

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 925**

51 Int. Cl.:
C07D 493/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07865179 .1**
96 Fecha de presentación: **04.12.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2114953**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.11.2009**

54 Título: **Procedimiento para preparar fluoresceína sustancialmente pura**

30 Prioridad:
11.12.2006 US 869488 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.10.2012

73 Titular/es:
**ALCON RESEARCH, LTD.
6201 SOUTH FREEWAY, MS-TB4-8
FORT WORTH, TX 76134-2099, US**

72 Inventor/es:
**BYDLINSKI, Gregory;
HARRIS, Gregg Robert y
SCOTT, Britt S.**

74 Agente/Representante:
Curell Aguilá, Mireia

ES 2 387 925 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para preparar fluoresceína sustancialmente pura.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a procedimientos para preparar fluoresceína sustancialmente pura.

5 Antecedentes de la invención

La fluoresceína es un compuesto naranja rojizo, $C_{20}H_{12}O_5$, que muestra una fluorescencia intensa en solución alcalina y se utiliza en aplicaciones tales como la medicina con fines diagnósticos, en oceanografía como trazador, y como pigmento textil.

10 La fluoresceína fue sintetizada por primera vez por el químico alemán Adolf Von Baeyer en 1871, a partir de los derivados del petróleo resorcinol (1,3-dihidroxibenceno) y anhídrido ftálico. Paul Erlich, un bacteriólogo alemán, utilizó el pigmento fluorescente (en forma de sal sódica de fluoresceína), conocida entonces como "uranina", para trazar la ruta de secreción de humor acuoso en el ojo. Se cree que éste es el primer caso de uso de pigmento fluorescente *in vivo* para estudiar la fisiología.

15 La angiografía con fluoresceína es una importante herramienta diagnóstica que permite el estudio del estado de los vasos sanguíneos en el fondo del ojo. Estos vasos representan un factor clave en muchas enfermedades que implican a la retina. La angiografía se lleva a cabo inyectando fluoresceína en una vena del brazo del sujeto. En un corto tiempo (típicamente de entre unos pocos a unos cuantos segundos), el pigmento viaja hasta los vasos en el fondo del ojo y se utiliza una cámara con filtros especiales para obtener imágenes del pigmento a medida que circula en los vasos sanguíneos oculares. Mediante el examen de las imágenes producidas de esta manera, puede realizarse una evaluación de cualquier problema circulatorio, por ejemplo la extravasación, el hinchado, vasos anormales o nuevos, y otros.

20 La fluoresceína absorbe la luz azul, con picos de absorción y excitación en longitudes de onda entre 465 y 490 nm. La fluorescencia se produce en las longitudes de onda del amarillo-verde, de 520 a 530 nm. Aunque comúnmente se denomina fluoresceína, el pigmento utilizado en la angiografía es la fluoresceína sódica, la sal disódica soluble de la fluoresceína.

25 La dosis adulta normal de la fluoresceína es de 500 mg mediante inyección intravenosa. Típicamente se empaqueta en dosis de 5 ml de una solución al 10% ó 2 ml de una solución al 25%. Tras entrar en el sistema circulatorio, aproximadamente 80% de las moléculas de pigmento se unen a la proteína sérica. El resto de moléculas de fluoresceína no unidas o libres emiten fluorescencia al excitarlas con luz de la longitud de onda apropiada. El pigmento es metabolizado por el hígado, formando monoglucurónido de fluoresceína, y es finalmente eliminado en la orina en las 24 a 36 horas posteriores a la administración.

30 Se ha informado de que la pureza de la fluoresceína en las formulaciones de fluoresceína puede correlacionarse con efectos secundarios y tolerancia a la inyección ("Effective differences in the formulation of intravenous fluorescein and related side effects", de Yannuzi *et al.*, Am. J. Ophthalmol. 78(2):217-221, 1974). La eliminación de la totalidad, o sustancialmente la totalidad, de impurezas de las composiciones de fluoresceína utilizadas para la angiografía es, por lo tanto, uno de los objetivos importantes de la presente invención.

Puede hacerse referencia a las publicaciones siguientes para información adicional sobre las composiciones de fluoresceína y procedimientos para la preparación y purificación de la fluoresceína.

40 La patente alemana nº DD 136498 (Friedrich *et al.*), titulada "Process for Preparing Highly Purified Fluorescein for Injection Purposes" describe un procedimiento para preparar fluoresceína utilizando piridina.

La solicitud de patente publicada nº US2006/0106234A1 (Tran-Guyon *et al.*), titulada "High Purity Phthalein Derivatives and Method for Preparing Same" describe un procedimiento para preparar fluoresceína utilizando un solvente anhidro.

45 Las patentes o publicaciones siguientes también pueden consultarse para conocer más antecedentes: la patente US nº 5.637.733 (Sujeeth), titulada "Synthesis of Fluorescein Compounds with Excess Resorcinol as a Solvent" y la patente US nº 1.965.842 (Kranz), titulada "Production of Hydroxybenzene-Phthaleins".

50 La fluoresceína altamente purificada resulta necesaria para la preparación de soluciones con fines de inyección. La fluoresceína purificada utilizada idealmente debe: (i) encontrarse libre de impurezas, que pueden ser tóxicas y/o no presentar fluorescencia, (ii) ser baja en sal, lo que puede conducir a una osmolalidad inaceptablemente alta o hipertonicidad del producto de fluoresceína inyectable, e (iii) presentar poco color. Determinadas impurezas presentan un color fuerte. La ausencia de color a frecuencias particulares puede indicar, por lo tanto, la ausencia de dichas impurezas. El perfil de color de las composiciones de fluoresceína se considera, por lo tanto, un atributo de calidad significativo y un marcador visual de pureza.

Resulta necesario un método para identificar y cuantificar los niveles muy bajos de impurezas que pueden encontrarse presentes en las composiciones de fluoresceína. Dicho método debería poder separar, identificar y cuantificar las impurezas que puedan encontrarse presentes.

- 5 De esta manera, existe una necesidad de una composición de fluoresceína que sea altamente pura, con poco color, bajo contenido en cloruro sódico y de un procedimiento para producir dicha fluoresceína que no requiera la utilización de piridina o de otro solvente no acuoso (y potencialmente nocivo), así como de un método para determinar la pureza de dicha fluoresceína. La presente invención se refiere a la satisfacción de dicha necesidad.

Sumario de la invención

10 La presente invención se refiere a nuevos procedimientos mejorados para la preparación de fluoresceína purificada, es decir, a un procedimiento para preparar fluoresceína sustancialmente pura, que comprende:

- (a) convertir fluoresceína de grado comercial en O,O'-diacetilfluoresceína utilizando anhídrido acético como solvente y como reactivo, a temperatura de reflujo,
- (b) hidrolizar la diacetilfluoresceína preparada a partir de fluoresceína de grado comercial, con hidróxido sódico en agua para formar fluoresceína,
- 15 (c) añadir carbón, eficaz para reducir el número de color, a la fluoresceína en solución para formar una mezcla de fluoresceína/carbón,
- (d) filtrar la mezcla de fluoresceína/carbón para formar un filtrado,
- (e) añadir etanol al filtrado para obtener una proporción de 2:1 de etanol con respecto al agua,
- 20 (f) ajustar el pH a un nivel comprendido entre 1,0 y 2,5 utilizando una solución de ácido clorhídrico, bajo enfriamiento durante un periodo de 2 a 4 horas para formar un precipitado.
- (g) filtrar la solución para retener el precipitado, y
- (h) lavar el precipitado con agua y etanol,

en el que la fluoresceína resultante se define como sustancialmente pura en el caso de que haya una ausencia total, o prácticamente total, de impurezas.

- 25 La fluoresceína altamente purificada producida mediante el método de la invención presenta un nivel más bajo de impurezas de sustancias relacionadas que las composiciones de fluoresceína de la técnica anterior. La fluoresceína producida mediante estos nuevos procedimientos también presenta menos color (a 590 nm) que otras composiciones conocidas, proporcionando un marcador fácilmente visible de pureza. La fluoresceína también presenta un contenido de cloruro sódico menor y, por lo tanto, se formula más fácilmente para el uso farmacéutico que otras composiciones conocidas. Los procedimientos de la invención mejoran otros procedimientos conocidos mediante la eliminación de la utilización de piridina en el procedimiento de purificación, al no requerir la utilización de solvente anhidro, reduciendo la cantidad de anhídrido acético requerido para acetilar la fluoresceína cruda, y mejorando el rendimiento de fluoresceína altamente purificada. La presente descripción también hace avanzar el estado de la técnica al proporcionar un método fiable para separar y cuantificar impurezas de sustancias relacionadas en las composiciones de fluoresceína y para, por lo tanto, determinar la pureza de las composiciones de fluoresceína.
- 30
- 35

Una forma de realización de la presente invención se refiere a un procedimiento para preparar fluoresceína sustancialmente pura. El procedimiento comprende hidrolizar diacetilfluoresceína formando fluoresceína, tratar la fluoresceína con carbón, filtrar, añadir etanol al filtrado, ajustar el pH utilizando una solución ácida para formar un precipitado, filtrar y lavar. En un aspecto de la presente forma de realización, se ajusta el nivel de pH de 1,0 a 2,5. En otros aspectos, se mantiene una temperatura de enfriamiento de entre 20°C y 25°C, ajustando simultáneamente el nivel del pH, y el nivel del pH se ajusta durante un periodo de 2 a 4 horas.

40

También se describe un método de HPLC para cuantificar los niveles de impurezas de sustancias relacionadas de la fluoresceína. El método comprende obtener un cromatograma de cromatografía líquida de alta presión de la composición; identificar picos en el cromatograma correspondientes a impurezas de sustancias relacionadas y obtener mediciones del área de los picos para determinar una concentración relativa de las mismas. En un aspecto de dicho método, los picos presentan tiempos de retención de HPLC relativos de aproximadamente 0,75, 1,19, 1,23, 1,68 y 1,71. Se describe además un método de HPLC/MS para identificar las impurezas de sustancias relacionada en la fluoresceína.

45

50 La presente invención se comenta más completamente con la ayuda de las figuras y descripción detallada siguientes.

Breve descripción de los dibujos

La fig. 1 es un esquema de un diseño experimental de experimentos de purificación de fluoresceína.

La fig. 2 es un esquema de un diseño experimental de experimentos de pH/precipitación de fluoresceína.

5 La fig. 3 es un espectro de UV/VIS que muestra la intensidad del color de una sustancia farmacológica de fluoresceína tal como se describe en el Ejemplo 3.

La fig. 4 es un cromatograma de HPLC de blanco de diluyente tal como se describe en el Ejemplo 5.

La fig. 5 es un cromatograma de HPLC de estándar de referencia de fluoresceína al 1% USP tal como se describe en el Ejemplo 5.

10 La fig. 6 es un cromatograma de HPLC de materia prima de fluoresceína del proveedor A tal como se describe en el Ejemplo 5.

La fig. 7 es un cromatograma de HPLC de materia prima de fluoresceína con adición de resorcinol al 0,8% tal como se describe en el Ejemplo 5.

La fig. 8 es un diagrama de la estructura de la fluoresceína y de las estructuras propuestas de impurezas de sustancias relacionadas, tal como se describen en los Ejemplos 5 y 6.

15 La fig. 9 es un cromatograma de HPLC representativo de la fluoresceína del sistema de LC/MS.

La fig. 10 es: (a) un cromatograma de fluoresceína con detección de UV, y (b) un espectro de masas de termopulverización del pico de HPLC de la fluoresceína muestreado en 13,65-14,45 minutos.

20 La fig. 11 es: (a) un cromatograma de la Impureza A en la fluoresceína con detección selectiva de masas en m/z 259 utilizando el espectrómetro de masas, y (b) un espectro de masas de termopulverización del pico de HPLC de la Impureza A muestreada en 11,95-12,05 minutos.

La fig. 12 es: (a) un cromatograma de la Impureza B en la fluoresceína con detección selectiva de masas en m/z 285 utilizando el espectrómetro de masas, y (b) un espectro de masas de termopulverización del pico de HPLC de la Impureza B muestreada en 15,45-15,55 minutos.

25 La fig. 13 es: (a) un cromatograma de la Impureza C en la fluoresceína con detección selectiva de masas en m/z 347 utilizando el espectrómetro de masas, y (b) un espectro de masas de termopulverización del pico de HPLC de la Impureza C muestreado en 16,10-16,50 minutos.

La fig. 14 es: (a) un cromatograma de la Impureza D en la fluoresceína con detección selectiva de masas en m/z 347 utilizando el espectrómetro de masas, y (b) un espectro de masas de termopulverización del pico de HPLC de la Impureza D muestreada en 18,20-18,65 minutos.

30 La fig. 15 es: (a) un cromatograma de la Impureza E en la fluoresceína con detección selectiva de masas en m/z 333 utilizando el espectrómetro de masas, (b) es un espectro de masas APCI del pico de HPLC de la Impureza E muestreado en 13,23-13,52 minutos, (c) un cromatograma de la Impureza E en la fluoresceína con detección mediante el escaneo total de las absorbancias entre 220 y 500 nm, y (d) un espectro de UV-Vis del pico de la Impureza E.

35 La fig. 16 es: (a) un cromatograma de la Impureza F en la fluoresceína con detección selectiva de masas en m/z 425 utilizando el espectrómetro de masas, (b) es un espectro de masas APCI del pico de HPLC de la Impureza F muestreado en 19,10-19,32 minutos, (c) un cromatograma de la Impureza F en la fluoresceína con detección mediante el escaneo total de las absorbancias entre 220 y 500 nm, y (d) un espectro de UV-Vis del pico de la Impureza F.

40 La figura 17 es: (a) un cromatograma de la Impureza G en la fluoresceína con detección selectiva de masas en m/z 375 utilizando el espectrómetro de masas, (b) es un espectro de masas APCI del pico de HPLC de la Impureza G muestreado en 21,27-21,54 minutos, (c) un cromatograma de la Impureza G en la fluoresceína con detección mediante el escaneo total de las absorbancias entre 220 y 500 nm, y (d) un espectro de UV-Vis del pico de la Impureza G.

45 La figura 18 es: (a) un espectro de masas APCI del pico de HPLC de la Impureza H-1 muestreado en 51,75-51,85 minutos, y (b) un cromatograma de la Impureza H-1 en la fluoresceína con detección mediante el escaneo total de las absorbancias entre 220 y 500 nm.

50 La figura 19 es: (a) un espectro de masas APCI del pico de HPLC de la Impureza H-2 muestreado en 52,67-52,79 minutos, y (b) un cromatograma de la Impureza H-2 en la fluoresceína con detección mediante el escaneo total de las absorbancias entre 220 y 500 nm.

La figura 20 es el escaneo de absorbancias de UV-Vis de la Impureza H-2.

Descripción detallada de la invención

Tal como se utiliza en la presente memoria, las abreviaturas y términos siguientes, a menos que se indique lo contrario, debe entenderse que presentan los significados siguientes:

5 la abreviatura "APCI" se refiere a la ionización química a presión atmosférica.

La abreviatura "M/S" o "MS" se refiere a un espectrómetro de masas.

La abreviatura "HPLC" se refiere a la cromatografía líquida de alto rendimiento.

La abreviatura "UV-Vis" se refiere al ultravioleta-visible.

La abreviatura "LC/MS" se refiere a cromatografía líquida/espectrómetro de masas.

10 El término "carbón" comprende los agentes de carbón activado que resultan efectivos en la reducción del número de color. Entre los agentes ejemplares se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, Norit[®] SA Plus y Norit[®] SX Ultra, disponible comercialmente del proveedor Univar USA, Dallas, Texas. Las formas de carbón capaces de reducir el número de color pueden determinarse mediante experimentación rutinaria (se ha determinado, por ejemplo, que otra forma disponible comercialmente de carbón que no resulta efectiva para reducir el número de color, es decir, Darco[®] KB).

15 La expresión "número de color" es la absorbancia de una solución al 1,0% de materia prima de fluoresceína preparada en hidróxido sódico acuoso y solución de bicarbonato sódico a pH 9,4, medida a 590 nm.

Las expresiones "sustancia farmacológica de fluoresceína" y "materia prima de fluoresceína" se utilizan intercambiabilmente en la presente memoria.

20 La expresión "impureza de sustancia relacionada" comprende impurezas sintéticas, isómeros, productos de oxidación, productos de dimerización y productos de descomposición de fluoresceína y/o reactivos de fluoresceína. En la figura 8 se muestran estructuras ejemplares de dichas impurezas de sustancias relacionadas.

