



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA
DETERMINACIÓN DE $F(Ab')_2$ Y FAB POR HPLC DE
EXCLUSIÓN MOLECULAR EN PRODUCTO TERMINADO
DE FABOTERAPICO.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ISRAEL CANCHOLA RAMÍREZ

DIRECTOR DE TESIS: OFB ALEJANDRO ALCÁNTARA PINEDA

ASESOR INTERNO: M en Biot. LOURDES A. SANTANA CASTILLO



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

Agradezco a mis padres por todo su amor y comprensión, a sus enseñanzas que me han otorgado, por impulsarme y enseñarme el camino para lograr mis metas. Con todo mi amor, cariño y henchido el pecho de orgullo les doy gracias por su apoyo para mi formación personal y profesional.

A mis hermanos Lizbeth, Izchel y Sergio por su cariño y apoyo, con ellos se forma la mejor de las familias.

A mis queridos maestros Alex y Lulú que me han permitido trabajar a su lado y quienes han impulsado mi carrera profesional. Con su apoyo he logrado culminar este ciclo en mi vida profesional.

A mis amigos, ya hermanos Miguel, Cesar y Carlos, quienes me han concedido crecer a su lado.

INDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	FUNDAMENTACIÓN TEORICA	3
2.1	Alacranismo	3
2.2	Faboterapia	4
2.3	Cromatografía de exclusión molecular como método analítico	9
2.4	Validación de métodos analíticos	20
3.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
4.	OBJETIVOS	28
5.	HIPOTESIS	29
6.	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	30
7.	MATERIALES Y MÉTODO	31
7.1	Materiales	31
7.2	Reactivos	32
7.3	Muestras	32
7.4	Sustancias de referencia	32
7.5	Equipos e instrumentos	33
7.6	Preparación de la fase móvil	33
7.7	Preparación de la solución de adecuabilidad del sistema	34
7.8	Preparación de la solución interferente de IGG + IGG _T	34
7.9	Condiciones de corrida cromatográfica	35
7.10	Preparación e inyección de las muestras	35
7.11	Información de reporte y cálculos	36
7.12	Estudio de precisión y adecuabilidad del sistema	37
7.13	Linealidad individual del sistema	37
7.14	Linealidad combinada del sistema	38
7.15	Estudio de especificidad	39
7.16	Estudio de selectividad	40
7.17	Estudio de exactitud, repetibilidad y linealidad	41
7.18	Estudio de proteínas interferentes en la exactitud	43
7.19	Estudio de precisión intermedia	45
7.20	Estudio de estabilidad analítica de la muestra	47
7.21	Estudio de tolerancia	48
7.22	Estudio de robustez	49

8.	RESULTADOS	
8.1	Presición y adecuabilidad del sistema	52
8.2	Linealidad individual del sistema	53
8.3	Linealidad combinada del sistema	57
8.4	Estudio de especificidad	59
8.5	Estudio de selectividad	61
8.6	Estudio de exactitud, repetibilidad y linealidad	63
8.7	Estudio de proteínas interferentes en la exactitud	73
8.8	Estudio de precisión intermedia	78
8.9	Estudio de estabilidad analítica de la muestra	85
8.10	Estudio de tolerancia	90
8.11	Estudio de robustez	94
9.	ANÁLISIS DE RESULTADOS	98
10.	CONCLUSIONES	102
11.	BIBLIOGRAFIA	103

1. INTRODUCCIÓN.

El desarrollo de nuevos productos en la industria Biofarmacéutica basados en proteínas y péptidos con acción terapéutica requiere la innovación e implementación de nuevas metodologías analíticas. Este es el caso de los faboterápicos, que son inmunoglobulinas purificadas y digeridas con pepsina presentadas como fragmentos de $F(ab')_2$, este grupo de medicamentos corresponden a la seroterapia de tercera generación la cual se presenta como una solución al problema de alacranismo en México.

Así pues es determinante que en el laboratorio de control de calidad se obtengan análisis con resultados confiables de manera eficiente y eficaz, por tal motivo se desarrollan y validan nuevos procedimientos analíticos que confirmen la calidad en el producto.

Dentro de las técnicas más utilizadas en el análisis de proteínas y péptidos en la industria farmacéutica se encuentra la cromatografía líquida de alta resolución de exclusión molecular (CEM). Usualmente a esta técnica se le han asignado diferentes términos dependiendo del campo de aplicación: En bioquímica y áreas relacionadas, el término cromatografía de filtración en gel (CFG) es usual, mientras que en el análisis de síntesis de polímeros, cromatografía de permeación en gel (CPG) es comúnmente utilizado.

El fundamento de la cromatografía de exclusión molecular es la forma conceptual y mecanística más simple de la cromatografía. En condiciones ideales los analitos no interaccionan con la superficie del empaquetado de la columna, pero son separados por su capacidad para penetrar los poros de la matriz en la columna, esto es que pequeños analitos penetran dentro de pequeños poros a los cuales grandes analitos no pueden ingresar, así de esta manera las partículas pequeñas exploran una larga fracción de

volumen dentro de los poros. Es decir las moléculas grandes eluyen primero seguidas por las pequeñas.

El desarrollo y aplicación de nuevos métodos analíticos para el análisis y liberación de productos a granel y producto terminado en la industria Biofarmacéutica, requieren de ser validados de acuerdo a las buenas prácticas de manufactura para asegurar la fiabilidad de la aplicación analítica del método.

Trabajar con métodos validados es una práctica que permite no sólo la confianza y seguridad en los resultados sino además permite cumplir con las exigencias legales a nivel nacional e internacional con el fin de asegurar la calidad y eficacia del producto.

La validación de un método parte de su clasificación analítica y según su aplicación se pueden evaluar los parámetros de desempeño: Adecuabilidad, Linealidad, Exactitud, Precisión (Repetibilidad, Precisión intermedia), Selectividad, Especificidad, Tolerancia, Robustez, Límite de detección y cuantificación.

2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.

2.1 ALACRANISMO.

Los envenenamientos por animales ponzoñosos son un verdadero problema de salud pública. México es uno de los países con mayor incidencia de alacranismo en el mundo, donde se encuentran distribuidas 7 especies peligrosas del genero *Centruroide* (Figura 1). Las consecuencias del alacranismo han sido subestimadas debido a que existe un subregistro en las estadísticas, por no tratarse de un daño a la salud de notificación obligatoria. En el 2005 los estados de Morelos, Jalisco, Puebla, Guerrero, Colima y Michoacán contribuyeron con el mayor número de casos.¹

El veneno de alacrán es una mezcla de toxinas, de las que sólo algunas ocasionan envenenamiento, de leve hasta mortal, en los humanos. Las toxinas tienen afinidad por el sistema nervioso a nivel de los canales iónicos de sodio, potasio y calcio, prolongando así el potencial de acción de la membrana celular y aumentando la liberación de la acetilcolina y catecolaminas a nivel simpático, parasimpático y de terminaciones nerviosas. Los efectos principales son neurotóxicos y cardiotoxicos.²



Figura 1. Distribución del género *Centruroides* en México y Estados Unidos de América. En rojo se muestra la zona de distribución de escorpiones del género *Centruroides*.

2.2 FABOTERAPIA.

Los anticuerpos fueron descubiertos en 1890, cuando Behring y Kitasato demostraron que el suero (la porción fluida de la sangre coagulada) de animales inmunizados con toxina diftérica o con toxina tetánica contenía agentes protectores. Al inyectar suero inmune junto con una dosis letal de toxina a animales susceptibles estos sobrevivieron, en tanto que los animales control, que recibieron toxina pero no suero, murieron. Había nacido entonces la seroterapia, razón por la que se le dio a Behring el primero de los premios Nobel en Medicina y Fisiología.³ En París, otro investigador Emilio Roux, repite

la experiencia el 10. de Febrero de 1894; esta vez utiliza antitoxina diftérica producida en caballos. De manera vertiginosa se extiende el uso del suero antidiftérico con la consecuente disminución de la mortalidad asociada en niños. Los antivenenos surgieron muy poco después. C. Phisalix y G. Bertrand por un lado y Albert Calmette por otro, también en 1894, inmunizan caballos con veneno de serpientes europeas y cobras asiáticas, y demuestran la utilidad de los sueros equinos en el tratamiento de mordidos por serpientes.⁴

Cuando un paciente recibe un suero inmune se dice que ha sido inmunizado pasivamente, condición que contrasta con la inmunización activa que resulta de la exposición directa a un patógeno o toxina. Las moléculas activas de los sueros inmunes (antisueros) son los anticuerpos. Un anticuerpo es una proteína que se une específicamente a una sustancia en particular, su antígeno.

Cada molécula de anticuerpo tiene dos sitios capaces de interactuar con el antígeno correspondiente, sin embargo, todos los anticuerpos tienen la misma estructura general y a su conjunto se les llama inmunoglobulinas. Existen varias clases de inmunoglobulinas, denominadas IgG, IgM, IgD, IgA e IgE, de las cuales las más abundantes en la circulación sanguínea son las IgG, además son éstas las que corresponden a una respuesta inmune madura y por tanto incluyen la gran mayoría de los anticuerpos que se producen comercialmente. Todas las IgG tienen una misma estructura general (Figura 2) compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas, dos pesadas (H) y dos ligeras (L) que se encuentran unidas entre sí por puentes de disulfuro. A su vez, las dos cadenas pesadas se encuentran unidas entre sí por otros dos puentes de disulfuro en lo que se conoce como región bisagra, aproximadamente a la mitad de la longitud de las cadenas. Un poco más hacia la región amino terminal, cada cadena pesada se une mediante un puente de disulfuro con una cadena ligera. Cada cadena pesada tiene tres regiones constantes C1, C2 y C3, las dos últimas de la región carboxi terminal (antes de la bisagra) y la primera en la región amino terminal (inmediatamente después de la bisagra) y una región variable (Vn) en el extremo amino terminal, mientras que cada cadena ligera tiene sólo una región

constante CL en el extremo carboxi terminal y una región variable VL en el extremo amino terminal.

El papel principal de los anticuerpos es el de incrementar grandemente la eficacia de los mecanismos normales de resistencia hacia un agente específico. Por ejemplo, un antisuero dirigido contra una bacteria contiene anticuerpos que cubren la superficie de la célula bacteriana y la vuelven más susceptible a la fagocitosis; en muchos casos, la cubierta de anticuerpos, permite también que la bacteria pueda ser destruida por el sistema del complemento.

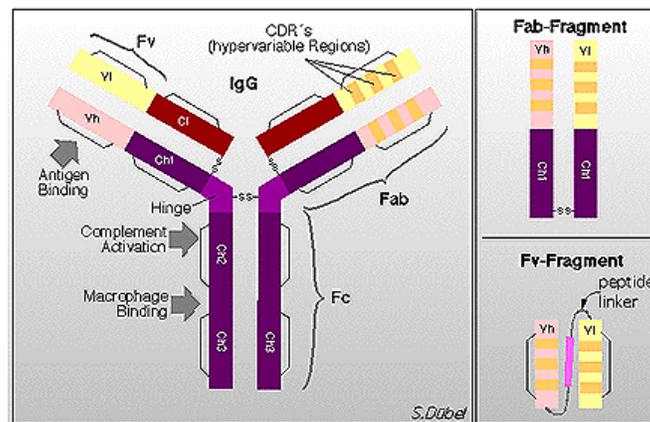


Figura 2. Molécula de IgG.

Los anticuerpos protegen no sólo contra las invasiones bacterianas sino también contra la acción de toxinas bacterianas y de ponzoñas de animales venenosos. Si un animal es inmunizado con una toxina desarrollará anticuerpos capaces de combinarse con la misma y neutralizarla, esto es, la hará no tóxica. Un suero que contiene tales anticuerpos es llamado antitoxina (e.g., contra la toxina tetánica); un suero con anticuerpos dirigidos contra los diferentes componentes de un veneno animal es llamado antiveneno (e.g., contra el veneno de alacrán).⁵

Los seroterápicos de primera generación, se utilizaron hasta los primeros años de la década de los 30s, si bien aún quedan productores que los siguen preparando. Hasta entonces, las antitoxinas y antivenenos eran los sueros crudos provenientes de caballos hiperinmunizados. Es decir, a los pacientes se les administraban multitud de proteínas séricas irrelevantes que acompañaban a los anticuerpos. Con tales seroterápicos, las reacciones alérgicas y la enfermedad del suero eran muy frecuentes; por ejemplo, se estima que la frecuencia de la enfermedad del suero en los cientos de miles de niños tratados con antitoxina diftérica fue de alrededor del 50%. Esta incidencia se redujo substancialmente con el fraccionamiento de las inmunoglobulinas mediante su precipitación con diversas sales y otros agentes precipitantes. El proceso de precipitación separa, de manera muy eficiente, a las inmunoglobulinas de otras proteínas séricas entre las que destaca la albúmina por su capacidad de inducir reacciones adversas. Los productos constituidos por inmunoglobulinas altamente enriquecidas son la base para la seroterapia de segunda generación que todavía se utiliza ampliamente a nivel mundial.⁶

Posteriormente, en las décadas de los 40s y 50s, se estudió el efecto de varias enzimas proteolíticas sobre las inmunoglobulinas. El resultado principal de estas investigaciones fue el conocimiento de que la función neutralizante de los anticuerpos (la que interacciona con las toxinas y moléculas de los venenos) puede dissociarse de las llamadas funciones efectoras de los anticuerpos (que son las responsables de varios de los efectos secundarios de la seroterapia).

Cuando las IgG son digeridas enzimáticamente, se obtienen diferentes fragmentos, dependiendo la enzima que se emplea, es decir si se utiliza papaína, se obtienen tres fragmentos, el fragmento cristizable (Fc) y dos fragmentos de unión a antígeno (Fab) y si se empleó pepsina, se obtienen un fragmento F (ab) 2, mientras que el fragmento cristizable es digerido. Lo anterior se debe a que la papaína corta las cadenas pesadas inmediatamente después (hacia la región amino terminal) de la bisagra, mientras que la pepsina lo hace antes (hacia la región carboxi terminal) de la bisagra.

Los Fab y F(ab)₂ son los fragmentos que conservan la capacidad de unir específicamente el antígeno que los originó y los F(ab)₂ además, lo precipitan, mientras que la fracción Fc de los anticuerpos normalmente actúa como un marcador señal para macrófagos y la activación de linfocitos para que reconozcan y fagociten al complejo antígeno-anticuerpo. (Figura 3)

La modificación proteolítica, además, reduce el tamaño de las inmunoglobulinas y sus propiedades inmunogénicas y antigénicas. Las inmunoglobulinas purificadas y digeridas con pepsina, es decir, como fragmentos F(ab')₂, constituyen la aparición de la seroterapia de tercera generación o Faboterapia. El uso de faboterápicos prácticamente ha eliminado las reacciones de hipersensibilidad de tipo inmediato (anafilaxia) y de tipo tardío (enfermedad del suero).⁷

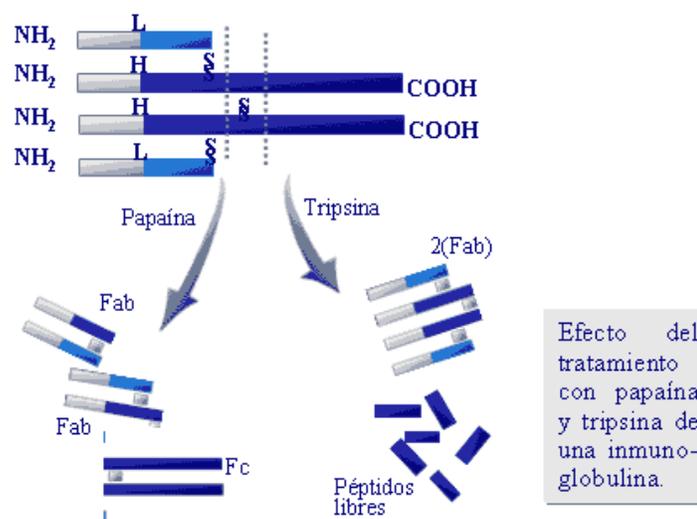


Figura 3. Método de obtención de los fragmentos Fab₂

Otra ventaja de los fragmentos F(ab')₂ (100 KD) sobre las inmunoglobulinas IgG (250 KD) es que llegan mejor al compartimento extravascular, lo que permite la neutralización eficiente de muchos componentes de los venenos que actúan fuera del torrente circulatorio. Los antivenenos también pueden estar constituidos por fragmentos Fab (50 KD) resultantes de la digestión de inmunoglobulinas con papaína; sin embargo, los fragmentos Fab tienen una vida media muy corta ya que, por su menor peso

molecular, se eliminan rápidamente por orina. Este hecho lleva a rebotes de envenenamiento y a la necesidad de aplicar más dosis de antiveneno a lo largo de varios días.⁸

2.3 CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR COMO MÉTODO ANALÍTICO.

Los orígenes de CEM datan de los principios de los 90's. En 1959 Porath y Flodin describieron la separación de macromoléculas solubles en agua sobre geles de povidextranso. En cuanto esos geles habían sido disponibles comercialmente, fueron extensamente usados para separar biomoléculas por la nueva técnica a la que fue llamada cromatografía de filtración en gel (CFG), típicamente en sistemas de baja presión.

En 1964 J.C. Moore de la compañía Dow Chemical, revela la separación de polímeros sintéticos sobre empaquetados de geles de poliestireno en fases orgánicas móviles. A esta nueva técnica le fue llamada cromatografía de permeación en gel (CPG) y muy pronto llegó a ser un método estándar para determinar la distribución de masa molar (MMDs) en polímeros.⁹

Componentes del sistema de cromatografía de exclusión molecular.

Existen considerables diferencias entre CEM y otros tipos de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), el criterio para conseguir alta resolución en CEM tiene algunas diferencias con respecto a las demás.¹⁰

Fase móvil.¹¹

El primer paso en la selección del sistema de separación de CEM, comienza por la elección de la fase móvil. Se necesita seleccionar una fase móvil en la que los analitos,

usualmente polímeros, sean solubles. Esto determina la selección de la fase estacionaria, específicamente se selecciona una columna diseñada para cromatografía de exclusión en fase orgánica o acuosa.

En general pocas observaciones pueden ser hechas en la selección de la fase móvil para cromatografía acuosa de exclusión molecular. Polímeros hidrofílicos neutros pueden ser analizados en agua o en algunos casos con pequeñas cantidades de sales adicionadas. Si el polímero es iónico, una sal definitivamente debe ser adicionada a la fase móvil para suprimir las interacciones iónicas entre el polímero y la fase móvil y/o el polímero consigo mismo.

La fase móvil en cromatografía de exclusión molecular debe ser un buen disolvente para el o los polímero(s) a separar e identificar, con el fin de evitar efectos de no exclusión. Además es importante disolver la muestra a la temperatura adecuada y no permitir la formación de agregados antes, durante y posterior a la inyección. Aunque en algunos casos, la adición de electrolitos puede ser necesaria para activar la disgregación.

Una cuestión importante en la fase móvil es el fenómeno de solvatación preferencial. Cuando un polímero se disuelve en una mezcla de disolventes, la composición de la fase móvil dentro de la columna puede ser diferente a como se encuentra en el exterior, debido a la diferencia en las interacciones de los polímeros con los componentes de la fase móvil dentro de la columna. Si aparece este fenómeno la separación en la columna de los agregados es diferente a la de los polímeros en donde no existe la solvatación preferencial.

Aunque este efecto ha sido conocido durante mucho tiempo, a menudo es descuidado por analistas, pero es aceptable si su contribución no varía a lo largo de la corrida analítica.

La bomba¹²

Una velocidad de flujo constante durante la corrida cromatográfica es muy importante en CEM debido a la relación logarítmica entre la masa molar y el volumen de elusión, ya que un cambio en la velocidad de flujo de sólo 0.1% puede causar un error en la determinación de masa molar de hasta el 10%. Para esto es requerida una bomba de buena calidad o compensación en la variación de flujo. Desafortunadamente, muchas bombas sólo pueden reproducir un flujo de 0.2-0.3%, y esta precisión puede ser reducida debido a fugas en el sistema o por un aumento desmedido de la presión dentro de la columna.

Ha habido intentos de determinar la velocidad de flujo midiendo el viaje de un pulso térmico a lo largo de un capilar, pero en general la precisión de estos dispositivos no es suficiente. El enfoque más eficiente y barato es la utilización de un patrón interno de bajo peso molecular en la calibración. Aunque en la calibración también se puede obtener midiendo el tiempo para llenar un matraz aforado o por el disolvente que pasa por el sistema en un tiempo definido.

Sin embargo, el conocimiento en la diferencia de la velocidad de flujo no es absolutamente necesario, siempre y cuando las variaciones en el flujo sean compensadas por el uso de un estándar interno. Es importante que esa corrección sólo funcione bien si el flujo es suficientemente constante durante la corrida cromatográfica.

Tipos de bomba

Básicamente, hay que distinguir entre dos tipos de bombas, de los cuales el desempeño puede variar considerablemente (así como su idoneidad para el desempeño en CEM).

Bombas de jeringa. Este tipo de bomba funciona como una gran jeringa, el émbolo que es impulsado por un tornillo como unidad de alimentación (usualmente por un motor de

pulsos), ofrece completamente flujo por pulsos, que es especialmente importante para los sistemas que usen un detector de viscosidad.

Bombas alternativas: este grupo comprende a casi todos los tipos de bombas disponibles en el comercio: las bombas de un solo pistón son baratas, pero no muy adecuadas para CEM, bombas de doble pistón pueden tener los pistones disponibles en serie o paralelo para este tipo de sistema.

La columna¹³

En general, uno puede dividir en dos categorías la cromatografía de exclusión molecular: CEM en solventes orgánicos y CEM en solventes acuosos. Para polímeros que son solubles en solventes orgánicos, son usadas comúnmente fases estacionarias de estireno-divinilbenzeno. Para proteínas que son solubles en eluentes acuosos son comúnmente utilizados empaquetados de metacrilatos hidrofílicos.

