



MÉTODOS ELECTROFORÉTICOS ESPECIFICADOS EN LA FARMACOPEA EUROPEA PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE HEMODERIVADOS

M^a Virginia Giménez Amezcua

Grado en Farmacia. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Trabajo de Fin de Grado. Madrid, Junio de 2018.

INTRODUCCIÓN.

Real Farmacopea Europea (RFE): Recoge una serie de monografías que describen los procedimientos analíticos y criterios de aceptación que permiten conocer la calidad de un medicamento.

Aproximadamente un 30% de las monografías de la RFE corresponden a plantas medicinales, vacunas, antisueros, productos biológicos, hemoderivados, etc. Hemoderivado: medicamento constituido por proteínas obtenidas de plasma sanguíneo humano.

La RFE se usa desde 1992 para determinar la pureza y calidad de los hemoderivados.

OBJETIVOS.

El objetivo principal es revisar los métodos electroforéticos reseñados en la RFE utilizados para



- Identificar inequívocamente el compuesto en estudio.
- Analizar las posibles impurezas que contenga el hemoderivado.
- Valorar la actividad biológica de los factores de coagulación.

METODOLOGÍA.

Electroforesis → Método físico de análisis. Se basa en la migración de las partículas de una muestra sobre un soporte al ser sometidas a la acción de un campo eléctrico.

El desplazamiento de las partículas dependerá de
 → Parámetros
 → Fuerzas

La movilidad electroforética dependerá en gran medida del tamaño y forma de las partículas.

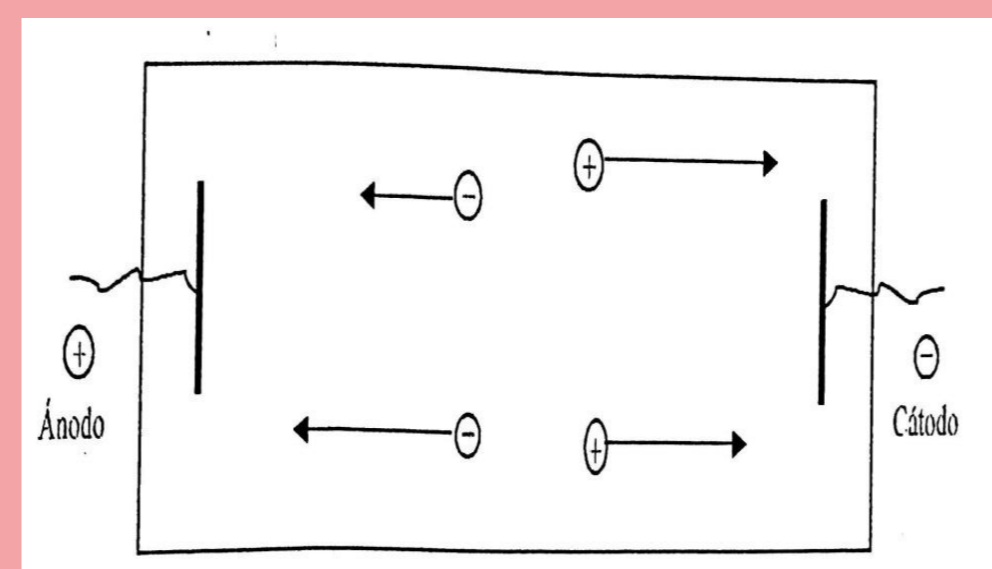


Figura 1. Esquema del proceso electroforético.

Existen cuatro principales modalidades electroforéticas recogidas en la Real Farmacopea Europea:

1. E. Z. en membrana de acetato de celulosa.
2. E. Z. en gel de poliacrilamida SDS.
3. Inmunotransferencia Western Blot
4. Inmunolectroforesis

Electroforesis de zona (E. Z.)

En ella se separan las proteínas en función de su velocidad de migración.

