

## Desarrollo de un método de CLAR-IR para la determinación de etanol residual en vacuna

### Development of a HPLC-IR method for determination of residual ethanol in vaccine

Matilde Cuevas Valdespino<sup>I</sup>; Yanet Támbara Hernández<sup>II</sup>; M. Ileana Delgado Arrieta<sup>III</sup>; Aida Yaima Merchán Milia<sup>I</sup>; Mirtha Castiñeira Díaz<sup>IV</sup>; Jenny Márquez Rodríguez<sup>V</sup>

<sup>I</sup>Licenciada en Bioquímica. Investigadora Agregada. Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas. La Habana, Cuba.

<sup>II</sup>Licenciada en Radioquímica. Investigadora Auxiliar. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. La Habana, Cuba.

<sup>III</sup>Licenciada en Bioquímica. Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas. La Habana, Cuba.

<sup>IV</sup>Doctora en Ciencias. Profesora Titular. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. La Habana, Cuba.

<sup>V</sup>Técnico en Farmacia Industrial. Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas. La Habana, Cuba.

---

#### RESUMEN

Los ingredientes farmacéuticos activos de la vacuna antimeningocócica cubana VA-MENGOC-BC<sup>TM</sup> (vesículas de membrana externa purificadas de *Neisseria meningitidis*, serogrupo B y polisacárido capsular purificado de *Neisseria meningitidis*, serogrupo C) son conservados en etanol, de ahí que dicha vacuna posea un contenido de etanol residual, cuya concentración real no se conocía hasta el momento. Las regulaciones internacionales plantean que los productos biofarmacéuticos y sus ingredientes farmacéuticos activos deben tener bien caracterizadas todas sus impurezas, por lo que el objetivo de este trabajo fue el desarrollo de un método de determinación de etanol mediante cromatografía líquida de alta resolución-índice de refracción para estos fines y su comparación con un método utilizado frecuentemente para cuantificar este solvente, como es la cromatografía gaseosa. El método evaluado resultó ser útil y con una buena robustez para la determinación de este solvente orgánico en esta vacuna

antimeningocócica. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos al evaluar las mismas muestras de vacuna mediante ambos métodos cromatográficos (cromatografía líquida de alta resolución y cromatografía gaseosa), lo que indica la posibilidad del uso de la cromatografía líquida de alta resolución en sustitución de la cromatografía gaseosa para esta determinación.

**Palabras clave:** Etanol, cromatografía gaseosa, cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), impureza.

---

## ABSTRACT

Active pharmaceutical ingredients of Cuban anti-meningococcal vaccine VA-MENGOC-BC™ (vesicles of purified external membranes of *Neisseria meningitidis*, B serum-group, and purified capsular polysaccharide of *Neisseria meningitidis*, serum-group C) are stored in ethanol, thus that such vaccine has residual ethanol content, of which real concentration is not known just now. International regulations propose that the biopharmaceutical products and its active pharmaceutical ingredients must to have well defined all impurities, thus, the aim of present papers was to develop an ethanol assessment method by liquid high performance-refraction index chromatography to these aims and its comparison with a frequent used method to quantify this solvent, like in the case of gas chromatography. Method assessed was very useful and with a good robustness for determination of this organic solvent in this anti-meningococcal vaccine. There were not statistically significant differences among results obtained with assessment of the same samples of vaccine by both chromatographic methods (high resolution liquid and gas), indicating possibility of high performance liquid chromatography use in substitution of the gas one for this determination.

**Key words:** Ethanol, gas-chromatography, high performance liquid-chromatography (HPLC), impurity.

---

## INTRODUCCIÓN

Las regulaciones de impurezas de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH),<sup>1,2</sup> establecen la necesidad de caracterizar y evaluar las posibles impurezas presentes en los productos biofarmacéuticos y emitir sus especificaciones.

Las vesículas de membrana externa de *Neisseria meningitidis* serogrupo B y el polisacárido capsular purificado del serogrupo C, ambos ingredientes farmacéuticos activos de la vacuna VA-MENGOC-BC™, se conservan en etanol.<sup>3</sup> Como consecuencia, la vacuna final contiene residuos de este producto pero la magnitud de esta impureza se desconocía hasta el momento.

