

Validación de un método analítico para la determinación de timerosal en vacunas por espectrofotometría visible

Validation of an analytical method for the determination of timerosal in vaccines by visible spectrophotometry

GLEIDYS QUINTANA^{A,*}, MARILÍN RONDÓN^A, MIRIAN REGNAULT^{A,*}

Resumen

La Organización Mundial de la Salud entiende por vacuna “cualquier preparación destinada a generar inmunidad contra una enfermedad estimulando la producción de anticuerpos”. Entre los componentes de la vacuna se encuentran: el antígeno, los excipientes, el preservante y el adyuvante. En vista de que las vacunas con timerosal como preservante se utilizan con frecuencia en todo el mundo a niveles de concentración entre 0,008 y 0,05 mg por dosis, la OMS se ha encargado de examinar y comprobar que los productos que lo contienen cumplan las normas internacionales de garantía de la calidad, seguridad y eficacia. Para garantizar que se cumplen con los niveles de timerosal declarados en la vacuna, es necesario contar con una metodología analítica que posea una adecuada exactitud, precisión y especificidad para realizar la cuantificación de timerosal. Se validó un método analítico mediante la evaluación de las características de desempeño de la Categoría I planteada por la Farmacopea de los Estados Unidos de América y el Formulario Nacional, encontrándose linealidad en el método analítico para el intervalo de concentración comprendido entre 0,010 -0,200 mg/mL, con un coeficiente de correlación $r = 0,9999$. Para la exactitud se obtuvieron resultados con un porcentaje de recuperación desde 97,5% a 101,5% para la vacuna Heberpenta®-L. En el estudio de la precisión, para la repetibilidad se obtuvieron coeficientes de variación para la vacuna Heberbiovac de 1,3%, Heberpenta®-L 0,9% y Antimeningocócica 1,4%; para la precisión intermedia empleando dos analistas, los coeficientes de variación obtenidos fueron para la vacuna Heberbiovac de 2,1%, Heberpenta®-L 2,1% y Antimeningocócica 2,2%. Adicionalmente el método resultó ser específico, debido a que no se vio afectado por interferencias asociadas a la matriz después de degradada la vacuna.

Palabras clave: validación, timerosal, vacunas, espectrofotometría visible, heberbiovac, heberpenta®-L, antimeningocócica.

Abstract

The World Health Organization understands as vaccine “any preparation designed to generate immunity against a disease by stimulating the production of antibodies.” Among the components of the vaccine are: the antigen, the excipients, the preservative and the adjuvant. In view of the fact that thimerosal vaccines as a preservative are frequently used worldwide at concentration levels between 0.008 and 0.05 mg per dose, WHO has been responsible for examining and verifying that the products containing it comply with the International standards of quality assurance, safety and efficacy. To ensure that thimerosal levels declared in the vaccine are met, it is necessary to have an analytical methodology that has adequate accuracy, precision and specificity to perform the quantification of thimerosal. An analytical method was validated by evaluating the performance characteristics of Category I posed by the Pharmacopoeia of the United States of America and the National Form, finding linearity in the analytical method for the concentration range between 0.010 -0.200 mg /

A Postgrado de aseguramiento de la calidad, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

* Correspondencia: miriamregnault@gmail.com; gleidysq26@gmail.com; shana_289@yahoo.com.

mL, with a correlation coefficient $r = 0.9999$. For accuracy, results were obtained with a recovery percentage from 97.5% to 101.5% for the Heberpenta®-L vaccine. In the study of precision, for the repeatability, coefficients of variation were obtained for the Heberbiovac 1.3%, Heberpenta®-L 0.9%, and 1.4% anti-meningococcal vaccine; for the intermediate precision using two analysts, the coefficients of variation obtained were for the Heberbiovac 2.1%, Heberpenta®-L 2.1%, and 2.2% anti-meningococcal vaccine. Additionally, the method turned out to be specific, because it was not affected by interference associated with the matrix after the vaccine was degraded.

Key words: validation, thimerosal, vaccines, visible spectrophotometry, heberbiovac, heberpenta®-L, antimeningococcal.

Introducción

La Organización Mundial de la Salud (OMS) entiende por vacuna "cualquier preparación destinada a generar inmunidad contra una enfermedad estimulando la producción de anticuerpos" (OMS, 2016). Las vacunas empleadas en el presente trabajo corresponden a vacunas polivalentes, combinadas y recombinantes (Norma N-PERC-001, 2008) las cuales fueron: **Vacuna Antimeningocócica BC:** vacuna polivalente, la cual está indicada para la inmunización activa contra la enfermedad meningocócica causada por los serogrupos B y C. La meningitis meningocócica es una infección bacteriana grave de las membranas que rodean el cerebro y la médula espinal; puede causar importantes daños cerebrales y es mortal en el 50% de los casos no tratados (OMS, 2015). **Vacuna Heberpenta®-L:** es una vacuna combinada (pentavalente líquida) de difteria, tétanos, células enteras de *Bordetella pertussis*, hepatitis B y *Haemophilus influenzae* tipo b. Está indicada para la inmunización activa contra la difteria, tétanos, tosferina (*B. pertussis*), hepatitis B y *Haemophilus influenzae* tipo b, en niños a partir de las 6 semanas de edad (OPS, 2012). **Vacuna Heberbiovac HB:** vacuna recombinante, la cual está indicada para la inmunización activa contra la infección por el virus de la hepatitis B (VHB) y la prevención de

sus consecuencias potenciales, como las hepatitis agudas y crónicas, la cirrosis hepática y el hepatocarcinoma primario, y resulta un buen aliado en el control de la hepatitis tipo D (OPS, 2016).

Las vacunas Antimeningocócica BC, Heberpenta®-L y Heberbiovac HB contienen timerosal en su composición, como preservante contra el crecimiento microbiano. La OMS define que el timerosal es un compuesto que contiene etilmercurio y se utiliza para evitar el crecimiento de bacterias y hongos en algunas vacunas inactivadas (con virus muertos), las cuales se suministran en viales multidosis. Por consiguiente, se utiliza en la producción de algunas vacunas, tanto para inactivar determinados microorganismos y toxinas como para contribuir a mantener la esterilidad de la cadena de producción (OMS 2011a). La acción antimicrobiana del preservante se asocia con el etilmercurio, que se libera después de la transformación de timerosal en etilmercurio y tiosalicilato. Por otro lado, la concentración de timerosal establecida en las vacunas debe cumplir con los requerimientos para preservantes indicados en la USP que determinan que una vacuna que contiene 0,01% de timerosal como preservante, contiene 0,05 mg de timerosal por 0,5 mL o aproximadamente 25 microgramos de mercurio por 0,5 mL de vacuna (Porrás, 2010).

El uso de timerosal en las vacunas como preservante e inactivador ha sido evaluado detenidamente durante más de 10 años por la OMS y en particular por su Comité Consultivo Mundial sobre Seguridad de las Vacunas (GACVS por sus siglas en inglés). En función de estos estudios, el GACVS ha expresado que no hay pruebas de que la cantidad de timerosal utilizada en las vacunas suponga un riesgo para la salud. Por otra parte, el Instituto de Medicina y la Academia de Pediatría de los EEUU, el Comité de Seguridad de los Medicamentos del Reino Unido y la Agencia Europea de Medicamentos han llegado a conclusiones similares (OMS, 2011b).

