

Validación del procedimiento para la cuantificación de la norpseudoefedrina por cromatografía gaseosa

Validation of proceeding for the quantification of the norpseudoephedrine by gas chromatography

Lic. Aimée Echevarría¹; Tec. Roberto Romero Silva²

¹ Licenciada en bioquímica. Aspirante a investigadora. Instituto de Medicina del Deporte. Laboratorio Antidoping. INDER.

² Técnico. Instituto de Medicina Deportiva. Laboratorio Antidoping. INDER avlopez43@inder.cu

RESUMEN

En la actualidad es de vital importancia para cualquier laboratorio la validación de sus métodos de análisis para garantizar un resultado con elevada confianza y seguridad, es por eso que en el presente trabajo se propone un procedimiento experimental rápido, sencillo, económico y seguro para la evaluación de 15 parámetros que permitirán de forma inequívoca la validación por el procedimiento propuesto para la determinación cuantitativa de Norpseudoefedrina por cromatografía gaseosa con detección específica de nitrógeno/fósforo (CG/NPD). Los resultados obtenidos mostraron que se cumple con los criterios de aceptación establecidos para los 15 parámetros evaluados por este procedimiento, quedando de esta forma el método validado.

Palabras Claves: Validación, Doping, Norpseudoephedrine, Instituto Medicina de Deporte, cromatografía gaseosa.

ABSTRACT

Nowadays one of the priorities of the laboratories for the anti-doping control is the validation of analytical methodology to guarantee results with elevated levels of confiability. The aim of the present research suggest and rapid experimental procedures simples, economic and reliable for the evaluation of 15 parameter to allow us enequivacally the validation of the methods for the quantification of norpseudoephedrine using gas chromatography with specifical detection by Nitrogen/Phosphorus (**CG/NPD**). The obtained showed tha criteria followed for the evaluation were correct.

Keywords: Validation, Doping, Norpseudoephedrine, gas chromatography.

INTRODUCCIÓN

Los métodos necesitan ser validados antes de su introducción en un trabajo de rutina o cuando determinadas condiciones de un método ya validado cambian (1). Los criterios la validación de un método debe incluir: tipos de compuesto, matrices, materiales, reactivos, parámetros a determinar con sus criterios de aceptación, equipamiento y otros (12-14). El proceso de validación ha recibido una considerable

atención en la literatura actual y por parte de Agencias reguladoras de la actividad (2-6). En el ámbito mundial y en todos los laboratorios se realizan diariamente millones de mediciones analíticas que deberán ser validadas (7-11).

En este trabajo validaremos un método de análisis utilizado en el laboratorio antidoping para la cuantificación de Norpseudoefedrina (compuesto ubicado en el grupo I de Estimulantes del Listado de Sustancias Prohibidas por el Comité Olímpico Internacional) por cromatografía de gases con detección específica de nitrógeno/fósforo (CG/NPD)

La Norpseudoefedrina, conocida también por Catina, es una amina simpaticomimética formada por un anillo bencénico que en su cadena lateral de etilamina se encuentra sustituido el carbono β por un grupo hidroxilo y el carbono α por un grupo metilo (15). Esta sustancia tiene una acción estimulante sobre el sistema nervioso central y es por ello que para discernir entre su uso terapéutico y su posible abuso, se ha propuesto un criterio cuantitativo para informar su presencia en orina. La concentración de corte establecida es de 5 $\mu\text{g/ml}$ considerándose positiva una muestra cuya concentración sea superior a la misma.

MATERIALES Y MÉTODOS

En la Fase de Extracción de los analitos se utilizan las sustancias de referencia de Metilefedrina y Norpseudoefedrina en una solución metanólica a 1 mg/ml .

Muestras de calibración (cal): Se prepararon en cada ensayo (1, 6, 12, 18, 25 $\mu\text{g/ml}$) por adición del analito (Norpseudoefedrina) sobre la matriz (orina) blanco(M).

Muestras control (con): Se prepararon en lotes con concentraciones conocidas (1.2,10,21.25 $\mu\text{g/ml}$), de manera que en cada ensayo se utilizó distintas alícuotas del mismo lote.

Para este trabajo se realizaron 4 ensayos configurados como se muestran en el procedimiento experimental (Tabla NO 1).

Ensayo 1 (recuperación): Se prepararon los niveles 1, 3 y 5 de concentraciones (inferior, media y superior) con matriz previamente extraída (muestras S).

Ensayo 2 (estabilidad): Se prepararon muestras de control (3 replicados) tras haber sido sometida a los ciclos de congelación y descongelación (C/D) siguientes: C/D0, muestras control conservadas en refrigeración; C/D 1, muestras control tras un ciclo de congelación y descongelación; C/D 2, muestras control tras dos ciclos de congelación y descongelación.