Es muy frecuente el uso de los métodos cromatográficos y sobre todo de la cromatografía gaseosa (GC) para la determinación de etanol,<sup>4-7</sup> por tratarse de un analito volátil, aunque requiere condiciones especiales en el laboratorio; sin embargo, se considera un método rápido y preciso, por lo que fue utilizado como método de referencia para la realización de este trabajo. Por otra parte la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), que es un poco menos popular, es también considerada una herramienta analítica importante para esta determinación ya que es sensible y exacta, aunque el tiempo de análisis por muestra es algo mayor, razones por lo que ha sido usada para determinar el rendimiento de la producción industrial de etanol,<sup>8</sup> para determinar su concentración en fluidos biológicos,<sup>9</sup> en el análisis de bebidas alcohólicas<sup>10,11</sup> y alimentos,<sup>12</sup> etc. Ambos métodos son automatizados, consumen una pequeña cantidad de muestra y además poseen la ventaja de que los instrumentos pueden ser calibrados contra agua pura o soluciones estándar de alcohol, lo que permite obtener un pico completamente resuelto de otros componentes de la muestra, por lo que la determinación es muy exacta.<sup>13</sup>

El método de cromatografía líquida de alta resolución-índice de refracción (CLAR-IR) que se propone en este trabajo para la determinación del contenido residual de etanol en VA-MENGOC-BC<sup>TM</sup>, es similar al reportado previamente por *Naidu* y otros en el 2004,<sup>14</sup> para otros fines, este utiliza una columna Aminex HPK-87H (BIORAD), empacada con un copolímero estireno-divinil benceno sulfonado, que realiza la separación mediante el uso del mecanismo de ion exclusión, ayudado por mecanismos de intercambio iónico, intercambio de ligandos, exclusión por tamaño, fase reversa y partición en fase normal. Este modo de interacción múltiple ofrece una habilidad única para separar compuestos.<sup>15</sup> Además, esto permite el trabajo del sistema cromatográfico en condiciones isocráticas y no requiere la derivatización de las muestras. Estas ventajas han sido anteriormente utilizadas para determinar alcoholes orgánicos, como glicerol y etanol.<sup>12,14</sup>

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un método de CLAR-IR para la determinación de la concentración de etanol residual en la vacuna VA-MENGOC-BC<sup>TM</sup>, y comparar sus resultados con los obtenidos mediante GC.

## MÉTODOS

El método de CLAR-IR desarrollado para la determinación de etanol residual en la vacuna VA-MENGOC-BC<sup>TM</sup>, consistió en la evaluación de muestras de sobrenadante vacunal (n= 25) con la utilización de un sistema de CLAR-IR, acoplado a una columna Aminex HPK-87H (BioRad), 7,5 x 300 mm con partículas de 5 µm. Se utilizó como fase móvil H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,005 M. Para realizar la estandarización del método se evaluaron 2 condiciones de corrida (flujo de 0,3 mL/min a temperatura ambiente y flujo de 0,6 mL/min a 40 °C); volumen de inyección: 100 µL; tiempo de corrida: 25 min. La señal cromatográfica fue registrada, para lo cual se usó el software Ezchrom Chromatographic data system. La concentración de etanol fue calculada mediante la utilización de una curva de calibración de 0,1 a 0,5 % de etanol, con el uso del mismo volumen de inyección.

Además, con el objetivo de garantizar el buen funcionamiento del método se evaluó su robustez, para ello fueron evaluados los siguientes factores: velocidad de flujo (de 0,6 a 0,58 mL/min), agua para CLAR (agua para CLAR o agua para inyección), concentración de la fase móvil (de 0,005 a 0,006 M), estabilidad de la fase móvil una semana después de preparada, filtrar la muestra o no por un filtro de

LiChroprep RP C18 previo al ensayo, mantener las muestras tapadas o destapadas entre réplicas y evaluar las muestras preparadas el mismo día o al día siguiente de su preparación. Luego se aplicó el diseño descrito por *Youden y Steiner*,<sup>16</sup> para evaluar la influencia de cada uno de estos factores en el resultado del ensayo.

