

## Development and validation of enzymatic method for the determination of alcohol in immunoglobulin and albumin

Carrillo-Cabrera D<sup>1</sup>, González-Farah A<sup>1</sup>, Rodríguez-Bernal J<sup>1</sup>, Suárez-Pérez Y<sup>2</sup>,  
Fernández-Cervera M<sup>2\*</sup>, Veliz Rivera J<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Master en Ciencias Farmacéuticas. Empresa Planta de Sueros y Productos Hemoderivados (EPSH) “Adalberto Pessan González”

<sup>2</sup> DraC. Ciencias Farmacéuticas. Profesora Titular, IFAL

<sup>1</sup> Téc. Empresa Planta de Sueros y Productos Hemoderivados (EPSH) “Adalberto Pessan González”

Email: [mirnafc@uh.cu](mailto:mirnafc@uh.cu); [mirnafc@yahoo.com](mailto:mirnafc@yahoo.com)

---

### RESUMEN

Se desarrolló y validó un método enzimático para la cuantificación del contenido de alcohol en los IFAs de Inmunoglobulina y Albúmina. En ambos casos el procedimiento analítico resultó lineal, exacto, preciso y específico para el control de calidad. Se demostró que el método fue lineal en el rango de 6.0 a 19.0 mg de alcohol/g de proteína para la albúmina y de 9.2 a 27.6 mg de alcohol/g de proteína para la inmunoglobulina, respectivamente. El método sugerido se aplicó con éxito en la determinación del contenido de alcohol como impureza en lotes industriales.

**PALABRAS CLAVE:** inmunoglobulina, método enzimático, albúmina, validación de métodos analíticos, contenido de alcohol.

### ABSTRACT

An enzymatic method for the quantification of alcohol content in immunoglobulin and albumin was developed and validated. In both materials, the analytical procedure was linear, accurate, precise and specific. The method was linear in the range from 6.0 to 19.0 mg of alcohol/g of protein to albumin and to immunoglobulin from 9.2 to 27.6 mg of alcohol/g of protein, respectively. The proposed method was applied successfully in industrial batches for the determination of the alcohol content as impurity.

**KEYWORDS:** immunoglobulin, albumin, enzymatic method, analytical method validation, alcohol content.

---

## INTRODUCCIÓN

Las inmunoglobulinas son proteínas químicamente relacionadas que poseen función de anticuerpo, siendo su síntesis y excreción en la sangre y fluidos corporales, el resultado de procesos específicos de actividad antigénica en los órganos linfoides. La utilización de inmunoglobulinas humanas polivalentes de título sustitutivo, ha representado un gran progreso en la lucha contra el déficit inmunitario sérico, así como en la profilaxis o terapéutica<sup>1-3</sup>.

La albúmina es una proteína globular formada por una simple cadena polipeptídica, a la cual se le han conferido dos funciones fundamentales: regulación de la presión coloidosmótica y transporte de moléculas en la sangre. Desde el punto de vista fisiológico, la albúmina es considerada una proteína multifuncional siendo muy significativo su elevado efecto coloidosmótico<sup>4,5</sup>.

El fraccionamiento de las proteínas plasmáticas es una operación compleja, ya que estas pueden ser alteradas irreversiblemente por el calor, ácidos o bases fuertes y otros agentes desnaturizantes. Por ello, si se quieren separar y purificar sin cambios, solamente se pueden emplear algunos procedimientos. Algunas de estas proteínas, solo presentan pequeñas diferencias moleculares entre ellas, otras se encuentran en cantidades ínfimas o, por sus características de solubilidad, tienden a permanecer en las interfases.

La solubilidad de las proteínas depende de la constante dieléctrica del medio, que puede disminuirse añadiendo un solvente orgánico miscible en agua, por ejemplo etanol el cual opera sobre la fuerza iónica, y que constituye el principio en que se basa el método de fraccionamiento alcohólico de Cohn<sup>6</sup>. El etanol es muy ventajoso porque inhibe el crecimiento bacteriano y por tanto impide la liberación de pirógenos.

