

CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL PATRÓN INTERNO EN EL PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DE FÁRMACOS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

*Luz Stella Ospina de Nigrinis** y *Luis José León Castillo**.

*Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Farmacia. A.A. 14490, Santafé de Bogotá, Colombia.
E-Mail: lospina@impsat.net.co

RESUMEN

Este trabajo evalúa cómo el uso del patrón interno puede afectar la precisión y la exactitud de un método analítico por cromatografía líquida de alta eficiencia. Se hace énfasis en la importancia de conocer independientemente el porcentaje de recuperación del patrón interno y del fármaco empleando la metodología a utilizar para determinar el fármaco en el plasma.

Palabras claves: Patrón interno - Patrón externo - Normalización Externa - Precisión - Exactitud.

SUMMARY

CONTRIBUTION TO THE STUDY OF THE INFLUENCE OF THE INTERNAL STANDARD IN DRUG RECOVERY FROM BIOLOGICAL SAMPLES

This paper determine how the use of internal standard technique in high performance liquid chromatography can affects the precision and accuracy of a given chromatographic method. An important issue is determine independently the recovery of the internal and external standards using the analytical methodology employed for determination of the drug evaluated in plasma.

Key words: Internal standard - External standard - Precision - Accuracy.

INTRODUCCIÓN

La Cromatografía líquida de alta eficiencia, HPLC o CLAE, es una de las técnicas más ampliamente utilizada para la separación, identificación y cuantificación de fármacos y sus metabolitos en fluidos biológicos. Para realizar estos estudios, las muestras deben someterse a un tratamiento previo al análisis cromatográfico, lo cual puede afectar la precisión y la exactitud del método; esto es susceptible de corregirse introduciendo el empleo del patrón interno, para lo cual se debe demostrar si el patrón interno verdaderamente mejora la precisión y la exactitud del método.

Para seleccionar el patrón interno, se recomienda que su estructura sea similar a la del compuesto a cuantificar, para lo cual se recurre a homólogos, análogos e isómeros del compuesto de interés. En cuanto a los parámetros cromatográficos, el patrón interno deberá presentar una resolución óptima, respecto a los demás compuestos presentes en la muestra y poseer un factor de capacidad k que se encuentre en un rango de $\pm 30\%$ del valor de k del compuesto a evaluar. Además el patrón interno deberá ser incorporado a la muestra desde el inicio del análisis para que sufra la misma manipulación que el compuesto de interés (1-4).

La utilización del patrón interno ha sido objeto de opiniones dispares; mientras que algunos

Recibido para evaluación: Septiembre de 1998
Aprobado para publicación: Febrero de 1999

autores lo consideran necesario para mejorar la precisión del método, otros consideran que su utilización no contribuye a mejorar la exactitud ni la precisión del método.

Curry y Whelpton (5) concluyen que no hay razón para suponer que la inclusión de un patrón interno produzca resultados más satisfactorios y por el contrario se debe considerar la probabilidad de que el patrón interno afecte de manera adversa al método.

Raid y Wilson (6) y Karnes (7) recomiendan que durante el desarrollo y la validación de una metodología analítica se evalúe el efecto del patrón interno sobre el método, comparando la normalización externa (uso del patrón externo), con el uso del patrón interno, estableciendo así la verdadera utilidad del patrón interno.

Haefelfinger (8) demuestra mediante la ley de la propagación del error, que es posible determinar cómo el uso del patrón interno afecta la precisión del método y no siempre la mejora. La metodología propuesta considera la evaluación de los coeficientes de variación de las respuestas del fármaco (C_{va}), del patrón interno (C_{vb}), la relación fármaco/patrón interno (C_{vq}) y el coeficiente de correlación (r) existente entre las respuestas para muestras repetidas de una mezcla del fármaco y del patrón interno.

El autor establece que si se cumple la relación $C_{vb} < 2rC_{va}$, se mejora la precisión del método, presentándose los siguientes casos:

- Sí $r = 1$, no se mejora de la precisión del método
- Sí $C_{va} = C_{vb}$ y $r > 0,5$ ó sí $C_{va} = 2 C_{vb}$ y $r > 0,25$ se mejora la precisión del método.

