

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL  
DE HUAMANGA**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE FARMACIA Y  
BIOQUÍMICA**



**Desarrollo y validación del método analítico  
por cromatografía líquida de alta resolución  
(HPLC) para la determinación cuantitativa de  
ácido caprílico en antisueros.**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO**

**Bach. JANAMPA CANCHARI, ROMAO GONZALO**

**AYACUCHO - PERÚ**

**2012**

A mi madre Maria Canchari y a mi padre Justo Janampa, por su apoyo constante para salir adelante.  
A mis hermanos Flor, Ángel y Vlady por que me dan fuerzas en cada momento de mi vida.  
A mi esposa Cinthya y a mi hijo Alessandro por ser la inspiración del cada día en mi desarrollo personal y profesional.

## AGRADECIMIENTOS

A mi alma mater, la Universidad Nacional De San Cristóbal de Huamanga.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, en especial a la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica que permitió mi formación profesional.

Agradecimiento al Instituto Nacional de Salud (INS), en especial al Centro Nacional de Control de Calidad (CNCC), que hizo posible la realización del presente trabajo, así como también al Centro Nacional de Productos Biológicos (CNPB) por su apoyo desde el inicio del proyecto.

El agradecimiento profundo a la QF. Maricela López Sierralta, y en forma muy especial a los Dres. Q.F. Gladys Monico Rosales, Q.F. Flor Fuentes, Blgo. Javier Rodríguez, a mis familiares y amigos.

## INDICE

	Pág.
<b>RESUMEN</b> .....	<b>v</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>II. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>3</b>
2.1. Antecedentes .....	3
2.2. Desarrollo de método .....	4
2.3. Validación .....	4
2.4. Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) .....	13
2.5. Ácido caprílico .....	18
2.6. Antisueros .....	20
2.6.1. Tipos de antisueros .....	22
2.6.2. Suero antibotrópico polivalente .....	22
2.6.3. Proceso de precipitación de proteínas con ácido caprílico .....	23
2.7. Método de precipitación de proteínas en matrices biológicas .....	26
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
3.1. Lugar de ejecución .....	27
3.2. Población .....	27
3.3. Muestra .....	27
3.4. Recolección de muestra .....	27
3.5. Muestreo .....	28
3.6. Desarrollo del método analítico .....	28
3.7. Diseño metodológico por HPLC .....	32
3.8. Análisis estadístico .....	34
<b>IV. RESULTADOS</b> .....	<b>38</b>
<b>V. DISCUSIÓN</b> .....	<b>43</b>
<b>VI. CONCLUSIONES</b> .....	<b>51</b>
<b>VII. RECOMENDACIONES</b> .....	<b>52</b>
<b>VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>54</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>58</b>



## INDICE

	Pág.
<b>RESUMEN .....</b>	<b>v</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>II. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>3</b>
2.1. Antecedentes.....	3
2.2. Desarrollo de método.....	4
2.3. Validación .....	4
2.4. Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) .....	13
2.5. Ácido caprílico .....	18
2.6. Antisueros.....	20
2.6.1. Tipos de antisueros.....	22
2.6.2. Suero antibotrópico polivalente .....	22
2.6.3. Proceso de precipitación de proteínas con ácido caprílico .....	23
2.7. Método de precipitación de proteínas en matrices biológicas .....	26
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>27</b>
3.1. Lugar de ejecución.....	27
3.2. Población .....	27
3.3. Muestra .....	27
3.4. Recolección de muestra.....	27
3.5. Muestreo .....	28
3.6. Desarrollo del método analítico.....	28
3.7. Diseño metodológico por HPLC.....	32
3.8. Análisis estadístico .....	34
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>38</b>
<b>V. DISCUSIÓN .....</b>	<b>43</b>
<b>VI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>51</b>
<b>VII. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>52</b>
<b>VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>54</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>58</b>

## **Desarrollo y validación del método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la determinación cuantitativa de ácido caprílico en antisueros.**

Autor : Bach. Romao Gonzalo Janampa Canchari

Asesores : Mg. Maricela López Sierralta

Mg. Gladys Monico Rosales

### **RESUMEN**

El ácido caprílico es un ácido graso de ocho carbonos que se encuentra de forma natural en la palma, aceite de coco y en la leche de los humanos, cuya función en los antisueros es precipitar las proteínas. El Objetivo del presente trabajo de investigación es desarrollar y validar la metodología para determinar ácido caprílico en antisueros contra la picadura de serpientes del género *botrops*, por el método analítico de la Cromatografía Líquida de alta Performance (HPLC). Se analizaron 3 lotes diferentes de muestra mediante un pool. Se corrieron en el sistema dos curvas estándar en diferentes fechas, independiente a ellos y paralelo a la segunda curva del estándar se corrieron tres curvas matrices enriquecidas con el ácido caprílico. La aptitud del sistema estuvo dentro de los parámetros exigidos por la USP 34, analizadas en las desviaciones de un estándar inyectado seis veces a 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . La exactitud y la precisión fueron calculadas en función de la recuperación del ácido caprílico de las matrices enriquecidas comparadas a la segunda curva estándar corrida en paralelo y en base su desviación estándar relativa. El límite de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ), basado en la desviación estándar de la respuesta y la pendiente de la curva citada por la ICH. Se observó que una de las dos curvas de calibración estándar llega a detectar hasta 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . En la muestra se compararon las concentraciones de las matrices enriquecidas con ácido caprílico y sus respectivas áreas promedio. En la regresión lineal se obtuvo un coeficiente de correlación de  $r = 0.9993$ , un coeficiente de determinación de 0.9987. La exactitud se calculó por el método de recuperación, obteniendo valores entre el 88.78 y el 94.33%. En la precisión se evaluó la repetibilidad, el cual resultó ser menor al 3% expresado como la desviación estándar relativa. Con la curva matriz promedio: el límite de detección (LOD): 28.83  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y el límite cuantificación (LOQ): 87.36  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . En Conclusión: La validación demostró que el método en estudio es preciso, exacto, lineal y altamente sensible.

**Palabras clave:** validación, método analítico, HPLC, ácido caprílico, antisueros.

## I. INTRODUCCIÓN

La validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece por medio de un estudio y programa documentado que ese método posee todos los requisitos para el uso propuesto. La validación es parte integral de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y del desarrollo de un método de análisis puesto que sin fiabilidad de los resultados analíticos es imposible asegurar que un producto cumple con las especificaciones exigidas, además, contribuye a garantizar la calidad y asegura las propiedades de calidad de un producto determinado (Capcha y Llanos 2007).

El Centro Nacional de Productos Biológicos (CNPB) es un órgano de línea del Instituto Nacional de Salud (INS) que se encarga de producir e investigar biológicos de uso humano y animal e insumos para investigación biomédica; también desarrolla nuevas tecnologías para satisfacer la demanda del país en prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades de incidencia en salud pública humana y veterinaria. Realiza la producción de antisueros contra la picadura de serpientes, para lo cual utilizan el ácido caprílico para precipitar las proteínas, el mismo que es removido por diálisis para obtener un producto final libre de impurezas y trazas, para el control de calidad existe una técnica de cuantificación de ácido caprílico por cromatografía de gases donde la mayoría de sus antígenos son compuestos no volátiles y que conlleva a tratamientos

adicionales de la muestra y por consiguiente un mayor tiempo de análisis del producto, por lo mismo que se plantea una técnica de análisis alternativa por el método de la Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC), que es un método de análisis versátil y de rutina adecuada para la cuantificación del ácido caprílico (CNPB, 2003).

Con el presente trabajo se proporciona al Instituto Nacional de Salud (INS), una técnica de análisis capaz de cuantificar al ácido caprílico en antisueros como producto terminado de manera satisfactoria, con el cual se podrá ayudar a estandarizar el proceso de diálisis en el proceso de producción.

#### **OBJETIVO GENERAL:**

1. Desarrollar y validar el método analítico para la determinación de ácido caprílico en antisueros por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

#### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

1. Desarrollar el método analítico para la determinación de ácido caprílico en antisueros.
2. Determinar la linealidad, precisión, exactitud y la especificidad del método para la cuantificación de ácido caprílico en antisueros.
3. Determinar la sensibilidad (el límite de detección y cuantificación del método) para la cuantificación de ácido caprílico en antisueros.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. ANTECEDENTES.

Del Castillo, B. (1998). Describe que en los últimos años, el Instituto Clodomiro Picado de Costa Rica ha implementado de manera exitosa la cuantificación de ácido caprílico por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), que les permite monitorear mejor su proceso de producción y por tanto obtener un producto de mejor calidad, dicho método ha sido implementado por otros países como España, Brasil y Uruguay.

Herrera, M. (2009) publicó: Desarrollo y validación de una fase reversa por el método de HPLC para la determinación de ácido caprílico en formulaciones de inmunoglobulinas terapéuticas y su aplicación a la producción de antisueros. Instituto Clodomiro Picado. San José-Costa Rica, los valores obtenidos fueron idóneos y hoy sirve parte de una técnica de rutina para mejorar su control de producción.

Athavale, M. (2009). publicó una metodología enzimática colorimétrica denominada: Validación de una simple, rápida y costo efectivo de método para la estimación de ácido caprílico y caprilato de sodio en productos biológicos usando NEFA-C kit, que les permite monitorear el ácido caprílico residual en sus productos biológicos.

Morais, V. (2009). En Uruguay se trabaja mucho en el campo de investigación de sueros contra la picadura de serpientes, recientemente se alterna el uso de la cromatografía líquida de alta performance (HPLC) en lugar de la cromatografía de gases (CG), denominando al trabajo piloto: Determinación de ácido caprílico en suero antiofídico, tomando como referencia el trabajo realizado en Costa Rica, usando la ultrafiltración por membrana de corte de 10 kDa, con la finalidad de retener las proteínas de mayor peso molecular al corte, obteniendo una solución más pura, para luego cuantificar el ácido caprílico por el método de HPLC, ratificando con ello que existen ventajas en cuanto a tiempo y costos se refiere.

## **2.2. DESARROLLO DE MÉTODO**

Es la realización de un método para comparar equipos y técnicas, con el fin de decidir con qué equipo, con qué tamaño de muestra o con qué técnica podría optimizarse la recuperación y el error al determinar un componente particular en la muestra (Juran, Gryna y Bingham, 1996).

## **2.3. VALIDACIÓN**

Definimos validación como un programa documentado que asegura que un proceso determinado proporciona de forma homogénea y reproducible un producto que cumple con las especificaciones previamente establecidas. Es la comprobación formal y sistemática de que un proceso de fabricación y análisis de un producto, al mantener los métodos de producción y control establecidos, satisface los requisitos de calidad (Ramírez y Acosta 2007).

### **2.3.1. VALIDACIÓN DE UN MÉTODO**

Es el proceso que establece, mediante estudios en laboratorio, que las características de desempeño del procedimiento cumplen los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas (USP 34, 2011).

Debido a la naturaleza de la muestra, los métodos bioanalíticos son más complejos y más difíciles de validar que los métodos utilizados para el control de calidad de productos farmacéuticos y sustancias de drogas. Esto se debe a los métodos bioanalíticos incluyen matrices más complejas, una gran variedad de posibles interferencias de metabolitos, y los volúmenes de muestra suelen ser bajas. Además, los datos bioanalíticos tienen que ser precisos y fiables, ya que se utilizan para aplicaciones críticas, incluyendo el cálculo de los parámetros farmacocinéticos, que son fundamentales para la revisión de la actuación de un fármaco o una formulación. Por lo tanto, los métodos bioanalíticos necesariamente deben ser completamente validados (Ludwig, 2010).

### **2.3.2. OBJETIVOS DE UNA VALIDACIÓN DE MÉTODO ANALÍTICO:**

El objetivo de la validación de un método analítico es dejar evidencia, mediante documentación, del cumplimiento de las condiciones de exactitud, precisión y confiabilidad, así como de la integridad y recuperabilidad de los resultados de los ensayos efectuados. De este modo queda demostrado que se puede confiar en un método para producir el resultado esperado dentro de límites definidos (Medina y Berrocal, 2008).

### **2.3.3. TIPOS DE VALIDACIÓN**

#### **❖ Validación Prospectiva:**

Se realiza cuando se trata del diseño o de la adecuación de un método de análisis para un producto o proceso determinado (Medina y Berrocal 2008).

#### **❖ Validación Retrospectiva:**

Se realiza cuando un método analítico que se ha venido utilizando durante mucho tiempo, no dispone de la evidencia experimental y documentada sobre su validez (Medina y Berrocal 2008).

## ❖ Revalidación

Los métodos de análisis exigen la revalidación si:

- Los parámetros del método tiene que ser cambiado para mantener el rendimiento original y el cambio este fuera de la tolerancia permitida por la USP.
- Los nuevos compuestos analizados no están dentro del alcance original del método.
- Cambios de la muestra matriz

Cualquier modificación deberá documentarse mediante un procedimiento de control de cambios y el método debe ser revalidado. Como parte del procedimiento, la razón para el cambio debe ser definida y el cambio debe ser autorizado para la aplicación y documentado. Las pruebas de rendimiento debe estar justificada y documentada, y el cambio lanzado formalmente (Ludwig, 2010).

### 2.3.4. ¿PORQUÉ VALIDAR?

Nos interesa mantener un método que sea estable, capaz y robusto. Un método validado nos da la seguridad de ello, dado que estas características son esenciales para mantener altos niveles de calidad en los resultados del análisis. Entonces, ¿Por qué validar?:

- Validando aseguramos que se cumpla con los requerimientos preestablecidos, confirmando su precisión y exactitud.
- También validando aseguramos que las modificaciones de las condiciones normales de ensayo y medio ambiente operacional no afecten negativamente el resultado final.



- Porque validando tenemos un control de los puntos críticos del ensayo y poder así prevenir y evitar resultados erróneos que afecten la calidad de análisis (Medina y Berrocal 2008).

### **2.3.5. PROTOCOLO DE VALIDACIÓN**

Un protocolo es un conjunto de registros que permiten documentar el proceso de validación, en el se describen los detalles de un estudio integral planificado para investigar el funcionamiento uniforme de un nuevo sistema/equipo, un nuevo procedimiento o la aceptabilidad de un nuevo proceso antes de ejecutarlo. Los protocolos incluyen antecedentes importantes, explican el fundamento lógico y el objetivo del estudio, ofrecen una descripción completa de los procedimientos que habrán de seguirse, fija los parámetros que habrán de medirse, describen como se analizan los resultados y facilita los criterios de aceptación determinados con anterioridad para extraer las conclusiones. Los estudios de validación, los estudios de estabilidad y los estudios clínicos son ejemplos de protocolos escritos para la industria farmacéutica. Los protocolos de validación son importantes para asegurar que se recaben pruebas documentadas a fin de demostrar que un equipo, un sistema, un proceso o un método analítico se desempeñan uniformemente en conformidad con el nivel especificado (DIGEMID, 1999).

### **2.3.6. PARÁMETROS DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS**

Las características de desempeño de un método analítico según la norma USP 34, se expresan en función de los parámetros analíticos.

#### **2.3.6.1. LINEALIDAD**

ICH define la linealidad de un procedimiento analítico como su capacidad (dentro de un rango determinado) para obtener resultados de las pruebas que son directamente proporcionales a la concentración (cantidad) de analito en la muestra.

Linealidad se puede demostrar directamente en la sustancia de ensayo (por dilución de una solución madre de patrón) o por separado un peso mezclas sintéticas de los componentes del ensayo del producto. La respuesta debe ser directamente proporcional a las concentraciones de los analitos o proporcional por medio de un cálculo matemático bien definido. Una ecuación de regresión lineal aplicada a los resultados debe tener un intercepto no significativamente diferente de cero. Si un intercepto distinto de cero significativo se obtiene, se deberá demostrar que esto no tiene ningún efecto sobre la exactitud del método (Ludwig, 2010).

Esta relación matemática se expresa de la siguiente manera:

$$Y = bx + a$$

Donde:

X : La concentración del analito

Y : Valor de la respuesta en área del pico cromatográfico

b : Valor de la pendiente de la recta

a : Valor del intercepto de la recta con el eje Y

### **2.3.6.2. PRECISIÓN**

Es el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el procedimiento repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea. La precisión de un método analítico habitualmente se expresa como la desviación estándar o la desviación estándar relativa (Coeficiente de variación) de una serie de mediciones. La precisión puede ser una medida del grado de reproducibilidad o de repetibilidad del procedimiento analítico en condiciones normales de operación. En este contexto, la reproducibilidad se refiere al uso del procedimiento analítico en diferentes laboratorios, como por ejemplo en un estudio en colaboración. La precisión

intermedia (también conocida como tolerancia o fortaleza) expresa la variación dentro de un laboratorio, por ejemplo e diferentes días, con diferentes analistas o con equipo diferente dentro del mismo laboratorio. La repetibilidad se refiere a la utilización del procedimiento analítico en un laboratorio durante un período de tiempo corto realizado por el mismo analista con el mismo equipo (USP 34).

### **2.3.6.3. EXACTITUD**

Es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante ese procedimiento y el valor verdadero. La exactitud de un procedimiento debe establecerse en todo su intervalo (USP 34).

La exactitud puede a menudo expresarse como un porcentaje de recuperación, por medio de la valoración de cantidades conocidas agregadas de analitos. Representa el grado en que un método analítico es exacto para los fines propuestos. Este test evalúa la especificidad del método en la presencia de los excipientes bajo las condiciones de trabajo observadas para el análisis de un producto. Para el análisis de un producto farmacéutico la exactitud es evaluada por el análisis de una mezcla con cantidades conocidas de componentes (Castro, 1999).

Entre los procedimientos para determinar la exactitud de un método de análisis cabe citar:

- Comparar el método propuesto con otro cuya exactitud haya sido ya establecida.
- Comprobar este parámetro, utilizando como muestra un patrón de calidad certificada.
- Aplicar el método analítico a una muestra o mezcla de excipientes a las que se añaden cantidades conocidas de un analito.

Mediante este último método se agregan cantidades conocidas de analito o mezcla de excipientes, tanto por encima como por debajo del nivel normal previsto. A partir de los resultados obtenidos luego de aplicar el método propuesto, se calcula la exactitud como el porcentaje de analito recuperado por medio de la valoración mediante la siguiente fórmula:

$$\% R = \frac{Xh}{Xa} \times 100$$

Donde:

%R: Porcentaje de recuperación

Xh: Área obtenida por el estándar

Xa: Área obtenida por la matriz

#### **2.3.6.4. ESPECIFICIDAD**

ICH define la especificidad como "la capacidad de evaluar inequívocamente el analito en presencia de componentes que puede esperarse que se presente. Normalmente esto puede incluir impurezas, productos de degradación, la matriz, etc. (Ludwig, 2010).

#### **2.3.6.5. SENSIBILIDAD**

Conformado por los límites de detección y límites de cuantificación.

##### **2.3.6.5.1. LÍMITE DE DETECCIÓN**

Es una de las características de las pruebas límite. Es la cantidad mínima de analito en una muestra que puede detectarse, aunque no necesariamente cuantificarse, en las condiciones experimentales indicadas. Las pruebas de límite simplemente comprueban que la cantidad de analito se encuentra por encima o por debajo de un nivel determinado. El límite de detección se expresa habitualmente en forma de concentración de analito (por ejemplo, porcentaje, partes por billón) en la muestra (USP 34).

Este parámetro hace referencia a la mínima concentración del compuesto en estudio que es posible detectar con certeza, es decir que se puede diferenciar la respuesta dado por un blanco, el cual contiene todos los componentes de la muestra menos el compuesto de estudio (ICH, 1996).

El límite de detección se calcula mediante la fórmula:

$$LD = \frac{3.3 \times D.S}{b}$$

Donde:

3.3 : Factor

D.S : Desviación estándar

b : Pendiente

#### **2.3.6.5.2. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN**

El límite de cuantificación es una de las características de las valoraciones cuantitativas de compuestos que se encuentran en baja concentración en la matriz de una muestra, tales: impurezas en fármacos a granel y productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Es la mínima concentración del analito que puede determinarse con precisión y exactitud aceptables en las condiciones experimentales indicadas. El límite de cuantificación se expresa habitualmente en forma de concentración de analito (por ejemplo, porcentaje, partes por billón) en la muestra (USP 34).

