

DESARROLLO DE UN NUEVO MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR HEMO EN LA FORMULACIÓN ANT-00

Mislén Gómez Matos; Yenela García Hernández*; Alejandro Echagarrúa Rodríguez; Lais Pérez Pérez; Ana Luisa Cabrera González

Centro Nacional de Biopreparados (BioCen). Carretera Beltrán Km 1,5, Bejucal, 32 600, Mayabeque, Cuba.

yenela@biocen.cu

RESUMEN

ANT-00 es una formulación de origen natural que contiene sangre bovina, en una matriz de otras sustancias naturales. El mismo tiene como compuesto bioactivo de mayor importancia farmacológica la molécula de hemo, que aporta la hemoglobina de la sangre bovina. El objetivo de este trabajo fue desarrollar y validar el método de cuantificación de hemo en ANT-00. El método consistió en la solubilización del hemo en una disolución de NaOH 0,1 mol/L y Tritón X-100 al 2,5 %. La concentración de hemo se determinó espectrofotométricamente a partir de la absorbancia (575 nm) de la muestra y un patrón de trabajo de hematina porcina. Se determinó la influencia en el disolvente de dos concentraciones de NaOH (0,1 y 0,5 mol/L) así como la influencia de la centrifugación. Se calculó el coeficiente de extinción molar de la hematina porcina en las condiciones de trabajo y se realizó un estudio de la estabilidad del patrón de trabajo a la concentración de 60 µg/mL durante 28 días, a temperatura de 2 a 8 °C y de 15 a 25 °C. Se evaluaron los parámetros de especificidad, linealidad, exactitud y precisión. Se obtuvo como resultado que no existen diferencias significativas entre una u otra concentración de NaOH ni entre las muestras centrifugadas o no ($p > 0,05$). El coeficiente de extinción molar de la hematina porcina obtenido fue de $6,465 \pm 0,303 \cdot 10^3$ L/cm.mol. En el estudio de estabilidad se obtuvo que el patrón es estable a temperatura de 2 a 8 °C pero no a temperatura de 15 a 25 °C. El método además mostró ser específico, lineal, exacto y preciso, al cumplir con los criterios de aceptación requeridos.

Palabras claves: Hemo, Espectrofotometría, Validación

DEVELOPMENT OF A NEW ANALYTICAL METHOD FOR HEME QUANTIFICATION IN ANT-00

ABSTRACT

ANT-00 is a formulation of natural origin that contains bovine blood, in a matrix of other natural substances. It has as a bioactive compound of major pharmacological importance the heme molecule, which provides the hemoglobin of bovine blood. The objective of this work was to develop and validate the method of quantification of heme in ANT-00. The method consisted in the solubilization of heme in a solution of NaOH 0.1 mol/L and Triton X-100 2.5%. The heme concentration was determined spectrophotometrically from the absorbance (575 nm) of the sample and a working standard of porcine haematin. The influence of two NaOH concentrations (0.1 and 0.5 mol/L) on the solvent was determined, as well as the influence of centrifugation. The coefficient of molar extinction of porcine haematin was calculated under working conditions and a study of the stability of the working standard at the concentration of 60 µg/mL for 28 days, at a temperature of 2 to 8 °C and of 15 to 25 °C was carried out. The parameters of specificity, linearity, accuracy and precision were evaluated. The result was that there were no significant differences between the NaOH concentrations and between the centrifugated and un-centrifugated samples ($p > 0.05$). The molar extinction coefficient of the porcine haematin obtained was $6.465 \pm 0.303 \cdot 10^3$ L/cm.mol. In the stability study it was obtained that the standard is stable at a temperature from 2 to 8 °C but not at a temperature from 15 to 25 °C. The

method also proved to be specific, linear, accurate and precise, meeting the required acceptance criteria.

Palabras claves: Heme, Spectrophotometry, Validation

INTRODUCCIÓN

ANT-00 es una formulación de origen natural que contiene miel de abejas, sangre bovina, extracto acuoso abomasal, benzoato de sodio y propóleos. La sangre bovina es hidrolizada parcialmente por acción del extracto acuoso abomasal. La miel de abejas, el benzoato de sodio y el propóleos se utilizan como preservantes de la formulación. La misma tiene como compuesto bioactivo de mayor importancia farmacológica la molécula de hemo, que aporta la hemoglobina de la sangre bovina. Esta formulación de acción antianémica se va a emplear como Ingrediente Farmacéutico Activo (IFA) en futuros medicamentos por lo que es necesario desarrollar un método analítico capaz de cuantificar la molécula de hemo.

Los métodos analíticos para la cuantificación de esta molécula se pueden agrupar en tres grupos: espectroscopía de absorción atómica¹, métodos espectrofotométricos que cuantifican hierro como los métodos de la ferrozina² y la o-fenantrolina³ y métodos espectrofotométricos que cuantifican hemoglobina o hemo⁴ como los métodos de la cianometahemoglobina^{5, 6}, la acetona acidificada^{1, 7-10} y la hematina alcalina^{11, 12}. Las dos primeras variantes cuantifican el hierro total presente en la muestra, tanto el hierro hemo como el no hemo, por lo que los métodos de la tercera variante son los más directos.

