



Migración específica de N-nitrosaminas en productos elastoméricos

Resumen

Para analizar la migración de N-nitrosaminas desde materiales elastoméricos de caucho, como chupos para biberones, y desde materiales elastoméricos de látex, como guantes y condones, se requieren técnicas de alta sensibilidad que permitan determinar si los materiales migran cantidades de N-nitrosaminas que superen el límite permitido por la regulación (LOD 10 µg/Kg de material). Para ello, en este trabajo se implementó y validó un método de análisis de N-nitrosaminas: nitrosodimetilamina (NDMA), nitrosometiletilamina (NMEA), nitrosodietilamina (NDEA), nitrosopiridinamina (NPYR), nitrosodipropilamina (NDPA), nitrosofenilisopropilamina (NPIP) y nitrosodibutilamina (NDBA), mediante cromatografía de gases acoplada a un detector de espectrometría de masas (GC-MS), y se comparó la extracción de N-nitrosaminas por extracción líquido-líquido y por microextracción en fase sólida en su versión de espacio de cabeza (HS-SPME).

La extracción mediante HS-SPME permite la recuperación de las N-nitrosaminas de mayor peso molecular: NDPA, NPIP y NDBA, mientras que la extracción líquido-líquido resultó apropiada para la extracción y análisis de todas las N-nitrosaminas evaluadas en este trabajo. Se estableció que el límite de detección instrumental (LOD) para las N-nitrosaminas NDPA, NPIP y NDBA es de 3 a 6 µg/Kg empleando el método de monitoreo de ión selectivo (SIM). Este LOD se encuentra por debajo del límite de migración permitido por la regulación internacional.

Como aplicación del método se evaluó la migración de N-nitrosaminas en tres materiales elastoméricos: chupos de caucho para biberones, guantes y condones de látex. Todos los materiales presentaron resultados de migración de N-nitrosaminas por debajo del LOD permitido. Sin embargo, se evidenció la migración de otros compuestos potencialmente peligrosos para la salud como ftalatos y sustancias nitrosables.

Palabras clave: N-nitrosaminas; látex; caucho.

Specific migration of N-nitrosamines in elastomeric products

Abstract

To analyze the migration of N-nitrosamines from elastomeric rubber materials, such as baby bottle nipples, and from elastomeric latex materials, such as gloves and condoms, highly sensitive techniques are required to determine if the materials migrate amounts of N-nitrosamines that exceed the limit permitted by regulation (LOD 10 µg/Kg of material). For this purpose, a method for analyze N-nitrosamines was implemented and validated in this work: nitrosodimethylamine (NDMA), nitrosomethylethylamine (NMEA), nitrosodiethylamine (NDEA), nitrosopyridinamide (NPYR), nitrosodibutylamine (NDBA), nitrosodipropylamine (NDPA), and nitrosophenylisopropylamine (NPIP), using gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). The extraction of N-nitrosamines was compared using liquid-liquid extraction and headspace solid-phase microextraction (HS-SPME).

HS-SPME extraction allows for the recovery of higher molecular weight N-nitrosamines: NDPA, NPIP, and NDBA, while liquid-liquid extraction proved suitable for the extraction and analysis of all the N-nitrosamines evaluated in this study. It was established that the instrumental detection limit (LOD) for the N-nitrosamines NDPA, NPIP, and NDBA is between 3 and 6 µg/Kg using the selective ion monitoring (SIM) method. This LOD is below the migration limit permitted by international regulations.

As an application of the method, the migration of N-nitrosamines was evaluated in three elastomeric materials: rubber baby bottle nipples, latex gloves, and condoms. All materials showed N-nitrosamine migration results below the permitted LOD. However, the migration of other potentially health-hazardous compounds, such as phthalates and nitrosable substances, was evident.

Keywords: N-nitrosamines; latex; frubber.

Migração específica de N-nitrosaminas em produtos elastoméricos

Resumo

Para analisar a migração de N-nitrosaminas a partir de materiais de borracha elastomérica, como bicos de mamadeira, e de materiais de látex elastomérico, como luvas e preservativos, são necessárias técnicas altamente sensíveis para determinar se os materiais migram quantidades de N-nitrosaminas que excedem o limite permitida pela regulamentação (LOD 10 µg/Kg de material). Para tal, foi implementado e validado neste trabalho um método para analisar N-nitrosaminas: nitrosodimetilamina (NDMA), nitrosometiletilamina (NMEA), nitrosodietilamina (NDEA), nitrosopiridinamida (NPYR), nitrosodibutilamina (NDBA), nitrosodipropilamina (NDPA) e nitrosofenilisopropilamina (NPIP), usando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS). A extração de N-nitrosaminas foi comparada usando extração líquido-líquido e microextração em fase sólida por headspace (HS-SPME).

A extração por HS-SPME permite a recuperação de N-nitrosaminas de maior peso molecular: NDPA, NPIP e NDBA, enquanto a extração líquido-líquido provou ser adequada para a extração e análise de todas as N-nitrosaminas avaliadas neste estudo. Foi estabelecido que o limite de detecção instrumental (LOD) para as N-nitrosaminas NDPA, NPIP e NDBA é entre 3 e 6 µg/Kg usando o método de monitoramento de íon seletivo (SIM). Este LOD está abaixo do limite de migração permitido pelas regulamentações internacionais.

Como aplicação do método, a migração de N-nitrosaminas foi avaliada em três materiais elastoméricos: bicos de borracha para mamadeiras, luvas de látex e preservativos. Todos os materiais apresentaram resultados de migração de N-nitrosaminas abaixo do LOD permitido. No entanto, a migração de outros compostos potencialmente prejudiciais à saúde, como ftalatos e substâncias nitrosáveis, foi evidente.

Palavras-chave: N-nitrosaminas; látex; borracha.



Introducción

Las N-nitrosaminas son compuestos orgánicos volátiles cuya estructura química se caracteriza por la presencia de un grupo nitroso unido a una amina secundaria o terciaria [1]. La α -hidroxilación enzimática de N-nitrosaminas, mediada por el citocromo P450, genera una nitrosamina primaria dealquilada que se puede descomponer en diazonio, el cual es un agente alquilante del ADN, lo cual explica las propiedades mutagénicas y carcinogénicas de estos compuestos [2-4].

