

## Validación del método de valoración biológica de gonadotrofina coriónica humana

### Validation of the biological potency test for human chorionic gonadotropin

MSc. Alicia Lagarto Parra, MSc. Caridad García Peña, Téc. Tatiana Gabilondo Ramírez, Téc. Osmaida Triana Manso

Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM), UCTB Control Biológico. La Habana. Cuba.

---

#### RESUMEN

**Introducción:** en el Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos se cuenta con una serie de ensayos biológicos para el control de calidad que deben ser sujetos a validación, entre ellos se encuentra la valoración biológica de gonadotrofina coriónica humana.

**Objetivo:** evaluar el desempeño del método de valoración biológica de gonadotrofina coriónica humana.

**Métodos:** se evaluaron la exactitud, la precisión y la especificidad como parámetros de validación siguiendo la metodología descrita en la Regulación 41-2007 del Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED) para la Validación de métodos de análisis.

**Resultados:** en el estudio de exactitud no se observaron diferencias significativas entre los valores de peso del útero obtenidos al ensayar la muestra y el material de referencia a las tres dosis administradas. En el estudio de la repetibilidad se alcanzaron coeficientes de variación menor del 50 %. No se observaron diferencias significativas entre las precisiones alcanzadas por dos analistas diferentes en días diferentes. El estudio de especificidad mostró que los excipientes o sustancias auxiliares de la formulación no interfieren en la valoración biológica del producto.

**Conclusiones:** el método biológico validado resultó ser específico, exacto y preciso en el rango de concentraciones estudiadas, lo que corrobora su calidad, teniendo un valor agregado.

**Palabras clave:** validación, métodos biológicos, gonadotrofina.

## ABSTRACT

**Introduction:** a number of biological tests for quality control used in the Center for Drug Research and Development should be validated. Biological potency test of human chorionic gonadotropin is one of them.

**Objective:** to evaluate the performance of the human chorionic gonadotropin biological potency test.

**Methods:** the accuracy, precision and specificity were evaluated as validation parameters according to the 41-2007 Regulation of the Center for the State Control of Drug Quality (CEDMED) for analysis method validation.

**Results:** in the accuracy test, no significant differences were observed between the uterus weight values from tested sample and the reference material at the 3 tested doses. Variation coefficients were less than 50 % in the repeatability test. There were no significant differences between the precision values of two different analysts at different times. The specificity test showed that excipients or auxiliary substances in the formulation did not interfere with the results of the biologic potency test of the final product.

**Conclusions:** the validated biological method showed good accuracy, precision and specificity in the range of studied concentrations, all of which proved its quality, so it has added value.

**Key words:** validation, biologic method, gonadotropin.

---

## INTRODUCCIÓN

Como parte del cumplimiento de las Buenas Prácticas de Laboratorio uno de los requisitos exigidos es la validación de los ensayos biológicos empleados para el control de calidad de productos farmacéuticos, ya que la validación proporciona un alto grado de confianza y seguridad del proceso productivo o del método analítico así como también en la calidad de los resultados.

En el Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM) se cuenta con una serie de ensayos para la determinación de potencia biológica, entre ellos se encuentra la valoración biológica de gonadotrofina coriónica humana (GCH). La GCH es una hormona obtenida de la orina de mujeres embarazadas que se emplea en tratamientos de infertilidad en la mujer, entre otros. Dicho medicamento requiere en su control de calidad la determinación de su potencia biológica mediante el ensayo de valoración de GCH, el cual se encuentra descrito en la Farmacopea de los Estados Unidos (USP 32).<sup>1</sup>

La valoración biológica de GCH se considera un ensayo normalizado ya que aparece descrito en la USP 32, por lo que se realizó una evaluación de desempeño evaluando la exactitud, la precisión y la especificidad como parámetros de validación, siguiendo la metodología descrita en la Regulación 41-2007 del Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED) para la Validación de métodos de análisis.<sup>2</sup>

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el desempeño del método biológico de valoración de GCH para obtener pruebas adecuadamente documentada y demostrativa de que los métodos de control son lo suficientemente fiable para producir resultados previstos dentro de intervalos definidos.

