

Validación de una técnica colorimétrica para la determinación de carbohidratos

Carmen Soto, Maribel Cuello, Yusimí Alfonso, Osmir Cabrera y Gustavo Sierra.

Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana, Cuba.

E-mail: csoto@finlay.edu.cu

La adecuada estandarización de un ensayo analítico, seguido de la validación del método y la homogeneidad de los reactivos químicos y biológicos a lo largo de los diferentes estudios, son elementos imprescindibles para alcanzar óptimos resultados. En este trabajo se seleccionó una metodología para la validación del método analítico empleado en la determinación de ribosa por el método del orcinol y se utilizó una solución estándar de ribosa (0,025 mg/mL). Se realizó un análisis de los criterios fundamentales de validación: linealidad, precisión, exactitud, sensibilidad, especificidad, límites de detección y robustez. Se comprobó la utilidad de dicho procedimiento y se demostró mediante el diseño experimental y los procedimientos estadísticos empleados que dicho método es lineal ($r^2 > 0,98$), exacto ($F_{exp.} < F_{tab.}$ y $t_{exp.} < t_{tab.}$), preciso ($CV < 3\%$), sensible ($LD = 1 \text{ ug/mL}$ y $LC = 3.3 \text{ ug/mL}$) y específico (respuesta no significativa), por lo cual es confiable. La determinación de ribosa es una técnica colorimétrica que cuantifica pentosas y se emplea con el objetivo de conocer el contenido exacto de la misma en una muestra de producto purificado. Además es empleada como control final según la OMS en las vacunas conjugadas de *Haemophilus influenzae*.

Palabras claves: Orcinol, ribosa, validación, *Haemophilus influenzae*.

Introducción

Las enfermedades producidas por *Haemophilus influenzae* (*Hi*) son reconocidas a nivel mundial como una problemática de salud, sobre todo para edades tempranas (1-2) constituyendo la causa más encontrada de meningitis bacteriana no epidémica. Se estima que más de 500 000 niños mueren anualmente en el mundo debido a esta enfermedad y aquellos que sobreviven, el efecto puede ser severo y dejar secuelas neurológicas permanentes a pesar incluso de imponerse la terapéutica adecuada (3-4).

Las vacunas disponibles en la actualidad para la vacunación de niños menores de un año de edad se han obtenido mediante la conjugación del PRF con proteínas portadoras, convirtiendo así el polisacárido capsular en un antígeno dependiente de las células T.

La industria farmacéutica centra sus esfuerzos en la validación de métodos analíticos, refiriéndolo así en la Guía para Buenas Prácticas de Producción de Productos Médicos en 1989, debido al gran incremento de nuevos productos que tienen que ver con la salud y que requieren de métodos de análisis apropiados (5).

Existen regulaciones dictadas por las organizaciones reguladoras nacionales como el Centro Estatal de Control de Medicamentos (CECMED) e internacionales como la Organización Mundial de la Salud (OMS), la

Organización Panamericana de la Salud (OPS) (6,7) y otras donde se exige validar los métodos analíticos y de control relacionados en todo el proceso de producción de un fármaco. Para el desarrollo de un nuevo producto es necesario la utilización de métodos analíticos que permitan cuantificar el producto en forma de materia prima o como principio activo de la formulación con un alto grado de confiabilidad (8). La adecuada estandarización de un ensayo analítico, seguido de la validación del método y la homogeneidad de los reactivos químicos y biológicos a lo largo de los diferentes estudios, son elementos imprescindibles para alcanzar óptimos resultados. Basado en este criterio se tomo como objetivo para este trabajo la validación de un método analítico colorimétrico para la determinación de carbohidratos y específico para sustancias que en su composición tengan pentosas como, por ejemplo, las ribosas presentes en polisacáridos, RNA y otros compuestos.

