

## 2 Procedimientos analíticos

Para los procedimientos analíticos descritos en la Farmacopea Europea (Ph. Eur.), sólo se proporciona la referencia y se mencionan detalles específicos si corresponde.

Para los procedimientos analíticos no descritos en la Ph. Eur., se proporcionan los métodos en este capítulo.

### 2.1 Prueba límite de cianuros residuales

#### *Principio*

Los iones cianuro o cianato se transforman en cloruro de cianógeno por cloración.

El ácido cianhídrico que se obtiene después de la acidificación con ácido ortofosfórico reacciona con cloramina T y produce cloruro de cianógeno volátil que se puede analizar mediante cromatografía de gases con inyección en espacio de cabeza y detector de captura de electrones (ECD).

#### *Equipos y reactivos*

- **Equipo:** equipo de laboratorio estándar; el equipo específico que se debe utilizar es:
  - Sistema computarizado de cromatografía de gases con detector de captura de electrones;
  - Columna capilar de metil silicona (L = 60 m, d.i. = 0,32 mm, grosor de la película = 1,8 µm), o equivalente.
  - Muestreador de espacio de cabeza;
- **Reactivos:** ácido ortofosfórico concentrado 85 %, cloramina T al 0,5 % p/v en agua ultrafiltrada desgasificada.
- **Referencia:** solución estándar de cianuro a razón de 1 g/L en agua.

#### *Soluciones*

- **Solución de ácido ortofosfórico:** Solución al 5 % v/v de ácido ortofosfórico concentrado en agua ultrafiltrada desgasificada.
- **Solución de referencia secundaria** a razón de 0,1 mg/L obtenida mediante la dilución de la solución de cianuro estándar a razón de 1 g/L con agua ultrafiltrada desgasificada.
- **Testigo:** en el tubo, coloque 2 mL de agua ultrafiltrada desgasificada.
- **Soluciones muestra:** en el tubo, coloque 1 mL de solución de PRP-AH y agregue 1 mL de agua ultrafiltrada desgasificada.
- **Solución de control positivo:** En el tubo, coloque 1 mL de solución de referencia secundaria a 0,1 mg/L y agregue 1 mL de agua ultrafiltrada desgasificada.
- **Soluciones muestra con agregados:** en el tubo, coloque 1 mL de solución de PRP-AH. Agregue 1 mL de solución de referencia secundaria a razón de 0,1 mg/L.





### Procedimiento operativo

En cada tubo inserte un vial y agréguele al vial 1 mL de solución de cloramina T al 0,5%. En el tubo preparado con las soluciones anteriores (control positivo, muestra, testigo muestra con agregados y soluciones), agregue 3 mL de solución de ácido ortofosfórico. Tape los tubos inmediatamente.

El cloruro de cianógeno volátil que se produce durante la reacción se analiza mediante cromatografía de gases. Las condiciones que se mencionan a continuación se pueden modificar dependiendo del equipo utilizado.

- Parámetros de muestreador de espacio de cabeza:
  - Temperatura de control de la muestra: +80AC
- Parámetros de la cromatografía de gases:
  - Temperatura del horno: +60 °C durante 10 minutos y luego +150 °C (de 10 a 20 minutos)
  - Temperatura del detector: +300°C
  - Temperatura del inyector: +100 °C

### Lectura, cálculo y resultados

En el cálculo, tenga en cuenta la dilución (1:5) inducida por el muestreo (1 mL).

Calcule la recuperación obtenida para las muestras con agregados:

$$\text{Recuperación} = \frac{(\text{PRPAH area} + \text{addition of T+}) - (\text{area of neat PRPAH})}{(\text{area of T+})} \times 100$$

Si el área del PRP-AH es más pequeña que el área del control positivo, informe los resultados como < 100 µg/L (5 x 20 µg/L), de lo contrario, diluya la muestra con agua purificada (factor de dilución d) e informe el resultado como 100 mg/L x d.

### Criterios de validez

El cromatograma del testigo no debe mostrar interferencia.

El cromatograma del control positivo y el de la muestra con agregados debe cumplir con:

- Factor de coileo: 0,8 a 1,5
- Factor de resolución: no menos de 1,5.

