

# Validación del método analítico para la determinación de N-acetil-DL-triptófano en muestras de albúmina por cromatografía líquida de alta resolución

## Validation of analytical method for the determination of N-Acetyl-DL-tryptophan in albumin samples by High Performance Liquid Chromatography

EVER FONTECHA, MIRIAN REGNAULT

### RESUMEN

La Albúmina Humana al 20% es una solución acuosa estéril obtenida por fraccionamiento del plasma sanguíneo con etanol. Esta solución es osmóticamente equivalente a aproximadamente 400 mL de plasma normal y no contiene preservativos. Este producto está indicado a pacientes que cursan con hipoalbuminemia (<2,5g/dL) como resultado de quemaduras, hemorragias severas, sepsis, cualquier condición de choque o colapso, pacientes hemodializados con hipotensión que tienen sobrecarga de líquidos y no pueden tolerar soluciones salinas, síndrome nefrótico, hipoalbuminemia por lesión hepática severa, pancreatitis necrotizante. El proceso productivo de la Albúmina Humana al 20% incluye dos pasos de pasteurización a 60 °C por 4 y 10 horas, respectivamente. En el primer paso es necesario añadir dos estabilizantes térmicos, N-acetil-DL-triptófano y caprilato de sodio, para evitar la desnaturalización de la proteína. En el presente trabajo se reporta la validación del método analítico utilizado para la determinación de N-acetil-DL-triptófano en muestras de albúmina humana en producto terminado y en proceso por HPLC. Para garantizar la confiabilidad de los resultados analíticos se calificó el equipo de HPLC utilizado, evaluándose su calibración, exactitud de la longitud de onda y linealidad del detector así como la exactitud del flujo, y las pruebas de gradiente de la bomba del sistema, confirmándose que el mismo operó consistentemente de acuerdo a sus especificaciones de diseño. Los parámetros encontrados en el estudio de la validación fueron: especificidad: no se encontraron interferencias por parte de la matriz de la muestra; adecuación del sistema: se obtuvo un promedio en número de platos teóricos de 8684 con un factor de asimetría promedio de 1,91; linealidad: ecuación de regresión lineal igual a  $8 \times 10^6 X + 6190,6$  ( $r^2=0,9986$ ). En cuanto a la precisión, los valores de repetibilidad encontrados para el analista 1 fueron de 0,32% y para el analista 2 de 0,17%, con un promedio de precisión intermedia de 0,25 en términos de desviación estándar relativa. Para el parámetro exactitud, el promedio de los valores de porcentajes de recuperación fue de 99,87 con una desviación estándar relativa de 0,95%. El parámetro robustez fue evaluado utilizando el diseño factorial de Plackett-Burman para los factores pH, flujo y concentración de sales de la fase móvil y con estos resultados se consideró validado el método analítico estudiado.

**Palabras clave:** N-acetil-DL-triptófano, albúmina humana, HPLC

### ABSTRACT

Human Albumin 20% is a sterile aqueous solution obtained by fractionation of blood plasma with ethanol. This solution is osmotically equivalent to approximately 400 mL of normal plasma and contains no preservatives. This product is indicated for patients with hypoalbuminemia (<2.5 g/dL) as a result of burns, severe bleeding, sepsis, shock or any condition of collapse, hypotension in hemodialysis patients with fluid overload whom cannot tolerate salt solutions, nephrotic syndrome, hypoalbuminemia by severe liver injury, necrotizing pancreatitis. The production process of 20% human albumin involves two-step pasteurization at 60 °C for 4 and 10 hours, respectively. In the first step, it is necessary to add two thermal stabilizers, N-acetyl-DL-tryptophan and sodium caprilate to avoid protein denaturation. In this paper we report the validation of the analytical method for the determination of N-acetyl-DL-tryptophan in final samples of human albumin and in processed product by HPLC. To ensure reliability of analytical results we qualified the HPLC system used assessing calibration, wavelength accuracy and detector linearity as well as flow rate accuracy and

\* Postgrado de Aseguramiento de la Calidad, Facultad de Farmacia  
Universidad Central de Venezuela. e-mail:everfontecha@yahoo.es; miriamregnault@hotmail.com

gradient pump performance which was found it operated consistently according to its design specifications. The parameters found on validation study were: specificity: no interference from the sample matrix; system suitability: a theoretical plate's number of 8684 with an asymmetry factor of 1.91; linearity: linear regression equation equal to  $8 \times 10^6 X + 6190.6$  ( $r^2 = 0.9986$ ). With regard to precision, repeatability values found for analyst 1 was 0.32% and for analyst 2 was 0.17% with an average value of 0.25 for intermediate precision in terms of relative standard deviation. Accuracy: recovery of 99.87% with a relative standard deviation of 0.95%. Robustness parameter was evaluated using the Plackett-Burman factorial design for mobile phase pH, flow rate and salt concentration and with those results it was considered validated the analytical HPLC method studied.

