Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

DETERMINACION DE TIMEROSAL POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA EN UNA SOLUCION HIGIENICA PARA LENTES DE CONTACTO

T E S I S

Que para obtener el título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a :

José Diego Alberto Santiago

México, D. F.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

1990

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 está 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.

CONTENIDO

PAG.

CAPITULO

I. INTRODUCCION..... 1

II. GENERALIDADES..... 4
II.1. Concepto de antiséptico y desinfectante.. 4
II.2. Monografía del timerosal..... 6
A. Mecanismo de acción..... 8
B. Vías de degradación..... 9
C. Toxicidad..... 11
D. Métodos analíticos de cuantificación. 11
E. Usos..... 12
II.3. Cromatografía..... 13
A. Concepto..... 13
B. El proceso cromatográfico..... 13
C. Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAR) y sus diferentes técnicas de aplicación..... 20
D. Partes esenciales de un Cromatógrafo de Líquidos..... 28
II.4. Validación de métodos analíticos..... 33

III. PARTE EXPERIMENTAL..... 38
III.1 Adaptación del método analítico al producto..... 38

III.2 Descripción del método analítico 41

CAPITULO PAG.

III.3 Validación del método analítico 44

IV. RESULTADOS EXPERIMENTALES..... 48

V. CONCLUSIONES..... 57

VI. BIBLIOGRAFIA..... 58

CAPITULO I
INTRODUCCION

I. INTRODUCCION

Gracias a su amplio poder bacteriostático y fungistático el timerosal es ampliamente usado en preparaciones farmaceúticas tales como soluciones oftalmicas y soluciones higiénicas para lentes de contacto. Su compatibilidad química y baja toxicidad lo hacen ser el preservativo de elección de soluciones higiénicas para lentes de contacto.

Los procedimientos de cuantificación química previamente reportados al método presentado en este trabajo han incluído espectrofotometría UV (23), polarografía (14,24), colorimetría (25,27) y espectroscopía de absorción atómica (8), sin embargo ninguno es específico para determinar timerosal en presencia de sus productos de degradación, particularmente el método colorimétrico, el cual es sensible a todas las especies que contienen mercurio en su molécula presentes en la solución de prueba.

Se ha determinado que el timerosal en soluciones acuosas fuertemente iónicas se degrada en tres productos (Acido tiosalicílico, Cloruro etil mercúrico y Acido 2,2 ditiosalicílico) (30) de los cuales el Cloruro etil mercúrico es altamente tóxico para el ser humano al ser absorbido a través de la cornea del ojo, esto puede ocurrir al entrar en contacto frecuente con el ojo, una lente que está siendo enjuagado con

una solución a base de timerosal conteniendo productos de degradación de éste.

El 90% de las soluciones para enjuagar lentes de contacto son formuladas a base de timerosal en cantidades muy pequeñas que por métodos comunes de baja sensibilidad es difícil determinar con precisión y exactitud.

Un procedimiento altamente sensible aplicado por algunos laboratorios en el ensayo de timerosal de sus soluciones higiénicas para lentes de contacto, es por espectroscopía de absorción atómica el cual ya se mencionó es un método analítico inespecífico para la mólecula intacta del timerosal.

He aquí la importancia del desarrollo de un método analítico específico para la mólecula intacta del timerosal.

Entre los métodos por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAR) reportados para el análisis de timerosal se encuentra el de intercambio iónico que según fuentes bibliográficas no es aplicable debido a la forma pobre del pico correspondiente a la molécula de timerosal. (28)

Un método más reciente de CLAR por compresión radial de ensayos imprecisos y resolución no satisfactoria del timerosal y sus productos de degradación (29).

El presente trabajo es el desarrollo de un método específico para determinar timerosal en presencia de sus productos de degradación el cual da muy buena forma y resolución de los picos o cromatogramas correspondientes a timerosal y sus productos de degradación.

Para probar la efectividad del método, éste fue validado de acuerdo a los requerimientos para su aplicación en control y aseguramiento de la calidad.

CAPITULO II

GENERALIDADES

II. GENERALIDADES

II.1 Concepto de antiséptico y desinfectante

El timerosal es un agente químico al que se le ha dado diferentes aplicaciones, entre ellas como antiséptico, es decir, para impedir el desarrollo o matar a los microorganismos en un tejido vivo o como desinfectante, es decir, con la misma acción del antiséptico sólo que aplicado a objetos inanimados y como conservador o preservativo de productos biológicos y farmacéuticos.

En este caso particular del producto sobre el cual se trabajó se utiliza con dos finalidades a saber como desinfectante y conservador.

Para que una sustancia pueda ser aplicada como desinfectante debe reunir ciertas propiedades deseables como son (22):

- Poseer un amplio espectro antimicrobiano

- Tener marcada estabilidad física y química

- Poseer acción letal en presencia de líquidos orgánicos (sangre, esputo y heces)

- Ser compatible con otros componentes de la formulación

- No ser corrosivo ni destructivo para los materiales

- Ser costeable

Un conservador debe reunir las mismas propiedades ya mencionadas sólo que en productos biológios debe ser no tóxico a las dosis usuales.

El timerosal está clasificado dentro de los antisépticos mercuriales orgánicos en una de las clasificaciones (22) de antisépticos más usadas, ésta clasificación se presenta a continuación, en ella podemos ver la variedad de desinfectantes que existen.

I. ACIDICOS	CONCENTRACION USUAL (%)
Fenol	0.2 - 0.5
Clorocresol	0.05 - 0.1
O-fenilfenol	0.005- 0.01
Alquilésteres del acido p-hidroxibenzonico	0.001- 0.2
Acido benzonico y sus sales	0.1 - 0.3

Acido sórbico y sus sales	0.05	-	0.2
Acido bórico y sus sales	0.5	-	1.0

2. NEUTROS			
Clorobutanol	0.5		
Alcohol benzílico	1.0		
B-feniletilalcohol	0.2	-	1.0

3. MERCURIALES ORGANICOS	CONCENTRACION USUAL (%)		
Timerosal	0.001	-	0.1
Acetato, nitrato fenil mercúrico	0.002	-	0.005
Nitromersol	0.001	-	0.1

4. COMPUESTOS CUATERNARIOS DE AMONIO			
Cloruro de benzalconio	0.004	-	0.02
Cloruro de etilpiridinio	0.01	-	0.02

II.2 Monografía del timerosal

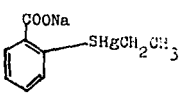
Sinónimos: Timerosal, tiomersalato, merthiolate, tiomersal.

Nombres químicos:

Mercurietil (2 - mercaptobenzoato-s-) de sodio

Etil (sodio -o mercaptobenzoato) mercúrico

Etil mercuritiosalicilato de sodio

Fórmula desarrollada: 

Fórmula condensada: $C_9 H_9 Hg Na O_2 S$

Peso molecular: 404.81

Descripción: Polvo cristalino de color crema claro y olor característico estable en el aire pero no a la luz del sol.

Solubilidad: 1 gramo es soluble en 1 ml. de agua, 8 ml. de alcohol y prácticamente insoluble en éter y benceno.

