


SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALITICAS			
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department		Determinación de Osmolalidad de acuerdo con Pharm. Eur. and USP	
130SOP008/02	Sustituye: 130SOP008/01	Válido desde:	C

**RAZÓN DE EMISIÓN:**

Especificación de la escala de calibración aplicable en la sección 4.2 y los volúmenes de muestra aplicables en la sección 4.3

**ÁMBITO DE APLICACIÓN:**

Control de Calidad de los departamentos del grupo Octapharma

**AUTOR:**

J. Müllner, 10.12.2009 (Método de Validación)

**REVISIÓN:**


(Jefe Internacional de los métodos de validación)

**APROBACIÓN:**

(Control Corporativo de la Calidad)


(Aseguramiento Corporativo de la Calidad)

Este Procedimiento Operativo Estándar (SOP) define el encuadramiento general necesario para el tema mencionado. Puede ser traducida a los respectivos idiomas, utilizados en las diferentes instalaciones de Octapharma y se complementa con la información adicional de acuerdo a las necesidades locales, siempre y cuando no existan discrepancias o conflictos con la información indicada en el interior del SOP-principal. Las diferentes instalaciones de Octapharma serán responsables por la validez de las traducciones e informaciones adicionales.

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALITICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	Determinación da Osmolalidad de acuerdo con Pharm. Eur. and USP	
130SOP008/02	Página 2 de 6	


**REVISIÓN HISTÓRICA:**

Versión	Fecha	Motivo de la emisión
130SOP008/02	10.12.2009	Especificación de la escala de calibración aplicable en la sección 4.2 "Calibración" y de los volúmenes de la muestra en la sección 4.3 "Evaluación de muestras"
130SOP008/01	01.09.2008	Enmienda del SOP-principal después de la renovación del rango de calibración hasta 2000 mOsmol /kg, lo que permite la medición de la osmolalidad mayor de 400 mOsmol/kg sin dilución de acuerdo con CC 08/54
130SOP008/00	30.09.2005	Definición de un estándar corporativo 1ra.edición

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALITICAS	
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	Determinación da Osmolalidad de acuerdo con Pharm. Eur. and USP
130SOP008/02	Página 3 de 6

### ÍNDICE:

<b>1</b>	<b>FUNDAMENTO DE LA PRUEBA .....</b>	<b>4</b>	<b>ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS ....</b>	<b>4</b>	<b>ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.</b>
<b>3</b>	<b>EQUIPAMIENTOS Y REACTIVOS .....</b>	<b>4</b>	<b>ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.</b>
3.1	Equipamiento .....	<b>5</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.2	Reactivos.....	<b>5</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>4</b>	<b>PROCEDIMIENTODE LA PRUEBA ....</b>	<b>5</b>	<b>ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.</b>
4.1	Preparación de las muestras .....	<b>5</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.2	Calibración .....	<b>5</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.3	Mediciones de los controles y muestras.....	<b>5</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.4	Evaluación .....	<b>5</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.5	Criterios de Aceptación de un resultado válido de un teste	<b>6</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>5</b>	<b>DOCUMENTACIÓN .....</b>	<b>6</b>	<b>ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.</b>
<b>6</b>	<b>NOTAS ESPECIALES .....</b>	<b>6</b>	<b>ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.</b>
<b>7</b>	<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>6</b>	<b>ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.</b>

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALITICAS	
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	Determinación da Osmolalidad de acuerdo con Pharm. Eur. and USP
130SOP008/02	Página 4 de 6

## 1. FUNDAMENTO DE LA PRUEBA

La osmolalidad es un medio práctico de dar una medida global de la contribución de los diversos solutos presentes en una solución, a la presión osmótica de la solución. La osmolalidad de una solución dada está indicada por la siguiente ecuación (aproximación):

$$\xi_m = v \cdot m \cdot \Phi$$

$\xi_m$	osmolalidad de la solución
$v$	Número total de iones presentes o formados por solvólisis de una molécula de soluto
$m$	molalidad de la solución
$\Phi$	Coefficiente osmótico molar

La osmolalidad se determina mediante la medición de la depresión del punto de congelación de la solución. La relación entre la depresión del punto de congelación y la osmolalidad es el siguiente:

$$\xi_m = \frac{\Delta T}{1.86} \times 1000 \text{ mosmol / kg}$$


La unidad de osmolalidad es osmole por kilogramo, pero normalmente el miliosmol por kilogramo (mOsmol/kg) es utilizado.

## 2. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Corresponding Analytical SOPs of Octapharma subsidiaries in the particular languages
2. Corresponding equipment SOPs of Octapharma subsidiaries in the particular languages
3. Corresponding quality control sheets or database reports of the particular Octapharma subsidiaries
4. Corresponding method validation documents prepared by any QC department
5. Corresponding method transfer and comparison documents prepared by QC Vienna
6. 015POL001 - Corporate Change Control Policy
7. European Pharmacopoeia, monograph 2.2.35, Osmolality
8. United States Pharmacopoeia, monograph <785>, Osmolality and Osmolarity

## 3. EQUIPOS Y REACTIVOS

Equipos, reactivos y otros materiales que resaltan **con negrita, cursiva y subrayado**, son estrictamente obligatorios para cada lugar. Otras marcas de equipos, reactivos y materiales ya demostraron y probaron ser válidos. Solamente son sugerencias para su uso y pueden ser sustituidos por un producto de otra marca o proveedor, en caso de que tenga la misma calidad y funcionalidad, cuando el método no se vea afectado por el cambio. En cualquier caso, los cambios deben ser manejados de acuerdo con el 015POL000.

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALITICAS	
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	<b>Determinación da Osmolalidad de acuerdo con Pharm. Eur. and USP</b>
130SOP008/02	Página 5 de 6

### **3.1 Equipos**

- Osmómetro crioscópico con impresora
- Tazas de medición
- Pipetas calibradas
- Puntas de pipeta desechables

### **3.2 Reactivos**

- Soluciones de calibración con osmolalidad que abarcan la osmolalidad de la solución de la muestra
- Muestra de control con osmolalidad dentro de la banda de calibración
- Agua para inyectables, WFI

## **4. PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA**

La calibración de los Instrumentos y medición de la muestra tiene que ser realizada con el respectivo SOP del instrumento o con el manual de instrucciones.

### **4.1 Preparación de la muestra**

Las muestras se miden sin diluir.

### **4.2 Calibración**

En ese caso, el cero del aparato se determina por la medición de la agua para inyectables (WFI) y verificados por la medición de WFI como muestra. A continuación, se realiza la calibración del instrumento mediante una o más soluciones de calibración adecuadas en el rango de hasta 2000 mOsmol/kg. La calibración se comprueba mediante la medición del calibrador o de una muestra de control adecuada. Si la desviación de la calibración verificada es mayor que los límites de calibración predefinidos, entonces la calibración tiene de ser repetida.


### **4.3 Medición de los controles y muestras**

Una vez al día antes de la medición de las muestras y después de cada calibración, una muestra de control tiene que ser medida por lo menos 2 veces. El valor medio ha de ser ingresado en un gráfico de control de la calidad. Todas las muestras deben ser medidas por lo menos 2 veces.

Se introducen 20 µl, 50 µl o 200 µl de volumen de la muestra, (en dependencia de las recomendaciones del manual de instrucciones del osmómetro utilizado), en la célula de medición y se inicia el sistema de enfriamiento.

### **4.4 Evaluación**

El instrumento calcula de forma automática la osmolalidad de las soluciones de medida, y las imprime. Se calculan los valores medios de las mediciones de muestras de control y de las muestras. Los resultados se dan como mosmol/kg.

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALITICAS	
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	<b>Determinación da Osmolalidad de acuerdo con Pharm. Eur. and USP</b>
130SOP008/02	Página 6 de 6

#### **4.5 Criterios de Aceptación de un resultado válido**

- La osmolalidad medida de la muestra de control, tiene que estar dentro de los límites especificados. Si el resultado de la muestra de control no cumple, debe ser realizada una re-calibración del instrumento.
- La osmolalidad de la solución de prueba tiene que estar dentro del rango de calibración.

#### **5. DOCUMENTACIÓN:**

La siguiente información se indica en los datos en bruto, hojas adicionales de evaluación o el LIMS respectivo. La trazabilidad de los resultados tienen que estar garantizada.


- Números de lote y caducidad de los controles y calibradores
- Números de lotes y números de frascos de muestras
- Fecha del análisis
- Nombre del analista y de la persona que revisa
- Valores medios del control y de las medidas de las muestras

#### **6. NOTAS ESPECIALES**

- Medidas de las muestras tienen que ser realizadas en las mismas condiciones que las medidas de calibraciones (mismo volumen, etc.)
- Deben ser evitadas las burbujas de aire en las tazas de medición!
- Las muestras son materiales potencialmente infecciosos. Por lo tanto, cuando se manosean muestras, la manipulación debe ser con guantes.

#### **7 ABREVIATURAS**

EP.....Farmacopea Europea  
USP.....Farmacopea de los Estados Unidos  
QC..... Control de Calidad  
SOP. .... Procedimiento Operativo Estándar  
VAL. .... Validación  
POL ..... Política  
LIMS..... Sistema de Información del Laboratorio

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS			
 Pharmazeutika Produktionsges.m.b.H. Quality Control Department Method Validation Group		<b>Identificación de proteínas humanas por  Inmunoelectroforesis de acuerdo con la Pharm. Eur.</b>	
<b>130SOP025/01</b>	reemplaza: 130SOP025/00	Válido desde:	<b>C</b>

**RAZÓN DE EMISIÓN:** Tiempo de lavado del gel de fijación de 2 - 24 horas,  
condiciones de separación de acuerdo con el fabricante

**ÁREA DE APLICACIÓN:** Departamentos de Control de Calidad del Grupo Octapharma


**AUTOR:** G. Schwarz, 22.06.2006 (Método de Validación)

**REVISIÓN:** ..... (Jefe Internacional de los métodos  
de validación)

**APROBACIÓN:** ..... (Control Corporativo de la  
Calidad)

..... (Aseguramiento de la Calidad  
Corporativa)


**Este Procedimiento Operativo Estándar (SOP), define el encuadramiento general necesario para el tema mencionado. Puede ser traducido a los respectivos idiomas utilizados en las diferentes instalaciones de Octapharma y se complementa con información adicional de acuerdo a las necesidades locales, siempre y cuando no existan discrepancias o conflictos con la información indicada en el interior del SOP-principal. Las diferentes instalaciones de Octapharma serán responsables por la validez de las traducciones e informaciones SOP-principal. Las diferentes instalaciones de Octapharma serán responsables por la validez de las traducciones e informaciones adicionales.**

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 Pharmazeutika Produktionsges.m.b.H. Quality Control Department Method Validation Group	<b>Identificación de las proteínas humanas por Inmunoelectroforesis de acuerdo con la Pharm. Eur.</b>	
<b>130SOP025/01</b>	Página 2 de 7	

### ***HISTORIAL DE REVISIÓN***


Versión	Fecha	Razón de Emisión
130SOP025/01	22.06.2006	Tiempo de lavado del gel de fijación de 2 - 24 horas, condiciones de separación de acuerdo con el fabricante
130SOP025/00	08.11.2005	Definición del estándar corporativo 1 <sup>ra</sup> edición



SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 Pharmazeutika Produktionsges.m.b.H. Quality Control Department Method Validation Group	Identificación de las proteínas humanas por Inmunoelectroforesis de acuerdo con la Pharm. Eur.	
130SOP025/01	Página 3 de 7	

## ***TABLA DE CONTENIDOS***

<b>1</b>	<b>PRINCIPIO DE LA PRUEBA .....</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAS, BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>EQUIPOS Y MATERIALES .....</b>	<b>4</b>
3.1	Equipos .....	4
3.2	Reactivos .....	5
3.3	Soluciones .....	5
3.4	Preparación de la muestra .....	6
3.5	Separación e inmunoprecipitación .....	6
3.5.1	Condiciones de separación .....	6
3.6	Coloración y decoloración .....	6
<b>4</b>	<b>EVALUACIÓN.....</b>	<b>6</b>
4.1	Criterios de aceptación para un resultado de prueba válido.....	6
<b>5</b>	<b>DOCUMENTACIÓN .....</b>	<b>7</b>
<b>6</b>	<b>NOTAS ESPACIALES .....</b>	<b>7</b>
6.1	Volumen mínimo de muestra y de reactivos .....	7
<b>7</b>	<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>7</b>

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 Pharmazeutika Produktionsges.m.b.H. Quality Control Department Method Validation Group	<b>Identificación de las proteínas humanas por Inmunoelectroforesis de acuerdo con la Pharm. Eur.</b>	
130SOP025/01	Página 4 de 7	

## 1 PRINCIPIO DE LA PRUEBA

La Inmunoelectroforesis es una técnica cualitativa que combina la electroforesis en gel seguida por inmunodifusión e inmunoprecipitación (de las proteínas sometidas a electroforesis) con un antisuero poliespecífico en geles de agarosa alcalinos tamponados. La visualización de las bandas de proteínas se realiza mediante la tinción con negro de *amido*. Las bandas de proteínas se comparan con las bandas obtenidas con suero humano como una preparación de referencia.

## 2 REFERENCIAS, BIBLIOGRÁFICAS


1. Corresponding Analytical SOPs of Octapharma subsidiaries in the particular languages
2. Corresponding equipment SOPs of Octapharma subsidiaries in the particular languages
3. Corresponding quality control sheets or database reports of the particular Octapharma subsidiaries
4. Corresponding method validation documents prepared by QC Vienna
5. Corresponding method transfer and comparison documents prepared by QC Vienna
6. 015POL000 - Corporate Change Control Policy
7. European Pharmacopoeia, monograph 07/2005:0255, Human albumin solution
8. European Pharmacopoeia, monograph 01/2005:0918, Human normal immunoglobulin for intravenous administration
9. European Pharmacopoeia, monograph 01/2005:20701, Immunochemical methods
10. USP 28 / NF 23, monograph <726> Electrophoresis

## 3 EQUIPOS Y MATERIALES

Equipos, reactivos y otros materiales que resaltan con ***negrita, cursiva y subrayado***, son estrictamente obligatorios para cada lugar. Otras marcas de equipos, reactivos y materiales que demostraron y probaron ser válidos. Solamente son sugerencias para su uso y pueden ser sustituidos por un producto de otra marca o proveedor, en caso de que tenga la misma calidad y funcionalidad, cuando el método no se vea afectado por el cambio. En cualquier caso, los cambios tienen que ser manejados de acuerdo con el 015POL000.

### 3.1 Equipos

- Cámara de Electroforesis, e.j. TSM 182 (BOSKAMP)
- Fuente de alimentación de la electroforesis, e.j. EPS 3500 (FARMACIA)
- Caja de plástico con tapa
- Recipientes de vidrio
- Pipetas, calibradas
- Pinzas
- Vortex


SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 Pharmazeutika Produktionsges.m.b.H. Quality Control Department Method Validation Group	<b>Identificación de las proteínas humanas por Inmunoelectroforesis de acuerdo con la Pharm. Eur.</b>	
130SOP025/01	Página 5 de 7	

### 3.2 Reactivos

- Kit de prueba para Inmunoelectroforesis, e.j. Hydragel IEP (SEBIA) consta de:
  - Gel de agarosa para inmunoelectroforesis
  - Tampón TRIS-barbital, para la concentración
  - Solución colorante concentrada de *Amidoblack*
- Suero anti-humano integral, prog. en conejo (e.j. SIGMA)
- Suero humano normal de control (e.j. DADE BEHRING)
- Cloruro de sodio p.a. (e.j. MERCK)
- Ácido acético glacial p.a. (e.j. MERCK)
- Agua para uso en laboratorio, WFL

### 3.3 Soluciones

- Solución Tampón TRIS-barbital:  
La solución tampón concentrado se diluye con WLF de acuerdo con las instrucciones del Kit de pruebas.  
Período de validez de 6 meses de +15°C a +25°C
- Solución de tinción *amidoblack*:  
La concentración es diluida con WFL de acuerdo con las instrucciones del Kit de pruebas.  
Período de validez de 6 meses de +15°C a +25°C
- Solución decolorante:  
50 ml de ácido acético glacial se diluyen hasta 1000 ml con WFL.  
Período de validez de 6 meses de +15°C a +25°C
- Solución salina isotónica  
9,00 ± 0,05 g de cloruro sódico se disuelven en 1000 ml de WFL.  
Período de validez de 3 meses de +2°C a +8°C, y de 1 mes de +15°C a +25°C

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 Pharmazeutika Produktionsges.m.b.H. Quality Control Department Method Validation Group	<b>Identificación de las proteínas humanas por Inmunoelectroforesis de acuerdo con la Pharm. Eur.</b>	
130SOP025/01	Página 6 de 7	

## **4 PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA**

### **4.1 Preparación de la muestra**

Las muestras se diluyeron con solución salina isotónica a una concentración final de proteína de 1%.

### **4.2 Separación e inmunoprecipitación**

Los geles de agarosa se preparan como se indica en el folleto del estuche y se aplican la muestra de control (suero humano normal) y las muestras y se inicia la separación.

#### **4.2.1 Condiciones de separación**

Las condiciones de separación tienen que ser fijadas de acuerdo con las instrucciones del fabricante del equipo de electroforesis.

Después de la separación de los geles se transfieren a una cámara húmeda, el anti-suero humano se aplica como se indica en el folleto del estuche y la inmuno-difusión se lleva a cabo durante al menos 18 horas. Después, los geles se lavan con solución salina isotónica durante 2 a 24 horas y con WFL durante al menos 1 hora y se secan.

### **4.3 Coloración y decoloración**


Los geles se tiñeron con solución negro de amido durante unos 2 minutos, son descolorados en 2 o 3 baños de descoloramiento hasta que el fondo pierde el color (alrededor de 2 min. en cada baño) y se secan.

## **5 EVALUACIÓN**

La evaluación se realizará por inspección visual de los inmunoprecipitados y la comparación con el suero de control. El principal componente de la muestra tiene que ser idéntico a la de la respectiva banda de la proteína de la preparación de control. La muestra puede mostrar la presencia de pequeñas cantidades de otras proteínas plasmáticas.

### **5.1 Criterios de aceptación para un resultado de prueba válido**

- El suero de control debe mostrar el patrón de bandas regular del suero humano normal.

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 Pharmazeutika Produktionsges.m.b.H. Quality Control Department Method Validation Group	Identificación de las proteínas humanas por Inmunoelectroforesis de acuerdo con la Pharm. Eur.	
130SOP025/01	Página 7 de 7	

## 6 DOCUMENTACIÓN

La siguiente información debe ser guardada junto con los datos iniciales, hojas adicionales de evaluación o el respectivo LIMS: Se debe asegurar la trazabilidad consistente de los resultados:

- Número de lote y la caducidad de los controles y reactivos
- Número de lote y números de los viales de las muestras
- Fecha del análisis
- Nombre del analista y del que lo realiza

## 7 NOTAS ESPACIALES

- Cuando se manipulan immunofilms y reactivos que contienen azida sódica tienen que ser usados los guantes.
- Las muestras son material potencialmente infeccioso. Por lo tanto, la manipulación de las muestras tiene que realizarse con guantes.


### 7.1 Volúmenes Mínimos de muestra y de reactivos

Se requiere un volumen de muestra de aproximadamente 100 µL.

## 8 ABREVIATURAS

EP; Pharm. Eur. . Farmacopea Europea  
USP..... Farmacopea de los Estados Unidos  
QC..... Control de la Calidad  
SOP..... Procedimiento de operación estándar  
VAL..... Validación  
POL..... Política  
LIMS..... Sistema de Información de Laboratorio



SOP - PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS			
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department		Determinación del pH según la Pharm. Eur. y la USP	
130SOP028/03	Sustituye a: 130SOP028/02	Válido desde:	C

**RAZÓN DE EMISIÓN:** Adición de la dilución de **NewGam 10%**

**ÁREA DE APLICACIÓN:** Departamentos de Control de Calidad del grupo Octapharma


**AUTOR:** **P. Nock, 01.07.2013** (Validación de Método)

**REVISIÓN:** ..... (Jefe Internacional de Validación de los Métodos)

**APROBACIÓN:** ..... (Control Corporativo de la Calidad)

..... (Garantía Corporativo de la Calidad)


**Este Procedimiento Operativo Estándar (SOP) define el encuadramiento general necesario para el tema mencionado. Puede ser traducido a los respectivos idiomas, utilizados en las diferentes instalaciones de Octapharma y se complementa con la información adicional de acuerdo con las necesidades locales, siempre y cuando no existan discrepancias o conflictos con la información indicada en el interior del SOP-principal. Las diferentes instalaciones de Octapharma serán responsables por la validez de las traducciones e informaciones adicionales.**

SOP - PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	Determinación del pH según la Pharm. Eur. y la USP	
	130SOP028/03	Página 2 de 8

### ***HISTORIAL DE REVISIONES***


Versión	Fecha	Motivo de la emisión
130SOP028/03	01. Julio 2013	Adición de la dilución de NewGam 10%
130SOP028/02	01. Julio 2008	Adición de la dilución de Gammanorm y Rhesonativ
130SOP028/01	28. Septiembre 2006	Cambios en los tampones estándar utilizados; Permision a rangos de temperatura establecidos entre 23°C a 25°C para todos los lotes de los EE.UU.; ámbito de aplicación ampliado
130SOP028/00	30. Septiembre 2005	Definición de un estándar corporativo 1 <sup>ra</sup> emisión



SOP - PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	Determinación del pH según la Pharm. Eur. y la USP	
130SOP028/03	Página 3 de 8	

## ***TABLA DE CONTENIDOS***

<b>1</b>	<b>FUNDAMENTO DE LA PRUEBA .....</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>EQUIPOS Y REACTIVOS .....</b>	<b>5</b>
3.1	Equipos .....	5
3.2	Reactivos .....	5
<b>4</b>	<b>SOLUCIONES .....</b>	<b>5</b>
4.1	Solución salina isotónica .....	5
4.2	Solución de cloruro de potasio 3M .....	5
<b>5</b>	<b>PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA .....</b>	<b>6</b>
5.1	Calibración .....	6
5.2	Preparación de las muestras .....	6
5.3	Medición de los controles y las muestras .....	6
<b>6</b>	<b>EVALUACIÓN .....</b>	<b>7</b>
6.1	Criterios de aceptación para un resultado de prueba válido .....	7
<b>7</b>	<b>DOCUMENTACIÓN .....</b>	<b>7</b>
<b>8</b>	<b>NOTAS ESPECIALES .....</b>	<b>8</b>
8.1	Muestra mínima y volúmenes de los reactivos .....	8
<b>9</b>	<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>8</b>

SOP - PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	Determinación del pH según la Pharm. Eur. y la USP	
130SOP028/03	Página 4 de 8	

## 1 FUNDAMENTO DE LA PRUEBA

El pH es un número que representa convencionalmente la concentración de iones de hidrógeno de una solución acuosa. Por razones prácticas, su definición es experimental. El pH de una solución para el análisis está relacionado con el de una solución de referencia (pHs) por la siguiente ecuación:

$$pH = pH_s - \frac{E - E_s}{k}$$

E Potencial de la célula con la solución de la muestra [V]


E<sub>s</sub> Potencial de la célula con la solución de referencia [V]

k Cambio en el potencial por unidad de cambio en el pH [V] (dependiente de la temperatura, a partir de la ecuación de Nernst)

La determinación potenciométrica del pH, se realiza midiendo la diferencia del potencial entre dos electrodos sumergidos, en la solución a analizar. Uno de estos electrodos es un electrodo de vidrio sensible a los iones de hidrógeno y la otra es un electrodo de referencia que contiene la solución de referencia.

## 2 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Corresponding Analytical SOPs of Octapharma subsidiaries in the particular languages
2. Corresponding equipment SOPs of Octapharma subsidiaries in the particular languages
3. Corresponding SOPs of EBEWE Pharma
4. Corresponding quality control sheets or database reports of the particular Octapharma subsidiaries
5. Corresponding method validation documents prepared by QC Vienna
6. Corresponding method transfer and comparison documents prepared by QC Vienna
7. 015POL000 - Corporate Change Control Policy
8. European Pharmacopoeia, monograph 2.2.3, Potentiometric Determination of pH
9. USP / NF, monograph <791>, pH

SOP - PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	Determinación del pH según la Pharm. Eur. y la USP	
130SOP028/03	Página 5 de 8	

### 3 EQUIPOS Y REACTIVOS

Equipos, reactivos y otros materiales resaltados en **negrita, cursiva y subrayado**, son estrictamente obligatorios para cada lugar. Otras marcas de equipos, reactivos y materiales que demostraron y probaron ser válidos. Éstas son solamente sugerencias para su uso y pueden ser sustituidos por un producto de otra marca o proveedor, en caso de que tenga la misma calidad y funcionalidad, cuando el método no se vea afectado por el cambio. En cualquier caso, los cambios tienen que ser manejados de acuerdo con el 015POL000.

#### 3.1 Equipos

- Medidor de pH, por ejemplo, pHM 240/Ion meter (RADIOMETER)
- Electrodo de pH de vidrio combinados (por ejemplo, pHC 3081-8, RADIOMETER)
- Vasos polivalentes de 54 ml, desechables, de poliestireno
- Tubos de ensayo desechables de poliestireno
- Pipetas calibradas

#### 3.2 Reactivos

- Soluciones tampón estándares certificadas internacionalmente, por ejemplo, de acuerdo con IUPAC (RADIOMETER); valores del pH, por ejemplo: 1.679/4.005/6.865/7.413/10.012
- Solución tampón estándar trazable a SRM de NIST y PTB, por ejemplo, el valor del pH: 11.00 (MERCK)
- Solución electrolítica 3 M de KCl AgCl saturada (por ejemplo, WTW)
- Cloruro de potasio p.a. (por ejemplo, MERCK)
- Cloruro de sodio p.a. (por ejemplo, MERCK)
- Agua para uso en laboratorio, WFL (OCTAPHARMA)


### 4 SOLUCIONES

#### 4.1 Solución salina isotónica

Se disuelven  $9.00 \pm 0.05$  g de cloruro de sodio en 1000 ml de WFL. Período de validez: 3 meses entre +2°C y +8°C; 1 mes entre +15°C y +25°C.

#### 4.2 Solución de cloruro de potasio 3M

Se disuelven  $111.8 \pm 0.1$  g de cloruro de potasio en 500 ml de WFL. Período de validez: 3 meses entre +15°C y +25°C.

SOP - PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	Determinación del pH según la Pharm. Eur. y la USP	
	130SOP028/03	Página 6 de 8

## 5 PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

### 5.1 Calibración

Dependiendo del instrumento utilizado, el medidor de pH debe calibrarse en intervalos regulares (al menos una vez al día, preferiblemente cada 4 horas). Después de cada calibración se mide el pH intermedio con un tampón de control, para comprobar la calibración. En el siguiente cuadro se muestra un ejemplo de tampones de calibración y tampones de control con diferentes rangos de pH. Los métodos 2 y 3, que se enumeran a continuación están de acuerdo con la USP y la Farmacopea Europea.

Método	Rango (pH)	Tampón 1 (pH)	Tampón 2 (pH)	Tampón de Control (pH)	Temperatura Rango
1	1.68 – 6.87	6.865	1.679	4.005	23° - 25°C
2	4.00 – 7.41	7.413	4.005	6.865	23° - 25°C
3	7.41 – 11.00	11.00	7.413	10.012	23° - 25°C


### 5.2 Preparación de las muestras

Las muestras de Octagam, Albúmina FC, [NewGam 10%](#), Gammanorm y Rhesonativ se diluyen con solución salina isotónica a una concentración de proteína del 1%. Todas las otras muestras se miden sin diluir.

### 5.3 Medición de los controles y las muestras

Al comienzo de cada serie de mediciones, el valor del pH se mide con un tampón de control adecuado (ver sección 4.2) y el resultado se incluye en un gráfico de control de calidad. Si el resultado se encuentra dentro de los límites especificados, se pueden medir las muestras.

Los métodos tienen que ser seleccionados de acuerdo a los valores del pH esperado.

SOP - PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	Determinación del pH según la Pharm. Eur. y la USP	
130SOP028/03	Página 7 de 8	

## 6 EVALUACIÓN

Los valores del pH de los controles y las muestras se calculan de forma automática por el instrumento y se imprimen. Los resultados de las mediciones de control de los tampones deben incluirse en los respectivos cuadros de control de calidad.


### 6.1 Criterios de aceptación para un resultado de prueba válido

- La última calibración de los métodos utilizados deben realizarse como máximo 4 horas antes de las mediciones.
- Los valores del pH de los tampones de control, no deben diferir en más de 0.05 unidades de valor del pH que corresponde a las soluciones. Los valores encontrados para los tampones de control tienen que ser incluidos en los gráficos de control de calidad.
- Las temperaturas de las muestras deben estar dentro del rango de temperatura permitido.

## 7 DOCUMENTACIÓN

La siguiente información se indica en los datos en bruto, en las hojas de evaluación adicionales o en los LIMS respectivos. Se debe garantizar una trazabilidad consistente de los resultados.

- Números de los lotes, números de los viales, vencimiento del tampón de control y los calibradores
- Números de los lotes y números de los viales de muestras
- Fecha del análisis
- Nombre del analista y del revisor
- Valores medios de las medidas de control y de las muestras
- Temperaturas de los controles y de las muestras durante la medición

SOP - PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	<b>Determinación del pH según la Pharm. Eur. y la USP</b>	
<b>130SOP028/03</b>	Página 8 de 8	

## 8 NOTAS ESPECIALES


- Muestras/ lotes de EE.UU. debe ser analizados con un método que se ajuste a la USP!
- Si el cumplimiento de la USP no es necesario, el rango de temperatura permitido para la medición se puede extender de +20 a +25°C.
- ¡No utilice los envases originales de las soluciones tampón para las mediciones!
- Las alícuotas de los tampones utilizados como controles o calibradores tienen que cambiarse todos los días.
- El electrodo de vidrio del pH se almacena en 3M de KCl, si no está en uso.
- Las muestras son materiales potencialmente infecciosos. Por lo tanto, deben manipularse con guantes.