25 La expresión "sustancialmente sin piridina" se refiere a que la composición de fluoresceína no presenta piridina por lo menos al 99%. Más preferente es el caso en que la pureza analítica es de por lo menos 99,9%, todavía más preferentemente la composición de fluoresceína se encuentra completamente libre de piridina.

30 La expresión "fluoresceína sustancialmente pura" se refiere a la ausencia total, o a la ausencia prácticamente total, de impurezas, tales como las impurezas de sustancias relacionadas. Por ejemplo, en el caso de una composición de fluoresceína sustancialmente pura, no se observan impurezas de sustancias relacionadas detectables, o en el caso de que se detecta una sola impureza de sustancia relacionada, se encuentra presente en una cantidad no superior a 0,1% en peso, o en el caso de que se detecten múltiples impurezas de sustancias relacionadas, se encuentran presentes agregadas en una cantidad no superior a 0,6% en peso.

35 Los procedimientos de la presente invención producen productos de fluoresceína con perfiles bajos de impurezas de sustancias relacionadas. Es generalmente conocido que incluso el material de fluoresceína purificado puede contener niveles bajos de determinadas impurezas, por ejemplo resorcinol y ácido 2-(2',4'-dihidroxibenzoil)benzoico. Sin embargo, no se conocía anteriormente que las muestras comerciales de fluoresceína podían contener varias impurezas además del resorcinol y el ácido 2-(2',4'-dihidroxibenzoil)benzoico. La cantidad de estas impurezas potenciales se reduce sustancialmente mediante los procedimientos de la presente invención. Dichas impurezas se denominan colectivamente en la presente memoria "impurezas de sustancias relacionadas".

40 Se llevaron a cabo experimentos para determinar los pesos moleculares de dichas impurezas de sustancias relacionadas mediante LC/MS, y, aunque pretender restringirse a ninguna teoría en particular, se proponen en la presente memoria estructuras para dichas impurezas (ver la figura 8). Se ha descubierto un procedimiento para resolver y cuantificar el bajo nivel de impurezas de sustancias relacionadas que puede encontrarse presente incluso en composiciones de fluoresceína purificadas y se describe en detalle posteriormente. Se ha descubierto que los procedimientos de la presente invención proporcionan una fluoresceína altamente purificada que presenta niveles sustancialmente reducidos de impurezas de sustancias relacionadas. Lo anterior puede observarse en los perfiles de impurezas de la sustancia farmacológica de fluoresceína purificada preparada mediante el procedimiento de la presente invención, tal como se muestra posteriormente, en la Tabla 1, en comparación con el perfil de impurezas de la fluoresceína de grado técnico de diversos fabricantes, tal como se muestra en la Tabla 2, posteriormente, y el perfil de impureza de sustancia farmacológica de fluoresceína de diversos fabricantes, tal como se muestra posteriormente, en las Tablas 3 a 5.

Tabla 1

Perfiles de impurezas de lotes de validación de la sustancia farmacológica de fluoresceína del método de la presente invención^a

Referencia nº	Impureza A	RRT	Impureza C	Impureza D	Impureza E	Impureza F	Impureza G	Impureza H-1	Impureza H-2	RRT 1,74	Total (%)
1	ND ^b	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND ^b
2	ND	ND	ND	ND	ND	< LOQ ^c	ND	< LOQ ^c	< LOQ ^c	ND	ND
3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	< LOQ ^c	ND	ND

^a Se analizó el resorcinol mediante un método separado en cada uno de los tres lotes. La concentración de resorcinol en cada lote era inferior al 0,05%.

^b ND=No detectado, <0,01%^c.

^c LOQ=Inferior al límite de cuantificación del 0,025%; estimado en 0,01%.

Tabla 2
Perfiles de impurezas de fluoresceína de grado técnico de diversos fabricantes

Nº de ref. del proveedor	Impureza A (%)	RRT 1,10 (%)	Impureza C (%)	Impureza D (%)	Impureza E (%)	Impureza F (%)	Impureza G (%)	Impureza H-1 (%)	Impureza H-2 (%)	RRT 1,74 (%)	Total (%)
Proveedor B 4	0,3	---	---	0,1	---	0,7	---	0,3	0,3	---	4,4 ^a
Proveedor B 5	0,4	---	---	0,06	---	0,6	---	0,2	0,2	---	3,8 ^a
Proveedor B 6	0,2	---	---	0,01	---	0,5	---	0,2	0,2	---	1,5 ^a
Proveedor B 7	0,6	---	---	0,07	---	0,07	---	0,06	0,1	---	0,9
Proveedor B 8	0,7	---	---	0,07	---	0,08	---	0,06	0,1	---	1,0
Proveedor B 9	0,6	---	---	0,7	---	0,7	---	0,4	0,1	---	0,9
Proveedor B 10	0,45	---	---	0,59	---	0,15	---	0,21	0,22	---	4,21 ^b
Proveedor B 11	0,64	---	---	0,53	---	0,14	---	0,18	0,19	---	4,15 ^b
Proveedor B 12	0,68	---	---	0,54	---	0,14	---	0,18	0,19	---	4,20 ^b
Proveedor B 13	---	---	---	1,22	---	0,11	---	0,97	0,98	0,11	5,57 ^c

Proveedor B 14	5,9	---	---	0,2	---	0,8	---	0,01	0,01	---	9,4 ^d
Proveedor B 15	5,6	---	---	0,1	---	0,9	---	0,01	0,02	---	9,6 ^d
Proveedor B 16	5,3	---	---	0,2	---	1,0	---	0,01	0,02	---	9,5 ^d
Proveedor B 17	5,3	---	---	0,2	---	1,0	---	0,01	0,03	---	9,7% ^d

^a Impurezas desconocidas también presentes en una concentración de entre 0,06% y 0,9%.

^b Impurezas desconocidas también presentes en una concentración de entre 0,06% y 0,7%.

^c Impurezas desconocidas también presentes en una concentración de entre 0,05% y 0,5%.

^d Impurezas desconocidas también presentes en una concentración de entre 0,06% y 0,8%.

Tabla 3
 Perfil de impurezas de sustancia farmacológica de fluoresceína fabricada por el proveedor A

Nº de ref. del proveedor	Impureza A (%)	RRT 1,10 (%)	Impureza C (%)	Impureza D (%)	Impureza E (%)	Impureza F (%)	Impureza G (%)	Impureza H-1 (%)	Impureza H-2 (%)	RRT 1,74 (%)	Total (%)
Proveedor B 18	< 0,05	---	---	---	0,1	0,3	---	---	---	---	0,4
Proveedor B 19	< 0,05	---	---	---	< 0,05	0,09	---	---	---	---	0,09
Proveedor B 20	0,2	---	---	---	0,06	0,09	-	---	---	---	0,4

Tabla 4
 Perfil de impurezas de sustancia farmacológica de fluoresceína fabricada por el proveedor E

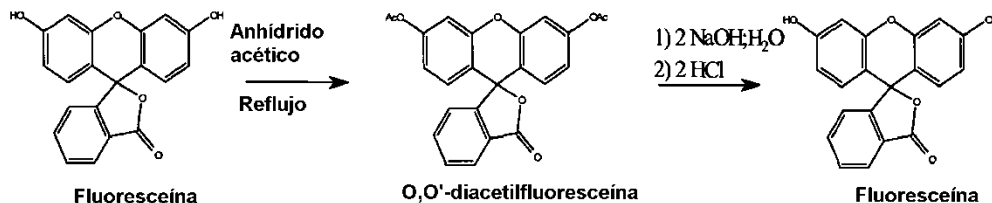
Nº de ref. del proveedor	Impureza A (%)	RRT 1,10 (%)	Impureza C (%)	Impureza D (%)	Impureza E (%)	Impureza F (%)	Impureza G (%)	Impureza H-1 (%)	Impureza H-2 (%)	RRT 1,74 (%)	Total (%)
Proveedor B 21	< 0,05	---	< 0,05	---	< 0,05	< 0,05	0,08	---	---	---	0,08
Proveedor B 22	< 0,05	---	< 0,05	---	< 0,05	< 0,05	0,07	---	---	---	0,07
Proveedor B 23	< 0,05	---	< 0,05	---	< 0,05	< 0,05	0,1	---	---	---	0,1
Proveedor B 24	---	---	---	< 0,05	---	< 0,05	---	0,06	< 0,05	---	0,06
Proveedor B 25	0,07	---	---	0,05	---	0,2	< 0,05	0,1	0,2	---	0,6
Proveedor B 26	0,06	---	---	0,05	---	0,2	< 0,05	0,1	0,2	---	0,6
Proveedor B 27	0,07	---	---	0,05	---	0,2	< 0	---	---	---	---

Tabla 5
 Perfil de impurezas de sustancia farmacológica de fluoresceína fabricada por el proveedor F

Nº de ref. del proveedor	Impureza A (%)	RRT 1,10 (%)	Impureza C (%)	Impureza D (%)	Impureza E (%)	Impureza a F (%)	Impureza G (%)	Impureza H-1 (%)	Impureza H-2 (%)	RRT 1,74 (%)	Total (%)
Proveedor B 28	0,1	0,03	---	0,05	---	0,2	---	0,1	0,1	0,03	0,7
Proveedor B 29	0,03	< 0,025	---	0,03	---	0,05	---	0,05	0,06	< 0,025	0,2
Proveedor B 30	0,05	< 0,025	---	0,04	---	0,1	---	0,1	0,1	0,04	0,5
Proveedor B 31	0,04	< 0,025	---	0,04	---	0,07	---	0,09	0,1	0,03	0,4
Proveedor B 32	0,04	---	---	0,04	---	0,1	---	0,07	0,08	---	0,3
Proveedor B 33	0,03	---	---	0,04	---	0,09	---	0,07	0,07	---	0,3
Proveedor B 34	0,04	---	---	0,03	---	0,08	---	0,05	0,05	---	0,3
Proveedor B 35	0,03	---	---	0,04	---	0,08	---	0,07	0,08	---	0,3
Proveedor F 36	0,03	---	---	0,04	---	0,1	---	0,08	0,1	---	0,4
Proveedor F 37	0,03	---	---	0,04	---	0,08	---	0,07	0,09	---	0,3

Proveedor F 38	0,03	---	---	0,04	---	0,1	---	0,08	0,07	---	0,3
Proveedor F 39	0,03	---	0,0	---	0,1	---	---	0,09	0,07	---	0,3
Proveedor F 40	0,03	---	0,03	0,04	---	0,08	---	0,08	0,07	---	0,3
Proveedor F 41	0,03	---	0,03	0,04	---	0,07	---	0,07	0,07	---	0,3
Proveedor F 32	0,03	---	0,03	0,04	---	0,09	---	0,07	0,07	---	0,3
Proveedor F 43	0,04	---	---	0,03	---	0,09	---	---	---	---	---

Se ilustra posteriormente un esquema del procedimiento general que implica la presente invención. Se diacetiló fluoresceína de grado comercial mediante reacción con anhídrido acético a temperaturas de reflujo. Se aisló la fluoresceína diacetilada producida de esta manera y después se hizo reaccionar con base para producir la fluoresceína desacetilada, que seguidamente se trató con carbón para producir una fluoresceína de bajo nivel de color de alta pureza y bajo contenido de cloro. Se ilustra el esquema de reacción a continuación:



Los solventes, tiempos de reacción y temperaturas, y valores de pH particulares utilizados para preparar la fluoresceína pura se han determinado basándose en una serie de experimentos. Los objetivos de dichos experimentos fueron obtener una fluoresceína de grado farmacéutico de alta pureza de bajos niveles de color y contenido de sales, y evitar la utilización de un solvente nocivo que se utiliza en los métodos conocidos de la técnica anterior, es decir, la piridina. Son objetivos adicionales minimizar el coste y tiempo implicados en los procedimientos mediante, por ejemplo, la utilización de cantidades mínimas de solventes o la reducción del tiempo o tiempos de ciclo de reacción de las etapas necesarias.

El procedimiento de purificación de la fluoresceína se inicia en la conversión de la fluoresceína en O,O'-diacetilfluoresceína. Con este fin se utilizó anhídrido acético como solvente y como reactivo, evitando totalmente la utilización de piridina, un solvente nocivo utilizado en procedimiento de la técnica anterior. De esta mane, se agitó una mezcla de fluoresceína y anhídrido acético durante varias horas bajo reflujo y la suspensión resultante se dejó enfriar. El enfriamiento adicional hasta el nivel de congelación o hasta un nivel inmediatamente inferior provoca la cristalización completa. Se recoge el material cristalizado y se lava en primer lugar con anhídrido acético frío y después con acetona fría. A continuación, se resuspendió el material en acetona bajo agitación y calentamiento suave. Tras enfriar, se recogió el material cristalino blanco, se lavó con acetona fría y se secó al aire, proporcionando O,O'-diacetilfluoresceína de alta pureza.

A continuación, se convirtió la O,O'-diacetilfluoresceína nuevamente en fluoresceína, con la formación de la sal sódica y la eliminación de las impurezas finales. Para llevar a cabo esta conversión, se hidrolizaron los grupos acetilo de la O,O'-diacetilfluoresceína utilizando una solución cáustica. De esta manera, se cargaron O,O'-diacetilfluoresceína y metanol en un recipiente adecuado, se añadió una solución preparada de hidróxido sódico en agua desionizada y se calentó la mezcla bajo reflujo con agitación. A continuación, se enfrió la mezcla, se filtró utilizando un adyuvante de filtración y después se lavaron con metanol. Seguidamente redujo el volumen del filtrado mediante destilación al vacío, se añadió agua y se enfrió la mezcla de reacción. A continuación se ajustó el pH de la mezcla de reacción a un valor entre 8,5 y 8,7. Se añadió un carbón adecuado, por ejemplo Norit[®] SX Ultra, bajo agitación durante una hora. En caso necesario, se repitió la etapa del carbón. Seguidamente, se siguieron las etapas críticas de precipitación. En primer lugar, se añadió etanol al filtrado de manera que se obtuviese una proporción de 2:1 de etanol con respecto al agua. Esta proporción se basa en el inesperado descubrimiento de que una proporción más alta de solvente orgánico a agua en el procedimiento de precipitación rinde un contenido de cloro más bajo en el producto de fluoresceína. Los experimentos llevados a cabo para detectar dicho efecto se describen en mayor detalle posteriormente. A continuación, para acidificar la fluoresceína, se añadió una solución diluida de ácido clorhídrico para establecer un intervalo calibrado de pH. Este intervalo se basa en el inesperado descubrimiento de que un pH más bajo proporciona un producto con un color más deseable. Más concretamente, se determinó mediante experimentación que el intervalo de pH óptimo del filtrado debe encontrarse comprendido entre 1,0 y 2,5, y que la acidificación debería llevarse a cabo lentamente, a lo largo de un periodo de tiempo de dos a cuatro horas, de manera que se evite la agregación del producto, y bajo enfriamiento. Tras la agitación y enfriamiento adicionales, seguidamente se aisló la fluoresceína mediante filtración. Se lavó el producto con una solución de agua y etanol, y el producto se secó, proporcionando un rendimiento de entre 80% y 90% de fluoresceína de muy alta calidad. La fluoresceína de alta pureza puede utilizarse en la preparación de fluoresceína para la inyección. Con este fin, se convirtió la fluoresceína en la forma de sal disódica soluble utilizando hidróxido sódico y se rellenaron ampollas con la misma para la esterilización posterior.

Un ejemplo de la experimentación realizada para llevar a cabo el procedimiento de la invención es la calibración del intervalo de pH en el que se precipita el producto de fluoresceína. Este intervalo de pH se ajustó de un intervalo más alto a uno más bajo en parte basándose en observaciones empíricas sobre el espectro de color del producto formado. De esta manera, se determinó que el intervalo óptimo de pH en el que debería precipitarse el producto de fluoresceína para conseguir el objetivo de un producto de bajo nivel de color es de entre pH 1,0 y pH 2,5.

También se ha descubierto inesperadamente que las proporciones más altas de solvente orgánico a solvente acuoso durante el procedimiento de preparación rinden un contenido de cloro más bajo en el producto de fluoresceína. Este resultado no fue anticipado, ya que se esperaba que resultase necesaria una proporción

orgánico/acuoso baja para reducir el nivel de cloruro sódico. La utilización de proporciones más altas de solvente orgánico presenta el beneficio añadido de mejorar la tasa de filtración, reduciendo de esta manera el tiempo necesario para procesar el material.