Para la obtención de las pastas de Albúmina e Inmunoglobulina, y a partir de estas los liofilizados, se emplea etanol como solvente en el proceso de fraccionamiento, por lo que es necesario disponer de una técnica que permita cuantificar esta impureza presente en los Ingredientes Farmacéuticos Activos (IFAs). La inclusión de estas estimaciones forma parte de las exigencias más actuales, por el riesgo o daño potencial que para los pacientes implica la presencia de este compuesto.

Las diferentes Farmacopeas<sup>7-9</sup>, no establecen ningún método para determinar concentración de alcohol en estos IFAs por lo que a través de este trabajo se desarrolló una técnica enzimática con esta finalidad.

La validación de un método analítico es el proceso establecido por los estudios de laboratorio para garantizar el cumplimiento de una serie de requisitos indispensables para la futura aplicación analítica del método. Es necesaria porque proporciona un alto grado de confianza y seguridad del proceso productivo, o del método analítico, así como también en la calidad de los resultados. Estos requisitos son expresados en términos de parámetros analíticos<sup>9-11</sup>.

El objetivo del presente estudio es desarrollar un método enzimático preciso, específico, exacto y lineal para la determinación del contenido de alcohol como impureza en los IFAs albúmina e inmunoglobulina.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### *Productos químicos y reactivos*

Inmunoglobulina Humana Liofilizada (Lote: 7021) y Albúmina Humana Liofilizada (Lote: 7006) suministradas por la Empresa Planta de Sueros y Productos Hemoderivados (EPSH, Cuba). Kit comercial para la determinación de concentración de proteínas, Precinorm U (Roche Diagnostics, Alemania), kit de alcohol en sangre (Tampón, NAD, ADH) (Randox Laboratory LTD, Inglaterra). El resto de los reactivos y soluciones fueron de calidad analítica.

### *Preparación de las muestras de ensayo*

Las muestras de Inmunoglobulina y Albúmina Humana Liofilizada se prepararon al 10% (m/v). Se pesaron 5g de cada muestra de ensayo individualmente y se restituyeron en aproximadamente 35 mL de agua destilada. Luego las muestras se trasvasaron a volumétricos de 50 mL, se completó volumen con agua destilada y se homogenizaron con agitación suave para evitar la formación de espuma.

### *Método de determinación de alcohol en los IFAs*

Se utilizó la técnica descrita por el fabricante (Randox Laboratory LTD, Inglaterra) para cuantificar alcohol en los IFAs al 10%, para la cual se prepararon los patrones, el blanco y la muestra según la composición declarada en la Tabla I. Una vez preparadas las mezclas se homogenizaron, se taparon e incubaron en un baño de agua termostataado (MP 13, Julabo, Alemania) a  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$  durante 25 minutos. El ensayo se realizó por triplicado para cada caso. Los valores de absorbancia y concentración (CL) se obtienen directamente al aplicar para el procesamiento de los datos el software Espectramanager (Roche Diagnostics, Alemania) a una longitud de onda de 340 nm. La absorbancia de las soluciones fue determinada en un espectrofotómetro UV-VIS V-530, Jasco, Japón.

La concentración de Alcohol (CA) expresada en mg alcohol / g proteínas se determinó a través de la siguiente expresión:

$$CA = \frac{CL \times 100}{P}$$

Donde: CL: Concentración de alcohol estimada (mg/mL), P: Concentración real de proteínas en la muestra (g/100mL), 100: Factor matemático para el cálculo.

**Tabla 1.** Preparación de blanco, patrón y muestra

	Reactivo blanco	Patrones	Muestra
Solución 1 (Tampón)	4,80 mL	4,80 mL	4,80 mL
Solución 2 (NAD)	0,10 mL	0,10 mL	0,10 mL
Agua bidestilada	0,01 mL	---	---
Soluciones patrones	---	0,01 mL	---
Muestras	---	---	0,01 mL
Solución 3 (ADH)	0,02 mL	0,02 mL	0,02 mL

### **Validación del método de determinación de alcohol en los IFAs**

El método se validó para la cuantificación de contenido de alcohol como impureza, teniendo en cuenta los parámetros exigidos<sup>9</sup> para la categoría II.

