



### 3.3 Contenido de fósforo

La prueba del análisis de fósforo realizada mediante el método de colorimetría de Chen en PRP se describe en el capítulo 2.4. Como ensayo cuantitativo, se evaluaron la linealidad, la exactitud y la precisión. Se determina el contenido de fósforo mediante una reacción colorimétrica, la cual mide la absorción espectrofotométrica de un complejo fosfomolibdico coloreado a 825 nm. Dado que la absorción a esta longitud de onda no es específica para ese complejo coloreado, no se puede evaluar la especificidad. Se presenta un resumen de la validación en la tabla 12.

**Tabla 12: Contenido de fósforo en PRP: Validación, resumen**

Características	Criterios de aceptación	Resultados
<b>Linealidad</b>	Significancia de la pendiente: $P_{\text{linealidad}} < 0,01$ No hay desviación de la linealidad: $P_{\text{desviación de la linealidad}} > 0,05$	$P_{\text{linealidad}} < 0,0001$ ; $P_{\text{desviación de la linealidad}} = 0,83$ Después del ajuste lineal de $Y = \text{concentración medida}$ con respecto a $X = \text{volumen de la solución}$ , se destaca la siguiente relación: $Y = -0,3321 + 7,7181 \cdot X$ Coeficiente de correlación lineal $r = 0,9991$ con 16 grados de libertad Intervalo de linealidad: [3,9 -- 12,4]%
<b>Exactitud</b>	La recuperación porcentual promedio calculada para los 5 niveles de agregados teóricos se encuentra entre el 90 % y el 110 %.	La recuperación porcentual promedio y sus límites de confianza del 95 % son los siguientes: 100,4 % [99,0 % - 101,8 %]
<b>Precisión</b>	El coeficiente de variación de la precisión intermedia es $\leq 10$ %.	El coeficiente de variación de la precisión intermedia es igual a: 1,3% Intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia para 1 prueba con 1 medición que se realiza de la manera habitual: $\pm 0,22$ % de peso seco





### 3.3.1 Linealidad

Tres operadores llevaron a cabo tres pruebas independientes. Cada prueba incluyó un rango de 6 volúmenes de la solución de la muestra de prueba, correspondiente a un rango de seis cantidades de PRP ( $\mu\text{g}$ ) sometido a prueba.

Los datos analizados son concentraciones de fósforo expresadas en % y se presentan en la tabla 13.

**Tabla 13: Contenido de fósforo en PRP: Validación, linealidad; Cantidad de fósforo en la muestra (%)**

Volumen (mL)	Cantidad teórica de PRP ( $\mu\text{g}$ )	Grupo 1 (%)	Grupo 2 (%)	Grupo 3 (%)
0,6	60	4,42	4,41	4,25
0,8	80	5,49	5,88	5,98
1,0	100	7,35	7,41	7,32
1,2	120	9,03	8,94	8,83
1,4	140	10,53	10,46	0,43
1,6	160	12,12	11,92	12,07

Se les aplica a los datos una regresión lineal no ponderada, en la que se usa el método de los cuadrados mínimos. Se verifica la homogeneidad de las varianzas límite mediante una prueba de Cochran a un nivel de significancia del 5 %. Se evalúa la dependencia entre las cantidades esperadas (volumen de muestra de la solución de PRP), las cantidades de fósforo medidas y la linealidad de esta relación mediante un análisis de varianza de la regresión. El análisis de varianza permite concluir la significancia de la pendiente ya que el valor P de linealidad con la tabla Snedecor a un nivel de significancia del 1% es inferior al 1% (valor  $P < 0,0001$ ), y una desviación no significativa de la linealidad ya que el valor P de la falta de ajuste de la linealidad con la tabla Snedecor al 5 % es superior al 5% (valor  $P = 0,83$ ).