La metodología más frecuente para cuantificar timerosal en vacunas es la espectrofotometría de absorción visible debido a que presenta mejores resultados en términos de linealidad, exactitud, precisión y especificidad, además de ser un método sencillo de realizar en comparación a otros métodos analíticos empleados (Singh, 2011). El método colorimétrico para el análisis de mercurio usando ditizona (DT) como agente acomplejante fue uno de los primeros métodos usados para la determinación de mercurio. Sin embargo, la evaluación del metal que contiene especies en el rango visible requiere de una etapa de derivación con un cromóforo adecuado, la ditizona o ditiocarbamato se utiliza para el análisis de mercurio, debido a su capacidad para formar quelatos estables, en la relación de 1:2 o 1:1 con compuestos inorgánicos de (Hg^{2+}) y organomercurio catiónico (RHg^+), respectivamente (Zareba y col., 2016). La determinación de timerosal en vacunas realizada por el método colorimétrico se lleva a cabo de manera indirecta.

Los siguientes autores han publicado diversas aplicaciones analíticas para la determinación del timerosal en diferentes

tipos de muestras incluyendo las biológicas: Fleitman y col. (1991) llevaron a cabo la aplicación de dos técnicas para la determinación de la estabilidad de timerosal en solución oftálmica de Ketorolac Trometamina, empleando la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) así como la técnica colorimétrica. Parkin (1991) realizó un análisis secuencial por cromatografía de una muestra degradada de timerosal con y sin la adición de un exceso de ácido tiosalicílico, lo cual permitió cuantificar las cantidades disponibles del ion etilmercurio y timerosal y por diferencia la cantidad del ion etilmercurio libre. Prasad y Singh (1995) desarrollaron un método reproducible y específico para cuantificar menos de un microgramo de timerosal en productos biológicos por espectrometría visible, a una longitud de onda de 538 nm. Emplearon ditizona, acetona, agua e hidróxido de sodio para formar el complejo coloreado con timerosal. El método resultó ser simple, específico, sensible, reproducible y rápido. Tleugabulova y González (1996) determinaron la cantidad de timerosal no degradado en presencia de sus productos de descomposición en la vacuna contra la hepatitis B recombinante, usando un método de cromatografía líquida en fase reversa. Costa y col. (2001) aplicaron un método de cromatografía líquida en fase reversa para estudiar la estabilidad del timerosal en muestras de vacunas para la hepatitis B recombinante cubanas, almacenadas bajo diferentes condiciones de temperatura. Se demostró buena estabilidad del preservante en las muestras de vacunas de hasta 6 años. Jamaluddin y Shah (2003) desarrollaron un método espectrofotométrico sensible y altamente selectivo para la determinación de mercurio a nivel de traza en muestras ambientales, biológicas, suelo y plantas; para ello emplearon ditizona la cual

reacciona en un medio ligeramente ácido (1,4 dioxano 50% acuoso con mercurio (II)), para generar un quelato naranja el cual tiene un máximo de absorción a 488 nm. Coenen y col. (2006) evaluaron la estabilidad de 27 lotes de producción de escala completa de la vacuna influenza a temperaturas elevadas de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los lotes variaron con respecto a las cepas que contenían y en relación a la presencia del preservante timerosal en la solución. Por otra parte, en este trabajo se demostró que la presencia de timerosal en la solución no tiene ningún efecto sobre la estabilidad de la vacuna. Asma y col. (2012), desarrollaron un nuevo método de inyección de flujo de difusión de gas sencillo para la determinación de timerosal en muestras biológicas. El método fue aplicado con éxito para la determinación de timerosal en diferentes tipos de vacunas y dio resultados que concuerdan con los encontrados por el método por HPLC. Zareba y col. (2016) desarrollaron y validaron un método cromatográfico de separación simultánea, identificación y determinación de timerosal (preservativo) y aluminio (adyuvante) en vacunas y productos farmacéuticos HPLC con detección en el visible. El método con la aplicación de la derivación de la post-columna empleando la ditizona como agente complejante, hace posible la determinación de aluminio y timerosal simultáneamente.

Según la OMS, se considera necesario que los métodos analíticos sean sometidos a un proceso de validación, por medio del cual se compruebe si el método es lo suficientemente confiable, adecuado para el propósito y aplicación analítica propuesta y si los resultados previstos se obtienen dentro de las condiciones prefijadas. La misma debe realizarse de acuerdo al protocolo de validación, que incluya las características de desempeño analítico a

ser verificadas para los diferentes tipos de procedimientos analíticos (OMS, 2010). De acuerdo a lo establecido en la USP 38 NF 33 en el apartado <1225>, la validación de un procedimiento analítico es una evidencia documental, la cual establece mediante estudios en laboratorio, que las características de desempeño del procedimiento cumplen los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas. Las características de desempeño analítico típicas que deben considerarse en la validación de los procedimientos analíticos son las siguientes: exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, intervalo y robustez (USP38 NF 33, 2015a).

El presente trabajo de investigación consistió en la validación de un método analítico para la determinación de timerosal en vacunas por espectrofotometría de absorción visible, el cual fue desarrollado por el Centro Nacional de Biopreparados (BioCen) de Cuba y transferido a la planta productora de vacunas de Venezuela (PON, 2016). El estudio de validación se llevó a cabo en el Laboratorio de Control de Calidad de dicha planta, la cual cuenta con condiciones ambientales adecuadas, equipos calificados e instrumentos calibrados.

Materiales y Métodos

EQUIPOS Y MATERIALES

Los equipos empleados en el siguiente trabajo fueron: un espectrofotómetro UV-visible de doble haz marca Perkin Elmer modelo Lambda 25 (Corporación Científica Venezolana, Venezuela), entre las especificaciones de este equipo se tiene: un detector de fotodiodo, fuentes de radiación con lámparas de deuterio y halógeno pre alineadas, trabaja a un rango de longitudes de onda de 190 nm

a 1100 nm y una precisión fotométrica de absorbancia $\pm 0,003$, balanza analítica marca Denver modelo P214 (capacidad máxima 210 g y $d = 0,0001$ g) (Albis Venezolana, Venezuela), centrifuga marca Labnet modelo Hermle Z 300 (Velocidad máxima 13,500 rpm) (LabNet, NJ., USA), mini vortex marca VWR modelo 945303 (rango de velocidad 500-3000 rpm) (VWR, PA, USA), sonicador marca VWR modelo 550HT (frecuencia de trabajo 15–400 kHz) (VWR, PA, USA), micropipetas de (100-1000) μ L marca Gilson modelo pipetman M-P1000M (resolución 2 μ L), micropipetas de 1-5mL marca Gilson modelo Pipetman M-P5000M (resolución 0,2 mL) (Gilson, Inc, WI, USA). Los materiales de vidrio utilizados fueron balones aforados todos clase A.

REACTIVOS

Ácido Sulfúrico, lote K44921632, fecha de expiración 30/09/2018, etanol, lote K45732983, fecha de expiración 30/06/2019, ditizona lote K45351592, fecha de expiración 30/04/2019, todos grado reactivo (Merck, Alemania).

PATRÓN Y MUESTRA

El patrón de referencia utilizado para evaluar la linealidad del método fue un estándar primario de timerosal, lote: IOH094, vigente según Catálogo de Estándares de Referencia (USP, Maryland, USA).