#### ***Linealidad del sistema***

Se llevó a cabo construyendo curvas de calibración de absorbancia contra concentración en el rango comprendido entre el 50% y el 150%. El análisis se realizó por triplicado para cada nivel de concentración. Los resultados se procesaron estadísticamente a través del paquete STATISTICA for Windows versión 6.01 (opción regresión lineal múltiple) y se determinó: r (coeficiente de correlación lineal), r<sup>2</sup> (coeficiente de determinación), a (intercepto) y b (pendiente), para un 95% de confianza.

#### ***Exactitud***

Para este parámetro se construyeron curvas de recuperación de concentración obtenida (Y) contra concentración teórica (X) a una longitud de onda de 340 nm. El análisis se realizó por triplicado para tres niveles de concentración equivalentes a 50, 100 y 150%. Se aplicaron los mismos criterios estadísticos que para la linealidad del sistema calculándose el porcentaje de recuperación ( $\mathcal{R}$ ) y el coeficiente de variación (CV) total. Se realizó la prueba G de Cochran, para determinar si el factor de concentración tiene alguna influencia en los resultados. Por último se aplicó la prueba t de Student para demostrar que no existían diferencias significativas entre el valor medio de recuperación obtenido y el 100%.

#### ***Precisión***

##### ***Repetibilidad***

Se evaluaron tres niveles de concentraciones: bajo (75%), medio (100%) y alto (125%) comprendidos dentro del rango de linealidad del sistema. Las determinaciones se realizaron por triplicado, por el mismo analista y bajo idénticas condiciones de trabajo. Se procedió a estimar el valor del CV para cada nivel de concentración.

##### ***Precisión intermedia***

Participaron dos analistas, en dos días diferentes, en el mismo laboratorio. Se analizaron por triplicado, los tres niveles de concentración descritos en la repetibilidad. Se calculó el CV total. Se realizó la Prueba F de Snedecor para determinar si existían diferencias significativas entre los resultados de los analistas que emplearon el mismo método y entre los días en que se realizaron los análisis. Además, la Prueba de t de Student para comprobar si los valores obtenidos entre los analistas, que emplearon igual método, y los dos días en que realizaron los análisis eran homogéneos, para el nivel de significación  $\alpha = 0,05$ .

##### ***Especificidad***

Se prepararon placebos de los IFAs en estudio los que se procesaron por triplicado mediante el método propuesto. Se compararon los porcentajes de recuperación (R) obtenidos en los placebos con los obtenidos en las muestras preparadas al 100%. Además se realizaron y compararon espectros de absorción de 190 a 600 nm a los placebos, a las muestras y al patrón de alcohol.

**Límite de cuantificación y de detección**

La evaluación de estos parámetros se realizó estimando el límite de cuantificación (Lc) y el límite de detección (Ld)<sup>12</sup>. Para ello se trabajaron con diferentes concentraciones; 20, 30 y 40% equivalentes a 3.68; 5.53 y 7.37 mg/g para Inmunoglobulina y de 2.47; 3.71 y 4.92 mg/g para Albúmina.

Para realizar la comprobación experimental de los límites de cuantificación calculados anteriormente, se analizaron por triplicado placebos cargados con concentraciones equivalentes a 5.79 mg/g para Inmunoglobulina y 5.46 mg/g para Albúmina. Se determinó ( $\mathcal{R}$ ) y la desviación estándar (DS) en cada caso.

**Rango**

Se estableció el intervalo en que se cumplen los criterios de linealidad, exactitud y precisión.

**Control de calidad de lotes industriales de Inmunoglobulina y Albúmina**

Se llevó a cabo la cuantificación de alcohol a partir del método propuesto una vez validado. Se analizaron 50 lotes industriales consecutivos en el período de 2004 - 2005. Se aplicó el programa Statgraphics Plus 5.1 (Statistical Graphics Corp., EUA), y se obtuvieron los gráficos de dispersión y de caja y puntilla que muestran la distribución de los resultados obtenidos.

