

Validación de una técnica enzimática para el control de calidad de un jarabe de tripsina.

Autores: *Maureen Fernández, , *Natacha García, **Rubén Otniel, **Viviana García.

*Laboratorio de Nutrición. Dpto. de Fisiología. ICBP "Victoria de Girón".

**Dpto. de Tecnología. Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL-UH)

e mail: ngarcia_28@yahoo.com

Resumen.

El jarabe de Tripsina posee una elevada actividad proteolítica y por esta razón puede ser empleado como suplemento alimenticio en niños con alergia a las proteínas de la leche de vaca.

Teniendo en cuenta los diferentes parámetros que pueden variar la actividad de esta enzima en el producto terminado es importante contar con un método fiel que garantice la calidad del mismo. Por ello se realizó la validación de una técnica analítica, el método de Anson-Lowry, para el control de la calidad del producto terminado, mediante los parámetros: Linealidad, precisión, exactitud y especificidad.

Los ensayos realizados permitieron demostrar la validez del método de Anson-Lowry, por lo que puede ser utilizado para el control de la calidad del Jarabe, mediante la cuantificación de la actividad proteolítica de la Tripsina.

Abstract.

The syrup of Trypsin possesses a high proteolytic activity and for this reason is an employee as nutritious supplement it stops in children with allergy to the proteins of the cow milk.

Keeping in mind the different parameters that can vary the activity of this enzyme in the finished product is important to have a faithful method that guarantees the quality of the same one. For it was carried out the validation of an analytic technique, the method of Anson-Lowry, for the control of the quality of the finished product, by means of the parameters: Lineality, precision, accuracy and specificity.

The carried out rehearsals allowed to demonstrate the validity of of Anson-Lowry method, for what can be used for the control of the quality of the Syrup, by means of the quantification of the proteolytic activity of the Trypsin.

Introducción.

En la actualidad, la industria farmacéutica se encuentra vinculada en garantizar la máxima calidad de los productos desde el momento en que los mismos se diseñan, con el cumplimiento de las llamadas buenas prácticas de laboratorio. Para ello es necesario tener en cuenta una serie de aspectos que incluyen los equipos utilizados en el control de la calidad, la clasificación del personal, la documentación y las técnicas o métodos de análisis empleados^{1,2}.

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.

En el presente artículo se expone los parámetros evaluados en la validación de un método analítico para la cuantificación de la tripsina (principio activo) incorporado a un jarabe que tiene como aplicación práctica la hidrólisis de las proteínas de la leche.

El jarabe de tripsina es utilizado para el tratamiento de la alergia a las proteínas de la leche de vaca, en niños que presentan una mucosa intestinal lesionada donde es mayor la absorción de proteínas extrañas, en su forma natural, y una mayor sensibilización a las mismas.

Materiales y Métodos.

Para la validación del método se evaluaron los siguientes parámetros:

Linealidad⁵:

Se realizó el análisis por triplicado de muestras que contenían cantidades equivalentes al 10, 20, 40, 50, 60, 80, 100 y 120% del principio activo presente en el jarabe. Se llevó a cabo la construcción de la curva de calibración de D.O. vs Concentración. y se aplicó regresión lineal por STAT para Windows, calculando el coeficiente de correlación ($r \geq 0,990$), coeficiente de determinación (r^2), la pendiente y la significación del intercepto.

Crterios:

. Expresión de la recta de regresión:

Ecuación de la recta $y = bx + a$ donde: $x =$ concentración

$b =$ pendiente.

$a =$ intercepto.

$y =$ respuesta.

Para determinar la linealidad del método se calculó el coeficiente de variación de los factores de respuesta (f), la media de f, la Desviación estándar de f y el Coeficiente de variación (C.V) de f. Por otra parte, se realizó la prueba de proporcionalidad mediante el cálculo del valor del error sistemático del método (a), que es la intersección con el eje de las ordenadas, que debe ser lo más cercano a cero. Se determinó la varianza del término independiente y la varianza del error experimental total, la desviación o error del estándar del término independiente y la desviación estándar relativa del término independiente, siendo los límites de confianza del término independiente $a \pm tSa$ donde t es el valor de la distribución de Student para $n - 2$ grados de libertad a la probabilidad escogida ($p = 0,05$). Si estos límites incluyen el cero se cumple la condición de proporcionalidad.

La significación estadística de a se puede deducir también de la expresión:

$$t_{\text{exp}} = | a | / S_a$$

Precisión⁶:

La precisión del método se evaluó mediante los parámetros repetibilidad y reproducibilidad del método:

- Repetibilidad: La evaluación de este parámetro se realizó a través del análisis sextuplicado de tres cantidades ensayadas (80, 100, 120%) mediante el método

enzimático de trabajo. Las determinaciones se realizaron el mismo día bajo las mismas condiciones de trabajo. Para determinar este parámetro se calcula el coeficiente de variación (C.V.), el cual debe ser menor del 5% para métodos biológicos.

