









Desarrollo de un método mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia acoplado a un detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) y su validación para la cuantificación de triclosán en pasta de dientes.

High Performance Liquid Chromatography coupled Diode Array Detector (HPLC-DAD) method development and validation for the quantification of triclosan in toothpaste.

Muñiz-Valencia, R.¹ , Rodríguez-Pérez, M. A.¹ , Barragan-Mendoza, L.¹ ,
De la Cruz-Torres, L.F.¹ , Macias-López, E.G.¹ , Maldonado-Michel M.A.¹ ,
Rodríguez-Aguilar, B.A.¹ , Ceballos-Magaña, S.G.^{2*} .

¹ Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Colima, Colima-Coquimatlán km. 9, Coquimatlán, C.P. 28400, Colima, México.

² Facultad de Ciencias, Universidad de Colima, c/ Bernal Díaz del Castillo 340, C.P. 28045 Colima, México.



Please cite this article as/Como citar este artículo: Muñiz-Valencia, R., Rodríguez-Pérez, M. A., BarraganMendoza, L., De la Cruz-Torres, L.F., Macias-López, E.G., Maldonado-Michel M.A., Rodríguez-Aguilar, B.A., Ceballos-Magaña, S.G. (2023). High Performance Liquid Chromatography coupled Diode Array Detector (HPLCDAD) method development and validation for the quantification of triclosan in toothpaste. *Revista Bio Ciencias*, 10 e1410. <https://doi.org/10.15741/revbio.10.e1410>

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: August 31th 2022.

Accepted/Aceptado: January 24th 2023.

Available on line/Publicado: February 21th 2023.

RESUMEN

El triclosán se utiliza en muchos productos para el cuidado de la salud como agente antimicrobiano y desinfectante de amplio espectro; sin embargo, actualmente se considera un contaminante emergente. El presente estudio tuvo como objetivo desarrollar un método de cromatografía de líquidos acoplada a un detector de arreglo de diodos para la determinación de triclosán en pasta de dientes. El desarrollo del método implicó la optimización de la separación y la preparación de muestras. Para la optimización de la separación cromatográfica, se probaron diferentes columnas de Fase Inversa y sistemas de elución. Después de diferentes experimentos, se optimizó la separación cromatográfica empleando las siguientes condiciones: una columna Symmetry C18 a 30 °C, velocidad de flujo de 0.6 mL/min, tiempo de análisis de aproximadamente 3 minutos y detección de longitud de onda a 225 nm. Para optimizar la preparación de la muestra de pasta de dientes, se eligió una metodología de superficie de respuesta que utiliza un diseño factorial fraccional Box-Behnken. La preparación de la muestra consistió en extraer 0.2 g de muestra mediante sonicación durante 7 minutos utilizando 2 mL de metanol. El método desarrollado fue validado de acuerdo con la Conferencia Internacional sobre Armonización y las directrices de la Decisión de la Comisión Europea 200/657/CE. El método analítico desarrollado se determinó como rápido, económico, lineal, sensible, preciso y robusto y permitió cuantificar triclosán en diferentes productos de salud.

PALABRAS CLAVE: Contaminantes emergentes; alterador endocrino; HPLC-DAD; triclosán; productos de cuidado personal.

*Corresponding Author:

Silvia G. Ceballos-Magaña, Universidad de Colima, c/ Bernal Díaz del Castillo 340, C.P. 28045 Colima, México. Teléfono (312) 316 1125. E-mail: silvia_ceballos@uocol.mx

ABSTRACT

Triclosan is used in many healthcare products as a broad-spectrum antimicrobial and disinfectant agent; however, it is currently considered an emerging pollutant. The present study aimed to develop an analytical method using liquid chromatography coupled to a Diode Array Detector for triclosan determination in toothpaste. Method development involved the optimization of separation and sample preparation. For chromatographic separation optimization, different Reverse Phase columns and elution systems were tested. After different experiments, chromatographic separation was optimized employing the following conditions: a Symmetry C18 column at 30 °C, 0.6 mL/min flow-rate, running time of about 3 minutes, and wavelength detection at 225 nm. To optimize toothpaste sample preparation, a response surface methodology using a Box-Behnken fractional factorial design was chosen. The sample preparation consisted of extracting 0.2 g of the sample by sonication for 7 minutes using 2 mL of methanol. According to the International Conference on Harmonization and European Commission Decision 200/657/EC guidelines, the developed method was validated. The developed analytical method was found fast, economic, linear, sensitive, precise, and robust and allowed to quantify triclosan in different healthcare products.

KEY WORDS: Emerging pollutants; endocrine disruptor; HPLC-DAD; triclosan; personal care products.

Introducción

El triclosán (5-cloro-2-[2,4-dicloro-fenoxy]-fenol) (TCS) es un compuesto químico común utilizado en un gran número de productos de cuidado personal (pasta de dientes, jabones, desodorantes, champú, limpiadores domésticos, entre otros) como agente desinfectante y antimicrobiano de amplio espectro (Dann *et al.*, 2011). Actualmente, el triclosán se considera un contaminante emergente de preocupación debido a su posibilidad de causar efectos adversos en la salud humana y ecológicos (Witorsch *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2017). La producción global de TCS se estimó en más de 1500 toneladas por año, donde Europa es el mayor productor, con 350 toneladas (Singer *et al.*, 2002; Dann *et al.*, 2011). La exposición a TCS generalmente ocurre a través de productos de belleza, limpieza del hogar o higiene personal, tales como geles de ducha, desodorantes, jabones, enjuagues bucales, lociones, cremas y pasta de dientes. La concentración de TCS en los productos para el cuidado personal suele estar en el rango de 0.1-0.3 %; por lo tanto, estos productos son la principal fuente de TCS en el ambiente (Sabaliunas *et al.*, 2003; García-Yerena *et al.*, 2016). El TCS se ha encontrado en diferentes matrices ambientales, como aguas superficiales y sedimentos, debido probablemente a su amplio uso y su hidrofobicidad (Pinckney *et al.*, 2017). La ruta principal de entrada de este compuesto al ambiente

es en descargas en los ecosistemas acuáticos provenientes de en aguas residuales domésticas o de plantas de tratamiento de aguas residuales; contaminando el ambiente circundante (Dhillon *et al.* 2015; Yueh *et al.*, 2016).