La validación de un método analítico es el proceso que establece, mediante estudios en laboratorio, que las características de desempeño del método cumplen los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas¹³. En las actividades de control desempeña un papel determinante pues de ellos depende la comprobación confiable y reproducible de los índices de calidad de las materias primas, IFAs y productos terminados, lo cual contribuye notablemente al aseguramiento de la calidad, seguridad y eficacia de los mismos¹⁴. Además, la validación de los métodos analíticos que se emplean para evaluar la calidad durante las producciones farmacéuticas es un requisito para la aprobación del registro sanitario del medicamento para su comercialización^{15, 16}.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar y validar el método de cuantificación de hemo en la formulación ANT-00.

MATERIALES Y MÉTODOS

Todas las materias primas empleadas en el estudio de validación fueron producidas en BioCen (Cuba), excepto la miel de abejas y el propóleos que fueron producidos en APICUBA (Cuba). En todos los casos se cumplió con las especificaciones de calidad establecidas para el control de la calidad de las materias primas. Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica, procedentes de las firmas Merck (Alemania) y Sigma – Aldrich (Merck, Alemania).

Descripción del método analítico

Las muestras de ANT-00 se solubilizaron en una disolución de NaOH 0,1 mol/L y Tritón X-100 al 2,5 %. Luego se midió la absorbancia (ABS) a 575 nm en un espectrofotómetro (Jenway, Reino Unido de Gran Bretaña) utilizando como blanco la disolución de NaOH 0,1 mol/L y Tritón X-100 al 2,5 %. El

contenido de hemo se calculó a partir de un patrón de trabajo de hematina porcina. La suspensión *stock* de ANT-00 se preparó en agua destilada a una concentración de 10 mg/mL.

Desarrollo del patrón de hematina porcina

El patrón de hematina porcina se preparó en el laboratorio a partir de una disolución *stock* de hematina porcina en NaOH y Tritón X-100 a 2,5 mg/mL. Esta disolución fue preparada utilizando el reactivo suministrado por Sigma-Aldrich cuyo contenido de hemo se estimó a partir del contenido de hierro que reporta el certificado del fabricante y fue del 93,5 % .

Cálculo del coeficiente de extinción molar (ϵ) de la hematina porcina

Se prepararon cinco concentraciones diferentes de hematina porcina (20, 40, 60, 80 y 100 $\mu\text{g/mL}$) y se midió la ABS de cada concentración por triplicado. El procedimiento anterior fue realizado por cuatro analistas del laboratorio. Posteriormente se calculó el ϵ de cada valor de concentración obtenido y se determinó el valor promedio del ϵ .

Preparación del patrón de trabajo

A partir del ϵ se calculó el volumen de la solución *stock* necesario para preparar 50 mL de la disolución patrón de trabajo de hematina porcina a la concentración de 60 $\mu\text{g/mL}$, utilizando la disolución de NaOH 0,1 mol/L y Tritón X-100 al 2,5 % y se midió la ABS por triplicado. Se envasó la muestra patrón en bulbos 2R previamente esterilizados con sus respectivos tapones, casquillos y etiquetas de identificación.

Para la lectura del patrón en cada corte se tomaron 3 bulbos de la muestra patrón y se dejaron reposar en el laboratorio durante 1 h para que adquirieran la temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se rompió el sello de los bulbos y se tomaron lentamente 1,5 mL con una jeringuilla de 5 mL, para evitar la formación de espuma y se midió la ABS de las muestras para calcular el promedio.

Estudio de estabilidad

Se realizó un estudio de la estabilidad de vida de estante, el cual tuvo una duración de 28 días con cortes para realizar los ensayos a los 0, 3, 7, 14, 21 y 28 días. Se utilizaron 3 lotes de 36 bulbos cada uno, los cuales se envasaron con 2 mL de disolución de hematina porcina a 60 $\mu\text{g/mL}$ en NaOH 0,1 mol/L y Tritón X-100 al 2,5 %. La mitad de las muestras se almacenaron en refrigeración a la temperatura de 2 a 8 °C y el resto a la temperatura de 15 a 25 °C, ambas protegidas de la luz. Se evaluaron tres muestras de cada lote en cada tiempo experimental. Se midió la ABS de cada muestra y se utilizó como criterio de aceptación que la ABS en el corte donde se realizó la determinación fuera $\geq 97,5\%$ de la ABS determinada en el tiempo 0.

Estandarización del método en muestras de ANT-00

Influencia de la concentración de NaOH

Se evaluó el efecto de dos concentraciones diferentes de NaOH (0,1 y 0,5 mol/L) en la solubilización del hemo que contienen las muestras de la formulación ANT-00. Para ello en seis tubos *Corning* de 15 mL se adicionaron 5 mL de la disolución de NaOH 0,5 mol/L y Tritón X-100 al 5 %. Luego, agitando a baja velocidad, se adicionaron 5 mL de la suspensión *stock* de ANT-00. Se centrifugó a 6471g durante 3 min, se tomaron 1,5 mL del sobrenadante y se midió la ABS. Posteriormente se tomaron otros seis tubos *Corning* de 15 mL y se repitió el procedimiento utilizando una disolución de NaOH 0,1 mol/L y Tritón X-100 al 5 %. Este procedimiento se aplicó a tres lotes de ANT-00. Se

calculó el contenido de hemo en cada muestra y se determinó si existían diferencias significativas entre los valores de contenido de hemo obtenidos aplicando una Prueba de *t* de *Student's* con un nivel de significación de $p < 0,05$.