C_{vq} se establece mediante la relación: $(C_{va}^2 + C_{vb}^2 - 2r C_{va} C_{vb})^{1/2}$

Sí en una metodología analítica que ha sido validada usando un patrón interno éste se cambia, se deben revalidar los parámetros de selectividad, precisión, exactitud y recuperación (9).

PARTE EXPERIMENTAL

Patrones y Reactivos

Los patrones de los fármacos empleados en este trabajo fueron obsequiados por casas farmacéuticas y por el Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional (UN) así:

Carbamazepina (Ciba Geigy), Fenobarbital (Departamento de Farmacia UN), Ibuprofeno (La Santé), Ketoprofeno (La Santé), Levopromazina (Specia), Metopimazina (Specia), Clorpromazina (Specia).

Los reactivos utilizados fueron calidad reactivo y los disolventes para cromatografía fueron calidad HPLC.

Instrumentación

Se utilizó un cromatógrafo para líquidos Perkin Elmer con módulo de selección para 4 disolventes y bomba Perkin Elmer serie 410, detector UV-VIS Perkin Elmer LC95, integrador Perkin Elmer LCI100. Se empleó una columna LiChroCART RP18 Merck (125mm x 4mm, tamaño de partícula 5 micrones).

Para los sistemas fármaco/patrón interno se emplearon las siguientes condiciones:

ibuprofeno/ketoprofeno: fase móvil MeOH:H₂O 60:40 ajustada a pH 3 con H₃PO₄, temperatura 35°C, flujo 1mL/min y una λ de 220 nm.

levopromazina/metopimazina: fase móvil MeOH:AcN:-H₂O:-TEA 28:25:46:1 ajustada a pH 4 con H₃PO₄, temperatura 30°C, flujo 1mL/min y λ de 254nm

carbamazepina/fenobarbital: fase móvil MeOH:H₂O 55:45, temperatura 35°C, flujo 1mL/min y λ de 212nm

captopril/fenobarbital: fase móvil MeOH:H₂O 35:65 ajustada a pH 3 con H₃PO₄, temperatura 35°C, flujo 1mL/min y una λ de 220nm. En todos los casos el volumen de inyección fue de 20 μ L.

Metodología

Para evaluar el efecto del patrón interno en la cuantificación de fármacos en muestras biológicas se procedió así: se calificó la idoneidad del método cromatográfico y se seleccionaron las condiciones óptimas para el proceso. Se validaron los parámetros: especificidad, precisión, linealidad y exactitud (10).

Especificidad: Se realizaron cromatogramas de los fármacos a evaluar (fármaco de interés y patrón interno), en medio acuoso y en la matriz biológica (plasma), además se obtuvieron los cromatogramas de blancos de plasma.

Precisión: A partir de una muestra homogénea de concentración conocida se desarrolló diez veces la metodología, inyectando cada vez al cromatógrafo con el fin de evaluar la repetibilidad; el mismo proceso se siguió en días diferentes para calificar la precisión entre días. El evaluador fue el coeficiente de variación (CV).

Linealidad: Para cada uno de los fármacos en estudio se evaluó la proporcionalidad de la respuesta en un intervalo (rango) determinado de concentraciones. Los datos experimentales se sometieron a un tratamiento por mínimos cuadrados para obtener la recta de mejor ajuste, y la regresión se evaluó mediante un análisis de varianza para la regresión lineal y los test t de convergencia al origen y para la pendiente. Cada una de las concentraciones de cada recta (cinco) fueron evaluadas por triplicado. Los intervalos de concentración para cada fármaco fueron: ibuprofeno: 10-60 $\mu\text{g/mL}$; levopromazina 2-18 $\mu\text{g/mL}$; carbamazepina 2-16 $\mu\text{g/mL}$; captopril 10-50 $\mu\text{g/mL}$ tanto para el sistema (medio acuoso), como para el método (plasma).

Selección del Patrón Interno: Para la selección del patrón interno se tuvo en cuenta lo establecido para este efecto, fundamentalmente la similitud estructural y la resolución entre éste y el fármaco de interés. Los patrones internos seleccionados y sus concentraciones por mL fueron: ketoprofeno 50 $\mu\text{g/mL}$ y 30 $\mu\text{g/mL}$, metopimazina 15 $\mu\text{g/mL}$, y fenobarbital 20 $\mu\text{g/mL}$ y 10 $\mu\text{g/mL}$

respectivamente. En el caso del ketoprofeno y del fenobarbital las dos concentraciones bajas fueron usadas también para la evaluación de la precisión.