### 8.1 Muestra mínima y volúmenes de los reactivos

El volumen mínimo de la muestra para la medición del pH es de aproximadamente 1 ml.

## 9 ABREVIATURAS

EP ..... Farmacopea Europea  
 USP ..... Farmacopea de los Estados Unidos  
 QC ..... Control de Calidad  
 SOP ..... Procedimiento Operativo Estándar  
 VAL ..... Validación  
 POL ..... Política  
 LIMS ..... Sistema de Información de Laboratorio  
 V ..... Volt  
 SRM ..... Material de referencia estándar  
 PTB ..... Physikalisch – Technische Bundesanstalt  
 NIST ..... Instituto Nacional de Estándares y Tecnología  
 IUPAC ..... Unión Internacional de Química Pura y Aplicada

SOP - PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS			
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department		<b>Determinación de sodio y potasio por Espectrometría de Emisión Atómica</b>	
<b>130SOP029/03</b>	Sustituye a: 130SOP029/02	Válido desde:	<b>C</b>

**RAZÓN DE EMISIÓN:** Criterios adicionales de adecuación del sistema debido a una solicitud de la FDA.  
Supresión del dispositivo ELEX y determinación de Ca por AES en este SOP

**ÁREA DE APLICACIÓN:** Departamentos de Control de Calidad del grupo Octapharma


**AUTOR:** C. Haderer, 14.10.2013 (Validación del Método)

**REVISIÓN:** ..... (Jefe Internacional de la Validación de los Métodos de)

**APROBACIÓN:** ..... (Control Corporativo de la Calidad)

..... (Garantía Corporativo de la Calidad)


**Este Procedimiento Operativo Estándar (SOP) define el encuadramiento general necesario para el tema mencionado. Puede ser traducido a los respectivos idiomas, utilizados en las diferentes instalaciones de Octapharma y se complementa con la información adicional de acuerdo con las necesidades locales, siempre y cuando no existan discrepancias o conflictos con la información indicada en el interior del SOP-principal. Las diferentes instalaciones de Octapharma serán responsables por la validez de las traducciones e informaciones adicionales.**

SOP - PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	Determinación de sodio y potasio por Espectrometría de Emisión Atómica	
	130SOP029/03	Página 2 de 9

### **HISTORIAL DE REVISIONES**


Versión	Fecha	Motivo de la emisión
130SOP029/03	14.10.2013	Criterios adicionales de adecuación del sistema debido a una solicitud de la FDA. Supresión del dispositivo ELEX y determinación de Ca <sup>2+</sup>
	30.01.2009	Actualización después de realizar los estudios adicionales de validación. Control adicional de la calibración y del método de varianza. Cambio en la nomenclatura de las soluciones de calibración. Revisión general; validez ampliada para el producto NewGam
130SOP029/01	09.07.2008	Revisión general. Inclusión de los productos: Gammanorm <sup>®</sup> , Rhesonativ <sup>®</sup> y Human-cl rhFVIII
130SOP029/00	30.09.2005	Definición de un estándar a nivel corporativo Adaptación del diseño al actual SOP principal
130DTM029/02	13.06.2002	Inclusión de OCTAGAM <sup>®</sup>
000DTM029/01	31.07.1999	Inclusión de los concentrados de FVIII y FIX
000DTM029/00	15.12.1998	1 <sup>ra</sup> emisión Válido para la Albúmina humana



SOP - PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	Determinación de sodio y potasio por Espectrometría de Emisión Atómica	
	130SOP029/03	Página 3 de 9

## ***TABLA DE CONTENIDOS***

<b>1</b>	<b>FUNDAMENTO DE LA PRUEBA .....</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>EQUIPOS Y REACTIVOS .....</b>	<b>5</b>
3.1	Equipos .....	5
3.2	Reactivos .....	5
<b>4</b>	<b>SOLUCIONES .....</b>	<b>6</b>
4.1	Estándar interno que contiene Litio o Cesio (Solución de trabajo) .....	6
4.2	Estándares de calibración .....	6
4.3	Muestra de Control .....	6
<b>5</b>	<b>PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA .....</b>	<b>7</b>
5.1	Preparación de la muestra .....	7
5.2	Medición .....	7
5.2.1	Calibración .....	7
5.2.2	Verificación de la calibración .....	7
5.2.3	Análisis de las muestras .....	7
<b>6</b>	<b>EVALUACIÓN .....</b>	<b>8</b>
6.1	Criterios de aceptación de un resultado de prueba válido .....	8
<b>7</b>	<b>DOCUMENTACIÓN .....</b>	<b>8</b>
<b>8</b>	<b>NOTAS ESPECIALES .....</b>	<b>8</b>
<b>9</b>	<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>9</b>


SOP - PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	Determinación de sodio y potasio por Espectrometría de Emisión Atómica	
130SOP029/03	Página 4 de 9	

## 1 FUNDAMENTO DE LA PRUEBA

La emisión atómica es un proceso que ocurre cuando la radiación electromagnética es emitida por los átomos o iones excitados. En la espectrometría de emisión atómica la muestra es sometida a temperaturas lo suficientemente altas como para causar la disociación, no sólo en átomos, sino también para hacer que se realicen grandes cantidades de excitación colisional e ionización de los átomos de la muestra. Una vez que los átomos e iones se encuentren en estados de excitación, ellos pueden caer a estados más bajos a través de transiciones de energía térmica o radiactiva y emitir radiación electromagnética. Cada átomo tiene asociado un discreto conjunto de niveles de energía, por tanto, los átomos excitados emiten un conjunto de líneas de emisión características. La intensidad de esta radiación emitida es directamente proporcional al número de átomos en el proceso de transición, por lo tanto, es posible realizar la determinación cuantitativa de los elementos, en comparación con las soluciones de referencia con concentraciones conocidas del elemento en cuestión. Para la determinación de sodio y potasio, se utilizan las líneas de emisión a 589 nm (Na), 767 nm y 776 (K). Para compensar las fluctuaciones en la señal de medición causadas por cambios aleatorios en la temperatura de la llama, varias interferencias químicas en las tasas de aspiración, se añade un estándar interno como el cesio o el litio en una cantidad constante, a las muestras y patrones. La calibración del espectrómetro de emisión atómica se realiza mediante calibración directa.

## 2 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Corresponding analytical SOPs of Octapharma subsidiaries in the particular languages
2. Corresponding equipment SOPs of Octapharma subsidiaries in the particular languages
3. Corresponding quality control sheets or database reports of the particular Octapharma subsidiaries
4. Corresponding method validation documents prepared by any QC
5. Corresponding method transfer and comparison documents prepared by QC Vienna
6. 015POL000 - Corporate Change Control Policy
7. European Pharmacopoeia, monograph 2.2.22, Atomic Emission Spectrometry (Method I, Direct Calibration)

SOP - PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	Determinación de sodio y potasio por Espectrometría de Emisión Atómica	
130SOP029/03	Página 5 de 9	

### 3 EQUIPOS Y REACTIVOS


Equipos, reactivos y otros materiales resaltados en **negrita, cursiva y subrayado**, son estrictamente obligatorios para cada lugar. Otras marcas de equipos, reactivos y materiales que demostraron y probaron ser válidos. Éstas son solamente sugerencias para su uso y pueden ser sustituidos por un producto de otra marca o proveedor, en caso de que tenga la misma calidad y funcionalidad y el método no se vea afectado por el cambio. En cualquier caso, los cambios tienen que ser manejados de acuerdo con el 015POL000.

#### 3.1 Equipos

- Espectrometro de emisión atómica con llama de acetileno/aire comprimido (por ejemplo, Eppendorf EFOX 5053) o con llama de propano/comprimido IL 943 o Sherwood 420)
- Viales de muestras
- Matraces aforados
- Diluidor
- Pipetas y puntas apropiadas para las diluciones de las muestras
- Tubos de ensayos de poliestireno desechables

#### 3.2 Reactivos

- Diluyente de litio o cesio/estándar interno-solución madre
- Estándar de calibración adecuado disponible en el mercado en función del instrumento utilizado
- Cloruro de sodio p.a.
- Cloruro de potasio p.a.
- Acetileno o propano, purificado
- Aire comprimido
- Agua para uso en laboratorio, WFL

SOP - PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	Determinación de sodio y potasio por Espectrometría de Emisión Atómica	
130SOP029/03	Página 6 de 9	

## 4 SOLUCIONES

### 4.1 Estándar interno que contiene Litio o Cesio (Solución de trabajo)

Preparado de acuerdo con las instrucciones de los respectivos equipos o adquirido del fabricante del instrumento.

### 4.2 Estándares de calibración

Se utilizan para la calibración los estándares adquiridos que contienen la cantidad prescrita de sodio y potasio.


Ejemplos de estándares de calibración:

- Estándares de múltiples elementos para el Fotómetro de Llama; no. 156100 (Sherwood)
- Estándar de Calibración 140/5; no. 0009751750 (IL)
- Solución stock estándar de suero; no. 0030 310.004 (Eppendorf)

Para obtener una información detallada, consulte los respectivos manuales e informes de validación. El estándar interno se utiliza como solución en blanco.

### 4.3 Muestra de Control

Debe ser analizada una muestra de control adecuada en cada ocasión para verificar el funcionamiento del instrumento.

SOP - PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	Determinación de sodio y potasio por Espectrometría de Emisión Atómica	
130SOP029/03	Página 7 de 9	

## 5 PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

### 5.1 Preparación de la muestra

Todas las soluciones y materiales tienen que estar a temperatura ambiente antes de usarlos. Si es necesario, las muestras son pre-diluidas con WFL a concentraciones de Na y K en el rango válido del instrumento respectivo. La dilución final con el estándar interno se realiza de forma manual o con el instrumento, según el fotómetro de llama respectivo.

Las muestras y los controles se miden por triplicado.

### 5.2 Medición

Todas las soluciones se introducen en la llama hasta que se observa una lectura constante.

#### 5.2.1 Calibración

La calibración se realiza de acuerdo con las instrucciones del instrumento respectivo.

Durante una serie de mediciones, la calibración tiene que ser repetida después de 20 minutos.


#### 5.2.2 Verificación de la calibración

Después de cada calibración, se verifica la curva de calibración mediante la medición de las muestras de control.

Para comprobar la ausencia de desviaciones, el calibrador tiene que ser medido, también, al final de cada secuencia.

#### 5.2.3 Análisis de las muestras

Las muestras y los controles se diluyen con estándar internos de Li o Cs, ya sea manualmente o mediante el uso de un dispositivo de dilución automática. Se miden al menos tres diluciones por separado.

SOP - PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	Determinación de sodio y potasio por Espectrometría de Emisión Atómica	
130SOP029/03	Página 8 de 9	

## 6 EVALUACIÓN

El resultado de cada medición es impreso en el instrumento y el valor medio se calcula considerando 3 determinaciones.

### 6.1 Criterios de aceptación de un resultado de prueba válido

- Los resultados de las muestras de control respectivas tienen que estar dentro del rango especificado, **para el sodio  $\pm 3\%$  del contenido fijado.**
- El resultado de calibrador medido al final de cada secuencia tiene que estar dentro de  $\pm 2$  mmol de  $\text{Na}^+$  /L **del contenido de sodio fijado.**
- La variación en el conjunto de tres determinaciones de cada muestra no debe exceder la variación del método establecido para cada producto.


## 7 DOCUMENTACIÓN

La siguiente información se indica junto con los datos en bruto, las hojas de evaluación adicionales o con los LIMS respectivos. Se debe garantizar una trazabilidad consistente de los resultados.

- Portada con un resumen que contiene los resultados de toda la secuencia
- Un número de secuencia
- Fecha del análisis
- Nombre del analista
- Números de los lotes y caducidad de los reactivos y controles
- Identificación de la muestra
- Los resultados promedio de las muestras y los controles


## 8 NOTAS ESPECIALES

Si las concentraciones medidas en las diluciones de la muestra se encuentran fuera del rango de medición, tiene que prepararse una pre-dilución adecuada con WFL.

SOP - PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	Determinación de sodio y potasio por Espectrometría de Emisión Atómica	
130SOP029/03	Página 9 de 9	

## 9 ABREVIATURAS

E.P., Ph. Eur. .... Farmacopea Europea  
LIMS..... Sistema de Información de Laboratorio  
POL..... Política  
QC..... Control de Calidad  
RSD ..... Desviación Estándar Relativa  
SOP..... Procedimiento Operativo Estándar  
VAL..... Validación

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS			
 For the safe and optimal use of human proteins Departamento Corporativo de Control de Calidad		<b>Determinación del Heme en la Albúmina Humana de acuerdo a la Farmacopea Europea y la Farmacopea Americana (USP)</b>	
<b>130SOP033/01</b>	sustituye: 130SOP033/00	Válido desde:	<b>C</b>

**RAZÓN de EMISIÓN:** Adición de cloruro de sodio como líquido de compensación

**ÁREA de APLICACIÓN:** Departamentos de Control de Calidad del grupo Octapharma

**AUTOR:** E. Gammelgård,  
01.07.2008 (Método de Validación)


**REVISIÓN:** ..... (Jefe Internacional del Método de Validación)

**APROBACIÓN:** ..... (Control Corporativo de Calidad)

..... (Aseguramiento Corporativo de Calidad)


Este Procedimiento Operativo Estándar (SOP) define el encuadramiento general necesario para el tema mencionado. Puede ser traducido a los respectivos idiomas, utilizados en las diferentes instalaciones de Octapharma y se complementa con la información adicional de acuerdo a las necesidades locales, siempre y cuando no existan discrepancias o conflictos con la información indicada en el interior del SOP-principal. Las diferentes instalaciones de Octapharma serán responsables por la validez de las traducciones e informaciones adicionales.



SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Departamento Corporativo de Control de Calidad	<b>Determinación del Heme en la Albúmina Humana de acuerdo a la Farmacopea Europea (Ph.Eur.) y la Farmacopea Americana (USP)</b>	
	<b>130SOP033/01</b>	Página 2 de 7


### ***HISTORIAL DE REVISIÓN***

<b>Versión</b>	<b>Fecha</b>	<b>Razón de emisión</b>
130SOP033/01	01.07.2008	Adición de cloruro de sodio como líquido de compensación
130SOP033/00	08.11.2005	Definición de un estándar corporativo 1 <sup>ra</sup> edición

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Departamento Corporativo de Control de Calidad	Determinación del Heme en la Albúmina Humana de acuerdo a la Farmacopea Europea (Ph.Eur.) y la Farmacopea Americana (USP)	
130SOP033/01	Página 3 de 7	

## ***TABLA DE CONTENIDOS***

<b>1</b>	<b>FUNDAMENTO DE LA PRUEBA .....</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>EQUIPAMIENTOS Y REACTIVOS .....</b>	<b>5</b>
3.1	Equipamientos.....	5
3.2	Reactivos.....	5
<b>4</b>	<b>SOLUCIONES.....</b>	<b>5</b>
4.1	Solución salina isotónica.....	5
<b>5</b>	<b>PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA .....</b>	<b>6</b>
5.1	Preparación de la muestra .....	6
5.2	Mediciones de control y muestras.....	6
<b>6</b>	<b>EVALUACIÓN.....</b>	<b>6</b>
6.1	Criterio de Aceptación para una prueba válida.....	6
<b>7</b>	<b>DOCUMENTACIÓN.....</b>	<b>6</b>
<b>8</b>	<b>NOTAS ESPECIALES.....</b>	<b>7</b>
8.1	Muestra mínima y volúmenes de reactivos.....	7
<b>9</b>	<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>7</b>


SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Departamento Corporativo de Control de Calidad	<b>Determinación del Heme en la Albúmina Humana de acuerdo a la Farmacopea Europea (Ph.Eur.) y la Farmacopea Americana (USP)</b>	
	130SOP033/01	Página 4 de 7

## **1 FUNDAMENTO DE LA PRUEBA**

Medición de la absorbancia de una solución, diluida hasta un contenido proteico de 1%, en una longitud de onda de 403 nm usando agua R o solución de cloruro de sodio al 0.9% como líquido de compensación.

## **2 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Corresponding Analytical SOPs of Octapharma subsidiaries in the particular languages
2. Corresponding equipment SOPs of Octapharma subsidiaries in the particular languages
3. Corresponding quality control sheets or database reports of the particular Octapharma subsidiaries
4. Corresponding method validation documents prepared by QC Vienna
5. Corresponding method transfer and comparison documents prepared by QC Vienna
6. 015POL000 - Corporate Change Control Policy
7. European Pharmacopoeia, monograph 07/2005:0255, Human Albumin Solution
8. European Pharmacopoeia, monograph 01/2005:20225, Absorption spectrophotometry, ultraviolet and visible
9. USP 28 / NF 23, monograph "Albumin Human"

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Departamento Corporativo de Control de Calidad	Determinación del Heme en la Albúmina Humana de acuerdo a la Farmacopea Europea (Ph.Eur.) y la Farmacopea Americana (USP)	
130SOP033/01	Página 5 de 7	

### 3 EQUIPAMIENTOS Y REACTIVOS

Equipamientos, reactivos y otros materiales se resaltan **con negrita, cursiva y subrayado**, siendo estrictamente obligatorio para cada lugar. Otras marcas de equipos, reactivos y materiales demostraron y probaron ser válidos. Solamente fueron sugeridos para el uso y pudieron ser sustituidos por un producto de otra marca o proveedor, en caso de presentar la misma calidad y funcionalidad y el método no se afectó por el cambio. En cualquier caso, los cambios deben ser manejados de acuerdo con el 015POL000.

#### Equipamientos

- Espectrofotómetro de doble haz
- Pipetas calibradas
- Tubos de ensayo de poliestireno desechables
- Cubetas de poliestireno desechables, de medio micro, 1 cm
- Vórtice


#### 3.1 Reactivos

- Cloruro de Sodio p.a. (por ejemplo MERCK)
- Agua para uso en laboratorio, WFL
- Solución de controle albúmina *in-house*, control de las muestras para la determinación del grupo Heme

### 4 SOLUCIONES

#### 4.1 Solución salina isotónica

9.00 ± 0.05 g de cloruro de sodio se disolvieron en 1000 ml de agua para inyección (WFL).  
Período de validez: 3 meses de +2°C a +8°C; 1 mes de +20°C a +25°C.

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Departamento Corporativo de Control de Calidad	<b>Determinación del Heme en la Albúmina Humana de acuerdo a la Farmacopea Europea (Ph.Eur.) y la Farmacopea Americana (USP)</b>	
130SOP033/01	Página 6 de 7	

## 5 PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

### 5.1 Preparación de la muestra

Las muestras y la muestra de control se diluyeron con solución salina isotónica a una concentración final de proteína del 1%. Todas las muestras y la muestra de control fueron diluidas 2 veces.

### 5.2 Mediciones de control y muestras

Al comienzo de una serie de pruebas, ha de medirse una muestra de control en doble determinación.

Las absorbancias de la muestras de control y las muestras con una longitud de onda de 403 nm fueron determinadas usando agua R o cloruro de sodio 0.9% como líquido de compensación.

## 6 EVALUACIÓN

Las absorbancias de control y las muestras fueron imprimidas y se calcularon los valores medios de las dobles determinaciones. El valor medio de la medición de la muestra de control se introdujo en un gráfico de control de calidad. La absorbancia máxima permitida para las muestras es de 0.15, de acuerdo a la Ph. Eur. y de 0.25 según la USP.


### 6.1 Criterio de Aceptación para una prueba válida

- La absorbancia media de la muestra de control debe estar dentro de los límites especificados.

## 7 DOCUMENTACIÓN

La siguiente información se indica en los datos primarios, hojas adicionales de evaluación o el LIMS respectivo. La trazabilidad de los resultados debe garantizar:

- Número de lotes y caducidad de controles y reactivos.
- Número de lotes y número de viales de muestras.
- Fecha de análisis.
- Nombre del analista y del revisor.
- Valores medios de control y mediciones de la muestra.

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Departamento Corporativo de Control de Calidad	<b>Determinación del Heme en la Albúmina Humana de acuerdo a la Farmacopea Europea (Ph.Eur.) y la Farmacopea Americana (USP)</b>	
130SOP033/01	Página 7 de 7	

## 8 NOTAS ESPECIALES


- Las muestras son materiales potencialmente infecciosos. Por lo tanto, cuando se manipulan las muestras deben utilizarse guantes.

### 8.1 Muestra mínima y volúmenes de reactivos

Un volumen de muestra de al menos 500µL fue requerido para la doble determinación, utilizando semi-micro cubetas.

## 9 ABREVIATURAS

EP; Ph. Eur. .... Farmacopea Europea  
USP..... Farmacopea de los Estados Unidos  
QC..... Control de Calidad  
SOP..... Procedimiento Operativo Estándar  
VAL..... Validación  
POL..... Política  
LIMS..... Sistema de Información de Laboratorio

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS			
 For the safe and optimal use of human proteins Departamento Corporativo de Control de Calidad		<b>Determinación de la Distribución del Tamaño Molecular en la Albúmina Humana por HPLC de acuerdo con Farmacopea Europea (EP)</b>	
<b>130SOP038/03</b>	sustituye: 130SOP038/02	Válido desde:	<b>C</b>

**RAZÓN DE EMISIÓN:** -Procedimiento obligatorio de preparación de muestras de la Fracción V

**ÁREA DE APLICACIÓN:** Departamentos de Control de Calidad del grupo Octapharma


**AUTOR:** D. Krause, 02. Feb. 2009 (Método de Validación)

**REVISIÓN:** ..... (Jefe Internacional del Método de Validación)

**APROBACIÓN:** ..... (Control Corporativo de Calidad)

..... (Aseguramiento Corporativo de Calidad)


**Este Procedimiento Operativo Estándar (SOP) define el encuadramiento general necesario para el tema mencionado. Puede ser traducido a los respectivos idiomas, utilizados en las diferentes instalaciones de Octapharma y se complementa con la información adicional de acuerdo a las necesidades locales, siempre y cuando no existan discrepancias o conflictos con la información indicada en el interior del SOP-principal. Las diferentes instalaciones de Octapharma serán responsables por la validez de las traducciones e informaciones adicionales.**

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Departamento Corporativo de Control de Calidad	<b>Determinación de la Distribución del Tamaño Molecular en la Albúmina Humana por HPLC de acuerdo con Farmacopea Europea (EP)</b>	
	130SOP038/03	Página 2 de 11

### **HISTORIAL DE REVISIÓN**


Versión	Fecha	Razón de emisión
000DTM038/00	19.02.1999	1 <sup>ra</sup> edición
000DTM038/01	06.09.2002	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>no hay cambio</b> en el método analítico</li> <li>• cambio de equipamiento y software de evaluación</li> <li>• adición de “acuerdo a la Ph. Eur.” en el título;</li> <li>• actualización de la edición de la Ph. Eur.</li> <li>• corrección de errores de escritura</li> </ul>
130SOP038/00	08.11.2005	Definición de un estándar a nivel corporativo;
130SOP038/01	03.03.2008	<ul style="list-style-type: none"> <li>• actualización después de la revalidación</li> <li>• Cambios en el sistema de adecuabilidad del sistema: nuevo criterio de aceptación</li> <li>• nuevo diseño: adición de la sección 4 -soluciones</li> <li>• adición de la muestra de control</li> <li>• adición de la “muestra en blanco”</li> <li>• reescritura de la sección 6.2</li> </ul>
130SOP038/02	27.06.2008	<ul style="list-style-type: none"> <li>• descripción más detallada de evaluación de la muestra (sección 6.2)</li> <li>• supresión de la 2<sup>da</sup> columna (gel TSK G3000 SW)</li> </ul>
130SOP038/03	02.02.2009	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Procedimiento obligatorio de preparación de muestras de la Fracción V</li> </ul>



SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Departamento Corporativo de Control de Calidad	Determinación de la Distribución del Tamaño Molecular en la Albúmina Humana por HPLC de acuerdo con Farmacopea Europea (EP)	
130SOP038/03	Página 3 de 11	

## **TABLA DE CONTENIDOS**

<b>1</b>	<b>FUNDAMENTO DE LA PRUEBA .....</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>EQUIPAMIENTOS Y REACTIVOS .....</b>	<b>5</b>
3.1	Equipamientos.....	5
3.2	Reactivos.....	6
<b>4</b>	<b>SOLUCIONES.....</b>	<b>6</b>
4.1	Eluyente .....	6
4.2	Solución de cloruro de sodio, 0.9% (solución salina al 0.9%).....	6
4.3	Filtración en gel estándar .....	6
4.4	Solución para el volumen de vacío, por ejemplo, solución de azul de dextrano.....	6
<b>5</b>	<b>PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA .....</b>	<b>7</b>
5.1	Preparación de muestras de albúmina humana y de muestras de control .....	7
5.2	Preparación de muestras de la Fracción V .....	7
5.3	Preparación de HPLC y separación de la Columna .....	7
5.4	Prueba de adecuabilidad del sistema.....	7
5.5	Rendimiento del ensayo .....	7
5.6	Parámetros cromatográficos.....	8
<b>6</b>	<b>EVALUACIÓN.....</b>	<b>ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.</b>
6.1	Criterio de aceptación para una prueba válida .....	8
6.1.1	Prueba de adecuabilidad del sistema.....	8
6.2	Muestras .....	8
6.3	Ejemplos de Cromatogramas .....	9
6.3.1	Muestra del producto final de la Albúmina Humana .....	9
6.3.2	Muestra de Albúmina Humana (subrayado) .....	10
<b>7</b>	<b>DOCUMENTACIÓN .....</b>	<b>11</b>
<b>8</b>	<b>NOTAS ESPECIALES .....</b>	<b>11</b>
8.1	Límite de Cuantificación.....	11
8.2	Volumen de la Muestra .....	11
<b>9</b>	<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>11</b>


SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Departamento Corporativo de Control de Calidad	<b>Determinación de la Distribución del Tamaño Molecular en la Albúmina Humana por HPLC de acuerdo con Farmacopea Europea (EP)</b>	
130SOP038/03	Página 4 de 11	

## **1 FUNDAMENTO DE LA PRUEBA**

La distribución del tamaño molecular fue determinada por medio de la cromatografía líquida, de acuerdo con el principio de la cromatografía por exclusión por tamaño. La separación de las muestras se correspondía con el tamaño molecular de sus componentes. Los polímeros y agregados se eluyen antes de los oligómeros, monómeros y productos catabólicos o fragmentos. La detección por UV se realizó a 280 nm.

## **2 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Corresponding analytical SOPs of Octapharma subsidiaries in the particular languages
2. Corresponding equipment SOPs of Octapharma subsidiaries in the particular languages
3. Corresponding quality control sheets or database reports of the particular Octapharma subsidiaries
4. Corresponding method validation reports to referring samples prepared by Octapharma Vienna
5. Corresponding method transfer and comparison documents prepared by QC Vienna
6. European Pharmacopoeia, monograph 0255: Human albúmina soluciones
7. European Pharmacopoeia, general chapters, methods of analysis 2.2.29: Liquid Chromatography
8. European Pharmacopoeia, general chapters, methods of analysis 2.2.46: Chromatographic separation techniques
9. United States Pharmacopoeia, general chapters, <621> Chromatography
10. United States Pharmacopoeia, Official Monographs, Albúmina Human
11. 015POL000 - Corporate Change Control Policy


SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS	
 For the safe and optimal use of human proteins Departamento Corporativo de Control de Calidad	<b>Determinación de la Distribución del Tamaño Molecular en la Albúmina Humana por HPLC de acuerdo con Farmacopea Europea (EP)</b>
130SOP038/03	Página 5 de 11

### 3 EQUIPAMIENTOS Y REACTIVOS

Equipamientos, reactivos y otros materiales se resaltan **con negrita, cursiva y subrayado**, siendo estrictamente obligatorio para cada lugar. Otras marcas de equipos, reactivos y materiales demostraron y probaron ser válidos. Solamente fueron sugeridos para el uso y pudieron ser sustituidos por un producto de otra marca o proveedor, en caso de presentar la misma calidad y funcionalidad y el método no se afectó por el cambio. En cualquier caso, los cambios deben ser manejados de acuerdo con el 015POL000.

#### 3.1 Equipamientos

- Sistema-HPLC constituido por  
Bomba, **detector-UV**, automuesteador, PC con software de evaluación
- Tamaño de las columnas de cromatografía de exclusión (*TOSOH BIOSCIENCE*)  
**Gel TSK G3000 SW<sub>XL</sub>, 7.8 mm de ID x 30 cm, tamaño de la partícula: 5  $\mu$ m**, más pre-columna
- Pipetas de pistón y puntas
- Dispensador con *combitips*
- Viales Autosampler con tapas
- Unidades de filtros desechables, tamaño del poro: 0.2  $\mu$ m
- Mezclador del vibración
- Agitador
- Tubos de ensayos desechables
- Material de vidrio, por ejemplo, matraces aforados
- Balanza analítica
- Precisión del balance
- La unidad de filtración de membrana consta de:  
Filtro de membrana, discos de filtros de acetato de celulosa (tamaño del poro:  $\leq 0.45 \mu$ m) y bomba de vacío
- Agitador magnético
- Aguja de inyección estériles
- Jeringas desechables, de 2 mL

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Departamento Corporativo de Control de Calidad	<b>Determinación de la Distribución del Tamaño Molecular en la Albúmina Humana por HPLC de acuerdo con Farmacopea Europea (EP)</b>	
130SOP038/03	Página 6 de 11	

### 3.2 Reactivos

- El gel de filtración estándar (BIO-RAD) contiene:

Tiroglobulina,	MW 670 000	5.0 mg
Globulina-Bovina $\gamma$ ,	MW 158 000	5.0 mg
Ovoalbúmina, de pollo	MW 44 000	5.0 mg
Mioglobulina Equina,	MW 17 000	2.5 mg
Vitamina B <sub>12</sub> ,	MW 1 350	0.5 mg
- Marcador del peso molecular, MW > 670 000, por ejemplo, Azul de Dextrano usado para la determinación del volumen de vacío
- Hidrogeno fosfato di-sodio dihidratado, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, p.A.
- Di-hidrogeno fosfato de sodio monohidratado, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, p.A.
- Cloruro de Sodio, NaCl p.A.
- Azida de sodio, NaN<sub>3</sub> como preservante
- Agua para uso en laboratorio, WFL
- Muestra de control adecuada, por ejemplo, Albúmina Humana (OCTAPHARMA)

## 4 SOLUCIONES

### 4.1 Eluyente

4.87 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 1.74 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O y 11.69 g de NaCl se disolvieron en 1000 mL de WFL. 50 mg de NaN<sub>3</sub> fueron añadidos para la preservación. El tampón de elución fue filtrado a través de un poro de tamaño  $\leq 0.45 \mu\text{m}$  y fue desgasificado antes de su uso.