- 5 Se llevaron a cabo experimentos de precipitación adicionales para desarrollar procedimientos para la presente invención y se describe posteriormente, y se muestran en las figuras 1 y 2. En particular, se llevaron a cabo experimentos para reducir el nivel de cloro mediante la modificación del procedimiento de precipitación, tal como se muestra en la Tabla 6, a continuación.

Tabla 6: experimentos de precipitación

Referencia del experimento	Proporción de agua:etanol	Volúmenes	Lavado* (S o N)	Cloro (% en peso)	Comentario
A	1:1	10	N	0,91	Sólido amarillo-rojo
	1:1	15	N	0,87	Sólido amarillo-rojo
B	1:1	10	N	0,80	Sólido amarillo-rojo
	2:1	15	N	0,97	Sólido amarillo-rojo
C	1:1	10	N	0,76	Sólido amarillo-rojo
	1:2	15	N	0,65	Sólido rojo oscuro
D	1:1	10	N	1,45	Rendimiento de 86% de sólido amarillo-rojo
E	1:2	15	N	0,45	Rendimiento de 92% de sólido rojo oscuro
F	1:1	10	Y	0,10	Rendimiento de 87% de sólido amarillo-rojo
G	1:2	15	Y	0,0056	Rendimiento de 78% de sólido rojo oscuro
H	1:1	10	N	1,05	Sólido amarillo-rojo
I	1:2	15	N	0,49	Sólido rojo oscuro
J	1:1	10	Y	0,13	Sólido amarillo-rojo
K	1:2	15	Y	0,026	Sólido rojo oscuro

*Agua:etanol, 3:1, lavado de volumen 2x1

- 10 La Tabla 6 muestra que una modificación de la proporción de solventes del medio de precipitación afecta a la cantidad de cloro presente. En particular, el incremento de la proporción de etanol a agua en el medio de precipitación produce un contenido de cloro más bajo. El experimento A muestra una reducción marginal del contenido de cloro al incrementar el volumen del medio de precipitación de agua:etanol (1:1) de 10 volúmenes (referencia) a 15 volúmenes (ver la Tabla 6). El experimento B compara la precipitación a partir de agua:etanol (1:1, 10 volúmenes, referencia) con la precipitación a partir de agua:etanol (2:1, 15 volúmenes). El resultado del experimento es antiintuitivo en el sentido que la reacción de referencia que presenta un contenido de agua más bajo y menos volumen produce un contenido de cloro más bajo.

- 15 El experimento C compara la precipitación a partir de agua:etanol (1:1, 10 volúmenes, referencia) con la precipitación a partir de agua:etanol (1:2, 15 volúmenes). Los resultados del experimento C muestran que el medio de precipitación con contenido orgánico más alto produce un contenido de cloro más bajo.

- 20 La tendencia a que el contenido orgánico más alto en el medio de precipitación produzca un contenido de cloro más bajo se reproduce en los experimentos D, E, F y G, y en los experimentos H, I, J y K para el producto tanto no lavado como el lavado. Aunque los resultados aparentemente son antiintuitivos, se cree, aunque sin restringirse a

ninguna teoría en particular, que el contenido orgánico más alto permite un lavado más rápido y eficiente de la tarta de producto.

Otro aspecto considerado es si el color de la fluoresceína depende del pH del medio de precipitación; ver la Tabla 7, a continuación, en la que se ha utilizado un medio de precipitación de etanol:agua en una proporción de 2:1.

5

Tabla 7

Color de la fluoresceína como función del pH

[Medio de precipitación de etanol:agua (2:1)]

Referencia del experimento	pH 1,0 a 1,5	pH 2,0 a 2,5	pH 3,0 a 3,5	pH 4,0 a 4,5
L	Sólido rojo	Sólido rojo	Sólido granate	Sólido marrón

10 Los resultados indican que el color de la fluoresceína es sensible a los cambios del pH. Por ejemplo, a un pH de aproximadamente 3,0, la apariencia del producto empieza a adoptar un tono granate, que se considera no deseable.

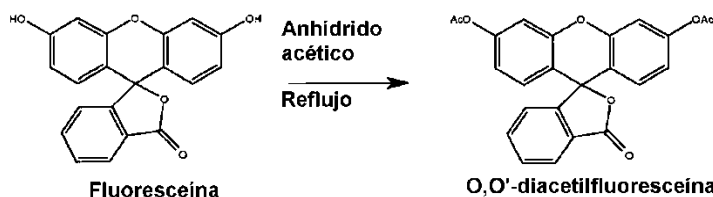
Los Ejemplos 1 a 8, posteriormente, se proporcionan a fin de ilustrar adicionalmente determinadas formas de realización de la invención. Los datos representativos obtenidos de los Ejemplos 5, 6, 7 y/o 8 se muestran en las figuras 9 a 19.

15 Los datos para las figuras 9 a 14 se obtuvieron con un LC/MS utilizando un espectrómetro de masas por termopulverización conectado a un HPLC. Se observaron los picos mediante la utilización de un detector de UV (280 nm) y un espectrómetro de masas por termopulverización. Condiciones experimentales: instrumento=espectrómetro de masas por termopulverización Vestec modelo 201B conectado a un sistema MS-HPLC modelo 600 de Waters y a un detector de UV (280 nm) modelo 486MS de Waters; columna=Symmetry C-8 de Waters, 5 µm, 3,9x150 mm; fase móvil=gradiente lineal programado de 0% B a 100% B durante 25 minutos; fase móvil A=acetato amónico 0,1 M en metanol:agua 10:90 v:v; fase móvil B=acetato amónico 0,1 M en metanol; caudal=1,0 ml/minuto; concentración de la muestra=puro; y volumen de inyección=20 µl.

20 Los datos para las figuras 15 a 20 se obtuvieron con un LC/MS utilizando un espectrómetro de masas conectado a un HPLC. El espectrómetro de masas se utilizó con el interfaz de ionización química a presión atmosférica (APCI) y el espectrómetro se hizo funcionar en el modo de iones positivos de detección. Los picos se observaron mediante la utilización de un detector de UV-Vis realizando un seguimiento de la absorbancia total entre 220 y 500 nm y el espectrómetro de masas. Se utilizó una columna Symmetry C-8 de Waters (3,9x150 mm) a un caudal de 0,6 ml/minuto y se programó de 0% de fase móvil B a 100% de fase móvil B durante 30 minutos. La fase móvil B era acetato amónico 0,01 M en metanol y la fase móvil A era acetato amónico 0,01 M en metanol:agua 10:90.

Ejemplo 1

30 Formación de diacetato de fluoresceína

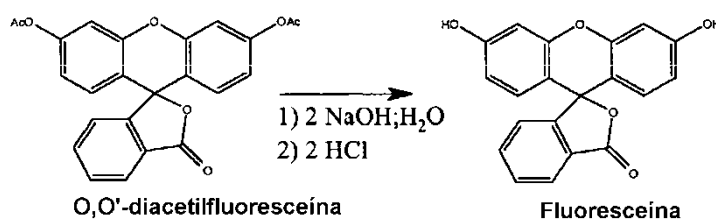


35 A un matraz de fondo redondo de 3 cuellos de 5 litros se añadieron fluoresceína (1.000 g, 3,01 moles) y anhídrido acético (1.622 g, 15,9 moles). La mezcla resultante se agitó durante 3 a 5 horas bajo reflujo y la suspensión resultante se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente. Bajo agitación continua, la mezcla de reacción se enfrió adicionalmente hasta una temperatura de entre -5°C y 3°C para provocar la cristalización completa. El material cristalizado se recogió en un filtro Buchner, se lavó con anhídrido acético frío (2x500 ml) y después acetona fría (1x600 ml). El material se secó parcialmente y se resuspendió en acetona (1.000 ml) bajo agitación y calentamiento suave. Tras el enfriamiento, se recogió el material cristalino blanco sobre un filtro, se lavó con acetona fría (2x700 ml) y se secó al aire. Rendimiento: ~75% a 85%; único punto mediante TLC; PF=203°C a 205,5°C y pureza del 99,7%.

40

Ejemplo 2

Formación de fluoresceína a partir de diacetil-fluoresceína, formación de sal sódica y eliminación de las impurezas finales



Se cargaron O,O'-diacetilfluoresceína (1.000 g) y metanol (4.000 ml) en un reactor adecuado. Separadamente se preparó una solución de hidróxido sódico (480 g, sosa cáustica al 50%) en agua desionizada (620 ml). La solución de hidróxido sódico se cargó en el reactor que contenía la O,O'-diacetilfluoresceína y metanol. Se calentó la mezcla hasta el reflujo y se agitó bajo reflujo durante 90 minutos. La mezcla de reacción se enfrió hasta una temperatura de entre 20°C y 25°C. Se filtró la mezcla utilizando un adyuvante de filtración (100 g), seguido de un lavado con metanol (500 ml). El filtrado (5.000 ml) se destiló bajo vacío hasta un volumen residual de entre 1.400 ml y 1.700 ml y seguidamente la mezcla de reacción se enfrió hasta una temperatura de entre 20°C y 25°C. Se añadió agua desionizada (5.000 ml) al concentrado de destilación. Separadamente, se preparó una solución de hidróxido sódico (56 g, sosa cáustica al 50%) en agua desionizada (72 g). La solución de hidróxido sódico (100 ml) recién preparada se utilizó para ajustar el pH de la reacción a un valor de entre 8,5 y 8,7. Se cargaron Norit SX Ultra (100 g), adyuvante de filtración (100 g) y agua desionizada (500 ml) a la reacción a temperatura ambiente y seguidamente la mezcla se agitó durante 1 hora. Se filtró el lote y se cargaron Norit SX Ultra (100 g) y agua desionizada (500 ml) adicionales al filtrado a temperatura ambiente y la mezcla seguidamente se agitó durante 1 hora. Se filtró el lote y se lavó con agua desionizada (2.000 ml). Se cargó etanol (10.000 ml) en el filtrado. Separadamente, se preparó una solución de ácido clorhídrico mediante la disolución de ácido muriático (al 32%, 820 g) en agua desionizada (320 ml). La solución de ácido diluida se utilizó para ajustar el pH del filtrado a un valor de entre 1,0 y 2,5, manteniendo la temperatura del lote entre 20°C y 25°C. Se agitó el lote a una temperatura de entre 20°C y 25°C durante 1 hora y después se aisló mediante filtración. Se lavó la torta con una solución (agua para inyección:etanol) (3:1) (2x1.000 ml). Se secó el producto, proporcionando un rendimiento típico de entre 80% y 90% de fluoresceína de muy alta calidad.

Ejemplo 3

Intensidad de color de sustancia farmacológica de fluoresceína

Equipos

Espectrofotómetro capaz de aceptar cubetas de 1 cm y escaneo entre 660 nm y 570 nm.

Cubetas de espectrofotómetro (1 cm de camino óptico) de un material apropiado para las longitudes de onda 660 a 570 nm, tal como cuarzo.

Se midió la intensidad del color de la sustancia farmacológica de fluoresceína, tal como se describe posteriormente. El procedimiento se utilizó para determinar en color de una solución al 1,0% de materia prima de fluoresceína preparada en una solución acuosa de hidróxido sódico y una solución de bicarbonato sódico a pH 9,4, mediante la medición de su absorbancia a 590 nm. Este valor también puede denominarse "número de color". Un incremento de la medición de absorción a 590 nm corresponde a un incremento de la intensidad del color visible del producto farmacológico acabado.

Se introdujeron fluoresceína (250 mg \pm 5 mg, pesados con precisión) y bicarbonato sódico (50 mg) en un vaso de 25 ml. Se añadió hidróxido sódico (5 ml de solución al 1%). La solución se calentó suavemente bajo agitación. Se añadió hidróxido sódico (al 1%, hasta 1 ml adicional, total: 6,0 ml) hasta que se había disuelto todo el material y la solución era transparente. Se enfrió la reacción hasta la temperatura ambiente. Se ajustó el pH a 9,4 utilizando solución de hidróxido sódico al 1% gota a gota en caso necesario. En el caso de que el pH fuese superior a 9,4, se descartaba la solución y se preparaba nuevamente utilizando menos hidróxido sódico. La solución se transfirió cuantitativamente a un matraz volumétrico (25 ml) y se añadió CS para 25,0 ml con agua purificada. La concentración final fue de 10 mg/ml, o 1%.

Método

Se fijó el cero del espectrofotómetro estableciendo una línea base con el blanco de agua purificada en las cubetas tanto de muestra como de referencia, escaneando de 660 nm a 570 nm a una tasa de 100 nm/minuto. Se añadió solución de fluoresceína (al 1%) a la cubeta de muestra. Se escaneó la solución de muestra entre 660 nm y 570 nm a una tasa de 100 nm/minuto. Se registró la lectura de absorbancia a 590 nm. Se realizó la medición por duplicado, en una alícuota separada de la muestra. La Tabla 1 lista los resultados típicos de números de color para varios ensayo de muestra de materia prima de fluoresceína utilizando este método. Se corrigieron los resultados utilizando la ecuación mostrada en la sección siguiente. La figura 3 muestra un espectro típico obtenido a partir de una muestra de materia prima de fluoresceína.

Cálculos

Se corrigieron las lecturas de absorbancia para la concentración de muestra, de la manera siguiente:

$$\text{Absorbancia corregida} = \text{Absorbancia} \times (\text{Peso de diana})/(\text{Peso real})$$

5 Se obtuvieron mediciones de la intensidad del color de lotes de muestra de fluoresceína tal como se ha descrito en el Ejemplo 2, y se listan en la Tabla 8, a continuación.

Tabla 8

Número de color para soluciones de fluoresceína al 1%	
Muestra	Número de color
1	0,028 A.U.
2	0,032 A.U.
3	0,018 A.U.
4	0,025 A.U.

Ejemplo 4

Determinación del cloro residual de la fluoresceína utilizando la titulación potenciométrica

10 Equipos

Titulador automático Brinkman 716 DMS Titrino o equivalente

Cambiador de muestras Brinkman 730 y automuestreador 759 Swing Head o equivalente

Electrodo Titrode de Ag

Balanza analítica de 5 sitios decimales o equivalente

15 Sonicador

Placa térmica

Centrífuga capaz de 3.000 rpm

Probetas, 16x125 mm, VWR nº de cat. 47729-578 ó equivalente

Tapones blancos para probetas de 16 mm, VWR nº de cat. 60828-760 ó equivalente

20 Filtros de suero sanguíneo, 6x16 mm, VWR nº de cat. 28295-556 ó equivalente

Se utilizó el método siguiente para cuantificar las cantidades residuales de cloro en la fluoresceína utilizando la titulación potenciométrica con nitrato de plata, un titulador automático y un electrodo de plata.

(1) Preparación de solución de reactivos, hidróxido amónico (5 N)

25 A agua purificada (~600 ml) se añadió hidróxido amónico concentrado (~338 ml) y se diluyó hasta 1.000 ml con agua purificada. Se utilizó esta solución para el autotitulador para enjuagar y almacenar el electrodo de plata.

(2) Preparación de solución estandarizada, nitrato de plata, 0,10 N, acuoso

30 Se utilizó nitrato de plata 0,10 N preparado comercialmente en forma de solución preferentemente con un certificado de análisis. Sin embargo, en caso de no disponerse de una solución comercialmente certificada de nitrato de plata, puede pesarse el nitrato de plata (17,0 g) y disolverse en agua purificada (1.000 ml) y estandarizarse. Se pesó estándar de referencia de cloruro potásico (seco, 50 mg) y se disolvió en agua purificada (~30 ml) en un matraz de titulación. Se añadió ácido nítrico (1 ml) a dicha solución. La solución se tituló potenciométricamente utilizando un electrodo macizo de plata. Cada ml de nitrato de plata 0,10 N era equivalente a 7,455 mg de cloruro potásico. Se calculó la normalidad del nitrato de plata utilizando la ecuación siguiente: $N \text{ AgNO}_3 = (\text{mg de KCl} \times \text{Pureza del KCl})/(\text{ml de AgNO}_3 \times 74,55)$.