La ecuación de la recta de regresión es:

$$Y = (-0,3321 \pm 0,2013) + (7,7181 \pm 0,1748) \cdot X$$

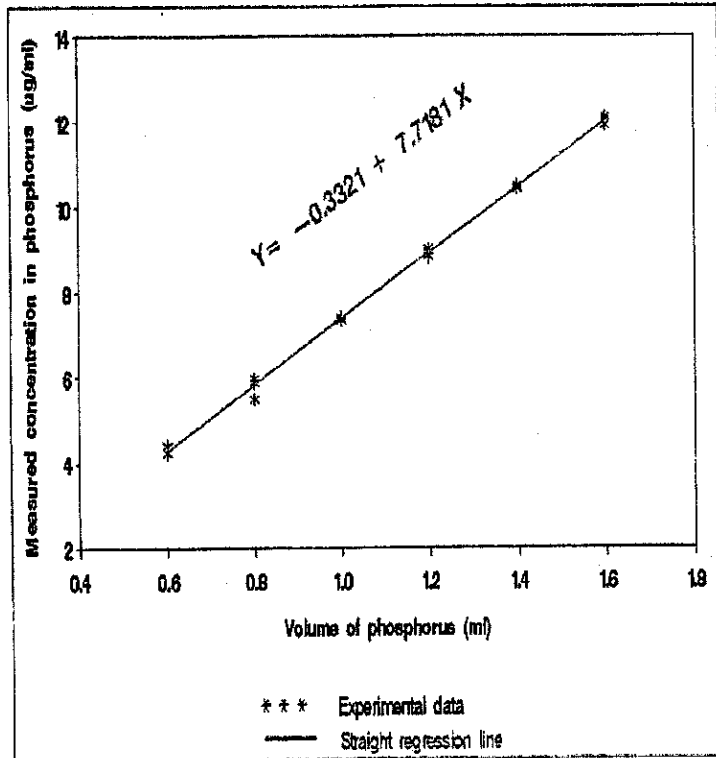
Donde:

- X = volumen (mL)
- Y = cantidad medida (%)
- Coeficiente de correlación lineal  $r = 0,9991$  con 16 grados de libertad
- Intervalo de linealidad: [3,94 - 12,38] %