Influencia de la centrifugación

En 12 tubos *Corning* de 15 mL se adicionaron 5 mL de la disolución de NaOH a la concentración seleccionada en el experimento anterior y Tritón X-100 al 5%, agitando a baja velocidad, se adicionaron 5 mL de la suspensión *stock* de ANT-00. Luego se tomaron seis tubos y se centrifugaron a 6471 g durante 3 min. Posteriormente se tomaron 1,5 mL del sobrenadante de los 12 tubos y se midió la ABS. Se calculó el contenido de hemo en cada muestra. Este procedimiento se aplicó a tres lotes de ANT-00. Se determinó si existían diferencias significativas entre el contenido de hemo aplicando una Prueba de *t* de *Student's* con un nivel de significación de $p < 0,05$.

Cuantificación de hemo en diferentes lotes de ANT-00

Se prepararon las soluciones *stock* de 23 lotes de la formulación ANT-00. Luego en un tubo *Corning* de 15 mL, se adicionaron 5 mL de la disolución de NaOH a la concentración seleccionada en el experimento previo y Tritón X-100 al 5 % y 5 mL de la disolución *stock* de ANT-00. Se homogenizaron los tubos, se tomaron 1,5 mL del sobrenadante y se midió la ABS. Se calculó el contenido de hemo en cada muestra a partir del patrón de concentración de 60 $\mu\text{g/mL}$ y se calculó el contenido promedio de hemo entre los lotes analizados.

Validación del método analítico

Especificidad

Se determinó el contenido de hemo en seis réplicas de muestras de ANT-00 y en seis réplicas de muestras de ANT-00 a las cuales se le adicionaron 2,48 mL de placebo preparado con miel de abejas, propóleos, extracto acuoso abomasal, benzoato de sodio y agua destilada. Después de calcular el contenido de hemo en cada muestra se determinó si existían diferencias significativas entre ambos grupos de muestras aplicando una Prueba de *t* de *Student's* con un nivel de significación de $p < 0,05$. Se realizaron los espectros de absorción al UV-Vis de las muestras de ANT-00, placebo y hemina porcina que se utilizó como patrón de trabajo, desde 545 a 605 nm y se compararon los resultados cualitativamente. Los espectros de absorción de la hemina porcina y de ANT-00 deben ser similares. El placebo no debe absorber en el rango de longitudes de onda de interés analítico para ANT-00.

Linealidad

Se determinó la linealidad del método mediante la cuantificación de hemo en las muestras de ANT-00 y de hemina porcina que se utilizó como patrón de trabajo. En ambas muestras se evaluó el rango de concentraciones de 7,7 a 14,3 mg/g (70 a 130 % del contenido medio de hemo). Posteriormente se realizó el análisis de regresión lineal, utilizando el método de los mínimos cuadrados entre la ABS y la concentración de hemo. Se tomó como criterio de aceptación que el coeficiente de correlación (r) $\geq 0,99$, el coeficiente de determinación (r^2) $\geq 0,98$, la desviación estándar relativa de la pendiente: $S_b(\text{rel}) \leq 2,0 \%$ y el coeficiente de variación de los factores de respuesta: $CV_f \leq 5,0 \%$.

Exactitud

Se determinó la exactitud de la cuantificación de contenido de hemo aportado por ANT-00 en tres muestras a la concentración de 7,7 mg/g de hemo. A dos de estas muestras se le adicionaron cantidades conocidas de hemina porcina (3,3 y 6,6 mg de hemo) y la tercera muestra se utilizó como control. Las muestras presentaron tres niveles de concentración de hemo correspondientes al 70, 100 y 130 %. Se prepararon tres réplicas de cada concentración, se midió la ABS y se determinó la concentración de hemo así como el porcentaje de recuperación en cada muestra. Posteriormente se determinó si existían diferencias significativas entre el porcentaje de recuperación de cada muestra y el 100 % aplicando una Prueba de *t* de Student's con un nivel de significación de $p < 0,05$.

Precisión

Repetibilidad

Se determinó la precisión del ensayo para tres niveles de concentración: 70, 100 y 130 %, para ello se prepararon muestras que contenían 7,7; 11 y 14,3 mg/g de hemo. Se midió la ABS, se determinó la concentración de hemo en cada muestra, así como la concentración de hemo promedio y se calculó el Coeficiente de variación (CV) entre las cuatro réplicas de cada concentración utilizando como criterio de aceptación que el $CV \leq 3,0 \%$.