**Key words:** N-acetyl-DL-tryptophan, human albumin, HPLC.

## Introducción

La albúmina es la proteína más abundante en el plasma humano, constituyendo cerca del 50% de las proteínas presentes en individuos sanos. Es una molécula compuesta por 585 aminoácidos con 17 puentes disulfuro, y un peso molecular de 67.000 Dalton, el cual es un peso relativamente bajo en comparación con el de otras proteínas plasmáticas. Según la Farmacopea Europea, la solución de albúmina humana es una solución acuosa de proteína obtenida a partir de plasma. Se presenta como una solución concentrada con de un 15% a un 25% de proteína total o como una solución isotónica con de un 3,5% a un 5% de proteína total; la farmacopea establece que los preparados comerciales de albúmina deben contener un 95% de albúmina del total de proteínas. En la formulación, se añaden estabilizantes térmicos, como el caprilato sódico y el N-acetiltriptófano para proteger a la proteína y evitar que la misma se desnaturalice durante el choque térmico. No se añaden conservantes antimicrobianos en la preparación de la albúmina. Asimismo, la solución de albúmina humana debe contener como máximo 160 miliequivalentes de sodio por mililitro. Para la obtención de la albúmina humana se utiliza el método de Cohn-Oncley o fraccionamiento alcohólico del plasma. Este método permite la separación selectiva de la fracción V, con un alto contenido de albúmina (Cohn y col., 1944). El proceso productivo de la albúmina humana al 20% incluye dos pasos para la eliminación e inactivación viral, para lo cual el producto se somete a un primer proceso de pasteurización, calentando a 60 °C por un período de 4 horas, denominado choque térmico y luego un segundo proceso de pasteurización a 60 °C durante 10 horas, lo que permite la inactivación de virus (VIH, virus de la hepatitis y parvovirus B19), bacterias y parásitos (Quimbiotec, 2005).

El producto albúmina humana al 20% es una solución acuosa estéril de albúmina cuya composición contempla es 1,6 mmol de caprilato de sodio, 1,6 mmol de N-acetil-DL-triptófano y una cantidad de sodio máxima de 16,0 mmol. Este producto está indicado para pacientes que cursan con hipoalbumi-

nemia (<2,5g/dL) como resultado de quemaduras, hemorragias severas, sepsis, cualquier condición de choque o colapso, pacientes hemodializados con hipotensión que tienen sobrecarga de líquidos que no pueden tolerar soluciones salinas, síndrome nefrótico, hipoalbuminemia por lesión hepática severa o pancreatitis necrotizante (Quimbiotec, 2005).

La validación de un método analítico es el proceso por medio del cual se establece por estudios de laboratorio que las características del mismo cumplen con los requisitos que propone la aplicación. El uso de un procedimiento validado con instrumentos calificados ofrece la confianza de que el procedimiento generará datos de prueba de calidad aceptable (USP 36, 2013). La calificación de equipos carece de procedimientos específicos y se han reportado diversos enfoques (Chan, 2004; USP 36, 2013) que lo consideran de gran importancia para generar datos confiables y reproducibles. Los parámetros de validación generalmente requeridos para un método analítico son exactitud, precisión, especificidad, linealidad, intervalo y adecuación del sistema (USP 36, 2013; ICH Q2B, 1996 y Q2R1, 2005) y robustez (AEFI, 2001).

Jones en 1993 estudió la caracterización de proteínas de interés farmacéutico, así como la selección y optimización de los métodos utilizados en la caracterización de la sustancia medicamentosa y en el control de calidad del producto final. Así, Luo y col. (2011) analizaron los métodos analíticos que se utilizan para caracterizar los atributos importantes de las proteínas biofarmacéuticas, seguido por la determinación de impurezas, relacionadas con el producto y el proceso. Fang y col. (2011) caracterizaron los productos de degradación del N-acetil triptófano en soluciones concentradas de albúmina de suero humano y desarrollaron un método automatizado de cromatografía líquida de alta resolución con espectrometría de masas para su cuantificación. Así mismo, se han publicado varios métodos analíticos para la determinación del estabilizante entre ellos cromatografía líquida de alta resolución y electroforesis capilar con detección ultravioleta (Inoue, Tokuyama y Takai, 1983; Yu y Finlayson, 1984; Wong y col., 1984; Nelis

y col., 1985; Reuge, 1986; Jaworska y col., 2009; Utrera y Estevez, 2012). En el presente trabajo se reporta la validación del método analítico utilizado para la determinación de N-acetil-DL-triptófano en muestras de albúmina humana al 20% mediante el uso de la HPLC para garantizar la confiabilidad de los resultados analíticos. Así mismo, reportamos los resultados de la calificación del equipo de HPLC utilizado en dicha validación.

## Materiales y métodos

### EQUIPOS

Se ejecutaron las pruebas de calificación de operación del equipo HPLC Akta, modelo P-10, fabricado por Amersham Biosciences (New Jersey, USA), ubicado en el laboratorio de físico-químico de la Planta Productora de Derivados Sanguíneos. Para la validación de la metodología se utilizaron además un pHmetro marca Orión 720-A; balanza analítica, marca Mettler AE240 (Ohio, USA), balanza semi-analítica, marca Mettler PJ3000 (Ohio, USA); micro pipetas automáticas, marca Gilson (Wisconsin, USA); plancha de agitación, marca Velp Científica (Tecno-Center, Maracay, Venezuela); bomba de vacío marca Millipore (Cienvar, Caracas Venezuela). Todos los equipos utilizados tenían certificados de calibración vigentes.

### REACTIVOS

Para la calificación del equipo de HPLC se utilizó: Titrisol ácido sulfúrico 0,1 M y dicromato de potasio 100,1% ambos marca Merck (Darmstadt, Alemania). Para la validación del método analítico se utilizó: fosfato de sodio monobásico monohidratado, grado reactivo 99 – 102%; fosfato de sodio dibásico anhidro, grado reactivo >99%; bicarbonato de sodio, grado reactivo >99,5%; cloruro de sodio, grado reactivo >99,5%, todos marca Merck (Darmstadt, Alemania); azida de sodio, marca Fisher Scientific (Pittsburgh, USA), grado reactivo >99%. Todos los reactivos fueron utilizados en fechas previas a su expiración.

### CALIFICACIÓN DEL EQUIPO DE HPLC

Los parámetros críticos y los criterios de aceptación de operación para el HPLC Akta P10 se realizan según lo referido por Vita, 2003 y Chan, 2004.