Estabilidad: 1 mes de +2°C a +8°C si el NaN<sub>3</sub> se añade como preservante.

### 4.2 Solución de cloruro de Sodio, 0.9% (solución salina al 0.9 %)


9.0 g de cloruro de sodio se disolvieron en 1000 mL de WFL.

### 4.3 Filtración en gel estándar

Varios viales de gel de Filtración estándar fueron disueltos cada uno en 1000  $\mu\text{L}$  de WFL, se agruparon y diluyeron 1 + 1 con solución salina al 0.9 %. La solución fue filtrada a través de un filtro de 0.2  $\mu\text{m}$ , repartidos en viales del automuestreador (100  $\mu\text{L}$ ) y se congelaron a -20 °C.

### 4.4 Solución para el volumen de vacío, por ejemplo, solución de azul de dextrano

20 mg de azul de dextrano fueron disueltos en 100 mL de solución salina al 0.9 % a 37 °C durante 10 min, se homogeneizó y filtró a través de un filtro de 0.2  $\mu\text{m}$ , dando una concentración de 0.2 mg/mL

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Departamento Corporativo de Control de Calidad	<b>Determinación de la Distribución del Tamaño Molecular en la Albúmina Humana por HPLC de acuerdo con Farmacopea Europea (EP)</b>	
130SOP038/03	Página 7 de 11	

## 5 **PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA**

### 5.1 **Preparación de muestras de albúmina humana y de muestras de control**

Las muestras se diluyeron con solución salina al 0.9 %, de acuerdo a su contenido de proteína hasta una concentración adecuada, por ejemplo, 1 % de proteína. Las soluciones de las muestras diluidas se filtraron a través de un filtro desechable de 0.2 µm en los viales del automuestrador.

### 5.2 **Preparación de muestras de la Fracción V**

Las muestras congeladas y reconstituidas de la Fracción V, fueron descongeladas (+15 °C a +25 °C), hasta que la solución alcanzó la temperatura ambiente.

**La descongelación a 37 °C debe ser evitada!**

Las muestras descongeladas tienen que diluirse posteriormente con 0.9 % de solución salina con una concentración de proteína adecuada, por ejemplo, 1% de proteína, en 1 hora. Las soluciones de las muestras diluidas se pudieron filtrar a través de un filtro desechable de 0.2 µm, en viales del automuestrador.

Las muestras diluidas deben ser analizadas dentro de las 24 horas después de la dilución.

### 5.3 **Preparación de la HPLC y columna de separación**

Al comienzo de cada serie de ensayos, durante un período de tiempo de 15 minutos, el flujo del sistema HPLC aumentó lentamente a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min y la columna se equilibró durante 30 minutos.

### 5.4 **Prueba de adecuabilidad del Sistema**

La prueba de adecuabilidad del sistema se efectuó usando gel de filtración estándar antes de cada secuencia.

Una prueba adicional del sistema de idoneidad debe ser realizada cuando la columna o el lote del eluyente ha sido cambiado.


Las condiciones cromatográficas de separación están de acuerdo con el punto 5.6.

### 5.5 **Rendimiento del ensayo**

Las muestras diluidas y la solución para la determinación de volumen de vacío pueden ser filtrados a través de un filtro de 0.2 µm, en viales del automuestrador.

Con cada secuencia de la muestra, se realizó una sola inyección de la solución para la determinación del volumen de vacío. Después de la determinación del volumen de vacío, la muestra tiene que ser analizada como “muestra en blanco” para comprobar la eliminación total del azul dextrano.

Todas las muestras y los controles fueron analizados en una sola determinación.

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS	
 For the safe and optimal use of human proteins Departamento Corporativo de Control de Calidad	<b>Determinación de la Distribución del Tamaño Molecular en la Albúmina Humana por HPLC de acuerdo con Farmacopea Europea (EP)</b>
130SOP038/03	Página 8 de 11

## 5.6 Parámetros Cromatográficos

Velocidad de flujo: 0.5 mL/min, isocrático

Columna: TSK gel G3000SW<sub>XL</sub>, 7.8 mm de ID x 30 cm, además la pre-columna

Contenido de Proteína/inyección: 200 µg/iny. Correspondiente a EP (rango de 50 µg a 600 µg)

Detección: UV 280 nm

Tiempo de Ejecución: 35 min

## 6 EVALUACIÓN

### 6.1 Criterio de aceptación para una prueba válida

#### 6.1.1 Sistema de adecuabilidad de la prueba

- Platos teóricos de picos de gammaglobulina en gel de filtración estándar:  
> 1100 de acuerdo con la validación: > 1000
- Control de la muestra: % de polímeros y agregados se encontraban dentro de los límites definidos.

En el caso de que el resultado de los platos teóricos se encuentren entre 1000 y 1100 y las muestras de control estén dentro de sus límites, la secuencia es válida, pero antes de la secuencia siguiente la columna tiene que ser cambiada.


### 6.2 Muestras

La evaluación de los cromatogramas se realizó de acuerdo con el método de normalización (100 % - método). La cantidad relativa (en %) de cada componente se calculó dividiendo el área correspondiente al pico, mediante la suma de las áreas picos de todos los componentes (polímeros y agregados, oligómeros, dímeros, monómeros y fragmentos) sometidos a prueba. La integración del N-Acetil-DL-triptófano fue suspendida.

$$\text{área total del pico} = \frac{\text{área}_{\text{polímeros y agregados}} + \text{área}_{\text{oligómeros}} + \text{área}_{\text{dímeros}} + \text{área}_{\text{monómeros}} + \text{área}_{\text{fragmentos}}}{\text{área}_{\text{pico total}}}$$

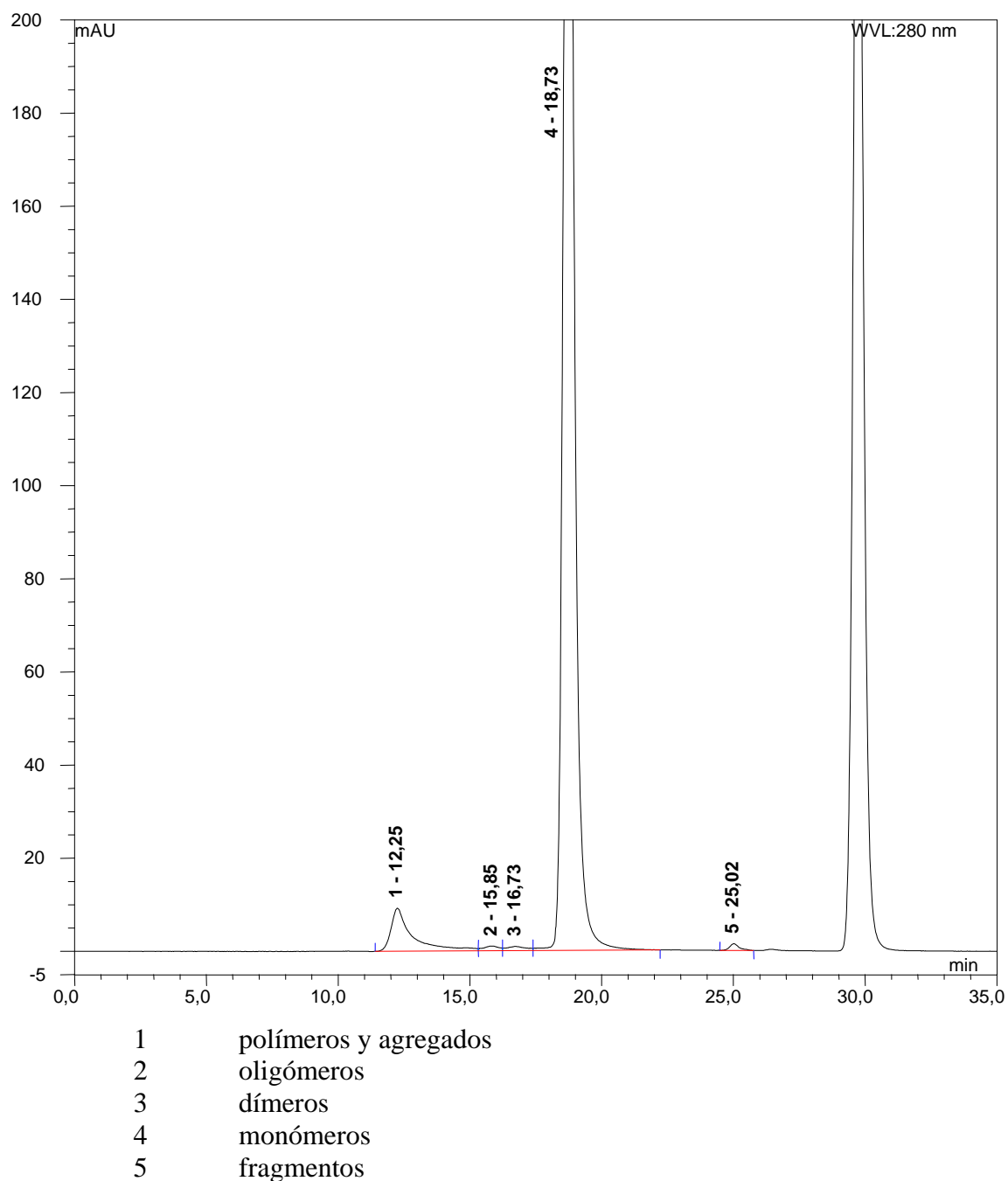
$$\text{cantidad real. [\%]} = \frac{\text{área correspondiente al pico}}{\text{área pico total}} \cdot 100$$


El pico correspondiente a los polímeros y los agregados está situado en la parte del cromatograma que representa el volumen de vacío (véase pico 1 en cromatogramas). El área pico de los polímeros y los agregados no deben ser mayores que el 10% del área total del cromatograma (correspondiente aproximadamente al 5% de los polímeros y agregados).

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS	
 <p>For the safe and optimal use of human proteins Departamento Corporativo de Control de Calidad</p>	<p><b>Determinación de la Distribución del Tamaño Molecular en la Albúmina Humana por HPLC de acuerdo con Farmacopea Europea (EP)</b></p>
130SOP038/03	Página 9 de 11

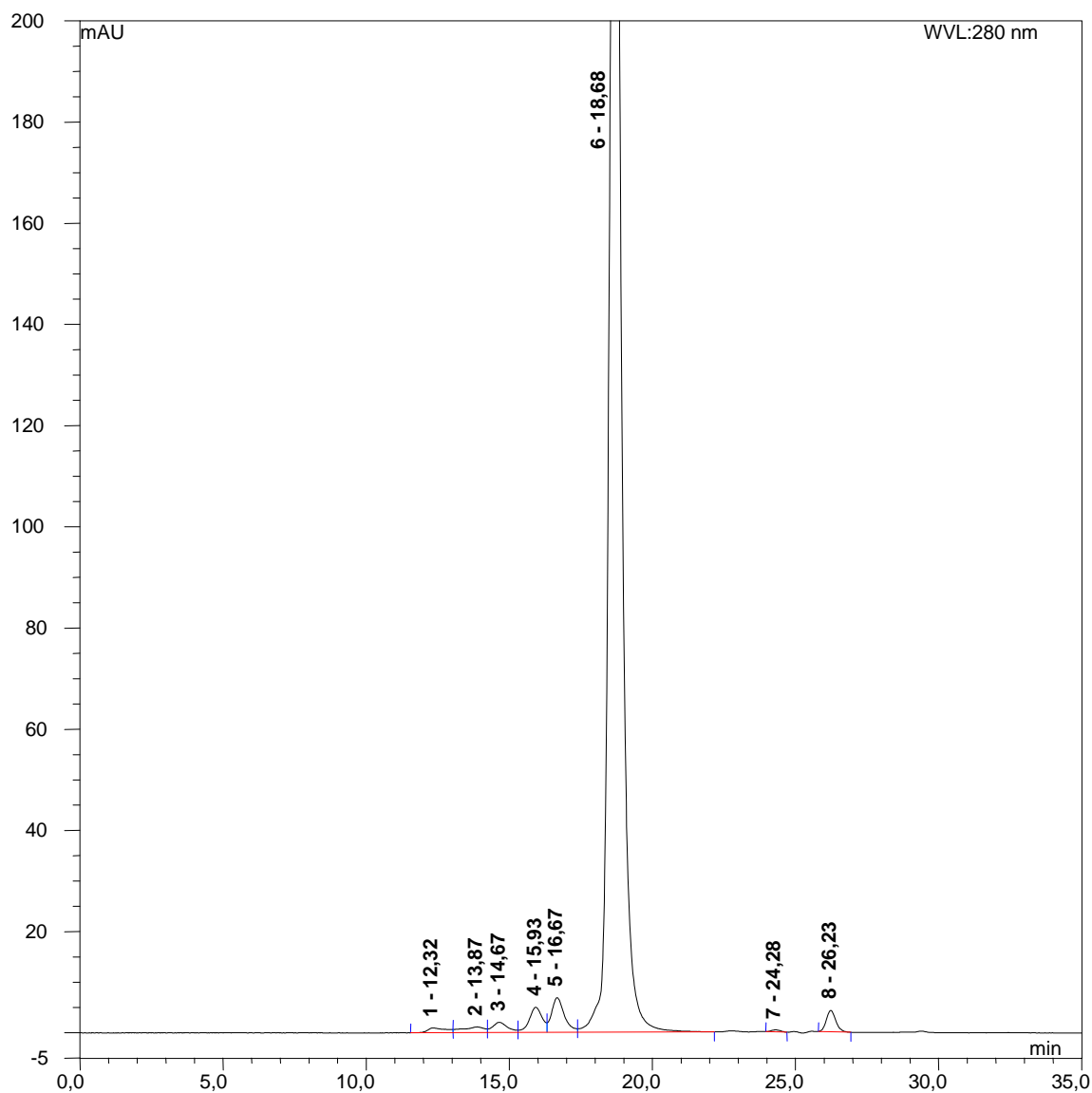
## 6.3 Ejemplos de Cromatogramas

### 6.3.1 Muestra del producto final de la Albúmina Humana




SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS	
 <p>For the safe and optimal use of human proteins Departamento Corporativo de Control de Calidad</p>	<p><b>Determinación de la Distribución del Tamaño Molecular en la Albúmina Humana por HPLC de acuerdo con Farmacopea Europea (EP)</b></p>
130SOP038/03	Página 10 de 11

### 6.3.2 Muestra de Albúmina Humana (subrayado)



- |       |                       |
|-------|-----------------------|
| 1     | polímeros y agregados |
| 2 a 4 | oligómeros            |
| 5     | dímeros               |
| 6     | monómeros             |
| 7 y 8 | fragmentos            |



SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Departamento Corporativo de Control de Calidad	<b>Determinación de la Distribución del Tamaño Molecular en la Albúmina Humana por HPLC de acuerdo con Farmacopea Europea (EP)</b>	
130SOP038/03	Página 11 de 11	

## 7 DOCUMENTACIÓN

La siguiente información está preferentemente indicada dentro de los datos primarios, hojas adicionales de evaluación o de la respectiva LIMS. De acuerdo con la trazabilidad de los resultados debe ser garantizada, considerando:

- Cromatogramas de los estándares y las muestras con los resultados calculados
- Hoja de portada con un resumen de los resultados del ensayo completo
- Impresión de la prueba de idoneidad del sistema

## 8 NOTAS ESPECIALES

### 8.1 Límite de Cuantificación


Polímeros y agregados: 0.3 %

### 8.2 Volumen de la Muestra

Volumen mínimo de muestra para la prueba: 0.5 mL

## 9 ABREVIATURAS

acc..... de acuerdo con  
AU ..... unidad de absorbancia  
CBER..... Centro de Evaluación e Investigación Biológica  
CFR..... Código de Regulaciones Federales  
EP ..... Farmacopea Europea  
HPLC..... cromatografía líquida de alto rendimiento  
ID..... diámetro interior  
LIMS..... Sistema de Gestión de Información de Laboratorio  
MW ..... peso molecular  
POL..... política  
QC..... control de calidad  
rel. .... relativo  
RSD ..... desviación relativa estándar  
SOP..... procedimiento operativo estándar  
VAL..... validación

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS			
 For the safe and optimal use of human proteins Departamento Corporativo de Control de Calidad		<b>Determinación del Ácido Caprílico (Ácido Octanoico) en muestras de ALBÚMINA HUMANA por Cromatografía de Gas</b>	
<b>130SOP047/02</b>	sustituye: 130SOP047/01	Válido desde:	<b>C</b>

**RAZÓN de EMISIÓN:** - CC 10/022 – Cambio en el régimen de prueba para el ácido Caprílico – Albúmina

**ÁREA de APLICACIÓN:** Departamentos de Control Calidad del grupo Octapharma


**AUTOR:** S. Ernback, 23. Mar. 2010 (Análisis Bioquímico del Control de Calidad)

**REVISIÓN:** ..... (Jefe Internacional del Método de Validación)

**APROBACIÓN:** ..... (Control Corporativo de Calidad)


..... (Aseguramiento Corporativo de Calidad)

**Este Procedimiento Operativo Estándar (SOP) define el encuadramiento general necesario para el tema mencionado. Puede ser traducido a los respectivos idiomas, utilizados en las diferentes instalaciones de Octapharma y se complementa con la información adicional de acuerdo a las necesidades locales, siempre y cuando no existan discrepancias o conflictos con la información indicada en el interior del SOP-principal. Las diferentes instalaciones de Octapharma serán responsables por la validez de las traducciones e informaciones adicionales.**

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Departamento Corporativo de Control de Calidad	<b>Determinación del Ácido Caprílico (Ácido Octanoico) en muestras de HUMANA ALBÚMINA por Cromatografía de Gas</b>	
	<b>130SOP047/02</b>	Página 2 de 13


### ***HISTORIAL DE REVISIÓN***

<b>Versión</b>	<b>Fecha</b>	<b>Razón de emisión</b>
130SOP047/02	23. Mar. 2010	CC 10/022 – Cambio en el régimen de prueba para el ácido Caprílico – Albúmina
130SOP047/01	23. En. 2009	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adición de la 2<sup>da</sup> columna y sus parámetros-GC</li> <li>• Revisión</li> </ul>
130SOP047/00	08. Nov. 2005	Definición de un estándar a nivel corporativo; revisión y actualización
000DTM047/03	21. En. 2003	Nuevo sistema de prueba de idoneidad, revisión
000DTM047/02	18. En. 2000	Adición de solución de proteína plasmática al 5% en el título
000DTM047/01	22. Sep. 1998	Actualización tras el método validación; cambio en la composición de los estándares
000DTM047/00 R&D	12. Ag. 1997	1 <sup>ra</sup> edición

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Departamento Corporativo de Control de Calidad	Determinación del Ácido Caprílico (Ácido Octanoico) en muestras de HUMANA ALBÚMINA por Cromatografía de Gas	
130SOP047/02	Página 3 de 13	

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>1</b>	<b>FUNDAMENTO DE LA PRUEBA .....</b>	<b>ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>EQUIPAMIENTOS Y REACTIVOS .....</b>	<b>ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.</b>
3.1	Equipamientos .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.2	Reactivos .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>4</b>	<b>SOLUCIONES .....</b>	<b>ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.</b>
4.1	Referencia Interna (IR) .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.2	Solución stock de ácido caprílico .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.3	Solución de cloruro de sodio al 0.9 % (solución salina al 0.9 %)	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.4	Solución de hidróxido de sodio al 10 % (NaOH al 10 %)	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.5	Solución inoculada con ácido caprílico (estándar) que contiene albúmina al 5% .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>5</b>	<b>PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA .....</b>	<b>ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.</b>
5.1	Preparación del estándar, muestras y controles .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
5.2	Parámetros cromatográficos .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
5.2.1	INNOWax .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
5.2.2	Quadrex 007 .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
5.3	Sistema de idoneidad del método cromatográfico .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>6</b>	<b>EVALUACIÓN .....</b>	<b>ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.</b>
6.1	Criterio de Aceptación para una prueba válida .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
6.1.1	Sistema de idoneidad de la prueba .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
6.2	Factor de respuesta del estándar mixto .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
6.3	Cálculo de la muestra .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
6.4	Evaluación de la muestra .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
6.5	Ejemplos de Cromatogramas .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
6.5.1	Muestra del productoo final de la Albúmina Humanaa-INNOWax	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
6.5.2	Muestra del productoo final de la Albúmina Humanaa-Quadrex 007	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>7</b>	<b>DOCUMENTACIÓN .....</b>	<b>ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.</b>
<b>8</b>	<b>NOTAS ESPECIALES .....</b>	<b>ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.</b>
8.1	Conversiones .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
8.2	Límite de Cuantificación .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
8.3	Volumen de la Muestra .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>9</b>	<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.</b>


SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS	
 For the safe and optimal use of human proteins Departamento Corporativo de Control de Calidad	<b>Determinación del Ácido Caprílico (Ácido Octanoico) en muestras de HUMANA ALBÚMINA por Cromatografía de Gas</b>
130SOP047/02	Página 4 de 13

## **1 FUNDAMENTO DE LA PRUEBA**

Las muestras conteniendo ácido caprílico (ácido octanoico) son mezcladas con ácido heptanoico como referencia interna, que interacciona de forma análoga con la matriz muestra que contiene proteína. Después de la esterificación con metanol en un entorno fuertemente clorhídrico, ambos ésteres metílicos son extraídos en n-heptano y son determinados por medio de la cromatografía de gas capilar (detector de ionización de llama). Con la ayuda de un gradiente de temperatura adecuada y el flujo de gas, las sustancias son separadas mediante la interacción con la fase estacionaria del capilar. La cantidad de ácido caprílico fue calculado con el método de referencia interna.

## **2 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Corresponding analytical SOPs of Octapharma subsidiaries in the particular languages
2. Corresponding equipment SOPs of Octapharma subsidiaries in the particular languages
3. Corresponding quality control sheets or database reports of the particular Octapharma subsidiaries
4. Corresponding method validation documents prepared by any QC
5. Corresponding method transfer and comparison documents prepared by QC Vienna
6. European Pharmacopoeia, monograph 0255: Humana albúmina solutions
7. European Pharmacopoeia, general chapters, methods of analysis 2.2.28: Gas chromatography
8. European Pharmacopoeia, general chapters, methods of analysis 2.2.46: Chromatographic separation techniques
9. United States Pharmacopoeia, general chapters, <621> Chromatography
10. United States Pharmacopoeia, Official Monographs, Albúmina Humana
11. 015POL000 - Corporate Change Control Policy

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Departamento Corporativo de Control de Calidad	Determinación del Ácido Caprílico (Ácido Octanoico) en muestras de HUMANA ALBÚMINA por Cromatografía de Gas	
130SOP047/02	Página 5 de 13	

### 3 EQUIPAMIENTOS Y REACTIVOS


Equipamientos, reactivos y otros materiales se resaltan **con negrita, cursiva y subrayado**, siendo estrictamente obligatorio para cada lugar. Otras marcas de equipos, reactivos y materiales demostraron y probaron ser válidos. Solamente fueron sugeridos para el uso y pudieron ser sustituidos por un producto de otra marca o proveedor, en caso de presentar la misma calidad y funcionalidad y el método no se afectó por el cambio. En cualquier caso, los cambios deben ser manejados de acuerdo con el 015POL000.

#### 3.1 Equipamientos

- Sistema de Cromatografía de Gas que consiste en:  
Cromatógrafo de gas, auto-muestrador y software de evaluación
- **Columna Capilar, fase estacionaria: polietileno glicol**  
Por ej. INNOWax (AGILENT), 30 m x 0.25 mm de ID x 0.25 µm df o  
QuadraX 007-FFAP (ICT), 50 m x 0.32 mm de ID x 1.0 µm df o su equivalente
- Pipetas de pistón carrera y sugerencias
- Dispensador con *combitips*
- Viales autosampler con tapas
- Mezclador de vibración
- Agitador
- Tubos de ensayos desechables
- Matraces aforados, Grado A
- Tubos de centrífuga de vidrio
- Balanza analítica
- Balanza de precisión
- Agitador magnético
- Baño de agua de laboratorio
- Centrífuga de laboratorio
- Pipetas Pasteur
- Temporizador

#### 3.2 Reactivos

- **Estándares**
  - Ácido caprílico (ácido octanoico), p.a., pureza  $\geq 99$  %
- **Referencias Internas**
  - Ácido heptanoico, p.a., pureza  $\geq 95$  %
- **Muestras de Control**
  - Muestras de control, por ej. Albúmina Humana al 20 % (OCTAPHARMA)

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS	
 <p>For the safe and optimal use of human proteins Departamento Corporativo de Control de Calidad</p>	<b>Determinación del Ácido Caprílico (Ácido Octanoico) en muestras de HUMANA ALBÚMINA por Cromatografía de Gas</b>
130SOP047/02	Página 6 de 13

➤ **Productos químicos y tampón**

- Metanol, pureza  $\geq 99\%$
- Agua para uso en laboratorio, WFL
- Muestra en blanco de Albúmina, por ejemplo, la albúmina con una concentración de aproximadamente el 20% sin ácido caprílico
- 50 % de solución de hidróxido de sodio
- Ácido clorhídrico, 32 % de HCl
- n-Heptano, p.a.
- Etanol al 96 %

#### **4 SOLUCIONES**

##### **4.1 Referencia Interna (RI)**

200 mg de ácido heptanoico se añadieron a 4 mL de HCl al 32 % y se completó hasta los 20 mL con el 10 % de NaOH.

##### **4.2 Solución stock de ácido caprílico**

200 mg de ácido caprílico se añadieron a 2 mL de HCl al 32 % y se completó hasta los 10 mL con el 10 % de NaOH.

##### **4.3 Solución de cloruro de sodio al 0.9 % (solución salina al 0.9 %)**


9 g de cloruro de sodio se disolvieron en 1000 mL de WFL.

##### **4.4 Solución de hidróxido de sodio al 10 % (NaOH al 10 %)**

50 % de solución de hidróxido de sodio se diluyeron 1 + 4 con WFL, dando una concentración del 10 %.

##### **4.5 Solución inoculada de ácido caprílico (estándar) que contiene albúmina al 5%**

250  $\mu$ L de solución stock de ácido caprílico es mezclada en un matraz volumétrico de 10 mL con solución salina al 0.9 %, 2.5 mL de una muestra en blanco de albúmina (contenido de proteína circa de 20 %) fueron añadidos y completados hasta los 10 mL con solución salina al 0.9 %. Esta solución dio una concentración de 0.50 mg/mL de ácido caprílico y 5 % de proteína.

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Departamento Corporativo de Control de Calidad	<b>Determinación del Ácido Caprílico (Ácido Octanoico) en muestras de HUMANA ALBÚMINA por Cromatografía de Gas</b>	
130SOP047/02	Página 7 de 13	

## 5 PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

Las muestras y la muestra de control se diluyeron (si era necesario) en una concentración de proteína de aproximadamente el 5%, con solución salina al 0,9%.

### 5.1 Preparación del estándar, muestras y controles

Cada muestra y su control pueden ser preparados ya sea en duplicado, o como una sola muestra, sólo la solución pico del ácido caprílico se puede preparar 6 veces.


- Mezclar en un tubo de centrifuga de vidrio:
  - 1000 µL de metanol
  - 200 µL de muestra, solución pico de ácido caprílico (estándar), o control
  - 20 µL referencia interna (dando una concentración de 0.2 mg/mL)
  - 500 µL de ácido clorhídrico
- Agitar
- Incubar a una temperatura de  $+60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante  $30\text{ min} \pm 5\text{ min}$
- Los tubos se enfrían (baño de agua fría)
- Añadir 500 µL de WFL
- Añadir 1000 µL de n-heptano
- Mezclar por lo menos durante 2 min
- Centrifugar a  $3000\text{ rpm} \pm 500\text{ rpm}$  y  $+20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Llenar los viales auto-muestrador con sobrenadante

### 5.2 Parámetros cromatográficos

#### 5.2.1 INNOWax

Volumen de inyección:	5 µL		
Temperatura del inyector:	250 °C		
Presión de entrada A:	100 kPa		
flujo de división:	70 mL/min		
Flujo de columna:	1.5 mL/min constante		
Detector de temperatura:	300 °C		
Temperatura inicial del horno:	80 °C		
Temperatura del programa:	5 °C/min	a 130 °C	por 0 min
	45 °C/min	a 240 °C	por 2 min
Tiempo de ejecución:	15.44 min		



SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Departamento Corporativo de Control de Calidad	<b>Determinación del Ácido Caprílico (Ácido Octanoico) en muestras de HUMANA ALBÚMINA por Cromatografía de Gas</b>	
130SOP047/02	Página 8 de 13	

### 5.2.2 Quadrex 007

Volumen de inyección: 0.5 µL  
Temperatura del inyector: 220 °C  
Presión de entrada A: 120 kPa  
flujo de división: 80 mL/min  
Flujo de columna: 1.5 mL/min constante  
Detector de temperatura: 240 °C  
Temperatura inicial horno: 130 °C                      mantener durante 10 min  
Temperatura del programa: 45 °C/min              a 240 °C durante 2 min  
Tiempo de ejecución: 15.44 min

### 5.3 Sistema de adecuabilidad del método cromatográfico

La desviación de la línea de base y la limpieza del capilar fueron controladas mediante inyección de n-heptano. La solución de albúmina inoculada fue inyectada 6 veces para la calibración que se extendió sobre la secuencia de la muestra (3 inyecciones al inicio, 1 inyección intermedia y 2 al final), para controlar los platos teóricos, los tiempos de retención y las áreas picos correspondientes.