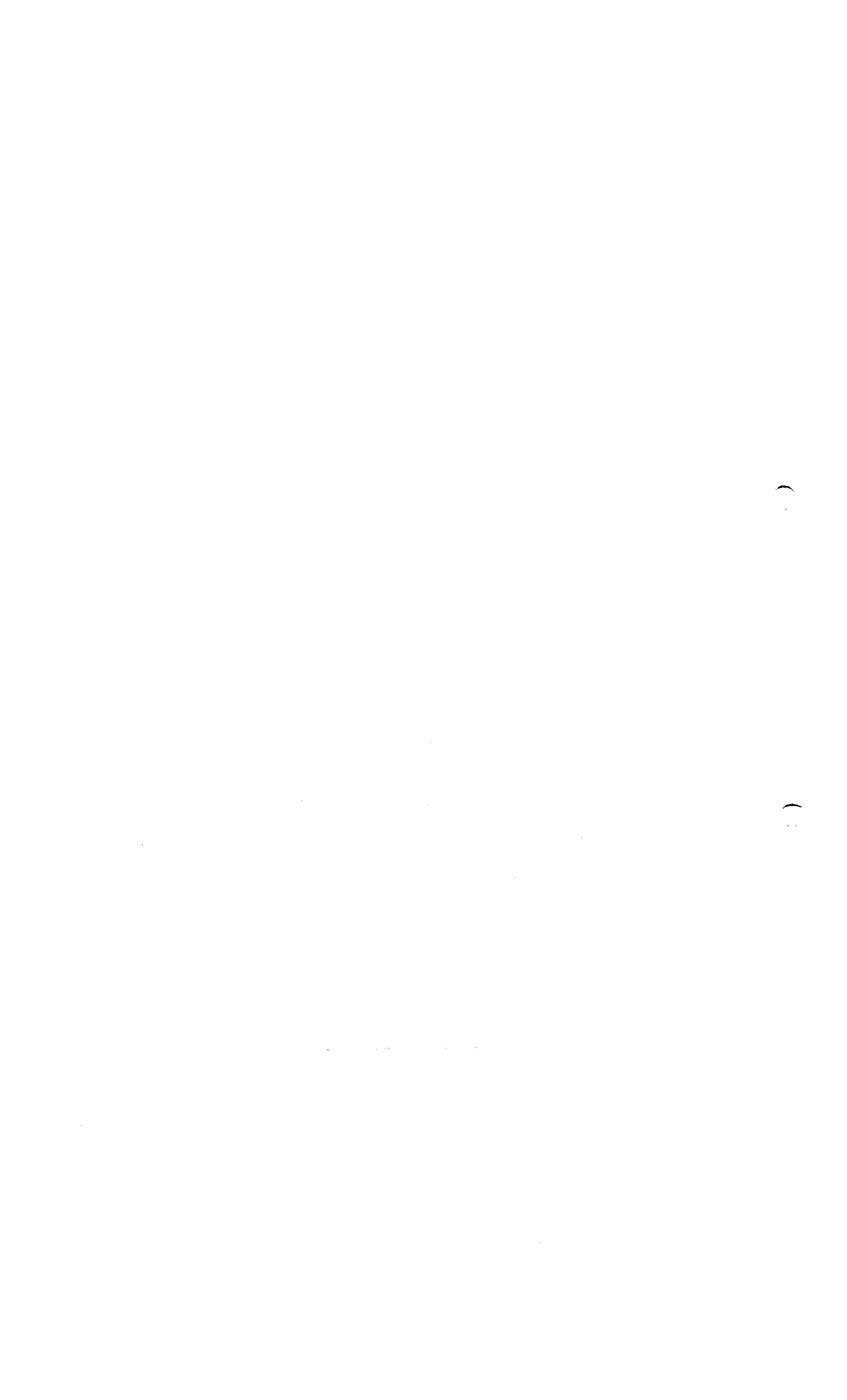
El área del control positivo está dentro de los límites de la gráfica de control.

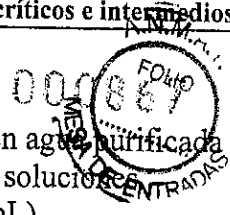
La recuperación es de entre el 80 % y el 120 %.

## 2.2 Contenido de polisacárido

### 2.2.1 Contenido de fósforo

Se aplica el método utilizado para el PRP (vea la sección 3.2.S.2.4 Controles de los pasos críticos e intermedios, Intermedio PRP) con las siguientes especificaciones:





- **Solución muestra de prueba:** diluya una alícuota de solución de PRP-AH en agua purificada para que el contenido teórico de fósforo se encuentre dentro del rango de las soluciones estándar (por lo general, diluya 50 veces con una muestra de prueba de 0,1 mL).
- **Expresión de resultados**

$$\mu\text{g/mL de fósforo} = \frac{\text{OD} - \text{Blm} - b}{a} \times D$$
$$\text{TS}$$

Donde:

Blm = Testigo de mineralización

D = Factor de dilución

TS = Volumen de la muestra de prueba (mL)

### 2.2.2 Cálculo del contenido de polisacárido

El contenido de polisacárido se calcula con base en el contenido de fósforo.

Para el polisacárido activado de *Haemophilus* AH:

$$[\text{Polisacárido}] (\mu\text{g/mL}) = ([\text{Fósforo}] * 100)/8,4$$

Donde:

- Fósforo: contenido de fósforo del PRP-AH ( $\mu\text{g/mL}$ )
- 8,4: contenido teórico de fósforo (% p/p)

### 2.3 Porcentaje de polisacárido unido a ADH

El porcentaje de ADH unida a polisacárido se calcula restando la ADH libre (nEq  $\text{NH}_2/\text{mg}$ ) de la ADH total (nEq  $\text{NH}_2/\text{mg}$ ).

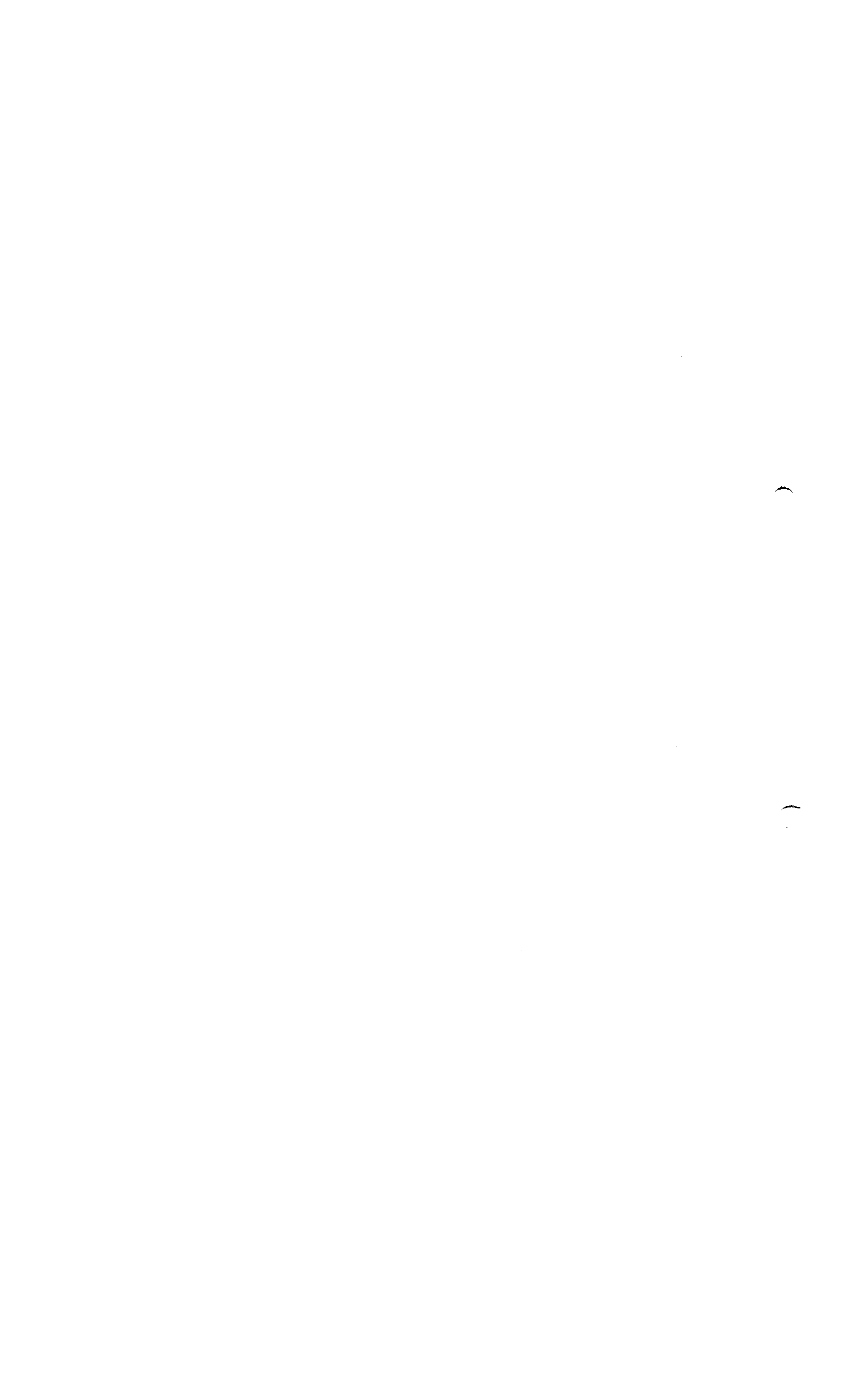
Para calcular el porcentaje de ADH unida a polisacárido, se utilizan los siguientes valores:

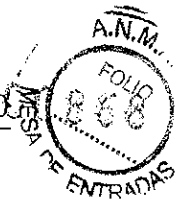
- ADH total en el PRP-AH expresado en nEq  $\text{NH}_2/\text{mL}$  (vea el capítulo 2.4.1)
- ADH libre en el PRP-AH expresado en nEq  $\text{NH}_2/\text{mL}$  (vea el capítulo 2.4.2)
- Contenido de polisacárido en el PRP-AH expresado en mg/mL (vea el capítulo 2.2)

Se utilizan las siguientes fórmulas:

$$\text{ADH total (nEq } \text{NH}_2/\text{mg)} = \frac{\text{ADH total en PRP - AH (nEq } \text{NH}_2/\text{mL)}}{\text{Contenido de polisacárido (mg/mL)}}$$

$$\text{ADH libre (nEq } \text{NH}_2/\text{mg)} = \frac{\text{ADH libre en PRP - AH (nEq } \text{NH}_2/\text{mL)}}{\text{Contenido de polisacárido (mg/mL)}}$$





•  $\% \text{ de polisacárido unido a ADH en PRP - AH} = \frac{\text{ADH total} - \text{ADH libre} \times 174.2 \times 100}{1000 \times 1000}$   
Donde: 174,2 corresponde al peso molecular de ADH (g/mol)

## 2.4 Proporción ADH libre / ADH total

Determine la proporción entre la ADH total presente en el PRP-AH expresada en nEq NH<sub>2</sub>/mL (vea el capítulo 2.4.1) y la ADH libre presente en el PRP-AH expresada en nEq NH<sub>2</sub>/mL (vea el capítulo 2.4.2).

### 2.4.1 Contenido de ADH total

#### Principio

Los grupos funcionales NH<sub>2</sub> de ADH: [H<sub>2</sub>N-HN-OC-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CO-NH-NH<sub>2</sub>] reaccionan con ácido 2,4,6- sulfónico en presencia de tetraborato de sodio para producir una molécula de color que se puede analizar mediante espectrofotometría a 500 nm.

#### Equipos y reactivos

- **Equipo:** equipo de laboratorio estándar con espectrofotómetro de luz UV visible
- **Reactivo:**

Las cantidades son indicativas y se pueden multiplicar o dividir por un factor determinado, si fuera necesario.

#### Solución estándar de referencia madre de ADH a razón de 5 μmol/mL

ADH (Merck o equivalente) ..... 87,1 mg  
Agua purificada ..... hasta 100 mL

Prepare de forma extemporánea.

#### Solución estándar de referencia de trabajo de ADH a razón de 50 nmol/mL (100 nEqNH<sub>2</sub>/mL)

Diluya la solución madre estándar de referencia de ADH (5 μmol/mL) a razón de 1:100 con agua purificada.

Vierta en viales pequeños de 5 mL y almacene a ≤ -20 °C.