Como respuesta a estos riesgos identificados para la salud pública, numerosas agencias reguladoras a nivel internacional, como la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) [5], la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) [6] y la Organización Mundial de la Salud (OMS) [7], han establecido límites y regulaciones estrictas para establecer la presencia de N-nitrosaminas en alimentos [8], agua potable [5, 9], productos farmacéuticos [10], entre otros productos de consumo humano.

Entre los productos de mayor consumo que requieren que se observe la presencia de N-nitrosaminas, se encuentran los productos elastoméricos de látex, como guantes, globos inflables [11] y condones [12, 13], así como productos elastoméricos de caucho, especialmente chupos para biberones y chupos de entretenimiento [14-17]. En la fabricación de estos productos se emplean aceleradores de vulcanización, como ditiocarbamatos, que al descomponerse producen aminas secundarias, las cuales, mediante la interacción con agentes nitrosantes, como sales de nitritos u óxidos de nitrógeno, producen N-nitrosaminas [1].

Las N-nitrosaminas más comunes son nitrosodimetilamina (NDMA), nitrosodibutilamina (NDBA), nitrosodipropilamina (NDPA), nitrosometiltilamina (NMEA), nitrosodietilamina (NDEA), nitrosopiridinamina (NPYR) y nitrosifenilisopropilamina (NPIP). Internacionalmente su migración se encuentra regulada por la directiva UNE 93/11/EEC, la cual indica que la liberación de N-nitrosaminas no puede exceder 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de material [18]. En Colombia, la Resolución 4143 de 2012 del Ministerio de Salud y Protección Social regula que la migración de N-nitrosaminas de productos elastómeros debe ser evaluada por medio de un método con límite de detección (LOD) de 0,01 mg/Kg de simulante [19].

Dado que las N-nitrosaminas son contaminantes químicos riesgosos para la salud humana y animal, se requiere de la implementación y aplicación de regulaciones estrictas que mitiguen los efectos adversos de estas sustancias. Estas regulaciones deben ir acompañadas de una investigación en metodologías analíticas para el cumplimiento de la normatividad. Ante esta necesidad, los métodos analíticos para la detección y cuantificación de N-nitrosaminas, especialmente en medicamentos, han evolucionado significativamente, utilizando técnicas avanzadas como cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS/MS) [8, 17, 20-23] y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS/MS) [9-11, 24-25].

El objetivo de este trabajo es implementar un método de extracción y un método de análisis que permitan cumplir los requisitos técnicos de la regulación y que permitan ofrecer el servicio de análisis a productores de materiales elastoméricos de la región. Para ello, se comparó la selectividad de la extracción de N-nitrosaminas mediante extracción líquido-líquido y microextracción en fase sólida en su versión de espacio de cabeza (HS-SPME). Se implementó y validó el análisis de N-nitrosaminas mediante GC-MS.

El método validado se empleó para establecer la migración específica de N-nitrosaminas en productos elastoméricos comerciales de amplio consumo, como guantes, condones de látex y chupos para biberones de caucho. El uso de estos materiales implica el contacto

con saliva y sudor, lo que puede ocasionar la migración de N-nitrosaminas y, por ende, requieren de vigilancia analítica. Para productos del mercado latinoamericano no se encontraron evidencias de estudios anteriores.

Materiales y métodos

Reactivos

Para la evaluación instrumental se empleó el material de referencia certificado (MRC) EPA 521 Nitrosamine Mix 40035-U (Supelco), el cual contenía una mezcla de siete nitrosaminas (NDMA, NDBA, NDPA, NMEA, NDEA, NPYR y NPIP), cada una con una concentración de $2000,00 \pm 6,52 \mu\text{g}/\text{mL}$ en diclorometano. A partir de este MRC se prepararon siete niveles de calibración entre 5 y 35 $\mu\text{g}/\text{L}$.

Para la evaluación metodológica de los ensayos de migración de N-nitrosaminas hacia el simulante saliva artificial, se empleó el MRC EPA 8270/Appendix IX Nitrosamines Mix 502138 (Supelco), el cual contenía una mezcla de 9 nitrosaminas: NDMA, NDBA, NDPA, NMEA, NDEA, NPYR, NPIP, N-nitrosomorfolina (NMOR) y N-difenilnitrosamina (NDPhA), cada una con una concentración de $2000,0 \pm 40,2 \mu\text{g}/\text{mL}$ en metanol. A partir de dicho MRC se prepararon cinco niveles de calibración, entre 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, en simulante saliva artificial.

El simulante de saliva artificial se preparó por disolución de 2,0 g de NaHCO_3 , 0,2 g de NaCl , 0,1 g de K_2CO_3 y 20,0 mg de NaNO_3 en 0,5 L de agua destilada. El pH final del simulante de saliva fue $9,0 \pm 0,1$.

Para la determinación de los índices de retención se empleó una mezcla de alcanos lineales C7-C30 Saturated alkanes 49451-U (Supelco) con una concentración de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en hexano. Se empleó tetradecano (> 99,0%) 87146 (Sigma-Aldrich) como estándar interno.

Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

Se empleó un cromatógrafo de gases Agilent 7890B acoplado a un detector selectivo de masas Agilent 5977A. El equipo estaba equipado con una columna capilar RTX5-MS (5%-fenil)-metilpolisiloxano (30 m \times 0,25 mm \times 0,25 μm). Se empleó como gas de arrastre helio (99,999%) a un flujo de 1,0 mL/min. Para el análisis cromatográfico se fijó la temperatura de inyección en 250 $^\circ\text{C}$, en modo *split* 1:10 para las extracciones líquido-líquido, con un volumen de inyección de 1 μL , y en modo *splitless* para la fibra de microextracción en fase sólida. Se programó el horno de la columna para mantenerse durante 3 min a 40 $^\circ\text{C}$, luego se calentó con una rampa de 15 $^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta 100 $^\circ\text{C}$, donde se mantuvo por 1 min, y finalmente con una rampa de 17 $^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta 200 $^\circ\text{C}$. Los espectros de masa de los compuestos se obtuvieron por ionización en modo de impacto electrónico (IE), con una energía de ionización de 70 eV, por medio del escaneo continuo de un rango de masas (modo SCAN) y por monitoreo de ion selectivo (modo SIM), en un rango de masas de 40 a 350 uma. La temperatura de la fuente de iones se mantuvo en 230 $^\circ\text{C}$ y la temperatura de la línea de transferencia al espectro de masas se fijó en 250 $^\circ\text{C}$.