Aunque se ha encontrado TCS en bajas concentraciones, su vertido continuo al ambiente a través de diversas fuentes ha suscitado una gran preocupación por los efectos que puede generar sobre la biota (Chtourou *et al.*, 2018). Los estudios de los efectos del TCS a largo plazo van desde alteraciones endocrina, estimulación del estrés oxidativo, desacoplamiento de las mitocondrias hasta la interferencia con canales iónicos (Olaniyan *et al.*, 2016; Yueh *et al.*, 2016; Bever *et al.*, 2018). Este compuesto también puede promover la tumorigénesis al alterar el estado de metilación del ADN y disminuir las concentraciones de tiroxina en mamíferos gestantes, fetales y juveniles (Paul *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2017). Asimismo, el TCS puede aumentar la proliferación de células hepáticas potenciando el crecimiento del cáncer de hígado inducido por dietilnitrosamina (Jackson *et al.*, 2018).

La pasta de dientes es uno de los principales productos de higiene personal que contienen las concentraciones más altas de TCS. Las principales vías de exposición humana son la absorción dérmica y oral, así como la ingesta accidental (Jackson *et al.*, 2018). Calafat *et al.* (2008) realizaron un estudio en 2003 para determinar las concentraciones de TCS en una muestra representativa de niños \geq a seis años de edad en una población de Estados Unidos, concluyeron que el 74 % de las muestras de orina analizadas tenían este compuesto en forma libre y conjugada en concentraciones de 2.4 a 3 790 $\mu\text{g/L}$.

Algunas técnicas para la determinación de TCS incluyen la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) (Sanches-Silva *et al.*, 2005) acoplado a espectrometría de masas (HPLC-MS) (Shen *et al.*, 2012), y cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS) (Wu *et al.*, 2007). Las técnicas mencionadas, HPLC es la herramienta más práctica y sencilla para la determinación de TCS en productos de cuidado personal (Piccoli *et al.*, 2002; Chiapetta *et al.*, 2011; Liu & Wu, 2012). En este artículo, se presenta un método analítico económico, simple y rápido para determinar TCS en muestras de pasta de dientes usando HPLC con detector de arreglo de diodos.

Material y Métodos

Reactivos

El estándar de triclosán (5-cloro-2-[2,4-dicloro-fenoxy]-fenol) (TCS), acetonitrilo (AcN) y metanol (MeOH) grado HPLC fueron adquiridos de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). El agua ultrapura con resistividad de 18.2 $\text{M}\Omega/\text{cm}$ se obtuvo de un sistema de agua Milli-Q de Millipore (Bedford, MA, U.S.A.).

Equipos

Para la extracción de la muestra se empleó un baño ultrasónico serie 2510MT (Branson, Brookfield, CT), un mezclador vortex Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, NY) y una balanza

analítica CX 220 (Citizen). Las columnas cromatográficas empleadas fueron la Symmetry C18 (150 x 4.6 mm, 5 μ m, Waters), Kinetex C18 (100 x 4.6 mm, 2.6 μ m, Phenomenex) y monolítica Onyx C18 (100 x 4.6 mm, Phenomenex). Para la filtración de la muestra utilizadas durante el estudio se usaron filtros con un tamaño de poro de 0.22 μ m (Millipore, U.S.A.).

Preparación de muestras

Pasta dental con y sin TCS, así como los demás productos de higiene personal se compraron en un mercado local en Colima, México. Para la extracción de TCS se añadieron 0.2 g de pasta dental a 2 mL de MeOH y luego se sonicó durante 7 minutos. Finalmente, se filtró 1 mL del sobrenadante (0.22 μ m) y se transfirió al vial de HPLC para su posterior análisis cromatográfico.

Análisis mediante HPLC-DAD

El análisis cromatográfico se llevó a cabo en un módulo de separación Alliance e2695, que consta de una bomba cuaternaria, desgasificador, automuestreador y horno de columna acoplado a un detector de arreglo de diodos modelo 2996 con un rango de longitud de onda de 190-800 nm. La adquisición, el procesamiento y la gestión de los datos se realizaron con el software Empower Pro 2. Todo el sistema fue adquirido de Waters (Milford, MA, U.S.A.)

El análisis de TCS se llevó a cabo utilizando una columna Symmetry C18, una fase móvil isocrática que consiste en AcN:Agua (80:20, vol:vol), a una temperatura de 30 °C y un flujo de 0.6 mL/min, y un volumen de inyección de 10 μ L. El tiempo de análisis es de 5 min. La determinación de TCS se registró a 225 nm. La identificación de TCS se realizó comparando tiempos de retención y espectros UV en el rango de 190-280 nm con el estándar previamente analizado.

Validación del método

La validación del método propuesto se llevó a cabo utilizando como muestra pasta de dientes y siguiendo la guía Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH, 1996/2005) Comisión Europea 200/657/EC. Los parámetros de validación calculados fueron selectividad, linealidad, precisión, exactitud, sensibilidad (límite de detección y cuantificación) y robustez. Los datos se analizaron utilizando el software Statistica 8.0 (Weiß, 2007).

La selectividad se evaluó comparando cuantitativamente el tiempo de retención y los espectros UV del pico de TCS obtenido en la muestra comparado con el estándar. La linealidad se estudió utilizando análisis de regresión lineal de la curva de calibración en cinco puntos, y se calcularon el rango lineal y el porcentaje de linealidad. La precisión se evaluó mediante el análisis de tres muestras a tres diferentes concentraciones de TCS y se expresó como porcentaje de recuperación del analito. La precisión (repetibilidad y reproducibilidad) del método se expresó como el porcentaje de desviación estándar relativa (RSD) de mediciones repetidas. Para la repetibilidad se analizaron tres concentraciones diferentes en el mismo día y para la reproducibilidad se analizaron tres concentraciones diferentes en tres días consecutivos. La sensibilidad se estimó utilizando el límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) que se determinaron mediante una serie de diluciones de una solución que contenía TCS hasta que

su señal se confundió con el ruido de fondo. Para obtener estos valores, la desviación estándar de la pendiente (σ) se divide por la pendiente (m) de la curva de calibración y se multiplica por 3.3 (LOD = $3.3\sigma/m$) o 10 (LOQ = $10\sigma/m$).

