification of N-nitrosamines ranged from 0.0337 to 0.0628 ng/mL and 0.1022 to 0.2370 ng/mL, respectively, demonstrating the high sensitivity and quantitative capability of the method. The recovery of N-nitrosamines ranged between 70% and 130%, and the repeatability and intermediate precision had coefficients of variation less than 10%, the same that were evaluated in a tablet containing 3 active pharmaceutical ingredients (Amlodipine, Hydrochlorothiazide and Valsartan). Calibration curves were constructed in a range of 1.0 to 15.0 ng/mL, obtaining coefficients of determination (R^2) greater than 0.995. Statistics played a crucial role in this study, as it confirmed the precision, accuracy and reliability of the method through analysis of variance, linearity studies and the construction of confidence intervals. The proposed method is suitable for the accurate and reliable analysis of N-nitrosamines in Valsartan, contributing to ensure the quality and safety of pharmaceutical products.

Keywords: validation, n-nitrosamines, liquid chromatography, mass spectrometry, valsartan.

Introducción

El Valsartán es un medicamento antihipertensivo que pertenece a la clase de los antagonistas de los receptores de angiotensina II. Los receptores de la angiotensina II, AT1 y AT2, desempeñan un papel crucial en la regulación del sistema renina-angiotensina-aldosterona, influyendo en la presión arterial y el equilibrio hídrico. (Burnier & Brunner, 1998) La angiotensina II, al activar estos receptores, induce respuestas fisiológicas, como la vasoconstricción y la liberación de aldosterona. Sin embargo, desregulaciones en estos receptores se vinculan a enfermedades como hipertensión, enfermedad cardiovascular, fibrosis y nefropatías. (De la Sierra, 2013) La familia de los Sartanes son medicamentos que bloquean selectivamente estos receptores y se han desarrollado específicamente para tratar estas condiciones. (Alba-Leonel et al., 2014; Del Castillo et al., 1998; Fernandez-Andrade et al., 1998)

A pesar de su eficacia, el uso de Sartanes ha enfrentado desafíos debido a la detección de impurezas denominadas N-nitrosaminas, las cuales han sido catalogadas como altamente tóxicas y cancerígenas para el ser humano. (OMS, 2019) Estos compuestos se forman a partir de la reacción de aminas secundarias o terciarias con nitritos en condiciones ácidas. (Moser et al., 2023) Las N-Nitrosaminas son considerados contaminantes químicos de preocupación debido a su capacidad demostrada para inducir cáncer en varias especies animales. La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha clasificado varias nitrosaminas como carcinógenos conocidos o probables para los seres humanos, lo que subraya la importancia de su análisis y control en productos de consumo. (EMA, 2020) Basándose en el riesgo que implican las N-nitrosaminas, la FDA y la EMA impusieron varias normativas estrictas para controlar sus niveles desde la revisión de procesos de fabricación hasta la retirada de producto del mercado basándose en los límites aceptables de nitrosaminas para la ingesta diaria (medicamentos, alimentos y agua potable) los cuales deben oscilar entre 26,5 y 96 ng/día. (FDA, 2023; Guo et al., 2019; ICH. M7 (R1), 2017) En

Ecuador, también se implementaron medidas sanitarias al respecto. Estas incluyeron el retiro preventivo del mercado local de medicamentos que contenían el principio activo Ranitidina y la modificación de los registros sanitarios de los productos farmacéuticos que contienen como principio activo Losartán, Irbesartán, Olmesartán, Candesartán, Valsartán, Eprosartán, Azilsartán y Telmisartán, con el objetivo de exigir a los titulares de estos registros sanitarios la acreditación del método para cuantificar las impurezas NMDA, NDEA y NMBA. (ARCISA, 2022) La contaminación por nitrosaminas ha impulsado la búsqueda de alternativas más seguras mientras la industria farmacéutica trabaja en desarrollar procesos de fabricación más seguros y nuevas formulaciones de Sartanes que cumplan con estándares de calidad y seguridad. (Aldunate, 2021)