Materiales y Métodos

Esta técnica denominado método de Bial (9,10) (Orcinol) se realiza en condiciones de temperatura y tiempo estables, utilizando una mezcla de ácido clorhídrico, orcinol y FeCl_3

El ácido rompe los enlaces glicosídicos y deshidrata los monosacáridos para la condensación con el orcinol, así

como para la oxidación de los grupos cetonas libres, a una temperatura de 100 °C y un tiempo de 20 min. Esto provoca la formación de un complejo verde estable que absorbe a una longitud de onda de 670 nm. El método utilizado en el ensayo se validó de acuerdo con los criterios establecidos (11). Los parámetros son los siguientes:

- **Linealidad:** La linealidad es la capacidad de un ensayo para obtener resultados directamente proporcionales a la concentración del analito en una muestra (5). Y se determina construyendo la curva de calibración de absorbancia contra concentración a partir de una solución estándar de Ribosa (25 µg/mL). El análisis se realizó seis veces para cada dilución, se trabajó en un rango de concentración de 1,25-12,5 µg/mL. Se mide la absorbancia de las diluciones utilizando como blanco agua destilada y calibrando el espectrofotómetro a cero. Se determinó la recta de regresión lineal y se calcularon los coeficientes de determinación y de correlación (r y r^2). Para la prueba de linealidad se hallaron el coeficiente de variación (CV_f) para el factor de respuesta f ; la desviación estándar relativa de la pendiente (Sb_{rel}) y la F de Fisher práctica (F_p) para $p = 0,05$.
- **Precisión (repetibilidad, reproducibilidad y precisión intermedia)**
- **Repetibilidad:** Se consideraron muestras de concentraciones altas (10 µg/mL), medias (5 µg/mL) y bajas (1,25 µg/mL), preparadas a partir de la solución estándar, realizando seis repeticiones bajo las mismas condiciones de ensayo, hechas por un mismo analista, el mismo día y las lecturas tomadas del mismo equipo. Se determinó el coeficiente de variación (CV) y se aplicó la prueba Anova de clasificación simple.
- **Precisión intermedia:** Se analizan tres niveles de concentración 1,25, 5 y 10 µg/mL por duplicado, en condiciones diferentes y por dos analistas durante tres días. Aquí utilizamos equipos procedentes de otras firmas diferentes a las que se utilizaron en el ensayo.
- **Reproducibilidad:** La determinación se realiza de la misma forma que la precisión intermedia pero utilizando reactivos provenientes de otras firmas. En este caso utilizamos ribosa proveniente de la misma firma, pero de otro lote (4956330), orcinol de la BDH y etanol de la Merck. También en condiciones diferentes y por dos analistas durante tres días. Se cumplen los mismos criterios que en

la precisión intermedia. Los valores a reportar son los siguientes:

- Resultados individuales
 - Media
 - Desviación estándar
 - Coeficiente de variación
- **Robustez:** Se analizó mediante un diseño factorial 2^3 , según la tabla de Yourden y Steiner,⁶ considerando las variables: tiempo de preparación de las soluciones $FeCl_3/HCL$; orcinol/etanol y la solución estándar de ribosa, agitación inmediata o no una vez añadidas las soluciones de trabajo, tiempo de incubación en el baño, temperatura del baño y temperatura de enfriamiento de las muestras. Se realizó cada determinación por triplicado.
 - **Exactitud:** La exactitud es el grado de identidad de los valores analíticos obtenidos con cierto método y el contenido real del parámetro en la muestra (5,12,13). EL análisis se realiza por sextuplicado a una muestra de concentración 5 µg/mL preparada a partir de la solución estándar que corresponde al 100% de la concentración. Estadísticamente suele efectuarse una prueba t de Student para determinar si el valor medio hallado y el valor considerado verdadero no difieren significativamente para un grado de probabilidad determinado. Si $t_{exp} < t_{tabla}$ significa que el método analítico desarrollado tiene la exactitud requerida ya que ambos valores no son estadísticamente diferentes. Si $t_{exp} > t_{tabla}$ significa que el método analítico no es exacto y que existe un error sistemático por defecto o por exceso que en valor absoluto es $|m - \bar{x}|$
 - **Sensibilidad:** En un método analítico sensible, ligeros incrementos de concentración coinciden con incrementos notables de señal o respuesta (5). Los límites de detección y cuantificación se calcularon teóricamente utilizando el valor de la ordenada en el origen obtenida para la recta de calibración en el ensayo de linealidad. Los límites calculados se comprobaron experimentalmente mediante el análisis repetitivo de 10 muestras de dos soluciones preparadas a las concentraciones obtenidas y los resultados fueron evaluados por un Anova de clasificación simple.