## 6 EVALUACIÓN

### 6.1 Criterio de Aceptación para una prueba válida


#### 6.1.1 Sistema de idoneidad de la prueba

- RSD del área pico para el ácido heptanoico ≤ 5 %
- Simetría del pico entre 0.8 y 1.5
- Platos teóricos > 2000
- Línea de base de separación del ácido heptanoico y el ácido caprílico
- Control de la muestra dentro del rango especificado

### 6.2 Factor de respuesta del estándar mixto

La evaluación de los cromatogramas sigue el método de referencia interna mediante la comparación de las áreas picos del ácido heptanoico (RI) y el ácido caprílico. La concentración de ácido caprílico se determinó por referencia interna al ácido heptanoico. Para ello, la solución pico de albúmina fue inyectada 6 veces y fue calculado el valor medio del factor de respuesta.

$$\frac{\text{área pico ácido heptanoico}_{IR}}{\text{área pico ácido caprílico}_{\text{estándar}}} \cdot \frac{\text{concentración ácido caprílico}_{\text{estándar}}}{\text{concentración ácido heptanoico}_{IR}} = \text{factor respuesta (RF)}$$

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS	
 For the safe and optimal use of human proteins Departamento Corporativo de Control de Calidad	<b>Determinación del Ácido Caprílico (Ácido Octanoico) en muestras de HUMANA ALBÚMINA por Cromatografía de Gas</b>
130SOP047/02	Página 9 de 13

### 6.3 Cálculo de la muestra

$$\text{ácido caprílico} \frac{\text{área pico ácido caprílico}_{\text{muestra}}}{[\text{mg/mL}]} = \frac{\text{área pico ácido heptanoico}_{\text{muestra}}}{\text{área pico ácido heptanoico}_{\text{muestra}}} \bullet \text{RF} \bullet \text{IR} [\text{mg/mL prep.muestra}] \bullet \text{dilución}$$

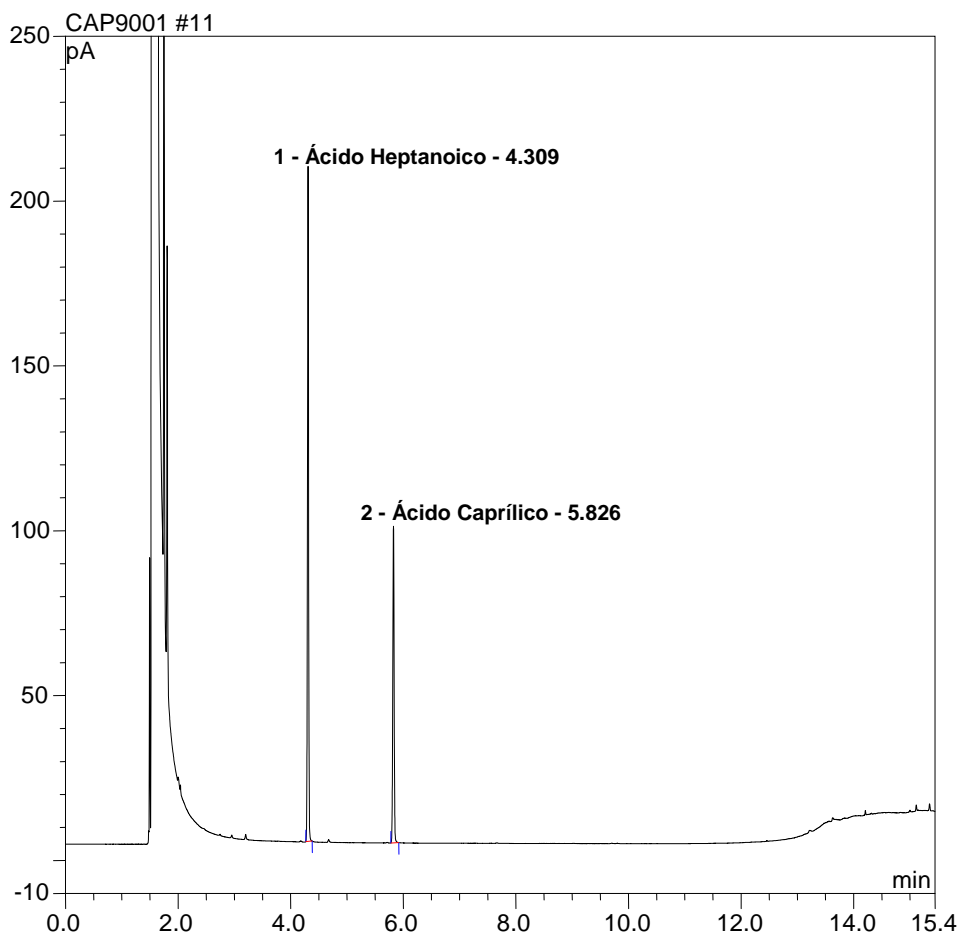
### 6.4 Evaluación de la muestra


Las muestras fueron calculadas con el método estándar interno utilizando todas las inyecciones estándares.

Los resultados se encuentran junto con los resultados del cromatograma.

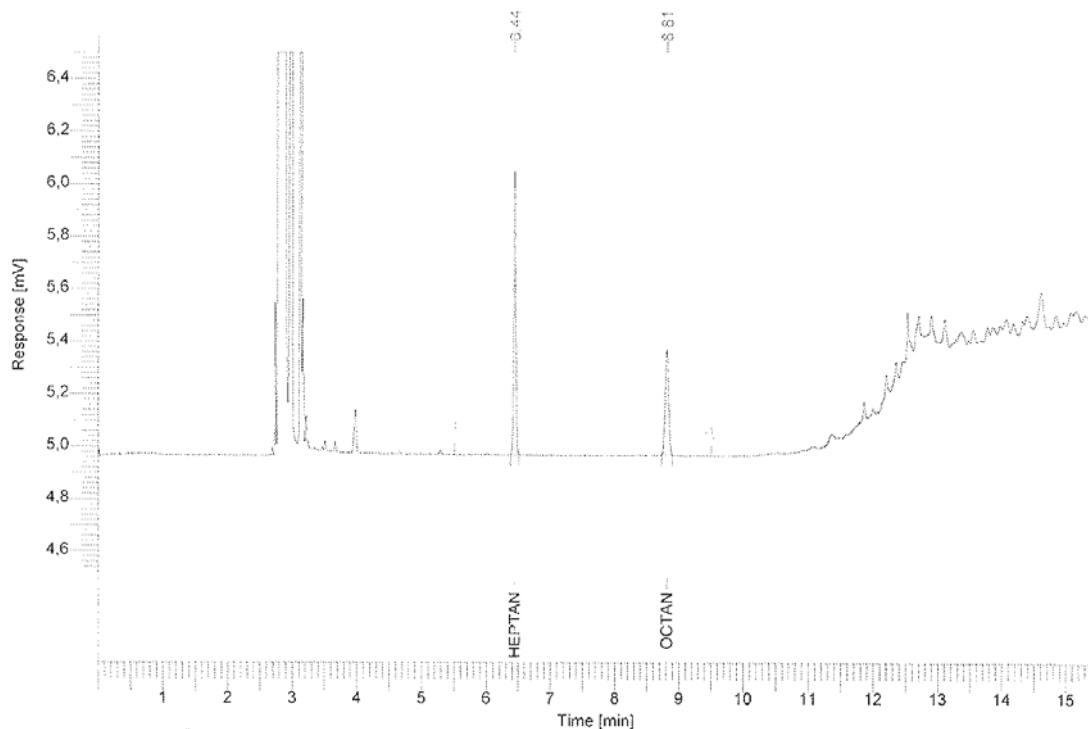
### 6.5 Ejemplos de Cromatogramas

#### 6.5.1 Muestra del producto final de la Albúmina Humana - INNOWax



SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Departamento Corporativo de Control de Calidad	<b>Determinación del Ácido Caprílico (Ácido Octanoico) en muestras de HUMANA ALBÚMINA por Cromatografía de Gas</b>	
	130SOP047/02	Página 10 de 13

### 6.5.2 Muestra del producto final de la Albúmina Humana - Quadrex 007




HEPTANO      ácido heptanoico  
OCTANO        ácido caprílico

## 7 DOCUMENTACION

La siguiente información está preferentemente indicada dentro de los datos primarios, hojas adicionales de evaluación o de la respectiva LIMS. De acuerdo a la trazabilidad de los resultados debe ser garantizada, considerando:

- Cromatogramas de los estándares y las muestras con los resultados calculados
- Hoja de portada con un resumen de los resultados del ensayo completo
- Impresión de la prueba de idoneidad del sistema

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS	
 For the safe and optimal use of human proteins Departamento Corporativo de Control de Calidad	<b>Determinación del Ácido Caprílico (Ácido Octanoico) en muestras de HUMANA ALBÚMINA por Cromatografía de Gas</b>
130SOP047/02	Página 11 de 13

## 8 NOTAS ESPECIALES

### 8.1 Conversiones

Caprilato de Sodio [mg/mL] = ácido caprílico [mg/mL] • 1.15

$$\text{Ácido caprílico [mmol/L]} = \frac{\text{ácido caprílico [mg/mL]}}{\text{MW}_{\text{ácido caprílico [mg/mmol]}}} \cdot 1000 [\text{mL}]$$

$$\frac{\text{Ácido caprílico [mmol/g albúmina]}}{\text{MW}_{\text{ácido caprílico [mg/mmol]}}} = \frac{\text{ácido caprílico [mg/mL]}}{\text{MW}_{\text{ácido caprílico [mg/mmol]}}} \cdot \frac{100}{\text{albúmina [g/100 mL]}}$$

$$\frac{\text{Ácido caprílico [mmol/g proteína]}}{\text{MW}_{\text{ácido caprílico [mg/mmol]}}} = \frac{\text{ácido caprílico [mg/mL]}}{\text{MW}_{\text{ácido caprílico [mg/mmol]}}} \cdot \frac{100}{\text{proteína [g/100 mL]}}$$

Descripción:

MW      peso molecular de ácido caprílico      144.22 mg/mmol

1000      factor de conversión para el cambio de mL a L

100      factor de conversión para considerar el porcentaje de albúmina por electroforesis-CAF

albúmina    %-resultado de electroforesis-CAF


proteína    contenido nominal en proteína [%]

### 8.2 Límite de Cuantificación

0,2 mg de Ácido Caprílico / ml de albúmina al 5%. Para todas las otras concentraciones de proteínas, la dilución tiene que ser evaluada.


### 8.3 Volumen de la Muestra


Volumen mínimo de la muestra para la prueba: 1 mL

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Departamento Corporativo de Control de Calidad	<b>Determinación del Ácido Caprílico (Ácido Octanoico) en muestras de HUMANA ALBÚMINA por Cromatografía de Gas</b>	
130SOP047/02	Página 12 de 13	

## 9 ABREVIATURAS

acc..... de acuerdo  
AU ..... unida de absorbancia  
CAF ..... Película de Acetato Celulosa para la electroforesis  
CBER..... Centro de Evaluación e Investigación Biológica  
CFR..... Código de Regulaciones Federales  
df..... espesor de la película  
EP ..... Farmacopea Europea  
GC..... cromatografía de gas  
ID ..... diámetro interior  
IR ..... referencia interna  
LIMS..... Sistema de Gestión de Información de Laboratorio  
MW ..... peso molecular  
POL..... política  
QC..... control de calidad  
rpm..... revoluciones por minuto  
RSD ..... desviación relativa estándar  
SOP..... procedimiento operativo estándar  
VAL..... validación

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 <p>For the safe and optimal use of human proteins Departamento Corporativo de Control de Calidad</p>	<b>Determinación del Ácido Caprílico (Ácido Octanoico) en muestras de HUMANA ALBÚMINA por Cromatografía de Gas</b>	
<b>130SOP047/02</b>	Página 13 de 13	

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS			
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department		<b>Determinación del Activador de Precalicroína por  Ensayo del Sustrato Cromogénico según la  Farmacopea Europea</b>	
<b>130SOP091/04</b>	reemplaza: 130SOP091/03	Válido desde:	<b>C</b>

**RAZÓN DE EMISIÓN:** Cambios según CC10/073

- Reemplazo del Activador de Precalicroína de Referencia FDA/CBER por una muestra de control adecuada
- Eliminación del pt. 8.1 cálculo para la liberación de FDA

**ÁREA DE APLICACIÓN:** Departamentos de Control de la Calidad del grupo Octapharma


**AUTOR:** D. Krause, 2010 – Jul – 15 (Método de Validación)

**REVISIÓN:** ..... (Jefe Internacional de los métodos de validación)

**APROBACIÓN:** ..... (Control Corporativo de la Calidad)

..... (Aseguramiento de la Calidad Corporativa)


**Este Procedimiento Operativo Estándar (SOP), define el encuadramiento general necesario para el tema mencionado. Puede ser traducido a los respectivos idiomas utilizados en las diferentes instalaciones de Octapharma y se complementa con información adicional de acuerdo a las necesidades locales, siempre y cuando no existan discrepancias o conflictos con la información indicada en el interior del SOP-principal. Las diferentes instalaciones de Octapharma serán responsables por la validez de las traducciones e informaciones adicionales.**

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	<b>Determinación del Activador de Precalicroína por Ensayo del Sustrato Cromogénico según la Farmacopea Europea</b>	
	130SOP091/04	Página 2 de 11

### **HISTORIAL DE REVISIÓN**


Versión	Fecha	Razón de emisión
130SOP091/04	2010-Jul-15	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cambios según CC10/073: <ul style="list-style-type: none"> <li>– Reemplazo del Activador de Precalicroína de Referencia FDA/CBER por una muestra de control adecuada</li> <li>– Eliminación del pt. 8.1 cálculo para la liberación de FDA</li> </ul> </li> </ul>
130SOP091/03	2008-Ene-31	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nueva distribución</li> <li>• Pt. 4 Soluciones agregadas</li> <li>• Revisión de los puntos 5.4, <b>Error! Reference source not found.</b> y 6.1</li> </ul>
130SOP091/02	2006-Nov-08	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sustracción opcional del blando del reactivo; adición del cálculo para la liberación de FDA</li> </ul>
130SOP091/01	2006-Ago-22	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cambio del estándar de calibración</li> <li>• Actualización tras revalidación</li> <li>• Sin sustracción de blanco de las muestras</li> <li>• Cambio de concentración del sustrato</li> </ul>
130SOP091/00	2005-Oct-07	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Definición de un estándar corporativo</li> </ul>
000DTM091/06	2003-Abr-08	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cambio de preparación de la muestra por soluciones de gamaglobulina</li> <li>• Adición en el título: ” según la EP”</li> </ul>
000DTM091/05	2002-Sep-10	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Corrección de errores de digitación;</li> <li>• Actualización de la Farmacopea Europea a 4<sup>ta</sup> edición</li> </ul>
000DTM091/04	1999-Feb-12	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Corrección de errores de tipo</li> </ul>
000DTM091/03	1998-Jun-22	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Más puntos de calibración;</li> <li>• Pool PKA según Ph. Eur. 3<sup>ra</sup> ed.</li> </ul>
000DTM091/02	1997-Ago-14	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cambio a determinación cinética;</li> <li>• Nuevo rango de calibración</li> </ul>
SOP091/01	1996-Jul-01	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1<sup>ra</sup> edición</li> </ul>



SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	Determinación del Activador de Precalicroína por Ensayo del Sustrato Cromogénico según la Farmacopea Europea	
130SOP091/04	Página 3 de 11	

## ***TABLA DE CONTENIDO***

<b>1</b>	<b>PRINCIPIO DE LA PRUEBA .....</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAS, LITERATURA.....</b>	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>EQUIPOS Y REACTIVOS .....</b>	<b>5</b>
3.1	Equipos .....	5
3.2	Reactivos.....	5
<b>4</b>	<b>SOLUCIONES.....</b>	<b>6</b>
4.1	Activador de Precalicroína en albúmina BRP o estándar internacional para el activador de pre-calicroína .....	6
4.2	Tampón B (tampón de dilución) .....	6
4.3	Substrato .....	7
4.4	Solución tampón - substrato.....	7
4.5	Pool - Plasma-Precalicroína (Pool PK) .....	7
<b>5</b>	<b>PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA .....</b>	<b>7</b>
5.1	Preparación de la muestra .....	7
5.2	Preparación de la curva de calibración .....	7
5.3	Sugerencias para la configuración de las placas de micro titulación.....	8
5.4	Secuencia de Pipetas .....	8
5.5	Parámetros de medición .....	9
<b>6</b>	<b>EVALUACIÓN.....</b>	<b>9</b>
6.1	Solución de envase final de la inmunoglobulina humana.....	9
6.2	Albúmina humana .....	9
6.3	Criterios de Aceptación para un resultado de prueba válido .....	9
<b>7</b>	<b>DOCUMENTACIÓN .....</b>	<b>10</b>
<b>8</b>	<b>NOTAS ESPECIALES .....</b>	<b>10</b>
8.1	Límite de Cuantificación (LOQ).....	10
8.2	Dígitos Significativos.....	10
<b>9</b>	<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>10</b>

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	<b>Determinación del Activador de Precalicroína por Ensayo del Sustrato Cromogénico según la Farmacopea Europea</b>	
130SOP091/04	Página 4 de 11	

## 1 PRINCIPIO DE LA PRUEBA

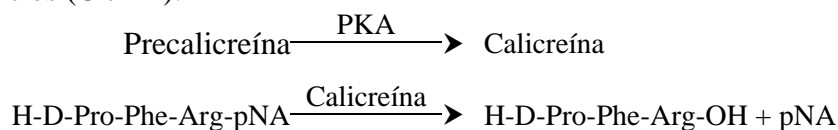
El activador de la Precalicroína (PKA), activa la Precalicroína a calicroína, la que es capaz de separar la p-nitroanilina (pNA) del sustrato H-D-Pro-Phe-Arg-pNA.

La liberación relativamente lenta de pNA amarilla a una temperatura constante muestra una correlación lineal a la concentración de calicroína disponible.

La determinación es realizada a una temperatura constante de +37°C (± 1°C) en una placa de micro titulación.


Las muestras o estándares mezclados con la Precalicroína o tampón B (para valores blanco) son incubadas por 10 minutos, luego el sustrato H-D-Pro-Phe-Arg-pNA es agregado y la cinética de los valores blancos de la muestra y estándar son registrados a 405 nm. Los datos entre el minuto 2 y 10 son usados para la evaluación.

La cuantificación es realizada con un estándar de referencia y expresada en unidades internacionales por mililitros (UI/mL).



## 2 REFERENCIAS, LITERATURA

1. Correspondientes SOPs analíticos de subsidiarias de Octapharma en los idiomas particulares
2. Correspondientes SOPs de equipos de subsidiarias de Octapharma en los idiomas particulares
3. Correspondientes hojas de control de calidad o reportes de bases de datos de las subsidiarias particulares de Octapharma
4. Correspondientes documentos de validación de métodos preparados por QC (Control de Calidad) Viena
5. Correspondientes documentos de transferencia y comparación de métodos preparados por QC Viena
6. 015POL000 – Política Corporativa de Control de Cambios
7. Farmacopea Europea, capítulos generales, métodos de análisis 2.6.15 Activador de Precalicroína
8. Farmacopea Europea, monografía 0255, Solución de Albúmina Humana
9. Farmacopea Europea, monografía 0918, Inmunoglobulina Normal Humana para Administración Intravenosa
10. Certificado de Estándar Internacional

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	Determinación del Activador de Precalicroína por Ensayo del Sustrato Cromogénico según la Farmacopea Europea	
130SOP091/04	Página 5 de 11	

### 3 EQUIPOS Y REACTIVOS


Equipos, reactivos y otros materiales que resaltan con **negrita, cursiva y subrayado**, son estrictamente obligatorios para cada lugar. Otras marcas de equipos, reactivos y materiales que demostraron y probaron ser válidos. Solamente son sugerencias para su uso y pueden ser sustituidos por un producto de otra marca o proveedor, en caso de que tenga la misma calidad y funcionalidad, cuando el método no se vea afectado por el cambio. En cualquier caso, los cambios tienen que ser manejados de acuerdo con el 015POL000.

#### 3.1 Equipos

- Lector de placa de micro titulación, adecuado para la medición cinética, con el software de control y evaluación
- Jeringas desechables
- Placas de micro titulación
- Pipetas calibradas con puntas desechables
- Crio-frascos 1.6 mL
- Tubos de prueba desechables
- Dispensador con combitips
- Recipiente para reactivo
- Mezclador por vibración
- Cronómetro
- Baño de agua
- Pipetas multi-canales

#### 3.2 Reactivos

- **Activador de Precalicroína en albúmina BRP** (EUR. COMMISSION), lote efectivo o estándar internacional para el activador de precalicroína (NIBSC), lote efectivo
- **Pool PK según EP 2.6.15** (por ej.COACHROM)
- Sustrato cromogénico, **H-D-Pro-Phe-Arg-pNA**,  
Por ej., S-2302 (CHROMOGENIX) op NAPEP 1902 (BIOPEP)
- Tris(hidroximetil)-aminometano, TRIS, p.A.
- Cloruro de sodio (NaCl), p.A.
- Azida de sodio (NaN<sub>3</sub>), extra pura, como preservante
- Ácido hidróclorico (HCl), 2 mol/L o más alto, p.A.
- Agua para uso de laboratorio (Water for laboratory use –WFL)
- Agua para inyección (Water for injection – WFI)
- Muestra de control adecuada, por ej. Muestra del producto final con contenido de PKA

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	<b>Determinación del Activador de Precalicerina por Ensayo del Sustrato Cromogénico según la Farmacopea Europea</b>	
130SOP091/04	Página 6 de 11	

## 4 SOLUCIONES

### 4.1 *Activador de Precalicerina en albúmina BRP o estándar internacional para el activador de pre-calicerina*

El contenido del frasco debe ser llevado a temperatura ambiente. El frasco es golpeado suavemente para recolectar el material al fondo. El frasco es abierto y el contenido total del estándar es disuelto agregando 1.0 mL de WFI. El estándar es reconstituido por 30 minutos.

El estándar disuelto es diluido con el tampón B hasta una concentración de 22 UI/mL y transferido a un tubo de poliestireno. La solución stock entonces está lista para el uso.

A partir de esta solución de stock, se prepara una serie equidistante de dilución según sigue, por ej:

	Factor Dil. [1:x]	Solución PKA, 22 UI/mL [μL]	tampón B [μL]	Actividad PKA [UI/mL]
S6	1	400	-	22
S5	1.22	328	72	18
S4	1.57	255	145	14
S3	2.20	182	218	10
S2	3.67	109	291	6
S1	11	20	200	2

Alícuotas (por ej., 25 μL cada una) son hechas de las diluciones estándar y son almacenadas congeladas a  $\leq -15^{\circ}\text{C}$ .

Si es necesario, se puede reconstituir más de 1 frasco, pero los frascos tienen que ser sometidos a un pool antes de diluir los estándares de calibración.

Estabilidad: 6 meses a  $\leq -15^{\circ}\text{C}$

### 4.2 *Tampón B (tampón de dilución)*


Para el tampón, las siguientes sustancias son ponderadas:

50 m MTRIS → 6.06 g/L

150 m M NaCl → 8.77 g/L

0.01% NaN<sub>3</sub> → 0.1 g/L (se puede agregar para preservación)

y disueltas con 900 mL WFL. El pH es ajustado a 8.0 con HCl y adicionado con WFL hasta un volumen final de 1000 mL. Entonces, la solución es filtrada usando un filtro de

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	<b>Determinación del Activador de Precalicroína por Ensayo del Sustrato Cromogénico según la Farmacopea Europea</b>	
130SOP091/04	Página 7 de 11	

membrana de 0.45 µm y vaciada en botellas de vidrio estériles y más pequeñas (por ej., frascos de 100 mL).

Estabilidad: sin abrir: 6 meses entre +2°C y +8°C, si es filtrada  
abierta: 1 mes entre +2°C y +8°C

## 4.2 Substrato

El sustrato congelado en seco es reconstituido con 6.8 mL WFI.

Estabilidad: reconstituido: 1 mes entre +2°C y +8°C si no está contaminado con microorganismos (La solución se pone amarillenta)

## 4.3 Solución tampón - sustrato

Para uso diario, 1 volumen de sustrato es mezclado con 4 volúmenes de B.

## 4.4 Pool - Plasma-Precalicroína (Pool PK)

La preparación del pool de plasma-precalicreína es realizado según la EP.

Tras descongelar o disolver (ver folleto para volúmenes de disolución), el pool está listo para ser usado.

**La cantidad de pool restante puede ser recongelada y descongelada una vez más.**

Estabilidad: liofilizado: hasta fecha de vencimiento entre +2°C y +8°C  
congelado: 2 años a ≤ -15 °C

# 5 PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA


## 5.1 Preparación de la muestra

Todas las diluciones son preparadas usando el Tampón B.

Las soluciones de albúmina humana son rutinariamente testeadas sin diluir, cada preparación es testada dos veces. Los productos finales de la inmunoglobulina son rutinariamente diluidos para obtener una solución al 3% de inmunoglobulina y testeados dos veces. De ser necesario, se pueden preparar más diluciones de todas las muestras.

## 5.2 Preparación de la curva de calibración

Las diluciones estándar (4.1) son usadas ya sean preparadas en fresco o descongeladas. Son pipeteadas a los pozos de una placa de micro titulación según los capítulos 5.3 y 5.4.

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	<b>Determinación del Activador de Precalicerina por Ensayo del Sustrato Cromogénico según la Farmacopea Europea</b>	
<b>130SOP091/04</b>	Página 8 de 11	

### 5.3 Sugerencias para la configuración de las placas de microtitulación

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NC <sub>Pool</sub>	S1	S2	S3	S4	S5	S6	CTR <sub>1</sub>	CTR <sub>1</sub>			
B	NC	BLS1	BLS2	BLS3	BLS4	BLS5	BLS6	BLCTR <sub>1</sub>	BLCTR <sub>1</sub>			
C	P <sub>1</sub>	P <sub>1</sub>	⋮	⋮								
D	BLP <sub>1</sub>	BLP <sub>1</sub>	⋮	⋮								
E												
F												
G												
H												

NC, NC<sub>Pool</sub>

S1 a S6

P<sub>1</sub>aP<sub>x</sub>

CTR<sub>x</sub>

BLxxx

blanco reactivo

diluciones estándar,

muestras,

control,

blancos de muestra, estándar y control

Las posiciones B2 a B7 son usadas para soluciones blanco-estándar.

Los pozos restantes son usados para la determinación de las muestras y para los blancos-muestra, que son realizadas en determinaciones dobles.


Para mayor facilidad de manipulación, las muestras y los blancos son pipeteados en hileras.

### 5.4 Secuencia de Pipetas

Para cada estándar, muestra y control, un blanco (BLxxx) es pipeteado usando tampón B en lugar de pool PK. Blancos de reactivo (NC, NC<sub>Pool</sub>) también son preparados donde el tampón B es usado como muestra.

Nombre	Muestra	Pool PK	Tampón B	Incubación	Substrato (4.3), precalentado
NC <sub>Pool</sub>	10 µL Tampón B	100 µL	-	10 min a +37 °C	100 µL
NC	10 µL Tampón B	-	100 µL		100 µL
Estándar / muestra / control	10 µL muestra / estándar / control	100 µL			100 µL
BLxxx	10 µL muestra / estándar / control	-	100 µL		100 µL

Iniciar medición según pt. 5.5

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	Determinación del Activador de Precalicroína por Ensayo del Sustrato Cromogénico según la Farmacopea Europea	
130SOP091/04	Página 9 de 11	

## 5.5 Parámetros de medición

Longitud de la onda de medición: 405 nm  
Longitud de la onda de referencia: 690 nm  
Temperatura de medición: + 37°C

La medición es iniciada después de la adición del sustrato inmediatamente o tras 2 minutos dependiendo del software de control usado. Los datos crudos son registrados una vez por minuto entre el minuto 2 y 10. En base a esta información, la diferencia de absorbencia por minuto ( $\Delta A_{405}/\text{min} = \Delta V$ ) es calculada.

## 6 EVALUACIÓN

El BL<sub>xxx</sub> y los blancos de reactivo (NC<sub>Pool</sub>, NC) son realizados en cada ocasión de prueba. Los blancos de reactivo son restados de los correspondientes valores de prueba:

- La  $\Delta V$  de NC es restada de  $\Delta V$  de BL<sub>xxx</sub>
- La  $\Delta V$  de NC<sub>Pool</sub> es restada de  $\Delta V$  de estándares, muestras y control.

Los valores  $\Delta V$  corregidos según el blanco son usados para el cálculo.

### 6.1 Solución de envase final de la inmunoglobulina humana

El resultado corresponde a una solución al 3% de la inmunoglobulina.

La muestra BL de algunas preparaciones de inmunoglobulina es principalmente más alta que el resultado de la muestra debido a una actividad no-específica de amidasa conocida para soluciones de inmunoglobulinas. Así, los valores de la muestra BL no son restados de los resultados de la muestra.


### 6.2 Albúmina humana

El valor de la muestra BL no es restado del valor de la muestra pero es indicado en la carátula del análisis.

### 6.3 Criterios de Aceptación para un resultado de prueba válido

- El coeficiente de correlación de la función de calibración debe ser  $\geq 0.990$ .
- El resultado de la muestra de control tiene que estar dentro del rango definido por la correspondiente base de datos u hoja de control de calidad.

En caso de que un rango de control se exceda o en caso de que un coeficiente de correlación sea inválido, toda la secuencia tiene que ser repetida.

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	<b>Determinación del Activador de Precalicroína por Ensayo del Sustrato Cromogénico según la Farmacopea Europea</b>	
130SOP091/04	Página 10 de 11	

## 7 DOCUMENTACIÓN

La siguiente información de preferencia está contenida dentro de los datos crudos, hojas adicionales de evaluación o los respectivos LIMS. Se debe asegurar la trazabilidad consistente de los resultados.

- Configuración de la placa de micro titulación y descripción.
- $\Delta V$  de estándares, controles, muestras y blancos, así como también los valores corregidos
- Gráfico de la función de calibración
- Coeficientes y coeficiente de correlación de la función de calibración
- Factores de dilución de las muestras
- Actividad PKA de muestras y controles con consideración de cualquier factor de dilución
- RSD[%] de los resultados de la determinación doble
- Resultado medio de cada determinación doble
- Carátula con un resumen de los resultados de toda la placa de micro titulación

## 8 NOTAS ESPECIALES

### 8.1 Límite de cuantificación (LOQ)

Albúmina humana	2.0 UI/mL
OCTAGAM <sup>®</sup> , NEWGAM	2.0 UI/mL (en base a una solución IgG3 %)


### 8.2 Dígitos Significativos

Los resultados pueden ser reportados con un dígito significativo tras el punto decimal, por ej. 2,8 UI/mL, pero deben cumplir con las correspondientes especificaciones de producto.