---

## MÉTODOS

### Sustancia de ensayo

Las diferentes sustancias de ensayo empleadas fueron suministradas por el Laboratorio Farmacéutico "Julio Trigo", las que se describen a continuación:

- GCH producto terminado 5 000 UI/bbo, lote 7001, fecha vencimiento marzo de 2009.
- Placebo, fecha vencimiento octubre de 2008.
- Material de referencia GCH, potencia 3151,8 UI/mg, lote 050310.

### Animales

Se emplearon ratas Wistar hembras recién destetadas entre 19 y 21 días de edad, cuya variación del peso corporal no fue mayor del 30 %. Todos los animales procedían de la colonia de la UCTB Control Biológico del CIDEM, los cuales se alojaron en sala con temperatura controlada de  $22 \pm 2$  °C, se alimentaron con dieta estándar para roedores proveniente del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB) y se les suministró agua acidulada a voluntad.

### Validación del método de valoración biológica de GCH

Todas las diluciones de la sustancia de prueba y el material de referencia se realizaron empleando una solución de albúmina 1 mg/mL en cloruro de sodio 0,9 % con pH entre 6,9 y 8,0. La muestra y la sustancia de referencia se prepararon en tres concentraciones: 0,5; 0,7; 0,98 UI/mL.

Para cada ensayo los animales fueron distribuidos en grupos de 10, conformando tres grupos para la muestra y tres grupos para la sustancia de referencia. A estos se les administró 0,2 mL/animal por vía subcutánea durante tres días consecutivos. Los animales se pesaron y sacrificaron por dislocación cervical el quinto día, y se procedió a la extracción del útero el que fue pesado. Los valores de peso corporal de los animales y el peso del útero fueron procesados en el programa estadístico 6 puntos para obtener como resultado el valor de potencia, el intervalo de confianza que no debe ser mayor que 0,1938 ( $p= 0,95$ ) y los límites de potencia los cuales deben estar entre 80-125 % para que la muestra cumpla con la valoración biológica.<sup>1</sup>

### Parámetros de validación

#### Exactitud

El ensayo se realizó mediante la comparación con un material de referencia. Se efectuaron tres ensayos en paralelo comparando el material de referencia con el producto terminado. Se determinó si existían diferencias significativas entre los resultados del peso de útero para los animales tratados con la muestra y los animales tratados con el material de referencia mediante la prueba estadística t de Student, tomando un valor de  $p < 0,05$  para la significación estadística.

## **Precisión**

Se evaluaron los parámetros de repetibilidad y precisión intermedia.

Repetibilidad: se evaluaron tres concentraciones de acuerdo con lo recomendado en la Regulación 41-2007 del CECMED<sup>2</sup> (80, 100 y 120 %), empleando como muestra el producto terminado y realizando el ensayo por triplicado. Para cada resultado, en cada nivel de concentración se determinó el valor medio, la desviación estándar y el coeficiente de variación. El coeficiente de variación debe ser menor del 50 %.

Precisión intermedia: se realizó el ensayo por dos analistas diferentes y cada uno efectuó el ensayo por triplicado en dos días diferentes. Se determinó el valor medio del resultado para cada analista y cada día. Se determinó estadísticamente si existían diferencias entre la precisión alcanzada por cada analista y cada día, si existían diferencias entre las medias obtenidas por cada analista. El coeficiente de variación total debe estar entre 50 y 150 %.

## **Especificidad**

Se realizó el ensayo de especificidad mediante el empleo de un placebo que contenía todos los ingredientes de la muestra excepto el analito. El ensayo se realizó empleando tres grupos experimentales, uno administrado con el placebo, otro administrado con la muestra de producto terminado y otro administrado con el material de referencia. Se realizaron tres ensayos por separado. La valoración del placebo no debe resultar en un incremento del peso del útero de los animales de forma dosis dependiente, lo cual si debe observarse para el material de referencia y la muestra de ensayo.

## **RESULTADOS**

En la tabla 1 se reflejan los resultados obtenidos en el ensayo de exactitud. Se compararon los resultados obtenidos mediante la prueba t de Student no pareada, tomando un nivel de significación de  $p < 0,05$ . No se observaron diferencias significativas entre los valores de peso del útero obtenidos al ensayar la muestra y el material de referencia, obteniéndose valores de  $p > 0,05$ .