#### DETECTOR

##### AUTO-DIAGNÓSTICO Y CALIBRACIÓN AUTOMÁTICA DE RUTINA DEL DETECTOR

Se verificó el correcto encendido y funcionamiento del detector UV. Criterio de aceptación: encendido del instrumento y el diagnóstico es aprobado.

#### EXACTITUD DE LONGITUD DE ONDA

Se verificó que el detector a la longitud de onda máxima del analito, que obtiene la máxima respuesta: se realizó colocando en la celda del detector una solución estándar de calibración de dicromato de potasio (0,15 mM en ácido sulfúrico 0,1 M). Se estableció una longitud de onda inicial 250 nm y luego procedió a incrementarla en 1 nm hasta 261 nm, tomando el valor de absorbancia en cada una de las longitudes de onda establecidas por un período de 10 segundos. Se utilizó como blanco el ácido sulfúrico 0,1 M (para realizar el auto-cero antes de cada medición). Criterio de Aceptación: La mayor respuesta debe ser a 257 nm  $\pm$  1.

#### LINEALIDAD

Se verificó la linealidad de la respuesta del detector UV utilizando soluciones estándares secundarios de dicromato de potasio de las siguientes concentraciones 0,05 mM; 0,10 mM; 0,15 mM y 0,20 mM en ácido sulfúrico 0,1 M; se seleccionó un longitud de onda de 257 nm, utilizando una jeringa de 10 mL se pasó el blanco de ácido sulfúrico 0,1 M para realizar el auto-cero. Se colocaron los estándares asegurando la homogeneidad de la solución en la celda, una vez estabilizado se registró el valor. Fue realizado por triplicado para cada solución. Criterio de Aceptación: coeficiente de determinación  $r^2 > 0,990$ ; Coeficiente de variación de las soluciones < 5% (en base a la sensibilidad: absorbancia/concentración).

#### BOMBA

##### AUTO – DIAGNÓSTICO Y VERIFICACIÓN DE RUTINA

Se verificó el correcto encendido y funcionamiento de la bomba P-900. Se encendió el instrumento y se esperó que el diagnóstico de rutina finalizara. Criterio de Aceptación: el instrumento enciende y el diagnóstico es aprobado.

#### EXACTITUD DEL FLUJO

Se verificó que el flujo de la bomba se encontrara dentro de los límites de acuerdo a su uso: se utilizaron tres (3) balones volumétricos de vidrio clase A de 25,0 mL. Se colocó en cero el cronometro, después de asignar el flujo correspondiente para evaluar la bomba (0,5 mL/min; 1 mL/min y 5 mL/min), se colocó el balón en la salida de la bomba y se accionó el cronómetro, cuando el líquido llegó al nivel de aforo del balón se detuvo el cronómetro y el flujo. El procedimiento se repitió para los tres flujos seleccionados. Criterio de Aceptación: flujo 0,5 mL/min (0,469 a 0,531); 1,0 mL/min (0,968 a 1,032) y 5,0 mL/min (4,94 a 5,06).

### ALARMA DE PRESIÓN MÁXIMA

Se verificó que la bomba accionara la alarma al momento de que la presión superó el límite asignado. Se configuró el límite de presión de la bomba en 1000 psi, se colocó un tapón en la salida de la bomba y se incrementó el flujo de la bomba en 0,1 mL/min hasta que la presión alcanzó la presión límite establecida. Criterio de Aceptación: se acciona la alarma y se detiene el flujo en la bomba al superar el límite de presión de forma automática.

### GRADIENTE DE BOMBA

Se verificó que la mezcla de gradientes realizada por la bomba binaria estuviera dentro del intervalo: se conectó el detector UV a la salida de la bomba, se llenó el reservorio A con ácido sulfúrico 0,1 M y el reservorio B con una solución de dicromato de potasio 0,15 mM en ácido sulfúrico 0,1 M. Se guardó el método en el «*Method Editor*» del software del equipo, con la longitud de onda del detector en 257 nm, y el gradiente a 2 mL/min de la siguiente manera: tiempo (%A: %B): inicial-100:0; 2 min-0:100; 4 min-100:0; 6 min-90:10; 8-10 min-100:0 y sin flujo hasta 12 min-100:0. Después de realizada la corrida del método de gradiente, se realizaron los cálculos en base a la altura del pico cromatográfico. Criterio de aceptación: entre 9,5% y 10,5%.

### VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA

Los parámetros críticos estudiados en la validación del método analítico para la determinación de N-acetil-DL-triptófano en muestras de albúmina humana al 20% y los criterios de aceptación fueron: Especificidad (% de discrepancia) < 2%; Adecuación del sistema (desviación estándar relativa, DER)  $\leq$  2%; N (número de platos teóricos) > 5000; T (factor de asimetría) 0,8 a 2; Linealidad (rango) 80 al 160% -  $r^2$  (coeficiente de determinación) > 0,99; Exactitud (recuperación, %R) = 90 al 110; Precisión DER  $\leq$  2% y Robustez DER  $\leq$  2%; R (recuperación, %R) = 98 a 102; Influencia del Factor (IF) < |3|%. Los parámetros fueron establecidos de acuerdo a las recomendaciones de la USP 36, ICH 2005 y AEFI, 2001.

### MUESTRAS

Se utilizaron muestras de albúmina humana al 20% conteniendo 50 mL de volumen total y 10 g en contenido de proteína. Cada solución de albúmina contenía: 20 g de albúmina humana, 1,6 mmol de caprilato de sodio; 1,6 mmol de n-acetil-DL-triptófano y un contenido máximo de sodio de 16 mmol. Todas las muestras fueron utilizadas en fechas previas a su expiración.

### SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Las sustancias de referencias utilizadas en la validación del método analítico fueron; N-acetil-DL-triptófano marca Alfa Aesar (Massachusetts, USA), potencia 99,49%; N-acetil-DL-triptófano, estándar primario, 100%. Todas las sustancias de referencia fueron utilizadas en fechas previas a su expiración.

### MATRIZ

Solución de albúmina humana al 20% antes de ajustar los estabilizantes del proceso productivo.

### FASE MÓVIL

Se pesó 3,887 g de fosfato de sodio dibásico anhidro, 11,688 g de cloruro de sodio y 50 mg de azida de sodio, para la preparación de la solución A, se trasvasaron a un balón aforado de 1000 mL, luego se agregó agua para inyectables para disolver los sólidos y finalmente se llevó a volumen con agua para inyectables. Se pesó 1,741 g de fosfato de sodio monobásico monohidratado, 11,688 g de cloruro de sodio y 50 mg de azida de sodio, para la preparación de la solución B, se trasvasaron a un balón aforado de 1000 mL, luego se agregó agua para inyectables para disolver los sólidos y finalmente se llevó a volumen con agua para inyectables. Se añadió la solución B sobre la solución A hasta obtener un pH de 7,00 para la preparación de la fase móvil; se mezcló por agitación magnética y finalmente se filtró a través de una membrana de 0,45  $\mu$ m.

### SOLUCIÓN DE BICARBONATO DE SODIO AL 10%

Se pesó 10 g de bicarbonato de sodio, se transvasaron a un vaso de precipitado de 150 mL, seguidamente se agregaron 50 mL de agua caliente, se agitó hasta disolución completa, se dejó enfriar, luego se transvasó a un balón aforado de 100 mL y finalmente se llevó a volumen con agua para inyectables.

### CROMATOGRAFÍA

Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: fase móvil 100% isocrática, flujo 0,80 mL/min, Columna cromatográfica de exclusión molecular TSK-gel G3000SW marca Tosoh Bioscience (Ohio, USA), detector UV a 280 nm.

### ESPECIFICIDAD

Se pesó 102 mg de N-acetil-DL-triptófano, para la preparación del estándar secundario, luego se transvasó cuantitativamente a un balón aforado de 25 mL, se disolvió con solución de bicarbonato de sodio al 10% p/v, se mezcló hasta disolver y se completó a volumen (solución madre). Se tomó una alícuota 500  $\mu$ L

y se transvasó a un balón aforado de 100 mL y llevó a volumen con fase móvil (100% concentración de trabajo  $\pm 0,0828$  mM). Se procedió a inyectar las siguientes muestras, a fin de verificar que no se presentara ningún tipo de respuesta (interferencia) en el tiempo de retención del pico de interés (N-acetil-DL-triptófano): 3 inyecciones de Fase móvil; 3 inyecciones de Matriz (dilución 0,05 mL en 10 mL); 5 inyecciones de analito (estándar secundario) y 5 inyecciones de matriz más analito (dilución 0,50 mL de solución madre del estándar secundario y 0,50 mL de la matriz en 100 mL con fase móvil). Se procedió a calcular el porcentaje de discrepancia existente entre las respuestas del analito y la matriz más analito para determinar la presencia o ausencia de posibles interferencias, mediante la siguiente ecuación: % discrepancia =  $\frac{D_i - D_s}{D_s} \times 100$  donde:  $D_i$  = respuesta media con interferencia y  $D_s$  = respuesta media sin interferencia. La respuesta se tomó calculando las áreas del analito en ambos casos.

#### ADECUACIÓN DEL SISTEMA

Se realizó inyectando el estándar al 100%, en las condiciones de trabajo, cinco repeticiones y se calcularon los siguientes parámetros: desviación estándar relativa de las repeticiones, número de platos teóricos (N) y el factor de asimetría (T).

#### LINEALIDAD

Se tomó una alícuota de 500  $\mu$ L de la solución madre y se transvasó a un balón aforado de 100 mL y llevó a volumen con fase móvil (100% concentración de trabajo  $\pm 0,0828$  mM). Adicionalmente se prepararon soluciones al 80%, 120%, 140% y 160% de la concentración de trabajo tomando alícuotas de la solución madre para el análisis de linealidad. Se realizó una curva de calibración con 5 estándares, a 80%, 100%, 120%, 140% y 160%, por duplicado, de la concentración de trabajo ( $\pm 0,0828$  mM) y se evaluó el punto de corte, la pendiente y el coeficiente de correlación lineal.

#### PRECISIÓN

Se realizó analizando el estándar al 100% de concentración de trabajo para seis (6) repeticiones, se calculó la desviación estándar relativa de las seis repeticiones por analista (repetibilidad instrumental) y entre los analistas (precisión intermedia). Adicionalmente, el analista 1 inyectó en el sistema seis estándares al 100% por duplicado de manera de verificar la repetibilidad del método.

#### EXACTITUD

Se pesó 6,1600 g de N-acetil-DL-triptófano, luego fue transvasado cuantitativamente a un balón aforado

de 25 mL, se disolvió con solución de bicarbonato de sodio al 10% p/v, se mezcló hasta disolver y se completó a volumen (solución madre). Se tomó una alícuota 330  $\mu$ L de la solución madre y se transvasó a un balón aforado de 10 mL y se llevó a volumen con solución matriz sin estabilizantes para obtener la muestra al 80%. Adicionalmente, se tomó una alícuota de 1 mL de la solución madre y se transvasó a un balón aforado de 25 mL y llevó a volumen con matriz sin estabilizantes para obtener la muestra al 100%. Finalmente se tomó una alícuota 500  $\mu$ L de la solución madre y se transvasó a un balón aforado de 10 mL y llevó a volumen con matriz sin estabilizantes para obtener la muestra al 120% de la concentración de trabajo. Se inyectó muestras a tres concentraciones diferentes por triplicado (80%, 100% y 120%); utilizando la inyección del estándar de 100% por quintuplicado para los cálculos; se calculó el porcentaje de recuperación (R) en base a la concentración teórica o real por cada uno de los analistas involucrados. Siendo  $R = \frac{\text{concentración obtenida}}{\text{concentración real}} \times 100$ .