35 (3) Preparación de muestra y titulación

Se introdujo materia prima de fluoresceína (2 g) en probetas (16x125 mm). Se añadió agua purificada (caliente, 10 ml). Se añadió ácido nítrico (1 ml) y se taparon todos los tubos, se agitaron durante 2 minutos y se sonicaron durante 15 minutos. Se centrifugaron todos los tubos durante 30 minutos (~3.000 rpm). Se separó el precipitado del sobrenadante utilizando filtros de suero sanguíneo. Se decantó la solución en un matraz de titulación. Se enjuagó el suero sanguíneo y se filtró utilizando agua purificada (porciones de 5 ml). Los enjuagues se vertieron en el matraz de titulación. Se retiraron los filtros de suero sanguíneo y se descartaron. Se repitió el procedimiento anteriormente indicado una segunda vez, excepto en que se taparon todos los tubos y se agitaron durante 1 minuto y todos los tubos se centrifugaron durante 20 minutos (~3.000 rpm). Se agruparon las soluciones del primer y segundo extractos y se enjuagó el filtro de suero con agua purificada. La solución agrupada se tituló con AgNO₃ 0,10 N hasta el punto final potenciométrico. Los parámetros de titulación incluyen utilizar un ciclo de lavado (hidróxido amónico 5 N) y un ciclo de enjuague (hidróxido amónico 5 N) tras cada muestra. Se muestra una lista de los parámetros a continuación.

(4) Cálculos

Porcentaje de cloro= $(V) \times (N) \times 35,453 \times 100 / W$

V=volumen de AgNO₃ 0,10 N titulado

N=normalidad del titulador AgNO₃

35,453=peso molecular del cloro

W=peso de la muestra de fluoresceína extraída

Tabla 9

Cloro residual	
Muestra	Cloro residual
1	0,023%
2	0,018%
3	<0,01%
4	<0,01%

20 **Ejemplo 5**

En este procedimiento, se preparó una solución de materia prima de fluoresceína en metanol y se separó de sus sustancias relacionadas utilizando un sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), programación de gradientes de fases móviles y una columna C-18. Se cuantificaron las sustancias relacionadas frente a una solución al 1% de estándar de referencia de fluoresceína. Se utilizó un detector de HPLC de ultravioleta para medir las respuestas de los picos a una longitud de onda de 280 nm. Fase móvil A: acetato amónico 0,01 M, 10% de metanol/90% de agua y ácido acético al 0,5%. La fase móvil B era acetato amónico 0,01 M, 100% de metanol; ácido acético al 0,5%. El estándar de referencia era una solución 0,5 mg/ml de fluoresceína en metanol, diluida hasta una concentración final de 0,005 mg/ml en metanol, ó 1% de la concentración teórica final de la muestra de 0,5 mg/ml de fluoresceína preparada de manera similar. Se utilizó un sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento capaz de un funcionamiento de gradiente programado, con un detector de UV/VIS de HPLC y la capacidad de realizar el seguimiento a 280 nm. Columna: columna Symmetry C-18 de Waters de 3,9X150 mm, 5 µm (o equivalente) capaz de por lo menos 20.000 placas/columna para la fluoresceína. Caudal: 0,6 ml/minuto. El programa de gradiente fue el siguiente:

Tiempo (minuto)	% de fase móvil A	% de fase móvil B
0	80%	20%
60	20%	80%
Lavado de columna:		
61	0%	100%
66	0%	100%

Se analizaron cuatro lotes de materia prima de fluoresceína del proveedor A utilizando dicho método. Se detectaron siete impurezas y se identificaron cinco impurezas (A, D, F, H-1 y H-2). El porcentaje total de impurezas informables ($\geq 0,025\%$) era de entre 0,2% y 0,7%. Se listan los resultados en la Tabla 10, posteriormente.

5 En una alternativa a dicho procedimiento, se modificaron el diluyente para la muestra y las preparaciones estándares con el fin de permitir el análisis simultáneo del resorcinol y otras impurezas de sustancias relacionadas. Para preparar el diluyente, en primer lugar se disolvió 0,77 g de acetato amónico en 1.000 ml de agua, se ajustó el pH a 3,9 con ácido acético, después se añadieron volúmenes iguales de tampón de acetato amónico y metanol. Tras disolver inicialmente fluoresceína en metanol en una proporción de 50 mg por cada 15 ml, este diluyente
10 seguidamente se utilizó en lugar del metanol para diluir estándares y muestras tal como en el procedimiento descrito en el Ejemplo 5 y también se cambió el blanco de metanol a otro diluyente. Se protegieron de la luz las preparaciones de estándar de fluoresceína y de muestra tras la dilución con el diluyente. Los tiempos de retención relativa típicos (RRT) del resorcinol y del ácido ftálico eran los siguientes:

	RRT	K'	B(%)
Resorcinol	0,13	1,21	24,2%
Ácido ftálico	0,16	1,53	24,9%

15 También puede añadirse un RRF (factor de respuesta relativa) al cálculo de las impurezas, en el que RRF representa la respuesta relativa a la fluoresceína.

Impureza	RRF ¹
Resorcinol	1,7
Ácido ftálico	2,6
Impureza A	0,43
Impureza D	1,0
Impureza F	1,0
Impureza H-1	1,0
Impureza H-2	1,0

20 ¹ Los factores de respuesta relativa de las impurezas D, F, H-1 y H-2 no han sido determinados. Los factores de respuesta relativa de los mismos se supone que son 1,0.

Las concentraciones en porcentaje de cada sustancia relacionada pueden calcularse tal como se muestra a continuación:

$$\% \text{ sustancias relacionadas} = \frac{\text{Concentración de sustancia}}{\text{Concentración de fluoresceína}} \times \text{RRF} \times 100$$

25 Tabla 10

Resultados del ensayo de HPLC de la materia prima de fluoresceína del proveedor A

Referencia del lote	Impureza A (%)	No conocido en RRT 1,10 ^a (%)	Impureza D (%)	Impureza F (%)	Impureza H-1 (%)	Impureza H-2 (%)	No conocido en RRT 1,74 (%)	Impureza total (%)
A	0,1	0,03	0,05	0,2	0,1	0,1	0,03	0,7

B	0,03	< 0,025	0,03	0,05	0,05	0,06	< 0,025	0,2
C	0,05	< 0,025	0,04	0,1	0,1	0,1	0,04	0,5
D	0,04	< 0,025	0,04	0,07	0,09	0,1	0,03	0,4

El límite de cuantificación del método es 0,025%.

El límite de detección del método es 0,01%.

^a El pico en RRT 1,10 probablemente es la impureza B o C.

5 Ejemplo 6

Se llevó a cabo una investigación para determinar la identidad de las impurezas de sustancias relacionadas con la fluoresceína. Se analizaron muestras de fluoresceína para la presencia y concentración de impurezas. El análisis de identificación se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alto rendimiento/espectrometría de masas (LC/MS).

10 En la figura 9 se reproduce un cromatograma de HPLC representativo del sistema de LC/MS. La fluoresceína produjo el pico principal en el cromatograma. El espectro de masas por termopulverización de la fluoresceína, mostrado en la figura 10(b), produjo un ion molecular M+H en m/z 333 que es consistente con un peso molecular de 332.

15 El espectro de masas por termopulverización de la impureza A, tal como se muestra en la figura 11(b), produjo un ion molecular M+H en m/z 259 que indica un peso molecular de 258. La estructura propuesta en la figura 8 para la impureza A, [ácido 2-(2',4'-dihidroxibenzoil)benzoico], se ha informado anteriormente como una impureza en las preparaciones de fluoresceína.

20 El espectro de masas por termopulverización de la impureza B, tal como se muestra en la figura 12(b), indica un ion molecular M+H en m/z 285, sugiriendo un peso molecular de 284. Un peso molecular de 284 puede corresponder a las fórmulas elementales C₁₅H₈O₆, C₁₆H₁₂O₅ o C₁₇H₁₈O₄. Una estructura propuesta mostrada para la Impureza B en la figura 8 podría aparecer de la reacción del resorcinol con el ácido succínico (como impureza en el precursor ácido ftálico de la fluoresceína).

El espectro de masas por termopulverización de la Impureza C, tal como se muestra en la figura 13(b), indica un ion molecular M+H en m/z 347. Esto representa un peso molecular de 346, y corresponde a una ganancia de 14 unidades de masas respecto a la fluoresceína.

25 El espectro de masas por termopulverización de la Impureza D, tal como se muestra en la figura 14(b), también produjo un ion molecular M+H en m/z 347, que probablemente es un isómero de la Impureza C. Las estructuras propuestas para las Impurezas C y D son tautómeros entre sí, siendo ambos productos de oxidación de tipo quinina de la fluoresceína.

30 La APCI de la Impureza E, tal como se muestra en la figura 15(b), produjo un ion molecular M+H en m/z 333 M+H, sugiriendo un peso molecular de 332, y un espectro de UV con un UV_{max} en 492. De esta manera, aparentemente la Impureza E podría ser un isómero posicional de la fluoresceína.

35 La APCI de la Impureza E, tal como se muestra en la figura 16(b), produjo un ion molecular M+H en m/z 425, sugiriendo un peso molecular de 424 y un UV_{max} superior a 400 nm. Los espectros aparentemente son consistentes con una molécula de resorcinol adicional añadida al compuesto parental. De esta manera, el Compuesto F podría formarse a partir de tres resorcinoles, mientras que el parental podría formarse a partir de dos resorcinoles.

La APCI de la Impureza G, tal como se muestra en la figura 17(b), produjo un ion molecular M+H en m/z 375, sugiriendo un peso molecular de 374, y un UV_{max} en 484 nm. Ambos espectros y la lipofilicidad aparentemente eran consistentes con el éster de acetato de fluoresceína.

40 La APCI de las impurezas H-1 y H-2, tal como se muestra en las figuras 18(a) y 19(a), produjeron un ion molecular M+H en m/z 739 para ambos compuestos, sugiriendo un peso molecular de 738 para cada uno. El espectro de absorbancia de UV-Vis de ambos compuestos era el mismo, con un UV_{max} de 233 nm, y máximos de absorbancia más débiles en 462 y 488 nm. El espectro de absorbancia de la Impureza H-2 se muestra en la figura 20.

Ejemplo 7

Preparación de fluoresceína para inyección, o Fluorescite al 25%

45 En 60% del agua necesaria para la inyección en el tanque de mezcla de compuestos, se disolvió y se pesó la cantidad necesaria de hidróxido sódico. Se añadió y se disolvió la fluoresceína. Se añadió agua para inyección adicional en caso necesario para la disolución, aunque el volumen no se llevó a más de 90% del volumen total. En el

5 caso de que la fluoresceína no se disolviese por completo tras 30 minutos de agitación, se pasaba a la etapa siguiente, de ajuste del pH. El pH se ajustó a 9,4, lo que se llevó a cabo utilizando hidróxido sódico 3 N y/o ácido clorhídrico 1 N. La mezcla se agitó durante 30 minutos a 180 rpm. Se comprobó nuevamente el pH. En el caso de que fuese menos de 9,3 ó superior a 9,5, se reajustaba el pH a 9,4 con hidróxido sódico 3 N y/o ácido clorhídrico 1 N. Se llevó la solución de fluoresceína sódica al volumen final con agua para inyección adicional y se agitó durante 15 minutos. Se comprobó nuevamente el pH tal como se ha indicado anteriormente. Utilizando un tanque de nitrógeno, se filtró a presión la solución a través de una serie de tres filtros de membrana con tamaño de poro de 5 micrómetros, 0,8 micrómetros y 0,45 micrómetros en un tanque de llenado estéril. Se comprobó nuevamente el pH del producto utilizando el procedimiento indicado anteriormente. Se extrajo asépticamente una muestra para su análisis en el laboratorio. Se llenaron con el producto ampollas previamente esterilizadas. A cada ampolla se añadieron 2,15 a 2,25 ml. Inmediatamente después del llenado, las muestras se sellaron por la punta o por tracción mediante métodos estándares. Se comprobó cada sello de ampolla durante la esterilización. Las ampollas se esterilizaron mediante autoclavado a 121°C durante 20 minutos o más, dependiendo del tamaño del lote. Se inspeccionaron cuidadosamente para detectar fugas. Se inspeccionó individualmente cada ampolla para materia particulada bajo condiciones óptimas de luz.

Ejemplo 8

Preparación de fluoresceína para inyección, o Fluorescite al 10%

20 A modo de procedimiento alternativo para preparar fluoresceína para inyección, se añadió a un tanque de acero inoxidable adecuado aproximadamente 70% a 75% de la cantidad del lote de agua templada para inyección (aproximadamente a 30°C). Se añadió fluoresceína bajo agitación hasta completar la suspensión. Se registró el pH inicial. Se añadió una cantidad suficiente (aproximadamente 7,5% del volumen total) de hidróxido sódico 7 N, y después cantidades adicionales de hidróxido sódico 7 N, con nueva comprobación del valor del pH tras esperar durante aproximadamente 15 minutos entre adiciones, hasta que el pH se encontraba entre 9,3 y 9,5, con un pH objetivo de 9,4. En el caso de que el pH fuese superior a 9,5, se ajustaba el pH mediante la adición de ácido clorhídrico 1 N para volver al intervalo de pH de 9,3 a 9,5. Tras alcanzar el intervalo de pH, se continuó la mezcla durante un periodo no inferior a 15 minutos. Se llevó el lote hasta el peso final con agua para inyección y se mezcló durante un periodo no inferior a 30 minutos. Se comprobó el pH y se ajustó con hidróxido sódico o ácido clorhídrico, según resultase necesario. Se llenaron asépticamente viales estériles con el producto, realizando inspección y ensayo adicionales según los procedimientos operativos estándares.

30

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para preparar fluoresceína sustancialmente pura, que comprende:
 - (a) convertir fluoresceína de grado comercial en O,O'-diacetilfluoresceína utilizando anhídrido acético como solvente y como reactivo, a temperatura de reflujo;
- 5 (b) hidrolizar la diacetilfluoresceína preparada a partir de fluoresceína de grado comercial, con hidróxido sódico en agua, para formar fluoresceína;
- (c) añadir carbón, eficaz para reducir el número de color de la fluoresceína en solución, para formar una mezcla de fluoresceína/carbón;
- (d) filtrar la mezcla de fluoresceína/carbón, para formar un filtrado;
- 10 (e) añadir etanol al filtrado, para obtener una proporción de 2:1 de etanol con respecto al agua,
- (f) ajustar el pH a un nivel comprendido entre 1,0 y 2,5 utilizando una solución de ácido clorhídrico, con enfriamiento durante un periodo de 2 a 4 horas, para formar un precipitado;
- (g) filtrar la solución para retener el precipitado; y
- (h) lavar el precipitado con agua y etanol,
- 15 en el que la fluoresceína resultante se define como sustancialmente pura en el caso de que haya una ausencia total, o prácticamente total, de impurezas.