En este contexto, la identificación y cuantificación de nitrosaminas demanda el desarrollo de técnicas altamente sensibles y avanzadas. (Chang et al., 2020; Öncü et al., 2023) Actualmente, se han difundido diversos métodos analíticos utilizando GC, GC/MS y LC/MS/MS para alcanzar niveles de detección extraordinariamente bajos, del orden de nanogramos por litro. (James & Edge, 2021; Mani & Banerjee, 2019) Sin embargo, cada método tiende a ser específico para un producto en particular. (Chidella et al., 2021; Nagendra et al., 2022; Wohlfart et al., 2021) El objetivo de este trabajo es presentar una técnica analítica práctica, eficiente y de alta sensibilidad, con facilidad de tratamiento de muestras, destinada a la detección y cuantificación rutinaria de cinco nitrosaminas en el principio activo farmacéutico Valsartán. La metodología analítica fue validada a través de cromatografía líquida acoplada a masas con fuente de ionización HESI, asegurándose de cumplir con los parámetros de linealidad, exactitud, repetibilidad, precisión intermedia, especificidad, robustez, límites de detección & cuantificación. (ICH. Q2 (R1), 2005)

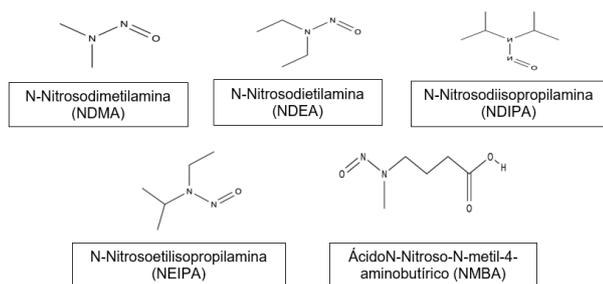
Materiales y métodos

Estándares y reactivos

Los estándares utilizados de N-nitrosodietilamina, N-nitrosoetilisopropilamina, N-nitrosodiisopropilamina, N-nitrosodibutilamina y ácido N-nitrosometilaminobutírico fueron de la marca Sigma-Aldrich, los cuales se encontraban en solución metanólica. Las estructuras químicas de las 5 nitrosaminas se muestran en la Figura 1. En cuanto a la preparación de las muestras, se emplearon reactivos de alta calidad, incluyendo agua grado masas de la marca Sigma-Aldrich, metanol y ácido fórmico grado masas pertenecientes a la marca Fisher Chemical.

Figura 1.

Estructuras químicas de las 5 nitrosaminas analizadas en este estudio



Instrumentación y condiciones cromatográficas.

Los experimentos se realizaron en un cromatógrafo líquido de ultra rendimiento acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo TSQ Quantis, equipado con una fuente de ionización por electrospray (HESI) de la marca ThermoFisher Scientific y operado en modo de monitorización de reacciones seleccionadas (SRM) con polaridad positiva. Los parámetros principales del modo SRM incluyen los iones de interés (iones precursores), iones producto, energía de colisión y fuente de fragmentación; todos estos se muestran en la Tabla 1. La resolución para el ion precursor (Q1) y los iones producto (Q3) se fijó en 0,7 y 1,2 m/z (FWHM) respectivamente, utilizando nitrógeno como gas portador. Como herramienta

para la recolección de datos se utilizó el software Chromeleon versión 7.3.1. La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna Accuore C18 (2,6 μm , 150 x 3 mm) a 60 °C con un flujo constante de 0,5 mL/min, con elución en gradiente utilizando la fase móvil A consistente en ácido fórmico al 0,1% en agua y la fase móvil B consistente en ácido fórmico al 0,1% en metanol, y como disolvente, ácido fórmico al 1% en agua. La elución se realizó con un gradiente como se muestra a continuación: 0 - 1.5 min, 3% B; 1.5 - 4.0 min, 50% B; 4.0 - 7.0 min, 75% B; 7.0 - 8.1 min, 85% B; 8.1 - 12.0 min, 95% B; y 12.0 - 15.0 min, 3% B para el equilibrio. Cada muestra se analizó con un volumen de inyección de 40 μL , manteniendo la temperatura a 10 °C. El tiempo de cada inyección fue de 15 minutos, lavando el inyector a una velocidad de 20 $\mu\text{L/s}$ durante 5 segundos.