Robustez

La robustez se realizó mediante la prueba de Youden-Steiner donde se seleccionaron siete parámetros en función de la probabilidad de variación del método. En esta prueba, se realizan ocho análisis cromatográficos para evaluar el efecto de dichos parámetros. En este estudio, los parámetros seleccionados fueron: operador, peso de la muestra, temperatura de extracción, tipo de filtro, agitación, tipo de pipeta y volumen de extracción. El valor nominal de cada parámetro se indica con letras mayúsculas (A-G) y su valor alternativo se indica con letras minúsculas (a-g). El efecto de una variable se calcula por la diferencia entre el resultado medio obtenido con la variable al valor nominal del resultado medio alcanzado con ella al valor alternativo por la ecuación: $D_i = \Sigma \text{letras mayúsculas} - \Sigma \text{letras minúsculas}$. Si una variable tiene un efecto sobre los resultados, su diferencia será significativamente mayor que las diferencias de las otras variables.

La desviación estándar de las diferencias (SDi) fue obtenido por $S_{D_i} = \sqrt{2x \Sigma(D_i^2/7)}$. Si SDi es menor que la desviación estándar del método (RSD o reproducibilidad), todos los parámetros juntos no afectan los resultados y se puede concluir que el método es robusto.

Aplicabilidad del método

La aplicabilidad del método fue probado por diversos productos de cuidado personal: se emplearon tres muestras de talco (Racel TM y Sanofi TM) con TCS, una crema con TCS (Sanofi TM), y otra crema sin RCS (Sanofi TM). Como control, se empleó una muestra de TCS de 100 mg/kg. Se utilizaron las condiciones cromatográficas y preparación de muestras mencionadas anteriormente. El tiempo de retención y el espectro UV se compararon con los de control.

Resultados y Discusión

Optimización del método mediante HPLC-DAD

Para obtener el menor tiempo de análisis y la mejor resolución del pico, se optimizó la separación. La naturaleza semisimétrica y fenólica de la estructura del TCS (Figura 1), fueron factores importantes observados que llevaron al uso de columnas con tales características. Diferentes grupos de investigación han desarrollado métodos de validación para la determinar y cuantificar TCS en productos para el cuidado dental empleando columnas C18 RP (Piccoli *et al.*, 2002; Mahitha *et al.*, 2014; Aminu *et al.*, 2018).

Por esta razón, se utilizaron dos columnas cromatográficas Symetry C18 y Kinetex C18 y una columna monolítica Onix C18. En las mismas condiciones cromatográficas: fase móvil de AcN:Agua 80:20 (vol:vol) a 30 °C y un flujo de 0.6 mL/min, el pico del TCS se eluyó en el

primer minuto del cromatograma, interfiriendo con el frente del disolvente cuando se utilizaron las columnas Kinetex C18 y monolítica Onyx (Figura 2) por lo que fueron descartadas para su posterior análisis. Por lo tanto, la separación óptima para el TCS se logró en un tiempo total del cromatograma de 2.5 min utilizando la columna Symmetry C18 (Figura 2). De acuerdo con el espectro UV de TCS, la longitud de onda de detección se estableció a 225 nm (máxima absorción del compuesto) y el tiempo de retención resultante fue de 2.3 min.

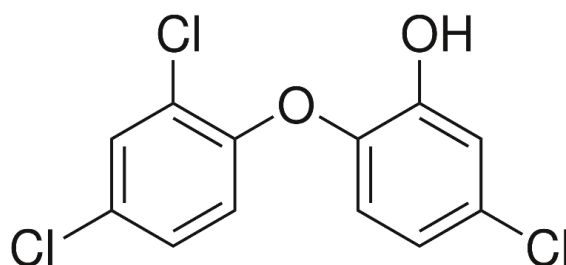


Figura 1. Estructura del TCS.

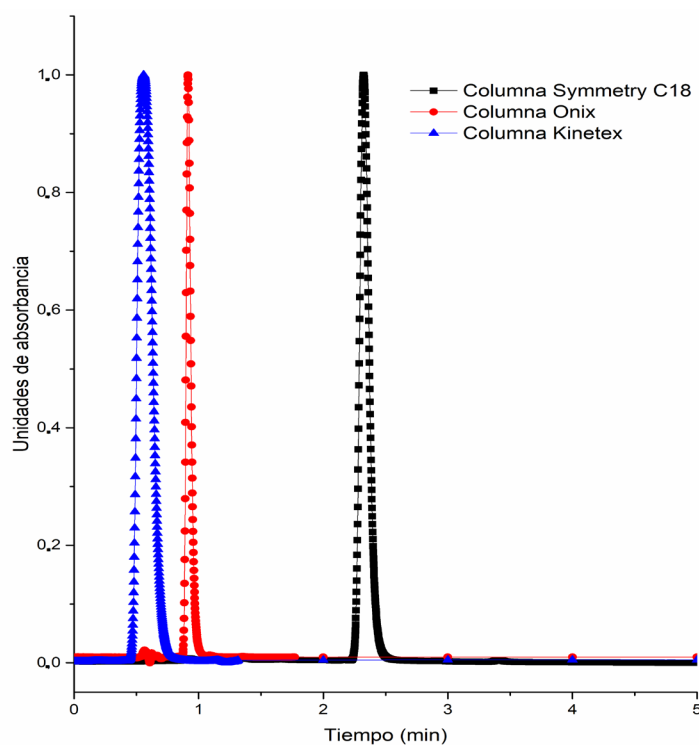


Figura 2. Cromatograma de separación del TCS a 100 mg/L.

Optimización se la preparación de la muestra

Antes del análisis del TCS, se optimizó la preparación de la muestra. Para la optimización de la preparación de la muestra se utilizó un diseño de experimento (DoE) utilizando el software Statistica 8.0 (StatSoft Inc. Tulsa, OK, U.S.A.). Para ello se optó por un diseño factorial fraccionado de Box-Behnken. Se ha demostrado que este DoE es un enfoque útil ampliamente aplicado en métodos analíticos para la optimización de las condiciones cromatográficas (Ahmad *et al.*, 2016; Abril *et al.*, 2018; Czyrski & Sznura, 2019; Mutalik *et al.*, 2021; Alam *et al.*, 2022), debido a que este diseño reduce sustancialmente la cantidad de experimentos necesarios para la optimización y, por lo tanto, ahorra tiempo y también considera las interacciones entre diferentes factores. Los usos prácticos del diseño de Box.Behnken para la estimación de fármacos como la pravastatina a granel y en forma de dosificación farmacéutica (Ahmad *et al.*, 2016), determinación de contaminantes emergentes (incluido el TCS) en muestras ambientales (Abril *et al.*, 2018), la cuantificación de antivirales en nanoliposomas cargados (Mutalik *et al.*, 2021), y la estimación de fármacos naturales emergentes como la timoquinona de las semillas de *Nigella sativa* (Alam *et al.*, 2022) han sido reportados previamente.