El límite de cuantificación según ICH se calcula mediante la fórmula:

$$L.Q = \frac{10 D.S}{b}$$

Donde:

10 : Factor

D.S : Desviación estándar

b : Pendiente

### 2.3.7. CRITERIOS DE VALIDACIÓN EN FUNCIÓN DEL TIPO DE MÉTODO ANALÍTICO

Las categorías de los métodos de prueba se indican a continuación:

a) **Categoría I**; métodos analíticos para la cuantificación de los componentes principales de fármacos a granel o ingredientes activos (incluyendo conservantes) en productos farmacéuticos terminados.

b) **Categoría II**; métodos analíticos para la determinación de impurezas en fármacos a granel o productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Estos métodos incluyen análisis cuantitativos y pruebas de límite.

c) **Categoría III**; métodos analíticos para la determinación de las características de desempeño (por ejemplo, disolución, liberación del fármaco).

d) **Categoría IV**; pruebas de identificación

Para cada categoría de análisis, se requiere diferente información analítica. En el cuadro Nº 2 se indican los elementos de datos que normalmente se requieren para cada una de las categorías de análisis.

**CUADRO Nº 01. Datos requeridos para la validación de los análisis**

PARÁMETRO DE DESEMPEÑO ANALITICO	CATEGORÍA I	CATEGORÍA II		CATEGORÍA III	CATEGORÍA IV
		CUANTIFICACIÓN	ENSAYO LÍMITE		
Exactitud	SI	SI	*	*	NO
Precisión	SI	SI	NO	SI	NO
Especificidad	SI	SI	SI	*	SI
Límite de detección	NO	NO	SI	*	NO
Límite de cuantificación	NO	SI	NO	*	NO
Linealidad	SI	SI	NO	*	NO
Rango	SI	SI	*	*	NO

(\*) Pueden requerirse, según la naturaleza de la prueba

FUENTE: USP34 NF29, Farmacopea de los Estados Unidos de América.2011.

## **2.4. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC)**

La Cromatografía Líquida de Alta Performance, es una técnica de separación constituida por una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida. Las separaciones se logran por partición, adsorción o procesos de intercambio iónico, según el tipo de fase estacionaria empleada. Los compuestos a analizar se disuelven en un líquido orgánico y la mayoría de las separaciones tienen lugar a temperatura ambiente. Por lo tanto, la mayoría de las drogas, sean compuestos no volátiles o térmicamente inestables, pueden analizarse mediante esta técnica sin riesgo de descomposición. El tiempo de elusión de un compuesto puede ser descrito por su factor de capacidad, ya que depende de la naturaleza química del compuesto analizado, la composición y la velocidad de flujo de la fase móvil y la composición y el área superficial de la fase estacionaria. La longitud de la columna es un parámetro determinante de la resolución. Sólo los compuestos que tienen diferentes factores de capacidad pueden ser separados por HPLC (Medina y Berrocal 2008).

### **2.4.1. CARACTERÍSTICAS DEL EQUIPO HPLC**

Un cromatógrafo líquido consta de un reservorio que contiene la fase móvil, una bomba para formar la fase móvil a través del sistema de presión, un inyector para introducir la muestra en la fase móvil, una columna cromatográfica, un detector y un dispositivo de recolección de datos como una computadora, integrador, o un registrador. Los sistemas de bombeo de HPLC bombean cantidades exactas de fase móvil desde los reservorios de solventes a la columna mediante una tubería y uniones adecuadas para soportar altas presiones. Las bombas empleadas para el análisis cuantitativo deben construirse con materiales inertes a los componentes corrosivos de la fase móvil y ser capaces de entregar la fase móvil en una velocidad constante, con fluctuaciones

mínimas, durante periodos prolongados de tiempo. Después de ser disueltos en la fase móvil u otra solución apropiada, los compuestos a cromatografiar se inyectan en la fase móvil, mediante muestreadores automáticos (Skoog, 1997).

Para la mayoría de los análisis farmacéuticos, la separación se logra por la partición de los compuestos en la solución de prueba entre la fase móvil y la estacionaria. La cromatografía en sistemas que constan de fases estacionarias polares y fase móviles no polares se denomina "Cromatografía de fase normal", mientras por el contrario, cuando se emplean fases móviles polares y fases estacionarias no polares se denomina "Cromatografía de fase reversa" (Quatrocchi, Andrizzi y Laba, 1998).

#### **2.4.2. CROMATOGRAFÍA EN FASE REVERSA**

Las fases estacionarias de fase reversa en cromatografía líquida consiste en un ligando no polar unido en la superficie de partículas de sílica microporosa, se estima que el 70% o más de las separaciones analíticas en cromatografía líquida son llevadas a cabo en el modo de cromatografía de fase reversa. Las fases reversas más comunes son: octadecil, octilfeniletil y cianopropil. Debida al amplio campo de las aplicaciones, fácil uso, y la naturaleza de las fases octadecil y octal, uno de estos es usualmente la primera elección para probar una nueva separación. Las fases móviles en la cromatografía de fase reversa están constituidas por mezclas de solventes polares generalmente agua y un modificador orgánico (Metanol, acetonitrilo, tetrahidrofurano), con o sin el agregado de aditivos (sales orgánicas o reactivos de apareamiento iónico), el dioxano y el tetrahidrofurano se mezclan tanto con el agua como con solventes no polares (Cloroformo, hexano) y pueden considerarse tanto solventes de fase normal o como de fase reversa, el acetonitrilo tiene por sus propiedades químicas una selectividad muy diferente a la del metanol que es modificador



orgánico más utilizado en fase reversa, en mezclas con agua o buffer y por su mayor poder disolvente de sales y reactivos de apareamiento iónico se prefiere frente al acetonitrilo . La retención en la separación por fase reversa está basada en la polaridad del soluto. Las moléculas más polares eluyen primero y las menos polares eluyen después, esto es debido a que las moléculas polares interaccionan con más fuerza con la fase móvil polar. El principal mecanismo de la retención es hidrofóbico o solvofóbico, esto significa que la repulsión de moléculas de la muestra del agua que contiene la fase móvil, controla la retención, no así la atracción entre el soluto y la fase estacionaria. (Morante y Del Hierro, 2007).

### **2.4.3. METODOLOGÍA DEL DESARROLLO CROMATOGRÁFICO**

#### **❖ Sistema de Cromatografía Líquida**

Este sistema cromatográfico nos da a conocer el uso de cada componente del equipo de cromatografía líquida que nos permite la separación de distintas sustancias (Medina y Berrocal 2008).

#### **❖ Fase Móvil**

Las características que debe presentar toda fase móvil para ser útil en cromatografía líquida son las siguientes:

- Disolver la muestra.
- No degradar o disolver la fase estacionaria.
- Tener baja viscosidad.
- Ser compatible con el tipo de detector utilizado.
- Tener una polaridad adecuada para permitir una retención conveniente de la muestra en la columna (Medina y Berrocal 2008).

#### ❖ **Precauciones**

Es esencial que la muestra sea soluble en la fase móvil para que pueda ser transportada a través de la columna. Cuando se introducen muestras en disolución, puede ocurrir precipitación de la muestra dentro de la cámara de inyección o en la columna, si el disolvente de la muestra y de la fase móvil son muy diferentes en polaridad, causando pérdida de resolución en la separación y por lo tanto ambos se deben de seleccionar con cuidado (Medina y Berrocal 2008).

#### **2.4.4. ELECCIÓN DE LA COLUMNA**

##### ❖ **Diámetro interior**

Se empieza con un diámetro interior de 4mm, el cual es óptimo para la eficacia separadora. La elección del diámetro de la columna dependerá de la concentración de un componente en el efluente y del volumen de fase móvil que debe consumirse en un análisis, todo lo cual se puede relacionar con la velocidad de la fase móvil. Se puede reducir el diámetro de la columna a 1-2 mm si se trata de volúmenes de muestra muy pequeña si se quiere gastar menores disolventes o si se requiere una gran sensibilidad de detección (Medina y Berrocal 2008).

##### ❖ **Longitud**

Se empieza con columnas de 125 mm. Se prolonga con un múltiplo en caso de requerirse un número de platos más elevados para la resolución de los componentes. Se emplearán columnas aún más cortas para problemas de separación muy rápidos pero sencillos, reduciéndose el tiempo de análisis (Medina y Berrocal 2008).

##### ❖ **Tamaño de partícula de la fase estacionaria**

Se empieza con partículas de 7 mm de tamaño medio (permeabilidad óptima; eficacia separadora extremadamente elevada). Se aumenta el tamaño de la

partícula si la presión del aparato no es suficiente para columnas muy largas. Se reduce cuando se requiere una mayor eficacia separadora por longitud de la columna, separaciones más rápidas (columnas más cortas) o volúmenes de elusión pequeños (cantidad de muestra reducida) (Medina y Berrocal 2008).

#### **2.4.5. ELECCION DEL DETECTOR**

Los detectores deben de reunir ciertas características tales como:

- Tener un amplio rango de respuesta.
- Poseer una respuesta lineal.
- No contribuir al ensanchamiento de la banda extracolumnar.
- Responder a todos los solutos.
- Tener sensibilidad apropiada.
- No afectarse por los cambios de temperatura.
- Poseer una buena relación señal/ruido.
- No destruir la muestra.
- Los detectores pueden ser: detector UV, detector de fluorescencia, detectores electroquímicos, detectores de índice de refracción y arreglo de diodos (Medina y Berrocal 2008).

##### **❖ Detector de índice de refracción**

Estos detectores miden la diferencia de índice de refracción, entre el disolvente que en su camino hacia la columna pasa a través de una mitad de la cubeta y el efluente de la columna que pasa por la otra mitad. Los dos compartimentos están separados por una placa de vidrio montada a un ángulo de modo que si las dos disoluciones difieren en el índice de refracción se produce una desviación de un haz de luz incidente. El desplazamiento del haz con respecto a la superficie fotosensible del detector provoca una variación de la señal de

salida, la cual, una vez amplificada y registrada, proporciona el cromatograma (Williams, 2007).

Los detectores de índice de refracción tienen la ventaja de que responden a casi todos los solutos. Es decir, son detectores universales análogos a los detectores de llama en cromatografía de gases. Además, son fiables y no dependen del caudal. Sin embargo, son muy sensibles a los cambios de temperatura, y se han de mantener a una temperatura constante en unas pocas milésimas de grado centígrado y por lo general no se pueden utilizar en la elusión con gradiente (Williams, 2007).

#### **2.4.6. APTITUD DEL SISTEMA SST (SYSTEM SUITABILITY TEST)**

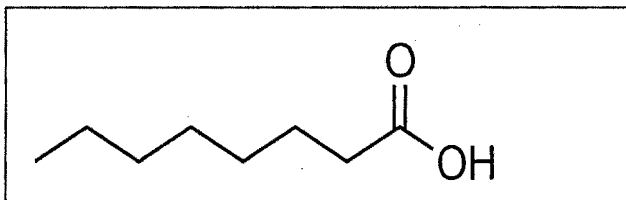
Las pruebas de aptitud del sistema, son una parte integral de los métodos cromatográficos líquidos, se emplean para comprobar que la resolución y la reproducibilidad del sistema Cromatográfico son aptas para realizar el análisis.

La forma más simple de evaluar la aptitud del sistema del HPLC es comparar el cromatograma de una muestra problema con el cromatograma de un estándar. Esto permite una comparación de la forma del pico, ancho del pico y resolución de la línea base. (Medina y Berrocal, 2008).

#### **2.5. ACIDO CAPRÍLICO**

Es un ácido graso saturado de ocho carbonos que se le conoce con el nombre químico de ácido octanoico. Se encuentra naturalmente en la leche de los seres humanos, en los bovinos, aceite de coco y aceite de palma. La FDA ha aprobado la inclusión del ácido caprílico en la lista GRAS (generalmente reconocido como seguro) (Church, 2011).

**Fórmula Molecular:**  $C_8H_{16}O_2$



FiguraN°1: fórmula estructural del ácido caprílico

Fuente: Efectos secundarios del ácido caprílico.(Church, 2011)

**Apariencia:** liquido transparente con ligera tonalidad amarilla

**Peso molecular:** 144.21 g/mol

**Densidad:** 0.91 g/cm<sup>3</sup>

**Solubilidad:** soluble en metanol y acetonitrilo

**Acidez (pKa):** 4.89

En 1969, Steimbuch y Audran, desarrollaron un nuevo sistema de purificación de anticuerpos a escala de laboratorio basado en la precipitación por ácido caprílico. Este ácido orgánico de ocho carbonos precipita la mayor parte de las proteínas plasmáticas con excepción de las inmunoglobulinas (anticuerpos), lo cual genera en el sobrenadante un producto de alta pureza. La sencillez del procedimiento y un menor número de reacciones adversas demostradas en ensayos clínicos como producto terminado son las principales ventajas de este proceso. (Morais, 2007).

En Argentina, el Instituto de hemoderivados "Presidente Illia" que depende de la Universidad de Córdoba, trabaja en la investigación y desarrollo de inmunoglobulinas contra antígenos de diversas enfermedades, una de ellas fue la investigación para la purificación de una inmunoglobulina específica contra el antígeno de superficie de la Hepatitis B (IgGHB), publicación denominada "Obtención de una Inmunoglobulina específica anti-AgHBs a partir de la precipitación de proteínas plasmáticas con ácido caprílico: Transferencia a escala Industrial". El método descriptivo se caracteriza por su simplicidad y bajo

costo, lo que les ofrece algunas ventajas comparativas con respecto a otros empleados en la actualidad (Oviedo y Zarsur 1996).

## **2.6. ANTISUEROS**

Son preparaciones obtenidas de sueros animales (generalmente caballos inoculados con veneno de serpientes), que contienen anticuerpos específicos al tipo de veneno contra la cual fue preparado y capaz de neutralizar sus efectos nocivos. La meta que persigue la terapia, después de ocurrido el accidente, es impedir o detener la absorción del veneno, neutralizar el veneno penetrado y curar las afecciones anexas por medios terapéuticos comunes y específicos (Miguel, 2008).

Los equinos son la especie animal más utilizada para la producción de los sueros antiofídicos, por su facilidad de manejo y los grandes volúmenes de sangría que se pueden obtener. Cada animal se somete a un esquema de inmunización que dura aproximadamente 3-4 meses; durante este tiempo se inyectan dosis subletales y crecientes del veneno. La ruta de inmunización que se utiliza es la vía subcutánea y se emplean diferentes adyuvantes como potenciadores de la respuesta inmune. Al final del esquema de inmunización se realizan sangrías de prueba a cada animal con el fin de determinar el título de anticuerpos neutralizantes. Si el título es satisfactorio se realizan sangrías de producción en recipientes estériles y empleando un anticoagulante a base de citrato. La sangre es transportada rápida y asépticamente a la planta de Producción, donde da inicio el proceso de purificación de las globulinas equinas (Rojas, Jiménez y Gutiérrez 1993).

En lo que respecta a los sistemas de purificación y proceso, en la actualidad coexisten varios tipos, desde los más modernos basados en la purificación de anticuerpos mediante columnas de intercambio iónico o afinidad, pasando por la purificación mediante precipitación con ácido caprílico, hasta los más antiguos

basados en la purificación mediante precipitación con sulfato de amonio (Morais, 2007).

Los esfuerzos para mejorar la calidad de los productos apuntan a modificar los procesos de purificación con el fin de obtener productos más puros, más seguros y que presenten reacciones adversas más leves tanto cuantitativa como cualitativamente. A pesar de una disminución considerable de las reacciones adversas, de los nuevos sueros en comparación con los usados en el siglo pasado, éstas no han sido eliminadas por completo por lo que todos los sueros heterólogos pueden generar reacciones adversas en mayor o en menor grado dependiendo de la calidad del producto. Clínicamente se ha demostrado que los productos basados en la purificación de los anticuerpos mediante precipitación con ácido caprílico o mediante columnas de afinidad o intercambio iónico presentan un menor número de reacciones adversas (Morais, 2007).

El ácido caprílico (ácido octanoico) es tan eficaz como el sulfato de amonio y puede ser utilizado para precipitar la mayor parte de las proteínas del suero. Utilizando el ácido caprílico se puede ayudar a evitar la formación de agregados de proteínas. A diferencia de sulfato de amonio, el ácido caprílico no concentra a las inmunoglobulinas ya que estos se quedan en la solución. Esta técnica no se recomienda para los sobrenadantes de cultivo celular, debido a los bajos rendimientos y la dilución de la muestra (Amersham, 2002).

Los antisueros elaborados en el Instituto Nacional de Salud (INS) son diversos, así como el suero antiloxoscélico monovalente que es una solución de inmunoglobulinas específicas obtenidas a partir del plasma de equinos hiperinmunizados con veneno de arañas del género *Laxosceles*, el suero anticrotalico monovalente, a partir del suero de equinos hiperinmunizados con veneno de serpientes del género *Crotalus*, el suero antilachésico monovalente, a partir del suero de equinos hiperinmunizados con veneno de la serpiente del

género *Lachesis* y el suero antibotrópico polivalente contra la picadura de venenos de serpientes del género *bothrops* (CNPB, 2003).

Los sueros heterólogos, entre los que se encuentra el suero antiofídico, han sido usados exitosamente durante gran parte del siglo XX. Muchos de los sueros antitoxinas han sido sustituidos en la actualidad por otros tratamientos, pero en el caso del accidente ofídico, el suero antiofídico, continúa siendo el único tratamiento eficaz. A pesar de su eficacia, el uso de anticuerpos heterólogos, principalmente obtenidos de caballos u ovejas, conlleva la posibilidad de reacciones adversas debido a la activación del sistema inmunológico. En un futuro, el suero antiofídico probablemente será reemplazado por anticuerpos humanizados o compuestos neutralizantes específicos. Mientras tanto, los desarrollos apuntan a obtener un producto más puro, de mejor calidad y a un costo adecuado (Morais, 2007).

#### **2.6.1. TIPOS DE ANTISUEROS**

El Antisuero puede clasificarse en **monovalente** (cuando son eficaces contra de una determinada especie de veneno) o **polivalente** (cuando son efectivos contra una amplia gama de especies, o varias especies diferentes al mismo tiempo). El primero, antisuero de serpientes, fue desarrollada por Albert Calmette, un científico francés del Instituto Pasteur. Vital Brazil, un científico brasileño desarrolló en 1901 el primer antisuero monovalente y polivalente para América Central y del Sur con los géneros *Crotalus*, *Bothrops* y *Elapidae*, así como para determinadas especies venenosas de arañas, escorpiones y ranas. Todos ellos fueron desarrollados en una institución brasileña, el Instituto Butantan, con sede en Sao Paulo, Brasil (CNPB, 2003).

#### **2.6.2. SUERO ANTIBOTROPICO POLIVALENTE**

El Centro Nacional de Productos Biológicos del Instituto Nacional de Salud, en Lima, produce desde 1966 un antiveneno botrópico en estado líquido, por



hiperinmunización de caballos, el cual es usado para el tratamiento de picaduras de serpientes del género *Bothrops*, específicamente contra los venenos de *B. atrox*, *B. pictus*, *B. barnetti*, *B. brazili* y *B. hyoprora* y cuya eficacia ha sido comprobada en diferentes evaluaciones preclínicas realizadas en otros laboratorios. Sin embargo, este preparado es proclive a reducir su eficacia cuando no se dispone de una cadena de frío, ya que las inmunoglobulinas equinas, a pesar de su estabilidad térmica, pueden sufrir los efectos prolongados a temperaturas mayores a 30 °C (García, Bonilla y Pesah 2008).

#### **2.6.2.1. COMPOSICIÓN:**

Cada frasco ampolla por 10 mL contiene:

-Inmunoglobulinas de origen equino, que neutralizan no menos de 25 mg de veneno de *Bothrops atrox*.

-Excipientes c.s.p. (CNPB, 2005).

#### **2.6.2.2. INDICACIONES**

Para el tratamiento de envenenamientos causados por la mordedura de serpientes del género *Bothrops* (*B. atrox* o "Jergón de Selva", "cascabel"; *B. brazili* o "Jergón Shushupe"; *B. pictus* o "Jergón de costa", "víbora"; *B. barnetti* o "Sancarranca", "macanche" y *B. hyoprora* o "Jergona") (CNPB, 2005).