Exactitud: Para determinar la exactitud tanto en el caso de la normalización externa, como cuando se usó patrón interno, se obtuvo la relación de las pendientes de las curvas de calibración del método y del sistema, y se expresó esta relación como porcentaje de recuperación. El sistema hace referencia a las soluciones acuosas de los patrones, y el método a la matriz biológica enriquecida con los patrones.

La metodología seguida para la extracción de los fármacos a partir de la muestra biológica, fue la extracción en fase sólida para lo cual se utilizaron cartuchos Sep Pack C18, empleando las condiciones indicadas en la Tabla 1.

Antes de hacer la extracción en fase sólida se precipitaron las proteínas del plasma con metanol y luego centrifugación a 2.500 r.p.m. por 15 minutos. Se adicionó un mL de muestra al cartucho, el cual se trabajó en las condiciones señaladas en la Tabla 1. El eluato se llevó a sequedad a una temperatura de 60°C en corriente de nitrógeno. El residuo se disolvió en un mL de fase móvil y previa filtración por membrana de 0.2 micrones se inyectaron 20 μL al cromatógrafo.

Parámetro de Haefelfinger. Este parámetro se determinó cuando se usó patrón interno a dos niveles de concentración para cada fármaco, inyectando doce veces cada concentración, se evaluó el coeficiente de correlación existente entre la respuesta del fármaco (X) y del patrón interno (Y), y se determinaron los CV para el fármaco, el patrón interno, y la relación de las respuestas fármaco/patrón interno.

Soluciones: En todos los casos se prepararon soluciones acuosas de los diferentes patrones para obtener las diluciones dentro de los intervalos de concentración señalados en linealidad, para trabajar el sistema. La muestra biológica fue enriquecida con soluciones patrón (método), de manera de obtener las mismas concentraciones por unidad de volumen como en el sistema. Para evaluar el efecto del patrón interno se adicionaron éstos para obtener por mL de plasma los valores ya indicados.

Tabla 1 Condiciones para la extracción en fase sólida

FÁRMACO	ACTIVACIÓN	LAVADO	ELUCIÓN
IBUPROFENO P.I. Ketoprofeno	MeOH 5.0 mL H2O 5.0 mL	MeOH : Buffer Fosfato pH 2.3 (5:95) 5.0 mL	MeOH : Buffer de fosfatos pH 7.3 (90:10) 10 mL
LEVOPROMAZINA P.I. Metopimazina	MeOH 5.0 mL H2O 5.0 mL	MeOH 20% 5.0 mL	MeOH 10 mL
CAPTOPRIL P.I. Fenobarbital	MeOH 5.0 mL H2O 5.0 mL	AcOH 1% 3.0 mL H2O 2.0 mL	MeOH 10 mL
CARBAMAZEPINA P.I. Fenobarbital	EtOH 8.0 mL H2O 5.0 mL	H2O 5.0 mL	EtOH 12 mL

P.I. Patrón Interno

Las muestras biológicas fueron congeladas a -20°C hasta su uso teniendo en cuenta su estabilidad.

Manipulación de la muestra biológica: El plasma fue mantenido bajo congelación a -20°C previa subdivisión del mismo en volúmenes aproximadamente de 20 mL. En el momento de su uso se descongeló a 4°C y luego a temperatura ambiente (20°C). Durante el manejo de la muestra biológica se observaron todas las normas de bioseguridad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Especificidad: Los cromatogramas de los fármacos evaluados, los de los respectivos patrones internos y los del plasma presentaron buena resolución, demostrándose de esta manera la no interferencia entre los tiempos de retención de los diferentes picos.

Precisión: Al observar los datos obtenidos en la evaluación de la precisión con la inclusión de un patrón interno y sin éste, en el caso del sistema

para el ibuprofeno, el CV (1.14%) fue mayor que el obtenido por normalización externa (0.70%), tanto en la evaluación de la repetibilidad como en la precisión entre días (CV 0.73% a 1.58%), observándose que el patrón interno afectó negativamente la precisión. En el método, el patrón interno disminuyó el CV en el caso de la repetibilidad (CV de 1.40% a 1.17%), cuando se usó patrón interno. Igual comportamiento se observó respecto a la precisión entre días (CV 2.10% a 1.59%). En el caso de la levopromazina, la carbamazepina y el captopril se observó que los CV disminuyeron cuando se incorporó el patrón interno; el efecto más significativo se observó en la precisión entre días.