Ensayo 3 (selectividad – especificidad): Se analizaron 5 blancos de orina de orígenes diferentes verificando de esta forma la ausencia de Interferencia (Int.%) en el analito (an) y en el Patrón Interno(pi).

Ensayo 4 : Para la posibilidad de analizar muestras con concentraciones superiores al limite de cuantificación (LCs) se tomaron 3 tubos conteniendo alícuotas de control superior (CS) y se diluyeron 1:2 en matriz blanco.

Con las muestras control preparadas en los ensayos 2, 3 y 4 fue posible el análisis de la precisión y exactitud inter e intra ensayo.

Para el procedimiento de extracción se parte de 2 ml de una muestra de orina a la cual se le adicionan 0.2 ml de KOH a una concentración de 5 M con el objetivo de aumentar el pH de la solución y favorecer así la formación de moléculas no ionizadas. Luego se le adicionan 2 ml de tert-butilmetiléter como fase orgánica, 20mL del standard interno, en este caso la Methylephedrine y 1 g de sulfato de sodio anhidro. Esta mezcla se centrifuga y luego se separa la fase orgánica para ser analizada mediante cromatografía de gases con detección específica de nitrógeno / fósforo (CG/NPD) en un Cromatógrafo gaseoso Hewlett Packard serie 6890, con una columna: Modelo HP 19091B-102, Ultra 2, 5 % Fenilmetilsiloxano, columna capilar, 12.5 metros, 200 μm de diámetro interno y 0.33 μm de grosor de fase estacionaria. El análisis instrumental fue ejecutado con las siguientes condiciones instrumentales: Temperatura del Inyector y el detector: 280°C; Temperatura Inicial del horno: 100°C; Rampa de Temperatura: 20°C/min hasta 300 °C, durante 4.5 min; Tiempo Total: 14.5 min; Gas portador: He a 1 ml/min flujo constante, el volumen de muestra inyectado fue de 3 μL con un modo split (10:1), el flujo de hidrógeno 4.5 ml/min y el flujo de aire 80 ml/min.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Después del análisis por cromatografía CG/NPD de cada muestra se obtuvieron los cromatogramas correspondientes y los resultados de la integración de los picos detectados. Se determinaron los tiempos de retención, las áreas y relaciones de áreas tanto del analito como del patrón interno. La Norpseudoefedrina fue identificada por su tiempo de retención relativo, siendo 0.61 ± 0.02 min. Para la realización de los cálculos de los diferentes parámetros se emplearon 2 programas de análisis estadísticos (Microsoft Excel y el SPSS 10.0). Ver tabla N0 2.

Los parámetros de validación han sido definidos por muchas organizaciones (ICH, FDA, ANDA, USP, AOAC, etc.) y descritos en la literatura, sin embargo desafortunadamente no existe en algunos casos una armonización e incluso difieren en algunas ocasiones en sus conceptos o descripciones (16,17). En la actualidad es de vital importancia para cualquier laboratorio la validación de sus métodos de análisis para garantizar un resultado con elevada confiabilidad. La valoración más importante en la validación de un método analítico lo constituye generalmente la determinación de si el método es suficientemente preciso y exacto para ser usado en un propósito específico (18). En este trabajo estos parámetros fueron evaluados según los criterios de aceptación para el % de ERR y % RSD, teniendo en cuenta, en el caso de la precisión, para cada uno de los niveles de concentración la desviación estándar relativa expresada porcentual mente y en el caso de la exactitud, la media de los valores absolutos de los errores porcentuales individuales obtenidos en los diferentes controles (19, 20). En ambos casos los resultados obtenidos son satisfactorios demostrando una buena precisión y exactitud en dicho método. Para la evaluación de la estabilidad del analito frente al efecto de los ciclos de congelación/descongelación (C/D), se realizó un análisis de la varianza para cada nivel de concentración, tomando como variable dependiente las concentraciones estimadas y como factor el nº de ciclos C/D, quedando demostrado según resultados obtenidos que los ciclos de congelación y descongelación no afectan la estabilidad de la muestra.

Los Límites de detección y cuantificación estimados (LDest y LCest) se calcularon a partir de la estimación del ruido tomado como la desviación estándar de los valores de respuesta obtenidos para el nivel de concentración inferior.

En la Homo/Heterocedasticidad para comprobar si se verifica el criterio de constancia de la varianza, se efectuó una prueba de homogeneidad de varianzas, (test F) tomando los dos valores extremos (mayor y menor) entre los calculados

para cada nivel de concentración y como la $F_{calc} > F_{tab}$ estamos en presencia de un método heteroscedástico, demostrando que existe dependencia de la varianza de las respuestas del método respecto a la concentración del analito.

