



- Preparación de las soluciones estándar de referencia de trabajo: 1,25 mg/L (solución A) y 5,00 mg/L (solución B):

Estas soluciones se deben preparar antes de usarlas.

- Solución A: 1,25 mg/L:

Solución estándar de referencia madre de 10 mg/L 1,25 mL
WFI..... hasta 10 mL

- Solución B: 5,00 mg/L:

Solución estándar de referencia madre de 10 mg/L 5 mL
WFI..... hasta 10 mL

- Preparación de la solución interna de control de 2 µg/mL:

Antes de preparar cada control interno con un contenido de aproximadamente 2 µg/mL, titular con exactitud la solución interna de control (proveedor 2) (con un contenido de aproximadamente 40 g/100 mL).

Esta titulación se lleva a cabo mediante yodometría tras una filtración previa de la solución comercial.

Realice dos diluciones sucesivas, 1/40 seguida de 1/50, en agua purificada: con esto se obtiene la solución (2).

Luego diluya a razón de 1/100 como sigue:

Solución de formaldehído (2)..... 50 mL
Metanol..... 500 mL
WFI..... hasta 5000 mL

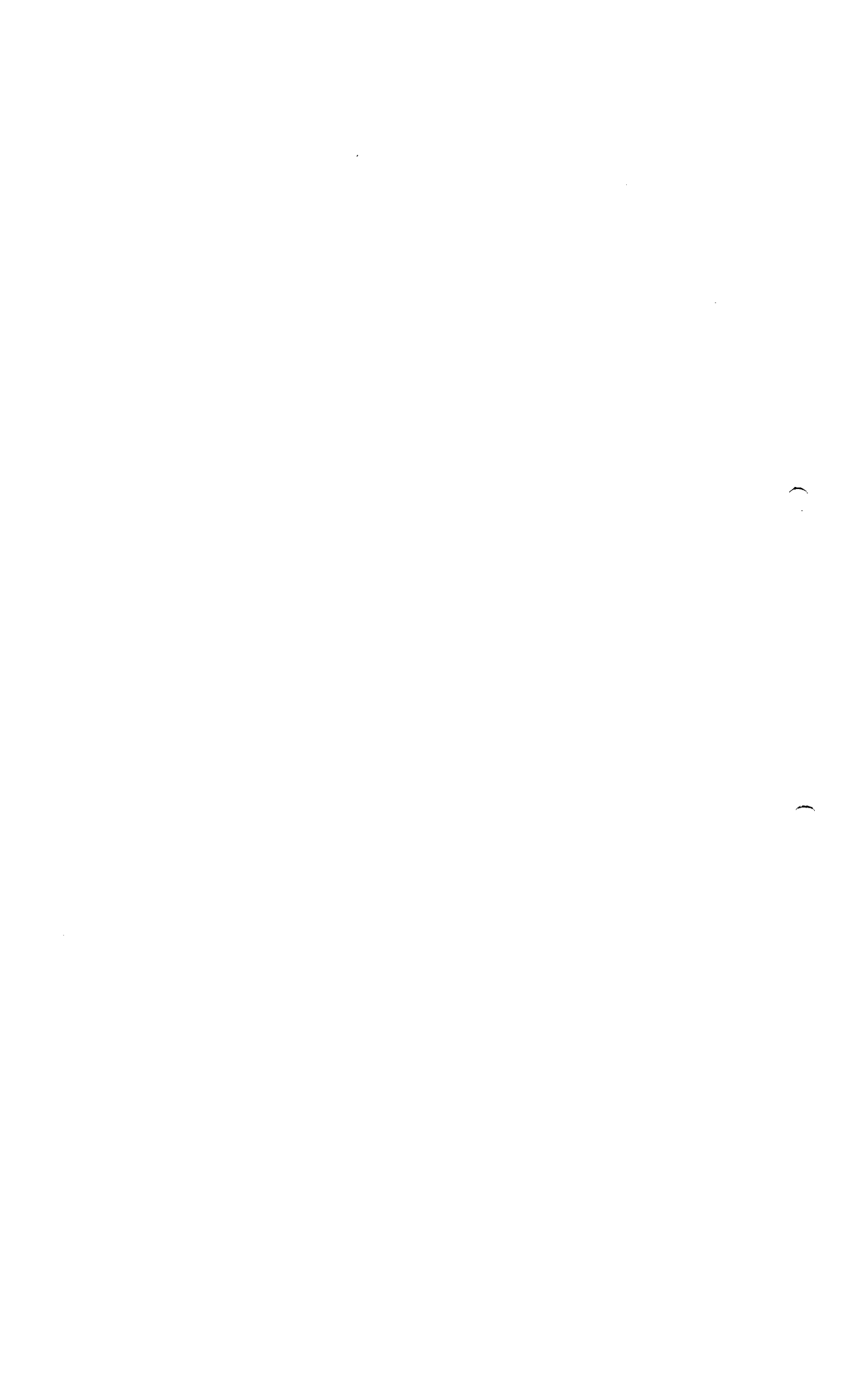
Almacenamiento a +5 °C ± 3 °C

Procedimiento operativo

Diluya la muestra a razón de 1/20 en el disolvente adecuado con el fin de obtener una respuesta que se encuentre dentro del rango de calibración.