La identificación de las N-nitrosaminas se realizó comparando los criterios cromatográficos (índice de retención lineal) y espectral (espectros de masa), obtenidos para cada nitrosamina presente en el MRC, contra los publicados en la base de datos NISTv.2017.

Validación del método

Para la validación del método se evaluaron los siguientes parámetros de desempeño: 1) selectividad, 2) linealidad y 3) precisión bajo condiciones de repetibilidad [26].

La selectividad fue evaluada mediante el análisis de blancos de re-

activos. Así se evaluó que el perfil cromatográfico del blanco no presentara señales asociadas a los analitos de interés.

La linealidad se evaluó mediante la preparación gravimétrica de soluciones calibrantes en un intervalo entre 5 y 35 $\mu\text{g/L}$. Las N-nitrosaminas se prepararon simultáneamente en siete niveles de calibración separados de manera equidistante, realizando triplicado del análisis GC-MS, mediante un diseño completamente al azar. Los resultados fueron evaluados mediante análisis de varianza para la regresión y pruebas t de Student para evaluar la significancia de la pendiente y del intercepto. Dicho tratamiento se realizó con la herramienta de análisis de datos de Microsoft Excel®. Para la evaluación de la linealidad de las curvas de calibración se empleó el software ValidaR del Instituto Nacional de Metrología, el cual permite verificar los supuestos de linealidad por comparación de valores experimentales con valores estadísticos p de Shapiro-Wilk, el estadístico Durbin-Watson y la prueba p de Breusch-Pagan para un nivel de confianza $p = 0,05$ [26].

La precisión del método bajo condiciones de repetibilidad se determinó al enriquecer el simulante de migración (saliva artificial) con 1 mg/Kg de N-nitrosaminas, se evaluó la respuesta obtenida luego de realizar la extracción por medio de HS-SPME para un sextuplicado de muestras. Los resultados fueron expresados como desviación estándar relativa (%RSD).

Extracción de nitrosaminas

Ensayos de migración de nitrosaminas

Los ensayos de migración global de nitrosaminas fueron realizados mediante el método de inmersión total en el Laboratorio de Extensión y Asesorías del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia, acreditado por el Organismo Nacional de Acreditación en Colombia (ONAC) (14-LAB-058). Se ensayaron muestras comerciales de chupos para biberón, guantes y condones. Para los ensayos de migración de N-nitrosaminas de estas muestras se siguió el procedimiento descrito en la norma europea EN 12868:2018 [27].

Los ensayos de migración se prepararon de tal manera que por cada 100 mL de simulante se sumergieron 15 g de material, para el caso de guantes y chupos, y 6 g de polímero, para el caso de los condones. Después, los ensayos se mantuvieron a 40 ± 2 °C en una incubadora Binder KB 115UL durante $24,0 \pm 0,5$ h. Se prepararon tres réplicas por cada muestra y un blanco (simulante saliva artificial). Una vez concluido el tiempo de exposición, se realizó la extracción de las N-nitrosaminas por dos métodos: HS-SPME y extracción líquido-líquido con diclorometano (Merck).

Microextracción en fase sólida en su versión de espacio de cabeza (HS-SPME)

Se realizó la extracción de los compuestos volátiles por medio de HS-SPME empleando una fibra divinilbenceno/carboxeno/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) (Supelco). El simulante (1 mL) se transfirió a un vial de 10 mL, el cual se cerró herméticamente con septa y agrafe. Los tiempos óptimos de equilibrio y de extracción se evaluaron mediante un diseño experimental de un factor a la vez (OFAT) [28], entre 5 y 15 min, a una temperatura de 40 ± 2 °C, en una incubadora Binder KB 115UL. Los compuestos retenidos se desorbieron en el puerto de inyección de un cromatógrafo de gases con detector selectivo de masas (GC-MS), a una temperatura de 250 °C, durante 5 min, en modo *splitless* (1 min).

Extracción líquido-líquido

Para la extracción líquido-líquido de N-nitrosaminas se transfirió el simulante acuoso de saliva artificial, producto del ensayo de migración global, a un embudo de decantación de 250 mL. Posteriormente, se hicieron dos extracciones sucesivas con 20 mL de diclorome-

tano (grado analítico, Merck). La fase orgánica se hizo pasar a través de un lecho de Na_2SO_4 anhidro, granular, en un embudo de filtración de vástago. El extracto orgánico obtenido se concentró en un sistema de destilación fraccionada a 50 °C hasta un volumen final de 1 mL. Al extracto obtenido se le adicionó una concentración de 30 mg/Kg de n-tetradecano (Sigma Aldrich) como estándar interno y se analizó por GC-MS.

Resultados y discusión

Durante el desarrollo del método de separación de siete N-nitrosaminas se ensayaron diferentes rampas de calentamiento, buscando la separación entre analitos con una resolución mayor a 1,5 en el menor tiempo de análisis posible. Bajo las condiciones establecidas, la resolución de las nitrosaminas NPYR (4) y NDPA (5) fue menor a 1. Con el propósito de cuantificación, se empleó el área bajo la curva del ion con abundancia relativa del 100% (pico base de cada espectro de masas), lo cual permite solucionar el problema de baja resolución.

En la **figura 1** se presenta el perfil cromatográfico del MRC de N-nitrosaminas en diclorometano a una concentración de 10 mg/L obtenido en modo SCAN. Se observan siete señales, las cuales fueron asignadas a cada N-nitrosamina declarada en el material de referencia, mediante la comparación del espectro de masas con el hallado en la biblioteca NIST 2017 y su respectivo índice de retención en columna RTX-5MS.

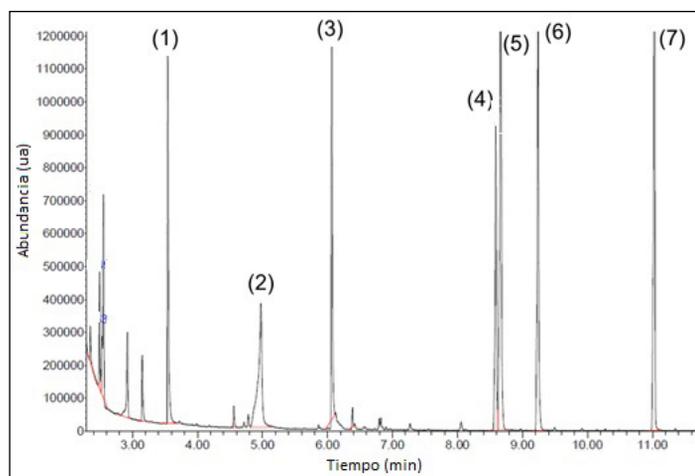


Figura 1. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) del material de referencia certificado de N-nitrosaminas, concentración 10 mg/L, modo SCAN, columna RTX5-MS.