A diferencia de otros modos de HPLC, la eficacia de separación en CEM viene sólo de la fase estacionaria, mientras que la fase móvil no debe tener ningún efecto. La separación se produce en todo el volumen de los poros, que normalmente equivale aproximadamente al 40% del volumen total de la columna. Esto significa que a menudo largas columnas o conjuntos de varias columnas son necesarias. Por lo tanto, la elección correcta de la columna (s) para un determinado polímero es el punto crucial de la determinación en CEM.

Básicamente, existen diferentes tipos de columnas de CEM en el mercado. Los diámetros típicos en la columna son 7,5 - 8 mm de las columnas de análisis y de 22 – 25 mm para columnas preparativas. Habitualmente las longitudes en la columna son de 25, 30, 50, y de 60 cm. Recientemente, se han introducido columnas con un diámetro de 2 - 3 mm, lo que ahorra tiempo y disolvente.

Los empaques están basados tanto en sílice porosa o semirígida (altamente ligada entre sí), geles orgánicos en la mayoría de los casos copolímeros de estireno y divinilbenceno. Hay, sin embargo, otros basados en empaques disponibles con polímeros, que se pueden utilizar en diferentes fases móviles.

En general, los empaques basados en sílice son bastante robustos, en tanto los empaques orgánicos deben ser manejados con mayor cuidado.

Selección de columna en CEM.

En la selección de columnas para un determinado problema de separación en CEM, se puede elegir entre un gran número de columnas de diferentes fabricantes. Muchos fabricantes ofrecen columnas del mismo tipo, que son comparables y en ocasiones casi equivalentes.

La gama de separación debe ser seleccionando con cuidado, ya que no tiene sentido usar una columna con un límite de exclusión de 10 en el análisis de productos de bajos pesos moleculares. Por otra parte, el alto peso molecular final del MMD debe aún estar por debajo del límite de exclusión.

El tamaño de las partículas ha de tenerse en cuenta, ya que determina la altura de los platos teóricos. Pequeñas partículas (normalmente 5 μm) proporcionan una mejor resolución (mayor número de platos), y para lograr el mismo resultado de separación generalmente se utilizan longitudes de columna más pequeños (10 μm). Por otra parte, empaques de 5 μm (o incluso 3 μm) son más sensibles a la contaminación por las muestras que contienen impurezas.

Manejo de una columna de cromatografía de exclusión molecular.¹⁴

A diferencia con otras columnas de HPLC, hay que tener varias precauciones en el uso de columnas de CEM.

Una columna utilizada en CEM debe ejecutarse siempre en la misma fase móvil. Esto no es sólo porque otro disolvente requerirá una nueva calibración, sino principalmente porque un cambio de disolvente puede reducir el rendimiento y tiempo de vida de la columna. Sin embargo, si un cambio de disolvente es necesario (por ejemplo, para eliminar la contaminación procedente de los análisis), esto debe hacerse por etapas (usando mezclas de disolvente 1 y 2) a una baja velocidad de flujo (0.5-1 mL/min). Para algunos disolventes, un cambio directo debe evitarse utilizando un disolvente intermedio.

Se debe tener cuidado en la conexión de las columnas o en la inyección de la muestra: ya que una sola burbuja de aire inyectado a la columna puede dañar el lecho cromatográfico. Al analizar muestras que pueden contaminar una columna, se debe siempre utilizar una precolumna.

Obviamente, una buena separación es sólo una parte de un buen análisis. Otro punto crucial es la detección de la muestra al salir de la columna.

Detectores.^{15, 16}

El instrumento de detección más utilizado en CEM es el detector de índice de refracción (RI), que existe con diversas modificaciones. Su principal ventaja es que puede ser aplicado en el análisis de casi cualquier polímero. Sin embargo, el detector más familiar y con mayor uso, es el detector de absorción ultravioleta (UV), el cual se puede aplicar a los polímeros que contienen compuestos cromóforos (grupos con dobles enlaces), como anillos aromáticos, grupos carbonilo, etc, pero no a cualquier otros polímeros. En

éstos se utilizan longitudes de onda de detección en el rango de 190-400 nm, que sin embargo, puede utilizarse sólo en los disolventes que presenten una absorbancia suficientemente baja a estas longitudes de onda. Muchos disolventes típicos de CEM pueden detectarse sólo por encima de una longitud de onda de 250 nm. Mientras que los detectores Infrarrojos (IR) están limitados a ciertas fases móviles, las cuales no generan señal en la longitud de onda de detección.

También es posible utilizar detectores de evaporación de dispersión de luz (ELSD) donde el eluato es convertido a finas gotas mediante una corriente de gas a presión. Cada gota no volátil que contiene el analito forma una partícula, que dispersa la luz de un rayo de luz transversal. La intensidad de la luz dispersada debe reflejar la concentración de sustancias no volátiles en el eluato.

Otro tipo de detectores muy útiles en CEM son los detectores sensibles a la masa molar, ya que el rendimiento de un pico de polímero corresponde a la fracción de masa molar. Como la respuesta de un detector depende de la concentración, así como la masa molar de la fracción, tiene que ser utilizado junto con un detector sensible a la concentración.

Básicamente los siguientes tipos de detectores sensibles a la masa molar se encuentran en el mercado:

Detectores de dispersión de luz de bajo ángulo (LALS).

Detectores de dispersión de luz multiángulo (MALS).

Detectores diferenciales a la viscosidad.

Parámetros cromatográficos.¹⁷

Factor capacidad (K').

El factor capacidad, también definido como relación de distribución de masa (D), se interpreta como el número de volúmenes de fase móvil necesarios para eluir un compuesto después del volumen inicial contenido en la columna (t_0). Este factor determina la retención de un soluto y puede ser calculado como:

$$K' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Donde:

t_0 = tiempo en el que el o los compuestos no retenidos pasan por el interior del sistema.

t_R = tiempo de retención del compuesto considerado.

Valores bajos de K' indican que el pico eluye muy próximo al frente de solvente, pudiendo verse comprometida la selectividad. Son recomendables valores de K' superiores a 1, consiguiéndose una óptima resolución con valores mayores de 2.

Números de platos teóricos (N).

El número de platos teóricos es una medida de la eficiencia del sistema cromatográfico y por lo tanto, de la capacidad del sistema de proporcionar bandas de elución estrechas.

De acuerdo con la teoría de los platos teóricos (Martín y Signe, 1941), es posible imaginar que una columna cromatográfica se divide en "n" segmentos, en cada uno de los cuales se establece un equilibrio de concentraciones del analito entre las fases.

Cada uno de los segmentos imaginarios se conoce como plato teórico (N). Si la longitud total de la columna es L, la altura equivalente a un plato teórico (H) es:

$$H = \frac{L}{N}$$

La forma posible de determinar el número de platos teóricos es considerando el cromatograma de manera ideal donde los picos están resueltos y toman una forma de campanas gaussianas.

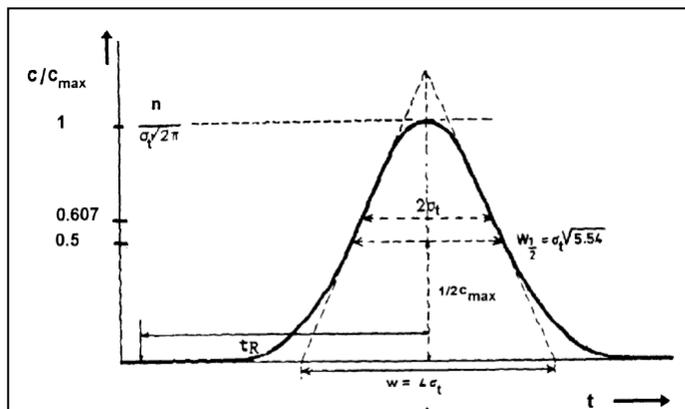


Figura 4. Descripción del ancho de pico en un cromatograma

El cálculo del número de platos teóricos se basa en la relación entre el tiempo de retención y la anchura del pico cromatográfico pudiendo emplearse distintas fórmulas tales como las que a continuación se detallan.

$$N = 16 \times \left(\frac{t_R}{W_b} \right)^2$$

Donde:

t_R = Tiempo de retención absoluto.

W_b = Ancho del pico en la línea base determinado por la tangente ajustada a un % de la altura del pico (USP).

En ocasiones es difícil medir el ancho del pico, ya que puede coeluir con otros componentes o puede haber poca sensibilidad del detector. Para evitar dichos problemas se puede medir el ancho a la media altura del pico.

$$N = 5.54 \times \left(\frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2$$

Donde:

t_R = Tiempo de retención.

$W_{1/2}$ = Ancho del pico al 50 % de la altura del pico (Farmacopea Europea y Japonesa, opcional en USP).

Los parámetros sobre los que se puede incidir para modificar el número de platos teóricos son la columna o soporte (longitud, calidad, tamaño de partícula) y las diversas condiciones cromatográficas definidas en el método (temperatura, flujo, fase móvil, etc.).

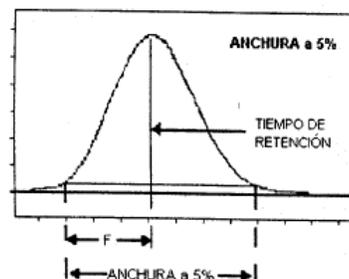
Este parámetro tiene especial interés en las pruebas de adecuabilidad del sistema donde existe un solo pico de interés dentro del cromatograma. En otros casos es más recomendable el estudio de la resolución.

Factor de asimetría o coleo. (T)

El factor de asimetría o coleo es una medida de la asimetría de la señal generada por el analito. Existen varias fórmulas de cálculo que toman la anchura de ambos lados del pico a distintas alturas, siendo la más habitual en las farmacopeas:

$$T = \frac{W_{0.05}}{2F}$$

Figura 5. Descripción de la asimetría en un pico.



Donde:

$W_{0.05}$ = anchura de pico al 5% de la altura del pico.

F = distancia entre la perpendicular trazada desde el máximo del pico y el frente al 5% de la altura del pico.

Un pico simétrico tendrá un factor de asimetría de 1.0. Un pico que presente un ensanchamiento por el inicio del pico tendrá valores inferiores a la unidad, mientras que si presenta valores superiores a la unidad se dice que presenta asimetría o coleo.

Como norma general el factor de asimetría debería encontrarse entre 0.8 y 1.5, aunque pueden aceptarse valores de hasta 2.0.

Las señales simétricas son preferibles porque minimizan las imprecisiones en la detección del inicio y el final del pico por parte de los sistemas de integración. Por lo tanto, permiten una mejor cuantificación del área bajo la curva.

Resolución (R_s).

La resolución es la medida de la separación entre dos picos. Este parámetro resulta muy útil para controlar el comportamiento de posibles interferencias. La fórmula de cálculo para la resolución es:

$$R_s = C \times \frac{t_{R1} - t_{R2}}{W_1 + W_2}$$

Donde:

t_{R1} y t_{R2} = tiempo de retención de los analitos (tiempo de retención del máximo del pico medido desde el inicio de la inyección). $t_{R1} < t_{R2}$.

C = constante cuyo valor varía según el criterio con el que se mida la anchura de pico.

W_1 y W_2 = anchura del pico a media altura, $C = 1.18$ (criterio farmacopea europea y japonesa).

W'_1 y W'_2 = anchura del pico por tangentes, $C = 2.0$ (criterio USP).

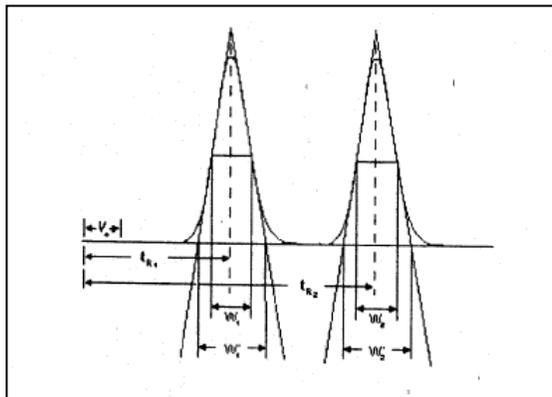


Figura 6. Determinación de la anchura de pico por el método de tangentes o a media altura.

Para realizar el cálculo de la anchura de pico y el tiempo de retención se deben expresar en las mismas unidades.

2.4 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.

En la industria farmacéutica, bajo la perspectiva de las buenas prácticas de manufactura se integra en 1987 por la FDA el concepto de validación de métodos analíticos con la publicación de una guía que tuvo como propósito el tener una visión global de la validación de métodos.¹⁸ Más tarde en 1994 el CDER presenta en su guía los aspectos a considerar cuando se evalúan los métodos cromatográficos desde la perspectiva regulatoria, donde se analizan los puntos importantes y debilidades, para poder asegurar que los parámetros de desempeño estuvieran siendo estudiados adecuadamente y que se contara con la suficiente información para evaluar los métodos cromatográficos.¹⁹ Así mismo, la conferencia internacional sobre armonización

(ICH) con el objeto de homogeneizar conceptos y tratar de sistematizar la validación de procedimientos analíticos incluidos como parte del registro de medicamentos en la comunidad Europea, Japón y Estados Unidos; publica las guías Q2A y Q2B. Desde entonces y hasta la actualidad la situación ha cambiado radicalmente de tal forma que hoy en día no se concibe la idea de que un laboratorio pueda utilizar un método analítico que no haya sido objeto de una previa validación o adecuación.¹⁹

Para validar un método analítico se requiere en primer lugar, un entorno de trabajo que garantice la seguridad de los resultados que se obtengan. Además, Se deben considerar la elaboración del protocolo de validación y controlar factores que intervengan en la validación del método como: la calificación de las instalaciones, la calificación de equipos e instrumentos, la calibración de los instrumentos, contar con estándares de referencia con certificado vigente, analistas capacitados en el método e insumos necesarios para la validación (muestras, placebos, etc.).

La validación de un método analítico se mide en función de sus parámetros de desempeño que son establecidos en función de su propósito analítico.²⁰ El hecho de que sea necesario evaluar unos u otros parámetros dependerán básicamente del tipo de ensayo, pudiendo resumirse en la siguiente tabla recomendada en la guía de validación del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos:

PÁRAMETRO DE DESEMPEÑO	CONTENIDO/ POTENCIA / VALORACIÓN	PRUEBA DE IMPUREZAS		IDENTIFICACIÓN
		CONTENIDO/ VALORACIÓN	LÍMITE	
PRECISIÓN/ ADECUABILIDAD DEL SISTEMA	SI	SI	SI	*
LINEALIDAD DEL SISTEMA	SI	SI	NO	NO
ESPECIFICIDAD ¹	SI ³	SI	SI	SI
EXACTITUD Y REPETIBILIDAD	SI	SI	NO	NO
LINEALIDAD DEL MÉTODO	SI	SI	NO	NO
PRECISIÓN DEL MÉTODO O PRECISIÓN INTERMEDIA ²	SI	SI	NO	NO
ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA ²	*	*	NO	NO
LÍMITE DE DETECCIÓN	NO	NO	SI	NO
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	NO	SI	NO	NO
ROBUSTEZ	*	*	*	NO
TOLERANCIA	*	*	*	NO

- * Puede ser requerido dependiendo de la naturaleza del método.
- 1 La falta de especificidad de un método analítico, puede ser compensado por otra alternativa analítica de soporte, como por ejemplo cromatografía de capa fina.
- 2 También es definido como un estudio de tolerancia.
- 3 Un método que es exacto y lineal, por definición es específico al placebo analítico o a los otros componentes de la muestra.

Alcántara A., García A., Soberón E., Cortés M., Rodríguez R., Herrera J. Métodos analíticos, Guía de validación. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A.C. 2002

Los parámetros de desempeño de una validación de métodos analíticos son ^{21, 22 y 23}.

- ***Precisión/Adecuabilidad del sistema de medición.***

Verificación de que el sistema (instrumento, analista, equipo, sustancia de referencia, entre otros) opera con base a criterios preestablecidos, que permitan asegurar la confiabilidad de los resultados de un método analítico.

- ***Linealidad.***

Habilidad para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática definida, son proporcionales a la concentración del analito, dentro de un intervalo determinado.

- ***Especificidad.***

Capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra.

- ***Selectividad.***

Capacidad de un método analítico para cuantificar exactamente el compuesto a analizar, en presencia de otros compuestos que pudieran estar presentes en la muestra.

- ***Exactitud.***

La exactitud de un método analítico expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero o un valor de referencia y el valor experimental encontrado.

- **Precisión.**

La precisión expresa el grado de concordancia o dispersión entre una serie de medidas de tomas múltiples a partir de una misma muestra homogénea en las condiciones prescritas.

Repetibilidad: Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas (por un mismo analista, mismos equipos y reactivos, etc.), en un mismo laboratorio.

Precisión Intermedia: Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia relativa obtenida entre determinaciones independientes realizadas en un mismo laboratorio, por diferentes analistas, en distintos días.

- **Límite de detección.**

Concentración mínima del analito en una muestra, que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

- **Límite de cuantificación.**

Concentración mínima del analito, que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones de operación establecidas.

- **Robustez.**

Capacidad del método analítico de mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas, en los parámetros normales de operación del método.

- **Tolerancia.**

Reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos, por el análisis de la misma muestra bajo diferentes condiciones de uso, como pueden ser: equipos, columnas, etc.

- **Estabilidad analítica de la muestra.**

Propiedad de una muestra, preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración del analito, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

Criterios de aceptación.

Para poder concluir la aceptación de cada uno de los parámetros de desempeño se contrastan los resultados con criterios de aceptación basados en las necesidades o finalidad del método y con la información obtenida durante la fase de desarrollo del procedimiento analítico, con ayuda de estimaciones estadísticas.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido al interés que siempre a existido en la industria farmacéutica por asegurar la calidad de los medicamentos de acuerdo a las buenas practicas de manufactura (GMP's), aparece el concepto de validación, el cual refiere a procesos, sistemas y métodos analíticos. Siendo la validación la herramienta que permite obtener las pruebas documentales mediante pruebas de laboratorio que aseguran que el método es adecuado para el análisis en las condiciones descritas. De forma tal que cualquier método analítico empleado en el control y liberación del producto debe estar validado conforme a la normatividad vigente.

Esta metodología analítica es innovadora ya que a nivel internacional no se encuentran metodologías parecidas en términos farmacopeicos. La metodología analítica ha sido desarrollada para el control y liberación de productos faboterápicos. Estos productos son innovadores a nivel internacional, los cuales han sido galardonados con el Premio Nacional de Tecnología 2005, en la categoría de organización industrial mediana y reconocimiento al mérito tecnológico 2006, siendo además productos designados por la FDA como drogas huérfanas (inexistencia de algún medicamento para tratar un padecimiento específico). Actualmente se exportan estos productos a los Estados Unidos, Australia, África, Turquía, Medio Oriente, Europa y Sudamérica, en donde se cumple con la legislación vigente correspondiente, la cual exige presentar la validación a la metodología analítica para el control y liberación de estos productos.

Cuando un método analítico no se encuentra en el estado validado, potencialmente se pueden presentar dos tipos de riesgo. Uno asociado al consumidor, el cual se presenta al utilizar un método que provee de resultados no confiables con el cual se aprueban lotes. De manera tal que este tipo de riesgo es fundamental eliminar dado que se podrían estar liberando lotes de productos que no cumplan con especificaciones.

Mientras que el riesgo asociado al fabricante se manifiesta cuando el método rechaza un producto que debería ser aprobado.