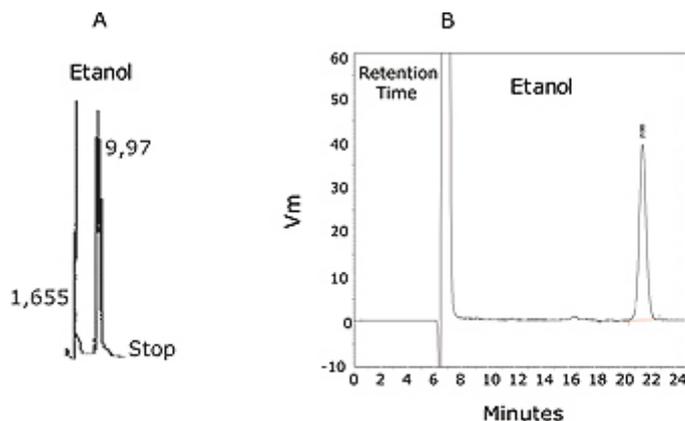
La comparación entre el método de CLAR desarrollado y la GC para determinar el contenido residual de etanol en esta vacuna antimeningocócica se realizó mediante la evaluación en paralelo las mismas muestras mediante un sistema de cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama (GC-FID), acoplado a una columna de relleno Porapak N (Riedel de Haën) de 2,4 m a 170 °C. La temperatura de inyección fue de 150 °C y la de detección de 190 °C; volumen de inyección: 5 µL mediante la técnica de inyección directa; tiempo de corrida fue de 8 min y la señal fue registrada mediante un Integrador Shimadzu.

Para realizar la comparación entre ambos métodos se evaluaron parámetros preliminares de validación como:

- Precisión en términos de:
  - Repetibilidad: se realizaron 3 réplicas de una de las muestras ensayadas, el mismo día y por el mismo analista.
  - Precisión intermedia: se realizaron 3 réplicas de una de las muestras en ensayo por 2 analistas en diferentes días.
- Linealidad: se determinó el  $r^2$  para las curvas de calibración obtenidas con la utilización de ambos métodos.

## RESULTADOS

Teniendo en cuenta la amplia utilización de la CLAR para la determinación de etanol, se estandarizó un método de CLAR-IR para la cuantificación de este solvente residual en la vacuna antimeningocócica cubana VA-MENGOC-BCä. En este caso, no se evaluó la temperatura de trabajo de la columna a 60° C, utilizada por otros autores con este tipo de sistema cromatográfico,<sup>14</sup> en aras de alargar la vida útil, ya que este puede ser un ensayo de rutina en un Laboratorio de Control de Calidad. En la [figura](#) aparecen los perfiles cromatográficos obtenidos en las muestras de sobrenadante vacunal, mediante GC y CLAR, específicamente en la figura (B) podemos observar el cromatograma correspondiente a la segunda variante de las condiciones de corrida, evaluadas para la cromatografía líquida (0,6 mL/min a 40 °C).



**Fig.** Cromatogramas tipo obtenidos en la determinación de etanol mediante ambos métodos cromatográficos. A: perfil cromatográfico obtenido en cromatografía gaseosa; B: perfil cromatográfico obtenido en cromatografía líquida de alta resolución.

La [tabla 1](#) muestra los resultados obtenidos en la evaluación de la robustez del método, parámetro, que aunque es también considerado un índice de precisión de este debe ser evaluado durante su fase de desarrollo,<sup>17,18</sup> de manera que se analice la influencia de la variación cuantitativa de una serie de parámetros cromatográficos y de estabilidad de la muestra en los resultados del ensayo, los cuales fueron modificados tanto para la curva de calibración como para las muestras analizadas.

**Tabla 1.** Resultados del estudio de la robustez del ensayo

No. de ensayo	% de etanol
1	0,32
2	0,30
3	0,33
4	0,30
5	0,28
6	0,29
7	0,32
8	0,32

En la [tabla 2](#) aparecen los resultados obtenidos al estudiar 25 lotes de VA-MENGOC-BC<sup>TM</sup>, mediante los 2 sistemas cromatográficos evaluados, mientras que en la [tabla 3](#) se muestran los valores obtenidos al determinar algunos parámetros preliminares de validación para los 2 métodos estudiados, de modo que se pueda establecer una comparación entre ambos.