En la **tabla 1** se presenta el número asignado a cada N-nitrosamina en el cromatograma, los índices de retención en columna RTX5-MS, la abreviatura usada, el ion molecular $[M]^{+*}$, que corresponde al pico base en todos los espectros de masas de las N-nitrosaminas (excepto para NDPA, PB = 70, y para NDPA, PB = 84), así como los iones fragmento característicos para cada N-nitrosamina. Se verificó que la desviación del tiempo de retención de los fragmentos de cuantificación y cualificación para cada una de las N-nitrosaminas no fuese mayor a 0,1 min, y que la relación entre las áreas de los picos correspondientes a los fragmentos de cualificación y cuantificación no presentara una desviación mayor al 20%.

En el intervalo de concentraciones evaluado (5-35 $\mu\text{g/L}$) sólo fue posible tres N-nitrosaminas: NDPA, NPIP y NDPA. Las N-nitrosaminas de peso molecular menor a 114 um no fueron detectadas en este intervalo de concentraciones. Esto pudo ser debido a la descomposición de N-nitrosaminas en el puerto de inyección. Mutsuga *et al.* sugieren la inyección de N-nitrosaminas a una temperatura de 120 °C en el puerto de inyección [16].

Los análisis con el método SIM se realizaron siguiendo el fragmento de mayor intensidad (pico base), el cual corresponde al ion molecular $[M+H]^{+*}$ para todas las N-nitrosaminas, excepto para NDPA

Tabla 1. Criterios cromatográficos y espectrales para la identificación de N-nitrosaminas en modo IE.

N.º	IRL (RTX5-MS)	N-nitrosamina	Abreviatura	Ion molecular [M] ⁺ * (Da)	Iones fragmento (m/z)
1	947	N-nitrosodimetilamina	NDMA	74	42, 43
2	1040	N-nitrosometiletilamina	NMEA	88	89, 42
3	1197	N-nitrosodietilamina	NDEA	102	56, 57, 42, 44
4	1363	N-nitrosopirrolidina	NPYR	100	41
5	1372	N-nitrosodi-n-propilamina	NDPA	130	70, 43
6	1402	N-nitrosopiperidina	NPIP	114	55, 42, 56
7	1565	N-nitrosodi-n-butilamina	NDBA	158	84, 57, 116

En negrita el ion molecular [M]⁺* usado para la cuantificación de cada N-nitrosamina, el ion [M-60]⁺ para la cuantificación de NDPA y el ión [M-74]⁺ para la cuantificación de NDBA.

Tabla 2. Curvas de calibración N-nitrosaminas (NSA). Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) en modo SCAN y modo SIM.

NSA	Curvas de calibración (y = mx + b)		R ²	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)
	m	b			
SCAN					
NDPA	3310,9 ± 429,1	1115519 ± 10280	0,952	9,4 ± 1,2	31,2 ± 3,8
NDBA	1341,6 ± 157,8	51566 ± 3588	0,960	8,8 ± 1,0	29,4 ± 3,4
SIM					
NDPA	159,2 ± 7,1	2210,9 ± 160,9	0,992	3,3 ± 0,2	11,1 ± 0,5
NPIP	188,1 ± 12,4	6390,0 ± 283,5	0,983	5,0 ± 0,3	16,6 ± 1,1
NDBA	158,8 ± 1,8	731,8 ± 44,8	0,963	6,3 ± 0,7	21,1 ± 2,4

Criterios de linealidad aceptados: prueba p de Shapiro-Wilk, el estadístico Durbin-Watson y la prueba p de Breusch-Pagan.

p = 0,05.

Intervalo de concentración 5–35 µg/L

y NDBA, cuyo pico base corresponde al fragmento m/z 70 y m/z 84, producto de la pérdida de la olefina [CH₃-CH=CH₂] y [CH₃-CH₂-CH=CH₂], respectivamente, y de la subsecuente pérdida de una molécula de agua debido a la abstracción de un hidrógeno secundario por rearrreglo McLafferty de la dialquil N-nitrosamina [29, 30].

En la **tabla 2** se presentan los resultados del ajuste por mínimos cuadrados ordinarios de las curvas de calibración para cada una de las N-nitrosaminas analizadas con métodos SCAN y SIM.

Si bien los valores de los coeficientes de determinación de las curvas de calibración son menores a 0,99, los resultados de las pruebas realizadas por ValidaR indican que los datos de NDPA y NDBA se ajustan a un modelo de regresión lineal y ajuste por mínimos cuadrados ordinarios, tanto para los resultados del análisis en modo SCAN como en modo SIM. El análisis de los residuales demostró que para NPIP, utilizando el modo SCAN, las observaciones presentan un comportamiento heterocedástico, es decir, la varianza de los errores del modelo aumenta con el aumento de la concentración, razón por la cual se debe considerar el uso de un modelo de regresión lineal de mínimos cuadrados ponderados [26].

La sensibilidad del modo SIM aumenta en un factor aproximado de diez veces para NDBA y de 20 veces para NDPA. Los LOD instrumentales para las NDPA, NPIP y NDBA presentan valores entre 3 y 6 µg/L con el modo SIM y alrededor de 10 µg/L con el modo SCAN. Estos valores obtenidos coinciden con los determinados por Mutsga *et al.*, quienes establecieron LOD de 5 µg/L para GC-MS con el modo SIM, usando soluciones calibrantes para las mismas N-nitrosaminas [16].