Las muestras de vacunas empleadas para evaluar la precisión, exactitud y especificidad del método fueron suministradas por la Gerencia de Control de Calidad del Instituto donde se realizó este trabajo. Estas muestras, fabricadas en Cuba en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), Centro de Ingeniería Molecular (CIM) y el Instituto Finlay, fueron las siguientes:

Heberbiovac, lote 5C0113 con fecha de expiración 01/2018; Heberpenta®-L, lotes 5AA1404/0, 5AA1405/1, 5AA0702/0 y 5AA0905/0 con fechas de expiración 12/2017 y 06/2017 respectivamente y Antimeningocócica BC, lote 524M con fecha de expiración 10/2018.

Las especificaciones del contenido de timerosal en las vacunas fueron establecidas conforme a las declaradas por el proveedor en el certificado de calidad del producto terminado. A continuación, se indican las especificaciones de las vacunas involucradas en la validación: Heberbiovac (0,030 – 0,070) mg/dosis de 20 μ g de HbsAgrec.; Heberpenta®-L (0,030–0,100) mg/mL; Antimeningocócica BC (0,07-0,13) mg/mL.

SOLUCIONES PARA EL TRATAMIENTO DE LOS PATRONES Y MUESTRAS

Ácido sulfúrico 1,0 N: en un balón aforado de 250 mL que previamente contenía 100 mL de agua destilada, se agregó lentamente 7 mL de ácido sulfúrico; se enrazó con agua destilada y homogeneizó.

Mezcla hidroalcohólica 50:50: en un cilindro graduado de 100 mL, que previamente contenía 50 mL de agua destilada, se añadieron 50 mL de etanol, se tapó y homogeneizó.

Ditizona 0,3 mg/mL: en un beaker de 50 mL, se pesó 15 mg de ditizona, luego se agregó 10 mL de etanol y se agitó hasta total disolución. Posteriormente, se transfirió a un balón aforado de color ámbar de 50 mL, se llevó a un volumen final con etanol. **Dilución de Ditizona 0,03 mg/mL (solución de trabajo):** en un balón aforado de 50 mL, se añadió 5 mL de solución de ditizona 0,3 mg/mL, y se llevó a un volumen final con etanol.

CONDICIONES ESPECTROFOTOMÉTRICAS

Se utilizó un espectrofotómetro UV-visible de doble haz, ajustado a una longitud de onda del visible de 482 nm, ya que a ese valor se obtuvo el máximo de absorción del complejo etilmercurio-ditizona.

LINEALIDAD E INTERVALO

Se pesó 20 mg de timerosal, se transfirió a un balón aforado de 100 mL con ayuda de 50 mL de agua destilada y se agitó en el sonicador hasta total disolución, posteriormente se llevó a volumen con agua destilada y se homogeneizó. A partir de esta solución se prepararon soluciones utilizando agua como solvente. Se prepararon siete soluciones patrones de timerosal cuyas concentraciones fueron de 0,200 mg/mL, 0,100 mg/mL, 0,080 mg/mL, 0,064 mg/mL, 0,050 mg/mL, 0,020 mg/mL y 0,010 mg/mL.

Cada una de las soluciones patrones empleadas para construir la curva de calibración y evaluar la linealidad e intervalo se trató conforme lo indicado a continuación:

Se tomaron 9 tubos de ensayo con tapa (los cuales corresponden 2 para el blanco y 7 para cada patrón), cuya capacidad es de 150 mm x 18 mm debidamente identificados.

A los dos tubos de ensayo correspondientes al blanco se le adicionó 0,36 mL de agua destilada; y a los restantes tubos de ensayo previamente identificados se les añadió a cada tubo de ensayo 0,36 mL de la solución patrón 0,010 mg/mL, 0,020 mg/mL, 0,050 mg/mL, 0,064 mg/mL, 0,080 mg/mL, 0,100 mg/mL y 0,200 mg/mL.

Una vez adicionado el blanco y cada uno de los patrones, se procedió a agregar los siguientes reactivos en el orden siguiente: 0,20 mL de ácido sulfúrico 1,0 N; 3,4 mL de mezcla hidroalcohólica (50:50) y 2,0 mL de la dilución de ditizona 0,03 mg/mL.

Se homogeneizó mediante agitación con minivortex a 1600 rpm durante 15 segundos y se dejó en reposo durante 5 minutos.

Transcurrido este tiempo se procedió a leer el blanco y cada uno de los patrones en el espectrofotómetro UV-visible según condiciones descritas anteriormente.

Se verificó el desarrollo de color; tanto del blanco como de cada solución patrón, siendo la coloración característica para el blanco de azul oscuro, patrón 0,010 mg/mL, 0,020 mg/mL, 0,050 mg/mL, 0,064 mg/mL azul, patrón 0,080 mg/mL azul verdoso, 0,100 mg/mL verde oscuro y 0,200 mg/mL verde claro (PON, 2016).

El procedimiento descrito anteriormente se realizó por triplicado para cada patrón, durante un día en forma independiente de modo de evaluar estadísticamente la regresión lineal del método. Los resultados obtenidos de concentración y absorbancia de cada réplica de solución patrón de timerosal citados anteriormente, fueron promediados y utilizados para elaborar una curva de calibración mediante un análisis de regresión por el método de mínimos cuadrados. Adicionalmente, por el método de los mínimos cuadrados se determinaron los siguientes parámetros: la ecuación de la recta, la pendiente, el intercepto y el coeficiente de correlación (r). Los criterios de aceptación de validación para la linealidad fueron: (r) debe ser no menos de 0,995 y para el intervalo se debe cumplir con los requisitos de precisión, exactitud y linealidad (USP 38 NF33, 2015b). Estos están descritos en cada sección respectivamente.

PRECISIÓN

En tres tubos de centrifuga se dispensó el contenido de 3 viales de la vacuna Heberbiovac (lote: 5C0113), 12 viales de la vacuna Heberpenta®-L (lote: 5AA1405/1) y 12 viales de la vacuna Antimeningocócica BC (lote: 524M), respectivamente y se centrifugaron durante 10 minutos a 5000 rpm. Luego se tomó el sobrenadante de cada tubo y se preservaron en tres beakers de 10 mL debidamente identificados respectivamente.

El tratamiento a las muestras se realizó de la siguiente manera:

Se tomaron 21 tubos de ensayo con tapa (los cuales corresponden 2 para el blanco, 1 para la solución patrón de verificación de 0,050 mg/mL de timerosal y los restantes a 6 réplicas de cada muestra de vacuna al 100 % de su concentración), cuya capacidad es de 150 mm x 18 mm debidamente identificados.

A los dos tubos de ensayo correspondientes al blanco se le adicionó a cada uno 0,36 mL de agua destilada; luego el tubo de ensayo dispuesto para la verificación del sistema se le agregó 0,36 mL de la solución patrón de verificación de 0,050 mg/mL de timerosal. Posteriormente, se utilizaron 6 tubos de ensayo y se añadió a cada uno 0,36 mL de la vacuna Heberbiovac, luego en otros 6 tubos de ensayo se añadió a cada uno 0,36 mL de la vacuna Heberpenta®-L y finalmente en los últimos 6 tubos de ensayo se agregó a cada uno 0,36 mL de la vacuna Antimeningocócica BC (todas las vacunas evaluadas se encontraban al 100 % de su concentración).