Para examinar los efectos en la extracción de TCS, se eligieron tres variables en tres niveles para establecer un DoE L^{k-1} , donde L son los niveles ensayados y k las variables elegidas. Las tres variables independientes en este experimento fueron: tiempo de sonicación (min), volumen de extracción de metanol (mL) y peso de la muestra (g), y la variable dependiente (recuperación de TCS) como respuesta. La Tabla 1 muestra el DoE utilizado para la optimización de la preparación de la muestra: la matriz de diseño factorial experimental con las tres variables independientes y sus tres niveles; también muestra la respuesta como recuperación de TCS para cada experimento. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado a una concentración de 100 mg/kg.

Tabla 1. Matriz del diseño de experimento (factores y sus niveles) utilizados para la optimización de la preparación a partir de muestras de pasta de dientes y las recuperaciones de la extracción de TCS de cada experimento como variable independiente.

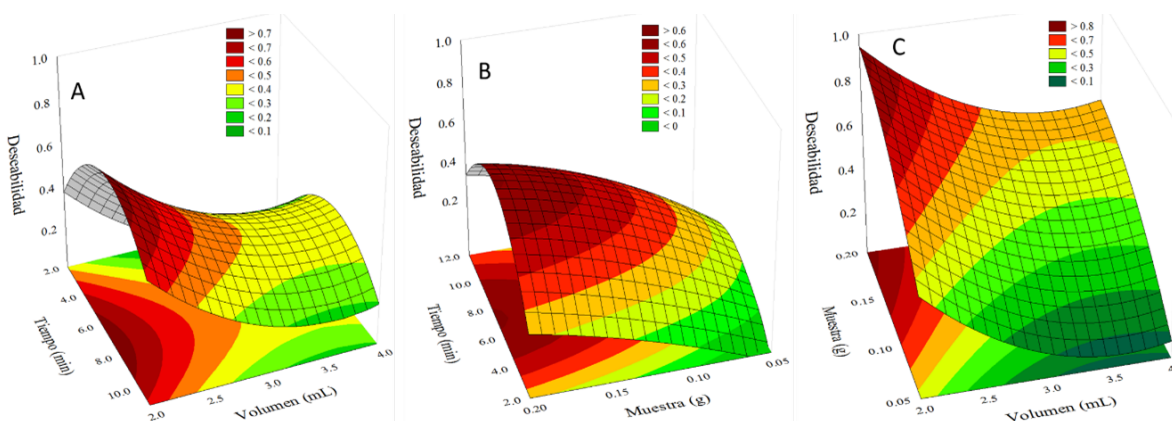
Experimento	Niveles de las variables analíticas*			RecuperaciónTCS (%)
	Tiempo (min)	Volumen de extracción (mL)	Peso de la muestra (g)	
1	5	2	0.05	32.9 ± 0.5
2	5	3	0.20	39.1 ± 5.1
3	5	4	0.10	25.8 ± 5.5
4	10	2	0.20	99.9 ± 1.7
5	10	3	0.10	43.2 ± 3.2
6	10	4	0.05	14.9 ± 2.8
7	15	2	0.10	60.7 ± 2.3
8	15	3	0.05	22.6 ± 2.6
9	15	4	0.20	55.0 ± 1.6

* Tres niveles de concentración para cada variable (bajo, medio y alto)

Utilizando los resultados del diseño factorial fraccionado, se aplicó la Metodología de Respuesta de Superficie (RSM) para visualizar las superficies de respuesta en 3D y los gráficos de contorno en 2D. En este sentido, los valores óptimos para cada variable se obtuvieron calculando un valor de deseabilidad (d) que oscila entre 0 y 1; representando un valor indeseable y uno deseable respectivamente. La función de deseabilidad se ajusta como una función cuadrática de la siguiente manera: $D = a_1 + a_2x + a_3y + a_4xx + a_5xy + a_6yy$.

En la Figura 3 A-C se muestra la superficie de respuesta para la deseabilidad de la extracción de TCS en función de dos factores. La Figura 3A corresponde a la superficie de respuesta de deseabilidad en función de Tiempo vs Volumen con una función $D = 1.64 + 0.26x - 1.12y - 0.01xx + 3.4286 \times 10^{-9}xy + 0.16yy$. La Figura 3B corresponde a la superficie de respuesta de deseabilidad en función del Tiempo vs Muestra $D = -0.74 + 0.18x + 5.41y - 0.013xx + 0.082xy - 11.44yy$. La Figura 3C corresponde a la superficie de respuesta de deseabilidad en función de Muestra vs Volumen $D = 1.78 - 1.12x + 6.77y + 0.16xx - 1.81 \times 10^{-7}xy - 14.18yy$.

Figura 3. Gráficos de superficie de respuesta, A) Tiempo vs Volumen. B) Tiempo vs Muestra y C) Muestra vs Volumen.



Como se puede observar en la Figura 3 A y B, para el factor “tiempo”, el mejor resultado se obtiene cuando se emplea 7 min. Para el factor “Volumen”, el mejor resultado se logra utilizando 2 mL de metanol (Figura 3 A y C). Para el factor “Muestra” los mejores resultados se obtienen utilizando un tamaño de muestra de 0.2 g (Figura 3 B y C).

Validación del método

La validación del método se realizó mediante la estimación de selectividad, linealidad, exactitud, precisión, robustez y sensibilidad. Para la validación se utilizó una muestra de pasta dental sin TCS (Racel™). Los resultados de los parámetros de validación se muestran en la Tabla 2.

Selectividad

La selectividad del método se evaluó mediante una comparación cualitativa de los cromatogramas de la solución estándar a 100 mg/L (Figura 2) y de la muestra de pasta de dientes (Figura 4), como se describió anteriormente. Se puede notar que se presentan otros picos en la muestra, sin embargo, no interfieren con el análisis y cuantificación de TCS. En un estudio publicado por Piccoli *et al.* (2002) determinaron la presencia de sacarina sódica en una muestra de pasta dental que contenía TCS, mientras que Baranowska *et al.* (2014) detectaron la presencia de metilparabeno, alcohol bencílico y benzoato de sodio en muestras de pasta de dientes mediante cromatografía líquida rápida. Sin embargo, esos constituyentes no influyeron en la señal TCS, por lo que no se consideraron como interferencia.