En el presente proyecto se plantea validar el desempeño de la metodología analítica para la determinación de Fab y F(ab')₂ por HPLC de exclusión molecular en producto terminado de faboterápico, para demostrar la capacidad del método de satisfacer los requisitos predeterminados.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Demostrar que la metodología analítica para determinar Fab y F(ab')₂ por HPLC de exclusión molecular en producto terminado de faboterápico es confiable y cumple con los criterios de aceptación predeterminados para los parámetros de desempeño establecidos.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

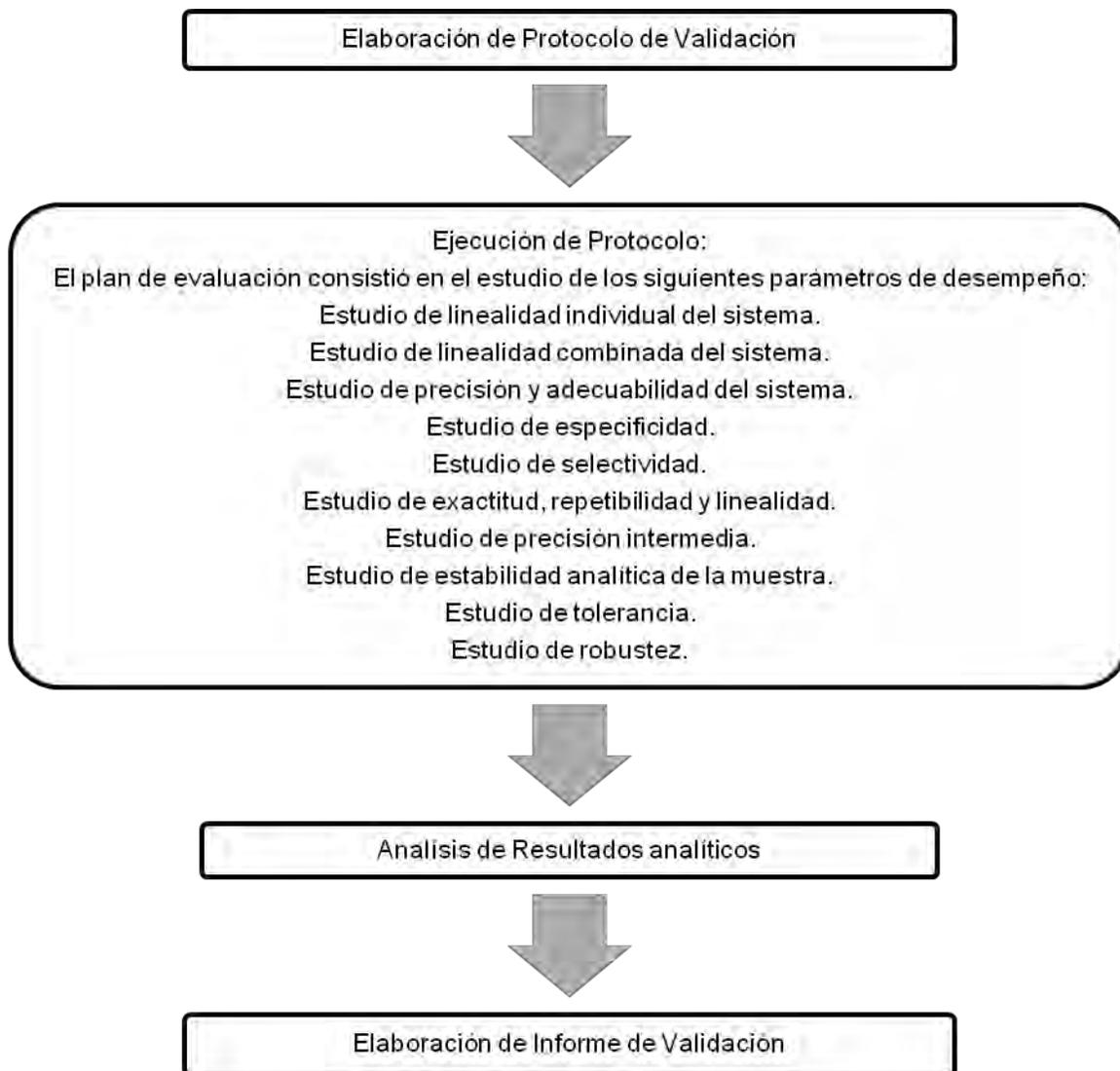
- Evaluar el desempeño en el sistema de cromatografía de exclusión molecular para determinar Fab y F(ab')₂.
- Investigar la especificidad y selectividad del método.
- Determinar la exactitud y precisión del método.
- Establecer la estabilidad analítica de la muestra.
- Determinar la capacidad del método para ser reproducible a variaciones pequeñas pero deliberadas en las condiciones normales de operación.
- Determinar la tolerancia del método en utilizar diferentes lotes de reactivos.
- Aplicar el método validado para la liberación de lotes de producto terminado.

5. HIPÓTESIS

Sí el método analítico para la determinación de Fab y F(ab')₂ cumple con los parámetros de: linealidad y precisión del sistema, especificidad, selectividad, exactitud, repetibilidad, linealidad del método, precisión intermedia, estabilidad analítica de la muestra, estudio de tolerancia y robustez, se asegurará su desempeño y capacidad como aplicación analítica.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

Toda validación comienza a partir de un método ya diseñado. La validación trata de demostrar con un número mínimo de ensayos, que tanto el método de análisis como su sistema analítico asociado producirán resultados adecuados a las exigencias preestablecidas. Este método analítico para fines de validación, se clasifica como un método de contenido. Dicha demostración se documenta y ejecuta de acuerdo al siguiente esquema:



7. MATERIALES Y MÉTODO.

7.1 MATERIALES.

- Acrodiscos GHP, 13 mm Syringe Filter poro de 0.2 μm
- Barra de agitación magnética
- Equipo de filtración completo y pinzas
- Espátulas.
- Filtros de nylon o polipropileno de 0.2 μm y 47 mm de diámetro.
- Gradilla para tubos Eppendorf.
- Insertos de 300 μL 6 x 29 mm con resorte plástico pre-instalado.
- Jeringas de plástico no estériles de 1 mL y/o 3 mL.
- Matraces Erlenmeyer de 1000 mL.
- Matraz Kitasato de 1000 mL.
- Matraz Volumétrico Erlenmeyer de 1000 mL.
- Micropipetas de 10 μl , 100 μL , 200 μL y 1000 μL .
- Pinzas
- Pipetas Pasteur con bulbo.
- Probetas graduadas.
- Puntas para micropipeta de 0.5-10 μL , 20-100 μL , 20-200 μL y 200-1000 μL .
- Tubos de Eppendorff de 0.5 mL y 1.5 mL.
- Unidad de filtración al vacío.
- Vasos de precipitados de 50 mL, 200 mL, 600 mL y 1000 mL.
- Vasos de vidrio Kimax de 1 L C/tapa de rosca y/o equivalente.
- Viales para HPLC con tapa 12x32 mm.

7.2 REACTIVOS.

- Fosfato monobásico de Potasio grado analítico o ultrapuro, 500 g.
- Fosfato dibásico de Sodio Anhidro, grado analítico o ultrapuro, 500 g.
- Agua grado HPLC.
- Ácido bórico granular.
- Hidróxido de sodio.
- Cresol.
- Cloruro de sodio
- Glicina.

7.3 MUESTRAS

- Producto a granel, concentrado y producto terminado de faboterápico.

7.4 SUSTANCIAS DE REFERENCIA.

- Estándar de Fab certificado.
- Estándar de F(ab')₂ certificado.
- Estándar de (IgG + IgGT) certificado.
- Estándar de albúmina sérica equina certificada.

7.5 EQUIPOS E INSTRUMENTOS.

- Parrilla de agitación, 0-1500rpm.
- Balanza analítica.
- Potenciómetro.
- Bomba de vacío
- Bomba binaria.
- Detector UV/Vis.
- Columna.
- Inyector.
- Módulo de separación incluye desgasificador
- Horno para columna
- Software de HPLC.
- Equipo de Computo.

7.6 PREPARACIÓN DE LA FASE MÓVIL.

Pesar 13.61 g de fosfato monobásico de potasio anhidro (KH_2PO_4) y disolver en 500 mL de agua grado HPLC con agitación constante. Adicionar 14.19 g de fosfato dibásico de sodio anhidro (Na_2HPO_4). Disolver y aforar a 1000 mL con agua grado HPLC. Medir y registrar el pH de la solución que deberá estar entre 6,6 y 6,8. Filtrar la fase móvil por membrana de 0.2 μm , con ayuda de un filtro de nylon o polipropileno. Almacenar la fase móvil en un frasco de vidrio transparente cerrado, y rotulado hasta su uso. Conservar la solución como máximo tres días a temperatura del laboratorio.

7.7 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE ADECUABILIDAD DEL SISTEMA.

A partir de la solución de referencia concentrada de Fab y F(ab')₂, se preparan 500 µL de la solución de adecuabilidad que contenga respectivamente 0.7 mg/mL de Fab y 0.7 mg/mL de F(ab')₂, utilizando como diluyente fase móvil.

El volumen en µL de cada estándar (V_s) se calcula con la siguiente ecuación:

$$V_s = \frac{0.7}{C_s} * 500$$

Donde:

V_s = volumen de la solución de referencia (µL) de Fab o F(ab')₂ a utilizar para preparar la solución de adecuabilidad (SA).

C_s = concentración de las soluciones de referencia (µg/µL) de Fab o F(ab')₂

7.8 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN INTERFERENTE DE IgG + IgG_T.

Con la información del contenido de IgG (%) e IgG_T (%) determinado por el método de SDS -PAGE (Electroforesis en gel de poliacrilamide con sulfato dodecil de sodio) para las muestra del lote a analizar, se determina el volumen de la solución de referencia.

Se calcula el volumen de la solución de referencia concentrada de IgG e IgG_T (V_s) en µL, para preparar 300 µL de la solución de interferentes con la siguiente ecuación:

$$V_s = \frac{1.65 \times \% Ig}{C_s * 100} * 300$$

Donde:

V_s = volumen de la solución de referencia (µL) de IgG o IgG_T a utilizar para preparar la solución interferente de IgG+IgG_T (SI)

%Ig = Porcentaje de IgG + IgGT reportada por SDS page del lote de la muestra analizar.

C_s = concentración de las soluciones de referencia (µg/µL) de IgG o IgG_T.

7.9 CONDICIONES DE CORRIDA CROMATOGRRÁFICA.

Columna: 250, 10 um CEM, 7.5 x 300 mm

Fase móvil:	Fosfatos 0.1 M, pH 6.7
Condiciones:	Isocrático
Presión:	< 1500 psi
Velocidad de flujo:	0.75 mL/min
Temperatura de la columna:	30 ° C
Temperatura de la muestra:	25 ° C
Longitud de onda de Detección:	280 nm
Volumen de inyección:	75 µL
Tiempo de corrida:	30 min

7.10 PREPARACIÓN E INYECCIÓN DE LAS MUESTRAS.

Homogeneizar el contenido de 3 viales con su diluyente.

Con la información del contenido de proteína del lote del producto reportado por el Método analítico para la determinación de proteínas en producto de faboterápico (producto a granel, producto concentrado y producto terminado) por el método de BRADFORD, determinar el siguiente factor de dilución:

$$D = \frac{C_{PT}}{1.65}$$

D = factor de dilución de las muestras del producto.

C_{PT} = concentración de proteína total del lote del producto (mg/mL)

El factor de dilución debe de ser redondeado al valor que en la práctica sea apropiado. De la mezcla de los 5 viales, diluir con fase móvil para preparar 500 μL , e identificar como M. Proceda a inyectar por triplicado 75 μL de M.

7.11 INFORMACIÓN DE REPORTE Y CÁLCULOS.

- De cada inyección reporte el área bajo la curva para Fab2 y Fab para SR, SI y M.
- Con ayuda de Excel, calcule el promedio aritmético de las 3 inyecciones para Fab2 y Fab para SR (\bar{y}_{SRFab2} , \bar{y}_{SRFab}), para SI (\bar{y}_{SIFab2}) y para la muestra (\bar{y}_{MFab2} , \bar{y}_{MFab}).
- Con ayuda de Excel, Calcule el porcentaje de Fab2 + Fab (%) para la muestra con la siguiente ecuación:

$$\% = \left[\frac{\left(\frac{\bar{y}_{MFab2} - \bar{y}_{SIFab2}}{\bar{y}_{SRFab2}} \right) \times 0.7 + \left(\frac{\bar{y}_{MFab}}{\bar{y}_{SRFab}} \right) \times 0.7}{1.65} \right] \times 100$$

7.12 ESTUDIO DE PRECISIÓN Y ADECUABILIDAD DEL SISTEMA.

En el estudio de adecuabilidad del sistema se evaluaron las características de variación, separación y eficiencia del sistema mediante una solución de adecuabilidad a 0.7 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de $\text{F(ab}')_2$ y 0.7 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de Fab. Se mezclaron 140 μL del estándar de Fab a 3 mg/mL más 144.8 μL del estándar de $\text{F(ab}')_2$ a 2.9 mg/mL con 315.2 μL de amortiguador para preparar 600 μL de la solución Fab+ $\text{F(ab}')_2$ cada uno a 0.7 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. De esta solución se inyectaron por sextuplicado 75 μL .

Criterios de aceptación:

- La precisión del sistema debe cumplir con $\text{CV} \leq 2\%$.
- Se deben cumplir los requisitos de adecuabilidad:

Proteína	$\text{F(ab}')_2$	Fab
Factor capacidad por inyección	≥ 0.6	≥ 0.8
Resolución (USP) por inyección	NA	Mín 1.2
Platos teóricos por inyección	Mínimo 800	Mínimo 1400

7.13 LINEALIDAD INDIVIDUAL DEL SISTEMA.

Para determinar la relación lineal de concentración contra respuesta analítica a cinco niveles de concentración para los componentes Fab y $\text{F(ab}')_2$ como soluciones individuales, se mezclaron 350 μL del estándar de Fab a 3 mg/mL con 1150 μL de amortiguador para preparar 1500 μL de la solución Fab a 0.7 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Esta solución se inyectó por triplicado en volúmenes de 30, 45, 60, 75 (100%) y 90 μL . Así mismo para el estándar de $\text{F(ab}')_2$ se mezclaron 362 μL del estándar $\text{F(ab}')_2$ a 2.9 mg/mL con 1137 μL de amortiguador para preparar aproximadamente 1500 μL de la solución de $\text{F(ab}')_2$ a 0.7 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. La solución se inyectó por triplicado en volúmenes de 30, 45, 60, 75 (100%) y 90 μL .

Criterios de aceptación para cada componente:

- El intervalo de confianza al 95% para la pendiente no debe incluir el valor de cero.
- El coeficiente de determinación (r^2) no debe ser menor a 0.98.
- El coeficiente de variación para la regresión ($CV_{y/x}$) no debe exceder el 2%.

7.14 LINEALIDAD COMBINADA DEL SISTEMA.

Para evaluar la relación lineal de concentración contra respuesta analítica a cinco niveles de concentración de las sustancias de referencia Fab y F(ab')₂ contenidos en una mezcla. Se prepararon 350 µL del estándar de Fab a 3 mg/mL más 362 µL del estándar de F(ab')₂ a 2.9 mg/mL con 787 µL de amortiguador para preparar 1500 µL de la solución Fab+F(ab')₂ en el que cada uno de las sustancias de referencia se encuentra a 0.7 µg/µL. De esta solución se inyectaron por triplicado volúmenes iguales a 30, 45, 60, 75 (100%) y 90 µL

Criterios de aceptación:

- El intervalo de confianza al 95% para la pendiente no debe incluir el valor de cero.
- El coeficiente de determinación (r^2) no debe ser menor a 0.98 para cada componente.
- El coeficiente de variación para la regresión ($CV_{y/x}$) no debe exceder el 2% para cada componente.

7.15 ESTUDIO DE ESPECIFICIDAD.

Para determinar la capacidad del método analítico en medir la respuesta de Fab y $F(ab')_2$ distinguible de las respuestas producidas por los aditivos del producto terminado de faboterapico y que el grado de interferencia de otras proteínas como IgG, IgGT y albúmina fuera despreciable. Se prepararon e inyectaron soluciones de adecuabilidad, soluciones de aditivos de faboterapico y soluciones de proteínas para obtener sus cromatogramas e identificar la respuesta analítica correspondiente.

a) Preparación de la solución de adecuabilidad:

Se mezclaron 140 μL del estándar de Fab a 3 mg/mL más 145 μL del estándar de $F(ab')_2$ a 2.9 mg/mL con 315 μL de amortiguador para preparar 600 μL de la solución Fab+ $F(ab')_2$ cada uno a 0.7 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Se Inyectaron 75 μL por quintuplicado.

b) Preparación de la solución de aditivos de producto terminado de faboterapico:

Fue preparada por triplicado la matriz analítica de producto terminado mezclando cresol, cloruro de sodio, glicina, amortiguador de boratos y agua purificada por ósmosis inversa. Se diluyeron 1 a 3 v/v con fase móvil e inyectaron por duplicado 74 μL de cada matriz analítica preparada.

c) Preparación de las proteínas de producto terminado:

Se preparo por triplicado la siguiente solución de proteínas: 22 μL de un estándar de IgG + IgGT de 1.4 mg/mL, más 25 μL de estándar de albúmina sérica equina de 0.2 mg/mL y fase móvil hasta completar 600 μL . Fueron inyectadas por duplicado 75 μL de cada solución. Estas soluciones representan el 3% de IgG, 3% de IgGT y 0.5% de albúmina en producto terminado.

Criterios de aceptación:

- Los aditivos de producto terminado de faboterapico no deben generar respuesta analítica en la señal de $F(ab')_2$ o de Fab.
- Las proteínas de producto terminado de faboterapico no deben generar respuesta analítica en la señal de $F(ab')_2$ o de Fab.

7.16 ESTUDIO DE SELECTIVIDAD.

El estudio de selectividad consistió en verificar que los componentes que se pudieran generar por efecto de la temperatura no interfieran en la determinación de Fab o de $F(ab')_2$. El producto fue sometido a calor de manera indirecta y procesada como lo indica el método analítico; para obtener un cromatograma que pudiera ser comparado con respecto al comportamiento de una solución de adecuabilidad.

a) Preparación de la solución de adecuabilidad.

Para obtener una solución de 600 μ L de Fab+ $F(ab')_2$ cada uno a 0.7 μ g/ μ L, fueron mezclados 140 μ L del estándar de Fab a 3 mg/mL más 145 μ L del estándar de $F(ab')_2$ a 2.9 mg/mL con 315 μ L de amortiguador. De esta solución se inyectaron 75 μ L por quintuplicado, para visualizar la señal analítica del $F(ab')_2$ + Fab.

b) Preparación de la muestra tratada con calor.

Se preparo un baño de agua a ebullición en un vaso de precipitados de 200 mL con la ayuda de un mechero Bunsen, un tripié y una tela de asbesto. Se transfirieron 5 mL de 3 muestras de producto terminado a 3 tubos falcon respectivamente y se calentaron en el baño de agua por 30 minutos. Se dejaron enfriar a condiciones de laboratorio, posteriormente se transfirieron 1 mL de cada muestra a un tubo de ensayo respectivo, a

los que se les adicionaron 1.5 mL de la fase móvil a cada tubo, se mezclaron, filtraron e inyectaron 75 µl por triplicado como lo indica el método. En total se realizaron 9 inyecciones (3 por cada muestra).

Criterio de aceptación:

- La señal analítica del F(ab')₂ o de Fab en el cromatograma del producto terminado de faboterapico tratado con calor, debe desaparecer o disminuir de manera importante respecto de la señal analítica del F(ab')₂ o de Fab en el cromatograma de la adecuabilidad.

7.17 ESTUDIO DE EXACTITUD, REPETIBILIDAD Y LINEALIDAD.

Para verificar que el método sea exacto, repetible, lineal y de rango aceptable. Se prepararon muestras de diferentes combinaciones con relación a la concentración de F(ab')₂ + Fab (50 a 150%) en la matriz analítica de producto terminado incluyendo únicamente sus aditivos y en donde el porciento de áreas de F(ab')₂ correspondieron al 22 a 72% y de Fab al 28 a 78%. Se calcularon los recobros de los componentes (Fab y F(ab')₂) en las muestras.

a) Preparación de la solución de adecuabilidad.

Se mezclaron 232 µL del estándar de Fab a 3 mg/mL más 302 µL del estándar de F(ab')₂ a 2.31 mg/mL con 466 µL de amortiguador para preparar 1000 µL de la solución Fab+F(ab')₂ cada uno a 0.7 µg/µL.

b) Preparación de las muestras adicionadas de Fab+F(ab')₂

Preparar muestras adicionadas como indica en la siguiente tabla, en la cual se reporta el % en concentración de cada componente.

MUESTRA	1	2	3	4	5
REPLICAS*	6	3	3	3	3
F(ab') ₂ µL	151	226.5	75.5	226.5	75.5
Fab µL	116	58	174	174	58
µL placebo de producto terminado 10X	50	50	50	50	50
Fase móvil µL	183.0	165.5	200.5	49.5	316.5
Vol. total, µL (CBP)	500	500	500	500	500
%Concentración F(ab') ₂	100	150	50	150	50
% Concentración Fab	100	50	150	150	50

*Replicas, significa el número de veces que habrá que preparar cada solución (6, sextuplicado; 3, triplicado).

c) Proceso de la solución de adecuabilidad y de las muestras.

Fueron programadas inyecciones de 75 µL por quintuplicado de la solución de adecuabilidad antes (inicio) y después (fin) de inyectar 75 µL por triplicado de cada muestra; como lo indica el método analítico.

Criterios de aceptación:

Para cada componente (F(ab')₂ y Fab):

Exactitud del método.

Para la relación % de área adicionada vs % de área recuperada.

- El intervalo de confianza al 95% para la pendiente ($LIC(M)$, $LSC(M)$), debe incluir el valor de la unidad.
- El intervalo de confianza al 95% para la ordenada al origen ($LIC(B)$, $LSC(B)$), debe incluir el valor de cero.

Linealidad del método.

- El valor del coeficiente de determinación no debe ser menor de 0.98.

Repetibilidad.

- El coeficiente de variación de regresión (CV_{y/x}) no debe exceder el 3%.
- El coeficiente de variación del % de recobro (CV) no debe exceder el 3%.

7.18 ESTUDIO DE PROTEÍNAS INTERFERENTES EN LA EXACTITUD.

El estudio de proteínas interferentes en la exactitud consistió en determinar si el grado de interferencia de las proteínas IgG e IgGT es aditiva a la señal analítica de F(ab')₂ y Fab, y para justificar el uso de una solución interferente en el método, de así requerirse, para asegurar exactitud.

Para el desarrollo de este estudio se prepararon muestras al nivel de concentración de la solución de adecuabilidad de F(ab')₂ + Fab con 2 diferentes niveles adicionados de IgG + IgGT (3% y 5%). Una vez preparadas las muestras se inyectaron y se determinaron los recobros de las áreas de los componentes en las muestras (F(ab')₂ y Fab) sin restar y restando la interferencia de la IgG + IgGT.

a) Solución de adecuabilidad.

Se mezclaron 70 µL del estándar de Fab a 3 mg/mL más 91 µL del estándar de F(ab')₂ a 2.31 mg/mL con 139 µL de amortiguador. Esta solución de adecuabilidad contenía Fab + F(ab')₂ cada uno a 0.7 µg/µL.

b) Solución interferente de IgG + IgGT al 3%.

Se mezclaron 15 µL del estándar de IgG (1 mg/mL), más 15 µL de estándar de IgGT (1 mg/mL) con 270 µL de amortiguador.

c) Solución interferente de IgG + IgGT al 5%.

Fue preparada mezclando 25 μ L del estándar de IgG (1 mg/mL), más 25 μ L de estándar de IgGT (1 mg/mL) con 250 μ L de amortiguador.

d) Mezcla de Fab + F(ab')₂ e IgG + IgGT al 3%.