Espectro absorción infrarrojo:

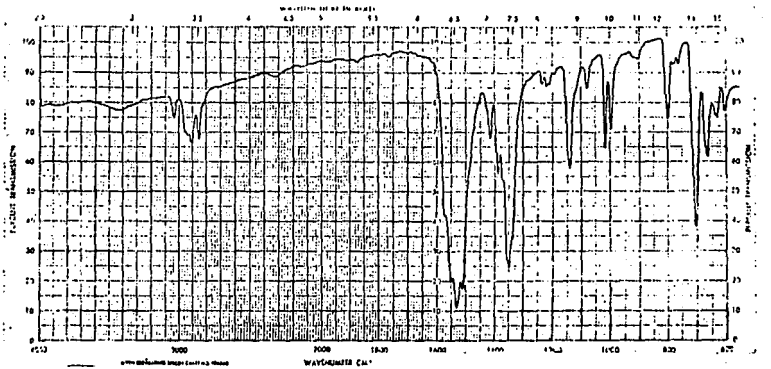


Fig. 1 Espectro de absorción infrarrojo del timerosal

II.2.A Mecanismo de Acción.

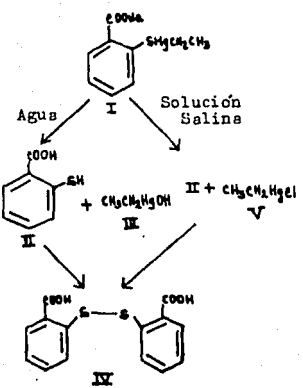
Se han propuesto varias teorías para explicar el mecanismo del efecto antibacteriano de los mercuriales. La explicación más verosímil en la actualidad es que el ión mercúrico inhibe enzimas sulfidrílicas, sin embargo el ión mercúrico también se combina con grupos químicos aminos y otros biológicamente importantes, así también es un precipitante de proteínas y la acción antibacterial de los compuestos de mercurio fué primero atribuída a esta propiedad. La acción inhibidora

de enzimas sulfidrilicas es reversible, es decir si el metal es removido de la enzima la actividad es restaurada.

Los antisépticos mercuriales inhiben las enzimas sulfidrílicas de los tejidos de la misma manera que las bacterianas.

II.2.B Vías de degradación

El timerosal a una concentración de 0.5% en agua o 0.8% en solución salina sometido a un proceso de degradación acelerada mediante reflujo durante varios días (16 horas) se degrada a ácido tiosalicílico y éste posteriormente a ácido 2,2 ditiosalicílico. El esquema de la reacción de degradación se muestra en la figura siguiente (Fig. 2).



(I) Timerosal

(II) Acido tiosalicílico

(III) Hidroxido etil mercúrico

(IV) Acido 2,2 ditiosalicílico

(V) Cloruro etil mercúrico

Fig. 2 Esquema de reacción de degradación del timerosal en solución acuosa.

con una lámpara de cátodo hueco de mercurio y una flama de aire-acetileno. Iones metalicos pueden causar interferencia.

Método por CLAR (1): La muestra del producto no sufre ningun cambio antes de ser analizada, se introduce directamente a la columna la cual separa el timerosal de los demás componentes de la muestra y es cuantificado mediante un detector UV utilizando una curva estandar de referencia de dos puntos.

II.2.E Usos

Tintura al 0.1% para desinfección preoperativa de la piel, solución acuosa al 0.1% para curar heridas y llagas de la piel, crema o tintura al 0.1% para tratar infecciones micóticas de la piel, soluciones al 0.02% para soluciones oftálmicas y para irrigación uretral, soluciones de 0.01 a 0.02% como preservativas o conservadoras de productos biológicos, soluciones acuosas de 0.001 a 0.0015% para la higiene y conservación de lentes de contacto.

II.3 CROMATOGRAFIA

II.3.A Concepto

La cromatografía es una técnica desarrollada a principios del siglo XX que permite la separación de sustancias que se encuentran en una mezcla por un proceso de migración diferencial en el cual los componentes de la mezcla son transportados por una fase móvil (gas o líquido) al mismo tiempo que son retenidos selectivamente por una fase estacionaria que puede ser un líqido o un sólido.

II.3.B El proceso cromatográfico

Cuando una mezcla de sustancias se introduce en el sistema se establece un balance entre las fuerzas intermoleculares de la muestra, la fase móvil (eluyente) y la fase estacionaria. Estas fuerzas intermoleculares pueden ser medidas en términos de la polaridad, generalmente de magnitud diferente para cada componente de la mezcla por lo que cada uno de ellos se desplazará con velocidad diferente a lo largo del sistema. Las sustancias deben ser solubles en la fase móvil (13,16,17).

Existen tres formas de desarrollar el proceso:

a) Elución
b) Análisis frontal
c) Desplazamiento

El método que se usa con mayor frecuencia en cromatografía es el de elución.

En este caso se introduce una porción pequeña de la muestra a la fase móvil o estacionaria dependiendo del tipo de cromatografía de que se trate (placa o en columna). Los componentes empiezan a separarse uno de otro en bandas diferentes en el caso de cromatografía en columna, las bandas eluyen al final de la columna y son medidas por un detector.

En la figura siguiente se muestra un cromatograma típico de elución.

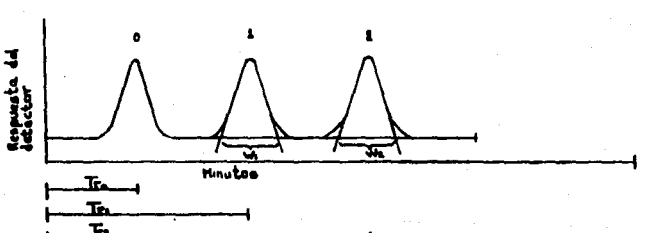


Fig. 3 Cromatograma típico de elución

H: Altura del cromatograma (Pico)

Es la distancia que existe entre la línea base al punto más alto del pico.

Tr: Tiempo de retención de un componente.

Se define por el tiempo transcurrido desde el momento de inyección de la muestra hasta la aparición de la máxima altura del cromatograma correspondiente.

Tr_o:

Es el tiempo de retención de un componente inerte , aire o algún disolvente que no es retenido por la columna.

Vr: Es el volúmen de retención.

Se define como el volúmen de disolvente (fase móvil) que pasa a través de la columna desde el momento de inyección de la muestra hasta el momento en que aparece la máxima altura del cromatograma.

V_o:

Volúmen de retención de un componente inerte que

no es retenido por la columna.

W: Amplitud del cromatograma

Se determina por la distancia que existe entre los dos puntos de inflexión del pico, localizados en las intersecciones de las pendientes del mismo con la línea base.

Eficiencia de la columna o número de platos teóricos(N).

Nos indica la capacidad de la columna para proporcionar picos estrechos y bien separados, mientras mayor sea N mayor número de platos teóricos tendrá la columna y por consiguiente será de mayor eficiencia o capacidad para la separación de los componentes, la ecuación que la define matemáticamente es la siguiente:

$$N = 16\left(\frac{Tr}{W}\right)^2$$

Donde:

Tr = Tiempo de retención

W = Amplitud del pico

Selectividad (α).