Extracción y análisis de N-nitrosaminas por HS-SPME y GC-MS

Dado que la extracción de compuestos volátiles mediante HS-SPME ha sido ampliamente usada en el análisis de N-nitrosaminas [10, 11], se evaluaron las condiciones óptimas para las variables tiempo de equilibrio y tiempo de extracción mediante un diseño de

experimentos OFAT [28]. Se mantuvo constante el volumen del vial (10 mL) y la temperatura de equilibrio y muestreo (40 °C) mientras se realizó la variación individual del tiempo de equilibrio y de extracción entre 5 y 15 min. En las **figuras 2A** y **2B** se presenta el comportamiento de la respuesta (área total) con el incremento del tiempo de equilibrio y de extracción, respectivamente.

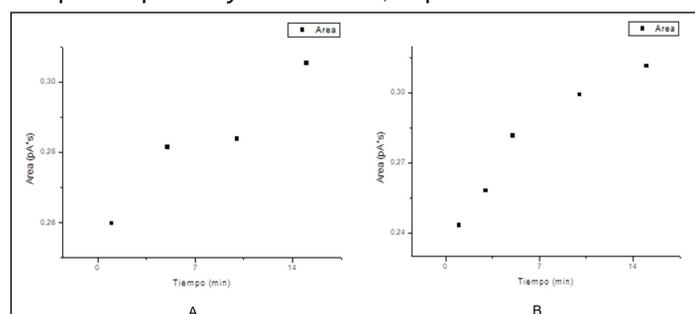


Figura 2. Evaluación del tiempo de equilibrio (A) y del tiempo de extracción (B) de N-nitrosaminas por HS-SPME.

Los resultados muestran que para tiempos de equilibrio (**figura 2A**) entre 5 y 10 min, la abundancia en la respuesta en el detector varía de forma insignificante, razón por la cual se seleccionó el menor tiempo de equilibrio (5 min). Para el tiempo de extracción (**figura 2B**) se observa que la abundancia en la respuesta del detector aumenta con el tiempo de extracción hasta un máximo donde permanece constante. Así se estableció 15 min como tiempo de extracción óptimo.

El empleo de HS-SPME permitió la extracción de cuatro N-nitrosaminas: NDPA, NPIP, NDBA y NDPA, en el rango de concentraciones entre 10 y 100 µg/Kg de simulante. Por debajo de este nivel de concentración no fue posible extraer las N-nitrosaminas NDMA, NMEA, NDEA, NPYR y NMOR. Este resultado coincide con los presentados por Feng *et al.*, quienes ensayaron la extracción de N-nitrosaminas (10 ng/mL en saliva artificial) con una fibra CAR/PDMS, durante 60 min, a una temperatura entre 45 y 80 °C, y evidenciaron una mayor extracción de NDPA y NDBA con respecto a la extracción de NDMA y NDEA [11].

Tabla 3. Repetibilidad y curvas de calibración para N-nitrosaminas extraídas por HS-SPME en simulante de saliva.

N-nitrosamina	%RSD	Curvas de calibración ($y = mx + b$)		R ²	LOD ($\mu\text{g/Kg}$ simulante)	LOQ ($\mu\text{g/Kg}$ simulante)
		m	b			
SCAN						
NDPA	9,6	5308,1 \pm 396,9	31996,8 \pm 24077,7	0,984	15,7 \pm 1,2	47,6 \pm 3,6
NDBA	16,6	7956,5 \pm 251,9	24611,2 \pm 15280,7	0,997	20,2 \pm 1,9	ND
SIM						
NDPA	9,7	1631,7 \pm 56,6	24348,3 \pm 3435,6	0,996	7,3 \pm 0,2	21,2 \pm 0,6
NPIP	8,6	78,9 \pm 3,6	800,8 \pm 221,4	0,993	9,7 \pm 0,4	29,4 \pm 1,2
NDBA	12,2	209,3 \pm 20,2	5480,9 \pm 1224,7	0,973	6,6 \pm 0,2	20,0 \pm 0,6

Criterios de linealidad aceptados: prueba p de Shapiro-Wilk, el estadístico Durbin-Watson y la prueba p de Breusch-Pagan.
 $p = 0,05$.

Intervalo de concentraciones de 10 a 100 $\mu\text{g/Kg}$ de simulante.

Se evaluó la precisión del método de extracción, en términos de repetibilidad, al enriquecer el simulante de saliva artificial con una concentración de 1 mg/Kg de simulante. Como resultado se obtuvieron %RSD menores al 15% para NDPA, NPIP y NDBA. Para NDPhA, el método de extracción HS-SPME presenta %RSD > 20%. La repetibilidad de HS-SPME típicamente se encuentra en porcentajes que varían entre 5 y 20% [11, 31]. Así, el método de extracción HS-SPME no presenta repetibilidad para NDPhA. Recientemente se han desarrollado nuevos soportes para fibras de SPME que aumentan la repetibilidad de la extracción hasta alcanzar valores alrededor del 3% de RSD [31].

Finalmente se obtuvieron las curvas de calibración en simulante de saliva artificial para las tres N-nitrosaminas: NDPA, NPIP y NDBA, en el rango de concentraciones entre 10 y 100 $\mu\text{g/Kg}$ de simulante. Los análisis se realizaron en modos SIM y SCAN. La evaluación de los supuestos de linealidad permitió establecer que los datos se ajustan a un modelo regresión lineal por mínimos cuadrados ordinarios [30, 31].

En la **tabla 3** se presentan el %RSD, los coeficientes de calibración de las curvas de los modos SCAN y SIM, y los LOD y LOQ metodológicos para cada N-nitrosamina extraída y detectada por HS-SPME en simulante de saliva artificial.

Como ocurrió con las soluciones de calibración, el análisis de los residuales estableció que la extracción de NPIP por HS-SPME y GC-MS en modo SCAN presenta un comportamiento heterocedástico, de tal forma que los datos no se ajustan a un modelo regresión lineal de mínimos cuadrados ordinarios [26].

Al comparar estos resultados con los trabajos publicados para la extracción de N-nitrosaminas mediante HS-SPME y posterior análisis GC-MS con diversos detectores, se encuentra diversos intervalos de sensibilidad. Por ejemplo, para GC-MS/MS se alcanza un LOQ de 50 $\mu\text{g/Kg}$ [10], mientras que con el uso de GC-MS-TQ se logra un LOD de 6 $\mu\text{g/Kg}$ [24]. En el caso de GC-MS Orbitrap, se logra un LOQ entre 0,03 y 0,40 $\mu\text{g/Kg}$ usando extracción en fase sólida [15]. Los resultados aquí obtenidos son del mismo orden a los establecidos con un analizador de triple cuadrupolo [24]. Se sugiere continuar la investigación para establecer las condiciones bajo las cuales es posible extraer y analizar N-nitrosaminas de bajo peso molecular, de un nivel inferior a 10 $\mu\text{g/Kg}$.