Tabla 3: Preparación de las muestras

	Testigo	Solución A	Solución A	Solución A	Solución B	Solución B	Control interno*	Prueba*	Control
Rango en µg (recalculado con el título exacto de la solución estándar de referencia madre al 40 %)	-	0,63	1,25	2,5	5	10	-	-	-
Solución estándar de referencia de trabajo (mL)	-	0,5	1,0	2,0	1,0	2,0	-	-	-



Solución de control interno	(mL)	-	-	-	-	-	-	2,0	-	-
Solución de prueba (TS)	(mL)	-	-	-	-	-	-	-	2,0	2,0
WFI	(mL)	2,0	1,5	1,0	-	1,0	-	-	-	-
Tampón de acetato	(mL)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	-
Tampón de acetato sin acetil acetona	(mL)	-	-	-	-	-	-	-	-	2,0

*: duplicado.

Mezcle e incube todos los tubos en baño de agua a +37 °C durante 50 minutos.

Lectura, cálculo, resultados

Cada tubo (testigo, rango, control interno, control, pruebas) se debe medir por fotometría a 413 nm en comparación con agua purificada.

La concentración de formaldehído de la muestra se determina mediante la curva de referencia.

• Rango

La DO del testigo se resta de la DO de cada punto del rango. Se obtiene un valor ΔDO para cada punto del rango. Este ΔDO se convierte en log ΔDO para cada punto y las concentraciones correspondientes (concentraciones logarítmicas).

Se define la regresión lineal $\text{Log}(\Delta\text{DO}) = F(\text{concentración logarítmica})$.

• Muestras

Se resta la DO del testigo de la DO de las soluciones de muestra, del control interno y del control. Se obtiene un valor de ΔDO para cada tubo.

Para cada prueba, se resta la DO del control correspondiente (ΔDO de prueba - DO de control), lo cual da un valor que se convierte en logarítmico. La concentración logarítmica se convierte a decimal: a (en μg en la muestra de prueba).

$$\text{Concentración de formaldehído} = \frac{a \times \text{dilución}}{\text{TS}} \mu\text{g/mL}$$

Donde:

a: concentración de formaldehído presente en la muestra de prueba en μg obtenida de la curva de calibración

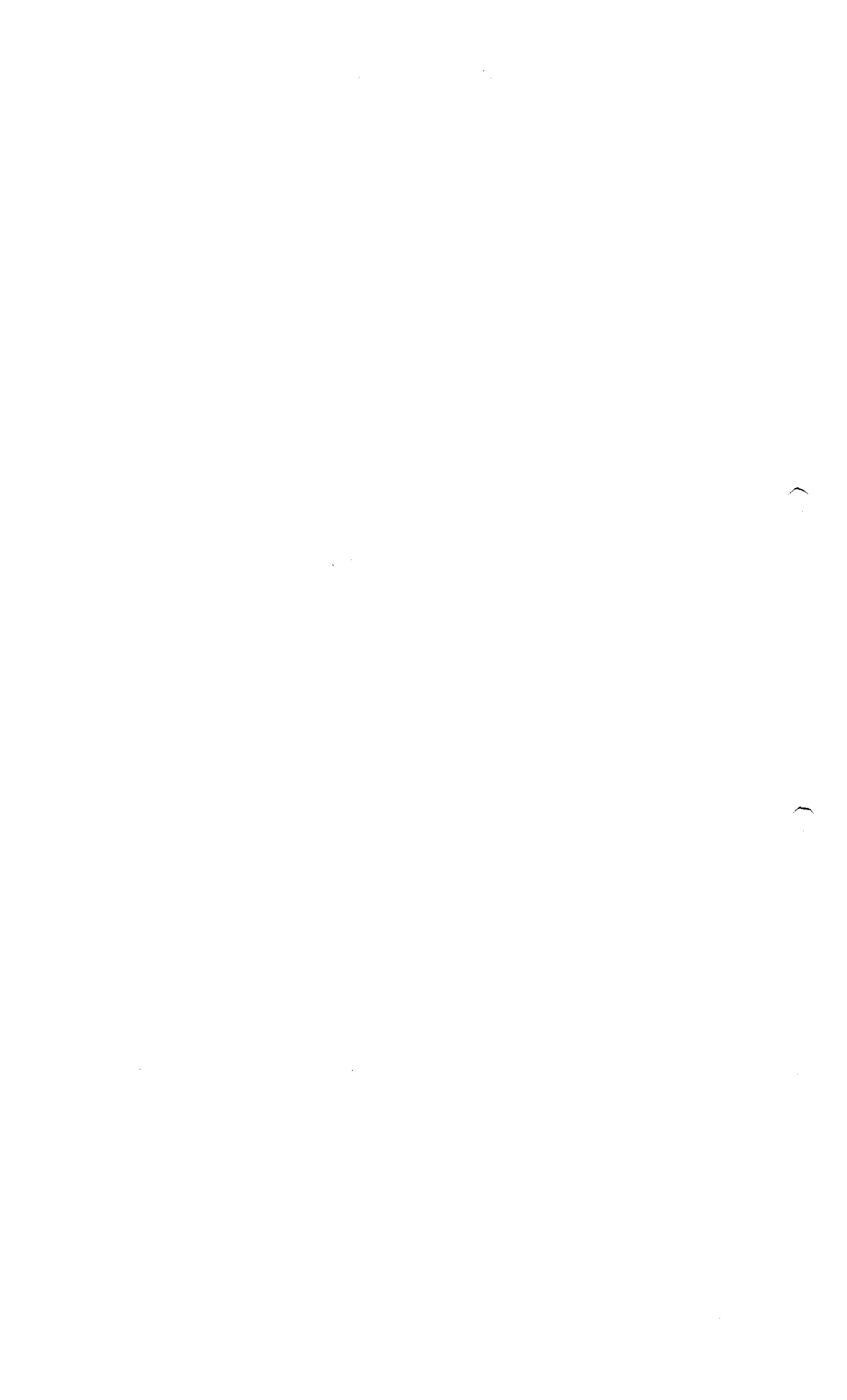
dilución: dilución de la muestra de prueba