- Reproducibilidad: En este caso se realizaron las determinaciones de las muestras correspondientes al 80, 100 y 120% por triplicado. El análisis se lleva a cabo por dos analistas en dos días diferentes.

Criterios: Se utilizó la prueba de Fischer para determinar si hay diferencias significativas entre los resultados de los analistas que emplearon el mismo método.

Donde: $F \geq 1$

Sí $F_{exp.} < F_{tab.}$, no existen diferencias significativas entre la precisión alcanzada por los analistas ($F_{n_1 - 1 / n_2 - 1}$, $P = 0,05$). El valor crítico de $F_{tab.}$ se busca en las tablas estadísticas, conociendo el # de grados de libertad ($n-1$), donde n es el número de muestras para un analista individual.

También se realizó la prueba de Student:

Sí $t_{exp.} < t_{tab.}$ ($P = 0,05$, $GL = n_1 + n_2 - 2$) no existe diferencia significativa entre las medidas obtenidas por los analistas.

Especificidad⁶:

Se analizaron placebos con la técnica planteada y se evaluó si existía respuesta o no de las sustancias auxiliares.

Criterios: Confirmar que el método es capaz de dar respuesta positiva únicamente al principio activo sin que exista interferencia de otros componentes

Exactitud⁷:

Se evaluaron placebos que contenían un 80, 100 y 120% del fármaco contenido en el jarabe y se llevo a cabo el análisis por triplicado en cada punto.

Criterios:

% de Recobro: 98- 102%

% de recuperación (R):

% de recuperación medio (\bar{R}):

Desviación Standard (S_r):

Coeficiente de variación:

Según la prueba Prueba de student: Sí $t_{exp.} < t_{tab.}$, significa que el método analítico empleado tiene la exactitud requerida ya que ambos valores no son estadísticamente diferentes.

Resultados y Discusión.

La técnica que se validó es un método biológico que esta sujeto a que se manifiesten mayores variaciones entre los resultados, esto es debido a que el proceso se rige por una reacción enzimática y depende de un gran número de parámetros como pueden ser la temperatura, el tiempo de hidrólisis y la concentración o cantidad de sustrato.

En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos en el estudio de linealidad del método, el cual resultó ser lineal en el rango de concentraciones de 2 a 20 mg/mL.

La ecuación de la recta es $y = -.0857 + .07300X$, con un factor de correlación de 0,99107.

Tabla I. Análisis de regresión de la linealidad.

STAT. MULTIPLE REGRESS.	Regression Summary for Dependent Variable: D.O R= .9907184 R ² = .98222338 Adjusted R ² = .98060733 F (1.11)= 607.79 p(.00000 Std. Error of estimate: .06764					
N=17	BETA	St. Err. of BETA	B	St. Err. of BETA	t(15)	p-level
Intercept			-.085667	.040586	-2.11078	.058498
CONC	.991072	.040200	.073004	.002961	24.65341	.000000

En la prueba de proporcionalidad para el intercepto se determinó el valor de $t_{exp} = -2,11$, valor inferior a la t_{tab} que fue de 2.13, lo cual expresa que el intercepto no es significativamente diferente de cero. De igual forma, la pendiente si da significativa con una t_{exp} alta (24,65341) correspondiendo con una probabilidad menor de 0,05 (0,000000); de donde se concluye que la pendiente es significativa.

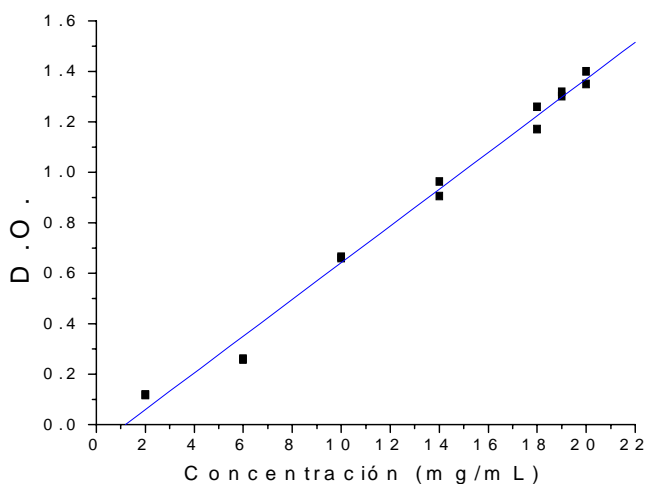


Figura 2. Curva de calibración. Ensayo de linealidad.

Los resultados de la prueba de precisión fueron evaluados a partir de la repetibilidad y reproducibilidad del método (Tablas II y III)

El coeficiente de variación (C.V.) alcanzado demuestra una buena repetibilidad, ya que para los métodos microbiológicos y biológicos se permite como límite máximo un 5%. Por lo tanto el método es repetible pues en los tres niveles de análisis se cumple con esta condición.

Tabla II. Resultados experimentales del estudio de repetibilidad.