Tabla 1.

Parámetros SRM de las 5 nitrosaminas

Componente	Precursor (m/z)	Producto (m/z)	Energía de colisión (V)	Fuente de fragmentación
NDMA	75.04	43.00	15.83	18.37
NDMA	75.04	44.07	12.03	18.37
NDMA	75.04	58.07	12.50	18.37
NDEA	103.04	29.12	14.27	14.29
NDEA	103.04	47.00	15.99	14.29
NDEA	103.04	75.12	10.64	14.29
NEIPA	117.09	43.07	16.75	0.00
NEIPA	117.09	47.00	16.12	0.00
NEIPA	117.09	75.12	9.55	0.00
NDIPA	131.04	43.07	11.19	0.00
NDIPA	131.04	47.00	13.13	0.00
NDIPA	131.04	89.05	77.74	0.00
NMBA	147.04	44.07	15.91	0.00
NMBA	147.04	87.07	14.69	0.00
NMBA	147.04	117.05	5.25	0.00

Preparación de soluciones estándar

Se prepararon soluciones madre individuales empleando estándares de referencia certificados para las nitrosaminas NDMA, NMBA, NEIPA y NDIPA a una concentración de 0,2 $\mu\text{g/mL}$. Adicionalmente, se elaboró una solución madre para la nitrosamina NDEA con una concentración de 0,132 $\mu\text{g/mL}$. Estas

soluciones madre se utilizaron como punto de partida para la generación de soluciones estándar de trabajo destinadas a la construcción de curvas de calibración. Para tal fin, se seleccionaron concentraciones específicas que abarcaran un rango dinámico adecuado para el análisis cuantitativo de las nitrosaminas. Para las nitrosaminas NDMA, NMBA, NEIPA y NDIPA, se prepararon soluciones estándar de trabajo a concentraciones de 1,00, 1,33, 2,50, 5,00, 7,50, 10,00 y 15,00 ng/mL. En el caso de la nitrosamina NDEA, se prepararon soluciones de calibración a concentraciones de 0,88, 3,30, 4,95, 6,60, 7,70, 9,90 y 13,20 ng/mL.

Preparación de soluciones muestra

Para el análisis de Valsartán, se pesaron 160 mg en un tubo de centrifuga de 15 mL y se agregaron con precisión 12 mL de diluyente. Durante la validación, se añadieron las soluciones patrón de nitrosaminas a la concentración de interés. Luego, se dejó reposar la muestra durante 1 minuto, se tapó y se agitó mecánicamente en un agitador orbital durante 3 minutos. Posteriormente, se transfirieron 1,5 mL a un tubo de centrifugación de 2 mL, el cual fue centrifugado a 5000 rpm durante 15 minutos. Una vez finalizado este proceso, se tomó el sobrenadante y se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,22 μ m PVDF hacia un vial grado masas.

Validación del método

El método analítico fue validado siguiendo los criterios de selectividad, linealidad, exactitud y precisión (repetibilidad y precisión intermedia), de acuerdo con las directrices generales de los capítulos 1225 y 1469 de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP NF, 2022). Se evaluó la sensibilidad del método mediante la determinación del límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ), siguiendo los lineamientos de validación de procedimientos analíticos establecidos por la ICH Q2. Además, se examinó la robustez como parte de los parámetros de validación.

Especificidad, linealidad y sensibilidad

Para confirmar la especificidad del método, se realizaron análisis de muestras utilizando el método desarrollado. Se observaron los cromatogramas de iones extraídos individualmente, los cuales muestran la intensidad de la señal de los iones específicos de cada una de las nitrosaminas en función del tiempo de retención en la columna cromatográfica.