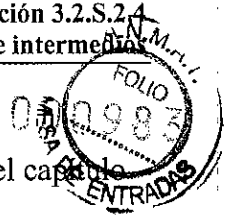
TS: Volumen de la muestra de prueba (mL).

Expresa el contenido de formaldehído libre en μg/mg de proteína usando la siguiente fórmula:

$$\text{Contenido de formaldehído residual libre en } \mu\text{g/mg de proteína} = \frac{\text{concentración de formaldehído } (\mu\text{g/mL})}{\text{contenido proteico (mg/mL)}}$$

Donde:





Contenido proteico (mg/mL) obtenido usando el contenido de nitrógeno proteico (vea el capítulo 2.1).

Criterios de validez

La prueba se considera válida si:

El coeficiente de correlación de la línea de calibración es mayor o igual que 0,9990.

La desviación relativa tolerada entre dos pruebas es menor o igual al 10 %.

El valor del control interno (promedio de 2 pruebas) se debe encontrar dentro de los límites determinados por el gráfico de control de calidad.

2.5 Título de floculación

Se aplica el método utilizado para el PTP (vea la sección 3.2.S.2.4 Controles de los pasos críticos e intermedios, Intermedio PTP).

2.6 Pureza antigénica

Se aplica el método utilizado para el PTP (vea la sección 3.2.S.2.4 Controles de los pasos críticos e intermedios, Intermedio PTP).

2.7 Distribución del tamaño molecular (HPLC): porcentaje de monómeros

Se aplica el método utilizado para el PTP (vea la sección 3.2.S.2.4 Controles de los pasos críticos e intermedios, Intermedio PTP).

2.8 Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica

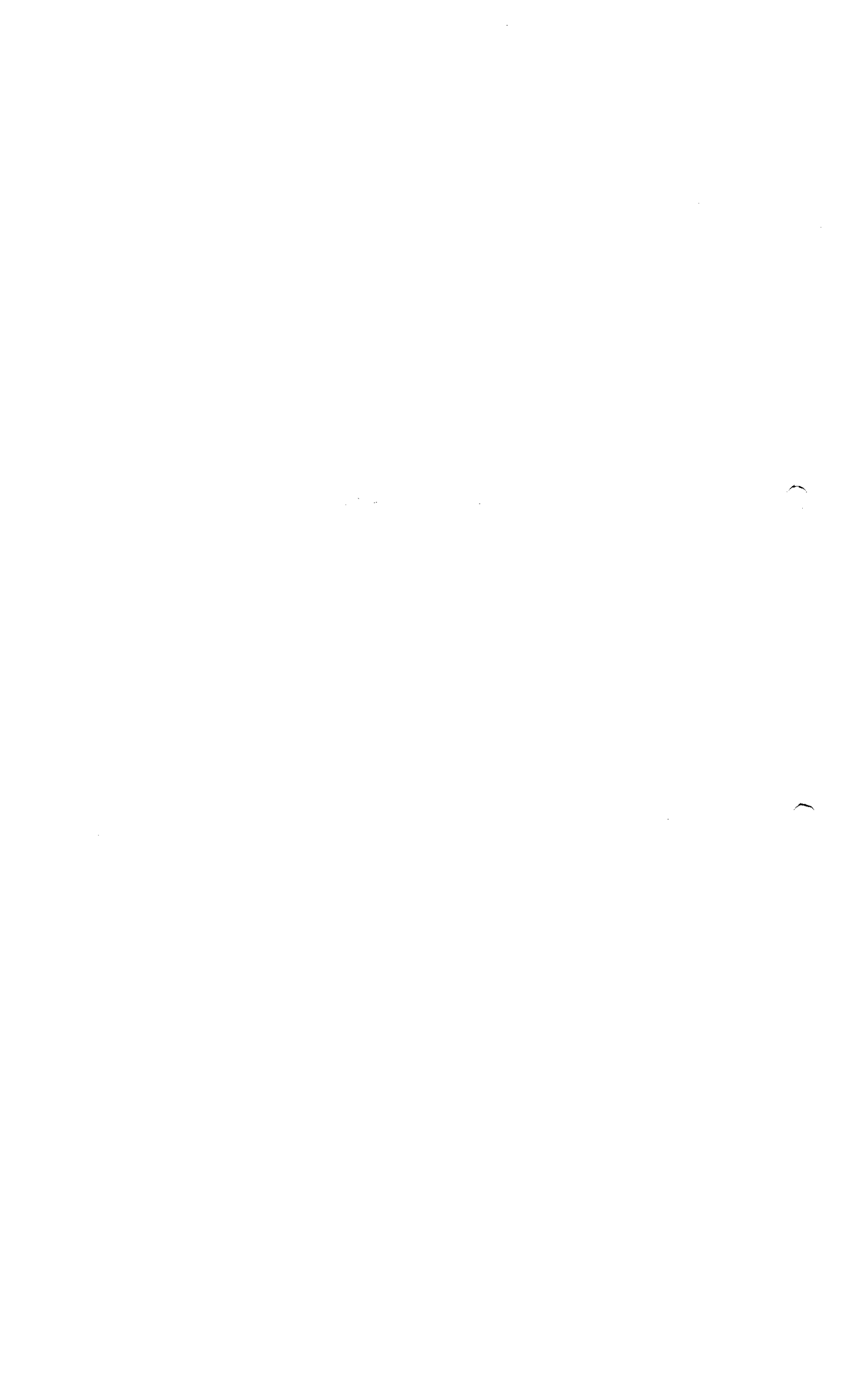
Se aplica el método utilizado para el PTP (vea la sección 3.2.S.2.4 Controles de los pasos críticos e intermedios, Intermedio PTP).