Describe la retención relativa de los componentes

por la fase estacionaria, es decir, que tanto se han separado-los picos entre sí, sin tomar en cuenta la amplitud de los mismos.

Se define mediante la ecuación siguiente:

$$\alpha = \frac{K_2}{K_1} = \frac{V_2 - V_0}{V_1 - V_0}$$

Donde:

K = Factor de retención

V = Volúmen de retención

Factor respuesta o de capacidad (K'r).

Es una medida de la retención de un componente por la fase estacionaria y es característico para una columna dada.

Se define por la siguiente expresión:

$$K'r = \frac{Tr - Tr_o}{Tr_o} = \frac{Vr - V_o}{V_o}$$

Donde:

Tr = Tiempo de retención

V = Volúmen de retención

Resolución (R).

El objetivo de todas las separaciones es la resolución de los picos, la resolución indica la separación entre dos picos adyacentes en un cromatograma y se puede representar de la siguiente manera.

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

Donde:

V = Volúmen o tiempo de retención

W = Amplitud del pico

Existe una relación más completa incluyendo los tres parámetros mencionados.

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

Si $\alpha = 1$ Todo se hace cero, entonces quiere decir que no se ha hecho una adecuada selección de la columna o

del sistema en general

Esta relación es de tipo general y vale para cualquier técnica cromatográfica y sirve como base para la elección de los sistemas de separación (25).

Para tener una buena resolución es necesario controlar los tres parámetros: N, α y K'r.

MANERAS DE MEJORAR CADA PARAMETRO

La eficiencia de la columna se puede incrementar si:

* Se aumenta la longitud de la columna

* Se disminuye la velocidad de flujo de la fase móvil

* Se aumenta la temperatura de la columna en el caso de la cromatografía de gases

* Se disminuye el tamaño de partícula de la columna.

La selectividad o factor de separación se puede mejorar por:

* Cambios en la composición química de la fase móvil.

* Cambio del PH de la fase móvil

* Cambios en la composición química de la fase estacionaria

* Recurrir a algun cambio o efecto químico especial (enlazar químicamente la fase estacionaria).

Los valores de K'r son cotrolados por cambios en la fuerza del disolvente.

II.3.C Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAR) y sus diferentes técnicas de aplicación.

La cromatografía de líquidos de Alta eficiencia es de especial importancia entre los métodos de análisis modernos ya que la correcta combinación de las condiciones de operación y la calidad de los materiales de relleno de las columnas empleadas hacen posible las siguientes ventajas entre otras técnicas analíticas comunes:

* Selectividad óptima
* Gran sensibilidad
* Tiempo de análisis corto

* Alta precisión
* Mayor exactitud
* Detección continua cuantitativa

II.3.C.1 Técnicas de clar

Los mecanismos o procesos de separación que dan como resultado la retención de las moléculas de una muestra por parte de la fase estacionaria dan lugar a las diferentes formas de CLAR, las que se describen a continuación:

CROMATOGRAFIA EN FASE NORMAL

En esta variante de CLAR la fase estacionaria es más polar que la fase móvil. El mecanismo de retención sobre sílica involucra interacciones de la muestra con los grupos polares hidroxilos (Si-OH), ver figura 4.

La cromatografía en fase normal utiliza también empaques de sílica de fase enlazada en la cual varios grupos funcionales son fijados o enlazados a un substrato de sílica, ocacionando que el empaque sea más polar que la fase móvil.

Fases polares enlazadas tales como ciano-propil y aminopropil son comunes para este caso.

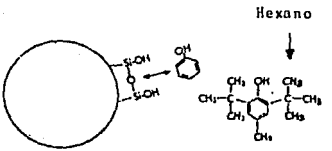


Fig. 4 Partícula de sílica de un empaque de fase normal.

Fase Normal (adsorción)

Materiales de empaque polares, tal como sílica, son usadas con solventes no polares tales como hidrocarburos. Este es el modo preparativo más usado.

CROMATOGRAFIA EN FASE INVERSA

Enlazando la sílica con un grupo funcional "no polar" se altera la superficie química de la sílica a una "no polar" en este caso la fase móvil será mas polar que la fase estacionaria y el proceso recibe el nombre de cromatografía en fase inversa. Los grupos funcionales más ampliamente enlazados a sílica son el C_{18} y C_8 alquilfenilaromático y grupos ciano. Los componentes menos polares de la muestra interactúan más con la fase estacionaria relativamente no polar.

El proceso se ilustra en la figura 5.

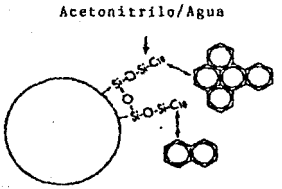


Fig. 5 Partícula de sílica de un empaque de fase inversa

Fase Inversa (Partición)

Empaques no polares son producidos por hidrocarburos químicamente enlazados (ejemplo: C_{18} o Fenil) a soporte de sílica, solventes polares son usados como metanol acuoso o soluciones amortiguadoras.

CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO

Está técnica emplea empaques (fase estacionaria) que contienen grupos iónicos fijos, sobre los cuales se hace pasar una fase móvil constituida por iones de carga opuesta.

El mecanismo de retención más común es el intercambio

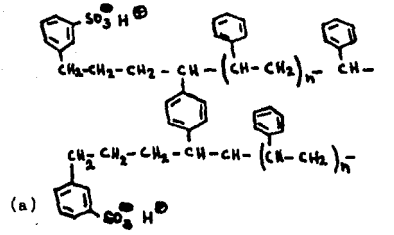
simple de iones X de la muestra e iones Y de la fase móvil con los grupos cargados R de la fase estacionaria como se ilustra en seguida.

$$X^- + RY \rightleftharpoons Y + R\,X \quad \text{(intercambio de anión)} \quad (1)$$
$$X^+ + RY \rightleftharpoons Y + R\,X \quad \text{(intercambio de catión)} \quad (2)$$

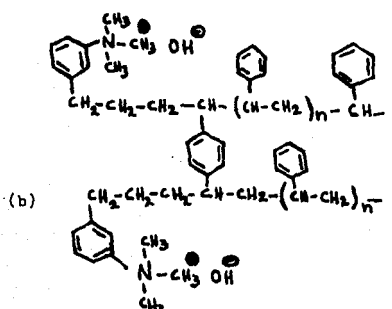
En el intercambio de anión (1) el ión X^- de la muestra están en competencia con el ión Y de la fase móvil por el sitio iónico R^+ de la fase estacionaria, similarmente ocurre en el intercambio de catión (2) con el ión X^+.

La mayoría de las fases estacionarias intercambiadoras de iones consisten de un empaque polimérico con grupos funcionales iónicos como SO^-_3 para intercambiadores de catión fuerte y $N(CH_3)^+_3$ para intercambiadores de anión fuerte.

Ejemplos de estos empaques se muestran a continuación, ver fig. 6 (a) y (b).



(a) Intercambiador de catión fuerte.



(b) Intercambiador de anión fuerte.

Fig. 6 Intercambiadores iónicos fuertes en cromatografía de líquidos.