La linealidad se evaluó analizando por triplicado soluciones estándar de las 5 nitrosaminas a 7 niveles de concentración. Las ecuaciones correspondientes y el coeficiente de determinación (R^2) se obtuvieron mediante el método de mínimos cuadrados. La linealidad es aceptable cuando el coeficiente de determinación R^2 es superior a 0,990.

El límite de detección (LOD) hace referencia a la concentración mínima de un analito que puede ser detectada por el método analítico utilizado, mientras que el límite de cuantificación (LOQ) representa la concentración mínima del analito que puede ser determinada con la precisión y exactitud requeridas dentro de las condiciones específicas del análisis. Para evaluar la respuesta de fondo, se analizaron 10 muestras en blanco y se calculó la desviación estándar de estas respuestas. Posteriormente, se multiplicó la desviación estándar por 3,3 para el LOD y por 10 para el LOQ, y se dividió por la pendiente obtenida de la curva de calibración de cada nitrosamina. Este procedimiento proporcionó valores teóricos para los límites de detección y cuantificación durante la validación del método.

Exactitud y precisión

La exactitud, repetibilidad y precisión intermedia se evaluaron de forma simultánea en una matriz compleja (producto que contenía Amlodipino, Hidroclorotiazida y Valsartán), preparando muestras por sextuplicado durante dos días y con la participación de dos analistas, cubriendo tres niveles de concentración (bajo, medio y alto) dentro de la curva de calibración. La exactitud se calculó como la relación (%) entre las concentraciones calculadas y teóricas

de cada nitrosamina. El criterio de aceptación para la exactitud fue del 70 al 130 % de recuperación, mientras que, para la precisión, el criterio de aceptación fue $\% CVr \leq 20 \%$ para la repetibilidad y $\% CVI \leq 30 \%$ para la precisión intermedia.

Robustez

En este parámetro se evaluó la estabilidad de la muestra preparando 6 muestras a concentración nominal y analizándolas una vez terminada su preparación, así como después de 24 horas almacenándolas a una temperatura de 2 a 8 °C. El criterio de aceptación utilizado fue el estadístico F ($F_{calc} < F_{tab}$).

Resultados y discusiones

Validación del método

El ensayo de especificidad indica que durante estos análisis no se detectaron picos de interferencias, es decir, no se observaron señales inesperadas o no deseadas que pudieran confundirse con las sustancias de interés en los cromatogramas. Esto sugiere que el método es específico y puede identificar de manera confiable las nitrosaminas de interés en presencia de otras sustancias que podrían estar presentes en la muestra. Para el estudio de interferencias se analizaron agua grado masas, disolvente, fase móvil y matriz, los cuales no presentan ningún tipo de señal que influya en la cuantificación de nuestros analitos de interés. Los cromatogramas individuales de cada una de las nitrosaminas analizadas se muestran en la Figura 2. Además, los espectros de masas de cada una de las N-nitrosaminas se muestran en la Figura 3.

Figura 2. Cromatogramas SRM aplicando fuente de ionización HESI para 5 nitrosaminas