**Tabla 2:** Resultados de la Linealidad del sistema para la Inmunoglobulina.

X Concentración teórica (%)	Absorbancia a 340 nm	Concentración experimental		f
		mg alcohol / g proteína	Y (%)	
50	0,0887	9,32	50,57	1,01
	0,0877	9,21	50,00	1,00
	0,0878	9,23	50,06	1,00
75	0,1350	13,66	74,12	0,98
	0,1391	14,12	76,61	1,02
	0,1350	13,66	74,12	0,99
100	0,1741	18,40	99,84	0,99
	0,1751	18,52	100,49	1,00
	0,1766	18,36	99,62	0,99
125	0,2190	23,02	124,93	0,99
	0,2186	22,98	124,69	0,99
	0,2188	23,00	124,80	0,99
150	0,2628	27,63	149,92	0,99
	0,2626	27,61	149,81	0,99
	0,2624	27,59	149,70	0,99
				f=0,999 Sf=0,008 CV=0,769%

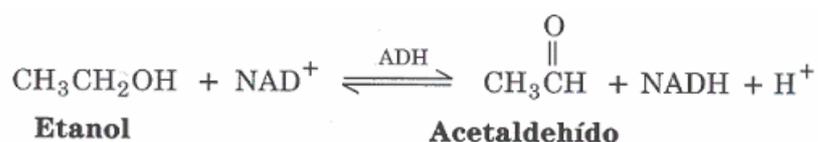
**Tabla 3:** Resultados de la Linealidad del sistema para la Albúmina.

X Concentración teórica (%)	Absorbancia a 340 nm	Concentración experimental		f
		mg alcohol / g proteína	Y (%)	
50	0,0641	6,05	48,90	0,97
	0,0644	6,08	49,10	0,98
	0,0665	6,28	50,70	1,01
75	0,0981	9,26	74,08	0,99
	0,0983	9,29	75,01	1,00
	0,0982	9,27	74,88	0,99
100	0,1310	12,37	99,92	0,99
	0,1311	12,38	100,00	1,00
	0,1313	12,40	100,15	1,00
125	0,1638	15,47	124,97	0,99
	0,1642	15,51	125,28	1,00
	0,1637	15,46	124,89	0,99
150	0,1965	18,56	149,90	0,99
	0,1981	18,71	151,10	1,00
	0,2003	18,92	152,80	1,01
				f=0,999 Sf=0,010 CV=1,009%

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El etanol es un disolvente empleado en el proceso de fraccionamiento del plasma, por lo que resulta vital su cuantificación en las muestras como residuo de disolvente volátil.

Frank Westheimer y Birgit Vennessland demostraron la estereoespecificidad de las enzimas en las reacciones que catalizan, a partir de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) de la levadura. La enzima cataliza la interconversión de etanol y acetaldehído de acuerdo con la siguiente reacción<sup>13</sup>:



El método de determinación de la concentración de alcohol en los IFAs, es un método enzimático y se basa en la oxidación del alcohol en sangre a acetaldehído utilizando la enzima ADH. Para que ocurra la reacción enzimática las mezclas se deben incubar en un baño de agua termostataado durante 25 minutos. Una vez transcurrido el tiempo para que se complete la reacción se cuantifica el correspondiente aumento de NADH espectrofotométricamente a 340 nm.

En las Tablas 2 y 3 se resumen los resultados experimentales obtenidos para la Linealidad del

sistema en las Inmunoglobulinas y Albúmina, respectivamente. El procesamiento estadístico de estos datos (Tabla 4), ilustra resultados satisfactorios, ya que se demuestra el cumplimiento de todos los criterios de aceptación establecidos. Las ecuaciones en los dos casos tuvieron elevados coeficientes de correlación lineal y de determinación. Estos resultados avalan la proporcionalidad existente entre la absorbancia y la concentración del analito en el rango analizado.

**Tabla 4.** Resultados del procesamiento estadístico de los resultados de la Linealidad del sistema para Inmunoglobulina y Albúmina.