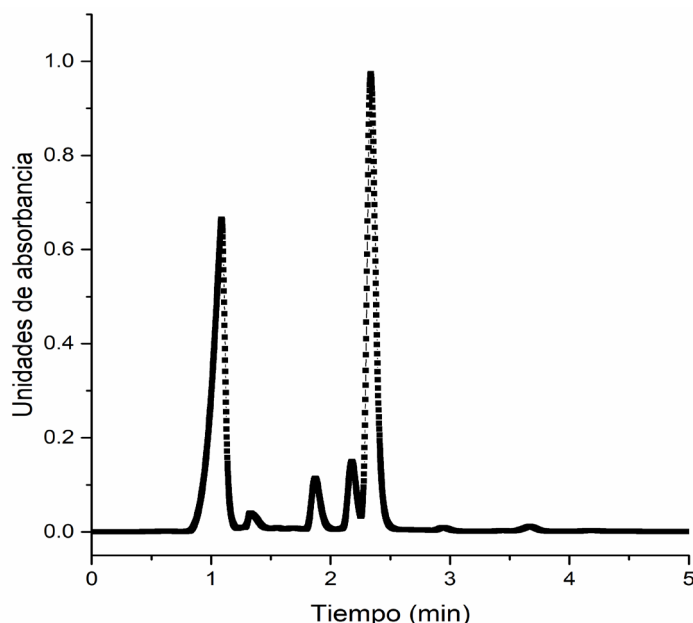


Figura 4. Cromatograma de muestra de pasta de dientes a 225 nm.

Linealidad

La linealidad se determinó a partir de curvas de calibración añadidas a cinco niveles de concentración y cada uno se analizó por triplicado. Las muestras de pasta de dientes (0.2 g) sin TCS se enriquecieron con 2 mL de solución estándar de TCS a 20, 50, 100, 200 y 400 mg/L, por lo que la concentración de TCS en términos de pasta de dientes fue equivalente a 200, 500, 1000, 2000 y 4000 mg/kg. La curva de calibración ajustada a la matriz se construyó trazando

las áreas de los picos (eje y) frente a su concentración (eje x) de TCS. Se calculó la ecuación lineal $y = mx + b$, se calculó la pendiente (m), el intercepto (b) y el coeficiente de regresión lineal (r). Se obtuvo un valor de r superior a 0.99. Además, el porcentaje de linealidad (L%) se calculó mediante la ecuación: $L (\%) = 100 \cdot (1 - (S_m/m))$ donde S_m es la desviación estándar de la pendiente y m es la pendiente de la curva de calibración ajustada a la matriz. El valor de L (%) obtenido fue de 96.4. Teniendo en cuenta estos resultados, el método desarrollado para la determinación de TCS puede considerarse lineal (ICH, 1996/2005). Los resultados de estos parámetros se muestran en la Tabla 2. El rango lineal de este método (20-400 mg/L) es más amplio en comparación con otros métodos informados (Piccoli *et al.*, 2002; Liu & Wu, 2012; Mahitha *et al.*, 2014), lo que permite la cuantificación de TCS a niveles más altos.

Exactitud

La precisión del método se calculó como la recuperación de TCS a tres concentraciones diferentes: concentración baja (200 mg/kg), media (1000 mg/kg) y alta (4000 mg/kg) (cada muestra se analizó por triplicado). Se pesó una cantidad adecuada de muestra y se añadió una cantidad conocida de estándar, se trató y analizó como se mencionó anteriormente. Los porcentajes de recuperación se calcularon con la ecuación ($\%R = \text{concentración encontrada} / \text{concentración adicionada} \times 100$). Las recuperaciones generales estuvieron entre 100.6 y 119.5 % (Tabla 2), lo que indica que este método fue lo suficientemente preciso para la determinación de TCS en muestras de pasta de dientes. Otros autores han documentado porcentajes de recuperación similares en muestras de pasta de dientes (Piccoli *et al.*, 2002; Mahitha *et al.*, 2014). Los criterios de aceptación habituales para este parámetro están en el rango de 100 ± 20 %. Estos valores se consideran aceptables dentro de los límites establecidos por la directriz de la Comisión Europea 2002/657/E.

Precisión

La precisión del método se evaluó a través de la repetibilidad y reproducibilidad en términos de desviación estándar relativa (RSD) (Tabla 2). Para la repetibilidad, se analizaron tres concentraciones diferentes (200, 1000 y 4000 mg/kg) de TCS por triplicado en el mismo día. Los valores RSD de repetibilidad para 200, 1000 y 4000 mg/kg fueron 15.7, 6.1 y 3.0 %, respectivamente. Para la reproducibilidad, las mismas tres concentraciones de TCS se analizaron por triplicado durante tres días diferentes. Los valores RSD para 200, 1000 y 4000 mg/kg fueron 9.9, 5.9 y 1.6 %, respectivamente. Las variaciones expresadas como RSD fueron inferiores al 20 %, y considerando los criterios de aceptación, el método puede considerarse preciso.

Sensibilidad

La sensibilidad del método se determinó mediante la determinación de los parámetros LOD y LOQ empleando las ecuaciones descritas anteriormente. Se tomó 1 ppm como la concentración de TCS que se confundió con el ruido de referencia, por lo que se utilizó esta concentración para calcular el LOD y el LOQ. Como se muestra en la Tabla 2, los valores LOD y LOQ son 30 y 50 mg/kg, respectivamente. Los límites del método encontrado se encuentran dentro del rango

generalmente determinado en otros estudios (Liu & Wu, 2012). Las pastas dentales comerciales que contienen TCS tienen una concentración de este compuesto entre 1000-3000 mg/kg, por lo que con el método propuesto se puede determinar perfectamente la concentración de TCS en la pasta dental. Por otro lado, el rango lineal del método fue de 200-4000 mg/kg, que es mayor que el LOD y el LOQ, lo que indica que estaba bien establecido.