Una vez adicionado el blanco, la solución patrón de verificación y la muestra de cada vacuna se procedió a agregar los siguientes reactivos en el orden que se presenta a continuación: 0,20 mL de ácido sulfúrico 1,0 N; 3,4 mL de mezcla

hidroalcohólica (50:50) y 2,0 mL de la dilución de ditizona 0,03 mg/mL.

Se homogeneizó cada una de las soluciones preparadas anteriormente en el minivortex a 1600 rpm durante 15 segundos y se dejó en reposo durante 5 minutos.

Se verificó el desarrollo de color del blanco y de la solución patrón de verificación según lo indicado en LINEALIDAD E INTERVALO.

Transcurridos los 5 minutos se procedió a leer el blanco, el patrón de verificación y cada una de las muestras en el espectrofotómetro UV-visible, según condiciones descritas anteriormente.

La repetibilidad del método analítico se evaluó durante un período corto de tiempo, con el mismo espectrofotómetro UV-visible y con un solo analista; con respecto a la precisión intermedia del método analítico se determinó con el mismo equipo pero con dos analistas. Los resultados obtenidos de cada réplica por vacunas fueron promediados y expresados en función del promedio y el coeficiente de variación. Adicionalmente, para la precisión intermedia del método analítico se realizó un análisis estadístico de los datos obtenidos por ambos analistas mediante el estadístico *t-Student*, con la finalidad de verificar si el método analítico se ve influenciado por variaciones dentro del laboratorio. El criterio de aceptación de la validación para la repetibilidad fue: coeficiente de variación no es más del 2,0 % y para la precisión intermedia: coeficiente de variación no es más del 3,0 % (USP 38 NF 33, 2015b).

EXACTITUD

En vista a la complejidad de la matriz de la vacuna Heberpenta®-L y que no se cuenta con patrones puros para la

evaluación de la exactitud del método indirecto propuesto para la determinación de timerosal en vacunas, se procedió a evaluar la exactitud del método a través del método de adición estándar (o *spiking*) (USP 38 NF33, 2015a).

En un tubo de centrifuga se dispensó el contenido de 12 viales de la vacuna Heberpenta®-L (lote: 5AA1405/1) y se centrifugó durante 10 minutos a 5000 rpm. Luego se tomó el sobrenadante y se preservó en un beaker de 10 mL debidamente identificado.

MUESTRA SIN PATRÓN AÑADIDO

Para la preparación de las muestras de la vacuna Heberpenta®-L sin patrón añadido de timerosal, en un beaker de 10 mL, se añadió una alícuota de 500 µL de la vacuna Heberpenta®-L y 1500 µL de agua destilada mediante una micropipeta. Se homogeneizó y se reservó hasta el momento de su uso.

MUESTRAS CON PATRÓN AÑADIDO

Para la preparación de las muestras de la vacuna Heberpenta®-L con patrón añadido de timerosal 0,200 mg/mL, empleando diferentes alícuotas del patrón: en cada beaker de 10 mL, se añadió una alícuota de 500 µL de la vacuna Heberpenta®-L, 200; 400; 500; 600; 800 y 1000 µL respectivamente de la solución patrón de timerosal 0,200 mg/mL y 1300; 1100; 1000; 900; 700 y 500 µL de agua destilada en cada beaker, mediante una micropipeta, respectivamente. Se homogeneizó y se reservó hasta el momento de su uso. De esta forma se obtuvo soluciones de la vacuna Heberpenta®-L (lote: 5AA1405/1) con patrón añadido de timerosal a una concentración de 0,02; 0,04; 0,05; 0,06; 0,08 y 0,10 mg/mL.

El tratamiento a las muestras con patrón añadido se realizó de la siguiente manera:

Se tomaron 24 tubos de ensayo con tapa (los cuales corresponden a 2 para el blanco, 1 para la solución patrón de verificación de 0,050 mg/mL de timerosal y los restantes a 3 réplicas de cada muestra con patrón añadido de timerosal 0,200 mg/mL), cuya capacidad es de 150 mm x 18 mm, debidamente identificados.

A los dos tubos de ensayo que corresponden al blanco se adicionó a cada uno 0,36 mL de agua destilada; luego al tubo de ensayo destinado para la verificación del sistema se agregó 0,36 mL de la solución patrón de verificación. Luego en otros tubos de ensayo previamente identificados con la cantidad de patrón añadido de timerosal 0,200 mg/mL se añadió por separado en su tubo correspondiente 0,36 mL de la muestra sin patrón añadido, muestras con 200 µL, 400 µL, 500 µL, 600 µL, 800 µL y 1000 µL de la solución patrón de timerosal 0,200 mg/mL (Todas las muestras sin y con patrón añadido se realizaron por triplicado).

Una vez adicionado el blanco, la solución patrón de verificación y la muestra con patrón añadido de timerosal 0,200 mg/mL se procedió a agregar los siguientes reactivos en el orden presentado a continuación: 0,20 mL de ácido sulfúrico 1,0 N; 3,4 mL de mezcla hidroalcohólica (50:50) y 2,0 mL de la dilución de ditizona 0,03 mg/mL.

Se homogeneizó cada una de las soluciones preparadas anteriormente en el minivortex a 1600 rpm durante 15 segundos y se dejó en reposo durante 5 minutos.

Se verificó el desarrollo de color del blanco y de la solución patrón de verificación según lo indicado en LINEALIDAD E INTERVALO.

Transcurridos los 5 minutos se procedió a leer el blanco, el patrón de verificación y cada una de las muestras con solución de patrón añadido de timerosal 0,200 mg/mL en el espectrofotómetro UV-visible, según condiciones descritas anteriormente.

Los resultados obtenidos de cada réplica de la vacuna Heberpenta®-L sin patrón añadido y con añadido de la solución patrón de timerosal de 0,200 mg/mL fueron promediados, y se calculó el porcentaje de recuperación de cada solución muestra con patrón añadido a través de la siguiente **fórmula**:

$$\%R = \frac{(Y - X_i) \times 100}{X_a}$$

Donde:

- Y = Concentración de la muestra más el patrón añadido
- X_i = Concentración de la muestra sin el patrón añadido
- X_a = Concentración del patrón añadido

El criterio de aceptación de validación para la exactitud fue: el porcentaje de recuperación se debe encontrar entre un 95,0-105,0 % (USP 38 NF 33, 2015b).

ESPECIFICIDAD

La evaluación de la capacidad del método para determinar de manera inequívoca el contenido de timerosal en presencia de productos de degradación, fue evaluada mediante la comparación de los resultados obtenidos entre la vacuna Heberpenta®-L (lote: 5AA1404/0) degradada con respecto a la vacuna Heberpenta®-L del mismo lote pero en óptimas condiciones. Esto se realizó en vista que el laboratorio no cuenta con el placebo de la vacuna Heberpenta®-L ni con materiales de referencia relacionados con impurezas o productos de degradación.