	NIVEL BAJO 80%	NIVEL MEDIO 100%	NIVEL ALTO 120%
1	12,41	13,39	13,28
2	12,57	13,06	14,18
3	12,73	13,35	13,86
4	13,05	13,64	14,07
5	13,54	13,15	13,70
6	14,02	14,26	14,02
Media	13,05	13,47	13,85
Sd	0,62	0,43	0,33
C.V.	4,75	3,22	2,36

Tabla III. Resultados del estudio de reproducibilidad.

		DIA 1			DIA 2			MEDIA
NIVEL BAJO	ANAL.1	13,39	13,06	13,35	14,27	12,80	13,64	13,43
	80%	ANAL.2	13,06	14,12	13,57	13,14	13,64	
NIVEL MEDIO	ANAL.1	13,06	13,54	14,02	14,50	12,73	14,67	13,72
	100%	ANAL.2	13,46	14,50	14,08	13,54	13,06	
NIVEL ALTO	ANAL.1	13,28	14,19	14,02	13,70	14,12	13,86	13,88
	120%	ANAL.2	13,56	14,33	13,22	14,18	14,07	

Nivel bajo- 80%:

C.V.= 3,27

$F_{exp} = 1,54$ $F_{tab}(N_1-1/N_2-1, P=0,05) = 5,05$ $F_{exp} < F_{tab}$ } Cumple

$t_{exp} = 0,10$ $t_{tab}(N_1+N_2-2, P=0,05) = 2,228$ $t_{exp} < t_{tab}$ } Cumple

Nivel medio-100%:

C.V.= 4,58

$F_{exp} = 2,34$ $F_{tab}(N_1-1/N_2-1, P=0,05) = 5,05$ $F_{exp} < F_{tab}$ } Cumple

$t_{exp} = 0,15$ $t_{tab}(N_1+N_2-2, P= 0,05) = 2,228$ $t_{exp} < t_{tab}$ } Cumple

Nivel alto-120%:

C.V.= 2,62

$F_{exp} = 1,61$ $F_{tab}(N_1-1/N_2-1, P= 0,05) = 5,05$ $F_{exp} < F_{tab}$ } Cumple

$t_{exp} = 0,16$ $t_{tab}(N_1+N_2-2, P= 0,05) = 2,228$ $t_{exp} < t_{tab}$ } Cumple

Del análisis de estos resultados podemos concluir que el método es reproducible.

Para evaluar la especificidad se aplicó el método propuesto a un placebo del producto comprobando la ausencia de respuesta en el equipo, con lo cual se demuestra la especificidad de la técnica.

En la Tabla IV se muestran los resultados del estudio de exactitud del método de cuantificación enzimática.

Tabla IV. Resultados experimentales del estudio de exactitud.

%	CANT.ADICIONADA (mg/mL)	CANT.RECUPERADA (mg/mL)	RECOBRO (%)	RECOBRO MEDIO(%)
80	13,15	13,14	99,92	
	13,15	13,57	103,19	100,80
	13,15	13,06	99,31	
100	13,63	13,46	98,75	
	13,63	13,57	99,56	99,22
	13,63	13,54	99,34	
120	14,12	14,18	100,42	
	14,12	14,19	100,49	100,80
	14,12	14,33	101,49	
RESULTADOS:				
$\bar{R} = 100,27$				
C.V.= 1,36				

$$t_{exp} = 0,03 \quad t_{tab} (P= 0.05, GL= n-1) = 2,31 \quad t_{exp} < t_{tab} \quad \} \quad \text{Cumple}$$

Al evaluar la exactitud se comprobó que el % medio de recobro, como el coeficiente de variabilidad se ajusta al rango fijado para la aceptación de este parámetro. Teniendo en cuenta lo anterior, podemos afirmar que no existen diferencias significativas entre los valores teóricos y reales. Por todo esto podemos decir que el método es exacto.

Conclusiones.

Según los resultados obtenidos en el análisis de los diferentes parámetros evaluados para la validación del método de cuantificación enzimática del jarabe de tripsina, podemos plantear que el mismo resulta valido para el control de calidad del producto terminado puesto que cumple con los parámetros: linealidad, precisión, exactitud y especificidad.

Referencias Bibliográficas.

1. Almirall, D.I.: Evaluación analítica de microcápsulas de Bisacodyl, ICAL, U.H., 1995.
2. Manual de administración de laboratorios de Control de Medicamentos. México, 1991 pg. 42-46.
3. Alais, Charles.: Ciencias de la leche. Principios de técnica lechera. Cia Editorial C Continental S.A., C.V México. Séptima Edición, 1988 pg. 87-89, 101-103.
4. Black, R.E.: Persistelt diarrhea in children of developing countrys. Rev. Pediatric infec. This J. Vol. XII, No.9, 1996 pg 751.
5. Quattrochi, O.A.; Abelaira de Adrezzy, S.I.; Laba, R.F. 1992 pg. 26, 27, 93, 302-321.
6. Fernández, A.: Validación de técnicas analíticas. CIDEM, 1996 pg. 7-11, 13, 14, 16-23.
7. Boehleret, J.P. et al.: Assay development in stability test method, Drug-rev, Ind. Pharm., No 10, 1984 pg. 289.