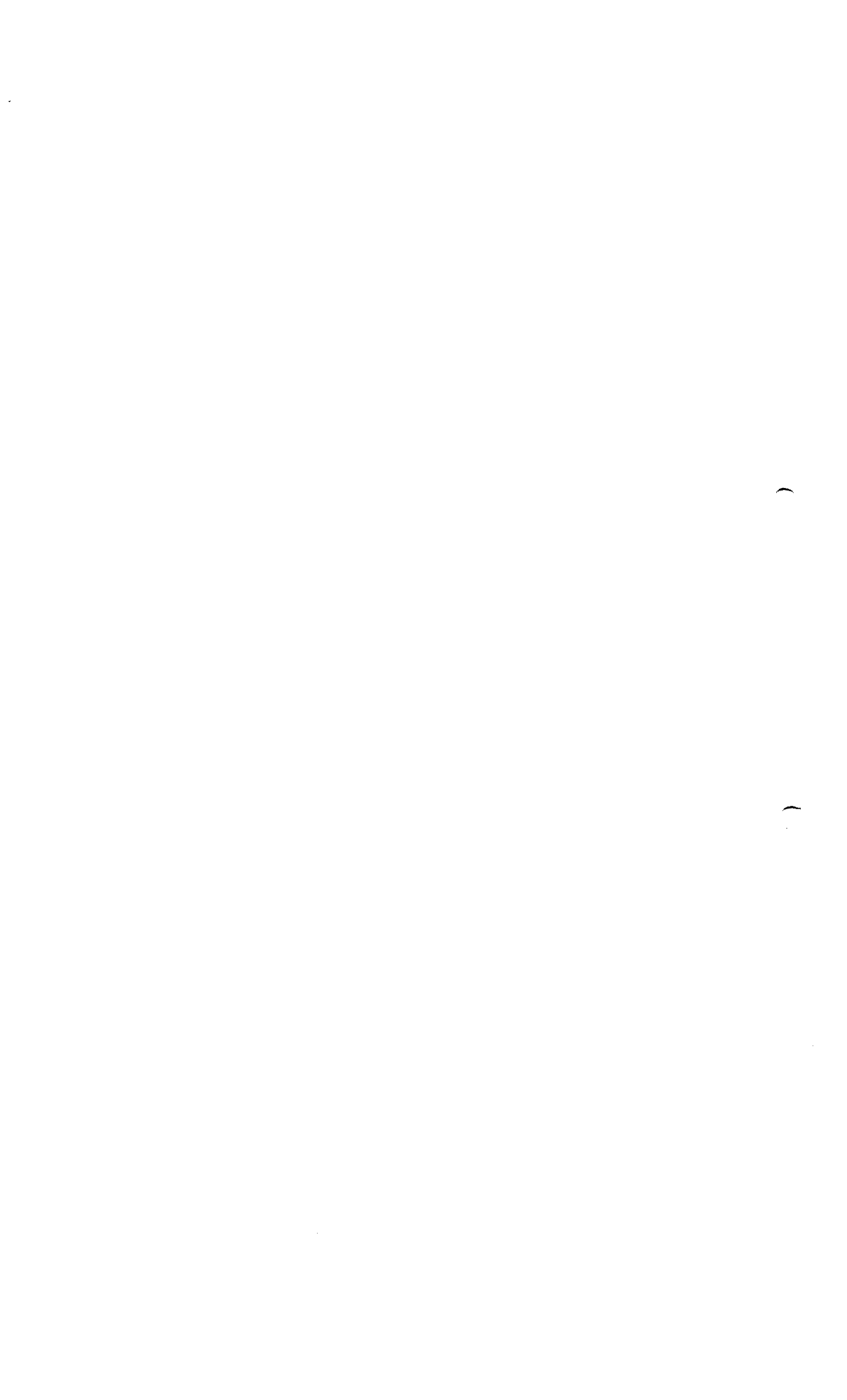
Utilice un vial para cada calibración. No vuelva a congelar los viales descongelados.

#### Solución interna de ADH a 100 nEqNH<sub>2</sub>/mL

ADH ..... 87,1 mg  
Agua purificada ..... hasta 100 mL

Diluya a 1:100 en agua purificada.

Coloque alícuotas en viales de 5 mL y almacene a ≤ -20 °C.





**Solución de tetraborato de sodio**

Tetraborato de sodio ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7, 10\text{H}_2\text{O}$ ) ..... 100 g  
 Agua purificada ..... hasta 2000 mL

Conserve a temperatura ambiente.

**Solución de ácido 2,4,6-trinitrobenceno sulfónico (TNBS)**

TNBS ..... 1 mL  
 Agua purificada ..... hasta 25 mL

Prepare de forma extemporánea.

**Procedimiento operativo**

Preparación de una muestra para análisis: diluya a razón de 1:10 en agua purificada.

Tome una muestra para cada referencia y 2 para el testigo.

Tome tres muestras de diferente volumen para la muestra diluida.

Tome tres muestras para el control interno.

**Tabla 2: Preparaciones para análisis**

		Testigo	1	2	3	4	5	6	Control interno	Prueba		
Agua purificada	mL	1,0	0,9	0,8	0,6	0,4	0,2	-	0,5	0,8	0,7	0,6
Solución estándar de referencia de trabajo de ADH (100 nEq $\text{NH}_2/\text{mL}$ )	mL	-	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	-	-	-	-
Solución interna de ADH (100 nEq/mL)	mL	-	-	-	-	-	-	-	0,5	-	-	-
Muestra	mL	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	0,3	0,4
Solución de tetraborato de sodio	mL	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Solución de TNBS	mL	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
nEq $\text{NH}_2/\text{muestra de prueba}$	-	-	10	20	40	60	80	100	a	a	a	a