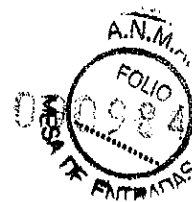
2.9 Ausencia de toxina (toxicidad específica) e irreversibilidad del toxoide

Esta prueba se realiza en la CTP de acuerdo con la monografía 0452 de la Ph. Eur. "Tetanus vaccine (adsorbed)" y con la TRS 800.

2.10 Prueba de pirógenos

Se aplica el método utilizado para el PTP (vea la sección 3.2.S.2.4 Controles de los pasos críticos e intermedios, Intermedio PTP).





3 Validación de los procedimientos analíticos

Se proporcionan los resultados de validación para las pruebas utilizadas 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) "Procedimientos analíticos de validación: texto y metodología".

3.1 Contenido de nitrógeno proteico

La prueba de análisis de nitrógeno proteico utilizando el método de Kjeldhal después de la precipitación de proteínas (con base en las monografías de la Ph. Eur. números 2.59 y 2.5.33, método 7.A) en la CTP se describe en el capítulo 2.1. Como ensayo cuantitativo, se evaluaron la linealidad, la exactitud y la precisión. El método es específico para el ión amonio después de la mineralización sulfúrica del nitrógeno orgánico. Se presenta un resumen de la validación en la tabla 4.

