

870127

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA

CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA UNIVERSIDAD
NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS



VALIDACION DE UN METODO ANALITICO PARA LA
DETERMINACION DE TIOMERSAL EN PRODUCTOS OFTALMICOS

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

TERESA GUADALUPE ROJAS MORALES

ASESOR: Q.F.B. BEATRIZ GARCIA VAZQUEZ

GUADALAJARA, JALISCO. 1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

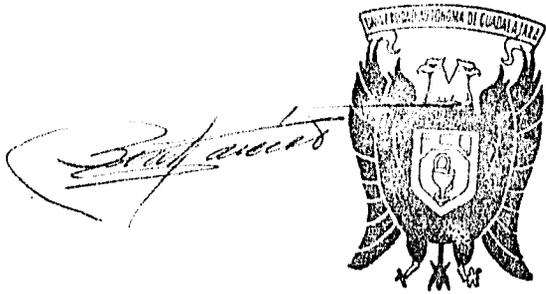


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Agradecimientos

A mi Papá:

Por su apoyo, cariño y sacrificio
por darme la mejor educación y
lograr la culminación de esta meta.

A mi Mamá:

Siempre te llevaré en mi corazón,
pues tu ejemplo de amor a Dios me
dió la fuerza para seguir adelante.

A Derman:

Por su amor, comprensión y
ejemplo que siempre he recibido.

A mis hijos Derman, Aldo y
Mayla:

Porque son lo más
importante para mí.

A mis Hermanos:

Porque juntos compartamos
muchos triunfos.

A mis Maestros:

Porque parte de lo que soy se
los debo a ellos.

En forma muy especial a la
maestra ZIB Beatriz García Vázquez
por su incansable disposición de ayuda
y ejemplo de profesionalismo.

Al Departamento de Desarrollo
Analítico de los Laboratorios
Lyntec:

Por las facilidades brindadas para
la realización de este trabajo.

A Luis Carlos:

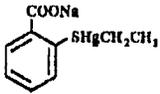
Por las facilidades
ofrecidas para la terminación
de este trabajo.

INDICE

1.0 INTRODUCCIÓN	1
2.0 GENERALIDADES	4
2.1 MONOGRAFÍA DEL TIOMERSAL	5
2.2 SOLUCIONES OFTÁLMICAS	10
2.2.1 <i>Definición y Características</i>	10
2.2.2 <i>Anatomía y Fisiología del Ojo</i>	11
2.2.3 <i>Formas Farmacéuticas de Aplicación Tópica en el Ojo</i>	17
2.2.4 <i>Condiciones de los Productos Oftálmicos</i>	18
2.2.5 <i>Agentes Conservadores</i>	24
2.2.6 <i>Pruebas de Control y Estabilidad</i>	25
2.2.7 <i>Envases</i>	27
2.3 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN	29
2.3.1 <i>Definición y Características</i>	29
2.3.2 <i>Descripción de las Fases</i>	30
2.3.3 <i>Tipos de Cromatografía Líquida</i>	32
2.3.4 <i>Equipo</i>	36
2.3.5 <i>Conceptos Teóricos</i>	42
2.4 VALIDACIÓN	44
2.4.1 <i>Definición de Validación</i>	44
3.0 MATERIALES Y REACTIVOS	50
3.1 MATERIALES	51
3.2 REACTIVOS	52

4.0 MÉTODO ANALÍTICO	55
4.1 FORMULACIÓN DEL PRODUCTO OPTÁLMICO	56
4.2 CONDICIONES DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO	57
4.3 PROCEDIMIENTO	58
4.4 CUANTIFICACIÓN	59
4.5 PROCEDIMIENTO DE VALIDACIÓN	60
4.5.1 <i>Linealidad del Sistema</i>	60
4.5.2 <i>Precisión del Sistema</i>	62
4.5.3 <i>Linealidad del Método</i>	63
4.5.4 <i>Exactitud al 100 %</i>	65
4.5.5 <i>Precisión del Método</i>	67
4.5.6 <i>Reproducibilidad</i>	68
4.5.7 <i>Especificidad</i>	69
5.0 ANALISIS DE RESULTADOS	70
5.1 LINEALIDAD DEL SISTEMA	71
5.2 PRECISIÓN DEL SISTEMA	74
5.3 LINEALIDAD DEL MÉTODO	76
5.4 EXACTITUD AL 100 %	78
5.5 PRECISIÓN DEL MÉTODO	79
5.6 REPRODUCIBILIDAD	81
5.7 ESPECIFICIDAD	83
6.0 CONCLUSIONES	89
7.0 BIBLIOGRAFÍA	95

**I
N
T
R
O
D
U
C
C
I
Ó
N**



1.0 INTRODUCCIÓN

El ser humano en su afán continuo de lograr mejores condiciones de vida, ha dedicado una buena parte de su esfuerzo a desarrollar medicamentos que curen sus enfermedades y les ayuden a recuperar su salud.

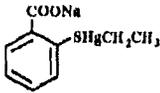
En los últimos años dado el avance de la tecnología, se ha dado gran importancia al desarrollo y validación de métodos analíticos por medio de los cuales se pueda asegurar la calidad del medicamento. Es decir, actualmente la preocupación es crear métodos y controles específicos que permitan conocer el producto y determinar las posibles causas que puedan afectar la calidad ofrecida al consumidor.

Un mecanismo por medio del cual se puede asegurar esta calidad es por medio de la validación de los métodos analíticos utilizados para el control del producto.

Los organismos oficiales han establecido una serie de parámetros con los que debe probarse todo método analítico para asegurar que cumple con los requisitos para las aplicaciones establecidas.

En este trabajo se presentará un estudio de validación de un método analítico para la determinación de timersal en productos oftálmicos, utilizando como técnica analítica la cromatografía de líquidos de alta resolución.

**G
E
N
E
R
A
L
I
D
A
D
E
S**



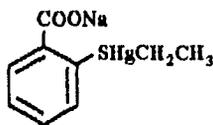
2.0 GENERALIDADES

2.1 MONOGRAFÍA DEL TIOMERSAL

Nombres químicos y sinónimos: o-Etilmercurio-tiobenzoato de sodio; etilmercurio-tiosalicilato de sodio; tiomersal sódico; tiomersal; tiomersalato; mercuriotiolato sódico, mercuriotiosalisilato de sodio etílico.

Descripción: polvo ligeramente cristalino, amarillo pálido, ligero olor característico.

Fórmula desarrollada:



Fórmula condensada:



Peso molecular:

404.8 g/mol

Solubilidad: fácilmente soluble en agua o etanol; casi insoluble en éter.

Ensayos de pureza: contiene no menos del 97.0 % y no más del 101.0 % de tiomersal, calculado con referencia a la sustancia seca.

Sustancias de referencia: tiomersal; secar durante 24 horas al vacío sobre pentóxido de fósforo.

Ensayos de identidad: A) El espectro de absorción en la región infrarroja de una dispersión de la muestra, previamente seca, en bromuro de potasio exhibe máximos a las mismas longitudes de onda que una preparación similar a la de la sustancia de referencia de tiomersal. B) Disolver 500 mg de la muestra, en 10 ml de agua y agregar 2 ml de solución 2 M de ácido clorhídrico, se forma un precipitado blanco, el cual después de lavar con agua y secar al vacío

sobre pentóxido de fósforo tiene una temperatura de fusión aproximadamente de 110 °C. C) Disolver 100 mg de la muestra en 10 ml de agua y agregar 2 ml de solución reactivo de nitrato de plata, se produce un precipitado blanco.

pH: entre 6 y 8. Determinado en una solución al 1 por ciento m/v de la muestra.

Sustancias solubles en éter: agitar 500 mg de la muestra con 20 ml de éter, durante 10 minutos. Filtrar y evaporar el filtrado a sequedad; secar el residuo 24 horas al vacío sobre pentóxido de fósforo. El residuo no excede de 4 mg (0.8 por ciento).

Pérdida por secado: no más de 0.5 por ciento. Secar la muestra 24 horas al vacío sobre pentóxido de fósforo.

Obtención: es sintetizado por la interacción de cloruro de etil mercurio, ácido tiosalisílico e hidróxido de sodio en medio alcohólico.

Valoración: en un matraz de 100 ml, depositar 500 mg de la muestra, agregar 5 ml de ácido sulfúrico y calentar suavemente hasta que se carbonice, continuar calentando y agregar solución de peróxido de hidrógeno (100 vol) gota a gota, hasta que la mezcla sea incolora. Diluir con agua, evaporar hasta ligero desprendimiento de humos, diluir a 10 ml con agua, enfriar y valorar con solución 0.1 M de tiocianato de amonio utilizando solución de sulfato férrico amónico como indicador. Cada ml de solución 0.1 M de tiocianato de amonio equivale a 20.24 mg de tiomersal.

Conservación: en recipientes herméticos, protegidos de la luz.

Estabilidad: las soluciones diluidas de tiomersal son relativamente estables al calor pero no a la luz. Son menos estables en soluciones alcalinas que en soluciones ácidas. Más estables a la luz a pH de 5 a 7. Son inestables al calor pero no a la luz en presencia de iones de Cu, Fe o Zn pero no de iones Ca o Mg. El tiomersal es absorbido por tapones de hule aun a los 0 °C. Soluciones de tiomersal para los ojos deben ser almacenados en frascos resistentes a la luz, no en contacto con el tapón, y en un buffer a pH entre 6 y 7.

Mecanismos de acción: los mercuriales orgánicos muy poco ionizables, su potencia antiséptica mayor que los ionizables, tiene el siguiente mecanismo de acción, que es válido para las soluciones diluidas. Como la acción antiséptica de los mercuriales es inhibida por los compuestos que contienen grupos sulfhidrilos (dimercaprol) se ha postulado que los mercuriales se combinan con los sistemas enzimáticos que contienen grupos sulfhidrilos (enzimas-SH) de gran importancia metabólica, con los que dichos cuerpos reaccionan, inactivándolos.

Acción farmacológica: antiséptico órgano-mercurial, bacteriostático para muchas bacterias. Los mercuriales orgánicos casi no son ionizables, pero sin embargo son más activos que los mercuriales inorgánicos (de 5 a 10 veces más potentes que el cloruro mercúrico) y no son afectados por la presencia de proteínas. De todas maneras no son bactericidas potentes y solo bacteriostáticos potentes, por lo que no son útiles para desinfectar instrumentos.