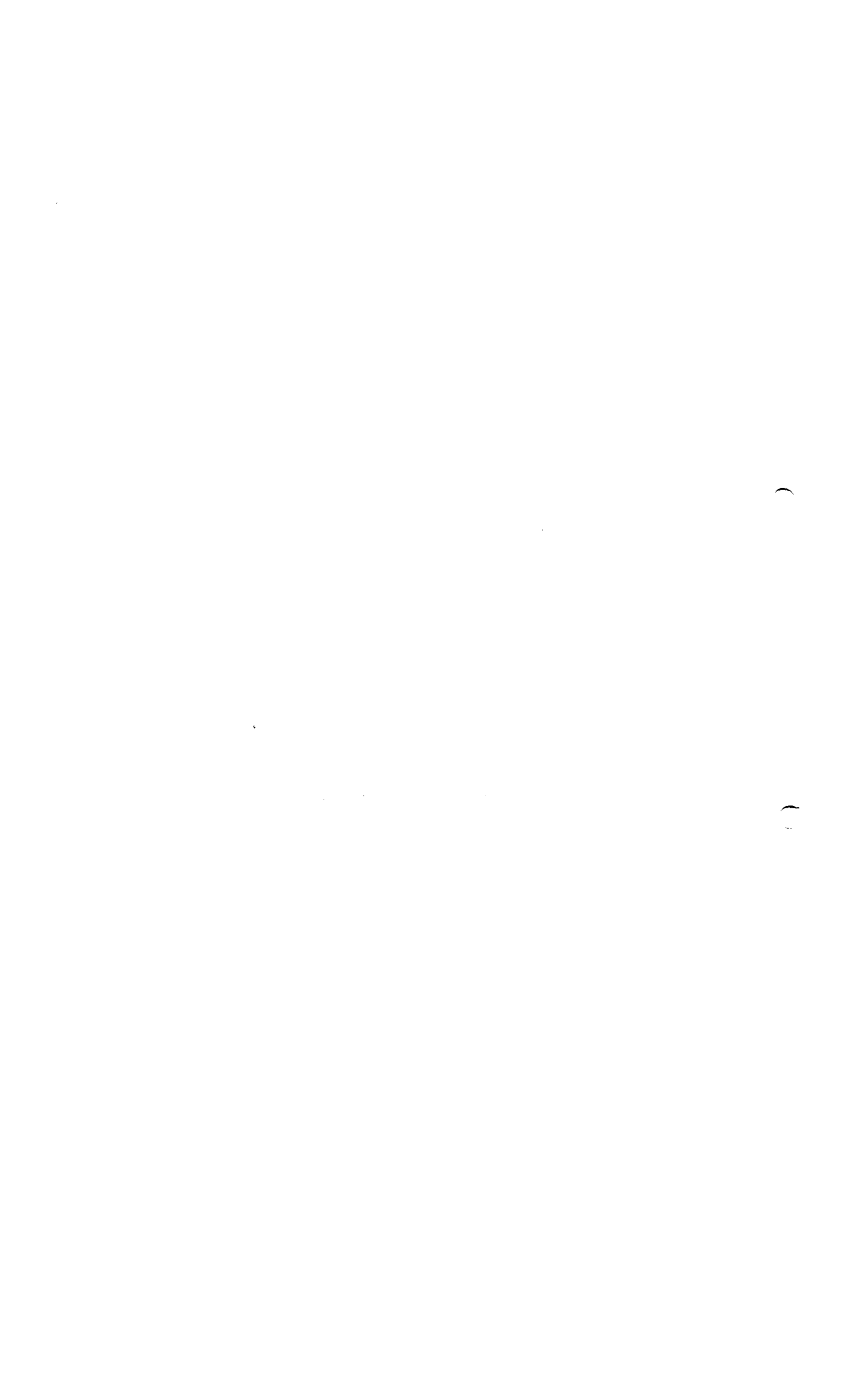
Agite los tubos con vórtice.

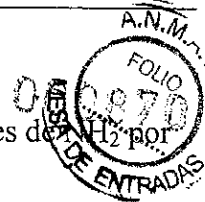
Deje los tubos en la oscuridad a temperatura ambiente durante 60 minutos.

**Lectura, cálculo, resultados**

Tome la lectura de la absorbancia a 500 nm en contraste con el testigo.

Grafique la curva de calibración de  $\text{DO } Y=aX + b$ , donde  $Y = \text{OD}$ ,  $X = \text{nanoequivalentes (nEq) de concentración de } \text{NH}_2 \text{ por muestra de prueba}$ ,  $a = \text{pendiente}$  y  $b = \text{ordenada al origen}$ .





Utilizando la curva de calibración, deduzca la concentración de los nanoequivalentes de  $\text{NH}_2$  por mL para cada análisis.

$$\text{nEq NH}_2/\text{mL} = \frac{(\text{OD} - b)}{a} \times \frac{D}{\text{TS}}$$

Donde:

D = dilución

TS = Muestra de prueba

#### ***Criterios de validez***

El coeficiente de correlación de la línea de calibración debe ser superior a 0,995.

Los valores del control interno (promedio de las 3 determinaciones) deben estar dentro de los límites determinados en la gráfica de control.

La desviación relativa entre los 3 análisis del control interno debe ser menor o igual al 10 %.

La desviación relativa entre las 9 concentraciones calculadas para la muestra debe ser menor o igual al 10 %.

### **2.4.2 Contenido de ADH libre por HPLC**

#### ***Principio***

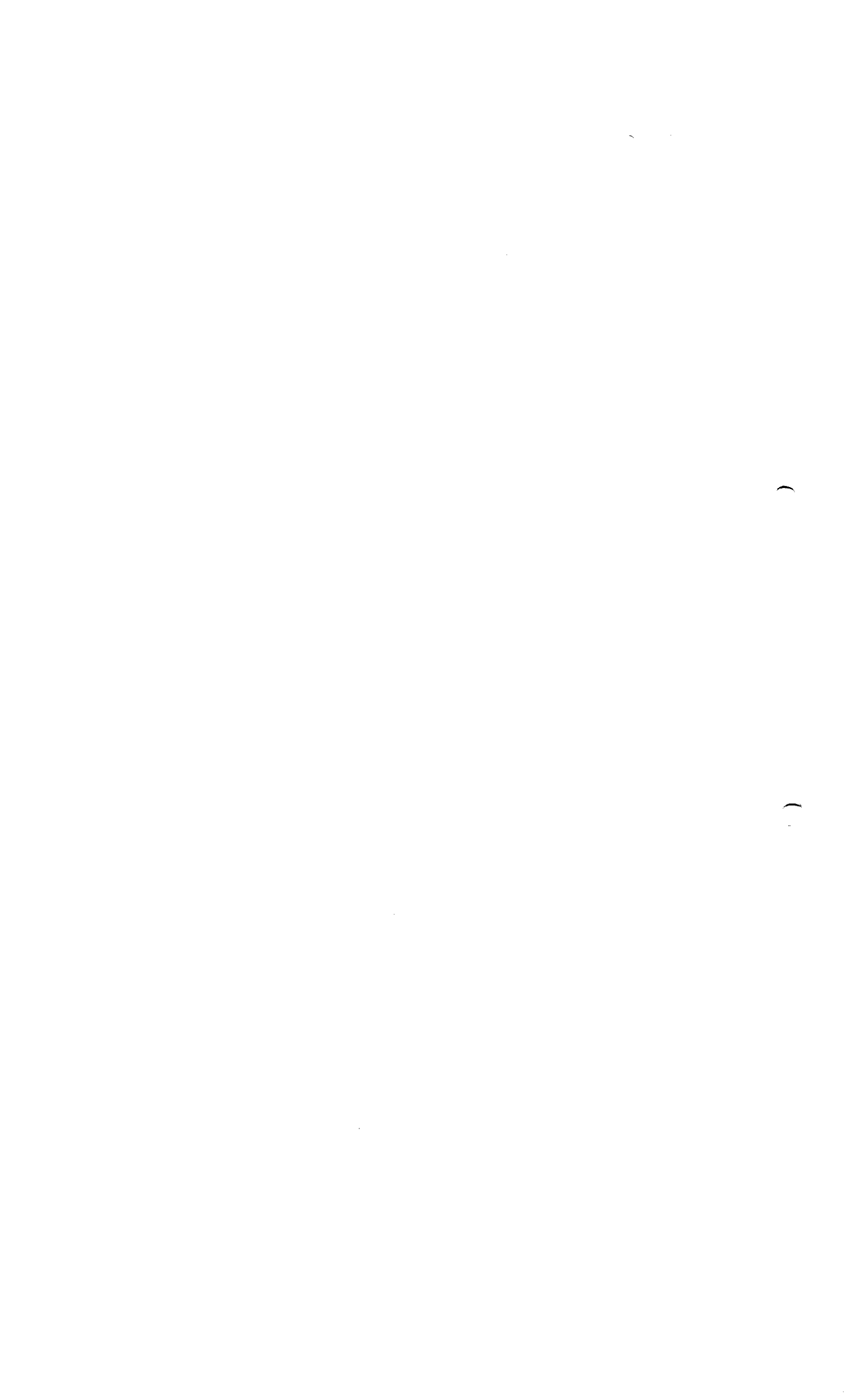
El ensayo de ADH se basa en la derivatización de la función amina primaria ( $\text{NH}_2$ ) del grupo hidrazida con 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato (AQC) fluorescente.