Tabla 2. Parámetros de validación para el método de HPLC–DAD utilizado para la determinación de TCS en pasta de dientes: rango lineal, linealidad, porcentaje de linealidad, coeficiente de correlación lineal, pendiente e intercepto de curva de calibración añadida, límite de detección y cuantificación, repetibilidad, reproducibilidad, recuperación y robustez.

Muestra de pasta de dientes (analyte TCS)				
Rango lineal (mg/kg)		200-4000		
Linealidad (%)		96.4		
r^a		0.9988		
m^b		47357		
b^c		1×10^6		
Sensibilidad	LOD ^d (ng/kg)		30	
	LOQ ^e (ng/kg)		50	
Precisión (RSD^f, %)	Repetibilidad	C_1^g	15.7	
		C_2^h	6.1	
		C_3^i	3.0	
	Reproducibilidad	C_1^g	9.9	
		C_2^h	5.9	
		C_3^i	1.6	
Exactitud	Recuperación (%)		C_1^g	119.5
			C_2^h	104.8
			C_3^i	100.6
Robustez S_{Di}		12.2		

^a Coeficiente de correlación; ^b pendiente; ^c intercepto; ^d límite de detección; ^e límite de cuantificación; ^f desviación estándar relativa; ^g Nivel de concentración baja del rango lineal 200 mg/kg, ^h Nivel de concentración media del rango lineal 1000 mg/kg, ⁱ Nivel de concentración alto del rango lineal 4000 mg/kg. S_{Di} (Diferencias de la desviación estándar).

Robustez

Para la prueba de Youden-Steiner, se realizaron ocho experimentos añadiendo TCS a 1000 mg/kg y procesando cada muestra de acuerdo con el método de preparación. En la Tabla 3 se muestra la variación de los parámetros, así como las combinaciones factoriales y los resultados de la prueba de Youden-Steiner. Los resultados muestran que la diferencia (Di) oscila entre -9.7 y 15.1, correspondiendo el mayor valor a la variable “operador” seguida de la variable “agitación”. Esto significa que estas dos variables son las que se deben controlar durante todo el proceso. Solo hay un informe que analizó diferentes factores que influyeron en la determinación de TCS en muestras de pasta de dientes (Mahitha *et al.*, 2014). En su investigación, Mahitha *et al.* (2014) evaluaron el efecto del analista, la temperatura de la columna, el flujo, el pH del tampón y la longitud de onda en la cuantificación de TCS.

Por otro lado, la desviación estándar de las diferencias (SDi) calculada con la ecuación descrita en la metodología fue de 12.2. Cuando SDi es significativamente mayor que la desviación estándar del método (15.7 %), significa que todos los factores juntos influyen en el resultado y que el método no es lo suficientemente robusto frente a las modificaciones elegidas (Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 2002). Teniendo en cuenta esta información, el método propuesto puede considerarse robusto.

Tabla 3. Diseño experimental para el Test de robustez de Youden-Steiner: Factores y niveles seleccionados y diferencia estimada de los siete factores.

Factores	Niveles		Combinación Factorial								Diferencia (D)*
	Usado	Nuevo	S	T	U	V	W	X	Y	Z	
Operador (A/a)	1	2	A	A	A	A	a	a	a	a	15.1
Peso de muestra (g) (B/b)	0.2	0.3	B	B	b	b	B	B	b	b	-5.4
Temperatura de extracción (°C) (C/c)	25	30	C	c	C	c	C	c	C	c	5.7
Tamaño poro del filtro (D/d)	0.20	0.45	D	D	d	d	d	d	D	D	8.4
Agitación (E/e)	Ultrasonido	Vortex	E	e	E	e	e	E	e	E	-9.7
Tipo de pipeta (F/f)	Automático	Manual	F	f	f	F	F	f	f	F	5.6
Volumen de extracción (mL) (G/g)	2	2.2	G	g	g	G	g	G	G	g	6.2

* En valor absoluto

Aplicabilidad del método

Para evaluar la aplicabilidad del método, se probaron cinco productos de cuidado personal: tres comerciales de talco (que contienen TCS) y dos cremas: una con TCS y otra comercializada como libre de TCS. Para propósitos de comparación, también se muestra un cromatograma de un

estándar de TCS de 100 mg/L en la Figura 5 (A). Los cromatogramas de las muestras procesadas se muestran en la Figura 5 (B-F). Cuatro muestras (todas de talco y crema con TCS) exhiben un pico homogéneo similar al control de TCS, con tiempos de retención de alrededor de 2.4 minutos. Por otro lado, la crema para etiquetas sin TCS presenta un pequeño pico con un tiempo de retención y un espectro UV idénticos con respecto a los productos que contienen TCS. De estos resultados se puede concluir que: 1) este método es aplicable para la determinación de TCS en productos de cuidado personal y 2) algunos productos con una etiqueta libre de TCS pueden contener este producto en cantidades menores. Son necesarios más estudios para corroborar esta afirmación. Finalmente, se demostró la aplicabilidad de nuestro método a las muestras reales.