#### ROBUSTEZ

A continuación se muestran los factores y el diseño factorial completo de ocho experimentos ( $2^3$ ) utilizados para evaluar la influencia de tres factores de Plackett-Burman.

#### Factores

Factor		Variación	
		(-)	(+)
A	pH de la Fase Móvil	6,8	7,2
B	Flujo	0,7mL/min	0,9mL/min
C	Concentración de Sales	-5% de sales	+5% de sales

#### Diseño Factorial

	Factores			Interacciones			
	A	B	C	AB	AC	BC	ABC
1	-	-	-	+	+	+	-
2	+	-	-	-	-	+	+
3	-	+	-	-	+	-	+
4	+	+	-	+	-	-	-
5	-	-	+	+	-	-	+
6	+	-	+	-	+	-	-
7	-	+	+	-	-	+	-
8	+	+	+	+	+	+	+

Ejemplo: El experimento 1, se realizó tomando el valor menor (-) los factores A, B y C; obteniendo el resultado correspondiente. Se calculó el valor de factor de respuesta (R) para cada experimento.  $R = \frac{\text{Concentración obtenida}}{\text{Concentración Real}} \times 100$ . Influencia del Factor individual (IF): Ejemplo A =  $\frac{1}{4} (-R_1 + R_2 - R_3 + R_4 - R_5 + R_6 - R_7 + R_8)$ . Influencia de Interacción entre Factores (IF): Ejemplo: AB =  $\frac{1}{4} (+R_1 - R_2 - R_3 + R_4 + R_5 - R_6 - R_7 + R_8)$ .

## Resultados y discusión

### CALIFICACIÓN DE EQUIPO DE HPLC

#### EXACTITUD DE LONGITUD DE ONDA

La Tabla I muestra los valores de absorbancia obtenidos a las diferentes longitudes de onda estudiadas en el detector objeto del estudio.

**Tabla I**

#### Resultados de exactitud de longitud de onda

Longitud de onda (nm)	Valor de absorbancia (UA)
250	0,6168
251	0,6188
252	0,6220
253	0,6249
254	0,6277
255	0,6295
256	0,6298
257	0,6296
258	0,6284
259	0,6256
260	0,6233
261	0,6198

La longitud de onda de mayor respuesta fue 256 nm. La respuesta de exactitud de longitud de onda del detector cumplió con el criterio de aceptación.

#### LINEALIDAD

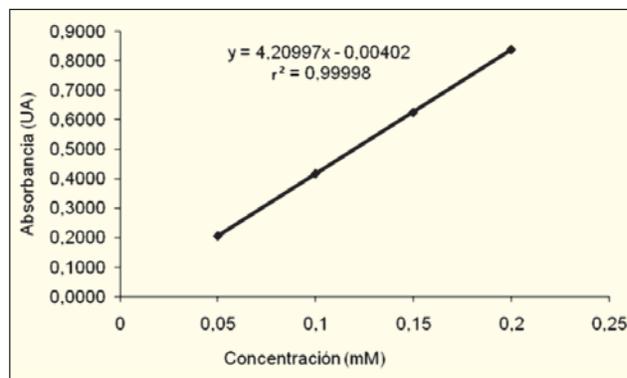
La Tabla II muestra los valores de absorbancia y sensibilidades obtenidas para las diferentes soluciones de dicromato de potasio en ácido sulfúrico 0,1 M. Así mismo, la Figura 1 muestra la línea de regresión obtenida.

**Tabla II**

#### Resultados de la linealidad

Conc* mM	Conc. Real mM	Abs			Promedio	Sensibilidad Abs/Conc.Real		
		1	2	3		1	2	3
0,05	0,04997	0,2062	0,2063	0,2062	0,2062	4,1265	4,1285	4,1265
0,1	0,09990	0,4176	0,4177	0,4175	0,4176	4,1802	4,1812	4,1792
0,15	0,14990	0,6252	0,6253	0,6254	0,6253	4,1708	4,1714	4,1721
0,2	0,19990	0,8383	0,8384	0,8384	0,8384	4,1936	4,1941	4,1941
Promedio sensibilidad						4,1682		
Coeficiente de variación						0,63%		

\*Concentraciones de dicromato de potasio con las siguientes concentraciones 0,05 mM; 0,10 mM; 0,15 mM y 0,20 mM en ácido sulfúrico 0,1 M.



**Figura 1. Linealidad del detector**

El coeficiente de determinación ( $r^2$ ) fue de 0,99998; el coeficiente de variación de la sensibilidad (Absorbancia/concentración real) fue de 0,63%. La respuesta del detector fue lineal y cumplió con el criterio de aceptación.

#### EXACTITUD DEL FLUJO

La Tabla III muestra los resultados de la exactitud de flujo de la bomba objeto de la calificación. El flujo de la bomba cumplió con el criterio de aceptación.