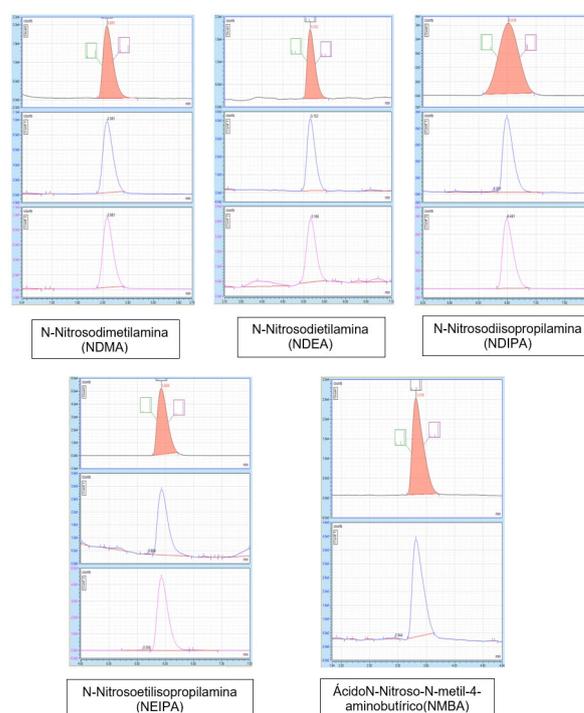
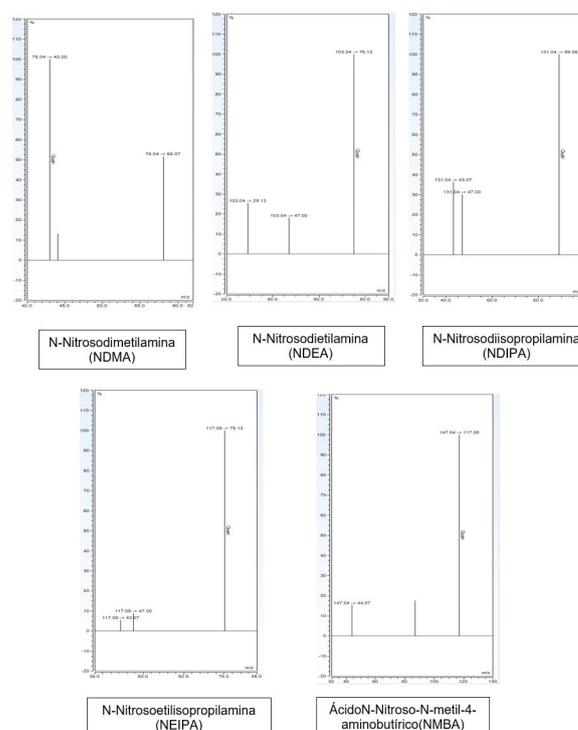


Figura 3. Espectro de masas (m/z) para 5 nitrosaminas



Se determinó la linealidad de las 5 nitrosaminas. Se empleó una técnica de regresión

lineal por el método de mínimos cuadrados para evaluar esta propiedad. Los resultados mostraron un coeficiente de determinación (R^2) superior a 0,999, lo que indica una correlación extremadamente alta entre la concentración de las N-nitrosaminas y la respuesta del equipo. Además, se realizó una inspección visual que también corroboró la excelente linealidad del método. Estos hallazgos confirman que el método es lineal dentro del rango de concentraciones analizadas, lo cual es fundamental para garantizar la precisión y la fiabilidad de las mediciones. El rango de trabajo de cada nitrosamina y su coeficiente de determinación se muestran en la Tabla 2, así como también su intercepto y pendiente.

Tabla 2.

Datos de linealidad de las 5 nitrosaminas

NIVEL	Concentración (ng/mL)				
	NDMA	NMBA	NDEA	NEIPA	NDIPA
1	0.9498	0.9524	0.8646	1.0503	0.9998
2	1.2664	1.2699	3.2422	1.4004	1.3331
3	2.3745	2.3810	4.8633	2.6258	2.4995
4	4.7491	4.7620	6.4844	5.2515	4.9990
5	7.1236	7.1430	7.5651	7.8773	7.4985
6	9.4981	9.5240	9.7266	10.5030	9.9980
7	14.2472	14.2860	12.9688	15.7545	14.9970
R²	0.9999	0.9999	0.9998	0.9999	0.9999
Intercepto	-7.0956	-20.3252	-2.6032	-80.1802	-36.2835
Pendiente	293.5932	353.6569	247.4240	669.1185	344.3598

El LOD y el LOQ representan las concentraciones mínimas a las cuales el analito puede ser detectado o cuantificado de manera confiable, respectivamente. En la Tabla 3 se muestran los límites LOD y LOQ obtenidos, así como las desviaciones estándar del ruido de fondo, además la Figura 4 muestra las regresiones lineales de cada una de las nitrosaminas analizadas respectivamente.