#### **2.6.2.3. CONSERVACIÓN**

El suero líquido debe conservarse en refrigeración a temperatura entre 2° a 8°C.

El suero no se debe de congelar ni exponer al sol (CNPB, 2005).

#### **2.6.3. PROCESO DE PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS CON ÁCIDO CAPRÍLICO**

El uso de ácido caprílico (ácido octanoico) como agente de precipitación de las proteínas del plasma de los animales se ha descrito en la literatura. Existen varios procedimientos para la purificación de antisueros de IgG total, con un buen perfil fisicoquímico y pureza, con la precipitación de ácido caprílico de

proteínas más no la inmunoglobulina se han desarrollado y ahora se utilizan para la producción de antivenenos (WHO, 2010).

Un proceso en particular en la que se añade ácido caprílico lentamente al plasma sin diluir, con agitación constante, hasta alcanzar una concentración de 5% (v / v) y 5,5 de pH. La mezcla se agita a 22-25 °C durante un mínimo de 1 hora. Las proteínas precipitadas se eliminan por filtración o centrifugación y se desecha. El filtrado o el sobrenadante que contiene las inmunoglobulinas se somete a la filtración de flujo tangencial para eliminar el ácido caprílico residual y las proteínas de baja masa molecular, dependiendo de la corte molecular de las membranas de ultrafiltración, y concentrar las proteínas. La solución de inmunoglobulina es entonces formulado mediante la adición de solución de cloruro sódico (NaCl), un agente antimicrobiano y cualquier otro excipiente (s) necesario, tales como estabilizadores. El pH se ajusta entonces a un valor neutro y, finalmente, sometido a la filtración estéril través de un filtro de 0.22 micras de tamaño de poro, y se distribuye en envases definitivos (frascos o ampollas). Las variaciones de este procedimiento han sido introducidas por los distintos fabricantes, e incluyen la dilución de plasma, los cambios en la concentración de ácido caprílico, el pH y la temperatura, entre otros (WHO, 2010).

El fraccionamiento de ácido caprílico permite la producción de antivenenos de pureza relativamente alta y con un contenido de proteína total de bajas, ya que las inmunoglobulinas no se precipitan. El rendimiento puede alcanzar hasta 60-75% de la actividad en el plasma de partida, dependiendo de los detalles del procedimiento y / o utiliza el equipo. Los perfiles de eficacia y seguridad del fraccionamiento de las inmunoglobulinas con ácido caprílico en antisueros ha sido demostrada en ensayos clínicos (WHO, 2010).

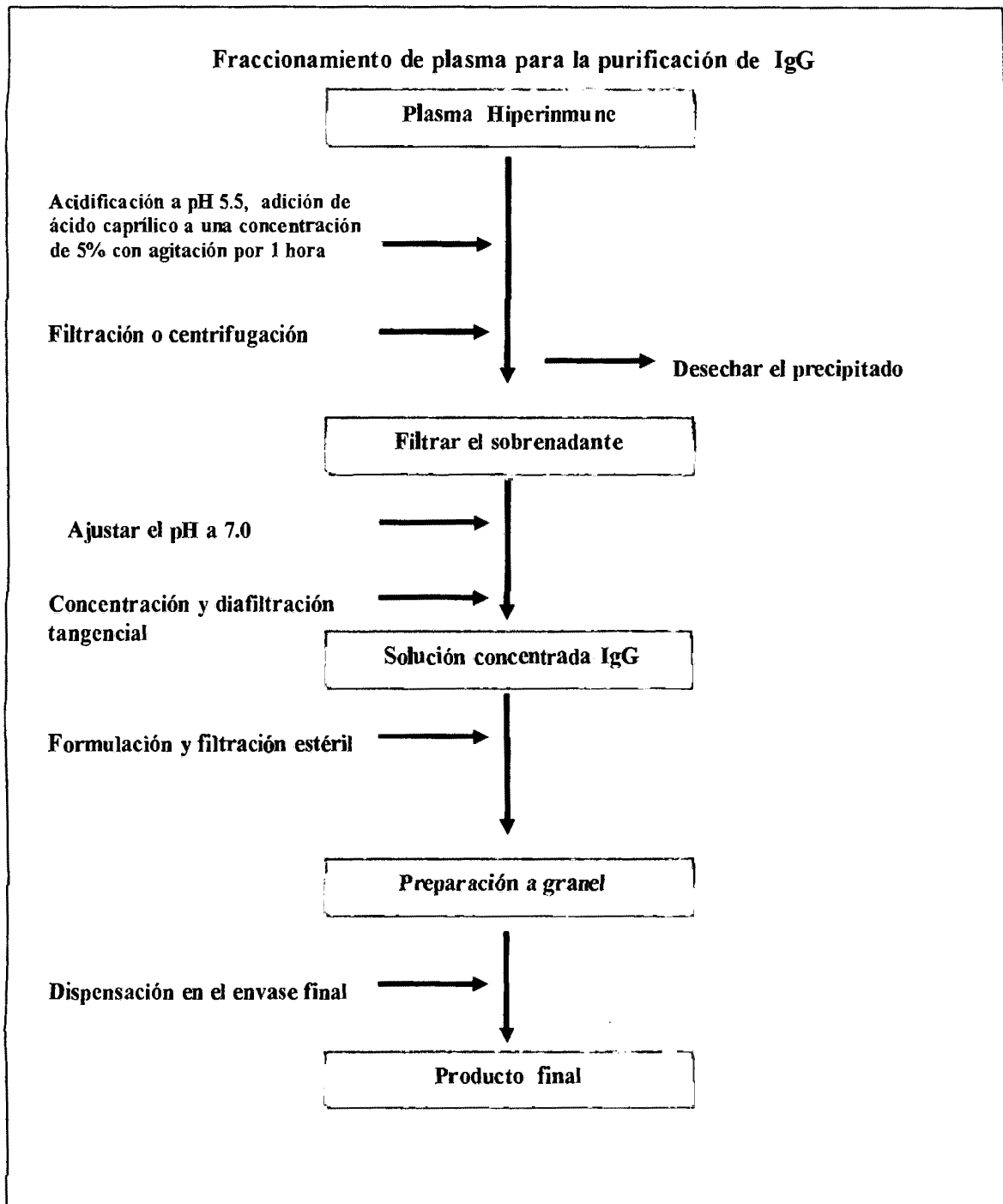


FIGURA N° 02: ESQUEMA DEL PROCESO DE PURIFICACIÓN DEL ANTISUERO

Fuente: OMS. GUÍAS GENERALES PARA LA PRODUCCIÓN 2010)

## 2.7. MÉTODO DE PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS EN MATRICES BIOLÓGICAS

La investigación sobre la precipitación de proteínas es bastante extensa. Muchos investigadores han utilizado la precipitación de proteínas en su análisis de drogas en el suero y el plasma, de modo que la cantidad total de fármaco se puede extraer. A menudo, la precipitación utilizada y los volúmenes óptimos de precipitación de matriz biológica difieren entre los investigadores, incluso para el análisis de los mismos medicamentos o similares. Comparación de los precipitantes de proteínas en diversas especies animales, que normalmente se utilizan en los estudios toxicológicos de drogas y la eliminación temprana, y la variación en los diferentes lotes de plasma no ha sido demostrada (Polson, Incledon y Raguvaran 2002).

### CUADRO Nº 02. Comparación de la capacidad de precipitación de diferentes solventes en el plasma humano.

Comparación de eficiencia de la precipitación de las proteínas desencadenantes en los diferentes lotes de plasma humano

Desencadenantes (2:1 ratio)		% Eficiencia de precipitación de proteínas <sup>a</sup>					Media (n=5)	%RSD (n=5)
		Numeros de lotes						
		1 <sup>b</sup>	1	2	3	4		
Acidos	TCA	91.0	91.4	91.9	91.2	90.8	91.3	0.41
	m- ácido fosfórico	90.2	89.3	79.8	87.7	81.5	85.1	4.94
iones metálicos	sulfato de zinc	99.0	98.5	98.5	99.0	99.1	98.8	0.27
Organicos	CAN	92.1	93.1	93.9	93.5	93.4	93.2	0.65
	EtOH	88.1	88.1	89.1	88.4	89.2	88.6	0.54
	MeOH	89.7	86.9	88.2	89.2	89.3	88.7	1.14
Sales	sulfato de amonio	84.2	84.8	85.8	86.1	87.1	85.6	1.17

<sup>a</sup> % Eficiencia de precipitación de proteínas= ((Proteínas plasmáticas totales – proteínas que permanecen en el sobrenadante)/ Proteínas plasmáticas Totales) x 100.

<sup>b</sup> Mucho misma matriz, analizaron por separado.

FUENTE: OPTIMIZACION DE PRECIPITACION DE PROTEINAS. POLSON, INCLEDON, RAGUVARAN 2002.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN**

El presente trabajo se realizó en los laboratorios de Fisicoquímica del Centro Nacional de Centro de Calidad (CNCC) del Instituto Nacional de Salud, ubicado en la ciudad de Lima, Distrito de Chorrillos, durante los meses de Enero a Abril del 2011.

#### **3.2. POBLACIÓN**

Ácido caprílico en antisueros (suero antibotrópico polivalente frascos de 10 mL), fabricados en el laboratorio de Inmunosueros del Centro Nacional de Productos Biológicos del Instituto Nacional de Salud.

#### **3.3. MUESTRA**

30 antisueros antibotrópicos polivalentes de tres lotes diferentes: lote1, 10400180: 9 viales, lote2, 10500220: 9 viales y el lote 3, 10600320: 12 viales, fabricados en el laboratorio de Inmunosueros del Centro Nacional de Productos Biológicos - INS.

#### **3.4. RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA**

La muestra se recolecto en área de Control de Calidad Interno del Centro Nacional de Productos Biológicos (CNPB) del Instituto Nacional de Salud (INS), de los meses de enero a abril del 2010.

### **3.5. MUESTREO**

El muestreo se realizó en forma no probabilística. Es decir, todos los elementos que forman la muestra tienen la misma probabilidad de ser escogidos, además de tener un tamaño y homogéneo.

### **3.6. DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO**

Para determinar el solvente más apropiado se tuvieron en cuenta las solubilidades del ácido caprílico. El ácido caprílico es ligeramente soluble en metanol y fuertemente soluble en acetonitrilo. Debido a que el ácido caprílico es de naturaleza más polar, se seleccionó una fase móvil compuesta por solventes polar y medianamente polar, como agua y acetonitrilo. Tomando como referencia la investigación realizada en el Instituto Clodomiro Picado de Costa Rica y otros artículos relacionados.

Para la elección de la columna cromatográfica se escogió columna eclipse XDB-C8, cuyo relleno se encuentra compuesto de octadecilsilano unido químicamente a sílice porosa de 5,0  $\mu\text{m}$  de diámetro, de naturaleza no polar. De esta manera los componentes quedarán armonizados y los tiempos de retención serán cortos. Con estas premisas se ensayó en el sistema inyectando soluciones de estándares de ácido caprílico y muestras problema, obteniéndose picos de absorbancia. Se inyectó en el sistema muestras de antiseros enriquecidas a concentraciones similares, observándose los cromatogramas, picos de absorbancia, tiempos de retención y áreas similares a los estándares.

Asimismo, se comparó con cromatogramas de fases móviles, no detectándose respuesta alguna en los mismos tiempos de retención.

El detector elegido es índice de refracción, por ser este el detector que responde mejor a los compuestos orgánicos, y basados en su propiedad de producir cambios en la fase móvil, son muy sensibles a las radiaciones de la temperatura,

por lo mismo que se acondiciona el equipo esperando que se equilibre en las condiciones de trabajo.

### **3.6.1. FASE DE ACONDICIONAMIENTO DE LOS ANTISUEROS**

Recoger las muestras del Centro Nacional de Productos Biológicos (CNPB) en un recipiente acondicionado con sachets de hielo de 2 – 8°C para conservar la cadena de frío en las muestras.

Se llevó las muestras a la cámara fría del Centro Nacional de Control de calidad (CNCC), se rotuló como Muestra Biológica y se almacenó en la cámara a temperatura de 2° a 8°C.

Para procesar las muestras, se sacó de la cámara fría la cantidad de muestras necesarias y se registró en una libreta de registro la cantidad de muestras que se retiraba y la que se dejaba en la cámara.

### **3.6.2. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS**

Columna : Eclipse XDB-C8 5  $\mu\text{m}$  (150 mm x 4.6 mm I.D., Agilent Technologies).

Fase móvil : acetonitrilo y agua (80/20, v/v).

Temperatura : detector y horno a 40°C.

Flujo : 0,5 mL/min.

Volumen de inyección: 20  $\mu\text{L}$

### **3.6.3. PREPARACIÓN DE LA FASE MÓVIL**

En un frasco colocar 4000 mL de acetonitrilo, y agregar 1000 mL de agua purificada, mezclar, filtrar y desgasificar al vacío con membrana de nylon de 0.2  $\mu\text{m}$ .

### **3.6.4. APTITUD DEL SISTEMA**

Se preparó solución estándar de 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de concentración, inyectar por sextuplicado. Con lo cual comprobamos el funcionamiento del sistema: bombeo,

inyector, horno, columna y detector, mediante la determinación de los parámetros cromatográficos.

Se introdujo 2,0 mL (2000  $\mu$ L) Sol. Estándar a una fiola de 10 mL (se enrasó con fase móvil, se agitó).

### **3.6.5. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN STOCK ESTÁNDAR:**

Se preparó una solución stock del estándar de ácido caprílico: 2000  $\mu$ g/ mL. Se transfirió aprox. 200 mg del estándar, pesados con exactitud, en una fiola de color ámbar de 100 mL y diluir con fase móvil, conservar a una temperatura de 20° a 25°C.

### **3.6.6. PRIMERA CURVA DE CALIBRACIÓN:**

A partir de la solución stock estándar, se preparó la curva de calibración estándar a las siguientes concentraciones: 40  $\mu$ g/ mL, 50  $\mu$ g/ mL, 60  $\mu$ g/ mL, 80  $\mu$ g/ mL, 100  $\mu$ g/ mL, 120  $\mu$ g/ mL, 150  $\mu$ g/ mL, 200  $\mu$ g/ mL, 250  $\mu$ g/ mL, 300  $\mu$ g/ mL, 350  $\mu$ g/ mL, 400  $\mu$ g/ mL, 450  $\mu$ g/ mL, 500  $\mu$ g/ mL, 550  $\mu$ g/ mL y 600  $\mu$ g/ mL.

**Por ejemplo: Para 400  $\mu$ g/ mL**

Se introdujo 2,0 mL (2000  $\mu$ L) Sol. Stock estándar a una fiola de 10 mL (se enrasó con fase móvil, se agitó y se filtró).

### **3.6.7. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS**

Se acondicionaron los tres lotes, hasta que estén atemperados, seguidamente a ello se preparó las muestras de cada lote, por triplicado.

**Por ejemplo:**

**Lote1:**

\* Se introdujo 2.0 mL de muestra a una fiola de 10 mL (se enrasó con fase móvil, se agitó, esperamos a que decante para que precipiten las proteínas de la



muestra para evitar enmascaramiento producida por estas, y luego se filtró el sobrenadante).

\* Se introdujo 5.0 mL de muestra a una fiola de 10 mL (se enrasó con fase móvil, se agitó, esperamos a que decante para que precipiten las proteínas de la muestra para evitar enmascaramiento producida por estas, y luego se filtró el sobrenadante).

### **3.6.8. SEGUNDA CURVA DE CALIBRACIÓN:**

A partir de la solución stock estándar, se preparó la segunda curva de calibración estándar a las siguientes concentraciones: 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 350  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 450  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 550  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

**Por ejemplo: Para 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$**

Se introdujo 2,0 mL (2000  $\mu\text{L}$ ) Sol. Stock estándar a una fiola de 10 mL

(enrase con fase móvil, se agitó y filtró con una membrana de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$  a viales ámbar).

### **3.6.9. PREPARACIÓN DE MATRIZ ENRIQUECIDA (CURVA MATRIZ)**

Se preparó por triplicado soluciones matriz enriquecidas con volúmenes apropiados de solución stock estándar para obtener las siguientes concentraciones: 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 350  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 450  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 550  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Se agregó 3,0 mL de antisuero (matriz), se agitó y dejó en reposo hasta que se precipite la mayor cantidad posible de proteínas y obtener el sobrenadante transparente, se filtró cada sobrenadante con la ayuda de una aguja y jeringa, a través de filtros PVDF de 0,22  $\mu\text{m}$  a los viales ámbar.

Con estas tres curvas matrices se calculará linealidad, exactitud y precisión.

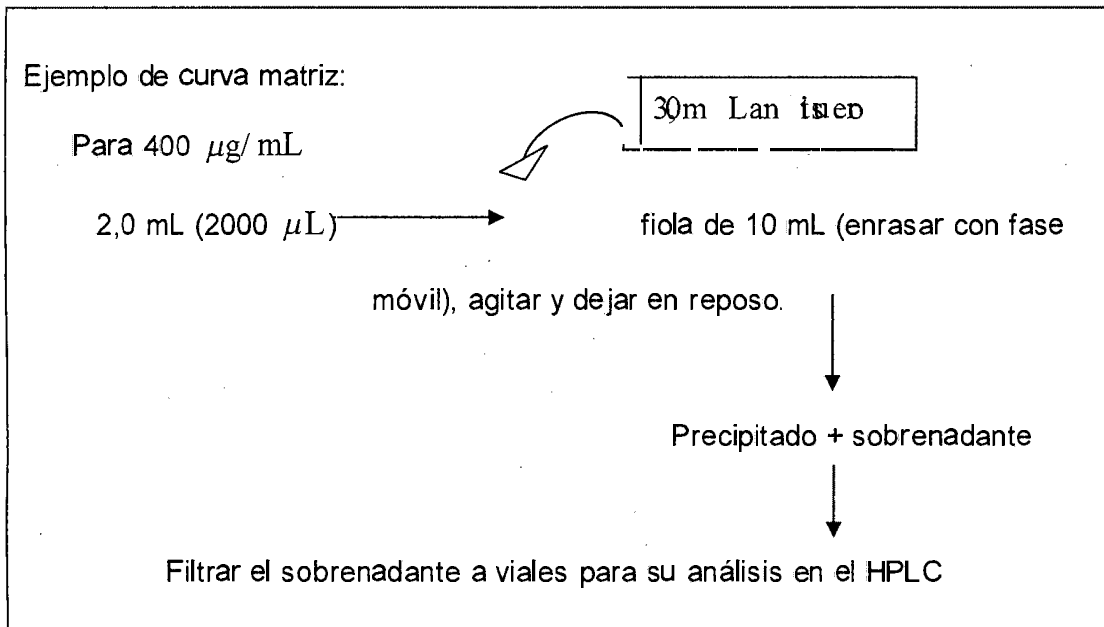


FIGURA N° 03: PREPARACIÓN DE LA CURVA MATRIZ PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO CAPRÍLICO.

### 3.6.10. PREPARACIÓN DEL BLANCO

El blanco es la fase móvil, para ello filtrar a través de filtros PVDF de 0,22  $\mu\text{m}$  a los viales del equipo HPLC.

## 3.7. DISEÑO METODOLÓGICO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

### 3.7.1. DESARROLLO DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

#### 3.7.2. APTITUD DEL SISTEMA

Se analizaron las desviaciones de los parámetros en el estándar elegido, aplicando la hoja de cálculo del programa Excel.

#### 3.7.3. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO CAPRÍLICO

Se analizaron con la primera curva de calibración estándar para poder detectar en ese rango al posible presencia del ácido caprílico, se preparan soluciones problema con 2 y 5 mL para los tres lotes del antisuero, se comparan los cromatogramas de los antisueros con los estándares y la fase móvil.