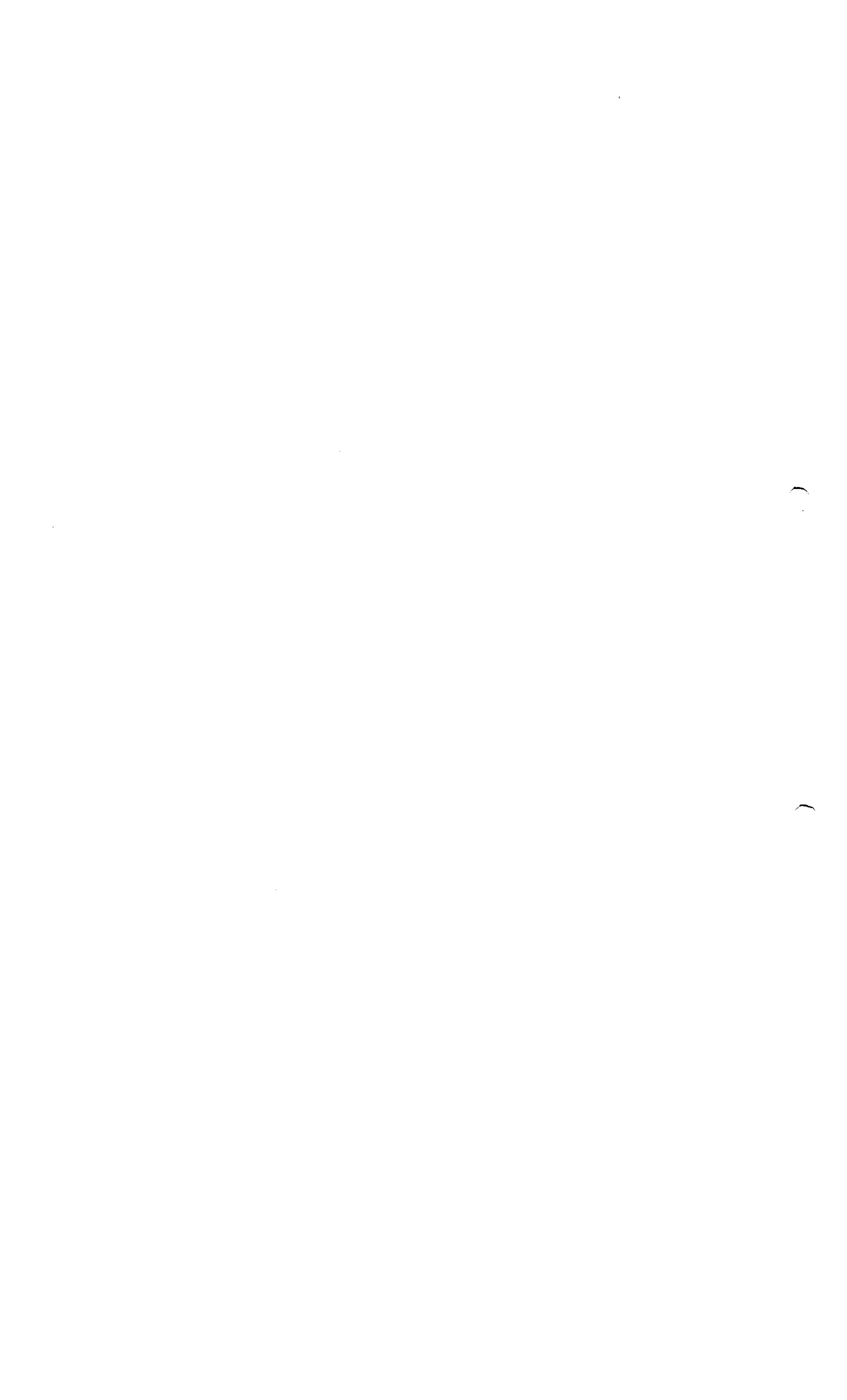
Tabla 4: Nitrógeno proteico en la CTP, resumen de validación

Características	Criterios de aceptación	Resultados
Linealidad	Significancia de la pendiente: $P_{\text{linealidad}} < 0,01$ No hay desviación de la linealidad: $P_{\text{desviación de la linealidad}} > 0,05$	$P_{\text{linealidad}} < 0,0001$; $P_{\text{desviación de la linealidad}} = 0,99$ Después del ajuste lineal de $Y =$ concentración medida en función de $X =$ volumen de la solución analizada, se destaca la siguiente relación: $Y = -0,06 + 5,78 \cdot X$ Coeficiente de correlación lineal $r = 0,9940$ con 13 grados de libertad Rango de linealidad: [2,42--23,45] mg
Exactitud	El valor 100% está incluido dentro del intervalo de confianza del porcentaje medio de recuperación.	La recuperación porcentual media y sus límites de confianza del 95 % son los siguientes: 99,5 % [98,2 %- -100,8 %]
Precisión	Sin límite asignado	Los parámetros de repetibilidad y precisión intermedia son respectivamente iguales a: - Coeficiente de variación: 2,3 % y 4,2 % - intervalos de confianza del 95 % de precisión intermedia para 1 corrida con una medición realizada de la manera habitual: $\pm 0,50$ mg/mL

3.1.1 Linealidad

Tres operadores llevaron a cabo tres pruebas independientes. Cada corrida incluyó un rango de 5 volúmenes de la solución CTP sometida a prueba.

Los datos analizados son las cantidades de nitrógeno proteico expresado en mg, y se presentan en la tabla 5.



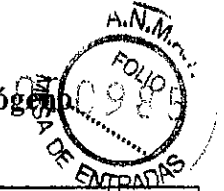


Tabla 5: Nitrógeno proteico en la CTP; validación, linealidad: cantidad de nitrógeno proteico de la muestra (mg)

Volumen de la solución de CTP sometida a prueba (mg)	Grupo 1(mg)	Grupo 2(mg)	Grupo 3(mg)
0,5	2,79	2,74	2,88
1,0	5,66	5,76	5,81
2,0	11,41	11,55	11,52
3,0	17,19	17,54	17,12
4,0	22,84	23,54	22,70

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 muestra de la solución de CTP) y las cantidades medidas de nitrógeno proteico, al igual que la linealidad de esta relación, se prueban mediante un análisis de varianza de la regresión. El análisis de varianza permite concluir la significancia de la pendiente ya que el valor de linealidad P usando la tabla Snedecor a un nivel de significancia del 1% es inferior al 1% (valor P < 0,0001), y una desviación insignificante 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 = 0,99).