Material necesario:

- Generador de corriente continua
- cubetas anódica y catódica
- Dispositivo soporte (papel, gel, etc).
- Detección mediante colorantes, marcadores fluorescentes, marcador isotópico u otros métodos

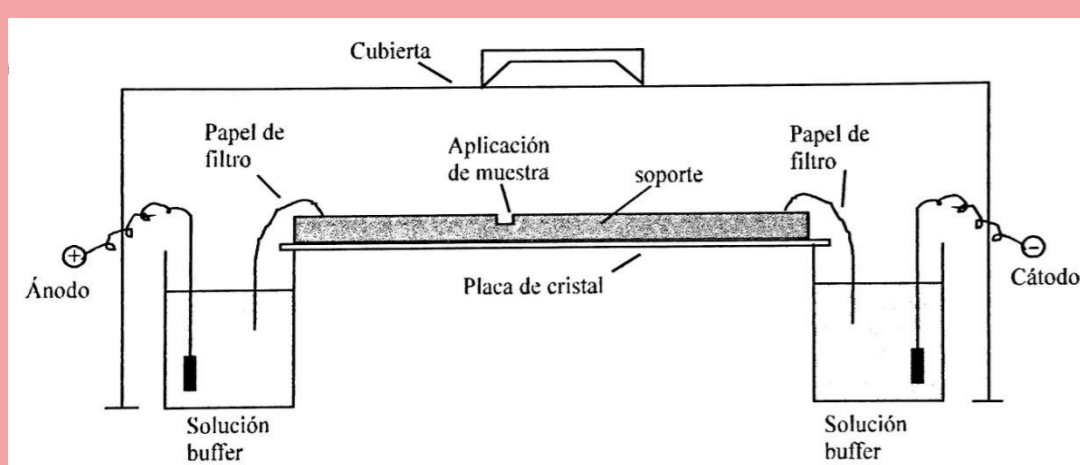


Figura 2. Esquema del material necesario para E.Z.

Procedimiento:

1. Se impregna el soporte en la solución electrolítica, y la misma se introduce en los compartimentos.
2. Se marca la línea de partida y se deposita la muestra en el soporte, junto a un patrón de referencia.
3. Se conecta la corriente eléctrica durante el tiempo necesario, y posteriormente se retira la corriente, se retira el soporte de la cubeta y se deja que se seque y se procede a la detección por densitometría, fluorimetría u otras técnicas

Electroforesis sobre membrana de acetato de celulosa

Ventajas:

- Los hidroxilos de la celulosa están acetilados
- Se disuelve fácilmente: recuperar componentes tras la electroforesis.

→ Al teñir los componentes, el soporte transparente

Inconvenientes:

- Baja resolución.

Electroforesis sobre gel de poliacrilamida SDS

Ventajas:

- Buena resistencia mecánica
- Porosidad reproducible
- No se dan fenómenos de adsorción, difusión mínima.

→ Versatilidad de uso de sustancias amortiguadoras

→ Analizar pequeñas cantidades de muestra.

→ Transparencia natural

→ Permite estudiar velocidades de emigración relativa en varios polipéptidos de peso molecular desconocido.