Resultados

En la Tabla 1 se observan los valores obtenidos para el ensayo de determinación de carbohidratos por el

método del orcinol. Los parámetros de linealidad, precisión a concentraciones bajas, medias y altas del analito; además de exactitud y sensibilidad del método,

se encuentran dentro de los rangos de aceptación establecidos (5,14).

Tabla 1. Resultados de la validación del método.

Parámetro	Procesamiento estadístico	Resultados	Criterios de aceptación
Linealidad	Coeficientes de correlación y determinación	$r^2 = 0,9964$ $r = 0,9981$	$r^2 = 0,98$ $R = 0,99$
	<i>Test</i> de linealidad	$CV_f = 4,55 \%$ $Sb_{re} = 1,06\%$	$CV_f = 5\%$ $Sb_{rel} = 2\%$
	<i>Test</i> de proporcionalidad	$a = 0,05$ $IC_{(a)} = (-0,0161; 0,0161)$	$a = 0$ $IC_{(a)}$ incluye el 0
	Precisión	<i>Conc. bajas</i> <i>Conc. medias</i> <i>Conc. Altas</i>	
Repetibilidad y Reproducibilidad	Coeficientes de variación	$CV_{Repet} = 2,09\%$ $CV_{Reprod} = 1,78\%$	$CV_{Repet} < 3\%$ $CV_{Reprod} < 3\%$
	<i>Test</i> de Anova de clasificación simple	Diferencias no significativas $F_{exp} = 0,63$ $1,09$	$0,89\%$ $0,83\%$ $F_{exp} < F_{tab} = 5,05$
	Robustez	Factorización	Diferencias no significativas para cada factor
Exactitud	$F_{exp} = 1,8$ $F_{exp} < F_{tab} = 2,01$		
Sensibilidad	LD = 1 µg/mL CV = 0,52 % CV = 3 % LC = 3,3 µg/mL CV = 0,62 %		

Discusión

Al evaluar estadísticamente la linealidad del método analítico validado, se obtuvieron coeficientes de correlación (r) y de determinación (r^2) que demuestran que existe regresión entre las variables concentraciones y las respuestas medidas. Para confirmar que dicha regresión era lineal se aplicaron diferentes *test* de linealidad, considerando el análisis de la varianza ($F_{A_{exp}}$) el *test* más riguroso que corroboró la linealidad de los métodos y del sistema instrumental. De igual forma se comprobó que se cumple la condición de proporcionalidad y el error sistemático de

cada método es despreciable. Por otra parte, el estudio de precisión mostró una buena repetibilidad y reproducibilidad de los resultados de acuerdo con los criterios de aceptación, mientras que los factores estudiados para cada método en el ensayo de robustez no influyeron significativamente en los resultados, por lo cual podemos considerar que dicho método es preciso y robusto. Para evaluar la exactitud se aplicaron diferentes procedimientos experimentales y estadísticos que responden a las características propias del método analítico validado. Además no se obtuvieron diferencias significativas entre la recuperación media y el 100% al aplicar la prueba t de

Student (t_{exp}), confirmando la buena exactitud del método. Se determinó igualmente que el método del orcinol es exacto, ya que no existen diferencias significativas entre los resultados, ni por su varianza (*test* de Fisher) ni por la diferencia de medias (*t* de Student). Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) calculados para el método de determinación, fueron corroborados experimentalmente. El método es sensible, ya que no se encontraron diferencias significativas entre los resultados obtenidos para cada límite y los coeficientes de variación para cada uno de ellos fueron menores que el coeficiente de variación permitido para el método.

Todos los resultados obtenidos en la validación del método espectrofotométrico permiten asegurar que es confiable, ya que cumplen los criterios de validación reportados por *Castro y otros* en 1989 (15) y por *Aguilar y otros* en 1992 (16). De esta manera se comprobó experimentalmente la utilidad del procedimiento establecido para la validación de otros métodos analíticos; y queda abierto el camino a la validación de todos los métodos analíticos en el control de la calidad.