DEGRADACIÓN DE LA VACUNA HEBERPENTA®-L

Se tomaron 6 viales de la vacuna Heberpenta®-L (lote: 5AA1404/0) y se almacenaron durante 24 horas a -21 °C; luego se dejó alcanzar la temperatura ambiente y se centrifugó durante 10 minutos a 5000 rpm. Se tomó el sobrenadante y se preservó en un beaker de 10 mL debidamente identificado. La vacuna Heberpenta®-L degradada y no degradada se centrifugó cada una por separado con la finalidad de remover los compuestos de aluminio presentes en las vacunas, los cuales pueden ocasionar interferencia durante la medición de timerosal en el espectrofotómetro.

El tratamiento de las muestras se realizó de la siguiente manera:

Se tomaron 15 tubos de ensayo con tapa (los cuales corresponden a 2 para el blanco, 1 para la solución patrón de verificación de 0,050 mg/mL de timerosal y los restantes a 6 réplicas de la vacuna Heberpenta®-L en óptimas condiciones y degradada), cuya capacidad es de 150 mm x 18 mm, debidamente identificados.

A los dos tubos de ensayo correspondientes al blanco se les adicionó a cada uno 0,36 mL de agua destilada; luego el tubo de ensayo destinado para la verificación del sistema se le agregó 0,36 mL de la solución patrón de verificación. Posteriormente, en otros 6 tubos de ensayo se añadió 0,36 mL de la muestra de la vacuna Heberpenta®-L en óptimas condiciones y en otros 6 tubos de ensayo se añadió 0,36 mL de la muestra de la vacuna Heberpenta®-L degradada.

Una vez adicionado el blanco, el patrón de verificación y la vacuna Heberpenta®-L en óptimas condiciones y la degradada se procedió a agregar los siguientes reactivos en el orden presentado a continuación: 0,20 mL de ácido sulfúrico 1,0 N; 3,4 mL

de mezcla hidroalcohólica (50:50) y 2,0 mL de la dilución de ditizona 0,03 mg/mL.

Se homogeneizó cada una de las soluciones preparadas anteriormente en el minivortex a 1600 rpm durante 15 segundos y se dejó en reposo durante 5 minutos.

Se verificó el desarrollo de color del blanco y de la solución patrón de verificación según lo indicado en LINEALIDAD E INTERVALO.

Transcurridos los 5 minutos se procedió a leer el blanco, el patrón de verificación y cada una de las muestras en el espectrofotómetro UV-visible, según condiciones descritas anteriormente.

Una vez obtenidos los resultados de la vacuna en óptimas condiciones y la degradada, se procedió a expresar los resultados en función del promedio y se compararon ambos resultados mediante el estadístico F y *t-Student* de modo de determinar si existen o no diferencias significativas entre los resultados obtenidos para la vacuna en óptimas condiciones y degradada. El criterio de aceptación de validación para la especificidad fue: ausencia de interferencia de otros componentes presentes en la matriz de la muestra (USP 38, NF 33, 2015b).

APLICABILIDAD DEL METODO ANALÍTICO

Para evaluar la aplicabilidad se emplearon 3 lotes distintos de la vacuna Heberpenta®-L, las cuales corresponden a los lotes 5AA0905/0, 5AA1404/0, 5AA0702/0 y se prepararon conforme a lo especificado en la precisión del método descrita anteriormente.

Los resultados obtenidos de cada réplica por lote fueron promediados y

expresados en función del promedio y el coeficiente de variación. Adicionalmente, se verificó el cumplimiento de la especificación declarada por el proveedor para el contenido de timerosal de la vacuna Heberpenta®-L (0,030 - 0,100) mg/mL. El criterio de aceptación para la aplicabilidad fue: el coeficiente de variación no debe ser más del 2,0 % (USP 38, NF 33, 2015b).

Resultados y discusión

LINEALIDAD E INTERVALO

Para evaluar la linealidad del método analítico se realizó la determinación de la concentración y la absorbancia de cada solución patrón por triplicado durante un día en forma independiente, de modo de evaluar estadísticamente la regresión lineal del método. Luego con los datos obtenidos de cada réplica por concentración previamente promediados se construyó una curva de calibración con siete niveles de concentración (**Figura 1** y **Tabla I**), con la finalidad de comprobar el comportamiento lineal del método.

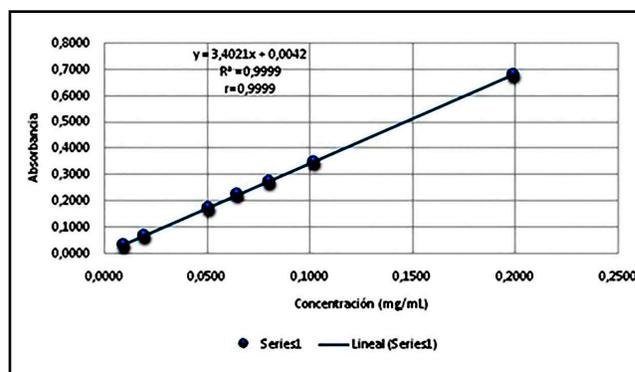


Figura 1. Curva de calibración para la determinación de timerosal en vacunas por un método indirecto.

Se decidió trabajar en un intervalo de concentración de timerosal que va de 0,010 mg/mL (14%) hasta un 0,200 mg/mL (308%), con un valor de concentración 0,064 mg/mL centrado como un 100%,

Tabla I

Concentración y absorbancia de los puntos correspondientes a la curva de calibración para la determinación indirecta de timerosal en vacunas

Patrón (mg/mL)	Concentración (mg/mL)	Promedio Concentración (mg/mL)	Absorbancias	Promedio Absorbancia
0,010 (14%)	0,0089	0,0091	0,0465	0,0373
	0,0097		0,0288	
	0,0089		0,0367	
0,020 (30%)	0,0197	0,0193	0,0770	0,0715
	0,0186		0,0657	
	0,0193		0,0719	
0,050 (78%)	0,0508	0,0504	0,1825	0,177
	0,0497		0,1716	
	0,0503		0,1769	
0,064 (100%)	0,0647	0,0647	0,2359	0,226
	0,0654		0,2190	
	0,0639		0,2230	
0,080 (124%)	0,0789	0,08	0,2872	0,2793
	0,0789		0,2676	
	0,0789		0,2830	
0,100 (157%)	0,1019	0,1016	0,3576	0,3509
	0,1012		0,3457	
	0,1012		0,3493	
0,200 (308%)	0,1992	0,1991	0,6899	0,6826
	0,1990		0,6781	
	0,1988		0,6798	

debido a que las concentraciones de timerosal para las vacunas Heberbiovac, Heberpenta®-L y Antimeningocócica BC por lo general se encuentran entre 0,05 mg– 0,08 mg por dosis de 1 mL (OMS, 2011a). Con respecto a la vacuna Antimeningocócica BC el valor de concentración de timerosal declarado por el proveedor se encuentra entre 0,07 mg – 0,13 mg por dosis de 0,5 mL; por consiguiente se consideró como el nivel máximo de la curva de calibración una concentración de 0,200 mg/mL.

El análisis de regresión por el método de mínimos cuadrados demostró que el método permite obtener resultados de la prueba proporcionales a la concentración del analito dentro del intervalo comprendido entre 0,010 mg/mL y 0,200 mg/mL, debido a que el coeficiente de correlación ($r = 0,9999$) se encontró dentro del criterio de validación establecido. Se evaluó un amplio intervalo de concentración con el objetivo de que este método analítico pueda ser aplicado a otras vacunas cuya concentración sea menor o mayor a las concentraciones establecidas por el proveedor en el certificado de calidad del producto terminado para las vacunas aquí estudiadas.