Parámetros	Inmunoglobulina	Albúmina	Criterios
Ecuación recta r r <sup>2</sup>	y = 0,0094x + 0,0031 r = 0,9995 r <sup>2</sup> = 0,9989	y = 0,0106x + 0,00004 r = 1,0000 r <sup>2</sup> = 1,0000	y = bx+a r ≥ 0,99 r <sup>2</sup> ≥ 0,98
Significación del intercepto t <sub>exp</sub> t <sub>tab</sub>	n = 13 1,88 2,16	n = 13 2,07 2,16	t <sub>exp</sub> < t <sub>tab</sub> no significativo
Pendiente b t p	0,0094 112,678 0,0000	0,0106 6354,77 0,0000	b ≈ 1 t alta, significativa p << 0,05

Al comparar los valores de t<sub>tab</sub> y t<sub>exp</sub> para un 95% de confianza, se observa que las intercepciones no difieren significativamente del origen. Las pendientes no fueron diferentes de la unidad, pues el valor de la probabilidad (p) fue mucho menor que 0.05 establecido como límite superior para la hipótesis nula de la pendiente. Las Tablas 2 y 3 reflejan los valores de los factores de respuesta (f) para cada muestra analizada a partir de los cuales se calculó el valor medio de  $\bar{f}$  para cada uno de los IFAs. En este parámetro se estipula como límite superior un CV ≤ 5.0 % por lo que se demuestra el cumplimiento de todos los criterios de aceptación para la linealidad del sistema en ambas matrices.

Para evaluar el parámetro exactitud se determinó el porcentaje de recuperación de los puntos equivalentes a tres niveles de concentración (Tablas 5 y 6). El procesamiento estadístico (Tabla 7) demostró el cumplimiento de todos los criterios exigidos según la regresión lineal aplicada. El coeficiente de recuperación medio quedó dentro del límite permitido (97-103%). Es de destacar, que a pesar de la complejidad de las muestras, ya que son productos biológicos, todas las recuperaciones fueron superiores al 97%. El CV total para cada muestra fue inferior al 3.0%, por lo que se puede considerar el método exacto. Adicionalmente se evaluó la influencia de la concentración de analito en la varianza (S) de los resultados a través de la Prueba G de Cochran (Tabla 7).

**Tabla 5:** Resultados de la Exactitud del método para la Inmunoglobulina.

Concentración Teórica (%)	Absorbancia	Concentración experimental (%)	R (%)	CV (%)
50	0,0887	50,60	101,20	0,628
	0,0877	50,03	100,06	
	0,0888	50,08	100,16	
100	0,1741	99,89	99,89	0,452
	0,1751	100,54	100,54	
	0,1766	99,67	99,67	
150	0,2628	150,00	100,00	0,073
	0,2626	149,89	99,93	
	0,2624	149,78	99,85	
<b>Criterio</b>	-	-	<b>97 - 103</b>	<b>≤ 3,0</b>

**Tabla 6:** Resultados de la Exactitud del método para la Albúmina

Concentración Teórica (%)	Absorbancia	Concentración experimental (%)	R (%)	CV (%)
50	0,0641	48,90	97,80	1,990
	0,0644	49,10	98,20	
	0,0665	50,70	101,40	
100	0,1310	99,92	99,92	0,117
	0,1311	100,00	100,00	
	0,1313	100,15	100,15	
150	0,1965	149,90	99,93	0,963
	0,1980	151,10	100,73	
	0,2003	152,80	101,87	
<b>Criterio</b>	-	-	<b>97 - 103</b>	<b>≤ 3,0</b>

**Tabla 7.** Resultados del procesamiento estadístico para la Exactitud del método

Resultados		Criterio de aceptación
Inmunoglobulinas	Albúmina	
$y = 0,9965x + 0,4$ $r = 0,9999$ $r^2 = 0,9999$ $t_{exp} = 1,51 < t_{tab}$ $(\alpha = 0,05, n = 7)$	$y = 1,017x - 1,4144$ $r = 0,9998$ $r^2 = 0,9996$ $t_{exp} = 1,66 < t_{tab}$ $(\alpha = 0,05, n = 7)$	$y = bx + a$ $r \geq 0,99$ $r^2 \geq 0,98$ $t_{exp} < t_{tab} (2,36)$ no significativo