En un trabajo similar en el que se evaluó la migración de N-nitrosaminas a partir de globos usando saliva artificial por HS-SPME y GC-MS, Feng *et al.* [11] encontraron LOD para NDPA de 2,65 $\mu\text{g/Kg}$, para NPIP de 0,70 $\mu\text{g/Kg}$, y para NDBA de 0,63 $\mu\text{g/Kg}$. Estos niveles de sensibilidad resultan de 10 a 100 veces inferiores a los establecidos mediante técnicas de análisis reconocidas por su mayor sensibilidad, lo que sugiere un posible error en las unidades de dicha publicación.

Vale la pena destacar que si se compara la extracción líquido-líquido con HS-SPME y GC-MS, esta última es más rápida y libre de solvente. La sensibilidad con HS-SPME resultó menor a la obtenida con extracción líquido-líquido para NDPA y NPIP y del mismo orden para NDBA.

Finalmente, los resultados demuestran que mediante el método de HS-SPME o extracción líquido-líquido y el análisis GC-MS, en modo SIM, es posible cumplir la evaluación de la restricción sobre que los materiales, objetos, envases y equipamientos elastoméricos destinados a entrar en contacto con alimentos y bebidas N-nitrosaminas en cantidades superiores a las detectadas con un método con LOD de 10 $\mu\text{g/Kg}$ de simulante para NDPA, NPIP y NDBA.

Ensayos de migración específica

La implementación del método validado se realizó con la evaluación de la migración de N-nitrosaminas a partir de tres materiales elastoméricos, guantes, condones de látex y chupos de biberón de caucho, hacia un simulante de saliva artificial. La extracción mediante HS-SPME de los simulantes obtenidos luego del proceso de migración descartó la migración de N-nitrosaminas al nivel de concentración del LOD. Para corroborar este hallazgo, los simulantes de saliva artificial obtenidos para cada uno de los materiales evaluados fueron sometidos a extracción líquido-líquido. En la **figura 3** se presentan los perfiles cromatográficos obtenidos con el modo SCAN.

En la **tabla 4** se presenta el número correspondiente a la señal en el cromatograma, los compuestos identificados, su índice de retención en columna RTX5-MS y su cuantificación por estándar interno.

En ninguno de los tres materiales elastoméricos evaluados se evidenció la migración de N-nitrosaminas hacia el simulante de saliva artificial al nivel de los LOD establecidos para soluciones calibrantes (3 a 6 $\mu\text{g/Kg}$). Por lo tanto, se determina que estos materiales cumplen con la normatividad vigente.

Se detectó la migración de otros componentes propios de la manufactura de los materiales. En el caso de los chupos de biberón, se evidenció la migración de vainillina y ftalato de dietilo en cantidades superiores a 10 mg/Kg; y en los condones se estableció la migración de butilhidroxitolueno (BHT) y N-etilfenilamina en cantidades por encima de 30 mg/Kg. El BHT es un excipiente empleado como ingrediente en cosméticos para estabilizar y proteger de la oxidación, que no presenta riesgos para el consumidor en concentraciones inferiores al 0,8% [32]. En los guantes, la migración de N-butil-1-butanamina y ácido dodecanoico supera 10 mg/Kg, la presencia de aminas puede deberse a la degradación térmica de las respectivas N-nitrosaminas en el puerto de inyección del cromatógrafo [16]. La migración de ftalato de dietilo y ácido dodecanoico es común en los tres materiales evaluados, en cantidades cercanas a los 10 mg/Kg de material.

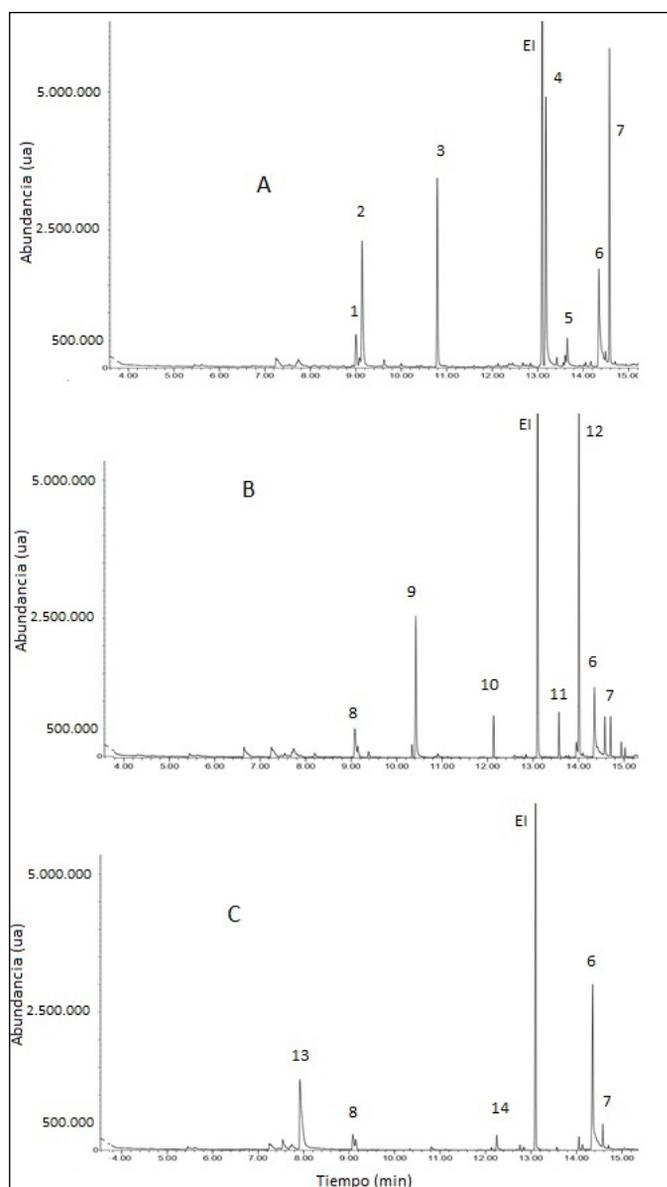


Figura 3. Análisis GC-MS (modo SCAN) de extractos líquido-líquido de ensayos de migración para A: chupo de biberón, B: condones y C: guantes. EI: estándar interno *n*-tetradecano.