Los intercambiadores de catión y anión débiles se basan en los grupos carboxilato (COO^-) o amino (NH^+_3) respectivamente y comparados con los intercambiadores fuertes han sido usados ocasionalmente.

La capacidad de intercambio de iones depende del

tamaño de partícula utilizado y del pH de trabajo. Así se obtiene que a pH bajo un intercambiador de catión es neutralizado por adición de protón:

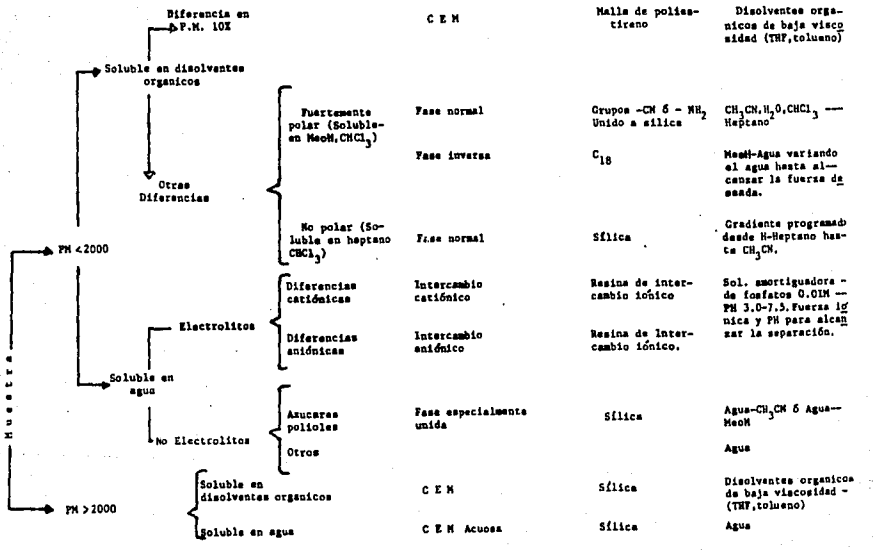
$$R^+ \quad + \quad \bar{O}H \rightleftharpoons R^+ \quad \bar{O}H$$

CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION MOLECULAR

En la cromatografía de exlusión molecular (CEM) el empaque es un material poroso que puede ser de malla de poliestireno o de sílica donde el tamaño del poro está bien definido. De manera las moléculas que son demasiado grandes para el poro no se retienen y salen rápidamente de la columna, mientras que las pequeñas penetran en los poros prolongando así su tiempo de elución.

Se recomienda como auxiliar en la elección de un buen sistema de separación el siguiente esquema: Tabla No. 1.

Tabla No. 1


PROPIEDADES DE LA MUESTRA
TIPO DE CROMATOGRAFIA
EMPAQUE
FASE MOVIL
Muestra
Diferencia en P.M. 10%
C E M
Malla de poliestireno
Disolventes organicos de baja viscosidad (THF,tolueno)
Soluble en disolventes organicos
Otras Diferencias
Fuertemente polar (Soluble en MeOH,$CHCl_3$)
Fase normal
Grupos -CN δ - NH_2 Unido a silica
CH_3CN,H_2O,$CHCl_3$ — Heptano
Fase inversa
C_{18}
MeoH-Agua variando el agua hasta alcanzar la fuerza deseada.
No polar (Soluble en heptano $CHCl_3$)
Fase normal
Silica
Gradiente programado desde H-Heptano hasta CH_3CN.
PM < 2000
Electrolitos
Diferencias catiónicas
Intercambio catiónico
Resina de intercambio iónico
Sol. amortiguadora - de fosfatos 0.01M — PH 3.0-7.5. Fuerza iónica y PH para alcanzar la separación.
Diferencias aniónicas
Intercambio aniónico
Resina de Intercambio iónico.
Soluble en agua
No Electrolitos
Azucares polioles
Fase especialmente unida
Silica
Agua-CH_3CN δ Agua—MeOH
Otros
Agua
PM > 2000
Soluble en disolventes organicos
C E M
Silica
Disolventes organicos de baja viscosidad - (THF,tolueno)
Soluble en agua
C E M Acuosa
Silica
Agua

II.3.D Partes esenciales de un cromatógrafo de líquidos

Un cromatógrafo de líquidos consta esencialmente de las siguientes partes:

* Depósito de la fase móvil
* Sistema de bombeo
* Sistema de inyección de la muestra
* Columna
* Detector
* Registrador y procesador de datos

Y la secuencia que presentan es la siguiente:

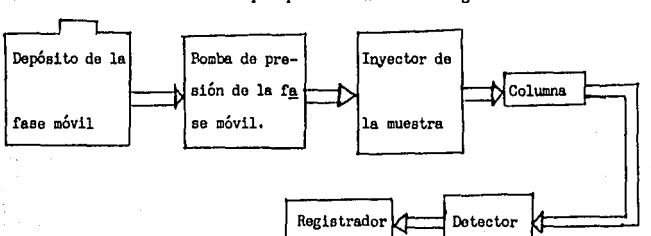


Fig. 7 Partes esenciales de un cromatógrafo de líquidos.

Sistema de bombeo

Tiene por objeto impulsar la fase móvil a través de la columna, manteniendo una velocidad de flujo constante y reproducible. Por lo que una bomba debe cumplir con ciertas especificaciones de funcionamiento, entre las más importantes se encuentran:

* Reproducibilidad
* Presición y
* Exactitud

Existen dos tipos de bombas, que son:

- Bombas de flujo constante y
- Bombas de presión constante.

Las bombas de flujo constante como su nombre lo indica, mantienen una velocidad de flujo constante, dentro de estas se encuentran las bombas reciprocantes que funcionan a base de pistones que impulsan el solvente y las bombas de desplazamiento positivo que funcionan mediante el embolo que empuja al solvente hacia el inyector o mediante la amplificación de la presión del solvente mediante un sistema hidraúlico.

Las bombas de presión constante emplean la presión de un gas inerte para impulsar el solvente. Este tipo de bomba se usa para sistemas isocráticos, es decir, que requieren de mantener constante la proporción de los solventes en la fase móvil.

Columna

Se considera a la columna como la parte fundamental de la cromatografía, ya que es en ésta donde se lleva a cabo la separación. La selección del material de empaque y las dimensiones de una columna dependerán básicamente del tipo de separación que se desee hacer.

Los requerimientos para los materiales de empaque de las columnas empleadas en CLAR incluyen:

* Grandes superficies de contacto

* Una capa fina de absorbente distribuída uniformemente

* Superficies con estructuras abiertas que sean de fácil acceso a la fase móvil.

* Estabilidad estructural

* Dificultad para ser comprimidas por presiones altas

Existen básicamente tres tipos de materiales de empaque:

a) Gel de sílice

b) Gel de sílice modificada químicamente en la superficie con grupos orgánicos diferentes y por lo tanto con comportamiento de selectividad específica.

c) Alúmina

Las partículas del material de empaque pueden ser irregulares, esféricas totalmente porosas o superficialmente porosas.

El tamaño de partícula varía de 5 a 15 micras de acuerdo al tipo de empaque de que se trate y repercute directamente en el area de contacto.