Figura 1/20

Diseño experimental para la purificación de la fluoresceína

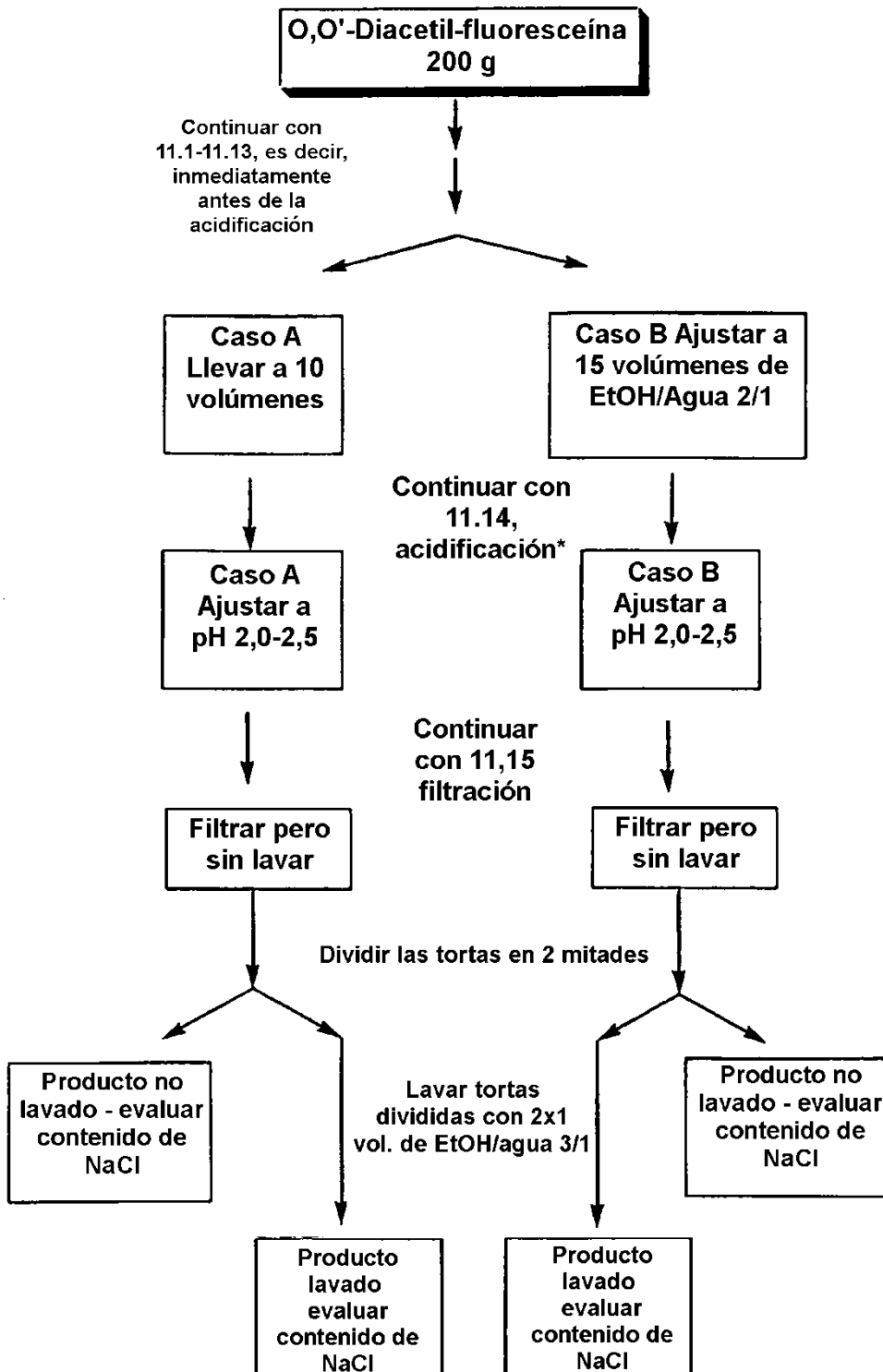


Figura 2/20

Diseño experimental para la purificación de la fluoresceína: efecto del pH sobre el color

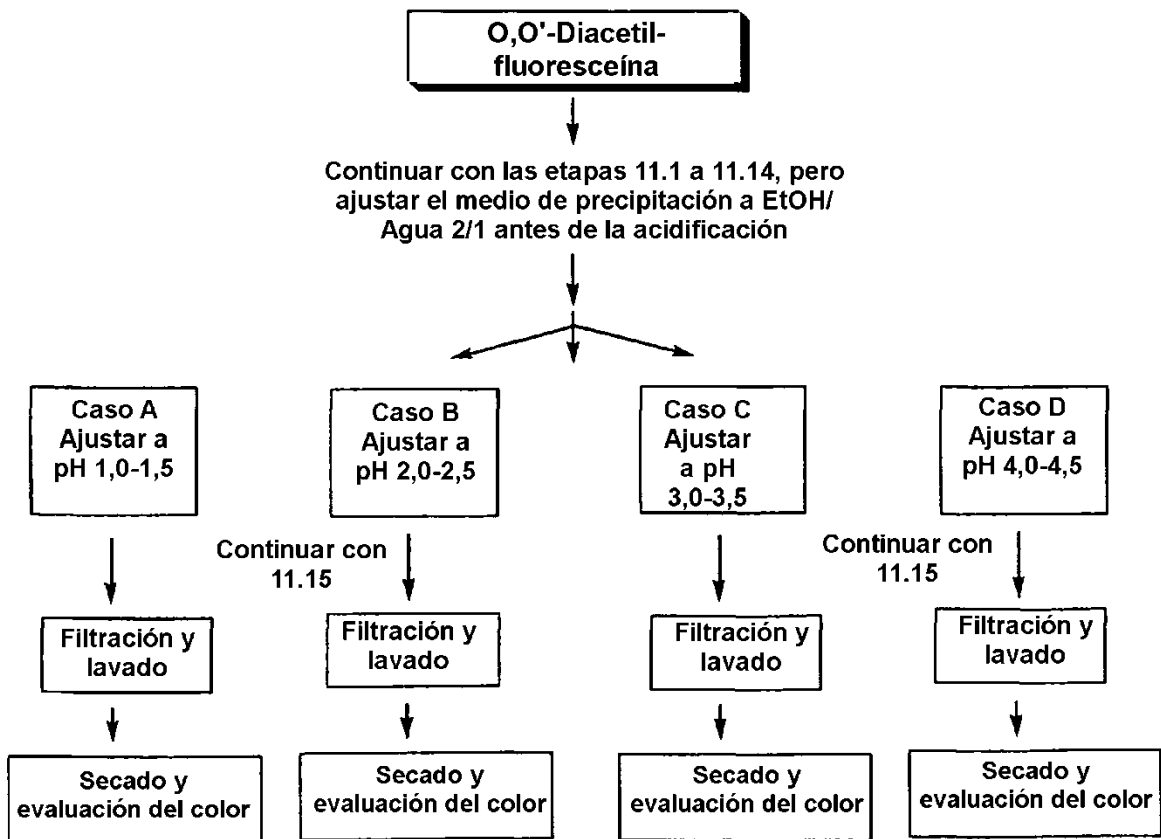


Figura 3/20

Espectro de UV/VIS de la fluoresceína

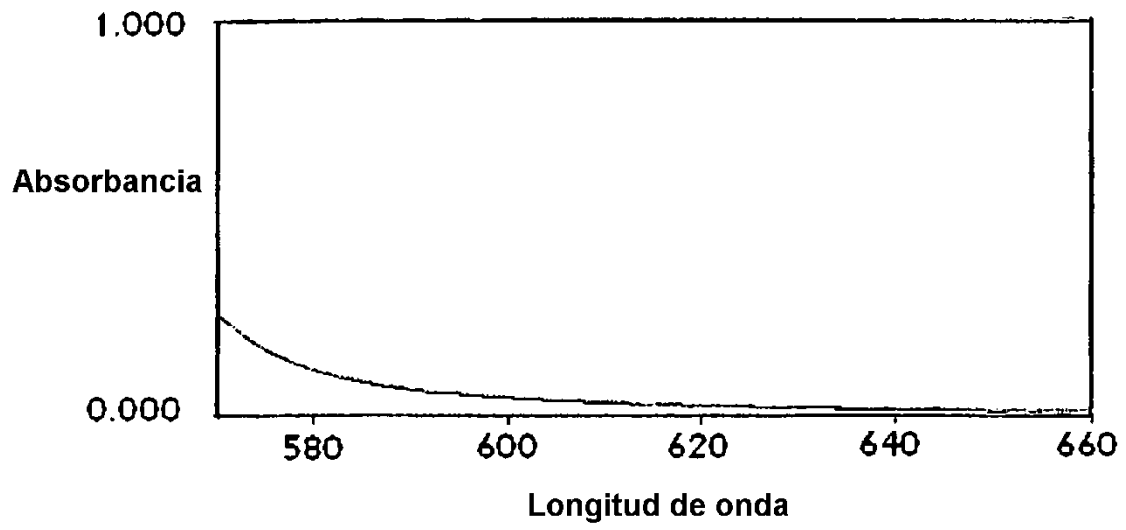


Figura 4/20

Cromatograma de HPLC del blanco de diluyente

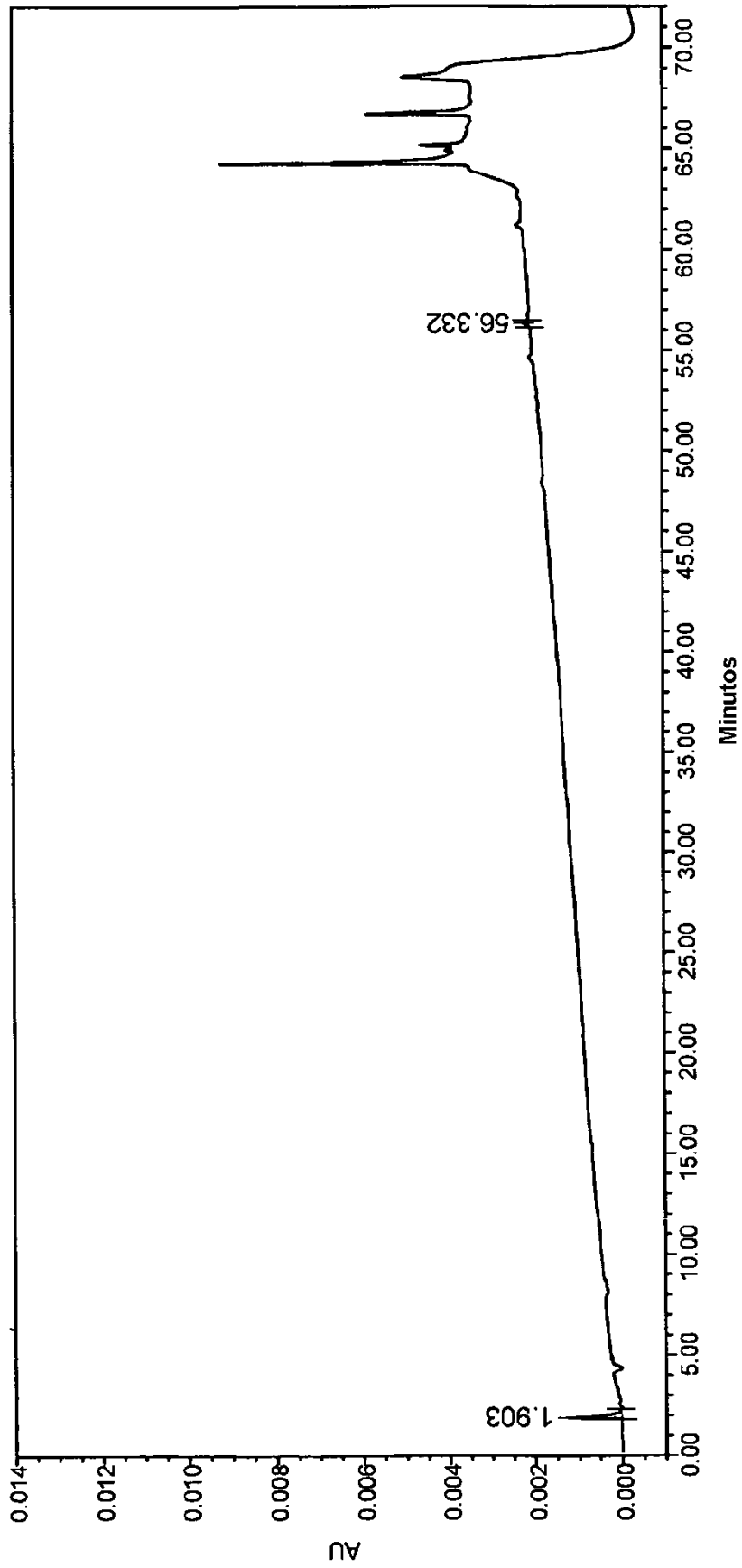


Figura 5/20
Cromatograma de HPLC de estándar de referencia de fluoresceína al 1% USP

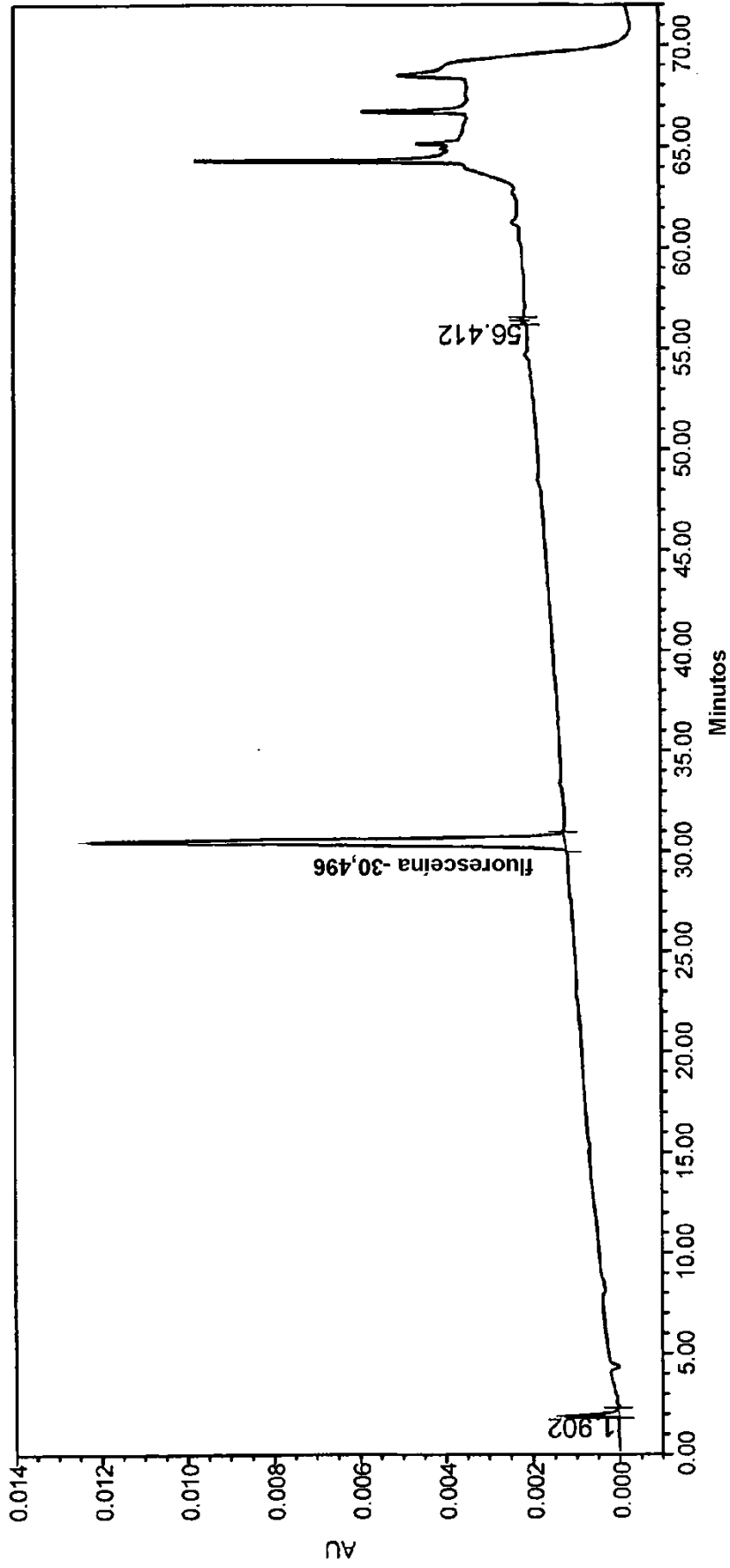


Figura 6/20
Cromatograma de HPLC de materia prima de fluoresceína del proveedor A (nº de referencia 44)

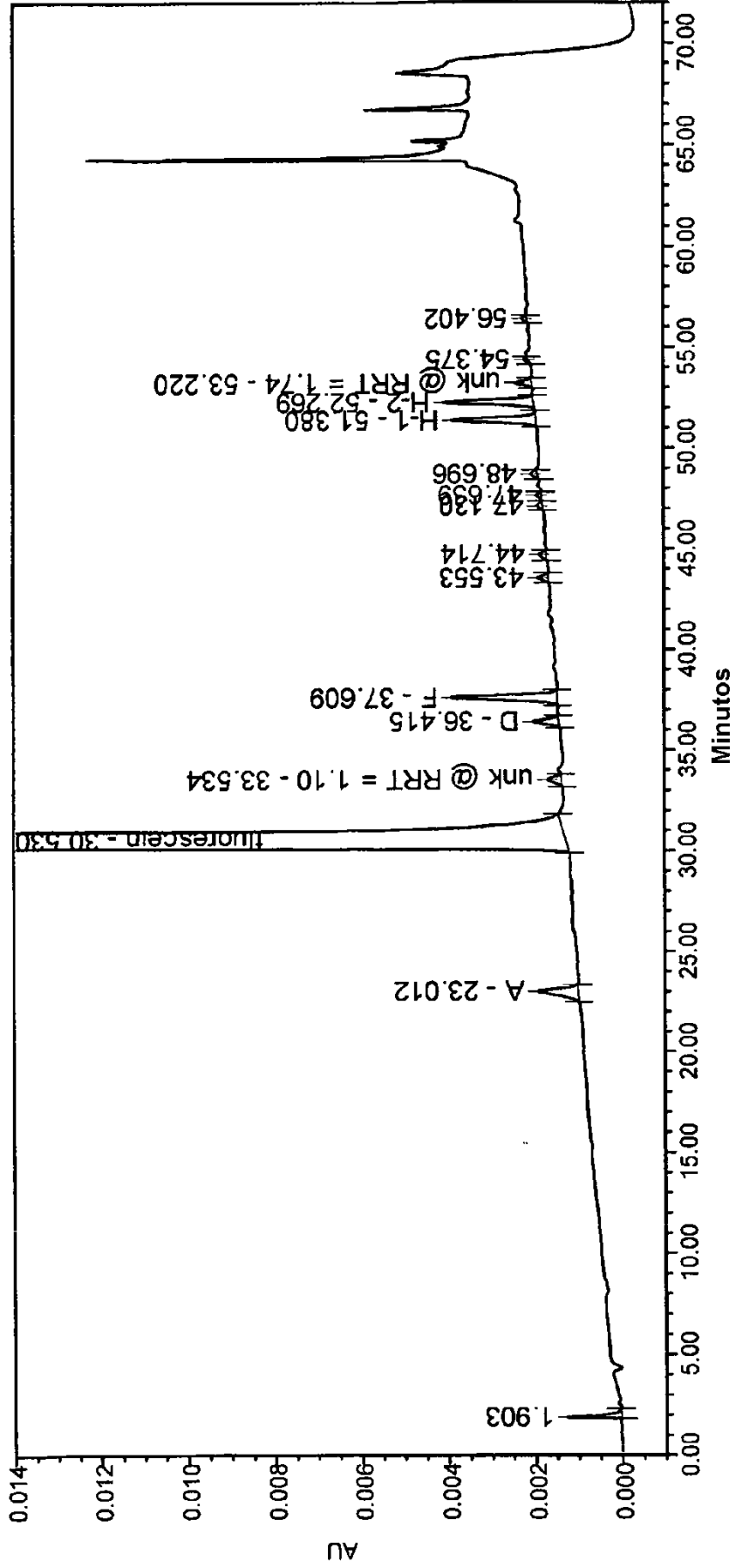


Figura 7/20
Cromatograma de HPLC de materia prima de fluoresceína con adición de resorcinol al 0,8%

