

Los valores del control interno deben estar dentro de los límites especificados en la gráfica de control.

Dos inyecciones del mismo producto derivado no deben diferir en más del 5 %.

## 2.5 Distribución de tamaño molecular por HP-SEC

### Referencia

Ph. Eur., prueba general 2.2.30 "Size exclusion chromatography" (cromatografía de exclusión por tamaño).

USP < 621> "Size exclusion chromatography" (cromatografía de exclusión por tamaño)

### Principio

Se realiza el análisis con un sistema de HPLC con una columna de tamiz molecular. Se eluye la muestra inyectada a presión a través de un gel poroso. Las moléculas (por ejemplo, ADN) de mayor tamaño que los poros más grandes del gel no pueden penetrar el gel y permanecen en la fase móvil circulante. Estas moléculas son las primeras en abandonar la columna. Las moléculas más pequeñas se difunden en los poros del gel más o menos rápidamente, según su tamaño y forma, y abandonan la columna en orden descendente de peso molecular.

Luego, las moléculas separadas se detectan con un espectrofotómetro UV. El tiempo de retención es inversamente proporcional a su peso molecular. El resultado se expresa como un coeficiente de partición ( $K_D$ ).

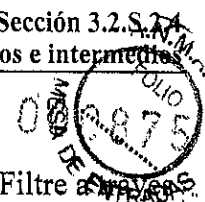
### Equipos y reactivos

- **Equipo:** equipo de laboratorio estándar; el equipo específico que se debe utilizar es:
  - Sistema computarizado de HPLC con detector de longitud de onda múltiple UV;
  - Dos columnas conectadas en serie de 7,5 x 300 mm, TOSHAAS TSKgel G6000PWxl y TOSHAAS TSKgel G4000PWxl o equivalente;
  - Filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  y 0,45  $\mu\text{m}$ .
- **Reactivos:** fosfato dihidrogenado de potasio, hidrogenofosfato disódico dihidrato, azida sódica, N-acetilo D-glucosamina, agua purificada ultrafiltrada y dextrano con un peso molecular de 80 000 (control interno).
- **Referencia:** ADN altamente polimerizado de *Micrococcus lysodeikticus*.

### Soluciones

- **Fase móvil:** Tampón de fosfato 0,2 M a un pH de 6,9 (proporciones relativas: hidrogenofosfato disódico dihidrato 105,8 g, fosfato dihidrogenado de potasio 55,1 g, completado hasta 5000 mL con agua). Filtre a través de un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ .
- **Tampón de fosfato 1 M:** proporciones relativas: hidrogenofosfato disódico dihidrato 10,58 g, fosfato dihidrogenado de potasio 5,51 g, completado hasta 100 mL con agua). Filtre a través de un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$ .





- **Fase de enjuague de la bomba y la columna:** Azida sódica al 0,05 % en agua. Filtre a través de un filtro de 0,22 µm.
- **Solución de referencia Vo:** prepare la solución de ADN a razón de 50 µg/mL en tampón de fosfato 1 M y agua.
- **Control interno Vd:** prepare una solución de dextrano a razón de 2 mg/mL en un tampón de fosfato 0,2 M para fase móvil, pH 6,9 (agite durante varias horas a temperatura ambiente hasta obtener una solución incolora, transparente y ligeramente viscosa). Filtre a través de un filtro de 0,22 µm. Transfiera una alícuota al vial para HPLC.
- **Solución de referencia Vt:** Prepare una solución de N-acetilo D-glucosamina a razón de 0,1 mg/mL en tampón de fosfato 0,2 M para fase móvil con un pH de 6,9. Filtre a través de un filtro de 0,22 µm. Transfiera una alícuota al vial para HPLC.
- **Muestra:** prepare una solución de PRP-AH sometida a prueba de 250 µg/mL en tampón de fosfato 0,1 M y agua, tomando en cuenta la concentración exacta de la solución de PRP-AH (proporciones relativas):

Utilice x mL de solución de PRP-AH, 400 µL de tampón de fosfato 1 M y complete hasta 2000 µL con agua. Calcule el volumen x de la solución de PRP-AH, tomando en cuenta su concentración exacta:

$$x(\mu L) = \frac{500}{\text{concentración de la solución en mg/mL}}$$

Agite a temperatura ambiente durante 1 hora. Transfiera una alícuota al vial para HPLC.