En la tabla 2 se muestran algunos rellenos de columnas y sus aplicaciones más habituales.

Tab. 2 RELLENOS DE COLUMNAS Y SUS APLICACIONES

TIPO		FASE ESTACIONARIA		FUNCIONALIZACION	FASES MOVILES	APLICACIONES
ADSORCION		Gel de sílice		$-\overset{OH}{\underset{|}{Si}}-O-\overset{OH}{\underset{|}{Si}}-$	Hexano, Cloroformo — Isopropanol	Esteres, porfirinas micotoxinas, vitaminas lipo solubles
		Alúmina		Al - o - Al	Hexano, Cloroformo Isopropanol	Aminas
REPARTO	FASE NORMAL	FASES ENLAZADAS	Amino	$-NH_2$	Hexano, Cloroformo — Isopropanol	Azucares, esteroides. Nitro derivados
			Ciano	-CN	Hexano, Cloroformo — Isopropanol	Nitro derivados Aminoacidos
			Diol	Glicidoxietilmetoxisilano	Agua. Na_2HPO_4 0.1M	Proteínas,peptidos,tensoactivos acuosos.
	FASE INVERSA		RP-2	Dimetilsilano	Agua,acetonitrilo,metanol	Aminas, fenoles, vitaminas hidrosolubles
			RP-8	Octilsilano	Agua,acetonitrilo, metanol	Catecolaminas,esteroides aceitas esenciales
			RP-18	Octadecilsilano	Agua, acetonitrilo metanol	Analgesicos,Ftalatos, aromaticos polinucleares
INTERCAMBIO IONICO		Intercambiador fuerte de cationes		Acido sulfónico	Na_2HPO_4 0.01-0.1M	Vitaminas hidrosolubles aminoácidos,nucleótidos
		Intercambiador fuerte de aniones		Amonio cuaternario	Na_2HPO_4 0.01-0.1M	Nucleótidos
		Intercambiador débil de aniones		$-NH_2$	H_3PO_4 0.01-0.05 M	Colorantes comestibles carbohidratos
EXCLUSION		Gel acuoso		Divinil benceno sulfonado	Agua	Proteínas,prótidos, - azúcares.
		Gel orgánico		Divinil benceno	Cloroforno, THF	Polimeros, gomas
		Silice de poro controlado.		Gel de silica	THF,alcoholes, agua	Polimeros, compuestos biológicos
		Vidrio de poro controlado.		Vidrio poroso	THF,alcoholes,agua	Compuestos biológicos

DETECTOR:

El detector se encarga a la vez de cuantificar los componentes que ha detectado al eluir estos en la columna.

Pueden ser de dos tipos:

Aquéllos que miden alguna propiedad del soluto únicamente, por ejemplo la absorción al espectro ultravioleta o fluorescencia y aquellos que miden alguna propiedad del soluto y la fase móvil, por ejemplo, el índice de refracción.

Los detectores más usados son:

* Detector UV
* Detector de índice de refracción
* Detector de fluorescencia

La selección del detector dependerá de las propiedades de los solutos que se deseen analizar.

II.4 Validación de métodos analíticos

Una parte integral del desarrollo de un método analítico es la validación del mismo, es decir, el método debe probarse para determinar su efectividad.

La validación de un método es el procedimiento por medio del cual queda establecido por estudios de laboratorio que la capacidad del método satisface los requisitos de aplicación analítica.

La forma de validar un método analítico estará en función de los requisitos que exija su futura aplicación, sin embargo, la forma más general incluye una evaluación de los parámetros; especificidad, linearidad, precisión y exactitud del método.

A continuación se describe cada uno de estos parámetros junto con el criterio de aceptación.

1. Especificidad

Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra.

Criterio: El método desarrollado debe ser capaz de separar la o las sustancias de interés de posibles interferencias.

2. Linearidad

Es la capacidad de un método analítico para asegurar que los resultados obtenidos son proporcionales a la concentración de la sustancia que les dio origen dentro de un rango determinado y por lo tanto cumplir con la ecuación de la línea recta $Y = mx + b$ donde:

m es la pendiente de la línea recta

b es la ordenada al origen

r es el coeficiente de correlación

Criterio: $m \simeq 1$, $b \simeq o$, $r \geq 0.99$, $r^2 \geq 0.98$

3. Precisión

Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales de una misma propiedad.

En otras palabras es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad de los resultados obtenidos del método bajo condiciones normales de operación, expresada en términos de desviación estándar o del coeficiente de variación.

Repetibilidad: Es el grado de concordancia entre determinaciones independientes de una misma propiedad realizadas por un sólo analista usando los mismos aparatos y técnicas en un mismo laboratorio.

Reproductibilidad: Es el grado de concordancia entre determinaciones independientes de una misma propiedad realizadas por dos o más analistas, usando los mismos y/o diferentes aparatos y técnicas en el mismo y/o diferentes laboratorios.

Criterio: Coeficiente de variación (C.V.)$\leq$ 1.5%

Coeficiente de variación (C.V) = desviación estándar relativa (D.E.R.).

4. Exactitud

Es el grado de concordancia entre un valor determinado experimentalmente y el valor de referencia.

El C.V. dependerá del tipo de método y muestra, la forma farmaceútica y la concentración.

Criterio:

METODO	C.V. (%)
Cromatográfico	$\leq$ 2
Químico y espectrofotométrico	$\leq$ 3
Microbiológicos	$\leq$ 5

5. Sensibilidad

Es la mínima cantidad detectable del compuesto por análizar, la cual puede pero no necesariamente ser cuantificada bajo las condiciones de operación establecidas.

Criterio: El grado de sensibilidad estará en función de los requerimientos de aplicación del método.

6. Tolerancia del sistema

Es el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo modificaciones de las condiciones normales de operación, tales como distintos tamaños de muestra de análisis, lotes reactivos, sistemas de elución, tipos de empaque, parámetros ambientales etc.

CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL

III. PARTE EXPERIMENTAL

III.1 Adaptación del método analítico al producto.

Fórmula de Marbete del producto en estudio
Cada 100 ml. contienen:

Timerosal	1.5 mg.
EDTA disódico	150.0 mg.
Pluronic F-127	400.0 mg.
Cloruro de sodio	780.0 mg.
Borato de sodio	200.0 mg.
Vehículo c.b.p.	100.0 ml.

Para la adaptación del método se trabajó con soluciones estándars de timerosal grado USP en agua, en concentraciones de 10,15 y 20 mcg/ml. éstas soluciones se preparan a partir de una solución patrón conteniendo 80 mg. de timerosal en 200 ml. de agua.

La cual se prepara disolviendo con agitación el timerosal en agua a temperatura ambiente, el esquema siguiente muestra las diluciones hechas.

$$\frac{80 \text{ mg}}{200 \text{ ml}} \times \frac{5}{100} = 20 \text{ mcg/ml}$$

$$\frac{80\ mg}{200\ ml} \times \frac{15}{100} \times \frac{25}{100} = 15\ mcg/ml$$

$$\frac{80\ mg}{200\ ml} \times \frac{5}{200} = 10\ mcg/ml$$

La primera parte del desarrollo consistió en disminuír la fuerza ácida de la fase móvil reportada en la literatura MeoH-Agua-ac. fosfórico (60:50:1) ya que siendo de pH 1.5 perjudica fácilmente el empaque de la columna, el procedimiento se llevó a cabo disminuyendo gradualmente la cantidad de ácido fosfórico de la fase móvil hasta obtener un pH de 2.4 con el que se obtuvieron buenos resultados sin perjudicar a la columna.