Usos: en las esterilizaciones preoperatorias puede aplicarse a la piel intacta la tintura al 1:1000. Las soluciones acuosas al 1:5,000 y 1:10,000 se utilizan para fines

oftálmicos. En el tratamiento de infecciones cutáneas micóticas puede emplearse una crema conteniendo 0.1 % de tiomersal. Puede usarse soluciones acuosas al 0.01 % en la preservación de productos biológicos.

Contraindicaciones y precauciones: algunos individuos son hipersensibles a radicales tío y mercurio como los contenidos en el tiomersal. Los síntomas incluyen eritema papilar y erupción vesicular en el sitio de la aplicación.

2.2 SOLUCIONES OFTÁLMICAS

2.2.1 *Definición y Características*

Los productos oftálmicos por definición son medicamentos estériles que se instilan en el ojo y pueden tener efectos anestésicos, antiinflamatorios, antiinfecciosos, miótico y midriático.

Una de las formas farmacéuticas de mayor aplicación en productos oftálmicos es la tópica. Para convertir una droga activa en medicamento oftálmico

es necesario no sólo dosificar la droga, sino elaborar un producto estable, que no contenga microorganismos y que no produzca irritación en el ojo. Algunos de los factores que determinan la eficacia de un principio activo son: su dosificación, el tiempo de contacto con las mucosas, su interacción con otros componentes de la formulación. Dichos factores pueden influir potenciando su actividad y aumentando o disminuyendo sus efectos secundarios.

2.2.2 Anatomía y Fisiología del Ojo

El ojo constituye un sistema óptico sumamente complejo cuyas partes principales son la córnea y el cristalino; por medio de este sistema, la imagen de los objetos que se ven se forman sobre una sensible membrana nerviosa que se llama retina. Esta imagen se transmite, por medio del nervio óptico al cerebro que la interpreta.

La córnea es la porción clara y transparente. Se halla situada delante de la cámara acuosa y su función consiste en permitir el paso de la luz al interior del ojo.

El iris es una membrana circular y pigmentada que se encuentra delante del cristalino. Su función es regular la cantidad de luz que penetra al ojo modificando el tamaño de la pupila.

La pupila es la abertura del iris y la misma se dilata o se contrae según sea menos o más intensa la luz que llega al ojo.

El cuerpo ciliar está situado entre el iris y la coroides. Su función es modificar la forma del cristalino por acción del músculo ciliar. Esta acción permite que el ojo vea a distintas distancias. Este fenómeno se llama de acomodación. El cuerpo ciliar secreta el humor acuoso.

Los párpados están revestidos íntimamente por una membrana mucosa que lleva el nombre de

conjuntiva y que cubre la parte anterior del globo ocular hasta la córnea.

La esclerótica es una membrana fibrosa que envuelve al ojo desde el nervio óptico hasta la córnea. Está situada debajo de la conjuntiva.

El coroides es una túnica vascular situada entre la esclerótica y la retina. Su función es nutrir las demás partes del ojo.

La retina es la túnica más interna del ojo donde se realiza la percepción. La retina contiene conos y bastones que son las células visuales que captan la luz, los colores y el movimiento.

El cristalino es un cuerpo incoloro y transparente suspendido en la porción anterior del globo ocular. Su función es enfocar los rayos de luz hacia la retina.

La cabeza del nervio óptico que entra en el globo ocular constituye la unión del nervio óptico y la retina y al crear campo visual aparece como la mancha ciega.

El ojo está protegido por pliegues móviles que se denominan párpados. Presentan piel en el superficie externa y conjuntiva en el lado interior. En su interior hay diversos tejidos, como cartilagos (en los párpados superiores), músculos, nervios, vasos sanguíneos, etc. Presentan unas glándulas profundas llamadas glándulas de Meibomio que secretan una sustancia oleosa importante, para facilitar la distribución de las lágrimas. Contribuye a evitar que la córnea se seque. Cerca de las pestañas hay glándulas sudoríparas y glándulas oleosas; estas últimas proporcionan el aceite necesario para la lubricación de las pestañas.

El aparato lagrimal consta de: a) glándula lagrimal, situada arriba del ojo. En ella se originan las lágrimas que se drenan por el conducto lagrimal hacia la porción superior de la conjuntiva; b) glándulas lagrimales accesorias que secretan lágrimas y moco; c) canaliculos, son aberturas situadas en el margen interno de los párpados superior e inferior, que recogen el exceso de lágrimas, las que pasan entonces

d) al saco lacrimal a través de los conductos lacrimales superior e inferior. El saco desagua en la nariz.

Para lograr la penetración de los diferentes principios activos es necesario conocer la composición química de las distintas partes del ojo, ya que de esto va a depender la mayor o menor permeabilidad a las drogas.

El epitelio y el endotelio de la córnea son ampliamente permeables a las drogas liposolubles e impermeables a los electrólitos.

El estroma de la córnea es atravesada por los electrólitos pero no por sustancias liposolubles. Por eso es importante para lograr la penetración de la droga, cumplir con la condición de mantener en equilibrio la forma ionizada y no ionizada.

La conjuntiva normal no permite el paso de electrólitos. Las paredes de los vasos del iris en condiciones normales impiden el libre paso de las

drogas, pero cuando el iris se encuentra inflamado su comportamiento es diferente.

Existen factores que determinan la penetración del medicamento en el ojo, como son entre otros la solubilidad que determina la velocidad de desaparición de la droga en el ojo y que determina la concentración intraocular. Este factor influye directamente en el efecto farmacológico, de ahí su importancia.

Lo que es importante señalar es que la penetración de un medicamento en el ojo normal puede ser diferente cuando éste se encuentra enfermo.

La superficie del globo ocular se encuentra húmedo debido a las lágrimas. Las lágrimas están compuestas por moco y secreciones proveniente de las glándulas lacrimales.

El pH de las lágrimas es de alrededor de 7.2 y se torna más alcalino cuando el lagrimeo es continuo. Los límites son entre 7.0 y 7.4.

2.2.3 Formas Farmacéuticas de Aplicación Tópica en el Ojo

A) Soluciones oftálmicas - colirios acuosos.

Los colirios son aquellas soluciones que, en un medio acuoso contienen uno o más principios activos y cuya finalidad es la aplicación tópica en los ojos, en forma de gotas.

El colirio se instila en el ojo con el fin de producir un efecto anestésico, antiinflamatorio, antiinfeccioso, miótico, midriático, ciclopléjico, etc.

Un producto oftálmico debe cumplir con los siguientes requisitos: ser terapéuticamente activo, libre de microorganismos y partículas extrañas, estable química y biológicamente por un tiempo razonable y no ser irritante a la córnea.

B) Suspensiones oftálmicas.

La formulación de suspensiones es muy parecida a las ya mencionadas para soluciones oftálmicas, tanto sus características como las pruebas de control. Un factor importante a considerar es el tamaño de

partícula en suspensión que debe tener dimensiones preestablecidas. En la práctica se acepta, como tamaño de partícula un 90 % menor a 10 μ , un 99 % menor a 20 μ y con ninguna partícula que supere las 50 μ .

C) Pomadas oftálmicas.

Las pomadas oftálmicas siguen las características generales de las pomadas de uso corriente, salvo dos condiciones que son fundamentales: esterilidad y el tamaño de partícula.

La esterilidad, como en cualquier producto oftálmico, debe respetarse tanto en su elaboración como en su fraccionamiento y empaque.

2.2.4 Condiciones de los Productos Oftálmicos

A) Presión osmótica

Los colirios deben ser isotónicos con el líquido lagrimal. Esta isotonía se logra agregando cloruro de sodio u otra sal en caso de incompatibilidad.

Se ha demostrado que una solución de cloruro de sodio al 0.9% tiene propiedades coligativas semejantes

a las del suero sanguíneo y mantiene una presión osmótica similar a la de las lágrimas.

El descenso del punto de congelación de las lágrimas es de 0.52 °C.

También se comprobó que los márgenes considerados como no irritantes para el ojo están entre 0.5 - 0.6 % y 2 % de cloruro de sodio cuyos descensos crioscópicos se hallan entre 0.3 y 1.1 °C.

En el caso de administrar la droga utilizando como vehículo soluciones tamponadas, la regulación de la presión osmótica es secundaria, ya que aunque el producto sea hipertónico, las lágrimas producen una inmediata dilución tendiendo a corregir la tonicidad.

B) Claridad de soluciones

Toda solución oftálmica debe ser clara y libre de partículas extrañas, fibras o filamentos.

Para lograr una solución que cumpla con esta especificación se recomienda un procedimiento de filtración por medio de un filtro de material adecuado.

C) pH

Aunque las lágrimas por sí mismas tienen capacidad de neutralizar tanto soluciones ácidas como básicas, es muy importante estabilizar el pH de las soluciones oftálmicas. Al desarrollar un producto oftálmico debe tenerse en cuenta que el pH no cause dolor o daño a la córnea; pero también debe asegurarse un valor de pH que establezca al producto así como su actividad terapéutica.

Las siguientes son algunas soluciones más utilizadas en la elaboración de productos oftálmicos.

SOLUCIONES REGULADORAS DE ACETATO DE SODIO-ÁCIDO BÓRICO

Solución de acetato de sodio (2% w/v) ml	Solución de ácido bórico (1.9% w/v) ml	pH de la solución resultante
-	100	5.00
5	95	5.70
10	90	6.05
20	80	6.30
30	70	6.50
40	60	6.65
50	50	6.75
60	40	6.85
70	30	6.95
80	20	7.10
90	10	7.25
95	5	7.40
100	-	7.60

Tabla 1.1.1

SOLUCIONES REGULADORAS DE SORENSEN

Solución de fosfato monosódico (8% w/v) ml	Solución de fosfato disódico (9.47% w/v) ml	pH de la solución resultante	Cloruro de sodio para isotonzar en g
90	10	5.91	0.52
80	20	6.24	0.51
70	30	6.47	0.5
60	40	6.64	0.49
50	50	6.81	0.48
40	60	6.98	0.46
30	70	7.17	0.45
20	80	7.38	0.44
10	90	7.73	0.43
5	95	8.04	0.42

Tabla 1.1.2

D) Viscosidad

Los productos oftálmicos deben tener cierta viscosidad con el fin de que el tiempo de contacto de la droga con la córnea sea mayor, aumentando así su efecto terapéutico.

Los agentes viscosantes más utilizados son los derivados de la celulosa como: carboximetilcelulosa, hidroximetilpropilcelulosa y otros derivados polivinílicos en concentraciones que van desde 0.25 % a 1 %.