Se preparó por triplicado una mezcla que contenía: 70 μ L del estándar de Fab a 3 mg/mL; 91 μ l del estándar de F(ab')₂ a 2.31 mg/mL; 15 μ L del estándar de IgG a 1 mg/mL; 15 μ L del estándar de IgGT a 1 mg/mL y 109 μ L de amortiguador.

e) Mezcla de Fab + Fab₂ e IgG + IgGT al 5%.

Se preparó por triplicado una mezcla que contenía: 70 μ L del estándar de Fab a 3 mg/mL; 91 μ l del estándar de F(ab')₂ a 2.31 mg/mL; 25 μ L del estándar de IgG a 1 mg/mL; 25 μ L del estándar de IgGT a 1 mg/mL y 89 μ L de amortiguador.

f) Proceso de la solución de adecuabilidad y de las muestras.

Se programo la inyección de 75 μ L por triplicado de la solución de adecuabilidad, 75 μ L por triplicado de las soluciones interferentes y 75 μ L por triplicado de cada muestra; como lo indica el método analítico.

Criterios de aceptación:

Para cada componente F(ab')₂ y Fab:

- El grado de interferencia de las soluciones interferentes de proteína en las muestras, debe ser eliminado de manera aceptable al restar la señal analítica de la solución interferente al de la muestra.
- El promedio del porcentaje de recobro debe estar entre 95% y 105 %

7.19 ESTUDIO DE PRECISIÓN INTERMEDIA.

El estudio de precisión del método consistió en establecer, si el grado de reproducibilidad entre analistas (2) y entre días (2) es aceptable.

Una misma muestra de producto terminado, fue analizada por triplicado por 2 analistas en 2 diferentes días, como lo establece el método.

a) Solución de adecuabilidad.

Se mezclaron 116.7 μL del estándar de Fab a 3 mg/mL más 116.7 μL del estándar de F(ab')_2 a 3 mg/mL con 266.6 μL de amortiguador (fase móvil) para preparar 500 μL de la solución Fab + F(ab')_2 cada uno a 0.7 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$. Fueron identificados como SA. Se inyectaron 75 μL por quintuplicado.

b) Preparación de la solución interferente (SI) de IgG + IgGT.

Fueron mezclados 14.9 μL de IgGT (3% reportado por SDS page para el lote de Producto terminado) a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ con 285.1 μL de fase móvil, esta solución se identifico como "SI" y se inyectaron 75 μL por triplicado.

c) Preparación e inyección de la muestra.

Mezclar por triplicado 201.2 μL de producto terminado y 298.8 μL de fase móvil para completar 500 μL de solución muestra (M), homogeneizar e identificar como M1. Esta misma operación se efectuó 2 veces más para producir dos muestras más, las cuales fueron identificadas como M2 y M3. La inyección de cada muestra se realizo por triplicado con un volumen de 75 μL respectivamente.

Criterios de aceptación.

El sistema es adecuado si se cumplen los siguientes requisitos:

Proteína	$F(ab')_2$	Fab
Factor capacidad por inyección	≥ 0.6	≥ 0.8
Resolución (USP) por inyección	NA	Mín 1.2
Platos teóricos por inyección	Mín 800	Mín 1500
CV área para las 5 inyecciones	Máx 2%	Máx 2%

El método es repetible si:

- El CV del método no excede el 2%.

El método es reproducible si:

- El CV total no excede el 3%.
- La probabilidad Fcal días / analistas debe ser mayor a 0.05 o el CV de días / analistas no excede el 3%.
- La probabilidad Fcal analistas no debe ser mayor a 0.05 o el CV de los analistas no excede el 3%.

7.20 ESTUDIO DE ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA.

Para establecer el intervalo de tiempo en el cuál la señal analítica de la muestra es estable, fue desarrollado el estudio del parámetro de desempeño de estabilidad analítica.

Se preparo por triplicado una matriz analítica de aditivos de producto terminado adicionados con $F(ab')_2 + Fab$, los cuales fueron inyectados al inicio y a las 12, 24, 48 y 72 horas (M0, M12, M24, M48 y M72) las cuales se encontraban almacenadas en el inyector, se determino el tiempo en el que la señal analítica es estable expresada como % de $F(ab')_2 + Fab$.

a) Solución de adecuabilidad.

Se mezclaron 232 μL del estándar de Fab a 3 mg/mL más 302 μL del estándar de $F(ab')_2$ a 2.31 mg/mL con 466 μL de amortiguador (fase móvil) para preparar 1000 μL de la solución Fab + $F(ab')_2$ cada uno a 0.7 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, se identifico como SA. Fueron inyectados 75 μL por quintuplicado de esta solución.

b) Preparación de la solución muestra.

Se preparo por triplicado la muestra de acuerdo a la siguiente tabla.

Ingrediente	Cantidad μL
Fab	350
$F(ab')_2$	455
Placebo 10X	150
Fase móvil	545
Volumen total	1500

Se inyectaron por triplicado 75 μL de cada muestra a tiempo cero (inicial), 12, 24 y 48 hrs.

Criterios de aceptación:

- La diferencia promedio de la composición porcentual para cada componente de cada tiempo, respecto del inicio no debe exceder el 2%.

7.21 ESTUDIO DE TOLERANCIA.

Este estudio de tolerancia consistió en determinar la capacidad del método para proveer de resultados reproducibles y confiables bajo diferentes lotes de reactivos utilizados en la preparación de las soluciones de amortiguadores. El análisis se desarrollo por el mismo analista, los mismos reactivos, las mismas sustancias de referencia y la misma muestra de producto terminado.

La muestra de producto terminado se analizo por triplicado, utilizando dos soluciones de amortiguador preparadas con diferentes lotes de reactivos, por un analista.

El siguiente procedimiento se aplico para cada solución amortiguadora:

a) Solución de adecuabilidad.

Se mezclaron 116.7 μL del estándar de Fab a 3 mg/mL más 116.7 μL del estándar de $\text{F(ab}')_2$ a 3 mg/mL con 266.6 μL de amortiguador (fase móvil) para preparar 500 μL de la solución $\text{Fab}+\text{F(ab}')_2$ cada uno a 0.7 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, se identifico como SA. De esta solución se inyectaron 75 μL por quintuplicado.

b) Preparación de la solución interferente (SI) de IgG + IgGT.

Se mezclaron 14.9 μL de IgGT (3% reportado por SDS page para el lote de producto terminado, a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de la solución de referencia) con 285.1 μL de fase móvil, esta solución se identifico como "SI" y se inyectaron 75 μL por triplicado.

c) Preparación e inyección de la muestra.

Se mezclaron 201.2 μL de la muestra de producto terminado y 298.8 μL de fase móvil para completar 500 μL de solución muestra (M), se homogeneizo e identifico como M1. Se realizo esta misma operación 2 veces más, para obtener las muestras correspondientes identificadas como M2 y M3. Se inyecto por triplicado 75 μL de M1, M2 y M3, respectivamente.

Criterios de aceptación:

Adecuabilidad.

- El sistema es adecuado si se cumplen los requisitos de adecuabilidad:

El método es tolerante si:

- El CV de los amortiguadores no excede el 3%.
- El CV total no excede el 3%.

7.22 ESTUDIO DE ROBUSTEZ.

El estudio de robustez consistió en establecer la capacidad del método para proporcionar resultados confiables, al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas en los parámetros de: pH de la fase móvil, concentración de la fase móvil, temperatura de la columna, temperatura de la muestra y velocidad de flujo, bajo las mismas condiciones de análisis (analista, reactivos y muestra), evaluando la muestra por triplicado.

El estudio fue basado en un diseño Plackett Burman de 8 corridas analíticas, que permitieron investigar 5 factores verdaderos, utilizando 2 factores falsos. El estudio considero el análisis por triplicado de una misma muestra para cada corrida analítica, utilizando el mismo equipo y desarrollado por el mismo analista.

El siguiente procedimiento se aplicó en cada corrida analítica, con las condiciones indicadas en la matriz Placektt Burman.

a) Solución de adecuabilidad para todas las corridas analíticas.

Se mezclaron 116.7 μL del estándar de Fab a 3 mg/mL más 116.7 μL del estándar de F(ab')_2 a 3 mg/mL con 266.6 μL de amortiguador (fase móvil) para preparar 500 μL de la solución Fab + F(ab')_2 cada uno a 0.7 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Se inyectaron 75 μL por quintuplicado de esta solución.

b) Preparación de la solución interferente (SI) de IgG + IgGT para todas las corridas analíticas:

Fueron mezclados 14.9 μL de IgGT (3% reportado por SDS page para el lote de Producto terminado) a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ con 285.1 μL de fase móvil, esta solución fue identificada como “SI” e inyectada por triplicado en un volumen de 75 μL .

c) Preparación e inyección de la muestra:

Se mezclaron 201.2 μL de producto terminado y 298.8 μL de fase móvil para completar 500 μL de solución muestra (M), fue homogeneizada e identificada como M1. Esta operación se efectuó 2 veces más para generar las muestras identificadas como M2 y M3. Se procedieron a inyectar por triplicado 75 μL de M1, M2 y M3, respectivamente. Se preparo la cantidad de muestras suficientes para realizar cada una de las siguientes corridas analíticas de acuerdo al siguiente diseño Plackett Burman.

Matriz de Plackett Burman y nivel de factores

Corrida Cromatográfica	pH	Factor Falso	Concentración Fase móvil	Temperatura Columna	Temperatura muestra	Factor Falso	Velocidad de Flujo
1	alto	bajo	bajo	alto	bajo	alto	alto
2	alto	alto	bajo	bajo	alto	bajo	alto
3	alto	alto	alto	bajo	bajo	alto	bajo
4	bajo	alto	alto	alto	bajo	bajo	alto
5	alto	bajo	alto	alto	alto	bajo	bajo
6	bajo	alto	bajo	alto	alto	alto	bajo
7	bajo	bajo	alto	bajo	alto	alto	alto
8	bajo	bajo	bajo	bajo	bajo	bajo	bajo

Considerando los siguientes niveles.

FACTOR	nivel		Unidades
	bajo	alto	
Ph	6.4	7	pH
Concentración de fase móvil	0.5	1.5	%
Temperatura de la Columna	Ambiente	40	oC
Temperatura de la Muestra	Ambiente	25	oC
Velocidad de Flujo	0.7	0.8	mL/min

Criterios de aceptación:

Adecuabilidad.

- El sistema es adecuado si se cumplen los requisitos de adecuabilidad.

Robustez.

- El método es robusto al factor bajo estudio, si la probabilidad de la F de Fisher ($\Pr F_{cal}$) es mayor o igual a 0.05.

8. RESULTADOS.

8.1 PRESICIÓN Y ADECUABILIDAD DEL SISTEMA.

En la tabla 1 se presentan las áreas y estadística de cada proteína para evaluar la precisión del sistema cromatográfico. Las tablas 2 y 3 muestran los resultados de los parámetros cromatográficos obtenidos en cada inyección para verificar la adecuabilidad del sistema.

Tabla 1 Áreas de cada proteína y sus parámetros estadísticos.

Inyección	F(ab') ₂	Fab
	Área	Área
1	5081453	5804667
2	5074723	5805126
3	5087591	5809964
4	5075079	5807941
5	5077060	5811694
6	5084310	5783776
\bar{y}	5080036.00	5803861.33
S	5272.7485	10206.9191
CV	0.10	0.18

Tabla 2 Parámetros de adecuabilidad del sistema para F(ab')₂

Inyección	Tiempo de retención	Factor capacidad (K')	Platos teóricos
1	10.124	0.60698	846.23
2	10.123	0.60683	844.13
3	10.136	0.60889	847.64
4	10.140	0.60952	847.51
5	10.130	0.60794	842.63
6	10.132	0.60825	850.72

Tabla 3 Parámetros de adecuabilidad del sistema para Fab

Inyección	Tiempo de retención	Factor capacidad (K')	Resolución USP (R)	Platos teóricos
1	11.846	0.88032	1.2748	1494.11
2	11.847	0.88048	1.2782	1498.75
3	11.860	0.88254	1.2783	1499.95
4	11.863	0.88302	1.2766	1505.41
5	11.854	0.88159	1.2774	1503.25
6	11.856	0.88190	1.2800	1498.52

Contrastación de los criterios de aceptación.

CRITERIO		RESULTADO	CUMPLE	REFERENCIA
Factor capacidad por inyección	$F(ab')_2 \geq 0.6$	Min = 0.60683	SÍ	Tabla 2 y 3
	$Fab \geq 0.8$	Min = 0.88032		
Resolución (USP) por inyección	Mín 1.2	Min = 1.2748		
Platos teóricos por inyección	$F(ab')_2$ Mínimo 800	Min = 842.63		
	Fab Mínimo 1400	Min = 1494.11		
El CV $\leq 2\%$	$F(ab')_2$	0.10		
	Fab	0.18		

8.2 LINEALIDAD INDIVIDUAL DEL SISTEMA.

En las tablas 4 y 5 se registra el intervalo de concentración evaluado de cada proteína, así como la respuesta analítica de cada inyección. A estos datos se les ha aplicado el modelo de regresión lineal por mínimos cuadrados para describir la relación lineal que existe entre la "Concenctración vs Área", mostrados en la tabla 6, figuras 7 y 8.

Tabla 4. Volumen de inyección y área para la solución estándar F(ab')₂

Volumen de inyección (μL)	Concentración de muestra (%)	Fracción Fab Área (Abs/min)
30	40	1884582
30	40	1878963
30	40	1889351
45	60	2988778
45	60	2967006
45	60	2970112
60	80	4086969
60	80	4050551
60	80	4086797
75	100	5095943
75	100	5152889
75	100	5122336
90	120	6277039
90	120	6264143
90	120	6314405

Tabla 5. Volumen de inyección y área para la solución estándar Fab

Volumen de inyección (μL)	Concentración de muestra (%)	Fracción Fab Área (Abs/min)
30	40	2211820
30	40	2234236
30	40	2191050
45	60	3364858
45	60	3375910
45	60	3403799
60	80	4569374
60	80	4556091
60	80	4597567
75	100	5735675
75	100	5731862
75	100	5719516
90	120	6881088
90	120	6917784
90	120	6924400

Tabla 6. Análisis de regresión lineal simple (% Concentración vs Área)
 $y = mx + b$

Parámetro	Fracción	
	Estándar de $F(ab')_2$	Estándar Fab
b	-311429.6	-134307.1
m	54751.09	58691.3633
$S_{y/x}$	29497.8546	18818.0622
$CV_{y/x}$	0.73	0.41
r^2	0.99966	0.99989
$LIC(m), LSC(m)$	54169.3518 ; 55332.8282	58320.2452 , 59062.4814

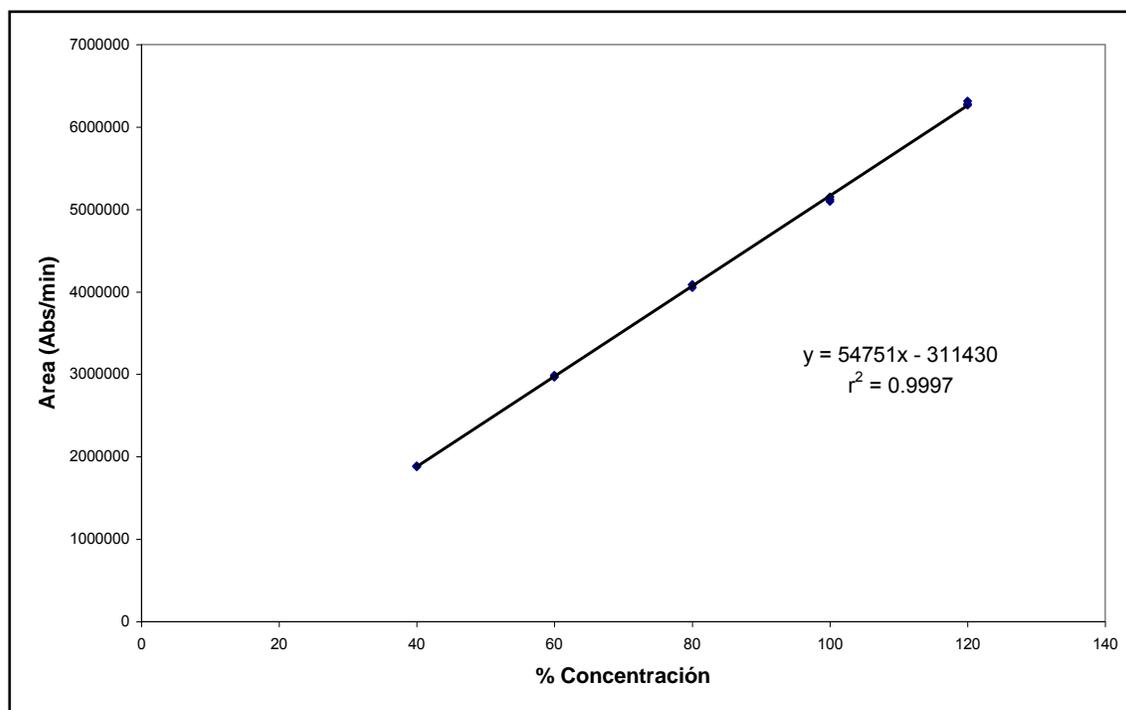


Figura 7. Diagrama de dispersión y línea de mejor ajuste para %Concentración vs Área de $F(ab')_2$

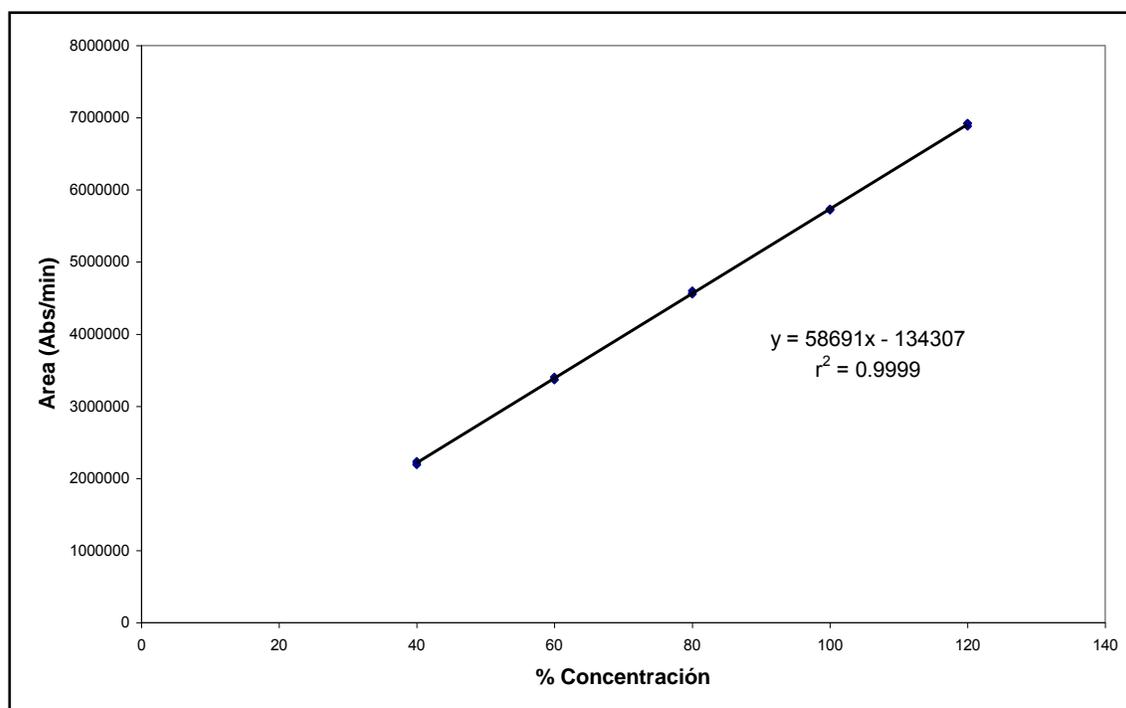


Figura 8. Diagrama de dispersión y línea de mejor ajuste para %Concentración vs Área de Fab

Contrastación de los criterios de aceptación.

CRITERIO		RESULTADO	CUMPLE	REFERENCIA
El intervalo de confianza al 95% para la pendiente no debe incluir el valor de cero.	$F(ab')_2$	54169.35; 55332.83	Sí	Tabla 6
	Fab	58320.25 , 59062.48		
El coeficiente de determinación (r^2) no debe ser menor a 0.98.	$F(ab')_2$	0.99966	Sí	
	Fab	0.99989		
El coeficiente de variación para la regresión ($CV_{y/x}$) no debe exceder el 2%.	$F(ab')_2$	0.73	Sí	
	Fab	0.41		

8.3 LINEALIDAD COMBINADA DEL SISTEMA.

Al igual que en la linealidad individual del sistema se presenta el intervalo de estudio para cada proteína y su respuesta correspondiente en las tablas 7 y 8. La descripción estadística de la relación lineal es presentada en la tabla 9, así como la descripción gráfica en las figuras 9 y 10.