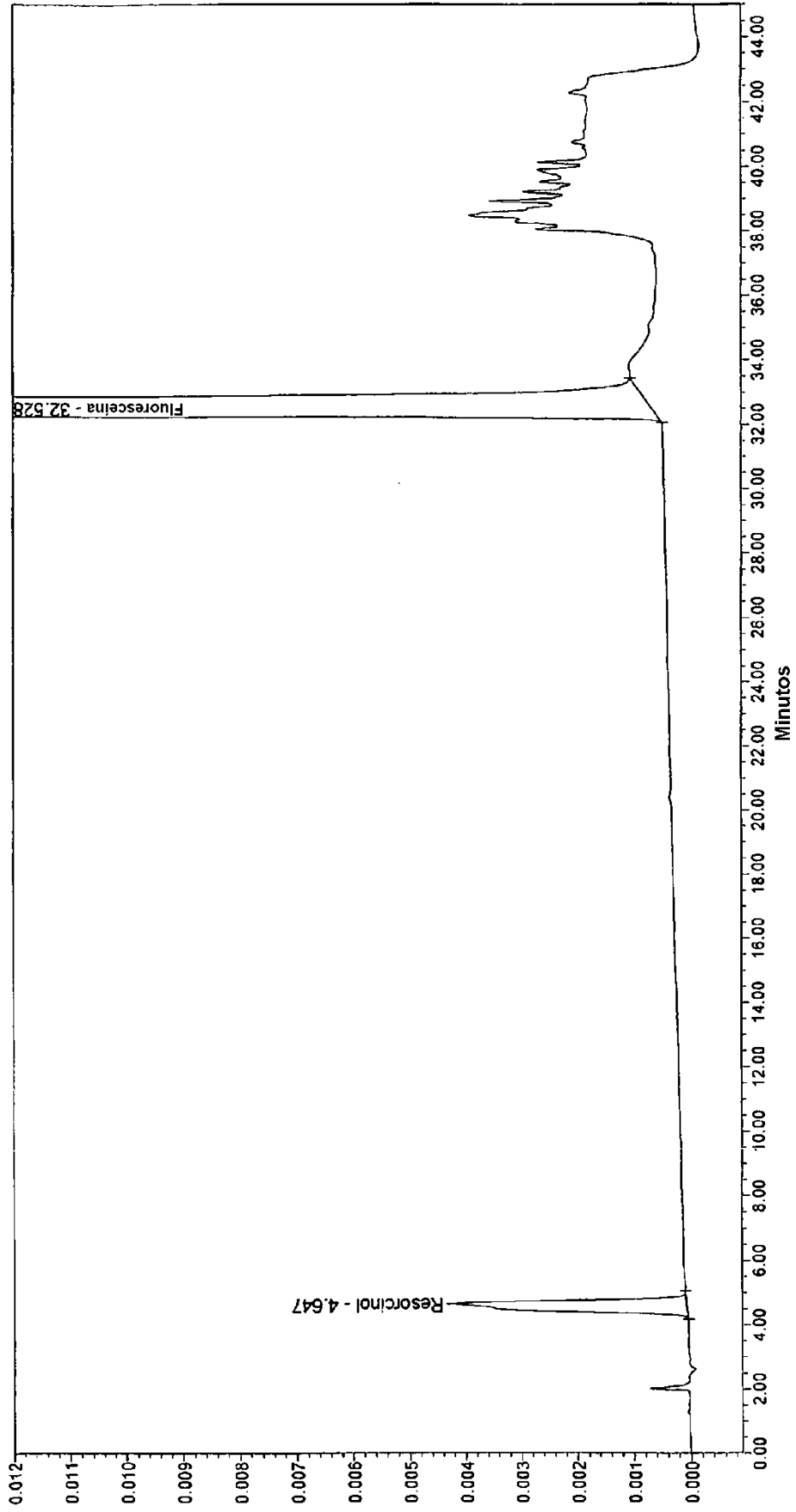
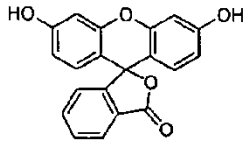
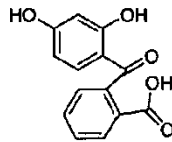


Figura 8/20

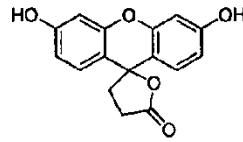
Estructura de la fluoresceína e impurezas propuestas



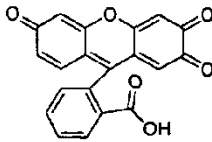
fluoresceína
 $C_{20}H_{12}O_5$
 peso mol. = 332
 M+H = 333



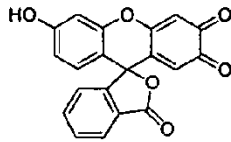
Pico A
 $C_{14}H_{10}O_5$
 peso mol. = 258
 M+H = 259



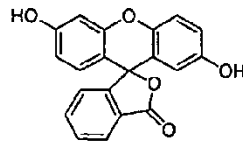
Pico B
 Aldrich S50082-8
 $C_{18}H_{12}O_5$
 peso mol. = 284
 M+H = 285



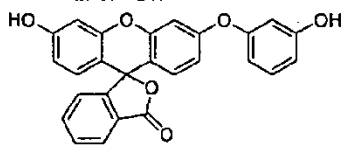
Pico C
 $C_{20}H_{10}O_6$
 peso mol. = 346
 M+H = 347



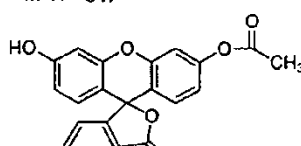
Pico D
 $C_{20}H_{10}O_6$
 peso mol. = 346
 M+H = 347



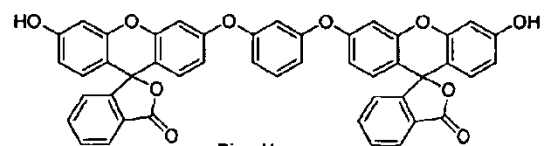
Pico E
 peso mol. = 332
 M+H = 333



Pico F
 peso mol. = 424
 M+H = 425



Pico G
 peso mol. = 374
 M+H = 375



Pico H
 peso mol. = 738
 M+H = 739

Figura 9/20

Cromatograma de HPLC de la fluoresceína del sistema de LC/MS

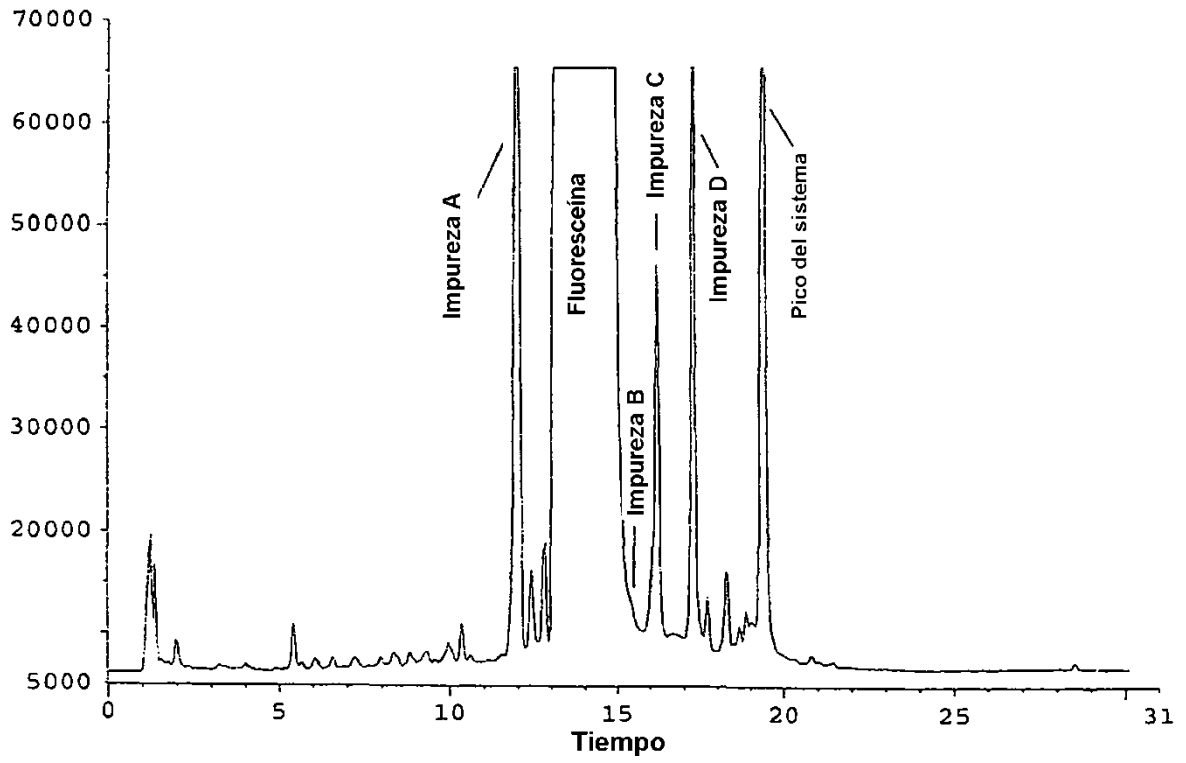


Figura 10/20

HPLC/MS de la fluoresceína

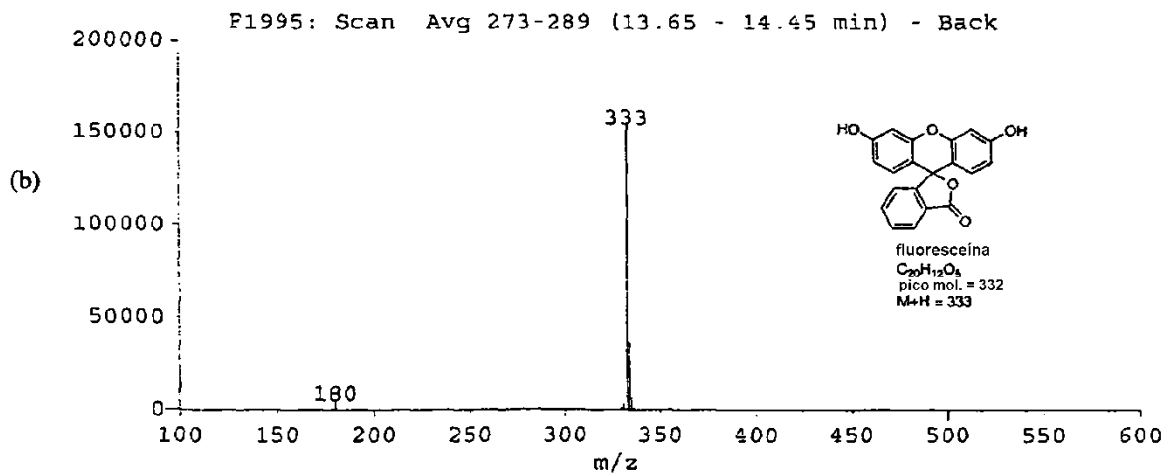
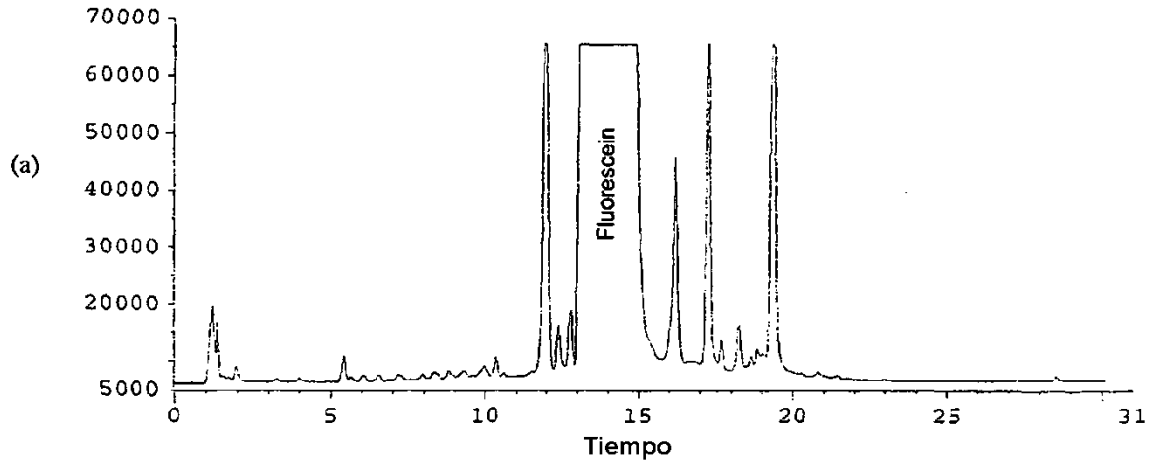


Figura 11/20

HPLC/MS de la Impureza A en sustancia farmacológica de fluoresceína

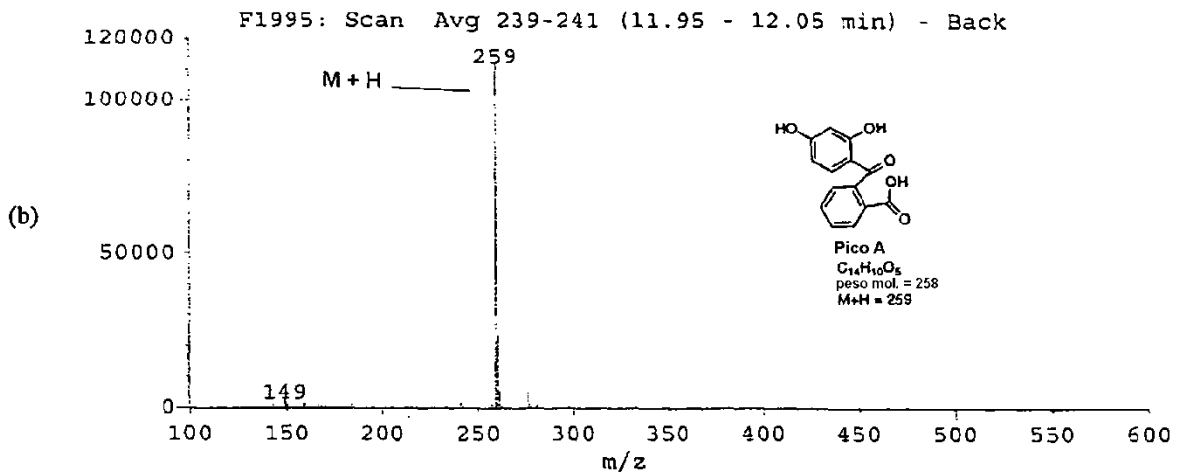
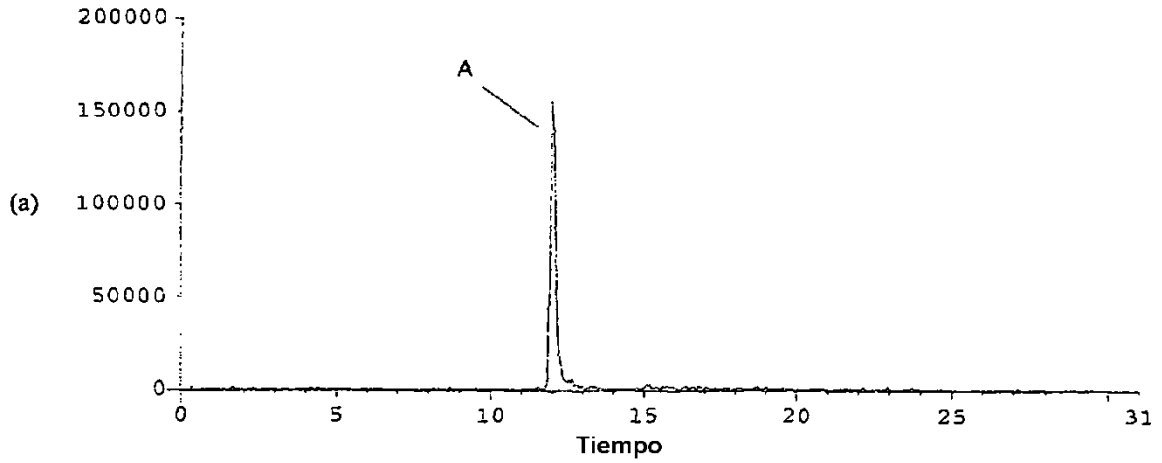