E) Esterilidad

La esterilidad es una de las especificaciones con las que debe cumplir todo producto oftálmico, debido al riesgo que representa agregar al ojo enfermo un medicamento contaminado.

Los métodos para esterilizar productos oftálmicos pueden variar dependiendo de la naturaleza química de los componentes del producto.

Los métodos de esterilización más utilizados son: filtro bacteriológico, autoclave y por medio de gas.

La mayoría de las formulaciones que existen en el mercado se presentan como multidosis, razón por la cual es imprescindible, para asegurar su esterilidad durante todo el período de vida útil, el agregar conservadores.

2.2.5 Agentes Conservadores

Ante la necesidad de mantener la esterilidad de las soluciones oftálmicas, durante un tiempo razonable, además de evitar la incorporación de gérmenes extraños al ojo enfermo, se han desarrollado una serie de sustancias conservadoras. Otra finalidad de las sustancias conservadoras es la de complementar los efectos de la esterilización inicial del producto, obtenida por autoclave, por elaboración de ambientes estériles o por filtración esterilizante. Algunas de las sustancias conservadoras de productos oftálmicos son las siguientes:

CONCENTRACION USADA DE LOS CONSERVADORES MAS COMUNES

Conservadores	Concentraciones
Clorobutanol	0.5 - 0.8 %
Clorobenzol	0.01 - 0.02 %
Tiomersal	0.001 - 0.01 %
Cloruro de bencetonio	0.005 - 0.01 %
Cloruro de fenilmercurio	0.002 - 0.004 %
Esteres del ácido p-hidroxibenzóico	0.1 %
Sulfato de polimixina	1,000 U/ml

Tabla 1.1.3

El tiorosal es especialmente utilizado con soluciones sulfamidadas y soluciones que contengan aniones complejos que normalmente inactivan la mayor parte de los bactericidas. Las soluciones de tiorosal pueden estabilizarse agregando una concentración del 0.0001 % m/v de EDTA.

Los conservadores deben tener las siguientes características:

- ✓ Brindar un efecto conservador por un tiempo razonable.
- ✓ No ser irritante, ni tóxico al tejido ocular.
- ✓ Ser compatible con los demás componentes de la formulación.
- ✓ Tener alta actividad bactericida frente a un amplio espectro de microorganismos.

2.2.6 Pruebas de Control y de Estabilidad

Para garantizar la calidad de un producto oftálmico es necesario realizar una serie de pruebas

que deberán cumplir con las especificaciones previamente establecidas.

En el caso de soluciones se debe controlar: pH, viscosidad, claridad, aspecto, color, esterilidad, irritabilidad, contenido en principio activo, etc.

Para las suspensiones además de las ya mencionadas se debe controlar: el grado de micronización de las materias primas insolubles.

En pomadas se controlará aspecto, color, pH, granulosis, contenido en principio activo, humedad, esterilidad, irritabilidad, etc.

Existen varios factores que pueden alterar la estabilidad de un producto oftálmico, entre ellos se encuentra: la temperatura, diversas radiaciones, dimensión de las partículas, constituyentes atmosféricos, conservadores, materiales constituyentes de los envases, gérmenes contaminantes, etc.

Todos estos factores deberán controlarse con el fin de lograr un producto oftálmico ideal, esto es, que cumpla con su actividad terapéutica, que sea estable durante su uso y que no cause molestia extrema al paciente.

2.2.7 Envases

El envase de un producto oftálmico debe cumplir dos requisitos: la conservación del preparado y una práctica utilización del mismo.

El material constituyente de envase no debe influir sobre el contenido, cediendo alcalinidad, plastificantes, ni debe absorber componentes de la formulación.

Debe tener un cierre perfecto que evite contaminación, evaporación u oxidación del producto, tanto durante su distribución como durante su empleo.

Debe ser de fácil manipuleo y perfectamente limpio a fin de evitar ser vehículo de transmisión de partículas extrañas y microorganismos.

Algunos de los materiales de envase más comúnmente utilizados, dependiendo de las características de la formulación son: el vidrio incoloro o ámbar y el plástico como derivados polietilénicos o poliestirénicos.

Los envases de vidrio se esterilizan por calor húmedo, en autoclave. Los de plástico, se pueden esterilizar con óxido de etileno o por radiaciones

gamma. Los tapones de baquelita se introducen en soluciones antisépticas y luego se secan en estufa a 40 °C.

2.3 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

2.3.1 Definición y Características

La cromatografía líquida se refiere a cualquier procedimiento cromatográfico en el cual la fase móvil es un líquido, por ejemplo la cromatografía tradicional en columna, (cualquier tipo: adsorción, partición o intercambio iónico), cromatografía de capa delgada, cromatografía en papel y cromatografía de líquidos de alta resolución (C.L.A.R.).

Las diferencias entre C.L.A.R. y los anteriores procesos cromatográficos mencionados radican en la optimización del equipo, materiales y técnicas utilizadas.

La C.L.A.R. se caracteriza por:

- ⇒ Columnas reutilizables de pequeño diámetro (2-5 mm), longitud de 10 a 50 cm y rellenas de partículas de diámetro muy pequeño (5-50 μm) que contienen la fase estacionaria.
- ⇒ Presiones de entrada relativamente altas y flujo controlado de la fase móvil.

- ⇒ Introducción precisa de la muestra, sin necesidad de grandes cantidades.
- ⇒ Detectores continuos especiales, capaces de operar a caudales muy bajos y detectar cantidades muy pequeñas.
- ⇒ Instrumentos normalizados y automatizados.
- ⇒ Análisis rápidos y
- ⇒ Alta resolución.

2.3.2 Descripción de las Fases

Fase estacionaria: puede ser un sólido poroso o una fase líquida con la que se impregna la superficie de las partículas. Los rellenos más ampliamente utilizados tienen la fase estacionaria químicamente enlazada a las partículas del soporte. Se preparan por reacción química entre los grupos hidroxilo de la superficie de las partículas de sílice y una molécula orgánica lineal o un organosilano.

Fase móvil: a diferencia de la cromatografía de gases, en C.L.A.R. la fase móvil no es inerte. La

separación se basa en las interacciones específicas entre las moléculas de la muestra y las fases estacionaria y móvil; así se presenta una variable adicional que puede seleccionarse adecuadamente para mejorar la separación del sistema.

Debe poseer las siguientes características:

- a) Debe ser libre de contaminantes.
- b) No debe alterar la composición de la muestra.
- c) Debe ser compatible con el detector.
- d) Debe disolver la muestra.
- e) Debe tener baja viscosidad.

Se puede usar una única sustancia como fase móvil durante el análisis de una mezcla de dos o más sustancias. También es posible mantener constante su composición (operación isocrática), o bien cambiarla (elución por gradiente) empezando con una sustancia única y aumentando con el tiempo la concentración del otro componente (o componentes).

2.3.3 Tipos de Cromatografía Líquida

Basándose en la naturaleza de la fase estacionaria, y en los procesos de separación, pueden enumerarse cuatro tipos de cromatografía:

- Cromatografía de adsorción.
- Cromatografía de partición.
- Cromatografía de intercambio iónico.
- Cromatografía de exclusión.

Cromatografía de adsorción: la fase estacionaria es un adsorbente (sílica, gel, alúmina), y la separación se basa en repetidas etapas de adsorción-desorción.

Cromatografía de partición: la separación se basa en un verdadero reparto entre las dos fases, por los diferentes coeficientes de distribución de los componentes de la mezcla.

Cromatografía de intercambio iónico: se usa casi exclusivamente con muestras iónicas o ionizables, el pH y la polaridad se utilizan para controlar el tiempo de

elución. Es ampliamente utilizada para el análisis de aminoácidos.

Cromatografía de exclusión: el material de relleno de la columna posee poros de dimensiones entre ciertos límites. La muestra es retenida o filtrada según sea su tamaño molecular. Se le conoce también como cromatografía entre geles.

En la práctica para procesos de adsorción y partición, se definen dos tipos más, según sea la polaridad relativa de las dos fases: cromatografía en fase normal y cromatografía en fase inversa.

Cromatografía en fase normal: la fase estacionaria es de carácter polar; se utilizan fases enlazadas polares, p. ej. un grupo amino, hidroxilo o ciano al final de la cadena hidrocarbonada, y la fase móvil es apolar, p. ej. n-hexano o tetrahidrofurano. Las muestras polares quedan retenidas en la columna durante tiempos mayores que los materiales menos polares o apolares (fig. 2.3.3.1).

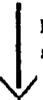
ORDEN DE ELUCION	DIRECCION DEL FLUJO
OH MUY POLAR (3ro.) OH SEMIPOLAR (2do.) OH APOLAR (1ro.)	 Fase móvil apolar

Figura 2.3.3.1 Fase normal

Cromatografía en fase inversa: la fase estacionaria es de naturaleza apolar p. ej. octadecilsilano, y la fase móvil es un líquido polar, normalmente agua o un alcohol. En este caso entre más apolar sea la muestra, mayor será su retención (fig. 2.3.3.2).

ORDEN DE ELUCION	DIRECCION DEL FLUJO
CH ₃ APOLAR (1ro.) CH ₃ SEMIPOLAR (2do.) CH ₃ MUY POLAR (3ro.)	 Fase móvil polar

Figura 2.3.3.2 Fase inversa

El criterio a seguir para seleccionar el tipo de cromatografía adecuado, puede ser el peso molecular de los componentes y su solubilidad en agua (fig. 2.3.3.3).

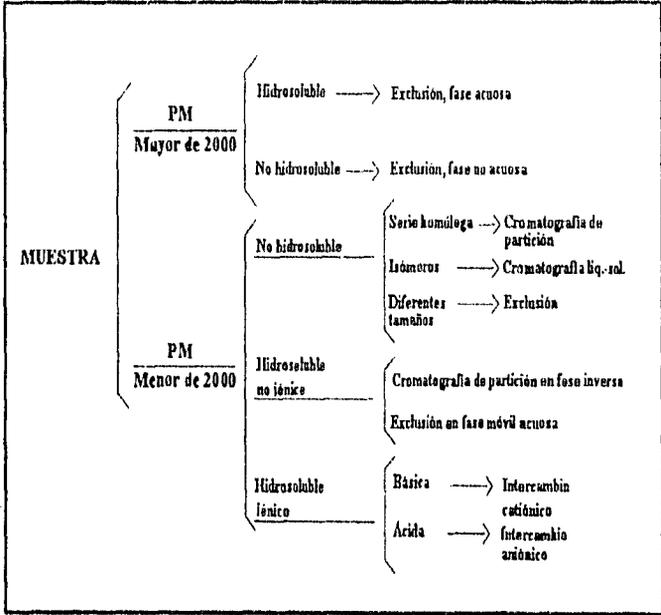


Figura 2.3.3.3 Selección del tipo de cromatografía

2.3.4 Equipo

Los componentes básicos del equipo utilizado en

C.L.A.R. son:

- * Una bomba para propulsar la fase móvil.
- * Un mecanismo para la introducción de la muestra.
- * Una columna que contenga la fase estacionaria.
- * Un detector que proporcione datos que permitan una evaluación cuantitativa.