Tabla 7. Porcentaje de concentración inyectadas y áreas de la mezcla de sustancias de referencia $F(ab')_2$

$F(ab')_2$	Área (Abs/min)	Fab (%)	Área (Abs/min)
40%	1927081	40%	2263263
40%	1913925	40%	2228032
40%	1912300	40%	2230321
60%	3095188	60%	3493879
60%	3094918	60%	3498806
60%	3089769	60%	3493213
80%	4198635	80%	4712309
80%	4209038	80%	4753713
80%	4184009	80%	4702171
100%	5241691	100%	5913405
100%	5273839	100%	5932023
100%	5271086	100%	5934345
120%	6338486	120%	7195231
120%	6360285	120%	7182992
120%	6343696	120%	7185275

Tabla 8. Análisis de regresión lineal simple (% Concentración vs área)
 $y = mx+b$

Parámetro	Mezcla	
	$(Fab')_2$	Fab
b	-247745.33	-215753.333
m	55141.77	61629.3983
Sy/x	33099.52	19743.727
CVy/x	0.79	0.42
r^2	0.99961	0.99989
$LIC(m), LSC(m)$	54489.00, 55794.54	61240.03, 62018.77

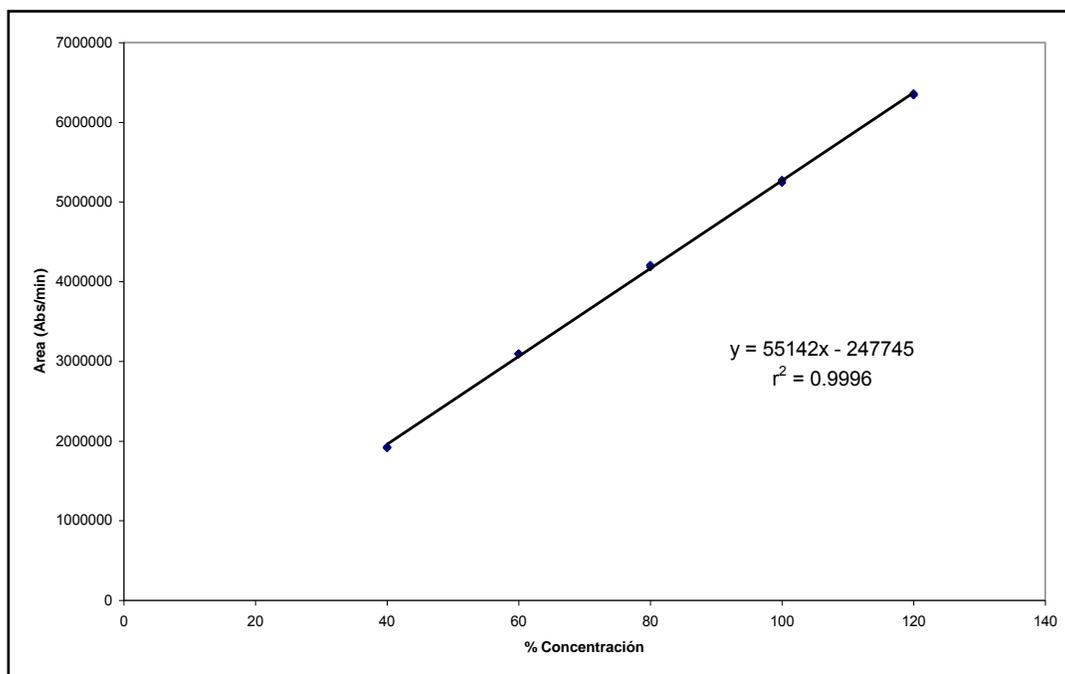


Figura 9. Diagrama de dispersión y línea de mejor ajuste para % Concentración vs Área de $F(ab')_2$ en la mezcla de referencia.

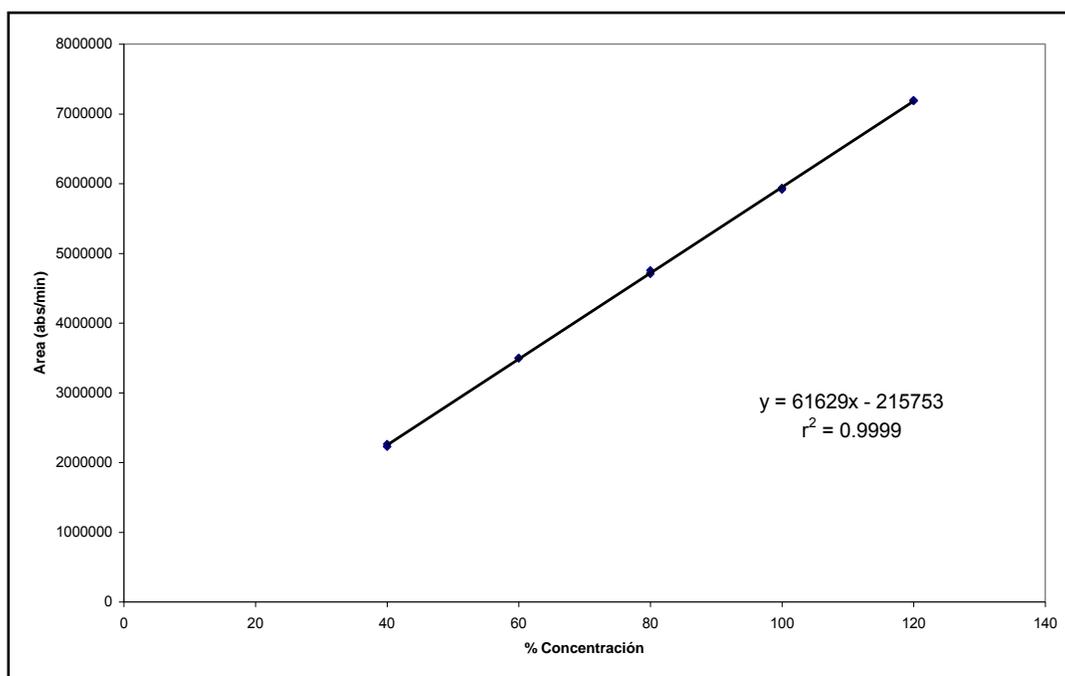


Figura 10. Diagrama de dispersión y línea de mejor ajuste para % Concentración vs Área de Fab en la mezcla de referencia

Contrastación de los criterios de aceptación.

CRITERIO		RESULTADO	CUMPLE	REFERENCIA
El intervalo de confianza al 95% para la pendiente no debe incluir el valor de cero.	$F(ab')_2$	54489.00; 55794.54	Sí	Tabla 8
	Fab	61240.03 ; 62018.77		
El coeficiente de determinación (r^2) no debe ser menor a 0.98.	$F(ab')_2$	0.99958	Sí	
	Fab	0.99988		
El coeficiente de variación para la regresión ($CV_{y/x}$) no debe exceder el 3%.	$F(ab')_2$	0.79	Sí	
	Fab	0.44		

8.4 ESTUDIO DE ESPECIFICIDAD.

Los siguientes cromatogramas son representativos de las soluciones de adecuabilidad, aditivos de faboterapico y de las proteínas IgG e IgGT.

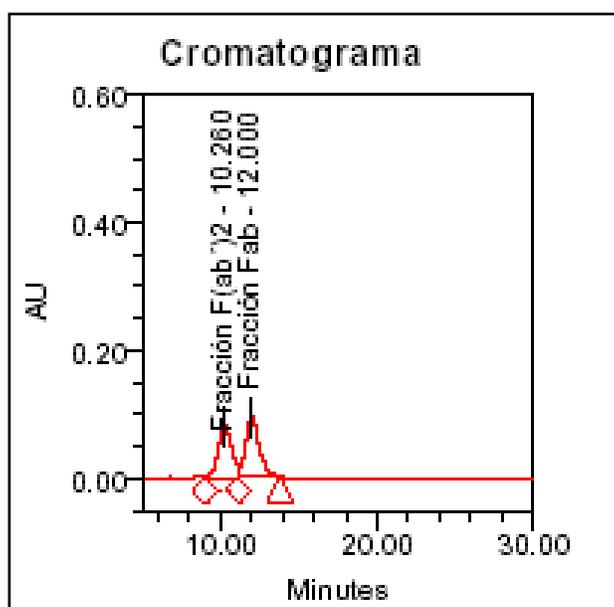


Figura 11. Cromatograma de la solución de adecuabilidad.

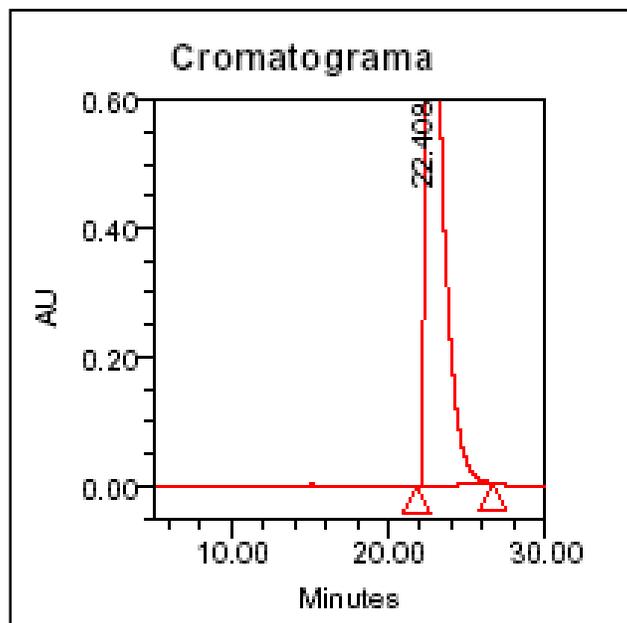


Figura 12. Cromatograma de la solución de aditivos de faboterapico.

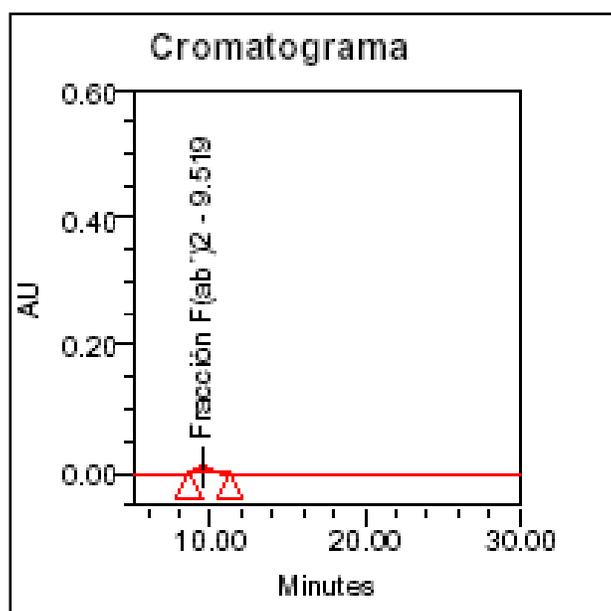


Figura 13. Cromatograma de la solución de IgG + IgGT y Albúmina.

Contrastación de los criterios de aceptación.

CRITERIO	RESULTADO	CUMPLE	REFERENCIA
Los aditivos de producto de faboterapico no deben generar respuesta analítica en la señal de F(ab') ₂ o de Fab.	No se presenta señal analítica de los aditivos de producto terminado al tiempo de retención de F(ab') ₂ y Fab	SÍ	Cromatograma 12.
Las proteínas de producto de faboterapico no deben generar respuesta analítica en la señal de F(ab') ₂ o de Fab.	Se presenta señal analítica de las proteínas al tiempo de retención de F(ab') ₂	NO	Cromatogramas 13.

8.5 ESTUDIO DE SELECTIVIDAD.

Los siguientes cromatogramas son representativos de las soluciones de adecuabilidad y de la matriz analítica degradada con calor.

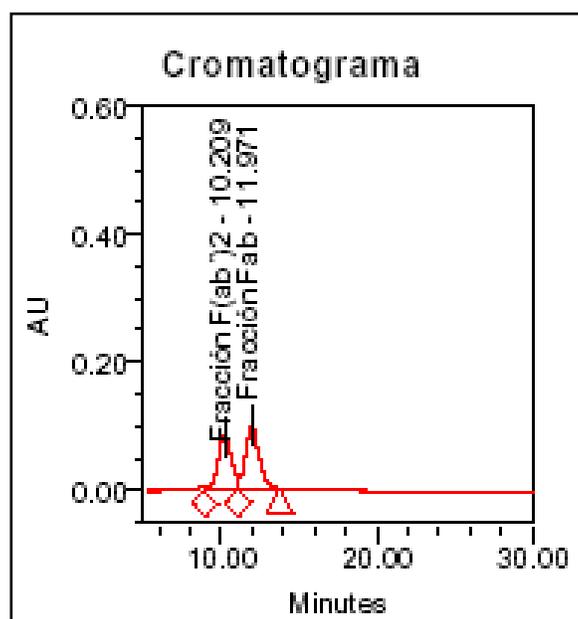


Figura 14. Cromatograma de la solución de adecuabilidad.

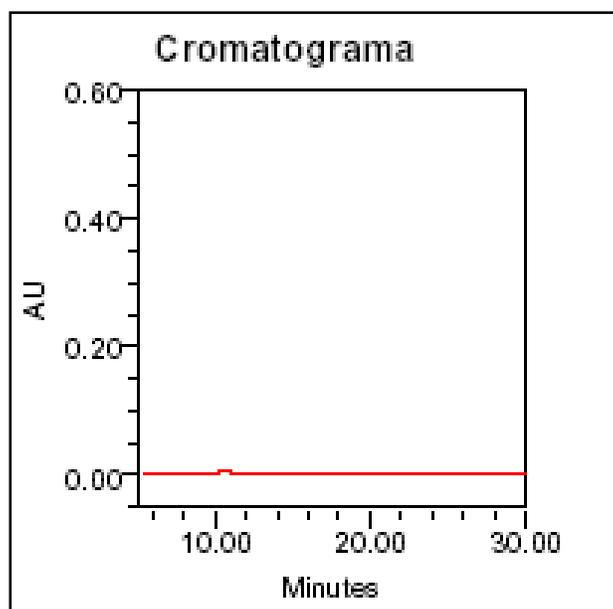


Figura 15. Cromatograma de la muestra tratada con calor.

Contrastación de los criterios de aceptación.

CRITERIO	RESULTADO	CUMPLE	REFERENCIA
La señal analítica del $F(ab')_2$ o de Fab en el cromatograma del producto terminado de faboterapico tratado con calor, debe desaparecer o disminuir de manera importante respecto de la señal analítica del $F(ab')_2$ o de Fab en el cromatograma de adecuabilidad	La señal analítica del del $F(ab')_2$ y del Fab desaparece.	Sí	Cromatogramas 14 y 15

8.6 ESTUDIO DE EXACTITUD, REPETIBILIDAD Y LINEALIDAD.

Las tablas 9, 10, 11 y 12 muestran la precisión y adecuabilidad del sistema al inicio y final de la corrida analítica. En la tabla 13 se presentan las áreas obtenidas de cada proteína para calcular el porcentaje de área recuperado que es mostrado en la tabla 14 y 15. La estadística de la relación lineal que existe entre el porcentaje de área adicionada contra el porcentaje de área recuperada, es mostrado en la tabla 16 y figuras 16 y 17. En la tabla 17 se registra el porcentaje de recobro de cada proteína para evaluar la exactitud del método.

Tabla 9. Áreas de cada componente y parámetros cromatográficos en la adecuabilidad del sistema antes de la corrida de las muestras.

F(ab') ₂					
INYECCIÓN	ÁREA	TIEMPO DE RETENCIÓN	FACTOR CAPACIDAD (K')	RESOLUCIÓN USP (R)	PLATOS TEÓRICOS
1	5424653	10.126	0.60730	NA	907
2	5383116	10.151	0.61127		925
3	5469899	10.182	0.61619		912
4	5418666	10.100	0.60317		894
5	5345201	10.106	0.60413		902
Fab					
INYECCIÓN	ÁREA	TIEMPO DE RETENCIÓN	FACTOR CAPACIDAD (K')	RESOLUCIÓN USP (R)	PLATOS TEÓRICOS
1	6358194	11.850	0.88095	1.3362	1685
2	6334777	11.880	0.88571	1.3437	1704
3	6416155	11.917	0.89159	1.3393	1699
4	6333479	11.819	0.87603	1.3260	1647
5	6333712	11.824	0.87683	1.3279	1656

Tabla 10. Áreas de cada componente y parámetros cromatográficos en la adecuabilidad del sistema después de la corrida de las muestras.

F(ab') ₂					
INYECCIÓN	ÁREA	TIEMPO DE RETENCIÓN	FACTOR CAPACIDAD (K')	RESOLUCIÓN USP (R)	PLATOS TEÓRICOS
1	5339592	10.071	0.59857	NA	894
2	5315946	10.075	0.59921		901
3	5348832	10.077	0.59952		899
4	5293869	10.079	0.59984		905
5	5324907	10.079	0.59984		902
Fab					
INYECCIÓN	ÁREA	TIEMPO DE RETENCIÓN	FACTOR CAPACIDAD (K')	RESOLUCIÓN USP (R)	PLATOS TEÓRICOS
1	6299341	11.783	0.87032	1.3222	1649
2	6303417	11.787	0.87095	1.3208	1657
3	6290377	11.790	0.87143	1.3229	1655
4	6301477	11.791	0.87159	1.3221	1650
5	6275431	11.792	0.87175	1.3242	1658

Tabla 11. Tendencia y variabilidad para áreas en la adecuabilidad del sistema al inicio de la corrida de las muestras.

ESTADÍSTICAS	ÁREA F(ab') ₂	ÁREA Fab
\bar{y}	5408307	6355263.4
S	46864.2422	35619.8360
CV	0.867	0.560

Tabla 12. Tendencia y variabilidad para áreas en la adecuabilidad del sistema al finalizar la corrida de las muestras.

ESTADÍSTICAS	ÁREA F(ab') ₂	ÁREA Fab
\bar{y}	5324629.2	6294008.6
S	21396.9972	11522.2092
CV	0.402	0.183

Tabla 13. Áreas de cada componente $F(ab')_2$ Fab en las muestras adicionadas.

MUESTRA / REPLICA	INyec	ÁREA		MUESTRA / REPLICA	INyec	ÁREA	
		$F(ab')_2$	Fab			$F(ab')_2$	Fab
1,1	1	5288929	6509767	3, 1	1	2370940	9157148
	2	5311718	6483823		2	2367191	9142063
	3	5363521	6564189		3	2361636	9178545
1,2	1	5397477	6372775	3, 2	1	2372787	9008386
	2	5347450	6367577		2	2379436	8978309
	3	5340000	6384141		3	2375997	8986350
1,3	1	5302721	6311028	3, 3	1	2269277	9205281
	2	5273825	6299224		2	2238261	8970469
	3	5285979	6266193		3	2254373	9156882
1,4	1	5314063	6297253	4, 1	1	8340679	9342129
	2	5383856	6143778		2	8192078	9806471
	3	5365888	6300183		3	8204157	9744111
1,5	1	5256084	6304336	4, 2	1	8148497	9471589
	2	5319615	6344626		2	8026759	10165145
	3	5215685	6343043		3	8083559	9920521
1,6	1	5364352	6299611	4, 3	1	8019729	9759230
	2	5341824	6312653		2	8037219	9767124
	3	5299823	6274705		3	8009423	9769488
2, 1	1	8407589	3724402	5, 1	1	2410898	2850266
	2	8285958	3524654		2	2293910	2832093
	3	8096519	3288736		3	2390074	2856021
2, 2	1	8095737	3417006	5, 2	1	2201836	2546663
	2	8205582	3169293		2	2339708	2940647
	3	8053677	3583981		3	2388904	3109391
2, 3	1	7388000	3447724	5, 3	1	2306752	2841424
	2	8653747	3570031		2	2300448	2812446
	3	8096384	3550483		3	2305789	2867810

INyec = inyección

Tabla 14. Porcentaje de área adicionada y recuperada da cada componente $[F(ab')_2$ y Fab] en muestra / replica / inyección.

MUESTRA / REPLICA / INYECCIÓN	F(ab') ₂		MUESTRA / REPLICA / INYECCIÓN	F(ab') ₂	
	% Adicionado	% Recuperado		% Adicionado	% Recuperado
1,1,1	46.09	44.83	3, 1,1	22.18	20.57
1,1,2		45.03	3, 1,2		20.57
1,1,3		44.97	3, 1,3		20.46
1,2,1		45.86	3, 2,1		20.85
1,2,2		45.65	3, 2,2		20.95
1,2,3		45.55	3, 2,3		20.91
1,3,1		45.66	3, 3,1		19.78
1,3,2		45.57	3, 3,2		19.97
1,3,3		45.76	3, 3,3		19.76
1,4,1		45.77	4, 1,1	46.09	47.17
1,4,2		46.70	4, 1,2		45.52
1,4,3		46.00	4, 1,3		45.71
1,5,1		45.47	4, 2,1		46.25
1,5,2		45.61	4, 2,2		44.12
1,5,3		45.12	4, 2,3		44.90
1,6,1		45.99	4, 3,1		45.11
1,6,2		45.83	4, 3,2		45.14
1,6,3		45.79	4, 3,3		45.05
2, 1,1	71.95	69.30	5, 1,1	46.09	45.82
2, 1,2		70.16	5, 1,2		44.75
2, 1,3		71.11	5, 1,3		45.56
2, 2,1		70.32	5, 2,1		46.37
2, 2,2		72.14	5, 2,2		44.31
2, 2,3		69.20	5, 2,3		43.45
2, 3,1		68.18	5, 3,1		44.81
2, 3,2		70.79	5, 3,2		44.99
2, 3,3		69.52	5, 3,3		44.57

Tabla 14 Continuación. Porcentaje de área adicionada y recuperada da cada componente [F(ab')₂ y Fab] en muestra / replica / inyección.