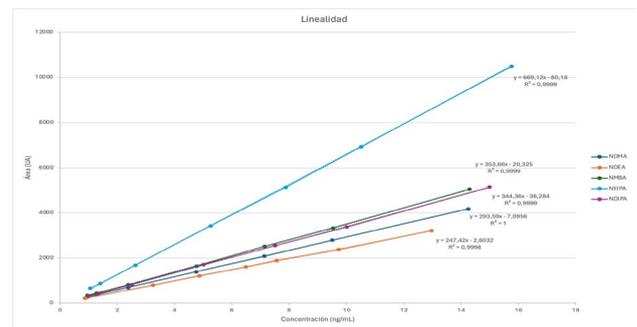
Tabla 3.

Límites de detección y cuantificación

Compuesto	Desviación estándar ruido de fondo	Límite de detección (ng/mL)	Límite de cuantificación (ng/mL)
NDMA	5.5913	0.0628	0.1904
NMBA	8.3826	0.0782	0.2370
NDEA	5.0686	0.0676	0.2049
NEIPA	7.9400	0.0392	0.1187
NDIPA	3.5177	0.0337	0.1022

Figura 4.

Área vs Concentración de las 5 nitrosaminas



Para evaluar la exactitud del método analítico, se llevaron a cabo análisis en tres niveles de concentración (bajo, medio y alto), fortificando cada nitrosamina en el producto de interés. En el primer día, un analista preparó seis muestras, mientras que otro analista también preparó seis muestras adicionales. Este procedimiento se repitió al día siguiente. En total, se analizaron 24 muestras. La exactitud se determinó mediante el cálculo del porcentaje de recuperación, que representa la relación (%) entre las concentraciones calculadas y teóricas de cada una de las nitrosaminas, obteniéndose para NDMA: 99,89 %, NMBA: 110,24 %, NDEA: 84,76 %, NEIPA: 91,34 % y NDIPA: 79,33 % de recuperación promedio, cumpliendo con el parámetro de validación propuesto de 70,0 a 130,0 %. La Tabla 4 muestra los valores de recuperación obtenidos para cada nitrosamina y para cada concentración.

Tabla 4.
Porcentaje de recuperación de las 5 nitrosaminas en los 3 niveles de concentración

Compuesto	Concentración teórica (ng/g)	Concentración experimental (ng/g)	Recuperación (%)
NDMA	73.34	74.13	101.08
	376.21	366.65	97.45
	787.58	796.49	101.13
NMBA	73.54	81.61	110.99
	377.24	412.63	377.24
	789.73	871.39	789.73
NDEA	64.37	50.89	79.06
	463.74	394.44	85.06
	752.76	678.57	90.15
NEIPA	81.10	88.06	108.60
	416.01	339.53	81.61
	870.90	729.94	83.82
NDIPA	77.20	62.66	81.18
	396.01	303.96	76.76
	829.03	663.64	80.05

La precisión se evaluó en términos de repetibilidad y precisión intermedia, evaluando el coeficiente de variación de repetibilidad y la reproducibilidad respectivamente, obteniéndose de esta manera en promedio para sus tres niveles de concentración los siguientes resultados, para NDMA: % CV_r = 5.75 y % CV_R = 5.89, NMBA: % CV_r = 4.82 y % CV_R = 4.87, NDEA: % CV_r = 5.43 y % CV_R = 5.47, NEIPA: % CV_r = 4.30 y % CV_R = 4.58 y NDIPA: % CV_r = 4.56 y % CV_R = 4.56. Los resultados individuales de cada una de las concertaciones de las nitrosaminas respectivas se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5.
Coefficientes de variación de la repetibilidad y precisión intermedia

Compuesto	Concentración teórica (ng/g)	% CV _r	% CV _R
NDMA	73,34	8,06	8,47
	376,21	6,74	6,74
	787,58	2,45	2,45
NMBA	73,54	6,87	6,87
	377,24	4,46	4,60
	789,73	3,14	3,14
NDEA	64,37	7,25	7,27
	463,74	6,57	6,57
	752,76	2,46	2,57
NEIPA	81,10	4,34	4,81
	416,01	6,09	6,19
	870,90	2,46	2,75
NDIPA	77,20	5,46	5,46
	396,01	5,60	5,60
	829,03	2,63	2,63

Las muestras analizadas para el estudio de robustez demostraron ser estables al ser almacenadas durante 24 horas a una temperatura entre 2 a 8 °C, ya que todos los estadísticos F calculados fueron menores a los tabulados.