Figura 5: Contenido de fósforo en PRP: validación, gráfico de linealidad

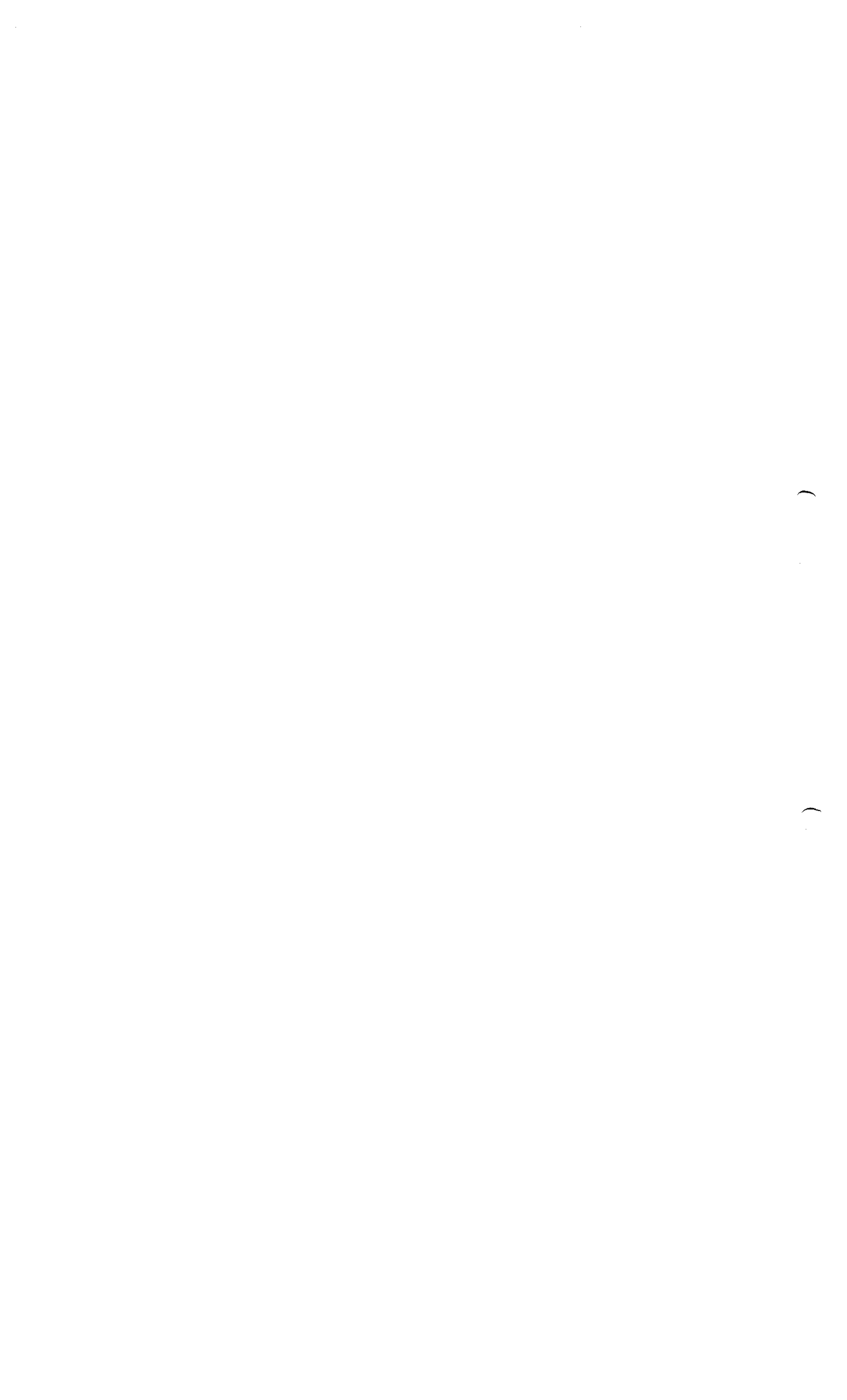


3.3.2 Exactitud

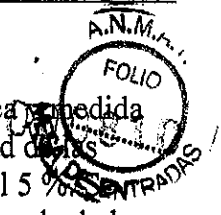
Los datos analizados corresponden al factor de concentración calculado, a partir de los resultados obtenidos en la prueba de linealidad (vea la tabla 13). Los factores de concentración teórica corresponden la proporción de la cantidad de PRP evaluada con respecto a la cantidad de 100 µg de PRP (cantidad típica de PRP sometido a prueba por rutina). Los factores de concentración medida corresponden a la proporción del contenido de fósforo obtenido en el nivel evaluado de PRP con respecto al contenido de fósforo obtenido con la cantidad de 100 µg de PRP. Los resultados del factor de concentración en los cinco niveles involucrados se presentan en la tabla 14.

Tabla 14: Contenido de fósforo en PRP: Validación, exactitud; factor de concentración calculada

Factor de concentración teórica	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
0,6	0,60	0,60	0,58
0,8	0,75	0,79	0,82
1,2	1,23	1,21	1,21
1,4	1,43	1,41	1,42
1,6	1,65	1,61	1,65



Se calculan las recuperaciones porcentuales entre los factores de concentración teórica y medida para cada nivel de concentración y para todos los grupos. Se verifica la homogeneidad de las varianzas intraniveles mediante una prueba de Cochran a un nivel de significancia del 5 %. Se demuestra la igualdad de las medias interniveles mediante el análisis de varianza y se calcula la recuperación porcentual media con límites de confianza del 95 %:



**Tabla 15: Recuperación porcentual promedio**

Recuperación porcentual	Límites de confianza del 95 %
100,39%	[98,97 - 101,82] %

La recuperación porcentual promedio está entre el 90 % y el 110 %.

### 3.3.3 Precisión

Se analizaron tres grupos en condiciones de precisión intermedia: los análisis se llevaron a cabo de manera independiente utilizando el mismo método, en una muestra primaria homogénea, en el mismo laboratorio, y los realizaron 3 operadores en 3 diferentes días.

Dentro de cada grupo, se sometieron a prueba 5 lotes de PRP y se llevaron a cabo 3 análisis por lote en condiciones que garantizaban la repetibilidad: los análisis se llevaron a cabo de forma independiente utilizando el mismo método, en una muestra primaria homogénea, en el mismo laboratorio, con los mismos equipos y los realizó el mismo operador en 3 días consecutivos.