Figura 12/20

HPLC/MS de la Impureza B en sustancia farmacológica de fluoresceína

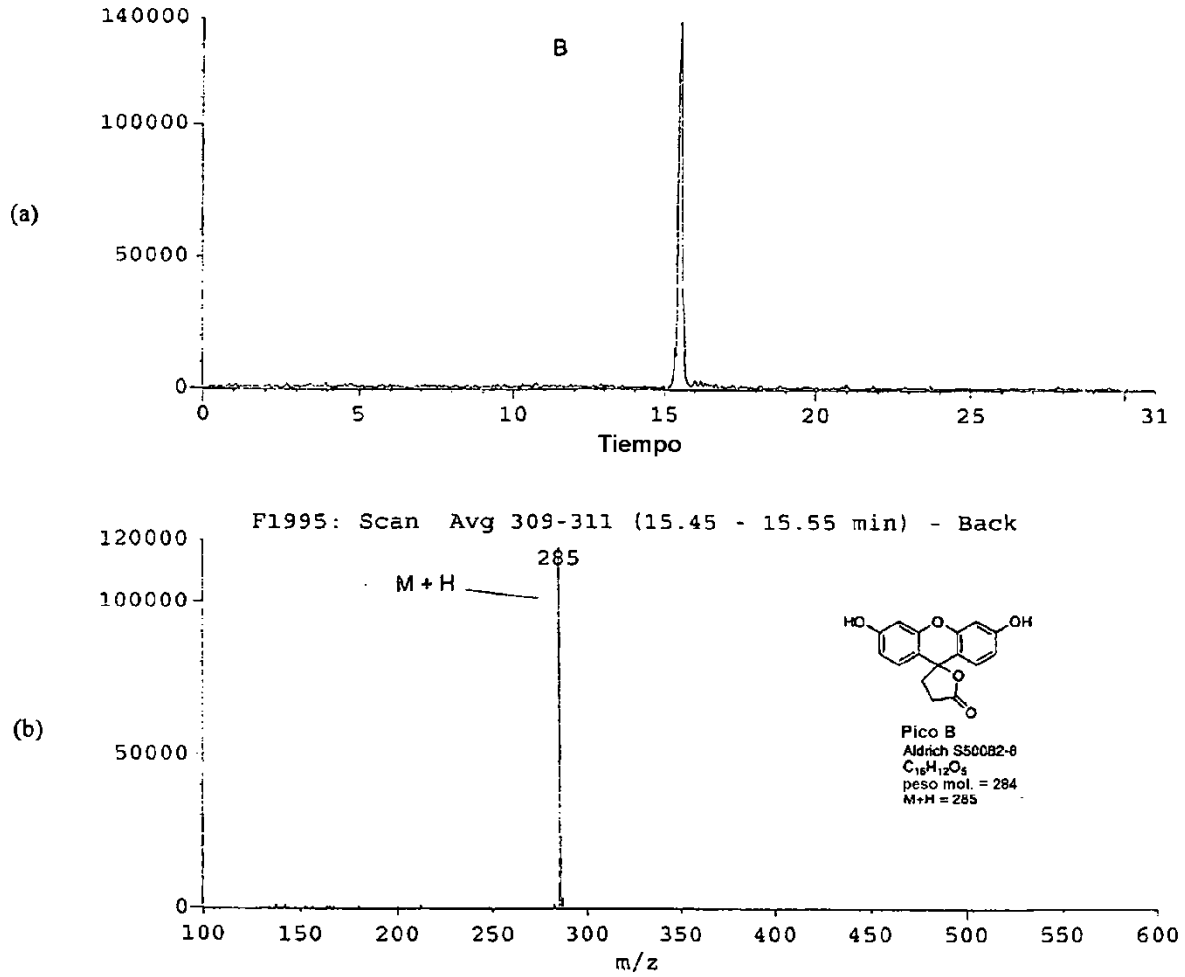


Figura 13/20

HPLC/MS de la Impureza C en sustancia farmacológica de fluoresceína

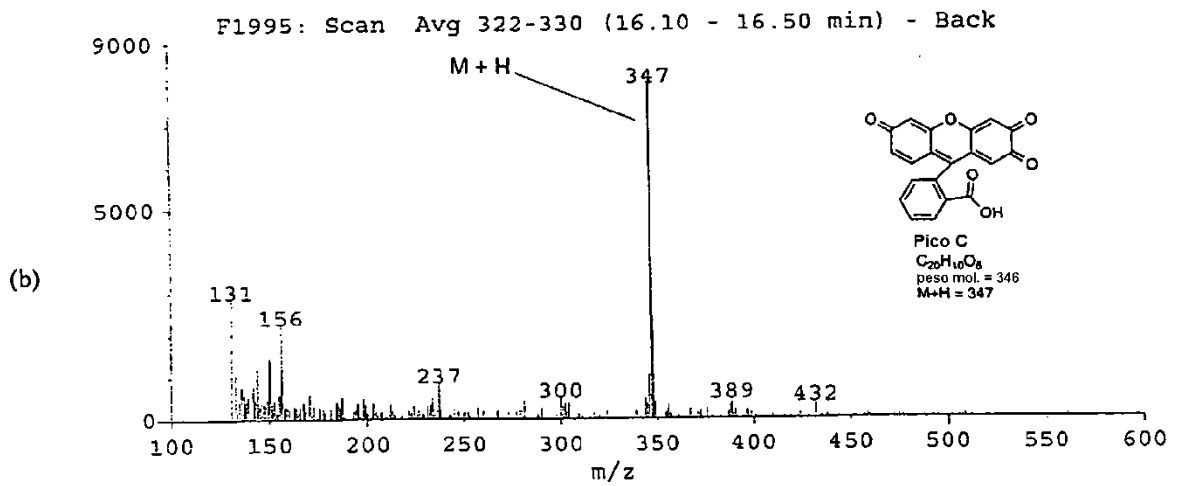
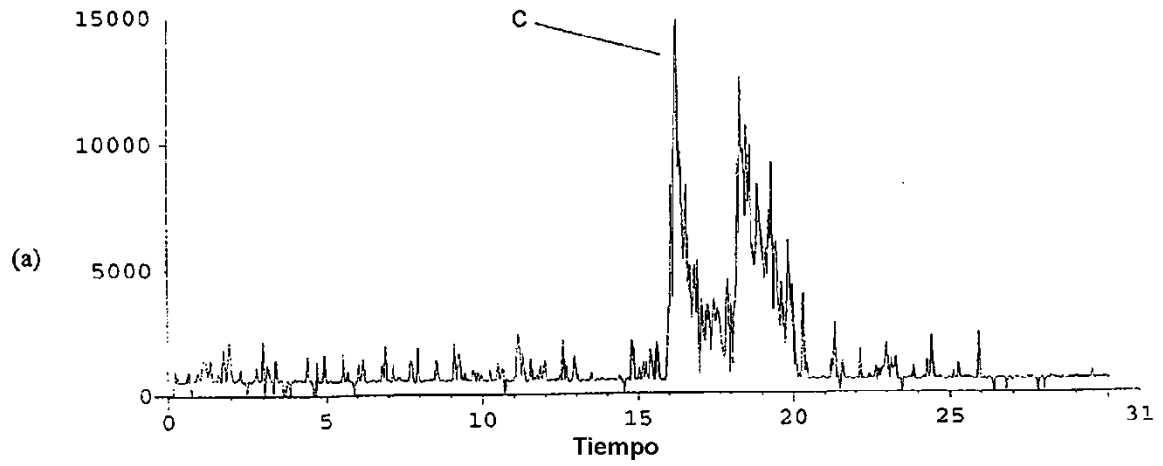


Figura 14/20

HPLC/MS de la Impureza D en sustancia farmacológica de fluoresceína

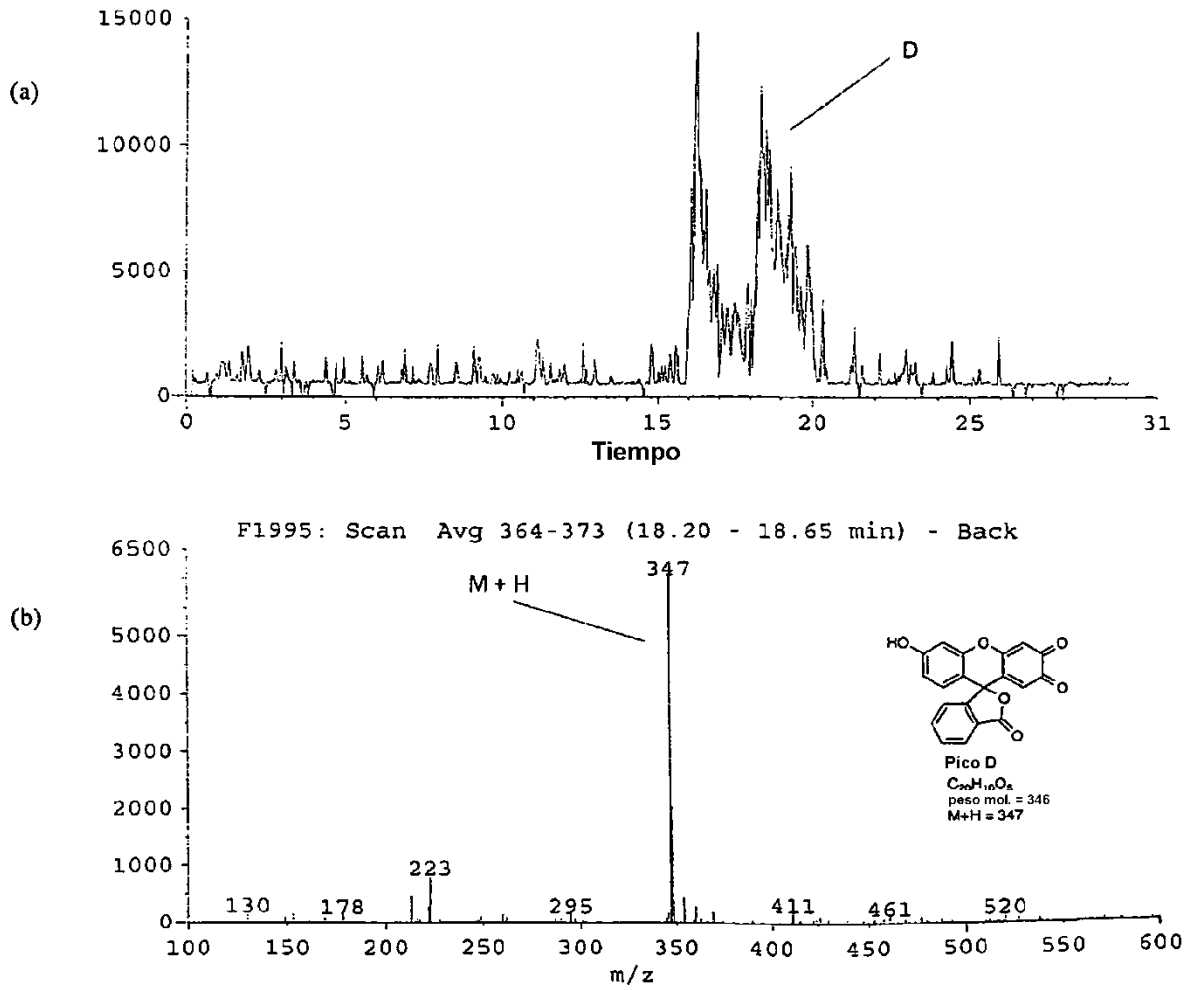


Figura 15/20

HPLC/MS de la Impureza E en sustancia farmacológica de fluoresceína

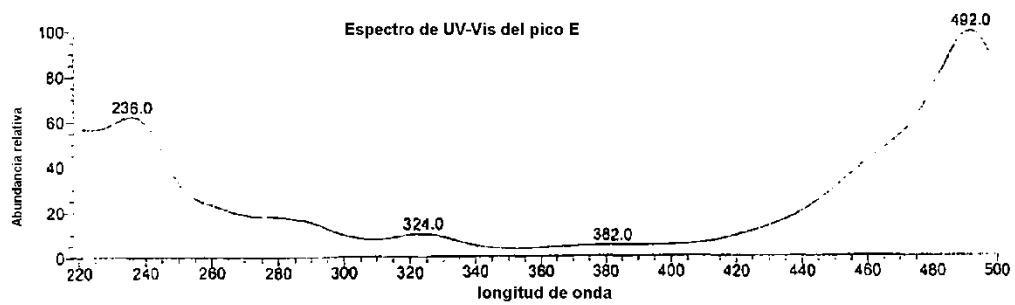
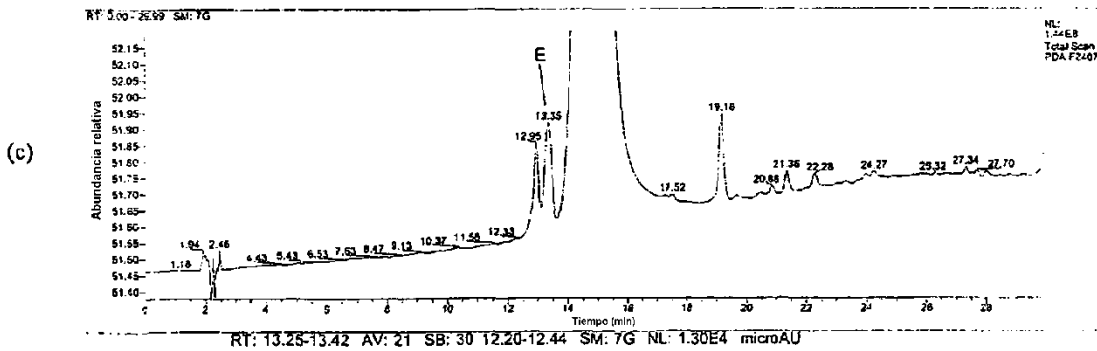
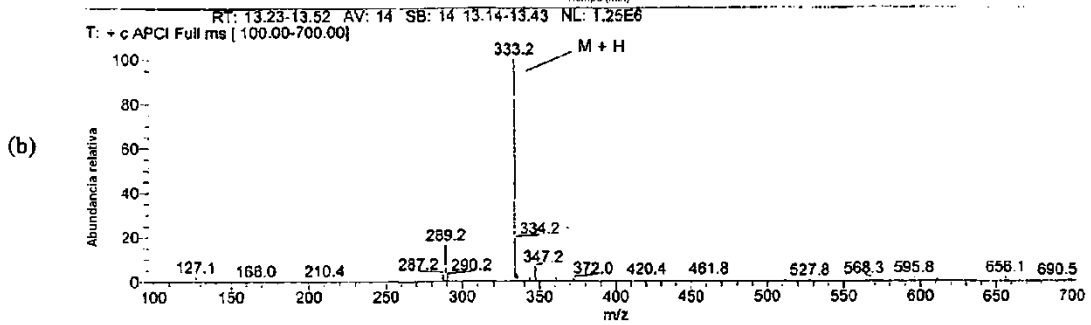
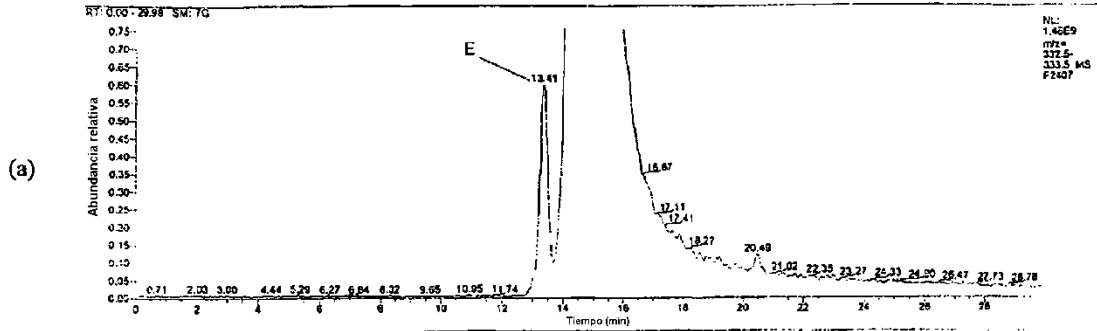