La ecuación de la línea recta de regresión es:

$$Y = (-0,059 \pm 0,220) + (5,775 \pm 0,089) \cdot X$$

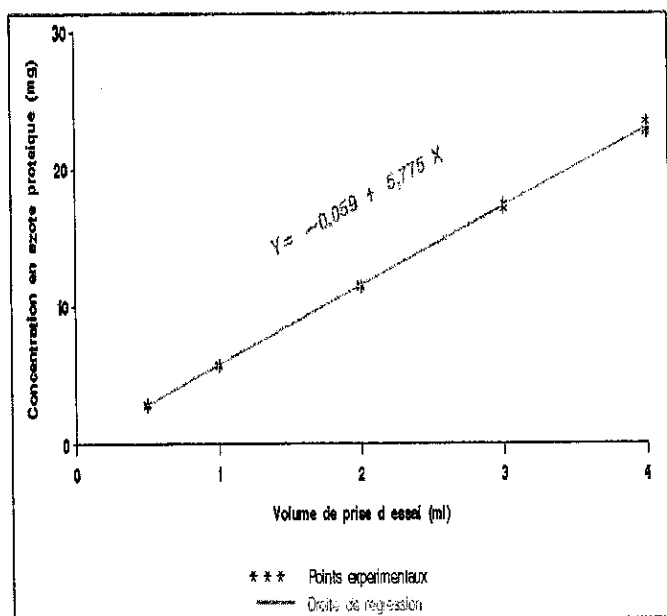
Donde:

- X = volumen (mL)
- Y = cantidad medida de nitrógeno proteico (mg)
- Coeficiente de correlación lineal $r = 0,9996$ con 13 grados de libertad
- Rango de linealidad: [2,42-23,45] mg de nitrógeno proteico





Figura 1: Contenido de nitrógeno proteico en el CTP; validación, gráfica de linealidad