Los datos analizados son concentraciones de fósforo expresadas en porcentaje de peso seco y se presentan en la tabla 16.

ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ  
APODERADO  
SANOFI PASTEUR S.A.





**Tabla 16: Contenido de fósforo en PRP: Validación, precisión; concentración en fósforo (de peso seco)**

Lote de PRP	Análisis	Grupo 1 (%)	Grupo 2 (%)	Grupo 3 (%)
FA221418	1	8,38	8,51	8,40
	2	8,65	8,42	8,49
	3	8,37	8,31	8,38
FA224375	1	8,21	8,22	8,27
	2	8,4	8,2	8,35
	3	8,11	8,16	8,22
FA224376	1	8,04	8,20	8,16
	2	8,33	8,24	8,30
	3	8,06	8,18	8,16
FA224377	1	8,16	8,30	7,99
	2	8,32	8,15	8,10
	3	8,07	8,13	7,98
FA247170	1	8,16	8,15	8,19
	2	8,34	8,22	8,27
	3	8,07	8,21	8,14

Para cada lote:

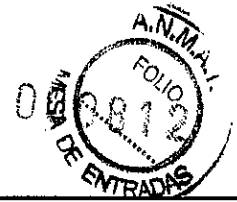
- Se verifica la homogeneidad de las varianzas intragrupalas mediante una prueba de Cochran a un nivel de significancia del 5 %.
- Los parámetros de repetibilidad/precisión intermedia se determinaron utilizando el cálculo de varianzas (varianza de repetibilidad en los grupos completos, varianza intergrupala y varianza de precisión intermedia).
- Se determinó el intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia con la prueba de la t en un nivel de significancia del 5 % con varianzas de repetibilidad e intergrupales.

En los lotes completos:

- Se verifica la homogeneidad de las varianzas de precisión intermedia mediante la prueba de Cochran.
- Se calculó una varianza de precisión intermedia común con su intervalo de confianza del 95%.

Las características de repetibilidad y precisión intermedia, así como el intervalo de confianza del 95 % para 1 corrida (1 medición) que se lleva a cabo de la manera habitual, se presentan en la tabla 17.





**Tabla 17: Características de repetibilidad y precisión intermedia**

Número de lote	Características	Coefficiente de variación	Desviación estándar	Intervalo de confianza del 95 %
FA221418	Repetibilidad	1,35%	0,114	/
	Precisión intermedia	1,35%	0,114	±0,262 %
FA224375	Repetibilidad	1,15%	0,095	/
	Precisión intermedia	1,15%	0,095	±0,218%
FA224376	Repetibilidad	1,29%	0,106	/
	Precisión intermedia	1,29%	0,106	±0,244%
FA224377	Repetibilidad	1,21%	0,098	/
	Precisión intermedia	1,53%	0,125	±0,288%
FA247170	Repetibilidad	1,11%	0,091	/
	Precisión intermedia	1,11%	0,091	±0,209%
Lotes completos	Precisión intermedia	1,29%	0,107	±0,216%

El coeficiente de precisión intermedia de variación es inferior al 10 %, con una media general del peso seco del 8,24 %.

**3.3.4 Conclusión**

El método es lineal en el rango: [3,94 - 12,38]% de fósforo. Se demuestra la exactitud en el mismo rango, con una recuperación promedio del 100 %. Se verifica la precisión del método con un intervalo de confianza de una precisión intermedia de ±0,22 % para 1 prueba que se realiza de la manera habitual.

El método es válido para medir el fósforo presente en el PRP.

**3.4 Contenido proteico**

La prueba de contenido proteico con el método de Lowry (basado en la Ph. Eur. 2.5.16) se describe en el capítulo 2.5. La adición de una sal de cobre en un medio alcalino, seguida por reactivo de Folin Ciocalteu, a una solución de proteínas produce un color azul oscuro, su intensidad se mide por espectrofotometría a 760 nm. Dado que muchos componentes no proteicos pueden afectar la intensidad del color, la precipitación de las proteínas de antemano mejora la especificidad de la prueba.

Como ensayo cuantitativo, se evaluaron la linealidad, la exactitud, la precisión y el límite inferior de cuantificación.

Se presenta un resumen de la validación en la tabla 18.