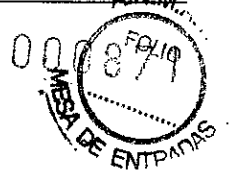
La hidrazida derivatizada se separa y cuantifica con el estándar interno, mediante una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase inversa con detección fluorimétrica.

Las condiciones de elución de la HPLC permiten separar la molécula de ADH libre derivatizada con AQC de los diferentes subproductos de reacción (6-aminoquinolina (AMQ), N-hidroxisuccinimida (NHS),  $\text{AQCNH}_3$  derivatizado de amoníaco). La ADH injertada en el polisacárido también reacciona con AQC, pero el producto obtenido queda retenido en la precolumna de HPLC. La fase de enjuague al final del ciclo de elución (alto porcentaje de acetonitrilo) permite eliminar los posibles contaminantes aminados derivatizados con AQC de la muestra. La cuantificación se obtiene al integrar el pico de fluorescencia de ADH (derivatizada con AQC) y el pico del estándar interno (valina derivatizada con AQC), cuya proporción de área es proporcional a la concentración de ADH.

#### ***Equipos y reactivos***

- **Equipo:** equipo de laboratorio estándar; el equipo específico que se debe utilizar es:
  - Sistema computarizado de HPLC con detector de fluorescencia;
  - Columna desactivada C18 de HPLC, 15 cm x 4,6 mm (5  $\mu\text{m}$ , 100 Å, 11 % C)
  - Precolumna C18 desactivada para HPLC, 2 cm x 4,6 mm (5  $\mu\text{m}$ );





- Filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  y 0,45  $\mu\text{m}$ .
- Soporte de la precolumna
- **Reactivos:** acetato de sodio anhidro, ácido ortofosfórico al 85 %, tretilamina, acetonitrilo, metanol, agua purificada ultrafiltrada, hidrazida de ácido adípico (ADH) para el control interno, DL valina (estándar interno), reactivo de derivatización 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato (AQC) (kit Waters™ o equivalente, disponible a nivel comercial).
- **Referencia:** Dihidrazida de ácido adípico (ADH)