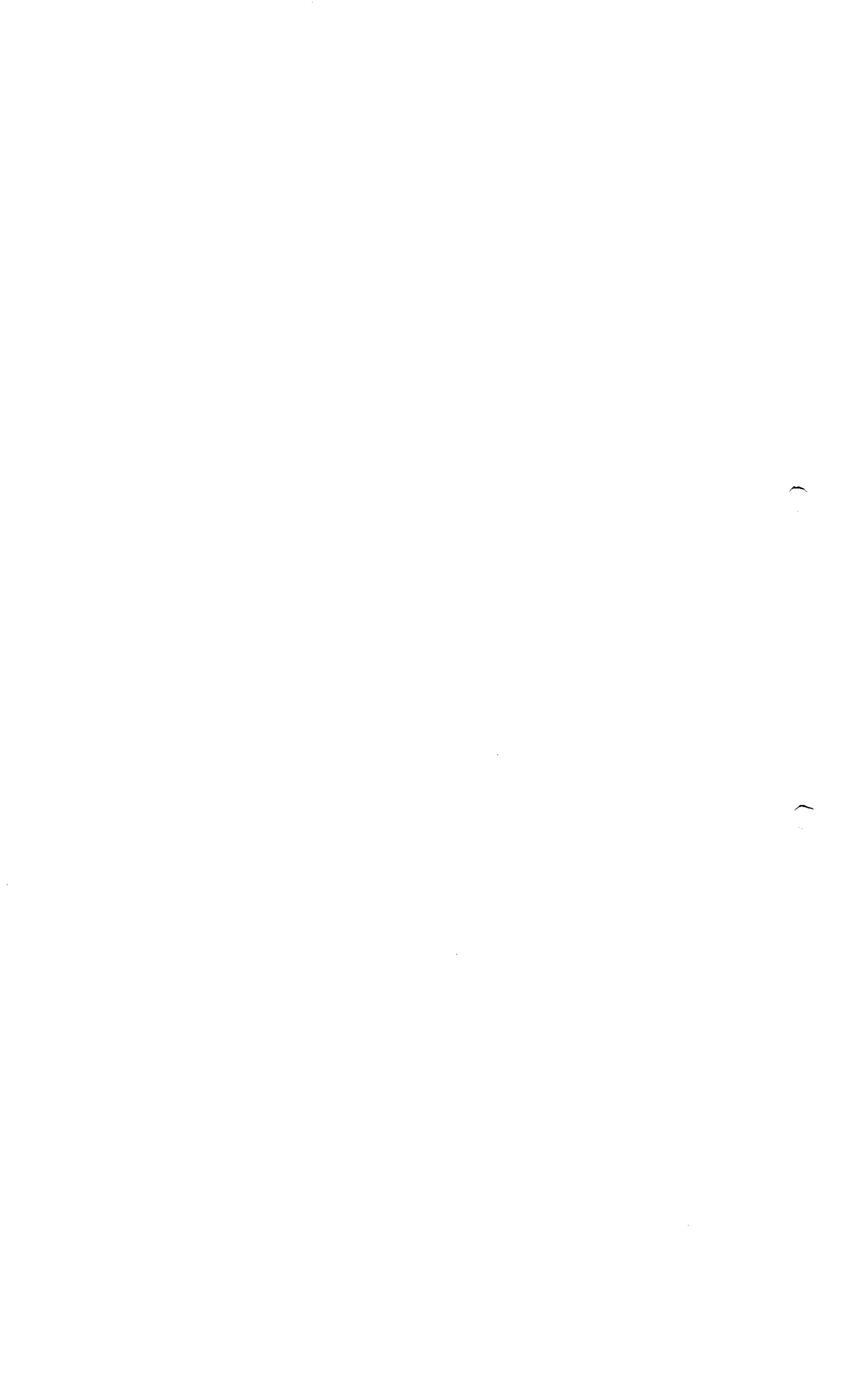


3.1.2 Exactitud

Los datos analizados corresponden al factor de concentración calculado, a partir de los resultados obtenidos en la prueba de linealidad (vea la tabla 5). Los factores de concentración teórica corresponden a la proporción entre el volumen analizado de solución CTP y el volumen del CTP de 1,0 mL (volumen típico utilizado de manera habitual). Los factores de concentración medidos corresponden a la proporción del contenido de nitrógeno proteico obtenido al volumen analizado entre el contenido de nitrógeno proteico obtenido con un volumen de CTP de 1,0 mL. Los resultados del factor de concentración en los cuatro niveles involucrados se presentan en la tabla 6.

Tabla 6: Contenido de nitrógeno proteico en el CTP; validación, exactitud: factor de concentración calculado

Factor de concentración teórica	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
0,5	0,49	0,48	0,50
1,5	2,01	2,00	1,98
2,0	3,03	3,04	2,95
4,0	4,03	4,09	3,91





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

Tabla 7: Recuperación porcentual media

Recuperación porcentual	Límites de confianza del 95 %
99,51 %	[98,23-100,78]%

El valor 100 % está dentro de los límites de confianza.

3.1.3 Precisión

Se analizaron tres grupos bajo 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 días diferentes.

Dentro de cada grupo, se llevaron a cabo 6 análisis bajo 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 una corrida de 3 días.

Los datos analizados son las concentraciones del contenido de nitrógeno proteico expresado en mg/mL, y se presentan en la tabla 8.

Tabla 8: Contenido de nitrógeno proteico en el CTP; validación, precisión: contenido de nitrógeno proteico (mg/mL)

Análisis	Grupo 1 (mg/mL)	Grupo 2 (mg/mL)	Grupo 3 (mg/mL)
1	5,80	5,63	5,21
2	5,75	5,71	5,59
3	5,82	5,89	5,36
4	5,88	5,66	1,62*
5	5,77	5,50	5,21
6	5,70	5,67	5,53

* La prueba de Dixon mostró que este resultado es atípico. Este valor se descartó del cálculo estadístico de la precisión.



Se verifica la homogeneidad de las varianzas intragrupalas mediante una prueba de Cook. El nivel de significancia del 5 %. Los parámetros de repetibilidad y precisión intermedia se calcularon 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 significación del 5 % con varianzas de repetibilidad e intergrupales. 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 habitualmente, se presentan en la tabla 9.

Tabla 9: características de repetibilidad y precisión intermedia

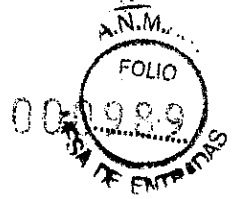
Características	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Intervalo de confianza del 95 %
Características de repetibilidad	0,127	2,3%	/
Características de precisión intermedia	0,235	4,2%	±0,499

3.1.4 Conclusión

El método es lineal en el rango: [2,42-23,45] mg de nitrógeno proteico. Se demuestra la exactitud en el mismo rango, con una recuperación media del 99,5 %. La precisión del método se verifica ya que la repetibilidad y el coeficiente de precisión intermedia de las variaciones son de alrededor del 2 % y del 4 %.

El método es válido para medir el nitrógeno proteico en la solución de CTP utilizando el método Kjeldahl.





3.2 Índice DO_{280}/DO_{260}

El método de medición de la densidad óptica a 280 nm y a 260 nm del CTP por espectrometría se describe en el capítulo 2.2. Puesto que la prueba corresponde a una medición física, la característica de validación estudiada es la precisión, en términos de repetibilidad y precisión intermedia. Se presenta un resumen de la validación en la tabla 10.

Tabla 10: Razón DO_{280}/DO_{260} del CTP; resumen de validación

Características	Criterio de aceptabilidad	Principio
Precisión	Sin límite asignado	Los parámetros de repetibilidad y precisión intermedia son respectivamente iguales a: - Coeficiente de variación: 0,3% y 0,6% - intervalo de confianza del 95% de la precisión intermedia para 1 prueba con 1 replicado realizado del modo habitual: $\pm 0,023$

3.2.1 Precisión

Se analizaron tres grupos bajo 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 días diferentes.