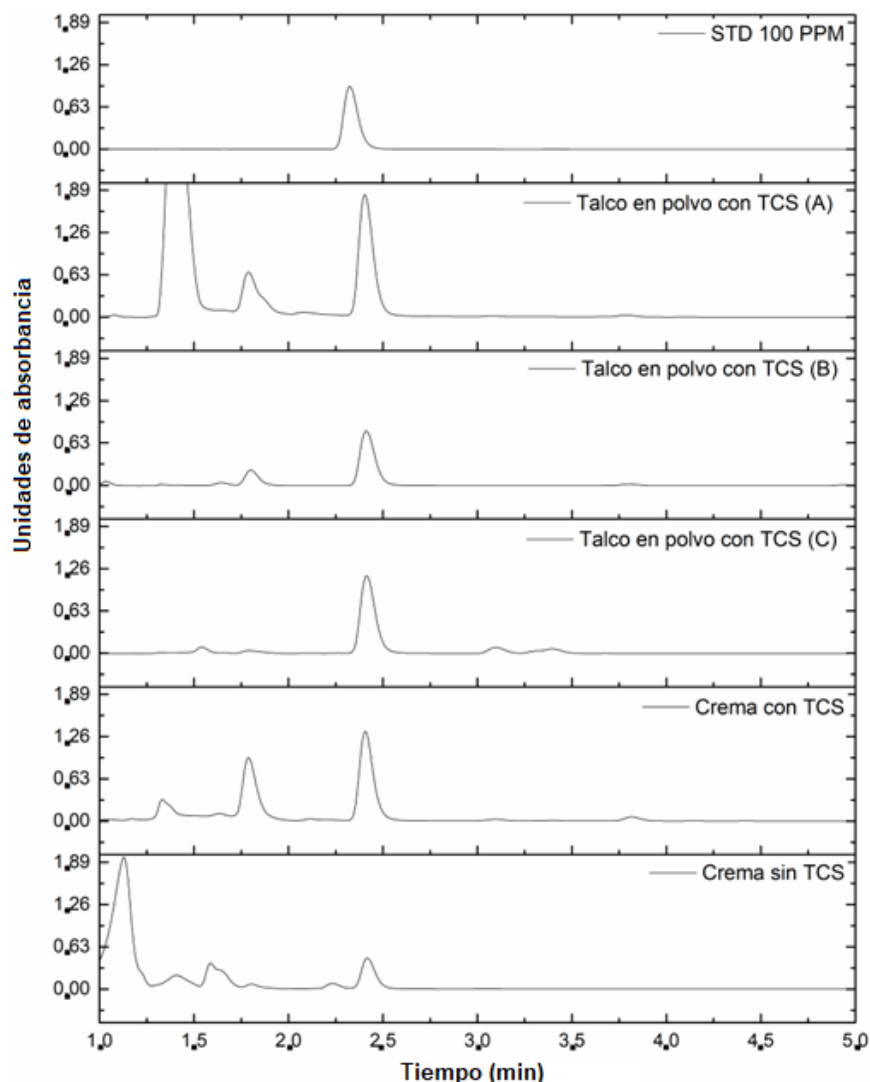


Figura 5. Cromatogramas de muestras de talco y crema

Conclusiones

Se desarrolló un método económico, simple y rápido para determinar TCS en muestras de pasta de dientes usando HPLC-DAD. Se probaron varias columnas de cromatografía, siendo Symmetry C18 la que mejor resolvió el TCS. Las condiciones óptimas para la extracción de TCS de la pasta dental se lograron mediante un diseño experimental factorial y una metodología de superficie de respuesta. El presente método mostró buena linealidad ($r > 0.99$), selectividad, precisión (rango de reproducibilidad y repetibilidad), exactitud (porcentaje de recuperación) y sensibilidad (LOD y LOQ). La robustez del método se realizó a través de una prueba de Youden-Steiner, los resultados obtenidos indican que el método puede considerarse como robusto. Finalmente, el método se aplicó con éxito en otros productos de uso personal, como cremas y talcos.

Contribución de los autores

Conceptualización del trabajo, MVR, CMSG.; desarrollo de la metodología, RPMA, BML, DCTLF, MLEG, MMMA, RABA; manejo de software, MLEG, RABA; validación experimental, RPMA, BML, DCTLF, MLEG, MMMA, RABA.; escritura y preparación del manuscrito, MVR, RPMA, BML, DCTLF, MLEG, MMMA, RABA, CMSG; redacción, revisión y edición, MVR, CMSG. Todos los autores de este manuscrito han leído y aceptado la versión publicada del mismo.

Financiamiento

Este trabajo fue apoyado por los proyectos de investigación CONACyT becas 316608 y 316686.

Agradecimientos

Barragan-Mendoza, De la Cruz-Torres, Macias-López, Maldonado-Michel, Rodríguez-Aguilar agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) México por las becas de investigación otorgadas.

Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

Referencias

Abril, C., Santos, J. L., Malvar, J. L., Martín, J., Aparicio, I., & Alonso, E. (2018). Determination of perfluorinated compounds, bisphenol A, anionic surfactants and personal care products in digested sludge, compost and soil by liquid-chromatography-tandem mass spectrometry.

- Journal of Chromatography A*, 1576, 34-41. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.09.028>
- Ahmad, A., Raish, M., Alkharfy, K., Mohsin, K., & Shakeel, F. (2016). Box-Behnken supported development and validation of robust rp-hplc method: an application in estimation of pravastatin in bulk and pharmaceutical dosage form. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 61(2), 2963-2967. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-97072016000200022>
- Alam, P., Shakeel, F., Taleuzzaman, M., Foudah, A. I., Alqarni, M.H., Aljaba, T. M., Alshehri, S., & Ghoneim, M. M. (2022). Box-Behnken Design (BBD) Application for Optimization of Chromatographic Conditions in RP-HPLC Method Development for the Estimation of Thymoquinone in Nigella sativa Seed Powder. *Processes*, 10(6), 1082. <https://doi.org/10.3390/pr10061082>
- Aminu, N., Chan, S. Y., Khan, N. H., & Toh, S. M. (2018). Concurrent determination of triclosan and flurbiprofen by high-performance liquid chromatography in simulated saliva and its application in dental nanogel formulation. *Acta Chromatographica*, 30(4), 219-224. <https://doi.org/10.1556/1326.2017.00286>
- Baranowska, I., Wojciechowska, I., Solarz, N., & Ikrutysza, E. (2014). Determination of preservatives in cosmetics, cleaning agents and pharmaceuticals using Fast Liquid Chromatography. *Journal of Chromatographic Sciences*, 52(1), 88-94. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bms210>
- Bever, C. S., Rand, A. A., Nording, M., Taft, D., Kalanetra, K. M., Mills, D. A., Breck, M. A., Smilowitz, J. T., German, J. B., & Hammock, B. D. (2018). Effects of triclosan in breast milk on the infant fecal microbiome. *Chemosphere*, 203, 467-473. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.186>
- Calafat, A. M., Ye, X., Wong, L. Y., Reidy, J. A., & Needham, L. L. (2008). Urinary Concentrations of Triclosan in the U.S. Population: 2003–2004. *Environmental Health Perspectives*, 116(3), 303-307. <https://doi.org/10.1289/ehp.10768>
- Chiapetta, S. C., de Oliveira, E. C. B., Olivier, B. C., Mercante, L. A., Henriques, D. M., & Pereira-Netto, A. D. (2011). Intralaboratory validation, comparison and application of HPLC-UV-DAD methods for simultaneous determination of benzalkonium chloride, chlorhexidine digluconate and triclosan. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22(10), 1913-1920. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532011001000012>
- Chtourou, M., Mallek, M., Dalmau, M., Mamo, J., Santos-Clotas, E., Salah, A. B., Walha, K., Salvadó, V., & Monclús, H. (2018). Triclosan, carbamazepine and caffeine removal by activated sludge system focusing on membrane bioreactor. *Process Safety and Environmental Protection*, 118, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2018.06.019>
- Czyrski, A., & Sznura, J. (2019). The application of Box-Behnken-Design in the optimization of HPLC separation of fluoroquinolones. *Scientific reports*, 9, 19458. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55761-z>
- Dann, A. B., & Hontela, A. (2011). Triclosan: environmental exposure, toxicity and mechanisms of action. *Journal of Applied Toxicology*, 31(4), 285-311 <https://doi.org/10.1002/jat.1660>
- Dhillon, G. S., Kaur, S., Pulicharla, R., Brar, S. K., Cledón, M., Verma, M., & Surampalli, R. Y. (2015). Triclosan: Current Status, Occurrence, Environmental Risks and Bioaccumulation Potential. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(5), 5657-5684. <https://doi.org/10.3390/ijerph120505657>
- García-Yerena, G., Sánchez, A. J., Galindo-Reyes, E., & Cerda-Cristerna, B. (2016). Triclosan in Toothpaste, Is There Any Real Risk for the Health?. *Odontos-International Journal of Dental Sciences*, 18(2), 41-49. <https://doi.org/10.15517/ijds.v0i0.24102>
- International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (ICH). (1996/2005). *Validation of Analytical Procedures:*