En la Idoneidad del análisis de una muestra diluida se efectuó un test F de comparación de varianzas y un test t de Student entre los valores de concentración superior (CS11, CS12, CS13) y los valores de concentración superior diluidos (CSD1, CSD2, CSD3), No existiendo diferencias significativas entre la varianza ni entre las medias de los valores de concentración estimados para las muestras CS y para las muestras CSD

La Recuperación fue calculada por la relación existente entre la respuesta obtenida cuando una cantidad de analito se determina prescindiendo del procedimiento de extracción y cuando se analiza siguiendo el procedimiento analítico completo. Para chequear la posible relación entre la recuperación y la concentración o cantidad de analito se hizo un análisis de regresión por mínimos cuadrados tomando como variable independiente la concentración y como variable dependiente los valores de Recuperación. Como se puede observar la recuperación de dicha sustancia es de un 100 % lo que demuestra que estamos en presencia de un método idóneo para la cuantificación de Norpseudofedrina. En cuanto a la Incertidumbre se calculó el intervalo de confianza para el 95% de probabilidad ($\alpha=0.05$) de cada uno de los valores obtenidos en las muestras de control (CI, CM y CS) a lo largo de los tres ensayos en que se analizaron (expresados porcentualmente respecto al valor medio, IC95%) y el resultado fue de 11.35 % .

Por todos los resultados obtenidos, algunos de los cuales discutimos con anterioridad por considerarlos de vital importancia para una validación concluimos que este trabajo además de ofrecer un modelo como estrategia de trabajo para la validación de métodos analíticos, se puede considerar como un método válido, es decir, adecuado para su propósito o sea para la cuantificación de Norpseudofedrina ya que todos los parámetros validados cumplen con los requisitos o criterios de aceptación establecidos para ello, repercutiendo de esta forma en respuestas inequívocas y con óptima calidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. General Principles de Validation. US FDA, Rockville, MD, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), May 1987.
2. Compliance of laboratory suppliers with GLP principles, Series on principles of good laboratory practice and compliance monitoring, number 5. OECD, GLP consensus document, environment monographie N° 49, Paris, 1992.
3. Guidelines for submitting sample and analytical data for method validation, Rockville, MD. US FDA, Center for Drugs and Biologics Department of Health and Human Services, Feb. 1987.
4. AOAC peer-Verified methods program, manual on policies and procedures. AOAC International, Arlington, VA, 1994.
5. EURACHEM Guidance Document N° 1/WELAC Guidance Document N° WGD 2: Accreditation for chemical laboratories: Guidance on the interpretation of the EN 45000 series of Standard and ISO/IEC Guide 25, 1993. Available from the EURACHEM secretariat, PO Box 46, Teddington, Middlesex TW11 0NH, UK, Tel.: + 44 81 943 7614, fax + 44 81 943 2767.

6. ISO/IEC Guide 43-1984: Development and Operation of laboratory proficiency testing, 1984. International Organization for Standardization, case post ale 56, CH-1211 Geneve 20, Switzerland.
7. W.B.Furman, T.P Layloff and R.F. Tetzlaff. Validation of computerized liquid chromatographic systems. Paper presented at the workshop on Antibiotics and Drugs in Feeds, 106th AOAC Annual International Meeting and Exposition, August 30, 1992, Ohio, USA, published in J. AOAC Intern., 77 (5), 1314-1318 (1994).
8. L. Huber and Mike Thomas. Validating computer controlled analytical systems in the pharmaceutical laboratory. LC/GC Magazine, 1995.
9. G. Szepesi, M. Gazdag and K. Mihalyfi. Selection of HPLC methods in pharmaceutical analysis-III method validation. J. Chromatogr. 464, 265-278.
10. H.B.S. Conacher. Validation of analytical methods for pesticide residues and confirmation of results, in Pesticide residues in Food. Technomic Publishing Company, 136-141, Lancaster, PA ISBN 87762-667-7, 1990.
11. V.P. Shah et al. Analytical methods validation: Bioavailability, bioequivalence, pharmacokinetic studies. Eur. J. Drug Metabolism and Pharmacokinetic, 16(4), 249-255, 1989 (1991).
12. L. Huber. Good Laboratory Practice in Doping Control. Hewlett Packard, Hewlett Packard Str. 8. D-76337 Waldbronn, Germany. Proceedings of the 13th cologne Workshop on Dope Analyses 12th to 17th March. 1995.
13. L. Huber. Validation of computerized analytical systems. Interpharm, Buffalo Grove, Illinois, USA1995, ISBN 0-935184-75-9.
14. H.T.Karnes, G. Shiu and V.P.Shah. Validation of bioanalytical methods. Pharmaceutical Research, 8(4), 421-426 (1991)
15. A Goodman Gilman; L S Goodman; A Gilman Las bases Farmalógicas de la terapéutica. Libro TOMO 1 N^o 27 Junio 1994.
16. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of pharmaceuticals for Human use, Validation of analytical procedures (Draft consensus text). released for consultation Oct. 26, 1993, at Step 2 of the ICH Process.
17. M. Thompson and R. Wood, International Harmonized Protocols for Proficiency Testing of Chemical Analytical Laboratory. Pure Appli. Chem. 1993, 65, 2123-2144, published simultaneously in J. AOAC Int. 76(4), 926-940, (1993)
18. L. Huber. Validation of analytical methods: Review and Strategy. LC/GC International Magazine, Hewlett Packard, Waldbronn, Germany, February 1998.
19. Center for Drugs Evaluation and Research (CDER). Reviewer Guidance. Validation Chromatographic Methods. 5600 Fishers Lane, Rockville, Maryland 20857. November 1994.
20. C. Hartmann, J. Smeyers-Verbeke, D.L. Massart, R.D. McDowall. Validation of bioanalytical chromatographic methods. J. Pharm. 17(1998) 193-218.