Equipo adicional puede ser:

- * Un registrador.
- * Un procesador de datos.
- * Un programador de solventes para sistemas con gradiente de elución.

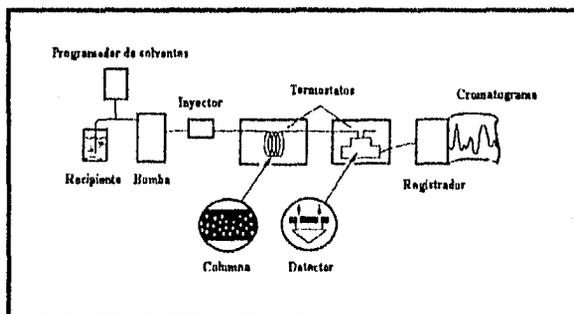


Figura 2.3.4.1

Bombas: el control del flujo de la fase móvil se logra por medio de bombas a alta presión. Este control, se traduce en operaciones reproducibles, las cuales a su vez, proporcionan mejor precisión y exactitud en el análisis.

Las bombas utilizadas se pueden clasificar en aquellas que impulsan el disolvente a velocidad de flujo constante y aquellas que lo impulsan a presión constante. Las de flujo constante son las más utilizadas en la mayoría de las aplicaciones de C.L.A.R.

Bombas de flujo constante:

- Reciprocantes.
- De desplazamiento positivo (mecánicas).

Bombas reciprocantes: utilizan cámaras de volúmenes pequeños (35-400 μ l) con pistones reciprocantes o diafragmas flexibles que impulsan el disolvente a la columna en contra de la presión que presenta por el empaque contenido. La velocidad de

flujo es fácil de controlar lo que permite el uso de gradiente de elución.

Algunas constan de mecanismos especiales para minimizar pulsación del flujo, otras de aditamentos para impulsar un flujo preciso.

Bombas de desplazamiento positivo: el mecanismo de operación es semejante a una jeringa, cuyo émbolo es impulsado por un tornillo sinfín, el que a su vez, es controlado por un motor. Impulsan un flujo constante sin pulsaciones, independientemente de la presión que opone la columna. Cualquier bloqueo del flujo puede causar una elevación de presión y dañar la bomba.

Introducción de la muestra: puede llevarse a cabo de diferentes maneras. El método más simple consiste en la inyección a través de un septum con la ayuda de una microjeringa; en equipos más sofisticados se cuenta con mecanismos especiales en los que se lleva a cabo con la ayuda de válvulas de diversos tipos.

La cantidad de muestra puede variar bastante, dependiendo de la sensibilidad del detector.

Generalmente se inyectan de 1-20 μ l de volumen conteniendo 0.1-10 μ g de soluto.

Columna: la columna y su contenido, son por supuesto, el corazón del cromatógrafo; puede ser de paredes de vidrio o más comúnmente, de acero inoxidable. Las columnas de vidrio pueden ser utilizadas para presiones hasta de 1500 psi., para más alta presión se utilizan las de acero inoxidable. Se encuentran disponibles dos tipos de empaques: los que son completamente porosos (gel de sílice), y aquellos que consisten de un centro sólido, usualmente vidrio, cubierto de una delgada capa porosa, normalmente de sílice; estos últimos tienen la ventaja de rápida transferencia de masa y además son estables a presiones elevadas.

Las partículas de relleno han de ser tan pequeñas para que sea posible poner la muestra en contacto con el máximo de superficie, pero no demasiado, porque pueden provocar un empaquetamiento tan compacto, que la fase móvil no puede bombearse con facilidad. Usualmente se utilizan columnas de 25-50 cm de

longitud y rellenas de partículas de diámetro comprendido entre 5-15 μm .

Detectores: el éxito de la técnica de C.L.A.R. depende en gran parte del uso de detectores altamente sensibles, debido a los tamaños de muestra tan pequeños que se utilizan.

Actualmente en los equipos de cromatografía líquida se utilizan principalmente los detectores ópticos. En estos detectores se hace pasar la corriente líquida a través de una microcubeta de pequeño volumen (aprox. 10 μl) donde la atraviesa un rayo de luz; las variaciones en la intensidad de la luz causadas por absorción U.V., emisión de fluorescencia o cambio en el índice de refracción (según el tipo de detector utilizado), que resultan de la interacción con los componentes de la muestra que pasan sucesivamente a través de la cubeta, se registran en forma de variaciones de voltaje de salida. Estas variaciones se registran gráficamente y se suministran a un integrador o computador que proporciona tiempos de retención y áreas de los picos.

El detector más utilizado en C.L.A.R. es el de absorción U.V. Un detector de este tipo de longitud de onda variable capaz de controlar desde 190-800 nm es útil en la cuantificación de un gran número de muestras.

2.3.5 Conceptos Teóricos

Resolución: es la medida del grado de separación de dos picos adyacentes en un sistema de dos componentes.

Se expresa como el cociente entre la distancia de los centros de los picos y el promedio de la amplitud de los mismos (fig. 2.3.5.1).

$$R_s = \frac{(V_2 - V_1)}{1/2(W_1 + W_2)}$$

donde:

V_1 y V_2 son tiempos de retención de los picos 1 y 2 respectivamente.

W_1 y W_2 es la amplitud de la base de los picos.

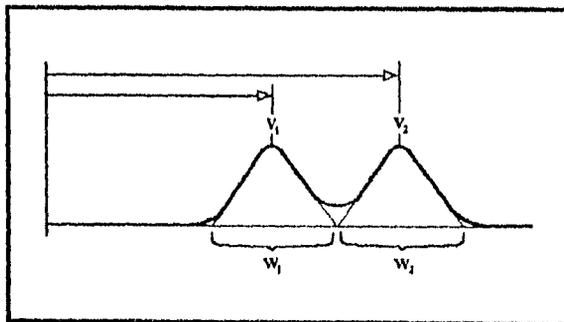


Figura 2.3.5.1

Tiempo de Retención es el tiempo que transcurre desde el momento de la inyección de la muestra, hasta la aparición del máximo del pico del componente.

El Factor de Resolución se relaciona con varios parámetros dependientes de la experimentación del analista, mediante la ecuación:

$$R_s = \left(\frac{N}{4} \right) \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{K'}{K' + 1} \right)$$

donde:

$$\alpha = \frac{V_2 - V_0}{V_1 - V_0}$$

Es el factor de separación. Describe la posición relativa de dos picos.
 V_0 = tiempo en que el disolvente es registrado como pico también.

$$N = 16 \frac{V^2}{W}$$

Número de platos teóricos. Expresa cuantitativamente la eficiencia de la columna.
 V = tiempo de retención
 W = amplitud del pico

$$K' = \frac{V_1 - V_0}{V_0}$$

Es el factor de capacidad. Expresa numéricamente la capacidad de separar un componente del disolvente y sus impurezas.

2.4 VALIDACIÓN

2.4.1 Definición de Validación

Es la determinación del grado de validez de un proceso de medición. Esta definición sugiere una actividad que toma lugar después de que el proceso de medición ha sido desarrollado. Si la evaluación es un éxito, el proceso recibirá confirmación y aprobación oficial.

Existen muchas formas de validar. El escoger cuáles son los puntos a validar depende de las necesidades y exigencias de cada laboratorio, de los requerimientos oficiales y algunas veces del criterio de las personas que realizan la validación.

La USP XXI la define en los siguientes términos:

Validación es el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método analítico satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. La capacidad se expresa en términos de parámetros analíticos y la

principal herramienta es el uso de la estadística. Los parámetros analíticos más comúnmente utilizados son:

- a) Linealidad y precisión del sistema
- b) Precisión y exactitud del método
- c) Límite de detección
- d) Selectividad
- e) Rango
- f) Linealidad
- g) Reproducibilidad

Es lógico pensar que diferentes métodos de análisis requieren de la validación de diferentes parámetros; es por eso que existen tres categorías diferentes de validación (tabla 2.4.1.1).

Categoría I: métodos analíticos para la cuantificación de componentes que se encuentran en mayor cantidad como principios activos, excipientes o conservadores.

Categoría II: métodos analíticos para la determinación de impurezas o compuestos de

degradación. Estos métodos incluyen determinación cuantitativa y pruebas de límite

Categoría III: métodos analíticos para la determinación de características permanentes como: tiempo de desintegración, disolución, etc.

PARAMETRO	Categoría I	Categoría II		Categoría III
		Cuantit.	P. de lim.	
Precisión	SI	SI	NO	SI
Exactitud	SI	SI	*	SI
Límite de detección	NO	NO	SI	*
Límite de cuantificación	NO	SI	NO	*
Selectividad	SI	SI	SI	*
Rango	SI	SI	*	*
Linealidad	SI	SI	NO	*
Reproducibilidad	SI	SI	SI	SI

* Parámetro no determinado en esta categoría

Tabla 2.4.1.1

Algunas definiciones básicas de los conceptos anteriores son:

Linealidad de un sistema o método analítico: es la habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un rango dado.

Precisión de un método analítico: es el grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestras de un lote homogéneo del producto.

Usualmente se expresa como desviación estándar o coeficiente de variación (desviación estándar relativa).

Exactitud de un método analítico: es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y un valor real. Normalmente se expresa como el porcentaje recuperado del análisis de

muestras a las que se les ha añadido una cantidad conocida de la sustancia.

Límite de detección: es la menor cantidad detectable del compuesto por analizar, la cual no es cuantificada necesariamente, bajo condiciones normales del método analítico.

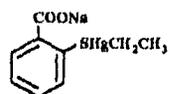
Límite de cuantificación: es un parámetro de métodos de cuantificación para compuestos que se encuentran en concentraciones muy bajas, dentro del medicamento como impurezas y compuestos de degradación.