Precisión Intermedia

La misma se analizó entre dos analistas, para lo cual se repitieron las operaciones del ensayo de repetibilidad por otro analista del mismo laboratorio. Se determinó la concentración de hemo promedio y se calculó el CV entre las ocho réplicas de cada concentración realizada por los dos analistas del laboratorio. Además, este parámetro también se analizó en dos días diferentes por un mismo analista y también se determinó la concentración de hemo promedio y se calculó el CV entre las ocho réplicas de cada concentración realizada en los dos días utilizando como criterio de aceptación que el $CV \leq 3,0 \%$.

Procesamiento estadístico de los resultados

En el procesamiento de los resultados fue empleado el programa Microsoft Excel del paquete de Microsoft Office 2010 y para realizar el análisis estadístico se empleó el programa GraphPadPrism versión 5.0 (Estados Unidos).

RESULTADOS

Desarrollo del Patrón de hematina porcina

Se calculó el ϵ de cada valor de concentración obtenido y se determinó el valor promedio del mismo, el cual fue de $6,465 \pm 0,303 \cdot 10^3 \text{ L/cm.mol}$ (Tabla 1).

Tabla 1. Absorbancia y Coeficiente de extinción molar obtenido para cada concentración de hematina porcina

Concentración (µg/mL)	ABS 1	ABS 2	ABS 3	ABS 4	ABS prom (DE)	ε (10 ³ L/cm.mol)
20	0,216	0,221	0,242	0,196	0,219 (0,019)	6,929
40	0,394	0,411	0,432	0,411	0,412 (0,016)	6,525
60	0,610	0,615	0,617	0,603	0,611 (0,006)	6,454
80	0,798	0,797	0,800	0,786	0,795 (0,006)	6,297
100	0,964	0,964	0,979	0,957	0,966 (0,009)	6,120
Promedio (DE)						6,465 (0,303)

ABS: Absorbancia, DE: Desviación estándar, ε: Coeficiente de extinción molar.

En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos en el estudio de estabilidad del patrón de hematina porcina a las dos temperaturas estudiadas (2 – 8 °C y 15 – 25°C).

Tabla 2. Comportamiento de la absorbancia del patrón de trabajo de hematina porcina durante 28 días

	Lote	Tiempo (d)						Límite de aceptación (97,5 % de la ABS en tiempo 0)
		0	3	7	14	21	28	
Temperatura de 2 – 8 °C								
ABS	1	0,616	0,615	0,614	0,612	0,613	0,608	0,600
	2	0,611	0,598	0,606	0,600	0,602	0,599	0,595
	3	0,620	0,608	0,616	0,604	0,614	0,609	0,604
Temperatura de 15 a 25°C								
ABS	1	0,633	0,629	0,626	0,620	0,608	0,597	0,617
	2	0,602	0,603	0,599	0,592	0,585	0,570	0,587
	3	0,603	0,602	0,600	0,594	0,587	0,569	0,588

ABS: Absorbancia, d: días.

Los resultados de los análisis de regresión lineal que se realizaron para estimar el período de validez, a partir del límite propuesto en el experimento, demostraron que a la temperatura de 2 a 8 °C los tiempos obtenidos fueron para el Lote 1, 66 días; para el Lote 2, 43 días y para el Lote 3, 48 días. En el caso del estudio a la temperatura de 15 a 25 °C los tiempos obtenidos fueron para el Lote 1, 13 días; para el Lote 2, 16 días y para el Lote 3, 16 días (Figuras 1 y 2).