## 9 ABREVIATURAS

$\Delta V$ .....	diferencia de absorción por minuto entre minutos 2 y 10 ( $\Delta A_{405}/\text{min}$ )
EP .....	European Pharmacopoeia (Farmacopea Europea)
LIMS.....	Laboratory Information Management System (Sistema de Gestión de MTP Placa de micro titulación)
NIBSC .....	National Institute for Biological Standards and Control (Instituto Nacional para Estándares y controles Biológicos)
QC.....	Quality Control (Control de Calidad)
PKA .....	Activador de precalicroína
PK-pool.....	Pool de Precalicroína
pNA .....	p-Nitroanilina
POL.....	Política
RSD .....	Desviación Estándar Relativa



SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	<b>Determinación del Activador de Precalicroína por  Ensayo del Sustrato Cromogénico según la Farmacopea  Europea</b>	
<b>130SOP091/04</b>	Página 11 de 11	

SOP..... Standard Operating Procedure (Procedimiento Operativo Estándar)  
VAL..... Validación  
WFI..... Agua para Inyección  
WFL..... Agua para uso de laboratorio

SOP - PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS			
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department		<b>Control Visual de las Preparaciones Líquidas y la Estabilidad a Corto Plazo de la Albúmina</b>	
<b>130SOP115/04</b>	Sustituye a: 130SOP115/03	Válido desde:	<b>C</b>

**RAZÓN DE EMISIÓN:** Actualización de acuerdo con CC 13803 (relativo a Gammanorm y Rhesonativ).  
Sustitución de los criterios de aceptación específicos con referencia a los requisitos establecidos en la especificación del producto final.

**ÁREA DE APLICACIÓN:** Departamentos de Control de Calidad del grupo Octapharma


**AUTOR:** M. Edblad; 16.11.2012 (Validación del Método)

**REVISIÓN:** ..... (Jefe Internacional de la Validación de los Métodos)

**APROBACIÓN:** ..... (Control Corporativo de la Calidad)


..... (Garantía Corporativa de la Calidad)

**Este Procedimiento Operativo Estándar (SOP) define el encuadramiento general necesario para el tema mencionado. Puede ser traducido a los respectivos idiomas, utilizados en las diferentes instalaciones de Octapharma y se complementa con la información adicional de acuerdo con las necesidades locales, siempre y cuando no existan discrepancias o conflictos con la información indicada en el interior del SOP-principal. Las diferentes instalaciones de Octapharma serán responsables por la validez de las traducciones e informaciones adicionales.**

SOP - PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	<b>Control Visual de las Preparaciones Líquidas y la Estabilidad a Corto Plazo de la Albúmina</b>	
	<b>130SOP115/04</b>	Página 2 de 7


### ***HISTORIAL DE REVISIONES***

Versión	Fecha	Motivo de la emisión
130SOP115/04	Nov 16, 2012	Actualización de acuerdo con CC 13803 (relativo Gammanorm y Rhesonativ). La sustitución de los criterios de aceptación específicos con referencia a los requisitos establecidos en la especificación del producto final
130SOP115/03	Feb 22, 2011	Cambio en la redacción de los criterios de aceptación de Gammanorm y Rhesonativ (según CC 2011-028)
130SOP115/02	Nov. 30, 2009	Eliminación de los criterios de aceptación “libre de partículas visibles” para concentrados de inmunoglobulina y de albúmina, porque no está contenida en ninguna de las Especificaciones Principales para dichos productos.
130SOP115/01	Oct. 13, 2008	Control visual de todas las preparaciones líquidas incluidas (según CC08/70)
130SOP115/00	Nov 08, 2005	Definición de un estándar corporativo 1 <sup>ra</sup> emisión

SOP - PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	Control Visual de las Preparaciones Líquidas y la Estabilidad a Corto Plazo de la Albúmina	
130SOP115/04	Página 3 de 7	

## ***TABLA DE CONTENIDOS***

<b>1</b>	<b>FUNDAMENTO DE LA PRUEBA .....</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>EQUIPOS Y REACTIVOS .....</b>	<b>5</b>
3.1	Equipos .....	5
<b>4</b>	<b>PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA .....</b>	<b>5</b>
4.1	Preparación de la muestra .....	5
4.2	Procedimiento .....	5
4.2.1	Control visual de las preparaciones líquidas .....	5
4.2.2	Estabilidad a corto plazo de la Albúmina .....	5
<b>5</b>	<b>EVALUACIÓN.....</b>	<b>6</b>
5.1	Control visual de los líquidos.....	6
5.1.1	Criterio de aceptación .....	6
5.2	Estabilidad a corto plazo de la Albúmina .....	6
5.2.1	Criterio de aceptación .....	6
<b>6</b>	<b>DOCUMENTACIÓN.....</b>	<b>6</b>
<b>7</b>	<b>NOTAS ESPECIALES .....</b>	<b>6</b>
7.1	Volúmenes mínimos de las muestras .....	6
<b>8</b>	<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>7</b>

SOP - PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	<b>Control Visual de las Preparaciones Líquidas y la Estabilidad a Corto Plazo de la Albúmina</b>	
130SOP115/04	Página 4 de 7	


## 1 **FUNDAMENTO DE LA PRUEBA**

Control Visual: En las soluciones parenterales las partículas visibles se evalúan de acuerdo con la Farmacopea Europea.

Estabilidad a corto plazo: La estabilidad del color de la Albúmina humana se controla por la incubación a 57°C y la inspección visual de acuerdo con CFR21.

## 2 **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Corresponding Analytical SOPs of Octapharma subsidiaries in the particular languages
2. Corresponding equipment SOPs of Octapharma subsidiaries in the particular languages
3. Corresponding quality control sheets or database reports of the particular Octapharma subsidiaries
4. Corresponding method validation documents prepared by QC Vienna
5. Corresponding method transfer and comparison documents prepared by QC Vienna
6. 015POL000 - Corporate Change Control Policy
7. European Pharmacopoeia, monograph 2.9.20, Particulate contamination: visible particles
8. CFR 21part 640, Additional standards for human blood and blood products, Subpart H, §640.82 (f) Albumin (Human), Heat stability
9. [Corresponding Final Product Specification \(FPS\) for the respective product and country](#)

SOP - PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	Control Visual de las Preparaciones Líquidas y la Estabilidad a Corto Plazo de la Albúmina	
130SOP115/04	Página 5 de 7	

### 3 EQUIPOS Y REACTIVOS

Equipos, reactivos y otros materiales resaltados en ***negrita, cursiva y subrayado***, son estrictamente obligatorios para cada lugar. Otras marcas de equipos, reactivos y materiales que demostraron y probaron ser válidos. Son solamente sugerencias para su uso y pueden ser sustituidos por un producto de otra marca o proveedor, en caso de que tenga la misma calidad y funcionalidad, cuando el método no se vea afectado por el cambio. En cualquier caso, los cambios tienen que ser manejados de acuerdo con el 015POL000.

#### 3.1 Equipos

- ***Equipos para partículas visibles según la Farmacopea Europea, monografía 2.9.20***
- Incubadora

### 4 PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

#### 4.1 Preparación de la muestra

Para el control visual y la estabilidad a corto plazo, la preparación de la muestra no es necesaria.

#### 4.2 Procedimiento


##### 4.2.1 ***Control visual de las preparaciones líquidas***

Se debe analizar un vial al inicio, a mediados y al final del llenado de cada lote.

Cualquier etiqueta adherente se retira de los envases de la muestra y la parte externa se lava y se seca. Los envases se giran suavemente o se invierten sin introducir burbujas de aire y se observan durante 5 segundos aproximadamente frente a un panel blanco. Luego se repite el procedimiento frente al panel negro.

##### 4.2.2 ***Estabilidad a corto plazo de la Albúmina***

Una botella del envase final se incuba durante 50 horas a 57°C.

SOP - PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	Control Visual de las Preparaciones Líquidas y la Estabilidad a Corto Plazo de la Albúmina	
130SOP115/04	Página 6 de 7	

## 5 EVALUACIÓN

### 5.1 Control visual de los líquidos

Se realiza una inspección visual relativa a la apariencia del producto, según los requisitos establecidos en las especificaciones del producto final.

Se registra cualquier partícula visible.

#### 5.1.1 Criterio de aceptación

Los requisitos establecidos en la especificación del producto final deben cumplirse.

### 5.2 Estabilidad a corto plazo de la Albúmina

Las muestras de albúmina calentadas se comparan visualmente con las muestras del mismo lote que no han pasado por esta fase de calentamiento.

#### 5.2.1 Criterio de aceptación

No deben producirse cambios visibles en las muestras.

## 6 DOCUMENTACIÓN

La siguiente información se indica en los datos en bruto, en las hojas de evaluación adicionales o en los LIMS respectivos. Se debe garantizar una trazabilidad consistente de los resultados:


- Números de los lotes y de viales de las muestras
- Fecha del análisis
- Tiempos exactos del inicio y fin de la incubación
- Nombre del analista y del revisor

## 7 NOTAS ESPECIALES

### 7.1 Volúmenes mínimos de las muestras

Se necesitan tres muestras de los envases finales de cada producto para realizar el control visual.


Para la estabilidad a corto plazo, se necesita un envase final de Albúmina.

SOP - PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	<b>Control Visual de las Preparaciones Líquidas y la Estabilidad a Corto Plazo de la Albúmina</b>	
130SOP115/04	Página 7 de 7	

## 8 ABREVIATURAS

EP ..... Farmacopea Europea  
Ph. Eur. .... Farmacopea Europea  
CFR..... Código de Regulaciones Federales  
QC..... Control de Calidad  
SOP..... Procedimiento Operativo Estándar  
VAL..... Validación  
POL..... Política  
LIMS..... Sistema de Información de Laboratorio



SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS			
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department		<b>Determinación de N-Acetil-DL-triptófano en la solución de albúmina humana y solución de proteínas plasmáticas humanas por SEC-HPLC</b>	
<b>130SOP146/01</b>	reemplaza: 130SOP146/00	Válido desde:	<b>C</b>

**RAZÓN DE EMISIÓN:** actualización después de la revalidación  
cambio de las soluciones de calibración y del rango  
cambio de la prueba de idoneidad del sistema y sus criterios de aceptación  
adición de un cromatograma de ejemplo  
supresión de 2ª columna (TSK gel G300SW)

**ÁREA DE APLICACIÓN:** Departamentos de Control de Calidad del Grupo Octapharma


**AUTOR:** D. Krause, 04.Jul.2008 (Método de Validación)

**REVISIÓN:** ..... (Jefe Internacional de los métodos de validación)

**APROBACIÓN:** ..... (Control Corporativo de la Calidad)


..... (Aseguramiento de la Calidad Corporativa)

**Este Procedimiento Operativo Estándar (SOP), define el encuadramiento general necesario para el tema mencionado. Puede ser traducido a los respectivos idiomas utilizados en las diferentes instalaciones de Octapharma y se complementa con información adicional de acuerdo a las necesidades locales, siempre y cuando no existan discrepancias o conflictos con la información indicada en el interior del SOP-principal. Las diferentes instalaciones de Octapharma serán responsables por la validez de las traducciones e informaciones adicionales.**

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	<b>Determinación de N-Acetil-DL-triptófano en la solución de albúmina humana y solución de proteínas plasmáticas humanas por SEC-HPLC</b>	
	<b>130SOP146/01</b>	Página 2 de 13


### ***HISTORIAL DE REVISIÓN***

<b>Versión</b>	<b>Fecha</b>	<b>Razón de Emisión</b>
000DTM146/00	26.01.1999	1 <sup>ra</sup> edición
000DTM146/01	18.01.2000	<b>ningún cambio</b> en el método analítico de la solución proteica al 5% de plasma humano; Corrección de errores tipográficos
130SOP146/00	08.11.2005	Definición de un estándar a nivel corporativo;
130SOP146/01	03.07.2008	<ul style="list-style-type: none"> <li>• actualización después de la revalidación</li> <li>• cambio de las soluciones de calibración</li> <li>• cambio de la prueba de idoneidad del sistema y sus criterios de aceptación</li> <li>• adición de un cromatograma de ejemplo</li> <li>• supresión de 2<sup>a</sup> columna (TSK gel G300SW)</li> </ul>

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	<b>Determinación de N-Acetil-DL-triptófano en la solución de albúmina humana y solución de proteínas plasmáticas humanas por SEC-HPLC</b>	
130SOP146/01	Página 3 de 13	

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>1</b>	<b>PRINCIPIO DE LA PRUEBA .....</b>	<b>ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAS, LITERATURA.....</b>	<b>ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.</b>
<b>3</b>	<b>EQUIPOS Y REACTIVOS .....</b>	<b>ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.</b>
3.1	Equipos .....	5
3.2	Reactivos.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>4</b>	<b>SOLUCIONES.....</b>	<b>6</b>
4.1	Eluyente .....	6
4.2	Solución de cloruro de sodio, 0.9% (solución salina 0.9%) .....	6
4.3	Gel de filtración estándar .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.4	Solución de hidróxido de sodio, 10% (NaOH 10%).....	7
4.5	Solución Stock del N-Acetil-DL-triptófano, 0.1 g/mL.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.6	Solución de calibración S1 a S3.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>5</b>	<b>PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA .....</b>	<b>ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.</b>
5.1	Preparación de las soluciones de calibración S1 a S3.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
5.2	Preparación de las muestras .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
5.3	Preparación de HPLC y la columna de separación.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
5.4	Prueba del Sistema de Idoneidad .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
5.5	Desempeño del ensayo.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
5.6	Parámetros cromatográficos.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>6</b>	<b>EVALUACIÓN.....</b>	<b>10</b>
6.1	Criterios de aceptación para un resultado de prueba válido .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
6.1.1	Prueba del Sistema de Idoneidad .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
6.2	Muestras .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
6.3	Ejemplo de cromatogramas.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
6.3.1	Producto final de la muestra de albúmina humana.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>7</b>	<b>DOCUMENTACIÓN .....</b>	<b>12</b>
<b>8</b>	<b>NOTAS ESPECIALES .....</b>	<b>ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.</b>
8.1	Conversiones.....	12
8.2	Volumen de la muestra .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>9</b>	<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>13</b>


SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	<b>Determinación de N-Acetil-DL-triptófano en la solución de albúmina humana y solución de proteínas plasmáticas humanas por SEC-HPLC</b>	
130SOP146/01	Página 4 de 13	

## 1 PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El N-Acetil-DL-triptófano se determina por medio de la cromatografía líquida de acuerdo con el principio de la cromatografía de exclusión por tamaño, utilizando un método estándar externo. La detección por UV se realizó a 280nm.

## 2 REFERENCIAS, LITERATURA

1. Corresponding analytical SOPs of Octapharma subsidiaries in the particular languages
2. Corresponding equipment SOPs of Octapharma subsidiaries in the particular languages
3. Corresponding quality control sheets or database reports of the particular Octapharma subsidiaries
4. Corresponding method validation documents prepared by QC Vienna
5. Corresponding method transfer and comparison documents prepared by QC Vienna
6. European Pharmacopoeia, monograph 0255: Human albumin solutions
7. European Pharmacopoeia, general chapters, methods of analysis 2.2.29: Liquid Chromatography
8. European Pharmacopoeia, general chapters, methods of analysis 2.2.46: Chromatographic separation techniques
9. United States Pharmacopoeia, general chapters, <621> Chromatography
10. United States Pharmacopoeia, Official Monographs, Albumin Human
11. 015POL000 - Corporate Change Control Policy


SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS	
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	<b>Determinación de N-Acetil-DL-triptófano en la solución de albúmina humana y solución de proteínas plasmáticas humanas por SEC-HPLC</b>
130SOP146/01	Página 5 de 13

### 3 **EQUIPOS Y MATERIALES**

Equipos, reactivos y otros materiales que resaltan con **negrita, cursiva y subrayado**, son estrictamente obligatorios para cada lugar. Otras marcas de equipos, reactivos y materiales que demostraron y probaron ser válidos. Solamente son sugerencias para su uso y pueden ser sustituidos por un producto de otra marca o proveedor, en caso de que tenga la misma calidad y funcionalidad, cuando el método no se vea afectado por el cambio. En cualquier caso, los cambios tienen que ser manejados de acuerdo con el 015POL000.

#### 3.1 **Equipos**

- El sistema HPLC consta de:
  - La bomba, detector de UV, muestreador automático, ordenador con software de evaluación
- Tamaño de las columnas de exclusión de la cromatografía (TOSOH BIOSCIENCE)
  - TSKgel G3000 SW<sub>XL</sub>**, 7.8 mm ID x 30 cm, tamaño de las partículas de 5µm, más las pre-columna
- Pipetas de pistón y puntas
- Dispensador con Combitips
- Frascos automuestreadores con tapas
- Unidades de filtro desechable, tamaño de poro 0,2 µm, por ejemplo Millex-GV
- Mezclador de la vibración
- Agitador
- Tubos de ensayo desechables
- Material de vidrio, p. ej matraces aforados
- Balanza analítica
- Balance de precisión
- Unidad de la membrana de filtración consiste en:
  - Filtro de membrana, discos de filtro de acetato de (tamaño de poro: ≤ 0,45 µm) y bomba de vacío
- Magnetic stirrer
- Aguja de inyección, estériles
- Jeringas desechables, 2 ml

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	<b>Determinación de N-Acetil-DL-triptófano en la solución de albúmina humana y solución de proteínas plasmáticas humanas por SEC-HPLC</b>	
130SOP146/01	Página 6 de 13	

### 3.2 Reactivos

- Filtración con gel estándar (BIO-RAD) que contiene:

Tiroglobulina,	MW 670 000	5.0 mg
γ- globulina bovina,	MW 158 000	5.0 mg
ovoalbúmina de pollo,	MW 44 000	5.0 mg
equina mioglobina,	MW 17 000	2.5 mg
vitamina B <sub>12</sub> ,	MW 1 350	0.5 mg
- Hidrógeno fosfato disódico dihidrato, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, p.A
- di-Sodio hydrogeno fostato monohidratado, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, p.A.
- Cloruro de sodio, NaCl p.A.
- Azida sódica, NaN<sub>3</sub> como conservante
- Agua para uso en laboratorio, WFL
- N-Acetil-DL-triptófano, pureza ≥ 98%
- Albumin blank sample, e.g. Albumin with a concentration of about 20% without N-Acetyl-DL-Tryptophan
- Control de la muestra, p. ej albúmina humana 20% (OCTAPHARMA)
- Solución de hidróxido de sodio, 50%

## 4 SOLUCIONES

### 4.1 Eluyente

4,87 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 1,74 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O y 11.69g de NaCl se disuelven en 1000ml WFL. 50mg NaN<sub>3</sub> se pueden añadir para su conservación. El tampón de elución se filtró a través de un poro de 0,2µm de tamaño y se desgasifica antes de su uso.


Estabilidad: 1 mes a +2°C y +8°C si se añade NaN<sub>3</sub> como conservante.

### 4.2 Solución de cloruro de sodio, 0.9%, (solución salina 0.9%)

9,0 g de cloruro sódico se disuelven en 1000 ml WFL.

### 4.3 Gel de filtración estándar

Varios de los frascos de gel de filtración estándar se disolvieron cada uno en 1000 µL WFI, se agruparon y se diluyeron 1 + 1 con solución salina al 0,9%. La solución se filtró a través de una unidad de ≤0,45 filtros, en porciones en el frasco de automuestreador (100 µL) y se congelaron a -20°C.

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS	
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	<b>Determinación de N-Acetil-DL-triptófano en la solución de albúmina humana y solución de proteínas plasmáticas humanas por SEC-HPLC</b>
130SOP146/01	Página 7 de 13

#### **4.4 Solución de Hidróxido de sodio, 10% (NaOH 10%)**

La solución de hidróxido sódico 50% se diluyó 1 + 4 con WFL, dando una concentración de 10%.

#### **4.5 Solución Stock del N-Acetil-DL-triptófano, 0.1 g/mL**

1,000 g  $\pm$  1 mg de N-Acetil-DL-triptófano se añaden a 1 mL de NaOH 10% y se llena con WFL a un volumen final de 10 mL.

Si la disolución es incompleta, puede ser añadido de 1 a 2 gotas de NaOH al 10% o adicionalmente la solución se homogeneiza en un baño de ultrasonidos durante aproximadamente 5 minutos.

Estabilidad: 3 meses si se conserva a +2°C y +8°C.


#### **4.6 Solución de calibración S1 a S3**

A partir de la Solución Stock (0,1 g/ml) y una muestra de albúmina en blanco (el contenido de proteína es aproximadamente 20%) las soluciones de calibración se preparan de la siguiente forma:

Nombre	Concentración de N-Acetil-DL-Triptófano [mg/mL]	Muestra blanca de Albúmina [ $\mu$ L]	Solución-Stock [ $\mu$ L]
S1	1	1980	20
S2	3	1940	60
S3	5	1900	100

Si se utiliza otra concentración de proteína, tienen que cambiar las consecuencias de las diluciones.

Estabilidad: 3 meses si se conserva a +2°C y +8°C.

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	<b>Determinación de N-Acetil-DL-triptófano en la solución de albúmina humana y solución de proteínas plasmáticas humanas por SEC-HPLC</b>	
	<b>130SOP146/01</b>	Página 8 de 13


## 5 **PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA**

### 5.1 **Preparación de las soluciones de calibración S1 a S3**

Soluciones de calibración (véase 4,6) se diluyó hasta un contenido de proteína de aprox. 1% con NaCl 0,9%, dando las concentraciones siguientes:

Nombre	Solución de calibración N-Acetil-DL-Triptófano	N-Acetil-DL-Triptófano (dilución considerada)
S1	1 mg/mL	0.05 mg/mL
S2	3 mg/mL	0.15 mg/mL
S3	5 mg/mL	0.25 mg/mL



SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS	
	<b>Determinación de N-Acetil-DL-triptófano en la solución de albúmina humana y solución de proteínas plasmáticas humanas por SEC-HPLC</b>
130SOP146/01	Página 9 de 13

## **5.2 Preparación de las muestras**

Las muestras se diluyeron con solución salina al 0,9% en un contenido de proteína de aprox. 1%. Las soluciones de muestra diluida se pueden filtrar a través de una unidad de filtración de 0,2µm disponibles en frascos automuestreadores automáticos.

## **5.3 Preparación del HPLC y de la columna de separación**

Al comienzo de cada serie de ensayos, durante un período de 15 minutos, el flujo del sistema de HPLC aumenta lentamente a una velocidad del flujo de 0,5mL/min y la columna se equilibra durante 30 minutos.

## **5.4 Prueba del Sistema de Idoneidad**

La prueba de idoneidad del sistema se lleva a cabo utilizando el estándar de filtración en el gel antes de cada secuencia. Las condiciones de separación cromatográficas están en conformidad con el ítem 5.6.

## **5.5 Desempeño del ensayo**

Cada serie de una calibración se lleva a cabo usando las soluciones de calibración S1 a S3 (5.1) donde S1 y S2 son inyectados una vez y S3 es analizado 6 veces para evaluar la precisión de la inyección (parte de la SST) y se realiza al menos 1 inyección de la muestra de control. Una muestra de cada lote es analizada mediante una sola inyección.

## **5.6 Parámetros cromatográficos**


Caudal: 0,5 mL/min, isocrático

Columna: TSK gel G3000SWXL, 7,8 mm de diámetro interior x 30 cm, más pre-columna

Volumen de inyección: 20 µL

Detección: UV 280 nm

Tiempo de ejecución: 35 min

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS	
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	<b>Determinación de N-Acetil-DL-triptófano en la solución de albúmina humana y solución de proteínas plasmáticas humanas por SEC-HPLC</b>
130SOP146/01	Página 10 de 13

## 6 EVALUACIÓN

### 6.1 Criterios de aceptación para un resultado de prueba válido

#### 6.1.1 Prueba del Sistema de Idoneidad

Los valores de la norma de filtración en gel para la gammaglobulina se introducen en la prueba del sistema de idoneidad.

➤ Gel-Filtración estándar:

Platos teóricos del pico de gamma globulina en la norma del Gel-Filtración estándar en:

> 1100

acc. validación: > 1000

En caso de que el resultado de los platos teóricos se encuentra entre 1000 y 1100 y las muestras de control se encuentran dentro de sus límites, la secuencia es válida, pero antes de la secuencia siguiente de la columna tiene que ser cambiado.


- Curva de calibración: correlación tiene que ser igual al menos  $\geq 0.995$
- RSD% del área del pico resultante de la determinación de S3 por 6-veces:  $\leq 5\%$
- Asimetría de N-acetil-DL-triptófano pico entre 0,8 y 1,5
- El resultado de la muestra de control tiene que estar dentro de los límites especificados.

### 6.2 Muestras

Realizar la evaluación de acuerdo con el método estándar externo mediante la calibración con las soluciones arriba mencionadas estándar (1,0 a 5,0 mg / ml) y calcular la función de regresión lineal.

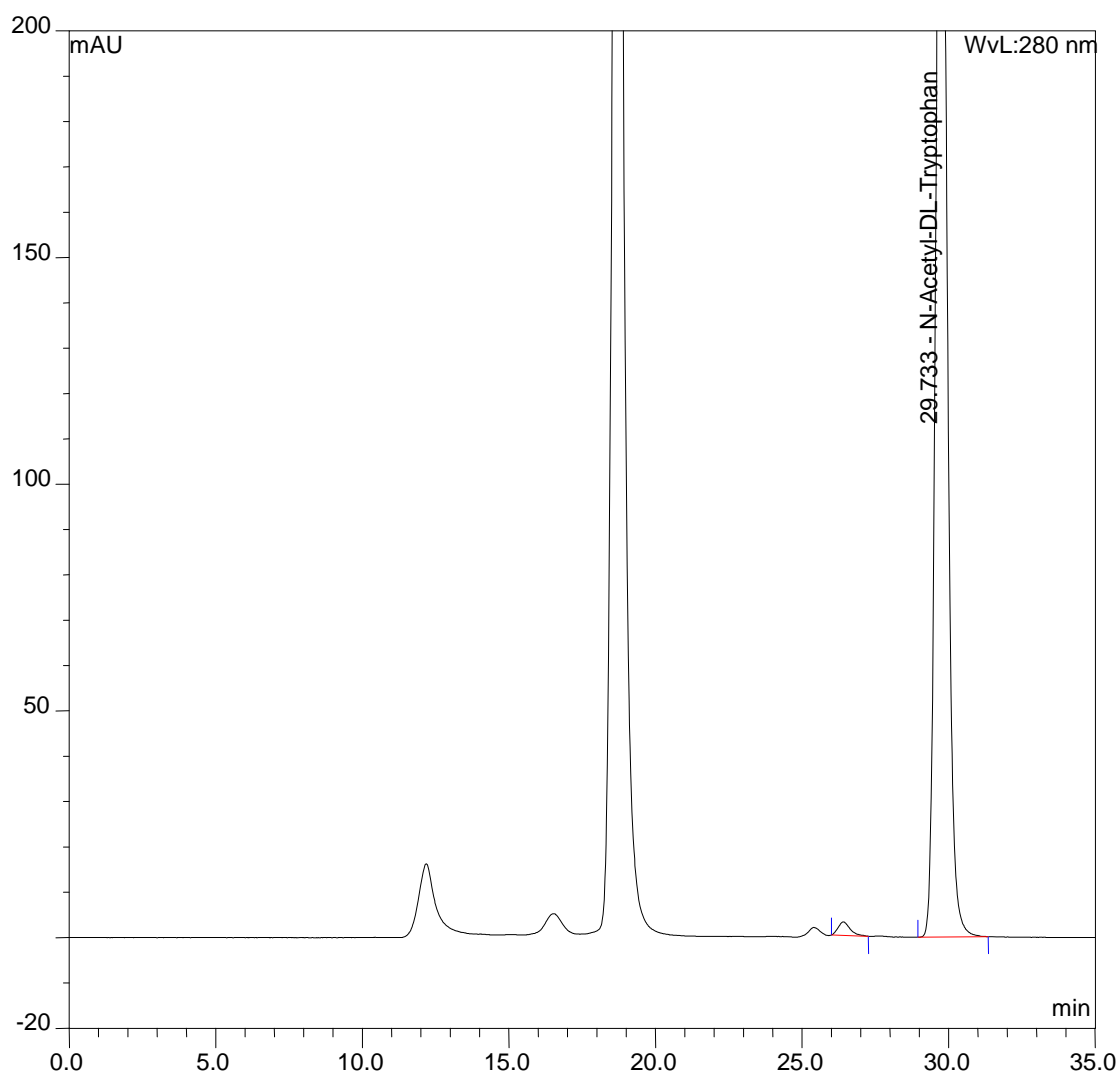
La concentración de N-Acetil-DL-triptófano para el área del pico correspondiente de la muestra desconocida (considerando factores de dilución) se calcula a partir de la función de regresión.


Una regresión lineal se calcula utilizando las áreas de los picos y las correspondientes N-acetil-DL-triptófano, las concentraciones de los patrones inyectados. Esto se hace automáticamente por el software de evaluación. La impresión de la evaluación de la línea de regresión se almacena junto con las primas de los datos de cada secuencia de análisis. Los criterios de aceptación se define en la sección 6.1.1.

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS	
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	<b>Determinación de N-Acetil-DL-triptófano en la solución de albúmina humana y solución de proteínas plasmáticas humanas por SEC-HPLC</b>
130SOP146/01	Página 11 de 13

### 6.3 Ejemplo de cromatograma

#### 6.3.1 Muestra de Producto final de Albúmina Humana



SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS	
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	<b>Determinación de N-Acetil-DL-triptófano en la solución de albúmina humana y solución de proteínas plasmáticas humanas por SEC-HPLC</b>
130SOP146/01	Página 12 de 13

## 7 DOCUMENTACIÓN

La siguiente información debe ser guardada junto con los datos iniciales, hojas adicionales de evaluación o el respectivo LIMS: Se debe asegurar la trazabilidad consistente de los resultados.