Reproducibilidad: es la precisión de un método expresada como la concordancia entre determinaciones realizadas en el mismo y/o diferentes laboratorios por diferentes analistas y/o utilizando diferentes equipos.

Especificidad: es la medida del grado de interferencia (o ausencia), en el análisis de mezclas complejas; es la habilidad para obtener una respuesta

debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra.

**M
A
T
E
R
I
A
L
E
S** **R
E
A
C
T
I
V
O
S**



3.0 MATERIALES Y REACTIVOS

3.1 MATERIALES

- 1.- Material de vidrio: matraces y pipetas volumétricas de diferentes capacidades, pipetas Pasteur, etc.
- 2.- Filtros Millipore de 2 μ .
- 3.- Microjeringas de 10 μ l.
- 4.- Balanza analítica.
- 5.- Cromatógrafo marca Waters, modelo 440.
Equipado con detector de longitud de onda fija a 254 nm, programador de solventes, inyector semiautomático y registrador modelo 1080A.
- 6.- Columna μ Bondapack C₁₈ (30 cm. x 3.9 mm D.I.)

3.2 REACTIVOS

1.- Agua destilada para cromatografía.

2.- Acetonitrilo destilado, G.R.

3.- Preparación de la fase móvil.

a) Solución de fosfato de sodio dibásico 0.2 M:

Pesar 56.78 g de Na_2HPO_4 anhidro, G.R. y transferir a un matraz volumétrico de 2 l. Disolver el fosfato de sodio dibásico en 1500-1800 ml de agua. Diluir hasta la marca y mezclar.

b) Solución de fosfato de sodio monobásico 0.2 M:

Pesar 55.16 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, G.R. y transferir a un matraz volumétrico de 2 l. Disolver el fosfato de sodio monobásico en 1500-1800 ml de agua. Diluir hasta la marca y mezclar.

c) Solución buffer de fosfatos 0.1 M, pH 7.8:

Usando una probeta graduada medir 915 ml de la solución de fosfato de sodio dibásica y transferir a un matraz volumétrico de 2 l. De la misma forma adicionar 85 ml de la solución de fosfato monobásica. Diluir hasta la marca y mezclar.

d) Concentración de la fase móvil:

Concentración de acetonitrilo: 15 %, concentración de la solución buffer de fosfatos: 85 %. Se mezcla la fase móvil y se ajusta el pH a 7.8 usando la solución de fosfato monobásica. Se hace pasar por filtro de 2 μ y se degasifica antes de usarse.

4.- Solución de cloruro de sodio:

Pesar 9 g de cloruro de sodio, G.R. (NaCl) y transferir a un matraz volumétrico de 1 l. Disolver el NaCl en 800-900 ml de H₂O. Diluir hasta la marca y mezclar.

5.- Preparación de soluciones estándar

a) Solución de estándar interno:

Pesar aproximadamente 19 mg de ácido 6-metoxi-2-naftilacético. Transferir a un matraz volumétrico de 100 ml. Disolver y diluir hasta la marca con acetonitrilo.

b) Soluciones patrón de tiomersal:

Pesar aproximadamente 32, 40, 48 mg de tiomersal, USP. y transferir a tres matraces volumétricos de 50 ml. Disolver y diluir hasta la marca con solución de cloruro de sodio. Las soluciones patrón tendrán concentraciones de 0.64, 0.80 y 0.96 mg/ml respectivamente.

c) Soluciones estándar de tiomersal para determinar el factor respuesta:

Pipetear 5 ml de cada una de las soluciones patrón a tres matraces volumétricos de 100 ml. Diluir hasta la marca con solución de cloruro de sodio. Los estándares tendrán concentraciones de 32, 40 y 48 µg/ml respectivamente.

d) Soluciones estándar de tiomersal utilizadas en la validación del método:

Pipetear 3, 4, 5, 6, 7 ml de la solución patrón de tiomersal de 0.8 mg/ml a matraces volumétricos de

100 ml. Diluir hasta la marca con solución de cloruro de sodio. Estas soluciones contendrá 24, 32, 40, 48 y 56 $\mu\text{g/ml}$ de tiomersal respectivamente.

La siguiente tabla muestra las concentraciones de los estándares preparados tanto para la determinación del factor de respuesta promedio del tiomersal como para la validación del método analítico.

Sol. Patrón mg/50 ml	concentr. mg/ml	Estándares $\mu\text{g/ml}$	Estándares de trabajo $\mu\text{g/ml}$
32	0.64	32	16
40	0.80	24, 32, 40, 48, 56	12, 16, 20, 24, 28
48	0.96	48	24

Tabla 3.1

**M
É
T
O
D
O**

**A
N
A
L
Í
T
I
C
O**

CC(=O)OC1=CC=C(C=C1)S[CH2]2

4.0 MÉTODO ANALÍTICO

4.1 FORMULACIÓN DEL PRODUCTO OFTÁLMICO UTILIZADO PARA EL PRESENTE ESTUDIO

Cada 100 ml contienen:	
Cloruro de sodio	0.770 g
Tiomersal	0.004 %
EDTA	0.001 %
Vehículo c.b.p.	100 ml

El estudio se concretó a validar el método para la determinación del tiomersal.

4.2 CONDICIONES DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO

Cromatógrafo	Marca Waters, modelo 440 Equipado con detector de longitud de onda fija a 254 nm, programador de solventes, inyector semiautomático y registrador modelo 1080A.
Columna	De 30 cm x 3.9 mm, de acero inoxidable empacada con μ Bondapak C ₁₈ (Waters).
Fase móvil	Acetonitrilo: Buffer de fosfatos 15:85. Filtrada y degasificada.
Velocidad de flujo	2 ml/min.
Presión	1800 psi
Temperatura	Ambiente
Velocidad de carta	0.5 cm/min
Rango	0.01 - 0.02
Atenuación	10 mV
U.V. longitud de onda	254 nm
Volumen de inyección	10 μ l

4.3 PROCEDIMIENTO

Tratar todos los estándares de la misma manera.

- 1.- Pipetear 2 ml de solución de estándar interno a un matraz volumétrico de 10 ml.
- 2.- Con una pipeta volumétrica de 5 ml tomar una alícuota de cada estándar de tiomersal y transferirla al matraz de 10 ml que contiene el estándar interno. Enjuagar la pipeta con 2.5 ml de solución de cloruro de sodio. Mezclar y diluir hasta la marca con solución de cloruro de sodio.
- 3.- Inyectar 10 μ l de los estándares de trabajo combinados (preparados en el paso 2) al cromatógrafo de líquidos, los picos eluyen en el siguiente orden:
 - 1.- Tiomersal $Tr = 2.78$ minutos
 - 2.- Estándar interno $Tr = 5.04$ minutos

4.4 CUANTIFICACIÓN POR ESTANDARIZACIÓN INTERNA

a) Factor de respuesta (Rf).

Por medio de la determinación del factor de respuesta se verifica en qué medida se afecta la cuantificación del tiomersal dependiendo de la respuesta del detector. Se determina utilizando únicamente las áreas obtenidas de la inyección de cada uno de los estándares de trabajo de 16, 20 y 24 µg/ml de tiomersal mediante la siguiente fórmula:

$$Rf = \frac{\text{Área del pico del est. interno}(\text{mg del est. de tiomersal})}{\text{Área del pico de Tiomersal}}$$

se obtiene un factor de respuesta promedio ($Rf_{\text{prom.}}$) de los estándares utilizados.

b) Determinar la respuesta del detector (R)

Es el valor corregido de respuesta del detector para los estándares de trabajo utilizados en la validación del método mediante la siguiente fórmula:

$$R = \frac{\text{Área del pico de tiomersal}}{\text{Área del pico del est. interno}}$$

e) Resultado de la cuantificación.

Se utilizan únicamente las áreas obtenidas de la inyección de los estándares utilizados en la validación. Según diluciones hechas y factores de conversión se obtiene:

$$\mu\text{g/ml tiomersal} = Rf_{\text{prom}} \left(\frac{1}{100\text{ml}} \right) \left(\frac{5\text{ml}}{50\text{ml}} \right) \left(\frac{5\text{ml}}{10\text{ml}} \right) \left(\frac{10\text{ml}}{5\text{ml}} \right) \left(\frac{1000\mu\text{g}}{\text{mg}} \right)$$

De aquí que:

$$\mu\text{g/ml tiomersal} = (Rf_{\text{prom}})(R)$$

d) Porcentaje de Recobro de Tiomersal

Se determina al dividir el resultado de la cuantificación en $\mu\text{g/ml}$ encontrados entre $\mu\text{g/ml}$ adicionados por cien.

$$\% \text{ tiomersal} = \frac{\mu\text{g/ml encontrados}(100)}{\mu\text{g/ml adicionados}}$$

4.5 PROCEDIMIENTO DE VALIDACIÓN

4.5.1 Linealidad del Sistema

Se determinó con la curva de calibración a partir de los estándares de trabajo de 12, 16, 20, 24 y

28 µg/ml, obtenidos de la solución patrón, correspondientes al 60, 80, 100, 120, y 140 % de la dosis. El análisis se hizo por duplicado empleando el método analítico establecido.

Se determinó:

- Coeficiente de correlación (r)
- Coeficiente de determinación (r^2)
- Pendiente (m)
- Intercepto (b)
- Coeficiente de variación (C.V.)

FÓRMULAS

Coeficiente de variación:

$$C.V. = \frac{DE}{X} (100)$$

Donde:

DE = desviación estándar

X = media

Ecuación de la línea recta:

$$y = mx + b$$

Pendiente:

$$m = \frac{n\sum xy - \sum x \sum y}{n\sum x^2 - (\sum x)^2}$$

Coeficiente de correlación:

$$r = \frac{[n\sum xy - (\sum x)(\sum y)]^{1/2}}{[n\sum x^2 - (\sum x)^2][n\sum y^2 - (\sum y)^2]^{1/2}}$$

Coefficiente de determinación:

$$r^2 = \frac{[nt(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)]^2}{[nt(\sum x^2) - (\sum x)^2][nt(\sum y^2) - (\sum y)^2]}$$

Donde:

n = número de repeticiones de cada dilución de la solución patrón

x = cantidad adicionada o dilución

y = propiedad medida o cantidad recuperada

t = número de diluciones

CRITERIO

$$m \approx 1$$

$$r \geq 0.99$$

$$r^2 \geq 0.98$$

$$b \approx 0$$

$$C.V. \leq 1.5 \%$$

4.5.2 Precisión del Sistema

Se aplicó el método analítico por sextuplicado a un mismo estándar de trabajo correspondiente al 100 % de la dosis establecida en la linealidad del sistema.