#### **3.7.4. LINEALIDAD**

Se evaluó la linealidad del método en las tres curvas independientes de las matrices enriquecidas en función de las áreas de cada concentración y comparándolas a las áreas de la curva del estándar. La linealidad de las curvas se determinó usando el análisis de regresión múltiple, el coeficiente de determinación y la significancia son evaluados por el t-student. Con los cuales también se calculó: el intercepto, la pendiente y el coeficiente de correlación.

#### **3.7.5. EXACTITUD Y PRECISIÓN**

La precisión del método analítico se estudió, sobre el sistema: evaluando la repetibilidad de las seis inyecciones de la solución estándar ( $400 \mu\text{g}/\text{mL}$ ); y sobre el método: evaluando la dispersión de cada una de las concentraciones de la matriz enriquecida con respecto al promedio de las tres curvas matrices, correspondiendo la evaluación a todo el procedimiento, desde la preparación de la muestra hasta la medición del ácido caprílico, por parte del instrumento.

La exactitud del método se evaluó en función de la recuperación del ácido caprílico. Para tal efecto, se trabajó con once concentraciones enriquecidas diferentes. Las concentraciones analizadas fueron de la segunda curva de calibración y las tres matrices corridas independientemente: de  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  a  $600 \mu\text{g}/\text{mL}$ .

#### **3.7.6. LÍMITE DE DETECCIÓN (LD) Y LIMITE DE CUANTIFICACIÓN (LQ)**

Estos parámetros se determinaron basados en la desviación estándar de la respuesta de la pendiente (recomendada por la ICH), comparando las dos curvas de calibración por separado (curva estándar y curva matriz enriquecida promedio), ambas de la fecha 2011-05-27, aplicando la desviación estándar del análisis de regresión en la primera curva, y la mayor desviación estándar de la segunda curva, para una mejor observación de la robustez.

### 3.7.7. ESPECIFICIDAD

Se determinó con matriz, matriz enriquecida, estándar y fase móvil, comparar los cromatogramas y sus tiempos de retención.

## 3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

### 3.8.1. LINEALIDAD

Cálculo de la recta de regresión lineal, por el método de mínimos cuadrados:

Ecuación de la Recta:

$$\left( y = bx + a \right)$$

Donde:

x : Concentración del ácido caprílico

y : Valor de la respuesta en área de pico cromatográfico

b : Valor de la pendiente de la recta

a : Valor del intercepto de la recta con el eje "y"

- **Fórmulas para hallar la pendiente "b"**

$$\left( b = \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sum (x - \bar{x})^2} = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}} \right)$$

- **Fórmula para hallar el intercepto "a"**

$$\left( a = \bar{y} - b\bar{x} = \frac{\sum y - b\sum x}{n} \right)$$

- **Fórmula para hallar el coeficiente de correlación "r"**

$$\left( r = \frac{n\sum x_i y_i - (\sum x_i)(\sum y_i)}{\sqrt{[n\sum x_i^2 - (\sum x_i)^2][n\sum y_i^2 - (\sum y_i)^2]}} \right)$$

**a. Test de hipótesis para demostrar regresión en función del coeficiente de correlación “r”:**

H0:  $\rho = 0$ : No hay correlación entre x e y

H1:  $\rho \neq 0$ : Si hay correlación entre x e y

**Criterio de aceptación:** r debe ser significativamente diferente de Cero. Si el valor “t experimental” obtenido es mayor que el “t” de la tabla o crítico para (n – 2) grados de libertad y un nivel de confianza del 95% (significancia,  $\alpha = 0.05$ ), entonces si hay correlación entre x e y.

Fórmula para hallar “t”:  $t_{\text{exp}}$

$$\left( t_{\text{exp}} = \frac{|r| \sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}} \right)$$

**b. Significación estadística de la pendiente “b”:**

Test de Hipótesis para la pendiente “b”:

Ho:  $\beta = 0$ : No es significativamente igual a cero

H1:  $\beta \neq 0$ : Si es significativamente diferente a cero

**Criterio de aceptación:** “b” debe ser significativamente diferente de cero. Si  $t_{\text{experimental}} > t_{\text{tabla}}$  para  $\alpha = 0.05$  y (n – 2) grados de libertad, entonces “b” es significativamente diferente de cero y se rechaza la hipótesis nula (H0).

Fórmula para hallar “t”:  $t_{\text{exp}} \left( t_{\text{exp}} = \frac{|b|}{Sb} \right)$

**Fórmulas para hallar la varianza de la pendiente:  $Sb^2$  y Desviación estándar de la pendiente Sb**

$$\left( Sb^2 = \frac{S^2_{x,y}}{\sum (x-x)^2} = \frac{S^2_{x,y}}{\sum x^2 \frac{(\sum x)^2}{n}} \right)$$

$$\left( S_b = \sqrt{S_b^2} \right)$$

**Fórmulas para hallar la varianza del error experimental total:  $S^2_{x,y}$**

$$\left( S^2_{x,y} = \frac{\sum y^2 - a \sum y - b \sum xy}{n-2} = \frac{\sum (y-y)^2 (1-r^2)}{n-2} \right)$$

**c. Significación estadística de la varianza del Intercepto "a":**

**Test de Hipótesis para el Intercepto "a":**

Ho :  $\alpha = 0$ : Es igual a cero

Ha :  $\alpha \neq 0$ : No es significativamente diferente de cero

**Criterio de Aceptación:** "a" no debe ser significativamente diferente de cero

**Fórmulas para hallar la varianza del Intercepto:  $S_a^2$**

$$\left( S_a^2 = \frac{S^2_{x,y} (\sum x^2)}{\sum (x-x)^2 (n)} = \frac{S^2_{x,y} (\sum x^2)}{\sum x^2 (\sum x)^2 (n)} \right)$$

**Fórmulas para hallar la varianza del error experimental total:  $S^2_{x,y}$**

$$\left( S^2_{x,y} = \frac{\sum y^2 - a \sum y - b \sum xy}{n-2} = \frac{\sum (y-y)^2 (1-r^2)}{n-2} \right)$$

**Fórmula para hallar la desviación estándar del Intercepto:  $S_a$**

$$\left( \begin{aligned} S_a &= \sqrt{S_a^2} \\ S_{a\ rel}(\%) &= \frac{S_a \cdot 100}{a} \end{aligned} \right)$$

**Fórmula para hallar los límites de confianza del Intercepto:**

$$\left( a \pm t_{\text{tabla}} \cdot S_a \right)$$

Donde "t" es el valor de la distribución de Student para (n - 2) grados de libertad a la probabilidad de  $\alpha = 0.05$ .

Fórmulas para hallar el valor de "t" experimental:  $t_{\text{exp}}$

$$\left( t_{\text{exp}} = \frac{|a|}{S_a} \right)$$

**Criterio de aceptación:**

Si  $t_{\text{exp}} > t_{\text{tabla}}$ ; para  $\alpha = 0.05$  y (n - 2) grados de libertad, entonces "a" no es significativamente diferente de cero y se rechaza la hipótesis nula (H0).

### 3.8.2. EXACTITUD

Se determina por el método de recuperación, mediante la siguiente fórmula:

$$\left( \%R = \frac{x_b \times 100}{x_a} \right)$$

**Donde:**

%R: Porcentaje de recuperación

Xb: Área obtenida por la matriz

Xa: Área obtenido por el estándar

### 3.8.3. PRECISIÓN

Se expresa matemáticamente como la desviación estándar (S) o como la desviación estándar relativa (RSD)

#### **IV. RESULTADOS**



**CUADRO N° 03:** Solventes utilizados en el desarrollo de la técnica para determinar el ácido caprílico en antisueros por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC). CNCC-INS. Lima, Abril 2011.

SOLVENTES	SOLUBILIDADES	RESULTADO
Agua	No Soluble	No conforme
Metanol	Ligeramente Soluble	No conforme
Acetonitrilo	Soluble	No conforme
Acetonitrilo/Agua (50:50)	Soluble	No conforme
Acetonitrilo/Agua(20:80)	Soluble	No conforme
Acetonitrilo/Agua(80:20)	Fuertemente soluble	Conforme

**CUADRO N° 04:** Detectores usados en el desarrollo de la técnica para determinar el ácido caprílico en antisueros por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC). CNCC-INS. Lima, Abril 2011.

DETECTORES	ESPECIFICACIÓN	OBSERVACIÓN	RESULTADO
<i>Ultravioleta (UV)</i>	Pico del ácido caprílico  simétrico	Pico del ácido caprílico cooleado	No conforme
Detector con arreglo de diodos(DAD)		Pico del ácido caprílico partido	No conforme
Detector con índice de refracción (RI)		Pico simétrico	Conforme

**CUADRO N° 05:** Columnas cromatográficas usadas a diferentes temperaturas en el desarrollo de la determinación de ácido caprílico en antisueros por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC). CNCC-INS. Lima, Abril 2011.

Temperaturas	Columnas Cromatográficas	Resultados
25°C	Purospher Star RP8 5 $\mu\text{m}$ (150mmX4.6mm) Merck	No conforme
	Purospher Star RP18 5 $\mu\text{m}$ (150mmX4.6mm) Merck	No conforme
	Purospher Star RP18 5 $\mu\text{m}$ (125mmX4.6mm) Merck	No conforme
	Phenomenex C18 5 $\mu\text{m}$ (125 mmX4.0)	No conforme
	Eclipse XDB-C18 5 $\mu\text{m}$ (150mmX4.6mm I.D.,Agilent Technologies	No conforme
	Eclipse XDB-C8 5 $\mu\text{m}$ (150mmX4.6mm I.D.,Agilent Technologies	No conforme
30°C	Purospher Star RP8 5 $\mu\text{m}$ (150mmX4.6mm) Merck	No conforme
	Purospher Star RP18 5 $\mu\text{m}$ (150mmX4.6mm) Merck	No conforme
	Purospher Star RP18 5 $\mu\text{m}$ (125mmX4.6mm) Merck	No conforme
	Phenomenex C18 5 $\mu\text{m}$ (125 mmX4.0)	No conforme
	Eclipse XDB-C18 5 $\mu\text{m}$ (150mmX4.6mm I.D.,Agilent Technologies	No conforme
	Eclipse XDB-C8 5 $\mu\text{m}$ (150mmX4.6mm I.D.,Agilent Technologies	No conforme
40°C	Purospher Star RP8 5 $\mu\text{m}$ (150mmX4.6mm) Merck	No conforme
	Purospher Star RP18 5 $\mu\text{m}$ (150mmX4.6mm) Merck	No conforme
	Purospher Star RP18 5 $\mu\text{m}$ (125mmX4.6mm) Merck	No conforme
	Phenomenex C18 5 $\mu\text{m}$ (125 mmX4.0)	No conforme
	Eclipse XDB-C18 5 $\mu\text{m}$ (150mmX4.6mm I.D.,Agilent Technologies	No conforme
	Eclipse XDB-C8 5 $\mu\text{m}$ (150mmX4.6mm I.D.,Agilent Technologies	Conforme

**CUADRO N° 06** Resultados de los parámetros de validación por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) para la determinación cuantitativa de ácido caprílico en antisueros. CNCC-INS. Abril, 2011.

PARÁMETROS	ESPECIFICACIONES	RESULTADOS
<b>APTITUD DEL SISTEMA</b>		
Precisión del sistema:	Máximo 2%	Áreas: 1,40 %
desviación relativa estándar		Tiempo de retención: 0,12 %
<b>LINEALIDAD</b>		
Ecuación de la recta	$y = bx + a$	$y = 1893,362x + (- 134916,984)$
Coefficiente de correlación (r)	Mínimo 0,995	0,9993
Coefficiente de determinación (r <sup>2</sup> )	Mínimo 0,995	0,9989
Test estadístico para r $\rho = 0,05$ y n - 2 grados de libertad	t regresión > t tabla	83,384 > 2,262
<b>PRECISIÓN</b>		
Desviación Estándar Relativa (D.S.R.)	< 3% (por ser traza)	≤ 3 %
Tiempo de retención	Reproducible	Tiempo de retención reproducible: 5,13
<b>EXACTITUD</b>		
Porcentaje de recuperación	80 - 100%	91,26%
Desviación Estándar Relativa (D.S.R.)	< 3% (por ser traza)	≤ 3 %
<b>ESPECIFICIDAD</b>		
Matriz	No interferencia	Conforme
Fase móvil	No interferencia	Conforme
Antisuero	No interferencia	Conforme
<b>SENSIBILIDAD</b>		
Referencial	Mínimo Detectable	40 µg/mL
LOD (Límite de detección)	Mínimo Detectable	28.83 µg/ mL
LOQ (Límite de cuantificación)	Mínimo Detectable	87.35 µg/mL

## V. DISCUSIÓN

La Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC), en la actualidad representa una herramienta de enorme importancia, no solo para la cuantificación de principios activos en las diversas formas farmacéuticas, sino también para el descarte de posibles trazas y compuestos relacionados presentes en cada uno de los fármacos, sobre todo en antisueros y formulaciones destinadas a ser vacunas de los propios seres humanos.

En el año 2002, Polson, Incledon y Raguvaran en su trabajo denominado "Optimización de proteínas", presentan algunos solventes con capacidad de precipitación y solubilidad en antisueros, que nos sirvió de base para poder buscar los mejores solventes para el antisuero. Se inició la prueba de solubilidad con el agua, observándose la no existencia de dicha propiedad por parte del antisuero, teniendo como resultado la no conformidad del mencionado solvente. Seguidamente se probó la solubilidad del antisuero con metanol, observándose una ligera solubilidad, en contraste a lo que nos indica Polson, Incledon y Raguvaran, en el cuadro Nº 2 de la página 24, en donde indican una eficacia de precipitación y solubilidad en promedio por parte del metanol de 88.7% resultando como no conforme. Se probó la solubilidad con acetonitrilo, observándose que esta presenta una muy buena solubilidad, este solvente orgánico no figura en la relación de solventes con capacidad de precipitación y solubilidad de Polson,

Inclodon y Raguvaran. Probada la solubilidad del antisuero con acetonitrilo se inyectó en el sistema teniendo una baja resolución por parte del solvente en la columna, pues no se logra separar adecuadamente del placebo y la fase móvil. Se busco una proporción adecuada con otro solvente para poder lograr una mejor elución en la columna a la hora de ser inyectado en el sistema, tal como se indica en el cuadro N° 3 de la página 37, se probó la proporción acetonitrilo y agua en la proporción (20:80) respectivamente, resultándonos en una partición de pico, resultando no conforme. Finalmente se probó con nuestra misma fase móvil que posee la proporción de acetonitrilo: agua (80:20) respectivamente, resultando este como el más adecuado, resultando como conforme a la hora de ver el cromatograma formado luego de su inyección en el sistema.

Realizada ya las pruebas del estándar de ácido caprílico en el sistema con los solventes elegidos, nos tocaba ubicar el mejor detector. En el año 2009, Herrera, Gutiérrez y León en su artículo para la determinación de ácido caprílico en antivenenos en formulaciones de inmunoglobulinas terapéuticas de Costa Rica, usan el HPLC con detector UV, sin embargo para nuestro trabajo de investigación, el detector UV, no nos evidenciaba una buena relación señal/ruido y contribuía a un ensanchamiento del cromatograma, es así que se probó con el detector de arreglo de diodos, teniendo el mismo resultado con una ligera partición de pico. En el 2007 el argentino Williams escribió en su manual de Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC), que los detectores de índice de refracción responden mejor a todos los solventes orgánicos, es así que se procedió a inyectar una solución estándar de ácido caprílico en el sistema, previo acondicionamiento del sistema, con una purga de cinco minutos aproximadamente del canal de la fase móvil, primeramente con agua y seguidamente una purga de otros cinco minutos con la misma fase móvil, hasta que el detector muestre 0,0 uRI en la pantalla del detector, un lavado de jeringa por cinco minutos y un acondicionamiento de la

columna por quince minutos, la respuesta fue buena, quedando como conforme para nuestro trabajo de investigación, tal como se muestra en el cuadro N° 04 de la página 38. Los equipos HPLC Lachrom Elite poseen un solvente de metanol al 5% para lavar sus jeringas, sin embargo, este detector nos realizaba picos negativos para la fase móvil, el cual dificultaba la buena cuantificación de nuestro activo, debido a que ambos picos cromatográficos poseen tiempos de retención muy cercanos, para ello se procedió a usar el solvente de mayor proporción en la fase móvil, que también sirve para tratar las muestras en su preparación, que en este caso fue el acetonitrilo, este solvente fue usado para lavar la jeringa del equipo por un mínimo de cinco minutos.

Para la elección de la columna, se probó primero con cartuchos de columnas, debido al alto costo de las columnas y su cuidado de solventes que pueden significarles corrosivos, se trabajó de acuerdo al cuadro N° 05 de la página 39, inicialmente con los cartuchos Purospher Star RP 8 5  $\mu\text{m}$  (150 mm X 4.6mm) Merck, Purospher Star RP18 5  $\mu\text{m}$  (150 mm X 4.6mm) Merck, Purospher Star RP 18 5  $\mu\text{m}$  (125 mm X 4.6mm) Merck, a temperatura ambiente, a 30° C y a 40° C, observándose poca resolución por parte de la columna, teniéndose un pico coleado. Seguidamente se probó una columna Phenomenex C18 5  $\mu\text{m}$  (125 mm X 4.0), en el cual se observa que el tiempo de retención del estándar del ácido caprílico se acerca mucho al tiempo de retención de la fase móvil, pegándose ambos picos, se trabajó también con temperaturas, a 25° C, 30° C y a 40° C, teniendo un resultado negativo para obtener una buena separación de picos, y consecuentemente una buena cuantificación del activo. Finalmente se logró conseguir dos columnas agilent, el primero, una columna Eclipse XDB-C18 5  $\mu\text{m}$  (150mmX4.6mm) I.D., Agilent Technologies, a las tres temperaturas, 25°C, 30° C y 40° C, no detectando a los dos picos que significan la fase móvil y el

estándar de ácido caprílico, sino como un solo pico. La segunda columna Agilent, una columna Eclipse XDB-C8 5  $\mu\text{m}$  (150mmX4.6mm) I.D., Agilent Technologies, inicialmente a 25° C, obteniéndose un pico casi separado del pico de la fase móvil. A 30° C, se obtuvo una mejor separación del pico del estándar en referencia al pico de la fase móvil. Se hizo una prueba más con el horno a 40° C, obteniéndose la mejor separación del pico de nuestro estándar, quedando esta como conforme. El uruguayo Victor Morais trabaja actualmente en la búsqueda de un método por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) que alterne al que en ese país ya se usa, la Cromatografía de Gases, que significa un mayor costo en muestras de sueros contra las picaduras de serpientes y en equipo, por ser el HPLC un método más versátil a la Cromatografía de Gases.

En el cuadro N° 07 de la página 55, anexo 01, el estudio de precisión del sistema, se realizó haciendo seis inyecciones del estándar de ácido caprílico a una concentración de 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , en el cual se observa un promedio de áreas de 577274, teniendo una tendencia a bajar el tamaño de las áreas desde 586243 a 563418, indicándonos una posible degradación del ácido caprílico en el sistema cromatográfico, aún así se obtiene una desviación estándar relativa (RSD) de 1.4 %, siendo su valor máximo permisible de 2%, recomendada por la ICH, así como de los tiempos de retención con un valor de RSD igual a 0.12%, que nos asegura de obtener buenos resultados fiables en el análisis del método. Herrera, Gutiérrez y León en su artículo para la determinación de ácido caprílico en antivenenos en formulaciones de inmunoglobulinas terapéuticas de Costa Rica, usaron para su trabajo de investigación reactivos y accesorios de mayor presupuesto al nuestro, contando con ácido caprílico al 99% importado de los Estados Unidos del laboratorio Sigma, usaron también para ello un sistema de purificación, de la empresa Millipore que ahora pertenece a la empresa Merck.