Inmunotransferencia Western Blot

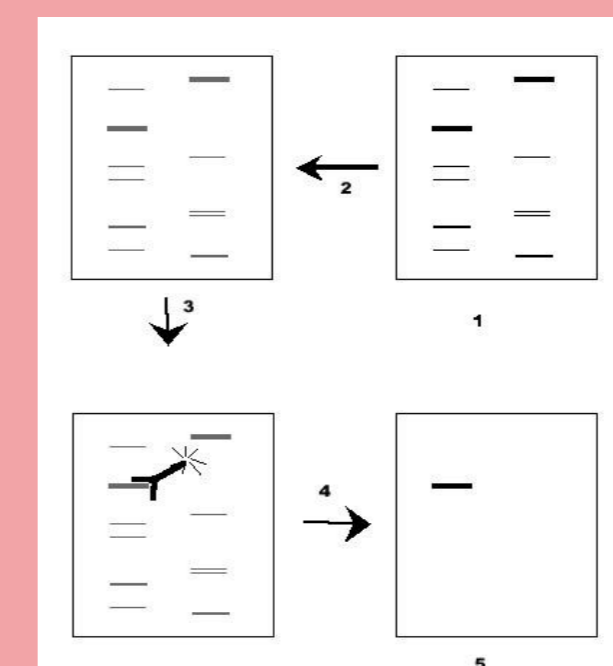
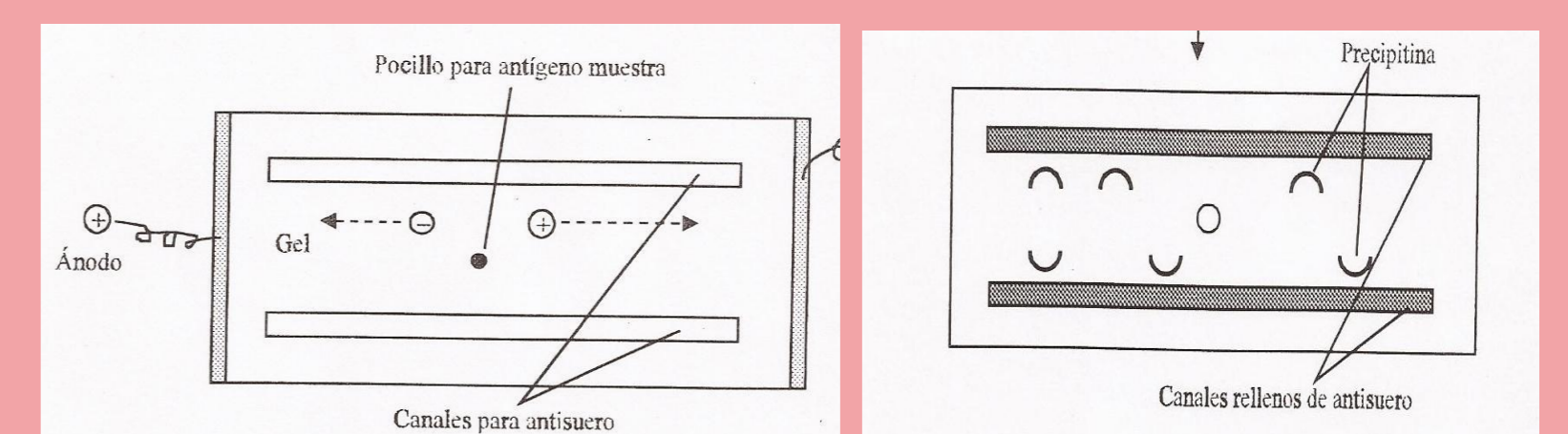


Figura 3. Esquema del proceso de inmunotransferencia WB

- 1) Separación proteínas SDS-PAGE
- 2) Transferir al soporte
- 3) Tratar con disolución de proteínas bloqueante,
- 4) Se agrega un anticuerpo marcado
- 5) Se procede a la detección complejo antígeno anticuerpo mediante anticuerpos secundarios y reacción enzimática o luminiscente

