

MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA DETERMINAR INDINAVIR EN PLASMA HUMANO Y ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DEL ERROR

C. Fernández Lastra, P. Modamio Charles, Verónica Albert Sánchez, M^a Salut Martínez Ferrer, E.L. Mariño Hernández

Unidad de Farmacia Clínica y Farmacoterapia. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona.
Avda. Joan XXIII s/n. 08028, Barcelona (España). <http://www.ub.es/farcli/wp0.htm>

Introducción

Indinavir (DCI) es un fármaco antirretroviral perteneciente al grupo de los inhibidores de la proteasa (IP) (1).

El objetivo del presente estudio ha sido el desarrollo y validación de una metodología analítica para la determinación de indinavir en plasma humano mediante cromatografía líquida de alta eficacia, y posteriormente el establecimiento de la función del error analítico del citado método.

Materiales y Métodos

El estudio se ha llevado a cabo mediante cromatografía líquida en fase reversa acoplada a un detector UV-visible.

El análisis cromatográfico se realizó a temperatura ambiente con una columna Luna C18 fase reversa, 5 μ m, 150 \times 4,6 mm (Phenomenex®) y una precolumna C18 ODS, Octadecyl, 4 \times 3,0 mm (Phenomenex®). La fase móvil consistió en acetonitrilo-tampón fosfato ajustado con ácido fosfórico a pH 5 (43:57, v/v), eluida isocráticamente a 1 ml/min. El detector UV-visible se monitorizó a 210 nm.

Previamente al análisis, las muestras se procesaron mediante extracción líquido-líquido siguiendo el siguiente procedimiento: a 1ml de plasma se le añadió 1 ml de tampón borato a pH 9 y se agitó mediante vórtex. A continuación se extrajo con hexano-etilacetato, y se agitó 10 min en un mezclador rotatorio. Se descartó la fase acuosa y la orgánica se transfirió a un tubo para ser evaporada en corriente de nitrógeno y a temperatura 50 \pm 1°C. El residuo se reconstituyó

con 125 μ l de fase móvil, y se inyectaron alícuotas de 80 μ l.

La validación del método analítico (2, 3) se inició con el ensayo de linealidad. Para éste se prepararon rectas de calibrado dentro del rango de concentraciones de 200-10.000 ng/ml. Para cada concentración el análisis se realizó por triplicado.

Para los ensayos de precisión y exactitud intra e interdía se escogieron tres concentraciones (alta, media y baja) dentro del rango de linealidad que fueron 200, 1.000 y 5.000 ng/ml. Dichas concentraciones se prepararon por quintuplicado. (variabilidad intradía) y se siguió la misma pauta, durante cinco días (variabilidad intradía).

También se establecieron los límites de detección y cuantificación de indinavir para este método analítico.

Para la obtención de la función del error analítico se prepararon tres rectas de calibrado y se calculó el valor medio y la desviación estándar de cada concentración, repitiéndose este proceso durante cinco días (4). Mediante análisis de regresión múltiple, considerando la desviación estándar como variable dependiente y el valor teórico de las concentraciones como variable independiente se discriminó la mejor función que relaciona ambas variables, mediante el método Stepwise Forward. Los cálculos se realizaron con el programa informático Microstat (Ecosoft Inc.).

Resultados y Discusión

En la figura 1 se muestra un cromatograma representativo de indinavir obtenido con el método analítico desarrollado.

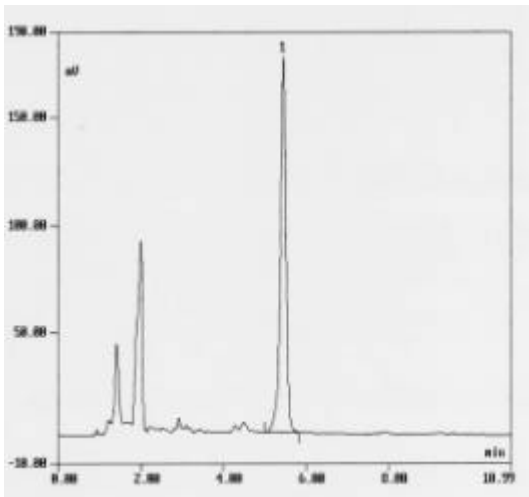


Figura 1. Cromatograma de indinavir a una concentración de 5.000 ng/ml en plasma humano.

Los resultados obtenidos en el ensayo de linealidad permiten comprobar una buena correlación entre el área y la concentración dentro del rango de concentraciones estudiado. Estos resultados se muestran en la tabla 1:

Tabla 1. Resultados del ensayo de linealidad.

Área = 0,936 + 0,01·Concentración		
r	Error estándar de la pendiente	F
0,993	2,80 E-04	369,1

Respecto a la precisión intradía, el coeficiente de variación (CV) presentó un valor máximo de 9,1% para la concentración de 5.000 ng/ml y un valor mínimo de 4,9% para la de 200 ng/ml. En el ensayo de precisión interdía se obtuvo un CV máximo de 7,7% para la concentración de 200 ng/ml, y un CV mínimo de 0,3% para la de 5.000 ng/ml.

El ensayo de exactitud permite obtener el porcentaje de desviación (%Bias) en relación al valor de concentración teórico. El bias de la exactitud intradía presentó un valor máximo de 14,7% y para la interdía de 14,3%, ambas para la concentración de 200 ng/ml.

Los límites de cuantificación y detección se establecieron en 100 y 50 ng/ml respectivamente.

Tras la validación del método analítico, se procedió a la discriminación de la función del error analítico. Dicha función resultó ser lineal y se ajustaba a la ecuación:

$$\text{Desviación Estándar} = 6,39 + 0,09 \cdot \text{Concentración}$$

A la vista de los resultados obtenidos en los ensayos de validación (todos los valores se encuentran dentro de los aceptados cuando se trabaja con muestras biológicas), se dispone de una metodología analítica apta para la correcta cuantificación de niveles plasmáticos de indinavir en pacientes VIH+. Por otro lado, la determinación de la función del error analítico se empleará como método de ponderación alternativo a los clásicos en la determinación de parámetros farmacocinéticos mediante las metodologías de cálculo de regresión no lineal.

Bibliografía

1. Panel on clinical practices for treatment of HIV. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-infected adults and adolescents. (2002) Disponible en: URL: <http://www.hivartis.org>
2. Causon R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion. J Chromatogr B, 689, 175, (1997).
3. AEFI. Validación de métodos analíticos. AEFI, La Bisbal (Girona), 2001.
4. Modamio P, Lastra CF, Mariño EL. Determination of analytical error function for β-blockers as a possible weighting method for the estimation of the regression parameters. J Pharm Biomed Anal, 14, 401 (1996).

Autor de contacto:
 Cecilia Fernández Lastra
 cecilia@farmacia.far.ub.es
 Universidad de Barcelona,
 Facultad de Farmacia. Dpto. de Farmacia y
 Tecnología Farmacéutica. Avda. Joan XXIII s/n
 08028-Barcelona
 Telf.: 93 402 45 44
 Fax: 93 403 57 14