Al realizar nuestra primera prueba en el suero antibotrópico polivalente (antisuero) con la fase móvil, a diferentes concentraciones, desde 41.46  $\mu\text{g}/\text{mL}$  hasta 621.93  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , una vez inyectados en el sistema, se observa una respuesta negativa, no encontrando en el sistema algún pico cromatográfico que nos evidencie alguna presencia de trazas en el antisuero, tal como se indica en el cuadro N° 8, página 56 del anexo 02, un indicativo de que los antisueros en la etapa de diafiltración o diálisis, en el proceso de producción se realiza de manera satisfactoria, como también que quizás se este realizando esta etapa en demasía, el cual podría corregirse y conllevar a una reducción de tiempo y costos en el proceso de fabricación de estos antisueros necesarios para la amazonia peruana. Por ello, es que se procedió a realizar un método por el cual, se enriquece al antisuero o matriz biológica con una solución stock estándar de ácido caprílico a diferentes concentraciones, se prepararon tres curvas matrices enriquecidas con solución stock estándar, de las cuales pudimos calcular los parámetros de la validación. Con el presente trabajo, se estará proporcionando al Instituto Nacional de Salud (INS) un documento que avale la no presencia de trazas en los tres lotes de sueros antibotrópicos polivalentes analizados.

En cuanto a las muestras, para poder separar las proteínas del ácido caprílico en los antisueros, y no usar el método realizado por Herrera, Gutiérrez y León en Costa Rica, por no contar con los materiales de ellos, se realizó una precipitación con nuestra fase móvil, conformado por acetonitrilo y agua en una proporción de 80:20 respectivamente, se dejó a decantación por unos minutos para evitar enmascaramiento, a diferencia del método de Costa Rica que realizan una ultrafiltración con unidades de filtración Centriprep® Millipore por 15 minutos y a 3000 RPM y de alto costo, teniendo en cuenta que estas unidades de filtración

son descartables, pues poseen una membrana interna de 10KDa, que es saturable y consecuentemente inservible.

La concentración de ácido caprílico encontrado en los tres lotes del antisuero están por debajo del límite de detección (28.85  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Recientemente se han publicado 2 artículos relacionados a métodos de cuantificación de ácido caprílico en productos biológicos, uno de ellos por el método de HPLC de fase reversa, publicado en Costa Rica, y reportan la concentración de ácido caprílico que se encuentra por debajo de 13,46  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . El segundo, es por un método enzimático colorimétrico, utilizando un kit de NEFA-C de la India y determinan la concentración de ácido caprílico y caprilato de sodio en productos biológicos por debajo de 7,21  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 8,31  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectivamente. A comparación con el primer método que también utiliza el HPLC, la ventaja del método desarrollado es que no utilizamos la ultrafiltración con unidades de filtro para centrifuga de 10 kDa nominal de peso molecular, para la obtención del antisuero libre de proteínas (sobrenadante), debido a su alto costo de estos filtros, se aplico el método de precipitación de proteínas con solventes (fase móvil), el cual es de fácil aplicación, accesible y de bajo costo. En cuanto al segundo método, los materiales y el kit de Nefa-C se encuentran sólo en la India, y los investigadores tanto de Uruguay como de argentina prefieren esperar confrontar aquel método con el de la Cromatografía Líquida de Alta Performace (HPLC).

Se analizaron las siguientes concentraciones: 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 350  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 450  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 550  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . En el rango entre 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , las cuales se evaluaron estadísticamente, obteniéndose un coeficiente de correlación ( $r$ ) de 0.9993, siendo el valor mínimo permitido de 0.995, y un

coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 0.9989, siendo el valor mínimo permitido de 0.995 ; con estos resultados se demuestra que existe una relación lineal entre la variable independiente, es decir la concentración "x" y la variable dependiente de la respuesta o áreas "y"; para determinar la linealidad del método se realizó pruebas estadísticas como prueba del coeficiente de relación (r), prueba del modelo de regresión lineal simple y prueba de significancia de la pendiente (b) y del intercepto (a). Para la significancia estadística del coeficiente de correlación (r) se aplicó la prueba "t" de Student donde el valor  $t_{\text{experimental}} = 83.384 > t_{\text{tabla}} = 2.262$ , con un nivel de confianza del 95% (significancia,  $\alpha = 0.05$ ), para n - 2 grados de libertad, corroborando la existencia de la relación lineal entre ambas variables. Así mismo se evaluó si los datos obtenidos se ajustan a un modelo de regresión lineal simple (MRLS), a través de la prueba estadística ANOVA de Regresión. De la evaluación estadística de la pendiente "b", se obtiene  $t_{\text{experimental}} = 83.384 > t_{\text{tabla}} = 2.262$ , obteniendo un valor significativamente diferente de cero, tal cual lo exige el criterio de aceptación, mientras que con el intercepto "a" se obtiene  $t_{\text{experimental}} = 14.93 > t_{\text{tabla}} = 2.262$ , en este último, si bien se rechaza la hipótesis nula para la significancia del intercepto, esto es debido probablemente a efectos de la metodología para evaluar concentraciones bajas de ácido caprílico. Tomando como referencia la tabla de "t" de Student del cuadro Nº 18 de la página 74.

Las áreas obtenidas en la segunda curva de calibración estándar nos representan el 100% de cada una de las concentraciones de ácido caprílico, y al evaluar los valores de área de cada una de las tres curvas matriz se obtienen porcentajes de recuperación promedio entre 88.78% y 93.52%, cumpliendo los criterios de aceptación de 80 a 100% recomendada por la ICH, demostrándose el grado de concordancia entre los resultados de la curva matriz con los valores referenciales de la curva de estándar para cuantificaciones de componentes residuales o trazas, no existiendo por lo tanto errores sistemáticos.

El estudio de precisión del método mostró una buena reproducibilidad de los resultados, obteniéndose una desviación estándar relativa (RSD) menor a 3%, teniendo en cuenta que la USP categoriza a las validaciones de trazas en la categoría II, donde el límite de precisión puede no requerirse y si fuese el caso de requerirlo, fácilmente entraría en el rango que la ICH recomienda, en la que indican que la precisión debe ser menor al 2% y en algunos casos menor al 3%. La repetibilidad del tiempo de retención del ácido caprílico nos sirve de apoyo para confirmar la precisión del método al obtener una desviación estándar relativa (RSD) de 0.12%.

En los resultados de la curva matriz enriquecida con ácido caprílico se determinaron los límites de detección y cuantificación, obteniéndose 28,83  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 87,36  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectivamente, para estos cálculos no se consideró la desviación estándar de la regresión lineal, se optó por tomar la mayor desviación estándar calculada. Estos resultados se corroboraron al trabajar con los estándares a concentraciones de 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a 600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

El método analítico demostró ser específico, por que los componentes de la matriz ni la fase móvil interfieren en la determinación del ácido caprílico ya que no se detecta ninguna respuesta significativa en el cromatograma, obteniéndose una lectura de 0%. Los tiempos de retención son aproximadamente iguales tanto del estándar (en promedio 4.93) como para la matriz enriquecida con ácido caprílico (en promedio 4.95 minutos). Todos los resultados obtenidos en la validación del método analítico, permite asegurar que dicho método analítico es confiable. De esta manera se probó experimentalmente la utilidad del procedimiento establecido para la validación de métodos analíticos.

## VI. CONCLUSIONES

1. Se desarrolló y validó el método analítico para la determinación de ácido caprílico en antisueros, por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC)
2. El método desarrollado por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) en fase reversa, producen resultados que son directamente proporcionales a la concentración del ácido caprílico dentro del intervalo de 100  $\mu\text{g/ mL}$  a 600  $\mu\text{g/ mL}$ .
3. El método es lineal en el intervalo de las concentraciones de 100  $\mu\text{g/ mL}$  a 600  $\mu\text{g/ mL}$  de la muestra; es preciso, porque se obtienen resultados repetitivos (desviación estándar relativo (RSD  $\leq$  3%) y además reproducibles en su tiempo de retención (RSD: 0.12%); es exacto, ya que permite la recuperación de casi la totalidad de la solución stock-estándar añadido al antisuero o matriz biológica (recuperación media: 91.26%), es específico, porque permite el análisis del ácido caprílico en antisueros (matrices biológicas) sin la interferencia de la matriz ni de los solventes de la fase móvil.
4. El método es sensible, ya que permite detectar y cuantificar concentraciones mínimas del estándar en la muestra, presenta límites de detección y cuantificación idóneos para el método.

## VII. RECOMENDACIONES

1. En la preparación de la muestra se recomienda trabajar con fioles ámbar, debido a que en la evaluación de aptitud del sistema se observa ligera degradación de la muestra, y si fuese necesario cubrirlas con aluminio para reducir el RSD al mínimo.
2. Es necesario implementar para el Centro Nacional de Productos Biológicos (CNPB) metodologías como la cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para reducir el tiempo y costo de análisis para poder determinar ácido caprílico en antisueros.
3. Existen muchos métodos de análisis de productos biológicos que no están contemplados en las farmacopeas y otras obras oficiales, motivo por el cual debemos tomar en cuenta que estas metodologías requieren ser validadas, para ser aplicados en las labores de análisis.
4. El Instituto Nacional de Salud debería transferir los productos terminados del Centro Nacional de Productos Biológicos (CNPB) al Centro Nacional de Control de Calidad (CNCC), ya que posee los equipos, material y personal capacitado para realizar las validaciones analíticas de los productos que se producen en la institución, para posteriormente realizarle su control de calidad y obtener mejores productos y de mayor calidad.

5. Se recomienda la aplicación del método analítico por HPLC para la cuantificación de ácido caprílico y la evaluación de la no presencia de trazas en el suero antituberculoso polivalente.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Amersham, B. (2002).** Purificación de anticuerpos en plasma. U.S.A, disponible en:  
[http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/GE\\_antibodypurification.pdf](http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/GE_antibodypurification.pdf)
2. **Amersham, B. (2011).** Tipos de antisuero. Disponible en:  
<http://es.wikipedia.org/wiki/Antisuero>
3. **Athavale, M. (2009).** Validación de una simple, rápida y costo efectivo de método para la estimación de ácido caprílico y caprilato de sodio en productos biológicos usando NEFA-C kit. Nueva Delhi, La India.
4. **Capcha, H. y Llanos, G. 2007.** Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación de dexametasona y clotrimazol en crema, por HPLC y análisis de productos comercializados en el Perú. Lima, Perú.
5. **Castro, M. Gaston, S. Pujol, M.1999.** Validación de métodos analíticos A.E.F.I., Sección catalana; Madrid, España.
6. **Centro Nacional de Productos Biológicos (CNPB).1996.** Vademecum. Ministerio de Salud. Editorial Staff Publicitario.S.R.L. San Luis. Lima, Perú.
7. **Centro Nacional de Productos Biológicos (CNPB). 2003.** Vademecum. Ministerio de Salud. Editorial Imprenta CEPREDIM. Lima-Perú.
8. **Church, M. 2011.** Efectos secundarios del ácido caprílico. Disponible en:  
[http://www.ehow.com/facts\\_5523630\\_caprylic-acid-side-effects.html](http://www.ehow.com/facts_5523630_caprylic-acid-side-effects.html)
9. **Del Castillo, B. 1998.** Técnicas instrumentales en farmacia y ciencias de la salud. 4ª edición. Editorial Piros; Barcelona, España.
10. **DIGEMID.1999.** Manual de Buenas Prácticas de Manufactura, Lima– Perú.
11. **García, P. Yarlequé, A. Bonilla, C. Pessah, S. Vivas, D. Sandoval, G. y Lazo, F. 2008.** Características bioquímicas y evaluación preclínica de un



- antiveneno botrópico liofilizado contra el veneno de la serpiente *Bothrops atrox*. Lima, Perú.
12. **Herrera, M. Meneses, F. Gutierrez, J. y León G. 2009.** Development and validation of a reverse phase HPLC method for the determination of caprylic acid in formulations of therapeutic immunoglobulins and its application to antivenom production. Instituto Clodomiro Picado. San José-Costa Rica.
  13. **International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for human use (ICH). 1996.** Validation of Analytical Procedures: Methodology Q2B. Switzerland.
  14. **Juran, J. F. Gryna y R. Bingham. 1996.** Manual de Control de Calidad. Disponible en:  
[http://books.google.com.pe/books?id=aObuffpTEAC&pg=PA93&&dg=que+es+un+desarrollo+de+metodo&hl=es&sa=x&ei=Rvyot6yIFlqa9gt-O\\_mFDg&ved=OCGEQ6AewBwv-one page&q](http://books.google.com.pe/books?id=aObuffpTEAC&pg=PA93&&dg=que+es+un+desarrollo+de+metodo&hl=es&sa=x&ei=Rvyot6yIFlqa9gt-O_mFDg&ved=OCGEQ6AewBwv-one page&q)
  15. **Ludwig, H. 2010.** Validation of Analytical Methods. Agilent Technologies. Germany. Disponible en:  
<http://www.chem.agilent.com/Library/primers/Public/5990-5140EN.pdf>
  16. **Medina, J. y Berrocal, J. 2008.** Validación de método analítico de valoración de naproxeno sódico 550 mg. tableta por cromatografía líquida de alta performance. Lima, Perú.
  17. **Miguel, G. 2008.** Suero Antiofídico. Disponible en:  
<http://es.answers.yahoo.com/question/index?gid=200809141144448AAeJ>  
UPN
  18. **Morais , V. 2007.** El suero antiofídico: Antecedentes históricos, uso presente y perspectivas futuras. Montevideo-Uruguay.

19. **Morais, V. 2009.** Determinación de ácido caprílico en suero antiofídico. Montevideo, Uruguay.
20. **Morante, S. Sierra, I y Del Hierro, I. 2007.** Desarrollo de Métodos Analíticos para la separación quiral y su aplicación al estudio de procesos de síntesis asimétrica. Editorial Dykinson S.L. Madrid, España.
21. **Oviedo, S. y Zarsur, J. 1996.** Obtención de una Inmunoglobulina específica anti-AgHBs a partir de la precipitación de proteínas plasmáticas con ácido caprílico: Transferencia a escala Industrial. Córdoba, Argentina.
22. **Polson, C. Pratibha, S. Incledon, B. Raguvanan, V. y Grant, R. 2002.** Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Lilly Laboratory for Bioanalytical Research. Canadá.
23. **Quattrocchi, O. Abelaira de Andrizzi, S. Laba, E. 1998.** Introducción al HPLC Aplicación y Práctica. Editorial Universitaria de Buenos Aires; Buenos Aires, Argentina.
24. **Ramirez, F. y Acosta, L. 2007.** Desarrollo y validación prospectiva del método de análisis de valoración de Glimipiride 2mg / Rosiglitazona 4 mg tabletas recubiertas por Cromatografía Líquida de Alta Performance. Lima, Perú.
25. **Rojas, G. Jiménez, J. y Gutiérrez, J. 1993.** Caprylic acid fractionation of hyperimmune horse plasma: Description of a simple procedure for antivenom production. Instituto Clodomiro Picado. San José-Costa Rica.
26. **Skoog D. 1997.** Análisis Instrumental. Ediciones Mc Graw – Hill/Interamericana 4ª edición; Madrid, España.
27. **United States Pharmacopeial Convention. 2011.** The United States Pharmacopeia (USP) 34 ed. U.S.A.

28. **Williams, F. 2007.** Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). Universidad de Buenos Aires. Argentina. Disponible en : [http://www.qi.fcen.uba.ar/materias/ai/clase4\\_2007.pdf](http://www.qi.fcen.uba.ar/materias/ai/clase4_2007.pdf)
29. **World Health Organization (WHO). 2010.** Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins, Geneva , Switzerland.

## **ANEXOS**

## ANEXO 01

Cuadro Nº 07: Aptitud del sistema, áreas obtenidas de la primera curva estándar, inyectando estándar de ácido caprílico a 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CNCC-INS. Lima, Abril 2011.

Nº Inyecciones	Áreas	Tiempo de retención
1	586243	5,02
2	582641	5,01
3	581103	5,00
4	575353	5,02
5	574888	5,00
6	563418	4,99
PROMEDIO	577274,33	5,01
RSD	1,40	0,24

## ANEXO 02

**CUADRO N° 08:** Comparación de las áreas obtenidas del estándar de ácido caprílico frente a las áreas de las matrices biológicas sin enriquecimiento de solución stock estándar de ácido caprílico a diferentes concentraciones. CNCC-INS. Lima, Abril 2011.

Concentración Estándar (ug/mL)	Área Promedio Estándar	Área Muestra (2 en 10 mL)			Área Muestra (5 en 10 mL)		
		Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 1	Lote 2	Lote 3
41.46	17458.33	---	---	---	---	---	---
51.83	30188.00	---	---	---	---	---	---
62.19	51333.00	---	---	---	---	---	---
82.92	81650.67	---	---	---	---	---	---
103.66	83680.33	---	---	---	---	---	---
124.39	107374.00	---	---	---	---	---	---
155.48	163022.33	---	---	---	---	---	---
207.31	255353.33	---	---	---	---	---	---
259.14	340794.67	---	---	---	---	---	---
310.97	399926.33	---	---	---	---	---	---
362.79	505909.00	---	---	---	---	---	---
414.62	583329.00	---	---	---	---	---	---
466.45	691351.67	---	---	---	---	---	---
518.28	787101.67	---	---	---	---	---	---
570.10	875138.33	---	---	---	---	---	---
621.93	976239.67	---	---	---	---	---	---

### ANEXO 03

**CUADRO N° 09:** Áreas del estándar de ácido caprílico comparados con las tres curvas de las matrices enriquecidas con solución stock estándar de ácido caprílico y sus respectivas áreas promedio. CNCC-INS. Lima, Abril 2011.

<b>Concentración (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Áreas Estándares</b>	<b>Áreas Matriz I</b>	<b>Áreas Matriz II</b>	<b>Áreas Matriz III</b>
103.66	82551.33	79191.33	74641.33	76035.67
155.48	183682.33	164761.33	166881.67	157562.67
207.31	281581.67	255809.33	247416.00	250431.00
259.14	393345.00	343963.33	361606.67	343138.33
310.97	480831.33	449486.00	453435.00	446037.33
362.79	602386.00	543719.67	546758.67	549984.00
414.62	681918.67	635359.33	651213.33	643290.00
466.45	820448.33	733946.33	751449.00	756910.00
518.28	921168.00	840480.00	844300.67	865602.67
570.10	1037744.33	909736.67	936810.33	933005.67
621.93	1149783.67	1048641.67	1079673.33	1074083.33

## ANEXO 04

**CUADRO N° 10:** Áreas obtenidas por las tres curvas matrices enriquecidas con solución stock estándar de ácido caprílico a diferentes concentraciones y sus respectivas áreas promedio. CNCC-INS . Lima, Abril 2011.

Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Áreas Matriz I	Áreas Matriz II	Áreas Matriz III	Áreas promedio matrices I, II y III
103,6550	79191,33	74641,33	76035,67	76622,78
155,4825	164761,33	166881,67	157562,67	163068,56
207,3100	255809,33	247416,00	250431,00	251218,78
259,1375	343963,33	361606,67	343138,33	349569,44
310,9650	449486,00	453435,00	446037,33	449652,78
362,7925	543719,67	546758,67	549984,00	546820,78
414,6200	635359,33	651213,33	643290,00	643287,56
466,4475	733946,33	751449,00	756910,00	747435,11
518,2750	840480,00	844300,67	865602,67	850127,78
570,1025	909736,67	936810,33	933005,67	926517,56
621,9300	1048641,67	1079673,33	1074083,33	1067466,11



## ANEXO 05

**CUADRO N° 11:** Datos de las tres curvas matrices enriquecidas con solución stock estándar de ácido caprílico, sus respectivas recuperaciones porcentuales y sus desviaciones estándar relativas. CNCC-INS. Lima, Abril 2011.

Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	%recuperado MT-I	%recuperado MT-II	%recuperado MT-III	Promedio% Recuperado	D.S.R.
103.66	95.93	90.42	92.11	92.82	3.0
155.48	89.70	90.85	85.78	88.78	3.0
207.31	90.85	87.87	88.94	89.22	1.7
259.14	87.45	91.93	87.24	88.87	3.0
310.97	93.48	94.30	92.76	93.52	0.8
362.79	90.26	90.77	91.30	90.78	0.6
414.62	93.17	95.50	94.34	94.33	1.2
466.45	89.46	91.59	92.26	91.10	1.6
518.28	91.24	91.66	93.97	92.29	1.6
570.10	87.66	90.27	89.91	89.28	1.6
621.93	91.20	93.90	93.42	92.84	1.5

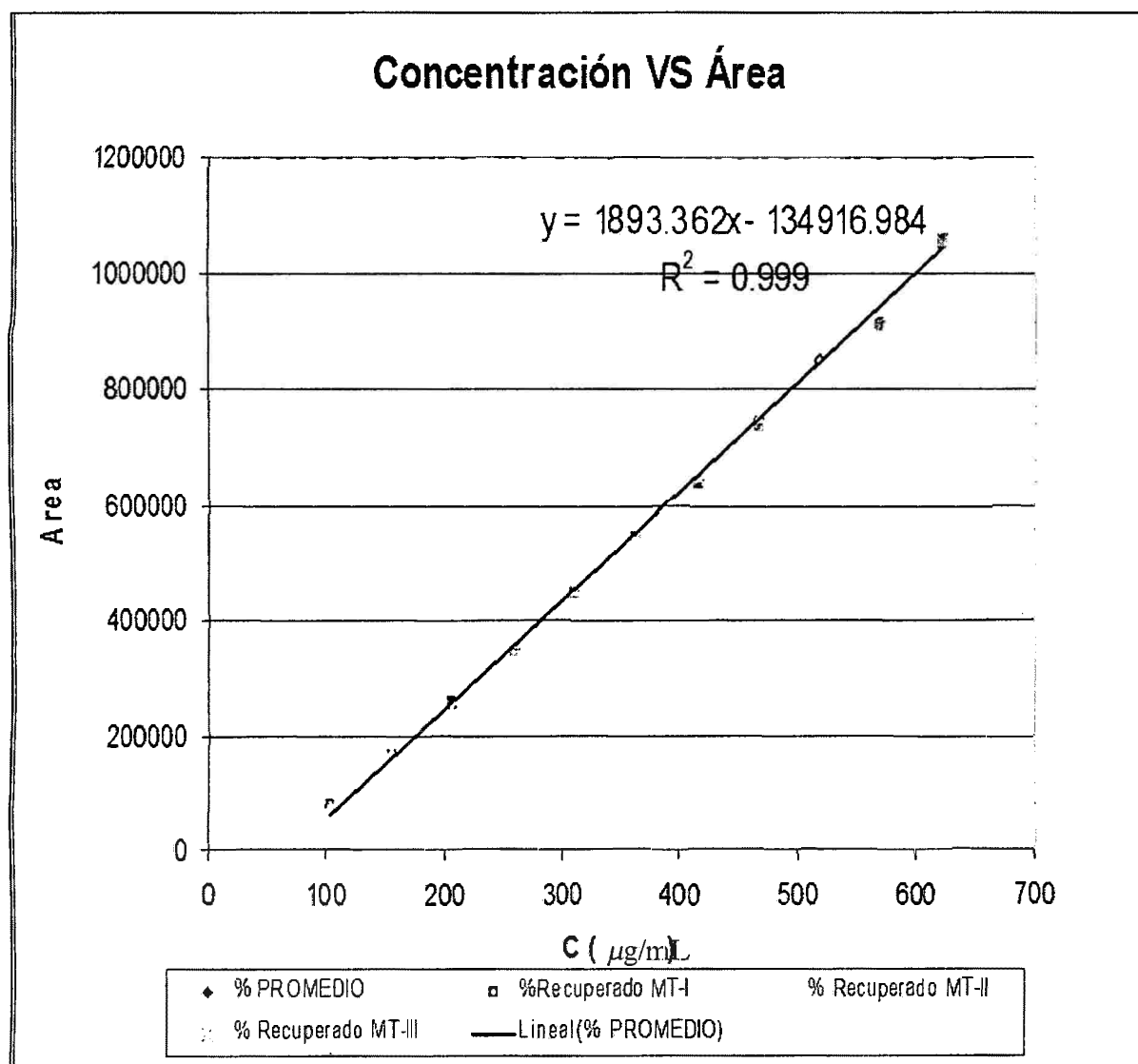
## ANEXO 06

CUADRO Nº 12: Porcentaje promedio recuperado, tiempo de retención promedio y desviación estándar relativa (RSD), para poder determinar la exactitud y la precisión de las tres curvas matrices enriquecidas con solución stock estándar de ácido caprílico. CNCC-INS. Lima, Abril 2011.

Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Promedio% Recuperado	Tiempo de retención (minutos)	D.S.R.%
103.66	92.82	5.14	3.0
155.48	88.78	5.14	3.0
207.31	89.22	5.13	1.7
259.14	88.87	5.13	3.0
310.97	93.52	5.13	0.8
362.79	90.78	5.13	0.6
414.62	94.33	5.13	1.2
466.45	91.10	5.13	1.6
518.28	92.29	5.13	1.6
570.10	89.28	5.12	1.6
621.93	92.84	5.12	1.5
	Promedio : 91.26	Promedio : 5.13	D.S.R. máximo: 3.0
	%	D.S.R : 0.12	

## ANEXO 07

**GRÁFICO Nº 01:** Dispersión del porcentaje promedio de las tres curvas matrices enriquecidas con solución stock estándar de ácido caprílico en relación a su promedio, obtenido en cada nivel de concentración. CNCC-INS. Lima, Abril 2011.



## ANEXO 08

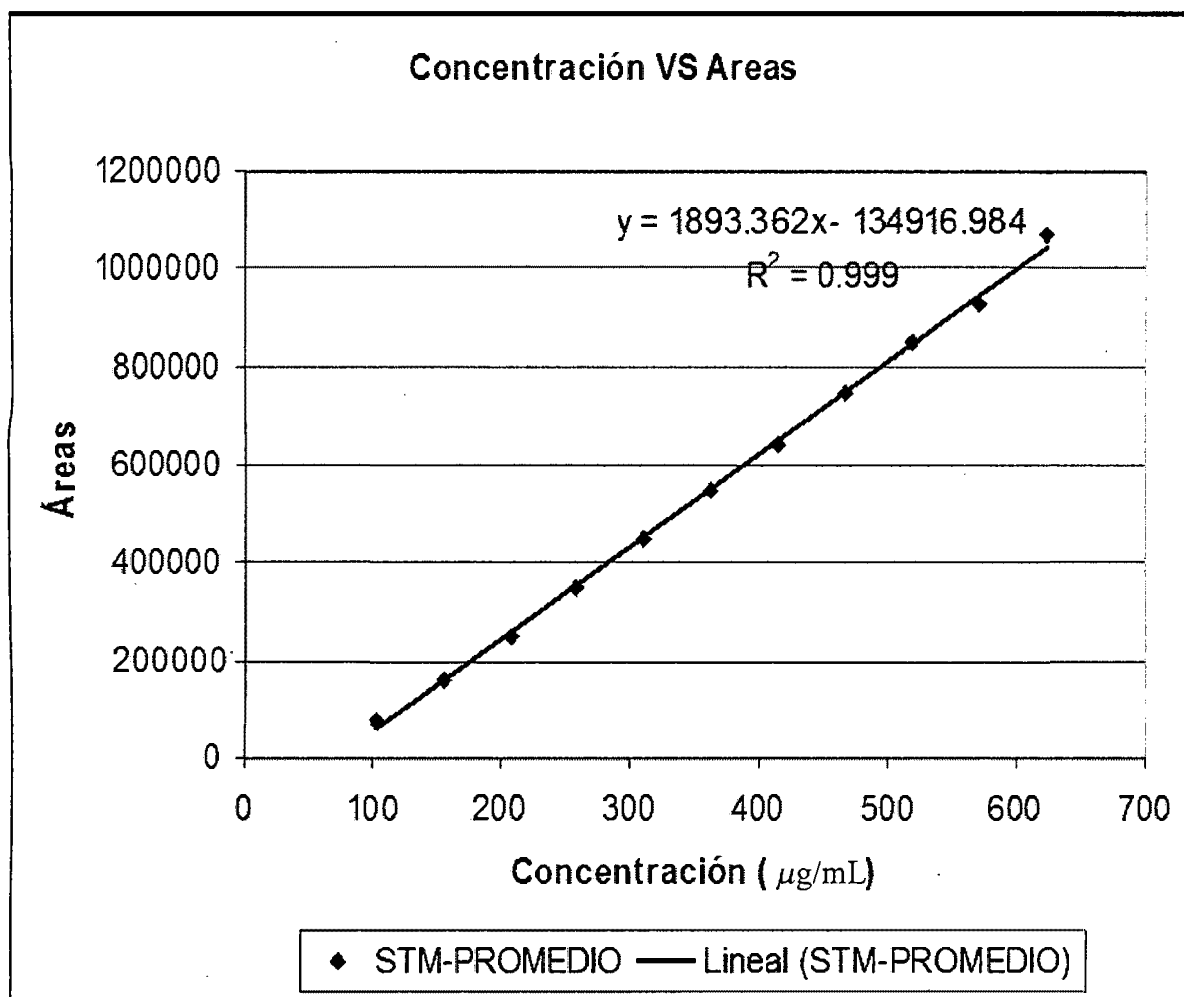
**CUADRO N° 13:** Valores estadísticos calculados para el test de linealidad a partir de las áreas promedio de las tres curvas matrices enriquecidas con solución stock estándar de ácido caprílico a diferentes concentraciones. CNCC-INS. Lima, Abril 2011.

X Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Y (Áreas)	$X^2$	$Y^2$	F(X/Y)
103.66	76622.7778	10744.3590	5871050074	0.001352796
155.48	163068.5556	24174.8078	26591353811	0.000953479
207.31	251218.7778	42977.4361	63110874308	0.000825217
259.14	349569.4444	67152.2439	1.22199E+11	0.000741305
310.97	449652.7778	96699.2312	2.02188E+11	0.000691567
362.79	546820.7778	131618.3981	2.99013E+11	0.000663458
414.62	643287.5556	171909.7444	4.13819E+11	0.000644533
466.45	747435.1111	217573.2703	5.58659E+11	0.000624064
518.28	850127.7778	268608.9756	7.22717E+11	0.000609644
570.10	926517.5556	325016.8605	8.58435E+11	0.000615318
621.93	1067466.1111	386796.9249	1.13948E+12	0.000582623

## ANEXO 09

**GRÁFICO N° 02:** Relación lineal entre las concentraciones y el promedio de las tres curvas matrices enriquecidas con solución stock estándar de ácido caprílico.

CNCC-INS. Lima, Abril 2011.



Pendiente (b): 1893.362

Intercepto (a): -134916.984

Coefficiente de correlación (r): 0.9993

Coefficiente de determinación (r): 0.9987

Ecuación obtenida:  $y = 1893,362x + (-134916,984)$

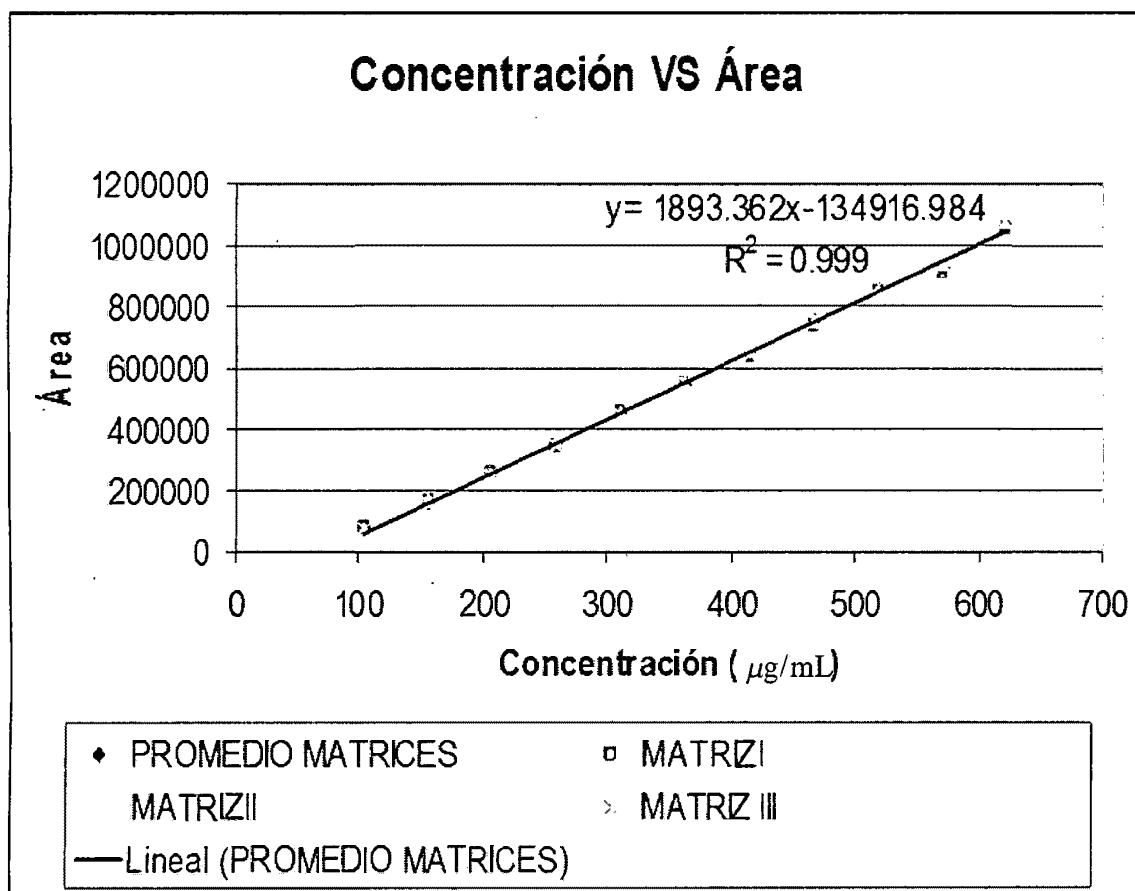
## ANEXO 10

CUADRO Nº 14: Concentraciones de las matrices enriquecidas con solución stock estándar de ácido caprílico, sus respectivas áreas promedio y desviaciones estándar para determinar el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ). CNCC-INS. Lima, Abril 2011.

Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Áreas	D.S.
103.66	76622.78	2331.13
155.48	163068.56	4884.68
207.31	251218.78	4251.76
259.14	349569.44	10432.70
310.97	449652.78	3701.65
362.79	546820.78	3132.63
414.62	643287.56	7927.00
466.45	747435.11	11996.50
518.28	850127.78	13537.12
570.10	926517.56	14656.66
621.93	1067466.11	1654.31

## ANEXO 11

**GRAFICO N° 03:** Relación lineal entre la concentración de las matrices enriquecidas con solución stock estándar de ácido caprílico y sus respectivas áreas promedio para hallar la pendiente "b" y consecuentemente los límites de detección y de cuantificación. CNCC-INS. Lima, Abril 2011.



Pendiente (b): 1893.4

Intercepto (a): -134917

Coefficiente de correlación (r): 0.9993

Coefficiente de determinación (r): 0.9987

LOD =  $3.3 \times D.S/b = 3.3 \times 16540.3 / 1893.362 = 28.83 \mu\text{g/mL}$

LOQ =  $10 \times D.S/b = 3.3 \times 16540.3 / 1893.362 = 87.36 \mu\text{g/mL}$

## ANEXO 12

CUADRO Nº 15 Valores obtenidos de la regresión lineal de las matrices enriquecidas con solución stock estándar de ácido caprílico y sus respectivas áreas promedio. CNCC-INS. Lima, Abril 2011.

Análisis de Varianza	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	Desviación Estándar
Regresión	1	1,05921E + 12	
Residuos	9	152340182,6	12342,61652
Total	10		



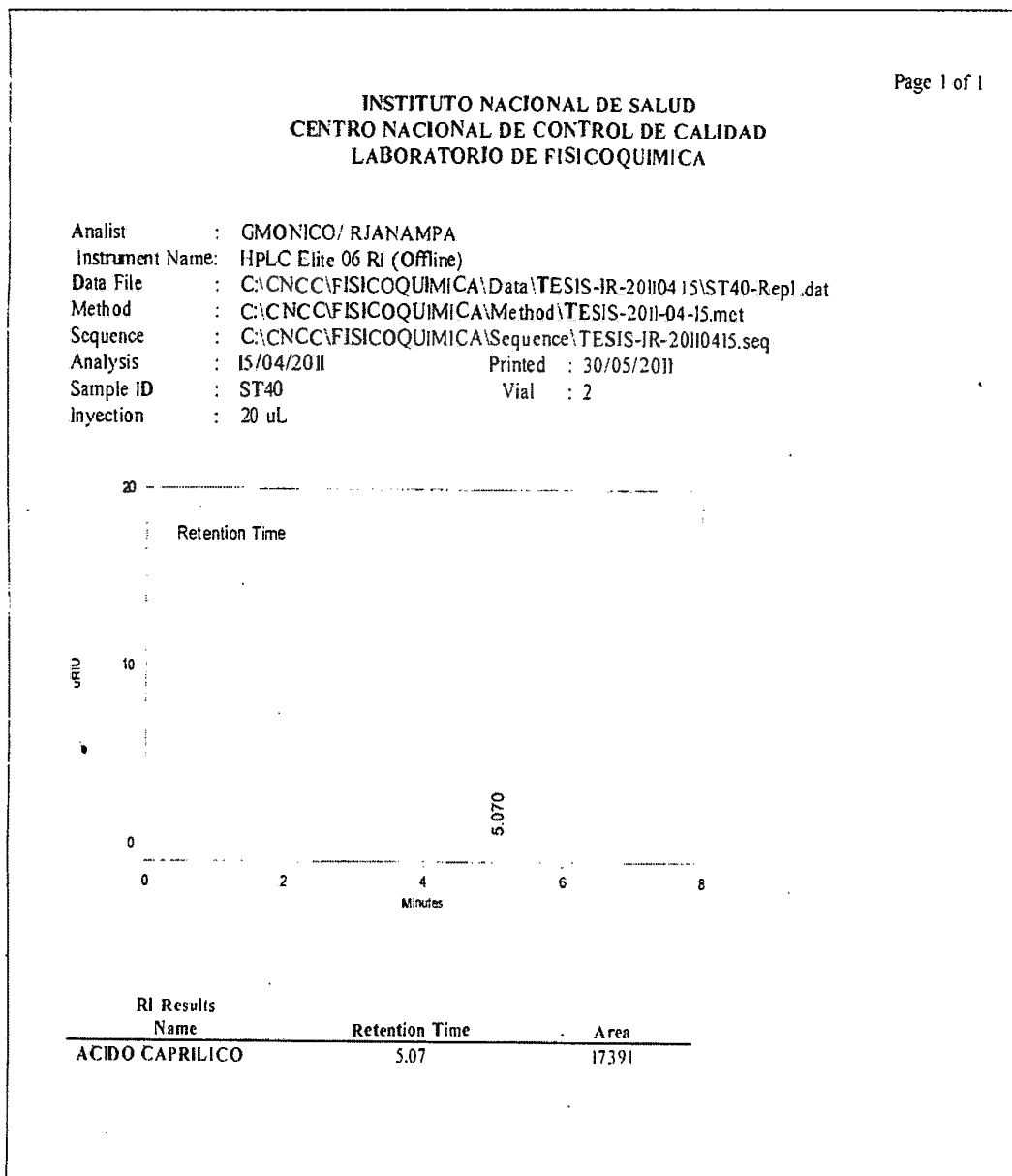
### ANEXO 13

CUADRO Nº 16 Tiempos de retención de las diferentes soluciones de trabajo, para determinar la especificidad. Lima, Abril 2011.