**Tabla III**

#### Resultados de la exactitud del flujo de la bomba

Flujo mL/min	Presión observada	Tiempo en minutos	Cálculo del flujo (mL/min)	Criterio de aceptación mL/min
0,5	53 psi	49,1	0,509	0,469 - 0,531
1	94 psi	24,77	1,009	0,968 - 1,032
5	302 psi	4,97	5,030	4,940 - 5,960

#### GRADIENTE DE LA BOMBA

Se encontró una desviación en el funcionamiento del detector. El mismo no saturó completamente. Por lo tanto, el flujo de 2 mL/min fue insuficiente para saturar el detector en el tiempo establecido. Como acción correctiva se aumentó el flujo de 2 mL/min a 4 mL/min para garantizar la saturación del detector UV y al flujo propuesto se obtuvo una buena saturación del detector en el tiempo de corrida. La Figura 2 muestra el cromatograma obtenido en la prueba de gradiente de la bomba estudiada. La Tabla IV muestra los resultados de la prueba de gradiente. Se concluyó que el gradiente de la bomba cumplió con el criterio de aceptación.

#### VALIDACIÓN

#### ESPECIFICIDAD

La Figura 3 muestra los cromatogramas de la fase móvil utilizada, matriz de la muestra, analito y matriz más analito.

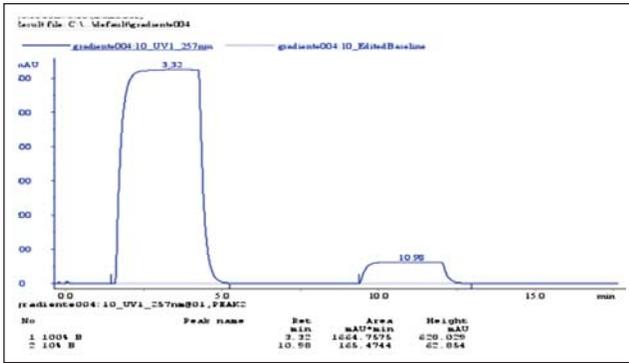


Figura 2. Cromatograma del gradiente de la bomba.

Tabla IV  
Resultados prueba de gradiente

Válvula	Altura de pico		Porcentaje de Altura (%)	Criterio de aceptación (%)
	100% B	A:B (90:10)		
A:B	628029	62854	10,01	9,5 - 10,5

Tabla V

Resultados de la especificidad

Prueba	Muestra	Relación de Áreas de las inyecciones					Promedio	DER (%)
		1	2	3	4	5		
3	Análito	655162	655558	661970	663787	664787	660253	0,69
4	Matriz + Análito	659852	657601	659088	662861	665697	661020	0,49

No se presentaron interferencias de otras sustancias en el tiempo de retención del N-acetil-DL-triptófano (16,5 min). El porcentaje de discrepancia encontrado fue de 0,12% (Tabla V).

ADECUACIÓN DEL SISTEMA

La Tabla VI muestra los resultados de la adecuación del sistema en términos de número de platos teóricos y factor de asimetría así como los valores de tiempo de retención y áreas para las réplicas estudiadas.