Se determinó;

♦ Media (X)

♦ Desviación estándar (DE)

♦ Desviación estándar relativa o coeficiente de variación (C.V.)

FÓRMULAS

Media:

$$\bar{X} = \frac{\sum x}{n}$$

Desviación estándar:

$$DE = \frac{[(x - \bar{X})^2]^{1/2}}{[n - 1]}$$

Donde:

x = cantidad adicionada o dilución

n = número de replicaciones

Coefficiente de variación:

$$C.V. = \frac{DE(100)}{\bar{X}}$$

Donde:

DE = desviación estándar

X = media

CRITERIO

$$C.V. \leq 1.5 \%$$

4.5.3 Linealidad del Método

Se prepararon soluciones adicionadas del principio activo (placebos cargados), cada una de manera independiente a tres diferentes concentraciones incluyendo el 100 % de la dosis. El análisis se hizo por sextuplicado para cada concentración.

Se determinó:

- ♦ Pendiente (m)
- ♦ Intercepto (b)
- ♦ Coeficiente de correlación (r)
- ♦ Coeficiente de determinación (r^2)
- ♦ Coeficiente de variación (C.V.)

FÓRMULAS

Coeficiente de variación:

$$C.V. = \frac{DE}{X}(100)$$

Donde:

DE = desviación estándar

X = media

Ecuación de la línea recta:

$$y = mx + b$$

Pendiente:

$$m = \frac{nt(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{nt(\sum x^2) - (\sum x)^2}$$

Intercepto:

$$b = \frac{\sum y - m(\sum x)}{nt}$$

Coeficiente de correlación:

$$r = \frac{[nt(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)]^{1/2}}{[[nt(\sum x^2) - (\sum x)^2][nt(\sum y^2) - (\sum y)^2]]^{1/2}}$$

Coeficiente de determinación:

$$r^2 = \frac{[nt(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)]^2}{[nt(\sum x^2) - (\sum x)^2][nt(\sum y^2) - (\sum y)^2]}$$

Donde:

n = número de replicaciones por cada cantidad
adicionada

x = cantidad adicionada o dilución

y = propiedad medida o cantidad recuperada

t = número de cantidades adicionadas

CRITERIO

$$m \approx 1$$

$$r \geq 0.99$$

$$r^2 \geq 0.98$$

$$b \approx 0$$

$$C.V. \leq 1.5 \%$$

4.5.4 Exactitud al 100 %

Se analizaron 6 placebos cargados con el 100. % del principio activo, preparados de manera independiente, por el mismo analista y en las mismas condiciones de operación.

Se determinó:

♦ Media (X)

♦ Desviación estándar (DE)

♦ Desviación estándar relativa o coeficiente de variación (C.V.)

♦ Intervalo de confianza 95% para la media (I.C.).

El coeficiente de variación depende del tipo de método y de la muestra; hay que tomar en cuenta la forma farmacéutica y la concentración:

MÉTODO	C.V.
Cromatográfico	≤ 2 %
Químicos y espectrofotométricos	≤ 3 %
Microbiológicos	≤ 5 %

FÓRMULAS

Media:

$$\bar{X} = \frac{\sum x}{n}$$

Desviación estándar:

$$DE = \frac{[\sum (x - \bar{X})^2]^{1/2}}{[n - 1]}$$

Coefficiente de variación:

$$C.V. = \frac{DE(100)}{\bar{X}}$$

Intervalo de confianza (I.C._{.95 %}):

$$I.C._{95\%} = \bar{X} \pm t_{n-1} \frac{DE}{n}$$

Donde:

x = cantidad adicionada o dilución

n = número de replicaciones

t_{n-1} = valor de t de Student para n - 1 grados de libertad y una probabilidad acumulada de 0.975 (t = 2.5706)

CRITERIO

C.V. \leq 2 %

I.C. debe incluir el 100 %

4.5.5 Precisión del Método

Se analizaron soluciones de placebos cargados, preparados independientemente, a tres diferentes concentraciones, con el mismo método, analista y equipo; se obtuvo el porcentaje de recobro para cada concentración determinándolo contra un estándar. Se hicieron pruebas por sextuplicado para cada concentración.

Se determinó:

- ♦ Media (X)
- ♦ Desviación estándar (DE)
- ♦ Desviación estándar relativa o coeficiente de variación (C.V.)
- ♦ Intervalo de confianza 95 % para la media (I.C.)

FÓRMULAS

Media:

$$X = \frac{\sum x}{n}$$

Desviación estándar:

$$DE = \frac{[(x-X)^2]^{1/2}}{[n-1]}$$

Coefficiente de variación:

$$C.V. = \frac{DE(100)}{X}$$

Intervalo de confianza (I.C._{95 %}):

$$I.C._{95 \%} = X \pm t_{n-1} \frac{DE}{n}$$

Donde:

x = cantidad adicionada o dilución

n = número de replicaciones

t_{n-1} = valor de t de Student para n - 1 grados de libertad y una probabilidad acumulada de 0.975 (t = 2.5706)

CRITERIO

C.V. ≤ 2 %

I.C. debe incluir el 100 %

4.5.6 Reproducibilidad

Se llevó a cabo por dos analistas en días diferentes, que analizaron placebos cargados con el 100 % de la dosis y por sextuplicado aplicando el método establecido.

Se determinó:

- ♦ Media (X)
- ♦ Desviación estándar (DE)
- ♦ Coeficiente de variación (CV)
- ♦ Intervalo de confianza 95 % para la media (I.C.)

CRITERIO

C.V. \leq 2 %

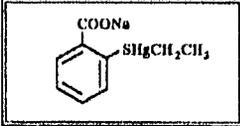
I.C. debe incluir el 100 %

4.5.7 Especificidad

Se sometieron muestras del producto conteniendo una concentración cercana al 100 % de la dosis teórica de tiomersal, de estándar interno y EDTA a condiciones de 37 °C durante seis meses. Para comprobar si el producto de degradación del tiomersal que es el ácido tiosalicílico no interfería con la respuesta que el detector da para la cuantificación del tiomersal.

**A
N
Á
L
I
S
I
S**

**R
E
S
U
L
T
A
D
O
S**



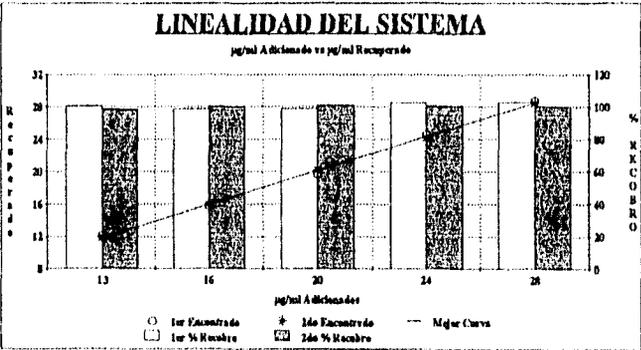
5.0 ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.1 LINEALIDAD DEL SISTEMA

La linealidad del sistema se determinó en base a los porcentajes de recobro obtenidos de la preparación de soluciones de tiomersal a partir de una solución patrón que se muestran en la tabla 5.1.1.1

% de Concentración	Cantidad Adicionada $\mu\text{g/ml}$	Respuesta	Cantidad Recuperada $\mu\text{g/ml}$	% de Recobro
60	12	0.55	12.06	100.51
		0.53	11.84	98.68
80	16	0.72	15.78	98.62
		0.73	16.00	100.05
100	20	0.90	19.73	98.68
		0.92	20.17	100.87
120	24	1.12	24.56	102.34
		1.10	24.12	100.51
140	28	1.31	28.72	102.60
		1.30	28.50	100.23

Tabla 5.1.1.1



Gráfica 5.1.2.1

Resultados obtenidos:

$$m = 1.0193$$

$$r = 0.996$$

$$r^2 = 0.992$$

$$b = -0.199$$

$$C.V. = 1.40 \%$$

Según los datos se observa la relación lineal entre la concentración de tiomersal (cantidad adicionada) y los resultados obtenidos (cantidad recuperada).

El valor del coeficiente de correlación indica el grado de aproximación a la línea recta.

La tendencia a cero del valor de intersección con el origen indica que no existe factor de corrección en este rango de concentración.

El valor de la pendiente indica la sensibilidad del detector a los cambios de concentración del tiomersal.

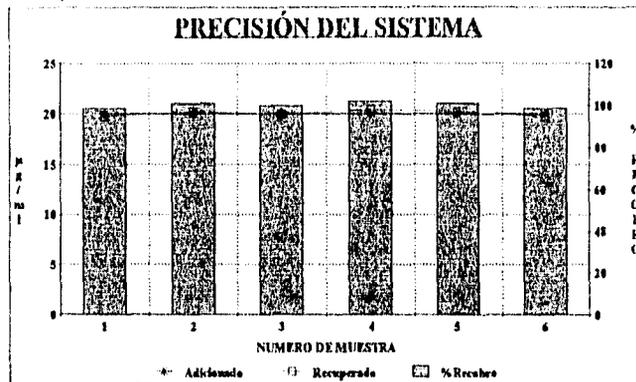
Y el valor del coeficiente de variación obtenido de los porcentajes de recuperación, se encuentra dentro del criterio establecido.

5.2 PRECISIÓN DEL SISTEMA

La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos del análisis de una misma solución estándar de timersal correspondiente al 100 % de la dosis. La prueba se hizo por sextuplicado.

No. Muestra	Respuesta	Cantidad Adicionada $\mu\text{g/ml}$	Cantidad Recuperada $\mu\text{g/ml}$	% de Recobro
1	0.90	20	19.74	98.74
2	0.92	20	20.17	100.81
3	0.91	20	19.95	99.82
4	0.93	20	20.39	101.97
5	0.92	20	20.17	100.81
6	0.90	20	19.74	98.74

Tabla 5.2.1



Gráfica 5.2.1

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

$$X = 100,15$$

$$DE = 1,28$$

$$C.V. = 1,28 \%$$

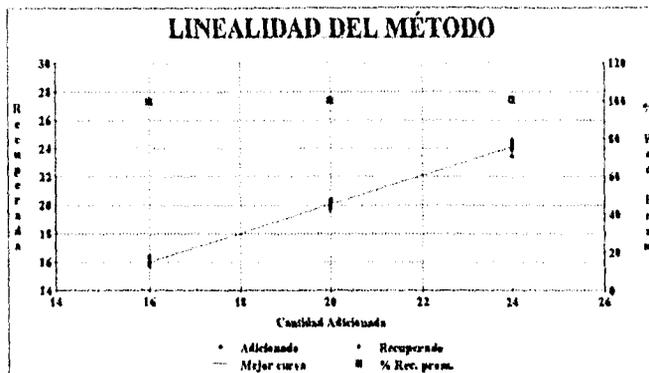
Los valores de coeficiente de variación obtenidos del porcentaje de recuperación muestran que no existe variación significativa en la sensibilidad del sistema para la cuantificación del timersal.