$b = 0,9965$ $t = 405,377$ $p = 0,0000$ $R_{total} = 100,144\%$ $CV_{total} = 0,463\%$ $G_{exp} = 0,3535$ $G_{tab} = 0,8709$ $t_{exp} = 0,02 < t_{tab}$	$b = 1,017$ $t = 128,961$ $p = 0,0000$ $R_{total} = 100,0004\%$ $CV_{total} = 1,327\%$ $G_{exp} = 0,3632$ $G_{tab} = 0,8709$ $t_{exp} = 0,0002 < t_{tab}$	$b \approx 1$ $t$ alta $p \ll 0,05$ $R_{total} = 97-103\%$ $CV_{total} \leq 3,0\%$ <b>Test de Cochran</b> $G_{exp} < G_{tab} \alpha=0,05 k=3 n=3$ <b>Test t Student</b> $t_{exp} < t_{tab} (12,71)$
--	--	---

Como la  $G_{exp} < G_{tab}$ , las varianzas de los tres niveles de concentración evaluados en la Inmunoglobulina y la Albúmina, fueron equivalentes, es decir, no influyó el factor concentración en la variabilidad de la respuesta medida. El conjunto de estos resultados confirman la exactitud del método. Por otra parte, el test de t Student corroboró la exactitud, ya que los valores de t obtenidas para cada muestra fueron inferiores a las tabuladas, por lo que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre la recuperación media y el 100%. De este modo se puede afirmar que la técnica fue exacta y no se afectó por errores sistemáticos de forma significativa, por lo que permite obtener valores experimentales muy próximos al valor verdadero, para el análisis del contenido de alcohol en los IFAs.

Para la repetibilidad del método, se estimó el CV para tres niveles de concentración: bajo, medio y alto. Según la Tabla 8 en todos los casos los CV reportados fueron inferiores al límite superior de 3.0%. Por lo que el método cumple con los criterios de aceptación establecidos y es suficientemente repetible.

**Tabla 8.** Resumen del procesamiento estadístico para la repetibilidad del método

Concentración (%)	Inmunoglobulina			Albúmina		
	$\bar{X}$	S	CV (%)	$\bar{X}$	S	CV (%)
75%	13,81	0,27	1,92	9,27	0,01	0,14
100%	18,43	0,08	0,45	12,38	0,01	0,12
125%	23,00	0,02	0,10	15,48	0,03	0,16

La precisión intermedia también fue evaluada, dando resultados satisfactorios. Se aprecia en ambos casos valores de  $CV \leq 3.0\%$  establecido como límite, estimados a partir de las mediciones de absorbancia a 340 nm. El análisis en ambas muestras se complementó con los test de Fischer y t de Student (Tablas 9 y 10). En ambos análisis la  $F_{exp} < F_{tab}$  por lo que no existieron diferencias significativas entre las precisiones de los analistas, independientemente del día en que se efectuó el ensayo. Los valores de las  $t_{exp}$  resultaron menores que las  $t_{tab}$  en

cada caso, no existiendo diferencias significativas entre las medias obtenidas por los analistas. El cumplimiento de los criterios de aceptación para los parámetros Repetibilidad y Precisión Intermedia demuestra la precisión del método para cuantificar alcohol, por lo que puede ser aplicado al control de calidad de los IFAs, sin influencia significativa de los errores aleatorios.

**Tabla 9:** Resultados de la precisión intermedia para la Inmunoglobulina

Días	75%		100%		125%	
	Analista 1 mg/g	Analista 2 mg/g	Analista 1 mg/g	Analista 2 mg/g	Analista 1 mg/g	Analista 2 mg/g
Día 1	14,55	14,28	18,21	18,29	23,13	23,42
	14,46	14,44	18,31	18,26	23,35	23,40
	14,72	14,67	18,67	18,52	23,45	23,41
Día 2	15,17	14,34	18,33	18,23	22,92	23,35
	14,34	14,48	19,25	18,44	23,29	22,75
	14,48	15,52	18,47	19,21	23,15	23,13
CV (%)	2,52		1,94		0,95	
Fischer(F) y Student(t) entre días	$F_{exp} = 4,98 < F_{tab} = 5,05$ $t_{exp} = 0,286 < t_{tab} = 2,23$		$F_{exp} = 4,60 < F_{tab} = 5,05$ $t_{exp} = 0,452 < t_{tab} = 2,23$		$F_{exp} = 4,91 < F_{tab} = 5,05$ $t_{exp} = 0,823 < t_{tab} = 2,23$	
Fischer(F) y Student(t) entre analistas	$F_{exp} = 0,42 < F_{tab} = 5,05$ $t_{exp} = 0,005 < t_{tab} = 2,23$		$F_{exp} = 1,07 < F_{tab} = 5,05$ $t_{exp} = 0,156 < t_{tab} = 2,23$		$F_{exp} = 0,51 < F_{tab} = 5,05$ $t_{exp} = 0,151 < t_{tab} = 2,23$	