PRECISIÓN

La repetibilidad y la precisión intermedia son dos formas distintas de evaluar la precisión del método analítico; para ello se emplearon las vacunas: Heberbiovac, Heberpenta®-L y Antimeningocócica BC, cada una al 100 % de su concentración, las cuales se evaluaron por sextuplicado conforme a lo establecido (ICH,1996), con la finalidad de demostrar la validez y la precisión del método.

Los resultados de la repetibilidad presentados en la **tabla II**, permiten señalar que el método en estudio mostró ser preciso durante periodos corto de tiempo, ya que las absorbancias obtenidas para cada vacuna presentaron un coeficiente de variación menor de un 2,0 % conforme al criterio de validación establecido en la USP 38 NF 33 (2015b).

Con respecto a la precisión intermedia se observa en las **tablas III, IV y V** que el método analítico no se vio afectado por variaciones en el laboratorio, debido a que los resultados obtenidos fueron

Tabla II
Resultados de la evaluación de la repetibilidad

Muestra	Lote	Absorbancias	Promedio Absorbancias	Concentración (mg/mL)	Promedio Concentración (mg/mL)	Desviación estándar	% Coeficiente de Variación
Heberbiovac (100 %) 1	5C0113	0,1672	0,1670	0,0474	0,0473	0,0006	1,3
Heberbiovac (100 %) 2		0,1666		0,0472			
Heberbiovac (100 %) 3		0,1643		0,0465			
Heberbiovac (100 %) 4		0,1665		0,0471			
Heberbiovac (100 %) 5		0,1704		0,0483			
Heberbiovac (100 %) 6		0,1669		0,0473			
Heberpenta®-L (100 %) 1	5AA1405/1	0,2049	0,2057	0,0585	0,0587	0,0005	0,9
Heberpenta®-L (100 %) 2		0,2049		0,0585			
Heberpenta®-L (100 %) 3		0,207		0,0591			
Heberpenta®-L (100 %) 4		0,2079		0,0594			
Heberpenta®-L (100 %) 5		0,203		0,0579			
Heberpenta®-L (100 %) 6		0,2064		0,0589			
Antimeningocócica (100 %) 1	524M	0,3546	0,3506	0,1025	0,1013	0,0014	1,4
Antimeningocócica (100 %) 2		0,3539		0,1023			
Antimeningocócica (100 %) 3		0,3559		0,1029			
Antimeningocócica (100 %) 4		0,3441		0,0994			
Antimeningocócica (100 %) 5		0,3505		0,1013			
Antimeningocócica (100 %) 6		0,3446		0,0996			

reproducibles entre los dos analistas ya que presentaron un coeficiente de variación menor de un 3,0 % conforme al criterio de validación establecido en la USP 38, NF33 (2015b).

Adicionalmente, en la **tabla VI** se evidenció que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos por ambos analistas, ya que el *t* calculado resultó menor que *t* crítico, para un *t*

Tabla III

Resultados de la evaluación de la precisión intermedia de la vacuna Heberbiovac

Analista	Muestra	Absorbancias	Concentración (mg/mL)	Coeficiente de Variación (%)
	Lote: 5C0113	Promedio: 0,1654	Promedio: 0,0468 Desviación estándar: 0,0010	
1	Herbiovac (100 %)	1	0,1672	0,0474
		2	0,1666	0,0472
		3	0,1643	0,0465
		4	0,1665	0,0471
		5	0,1704	0,0483
		6	0,1669	0,0473
2	Herbiovac (100 %)	1	0,1620	0,0458
		2	0,1670	0,0473
		3	0,1627	0,0460
		4	0,1572	0,0444
		5	0,1672	0,0474
		6	0,1673	0,0474

determinado a partir de varianzas distintas (vacunas Heberpenta®-L y Heberbiovac) y para un *t* obtenido a partir de varianzas iguales (vacuna Antimeningocócica BC).

Tabla IV

Resultados de la evaluación de la precisión intermedia de la vacuna Heberpenta®-L

Analista	Muestra	Absorbancias	Concentración (mg/mL)	Coeficiente de Variación (%)
	Lote: 5AA1405/1	Promedio: 0,2034	Promedio: 0,0580 Desviación estándar: 0,0012	
1	Heberpenta®-L (100 %)	1	0,2049	0,0585
		2	0,2049	0,0585
		3	0,2070	0,0591
		4	0,2079	0,0594
		5	0,2030	0,0579
		6	0,2064	0,0589
2	Heberpenta®-L (100 %)	1	0,1980	0,0565
		2	0,2000	0,0569
		3	0,2010	0,0572
		4	0,1960	0,0559
		5	0,2110	0,0602
		6	0,2010	0,0573

Tabla V

Resultados de la evaluación de la precisión intermedia de la vacuna Antimeningocócica

Analista	Muestra	Absorbancias	Concentración (mg/mL)	Coeficiente de Variación (%)
	Lote: 524M	Promedio: 0,3571	Promedio: 0,1032 Desviación estándar: 0,0023	
1	Antimeningocócica (100 %)	1	0,3546	0,1025
		2	0,3539	0,1023
		3	0,3559	0,1029
		4	0,3441	0,0994
		5	0,3505	0,1013
		6	0,3446	0,0996
2	Antimeningocócica (100 %)	1	0,3671	0,1062
		2	0,3608	0,1043
		3	0,3625	0,1048
		4	0,3591	0,1038
		5	0,3715	0,1075
		6	0,3601	0,1041

Se procedió inicialmente a realizar la prueba F considerando que las varianzas son iguales ($s_1^2=s_2^2$) si el $F_{cal.} \leq F_{crit.}$ y las varianzas son diferentes ($s_1^2 \neq s_2^2$) si el $F_{crit.} \leq F_{cal.}$, con la finalidad de seleccionar la prueba *t-Student* adecuada para determinar si existen diferencias significativas entre los valores obtenidos por ambos analistas (Miller y Miller, 2002).

Tabla VI

Aplicación de la prueba F y t-Student a los resultados obtenidos en las tablas IV, V y VI

Muestra	F crítico	F calculado	t crítico	t calculado
Heberbiovac	0,20	0,23	2,36	1,67
Heberpenta®-L	5,05	7,93	2,44	2,14
Antimeningocócica BC	5,05	1,10	2,23	-4,43
H ₀ Hipótesis Nula	F _{cal.} ≤ F _{crit.} s ₁ ² =s ₂ ² ; F _{crit.} ≤ F _{cal.} s ₁ ² ≠s ₂ ²		t _{cal.} ≤ t _{crit.} X ₁ =X ₂	

Tabla VII
Resultados para la evaluación de la exactitud

Muestra	Concentración del patrón añadido (mg/mL)	*Abs. de la muestra + patrón añadido	**Conc. de la muestra + patrón añadido (mg/mL)	Promedio Conc. de la muestra + patrón añadido (mg/mL)	***% R	
Heberpenta®-L sin patrón añadido	0	0,0548	0,0143	0,0149	****	
		0,0566	0,0148			
		0,0589	0,0155			
Heberpenta®-L	1	0,02	0,1202	0,0335	0,035	100,5
			0,1226	0,0343		
			0,1324	0,0371		
	2	0,04	0,1911	0,0544	0,0539	97,5
			0,1937	0,0552		
			0,199	0,0522		
	3	0,05	0,2192	0,0627	0,0639	98
			0,225	0,0644		
			0,2284	0,0646		
	4	0,06	0,2558	0,0734	0,0758	101,5
			0,2649	0,0761		
			0,2694	0,0778		
	5	0,08	0,3337	0,0964	0,0954	100,6
			0,3351	0,0968		
			0,3399	0,093		
	6	0,10	0,3937	0,114	0,1124	97,5
			0,391	0,1132		
			0,4001	0,1101		

*Abs. Absorbancia. ** Conc. Concentración. *** % R Porcentaje de Recuperación. **** No recupera porque se trata de la muestra sin patrón añadido.