Junio

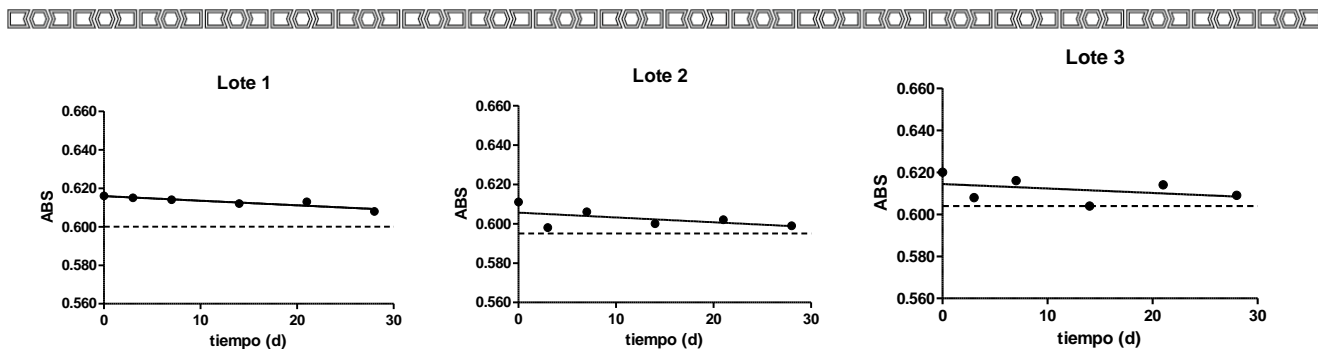


Figura 1. Regresión lineal a la temperatura de 2 – 8 °C

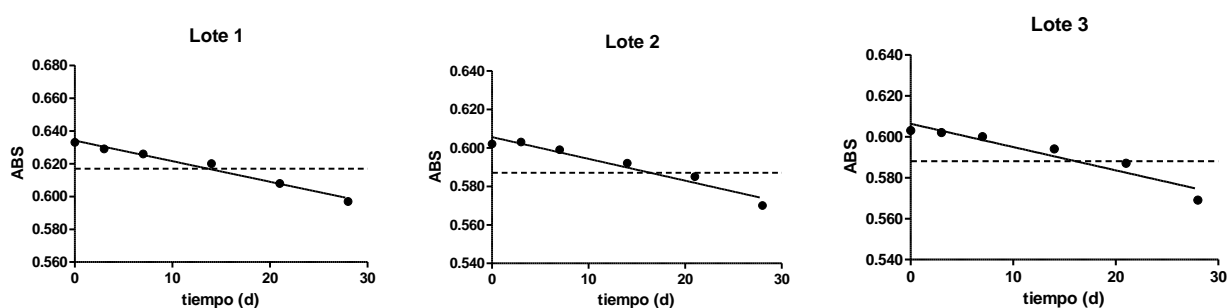


Figura 2. Regresión lineal a la temperatura de 15 – 25 °C

Estandarización del método en muestras de ANT-00

Se determinó que no existían diferencias significativas entre los valores de contenido de hemo obtenidos en las muestras que fueron analizadas con las diferentes concentraciones de NaOH en la disolución de extracción (Lote 01 $p = 0,0654$; Lote 02 $p = 0,0675$; Lote 03 $p = 0,0905$) (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto de la concentración de NaOH en la cuantificación de hemo en las muestras de ANT-00

Concentración de hemo (mg/g)					
Lote 012018		Lote 022018		Lote 032018	
0,1 mol/L	0,5 mol/L	0,1 mol/L	0,5 mol/L	0,1 mol/L	0,5 mol/L
11,21	11,06	11,78	12,00	11,25	11,47
11,44	11,10	12,02	11,80	11,27	11,67
11,34	11,23	11,93	11,69	11,57	11,69
11,21	11,26	12,13	11,84	11,38	11,41
11,07	10,97	12,08	11,78	11,61	11,52
11,22	10,96	11,80	11,71	11,48	11,71
11,25 (0,12)	11,10 (0,12)	11,96 (0,14)	11,80 (0,11)	11,43 (0,15)	11,58 (0,13)

Además también se obtuvo que no existían diferencias significativas entre los valores de hemo obtenidos en las muestras de ANT-00 cuando se mide la ABS sin centrifugar o cuando se aplica

previamente la centrifugación (Lote 042018 $p = 0,1660$; Lote 052018 $p = 0,6803$ y Lote 062018 $p = 0,9311$) (Tabla 4).

Tabla 4. Efecto de la centrifugación en la cuantificación de hemo en las muestras de ANT-00

Concentración de hemo (mg/g)					
Lote 042018		Lote 052018		Lote 062018	
Sin centrifugar	Centrifugado	Sin centrifugar	Centrifugado	Sin centrifugar	Centrifugado
11,41	11,50	12,29	12,31	11,20	11,18
11,45	11,45	12,33	12,44	11,18	11,20
11,49	11,54	12,33	12,29	11,18	11,18
11,49	11,43	12,29	12,27	11,18	11,20
11,45	11,54	12,29	12,31	11,22	11,20
11,45	11,48	12,27	12,31	11,22	11,20
11,46 (0,03)	11,49 (0,04)	12,30 (0,03)	12,32 (0,06)	11,20 (0,02)	11,20 (0,01)

Por otra parte, mediante el análisis del contenido de hemo en 23 lotes de ANT-00 producidos a escala piloto se pudo determinar el valor promedio del analito que fue de $11,55 \pm 0,33$ mg/g.

Validación del método analítico

Especificidad

Los valores de contenido de hemo obtenidos para las muestras de ANT-00 y ANT-00 + placebo fueron de $10,89 \pm 0,05$ (mg/g) y $10,94 \pm 0,04$ (mg/g) respectivamente. Se determinó que no existían diferencias significativas entre los mismos, para un valor de probabilidad de 0,0702 cumpliendo con el criterio de aceptación requerido. En la figura 3 se muestran los espectros de absorción.