Se determinó el tiempo que tardaba en estabilizarse la línea del sistema, encontrándose que se requería de 20 minutos para una columna relativamente nueva y de 40 minutos o más para una columna vieja o muy usada. Se probaron dos columnas diferentes en tamaño de partícula (4 y 10 micras), los resultados no presentaron diferencias significativas.

También se experimentó con diferentes volumenes de inyección de muestra: 10,15,20 y 25 mcl. dando mejores resultados el de 20 mcl. Se experimentaron diferentes velocidades

de flujo: 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 ml/min. dando mejores resultados 1.0 ml/min. ya que se presentaban los picos muy anchos con velocidades menores de 1.0 y los picos muy angostos y sin buena resolución con velocidades arriba de 1.0

Se probaron tres fases móviles diferentes inyectando una muestra estándar de timerosal con sus productos de degradación con el objeto de comparar los resultados obtenidos.

Acetonitrilo-Agua	(40:60)	pH	2.4	pH ajustado con
MeoH - Agua	(70:40)	pH	2.4	ácido fosfórico
MeoH - Agua	(60:50)	pH	2.4	

Los resultados se presentan en la tabla 4

Al concluir esta serie de pruebas se logró integrar la técnica con las óptimas condiciones de trabajo, las cuales se describen en: "DESCRIPCION DEL METODO ANALITICO".

Al sistema propuesto se le estudió su tolerancia, el conocimiento de éste parámetro nos indica el grado de variación de los resultados al modificar algunos parámetros fijados en la tecnica. En este caso se ha variado la proporción de disolventes en la fase móvil $\pm$ 5% de la relación central. Los resultados se muestran en la tabla 5.

En los resultados se puede apreciar que conforme se aumenta la proporción de metanol, los tiempos de retención disminuyen. Así también los factores de resolución entre los diferentes picos, no obstante sigue habiéndo buena resolución, por lo que se concluye que el sistema propuesto es tolerante dentro de los pequeños cambios en la composición fase móvil.

III.2 Descripción del método analítico.

Equipo:

Cromatografo de líquidos
Bomba modelo 590, waters
Inyectador modelo U6K, waters
Detector UV de longitud de onda fija a 254 nm.
Columna μBondapak C_{18} de 3.9 mm X 15 cm con precolumna.

Reactivos Metanol HPLC, Baker.

Agua destilada
Acido fosfórico, Baker.
Timerosal USP estándar de referencia

Condiciones de trabajo

Fase móvil: Metanol - agua (60:50), pH 2.40 ajustando-con ácido fosfórico, filtrada y degasificada.

Atenuación: 32

Velocidad de la carta: 0.2 cm/min

Flujo: 1.2 ml/min

Volumen de inyección: 20 mcl

Tiempos de retención aproximados:

Acido tiosalicilico	4.0 min.
Timerosal	7.0 min.
Acido 2,2 ditiosalicílico.	12.0 min.

Preparación de las soluciones estándar:

Pesar exactamente al rededor de 80 mg. de timerosal USP estándar de referencia y transferirlos a un matráz volumétrico de 200 ml, adicionar 50 ml de agua y agitar hasta disolver, llevar a volúmen con agua y mezclar. De esta solución transferir una alícuota de 5 ml a un matraz volumétrico de

100 ml llevar a volúmen con agua y mezclar.

(Esta solución contiene aproximadamente 20 mcg/ml).

Marcar esta solución con el No. 1

Medir una segunda alícuota de 5 ml y transferirla a una matráz volumétrico de 200 ml, llevar a volúmen con agua y mezclar (esta solución contiene aproximadamente 10 mcg/ml). Marcar esta solución con el No. 2.

NOTA: La muestra no sufre ningún tratamiento previo a su análisis su concentración teórica es de 15 mcg por ml.

PROCEDIMIENTO

Estabilizar el sistema con la fase móvil durante 30 a 40 minutos e inyectar seis veces la solución estándar No. 1, hacer lo mismo con la solución estándar No. 2.

Calcular la desviación estándar relativa de las seis inyecciones para cada solución 1 y 2, esta no debe ser mayor de 1.0%

Inyectar por duplicado un volúmen igual de la muestra.

Con los datos obtenidos de las soluciones estándar No. 1 y No.2 trazar una curva estándar de area contra concentración respectiva e interpolar en ella el area obtenida de la muestra, determinando así su concentración correspondiente.

El tr del timerosal es aproximadamente 7.0 minutos.

Cálculos

$$\% \text{ de timerosal en la muestra} = \frac{\text{conc. interplada}}{\text{conc. teórica}} \times 100$$

Todas las muestras análizadas en este trabajo fueron tratadas en esta forma.

Una vez adaptado el sistema se procedió a la validación estadística del mismo, este proceso se describe a continuación.

III.3 Validación del método analítico.

Para validar el método analítico se realizaron las siguientes pruebas.

1. Especificidad
2. Linearidad del sistema

3. Precisión del sistema
4. Presición del método
5. Exactitud del método
6. Tolerancia del sistema

ESPECIFICIDAD. Se analizaron muestras de las siguientes soluciones con el objetivo de detectar posibles interferencias debidas a excipientes y/o productos de degradación.

1. Placebo

2. Placebo adicionado de timerosal

3. Placebo adicionado de timerosal y acido tiosalicilico

4. Placebo adicionado de timerosal, acido tiosalicilico y ácido 2,2 ditisalicilico.

Las muestras fueron análizadas individualmente encontrándose ausencia de interferencias en los cromatogramas, los cuales se muestran en las figuras 8 a 11 al final de este capítulo.

Con éste experimento se demostró que el sistema es específico para timerosal bajo las condiciones de operación

mencionadas

LINEARIDAD DEL SISTEMA. Este experimento se llevó acabo análizando soluciones estándar de timerosal en un intervalo de concentración de 60 a 140% de la concentración teórica presente en la formulación, las soluciones fueron preparadas a partir de una misma solución patrón y se analizaron por duplicado.

Se determinó la concentración recuperada en mg/100 ml a partir de las areas obtenidas en cada concentración. Los resultados se muestran en la gráfica No. 1 en ella se puede apreciar que la respuesta del detector sigue un comportamiento lineal en este intervalo de concentraciones, cumpliendo así con la ecuación de la línea recta $y = mx + b$.

El coeficiente de correlación es muy próximo a la unidad y la ordenada al orígen muy cercana a cero.

PRESICION DEL SISTEMA

Se demostró por el análisis sextuplicado de una solución estándar de timerosal al 100% de la concentración teórica de la formulación, la D.E.R. obtenida en esta prueba es menor de 1.5% lo cual demuestra que el sistema es preciso.