Tabla 18: Contenido proteico del PRP: Validación, resumen

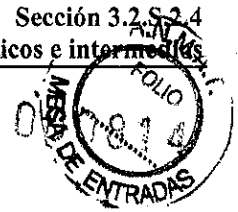
Características	Criterios de aceptabilidad	Resultados
<b>Linealidad</b>	$P_{linealidad} < 0,01$ $P_{desviación\ de\ la\ linealidad} > 0,05$	Después del ajuste lineal de $Y =$ concentración medida con respecto a $X =$ cantidad teórica, se delimita la siguiente relación:  $Y = -2,95 + 1,07 \cdot X$  Intervalo de linealidad: [0,7 - 2,9] %
<b>Exactitud</b>	El valor 100 % está dentro del intervalo de confianza de la recuperación porcentual promedio calculada para los 4 niveles de concentración teórica	La recuperación porcentual promedio y sus límites de confianza del 95 % son los siguientes:  99,4 % [97,7 % - 101,2 %]
<b>Precisión</b>	Coefficiente de variación de la precisión intermedia $\leq 15$ %	Los parámetros de repetibilidad y precisión intermedia son respectivamente iguales a:  * Agregado de 5 $\mu\text{g}$ - Coeficiente de variación: 8 % y 10 % - intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia para 1 prueba con 1 replicado realizado del modo habitual: $\pm 0,025\%$  * Agregado de 100 $\mu\text{g}$ - Coeficiente de variación: 5% y 6% - intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia para 1 prueba con 1 replicado realizado del modo habitual: $\pm 0,251\%$
<b>Límite inferior de cuantificación</b>	Comparación con la concentración más baja de la curva estándar.	QL = 5 $\mu\text{g}/\text{TS}$ es decir, 0,1 %

3.4.1 Linealidad

Tres operadores realizaron tres corridas independientes en tres días distintos. Cada corrida incluyó un rango de 5 niveles de agregado en el polisacárido.

Los datos analizados son cantidades de proteína presentes en el PRP expresadas en  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y se presentan en la tabla 19.





**Tabla 19: Contenido proteico del PRP: Validación, linealidad; cantidad de proteína en la muestra (µg/mL)**

Cantidad teórica (µg/mL)	Grupo 1 (µg/mL)	Grupo 2 (µg/mL)	Grupo 3 (µg/mL)
50	55,93	53,12	46,57
70	75,92	70,02	65,31
100	106,70	106,10	93,43
110	127,19	116,88	101,00
120	136,73	130,25	112,31

Se les aplica a los datos una regresión lineal no ponderada, en la que se usa el método de los cuadrados mínimos. Se verifica la homogeneidad de las varianzas límite mediante una prueba de Cochran a un nivel de significancia del 5 %. La dependencia entre las cantidades esperadas (volumen de la muestra de solución de PRP), las cantidades de fósforo medidas y la linealidad de esta relación se evalúan mediante un análisis de varianza de la regresión. El análisis de varianza permite concluir la significancia de la pendiente ya que el valor P de linealidad con la tabla Snedecor a un nivel de significancia del 1 % es inferior al 1 % (valor P < 0,0001), y una desviación no significativa de la linealidad ya que el valor P de la falta de ajuste de la linealidad con la tabla Snedecor al 5 % es superior al 5 % (valor P = 0,83).

La ecuación de la recta de regresión es:

$$Y = (-2,95 \pm 16,77) + (1,07 \pm 0,18) \cdot X$$

Donde:

X = agregado teórico (µg)

Y = concentración medida (µg/mL)