MUESTRA / REPLICA / INYECCIÓN	Fab		MUESTRA / REPLICA / INYECCIÓN	Fab	
	% Adicionado	% Recuperado		% Adicionado	% Recuperado
1,1,1	53.91	55.17	3, 1,1	77.82	79.43
1,1,2		54.97	3, 1,2		79.43
1,1,3		55.03	3, 1,3		79.54
1,2,1		54.14	3, 2,1		79.15
1,2,2		54.35	3, 2,2		79.05
1,2,3		54.45	3, 2,3		79.09
1,3,1		54.34	3, 3,1		80.22
1,3,2		54.43	3, 3,2		80.03
1,3,3		54.24	3, 3,3		80.24
1,4,1		54.23	4, 1,1	53.91	52.83
1,4,2		53.30	4, 1,2		54.48
1,4,3		54.00	4, 1,3		54.29
1,5,1		54.53	4, 2,1		53.75
1,5,2		54.39	4, 2,2		55.88
1,5,3		54.88	4, 2,3		55.10
1,6,1		54.01	4, 3,1		54.89
1,6,2		54.17	4, 3,2		54.86
1,6,3		54.21	4, 3,3		54.95
2, 1,1	28.05	30.70	5, 1,1	53.91	54.18
2, 1,2		29.84	5, 1,2		55.25
2, 1,3		28.89	5, 1,3		54.44
2, 2,1		29.68	5, 2,1		53.63
2, 2,2		27.86	5, 2,2		55.69
2, 2,3		30.80	5, 2,3		56.55
2, 3,1		31.82	5, 3,1		55.19
2, 3,2		29.21	5, 3,2		55.01
2, 3,3		30.48	5, 3,3		55.43

Tabla 15. Relación en porcentaje de área adicionada y recuperada de cada componente $[F(ab')_2$ y $F_{ab}]$ en las muestras – replicas.

MUESTRA / REPLICA	$F(ab')_2$		MUESTRA / REPLICA	Fab	
	% Adicionado	% Recuperado		% Adicionado	% Recuperado
1,1	46.09	44.94	1,1	53.91	55.06
1,2		45.68	1,2		54.32
1,3		45.66	1,3		54.34
1,4		46.16	1,4		53.84
1,5		45.40	1,5		54.60
1,6		45.87	1,6		54.13
2,1	71.95	70.19	2,1	28.05	29.81
2,2		70.55	2,2		29.45
2,3		69.50	2,3		30.50
3,1	22.18	20.53	3,1	77.82	79.47
3,2		20.90	3,2		79.10
3,3		19.83	3,3		80.17
4,1	46.09	46.13	4,1	53.91	53.87
4,2		45.09	4,2		54.91
4,3		45.10	4,3		54.90
5,1	46.09	45.38	5,1	53.91	54.62
5,2		44.71	5,2		55.29
5,3		44.79	5,3		55.21

Tabla 16. Análisis de regresión lineal simple del % de área adicionada vs % área recuperada.

ESTADÍSTICAS	COMPONENTE	
	$F(ab')_2$	Fab
b	-0.89790	1.24318
m	0.99655	0.99655
Sy/x	0.74883	0.74883
CVy/x	1.65	1.37
r^2	0.99758	0.99743
LIC(M), LSC(M)	0.97052 , 1.02258	0.97052 , 1.02258
LIC(B), LSC(B)	-2.16265 , 0.36685	-0.20092 , 2.68727

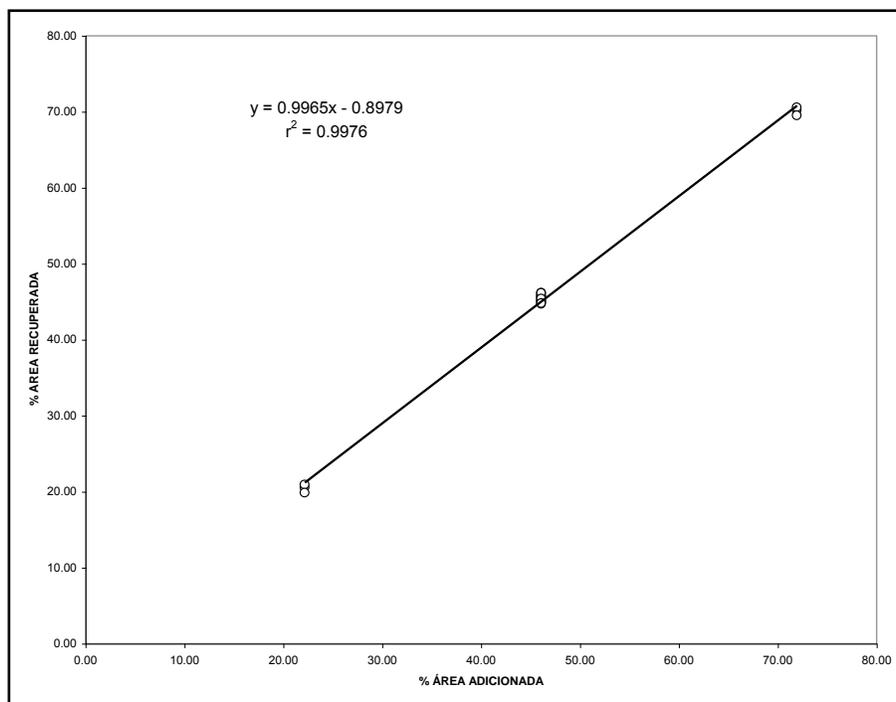


Figura 16. Diagrama de dispersión y línea de mejor ajuste para % área adicionada VS % área recuperada para $F(ab')_2$

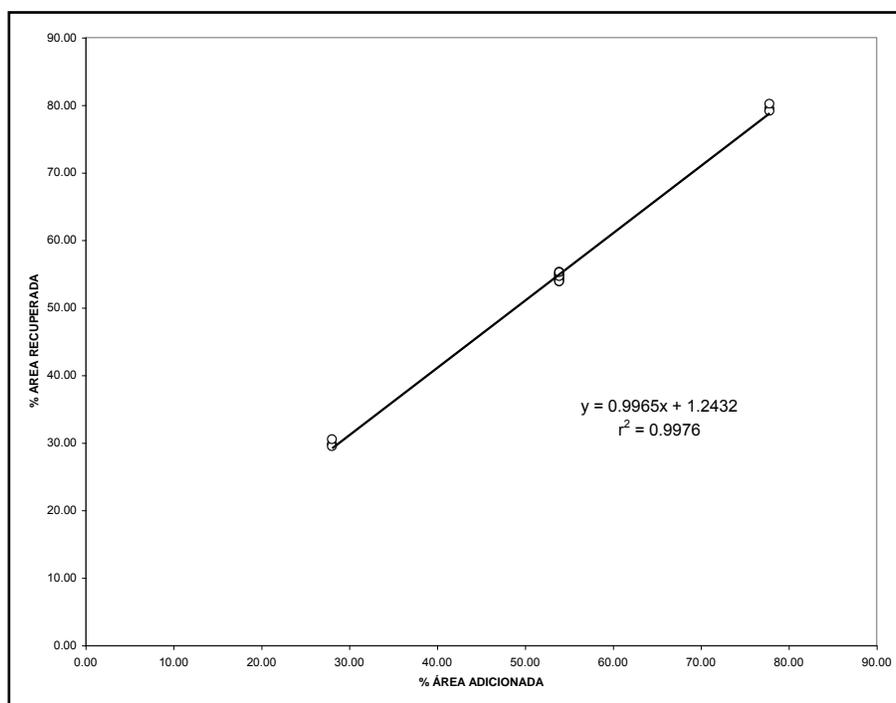


Figura 17. Diagrama de dispersión y línea de mejor ajuste para % área adicionada VS % de área recuperada para F_{ab}

Tabla 17. Porcentaje de recobro del área de cada componente [$F(ab')_2$ y Fab] en las muestras – replicas.

F(ab') ₂		Fab	
MUESTRA / REPLICA	% Recuperado	MUESTRA / REPLICA	% Recuperado
1,1	97.51	1,1	102.13
1,2	99.12	1,2	100.76
1,3	99.07	1,3	100.79
1,4	100.14	1,4	99.88
1,5	98.50	1,5	101.28
1,6	99.52	1,6	100.41
2,1	97.56	2,1	106.27
2,2	98.06	2,2	104.97
2,3	96.59	2,3	108.74
3,1	92.58	3,1	102.11
3,2	94.25	3,2	101.64
3,3	89.43	3,3	103.01
4,1	100.09	4,1	99.92
4,2	97.83	4,2	101.86
4,3	97.85	4,3	101.84
5,1	98.45	5,1	101.32
5,2	97.00	5,2	102.56
5,3	97.18	5,3	102.41
\bar{y}	97.26272	\bar{y}	102.32851
S	2.71553	S	2.26936
CV	2.79	CV	2.22

Contrastación de los criterios de aceptación.

- ADECUABILIDAD DEL SISTEMA ANTES DE LAS CORRIDAS DE LAS MUESTRAS

CRITERIO		RESULTADO	CUMPLE	REFERENCIA
Factor capacidad por inyección	$F(ab')_2 \geq 0.6$	Min 0.60317	SI	Tabla 9.
	$F_{ab} \geq 0.8$	Min 0.87603		
Resolución (USP) por inyección	Mín 1.2	Min 1.326		
Platos teóricos por inyección	$F(ab')_2$ Mínimo 800	Min 894		
	F_{ab} Mínimo 1400	Min 1647		
EI CV \leq 2%	$F(ab')_2$	0.87		Tabla 12
	F_{ab}	0.56		

- ADECUABILIDAD DEL SISTEMA DESPUÉS DE LAS CORRIDAS DE LAS MUESTRAS

CRITERIO		RESULTADO	CUMPLE	REFERENCIA
Factor capacidad por inyección	$F(ab')_2 \geq 0.6$	Min 0.59857	SI	Tabla 10
	$F_{ab} \geq 0.8$	Min 0.87032		
Resolución (USP) por inyección	Mín 1.2	Min 1.3208		
Platos teóricos por inyección	$F(ab')_2$ Mínimo 800	Min 894		
	F_{ab} Mínimo 1400	Min 1649		

- ADECUABILIDAD DEL SISTEMA DESPUÉS DE LAS CORRIDAS DE LAS MUESTRAS

CRITERIO		RESULTADO	CUMPLE	REFERENCIA
El $CV \leq 2\%$	$F(ab')_2$	0.40	SI	Tabla 13
	Fab	0.18		

- EXACTITUD.

CRITERIO		RESULTADO	CUMPLE	REFERENCIA
El intervalo de confianza al 95% para la pendiente ($LIC(M)$, $LSC(M)$), debe incluir el valor de la unidad.	$F(ab')_2$	0.97052 , 1.02258	SI	Tabla 16 y 17
	Fab	0.97052 , 1.02258		
El intervalo de confianza al 95% para la ordenada al origen ($LIC(B)$, $LSC(B)$), debe incluir el valor de cero.	$F(ab')_2$	-2.16265 , 0.36685		
	Fab	-0.20092 , 2.68727		
El promedio del porcentaje de recobro esta entre 95% y 105 %	$F(ab')_2$	97.26272		
	Fab	102.32851		

- LINEALIDAD DEL MÉTODO.

CRITERIO		RESULTADO	CUMPLE	REFERENCIA
El valor del coeficiente de determinación no debe ser menor de 0.98.	$F(ab')_2$	0.99758	SI	Tabla 16
	Fab	0.99743		

- REPETIBILIDAD.

CRITERIO		RESULTADO	CUMPLE	REFERENCIA
El coeficiente de variación de regresión (CV _{y/x}) no debe exceder el 3%.	F(ab') ₂	1.65	SI	Tabla 16
	Fab	1.37		
El coeficiente de variación del % de recobro (CV) no debe exceder el 3%.	F(ab') ₂	2.79	SI	Tabla 17
	Fab	2.22		

8.7 ESTUDIO DE PROTEÍNAS INTERFERENTES EN LA EXACTITUD.

La tabla 18 muestra la adecuabilidad del sistema para la corrida analítica del estudio de proteínas interferentes en la exactitud. En las tablas 19 y 20 se registran las áreas de las soluciones interferentes de IgG e IgGT al 3 y 5%. Para evaluar el grado de interferencia de las proteínas se documenta en la tabla 21 las áreas de las muestras adicionadas y en la tabla 24 el promedio de las inyecciones de cada muestra. El cálculo del porcentaje de recobro se muestra en la tabla 25 y 26.

Tabla 18. Áreas de F(ab')₂ y Fab y sus parámetros cromatográficos en la adecuabilidad del sistema.

F(ab') ₂					
INYECCIÓN	ÁREA	TIEMPO DE RETENCIÓN	FACTOR CAPACIDAD (K')	RESOLUCIÓN USP (R)	PLATOS TEÓRICOS
1	6312139	10.596	0.68190	NA	930
2	6230985	10.598	0.68222		926
3	6347028	10.636	0.68825		924
Fab					
INYECCIÓN	ÁREA	TIEMPO DE RETENCIÓN	FACTOR CAPACIDAD (K')	RESOLUCIÓN USP (R)	PLATOS TEÓRICOS
1	7585608	11.560	0.83492	1.3402	1707
2	7571924	11.561	0.83508	1.3434	1711
3	7622794	11.604	0.84190	1.3370	1707

Tabla 19, Áreas en la solución interferente de IgG + IgGT al 3%

SOLUCIÓN	INYECCIÓN	TIEMPO DE RETENCIÓN	ÁREA
SI3%	1	10.661	829145
	2	10.683	835097
	3	10.706	816350

Tabla 20. Áreas de la solución interferente de IgG + IgGT al 5%

SOLUCIÓN	INYECCIÓN	TIEMPO DE RETENCIÓN	ÁREA
SI3%	1	10.653	1450777
	2	10.668	1452539
	3	10.676	1439103

Tabla 21. Áreas de F(ab')₂ y Fab en las soluciones muestra adicionadas con interferentes de IgG + IgGT al 3% y 5%

MUESTRA / REPLICA	INyec	ÁREA	
		F(ab') ₂	Fab
M3%-1	1	7196282	7514964
	2	7130050	7540693
	3	7139222	7555374
M3%-2	1	7117944	7551973
	2	7148990	7536345
	3	7105917	7544840
M3%-3	1	7182842	7593910
	2	7211929	7607523
	3	7188581	7613469
M5%-1	1	7957157	7588110
	2	7954580	7629372
	3	7949822	7598759
M5%-2	1	7899233	7566281
	2	7908626	7572701
	3	7895127	7603867
M5%-3	1	7923582	7555459
	2	7977202	7564270
	3	7929203	7562152

INyec=Inyección

Tabla 22. Tendencia y variabilidad para áreas de $F(ab')_2$ y Fab de la solución de adecuabilidad.

ESTADÍSTICAS	$F(ab')_2$	Fab
\bar{y}	6296717.333	7593442
s	59538.77152	26324.28331
CV	0.95	0.35

Tabla 23. Tendencia y variabilidad para las áreas de las soluciones interferentes.

ESTADÍSTICAS	SI3%	SI5%
\bar{y}	826864	1447473
s	9579.390534	7301.974801
CV	1.16	0.50

Tabla 24. Promedio de áreas de las tres inyecciones de cada componente $F(ab')_2$ y Fab en las soluciones muestra con interferentes de IgG + IgGT al 3% Y 5%

MUESTRA / REPLICA	\bar{y} (ÁREA)	
	$F(ab')_2$	Fab
M3%-1	7155184.667	7537010.330
M3%-2	7124283.667	7544386.000
M3%-3	7194450.667	7604967.330
M5%-1	7953853.000	7605413.670
M5%-2	7900995.333	7580949.670
M5%-3	7943329.000	7560627.000

Tabla 25. Porcentaje de recobro para las áreas de Fab en las muestra adicionadas con interferentes (IgG + IgGT)

MUESTRA / REPLICA	% DE RECOBRO (%y)	
	SIN RESTAR SI	RESTANDO SI
M3%-1	99.26	99.26
M3%-2	99.35	99.35
M3%-3	100.15	100.15
M5%-1	100.16	100.16
M5%-2	99.84	99.84
M5%-3	99.57	99.57
\bar{y}	99.72060	99.72060
s	0.39063	0.39063
CV	0.39	0.39
LIC(μ), LSC(μ)).	99.31, 100.13	99.31, 100.13

Tabla 26. Porcentaje de recobro para las áreas de $F(ab')_2$ en las muestras adicionadas con interferentes (IgG + IgGT).

MUESTRA / REPLICA	% DE RECOBRO	
	SIN RESTAR SI	RESTANDO SI
M3%-1	113.634	100.50
M3%-2	113.143	100.01
M3%-3	114.257	101.13
M5%-1	126.317	103.33
M5%-2	125.478	102.49
M5%-3	126.150	103.16
\bar{y}	119.82989	101.77019
s	6.75432	1.41476
CV	5.64	1.39
LIC(μ), LSC(μ)).	112.74, 126.92	100.29, 103.25

Contrastación de los criterios de aceptación.

• ADECUABILIDAD DEL SISTEMA

CRITERIO		RESULTADO	CUMPLE	REFERENCIA
Factor capacidad por inyección	$F(ab')_2$ ≥ 0.6	Min 0.68190	SI	Tabla 18
	F_{ab} ≥ 0.8	Min 0.83492		
Resolución (USP) por inyección	Mín 1.2	Min 1.3370		
Platos teóricos por inyección	$F(ab')_2$ Mínimo 800	Min 924		
	F_{ab} Mínimo 1400	Min 1707		
EI CV $\leq 2\%$	$F(ab')_2$	0.95	SI	Tabla 22
	F_{ab}	0.35		

• GRADO DE INTERFERENCIA

CRITERIO		RESULTADO	CUMPLE	REFERENCIA	
El grado de interferencia de las soluciones interferentes de proteína en las muestras, debe ser eliminado de manera aceptable al restar la señal analítica de la solución interferente al de la muestra.	$F(ab')_2$	% DE RECOBRO SIN RESTA	119.83 %	Tabla 26	
		% DE RECOBRO CON RESTA	101.77 %		
	F_{ab}	% DE RECOBRO SIN RESTA	99.72 %	SI	Tabla 25
		% DE RECOBRO CON RESTA	99.72 %		

CRITERIO		RESULTADO	CUMPLE	REFERENCIA
El promedio del porciento de recobro esta entre 95% y 105 %	F(ab') ₂	101.77019 %	SI	Tabla 25 y 26
	Fab	99.72060 %		

8.8 ESTUDIO DE PRECISIÓN INTERMEDIA.

La adecuabilidad del sistema es presentado en la tabla 27 y 28 para el analista 1 y en la tabla 29 y 30 para el analista 2. La tabla 31 muestra el área de la solución interferente para los dos analistas y la tabla 32 las áreas de las muestras analizadas por ambos analistas y el promedio de las inyecciones en la tabla 33. La tendencia y variabilidad del porcentaje de proteínas se encuentra registrado en las tablas 34 y 35. El análisis de varianza se presenta en la tabla 36.

Tabla 27. Adecuabilidad del sistema para "SR" por el analista 1.

INYECCIÓN	ÁREA F(ab') ₂		ÁREA Fab	
	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 1	DÍA 2
SA1	6622114	6692737	7321290	7333627
SA2	6681422	6656854	7311781	7307547
SA3	6739665	6677736	7420527	7255618
SA4	6760462	6695898	7456269	7358759
SA5	6724222	6713349	7441632	7288212
\bar{y}	6705577.00	6687314.80	7390300	7308752.60
S	54935.25	21215.94	68608	39893.71
CV	0.82	0.32	0.93	0.55

Tabla 28. Parámetros de adecuabilidad del sistema cromatografico para el analista 1.

PARAMETRO	DÍA	F(ab') ₂					Fab				
		INYECCIÓN					INYECCIÓN				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
TIEMPO DE RETENCIÓN	1	10.249	10.926	10.931	10.896	10.901	11.982	12.771	12.776	12.736	12.740
	2	10.828	10.844	10.847	10.862	10.91	12.680	12.695	12.700	12.721	12.773
FACTOR CAPACIDAD (K')	1	0.63	0.73	0.74	0.73	0.73	0.90	1.03	1.03	1.02	1.02
	2	0.72	0.72	0.72	0.72	0.73	1.01	1.02	1.02	1.02	1.03
RESOLUCIÓN (R) USP	1	NA					1.3395	1.3471	1.3440	1.3426	1.3414
	2	NA					1.3402	1.3418	1.3428	1.3411	1.3445
PLATOS TEÓRICOS USP	1	954.64	957.64	949.94	950.94	953.97	1692.38	1697.85	1689.81	1679.17	1693.48
	2	918.09	921.66	919.60	919.16	924.75	1647.68	1662.86	1651.91	1649.02	1659.97

NA = No aplica.

Tabla 29. Adecuabilidad del sistema para "SR" por el analista 2.

INYECCIÓN	ÁREA $F(ab')_2$		ÁREA Fab	
	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 1	DÍA 2
SA1	6879931	6207601	7200206	6749762
SA2	6859349	6372503	7206376	6883062
SA3	6886799	6367173	7179453	6909031
SA4	6892636	6386828	7232334	6913382
SA5	6886800	6378184	7217928	6907315
\bar{y}	6881103.00	6342457.80	7207259.40	6872510.40
S	12966.50	75738.02	19788.13609	69631.37
CV	0.19	1.19	0.27	1.01

Tabla 30. Parámetros de adecuabilidad del sistema cromatografico para el analista 2.

PARAMETRO	DÍA	$F(ab')_2$					Fab				
		INYECCIÓN					INYECCIÓN				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
TIEMPO DE RETENCIÓN	1	10.909	10.914	10.937	10.873	10.887	12.748	12.75	12.778	12.705	12.722
	2	10.869	10.874	10.893	10.864	10.870	12.703	12.713	12.731	12.700	12.708
FACTOR CAPACIDAD (K')	1	0.73	0.73	0.74	0.73	0.73	1.02	1.02	1.03	1.02	1.02
	2	0.73	0.73	0.73	0.72	0.73	1.02	1.02	1.02	1.02	1.02
RESOLUCIÓN (R) USP	1	NA					1.3115	1.3109	1.3132	1.3088	1.3085
	2	NA					1.3220	1.3257	1.3275	1.3244	1.3244
PLATOS TEÓRICOS USP	1	914.59	917.47	919.62	913.47	911.95	1611.47	1618.58	1617.59	1615.82	1607.48
	2	925.43	921.95	929.52	920.83	921.14	1640.51	1639.96	1652.94	1637.04	1642.31

Tabla 31. Áreas de la Solución Interferente (SI).