**Tabla 2.** Concentración de etanol obtenida al evaluar muestras en paralelo mediante los 2 sistemas cromatográficos: GC y CLAR

Método cromatográfico	n	Rango de concentración (%)	Varianza	Valor medio (%)
GC	25	0,24-0,34	0,00095	0,29
CLAR	25	0,22-0,37	0,0018	0,30
p	-	-	0,1338	0,3196

**Tabla 3.** Algunos parámetros preliminares de validación en ambos métodos cromatográficos: GC y CLAR

Método cromatográfico	Repetibilidad (CV)	Precisión intermedia (CV)	Linealidad (r <sup>2</sup> )
GC	3,407 %	0,717 %	0,9982
CLAR	0,446 %	2,347 %	0,9993

## DISCUSIÓN

Al comparar los perfiles cromatográficos obtenidos en las muestras de sobrenadante vacunal, mediante GC y CLAR (fig.) se puede apreciar que en el cromatograma obtenido empleando el CLAR se define mejor el pico correspondiente al etanol, lo que reafirma la posibilidad del uso del método propuesto para la cuantificación de etanol en esta vacuna antimenigocócica. Teniendo en cuenta que en los cromatogramas obtenidos para las 2 variantes de condiciones de corrida evaluadas, para la cromatografía líquida, se obtuvo un perfil cromatográfico similar, se decidió estandarizar el método con la segunda variante (0,6 mL/min a 40 °C) (fig., B), debido a que este permite la misma resolución para el analito de interés en menor tiempo de corrida (25 min contra 45 min necesarios para realizar la otra variante).

Se pudo observar que los valores de concentración de etanol obtenidos, en todos los ensayos realizados para la evaluación de la robustez del método son muy similares (tabla 1), lo que fue corroborado al aplicar el cálculo descrito por *Youden y Steiner*,<sup>16</sup> donde se comprobó que el método en estudio es muy robusto pues ninguno de los factores ensayados influyó significativamente en los resultados del método analítico. Además, es necesario señalar que la evaluación del último factor (conservar las muestras preparadas de un día para otro) es recomendada especialmente por la regulación de la FDA para este tipo de método,<sup>19</sup> como forma de verificar la estabilidad de las muestras una vez preparadas, y da la posibilidad del uso de un automuestreador que trabaje durante la noche para la evaluación de la concentración de etanol residual en la vacuna VA-MENGOC-BC®.

Al estudiar el comportamiento de los parámetros de adecuabilidad del sistema en cada uno de los ensayos realizados en la evaluación de la robustez del método, se pudo comprobar que en todos los casos los parámetros cromatográficos analizados (CV del Tr, K, Rs, A y N) se encuentran dentro de los valores recomendados por la regulación de la FDA para los métodos cromatográficos (K > 2; Rs > 2; A < 2; y N > 2000),<sup>19</sup> al igual que el coeficiente de variación del Tr, que en cada uno de los

ensayos se mantuvo muy por debajo del 1 %. Todo lo anterior reafirma la robustez del método ya comprobada con el análisis de *Youden* y *Steiner*.

En la tabla 2 se observa que el rango de concentración de etanol obtenido mediante ambos sistemas cromatográficos es muy similar y que al realizar una comparación estadística de estos métodos a través de la prueba de la t de Student y la prueba de Fisher, no se encontró diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre las medias y las varianzas, lo que corrobora la posibilidad del uso de la CLAR como método alternativo a la GC para este tipo de determinación.

En la tabla 3 se precia que existe similitud entre el método de referencia (GG) y el método de CLAR, con una precisión aceptable ( $CV < 5 \%$ ), teniendo en cuenta que se trata de métodos cromatográficos para la detección de impurezas, en los que se ha planteado que coeficientes de variación entre un 5-10 % pueden ser aceptables.<sup>20</sup> Además se encontró una linealidad apropiada en el rango de la curva de calibración ( $r^2 \geq 0,99$ ), lo que permite afirmar que este método de CLAR-IR puede ser utilizado para el estudio de determinación de etanol residual en esta vacuna.