Linealidad: Este parámetro se validó con el propósito de confirmar la proporcionalidad entre la concentración del fármaco y su respuesta, para lo cual se utilizaron los evaluadores de la regresión, tanto en el caso del sistema como en el método, previo ajuste por mínimos cuadrados. Las ecuaciones encontradas para las rectas fueron:

Ibuprofeno:

Sistema Normalización Externa $Y = 208767.25 + 147004.3X$ $r = 0.998$

Patrón Interno $Y = 0.0115 + 0.014726X$ $r = 0.998$

Método Normalización Externa $Y = -1139.7 + 106170.4X$ $r = 0.999$

Patrón Interno $Y = 0.00784 + 0.012076X$ $r = 0.996$

Levopromazina:

Sistema Normalización Externa $Y = 257529.5 + 349921.7X$ $r = 0.995$

Patrón Interno $Y = 0.06071 + 0.0653X$ $r = 0.995$

Método Normalización Externa	$Y = 52670.65 + 240047.5X$	$r = 0.995$
Patrón Interno	$Y = 0.0425 + 0.05889X$	$r = 0.994$
Carbamazepina:		
Sistema Normalización Externa	$Y = 3.17 + 22.068X$	$r = 0.999$
Patrón Interno	$Y = 0.004163 + 0.06921X$	$r = 0.999$
Método Normalización Externa	$Y = 2.0 + 17.91X$	$r = 0.999$
Patrón Interno	$Y = 0.000446 + 0.1032X$	$r = 0.999$
Captopril:		
Sistema Normalización Externa	$Y = 0.816 + 3.507X$	$r = 0.998$
Patrón Interno	$Y = 0.0368 + 0.04625X$	$r = 0.999$
Método Normalización Externa	$Y = 3.023 + 2.51X$	$r = 0.995$
Patrón Interno	$Y = 0.0489 + 0.05774X$	$r = 0.999$

El análisis de varianza para la regresión lineal para un α de 0.05 y los respectivos grados de libertad para el numerador y para el denominador, mostró regresión y no desvió de la linealidad. Los test t para la pendiente y el intercepto para un α de 0.05 y n-2 grados de libertad mostraron regresión y convergencia al origen.

Parámetro de Hoefelfinger: El coeficiente de variación de los fármacos a determinar fue mayor que el coeficiente de variación de la relación de respuestas fármaco/patrón interno, cumpliéndose uno de los requisitos propuestos para el uso de un patrón interno: $C_{vb} < 2rC_{va}$. Esta relación puede ser afectada por la concentración del patrón interno.

Exactitud: En cuanto a los porcentajes de recuperación, se observó que los determinados utilizando patrón interno fueron mayores que los obtenidos por normalización externa; en la evaluación del captopril y la carbamazepina estos porcentajes sobrepasaron el 100% cuando se usó patrón interno como se observa en la Tabla 2.

Tabla 2. Porcentajes de recuperación de los fármacos evaluados

FÁRMACO	A	B
Ibuprofeno	72%	82%
Levopromazina	69%	90%
Captopril	71%	125%
Carbamazepina	81%	149%

A: Normalización Externa B: Patrón Interno

En el caso del ibuprofeno y la levopromazina, para los cuales se emplearon como patrones internos el ketoprofeno y la metopimazina, los porcentajes de recuperación para los patrones internos fueron mayores que los de los fármacos cuando fueron trabajados por normalización externa, como se observa en las Tablas 2 y 3.

Tabla 3. Porcentajes de recuperación de los patrones internos

PATRÓN INTERNO	% R
Ketoprofeno	90%
Metopimazina	76%
Fenobarbital	55%
Fenobarbital*	56%

*Porcentaje de recuperación en el sistema de extracción en fase sólida para el captopril.