Soluciones	Tiempo de retención	Tiempo de retención relativo (TRR)
Fase Móvil	Fase móvil : 3.58	---
Estándar	Fase móvil: 3.59	0.73
	Estándar : 4.93	1
Matriz Enriquecida	Fase móvil: 3.56	0.85
	Sustancia no identificada : 4.24	0.72
	Estándar : 4.95	1
Matriz diluida en Fase Móvil	Fase móvil : 3.53	---
	Sustancia no identificada : 4.26	---
Muestra filtrada (antisuero)	...	---

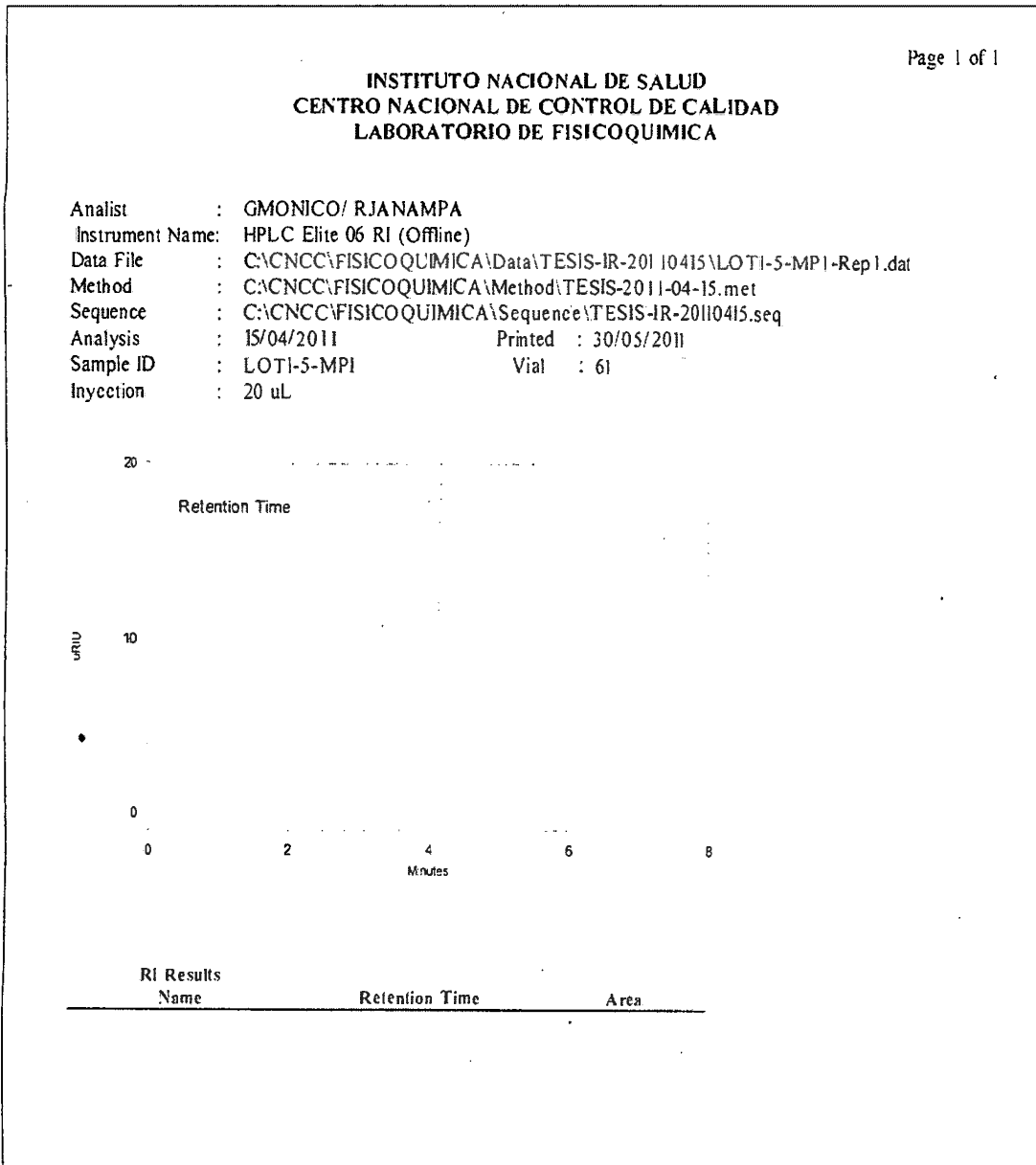
# ANEXO 14

**FIGURA Nº 4:** Cromatograma del estándar de ácido caprílico a 40 µg/mL.  
Concentración mínima detectable en el sistema. CNCC-INS. Lima, Abril 2011.



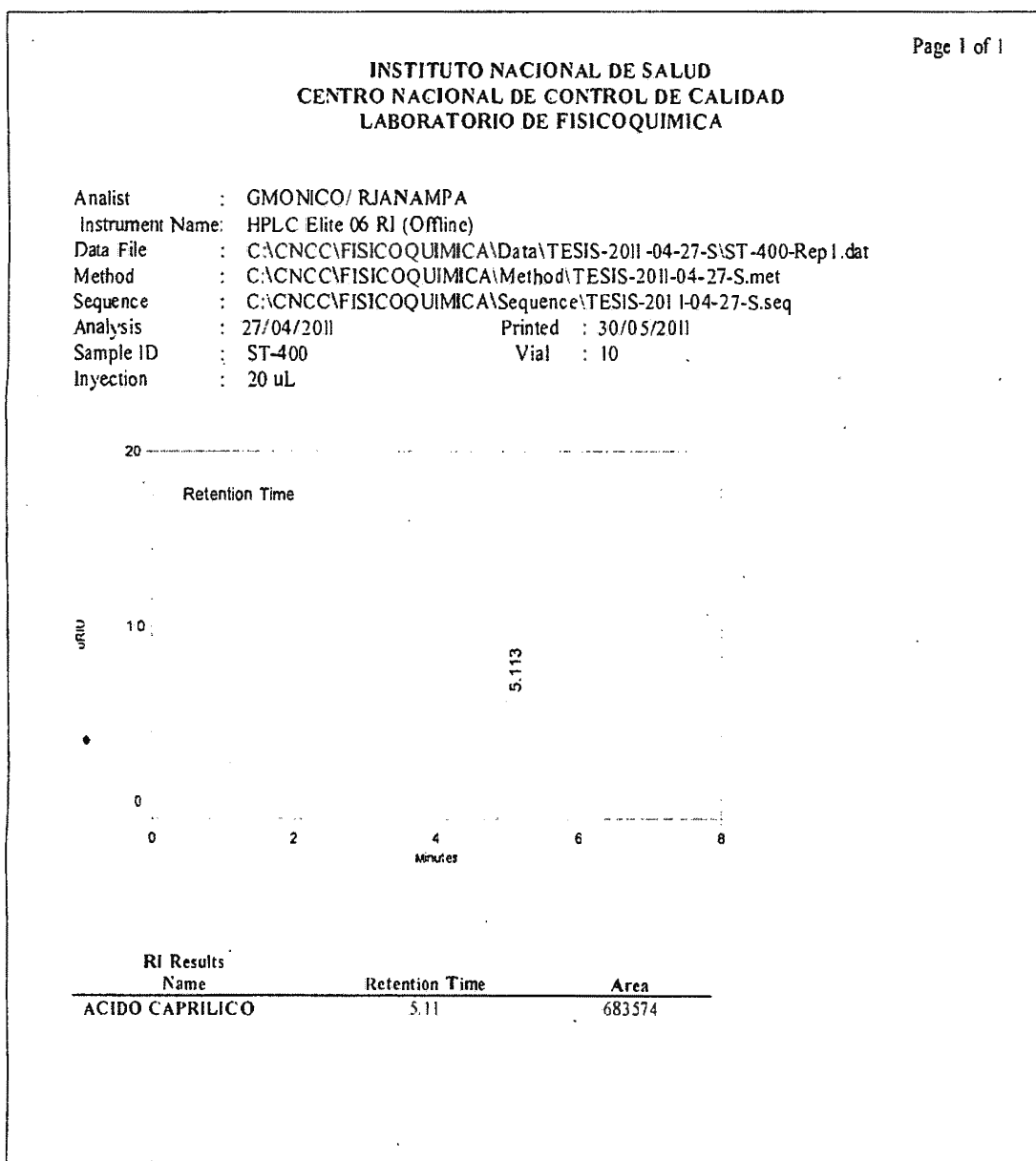
**ANEXO 15**

**FIGURA Nº 5:** Cromatograma de la matriz no enriquecida con solución stock estándar de ácido caprílico en fase móvil: 5 en 10mL. CNCC-INS. Lima, Abril 2011.



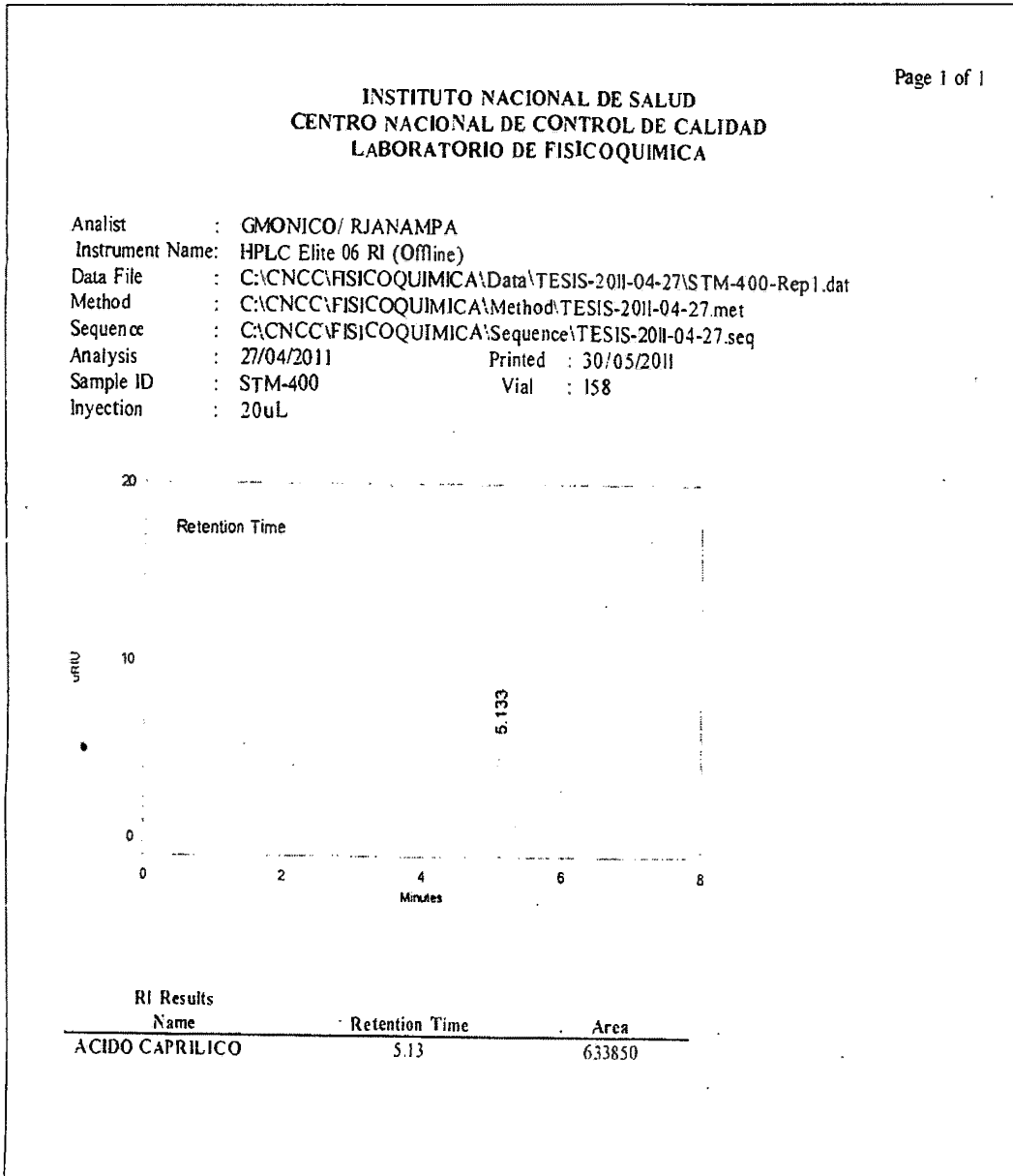
ANEXO 16

FIGURA Nº 6: Cromatograma de la solución estándar de ácido caprílico a 400 µg/mL  
CNCC-INS. Lima, Abril 2011.



## ANEXO17

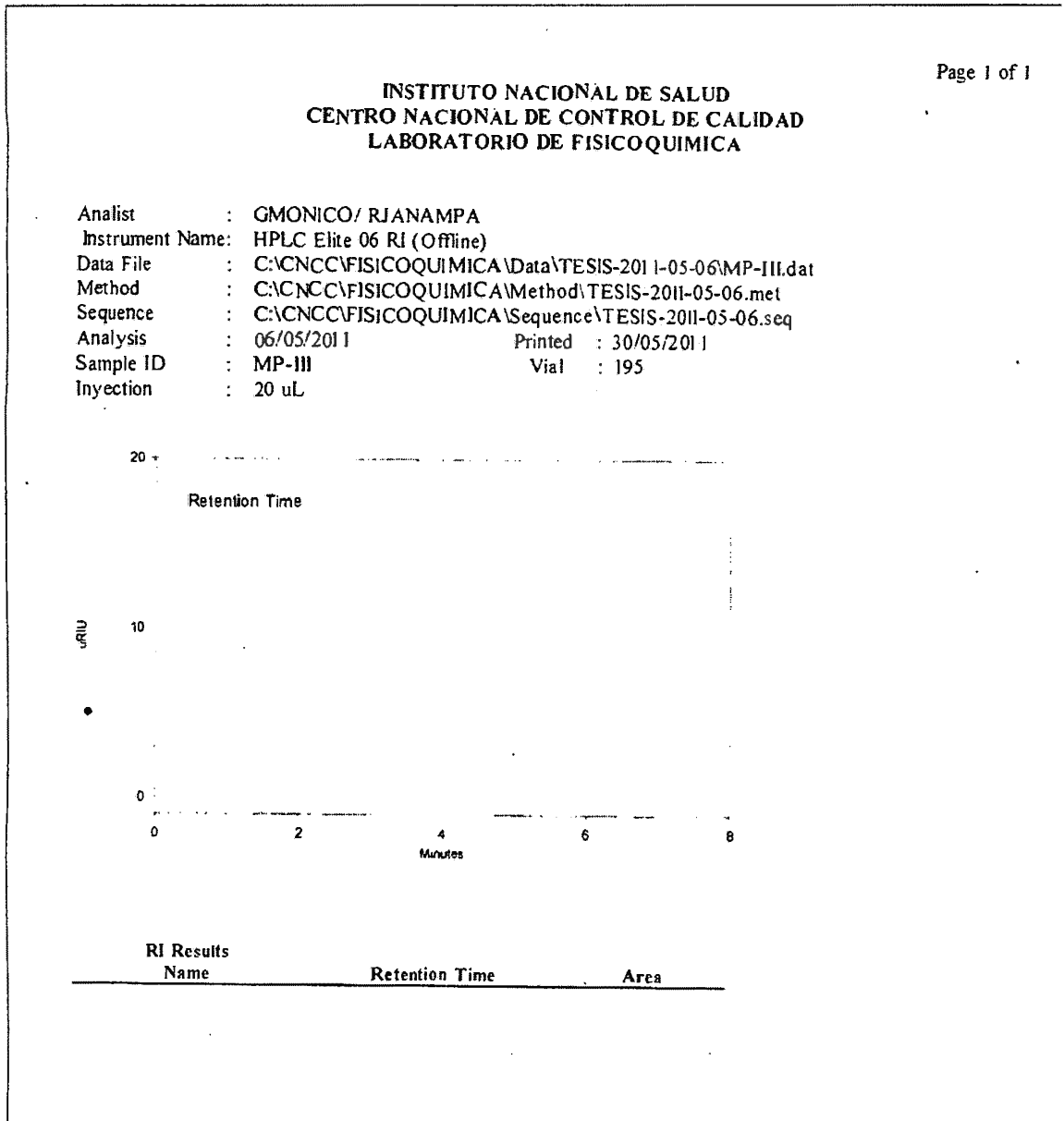
**FIGURA Nº 7:** Cromatograma de la matriz enriquecida con solución stock estándar de ácido caprílico estándar de ácido caprílico a 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  . CNCC-INS. Lima, Abril 2011.



ANEXO 18

FIGURANº 8: Cromatograma de la matriz pura (antisuero) filtrado en el sistema.

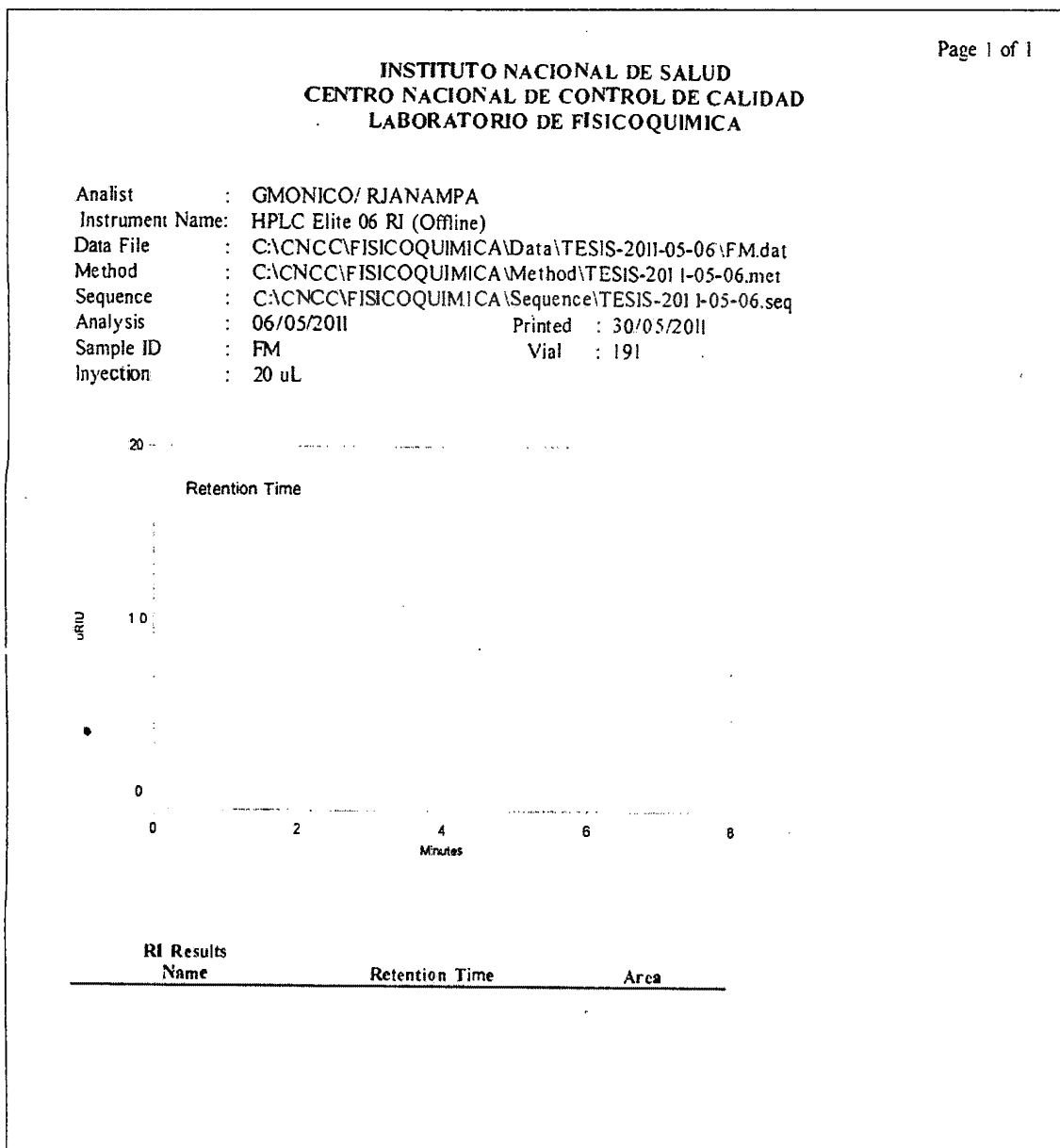
CNCC-INS. Lima, Abril 2011.



# ANEXO19

FIGURA N° 9: Cromatograma de la fase móvil filtrado en el sistema. CNCC-INS.

Lima, Abril 2011.