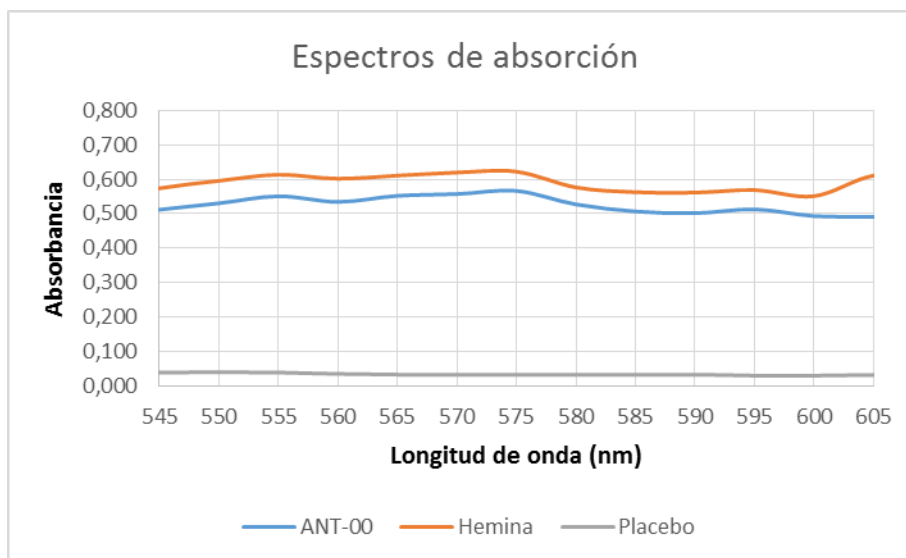


Figura 3. Espectros de absorción

Linealidad

En la figura 4 se muestran los análisis de regresión lineal obtenidos para la hemina porcina y ANT-00. Los valores de los parámetros estadísticos obtenidos para el estudio de linealidad de la hemina

fueron $r^2 = 0,9990$; $r = 0,9995$; $S_b \text{ rel} = 1,35$ y $CV_f = 2,77$. En el caso de ANT-00 los valores obtenidos fueron $r^2 = 0,9999$; $r = 0,9999$; $S_b \text{ rel} = 0,74$ y $CV_f = 2,36$.

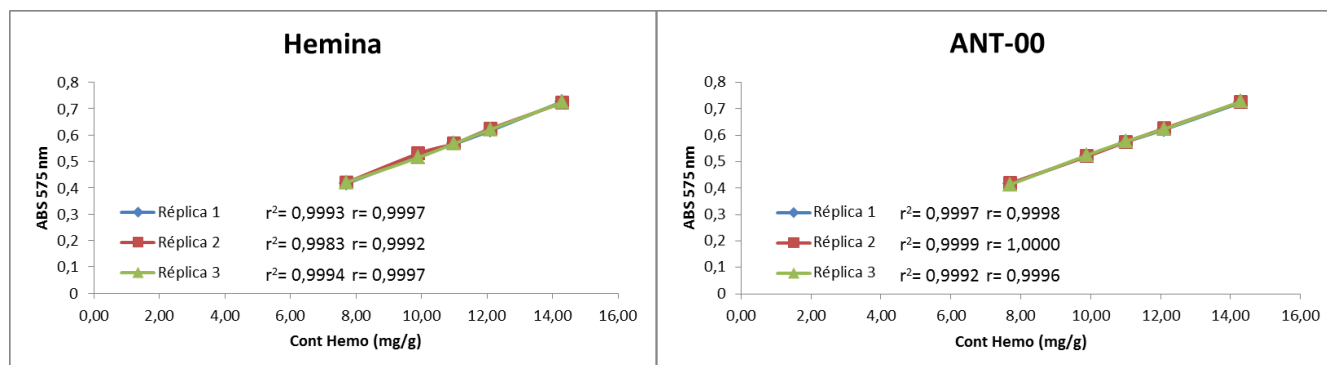


Figura 4. Análisis de regresión lineal en las muestras de hemina porcina y ANT-00.

Exactitud

Se calculó la concentración esperada de hemo en ANT-00 obteniéndose un valor de 7,62 mg/g de hemo. Además, se calculó la concentración esperada de hemo en la hemina para una muestra más concentrada y más diluida, reportando valores de concentración de hemo de 3,3 y 6,6 mg/g respectivamente. Los resultados obtenidos de la ABS y el contenido de hemo de las muestras se presentan en la tabla 5. Se determinó que no existían diferencias significativas entre los porcentajes de recuperación de cada muestra y el 100 %, reportando un valor de p de 0,2697 (Tabla 5).

Tabla 5. Concentración de hemo y porcentaje de recuperación del contenido de hemo a las diferentes concentraciones en la formulación ANT-00

Muestras	Absorbancia				Concentración de hemo promedio (mg/g)		Porcentaje de recuperación (%)
	1	2	3	Promedio	Valor calculado	Valor esperado	
1	0,394	0,393	0,394	0,394	7,62	7,62	100
2	0,565	0,563	0,567	0,565	10,94	10,92	100
3	0,728	0,738	0,722	0,729	14,12	14,22	99

Precisión

En la tabla 6 se muestran los resultados obtenidos en el estudio de la repetibilidad de la concentración de hemo para un analista así como los CV obtenidos.

Tabla 6. Repetibilidad del método de cuantificación de hemo en la formulación de ANT-00

Muestra	Concentración de hemo (mg/g)					CV (%)
	R1	R2	R3	R4	Promedio (DE)	
1	7,68	7,68	7,72	7,70	7,69 (0,02)	0,24
2	10,83	10,85	10,87	10,83	10,85 (0,02)	0,17
3	13,73	13,73	13,87	13,85	13,80 (0,07)	0,53

DE: Desviación estándar, CV: Coeficiente de variación.