EXACTITUD

Para demostrar la exactitud del método se seleccionó la vacuna Heberpenta®-L debido a que está constituida por más antígenos con respecto a las otras muestras utilizadas en la validación y tiene una matriz más compleja. Se procedió a calcular el porcentaje de recuperación, mediante el método de adición estándar (o *spiking*), ya que no se podía contar con todos los componentes de la muestra.

El criterio de validación establecido en la USP 38, NF 33 (2015b) para demostrar la exactitud del método indica que se debe recuperar entre un

95,0 y un 105,0%. Por consiguiente, en los resultados presentados en la **tabla VII**, se aprecia que los porcentajes de recuperación obtenidos para cada patrón se encuentran dentro del rango, por lo que se puede afirmar que el método es exacto permitiendo recuperar de manera confiable la cantidad de timerosal en la vacuna.

ESPECIFICIDAD

Para determinar la especificidad se procedió a someter la vacuna a condiciones de estrés tal como lo recomienda la USP, a fin de realizar un estudio comparativo que permita demostrar que la determinación

Tabla VIII
Resultados para la evaluación de la especificidad

Muestra Lote: 5AA1404/0		Absorbancias	Promedio Absorbancias	Concentración (mg/mL)	Promedio Concentración (mg/mL)	Desviación estándar
Heberpenta®-L (100 %) Condiciones normales	1	0,1976	0,1941	0,0573	0,0569	0,0021
	2	0,1857		0,0538		
	3	0,1888		0,0547		
	4	0,2013		0,0597		
	5	0,1978		0,0587		
	6	0,1933		0,0574		
Heberpenta®-L (100 %) degradada	1	0,1860	0,1880	0,0530	0,0550	0,0020
	2	0,1818		0,0527		
	3	0,1866		0,0541		
	4	0,1863		0,0554		
	5	0,1901		0,0565		
	6	0,1970		0,0585		

del analito no se ve influenciada por los productos de degradación generados al someterla a -21 °C. Esta forma de realizarlo se decidió debido a la imposibilidad de contar con los materiales de referencia relacionados con los productos de degradación de esta compleja vacuna ni con el placebo. Para la evaluación del método se empleó la vacuna Heberpenta®-L al 100% de su concentración, la cual se preparó y se determinó por sextuplicado.

Tabla IX
Aplicación de la prueba F y t-Student a los resultados obtenidos en la Tabla VIII

Muestra	F crítico	F calculado	t crítico	t calculado
Heberpenta®-L	5,05	1,05	2,23	1,46
H ₀ Hipótesis Nula	F _{cal.} ≤ F _{crít.} S ₁ ² =S ₂ ²		t _{cal.} ≤ t _{crít.} X ₁ =X ₂	

Los resultados obtenidos demostraron que los promedios de concentración de timerosal en la vacuna en óptimas condiciones y degradada a -21°C no presentaron diferencias significativas (Tablas VIII y IX), lo cual indicó que la condición de enfriamiento a la cual se expuso la vacuna no afectó el contenido de timerosal.

Es de interés resaltar que Coenen y col. (2006) así como estudios realizados por la OMS, señalan que al someter una vacuna absorbida (contienen adyuvante fijado en la superficie de los antígenos para aumentar el poder inmunogénico de la vacuna) a temperaturas por debajo de cero (0 °C) se afecta la potencia disminuyendo la respuesta inmunitaria de la misma. Es decir, la congelación produce la separación del adyuvante (hidróxido de aluminio) y del antígeno, ocasionando que la ineficacia de la vacuna, sin afectar el contenido del resto de los componentes presentes (OMS, 2006).

Al ocurrir el proceso de congelación de la vacuna se observó la formación de cristales en la vacuna degradada; esta posible interferencia del hidróxido de aluminio se eliminó centrifugando la muestra, lográndose determinar el contenido de timerosal sin interferencias de los productos de degradación y componentes de la matriz de la vacuna.

Adicionalmente, para demostrar que la determinación de timerosal no se ve afectada por interferencias generadas en la muestra degradada y el blanco, se procedió a realizar un barrido de longitudes de onda entre los 350 y 700 nm, encontrándose que la vacuna en óptimas condiciones y degradada presentan espectros similares y un máximo de absorción a la longitud de onda de 482 nm (Figura 2), lo que permitió afirmar que no hay interferencias

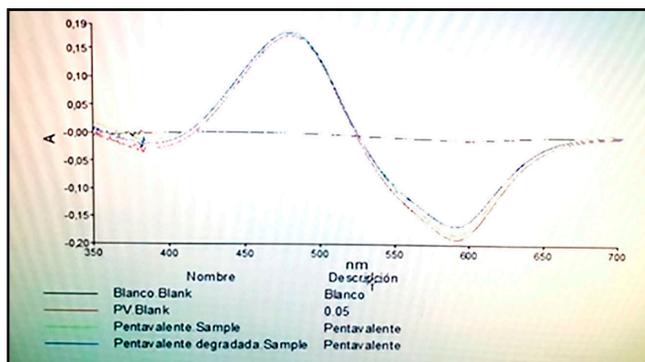


Figura 2. Demostración de la falta de interferencias generadas en la muestra degradada y el blanco: barrido de longitudes de onda entre los 350 y 700 nm.

de otros componentes presentes en la matriz de la muestra; adicionalmente, el blanco a lo largo de todo el barrido no presentó ninguna señal de absorción, por lo tanto, el método es específico para la determinación de timerosal en vacunas.

APLICACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO VALIDADO

Una vez validado el método analítico para la determinación de timerosal en vacunas se procedió a analizar tres lotes diferentes de la vacuna Heberpenta®-L (5AA0905/0, 5AA1404/0 y 5AA0702/0) y mediante los resultados obtenidos se pudo constatar que el método analítico es seguro y confiable, ya que se obtuvieron resultados exactos y precisos conforme al criterio de aceptación declarado por el proveedor en el certificado de calidad del producto terminado para los lotes de la vacuna Heberpenta®-L empleadas. En la **tabla X** se presentan los resultados obtenidos.