Tabla 4. Migración de compuestos volátiles en muestras de chupos para biberón, condones y guantes.

Material	N.º	IRL (RTX-5MS)	Compuesto	Migración (mg/Kg material)
Chupos de biberón	1	1030	2-etil-1-hexanol	1,9 ± 0,1
	2	1041	Alcohol bencílico	7,9 ± 0,3
	3	1170	Acetato de bencilo	8,1 ± 0,4
	4	1409	Vanillina	14,0 ± 1,0
	5	1452	Etil vanillina	1,4 ± 0,1
	6	1571	Ácido dodecanoico	6,5 ± 0,1
	7	1605	Ftalato de dietilo	11,0 ± 1,0
Condón	8	1027	Limoneno	6,8 ± 0,1
	9	1128	N-etilfenilamina	31,0 ± 2,0
	10	1256	N-bencil-N-etil-p-isopropilbenzamida	6,7 ± 0,1
	11	1509	N, N-dimetil-1-dodecanamina	3,0 ± 0,1
	12	1513	Butil-hidroxitolueno	61,0 ± 3,0
Guantes	6	1571	Ácido dodecanoico	18,0 ± 1,0
	7	1605	Ftalato de dietilo	7,4 ± 0,1
	13	< 1000	N-butil-1-butanamina	9,3 ± 0,5
	8	1024	Limoneno	0,9 ± 0,0
	14	1329	N,N-dibutil-formamida	0,9 ± 0,0
6	1571	Ácido dodecanoico	13,0 ± 1,0	
7	1605	Ftalato de dietilo	1,1 ± 0,1	

Conclusiones

En este trabajo se implementó un método normalizado para el ensayo de migración específica de N-nitrosaminas que permite cumplir con las exigencias analíticas de la regulación vigente. El método fue validado en términos de selectividad, linealidad y repetibilidad. Los límites de detección instrumentales (< 7 µg/L) y metodológicos (< 10 µg/Kg de simulante) permiten cumplir con la regulación establecida sobre la migración de tres N-nitrosaminas: NDPA, NPIP y NDPA. Este método se empleó para el análisis de la migración de N-nitrosaminas en tres materiales elastoméricos: chupos de biberón, condones y guantes. Se comprobó que ninguno de los materiales evaluados presenta migración de N-nitrosaminas y que cumplen con la normatividad vigente. Sin embargo, en todos los materiales evaluados, se evidenció la migración de otros compuestos potencialmente peligrosos para la salud como sustancias nitrosables y ftalatos.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado con el proyecto de investigación “Validación de un método por cromatografía de gases para el análisis de migración específica de nitrosaminas en empaques plásticos”, código Hermes 48541, de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia - Sede Bogotá.

Referencias

- [1] J. C. Beard y T. M. Swager, “An Organic Chemist’s Guide to N-Nitrosamines: Their Structure, Reactivity, and Role as Contaminants”, *The Journal of Organic Chemistry*, vol. 86, pp. 2037–2057, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.joc.0c02774>
- [2] K. Li et al., “Estimated cancer risks associated with nitrosamine contamination in commonly used medications”, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 18, nro. 18, pp. 9465, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph18189465>
- [3] A. Thresher, R. Foster, D. J. Ponting, S. A. Stalford, R. E. Tennant y R. Thomas, “Are all nitrosamines concerning? A review of mutagenicity and carcinogenicity data”, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 116, pp. 104749, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2020.104749>
- [4] E. S. Carlson, P. Upadhyaya y S. S. Hecht, “A general method for detecting Nitrosamide formation in the in vitro metabolism of nitrosamines by Cytochrome P450s”, *J. Vis. Exp.*, vol. 127, pp. 56312, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3791/56312>
- [5] United States Environmental Protection Agency, “Methods for organic chemical analysis of municipal and industrial wastewater. Method 607: Nitrosamines”, 1984. [En línea]. Disponible en: https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-09/documents/method_607_1984.pdf. [Último acceso: 12/07/2024]
- [6] D. Schrenk et al., “Risk assessment of N-nitrosamines in food”, *EFSA Journal*, vol. 21, nro. 3, 2023. DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.7884>
- [7] World Health Organization (WHO), “Good manufacturing practices considerations for the prevention and control of nitrosamine contamination in pharmaceutical products. [En línea]. Disponible en: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/medicines/norms-and-standards/current-projects/qas24_943_gmp_nitrosamines_forpublic52f95166-1c71-4cc2-a499-05bc4967bf14.pdf?sfvrsn=2140e3f4_2. [Último acceso: 12/07/2024].
- [8] S. S. Herrmann, L. Duedahl-Olesen y K. Granby, “Simultaneous determination of volatile and non-volatile nitrosamines in processed meat products by liquid chromatography tandem mass spectrometry using atmospheric pressure chemical ionisation and electrospray ionisation”, *Journal of Chromatography A.*, vol. 1330, pp. 20–29, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.01.009>
- [9] J. A. McDonald, N. B. Harden, L. D. Nghiem y S. J. Khan, “Analysis of N-Nitrosamines in Water by Isotope Dilution Gas Chromatography-Electron Ionisation Tandem Mass Spectrometry”,