- Impresión de la curva de calibración
- Cromatogramas de los estándares y las muestras con los resultados calculados
- cubierta de hoja con un resumen de los resultados del ensayo completo

## 8 NOTAS ESPECIALES

### 8.1 Conversiones


$$\text{N-Acetil-DL-Triptófano [mmol/L]} = \frac{\text{N-Acetil-DL-Triptófano [mg/mL]}}{\text{MW}_{\text{N-Acetil-DL-Triptófano [mg/mmol]}}} \cdot 1000 [\text{mL}]$$

$$\text{N-Acetil-DL-Triptófano [mmol/g Albumin]} = \frac{\text{N-Acetil-DL-Triptófano [mg/mL]}}{\text{MW}_{\text{N-Acetil-DL-Triptófano [mg/mmol]}}} \cdot \frac{100}{\text{Albúmina [g/100mL]}}$$

$$\text{N-Acetil-DL-Triptófano [mmol/g protein]} = \frac{\text{N-Acetil-DL-Triptófano [mg/mL]}}{\text{MW}_{\text{N-Acetil-DL-Triptófano [mg/mmol]}}} \cdot \frac{1000}{\text{proteína [g/L]}}$$

Explanation:

MW      peso molecular del N-Acetil-DL-Triptófano      246.3 mg/mmol  
 1000    Factor de conversión para el cambio de mL a L  
 100      Factor de conversión para considerar el porcentaje de albúmina a partir de la composición de proteínas  
 Albúmina %-resultado de la composición de proteína (electroforesis)  
 proteína    contenido de proteínas nominal


SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	<b>Determinación de N-Acetil-DL-triptófano en la solución de albúmina humana y solución de proteínas plasmáticas humanas por SEC-HPLC</b>	
130SOP146/01	Página 13 de 13	

## 8.2 Volumen de la muestra

Volumen mínimo de la muestra para la prueba: 1 mL

## 9 ABREVIATURAS

AU .....	Unidad de Absorbancia
CAF .....	Película de acetato de celulosa para la electroforesis
CBER.....	Centro de Evaluación e Investigación Biológica
CFR.....	Código de regulaciones federales
EP .....	Farmacopea Europea
HPLC.....	Cromatografía líquida de alto rendimiento
ID .....	Diámetro interior
LIMS.....	Información de laboratorio del sistema de gestión
MW .....	Peso molecular
POL.....	Política
QC.....	Control de Calidad
RSD .....	Desviación estándar relativa
SOP.....	Procedimiento operativo estándar
SST .....	Sistema de idoneidad de prueba
VAL.....	Validación

SOP - PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS			
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department		<b>Determinación de la Proteína Total por el Método de BIURET</b>	
<b>130SOP149/10</b>	Sustituye a: 130SOP149/09	Válido desde:	<b>C</b>

**RAZÓN DE EMISIÓN:** Reanudación de los límites de repetibilidad  
Aplicación de diferentes diluciones a OCTAGAM IP1  
Inclusión de las muestras QAT en-proceso de NewGam  
Sustitución de los controles internos por los controles corporativos  
Inclusión de las muestras a granel S4a después de la validación  
Definición de estabilidad de las muestras de envases finales del fibrinógeno reconstituidas

**ÁREA DE APLICACIÓN:** Departamentos de Control de Calidad del grupo Octapharma


**AUTOR:** J. Müllner, 04.03.2014 (QC de la Validación del método)

**REVISIÓN:** ..... (Jefe Internacional de la Validación de los Métodos)

**APROBACIÓN:** ..... (Control Corporativo de la Calidad)


..... (Garantía Corporativa de la Calidad)

**Este Procedimiento Operativo Estándar (SOP) define el encuadramiento general necesario para el tema mencionado. Puede ser traducido a los respectivos idiomas, utilizados en las diferentes instalaciones de Octapharma y se complementa con la información adicional de acuerdo con las necesidades locales, siempre y cuando no existan discrepancias o conflictos con la información indicada en el interior del SOP-principal. Las diferentes instalaciones de Octapharma serán responsables por la validez de las traducciones e informaciones adicionales.**

SOP - PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	<b>Determinación de la Proteína Total por el Método de BIURET</b>	
	<b>130SOP149/10</b>	Página 2 de 21

### ***HISTORIAL DE REVISIONES***


<b>Versión</b>	<b>Fecha</b>	<b>Motivo de la emission</b>
130SOP149/10	04.03.2014	Reanudación de los límites de repetibilidad de las muestras en proceso y del envase final Aplicación de diferentes diluciones a la muestra IP1 de OCTAGAM, dependiendo del contenido total de proteínas después del cambio de los límites de 30-90 g/l, de acuerdo con CC10/174 Inclusión de las muestras QAT en proceso de NewGam, para la validación del proceso de fabricación Sustitución de los controles internos por los controles corporativos Inclusión de las muestras a granel S4a después de la validación Definición de la estabilidad de la muestra reconstituida de los Envases finales de FIBRINÓGENO Enmiendas editoriales
130SOP149/09	28.02.2013	Definición de la muestra en proceso 1 de Octagam con 30 - 60 g de proteína /L, debe ser probada sin diluir
130SOP149/08	22.11.2012	Inclusión de la determinación de proteínas totales en envases finales de FIBRINÓGENO junto con los factores de corrección correspondientes de Kjeldahl. Adición de una fórmula de evaluación detallada para las muestras con espacios en blanco de las muestras (generalmente sólo se ha mencionado en la versión 06)
130SOP149/07	11.04.2012	Ampliación del ámbito de aplicación de las muestras en proceso y del envase final a NewGam después de la validación
130SOP149/06	20.11.2009	Actualización de la tabla 5.2.1 de la correlación entre las muestras en proceso de Cohn y el fraccionamiento de Kistler Nitschmann

SOP - PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	<b>Determinación de la Proteína Total por el Método de BIURET</b>	
	<b>130SOP149/10</b>	Página 3 de 21

### ***HISTORIAL DE REVISIONES***


<b>Versión</b>	<b>Fecha</b>	<b>Motivo de la emisión</b>
130SOP149/05	09.09.2009	CC 09/103 - Determinación de la proteína total en la muestra FFP mediante el método de Biuret - determinación sencilla y/o determinación doble. 000VAL149 IP 26x/00 Supl. – Cambio de la determinación triple a doble para la Muestra 4 de OCTAPLEX IP
130OP149/04	07.01.2009	El factor de corrección de Kjeldahl ha sido actualizado para Rhesonativ y Gammanorm de acuerdo con el control de cambios 2008-205 (OAB), después de una re-validación. Aclaración en el rendimiento en el análisis de Octaplas.
130SOP149/03	01.09.2008	Inclusión de la designación de muestras en proceso para el fraccionamiento básico según el proceso de Kistler Nitschmann. Sustitución de la tabla de diferencias máximas aceptables, dada en la sección 6.1, por la referencia de la cita correspondiente. Inclusión de las muestras en proceso y del envase final de OCTAPLEX según CC 07/066 (OPG) y de las muestras en proceso y del envase final de OCTAPLAS y UNIPLAS según CC 07/067 (OPG), después de la validación.
130SOP149/02	Julio de 2008	Inclusión de las muestras del envase final y en proceso de GAMMANORM/ RHESONATIV y de las muestras del envase final de ATENATIV según CC 2006-297 en OAB.



SOP - PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	<b>Determinación de la Proteína Total por el Método de BIURET</b>	
	<b>130SOP149/10</b>	Página 4 de 21


### ***HISTORIAL DE REVISIONES***

Versión	Fecha	Motivo de la emisión
130SOP149/01	20.04.2007	<p>Introducción del diluyente para ser usado en blancos de reactivos de las muestras en proceso 1 y 2 de OCTAGAM y omisión de la corrección del cálculo de los resultados de medición tras un estudio de validación complementario según CC 06/98.</p> <p>Inclusión de las muestras de pool de plasma, muestras en proceso 1 a 4 de COHN, muestras 5, 6, A, B, E y G de las muestras en proceso de la Albúmina 4%, 5%, 20% y 25% y del envase final después de la validación según CC 06/99.</p>
130SOP149/00	29.08.2006	<p>Definición de un estándar a nivel corporativo para la armonización de la determinación de las proteínas totales en las muestras en proceso y del envase final de OCTAGAM por el método BIURET tras la validación.</p>


SOP - PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	<b>Determinación de la Proteína Total por el Método de BIURET</b>	
	<b>130SOP149/10</b>	Página 5 de 21

## **TABLA DE CONTENIDOS**

<b>1</b>	<b>FUNDAMENTO DE LA PRUEBA .....</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>7</b>
<b>3</b>	<b>EQUIPOS Y REACTIVOS .....</b>	<b>8</b>
3.1	Equipos .....	8
3.2	Reactivos .....	8
<b>4</b>	<b>SOLUCIONES.....</b>	<b>9</b>
4.1	Reactivo de Biuret.....	9
4.2	Reactivo de la muestra en blanco.....	9
4.3	Solución salina isotónica.....	9
4.4	Diluyente – Solución Salina Isotónica con 10% (w/v) de Maltosa .....	9
4.5	OCTAGAM Estándar corporativo RS122 .....	9
4.6	ALBÚMINA Estándar corporativo RS118 .....	9
4.7	OCTAGAM Control corporativo RS529 .....	9
4.8	ALBÚMINA Control corporativo RS560.....	9
<b>5</b>	<b>PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA .....</b>	<b>10</b>
5.1	Calibración.....	10
5.2	Preparación de las muestras .....	10
5.2.1	Pool de Plasma -, Fraccionamiento Básico - y Muestras En-Proceso de la Albúmina.....	11
5.2.2	Muestras de los Envases Finales de la Albúmina.....	12
5.2.3	Muestras en proceso de OCTAGAM .....	12
5.2.4	Muestras de los envases finales de OCTAGAM.....	12
5.2.5	Muestras en-proceso y de los envases finales de GAMMANORM.....	13
5.2.6	Muestras en-proceso y de los envases finales de RHESONATIV .....	13
5.2.7	Muestras de los envases finales de ATENATIV .....	13
5.2.8	Muestras en-proceso y de los envases finales de OCTAPLEX.....	14
5.2.9	Muestras en-proceso y de los envases finales de OCTAPLAS/UNIPLAS .....	14
5.2.10	Muestras en-proceso de NewGam.....	15
5.2.11	Muestras de los envases finales de NewGam.....	15
5.2.12	Muestras de los envases finales de FIBRINÓGENO .....	16
5.3	Ensayo.....	16

SOP - PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS	
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	<b>Determinación de la Proteína Total por el Método de BIURET</b>
<b>130SOP149/10</b>	Página 6 de 21

<b>6</b>	<b>EVALUACIÓN.....</b>	<b>17</b>
6.1	Muestras sin muestras en blanco.....	17
6.2	Muestras con muestras en blanco.....	17
6.3	Criterios de aceptación para un resultado de prueba válido.....	18
6.3.1	Diferencia máxima aceptable de los valores individuales.....	18
<b>7</b>	<b>DOCUMENTACIÓN.....</b>	<b>19</b>
<b>8</b>	<b>NOTAS ESPECIALES .....</b>	<b>20</b>
8.1	Muestreo.....	20
8.2	Temperatura de incubación.....	20
8.3	Tiempo de incubación.....	20
<b>9</b>	<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>21</b>


SOP - PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	<b>Determinación de la Proteína Total por el Método de BIURET</b>	
130SOP149/10	Página 7 de 21	

## 1 FUNDAMENTO DE LA PRUEBA

Las proteínas forman un complejo coloreado con iones cúpricos en un medio alcalino. Los iones de cobre en el reactivo de Biuret se enlazan a las uniones peptídicas de proteínas formando complejos con un color púrpura, que se pueden medir en la región a 546 nm usando un espectrofotómetro. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de proteínas y se determina fotométricamente.

## 2 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Corresponding Analytical SOPs of Octapharma subsidiaries in the particular languages
2. Corresponding equipment SOPs of Octapharma subsidiaries in the particular languages
3. Corresponding quality control sheets or database reports of the particular Octapharma subsidiaries
4. Corresponding method validation documents prepared by any QC department
5. Corresponding method transfer and comparison documents prepared by QC Vienna
6. 015POL001 - Corporate Change Control Policy
7. [006POL006 Corporate Guidance Procedure Definition and Handling of Quality Control Charts](#)
8. T.E. Weichselbaum. "An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma", Am.J.Clin.Phathol. 16,Tech. Sect. 10, 40-49 (1946)
9. A.G. Gornall, C.J. Bardawill, M.M. David. "Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction", J.Biol. Chem.177, 751-766 (1949)
10. European Pharmacopoeia, Total protein 2.5.33
11. S. Kromidas: Handbuch der Validierung in der Analytik, Wiley VCH (2000)

SOP - PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS	
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	<b>Determinación de la Proteína Total por el Método de BIURET</b>
130SOP149/10	Página 8 de 21

### 3 EQUIPOS Y REACTIVOS


Equipos, reactivos y otros materiales resaltados en ***negrita, cursiva y subrayado***, son estrictamente obligatorios para cada lugar. Otras marcas de equipos, reactivos y materiales que demostraron y probaron ser válidos. Son solamente sugerencias para su uso y pueden ser sustituidos por un producto de otra marca o proveedor, en caso de que tenga la misma calidad y funcionalidad, cuando el método no se vea afectado por el cambio. En cualquier caso, los cambios tienen que ser manejados de acuerdo con el 015POL000.

#### 3.1 Equipos

- Espectrofotómetro UV-VIS (con haz simple o doble)
- PC con software de control y evaluación
- Pipetas y puntas adecuadas para las diluciones de las muestras
- Pipeta adecuada, por ejemplo, Dispensador manual con CombiTips para dispensar el reactivo
- Tubos de pruebas de poliestireno desechables
- Cubetas de poliestireno desechables
- Mezclador de vibración
- Cronómetro

#### 3.2 Reactivos

- Sulfato de pentahidrato de cobre (II) para análisis (por ejemplo, MERCK)
- Gránulos de hidróxido de sodio, para análisis (por ejemplo, MERCK)
- Tetrahidrato de tartrato de sodio de potasio para análisis (por ejemplo, MERCK)
- Yoduro de potasio para análisis (por ejemplo, MERCK)
- **OCTAGAM Estándar corporativo RS122**
- **ALBÚMINA Estándar corporativo RS118**
- **OCTAGAM Control corporativo RS529**
- **ALBÚMINA Control corporativo RS560**
- Cloruro de sodio para análisis (por ejemplo, MERCK)
- Monohidrato de Maltosa (por ejemplo, SIGMA, grado I,)
- Agua para uso en Laboratorio, WFL (OCTAPHARMA)

SOP - PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS	
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	<b>Determinación de la Proteína Total por el Método de BIURET</b>
130SOP149/10	Página 9 de 21

## 4 SOLUCIONES

### 4.1 Reactivo de Biuret

Se disuelven 5.1 g de tetrahidrato de tartrato de sodio de potasio, 5.0 g de yoduro de potasio, 3.0 g de pentahidrato de sulfato de cobre (II) y 8.0 g de hidróxido de sodio en 800 ml de WFL y se llena hasta los 1000 ml. No se añade ningún producto químico hasta que el agregado anterior se haya disuelto completamente; esperar unos 20 minutos entre adiciones. Período de validez: 1 mes entre +15°C y +25°C.

### 4.2 Reactivo de la muestra en blanco

Se disuelven 5.1 g de tetrahidrato de tartrato de sodio de potasio, 5.0 g de yoduro de potasio y 8.0 g hidróxido de sodio en 800 ml de WFL y se llena hasta los 1000 ml. No se añade ningún producto químico hasta que el anterior agregado se haya disuelto completamente, esperar unos 20 minutos entre adiciones. Período de validez: 1 mes entre +15°C y +25°C.

### 4.3 Solución salina isotónica

Se disuelven 9.0 g de cloruro de sodio en WFL dando 1000 ml. Período de validez: Definido en el SOP local respectivo.

### 4.4 Diluyente – Solución Salina Isotónica con 10% (w/v) de Maltosa

Se disuelven 11.0 g de monohidrato de maltosa en 100 ml de solución salina isotónica. Período de validez: 1 mes entre +2°C y +8°C.

### 4.5 OCTAGAM Estándar corporativo RS122

OCTAGAM 5% FC, listo para el uso. Período de validez: un mes entre +2°C y +8°C, después de haber sido utilizado.

### 4.6 ALBÚMINA Estándar corporativo RS118


Albúmina 5% FC, lista para el uso. Período de validez: un mes entre +2°C y +8°C, después de haber sido utilizado.

### 4.7 OCTAGAM Control corporativo RS529

OCTAGAM 5%, listo para el uso. Período de validez: un mes entre +2°C y +8 °C, después de abrirse.

### 4.8 ALBÚMINA Control corporativo RS560

Albúmina 25% FC, lista para el uso. Período de validez: un mes entre +2°C y +8°C, después de abrirse.

SOP - PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS	
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	<b>Determinación de la Proteína Total por el Método de BIURET</b>
<b>130SOP149/10</b>	Página 10 de 21

## **5 PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA**

Todas las soluciones/materiales tienen que ser llevados a temperatura ambiente antes de su uso.

### **5.1 Calibración**


Cada prueba está calibrada frente al actual estándar corporativo aplicando un punto de calibración, utilizando, ya sea RS122 de las muestras en proceso o del envase final para OCTAGAM y NewGam, o RS118 para el resto de las muestras (vea las tablas de la sección 5.2).

### **5.2 Preparación de las muestras**

Las muestras y los controles tienen que ser diluidos en el rango de medición adecuado y validado, si es necesario.

Los estándares tienen que estar preparados por triplicado, las muestras por duplicado, a excepción de las mezclas de plasma (FFP), que se pueden medir por duplicado o como una muestra única. Las diluciones de las muestras, los agentes diluyentes que se utilizarán, así como las muestras y blancos de reactivos necesarios a preparar, se resumen en las siguientes tablas.


Las muestras que contienen maltosa deben ser diluidas con un diluyente; las muestras que no contienen maltosa deben ser diluidas con suero isotónico puro.

SOP - PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department		<b>Determinación de la Proteína Total por el Método de BIURET</b>
<b>130SOP149/10</b>		Página 11 de 21

*5.2.1 Pool de Plasma -, Fraccionamiento Básico - y Muestras En-Proceso de la Albúmina*

Etapas de Producción	Muestra		Contenido Aprox. de Proteínas Totales (g/L)	Dilución Recomendada	Para diluir con	Blanco de Reactivo debe prepararse con
	Cohn	Kistler Nitschmann				
Estándar Corporativo RS118			≈ 50	Sin diluir!	-	Reactivo de Biuret y Solución Salina Isotónica
Fraccionamiento Básico	Pool	FFP/Pool	≥ 50	Sin diluir!	-	
	-	S1	≥ 50		-	
	IP 1	IP1	≥ 44		-	
	IP 3	IP 4	≥ 20		-	
	IP 4	IP 6	≥ 8		-	
Pasta Vg	IP 5	S 2	≈ 80	x 2	Solución Salina Isotónica	
	IP 6	S 3	≈ 80	x 2		
20% A granel	IP A	S 4	≥ 198	x 5		
		S 4a	≥ 200	x 6		
	IP B	S 6	≈ 200	x 4		
25% A granel	IP A	S 4	≥ 250	x 6		
		S 4a	≥ 250	x 6		
	IP B	S 6	≈ 250	x 5		
5% A granel	IP E	S 9	≈ 50	Sin diluir!	-	
4% A granel	IP G	S11	≈ 40		-	



SOP - PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS	
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	<b>Determinación de la Proteína Total por el Método de BIURET</b>
<b>130SOP149/10</b>	Página 12 de 21

### 5.2.2 Muestras de los Envases Finales de la Albúmina


Muestra	Contenido Aprox. de Proteínas Totales (g/L)	Dilución Recomendada	Para diluir con	Blanco de Reactivo debe prepararse con
Estándar Corporativo RS118	≈ 50	Sin diluir!	-	Reactivo de Biuret y Solución Salina Isotónica
Albúmina 4% FC	38 - 42			
Albúmina 5% FC	47 - 53			
Albúmina 20% FC	190 - 210	x 4	Solución Salina Isotónica	
Albúmina 25% FC	235 - 265	x 5		

### 5.2.3 Muestras en proceso de OCTAGAM

Muestra/ Producto	Muestra	Contenido Aprox. de Proteínas Totales (g/L)	Dilución Recomendada	Para diluir con	Blanco de Reactivo debe prepararse con
Estándar Corporativo RS122		≈ 50	Sin diluir!	-	Reactivo de Biuret y Diluyente
5% y 10% A granel	IP 1	61 - 90	x 1.5	Solución Salina Isotónica	
		30 - 60	Sin diluir!		
	IP 2	65 - 75	x 1.5	-	
	IP 4	55 - 65	Sin diluir!		
5% A granel	IP 7	45 - 55	Sin diluir!	-	
10% A granel	IP 7	90 - 120	x 2	Diluyente	

### 5.2.4 Muestras de los envases finales de OCTAGAM

Muestra	Contenido Aprox. de Proteínas Totales (g/L)	Dilución Recomendada	Para diluir con	Blanco de Reactivo debe prepararse con
Estándar Corporativo RS122	≈ 50	Sin diluir!	-	Reactivo de Biuret y Diluyente
OCTAGAM 5% FC	45 - 55	Sin diluir!	-	
OCTAGAM 10% FC	90 - 110	x 2	Diluyente	

SOP - PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS	
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	<b>Determinación de la Proteína Total por el Método de BIURET</b>
<b>130SOP149/10</b>	Página 13 de 21

### 5.2.5 Muestras en-proceso y de los envases finales de GAMMANORM


Muestra	Contenido Aprox. de Proteínas Totales (g/L)	Dilución Recomendada	Para diluir con	Factor de Corrección de Kjeldahl	Blanco de Reactivo debe prepararse con
Estándar Corporativo RS118	≈ 50	Sin diluir!	-	-	Reactivo de Biuret y Solución Salina Isotónica
UF conc., IP	≈ 190	x 4.2	Solución Salina Isotónica	0.878	
Solución a granel, IP	≈ 190	x 4.2		0.878	
Solución de GAMMANORM, FC	165	x 3.3		0.878	

### 5.2.6 Muestras en-proceso y de los envases finales de RHESONATIV

Muestra	Contenido Aprox. de Proteínas Totales (g/L)	Dilución Recomendada	Para diluir con	Factor de Corrección de Kjeldahl	Blanco de Reactivo debe prepararse con
Estándar Corporativo RS118	≈ 50	Sin diluir!	-	-	Reactivo de Biuret y Solución Salina Isotónica
UF conc. (Inmunoglobulina normal y Anti-D), IP	≈ 190	x 4.2	Solución Salina Isotónica	0.878	
Solución a granel. (Inmunoglobulina normal y Anti-D), IP	≈ 190	x 4.2		0.878	
Solución de RHESONATIV, FC	165	x 3.3		0.878	
RHESONATIV, liofilizado, FC	100	x 2		0.878	

### 5.2.7 Muestras de los envases finales de ATENATIV

Muestra	Contenido Aprox. de Proteínas Totales (g/L)	Dilución Recomendada	Factor de Corrección de Kjeldahl	Blanco de Reactivo debe prepararse con
Estándar Corporativo RS118	≈ 50	Sin diluir!	-	Reactivo de Biuret y Solución Salina Isotónica
ATENATIV 500 UI, FC	≈ 18	Sin diluir!	0.956	
ATENATIV 1000 UI, FC	≈ 18	Sin diluir!	0.956	


SOP - PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS	
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	<b>Determinación de la Proteína Total por el Método de BIURET</b>
<b>130SOP149/10</b>	Página 14 de 21

### 5.2.8 Muestras en-proceso y de los envases finales de OCTAPLEX

Muestra	Contenido Aprox. de Proteínas Totales (g/L)	Dilución Recomendada	Blanco de Reactivo debe prepararse con
Estándar Corporativo RS118	≈ 50	Sin diluir!	Reactivo de Biuret y Solución Salina Isotónica
OCTAPLEX IP1	≈ 60		
OCTAPLEX IP2	≈ 25		
OCTAPLEX IP4	≤ 8		
OCTAPLEX IP5	≈ 40		
OCTAPLEX FC	13 - 41		

### 5.2.9 Muestras en-proceso y de los envases finales de OCTAPLAS/UNIPLAS

Muestra	Contenido Aprox. de Proteínas Totales (g/L)	Dilución Recomendada	Blanco de Reactivo debe prepararse con	Blanco de Reactivo de la muestra en blanco debe prepararse con
Estándar Corporativo RS118	≈ 50	Sin diluir!	Reactivo de Biuret y Solución Salina Isotónica	Reactivo de la muestra en blanco y Solución Salina Isotónica
OCTAPLAS/UNIPLAS IP1	50 - 75	Sin diluir!		
OCTAPLAS/UNIPLAS FC	45 - 70			


SOP - PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS	
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	<b>Determinación de la Proteína Total por el Método de BIURET</b>
<b>130SOP149/10</b>	Página 15 de 21

### 5.2.10 Muestras en-proceso de NewGam

Muestra	Contenido de proteínas totales (g/L)	Dilución Recomendada	Para diluir con	Factor de Corrección de Kjeldahl	Blanco de Reactivo debe prepararse con Reactivo de Biuret y
Estándar Corporativo RS122	≈ 50	Sin diluir!	-	-	Diluyente
IP1 (QAT)	15 - 40	Sin diluir!	-	0.84	Solución Salina Isotónica
IP4 (QAT)	5.0 – 20.0	Sin diluir!	-	0.84	Solución Salina Isotónica
IP6 (QAT)	5.0 – 15.0	Sin diluir!	-	0.84	Solución Salina Isotónica
IP 9	5.0 - 10.0	Sin diluir!	-	0.84	Solución Salina Isotónica
IP 11	65 - 85	1 : 1.5	Solución Salina Isotónica	-	Diluyente
IP 11a	65 - 85	1 : 1.5	Solución Salina Isotónica	-	
IP12a (QAT)	55 - 85	1 : 1.5	Solución Salina Isotónica	-	Diluyente
IP13 (QAT)	55 - 80	1 : 1.5	Solución Salina Isotónica	-	Diluyente
IP17 (QAT)	25.0 – 45.0	Sin diluir!	-	-	Diluyente
IP 18b	25 - 45	Sin diluir!	-	-	Diluyente
IP 20	90 - 110	1 : 2	Solución Salina Isotónica	-	Diluyente
IP 21/24	90 - 110	1 : 2	Solución Salina Isotónica	-	Diluyente

### 5.2.11 Muestras de los envases finales de NewGam

Muestra	Contenido de proteínas totales (g/L)	Dilución Recomendada	Para diluir con	Factor de Corrección de Kjeldahl	Blanco de Reactivo debe prepararse con
Estándar Corporativo RS122	≈ 50	Sin diluir!	-	-	Reactivo de Biuret y Diluyente
NewGam FC	90 - 110	1 : 2	Solución Salina Isotónica	-	

SOP - PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS	
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	<b>Determinación de la Proteína Total por el Método de BIURET</b>
<b>130SOP149/10</b>	Página 16 de 21

### 5.2.12 Muestras de los envases finales de FIBRINÓGENO

Muestra	Contenido Aprox. de Proteínas Totales (g/L)	Dilución Recomendada	Factor de Corrección de Kjeldahl	Blanco de Reactivo debe prepararse con
Estándar Corporativo RS118	≈ 50	Sin diluir!	-	Reactivo de Biuret y Solución Salina Isotónica
FIBRINÓGENO FC	14 – 32.5	Sin diluir!	0.818	

Los envases finales de FIBRINÓGENO reconstituidos se pueden almacenar durante un máximo de 24 horas a temperatura ambiente, hasta 72 horas entre +2°C y +8 °C y hasta 28 días a ≤-20 °C.

### 5.3 Ensayo


Se pipetearon 5.0 ml de reactivo de Biuret, 200 µl del estándar o de dilución de la muestra en tubos de poliestireno desechables y bien mezclados.

Un blanco de reactivo con 5.0 ml de reactivo de Biuret y 200 µl de solución salina isotónica o diluyente, dependiendo de la muestra a medir, tiene que ser preparado de acuerdo con la tabla indicada anteriormente.

En el caso de las muestras en proceso y del envase final de OCTAPLAS y UNIPLAS se tienen que preparar por separado una muestra en blanco junto con otra mezcla de 200 µl de muestra y 5.0 ml del blanco de reactivo de la muestra, que tiene que ser determinada frente a un blanco preparado por la mezcla de 200 µl de solución salina isotónica y 5.0 ml del blanco de reactivo de la muestra.

Se determinan las mezclas del ensayo y las muestras en blanco incubadas a temperatura ambiente durante  $30 \pm 10$  minutos y la densidad óptica a 546nm contra el reactivo correspondiente o la muestra en blanco.

El tiempo entre la preparación y las mediciones debe ser el mismo para las muestras y los estándares.

SOP - PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS	
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	<b>Determinación de la Proteína Total por el Método de BIURET</b>
130SOP149/10	Página 17 de 21

## 6 EVALUACIÓN

Las concentraciones de proteínas se calculan por el software de evaluación considerando las densidades ópticas medidas y la concentración de proteínas del estándar en-casa, aplicando una calibración de un punto de acuerdo a la fórmula siguiente.

### 6.1 Muestras sin muestras en blanco

$$C_{Muestra} [g / L] = \frac{OD_{Muestra}}{OD_{Estándar}} \times C_{Estándar} \times DF \times KF [g / L]$$

$C_{Muestra}$  : Concentración de proteína total de la muestra [g/l]

$OD_{Muestra}$  : Densidad óptica de la mezcla de la reacción de la muestra

$C_{Estándar}$  : Concentración de proteína total del estándar [g/l]

$OD_{Estándar}$  : Densidad óptica de la mezcla de la reacción estándar

$DF$  ..... Factor de dilución

$KF$  ... Factor de corrección de Kjeldahl (si es necesario)

### 6.2 Muestras con muestras en blanco

$$C_{Muestra} [g / L] = \frac{(OD_{Muestra} - OD_{Muestrablanca})}{OD_{Estándar}} \times C_{Estándar} \times DF \times KF [g / L]$$

$C_{Muestra}$  : Proteína total de la muestra [g/L]

$OD_{Muestra}$  : Densidad óptica de la mezcla de la reacción de la muestra

$C_{Estándar}$  : Proteína total del estándar [g/L]

$OD_{Estándar}$  : Densidad óptica de la mezcla de la reacción del estándar


$F$  ..... Factor de dilución

$OD_{Muestra \text{ en Blanco}}$  : Densidad óptica de la muestra en blanco

$KF$  ... Factor de corrección de Kjeldahl (si es necesario)

Si es necesario, debe informarse el valor medio de las concentraciones corregido de la muestra en blanco.