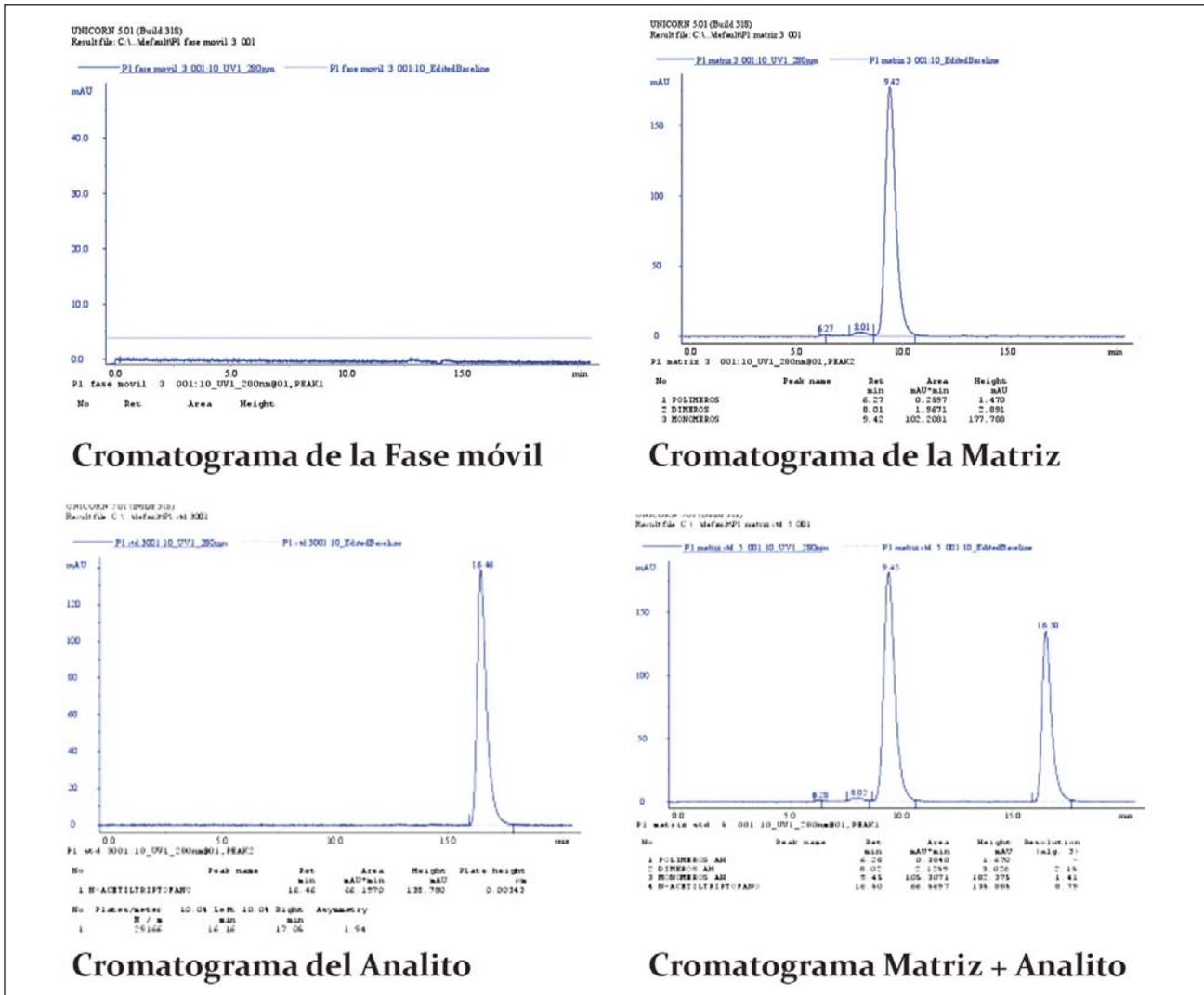


Figura 3. Cromatogramas de fase móvil utilizada, matriz de la muestra, analito y matriz más analito.

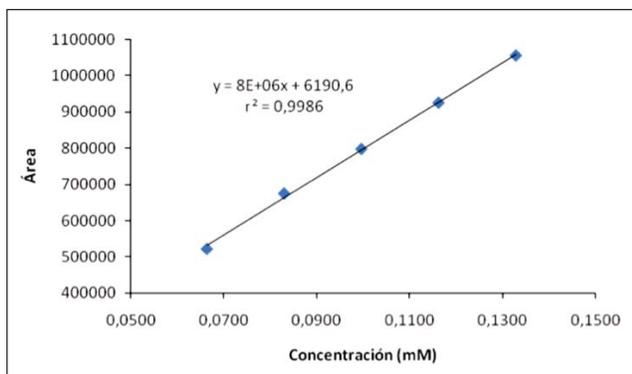
**Tabla VI**  
**Resultados de adecuación del sistema**

Nº de Réplica	Área	Tiempo de retención	Platos teóricos (N)	Factor de asimetría
1	655162	16,50	8742	1,89
2	655558	16,46	8700,6	1,92
3	661970	16,46	8749,8	1,94
4	663787	16,48	8598,3	1,91
5	664787	16,49	8628,3	1,9
X	660253	16,48	<b>8684</b>	<b>1,91</b>
DE	4581,367	0,018	67,853	0,019
DER (%)	<b>0,69</b>	0,110	0,78	1,01

La desviación estándar relativa de las áreas de las cinco inyecciones fue de 0,69%, el promedio de los platos teóricos (N) fue de 8684 y el promedio del factor de asimetría dio como resultado un valor de 1,91. Se concluyó que el sistema cromatográfico fue adecuado para la determinación de N-acetil-DL-triptófano por HPLC.

#### LINEALIDAD

La Figura 4 muestra los resultados de los valores del estudio de la linealidad del método analítico. Se obtuvo una línea de regresión igual a  $y = 8E+06x + 6190,6$  con un valor de  $r^2 = 0,9986$ . Se concluyó que el método analítico fue lineal en el rango de trabajo evaluado.



**Figura 4. Curva de linealidad del método analítico.**

#### PRECISIÓN

La Tabla VII muestra los resultados del estudio de precisión en términos de repetibilidad instrumental y la Tabla VIII muestra los resultados de la repetibilidad del método instrumental. La desviación estándar relativa obtenida en la repetibilidad instrumental para el analista 1 fue de 0,32%. La desviación estándar relativa obtenida en la repetibilidad del método fue de 0,59%. Se concluyó entonces que el método analítico

co fue preciso. La desviación estándar relativa de los analistas 1 y 2 fue de 0,32% y 0,17% respectivamente. La precisión intermedia estuvo conforme con la intención con la que fue diseñado el método analítico. El analista 1 obtuvo valores de desviación estándar relativa (DER) de 0,59% como repetibilidad del método para las diferentes soluciones de estándares.

**Tabla VII**  
**Resultados de la precisión y repetibilidad instrumental**

Analista	Áreas						Promedio	DER
	1	2	3	4	5	6		
1	657159	662016	659760	659431	657903	656046	658719,2	0,32
2	638746	640095	641225	641712	641277	640441	640582,7	0,17
	Precisión intermedia						Promedio	0,25

**Tabla VIII**  
**Resultados de la precisión y repetibilidad del método instrumental**

Estándar No	Conc. (mM)	Áreas		Promedio	DER (%)	Área/Conc.
		1	2			
1	0,0858	687362	689508	688435	0,22	8024046
2	0,0819	651261	652615	651938	0,15	7958355
3	0,0818	661117	654230	657674	0,74	8044236
4	0,0812	647209	644948	646079	0,25	7957455
5	0,0889	702237	705325	703781	0,31	7919538
6	0,0850	679241	681105	680173	0,19	8003107
					Promedio	7984456
					DER (%)	0,59

#### EXACTITUD

Las Tablas IX y X muestran los resultados de los estudios de exactitud realizados por los analistas 1 y 2 respectivamente. Los factores de respuesta (porcentaje de recuperación) de las diferentes concentraciones de muestras del analista 1 se encontraron dentro del criterio de aceptación. Los resultados de los factores de respuesta (porcentaje de recuperación) obtenidos por los dos analistas fueron 99,55% y 100,18% respectivamente. El promedio del factor de respuesta de los 2 analistas fue de 99,87% y DER 0,95%. Se concluyó que el método analítico presentó una exactitud dentro de los parámetros establecidos.