Conclusiones

El método analítico validado para la determinación de timerosal en vacunas a través de espectrofotometría visible, permitió resultados exactos, precisos, específicos y con una respuesta lineal en

Tabla X
Evaluación de tres lotes diferentes de la vacuna Heberpenta®-L

Vacuna		Absorbancias	Promedio Absorbancia	Concentración (mg/mL)	Promedio Concentración (mg/mL)	Coefficiente de Variación %	Declarado por el proveedor
Heberpenta®-L	Lote: 5AA0905/0	0,1616	0,1642	0,0483	0,0491	1,3	0,047
		0,1672		0,0499			
		0,1639		0,0490			
	Lote: 5AA1404/0	0,2051	0,2096	0,0594	0,0607	1,8	0,058
		0,2096		0,0607			
		0,2142		0,0621			
	Lote: 5AA0702/0	0,1645	0,1628	0,0467	0,0462	0,8	0,053
		0,1616		0,0458			
		0,1624		0,0461			

conformidad con lo establecido por la USP 38 en el apartado <857> (2015b).

El método analítico validado para la determinación de timerosal en las vacunas Heberbiovac, Heberpenta®-L y Antimeningocócica BC resultó ser lineal ya que se obtuvo un coeficiente de correlación $r = 0,9999$. Se cubrió un amplio intervalo de concentración (0,010 mg/mL-0,200 mg/mL), el cual puede ser aplicado a otras vacunas que contengan niveles de concentraciones de timerosal diferentes de las vacunas citadas anteriormente.

En la exactitud se logró obtener un porcentaje de recuperación dentro del criterio de validación establecido para medicamentos (95,0-105,0%); en el caso de la precisión los coeficientes de variación para la repetibilidad y la precisión intermedia se encontraron dentro de los criterios de validación.

El método analítico para la deter-

minación de timerosal en vacunas a través de espectrofotometría visible demostró ser específico debido a que no se vio afectado por interferencias asociadas a la matriz después de degradada la vacuna.

El contenido del preservante timerosal presente en las vacunas estudiadas, no se vio afectado cuando la vacuna se almacenó a temperaturas inferiores de los 0 °C.

Las pruebas estadísticas permitieron corroborar que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos por ambos analistas para el caso de la precisión intermedia y entre los resultados obtenidos para la vacuna degradada y en óptimas condiciones para el caso de la especificidad ya que la *t* calculada resultó ser menor o igual que la *t* crítica.

Los resultados obtenidos de los tres lotes diferentes de la vacuna Heberpenta®-L empleados para evaluar la aplicabilidad del método analítico validado, demostraron que la concentración de timerosal obtenida por cada lote se encontraron dentro de la especificación declarada por el proveedor.

Referencias bibliográficas

Asma F, Hafidha O, Nafaa A, Lotfi M. 2012. Gas diffusion flow injection determination of thimerosal in vaccines. *Talanta* 91: 47–51.

Coenen F, Tolboom J, Frijlink H. 2006 Stability of influenza sub-unit vaccine. Does a couple of days outside the refrigerator matter? *Vaccine* 24: 525–531.

Costa L, Vega M, Díaz Y, Marcelo J, Hernández J, Martino T. 2001. Reversed-phase high-performance liquid chromatography versus spectrophotometric assay for thimerosal in Cuban recombinant hepatitis B vaccine. *J Chromatogr A* 907: 173–179.

Fleitman J, Partridge I, Neu D. 1991. Thimerosal analysis in ketorolac tromethamine ophthalmic solution. Comparing HPLC and colorimetric techniques. *Drug Dev Ind Pharm* 17(4): 519–530.

ICH: International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Q2B Validation of analytical procedures: text and methodology. Ginebra, 1996.

Jamaluddin M, Shah M. 2003. A rapid spectrophotometric method for the determination of mercury in environmental, biological, soil and plant samples using diphenylthiocarbazone. *Spectroscopy* 17: 45–52.

Miller J, Miller J. Estadística y quimiometría para química analítica. 4ta ed. Prentice Hall: España, 2002. p. 53.

Norma para el registro sanitario, liberación de lotes y control de los productos biológicos. N-PERC-001. Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel”. Disponible en: http://www.inhrr.gob.ve/pdf/rc_pdf/N-PERC-001R0.PDF (diciembre 2008).

OMS: World Health Organization (WHO). 2006. Temperature sensitivity of vaccines. Immunization, Vaccines and Biologicals. World Health Organization. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/69387>.

OMS: Buenas prácticas de la OMS para laboratorios de control de calidad de productos farmacéuticos. Informe 44, anexo 1 de la serie de informes técnicos de la OMS, No. 957, 2010.

OMS: Organización Mundial de la Salud. (Página principal en Internet). Inmunización, vacunas y productos biológicos. Timerosal - preguntas y respuestas. OMS: Ginebra, 2011a. Disponible en: http://www.who.int/immunization/newsroom/thiomersal_questions_and_answers/es (29 de Septiembre 2016).

OMS: Organización Mundial de la Salud. (Página principal en Internet). Inmunización, vacunas y productos biológicos. Tiomersal. Hoja informativa. OMS: Ginebra, 2011b. Disponible en: https://www.who.int/immunization/newsroom/thiomersal_

- information_sheet/es/ (29 de Septiembre 2016).
- OMS: Organización Mundial para la salud. (Página principal en Internet). Nota descriptiva N°14. Noviembre 2015. Meningitis meningocócica. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs141/es/> (11 de Agosto 2016).
- OMS: Organización Mundial de la Salud. (Página principal en Internet). Temas de salud. Vacunas. OMS: Ginebra, 2016. Disponible en: <http://www.who.int/topics/vaccines/es/> (29 de Septiembre 2016).
- OPS: Organización Panamericana de la Salud. Cuba: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnológica; 2012. (29 de septiembre 2016).
- OPS: Organización Panamericana de la Salud. Heberbiovac HB. 2016. Disponible en: <http://www.paho.org/cub/index.php> (11 de Agosto 2016)
- Parkin J. 1991. Assay for thiomersal (thimerosal) with adaptation to the quantitation of total ethylmercury available in degraded samples. *J Chromatogr A* 587 (2): 329–332.
- Prasad K, Singh S. 1995. A new method for spectrophotometric determination of thiomersal in biologicals. *Biologicals* 23 (1): 65–69.
- PON: Procedimiento de Operación Normalizado. "Determinación de timerosal en productos biológicos a través del método de mezcla hidroalcoholica mediante UV-Visible". PON_CCFQ_009. Planta de Vacuna. Última revisión: julio 2016.
- Porras O. Timerosal en las vacunas. 2010. *Acta Pediátrica Costarricense* 22(1): 5–6.
- Singh N. 2011. Qualitative and quantitative analysis of various constituents of vaccines by using analytical techniques. *Pharmacophore* 2(3): 186–194.
- Tleugabulova D, González I. 1996. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic study of thimerosal stability in cuban recombinant hepatitis B vaccine. *J Chromatogr A* 729: 219–227.
- USP 38. Farmacopea de los Estados Unidos de América USP 38. Formulario Nacional NF 33. United States Pharmacopeia. Ed. 38. Rockville: Mack Printing; 2015a. <1225> Validación de Procedimientos Analíticos. pp: 1581–1587.
- USP 38. Farmacopea de los Estados Unidos de América USP 38. Formulario Nacional NF 33. United States Pharmacopeia. Ed. 38. Rockville: Mack Printing; 2015b. <857> Espectroscopia UV-Visible. pp. 718–720.
- Zareba M, Sanecki P, Rawski R. 2016. Simultaneous determination of thimerosal and aluminium in vaccines and pharmaceuticals with the use of HPLC method. *Acta Chromatographica* 28(3): 299–311.