#### Soluciones

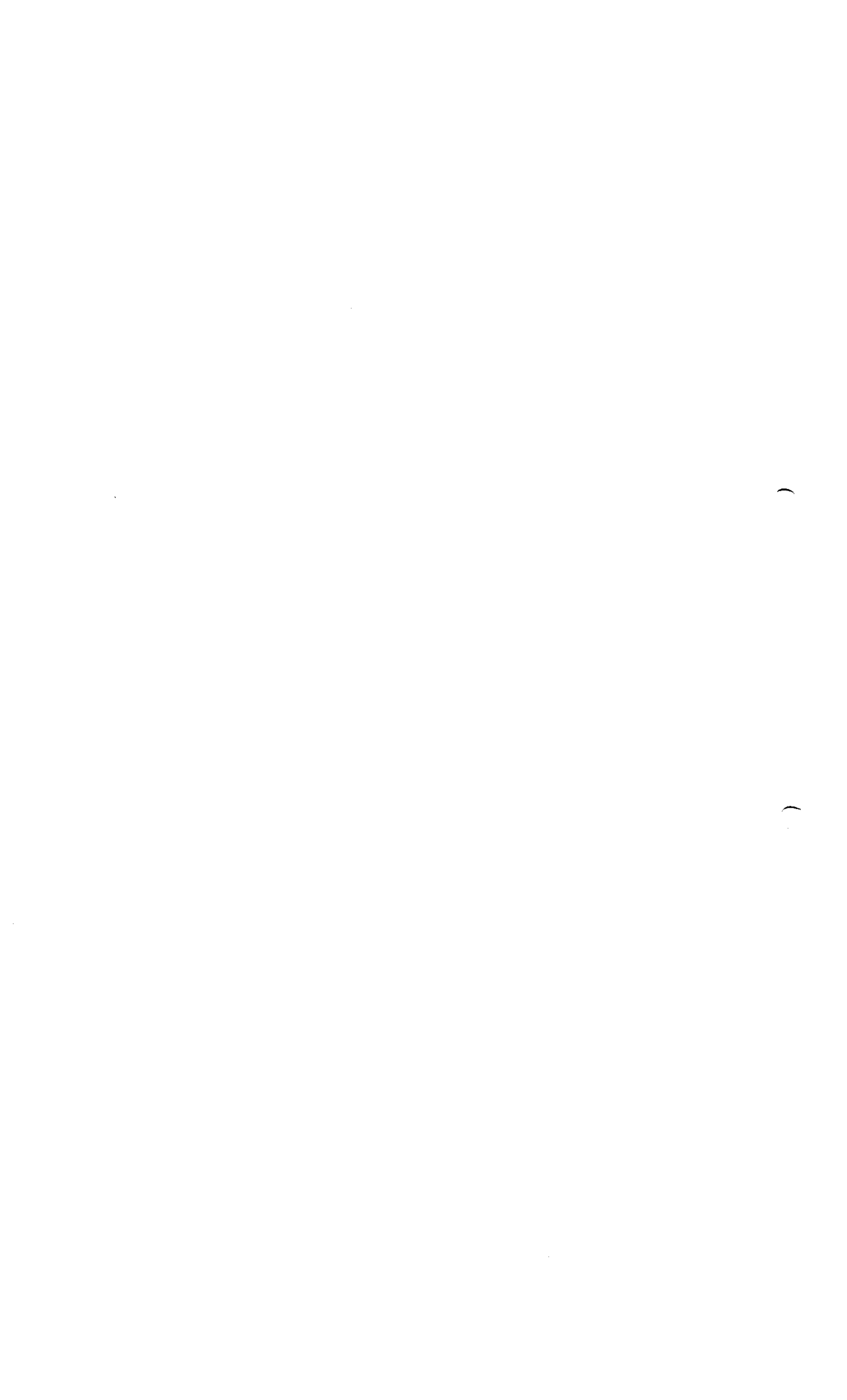
- **Solución tampón concentrada para HPLC:** acetato de sodio 600 mM, trietilamina 60 mM, pH 5,60 (proporciones relativas): acetato de sodio (49,2 g), trietilamina (8,4 mL) completada hasta 1000 mL con agua purificada ultrafiltrada y ajustada a un pH de 5,60 mediante la adición de ácido ortofosfórico al 85 %. Filtre a través de un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$ .
- **Tampón de elución diluido para HPLC:** diluya la solución tampón concentrada para HPLC en una proporción de 1:4 en agua purificada ultrafiltrada. Prepare inmediatamente antes de usar.
- **Tampón de elución 1:** tampón de elución diluido para HPLC y acetonitrilo (85/15 v/v). Prepare inmediatamente antes de usar.
- **Tampón de elución 2:** tampón de elución diluido para HPLC y acetonitrilo (40/60 v/v). Prepare inmediatamente antes de usar.
- **Testigo:** utilice agua purificada ultrafiltrada
- **Soluciones estándar de referencia** (utilice matraces de polipropileno): prepare un rango de soluciones estándar de referencia de 1  $\mu\text{M}$  a 40  $\mu\text{M}$  de ADH en agua purificada ultrafiltrada (equivalente a entre 2 y 80 nmol de  $\text{NH}_2$  por mL).
- **Solución de control interno** (utilice frascos de polipropileno): disuelva y diluya ADH en agua purificada ultrafiltrada para obtener una concentración de 2,5  $\mu\text{M}$ , equivalente a 5 nmol de  $\text{NH}_2$  por mL.
- **Solución estándar interna:** disuelva DL de valina en agua para preparar una solución madre estándar interna (por lo general, a razón de 2500 pmol/ $\mu\text{L}$ ). Diluya la solución madre estándar interna en agua purificada ultrafiltrada para obtener la concentración esperada de 1 pmol/ $\mu\text{L}$ .
- **Muestras de prueba** (utilice matraces de polipropileno): el PRP-AH sometido a prueba se diluye en agua purificada ultrafiltrada para que el resultado se encuentre dentro del rango de calibración (por lo general, diluir a razón de 1:10).

#### Procedimiento operativo

- **Derivatización:**

Agregue en el siguiente orden (proporciones relativas):

- 60  $\mu\text{L}$  de tampón borato de pH 8,8





- 10 µL de la solución requerida (testigo, soluciones estándar, solución de control y muestras de prueba)
- 10 µL de estándar interno (excepto el testigo)
- Agite con vórtice durante unos segundos. Agregue rápidamente 20 µL de reactivo AQC y agite inmediatamente con vórtice durante 30 segundos.
- Vierta al vial para HPLC. Incube a +65 °C durante no menos de 20 minutos.
- Deje reposar a temperatura ambiente.
- **Condiciones cromatográficas:**

**Tabla 3: Condiciones cromatográficas**

Inyector	Horno para columnas	Detección
Volumen de inyección: 10 µL Temperatura del muestreador: +20°C	Temperatura: +30°C	Excitación λ: 246 nm y emisión λ: 396 nm

Antes del análisis, asegúrese de que se hayan acondicionado adecuadamente las columnas (utilice una mezcla de agua/acetonitrilo [por lo general, 90/10 v/v ] y, progresivamente, el tampón de elución 1).