Conclusiones

En este estudio se logró desarrollar un exitoso método LC-HESI-MS/MS para la determinación y cuantificación de 5 N-nitrosaminas en el ingrediente activo farmacéutico Valsartán, perteneciente a la familia de los Sartanes. Este método se desarrolló en un producto específico, el cual contenía tres ingredientes activos farmacéuticos (Amlodipino, Hidroclorotiazida y Valsartán), por lo que se le denominó un producto con matriz compleja. El método propuesto fue sometido a una validación rigurosa y ofreció resultados satisfactorios para el análisis de las nitrosaminas objetivo. Esto evidenció un buen rendimiento y especificidad del método tanto en la cuantificación como en la identificación de nitrosaminas.

Este método, aunque validado específicamente para un único principio activo farmacéutico, marca un avance significativo hacia su aplicación en todos los productos de la familia de los Sartanes. Este estudio establece

una base sólida para futuras investigaciones orientadas a adaptar y validar el método en una variedad de productos farmacéuticos, tanto dentro de la misma familia como en otras categorías de ingredientes activos.

Referencias bibliográficas

- Alba-Leonel, A., Fajardo-Ortiz, G. & Papaqui-Hernández, J. (2014). Farmacoepidemiología de los fármacos antagonistas de los receptores de angiotensina (ARA) II en el tratamiento de la hipertensión arterial esencial. México. *Revista de Enfermería Neurológica*, 13(3). <https://doi.org/10.37976/enfermeria.v13i3.198>
- Aldunate, M. (2021). *Nitrosaminas, impurezas presentes en productos farmacéuticos de síntesis química*. <https://www.ispch.cl/newsfarmacovigilancia/19/images/parte04.pdf>
- ARCSA. (2022). *Resolución ARCSA-CGTC-00053-2022-JPFJ, la dirección ejecutiva de la agencia nacional de regulación, control y vigilancia sanitaria-ARCSA, Doctor Leopoldo Izquieta Pérez*. https://www.controlsanitario.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2022/01/RESOLUCION-ARCSA-DE-2022-003-JPFJ_Derogatoria-Resoluciones-para-la-implementacion-de-Trazabilidad.pdf
- Burnier, M. & Brunner, H. R. (1998). Angiotensin II receptor antagonists in hypertension. *Kidney International, Supplement*, 54(68). <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1998.06822.x>
- Chang, S. H., Chang, C. C., Wang, L. J., Chen, W. C., Fan, S. Y., Zang, C. Z., Hsu, Y. H., Lin, M. C., Tseng, S. H. & Wang, D. Y. (2020). A multi-analyte lc-ms/ms method for screening and quantification of nitrosamines in sartans. *Journal of Food and Drug Analysis*, 28(2). <https://doi.org/10.38212/2224-6614.1063>
- Chidella, K. S., Dasari, V. B. & Anireddy, J. (2021). Ultra-Sensitive LC-MS/MS Method for the Trace Level Quantification of Six Potential Genotoxic Nitrosamine Impurities in Telmisartan. *American Journal of Analytical Chemistry*, 12(06). <https://doi.org/10.4236/ajac.2021.126014>
- De la Sierra, A. (2013). Antagonistas de los receptores de la angiotensina II en el tratamiento de la hipertensión arterial, las enfermedades cardiovasculares y las renales. Realidad y futuro. *Hipertensión y Riesgo Vascular*, 30(SUPPL.1), 3–10. [https://doi.org/10.1016/S1889-1837\(13\)70013-8](https://doi.org/10.1016/S1889-1837(13)70013-8)
- Del Castillo, D., Campistol, J. M., Guirado, L., Capdevilla, L., Martínez, J. G., Pereira, P., Bravo, J. & Pérez, R. (1998). Efficacy and safety of losartan in the treatment of hypertension in renal transplant recipients. *Kidney International, Supplement*, 54(68). <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1998.06827.x>
- EMA. (2020). *Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP)*. https://www.ema.europa.eu/en/documents/referential/nitrosamines-emea-h-a53-1490-assessment-report_en.pdf
- FDA. (2023). *Recommended Acceptable Intake Limits for Nitrosamine Drug Substance-Related Impurities (NDSRIs) Guidance for Industry*. <https://www.fda.gov/drugs/guidance-compliance-regulatory-information/guidances-drugs>
- Fernandez-Andrade, C., Russo, D., Iversen, B., Zucchelli, P., Aranda, P., Guerra, L. & Casado, S. (1998). Comparison of losartan and amlodipine in renally impaired hypertensive patients. *Kidney International, Supplement*, 54(68). <https://doi.org/10.1038/sj.ki.4490576>
- Guo, L., Long, Z., Leng, X. & Turner, J. (2019). Rapid Analysis of Genotoxic Nitrosamines by HPLC-MS/MS. *Phenomenex*. <https://sciex.com/content/dam/SCIEX/pdf/tech-notes/all/Rapid-Analysis-of-Genotoxic-Nitrosamines-by-HPLC-MS-MS.pdf>
- ICH. M7 (R1). (2017). *Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk. In: International conference on harmonisation of technical*