Para el captopril y la carbamazepina, el fenobarbital usado como patrón interno fue recuperado en menor proporción que los fármacos trabajados por normalización externa, por lo cual la pendiente de la curva de calibración del método es mayor que la del sistema y al relacionar las pendientes del método y del sistema se obtiene un porcentaje de recuperación mayor al 100% obteniendo un 125% para el captopril y un 149% para la carbamazepina.

Si el porcentaje de recuperación del patrón interno es mayor que el del fármaco evaluado, la pendiente de la curva de calibración del método será menor que la del sistema. Al relacionar las pendientes se obtienen valores inferiores al 100%, pero mayores a los valores encontrados por norma-

lización externa. En el caso de que tanto el patrón interno como el fármaco se recuperen en igual proporción, independientemente de los valores reales, la relación de pendientes dará un porcentaje de recuperación del fármaco del 100% por lo cual hay que anotar que un porcentaje de recuperación del 100%, no siempre indica que el fármaco se esté recuperando en esta proporción. Como se tiene el valor del porcentaje de recuperación del patrón interno se puede incorporar a la relación de pendientes así:

$$\% \text{ Recuperación del Fármaco} = \frac{\text{Pendiente del método} \times \% \text{ R. P. I}^*}{\text{Pendiente del sistema}}$$

*Porcentaje de recuperación del patrón interno.

Al aplicar la anterior expresión se obtienen los siguientes porcentajes de recuperación para los fármacos evaluados:

ibuprofeno 73%; levopromazina 68%; carbamazepina 82%; captopril 70%

Los valores obtenidos así son muy semejantes a los porcentajes de recuperación encontrados por normalización externa.

CONCLUSIONES

1. En el desarrollo de la metodología analítica se deben evaluar y comparar los resultados de precisión y exactitud por los métodos de normalización externa y de adición de patrón interno, para establecer si se justifica la inclusión de un patrón interno, con el objeto de mejorar estos parámetros.
2. En las metodologías evaluadas el patrón interno tuvo un efecto positivo en la precisión en tres de los cuatro sistemas evaluados. El mayor efecto se observó en la evaluación de la precisión entre días
3. La relación $C_{vb} < 2r C_{va}$ debe ser evaluada en los métodos que utilizan patrón interno, debido a que nos indica el posible mejoramiento

de la precisión del método, lo anterior es necesario pero no suficiente.

4. El porcentaje de recuperación del patrón interno deberá ser evaluado y en lo posible ser lo más cercano al ciento por ciento: sí lo anterior no es factible, el porcentaje de recuperación hallado deberá ser incorporado en la relación de pendientes (método/sistema) como factor de corrección.
5. La concentración del patrón interno en los sistemas estudiados no afectó significativamente el porcentaje de recuperación de los fármacos.

BIBLIOGRAFÍA

1. O. A Quattrochi, S.I Abelaire y Rf. Laba. "Introducción a la HPLC Aplicación y Práctica". Artes gráficas Farro S.A. 1992. pp 46 - 51.
2. L. Snyder., y J Kirkland. "Introduction to Modern Liquid Chromatography". Wiley Interscience. 1979. pp 552-556.
3. J. Vessman en: Trace Organic Sample Handling Eric Reid Editor. 1981. pp 336-340.
4. S.J Van Der Wal y R. Snyder. "Precision of HPLC assays with sample pretreatment". Clin. Chem., **27**, 1233 (1981).
5. S.H Curry y R. Whelpton. "Blood Drugs and Other Analytical Challenges". Ellis Horwood, Chichester, 1978. pp 29-41.
6. E Raid y Wilson. "Analysis for Drugs and Metabolites Including Antiinfective Agents. Methodological Surveys in Biochemistry and Analysis". 1990. Vol 20. pp 50-55
7. T Karnes, G. Shiu y V. Shah., "Validation of bioanalytical methods". Pharm. Res. **8**, 421 (1991).
8. P. Haefelfinger. "Limits of the internal standard technique in chromatography". J. Chromatogr. **218**, 73 (1981).
9. D. Dadgar, P. Burnett, M.G. Choc, K. Gallicano y J. Hooper, "Application issues in bioanalytical method validation. Sample analysis and data reporting". J. Pharm. Biomed. Anal., **13**. 89 (1995).
10. ICH Topic Q 2 B. "Validation of Analytical Procedures: Methodology". 1997.