- Talanta*, vol. 99, pp. 146–154, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2012.05.032>
- [10] S. H. Chang, H. Y. Ho, Ch. Ch. Chang, Ch. Z. Zang, Y. H. Hsu, M. Ch. Lin, S. H. Tseng y D. Y. Wang, “Evaluation and optimization of a HS-SPME-assisted GC-MS/MS method for monitoring nitrosamine impurities in diverse pharmaceuticals”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 221, pp. 115003, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.115003>
- [11] D. Feng, L. Liu, L. Zhao, Q. Zhou y T. Tan, “Evaluation of Simulant Migration of Volatile Nitrosamines from Latex Gloves and Balloons by HS-SPME-GC-MS”, *Journal of Chromatographic Science*, vol. 50, nro. 8, pp. 733–738, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1093/chromsci/bms057>
- [12] International Organization for Standardization, *Condoms – Determination of nitrosamines migrating from natural rubber latex condoms*. ISO 29941: 2010, Geneve, 2010.
- [13] C. Burnier y G. Massonnet, “Forensic analysis of condom traces: Chemical considerations and review of the literature”, *Forensic Science International*, vol. 310, pp. 110255, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110255>
- [14] P. Li, H. Bai, H. Li, M. Chen, Q. Lü y Q. Zhang, “Determination of migration of 15 N-nitrosamines and N-nitrosatable substances from children’s latex articles by gas chromatography-tandem mass spectrometry using solid phase extraction”, *Chinese J. Chromatogr.*, vol. 32, nro. 1, pp. 81–91, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3724/SP.J.1123.2013.08032>
- [15] R. Li, Y. Liu, Z. Wang, Q. Zhang, H. Bai y Q. Lv, “High resolution GC-Orbitrap MS for nitrosamines analysis: Method performance, exploration of solid phase extraction regularity, and screening of children’s products”, *Microchemical Journal*, vol. 162, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105878>
- [16] M. Mutsuga, M. Yamaguchi y Y. Kawamura, “Analysis of N-Nitrosamine Migration from Rubber Teats and Soothers”, *American Journal of Analytical Chemistry*, vol. 4, nro. 6, 2013. DOI: <https://doi.org/10.4236/ajac.2013.46035>
- [17] J. B. Hwang, J. E. Lee, E. Kim, K. Y. Eom, H. Kim y S. Lee, “Analysis of N-nitrosamines and N-nitrosatable substances from baby bottle rubber teats by liquid chromatography tandem mass spectrometry”, *Food Additives and Contaminants: Part A*, vol. 40, nro. 4, pp. 518–527, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1080/19440049.2023.2193276>
- [18] Unión Europea, “Directiva 93/11/CEE de la Comisión, de 15 de marzo de 1993, relativa a la cesión de N-nitrosaminas y de sustancias N-nitrosables por las tetinas y chupetes de elastómeros o caucho”, *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, 1993. [En línea]. Disponible en: <https://op.europa.eu/es/publication-detail/-/publication/354de978-8111-4562-a90b-abf38b151a48>. [Último acceso: 12/07/2024].
- [19] Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia, “Resolución 4143 de 2012”, 2012. [En línea]. Disponible en: <https://www.alcaldiabogota.gov.co/sisjur/normas/Norma1.jsp?i=50951>. [Último acceso: 12/07/2024].
- [20] F. Kühne et al., “N-nitrosamines migration from food contact materials into food simulants: analysis and quantification by means of HPLC-APCI-MS/MS”, *Food Additives and Contaminants: Part A*, vol. 35, nro. 4, pp. 792–805, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1414959>
- [21] A. C. Batista Junios, Y. Arrates Rocha, G. Guimaraes Souza y A. Rodrigues Chaves, “Development of a reliable method for determination of N-nitrosamines in medicines using disposable pipette extraction and HPLC-MS analysis”, *Anal. Methods*, vol. 16, pp. 3318–3330, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1039/d4ay00554f>
- [22] J. H. Sung et al., “Liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of N-nitrosamines released from rubber or elastomer teats and soothers”, *Food Additives and Contaminants: Part A*, vol. 27, nro. 12, pp. 1745–1754, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1080/19440049.2010.508184>
- [23] M. A. Monteiro et al., “Investigation of Carcinogenic Impurities of N-Nitrosamines in Sartan Pharmaceutical Products Marketed in Brazil: Development and Validation of Method Based on High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry”, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 112, nro. 5, pp. 1305–1314, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2023.01.005>
- [24] N. Papadasu y R. Kotanka, “A Novel Validated GC-MS/MS Method for the Estimation of N-Nitroso Dimethyl Amine and N-Nitroso Diethyl Amine in Zidovudine”, *Journal of Chromatographic Science*, vol. 62, nro. 5, pp. 399–405, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmae008>
- [25] M. K. Parr y J. F. Josepg, “NDMA impurity in valsartan and other pharmaceutical products: Analytical methods for the determination of N-nitrosamines”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 164, pp. 536–549, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.11.010>
- [26] D. A. Ahumada, C. Paredes, J. Abella e I. González, *Validación de métodos en análisis químico cuantitativo*. Instituto Nacional de Metrología. Subdirección de Metrología Química y Biología, Bogotá, Instituto Nacional de Meteorología, 2023. Disponible en: https://inm.gov.co/web/wp-content/uploads/2023/05/Guia_ValidacionMetodosAnalisisQuimicoCuantitativo-16.pdf
- [27] Asociación Española de Normalización y Certificación, *Artículos de puericultura. Métodos para determinar la liberación de N-Nitrosaminas y sustancias N-Nitrosables por las tetinas y los chupetes de caucho o elastómeros*. UNE-EN 12868:2018, Madrid, AENOR, 2018.
- [28] C. G. Marrubini et al., “Experimental designs for solid-phase microextraction method development in bioanalysis: A review”, *Analytica Chimica Acta*, vol. 1119, pp. 77–100, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.04.012>
- [29] W. T. Rainey, W. H. Christie y W. Lijinsky, “Mass spectrometry of N-nitrosamines”, *Biomedical Mass Spectrometry*, vol. 5, nro. 6, pp. 395–408, 1978. DOI: <https://doi.org/10.1002/bms.1200050606>
- [30] J. W. Apsimon y J. D. Cooney, “Some Aspects of the Mass Spectra of N-Nitrosamines”, *Canadian Journal of Chemistry*, vol. 49, pp. 1367–1371, 1971. DOI: <https://doi.org/10.1139/v71-227>
- [31] R. Shirey y M. Halpenny, “SPME Adsorbent Fibers with a Nitinol-Core for an Enhanced Fiber Reproducibility”. [En línea]. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/marketing/global/documents/211/722/nit-reproducibility-wp6311en-mk.pdf>. [Último acceso: 12/07/2024].
- [32] Scientific Committee on Consumer Safety Members, “SCCS OPINION on Butylated Hydroxytoluene (BHT)”, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, vol. 138, supl. C, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2022.105312>

Citación del artículo:

D. C. Sinuco León, D. A. Mora Rojas y F. Rico Sarmiento, "Migración específica de N-nitrosaminas en productos elastoméricos", *Rev. Colomb. Quim.*, vol. 52, nro. 3, pp. 51-58, 2024. DOI: <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v52n3.111531>