En el caso de las muestras en proceso y de los envases finales de GAMMANORM/RHESONATIV y los envases finales de ATENATIV, las muestras en proceso 1 - 9 de NewGam y los envases finales de FIBRINÓGENO, se multiplican por las concentraciones de proteínas del factor de corrección de Kjeldahl respectivo (ver las tablas 5.2.5, 5.2.6, 5.2.7, 5.2.10 y 5.2.12).

SOP - PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	<b>Determinación de la Proteína Total por el Método de BIURET</b>	
130SOP149/10	Página 18 de 21	


### 6.3 **Criterios de aceptación para un resultado de prueba válido**

- El contenido total de proteína presente en la muestra de control tiene que estar dentro de los límites especificados, que se define de acuerdo con 006POL006.
- La diferencia máxima aceptable de los valores individuales no debe exceder el “Límite de Repetibilidad” o “Wiederholgrenze” según la ref. 11, página 65, es decir, 2.8 veces la desviación estándar tomada de los resultados de la precisión de los estudios de validación.

La diferencia máxima aceptable de los valores individuales de GAMMANORM/ RHESONATIV y ATENATIV no debe exceder  $\pm 2\%$  del valor medio.

#### 6.3.1 *Diferencia máxima aceptable de los valores individuales*

<i>Producto</i>	<i>Muestra</i>	<i>Diferencia máxima aceptable de los valores individuales, „Wiederholgrenze“ <math>r^*</math> [g/l]</i>
-	Pool de Plasma	1.0
OCTAGAM	IP1	2.0
	IP2	2.0
	IP4	1.0
	IP6, IP7 y FC 5%	1.0
	IP6, IP7 y FC 10%	2.0
	Pasta II	2.0
NewGam	IP1 (QAT)	0.3
	IP4 (QAT)	0.4
	IP6 (QAT)	0.4
	IP9	0.2
	IP11/IP11a	1.0
	IP12a (QAT)	2.0
	IP13 (QAT)	2.0
	IP17 (QAT)	0.3
	IP18b	0.3
	IP20	2.0
	IP21	2.0
	IP24 (QAT)	2.0
	FC	2.0

SOP - PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	<b>Determinación de la Proteína Total por el Método de BIURET</b>	
	<b>130SOP149/10</b>	Página 19 de 21

ALBÚMINA	COHN IP1	1.0
	COHN IP4 e IP6	0.5
	S2 y S3	2.0
	S4, S4a y S6 (20% y 25%)	5.0
	FC (20% y 25%)	5.0
	S9 y FC 5%	1.0
	FC 4%	1.0
OCTAPLAS	IP 1 y FC	1.0
OCTAPLEX	IP 1/IP 4 y FC	1.5
	IP 2/IP 5	1.0
FIBRINOGEN	IP y FC	0.3


\* derivado del "Límite de repetibilidad" o "Wiederholgrenze" según ref. 11.

## 7 DOCUMENTACIÓN

La siguiente información se indica en los datos en bruto, en las hojas de evaluación adicionales o en los LIMS respectivos. Se debe garantizar una trazabilidad consistente de los resultados.

- Fecha del análisis
- Nombre del analista
- Números de los lotes de reactivos, estándares y controles
- Identificación de la muestra
- OD de estándares, controles y muestras
- Factores de dilución de las muestras
- Contenido total de proteínas en las muestras, considerando las diluciones
- Cálculo de la concentración de proteínas para la muestra de control



SOP - PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS	
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	<b>Determinación de la Proteína Total por el Método de BIURET</b>
130SOP149/10	Página 20 de 21

## 8 NOTAS ESPECIALES

### 8.1 Muestreo

Estándares, muestras y controles deben ser dosificados por pipeteo inverso, con dispensador de mano o por pesaje, considerando el factor de densidad.

### 8.2 Temperatura de incubación


Básicamente, las mezclas de la reacción deben ser incubadas a temperatura ambiente.

La aplicación de la temperatura de incubación de 37°C es posible con la siguiente restricción, derivada de los respectivos estudios de validación:

- Las muestras en proceso y del envase final de OCTAGAM deben ser incubadas exclusivamente a temperatura ambiente, debido a la inestabilidad del complejo formado en presencia de la maltosa a una temperatura más alta.
- Las muestras de GAMMANORM/RHESONATIV y ATENATIV deben ser incubadas a temperatura ambiente.
- Las muestras del pool de plasma, las muestras en proceso y del envase final de Cohn y de Albúmina se pueden incubar a temperatura ambiente y también a 37°C.
- Las muestras en proceso y del envase final de OCTAPLEX deben ser incubadas a temperatura ambiente. Las muestras en proceso 1, 2 y 4 también se pueden incubar a 37°C.
- Las muestras en proceso 1 y del envase final de OCTAPLAS y UNIPLAS deben ser incubadas a temperatura ambiente. Las muestras en proceso 1 también se pueden incubar a 37°C.
- Las muestras del envase final de FIBRINÓGENO deben ser incubadas a temperatura ambiente.


### 8.3 Tiempo de incubación

Los tiempos de incubación a temperatura ambiente deben ser de al menos 20 minutos y pueden extenderse a 90 minutos, los tiempos máximos de incubación a 37°C deben ser de al menos 10 minutos y no deben exceder los 60 minutos.

SOP - PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	<b>Determinación de la Proteína Total por el Método de BIURET</b>	
<b>130SOP149/10</b>	Página 21 de 21	

## 9 ABREVIATURAS

CC.....	Control de Cambios
E.P. Ph. Eur. ....	Farmacopea Europea
FC .....	Envase final
IP.....	Muestras en-Proceso
LIMS.....	Sistema de Información de Laboratorio
POL.....	Política
QAT .....	Atributo de calidad (parámetros bioquímicos determinados dentro del alcance de la validación del proceso, además de las muestras extraídas habitualmente en el proceso)
QC.....	Control de Calidad
SOP .....	Procedimiento Operativo Estándar
VAL.....	Validación

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS	
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	<b>Determinación de la Composición Proteica por Electroforesis en Gel de Agarosa de acuerdo con la Farmacopea Europea y la USP</b>
130SOP176/04	Página 1 de 9

**RAZÓN DE LA EMISIÓN:**

Actualización del texto de los párrafos "Principio", "Procedimiento de la prueba", "Evaluación" y "Criterio de aceptación"

**ÁREA DE APLICACIÓN:**

Departamentos de Control de Calidad del Grupo Octapharma

**AUTOR:**

A C, Fylling 07.09.2012

(Método de Validación)

**REVISIÓN:**

.....

(Director del Método Internacional de Validación)

**APROBACIÓN:**


.....

(Control Corporativo de Calidad)

.....


(Aseguramiento de la Calidad Corporativa)

**Este Procedimiento Operativo Estándar (SOP), define el encuadramiento general necesario para la emisión mencionada. Puede ser traducido a los respectivos idiomas utilizados en las diferentes instalaciones de Octapharma y se complementa con información adicional de acuerdo a las necesidades locales, siempre y cuando no existan discrepancias o conflictos con la información indicada en el interior del SOP-principal. Las diferentes instalaciones de Octapharma serán responsables por la validez de las traducciones e informaciones adicionales.**


SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS	
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	<b>Determinación de la Composición Proteica por Electroforesis en Gel de Agarosa de acuerdo con la Farmacopea Europea y la USP</b>
<b>130SOP176/04</b>	Página 2 de 9

### ***HISTORIAL DE REVISIÓN***

<b>Versión</b>	<b>Fecha</b>	<b>Razón de la Emisión</b>
130SOP176/04	07.09.2012	Actualización del texto de los párrafos "Principio", "Procedimiento de la prueba", "Evaluación" y "Criterio de aceptación"
130SOP176/03	05.10.2011	Revisión después de la validación de la determinación de la composición de proteínas de GAMMANORM y RHESONATIV debido al cambio a electroforesis en gel de agarosa de acuerdo con CC 2010-119
130SOP176/02	06.05.2011	Revisión después de la validación de la determinación de la composición de proteínas de OCTAPLAS y UNIPLAS, y en las muestras 1 en proceso de fraccionamiento básico debido al cambio a electroforesis en gel de agarosa de acuerdo con CC 10/066.


SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS	
 <p>For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department</p>	<b>Determinación de la Composición Proteica por Electroforesis en Gel de Agarosa de acuerdo con la Farmacopea Europea y la USP</b>
<b>130SOP176/04</b>	Página 3 de 9

130SOP176/01	01.12.2010	<p>Revisión después de la validación de la determinación de la composición de proteínas de los envases finales de OCTAGAM 10%, Albúmina 5%, Albúmina 20% y Albúmina 25%, debido al cambio a electroforesis en gel de agarosa de acuerdo con CC 10/066.</p> <p>El cambio del título y del texto debe ser igualmente válido para el sistema de electroforesis HYDRASYS e HYDRASYS 2 de SEBIA.</p>
130SOP176/00	18.06.2010	<p>Nueva edición después de la validación de la determinación de la composición de proteínas del envase final de OCTAGAM 5%, debido al cambio a electroforesis en gel de agarosa de acuerdo con CC 10/066</p>

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS	
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	<b>Determinación de la Composición Proteica por Electroforesis en Gel de Agarosa de acuerdo con la Farmacopea Europea y la USP</b>
<b>130SOP176/04</b>	Página 4 de 9

## ***TABLA DE CONTENIDOS***

<b>1</b>	<b>PRINCIPIO DE LA PRUEBA .....</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAS, LITERATURA.....</b>	<b>5</b>
<b>3</b>	<b>EQUIPOS Y MATERIALES .....</b>	<b>5</b>
3.1	Equipos .....	6
3.2	Reactivos.....	6
3.3	Soluciones .....	6
<b>4</b>	<b>PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA .....</b>	<b>7</b>
4.1	Preparación de la Muestra.....	7
4.2	Puesta en Marcha y Funcionamiento del Sistema de Electroforesis.....	7
4.3	Separación.....	8
4.4	Procesamiento de los Geles de Agarosa .....	8
<b>5</b>	<b>EVALUACIÓN.....</b>	<b>8</b>
5.1	Criterio de Aceptación para un resultado de prueba válido .....	8
<b>6</b>	<b>DOCUMENTACIÓN .....</b>	<b>8</b>
<b>7</b>	<b>NOTAS ESPECIALES .....</b>	<b>9</b>
<b>8</b>	<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.</b>

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS	
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	<b>Determinación de la Composición Proteica por Electroforesis en Gel de Agarosa de acuerdo con la Farmacopea Europea y la USP</b>
<b>130SOP176/04</b>	Página 5 de 9

## **1 PRINCIPIO DE LA PRUEBA**

Las proteínas plasmáticas migran en una solución electrolítica bajo la fuerza de un campo eléctrico. El gel de agarosa es utilizado como medio de soporte en la electroforesis de zona. Se utilizó el tampón TRIS Barbitol con 9,2 de pH como solución electrolítica. El material de ensayo es aplicado cerca del cátodo (-). En el tampón alcalino, después de aplicar el voltaje de corriente directa, las proteínas, de acuerdo al tamaño de su partícula y la carga eléctrica - migran a diferentes velocidades hacia el ánodo (+). Después de ser separados por electroforesis, las proteínas se fijan y tiñen con Negro de Amido. La cuantificación se realiza por densitometría.


Este procedimiento se ha realizado en conformidad con los requisitos de la Farmacopea Europea y la Farmacopea de los Estados Unidos (USP).

## **2 REFERENCIAS, LITERATURA**

1. Corresponding Analytical SOPs of Octapharma subsidiaries in the particular languages
2. Corresponding equipment SOPs of Octapharma subsidiaries in the particular languages
3. Corresponding quality control sheets or database reports of the particular Octapharma subsidiaries
4. 015POL000 - Corporate Change Control Policy
5. European Pharmacopoeia, monograph 0918, Human normal immunoglobulin for intravenous administration
6. European Pharmacopoeia, monograph 0338, Human normal immunoglobulin
7. United States Pharmacopoeia, monograph Immune Globulin
8. European Pharmacopoeia, monograph 0255, Human Albumin Solution
9. United States Pharmacopoeia, monograph Albumin Human
10. European Pharmacopoeia, monograph 1646, Human plasma (pooled and treated for virus inactivation)
11. European Pharmacopoeia, monograph 2.2.31, Electrophoresis
12. United States Pharmacopoeia monograph <726> Electrophoresis

## **3 EQUIPOS Y MATERIALES**

Equipos, reactivos y otros materiales que resaltan con **negrita, cursiva y subrayado**, son estrictamente obligatorios para cada lugar. Otras marcas de equipos, reactivos y materiales se probaron y demostraron ser válidos. Sólo son sugerencias para su uso y pueden ser sustituidos por un producto de otra marca o proveedor, en caso de que tenga la misma calidad y funcionalidad cuando el método no se vea afectado por el cambio. En cualquier caso, los cambios tienen que ser realizados de acuerdo con el 015POL000.

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS	
 <p>For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department</p>	<p><b>Determinación de la Composición Proteica por Electroforesis en Gel de Agarosa de acuerdo con la Farmacopea Europea y la USP</b></p>
130SOP176/04	Página 6 de 9

### 3.1 Equipos

- **Sistema HYDRASYS Semi-automático de Electroforesis en Gel de Agarosa o HYDRASYS 2 de SEBIA**
- Software de Evaluación Dedicado (SEBIA)
- Cámara húmeda (SEBIA)
- Pipetas y puntas apropiadas para las diluciones de las muestras
- Tubos de poliestireno desechables
- Mezclador de vibración
- Cronómetro


### 3.2 Reactivos

- Kit de Proteínas HYDRAGEL 15/30 (SEBIA) que consiste en:
  - 10 Geles de Agarosa, listo para su uso, que contienen 0,8% de agarosa y Tampón Veronal TRIS de pH 9,2±0,1
  - Tiras de tampón, que contienen Tampón Veronal TRIS de pH 9,2±0,1
  - Solución de Tinción de Amido Negro
  - Solución de Tinción del Diluyente
  - Aplicadores para uso único
- **Solución Decolorante (SEBIA)**
- **Solución de Lavado (SEBIA)**
- Cloruro de sodio p.a. (por ejemplo, MERCK)
- **Inmunoglobulina Humana para la Electroforesis BRP (STRASBOURG)**
- **Albúmina Humana para la Electroforesis BRP (STRASBOURG)**
- Plasma Humano Normal, por ejemplo, Control de Plasma N (*Siemens Healthcare Diagnostics*)
- Suero Humano Normal, por ejemplo, N/T Control de Proteínas SL/M (*Siemens Healthcare Diagnostic*)
- Agua para Uso en Laboratorio, WFL

### 3.3 Soluciones

- Solución de Lavado  
Se diluyó 1 vial (80 ml) con 5 litros de WFL.  
Vida útil de +15°C a +25°C: hasta la fecha de caducidad.
- Solución de Tinción de Amido Negro  
El vial del Concentrado de Amido Negro se enjuaga con el diluyente de la solución de tinción y se diluye con 300 ml de WFL. La solución colorante sólo se debe utilizar durante 10 ciclos de tinción.  
Vida útil de +15°C a +25°C: protegido de la luz hasta la fecha de caducidad.



SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS	
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	<b>Determinación de la Composición Proteica por Electroforesis en Gel de Agarosa de acuerdo con la Farmacopea Europea y la USP</b>
<b>130SOP176/04</b>	Página 7 de 9

- Solución Decolorante  
Se llenan 5 ml de solución Decolorante con 5 l de WFL.  
Vida útil de +15°C a +25°C: hasta la fecha de caducidad.
- Solución Salina Isotónica  
Se disuelven 9,0 g de cloruro de sodio en 1000 ml de WFL.  
Vida útil de +2°C a +8°C: 3 meses, y de +20°C a +25 °C durante 1 mes.
- Inmunoglobulina Humana para la Electroforesis BRP  
El estándar liofilizado se disolvió en 1,0 ml de WFL y con una concentración del 5 %. Luego el estándar se dividió en alícuotas y se almacenó a  $\leq -20^{\circ}\text{C}$ . Vida útil  $\leq -20^{\circ}\text{C}$ : 1 año.
- Albúmina Humana para la Electroforesis BRP  
El estándar está listo para el uso y con una concentración del 5%. El estándar se dividió en alícuotas y se almacenó  $\leq -20^{\circ}\text{C}$ . Vida útil  $\leq -20^{\circ}\text{C}$ : 1 año.
- Control de Plasma N  
El estándar liofilizado se disolvió en 1,0 ml de WFL.  
El estándar se dividió en alícuotas y se almacenó  $\leq -20^{\circ}\text{C}$ . Vida útil  $\leq -20^{\circ}\text{C}$ : 1 año.
- N/T Control de Proteínas SL/M  
El estándar está listo para el uso. Vida útil de +2°C a +8°C: 14 días.

#### **4 PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA**

Los sistemas HYDRASYS o HYDRASYS 2<sup>SCAN</sup> son instrumentos multiples-parámetros y semi-automáticos. Las etapas automatizadas incluyen el procesamiento de los geles de agarosa HIDRAGEL en la siguiente secuencia: aplicación de la muestra, migración electroforética, secado, coloración, decoloración, secado final y evaluación densitométrica.

Las etapas manuales incluyen la configuración del instrumento para la operación y el manejo de muestras y geles, la carga de las muestras en los aplicadores de la muestra, la colocación de los aplicadores de la muestra en la cámara de migración, la transferencia de los geles en la cámara de tinción/decoloración y después en el densitómetro.

##### **4.1 Preparación de la Muestra**

Las muestras deben estar a temperatura ambiente antes de usarlas.


Si es necesario, las muestras deben ser diluidas con solución salina isotónica a 50 mg/mL.

Los volúmenes de las muestras establecidos en las instrucciones del fabricante se utilizan mediante el uso de aplicadores de uso único.

Las muestras y los controles se aplicaron a los geles de agarosa mediante el uso de aplicadores de uso único.

##### **4.2 Puesta en Marcha y Funcionamiento del Sistema de Electroforesis**

La puesta en marcha y el funcionamiento del sistema de electroforesis se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS	
	<b>Determinación de la Composición Proteica por Electroforesis en Gel de Agarosa de acuerdo con la Farmacopea Europea y la USP</b>
130SOP176/04	Página 8 de 9

### 4.3 Separación

En cada gel de agarosa, se miden las muestras de control requeridas de "Inmunoglobulina Humana para la Electroforesis BRP" o "Albúmina Humana para la Electroforesis BRP" o Plasma Humano Normal/Suero, respectivamente, para verificar el funcionamiento adecuado del equipo.

### 4.4 Procesamiento de los Geles de Agarosa

Los geles son procesados de acuerdo con los SOP de los instrumentos respectivos, incluyendo la aplicación de las muestras, la migración electroforética, el secado, la coloración, la decoloración y el secado final.

## 5 EVALUACIÓN

Las bandas de proteínas en los geles de agarosa secos son escaneados con un densitómetro. Las proporciones relativas de las bandas de proteínas principales son evaluadas por el software de acuerdo con las especificaciones del fabricante, según se describe en los SOP de los instrumentos respectivos.

### 5.1 Criterio de Aceptación para un resultado de prueba válido


- Plasma Humano Normal debe dar seis bandas diferentes.
- Suero Humano Normal debe dar cinco bandas diferentes.
- La proporción de la banda principal de proteínas de la Inmunoglobulina Humana para la Electroforesis BRP tiene que estar dentro de los límites definidos<sup>1</sup>.
- La proporción de la banda principal de proteínas de la Albúmina Humana para la Electroforesis BRP tiene que estar dentro de los límites indicados en el folleto.

<sup>1</sup>Los límites iniciales de la Inmunoglobulina Humana para la electroforesis BRP 2 de acuerdo al folleto están destinados a la electroforesis de zona con acetato de celulosa como material de apoyo. Pero con el uso de geles de agarosa con un sistema automatizado, los límites para la Inmunoglobulina Humana para la electroforesis BRP 2 se definieron mediante  $\pm 2$  SD de la media de los resultados de al menos seis ocasiones de análisis.

## 6 DOCUMENTACIÓN

La siguiente información está preferentemente indicada dentro de los datos sin procesar, hojas adicionales de evaluación o el respectivo LIMS. De acuerdo a la trazabilidad de los resultados se debe garantizar lo siguiente.

- Cubierta de hoja con un resumen de los resultados de la secuencia completa que contiene:
- El número de secuencia
- Fecha del análisis
- Nombre del analista

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS	
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	<b>Determinación de la Composición Proteica por Electroforesis en Gel de Agarosa de acuerdo con la Farmacopea Europea y la USP</b>
<b>130SOP176/04</b>	Página 9 de 9


- Números de lote y la caducidad de los reactivos y controles
- Identificación de la muestra
- Resultados del control y las mediciones de muestras

## **7 NOTAS ESPECIALES**

- Las muestras y los controles son materiales potencialmente infecciosos. Por lo tanto, para la manipulación de las muestras o controles se deben utilizar guantes.
- Los límites de las fracciones de proteínas de las muestras de control tienen que estar validados y pueden diferir de los límites establecidos en las respectivas farmacopeas europeas. Folleto de los Estándares de Referencia.

## **8 ABREVIATURAS**

BRP..... Preparación de Referencia Biológica  
LIMS..... Sistema de Gestión de Información de Laboratorio  
Ph. Eur. .... Farmacopea Europea  
POL..... Política  
SOP..... Procedimiento Operativo Estándar  
USP..... Farmacopea de los Estados Unidos

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS			
 For the safe and optimal use of human proteins Departamento Corporativo de Control de Calidad		<b>Determinación de Aluminio con Horno de Grafito</b> <b>Espectroscopía de Absorción Atómica</b>	
<b>130SOP314/02</b>	sustituye: 130SOP314/01	Válido desde:	<b>C</b>

**RAZÓN de EMISIÓN:** Adición de la posibilidad de utilizar cualquier espectrofotómetro de absorción atómica, adecuado para el análisis de las trazas de aluminio, de acuerdo con la Farmacopea Europea.  
Muestras añadidas: Octagam 10%  
Cambios de Editorial.

**ÁREA de APLICACIÓN:** Departamentos de Control de Calidad del grupo Octapharma


**AUTOR:** Silva Bergqvist (Método de Validación)  
Junio 24, 2008

**REVISIÓN:** ..... (Jefe Internacional del Método de Validación)

**APROBACIÓN:** ..... (Control Corporativo de Calidad)


..... (Aseguramiento Corporativo de Calidad)

Este Procedimiento Operativo Estándar (SOP) define el encuadramiento general necesario para el tema mencionado. Puede ser traducido a los respectivos idiomas, utilizados en las diferentes instalaciones de Octapharma y se complementa con la información adicional de acuerdo a las necesidades locales, siempre y cuando no existan discrepancias o conflictos con la información indicada en el interior del SOP-principal. Las diferentes instalaciones de Octapharma serán responsables por la validez de las traducciones e informaciones adicionales.

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Departamento Corporativo de Control de Calidad	<b>Determinación de Aluminio con Horno de Grafito</b> <b>Espectroscopía de Absorción Atómica</b>	
	<b>130SOP314/02</b>	Página 2 de 12


### ***HISTORIAL DE REVISIÓN***

<b>Versión</b>	<b>Fecha</b>	<b>Razón de emisión</b>
130SOP314/02	Junio, 2008	Posibilidad de usar cualquier espectrofotómetro de absorción atómica, adecuado para el análisis de trazas de aluminio a 309.3 nm y 396.2 nm, alternativamente, según las instrucciones prescritas por el fabricante con respecto a la longitud de onda (de acuerdo con la Farmacopea Europea). Muestras añadidas: Octagam 10% CC 08/057 (OAB) Cambios de editorial.
130SOP314/01	Nov 10, 2005	Añadir preparación de la muestra de Albuminativ y Octalbin. Aclaración de los criterios de aceptación
130SOP314/00	Julio 27, 2005	1 <sup>ra</sup> edición

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Departamento Corporativo de Control de Calidad	Determinación de Aluminio con Horno de Grafito Espectroscopía de Absorción Atómica	
	130SOP314/02	Página 3 de 12

## ***TABLA DE CONTENIDOS***

<b>1</b>	<b>FUNDAMENTO DE LA PRUEBA .....</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>EQUIPAMIENTOS Y REACTIVOS .....</b>	<b>5</b>
3.1	Equipamientos.....	5
3.2	Reactivos.....	5
3.2.1	Estándar.....	5
3.2.2	Productos químicos y búferes .....	6
3.2.3	Soluciones .....	6
<b>4</b>	<b>PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA .....</b>	<b>7</b>
4.1	Calibración.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.2	Preparación de la Muestra y la Muestra Monitor.....	7
4.3	Inicio de una secuencia .....	8
4.3.1	Preparación del Instrumento .....	8
4.3.2	Análisis de Secuencia.....	9
<b>5</b>	<b>EVALUACIÓN.....</b>	<b>ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.</b>
5.1	Sistema de idoneidad .....	10
5.2	Criterio de aceptación para el resultado válido de una prueba .....	10
<b>6</b>	<b>DOCUMENTACIÓN.....</b>	<b>ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.</b>
<b>7</b>	<b>NOTAS ESPECIALES .....</b>	<b>11</b>
7.1	Datos significativos.....	11
7.2	Volúmenes mínimos de la muestra .....	11
7.3	Características del método .....	11
<b>8</b>	<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.</b>


SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Departamento Corporativo de Control de Calidad	<b>Determinación de Aluminio con Horno de Grafito</b> <b>Espectroscopía de Absorción Atómica</b>	
130SOP314/02	Página 4 de 12	

## **1 FUNDAMENTO DE LA PRUEBA**

El aluminio se determinó con Horno de Grafito por Espectroscopía de Absorción Atómica, utilizando alternativamente la longitud de onda específica para el aluminio, 309,3nm y 396,2nm, aplicando el método I de calibración directa, de acuerdo con la Farmacopea Europea.

## **2 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Corresponding Analytical SOPs of Octapharma subsidiaries in the particular languages
2. Corresponding equipment SOPs of Octapharma subsidiaries in the particular languages
3. Corresponding quality control sheets or database reports of the particular Octapharma subsidiaries
4. Corresponding method validation documents
5. Corresponding method transfer and comparison documents
6. 015POL000 - Corporate Change Control Policy
7. Human Albúmina Solución, Europea Farmacopea

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Departamento Corporativo de Control de Calidad	Determinación de Aluminio con Horno de Grafito Espectroscopía de Absorción Atómica	
130SOP314/02	Página 5 de 12	

### 3 EQUIPAMIENTOS Y REACTIVOS

Equipamientos, reactivos y otros materiales se resaltan con **negrita**, **cursiva** y **subrayado**, siendo estrictamente obligatorio para cada lugar. Otras marcas de equipos, reactivos y materiales demostraron y probaron ser válidos. Solamente fueron sugeridos para el uso y pudieron ser sustituidos por un producto de otra marca o proveedor, en caso de presentar la misma calidad y funcionalidad y el método no se afectó por el cambio. En cualquier caso, los cambios deben ser manejados de acuerdo con el 015POL000.

#### 3.1 Equipamientos

- **Espectrofotómetro Atómico de absorción (AAS), horno de grafito**, equipado con una fuente de aluminio específica y suficiente fondo de corrección, para el análisis de las trazas de aluminio.

El instrumento utiliza un elemento específico de radiación (lámpara de cátodo hueco), utilizando la corrección de fondo Zeeman, es decir, la introducción de un campo magnético pulsado sobre el horno de grafito, la absorción de fondo no especificado para el elemento real podría determinarse y luego se resta.

Instrumentos adecuados: PERKIN ELMER AAnalyst 800 (AA800), VARIAN SPECTRA A-800 Zeeman, o instrumentos equivalentes.

- Copas
- Pipetas
- Matraces aforados, de 10, 100 y 1000 ml

#### 3.2 Reactivos

##### 3.2.1 Estándar


Solución stock:

Aluminio ( $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  en 0.5 M de  $\text{HNO}_3$ ), solución estándar de 1000 mg/L (1.8422-500) obtenida de **Merck**.

Preparación de una solución de trabajo estándar de aluminio (100 mg/L):

Transferir 10 ml de una solución stock estándar de aluminio a un matraz aforado de 100 ml, añadir 2 ml de  $\text{HNO}_3$  supra puro y diluir con agua para Laboratorio (WFL) hasta la marca.



SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Departamento Corporativo de Control de Calidad	Determinación de Aluminio con Horno de Grafito Espectroscopía de Absorción Atómica	
130SOP314/02	Página 6 de 12	

La solución se mantiene en un frasco de plástico lavado con ácido nítrico a temperatura ambiente durante un año.

Preparación de una solución estándar de aluminio (1 mg/L = 1 ppm):

Transferir 100 µl de una solución de trabajo estándar de aluminio a un matraz aforado de 10 ml, añadir 200 µl de HNO<sub>3</sub> supra puro y diluirla con agua para Laboratorio (WFL), hasta la marca.

La solución fue preparada en cada caso para el análisis.

Preparación de una solución estándar a granel (30 µg/L = 30 ppb)

Transferir 30 µl de una solución estándar de aluminio de 1mg/L al recipiente de muestra, agregar 970 µl a la solución de la muestra de dilución.

### **3.2.2 Productos químicos y búferes**

Nitrato de magnesio (Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), supra puro

Triton X-100 (Octoxinol 10).

65 % de Ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>), supra puro

Ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>), solución de lavado, por ejemplo, pro- análisis de HNO<sub>3</sub> diluido al 10%.