### 2.5.1 Procedimiento operativo

- Condiciones cromatográficas:

**Tabla 5: Condiciones cromatográficas**

Bomba	Inyector	Horno para columnas	Detección
Velocidad de flujo: 0,5 mL/min Elución isocrática al 100 % de tampón de fosfato de 0,2 M para fase móvil, pH 6,9	Volumen de inyección: 100 µL Temperatura del muestreador: +5 °C ± 3 °C	Temperatura: +30 °C ± 1 °C	Detección UV λ = 214 ó 260 nm (ADN)

- Análisis:

Después de equilibrar el sistema con fase móvil y de purgar el detector de índice de refracción, se pueden inyectar las soluciones como se describe en la tabla 6.

ROXANA MONTEMILONE DIRECTORA TÉCNICA SANOFI PASTEUR S.A.  
CHRISTIAN DOMINGUEZ APODERADO SANOFI PASTEUR S.A.





Tabla 6: Solución que se analizará

Solución	Volumen inyectado	Detección	Duración	Resultado obtenido
Vt de referencia: N-acetilo D-glucosamina	100 µL	UV 214 nm	60 min	Vt
Referencia Vo: ADN (50 µg/mL)	100 µL	UV 260 nm	60 min	Vo
Control interno: Dextrano (2 mg/mL)	100 µL	UV 214 nm	60 min	Vd (comienzo)
Muestras	100 µL	UV 214 nm	60 min	Ve (pico)
Control interno: Dextrano (2 mg/mL)	100 µL	UV 214 nm	60 min	Vd (final)

Al final de una corrida, se debe enjuagar el sistema y las columnas con solución de enjuague.

**Lectura, cálculo, resultados**

Se integran los cromatógrafos.

Ajuste, si es necesario, las líneas base al extremo inferior de los picos.

Para las muestras, calcule los coeficientes  $K_D$  a partir de los tiempos de retención del pico (asimilados con volúmenes de elución de los diferentes compuestos) con la fórmula:

$$K_D = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$$

Donde:

- $V_o$  = tiempo de retención del pico de ADN
- $V_t$  = tiempo de retención del pico de N-acetilo D-glucosamina
- $V_e$  = tiempo de retención del pico de PRP sometido a prueba (o de dextrano).

**Criterios de validez**

El control interno permite monitorear la calidad de la separación. El  $K_D$  del dextrano se determina utilizando el  $V_d$ . El  $K_D$  del dextrano debe encontrarse dentro de los límites especificados en la gráfica de control.

**Cromatogramas típicos**

Los cromatogramas típicos se presentan en la figura 1, en la figura 2, en la figura 3 y en la figura 4.