- requirements for registration of pharmaceuticals for human use. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-m7r2-guideline-assessment-and-control-dna-reactive-mutagenic-impurities-pharmaceuticals-limit-potential-carcinogenic-risk-step-5_en.pdf
- ICH. Q2 (R1). (2005). *Validation of analytical procedures: text and methodology*. In: *International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use*. https://database.ich.org/sites/default/files/Q2_R1_Guideline.pdf
- James, M. & Edge, T. (2021). Low-Level Determination of Mutagenic Nitrosamine Impurities in Drug Substances by LC-MS/MS. *LCGC Europe*, 34(7), 267–276. <https://doi.org/10.56530/lcgc.eu.dd3576s1>
- Mani, C. & Banerjee, S. (2019). *Determination of Nitrosamine Impurities Using the Ultivo Triple Quadrupole LC / MS*. Agilent. <https://www.agilent.com/cs/library/applications/application-nitrosamine-impurities-ultivo-triple-quadrupole-lc-ms-5994-1383en-agilent.pdf>
- Moser, J., Ashworth, I. W., Harris, L., Hillier, M. C., Nanda, K. K. & Scrivens, G. (2023). N-Nitrosamine Formation in Pharmaceutical Solid Drug Products: Experimental Observations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 112(5), 1255–1267. <https://doi.org/10.1016/J.XPHS.2023.01.027>
- Nagendra, N. K., Shaik, H., Balasubramanyam, S., Godugu, D. & Mudiam, M. K. (2022). Development, Validation, and Estimation of Measurement Uncertainty for the Quantitative Determination of Nitrosamines in Sartan Drugs Using LC-APCI-MS/MS. *SSRN Electronic Journal*. <https://doi.org/10.2139/ssrn.4009734>
- OMS. (2019). *Actualización sobre las impurezas de Nitrosaminas*. *Organización Mundial de la Salud*. <https://www.who.int/es/news/item/20-11-2019-information-note-nitrosamine-impurities>
- Öncü, T., Yüksel, B., Binay, E. & Şen, N. (2023). LC-MS/MS Investigation of nitrosamine impurities in certain Sartan group medicinal products available in Istanbul, Türkiye. *Annales Pharmaceutiques Francaises*. <https://doi.org/10.1016/j.pharma.2023.08.002>
- Wohlfart, J., Scherf-Clavel, O., Kinzig, M., Sörgel, F. & Holzgrabe, U. (2021). The nitrosamine contamination of drugs, part 3: Quantification of 4-Methyl-1-nitrosopiperazine in rifampicin capsules by LC-MS/HRMS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 203. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114205>