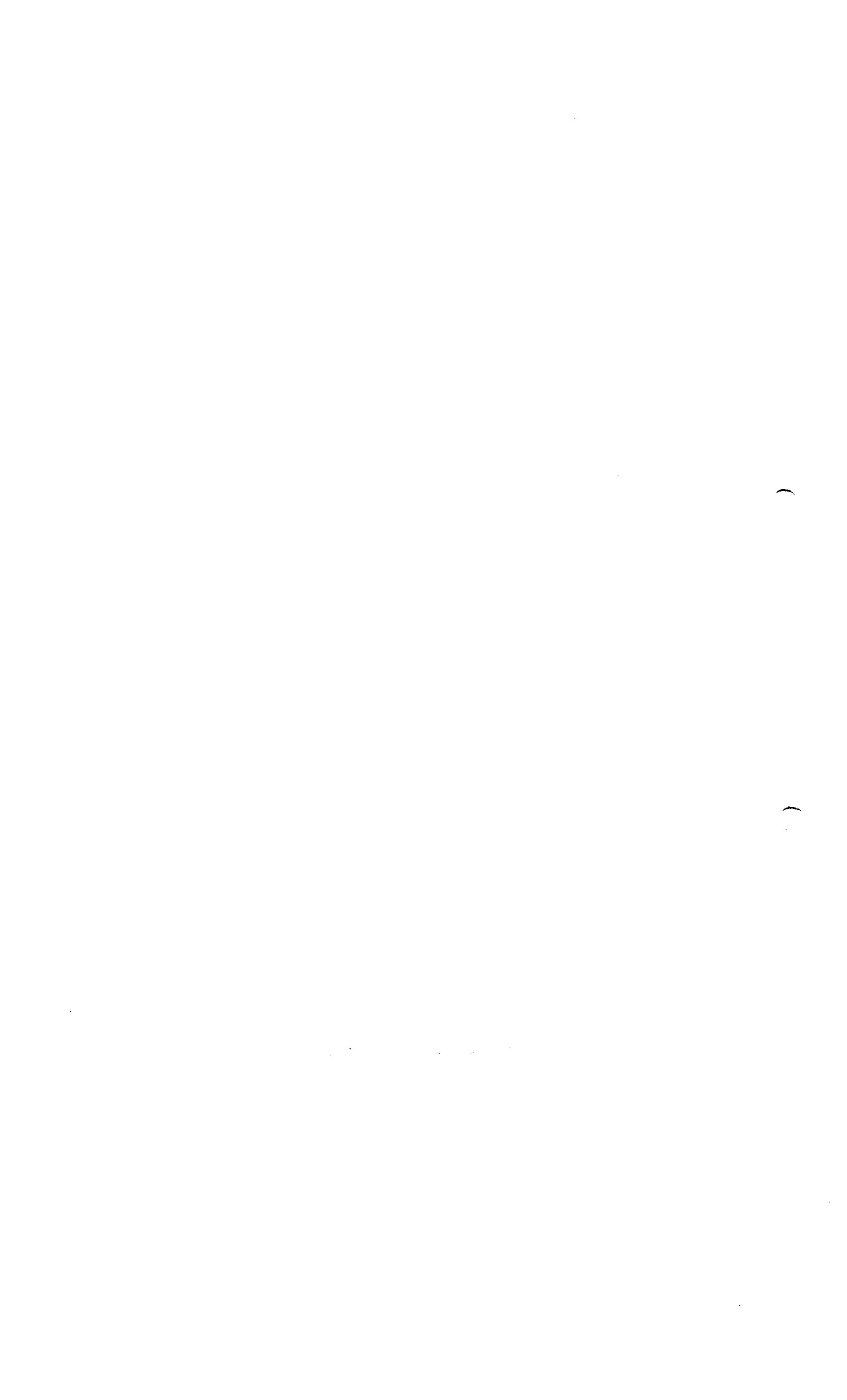
El análisis se lleva a cabo con el gradiente de fase móvil que se describe a continuación:

**Tabla 4: Descripción del gradiente de fase móvil**

Paso	% del tampón de elución 1	% del tampón de elución 2	Velocidad de flujo (mL/min)	Duración (min)
Elución	100	0	1,00	0
Elución	100	0	1,00	16
Enjuague	0	100	1,00	20
Enjuague	0	100	1,00	25
Equilibración	100	0	1,00	26
Equilibración	100	0	1,00	35

• **Análisis:**

Se inyectan las siguientes soluciones: tampón de elución 1 (cantidad de inyecciones necesarias para equilibrar el sistema), testigo derivatizado, solución de control interno (seis inyecciones al comienzo de la secuencia, número apropiado para verificar la estabilidad del sistema e inyecciones durante la secuencia para verificar la estabilidad a través del tiempo), rango de soluciones estándar de referencia de ADH (en orden ascendente de concentración) y muestras de prueba.





El número de inyecciones y el orden de las soluciones pueden depender de las prácticas del laboratorio.

**Lectura, cálculo, resultados**

En las condiciones descritas, la valina se eluye en el tiempo de retención aproximado ( $t_R$ ) de  $8,4 \pm 1$  minutos y la ADH derivatizada (ADH-AQC) se eluye a un  $t_R$  aproximado de  $12,9 \pm 1,5$  minutos. Se separa del subproducto de reacción principal (AMQ,  $t_R$  aproximado de 6,3 minutos).

Para cada cromatograma, se integran los picos de interés.

Los cálculos se basan en la proporción entre la señal integrada de fluorescencia del derivado de ADH-AQC y del derivado de valina-AQC a razón de  $1 \text{ pmol}/\mu\text{L}$ .

Grafique la curva  $Y = aX + b$

Donde:

X = concentración de ADH-AQC ( $\mu\text{mol}/\text{L}$ )

Y = proporción del área de ADH-AQC en relación con el área del estándar interno

a = pendiente

b = ordenada al origen

Para cada análisis, deduzca la concentración inicial de ADH de las muestras, según la siguiente fórmula:

$$[\text{ADH}] \mu\text{mol}/\text{L} = \frac{(Y - b)}{a} \times D$$

Donde:

D = dilución

**Criterios de validez**

La prueba se considera válida si se respetan los siguientes criterios de aptitud:

Cálculo según la Ph. Eur.	Pico principal en las soluciones estándar
Número de placas teóricas	$\geq 5000$
Asimetría	0,8 - 1,5
Resolución	$\geq 1,5$

Para las 6 inyecciones de solución de control interno al inicio del análisis, el criterio es  $CV \leq 5 \%$ .

Verificar que los cromatogramas de fase móvil no muestren picos significativos durante un período de hasta 16 minutos.

El cromatograma del testigo de la reacción no debe mostrar picos significativos en los tiempos de retención que corresponden a la ADH y a la valina.

El coeficiente de correlación de la línea de regresión del rango de calibración debe ser mayor o igual que 0,995.