Figura 1: Cromatograma típico de la solución de referencia Vo

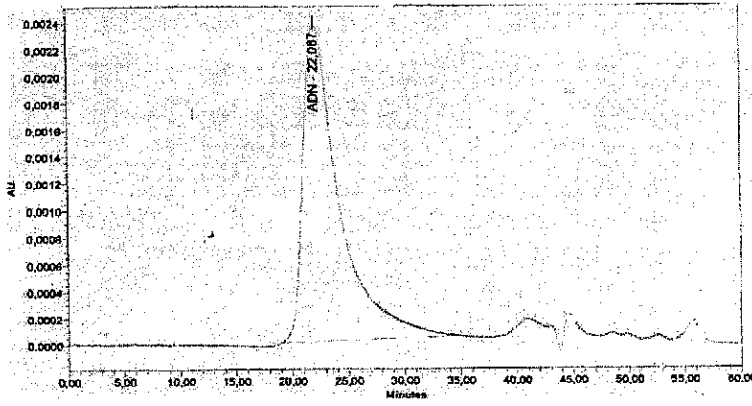


Figura 2: Cromatograma típico de la solución de referencia Vd

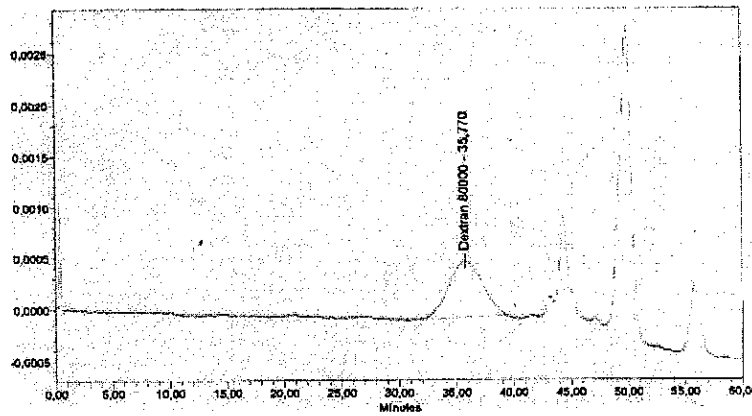
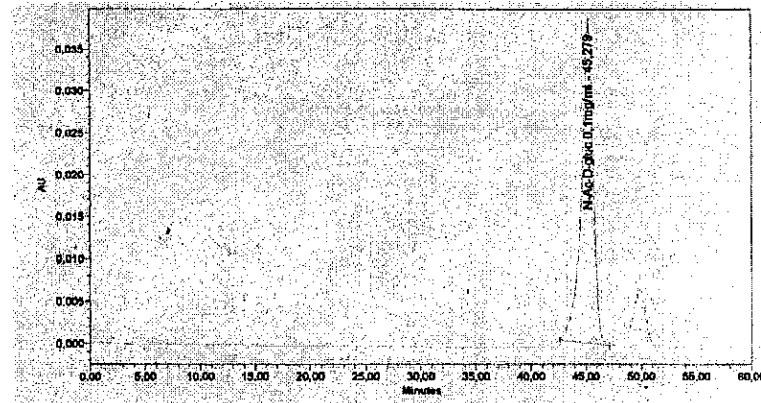