WFL, por ejemplo, MilliQ, agua con una resistencia no inferior a 15MΩ

95 % de etanol

Gas Argon, pureza: al menos del 99.996%

### **3.2.3 Soluciones**


0.015 % de Triton X-100; disolver 0.15 g de Triton X-100 (b) en 1000 ml de agua MilliQ.

Solución de la muestra de dilución; 0.5 ml de HNO<sub>3</sub> se añadieron a 100 ml de Triton al 0.015 % X-100.

Modificador de matriz, 2 % de Mg (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; disolver 2 g de Mg (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> en 100 ml de agua MilliQ.

Solución de enjuague adecuada para vidrios/copas: Por ejemplo, ácido nítrico diluido al 10%.

Solución de enjuague: Apropiado para el instrumento AAS (por ejemplo, agua MilliQ, 4 ml de Triton X-100 al 0.015% y 4 ml de HNO<sub>3</sub> al 65 %, volumen final: 1 Litro).

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Departamento Corporativo de Control de Calidad	<b>Determinación de Aluminio con Horno de Grafito</b> <b>Espectroscopía de Absorción Atómica</b>	
	130SOP314/02	Página 7 de 12

## 4 PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

### 4.1 Calibración

A partir de la solución estándar a granel, el instrumento realiza la dilución para que el punto de calibración sea de 3 a 6 en el rango lineal.

### 4.2 Preparación de la Muestra y de la Muestra Monitora

Retirar la cápsula de aluminio con precaución: Enjuagar el tapón con un 95% de etanol para limpiar el polvo de la parte superior. Tenga cuidado al desechar la tapa de aluminio del tapón.

La muestra y la muestra monitor se diluyeron directamente en el recipiente para muestras, con la solución de la dilución de la muestra. Además, la muestra monitora se enriqueció con 20l de una solución estándar de aluminio de 1 mg/l.


#### 1. Preparación de la Muestra

Ejemplo de dilución

Productos	Estimado Al conc. (µg/L)	Volumen de la muestra (µl)	Volumen de dilución (µl)	Factor de dilución
Octagam, 5% y 10%	Menos de 200	200	800	5
	Más de 200	100	900	10
Albúmina al 4%, 5%, 20% y 25 %	Menos de 200	200	800	5
	Más de 200	100	900	10

#### 2. Muestra Monitora

Productos	Estimado Al conc. (µg/L)	Volumen de la muestra (µl)	Volumen de dilución (µl)	Adición de volumen (µl)	Factor de dilución
Octagam, al 5% y 10%	Menos de 200	200	780	20	5
	Más de 200	100	880	20	10
Albúmina al 4%, 5%, 20% y 25 %	Menos de 200	200	780	20	5
	Más de 200	100	880	20	10

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Departamento Corporativo de Control de Calidad	<b>Determinación de Aluminio con Horno de Grafito</b> <b>Espectroscopía de Absorción Atómica</b>	
	130SOP314/02	Página 8 de 12

### 4.3 Inicio de una secuencia

#### 4.3.1 Preparación del Instrumento

Preparar el instrumento de acuerdo con los parámetros del instrumento.

Copa Matriz: añadir modificador de Matriz, 100µl de Mg al 2% (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> y 900µl de WFL.


Copa de Dilución: añadir solución de dilución de la muestra

##### 4.3.1.1 Parámetros del Instrumento

Un ejemplo de configuración del instrumento en VARIAN SPECTRA A-800 Zeeman.

Parámetros	Configuración
Modalidad Instrumento	Absorbancia
Modo de Calibración	Concentración
Modo de Medición	Área del Pico
Corriente Lámpara	10.0 mA
Ancho de ranura	R0.5nm
Longitud de onda	396.2nm
Modo de muestreo	Auto normal
Réplicas Muestras	3
Réplicas Estándar	3
Corrección de Fondo	BC On
Funda de Gas	Argón
Tasa de Reslope	Aprox. 50

Parámetros	Configuración
Inyección de calor	Encendido
Temperatura de la Inyección de calor	60 °C
Tasa Inyección de Calor	5
Unidades de concentración	µg/L (ppb)
Volumen Total	20µl
Volumen de la Muestra	10µl
Conc. a granel	30.00µg/L
Modificador Modo 1	Inyección Co
Modificador Vol. 1	5µl
Estándar 1	9.0µg/L
Estándar 2	15.0µg/L
Estándar 3	45.0µg/L

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Departamento Corporativo de Control de Calidad	Determinación de Aluminio con Horno de Grafito Espectroscopía de Absorción Atómica	
130SOP314/02	Página 9 de 12	

Ejemplo de programa de temperatura (en VARIAN SPECTRA A-800 Zeeman).

Paso no.	Temp. (°C)	Tiempo (seg.)	Flujo de Gas (L/min)	Tipo Gas	Lectura
1	90	45.0	3.0	Normal	No
2	120	20.0	3.0	Normal	No
3	130	10.0	3.0	Normal	No
4	1300	5.0	3.0	Normal	No
5	1300	1.8	3.0	Normal	No
6	1300	2.0	0.0	Normal	Si
7	2600	0.8	0.0	Normal	Si
8	2600	2.0	0.0	Normal	Si
9	2600	2.0	3.0	Normal	No

#### 4.3.2 Análisis de Secuencia

Antes de iniciar el análisis de secuencia de la Prueba en blanco (la solución diluyente de la muestra) y la solución a granel estándar se diluyeron en 10 ppb, verificándose que no presentaba contaminación.

Ejemplo de listas de secuencias para los estándares y las muestras preparadas.

Blanco (solución diluyente de la muestra = Copa de Dilución)

Solución de Calibración 30 ppb (Copa Estándar)

Modificador de Matriz (Copa Matriz)

Estas 3 primeras tazas se situaron en el centro del dispositivo de la muestra.

Muestra 1


Solución de la muestra Monitor 1 (Muestra 1 inoculado con 20 ppb).

Muestra 2

Solución de la muestra Monitor 2 (Muestra 2 inoculado con 20 ppb).

Continuar con 15 muestras.

En cada calibración, la solución de la muestra y la solución del monitor, fueron inyectadas 3 veces.

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Departamento Corporativo de Control de Calidad	Determinación de Aluminio con Horno de Grafito Espectroscopía de Absorción Atómica	
130SOP314/02	Página 10 de 12	

## 5 EVALUACIÓN

El instrumento calcula directamente la cantidad de aluminio en la muestra a partir la curva de calibración. La cantidad encontrada debe ser corregida con el factor de dilución.

### 5.1 Sistema de idoneidad

Calcular la recuperación de la solución del monitor por la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Recuperación} = \frac{(\text{Conc. de la solución monitor} - \text{Conc. de la muestra}) \times 100}{\text{Conc. de la solución monitor nominal}}$$


### 5.2 Criterio de aceptación para el resultado válido de una prueba

- El coeficiente de correlación, r de la linealidad de la calibración ha de ser  $\geq 0.990$ .
- Si la concentración de la muestra diluida excede el nivel superior del rango lineal, es decir, 45 µg/L, una dilución mayor debe hacerse.
- La precisión de la muestra por encima de 15 µg/L ha de ser  $\leq 10\%$  RSD. En caso de contaminación del ambiente, inyecciones indebidas, manejo inadecuado de la muestra, etc, 1 de cada 3 valores de la inyección pueden ser rechazadas.
- La recuperación de la solución monitor debe estar entre 80-120 %

## 6 DOCUMENTACIÓN

La siguiente información está preferentemente indicada dentro de los datos primarios, hojas adicionales de evaluación o de la respectiva LIMS. La capacidad seguimiento coherente de los resultados tiene que estar garantizada.

- Números de lotes y fecha de caducidad de los reactivos y de la preparación estándar.
- Fecha de análisis.
- Nombre del analista.
- Hoja de portada con un resumen de los resultados de la secuencia completa.
- La causa de un resultado rechazado debe ser documentado en los datos sin procesar.

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Departamento Corporativo de Control de Calidad	<b>Determinación de Aluminio con Horno de Grafito</b> <b>Espectroscopía de Absorción Atómica</b>	
130SOP314/02	Página 11 de 12	

## 7 NOTAS ESPECIALES

Los reactivos, así como las muestras, son materiales potencialmente infecciosos. Por lo tanto, para la manipulación de las muestras los guantes tienen que ser usados.

La determinación debe realizarse en muestras recién preparadas.

### 7.1 Datos significativos

Los resultados se indicaron con dos cifras significativas.

Una muestra con una concentración de aluminio por debajo de 15µg/L tuvo una respuesta < 15µg/L.

Los resultados por encima de 100µg/L su respuesta, por ejemplo, si es 115 será de 120µg/L, o si es 114 la respuesta será de 110µg/L.

### 7.2 Volúmenes mínimos de la muestra

Es necesario un mínimo de 1ml de muestra si la dilución no es necesaria.

### 7.3 Características del método


Alrededor de 20 muestras pueden ser analizadas en una secuencia. Si se necesita un nuevo análisis de las muestras debido a problemas con la calibración, esto podría realizarse al día siguiente en las mismas muestras que fueron diluidas.

LOQ es 3µg/L (ppb), (es decir, 15µg/L (ppb) para muestras diluidas x 5).

Rango lineal 3-45µg/L (ppb).

Precisión (repetitividad) de las muestras dentro del ensayo, por encima del límite de cuantificación LOQ, 3µg/L (ppb): 10% RSD

Precisión: 80-120 %

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 For the safe and optimal use of human proteins Departamento Corporativo de Control de Calidad	<b>Determinación de Aluminio con Horno de Grafito</b> <b>Espectroscopía de Absorción Atómica</b>	
130SOP314/02	Página 12 de 12	


## 8 ABREVIATURAS

AAS .....	Espectrofotometría de absorción atómica
EP .....	Farmacopea Europea
LIMS.....	Sistema de Información de Laboratorio
POL.....	Politica
ppb .....	partes por billón = $\mu\text{g/L}$
ppm .....	partes por millón = $\text{mg/L}$
QC.....	Control de Calidad
RSD .....	Desviación estándar relativa
SOP.....	Procedimiento Operativo Estándar
VAL.....	Validación
WFL.....	Agua para Laboratorio








MASTER-SOP FOR MICROBIOLOGICAL DETERMINATIONS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	<b>Testing for Sterility by Membrane Filtration Method according EP and USP</b>	
131SOP120/03	Page 2 of 9	


### ***REVISION HISTORY***

Version	Date	Reason of issue
131SOP120/02	08.01.2009	Change in number of vials for sterility test of large-volume parenterals of batch size more than 500
131SOP120/01	09.10.2006	Consideration of QC of EBEWE Pharma
131SOP120/00	26.09.2005	Definition of a corporate standard 1 <sup>st</sup> issue

MASTER-SOP FOR MICROBIOLOGICAL DETERMINATIONS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	Testing for Sterility by Membrane Filtration Method according EP and USP	
131SOP120/03	Page 3 of 9	

## TABLE OF CONTENTS

<b>1</b>	<b>TEST PRINCIPLE.....</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCES, LITERATURE.....</b>	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>EQUIPMENT AND MATERIAL.....</b>	<b>5</b>
3.1	Equipment .....	5
3.2	Media .....	5
<b>4</b>	<b>TEST PROCEDURE.....</b>	<b>5</b>
4.1	Samples .....	6
4.2	Preparation .....	6
4.3	Filtration.....	6
4.4	Media .....	7
4.5	Incubation.....	7
<b>5</b>	<b>EVALUATION.....</b>	<b>7</b>
<b>6</b>	<b>DOCUMENTATION .....</b>	<b>8</b>
<b>7</b>	<b>ABBREVIATIONS.....</b>	<b>9</b>

MASTER-SOP FOR MICROBIOLOGICAL DETERMINATIONS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	Testing for Sterility by Membrane Filtration Method according EP and USP	
131SOP120/03	Page 4 of 9	


## 1 TEST PRINCIPLE

This test method is specified by the EP and USP as being mandatory for products requiring a test for sterility. However, a satisfactory result only indicates that no contaminating microorganism has been found in the sample examined in the conditions of the test.

The testing for sterility is performed using the membrane filtration method, where the product is transferred through a membrane. Media added enables microorganisms, which have been captured by the membrane, to grow, resulting in a turbidity of the media.

## 2 REFERENCES, LITERATURE

1. Corresponding method SOPs of Octapharma subsidiaries in the particular languages
2. Corresponding equipment SOPs of Octapharma subsidiaries in the particular languages
3. Corresponding Analytical SOPs of EBEWE
4. Corresponding equipment SOPs of EBEWE
5. [Corresponding method validation documents prepared by any QC](#)
6. Corresponding method transfer and comparison documents prepared by any QC
7. 015POL000 - Corporate Change Control Policy
8. Deviation Management SOPs of Octapharma subsidiaries
9. USP – Chapter <71> Sterility Tests
10. EP – Chapter 2.6.1. Sterility

MASTER-SOP FOR MICROBIOLOGICAL DETERMINATIONS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	Testing for Sterility by Membrane Filtration Method according EP and USP	
131SOP120/03	Page 5 of 9	

### 3 EQUIPMENT AND MATERIAL

Equipment, reagents and other material highlighted by **underlined, bold and italic style** is strictly obligatory for each location. Other brands of equipment, reagents and material are already tested and found to be suitable. They are only suggested for use and can be replaced by a product of another brand or supplier in case same quality and same functionality is achieved and the method is not affected by the change. In any case changes have to be handled according 015POL000.

#### 3.1 Equipment


- Laminar Flow in sterility lab or isolator
- Incubation room / Incubator (+ 22,5 °C ± 2,5 °C)
- Incubation room / Incubator (+ 32,5 °C ± 2,5 °C)
- Peristaltic pump (peristaltic pump)
- Sterility Testing System (containers with membranes and hose system)
- Sterile instruments (scissors, tweezers, etc.)
- Fluid Pathway for Sterility Testing (only for testing of Octaplas<sup>®</sup>, Uniplas<sup>®</sup> and Novoplas<sup>®</sup>)

#### 3.2 Media

- Trypcase Soy Broth
- Thioglycollate Broth
- Water for injection (WFI) for reconstitution of lyophilised products
- Rinsing fluid (optional)

### 4 TEST PROCEDURE

The test for sterility must be performed under conditions avoiding cross contamination of the product during testing. For this purposes cleaning procedures and disinfections of the working area are performed prior to and after the test for sterility. However, the microorganisms to be detected during testing must not be affected. The environmental conditions are controlled prior, during and after testing.

MASTER-SOP FOR MICROBIOLOGICAL DETERMINATIONS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	Testing for Sterility by Membrane Filtration Method according EP and USP	
131SOP120/03	Page 6 of 9	

#### 4.1 Samples

- Minimum sample number

**number of containers per batch      minimum number of samples**

≤ 100	10% of the batch, at least 4 containers (whatever is more)
> 100 to 500	10 containers
> 500	2% of the batch or 20 containers (10 containers for large-volume parenterals) whichever is the less

- Sample volume

**filling volume of each container      minimum sample volume for each medium**

< 1 ml	total content of the container
1 ml to 40 ml	half the content of the container, but not less than 1ml
> 40 ml to ≤ 100 ml	20 ml
> 100 ml	10% of the content of the container, but not less than 20 ml

#### 4.2 Preparation

The samples to be tested and the required equipment are transferred into the sterility lab or isolator.


The sterile instruments and the suitable Sterility Testing Systems are taken out of their wrappings. The containers are placed on the designated openings on the peristaltic pump and the tubings are fixed to the peristaltic pump. The openings of the vent filter of the containers of the Sterility Testing System are closed with rubber stoppers to assure filtration of the product through the 0.45 µm membrane (diameter approx. 47 mm).

#### 4.3 Filtration

Avoiding cross contamination, all samples of one batch are transferred into the working area (LF or isolator). Lyophilized products are reconstituted before testing.

After removal of the flip-offs and the needle cover, the needle is pierced through the center of the stopper into the sample container. Filtration is initiated by starting the peristaltic pump.

After filtration of the required volume (see “sample volume”) the needle is withdrawn from the sample avoiding cross contamination and the same procedure is repeated with the next sample (see “minimum sample number”). After the last container has been subjected to this procedure, the membrane if necessary is rinsed with the appropriate rinsing solution. Afterwards the rubber caps are removed from the vent outlets and the filter outlets of the Sterility Testing Systems are closed with the respective closure caps.

MASTER-SOP FOR MICROBIOLOGICAL DETERMINATIONS		
 <p>For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department</p>	<b>Testing for Sterility by Membrane Filtration Method according EP and USP</b>	
131SOP120/03	Page 7 of 9	

#### 4.4 Media

After the transfer of the product through the membranes the containers are filled with media.

100 ml Thioglycollate Broth for detection of anaerobic bacteria

100 ml Tryptcase Soy Broth for detection of aerobic bacteria, molds and spore generating organisms.

Only media according to EP and USP are used.

During the filling of the first container with media the other container is closed with a clamp. After both containers have been filled, the tubing is clamped, withdrawn from the system and cut at a suitable distance from the container. The loose tube ends are connected to vent filter outlets, thus creating a closed system and avoiding a secondary contamination. At the end of a test series, containers without product are filled with media only as a negative control.

For lyophilized products tested, the corresponding water for injection is used as a negative control.

#### 4.5 Incubation

The containers are labeled with the respective labels and are subsequently incubated at the following temperatures:

Thioglycollate Broth: 30 °C to 35 °C

Tryptcase Soy Broth: 20 °C to 25 °C.

The containers are checked on a regular base during their 14-days incubation period.

### 5 EVALUATION

After 14 days of incubation the test for sterility is completed with the final visual inspection. *If no evidence of microbial growth is found, the product to be examined complies with the test for sterility.* The entire batch from which the samples have been taken is declared sterile.

*If evidence of microbial growth is found, the product to be examined does not comply with the test for sterility, unless it can be clearly demonstrated that the test was invalid for causes unrelated to the product to be examined.*


### 6 SPECIAL NOTES

#### 6.1 Method Suitability Test

The method suitability test is performed

- When the test for sterility has to be carried out on a new product.
- Whenever there is a change in the experimental conditions of the test.

The same micro-organisms as those described under 'Growth Promotion of the Media' are used. Incubate the containers containing medium for not more than 5 days.

MASTER-SOP FOR MICROBIOLOGICAL DETERMINATIONS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	Testing for Sterility by Membrane Filtration Method according EP and USP	
131SOP120/03	Page 8 of 9	

If clearly visible growth of micro-organisms is obtained after the incubation, the test can be carried out without further modification.

## 6.2 Growth Promotion of the Media

Test each batch of medium and inoculate with a small number of microorganisms (not more than 100 cfu).

The media are suitable if a clearly visible growth of micro-organisms occurs.

Table 1: Growth Promotion


microorganism	fluid thioglycollate medium	Soya-bean casein digest medium
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 19404 or equivalent	≤ 100 cfu 30 °C to 35 °C	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 or equivalent	≤ 100 cfu 30 °C to 35 °C	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 or equivalent	≤ 100 cfu 30 °C to 35 °C	
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404 or equivalent		≤ 100 cfu 20 °C to 25 °C
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231 or equivalent		≤ 100 cfu 20 °C to 25 °C
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 or equivalent		≤ 100 cfu 20 °C to 25 °C

## 7 DOCUMENTATION

Following information is preferably stated within the raw data, additional evaluation sheets or the respective LIMS. Consistent traceability of results has to be ensured.


- Batch numbers of media and material used
- Date of analysis
- Name of the analyst
- Sample identification



MASTER-SOP FOR MICROBIOLOGICAL DETERMINATIONS		
 For the safe and optimal use of human proteins Corporate Quality Control Department	<b>Testing for Sterility by Membrane Filtration Method according EP and USP</b>	
<b>131SOP120/03</b>	Page 9 of 9	

## 8 ABBREVIATIONS

EP ..... European Pharmacopoeia  
USP ..... United States Pharmacopoeia  
QC..... Quality Control  
SOP ..... Standard Operating Procedure  
POL..... Policy  
LIMS..... Laboratory Information Management System  
LF ..... Laminar Air Flow

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS			
 Corporate Quality Control Department		<b>Prueba de Pirógenos de acuerdo con la Farmacopea Europea</b>	
<b>137SOP030/01</b>	sustituye: 137SOP030/00	Válido desde:	<b>C</b>

**RAZÓN DE EMISIÓN:** Adición de la tabla de velocidad de aplicación (anexo 1)

**ÁMBITO DE APLICACIÓN:** Control de Calidad de los departamentos del grupo Octapharma


**AUTOR:** (Método de Validación)

**REVISIÓN:** (Jefe Internacional de los métodos de validación)

**APROBACIÓN:** (Control Corporativo de la Calidad)


(Aseguramiento Corporativo de la Calidad)

Este Procedimiento Operativo Estándar (SOP) define el encuadramiento general necesario para el tema mencionado. Puede ser traducida a los idiomas respectivos, utilizados en las diferentes instalaciones de Octapharma y se complementa con información adicional de las necesidades locales, siempre y cuando no existan discrepancias o conflictos con la información indicada en el interior del SOP-principal. Las diferentes instalaciones de Octapharma serán responsables por la validez de las traducciones e informaciones adicionales.

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 Corporate Quality Control Department		<b>Prueba de Pirógenos de acuerdo con la Farmacopea Europea</b>
137SOP030/01	PÁGINA 2/6	


### ***REVISIÓN HISTÓRICA***

Versión	Fecha	Motivo de la emisión
137SOP030/00	Septiembre 2005	Definición de estándar corporativo 1ra edición
137SOP030/01	Junio 2008	Adición de la tabla de velocidad de aplicación (anexo 1)

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS	
 Corporate Quality Control Department	<b>Prueba de Pirógenos de acuerdo con la Farmacopea Europea</b>
137SOP030/01	PÁGINA 2/6

## ÍNDICE

<b>1</b>	<b>FUNDAMENTO DE LA PRUEBA .....</b>	<b>ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>EQUIPAMIENTOS Y REACTIVOS .....</b>	<b>3</b>
3.1	Equipamiento .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.2	Especificación Animal .....	3
<b>4</b>	<b>PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA .....</b>	<b>3</b>
4.1	Realización de la prueba preliminar .....	3
4.2	Realización de la prueba principal .....	4
4.3	Determinación de la temperatura inicial y máxima .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>5</b>	<b>EVALUACIÓN .....</b>	<b>4</b>
<b>6</b>	<b>DOCUMENTACIÓN .....</b>	<b>5</b>
<b>7</b>	<b>NOTAS ESPECIALES .....</b>	<b>5</b>
<b>8</b>	<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>5</b>
<b>9</b>	<b>ANEXO .....</b>	<b>6</b>

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS	
 Corporate Quality Control Department	<b>Prueba de Pirógenos de acuerdo con la Farmacopea Europea</b>
137SOP030/01	PÁGINA 3/6

## 1 FUNDAMENTO DE LA PRUEBA

La Prueba de pirógenos está designada para limitar a un nivel aceptable los riesgos de reacción febril en el paciente que recibe la inyección del producto en cuestión. La prueba consiste en medir el aumento de la temperatura de los conejos después de la inyección intravenosa de una solución estéril de la sustancia de ensayo.

## 2 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- European Pharmacopoeia, monograph 2.6.8
- Procedures and facilities complies with the requirements of commission directive 86/609EEC and the national legalisation defined in the animal protection law concerning the protection of animals used for experimental or other scientific procedures

## 3 EQUIPAMIENTO Y MATERIALES

### 3.1 Equipamiento

- Jeringa desechable, estéril, libre de pirógenos y la aguja para inyección intravenosa.
- Balanza, calibrada.
- Temperatura - el dispositivo de detección (por ejemplo, dispositivo eléctrico con una grabadora). Se ha calibrado para garantizar una precisión al menos de 0,1°C. El dispositivo tiene que insertarse en el recto del conejo de prueba, a una profundidad de unos 5 cm. La inserción tiene que ser constante para cualquier conejo. Cuando se utiliza un dispositivo eléctrico, esto puede ser dejado en una posición durante toda la prueba.
- Hábitat para manejo adecuado de los animales y para la prueba

### 3.2 Especificación Animal


Utilice conejos sanos, adultos de ambos sexos con un peso no inferior a 1,5 kg (por ejemplo, Conejo- Nueva Zelanda, Conejo -Rusia), alimentados con una dieta completa y equilibrada que no contenga antibióticos, y no muestren pérdida de peso corporal durante la semana anterior a la prueba. Un conejo no debe ser utilizado en una prueba de pirógenos:

- a) Si se le realizó una prueba de pirógenos negativa en los últimos 3 días o
- b) Si se le realizó en las últimas 3 semanas una prueba de pirógenos donde la sustancia objeto de examen no pasó la prueba.

Los conejos tienen que estar en un área con una temperatura uniforme y libre de perturbaciones que los puedan excitar. El estado de salud de los animales utilizados en esta prueba será verificada para asegurar que todos los animales se encuentran aún en buenas condiciones.

## 4 PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

La prueba se lleva a cabo en un espacio tranquilo, donde no haya riesgo de perturbaciones, o de excitar a los animales, donde la temperatura ambiente esté a 3°C, que asemeje la de su hábitat. Suspender la alimentación de los conejos durante la noche hasta que la prueba termine de completarse. Suspender el agua durante la prueba. Los animales deben ponerse

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS	
 Corporate Quality Control Department	<b>Prueba de Pirógenos de acuerdo con la Farmacopea Europea</b>
137SOP030/01	PÁGINA 4/6

a prueba, al menos, 1 hora antes de iniciar el primer registro de temperatura y permanecer allí durante toda la prueba.

#### **4.1 Realización de la prueba preliminar**

Después de la selección de los animales, 1 a 3 días antes de probar el producto a examinar, tratar a los animales que no se han utilizado durante las últimas 2 semanas mediante la inyección intravenosa de 10 ml / kg de masa corporal de una solución libre de pirógenos con 9 g/l de cloruro de sodio, calentada a cerca de 38,5 ° C. Registrar las temperaturas de los animales, 90 minutos antes de la inyección y continuar durante 3 horas después de la inyección de la solución. Los animales que muestran una variación de su temperatura corporal superior a 0,6 ° C no se utilizan en la prueba principal.

#### **4.2 Realización de la prueba principal**

Para realizar el ensayo principal se utiliza un grupo de tres conejos que se utilizan para cada preparación.

Al encontrarse caliente la preparación líquida debe ser examinada hasta cerca de 38,5 ° C. El producto a ser examinado podrá disolverse, o ser diluido con una solución de cloruro de sodio 9g/l libre de pirógenos, o de otro líquido prescrito en la monografía. A menos que se especifique lo contrario en la monografía individual, se inyectan en la vena marginal de la oreja de cada uno de los tres conejos por lo menos 0.5 ml de la solución de ensayo por kg de peso corporal (anexo 1), completando cada inyección en 4 minutos después del inicio de la administración. No exceder los 10 ml por kg de peso corporal.

#### **Determinación de la temperatura inicial y máxima.**

La "temperatura inicial" de cada conejo es la media de dos lecturas registradas para estos conejos con un intervalo de 30 min en los 40 min antes de la inyección del producto a examinar. La "temperatura máxima" de cada conejo es la temperatura más alta registrada para cada conejo en las 3 horas después de la inyección.


Registrar la temperatura de cada conejo a intervalos que no excedan los 30 minutos, comenzando desde al menos 90 minutos antes de la inyección del producto y seguir 3 horas después de la inyección. La diferencia entre la temperatura máxima y la temperatura inicial de cada conejo se toma como su respuesta. Cuando esta diferencia es negativa, el resultado se considera como una respuesta cero.

Los conejos que muestran una variación de la temperatura mayor a 0,2 ° C entre dos lecturas sucesivas en la determinación de la temperatura inicial, se retiran de la prueba.

En el grupo de prueba usar sólo conejos que presenten una temperatura inicial que no difieran entre sí por más de 1°C. Todos los conejos que registren una temperatura inicial superior a 39,8°C o inferior a 38,0°C se retiran de la prueba.

Todos los animales que participan en un ensayo con sustancias proteicas son sacrificados al final del ensayo.

### **5 EVALUACIÓN**

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS		
 Corporate Quality Control Department		<b>Prueba de Pirógenos de acuerdo con la Farmacopea Europea</b>
137SOP030/01	PÁGINA 5/6	

Después de haber llevado a cabo la primera prueba en un grupo de 3 conejos, repita si es necesario en otros grupos de 3 conejos, hasta un total de cuatro grupos, dependiendo de los resultados obtenidos. Si la respuesta sumada del primer grupo no excede la cifra que figura en la segunda columna de la tabla, el producto pasa la prueba. Si la respuesta sumada supera la cifra en la segunda columna de la tabla, que no exceda la cifra que figura en la tercera columna de la tabla, repita la prueba como se indica más arriba. Si la respuesta sumada supera la cifra que figura en la tercera columna de la tabla, el producto no pasa la prueba.

Conejos utilizados en una prueba de pirógenos cuyo aumento medio de la temperatura es superior a 1,2°C, son permanentemente excluidos.

Número de conejos	El producto será aprobado si la respuesta sumada no excede	El producto será rechazado si la respuesta sumada excede
3	1.15 °C	2.65 °C
6	2.80 °C	4.30 °C
9	4.45 °C	5.95 °C
12	6.60 °C	6.60 °C

## 6 DOCUMENTACIÓN

Los datos siguientes son registrados:


- Medidas de peso corporal
- Dosis aplicadas
- Temperatura de control, temperatura máxima después de la inyección de la preparación, suma de las temperaturas máximas individuales.
- Interpretación de la prueba
- Fecha de la prueba preliminar

## 7 NOTAS ESPECIALES

- Las muestras son materiales potencialmente infecciosos. Entonces, cuando los manipulamos, debe utilizarse guantes.

## 8 ABREVIATURAS

QC..... Control de calidad  
QA.....Aseguramiento de Calidad  
SOP..... Procedimiento Operativo Estándar  
VAL..... Validación  
FC.....Recipiente Final  
ml.....Mililitro  
kg.....Kilogramo

SOP-PRINCIPAL PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS	
 Corporate Quality Control Department	<b>Prueba de Pirógenos de acuerdo con la Farmacopea Europea</b>
<b>137SOP030/01</b>	<b>PÁGINA 6/6</b>

## 9 ANEXO

Anexo 1 ..... Tabla de velocidad de aplicación