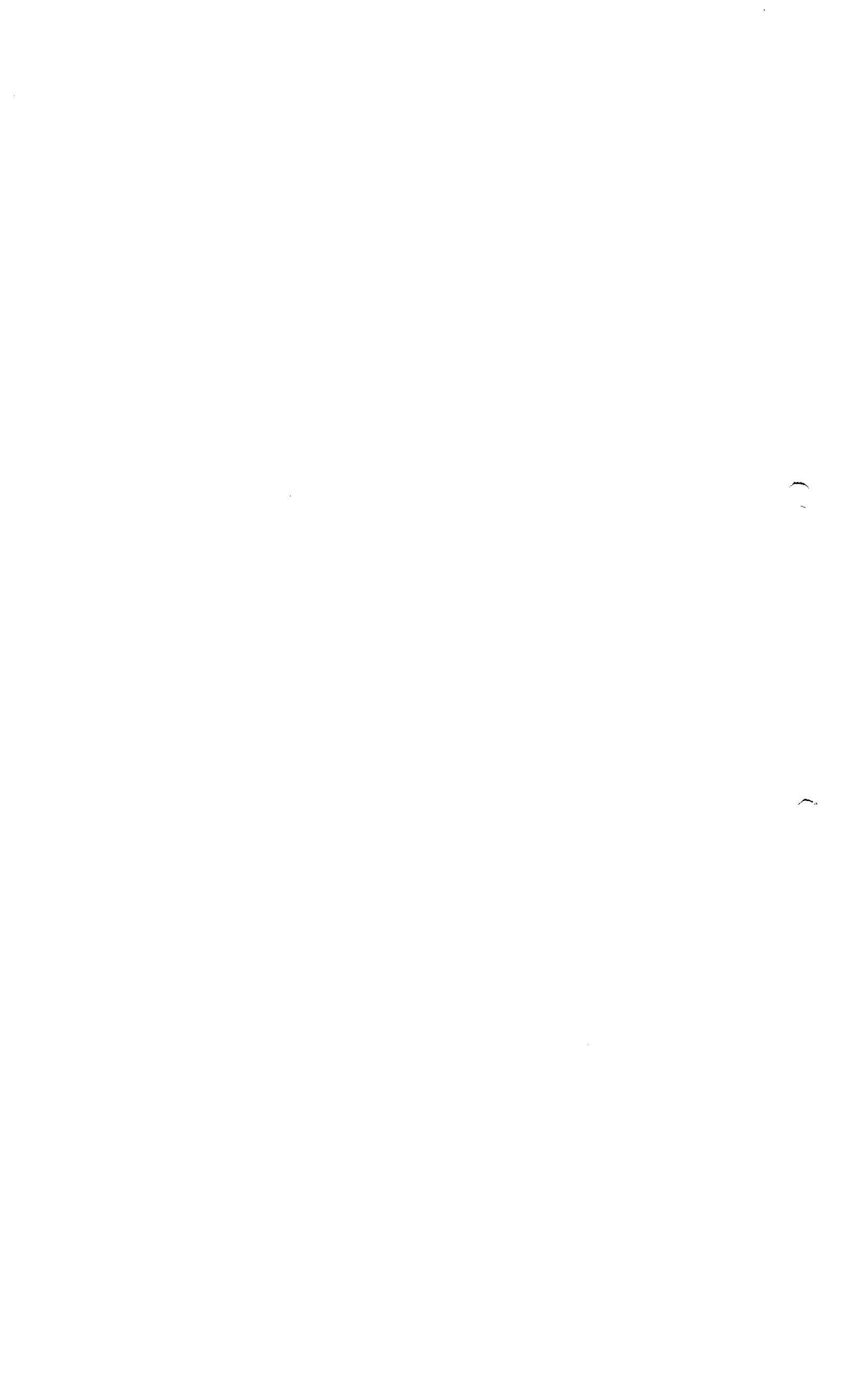
Dentro de cada grupo, se llevaron a cabo 6 análisis bajo condiciones que garantizaban la repetibilidad: los análisis se llevaron a cabo de forma independiente utilizando el mismo método, en una muestra primaria homogénea, en el mismo laboratorio, con los mismos equipos y los realizó el mismo operador en un solo día.

Los datos analizados son los índices DO_{280}/DO_{260} entre las densidades ópticas a 280 nm y a 260 nm, y se presentan en la tabla 11.

Tabla 11: Índice DO_{280}/DO_{260} del CTP; validación, precisión Resultados del índice DO_{280}/DO_{260}

Análisis	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
1	1,889	1,873	1,860
2	1,885	1,874	1,860
3	1,885	1,889	1,867
4	1,876	1,881	1,868
5	1,875	1,888	1,867
6	1,878	1,872	1,865

Se verifica la homogeneidad de las varianzas intragrupalas mediante una prueba de Cochran a un nivel de significancia del 5 %. Los parámetros de repetibilidad y precisión intermedia se



calcularon 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.

Las características de repetibilidad y precisión intermedia, así como el intervalo de confianza del 95% para 1 corrida (1 duplicado) que se lleva a cabo habitualmente, se presentan en la tabla 12.

Tabla 12: Características de repetibilidad y precisión intermedia

Características	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Intervalo de confianza del 95 %
Características de repetibilidad	0,006	0,32 %	/
Características de precisión intermedia	0,011	0,57 %	±0,023

3.2.2 Conclusión

La repetibilidad y la precisión intermedia son aceptables, puesto que los respectivos coeficientes de variación son menores al 1 %. La precisión del método se considera satisfactoria.

El método es válido para medir el índice DO_{280}/DO_{260} en la CTP.