**Tabla 10:** Resultados de la precisión intermedia para la Albúmina

Días	75%		100%		125%	
	Analista 1 mg/g	Analista 2 mg/g	Analista 1 mg/g	Analista 2 mg/g	Analista 1 mg/g	Analista 2 mg/g
Día 1	9,12	9,23	12,38	12,45	15,25	15,05
	9,34	9,01	12,68	12,27	15,70	15,70
	9,45	9,45	13,07	13,12	15,70	15,48
Día 2	9,55	9,34	12,27	13,21	15,81	15,81
	9,12	9,66	12,57	12,14	15,26	15,26
	9,12	9,12	12,44	12,58	15,15	15,59
CV (%)	2,20		2,83		1,76	
Fischer(F) y Student(t) entre días	$F_{exp} = 1,79 < F_{tab} = 5,05$ $t_{exp} = 0,298 < t_{tab} = 2,23$		$F_{exp} = 1,06 < F_{tab} = 5,05$ $t_{exp} = 0,422 < t_{tab} = 2,23$		$F_{exp} = 1,14 < F_{tab} = 5,05$ $t_{exp} = 0,000 < t_{tab} = 2,23$	
Fischer(F) y Student(t) entre analistas	$F_{exp} = 1,51 < F_{tab} = 5,05$ $t_{exp} = 0,105 < t_{tab} = 2,23$		$F_{exp} = 2,42 < F_{tab} = 5,05$ $t_{exp} = 0,197 < t_{tab} = 2,23$		$F_{exp} = 0,97 < F_{tab} = 5,05$ $t_{exp} = 0,014 < t_{tab} = 2,23$	

Se demostró que el método fue específico para alcohol, según los resultados del análisis cuantitativo (Tabla 11). Tanto para Inmunoglobulina como para Albúmina se obtuvieron recuperaciones (R) muy próximas al 100%, mientras que en los placebos fueron inferiores al 3.0%, en correspondencia con el criterio establecido para la exactitud (97-103%). La Figura 1 muestra los diferentes espectros de absorción obtenidos procesados por el método en estudio. Como se puede apreciar para el rango de interés analítico el placebo no absorbe apreciablemente, mientras que el patrón, y las muestras, presentan un comportamiento muy similar entre ellos. Estos datos evidencian que la técnica es específica para cuantificar alcohol en los IFAs y puede ser utilizada en su control de calidad.

**Tabla 11.** Resultados de la Especificidad del método

Muestras	Absorbancia	Concentración experimental (%)	R (%)
Placebo	0,002	0,21	1,14
	0,004	0,42	2,28
	0,003	0,37	1,99
Inmunoglobulina	0,174	18,40	99,89
	0,175	18,52	100,54
	0,176	18,36	99,67
Albúmina	0,131	12,37	99,92
	0,131	12,38	100,00
	0,131	12,40	100,14

Los valores utilizados en la estimación de los Ld y Lc se presentan en la Tabla 12. Una vez estimado teóricamente los Lc, se comprobaron experimentalmente obteniendo resultados satisfactorios. La recuperación promedio fue de  $99.070 \pm 0.741$  % para Inmunoglobulina y de  $98.79 \pm 1.250$  % para Albúmina. El método fue suficientemente sensible para el propósito con que fue desarrollado, pues es capaz de cuantificar cantidades equivalentes a aproximadamente 5.5 , siendo estos valores muy difíciles de alcanzar en la práctica, quedando siempre por encima los resultados experimentales según los procesos que se ejecutan hasta este momento.