Los resultados de las seis inyecciones con sus respectivas areas se muestran en la tabla No. 6 y figura No. 12.

PRESICION DEL METODO (REPRODUCIBILIDAD)

Esta prueba se llevó a cabo por el análisis triplicado de tres soluciones de concentraciones al 80, 100 y 120% de la concentración teórica de la formulación por dos análistas en dos días diferentes.

Los resultados se muestran en la tabla No. 7, la D.E.R. obtenida es menor a 1.5% lo que nos demuestra que el método desarrollado es preciso, es decir reproducible.

EXACTITUD DEL METODO

Para probar la exactitud del método se análizaron por triplicado muestras de placebos adicionados de timerosal a concentraciones de 60, 80, 100, 120 y 140%.

Con este experimento se demostró que bajo las condiciones normales de operación el método es exacto al obtenerse una D.E.R. menor al 2% Los resultados se presentan en la Tabla No. 8.

CAPITULO IV
RESULTADOS EXPERIMENTALES

IV. RESULTADOS EXPERIMENTALES

TABLA No. 4

RESULTADOS DE TRES FASES MOVILES PROBADAS DURANTE LA ADAPTACION DEL METODO

FASE MOVIL	COMPONENTES DE LA MUESTRA	TR	OBSERVACIONES
ACETONITRILO-AGUA (40:60) PH: 2.4	TIO TIMSAL DITIO	1.842 3.142 3.572	NO BUENA RESOLUCION ENTRE TIMSAL Y DITIO PICOS MUY ANGOSTOS
MEOH-AGUA (70:40) PH: 2.4	TIO TIMSAL DITIO	2.795 3.985 6.614	NO BUENA RESOLUCION ENTRE TIMSAL Y TIO PICOS MUY ANGOSTOS
MEOH-AGUA (60:50) PH: 2.4	TIO TIMSAL DITIO	3.860 6.982 16.857	MEJORES TR, BUENA RESOLUCION, TAMAÑO DE PICOS ACEPTABLE

TIO = ACIDO TIOSALICILICO

TIMSAL = TIMEROSAL

DITIO = ACIDO 2, 2 DITIOSALICILICO

TABLA No. 5
TOLERANCIA DEL SISTEMA

RELACION (MEOH:AGUA) EN LA FASE MOVIL	TIEMPOS DE RETENCION			FACTORES DE RESOLUCION	
	TIO	TIMSAL	DITIO	TIO/TIMSAL	TIMSAL/DITIO
(54 : 56)	4.78	9.57	12.47	2.99	1.11
(60 : 50)	3.86	6.98	16.85	1.98	2.68
(66 : 44)	3.22	4.32	6.97	1.37	2.24

TIO = ACIDO TIOSALICILICO

TIMSAL = TIMEROSAL

DITIO = ACIDO 2,2 DITIOSALICILICO

TABLA No. 6
PRECISION DEL SISTEMA

INYECCION	RESPUESTA DEL DETECTOR
1	407833
2	398425
3	401900
4	390470
5	401381
6	397732

MEDIA (X)	399623.5
DESVIACION ESTANDAR (D.E.)	5735.3
DESVIACION ESTANDAR RELATIVA (D.E.R.)	1.43%

TABLA No. 7
PRECISION DEL METODO

MUESTRA	ANALISTA	DIA	% OBTENIDO
1	1	1	99.00
2	1	1	99.93
3	1	1	101.00
1	2	1	99.91
2	2	1	100.06
3	2	1	100.63
1	1	2	98.40
2	1	2	99.57
3	1	2	99.48
1	2	2	99.08
2	2	2	100.50
3	2	2	97.54

DIA 1, $\bar{X}$	= 100.08%	DE = 0.6880	DER = 0.6874
DIA 2, $\bar{X}$	= 99.09%	DE = 1.0246	DER = 1.0340
ANALISTA 1, $\bar{X}$	= 99.56%	DE = 0.8804	DER = 0.8843
ANALISTA 2, $\bar{X}$	= 99.62%	DE = 1.1567	DER = 1.1611
$\bar{X}$ TOT.	= 99.60%	DE = 0.9805 TOT.	DER = 0.9845 TOT.

TABLA No. 8

EXACTITUD DEL METODO

% DE TIMEROSAL ADICIONADO RESPECTO AL ESTIPULADO	% RECOBRADO	DER (%)
60	98.9	0.75
80	98.6	1.01
100	100.5	0.52
120	102.0	0.22
140	99.1	0.68
	$\bar{X}$ = 99.8	DER = 0.63

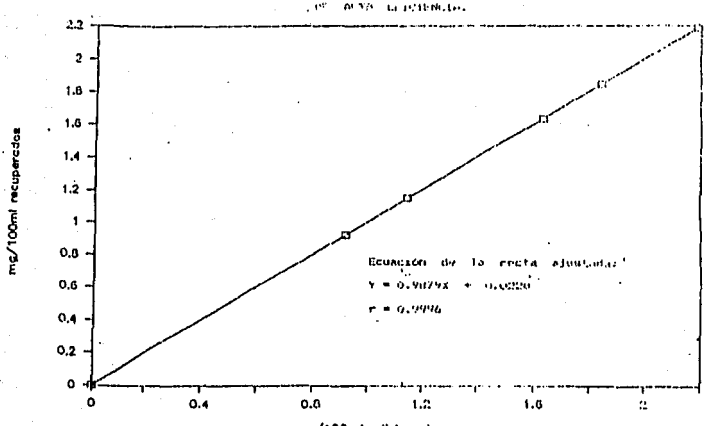
LINEARIDAD DEL SISTEMA

mg/100 ml Adicionados	mg/100 ml recuperados
0.924	0.932
1.155	1.161
1.640	1.663
1.848	1.832
2.188	2.184

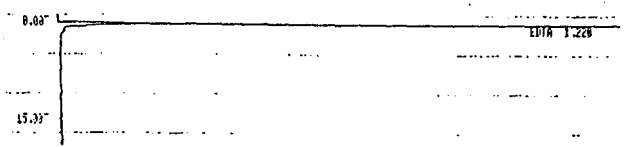
GRAFICA No.1 LINEALIDAD DEL SISTEMA.

DETERMINACION DE TIROSINA POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS

DE ALTA EFICIENCIA.