ANEXO 20

CUADRO Nº 18 Tabla estadística de la distribución "t" de Student

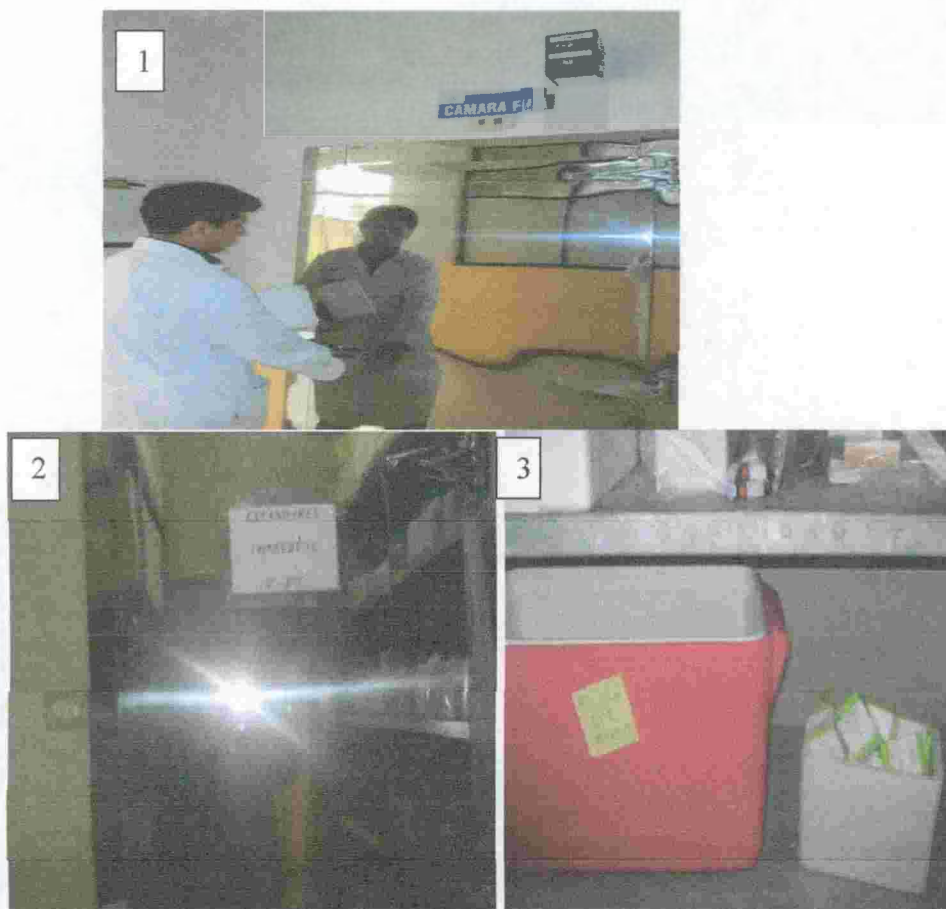
$\alpha$ $\nu$	0.100	0.050	0.025	0.010	0.005	0.001
1	6.314	12.706	25.452	63.657		
2	2.920	4.303	6.205	9.925	14.069	31.598
3	2.353	3.182	4.176	5.841	7.453	12.941
4	2.132	2.776	3.495	4.604	5.598	11.610
5	2.015	2.571	3.163	4.032	4.773	6.859
6	1.943	2.447	2.969	3.707	4.517	6.959
7	1.895	2.365	2.841	3.499	4.029	5.405
8	1.860	2.306	2.752	3.355	3.832	5.041
9	1.833	2.262	2.685	3.250	3.690	4.781
10	1.812	2.228	2.634	3.169	3.581	4.587
11	1.796	2.201	2.593	3.106	3.497	4.437
12	1.782	2.179	2.560	3.055	3.428	4.318
13	1.771	2.160	2.533	3.012	3.372	4.221
14	1.761	2.145	2.510	2.977	3.326	4.140
15	1.753	2.131	2.490	2.947	3.286	4.073
16	1.746	2.120	2.473	2.921	3.252	4.015
17	1.740	2.110	2.458	2.898	3.222	3.965
18	1.734	2.101	2.445	2.878	3.197	3.922
19	1.729	2.093	2.433	2.861	3.174	3.883
20	1.725	2.086	2.423	2.845	3.153	3.850
21	1.721	2.080	2.414	2.831	3.135	3.811
22	1.717	2.074	2.406	2.819	3.118	3.792
23	1.714	2.069	2.398	2.807	3.104	3.767
24	1.711	2.064	2.391	2.797	3.090	3.745
25	1.708	2.060	2.385	2.787	3.078	3.725
26	1.706	2.056	2.379	2.779	3.067	3.707
27	1.703	2.052	2.373	2.771	3.056	3.690
28	1.701	2.048	2.368	2.763	3.047	3.674
29	1.699	2.045	2.364	2.756	3.038	3.659
30	1.697	2.042	2.360	2.750	3.030	3.646
35	1.690	2.030	2.342	2.724	2.996	3.591
40	1.684	2.021	2.329	2.704	2.971	3.551
45	1.680	2.014	2.319	2.690	2.952	3.520
50	1.676	2.008	2.310	2.678	2.937	3.496
55	1.673	2.004	2.304	2.669	2.925	3.476
60	1.671	2.000	2.299	2.660	2.915	3.460
70	1.667	1.994	2.290	2.648	2.889	3.435
80	1.665	1.989	2.284	2.638	2.887	3.416
90	1.662	1.986	2.279	2.631	2.878	3.402
100	1.661	1.982	2.276	2.625	2.871	3.390
120	1.658	1.980	2.270	2.617	2.860	3.373
Ley normal	1.645	1.960	2.241	2.576	2.807	3.291



## ANEXO N° 21

FIGURAN° 04: Almacenamiento del antisuero en la cámara fría. CNCC-INS.

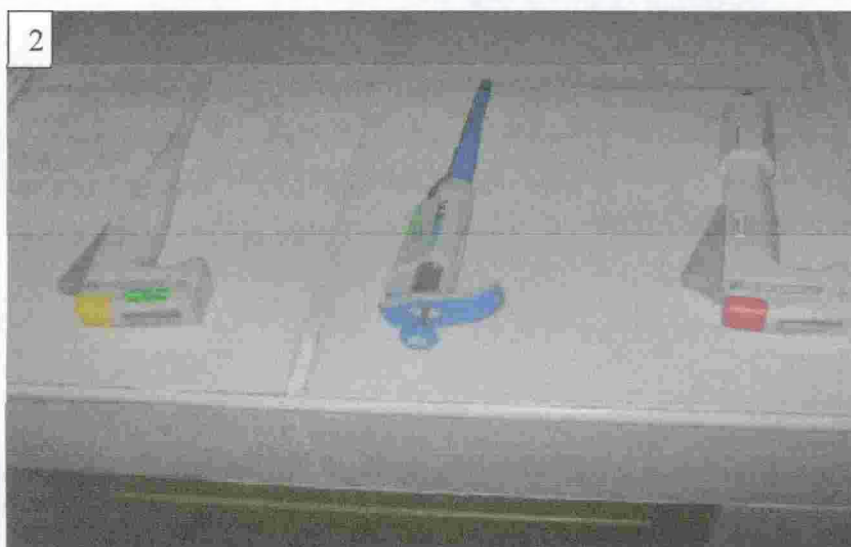
Lima, Abril 2011.



1. Ingreso a la Pre-Cámara.
2. Cámara fría (T°:2-8°C)
3. Almacenamiento de los antisueros en un cooler

## ANEXO Nº 22

FIGURA Nº 05: Accesorios para el pesaje del ácido caprílico. CNCC-INS. Lima, Abril 2011.



1. Balanza Analítica Electrónica.
2. Micropipetas para la medición de antisuero

## ANEXO N° 23

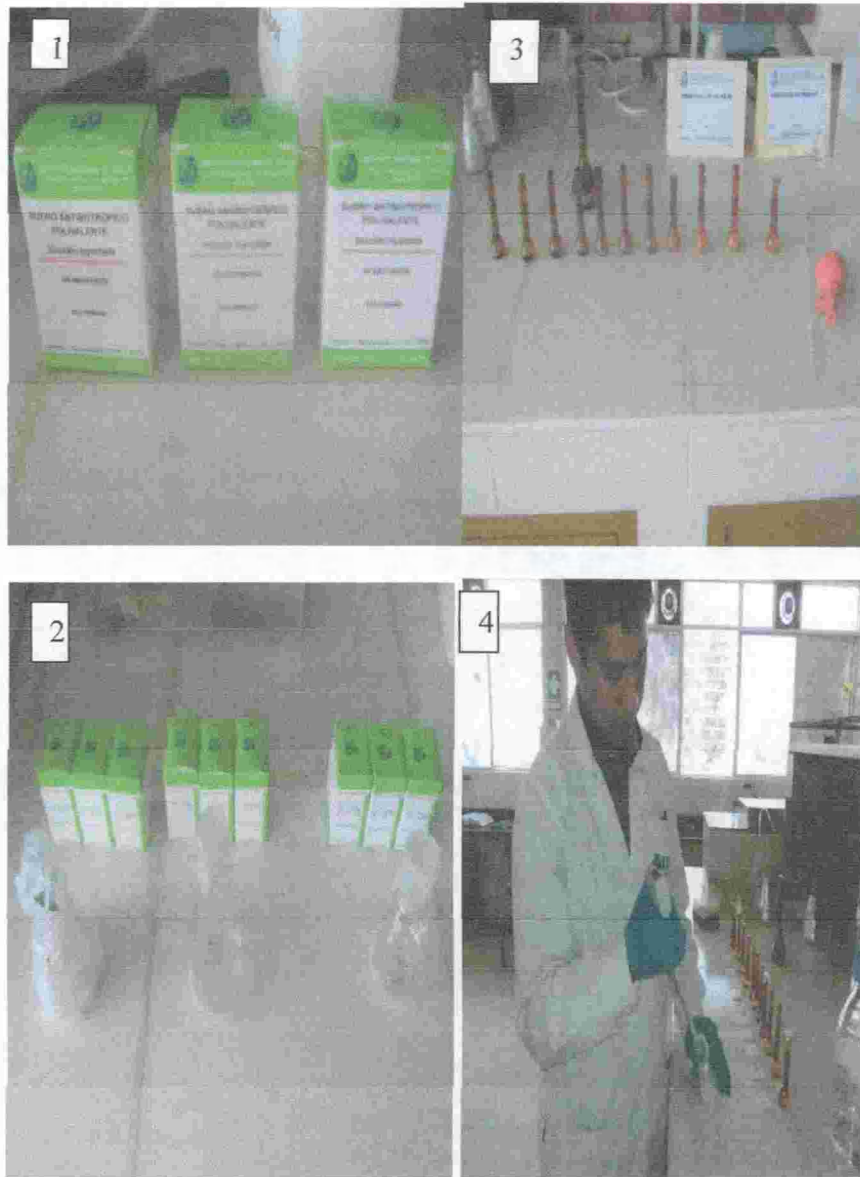
FIGURA N° 06: Filtración de agua y fase móvil. CNCC-INS. Lima, Abril 2011.



1. Purificador de agua.
2. Filtración al vacío de la fase móvil

## ANEXO Nº 24

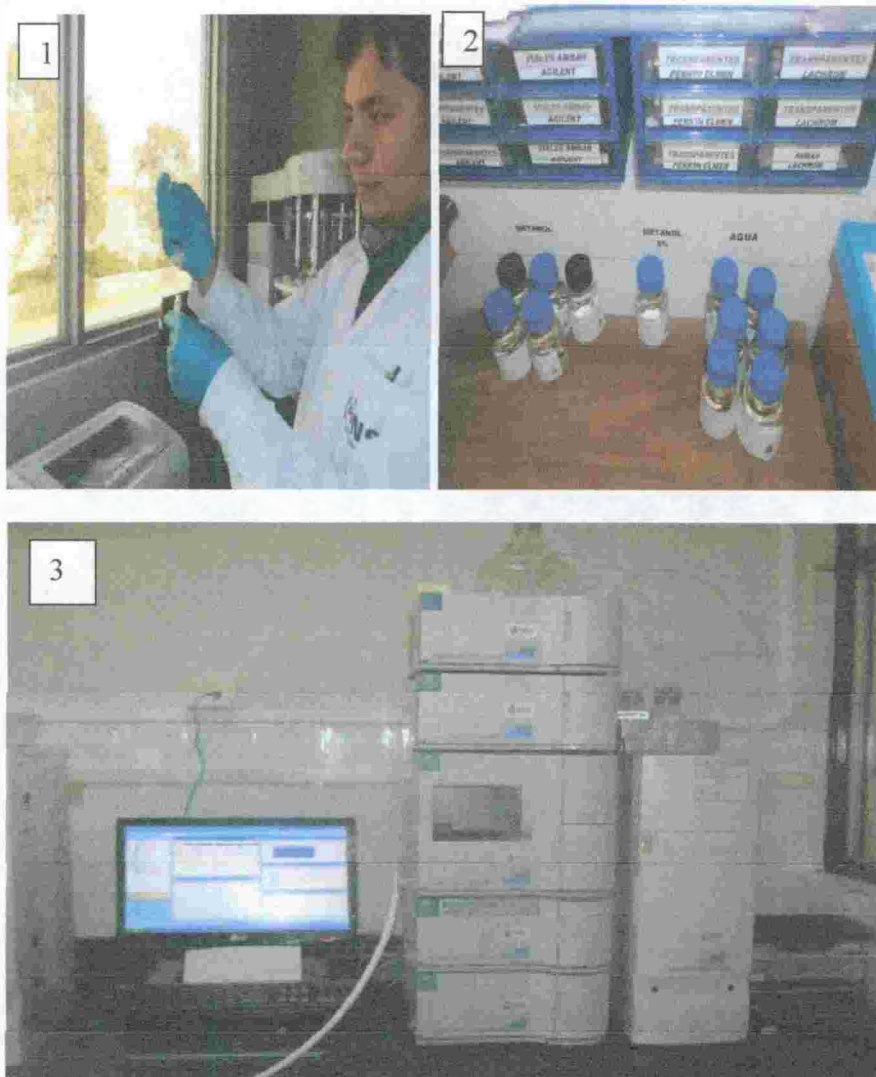
FIGURANº 06. Preparación las curvas estándar y matrices enriquecidas con solución stock estándar de ácido caprílico. CNCC-INS. Lima, Abril 2011.



1. Los tres lotes del antisuero a analizar.
2. Preparación de un pool de cada lote.
3. Preparación de la primera curva estándar.
4. Preparación de la curva matriz

## ANEXO Nº 25

FIGURA Nº 06. Filtración de los estándares, muestras y matrices enriquecidas con solución stock estándar de ácido caprílico. CNCC-INS. Lima, Abril 2011.



1. Filtración de los estándares y muestras para su lectura en el HPLC.
2. Solventes de la fecha de análisis (los solventes se filtran todos los días).
3. HPLC, marca Lachrom Elite, con detector de índice de refracción.

**TÍTULO:** Desarrollo y validación del método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la determinación cuantitativa de ácido caprílico en antisueros.

**Autor :** JANAMPA CANCHARI, Romao Gonzalo.

TÍTULO	OBJETIVOS	PROBLEMA	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES	METODOLOGIA
<p>Desarrollo y validación del método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la determinación cuantitativa de ácido caprílico en antisueros.</p>	<p><b>GENERAL</b> * Desarrollar y validar el método analítico para la determinación de ácido caprílico en antisueros por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)</p> <p><b>ESPECIFICOS</b> * Desarrollar y validar el método analítico para la determinación de ácido caprílico en antisueros. * Determinar la linealidad, la precisión, exactitud y la especificidad del método para la cuantificación de ácido caprílico en antisueros. * Determinar la sensibilidad (límite de detección y cuantificación del método) para la cuantificación de ácido caprílico en antisueros.</p>	<p>Los parámetros del desarrollo y validación del ácido caprílico en antisueros por el método de cromatografía líquida de alta resolución, estarán dentro de las especificaciones establecidas por el protocolo de validación.</p>	<p><b>-DESARROLLO -VALIDACIÓN.</b> Programa documentado que asegura que un proceso determinado proporciona de forma homogénea y reproducible un producto que cumple con las especificaciones previamente establecidas. <b>-CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC)</b> <b>-ÁCIDO CAPRÍLICO</b> Es un ácido graso saturado de ocho carbonos que se le conoce con el nombre químico de ácido octanoico. Se encuentra naturalmente en la leche de los seres humanos, en los bovinos (vacas), aceite de coco y aceite de palma. La FDA ha aprobado la inclusión del ácido caprílico en la lista GRAS (generalmente reconocido como seguro)</p> <p><b>-ANTISUEROS -SUERO ANTIBOTRÓPICO -POLIVALENTE -MÉTODOS DE PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS EN MATRICES BIOLÓGICAS.</b></p>	<p>Los parámetros del desarrollo y validación de ácido caprílico en antisueros por el método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) se encuentran dentro de las especificaciones establecidas en el protocolo de validación.</p>	<p><b>Variable Independiente:</b> Desarrollo y validación por HPLC. <b>Variable Dependiente:</b> Acido caprílico Antisueros <b>Indicadores :</b> Linealidad, exactitud, precisión, especificidad, límite de detección y el límite de cuantificación.</p>	<p><b>Población:</b> Acido caprílico en antisueros <b>Muestra:</b> 20 viales de antisueros de tres lotes diferentes <b>Método:</b> Determinación cuantitativa por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) <b>Análisis estadístico Linealidad</b> Cálculo de la recta de regresión lineal, por el método de mínimos cuadrados. <b>Exactitud y precisión</b> Se determina por el método de recuperación para la exactitud, las desviaciones estándar y estándar relativa para la precisión. <b>Límites de detección y cuantificación</b> La mínima cantidad de analito detectable y la mínima cantidad de analito cuantificable. <b>Especificidad</b> La no interferencia de la fase móvil ni la muestra matriz en la cuantificación de ácido caprílico.</p>

## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS R.D No.085-2012-FDB-D


*Bachiller : ROMAO GONZALO JANAMPA CANCHARI*

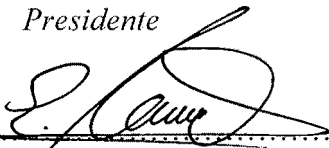
*En la ciudad de Ayacucho, siendo las doce del medio del día jueves tres de mayo del dos mil doce, en el auditorio de la Facultad de Ciencia Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristobal de Huamanga, reunidos los docentes bajo la Presidencia del Doctor Tomás Castro Carranza en su condición de Decano de la Facultad de Ciencias Biológicas, y con la asistencia de los miembros : Mg. Edwin Enciso Roca, Edgar Cárdenas Landeo y Maricela López Sierralta, quién además actuó como secretaria Docente y Asesora del trabajo de Investigación Titulado : "Desarrollo y Validación del Método Analítico por Cromatografía Líquido de alta Resolución (HPLC) para la determinación cuantitativa del Acido Caprílico en Antisueros.Limna 2009, presentado por el Bachiller en Farmacia y Bioquímica (Resolución No.151-2010-UNSCH-CU.) quién presentó optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico.*

*El Decano autoriza el inicio del acto de sustentación informando al sustentante el tiempo de disertación, luego de la exposición en el tiempo correspondiente, el jurado calificador procedió a realizar las observaciones y presentar que crean conveniente, luego el decano solicitó al sustentante y público en general para que abandone el auditorio y el jurado pueda deliberar y emitir la calificación correspondiente :*

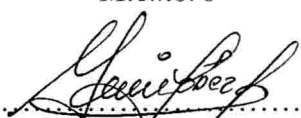
JURADO CALIFICADOR	EXPOSICIÓN	PREGUNTAS RPTAS	PROMEDIO
Mg. Edwin ENCISO ROCA	16	17	17
Mg. Maricela LÓPEZ SIERRALTA	18	18	18
Mg. Edgar CÁRDENAS LANDEO	17	17	17

*El sustentante obtuvo la nota promedio de diecisiete (17) de lo cuál dan fe los miembros, estampando su firma al pie de la presente. Concluye el acto siendo las do y quince de la tarde.*

  
.....  
Dr. Tomás Castro Carranza  
Presidente

  
.....  
Mg. Edgar Cardenas Landeo  
Miembro

  
.....  
Mg. Edwin Enciso Roca  
Miembro

  
.....  
Mg. Maricela López Sierralta  
Miembro - Asesor  
Secretaria-Docente