Figura 3: Cromatograma típico de la solución de referencia Vt



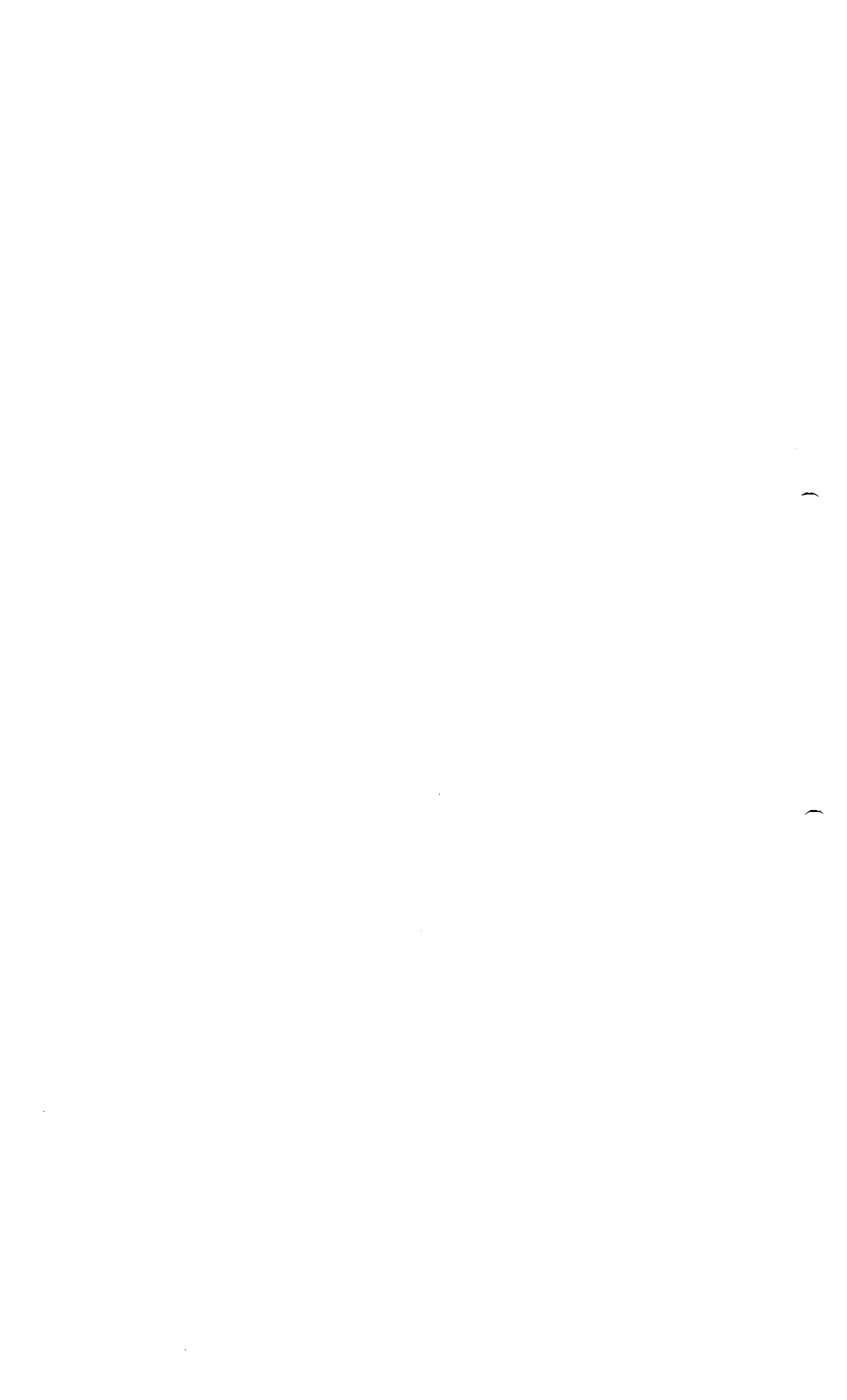
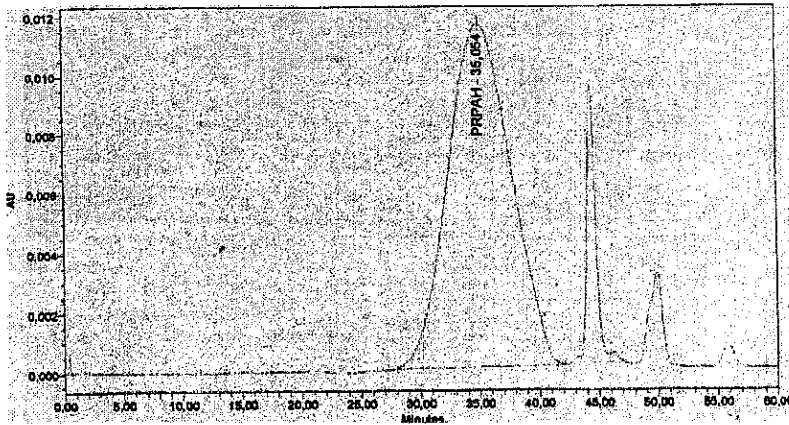




Figura 4: Cromatograma típico del PRP-AH sometido a prueba



### 2.6 Prueba de identificación de *Haemophilus* tipo b

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)



### 3 Validación de los procedimientos analíticos

Se proporcionan los resultados de validación de las pruebas que se utilizan para liberar los intermedios, cuando estas pruebas no se describen en la Ph. Eur.

La validación se llevó a cabo según los lineamientos de la ICH Q2 (R1) "Validation analytical procedures: text and methodology" (validación de procedimientos analíticos: texto y metodología).

#### 3.1 Prueba límite de cianuros residuales

El método para la prueba de cianuro residual con cromatografía de gas en el PRP-AH se describe en el capítulo 2.1. Como prueba límite, se sometieron a prueba la especificidad y el límite de detección. Se presenta un resumen de la validación en la tabla 7.