Figura 16/20

HPLC/MS de la Impureza F en sustancia farmacológica de fluoresceína

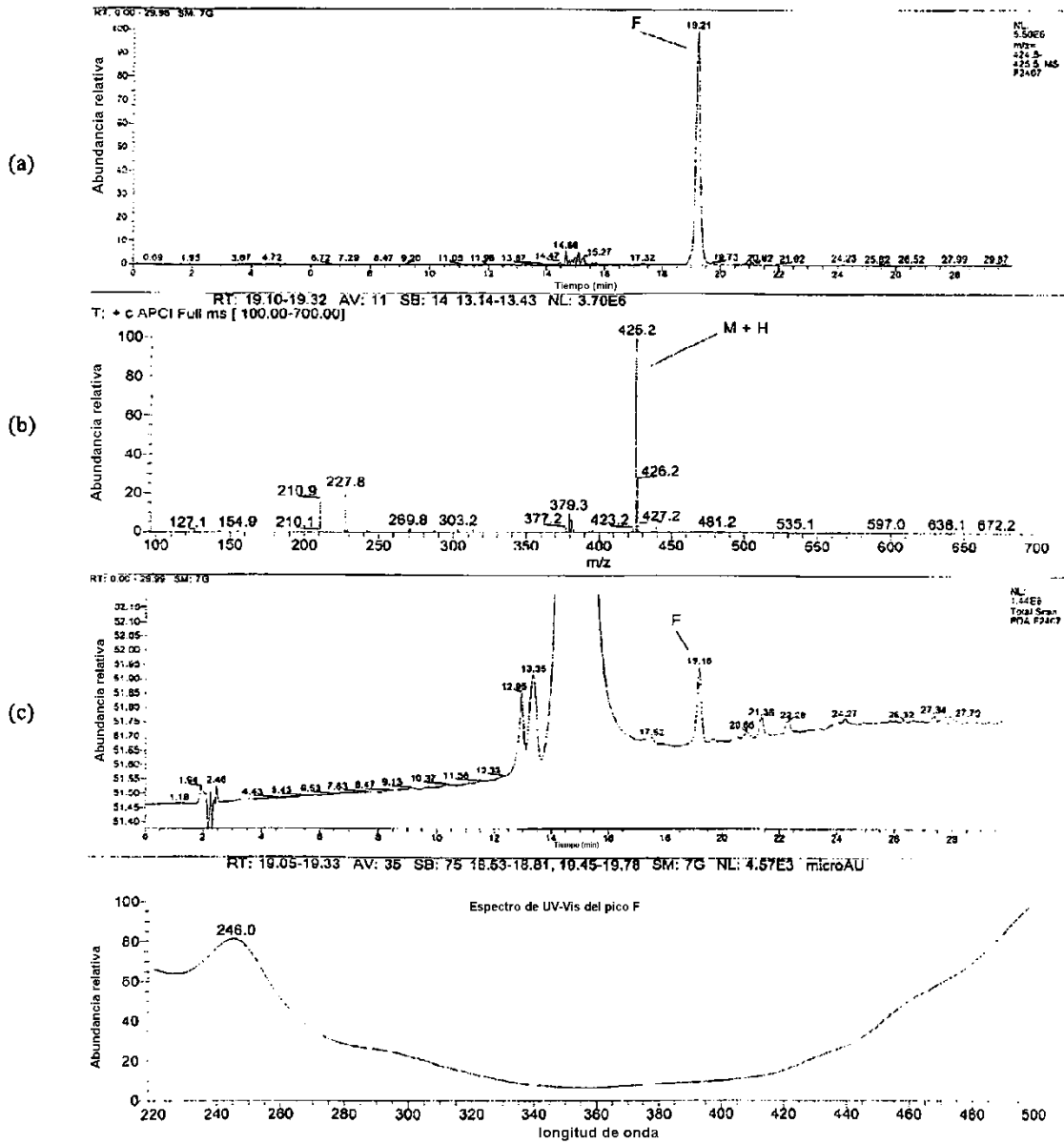


Figura 17/20

HPLC/MS de la Impureza G en sustancia farmacológica de fluoresceína

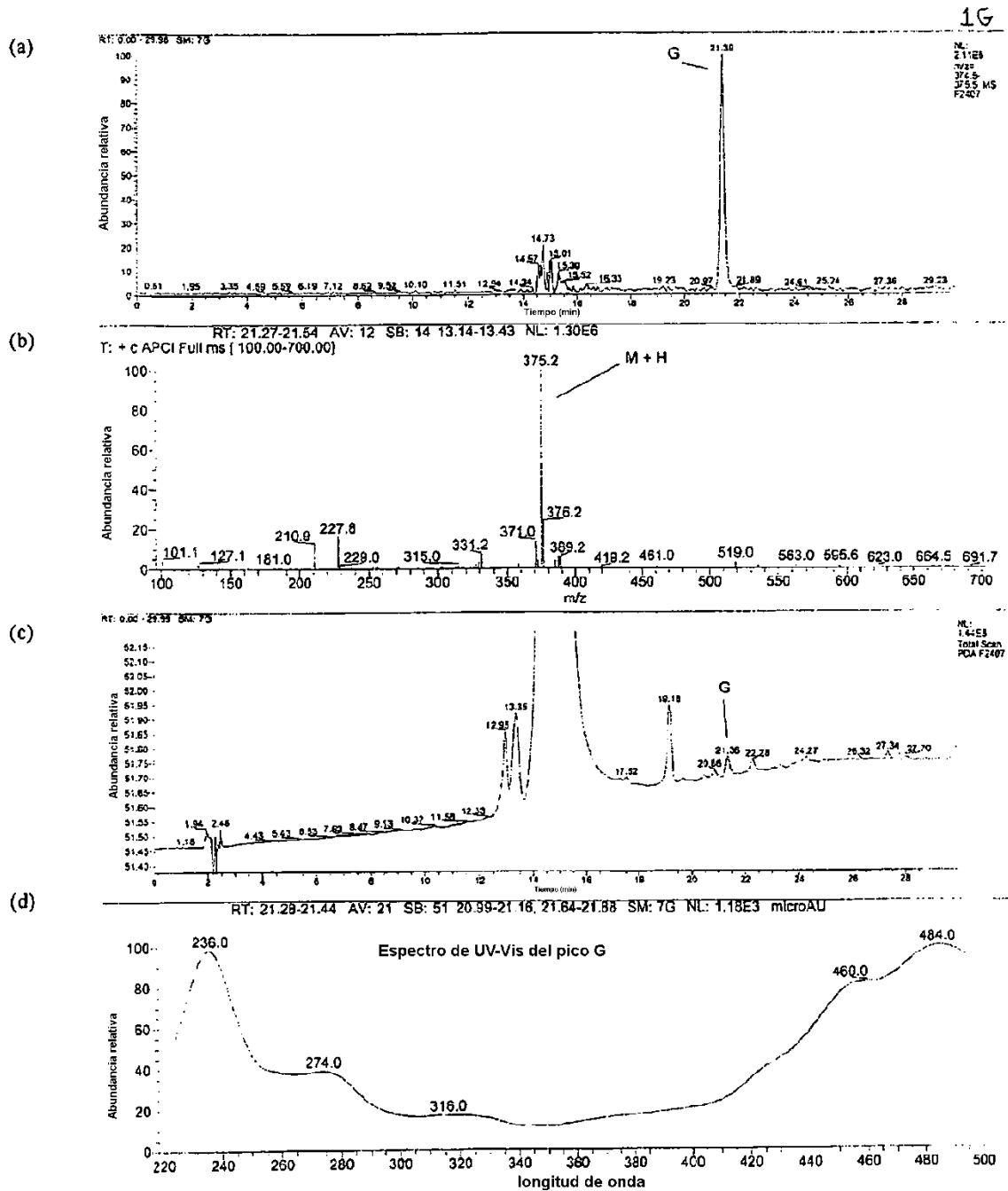


Figura 18/20

HPLC/MS de la Impureza H-1 en sustancia farmacológica de fluoresceína

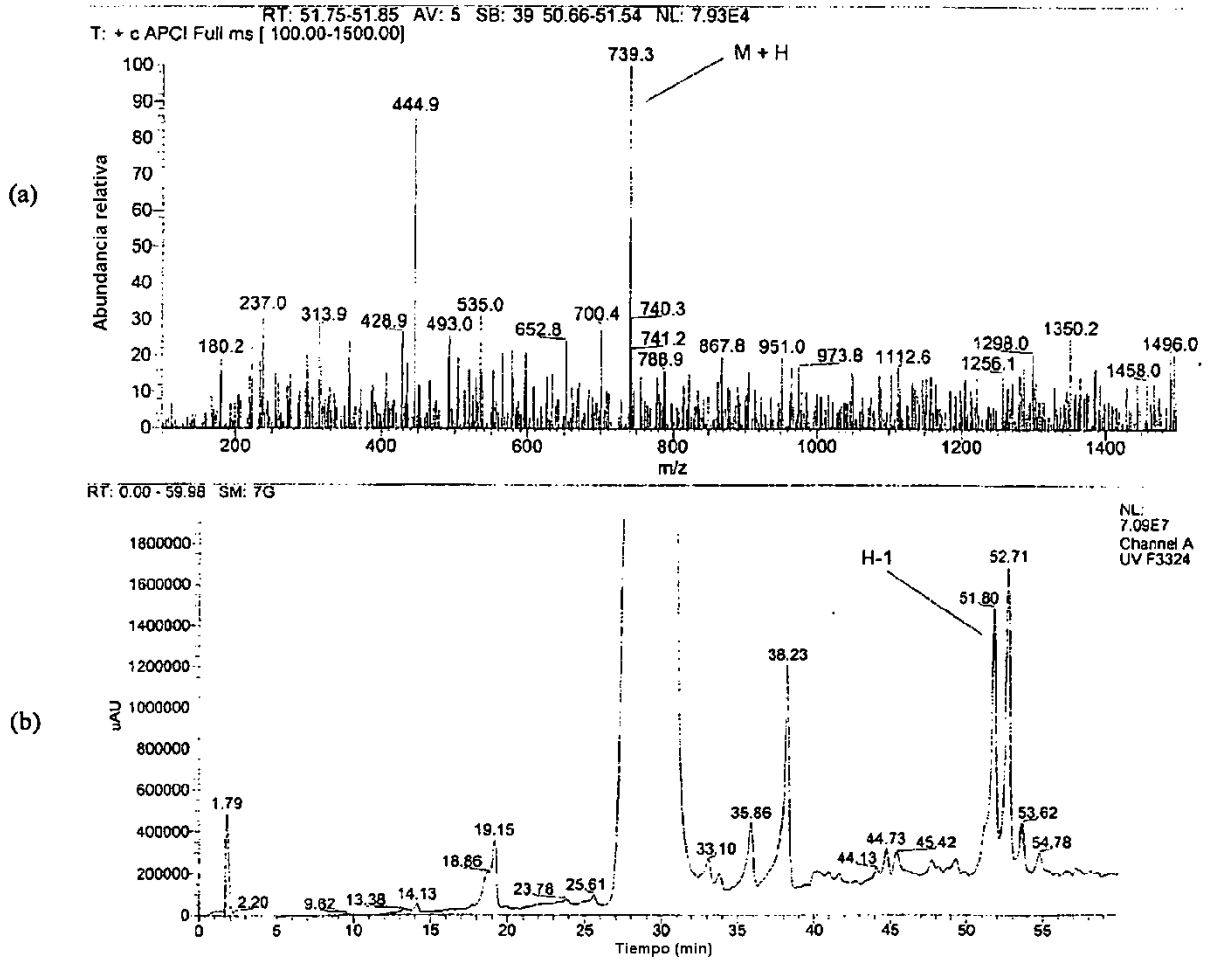


Figura 19/20

HPLC/MS de la Impureza H-2 en sustancia farmacológica de fluoresceína

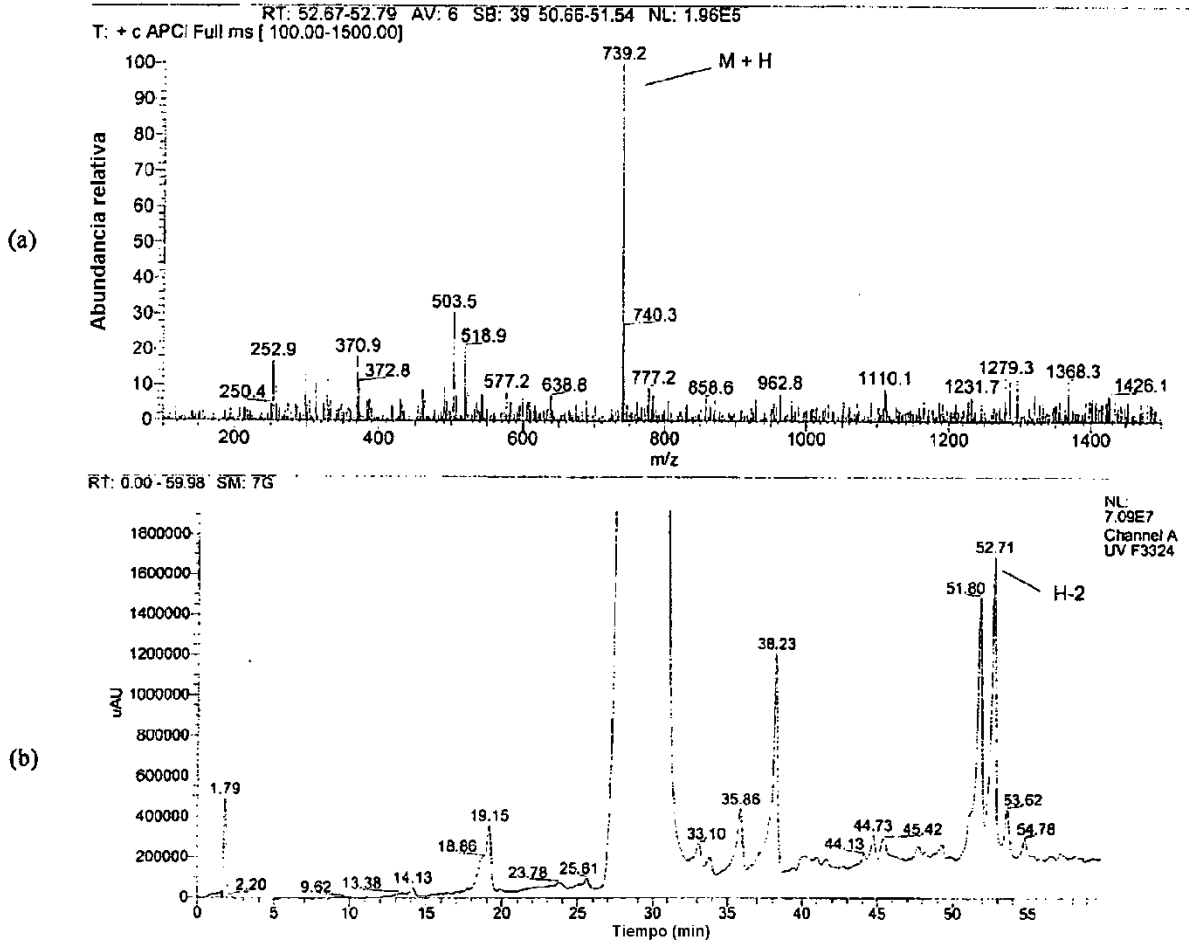


Figura 20/20