INYECCIÓN	DÍA	TR (min)	ANALISTA 1	TR (min)	ANALISTA 2
SI1	1	9.990	342373	9.987	375540
SI2	1	9.992	356844	9.998	362093
SI3	1	9.995	358519	10.003	370432
SI1	2	9.951	373855	9.830	369920
SI2	2	9.969	364739	9.976	373208
SI3	2	9.977	378897	NR	NR
NR: No reportado					

Tabla 32. Áreas de cada proteína para muestras.

INYECCIÓN	DÍA	ANALISTA 1		ANALISTA 2	
		F(ab') ₂	Fab	F(ab') ₂	Fab
SM1-1	1	14290973	SSA	14904875	SSA
SM1-2	1	14290973		15300857	
SM1-3	1	14310632		15338776	
SM1-1	2	14178005	SSA	14379201	SSA
SM1-2	2	14222754		14368312	
SM1-3	2	14160873		14342015	
SM2-1	1	14320357	SSA	15122441	SSA
SM2-2	1	14364527		15118187	
SM2-3	1	14336836		15143428	
SM2-1	2	14179200	SSA	14435370	SSA
SM2-2	2	14179701		14465101	
SM2-3	2	14178111		14463587	
SM3-1	1	14366443	SSA	15244551	SSA
SM3-2	1	14344501		15215360	
SM3-3	1	14339374		15224781	
SM3-1	2	14220126	SSA	14528630	SSA
SM3-2	2	14179394		14513891	
SM3-3	2	14209795		14448605	

SSA = Sin señal analítica.

Tabla 33. Promedios de las inyecciones de las áreas de cada proteína.

ANALISTA	DÍA	SR		SI	M		
		F(ab') ₂	Fab			F(ab') ₂	Fab
1	1	6625577.00	7272467.60	352578.67	SM1	14297526.0	NA
					SM2	14340573.3	
					SM3	14350106.0	
	2	6687314.80	7223705.00	372497.00	SM1	14187210.7	
					SM2	14179004.0	
					SM3	14203105.0	
2	1	6881103.00	7207259.40	369355.00	SM1	15181502.7	
					SM2	15128018.7	
					SM3	15228230.7	
	2	6342457.80	6872510.40	371564.00	SM1	14363176.0	
					SM2	14454686.0	
					SM3	14497042.0	

Tabla 34. Contenido (%) de $(Fab')_2 + Fab$ para las "muestras y sus promedios" (%)

INYECCIÓN	DÍA	ANALISTA 1		ANALISTA 2	
		$(Fab')_2 + Fab$ (%)	% PROMEDIO	$(Fab')_2 + Fab$ (%)	% PROMEDIO
SM1-1	1	89.2490	89.29	89.6162	91.32
SM1-2		89.2490		92.0576	
SM1-3		89.3748		92.2914	
SM2-1		89.4371	89.57	90.9576	90.99
SM2-2		89.7199		90.9314	
SM2-3		89.5426		91.0870	
SM3-1		89.7322	89.63	91.7104	91.61
SM3-2		89.5917		91.5305	
SM3-3		89.5589		91.5885	
SM1-1	2	87.5820	87.64	93.6961	93.59
SM1-2		87.8659		93.6232	
SM1-3		87.4733		93.4473	
SM2-1		87.5896	87.59	94.0718	94.20
SM2-2		87.5927		94.2707	
SM2-3		87.5826		94.2605	
SM3-1		87.8492	87.74	94.6956	94.48
SM3-2		87.5908		94.5970	
SM3-3		87.7836		94.1603	

Tabla 35. Tendencia y variabilidad del porcentaje de $F(ab')_2 + Fab$ de las muestras.

ANALISTA	DIA	% de $F(ab')_2 + Fab$	MÉTODO ANALÍTICO		
			\bar{y}	S	CV
1	1	89.29	89.50	0.17937	0.20
		89.57			
		89.63			
	2	87.64	87.66	0.07773	0.09
		87.59			
		87.74			
2	1	91.32	91.31	0.30915	0.34
		90.99			
		91.61			
	2	93.59	94.09	0.45766	0.49
		94.20			
		94.48			
	\bar{y}	90.63750			
	S	2.49267			
	CVt	2.75			

TABLA 36. TABLA DE ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EL ESTUDIO DE PRECISIÓN INTERMEDIA PARA EL PORCENTAJE DE RECOBRO Y ESTIMADORES DE VARIACIÓN					
FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	Fcal	Pr Fcal
ANA	1	50.96441	50.96441	6.10395	0.13213
DÍA / ANA	2	16.69882	8.34941	97.62536	2.40E-06*
ERROR DEL MÉTODO	8	0.68420	0.08553		
TOTAL	11	68.34743			
	Se=	0.29245			
	Cve=	0.32			
	St=	2.49267			
	Cvt=	2.75			
	S _{d/a} =	1.65971			
	C _{d/a} =	1.83			

* Efecto significativo.

Contrastación de los criterios de aceptación.

- ADECUABILIDAD DEL SISTEMA

CRITERIO		RESULTADO	CUMPLE	REFERENCIA	
Factor capacidad por inyección	$F(ab')_2 \geq 0.6$	ANALISTA 1 DIA 1	Min 0.63	SI	Tabla 28 y 30
		ANALISTA 1 DIA 2	Min 0.72		
		ANALISTA 2 DIA 1	Min 0.73		
		ANALISTA 2 DIA 2	Min 0.72		
	$F(ab')_2 \geq 0.8$	ANALISTA 1 DIA 1	Min 0.9		
		ANALISTA 1 DIA 2	Min 1.01		
		ANALISTA 2 DIA 1	Min 1.02		
		ANALISTA 2 DIA 2	Min 1.02		

Platos teóricos por inyección	F(ab') ₂ Mínimo 800	ANALISTA 1 DIA 1	Min 949.94	SI	Tabla 28 y 30
		ANALISTA 1 DIA 2	Min 918.09		
		ANALISTA 2 DIA 1	Min 911.95		
		ANALISTA 2 DIA 2	Min 920.83		
	Fab Mínimo 1400	ANALISTA 1 DIA 1	Min 1679.17		
		ANALISTA 1 DIA 2	Min 1647.68		
		ANALISTA 2 DIA 1	Min 1607.48		
		ANALISTA 2 DIA 2	Min 1637.04		

- ADECUABILIDAD DEL SISTEMA

CRITERIO		RESULTADO	CUMPLE	REFERENCIA	
Resolución (USP) por inyección	Mín 1.2	ANALISTA 1 DIA 1	Min 1.3395	SI	Tabla 28 y 30
		ANALISTA 1 DIA 2	Min 1.3402		
		ANALISTA 2 DIA 1	Min 1.3085		
		ANALISTA 2 DIA 2	Min 1.322		
CV área bajo la curva para las 5 inyecciones	F(ab') ₂ Máx 2%	ANALISTA 1 DIA 1	0.82	SI	Tabla 27 y 29
		ANALISTA 1 DIA 2	0.32		
		ANALISTA 2 DIA 1	0.93		
		ANALISTA 2 DIA 2	0.55		
	Fab Máx 2%	ANALISTA 1 DIA 1	0.19		
		ANALISTA 1 DIA 2	0.36		
		ANALISTA 2 DIA 1	0.27		
		ANALISTA 2 DIA 2	1.01		

- REPETIBILIDAD DE MÉTODO

CRITERIO		RESULTADO	CUMPLE	REFERENCIA
El CV del método no debe exceder el 2%.	ANALISTA 1 DIA 1	0.20	SI	Tabla 35
	ANALISTA 1 DIA 2	0.09		
	ANALISTA 2 DIA 1	0.34		
	ANALISTA 2 DIA 2	0.49		

- REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO

CRITERIO	RESULTADO	CUMPLE	REFERENCIA
La probabilidad Fcal analistas no debe ser mayor a 0.05 o el CV de los analistas no excede el 3%.	Pr = 0.1321	SI	Tabla 36
La probabilidad Fcal días / analistas debe ser mayor a 0.05 o el CV de días / analistas no excede el 3%.	CV d/a = 1.83		
El CV total no debe exceder el 3%.	2.75	SI	Tabla 35

8.9 ESTUDIO DE ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA.

La adecuabilidad y precisión del sistema cromatográfico se presenta en la tabla 37 y 38. El registro de áreas de las muestras analizadas a diferentes tiempos se encuentran en la tabla 39 y el cálculo del porcentaje de área, así como su estadística en la tabla 40. El cálculo de la diferencia absoluta se registra en la tabla 41.

Tabla 37. Áreas y parámetros cromatográficos en adecuabilidad del sistema para $F(ab')_2$ Y Fab

$F(ab')_2$					
SOLUCIÓN DE ADECUABILIDAD/ INYECCIÓN	ÁREA	TIEMPO DE RETENCIÓN	FACTOR CAPACIDAD (K')	RESOLUCIÓN (R)	PLATOS TEÓRICOS
SA-1	5428479	10.049	0.601	NA	879
SA-2	5371081	10.051	0.602		864
SA-3	5338074	10.054	0.602		884
SA-4	5262246	10.058	0.603		875
SA-5	5394481	10.059	0.603		879
Fab					
SOLUCIÓN DE ADECUABILIDAD/ INYECCIÓN	ÁREA	TIEMPO DE RETENCIÓN	FACTOR CAPACIDAD (K')	RESOLUCIÓN (R)	PLATOS TEÓRICOS
SA-1	6425037	11.759	0.867	1.3079	1612
SA-2	6631792	11.762	0.868	1.2955	1579
SA-3	6395456	11.765	0.867	1.3081	1622
SA-4	6407497	11.766	0.868	1.3067	1621
SA-5	6413838	11.768	0.868	1.3069	1625

NA: No aplica

Tabla 38. Porcentaje (%) de áreas para $F(ab')_2$ o Fab y sus parámetros estadísticos en adecuabilidad del sistema.

INYECCIÓN ADECUABILIDAD	$F(ab')_2$	Fab
	% ÁREA	% ÁREA
SA-1	45.80	54.20
SA-2	44.75	55.25
SA-3	45.49	54.51
SA-4	45.09	54.91
SA-5	45.68	54.32
\bar{y}	45.36	54.64
S	0.4355	0.4355
CV	0.96	0.80

Tabla 39. Áreas de $F(ab')_2$ y Fab en muestras adicionadas.

Condición de Estabilidad	Replica / inyección	ÁREA	
		$F(ab')_2$	Fab
M0 h	1- 1	5265802	6475300
	1- 2	5276828	6456227
	1- 3	5266472	6484983
	2- 1	5408183	6248771
	2- 2	5403164	6292314
	2- 3	5429293	6265479
	3- 1	5298388	6361383
	3- 2	5205374	6355104
	3- 3	5221105	6398772
M12 h	1- 1	5188464	6355121
	1- 2	5313228	6494194
	1- 3	5313947	6484601
	2- 1	5431883	6269404
	2- 2	5450043	6285679
	2- 3	5434375	6254304
	3- 1	5219987	6335082
	3- 2	5265266	6412146
	3- 3	5244444	6354498
M24 h	1- 1	5027251	6165448
	1- 2	5123212	6312547
	1- 3	5267039	6366729
	2- 1	5400633	6176596
	2- 2	5375955	6173784
	2- 3	5348340	6163668
	3- 1	5192831	6282813
	3- 2	5220106	6301717
	3- 3	5159339	6323862

Condición de Estabilidad	Replica / inyección.	ÁREA	
		$F(ab')_2$	Fab
M48 h	1- 1	5024461	6156572
	1- 2	5274463	6928814
	1- 3	5309685	6816547
	2- 1	5431399	6493870
	2- 2	5442263	6504052
	2- 3	5252027	6055511
	3- 1	5129372	6171331
	3- 2	5301243	6593834
	3- 3	5332858	6952882
M72 h	1- 1	5279496	6752886
	1- 2	5329535	6675737
	1- 3	5311141	6620293
	2- 1	5483343	6400076
	2- 2	5574515	6394204
	2- 3	5444542	6425154
	3- 1	5420954	6560683
	3- 2	5321604	6572210
	3- 3	5440161	6578944

Tabla 40. Porciento (%) de área para $F(ab')_2$ o Fab y sus estadísticas a cada tiempo de estabilidad.

Condición de Estabilidad	muestra/ inyecc.	% ÁREA		Condición de Estabilidad	muestra/ inyecc.	% ÁREA	
		$F(ab')_2$	Fab			$F(ab')_2$	Fab
M0 h	1- 1	44.85	55.15	M24 h	1- 1	44.92	55.08
	1- 2	44.97	55.03		1- 2	44.80	55.20
	1- 3	44.82	55.18		1- 3	45.27	54.73
	- y	44.88	55.12		- y	45.00	55.00
	S	0.0835	0.0835		S	0.2470	0.2470
	CV	0.19	0.15		CV	0.55	0.45
M0 h	2- 1	46.39	53.61	M24 h	2- 1	46.65	53.35
	2- 2	46.20	53.80		2- 2	46.55	53.45
	2- 3	46.42	53.58		2- 3	46.46	53.54
	- y	46.34	53.66		- y	46.55	53.45
	S	0.1228	0.1228		S	0.0951	0.0951
	CV	0.26	0.23		CV	0.20	0.18
M0 h	3- 1	45.44	54.56	M24 h	3- 1	45.25	54.75
	3- 2	45.03	54.97		3- 2	45.31	54.69
	3- 3	44.93	55.07		3- 3	44.93	55.07
	- y	45.13	54.87		- y	45.16	54.84
	S	0.2707	0.2707		S	0.2035	0.2035
	CV	0.60	0.49		CV	0.45	0.37
M12 h	1- 1	44.95	55.05	M48 h	1- 1	44.94	55.06
	1- 2	45.00	55.00		1- 2	43.22	56.78
	1- 3	45.04	54.96		1- 3	43.79	56.21
	- y	44.99	55.01		- y	43.98	56.02
	S	0.0463	0.0463		S	0.8743	0.8743
	CV	0.10	0.08		CV	1.99	1.56
M12 h	2- 1	46.42	53.58	M48 h	2- 1	45.55	54.45
	2- 2	46.44	53.56		2- 2	45.56	54.44
	2- 3	46.49	53.51		2- 3	46.45	53.55
	- y	46.45	53.55		- y	45.85	54.15
	S	0.0370	0.0370		S	0.5176	0.5176
	CV	0.08	0.07		CV	1.13	0.96
M12 h	3- 1	45.17	54.83	M48 h	3- 1	45.39	54.61
	3- 2	45.09	54.91		3- 2	44.57	55.43
	3- 3	45.21	54.79		3- 3	43.41	56.59
	- y	45.16	54.84		- y	44.45	55.55
	S	0.0641	0.0641		S	0.9962	0.9962
	CV	0.14	0.12		CV	2.24	1.79

Continuación. Tabla 40. Por ciento (%) de área para $F(ab')_2$ o Fab y sus estadísticas a cada tiempo de estabilidad.

Condición de Estabilidad	muestra/ inyecc.	% ÁREA	
		$F(ab')_2$	Fab
M72 h	1- 1	43.88	56.12
	1- 2	44.39	55.61
	1- 3	44.51	55.49
	\bar{y}	44.26	55.74
	S	0.3381	0.3381
	CV	0.76	0.61
M72 h	2- 1	46.14	53.86
	2- 2	46.58	53.42
	2- 3	45.87	54.13
	\bar{y}	46.20	53.80
	S	0.3562	0.3562
	CV	0.77	0.66
M72 h	3- 1	45.24	54.76
	3- 2	44.74	55.26
	3- 3	45.26	54.74
	\bar{y}	45.08	54.92
	S	0.2950	0.2950
	CV	0.65	0.54

Tabla 41. Por ciento de área promedio de $F(ab')_2$ y Fab en la muestra y la diferencia absoluta del por ciento de área promedio a cada tiempo respecto al por ciento del área promedio inicial.

TIEMPO	MUESTRA	% AREA $F(ab')_2$	\bar{y}	s	cv	$ d_i $	% AREA Fab	\bar{y}	s	cv	$ d_i $
0	1	44.88	45.45	0.7799	1.72	NA	55.12	54.55	0.7799	1.43	NA
	2	46.34					53.66				
	3	45.13					54.87				
12	1	44.99	45.54	0.7975	1.75	0.19	55.01	54.46	0.7975	1.46	0.15
	2	46.45					53.55				
	3	45.16					54.84				
24	1	45.00	45.57	0.8539	1.87	0.26	55.00	54.43	0.8539	1.57	0.22
	2	46.55					53.45				
	3	45.16					54.84				
48	1	43.98	44.76	0.9710	2.17	1.52	56.02	55.24	0.9710	1.76	1.26
	2	45.85					54.15				
	3	44.45					55.55				
72	1	44.26	45.18	0.9709	2.15	0.60	55.74	54.82	0.9709	1.77	0.50
	2	46.20					53.80				
	3	45.08					54.92				

Contrastación de los criterios de aceptación.

• ADECUABILIDAD DEL SISTEMA

CRITERIO		RESULTADO	CUMPLE	REFERENCIA
Factor capacidad por inyección	$F(ab')_2 \geq 0.6$	Min 0.602		
	$F(ab')_2 \geq 0.8$	Min 0.867		
Resolución (USP) por inyección	Min 1.2	Min 1.2955	SI	Tabla 37
Platos teóricos por inyección	$F(ab')_2$ Mínimo 800	Min 864		
	F_{ab} Mínimo 1400	Min 1579		
El $CV \leq 2\%$	$F(ab')_2$	0.96	SI	Tabla 38
	F_{ab}	0.80		

• ESTABILIDAD

CRITERIO		RESULTADO	CUMPLE	REFERENCIA	
La diferencia promedio de la composición porcentual para cada componente de cada tiempo, respecto del inicio no debe exceder el 2%.	$F(ab')_2$	12 horas	0.19	SÍ	Tabla 41
		24 horas	0.26		
		48 horas	1.52		
		72 horas	0.60		
	F_{ab}	12 horas	0.15		
		24 horas	0.22		
		48 horas	1.26		
		72 horas	0.50		

8.10 ESTUDIO DE TOLERANCIA.

Las tablas 42, 43 y 44 describen la adecuabilidad del sistema en el estudio de tolerancia. Las áreas de la solución interferente se muestran en la tabla 45 y en la tabla 46 las áreas de las muestras. El calculo de los promedios de las inyecciones en la tabla 47 y el calculo del porciento en la tabla 48. La tendencia y variabilidad del porcentaje de proteínas en la tabla 49.

Tabla 42. Áreas en la adecuabilidad del sistema para "SA" en el amortiguador 1 y 2.

AMOTIGUADOR 1		
INYECCIÓN	ÁREA F(ab') ₂	ÁREA Fab
SA1	6293659	7436134
SA2	6290150	7332410
SA3	6261653	7325281
SA4	6239101	7259591
SA5	6217874	7223237
AMOTIGUADOR 2		
INYECCIÓN	ÁREA F(ab') ₂	ÁREA Fab
SA1	5834340	6843535
SA2	5832003	6845072
SA3	5826778	6844248
SA4	5866779	6894750
SA5	5875778	6885873

Tabla 43. Parámetros cromatográficos en adecuabilidad del sistema para F(ab')₂ y Fab

F(ab') ₂								
INYECCIÓN	TIEMPO DE RETENCIÓN		FACTOR CAPACIDAD (K')		RESOLUCIÓN (R)		PLATOS TEÓRICOS	
	AMOTIGUADOR		AMOTIGUADOR		AMOTIGUADOR		AMOTIGUADOR	
	1	2	1	2	1	2	1	2
SA1	10.760	10.185	0.71	0.62	NA		876.26	850.30
SA2	10.820	10.197	0.72	0.62			885.42	854.30
SA3	10.825	10.200	0.72	0.62			887.19	858.24
SA4	10.823	10.188	0.72	0.62			890.44	856.64
SA5	10.826	10.190	0.72	0.62			898.19	852.59
Fab								
INYECCIÓN	TIEMPO DE RETENCIÓN		FACTOR CAPACIDAD (K')		RESOLUCIÓN (R)		PLATOS TEÓRICOS	
	AMOTIGUADOR		AMOTIGUADOR		AMOTIGUADOR		AMOTIGUADOR	
	1	2	1	2	1	2	1	2
SA1	12.584	11.904	1.00	0.89	1.2916	1.2687	1549.48	1517.79
SA2	12.654	11.917	1.01	0.89	1.2985	1.2695	1578.97	1517.61
SA3	12.661	11.919	1.01	0.89	1.2999	1.2700	1575.66	1518.21
SA4	12.657	11.909	1.01	0.89	1.3038	1.2724	1582.53	1514.99
SA5	12.660	11.912	1.01	0.89	1.3062	1.2702	1594.86	1513.87

Tabla 44. Variabilidad para el área $F(ab')_2$ y Fab en la adecuabilidad del sistema.

AMORTIGUADOR 1		
INYECCIÓN	ÁREA COMPONENTE $F(ab')_2$	ÁREA COMPONENTE Fab
\bar{y}	6260487.40	7315330.60
S	32614.66	81505.08
CV	0.52	1.11
AMORTIGUADOR 2		
INYECCIÓN	ÁREA COMPONENTE $F(ab')_2$	ÁREA COMPONENTE Fab
\bar{y}	5847135.60	6862695.60
S	22435.49	25410.19
CV	0.38	0.37

Tabla 45. Áreas y tiempos de retención en la solución interferente "SI".

INYECCIÓN	TR	AMORTIGUADOR 1	TR	AMORTIGUADOR 2
SI1	9.908	409637	9.310	341015
SI2	9.912	414156	9.320	340800
SI3	9.923	418601	9.337	342079

Tabla 46. Áreas para $F(ab')_2$ Y Fab en las muestras.