Referencias

- Levine OS, Granoff D, Lagos R, Fritzell B, Levine MM. Factors associated with a superior antibody response to a single dose of *Haemophilus influenzae* type b-tetanus toxoid conjugate vaccine administered to Chilean infants at 2 months of age *Vaccine* 1997;15:325-328.
- Anderson EC, Begg SC, Crawshaw SC, Hargreaves RM, Howard RM, Slack MPE. Epidemiology of invasive *Haemophilus influenzae* infections in England and Wales in the prevaccination (1992-1994). *Epidemiol Infect* 1995;115:89-100.
- Phillip P, Ronald WE. Biological Activity of Conjugate. *Suplement* 9:1991.
- Slack MPE. Invasive *Haemophilus influenzae* disease: the impact of Hib immunisation. *J med. Microbiol* 1995;42:75-77.
- Fernández, A. Rosales, I. Validación de Métodos Analíticos. Segundo taller Nacional de Validación (Notas del curso). 1999.
- WHO. Proposed Draft Requirements for *Haemophilus influenzae* type b. 1990;46:9-15.
- Chaloner-Larsson G, Anderson R, Egan A. A WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements. Part 2: Validation. Validation of analytical assays. *WHO Geneva* 1997:65-95.
- Gordon LK, inventors. Polysaccharide exotoxoid conjugate vaccine. US Patent. 4,619,828. 1986.
- Rampazoo P. Standardisation and Validation of Analytical Methods in the Pharmaceutical Industry. *II Farmaco* 1990;45:807-15.
- Kraskern PJ, Hagopian JA, and Carlos DJ, inventors. meningitis vaccine. US Patent. 4,307,088. 1980.
- Calpena AC, Escribano E, Fernández C. Validación de los métodos analíticos. *Farm Clin* 1991;7(9):749-58.
- Thielmann K. *Principios de metodología en bioquímica clínica*. ed. Organismos: Instituto Cubano del Libro, 1973
- Ochoa RA, Martínez, J.C; Estrada, E et al. Principios y procedimientos para la validación de inmunoensayos cuantitativos empleados para evaluar la inmunogenicidad de vacunas. *VacciMonitor*. 1999;8(10):9-13.
- Green, M. A practical guide to analytical method validation. *Analytical Chemistry*. 1996; 68: 305A-309A
- Aguilar G, Alcántara A, Chárvel A, García JL, Garzón A, Guerrero ME, et al. Validación de métodos analíticos. Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud, SSA. *Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biológicos*. México AC, 1992.
- Castro M, Gascón S, Pujol M, Sans JM, Vicente L. Validación de métodos analíticos. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. Monografía AEFI. Sección Catalana. *Comisión de Normas de Buena Fabricación y Control de la Calidad*. Edición Hewlett Packard, 1989.

Validation of a colorimetric technique for carbohydrate determination

Abstract

The appropriate standardization of an analytical assay, followed by the validation of the method and the homogeneity of the chemical and biological reagents used during the different studies are indispensable elements for obtaining optimal results. In this work a methodology was selected for the validation of the analytical method used to determine ribose by the orcinol method using a standard ribose solution (0,025 mg/mL). An analysis of the main validation criteria: linearity, precision, accuracy, sensitivity, specificity, detection limits and robustness were carried out. The usefulness of this procedure was demonstrated and by means of the experimental design and the statistical procedures used, the linearity ($r^2 > 0,98$), exactness ($F_{exp} < F_{tab}$ and $t_{exp} < t_{tab}$), preciseness ($CV < 3\%$), sensitivity ($LD = 1 \mu\text{g/mL}$ and $LC = 3.3 \mu\text{g/mL}$) and specificity (non significant answer) of the method were verified, for which reasons it is considered reliable. The determination of ribose is a colorimetric assay that quantifies pentoses and is used with the objective of knowing the exact pentose contents in a sample of purified product. It is also used as a final control for *Haemophilus influenzae* conjugated vaccines according to WHO.

Keywords: Orcinol, ribose, validation, *Haemophilus influenzae*