5.3 LINEALIDAD DEL MÉTODO

Los resultados obtenidos de la determinación de tiomersal en soluciones (placebos cargados) a tres concentraciones y por sextuplicado, son los siguientes:

Cantidad Adicionada $\mu\text{g/ml}$	% de Concentración	No. de Muestra	Respuesta	Cantidad Recuperada $\mu\text{g/ml}$	% de Recobro
16	80	1	0.72	15.78	98.83
		2	0.73	16.40	101.82
		3	0.74	16.22	101.25
		4	0.72	15.78	98.62
		5	0.73	16.00	100.40
		6	0.72	15.78	98.68
20	100	1	0.90	19.73	99.93
		2	0.91	19.95	99.75
		3	0.93	20.39	101.53
		4	0.93	20.39	101.95
		5	0.92	20.17	100.87
		6	0.90	19.71	98.68
24	120	1	1.12	24.56	102.33
		2	1.09	23.90	99.58
		3	1.10	24.12	100.50
		4	1.09	23.46	99.55
		5	1.11	24.34	101.42
		6	1.10	24.12	100.51

Tabla 5.3.1



Gráfica 5.3.1

Resultados obtenidos:

$$m = 1.0051$$

$$b = -0.0584$$

$$r = 0.995$$

$$r^2 = 0.990$$

$$C.V. = 1.18 \%$$

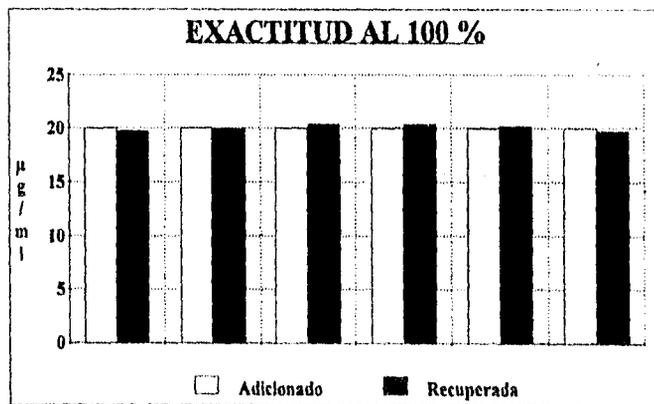
El grado de aproximación del coeficiente de correlación a la unidad, muestra la relación lineal entre la respuesta (cantidad recuperada) y la concentración de tiomersal en la solución (cantidad adicionada).

El valor de la pendiente indica la sensibilidad del método a los cambios de concentración del tiomersal.

La tendencia a cero del valor de la intersección al origen indica que no existe factor de corrección en este rango de concentraciones (60 al 140 % de la dosis).

5.4 EXACTITUD AL 100 %

Se determinó por medio de seis soluciones de tiomersal correspondiente al 100 % de la dosis, con el mismo analista y las mismas condiciones de operación. Los resultados se muestran en la tabla 5.3.1



Gráfica 5.4.1

ESTÁ VENTA EN
SALUD DE LA

Resultados obtenidos

media = 100.45 %

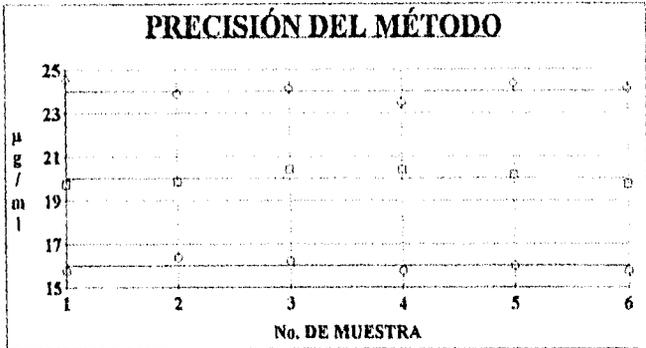
DE = 1.22

C.V. = 1.22 %

En base a los resultados del coeficiente de variación obtenido del porcentaje de recuperación se demuestra que el método es exacto en el rango de concentraciones probadas.

5.5 PRECISIÓN DEL MÉTODO

Se determinó por medio de placebos cargados a tres concentraciones correspondientes al 80, 100 y 120 % de la dosis. Se aplicó el método con el mismo equipo y analista. Se determinó por sextuplicado el porcentaje de recobro. Los resultados se muestran en la tabla 5.3.1



Gráfica 5.5.1

Resultados obtenidos al 80, 100 y 120 % de la dosis:

80 %	100 %	120 %
X = 99.93	X = 100.45	X = 100.64
DE = 1.4	DE = 1.22	DE = 1.07
C.V. = 1.4 %	C.V. = 1.22 %	C.V. = 1.07 %
I.C. = X ± 1.4	I.C. = X ± 1.28	I.C. = X ± 1.13

Según los resultados de recuperación a las diferentes concentraciones se observa mayor precisión del método en la concentración del 120 % de la dosis y menor precisión al 80 % de la dosis. Puede deberse en parte a la sensibilidad del equipo.

Sin embargo en los tres casos el coeficiente de variación está dentro del criterio establecido.

El intervalo de confianza del 95 % para la media con $n-1$ grados de libertad y una probabilidad acumulada de 0.975, incluye el cien por ciento por lo que la exactitud del método cumple con el criterio establecido.

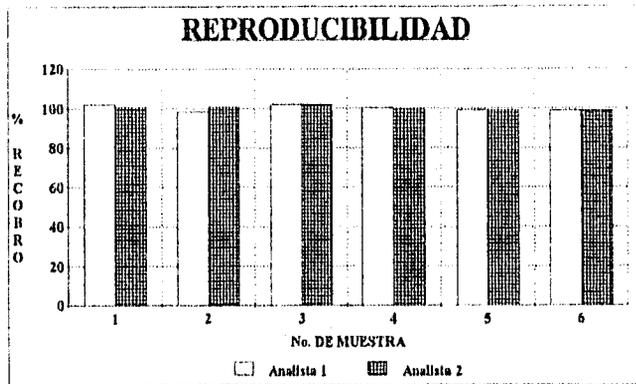
El intervalo de confianza del 95 % para la media expresa el rango de recuperación en que caerán el 95 % de los resultados de la cuantificación cuando el tiomersal se encuentre al 100 % de la dosis (40 $\mu\text{g/ml}$).

5.6 REPRODUCIBILIDAD

En la tabla 5.6.1 se enlistan los resultados obtenidos al aplicar el método a seis muestras de la formulación del producto oftálmico (al 100 % de la dosis). Este análisis se realizó por dos analistas, en días diferentes y con el mismo equipo.

Cantidad Adicionada $\mu\text{g/ml}$	No. Muestra	% de Recobro	
		Analista 1	Analista 2
20	1	101.95	100.72
	2	98.47	100.83
	3	101.95	101.95
	4	100.14	99.74
	5	99.23	98.97
	6	98.75	98.65

Tabla 5.6.1



Gráfica 5.6.1

Resultados obtenidos por los analistas:

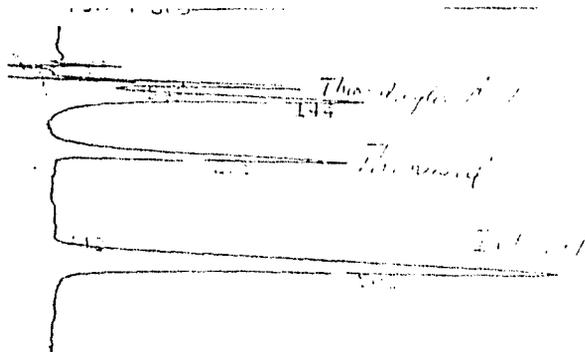
Analista 1	Analista 2
Media = 100.08	Media = 100.14
DE = 1.5	DE = 1.25
C.V. = 1.5 %	C.V. = 1.2 %
*I.C. = 100.08 ± 1.6	*I.C. = 100.14 ± 1.31

* $t_{0.975} = 2.5706$ para n-1 grados de libertad

Como se puede observar el analista 2 obtuvo un coeficiente de variación menor que el analista 1, sin embargo ambos obtienen un coeficiente de variación que cae dentro del criterio.

5.7 ESPECIFICIDAD

Para probar la especificidad del método analítico, se sometieron muestras del producto conteniendo timersal al procedimiento mencionado en el capítulo 4.0, las cuales mostraron el siguiente perfil cromatográfico:

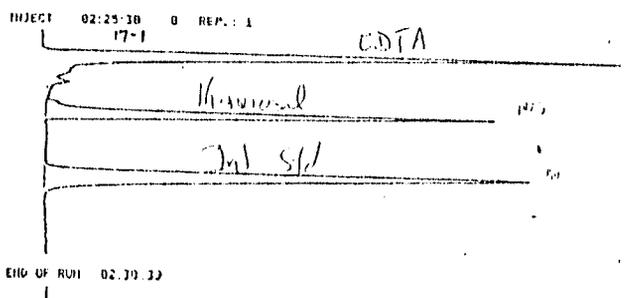


Gráfica 5.7.1

Ácido tiosalisílico	Tr = 1.44 min.
Tlomersal	Tr = 2.75 min.
Est. interno	Tr = 5.02 min.