ANEXOS

Tabla N° 1: Procedimiento Experimental

Tipo	Nivel	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Ensayo 1		Ensayo 2	Ensayo3	Ensayo4
			M	S			
	0	Blanco	4	2	2	5	2
Cal	1	1	4	4	2	2	2
Cal	2	6	4	-	2	2	2
Cal	3	12	4	4	2	2	2
Cal	4	18	4	-	2	2	2
Cal	5	25	4	4	2	2	2
Con	CI	1.2	-	-	3	3	3
Con	CM	10	-	-	3	3	3
Con	CS	21.25	-	-	3	3	3

Tabla N° 2: Resultados de la validación del método cuantitativo para la determinación de Norpseudephedrine.

PARÁMETRO	CRITERIOS DE ACEPTACIÓN RECOMENDABLES	RESULTADOS CG/NPD
Selectividad/Especificidad	Mayor $\text{Int}\%_{\text{an}} < 1\%$ Mayor $\text{Int}\%_{\text{I.S.}} < 10\%$	0.0 0.0 0.0
Arrastre	Mayor $\text{AR}\%_{\text{an}} < 1\%$ Mayor $\text{Ct}\%_{\text{an}} < 10\%$ Mayor $\text{AR}\%_{\text{I.S.}} < 1\%$	0.0 0.0 0.0
Homo/Heteroscedasticidad	Homoscedástico $F_{\text{cal}} < F_{\text{tab}}$ Heteroscedástico $F_{\text{cal}} > F_{\text{tab}}$	Heteroscedástico
Linealidad	Lineal $F_{\text{calc}} < F_{\text{tab}}$ No lineal $F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$	Lineal
Límite de detección estimado (LD_{est})	$\text{LD}_{\text{est}} < \text{LC}_i$	0.11 $\mu\text{g/ml}$
Límite de cuantificación estimado (LC_{est})	$\text{LC}_{\text{est}} < \text{LC}_i$	0.34 $\mu\text{g/ml}$
Recuperación	Recomendable $> 70\%$	$R_{\text{SI}} = 124.3$ $R_{\text{AN}} = 100.2$
Precisión intra-ensayo (repetibilidad)	$\text{RSD}\%_i < 20\%$ Concentración inferior (LC_i o CI) $\text{RSD}\%_i < 15\%$ resto	$\text{RSD}\%_{\text{CI}} = 4.3$ $\text{RSD}\%_{\text{CM}} = 5.7$ $\text{RSD}\%_{\text{CS}} = 3.9$
Exactitud intra-ensayo	$\text{ERR}\%_i < 20$ concentración inferior (LC_i o CI) $\text{ERR}\%_i < 15$ resto	$\text{ERR}\%_{\text{CI}} = 15.5$ $\text{ERR}\%_{\text{CM}} = 7.6$ $\text{ERR}\%_{\text{CS}} = 4.3$

Precisión intermedia RSD% _i del conjunto de resultados a cada conc.	RSD% _i < 20% RSD% _i < 15%	concentración inferior (LC _i o CI) resto	RSD% _{0i CI} = 6.75 RSD% _{0i CM} = 5.8 RSD% _{0i CS} = 4.8
Exactitud inter-ensayo ERR% _i del valor medio	ERR% _i < 20 ERR% _i < 15	concentración inferior (LC _i o CI) resto	ERR% _{0i CI} = 14.9 ERR% _{0i CM} = 7.5 ERR% _{0i CS} = 3.7
Idoneidad del análisis de una muestra diluida	$x_{CS} = x_{CSD}$	$p > 0.05$	$p = 0.17$
Incertidumbre asociada a los resultados	$U = \pm \frac{IC95\%_{max}}{\sqrt{n}}$	< 25%	± 11.35 %