Los resultados de la precisión intermedia del método analítico en relación a la cuantificación de hemo obtenidos por un mismo analista en dos días diferentes y por dos analistas se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Precisión intermedia del método de cuantificación de hemo en la formulación de ANT-00 para un analista en dos días diferentes y para dos analistas

Muestra	Concentración de hemo (mg/g)								CV (%)
	Día 1				Día 2				
	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4	
1	7,68	7,68	7,72	7,70	7,63	7,61	7,63	7,63	0,51
2	10,83	10,85	10,87	10,83	10,94	10,90	10,98	10,94	0,51
3	13,73	13,73	13,87	13,85	14,10	13,94	13,98	14,12	0,61
	Analista 1				Analista 2				
1	7,68	7,68	7,72	7,70	7,75	7,81	7,81	7,81	0,73
2	10,83	10,85	10,87	10,83	11,00	11,06	11,04	11,04	0,95
3	13,73	13,73	13,87	13,85	13,93	13,86	13,99	13,90	0,64

CV: Coeficiente de variación.

DISCUSIÓN

Desarrollo del Patrón de hematina porcina

En el laboratorio no se cuenta con un material de referencia y se decidió utilizar el reactivo de Sigma Aldrich. El peso a tomar para preparar una disolución *stock* del reactivo es muy pequeño por lo que se determinó el valor del ϵ ya que con este parámetro se puede calcular de forma más precisa la concentración de hematina porcina en una disolución patrón preparada en el laboratorio.

El estudio de la estabilidad de la solución de hematina porcina demostró que durante los 28 días del estudio a la temperatura de 2 a 8 °C la ABS se mantuvo dentro de los límites de aceptación ($\geq 97,5$ % de la ABS en tiempo 0), sin embargo a la temperatura de 15 a 25 °C los lotes no se mantuvieron dentro de los límites de aceptación. El límite de aceptación fue seleccionado calculando cuanto representa en valor de ABS la desviación estándar obtenida durante el cálculo de la concentración de hemo promedio en 23 lotes de ANT-00. El período de validez estimado a la temperatura de 2 a 8 °C fue superior al período propuesto. En el caso del estudio a la temperatura de 15 a 25 °C los tiempos obtenidos fueron menor que el periodo propuesto por lo que el patrón es estable a temperatura de 2 a 8 °C durante 43 días y a temperatura de 15 a 25 °C durante 13 días.

Estandarización del método en muestras de ANT-00

A partir de los resultados obtenidos se seleccionó la concentración de NaOH 0,1 mol/L ya que utilizar la disolución de menor concentración tiene ventajas prácticas pues implica un ahorro de reactivo y también disminuye los daños que puede provocar este reactivo por contacto a la salud de los trabajadores y al medio ambiente. Mediante este experimento quedó demostrado que una variación en la concentración del disolvente no varía ni afecta los resultados obtenidos durante el método.

Se decidió estudiar el efecto de la centrifugación en las muestras debido a la composición heterogénea de la formulación ANT-00 al ser de origen natural y biológico. Se podía esperar que la muestra no se solubilizara totalmente en el disolvente y los compuestos no solubles podían aportar turbidez a la muestra de ensayo. No obstante, los resultados demuestran que no es necesario el paso de centrifugación de las muestras, lo cual constituye también una ventaja desde el punto de vista práctico para el método analítico ya que reduce el tiempo del ensayo.

Los resultados obtenidos en la determinación de hemo en 23 lotes de ANT-00 permitieron establecer el valor medio del contenido de hemo así como los límites superior e inferior de aceptación en la especificación de calidad del ingrediente activo ANT-00.

Este método demostró ser robusto ya que la variación de los factores seleccionados (concentración de NaOH y centrifugación) no afectó el resultado del método analítico.

Validación del método analítico

Los resultados obtenidos en la especificidad permiten afirmar que el método propuesto es específico para la cuantificación de hemo en la formulación de ANT-00 y que los demás componentes de la formulación no interfieren en la determinación del mismo.

En el estudio de la linealidad se obtuvo que tanto para la hemina como para ANT-00, al aumentar la concentración de hemo, aumenta también la ABS de forma proporcional, lo cual quedó demostrado con los valores de r^2 de las curvas, los cuales fueron mayores de 0,98, así como en relación al resultado de r , los cuales se mantuvieron por encima de 0,99. También se comprobó la linealidad del método pues S_b (rel) fue menor del 2 % y el CV_f fue menor del 5 % cumpliendo así con el criterio de aceptación requerido.

La exactitud es la diferencia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor verdadero. Una diferencia grande significa que la exactitud es inadecuada y revela la existencia de un error sistemático que debe ser corregido. La exactitud se expresa matemáticamente en forma de porcentaje de recuperación entre el valor hallado y el verdadero¹⁶. Los resultados obtenidos mostrados en la tabla 5 se corresponden con el criterio de aceptación establecido en este trabajo. Por lo tanto se demuestra que el método utilizado en la presente investigación permite determinar con exactitud el contenido de hemo en la formulación ANT-00.