**Tabla 7: Prueba límite de cianuro residual en el PRP-AH: Validación, resumen**

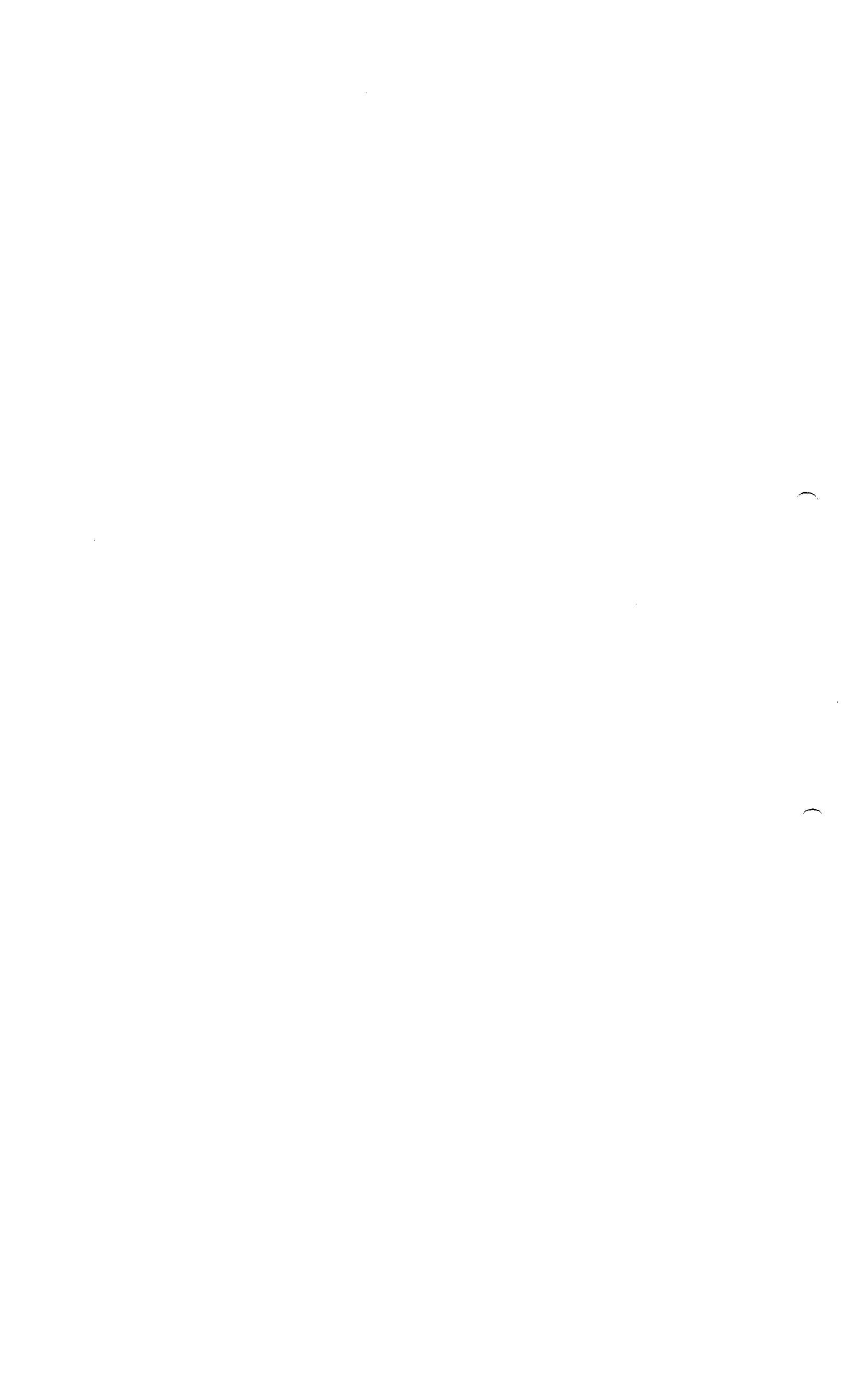
Características	Criterios de aceptabilidad	Resultados
Especificidad	<p><u>Picos interferentes:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>El área del pico de control positivo debe ser mayor o igual que el área mínima detectable.</li> <li>El área del pico de la muestra sin cloramina T no debe ser mayor o igual que el área mínima detectable.</li> <li>El área del pico del testigo no debe ser mayor o igual que el área mínima detectable.</li> </ul> <p><u>Método de recuperación:</u>                      Cada recuperación se debe encontrar entre el 80 % y el 120 %.</p>	<p><u>Picos interferentes:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>El área del pico de control positivo debe ser mayor o igual que el área mínima detectable.</li> <li>El área de la muestra sin cloramina T no presenta un pico mayor o igual que el área mínima detectable.</li> <li>El área del testigo no presenta un pico mayor o igual que el área mínima detectable.</li> </ul> <p><u>Método de recuperación:</u>                      Cada recuperación está entre el 80 % y el 120%.</p>
Límite de detección	Por documentar	El límite de detección es igual a 1 µg/L