Coefficiente de correlación lineal r = 0,9631 con 13 grados de libertad

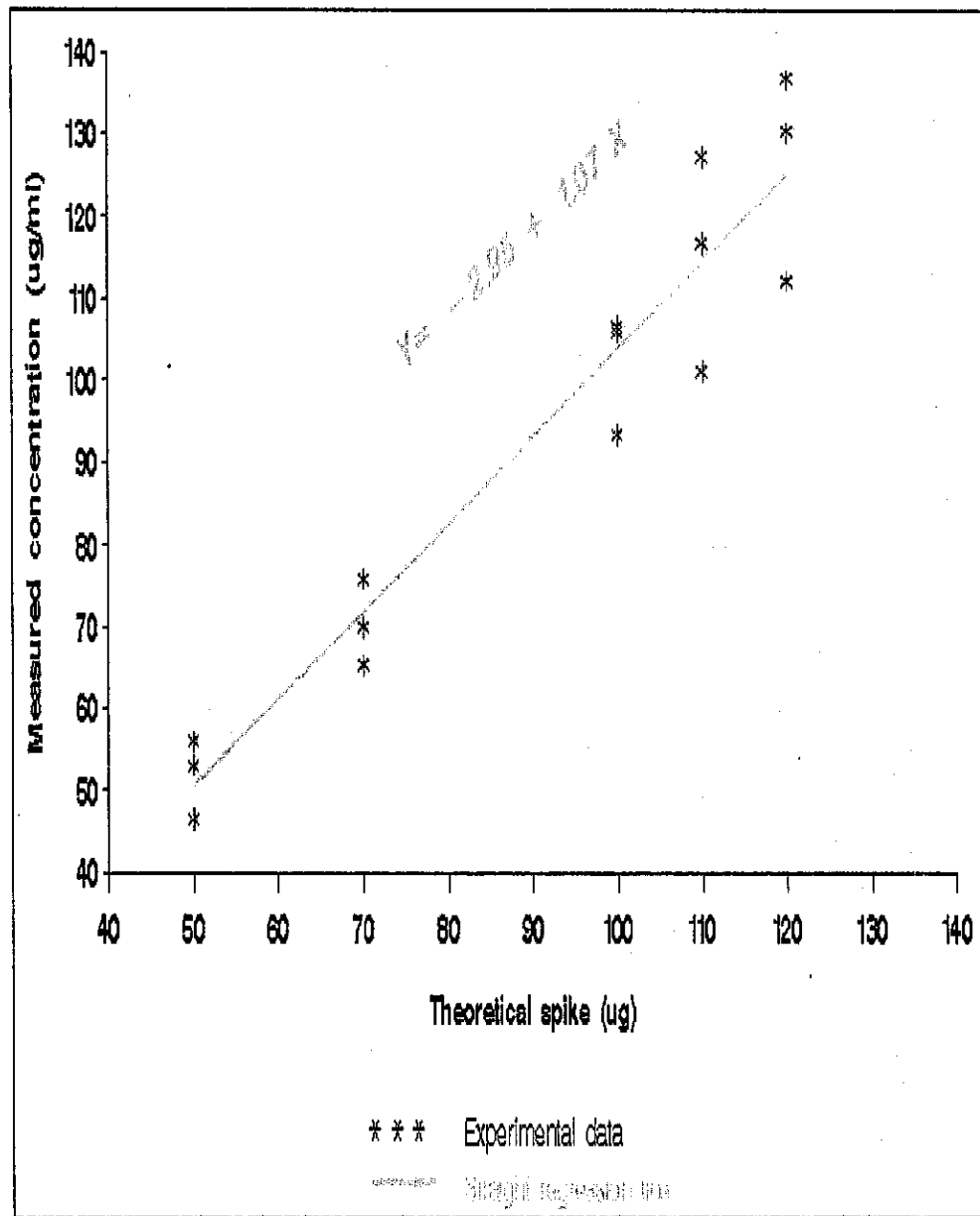
Intervalo de linealidad: [33,72 – 141,93 ] µg/mL

Puesto que la disolución promedio consistía en 246,52 mg csp 50 mL, el rango de linealidad es [0,68 - 2,88] %





Figura 6: Contenido proteico en el PRP: validación, gráfica de linealidad



### 3.4.2 Exactitud

Tres operadores realizaron tres corridas independientes en tres días distintos. Cada corrida incluyó un rango de 5 niveles de agregado en el polisacárido.

Se calculó la relación entre el contenido de proteína de acuerdo con los diferentes niveles de agregado y el contenido del agregado de 50 µg para cada grupo. Al expresar esa proporción en comparación con el factor de concentración teórica previsto, se obtiene el porcentaje de recuperación. Los resultados del factor de concentración en los cuatro niveles involucrados se presentan en la tabla 20.