INYECCIÓN	AMORTIGUADOR 1		AMORTIGUADOR 2	
	$F(ab')_2$	Fab	$F(ab')_2$	Fab
M1-1	14633356	SSA	13843161	SSA
M1-2	14591434	SSA	13873354	SSA
M1-3	14593339	SSA	14677939	SSA
M2-1	14508905	SSA	13987709	SSA
M2-2	14518441	SSA	14073153	SSA
M2-3	14016913	SSA	14706753	SSA
M3-1	13877214	SSA	13934071	SSA
M3-2	14369318	SSA	13406938	SSA
M3-3	14455375	SSA	14179216	SSA

SSA = Sin señal analítica.

Tabla 47. Promedios de las inyecciones de las áreas para $F(ab')_2$ Y Fab.

AMORTIGUADOR	SR		SI	M		
	$F(ab')_2$	Fab			$F(ab')_2$	Fab
1	6260487.40	7315330.60	414131.33	M1	14606043.00	SSA
				M2	14348086.33	
				M3	14233969.00	
2	6023971.80	6396782.40	341298.00	M1	14131484.67	
				M2	14255871.67	
				M3	13840075.00	

SSA = Sin señal analítica.

Tabla 48. Porcentaje de $(Fab')_2 + Fab$ (%) para las "muestras" y sus promedios (%).

MUESTRA	AMORTIGUADOR 1		AMORTIGUADOR 2	
	$(Fab')_2 + Fab$ (%)	% PROMEDIO	$(Fab')_2 + Fab$ (%)	% PROMEDIO
M1-1	96.36	96.17	95.09	97.12
M1-2	96.07		95.30	
M1-3	96.09		100.97	
M2-1	95.51	94.42	96.11	97.99
M2-2	95.58		96.71	
M2-3	92.18		101.17	
M3-1	91.23	93.65	95.73	95.07
M3-2	94.57		92.02	
M3-3	95.15		97.45	

Tabla 49. Tendencia y variabilidad del porcentaje de $F(ab')_2 + Fab$ de las muestras.

AMORTIGUADOR	Y	PROMEDIO	S	CV
1	96.17	94.74667	1.29137	1.36
	94.42			
	93.65			
2	97.12	96.72667	1.49921	1.55
	97.99			
	95.07			
\bar{y}	95.73667			
S	1.65597			
CV_t	1.73			

Contrastación de los criterios de aceptación.

• ADECUABILIDAD DEL SISTEMA

CRITERIO		RESULTADO	CUMPLE	REFERENCIA	
Factor capacidad por inyección	$F(ab')_2 \geq 0.6$	AMORTIGUADOR 1	Min 0.71	SI	Tabla 43
		AMORTIGUADOR 2	Min 0.62		
	$Fab \geq 0.8$	AMORTIGUADOR 1	Min 1.00		
		AMORTIGUADOR 2	Min 0.89		
Platos teóricos por inyección	$F(ab')_2$ Mínimo 800	AMORTIGUADOR 1	Min 885.42	SI	
		AMORTIGUADOR 2	Min 850.30		
	$Fab \geq 0.8$	AMORTIGUADOR 1	Min 1549.66		
		AMORTIGUADOR 2	Min 1513.87		
Resolución (USP) por inyección	Mín 1.2	AMORTIGUADOR 1	1.2916	SI	
		AMORTIGUADOR 2	1.2687		
CV área bajo la curva para las 5 inyecciones	$F(ab')_2$ Máx 2%	AMORTIGUADOR 1	0.52	SI	
		AMORTIGUADOR 2	0.38		
	Fab Máx 2 %	AMORTIGUADOR 1	1.11		
		AMORTIGUADOR 2	0.37		

• TOLERANCIA

CRITERIO		RESULTADO	CUMPLE	REFERENCIA
El CV de los amortiguadores no debe exceder el 3%.	AMORTIGUADOR 1	1.36	SI	Tabla 49
	AMORTIGUADOR 2	1.55		
El CV total no debe exceder el 3%.		1.73		

8.11 ESTUDIO DE ROBUSTEZ.

La precisión y adecuabilidad del sistema es presentada en las tablas 50 y 51. Las tablas 52 y 53 muestran la información de la solución interferente así como la información de las muestras. En la tabla 54 se presenta el calculo de los promedios de las inyecciones y en la tabla 55 el contenido en porcentaje de las proteínas. La tabla 56 muestra el análisis de Plackett Burman.

Tabla 50. Adecuabilidad del sistema para "SA".

INYECCIÓN	ÁREA		TIEMPO DE RETENCIÓN		FACTOR CAPACIDAD (K')		RESOLUCIÓN (R)	PLATOS TEÓRICOS	
	F(ab') ₂	Fab	F(ab') ₂	Fab	F(ab') ₂	Fab		F(ab') ₂	Fab
SA1	6535251	6688664	10.297	12.203	0.634	0.937	1.2902	NR	NR
SA2	6559009	6692059	10.342	12.253	0.642	0.945	1.2923	NR	NR
SA3	6552049	6699892	10.344	12.259	0.642	0.946	1.2923	NR	NR
SA4	6538274	6704312	10.174	12.054	0.615	0.913	1.2823	NR	NR
SA5	6531053	6700275	10.309	12.212	0.636	0.938	1.2889	NR	NR

NR = No reportado.

Tabla 51. Variabilidad para el área F(ab')₂ y Fab en la adecuabilidad del sistema.

	F(ab') ₂	Fab
\bar{y}	6543127.20	6697040.40
S	11865.96	6450.75
CV	0.18	0.10

Tabla 52. Áreas y tiempo de retención en la solución interferente "SI"

INYECCIÓN	TR	Área
SI1	10.316	611521
SI2	NR	SSA
SI3	NR	SSA

SSA = Sin señal analítica.
NR = No reportado.

Tabla 53. Áreas para $F(ab')_2$ y Fab en las muestras.

INYECCIÓN	CORRIDA ANALÍTICA	$F(ab')_2$	Fab		CORRIDA ANALÍTICA	$F(ab')_2$	Fab
SM1-1	1	13016714	SSA		5	14852434	SSA
SM1-2		13015476				14834238	
SM1-3		12986449				14819804	
SM2-1		12926834	SSA			14876400	
SM2-2		12991042				14895460	
SM2-3		12999590				14896660	
SM3-1		12905722	SSA			14924524	
SM3-2		12962443				NR	
SM3-3		13636986				14872569	
SM1-1	2	13630505	SSA		6	14878761	SSA
SM1-2		13608180				14883060	
SM1-3		13583683				14870192	
SM2-1		13611998	SSA			14479340	
SM2-2		13617261				14850450	
SM2-3		13644846				14837985	
SM3-1		13622473	SSA			14745503	
SM3-2		13652311				14844312	
SM3-3		13652746				14861847	
SM1-1	3	15114845	SSA	7	13276019	SSA	
SM1-2		15114879			13275019		
SM1-3		15083331			13270671		
SM2-1		15089914	SSA		13260370		
SM2-2		15066307			13253430		
SM2-3		15093592			13262526		
SM3-1		15129391	SSA		13244249		
SM3-2		15089246			13254990		
SM3-3		15100326			13297321		
SM1-1	4	13282914	SSA	8	14592624	SSA	
SM1-2		13275034			14592481		
SM1-3		13265964			14613960		
SM2-1		13131188	SSA		14658359		
SM2-2		13203239			14659832		
SM2-3		13205121			14682879		
SM3-1		13055888	SSA		14638935		
SM3-2		13115721			14662411		
SM3-3		13151087			14649483		

NR = No reportado
SSA = Sin señal analítica.

Tabla 54. Promedios de las inyecciones de las áreas para F(ab')₂ y Fab en SA, SI Y M.

SA		SI	CORRIDA ANALÍTICA	M		
F(ab') ₂	Fab				F(ab') ₂	Fab
6543127.20	6697040.40	611521.00	1	SM1-1	13006213.00	NA
				SM1-2	12972488.67	NA
				SM1-3	13168383.67	NA
			2	SM2-1	13607456.00	NA
				SM2-2	13624701.67	NA
				SM2-3	13642510.00	NA
			3	SM3-1	15114862.00	NA
				SM3-2	15083271.00	NA
				SM3-3	15106321.00	NA
			4	SM4-1	13278974.00	NA
				SM4-2	13179849.33	NA
				SM4-3	13107565.33	NA
			5	SM5-1	14843336.00	NA
				SM5-2	14889506.67	NA
				SM5-3	14872569.00	NA
			6	SM6-1	14880910.50	NA
				SM6-2	14722591.67	NA
				SM6-3	14853079.5	NA
			7	SM7-1	13275519.00	NA
				SM7-2	13258775.33	NA
				SM7-3	13276155.50	NA
			8	SM8-1	14592552.50	NA
				SM8-2	14667023.33	NA
				SM8-3	14655947.00	NA

NA: No aplica

Tabla 55. Contenido (%) de F(ab')₂ + Fab para las muestras y sus promedios (%).

M	(Fab') ₂ + Fab (%)	% PROMEDIO	CORRIDA	(Fab') ₂ + Fab (%)	% PROMEDIO
SM1-1	80.36	80.64	SM5-1	96.29	96.53
SM1-2	80.15		SM5-2	96.61	
SM1-3	81.42		SM5-3	96.67	
SM2-1	84.26	84.38	SM6-1	96.56	96.08
SM2-2	84.37		SM6-2	95.53	
SM2-3	84.49		SM6-3	96.14	
SM3-1	94.04	93.95	SM7-1	86.14	86.08
SM3-2	93.83		SM7-2	86.03	
SM3-3	93.98		SM7-3	86.07	
SM4-1	86.15	85.57	SM8-1	94.69	94.97
SM4-2	85.52		SM8-2	95.17	
SM4-3	85.05		SM8-3	95.06	

Tabla 56. Análisis de Plackett Burman del porcentaje de $F(ab')_2 + Fab$ en las muestras.

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F_{cal}	$Pr F_{cal}$
pH	1	6.499755	6.499755	4.137649	0.178938
Fase Movil	1	4.595806	4.595806	2.925623	0.229312
Temperatura de la columna	1	0.039092	0.039092	0.024886	0.889140
Temperatura de la muestra	1	7.846710	7.846710	4.995101	0.154964
Velocidad de flujo	1	251.444951	251.444951	160.066193	0.006189
Error	2	3.141762	1.570881		

Contrastación de los criterios de aceptación.

- ADECUABILIDAD DEL SISTEMA

CRITERIO		RESULTADO	CUMPLE	REFERENCIA
Factor capacidad por inyección	$F(ab')_2 \geq 0.6$	Min 0.615	SI	Tabla 50
	$F(ab')_2 \geq 0.8$	Min 0.913		
Resolución (USP) por inyección	Mín 1.2	Min 1.2823		
Platos teóricos por inyección	$F(ab')_2$ Mínimo 800	NR	NA	
	Fab Mínimo 1400	NR		
El $CV \leq 2\%$	$F(ab')_2$	0.18	SI	Tabla 50 y 51
	Fab	0.10		

- ROBUSTEZ

CRITERIO		RESULTADO	CUMPLE	REFERENCIA
El método es robusto al factor bajo estudio, si la probabilidad de la F de Fisher ($Pr F_{cal}$) es mayor o igual a 0.05.	pH	$Pr F_{cal} = 0.179$	SI	Tabla 56
	Fase Móvil	$Pr F_{cal} = 0.229$		
	Temperatura de la columna	$Pr F_{cal} = 0.889$		
	Temperatura de la muestra	$Pr F_{cal} = 0.155$		
	Velocidad de flujo	$Pr F_{cal} = 0.006^{**}$	NO	

**Existe un efecto altamente significativo

9. ANÁLISIS DE RESULTADOS.

El sistema cromatográfico es preciso y adecuado ya que se presenta una repetibilidad en las inyecciones de la solución de adecuabilidad, con una variabilidad en términos de coeficiente de variación menor al 2%. Además durante toda la validación no presenta problemas de adecuabilidad.

En el intervalo de estudio de 40% a 120% con cinco niveles de concentración $F(ab')_2$ y Fab se presenta una relación estadísticamente lineal entre la concentración de $F(ab')_2$ y Fab como soluciones individuales frente a la respuesta analítica (área), ya que la pendiente es estadísticamente mayor a cero ($LC_{(m)} > 0$). El método explica el 99% ($r^2 = 0.99$) de la variabilidad total de la respuesta analítica, para ambos compuestos. La precisión de la respuesta analítica en el intervalo de estudio cumple con el criterio de aceptación para cada componente $F(ab')_2$ y Fab ($CV_{y/x} \leq 2\%$).

El estudio de la relación lineal de la mezcla de las soluciones de referencia contra su respuesta analítica presentan una relación estadísticamente lineal debido a que la pendiente es mayor a cero ($LC_{(m)} > 0$). El modelo vuelve a explicar el 99% de la variabilidad total en las áreas para $F(ab')_2$ y Fab ($r^2 = 0.99$). La precisión de la respuesta analítica en el intervalo de estudio cumple con el criterio de aceptación para cada componente $F(ab')_2$ y Fab ($CV_{y/x} \leq 2\%$). Por tanto, se concluye que las curvas de calibración preparadas como soluciones individuales o como una solución combinada, se ajusta apropiadamente a un modelo lineal con precisión aceptable en el intervalo de 40% a 120% para $F(ab')_2$ y Fab . De esta forma se demuestra que no es crítica la preparación de la curva de referencia y se recomienda preparar la curva en función de la mezcla de las sustancias de referencia.

El estudio de especificidad los cromatogramas evaluados cumplen con los criterios para los aditivos del producto de faboterapico, pero no se cumplen para el caso de las proteínas del producto de faboterapico; las cuales interfieren en la señal analítica del $F(ab')_2$, ya que el tiempo de retención es parecido en ambos casos; por lo que el método es inespecífico en presencia de las proteínas IgG e IgGT, más no a la albúmina, esto sucede probablemente por las características de peso molecular.

La selectividad del método evidencia que las muestras sometidas a estrés no presentan señal analítica o interferencia con los analitos de interés, por lo que el método se puede considerar selectivo respecto a sustancias que pudieran generarse por efecto de la temperatura en el producto.

La evaluación de la repetibilidad del método o variación intra-análisis expresada matemáticamente por el coeficiente de variación del porcentaje de recobro y coeficiente de variación de regresión, no exceden el criterio de aceptación ($CV \leq 3\%$) en el intervalo correspondiente del 22 a 72% de áreas de $F(ab')_2$ y del 28 al 78% de áreas de Fab. Así que, se concluye que el método es repetible en el intervalo estudiado.

En la evaluación de la linealidad y exactitud del método los resultados del análisis de regresión para la cantidad adicionada y cantidad recuperada de cada componente de interés en la matriz analítica de aditivos de faboterapico muestran que el modelo explica el 99% de la variación ($r^2 = 0.99$). Además, estadísticamente el intervalo de confianza para la ordenada al origen incluye el cero, esto se interpreta como la capacidad del método para determinar sin respuesta del analito, al no adicionar analito. Otra evidencia de exactitud es que para el intervalo de confianza para la pendiente de la relación del % de área adicionada vs % de área recuperada se incluya la unidad, criterio que también cumple el método. Por tanto, el método se considera exacto en el intervalo correspondiente del 22 a 72% de áreas de $F(ab')_2$ y del 28 al 78% de áreas de Fab.

Debido a que en la evaluación del parámetro de especificidad se encontraron problemas con las señales analíticas de las proteínas IgG e IgGT y se conoce que durante el control del proceso y como producto terminado de faboterápico se realizan cuantificaciones de estas proteínas por el método de SDS-PAGE, se consideró determinar la exactitud del método en presencia de soluciones interferentes de IgG e IgGT con concentraciones conocidas. Los resultados demuestran que la señal analítica de $F(ab')_2$ que era interferida por las señales de las proteínas es eliminada de manera aceptable (95 a 105% de recobro) al utilizar la respuesta analítica de la solución interferente; por lo que lo anterior justifica la utilización de una solución interferente en el método para establecer exactitud en la cuantificación.

Los resultados del estudio de precisión intermedia del método establecen que estadísticamente se presenta efecto significativo de analistas y días, en donde al menos un analista en un día, es diferente a los demás días de análisis. Sin embargo, es importante señalar que la variación debido a ese efecto no excede el 3% y además la variación total del método es de $CV_t = 2.75\%$, que incluye la variabilidad del método y la variabilidad asignada al efecto de días / analistas, cumpliendo con el criterio de aceptación. Por tanto, el método se considera reproducible entre analistas.

El estudio de estabilidad determina que la estabilidad de la muestra es considerada en un intervalo de tiempo de 72 horas. En este tiempo los resultados confirman que se asegura la exactitud y precisión de la cuantificación del analito, ya que en el peor caso para $F(ab')_2$ la diferencia absoluta con respecto al tiempo cero es de 1.52 y para Fab es de 1.26.

El método es tolerante para cada uno de los lotes de reactivos utilizados en la preparación de las soluciones amortiguadoras ya que nos e presenta una variación mayor al 3% en términos de coeficiente de variación.

En el estudio de robustez los parámetros cromatográficos para factor capacidad, resolución y variación de área cumplen los criterios de aceptación. Pero los valores de platos teóricos en la solución de adecuabilidad no son reportados, pero se puede justificar la adecuabilidad del sistema con tener presente los valores de resolución ya que si cumple con el criterio de resolución, las bandas de los picos no cambian y de esta forma se puede justificar que el sistema se comporta bien, y por tanto no es crítico el no tener las salidas de los platos teóricos.

El análisis de Plackett Burman permitió determinar que no existe efecto significativo en los factores como el pH el cual puede presentarse en un intervalo de 6.4 a 7 de pH. La concentración de la fase móvil puede encontrarse de 0.5 a 1.5 %, sin presentar variación a las respuestas. El método también es robusto para la temperatura de la columna desde la temperatura ambiente (temperatura de cuarto) hasta 40 °C. Así mismo, el método es robusto para determinar los analitos en muestras en las que se encuentran desde una temperatura ambiente (temperatura de cuarto) hasta 25 °C.

La velocidad de flujo presenta estadísticamente un efecto altamente significativo ya que la probabilidad de este efecto es menor a 0.05. Por tanto, es recomendable que la velocidad de flujo permanezca siempre constante en 0.75 mL/min

10. CONCLUSIONES GENERALES.

- El sistema cromatográfico se comporta adecuadamente durante todas las corridas experimentales.
- El método es específico a los aditivos del producto de faboterápico.
- El método es específico respecto a IgG + IgGT + albúmina para la señal analítica de Fab.
- El método es no específico respecto a IgG + IgGT para la señal de F(ab')₂, pero sí para la albúmina.
- El método es selectivo ante los componentes que se pudieran generar por efecto de la temperatura.
- El error debido a la presencia de IgG+IgGT es eliminado al incluir en el método, una solución interferente de IgG + IgGT.
- El método es exacto, lineal y repetible en el intervalo estudiado.
- El método es reproducible ya que la variación total cumple con los criterios de aceptación.
- El método es tolerante a lotes de reactivos utilizados en la preparación de las soluciones amortiguadoras.
- La velocidad de flujo impacta de manera crítica en la exactitud del método. Se recomienda trabajar siempre con una velocidad de flujo de 0.75 mL/min.

Considerando lo anteriormente expuesto; el método se encuentra en el estatus “validado” y se considera confiable para su propósito analítico, se puede emplear para controlar producto a granel, así como para liberar los lotes de producto terminado de faboterápicos.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Secretaria de Salud. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Boletín de epidemiología, Semana 1, 2007.
2. Alagón A. *et al* 2003. Alacranismo. Practica Médica Efectiva.
3. The Nobel Prize in Physiology or Medicine. http://nobelprize.org/nobel_prizes
4. Vega L. 2007. Faboterapia ¿Será el fin de la Seroterapia?. Revista Mexicana de Pediatría.
5. Alagón A. Anticuerpos terapéuticos: El caso de los antivenenos. www.smb.org.mx/XXVIcongreso/text/Resumen-Invitados/
6. Chavez Méndez A. 2007. Desarrollo, optimización y validación de un método analítico tipo ELISA para cuantificar veneno de escorpión *Centruroides* en plasma humano. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.
7. Alagon A, Gonzalez J. De la seroterapia a la faboterapia. Foro Silanes 1998;2:8–9.
- 8 Bernstein J. Antivenom (Scorpion and Spider). http://highered.mcgraw-hill.com/sites/dl/free/0071437630/358186/goldfrank_toxicology_chap115a.pdf
9. J. Porath, From Gel-filtration to Adsorptive Size exclusion, J. Protein Chem., 16(5), 463–468 (1997).
10. B.Trathnigg, Size-exclusion Chromatography of Polymers, Encyclopedia of Analytical Chemistry, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2000. pp. 8008–8034
11. C. Wu, Column Handbook for size exclusion chromatography. Academic Press. pp 267-282.
12. Katz, Chromatography handbook of HPLC, Wiley & Sons pp. 559-579.
13. C. Wu, Column Handbook for size exclusion chromatography. Academic Press. pp 267-282.
14. Neve Uwe. HPLC Columns. Theory, Technology and Practice. Wiley-VCH. USA, 1997.
15. Trathnigg B.,Size-Exclusion Chromatography of Polimers. Encyclopedia of Analytical Chemistry. John Wiley & Sons Ltd.

16. Scott R. Chromatographic Detectors Design, Function, and operation. Georgetown University. 1996.
17. J.Vera. Memorias del Diplomado en Cromatografía líquida de alta resolución.
18. Guideline for Submitting Samples and Analytical, Data for Methods Validation, FDA, 1987.
19. Guidance Validation of Chromatographic Methods, CDER 1994.
químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos.
20. Alcántara A., García A., Soberón E., Cortés M., Rodríguez R., Herrera J. Métodos analíticos, Guía de validación. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A.C. 2002
21. ICH Q2A. Guideline for industry. Text on validation of analytical procedures. 1995
- 22 ICH Q2B. Guideline for industry. Text on validation of analytical procedures: Methodology 1996
23. Alcántara A. Taller de validación de métodos analíticos. LUAL ASESORES 2007