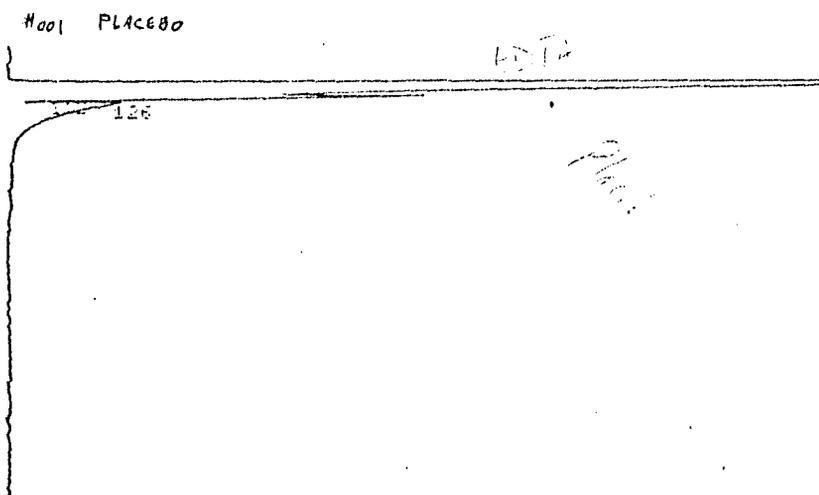
Como se puede observar en el cromatograma, el producto de degradación del tliomersal, ácido tiosalisílico, no interfiere en la cuantificación del tliomersal.

En los siguientes cromatogramas se muestra la resolución de los picos que se obtiene al inyectar las soluciones estándar de tioimersal preparadas para la validación del método analítico:



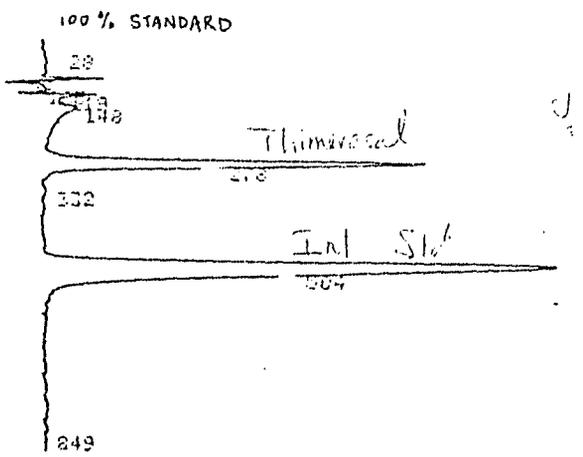
Gráfica 5.7.2

El siguiente cromatograma se obtiene al inyectar una solución placebo de EDTA. Su tiempo de retención aproximado es de 1.30 min. por lo que no interfiere con la determinación del timersal:



Gráfica 5.7.3

Este cromatograma se obtiene como respuesta al inyectar una solución estándar de tioimersal al 100 % de la dosis:



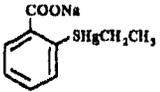
Gráfica 5.7.4

En la siguiente tabla se muestran los resultados globales obtenidos de la validación:

DETERMINACION	CRITERIO	RESULTADOS
Linealidad del Sistema	$r \geq 0.99$	0.996
	$m = 1$	1.0193
	$b = 0$	-0.199
	$r^2 \geq 0.98$	0.992
	C.V. ≤ 1.5	1.4 %
Precisión del Sistema	C.V. ≤ 1.5 %	1.28 %
Linealidad del Método	$r \geq 0.99$	0.995
	$m = 1$	1.0051
	$b = 0$	-0.05849
	$r^2 \geq 0.98$	0.990
	C.V. ≤ 2 %	1.18 %
Precisión del Método	C.V. ≤ 2 %	1.4, 1.22, 1.07 %
Exactitud del Método	Prom. recobro 98-102 %	98.65-101.95
	C.V. ≤ 2 %	1.22 %
Reproducibilidad	C.V. ≤ 2 %	1.5, 1.2 %
Especificidad	Dar respuesta específica	Da respuesta específica

Tabla 5.7.1

**C
O
N
C
L
U
S
I
O
N
E
S**



6.0 CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos, al aplicar el método, ya modificado para la determinación de tiomersal en oftálmicos, se puede concluir lo siguiente:

Sobre el sistema:

1) Es lineal, en el rango de concentraciones probada.

En la gráfica 5.1.1.1, se puede observar la relación lineal de la respuesta del detector a medida que aumenta la concentración de tiomersal.

La cercanía a la unidad del resultado de coeficiente de correlación ($r = 0.996$) indica el grado de aproximación a una línea recta.

Los valores obtenidos tanto de intercepto ($b = -0.199$) y de pendiente ($m = 1.0193$) están dentro del criterio establecido por las normas oficiales.

Los porcentajes de recobro obtenidos, con un coeficiente de variación de 1.4 %, demuestran que el sistema es lineal.

2) Es preciso, para la determinación de timersal en oftálmicos.

Se observa en la tabla 5.2.1 los resultados obtenidos de coeficiente de variación (C.V.= 1.28 %), calculado a partir de la cuantificación de 6 estándares, con una concentración cercana al 100 % de la dosis. Con lo que se demuestra que el sistema cumple con el criterio establecido.

Sobre el método:

3) Es lineal, en el rango de concentraciones probadas.

Se demostró en base a los resultados obtenidos (tabla 5.3.1), que tanto el coeficiente de correlación ($r = 0.995$), como la pendiente ($m = 1.0051$) y el valor de intercepto ($b = -0.0584$) cumplen con el criterio oficial.

Los porcentajes obtenidos de la recuperación, muestran un coeficiente de variación de 1.18 %, que demuestra la linealidad del método.

4) Es preciso y exacto, en el rango de concentraciones probadas.

Para las pruebas de precisión y exactitud, los resultados obtenidos de porcentaje de recobro, muestran un coeficiente de variación de 1.23 y 1.22 % respectivamente, así como un intervalo de confianza para la media con una probabilidad acumulada de 0.975 que incluye el 100 % (I.C._{0.975} para la media = 99.17-101.73), por lo que ambas determinaciones cumplen con el criterio oficial.

5) Es reproducible.

Según los resultados obtenidos del análisis de estándares cargados de tiomersal, al aplicar el método por dos analistas en días diferentes (tabla 5.6.1), se obtiene, a partir del porcentaje de recobro, los coeficientes de variación (C.V. = 1.5 % y 1.2 %), con lo que se demuestra que el método es reproducible.

6) Es específico.

Ya que la respuesta obtenida para la cuantificación del tiomersal, no es afectada por la presencia de otros activos de la formulación o de productos de degradación.

7) Se comprobó la hipótesis planteada de que el método desarrollado en la casa matriz de los laboratorios Syntex, una vez adaptado y validado, satisficaría las necesidades requeridas para aplicar el método en los laboratorios Syntex, México.

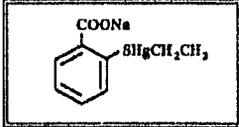
Las modificaciones principales fueron:

Condiciones	Casa matriz	Syntex México
Conc. fase móvil	12%	15 %
Estándar interno	Antipirina	Ac. 6-metoxi-2-naftilacético.
Velocidad de flujo	1.5 ml/min	2 ml/min
Presión	1800 psi	1800 psi
Temperatura	Ambiente	Ambiente
Velocidad de carta	0.5 cm/min	0.5 cm/min
Atenuación	10 mv	10 mv
U.V. Longitud de onda	254 nm	254 nm
Volumen de inyección	10 µl	10 µl
Columna	µBondapack C ₁₈	µBondapack C ₁₈

Por lo anterior se concluye que el método, ya adaptado, puede utilizarse como base para estudios posteriores, tanto como

método de control para el tiomersal en oftálmicos, como para estudios de estabilidad.

**B
I
B
L
I
O
G
R
A
F
Í
A**



7.0 BIBLIOGRAFÍA

1) **USP XXII, NE XVII; USA; Ed. United States Pharmacopeia Convention; 1990.**

2) **THE INDEX MERCK; USA, Ed. MERCK & Co; 1976.**

3) **MARTINDALE THE EXTRA PHARMACOPEIA; 29va. edición, England; Ed. The pharmaceutical press; 1989.**

4) **Genaro Alfonso R; REMINGTON FARMACIA; 17 edición; Argentina; ed. Médica Panamericana; 1987.**

5) Manuel Litter; **COMPENDIO DE FARMACOLOGÍA**; 2da. Edición; Editorial "EL ATENEO"; Buenos Aires, Argentina. 1977.

6) Louis S. Goodman and Alfred Gilman; **THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS**; fifth edition; Macmillan Publishing Co., Inc. New York, U.S.A.; 1975.

7) John E. Hoover; **REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES** 14th. ED., Mack Publishing Co., Easton Pennsylvania, 1975.

8) Howard C. Ansel; **INTRODUCTION TO PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS**; Lea & Febiger; Philadelphia, U.S.A. 1969.

9) Leon Lachman; Herbert A. Lieberman; Joseph L. Kanig; **THE THEORY AND PRACTICE OF INDUSTRIAL PHARMACY**, 2ND. Ed., Lea & Febiger; Philadelphia, U.S.A. 1976.

10) Tesis profesional, UAG; Verónica H. Uribe Z.
**VALIDACION DEL METODO ANALITICO PARA LA
DETERMINACION DE PROTEINAS DE ALTO PESO
MOLECULAR CONTAMINANTES DE INSULINA
INYECTABLE.**

11) R.W. Yost; L.S. Ettre y R.D. Conlon;
**INTRODUCCION A LA CROMATOGRAFIA LIQUIDA
PRACTICA;** The Perkin Elmer, Corp. Chromatography
Division; Norwalk, U.S.A. 1981.

12) L.R. Snyder & J.J. Kirkland; **INTRODUCTION
TO MODERN LIQUID CHROMATOGRAPHY;** 2nd.
Edition; John Wiley & Sons. Inc., Tarrytown, New York,
U.S.A. 1979.

13) J.N. Done, J.H. Knox & J.Lohcag; **APPLICATION
OF HIGH SPEED LIQUID CHROMATOGRAPHY;** A
Wiley Interscience Publication; Great Britain; 1974.

14) Garcia de la Mariana A, Castillo Benito del;
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA

RESOLUCIÓN; 1ra. Edición; México; Ed. Limusa, S.A. de C.V.; 1988.

15) Helman J.; **FARMACOTECNIA TEORICA Y PRACTICA**; 2da Edición; Volumen 6; Editorial Continental, S.A.; 1989.

16) **CONTROL ESTADISTICO DE LA CALIDAD**; 4ta. edición; Ed. Asociación Mexicana de estadística y control de calidad; México.

17) Meyer Paul L.; **PROBABILIDAD Y APLICACIONES ESTADISTICAS**; 2da. edición; Ed. Fondo Educativo Interamericano, s.a., México, 1987.

18) Wayne W. Daniel; **BIOESTADISTICA**; Editorial Limusa; México., 1977.