Inmunolectroforesis



Figuras 4 y 5. Esquema del proceso de inmunolectroforesis

- 1) Separación las proteínas (Ag) por electroforesis en gel de agarosa.
- 2) Situar el antisuero paralelamente a la dirección de separación electroforética.
- 3) Dejar difundir el antisuero para que se produzca el complejo Ag-Ac
- 4) Tinción con un colorante apropiado.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 7.0		Human albumin solution	
A ₁	absorbance at 254 nm.	multiplying by 6.25. The preparation contains not less than 95 per cent and not more than 105 per cent of the quantity of protein stated on the label.	
A ₂	absorbance at 280 nm.	Protein composition. Zone electrophoresis (2.2.21).	
D	diffusion factor, where applicable.	Use strips of suitable cellulose acetate gel or agarose gel as the supporting medium and barbital buffer solution pH 8.6 R1 as the electrolyte solution.	
Chlorides (2.4.4): maximum 350 ppm, determined on 15 mL of a 10 g/L solution.		If cellulose acetate is the supporting material, the method described below can be used. If agarose gels are used, and insofar as they are not part of a multimethod system, the manufacturer's instructions are followed instead.	
Sulphates (2.4.13): maximum 250 ppm, determined on 15 mL of a 40 g/L solution.		Test solution. Dilute the preparation to be examined with a 9 g/L solution of sodium chloride R to a protein concentration of 20 g/L.	
01.7010-025 corrected 7.0		Reference solution. Dilute human albumin for electrophoresis RSP with a 9 g/L solution of sodium chloride R to a protein concentration of 20 g/L.	
HUMAN ALBUMIN SOLUTION			
Albumini humani solutio			
DEFINITION			
Human albumin solution is an aqueous solution of protein obtained from plasma that complies with the requirements of the monograph Human plasma for fractionation (0553).			
PRODUCTION			
Separation of the albumin is carried out under controlled conditions, particularly of pH, ionic strength and temperature, so that in the final product not less than 95 per cent of the total protein is albumin. Human albumin solution is prepared as a concentrated solution containing 150-250 g/L of total protein or as an isotonic solution containing 35-50 g/L of total protein. A stabiliser stabilises against the effects of heat, such as sodium caprylate (sodium octanoate) or N-acetyltryptophan or a combination of these. As suitable concentration, may be added but no antimicrobial preservative is added at any stage during preparation. The solution is passed through a bacteriostatic filter and distributed aseptically into sterile containers which are then closed so as to prevent contamination. The solution in its final container is heated to 60 ± 1.0 °C and maintained at this temperature for not less than 10 h. The containers are then incubated at 36-37 °C for not less than 16 days or at 20-25 °C for not less than 4 weeks and examined visually for evidence of microbial contamination.			
CHARACTERISTICS			
A clear, slightly viscous liquid; it is almost colourless, yellow, amber or green.			
IDENTIFICATION			
Examined by a suitable immunoelectrophoretic technique. Using antiserum to normal human serum, compare normal human serum and the preparation to be examined, both diluted to contain 10 g/L of protein. The main component of the preparation to be examined corresponds to the main component of normal human serum. The preparation may also show the presence of small quantities of other plasma proteins.			
TESTS			
pH (2.2.3): 6.7 to 7.3.			
Dilute the preparation to be examined with a 9 g/L solution of sodium chloride R to obtain a solution containing 10 g/L of protein.			
Total protein. Dilute the preparation to be examined with a 9 g/L solution of sodium chloride R to obtain a solution containing about 15 mg of protein in 5 mL. To 2.0 mL of this solution in a reconstituted centrifuge tube add 2 mL of a 15 g/L solution of sodium molybdate R and 2 mL of a mixture of 10 volumes of orthophosphoric acid R and 50 volumes of water R. Dilute, centrifuge for 5 min, decant the supernatant liquid and allow the inverted tube to drain on filter paper. Determine the nitrogen in the residue by the method of sulphuric acid digestion (2.5.9) and calculate the quantity of protein by multiplying by 6.25. The preparation contains not less than 95 per cent and not more than 105 per cent of the quantity of protein stated on the label.			
Molecular size distribution. Liquid chromatography (2.2.29). Test solution. Dilute the preparation to be examined with a 9 g/L solution of sodium chloride R to a concentration suitable for the chromatographic system used. A concentration in the range of 0.12 g/L and injection of 50-600 µg of protein are usually suitable.			
Column: — size: L = 0.6 m, Ø = 7.5 mm, or L = 0.5 m, Ø = 7.5 mm; — stationary phase: hydrophilic silica gel for chromatography R, of a grade suitable for fractionation of globular proteins with relative molecular masses in the range 10 000 to 500 000.			
Mobile phase: dissolve 4.973 g of sodium hydrogen phosphate dibydrate R, 1.74 g of sodium dihydrogen phosphate monohydrate R, 11.955 g of sodium chloride R and 50 mg of sodium azide R in 1 litre of water R.			
Flow rate: 0.5 mL/min.			
Detection: spectrophotometer at 280 nm.			
The peak due to polymers and aggregates is located in the part of the chromatogram representing the void volume. Discard the peak due to the stabiliser. The area of the peak due to polymers and aggregates is not greater than 10 per cent of the total area of the chromatogram (corresponding to about 5 per cent of polymers and aggregates).			
Name. Dilute the preparation to be examined using a 9 g/L solution of sodium chloride R to obtain a solution containing 10 g/L of protein. The absorbance (2.2.25) of the solution measured at 403 nm using water R as the comparison liquid is not greater than 0.15.			
Prekallikrein activator (2.6.15): maximum 35 IU/mL.			