#### ROBUSTEZ

La Tabla XI muestra los resultados del estudio de robustez después de incorporar cambios deliberados a los parámetros seleccionados. Se obtuvo valores de influencia (IF) menores al 1%. Se concluyó que el método analítico permaneció sin alteraciones después de incorporar estos cambios.

**Tabla IX**  
**Resultados de la exactitud para el analista 1**

Analista	Muestra	Conc. (mM)	Áreas			Concentración obtenida				R
			1	2	3	1	2	3	Promedio	
	80%	0,0813	636935	627682	644689	0,08089	0,07971	0,08187	0,080825	99,42
	100%	0,0986	757349	773594	762862	0,09618	0,09824	0,09688	0,097102	98,48
1	120%	0,1232	984809	973990	973778	0,12507	0,12369	0,12367	0,124142	100,76
									Promedio	99,55
									DER (%)	1,15

**Tabla X**  
**Resultados de exactitud para el analista 2**

Analista	Muestra	Conc. (mM)	Áreas			Concentración obtenida				R
			1	2	3	1	2	3	Promedio	
	80%	0,0813	637281	636762	637122	0,08098	0,08091	0,08096	0,080952	99,57
	100%	0,0986	785971	796322	770735	0,09987	0,10119	0,09794	0,099668	101,08
2	120%	0,1232	976805	973737	954964	0,12412	0,12373	0,12135	0,123069	99,89
									Promedio	100,18
									DER (%)	0,79

**Tabla XI**  
**Influencia de los factores en la robustez**

Factor	Influencia (%) (<  3  %)	Resultado
A	0,11	CONFORME
B	0,17	CONFORME
C	0,55	CONFORME
AB	0,34	CONFORME
AC	0,25	CONFORME
BC	0,08	CONFORME
ABC	0,06	CONFORME

Nuestros resultados demuestran que el equipo de cromatografía líquida de alta resolución utilizado para la determinación de N-acetil-DL-triptófano, estabilizante térmico del producto inyectable albúmina humana al 20%, mostró el cumplimiento de las especificaciones de diseño sobre el rango de operación. Se consideró el equipo calificado operacionalmente. Así mismo, se demostró que la metodología analítica estudiada para la determinación de N-acetil-DL-triptófano por HPLC fue adecuada para determinar su concentración en las muestras evaluadas de albúmina humana al 20%. Por ello se consideró validado el método analítico.

### Referencias bibliográficas

Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, 2001. Validación de Métodos Analíticos. Barcelona: Monografías de la AEFI.

Chan C. 2004. Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Incorporated: 153-179.

Cohn EJ, Oncley JL, Strong LE, Hughes WL Jr, Armstrong SH Jr. 1944. Chemical, clinical, and immunological studies on the products of human plasma fractionation. I. The characterization of the protein fractions of human plasma J Clin Invest 23(4): 417-432.

Fang L, Parti R, Hu P. 2011. Characterization of N-acetyltryptophan degradation products in concentrated human serum albumin solutions and development of an automated high performance liquid chromatography-mass spectrometry method for their quantitation. J Chromatogr A 1218 (41): 7316-7324.

ICH. 1996. Guidance for Industry Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration.

ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2(R1). Current Step 4 Version. November 2005.

Inoue S, Tokuyama T, Takai K. 1983. Picomole Analyses of Tryptophan by Derivatization to 9-hydroxymethyl-B-Carboline. Anal Biochem 132(2):468-480.

Jaworska M, Cygan P, Wilk M, Anuszevska E. 2009. Capillary Electrophoresis with Indirect UV Detection for the Determination of Stabilizers and Citrates Present in Human Albumin Solutions. J Pharm Biomed Anal 50 (1):90-95.

Jones AJS. 1993. Analysis of polypeptides and proteins. Review Article. Adv Drug Deliv Rev 10(1): 29-90.

Luo Y, Matejic T, Ng C-K, Nunnally B, Porter T, Raso S, Rouse J, Shang T, Steckert J. 2011. Characterization and Analysis of Biopharmaceutical Proteins. En: Satinder A., Stephen S., editors. Sep. Sci Technol. Vol. 10. San Diego, CA, USA: Academic Press; pp. 283-359. Capítulo 8.

- Nelis HJ, Lefevere MF, Baert E, D'Hoore W, De Leenheer AP. 1985. Chromatographic determination of N-acetyl-DL-tryptophan and octanoic acid in human albumin solutions. *J Chromatogr* 333(2):381-387.
- Quimbiotec CA. 2005. Gerencia de Comercialización, Dirección Médica: Monografía Albúmina Humana al 20%.
- Reuge C. 1986. Determination of N-acetyl tryptophan in albumin solutions. Use of a F.P.L.C. Method. *Rev Fr Transfus Immunohematol* 29(6):495-8.
- The United States Pharmacopeia (USP) 36, NF 31. 2013. The United States Pharmacopeia Convention. National Publishing. Philadelphia: USA.
- Utrera M, Estévez M. 2012. Analysis of tryptophan oxidation by fluorescence spectroscopy: effect of metal-catalyzed oxidation and selected phenolic compounds. *Food Chem* 135(1):88-93.
- Vita R. 2003. Laboratory Validation. Davis Horwood International Publishing, LLC, Godalming, Surrey, UK. 581-607.
- Wong WS, Osuga DT, Burcham TS, Feeney RE. 1984. Determination of tryptophan as the reduced derivative by acid hydrolysis and chromatography. *Anal Biochem* 143(1):62-70.
- Yu MW, Finlayson JS. 1984. Quantitative determination of the stabilizers octanoic acid and N-acetyl-DL-tryptophan in human albumin products. *J Pharm Sci* 73(1): 82-86.