Los resultados del estudio de repetibilidad se observan en la tabla 2, en los que se alcanzaron coeficientes de variación menor del 50 %, lo cual demuestra la buena precisión del método según el límite para ensayos biológicos. En las tablas 3 y 4 se aprecian los resultados obtenidos para la evaluación de la precisión intermedia. Según los valores obtenidos de las pruebas de Fischer y t de Student, no existen diferencias significativas entre las precisiones alcanzadas por dos analistas diferentes en días diferentes, siendo el valor de  $p > 0,05$ . De igual forma no se observaron diferencias significativas entre las medias alcanzadas por los diferentes analistas en días diferentes, siendo el valor de  $p > 0,05$  para la prueba t de Student. El coeficiente de variación del total de ensayos realizados fue de 3,54 %, el cual se encuentra por debajo del valor especificado para métodos biológicos que emplean animales.

**Tabla 1.** Resultados del estudio de exactitud

	0,5 UI/mL	0,7 UI/mL	0,98 UI/mL
Muestra <sup>a</sup>	34,5	44,9	54,7
	55,8	68,6	81,4
	53,0	61,1	71,1
Valor medio	47,77	58,20	69,07
DE	11,57	12,11	13,47
Referencia <sup>a</sup>	35,1	44,5	54,8
	52,0	68,4	80,6
	51,3	58,6	71,3
Valor medio	46,13	57,17	68,90
DE	9,56	12,01	13,07
Prueba t de Student	0,1884	0,1049	0,0154
Valor p	0,8597	0,9215	0,9885

<sup>a</sup> Los valores en la tabla reflejan el valor medio del peso del útero de los 10 animales empleados en cada grupo.

**Tabla 2.** Resultados del estudio de repetibilidad

	80 %	100 %	120 %
1	2173,30	4983,20	4030,20
2	1697,10	5161,30	2769,20
3	3349,50	5241,10	3762,10
Valor medio	2406,63	5128,53	3264,03
DE	850,55	132,04	496,46
CV	35,34	2,57	15,21

Se reflejan los valores de potencia estimada (UI/bbo).

**Tabla 3.** Resultados del estudio de precisión intermedia

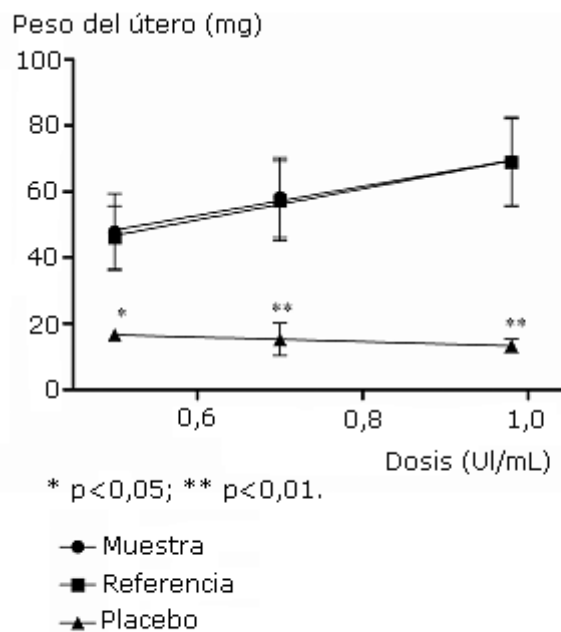
	Analista 1	Analista 2
Día 1	4983,2	5004,6
	5161,3	5079,0
	5241,1	4916,4
Día 2	5336,0	4872,2
	4801,7	5130,5
	4949,9	4742,6

Se reflejan los valores de potencia estimada (UI/bbo).