Se recomienda validar el método de determinación de etanol residual en la vacuna VA-MENGOC BC y aplicar el método desarrollado a la determinación de etanol residual en otras vacunas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ICH. ICH Expert Working Group on Technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Impurities in new drug substances (Q3A). London: ICH Press; 1999. p. 1-10.
2. ICH. ICH Expert Working Group on Technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Impurities Guideline for residual Solvents (Q3C). London: ICH Press; 1996. p. 1-20.
3. Campa C, Sierra G, Gutiérrez M, Sotolongo F, García L, Bicet G, et al. Método para obtener una vacuna con amplio rango de espectro protector contra la *Neisseria meningitidis* grupo B, la vacuna resultante, la gamma y el factor de transferencia, Cuba. Patente N° 125. 1987.
4. Tangerman A. Highly sensitive gas chromatographic analysis of ethanol in whole blood, serum, urine, and fecal supernants by direct injection method. Clin Chem. 1997; 43:1003-9.
5. McCarver-May DG, Durisin L. An accurate, automated, simultaneous gas chromatographic headspace measurement of whole blood ethanol and acetylaldehyde for human in vivo studies. J Anal Toxic. 1997;21:134-41.
6. Wang M, Choong Y, Su N, Lee M A. Rapid Method for Determination of Ethanol in alcoholic beverages using capillary gas chromatography. J Food Drug Anal. 2003; 11:133-40.

7. Da Silva G, de Araújo G, Silva D, Guimarães W. Ethanol fermentation of sucrose, sugarcane juice and molasses by *Escherichia coli* strain ko11 and *Klebsiella oxytoca* strain p2. *Brazilian J Microbiol.* 2005; 36: 395-404.
8. Digman M, Shinnars K, Dien B, Hatfield R, Li X, Muck R, Weimert P. On-farm pretreatment technologies for improving enzymatic degradability of cellulose and hemicellulose present in perennial grass. ASABE Annual International Meeting, Paper No. 071021. St. Joseph, Mich: ASABE; 2007.
9. Borucki K, Schreiner R, Dierkes J, Jachau K, Krause D, Westphal S, et al. Detection of recent ethanol intake with new markers: comparison of fatty acid ethyl esters in serum and of ethyl glucuronide and the ratio of 5-hydroxytryptophol to 5-hydroxyindole acetic acid in urine, *Alcoholism. Clin Experimental Res.* 2005; 29(5): 781-7.
10. Martin E, Ladaresta V, Giacometti J, Vogel J. Ethanol determination by HPLC in alcoholic beverages. *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene.* 1986; 77: 528-34.
11. Scharlab SL. *Accesorios y consumibles para cromatografía 2002-2003.* Barcelona: Scharlab Press; 2003. p. 145.
12. Falqué E, Gómez F. Simultaneous determination of the major organic acids, sugars, glycerol and ethanol by HPLC in grape musts and white wines. *J Chromatogr Sci.* 1996; 34: 245-53.
13. Vallesi M, Howell G. Which alcohol analysis method should you use? (cited 2008 Abril). Available from: <http://www.vintessential.com/pdf/AlcoholAnalysis.pdf>
14. Naidu K, Rausch KD, Johnston D, Tumbleson ME, Singh V. A Two-liter dry grind laboratory procedure to measure sugar profile and ethanol yields. Proceedings of the Corn Utilization & Technology Conference, Indianapolis, IN. Poster Presentation CD Rom. June 7-9, 2004.
15. BIORAD. *Life Science Research Products 1998/1999,* California: Biorad Press; 1999. p. 178.
16. Youden WJ, Steiner EH. *Statistical Manual of the Association of Official Analytical Chemist.* Washington: Published by the Association of Official Analytical Chemist; 1975.
17. ICH. ICH Expert Working Group on technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. *Validation of analytical procedures: Methodology (Q2R1).* 2005. London: ICH Press; p.1-12
18. WHO. *Technical Report Series 937. Expert Committee on specifications for pharmaceutical preparations. Analytical method validation* Geneva: WHO Press; 2006. p. 136-40.
19. Center for drug evaluation and research of the FDA (CDER): *Reviewer Guidance. Validation of Chromatographic methods.* 1994.
20. Rudd DR. Suitability of Analytical methods for stability testing-Is the room for Improvement? *J Validation Technol.* 2001; 5(3): 255-61.

Recibido: 12 de enero de 2009.  
Aprobado: 17 de febrero de 2009.

Lic. *Matilde Cuevas Valdespino*. Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas. Calle 17 No. 19 805, La Coronela, La Lisa, CP 11 600, La Habana, Cuba.