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Albúmina humana (monografía n° 255)

- Ensayo de composición proteica → Electroforesis de zona en gel de acetato de celulosa. (95% de la composición tiene que ser de albúmina humana).
- Ensayo de distribución de tamaños moleculares → Cromatografía de líquidos ó Electroforesis de zona sobre gel de poliacrilamida SDS.

Factor VIII de coagulación de la sangre humana (monografía n° 275)

- Ensayo de valoración → Electroforesis en gel de agarosa SDS con o sin Inmunotransferencia Western Blot.

Inmunoglobulina humana normal para uso intravenoso (monografía n° 918)

- Ensayo de composición proteica → Electroforesis de zona en gel de acetato de celulosa. (95% de la composición tiene que ser de albúmina humana).
- Ensayo de distribución de tamaños moleculares → Cromatografía de líquidos ó Electroforesis de zona sobre gel de poliacrilamida SDS.

Figura 6. Ejemplo de monografía de la Albúmina Humana recogida en la Real Farmacopea Europea.

CONCLUSIÓN.

Se verifica la importancia del uso de técnicas electroforéticas para el control de calidad en hemoderivados (las cuales vienen especificadas en la Real Farmacopea Europea).

BIBLIOGRAFÍA.

- Real Farmacopea Española, 2002. 2ª Edición. Madrid: Boletín Oficial del Estado.
- Valls, O; del Castillo, B. Técnicas instrumentales en farmacia y ciencias de la salud. 3ª edición. España: Barcelona Piro D.L; 1985.
- Eur-lex.europa.eu [Internet]. España: EUR-lex; 1994 [actualizado 8 Abr 2014; citado el 14 Mar 2018].
- Fernández Santarén, J. De la tesis doctoral de Tiselius a la proteómica: setenta y cinco años de electroforesis de proteínas. Arbor. 2004; CLXXVII (698): 259-284.
- Apartado "Electroforesis" incluido en el capítulo de Aparatos. Real Farmacopea Española, 2002. 2ª Edición. Madrid: Boletín Oficial del Estado. Capítulo 2.2.31, págs 43-49.
- Martín García Pérez, H. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. UNIV DIAG 2000; 1(2):31-41.
- Westemeier R et al. Electrophoresis in Practice: A Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separations. Fourth edition. Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co; 2005.
- De la Fuente Gonzalez, A. Rodriguez Lozano, J. Análisis de proteínas mediante electroforesis e inmunotransferencia (Western blot). Técnicas de diagnóstico. 2007; 22(5):252-8.
- Viñals Florez, L.M. ¿Qué son y para que se usan los hemoderivados?. RCCV. 2007; Vol. 1 (2).
- Bonilla, M. 2005. Farmacoterapia con Hemoderivados. Servicio de Farmacia Hospitalaria, Hospital Severo Ochoa, Madrid.
- Cala Molina, M.P, Vázquez Cardeño, A.M. Estudio comparativo por electroforesis capilar y cromatografía líquida de alta eficiencia de catequinas extraídas de plantas de la familia labiaceae, y determinación de su actividad antioxidante. Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias; 2008.