#### 3.1.1 Especificidad

##### 3.1.1.1 Picos interferentes:

El dato sometido a análisis es el área del pico del cromatograma, expresada en µV/s. Se probó la especificidad del testigo, de la muestra sin cloramina y del control positivo.

El área mínima detectable se calcula multiplicando el área del control positivo por el coeficiente 1,2/20\*. La tabla 8 recapitula los resultados de los picos interferentes. Si el área no es mayor o igual que el área mínima detectable, el resultado se expresa como "No". Si el área es mayor o igual que el área mínima detectable, el resultado se expresa como "Sí".





\* Área de señal/ruido del control positivo en 20 µg/L: 50

Límite de detección calculado: 1,2 µg/L (para una proporción señal/ruido igual a 3 (3/50x20))

**Tabla 8: Prueba límite de cianuros residuales: Especificidad; resultados correspondientes a los picos interferentes**

	Serie 1	Serie 2	Serie 3
Testigo	No	No	No
Muestra sin cloramina	No	No	No
Control positivo	Sí	Sí	Sí

El método es específico para los picos interferentes puesto que:

- El área del control positivo presenta un área del pico mayor o igual que el área mínima detectable.
- El área de la muestra sin cloramina T no presenta un pico mayor o igual que el área mínima detectable.
- El área del testigo no presenta un pico mayor o igual que el área mínima detectable.

### 3.1.1.2 Método de recuperación

- Se analizaron tres series 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 2 operadores en diferentes días.
- Dentro de cada serie, se llevaron a cabo 6 análisis en condiciones que garantizaban la repetibilidad: los análisis se llevaron a cabo de manera 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 un solo día.

La tabla 9 que aparece a continuación presenta los resultados correspondientes al testigo, la muestra, la muestra con agregados y el control positivo.





**Tabla 9: Prueba límite de cianuros residuales: Especificidad; Áreas medidas para el método de recuperación (µV/s)**

	Serie 1 (µV/s)	Serie 2 (µV/s)	Serie 3 (µV/s)
<b>Testigo</b>	4160	5068	5714
	4428	6134	5242
	3923	5688	6124
	4168	6172	4504
	4236	5359	5017
	3776	6091	4639
<b>Muestra</b>	6882	7459	6797
	5355	7055	7550
	5714	7463	6917
	5562	7355	7214
	5201	7288	6620
	5489	9634	7366
<b>Muestra con agregados</b>	294 549	278 618	358 048
	270 070	354 091	347 952
	290 893	274 246	340 737
	279 387	238 092	322 506
	265 576	252 189	313 843
	251 517	250 961	300 295
<b>Control positivo</b>	300 456	293 217	376 685
	292 066	355 171	389 990
	290 519	258 517	380 244
	264 661	288 605	364 888
	271 980	268 213	355 394
	265 905	275 278	338 581

La recuperación se calcula con las siguientes fórmulas:

$$R = \frac{(\text{área de muestra con agregado}) - (\text{área de la muestra})}{(\text{área del control positivo})} * 100$$

Los porcentajes de recuperación calculados se presentan en la tabla 10 que aparece a continuación.

*[Handwritten signature]*  
**ROXANA MONTEMLONE**  
 DIRECTORA TÉCNICA  
 SANOFI PASTEUR S.A.

*[Handwritten signature]*  
**CHRISTIAN DOMINGUEZ**  
 APODERADO  
 SANOFI PASTEUR S.A.