**Tabla 4.** Resultados estadísticos de la precisión intermedia del método biológico

	Por analista		Por día	
Valor medio	5078,8	4957,6	5064,2	4972,2
DE	200,90	142,92	120,75	223,47
Valor F	1,976		3,425	
Valor p	0,2364		0,1014	
Prueba t de Student	1,204		0,8873	
Valor p	0,2562		0,3957	
Valor medio total	5018,21			
DE total	177,88			
CV (%)	3,54			

En la figura se muestran los resultados del estudio de especificidad del método. Como se observa no se obtuvo un incremento del peso del útero dependiente de la dosis en los animales tratados con el placebo, lo cual si se observó para los animales tratados con la muestra y el material de referencia, cuya respuesta si fue dependiente de la dosis y muy similar entre ellos. Los valores obtenidos de peso del útero para las tres dosis fueron significativamente diferente en los animales tratados con el placebo al compararlos con los grupos tratados con el material de referencia y el producto terminado, de acuerdo a un análisis de varianza realizado (Anova).



**Fig.** Resultados del ensayo de especificidad. Obsérvese la representación del valor medio del peso del útero de tres ensayos.

## DISCUSIÓN

La validación es necesaria porque proporciona un alto grado de confianza y seguridad del proceso productivo o del método analítico, así como también en la calidad de los resultados. Esto lógicamente se traduce en la disminución de número de fallos y repeticiones con el consiguiente ahorro de los costos asociados y en la optimización del método para mejorar su practicabilidad y posibilidades de automatización. El objetivo principal de la validación analítica es el de asegurar que un procedimiento analítico seleccionado dará resultados reproducibles y confiables que sean adecuados para el propósito previsto.<sup>3</sup>

La exactitud indica la capacidad del método analítico para dar resultados lo más próximo posible al verdadero valor.<sup>4</sup> El ensayo de exactitud realizado para el método de valoración biológica de GCH mostró muy buenos resultados, lo que demuestra la exactitud del método.

La precisión es el grado de correlación o cercanía entre los resultados analíticos individuales que se obtienen al aplicar repetidamente el método a varias muestras.<sup>5</sup> La precisión del método fue evaluada mediante los ensayos de repetibilidad y precisión intermedia. Los resultados muestran que el ensayo es preciso, en el que se obtuvieron coeficientes de variación por debajo de los límites establecidos para métodos biológicos.

La especificidad se define como la capacidad de un método analítico para medir de manera exacta y específica el analito, sin interferencia de impurezas, productos de degradación, compuestos relacionados o excipientes que puedan estar presentes en la matriz de la muestra.<sup>4</sup> Los resultados del ensayo de especificidad indican que los excipientes o sustancias auxiliares de la formulación no interfieren en la valoración biológica del producto; por tanto, el método resulta específico y no se observan interferencias de las sustancias auxiliares en la valoración del producto terminado.

De acuerdo con los resultados, el método biológico validado para la valoración de GCH resultó ser específico, exacto y preciso en el rango de concentraciones estudiadas, lo que corrobora su calidad, teniendo un valor agregado. Dicho ensayo se realiza a las producciones de GCH de la Empresa "Julio Trigo" como parte del control de calidad.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. USP 32. Ensayo de valoración de gonadotrofina coriónica humana. Monografía Chorionic Gonadotropin. Rockville: United Pharmacopoeial Convention, Inc.; 2009. [CD-rom].
2. CECMED. Validación de Métodos Analíticos. Regulación N° 41-2007. La Habana: MINSAP; 2007.
3. FDA. Analytical procedures and methods validation chemistry, manufacturing, and controls documentation. Guidance for Industry. Center for Biologics Evaluation and Research. Silver Spring, MD: FDA; 2002.

4. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Validation of analytical procedures: Text and Methodology, Q2(R1). Geneva: ICH; 2005.

5. USP 32. General Chapter 1225. Validation of compendial methods. United States Pharmacopeia XXXII. Rockville: United Pharmacopoeial Convention, Inc.; 2009. [CD-rom].

Recibido: 24 de noviembre de 2011.

Aprobado: 29 de diciembre de 2011.

*Alicia Lagarto Parra*. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM), UCTB Control Biológico. 17 No. 6208 e/ 62 y 64 Playa, La Habana, Cuba. Correo electrónico: [cidem.cb@infomed.sld.cu](mailto:cidem.cb@infomed.sld.cu), [alicia.lagarto@cidem.sld.cu](mailto:alicia.lagarto@cidem.sld.cu)