- Text and Methodology.* ICH, Geneva.
- Jackson, E. N., Rowland-Faux, L., James, M. O., & Wood, C. E. (2018). Administration of low dose triclosan to pregnant ewes results in placental uptake and reduced estradiol sulfotransferase activity in fetal liver and placenta. *Toxicology Letters*, 294, 116-121. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.05.014>
- Liu, T., & Wu, D. (2012). High Performance Liquid Chromatographic Determination of triclosan and triclocarban in cosmetic products. *International Journal of Cosmetic Science*, 34, 489-494. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2012.00742.x>
- Mahitha, P., Gurupadaya, B. M. & Chandan, R.S. (2014). Analytical method development and validation of triclosan in dental formulations. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 5(9), 3810-3816. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.5\(9\).3810-16](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.5(9).3810-16)
- Mutalik, S. P., Mullick, P., Pandey, A., Kulkarni, S., & Mutalik, S. (2021). Box–Behnken design aided optimization and validation of developed reverse phase HPLC analytical method for simultaneous quantification of dolutegravir sodium and lamivudine co-loaded in nano-liposomes. *Journal of Separation Sciences*, 44(15), 2917-2931. <https://doi.org/10.1002/jssc.202100152>
- Official Journal of the European Communities. (2002). 2002/657/EC: Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, L 221, 8-36. <http://data.europa.eu/eli/dec/2002/657/oj>
- Olaniyan, L. W., Mkwetshana, N., & Okoh, A. I. (2016). Triclosan in water, implications for human and environmental health. *Springerplus*, 5, 1639. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-3287-x>
- Paul, K. B., Hedge, J. M., Devito, M. J., & Crofton, K. M. (2010). Developmental triclosan exposure decreases maternal and neonatal thyroxine in rats. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(12), 2840-2844. <https://doi.org/10.1002/etc.339>
- Piccoli, A., Fiori, J., Andrisano, V., & Orioli, M. (2002). Determination of triclosan in personal health care products by liquid chromatography (HPLC). *Il Farmaco*, 57(5), 369-372. [https://doi.org/10.1016/S0014-827X\(02\)01225-9](https://doi.org/10.1016/S0014-827X(02)01225-9)
- Pinckney, J. L., Thompson, L., & Hylton, S. (2017). Triclosan alterations of estuarine phytoplankton community structure. *Marine Pollution Bulletin*, 119(1), 162-168. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.03.056>
- Sabaliunas, D., Webb, S. F., Hauk, A., Jacob, M., & Eckhoff, W. S. (2003). Environmental fate of Triclosan in the River Aire Basin, UK. *Water Research*, 37(13), 3145-3154. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00164-7](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00164-7)
- Sanches-Silva, A., Sendón-García, R., López-Hernández, J., & Paseiro-Losada, P. (2005). Determination of triclosan in foodstuffs. *Journal of Separation Science*, 28(1), 65-72. <https://doi.org/10.1002/jssc.200401845>
- Shen, J. Y., Chang, M. S., Yang, S. H., & Wu, G. J. (2012). Simultaneous determination of triclosan, triclocarban, and transformation products of triclocarban in aqueous samples using solid-phase micro-extraction-HPLC-MS/MS. *Journal of Separations Sciences*, 35(19), 2544-2552. <https://doi.org/10.1002/jssc.201200181>
- Silva, D. C., Araújo, C. V., López-Doval, J. L., Neto, M. B., Silva, F. T., Paiva, T. C., & Pompêo, M. L. (2017). Potential effects of triclosan on spatial displacement and local population decline of the fish *Poecilia reticulata* using a non-forced system. *Chemosphere*, 184, 329-336. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.06.002>
- Singer, H., Muller, S., Tixier, C., & Pillonel, L. (2002). Triclosan: Occurrence and Fate of a Widely Used Biocide in the Aquatic Environment: Field Measurements in Wastewater Treatment Plants, Surface Waters, and Lake Sediments. *Environmental Science & Technology*, 36(23),

- 4998-5004. <https://doi.org/10.1021/es025750i>
- Weiß, C. H. (2007). StatSoft, Inc., Tulsa, OK.: STATISTICA, Version 8. AStA Advances in Statistical Analysis, 91(3), 339–341. <https://doi.org/10.1007/s10182-007-0038-x>
- Witorsch, R. (2014). Critical analysis of endocrine disruptive activity of triclosan and its relevance to human exposure through the use of personal care products. *Critical Reviews in Toxicology*, 44(4), 535-555. <https://doi.org/10.3109/10408444.2014.910754>
- Wu, J. L., Lam, N. P., Martens, D., Kettrup, A., & Cai, Z. (2007). Triclosan determination in water related to wastewater treatment. *Talanta*, 72(5), 1650-1654. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.03.024>
- Yueh, M. F., & Tukey, R. H. (2016). Triclosan: A Widespread Environmental Toxicant with Many Biological Effects. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 56, 251-272. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010715-103417>