**Tabla 12:** Resultados de la estimación de la sensibilidad del método

Parámetro	Inmunoglobulina	Albúmina
b	0,0094	0,0106
Ybl	0,0019	0,0006
Sbl	0,5436	0,5466
Ld ()	1,9345	1,8218
Lc ()	5,7952	5,4600

El cumplimiento de las exigencias internacionales para la validación de técnicas analíticas garantiza que el procedimiento desarrollado fue lineal, preciso y exacto en el rango analizado: de 6,0 a 19,0 mg de alcohol/g de proteína para la albúmina y de 9,2 a 27,6 mg de alcohol/g de proteína para la inmunoglobulina, respectivamente.

### ***Aplicación del método en lotes industriales de Inmunoglobulina y Albúmina***

La utilidad de este método se verificó mediante la replicación de las estimaciones del contenido de alcohol en los IFA a 50 lotes industriales consecutivos, cuyos resultados se evaluaron estadísticamente (Figura 2). La asimetría y curtosis fueron de 0,9328 y -1,4222 para Inmunoglobulina y de 0,6632 y -1,6597 para Albúmina, respectivamente. Los valores de curtosis estandarizado y coeficientes de asimetría están dentro del rango esperado (-2 a +2), por lo cual los datos se ajustan a la distribución normal. En ambos casos los contenidos de alcohol mostraron gran variabilidad dependiendo del lote, por influencia de los procesos de liofilización, donde se debe eliminar el alcohol residual. El comportamiento de los datos en ambos casos tiende a una asimetría desplazada ligeramente al límite inferior del intervalo en el cual se distribuyen los valores, lo cual está en correspondencia con los valores menores de cero de los coeficientes de curtosis. Se demuestra experimentalmente la utilidad del método enzimático diseñado y validado.

## **CONCLUSIÓN**

El método enzimático empleado para determinar el contenido de alcohol en los IFAs fue suficientemente específico, lineal, preciso y exacto, por lo que se puede aplicar al control de calidad.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Chapel HM, Lee M. The comparison of the efficacy and safety of intravenous versus subcutaneous immunoglobulin replacement. *Therapy. J. Clin. Immunol.* 2000; 20: 94– 110.
2. Kazatchkine MD, Kaveri SV. Immunomodulation of autoimmune and inflammatory diseases with intravenous immunoglobulin. *N. Engl. J. Med.* 2001; 345 (10): 747-55.
3. Ballou M. Intravenous immunoglobulins: Clinical experience and viral safety. *J. Am. Pharm. Assoc.* 2002; 42: 449-59.
4. Evans TW. Review article: albumin as a drug – biological effects of albumin unrelated to oncotic pressure. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2002; 16: 6-11.
5. Uhing MR. The albumin controversy. *Clin. Perinatol.* 2004; 31: 375 -88.
6. Cohn EJ, Strong L, Hughes WL, Mulford DJ, Ashworth JN, Melin M. Preparation and properties of serum and plasma proteins. IV. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. *J. Am. Chem. Soc.* 1946; 68: 459-75.

7. European Pharmacopoeia. 5ta Edition, Council of Europe, Strasbourg. 2001.
8. British Pharmacopoeia (BP) 2003, (Versión electrónica).
9. United State Pharmacopoeia (USP 30). United States Pharmacopoeia and National Formulary: United States Pharmacopeial Convention. 2007, (Versión Electrónica).
10. ICH Q2A. Harmonised Tripartite Guideline. Text on Validation of Analytical Procedures. 1995, Disponible en <http://www.fda.gov>
11. Shap J. Quality in manufacture of medicines and other healthcare products. Part 5: Quality control. London: Pharmaceutical Press; 2000. p. 283-358.
12. Quattrochi A, Abelairra de Andizzi I, Laba F. Introducción a la HPLC. Aplicación práctica, Artes gráficas Farro S.A. 1992: 1025.
13. Popják G. Specificity of enzyme reactions. En: Boyer P.D. (ed.) The Enzymes. 3ra Edición. Vol. 2. Academic Press. 1970: pp. 217-279.