La precisión de un método analítico expresa el grado de dispersión de los resultados obtenidos a partir de múltiples muestras provenientes de una muestra homogénea, o sea es la distribución de los valores analíticos alrededor de su media y evalúa la capacidad del método para dar resultados semejantes cuando se aplica repetidamente. Los resultados se expresaron en términos de CV, el cual debe ser menor del 3,0 % para métodos espectrofotométricos¹⁶. Se puede observar que el valor obtenido para la repetibilidad cumplió ampliamente con el rango establecido, reflejando la elevada precisión del procedimiento cuando se aplica repetidamente en las mismas condiciones de operación (analista, día, equipo). Por otro lado, la precisión intermedia se utiliza para comprobar la precisión del método dentro del mismo laboratorio cuando se analiza en condiciones diferentes, es decir, analistas diferentes, días diferentes, equipos diferentes, etc. Al igual que en la repetibilidad el CV de las determinaciones para los analistas y por días debe ser $\leq 3,0$ %¹⁶. En la tabla 7, puede apreciarse que todos los CV cumplieron con lo establecido, con valores incluso inferiores al 1,0 %, lo cual fue indicativo de la escasa influencia de errores aleatorios cuando el procedimiento se repite en condiciones diferentes de operación.

El método fue válido para el objetivo propuesto pues resultó específico frente a los restantes componentes de la formulación ANT-00, lineal, exacto y preciso en el rango de concentraciones del analito de 70 a 130 %.

El método desarrollado en este trabajo tuvo como referencia el método de la hematina alcalina propuesto por Wolf y colaboradores en 1984 para la cuantificación de hemoglobina en sangre¹². En este estudio se desarrolló un nuevo método analítico por espectrofotometría UV-Visible para la cuantificación de hemo en la formulación antianémica ANT-00. Este trabajo permitirá continuar con el

desarrollo farmacéutico de un nuevo medicamento en forma sólida que contenga como IFA el ANT-00.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ardila Quintero JA. Validación interna de los métodos analíticos para la cuantificación de hierro total, hierro no hemo e implementación del método para la determinación de hierro hemo en alimentos (Tesis de grado). Bucaramanga: Universidad industrial de Santander; 2009.
2. Riemer J, Hoepken HH, Czerwinska H, Robinson SR, Dringen R. Colorimetric ferrozine-based assay for the quantitation of iron in cultured cells. *Analytical Biochemistry*. 2004; 331: 370–375. doi:10.1016/j.ab.2004.03.049.
3. Murti GSR, Moharir AV, Sarma VAK. Spectrophotometric determination of iron with orthophenanthroline. *Microchemical Journal* 1970; 15(4): 585–589. doi:10.1016/0026-265x(70)90101-3.
4. Mohapatra D, Bhatia V, Parida S. Diagnostic Dilemma in Catching Anaemia Early. *Indian Journal of Community & Family Medicine*, Vol. 4, Issue 01, Jan-Jun, 2018.
5. González-Pérez M, Otero-Cabrera Y, García-Hernández Y, Gómez-Matos M, García-Felipe M, Llamas-Valiente J. Validación de la Técnica de Cianometahemoglobina en la determinación de hemoglobina al Trofin deshidratado. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 2015; 46 (2): 182-190.
6. Kalyan V, Naveen D, Santhoshi B, Jaya T, Ranga D. Haemoglobin estimation by non-cyanide methods. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2012 Agosto, Vol-6(6): 955-958.
7. Hornsey HC. The colour of cooked cured pork. I.- Estimation of the Nitric Oxide - Haem Pigments. *J. Sci. Food. Agric*. 1956; 534-539.
8. Pourkhalili A, Mirlohi M, Rahimi E. Heme iron content in lamb meat is differentially altered upon boiling, grilling, or frying as assessed by four distinct analytical methods. *The Scientific World Journal* 2013 ID 374030, 5 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/374030>.
9. Mistura L, Colli C. The effect of irradiation and thermal process on beef heme iron concentration and color properties. *Ciência e Tecnologia de Alimentos Campinas* 2009 jan.-mar.; 29(1): 195-199.
10. Dall M, Hviid M. Meat quality in the Danish pig population anno 2018. *Meat Science* 163 (2020) 108034, <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.108034>.
11. Vyankatesh AT, Sankhe SV. Evaluation of hemoglobin estimation with non-cyanide alkaline haematin D- 575 method. *Int J Res Med Sci*. 2016 Oct; 4(10):4297-4299. DOI: <http://dx.doi.org/10.18203/2320-6012.ijrms20163157>.
12. Wolf HU, Lang W, Zander R. Alkaline haematin D-575, a new tool for the determination of haemoglobin as an alternative to the cyanhaemoglobin method. II. Standardisation of the method using pure chlorohaemin. *Clinica Chimica Acta* 1984; 136: 95-104.



13. HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE. Text on validation of analytical procedures, ICH Q2A, 1995.

14. OFICINA NACIONAL DE NORMALIZACIÓN. Norma Cubana 26-212. Evaluación de características y validación de métodos de ensayo. Buenas Prácticas de laboratorios. Ministerio de Salud Pública, La Habana, 1992.

15. INTERNATIONAL STANDART ORGANIZATION. Sistemas de Gestión de la Calidad – Requisitos ISO 9001, 2000.

16. Resolución CECMED No. 40/2014. Anexo No.1 De las Buenas Prácticas para Laboratorios de Control de Medicamentos. Validación de Métodos Analíticos.