ESPECIFICIDAD

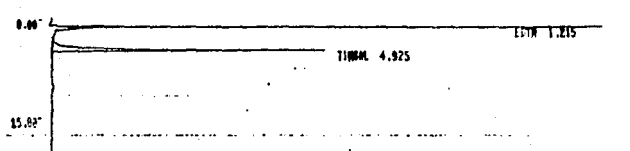


CAL. METHOD 04

	SF	PA	PB
	.100000$_{10}$+01	.100000$_{10}$+01	.100000$_{10}$+01

NO.	NAME	RT	A OR H	MK	CONC
1	EDTA	1.220	334830		334830.2379
2	TIO				
3	TIMSAL				
4	DITIO				
	TOTAL		334830		334830.2379

FIGURA No. 8. PLACEBO

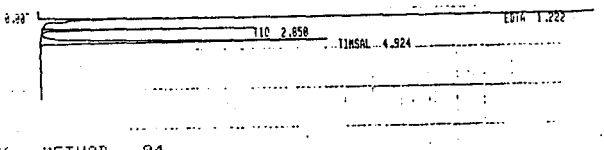


CAL. METHOD 04

	SF	PA	PB
	.100000$_{10}$+01	.100000$_{10}$+01	.100000$_{10}$+01

NO.	NAME	RT	A OR H	MK	CONC
1	EDTA	1.215	306947		306947.2937
2	TIMSAL	4.925	297963		297963.2916
	TOTAL		604910		604910.5853

FIGURA No. 9. PLACEBO ADICIONADO DE TIMEROSAL

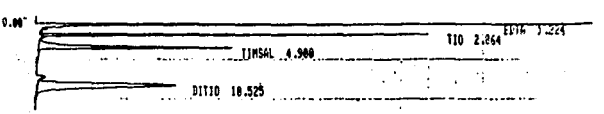


CAL. METHOD 04

		SF	PA	PB
		.100000E+01	.100000E+01	.100000E+01

NO.	NAME	RT	A OR H	MK	CONC
1	EDTA	1.222	317538	317538	.3300
2	TIO	2.850	110370	110370	.4330
3	TIMSAL	4.924	305377	305377	.3559
	TOTAL		763400	763400	.7872

FIGURA No. 10. PLACEBO ADICIONADO DE TIMEROSAL Y ACIDO TIOSALICILICO



CAL. METHOD 04

		SF	PA	PB
		.100000E+01	.100000E+01	.100000E+01

NO.	NAME	RT	A OR H	MK	CONC
1	EDTA	1.224	405793	405793	.3173
2	TIO	2.864	202299	202299	.0647
3	TIMSAL	4.900	212682	212682	.9579
4	DITIO	10.525	346587	346587	.7094
	TOTAL		1167362	1167362	2.116736

FIGURA No. 11. PLACEBO ADICIONADO DE TIMEROSAL, AC. TIOSALICILICO Y AC. 2,2 DITIOSALICILICO.

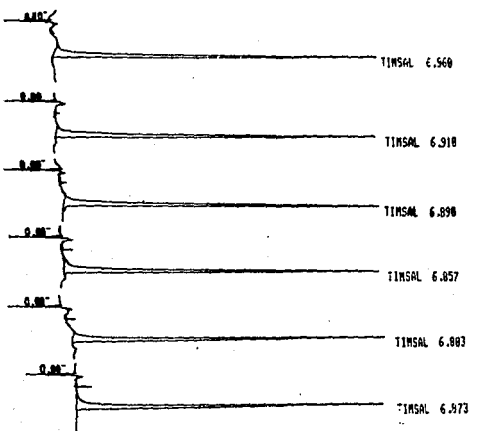


FIGURA No. 12. PRECISION DEL SISTEMA

CAPITULO V

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Se ha desarrollado un método por CLAR para determinar timerosal en una solución higiénica para lentes de contacto. Este método resultó ser específico para determinación de timerosal en presencia de sus productos de degradación por lo tanto puede ser indicador de control de calidad y de estabilidad.

2. El método cumple con los requisitos de validación necesarios para su aplicación en control de calidad.

3. La ventaja de este método respecto al de Espectroscopia de absorción atómica (a la fecha oficial) es la especificidad para el análisis de timerosal en presencia de sus productos de degradación.

4. Debido a que la muestra del pruducto no requiere ningún tratamiento previo a su análisis el tiempo de éste es muy corto además de la gran sensibilidad de la técnica.

5. El desarrollo de este método ha logrado disminuír los costos de análisis del producto debido a que la empresa ya cuenta con el equipo para hacerlo.

6. El método es aplicable a varios productos de la línea a base de timerosal.

CAPITULO VI

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. M.J. Reader and C.B. Lines
Journal of pharmaceutical Sciences 72, 1406 (1983)

2. R.C. Meyer and L.B. Cohn
J. pHARM.SCI, 67, 1636 (1978)

3. N.E. Richardson, D.J.G. Davies
J. pharm, pharmacol. 29, 717 (1977)

4. The Merck Index, Tenth adition P. 1334, 1209

5. Martindale, The Extrapharmacopea, 26 edición

6. T.W. Clarkson, Annu. Rev. Pharmacol. 12, 375 (1972)

7. A.M.J. N. BLAIR, B. Clark, etal. Toxicology, 3 (1975), 171-176

8. The United States pharmacopoeia
21th rev. United States pharmacopoeia Convention Inc. USA 1985 p. 1479

9. O sol A. Ed. Remingtón's Pharmaceutical Sciences, 16th ed Mac Printing Co. Easton P.A., 1980 p. 1108.

10. Kharasch. Thimerosal, preparado por reacción de cloruro etilmercurico pat. 1, 672, 615 (1928)

11. Fritz James S. Química Analítica Cuantitativa Ed. Limusa 3a. ed. México D.F. p. 427-484.

12. Kiyoshi Tsuji GLC E HPLC. Determinación of Therapeutic -

Agents Marcel Dekker Inc. N.Y. 1978 p. 1-44.

13. Snyder L.R.E. J.J. Kirkland. Introducción to Modern Liquid Chomatography. 2nd. ed. John Wiley sons. Inc. N.Y. 1979 p. 126-153.

14. E.B. Beyer, J. ASSOC. OFF. Anal. Chem. 52.844 (1969)

15. J.L.A. Webb I.S. Bhatia A.H. Corwin and AG.S. Chem.Soc 72. 91 (1950)

16. Waters Associates
Operador Manual. USA 1982. Water Asociates

17. Yost. R.W.
Introducción a la Cromatografía Liquida Práctica
1a. ed. Perkin Elmer USA. 1980 p. 5,18-23, 227-229

18. Goodman and Gilman
The pharmacological basis of Therapeutics
Fourth edition, the Macmillan Company
New York USA. 1970 p. 1032, 1048.

19. Waters Soorcebook for Chromatography columns and supplies
Waters Chromatography División
USA. 1985

20. Bernard D., Davis M.D.
Tratado de microbiología
Editorial Salvat
España 1975

21. Britis pharmacopoeia 1980
Vol. I England 1980 p. 452

22. Lachman Leon PHD., Lieberman
Theory and practice of Industrial Farmacy
Second edition. Lea and Febiger USA. p. 553-555

23. F. Neuwal and G. Schimitzek, pharm.Ztg., 112, 1308 (1967)

24. T. Omura S. Morishita, and Y.. Veda Bunseki Kagaku, 19,941 (1970)

25. A.R. Neurah, Cesk Farm., 10, 75 (1961)

26. J. Viska and A. Okac. Cesk Farm. 15, 356 (1966)

27. J. Viska and A. Okac. Cesk Farm. 16,29 (1967)

28. C.C. Fu and M.J. Sibley, J. Pharm sci 66, 738 (1977)

29. S.W. Lam. R.C. Meyer, and L.T. Takahashi, J. Parent. Sci. Technol., 35, 262 (1981)

30. F. Tanaka and M. Mitsuno Ann Rept. Takeda Research Lab., 10, 65 (1951)