

ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN PROTOCOLO DE HPLC (HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY) PARA MEDIR COENZIMA Q10 EN PLAQUETAS

Myrian Ibeth Chiluiza Jácome¹

RESUMEN

Se presenta una nueva metodología para la cuantificación de coenzima Q10 en plaquetas a través de la técnica de HPLC (cromatografía líquida de alta precisión), misma que servirá para el estudio de los mecanismos involucrados en la disfunción mitocondrial de enfermedades cardíacas, mitocondriales e hipertensión, así como para la evaluación de la absorción de la coenzima en tejidos de interés médico. Los resultados de la estandarización y validación de este método, cumplieron con las normas de calidad internacionales más reconocidas en la reglamentación de métodos analíticos, tales como las dadas por el Eurachem, la ICH (Conferencia Internacional sobre Armonización de Requisitos Técnicos para el Registro de Productos Farmacéuticos para Uso Humano) y la USP (Farmacopea de los Estados Unidos), por lo que se concluye que el presente método es preciso, exacto y produce resultados consistentes.

Palabras clave: coenzima Q10, cromatografía líquida de alta precisión, estandarización, validación.

ABSTRACT

This paper presents a new methodology for quantification of coenzyme Q10 in platelets through high performance liquid chromatography technique, it will serve to study the mechanisms involved into mitochondrial dysfunction of hypertensive, mitochondrial and heart diseases and for the evaluation of the absorption of the coenzyme into tissues of medical interest. The results of the standardization and validation of this method met international standards for analytical methods such as those by the Eurachem, ICH (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) and USP (United States Pharmacopeia), so, this method is precise, accurate and produces consistent results.

Keywords: coenzyme Q10, high performance liquid chromatography, standardization, validation.

¹ Centro de Biomedicina de la Universidad Central del Ecuador. Escuela Politécnica del Ejército. Departamento de Ciencias de la Vida. Ingeniería en Biotecnología.

INTRODUCCIÓN

La coenzima Q10 (CoQ10) es un antioxidante liposoluble esencial para el funcionamiento óptimo de todas las células del organismo. Se encuentra principalmente en la mitocondria, donde interviene en la formación de un gradiente de protones transmembrana que constituye la base para captar energía y formar ATP, además que permite el paso de electrones desde el complejo I y II al complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial, sin lo cual ésta simplemente se frenaría y consecuentemente todas las células afectadas morirían por asfixia (Brandt U, 1997) (Okun JG, 1999). Asimismo, la CoQ10 actúa en la prevención del daño oxidativo del ADN, membranas biológicas y lipoproteínas, impidiendo los procesos de peroxidación lipídica (Barshop, 2007) (Crane F. , 2000).

La coenzima Q10 se determina frecuentemente en plasma o suero sanguíneo, sin embargo existen algunos estudios que cuestionan el valor de estas mediciones, puesto que no reflejarían exactamente la concentración intracelular de la misma (Zhang Y, 1995) (Niklowitz, 2004) y por lo tanto su relación con patologías tales como Isquemia miocárdica, hipertensión, Alzheimer, Huntington, entre otras (Beal, 1999) (Munkholm, 1999) (Langsjoen, 1999), podría ser discutida. Es por ello que recientemente para la investigación clínica del rol de la CoQ10 en las patologías antes mencionadas, se está poniendo atención a su determinación en células sanguíneas, siendo las células predilectas las plaquetas, debido a que son ricas en mitocondrias, se pueden aislar fácilmente de pequeños volúmenes de sangre y presentan varias semejanzas con las neuronas, lo que posibilita el estudio de los mecanismos metabólicos y bioquímicos de varios desórdenes de tipo neurológico (Contin, 2011) (Bhagavan, 2006).

Con estos antecedentes y debido a la escasez de trabajos en torno al desarrollo de metodologías de medición de CoQ10 en células sanguíneas, este trabajo busca estandarizar y validar un protocolo de medición de coenzima Q10 en plaquetas mediante la metodología de HPLC, bajo las condiciones ambientales de nuestro país.

METODOLOGÍA

El presente estudio se llevó a cabo en dos fases denominadas estandarización y validación del método, respectivamente. Durante la primera, se evaluó el protocolo candidato propuesto por Contin (2011) bajo las condiciones del Laboratorio de Cromatografía del Centro de Biomedicina de la Universidad Central del Ecuador y se realizaron varias pruebas de optimización del mismo, tanto para la parte de

extracción como para la de cuantificación de las muestras de CoQ10. El protocolo óptimo resultante se aplicó en el grupo de estudio analizado: 35 personas de sexo masculino y femenino, de nacionalidad ecuatoriana, cuyas edades se encuentran dentro del rango de 18 a 30 años, que aceptaron participar en esta tesis previa firma del consentimiento informado, con el requisito de no haber ingerido ningún medicamento los últimos tres meses previos al estudio y no presentar ningún trastorno metabólico aparente.

En la fase de validación del método en cambio, se realizaron las siguientes pruebas de calidad analítica: exactitud, precisión, robustez, linealidad, sensibilidad, identidad e incertidumbre, mismas que fueron corridas de acuerdo a las normas establecidas por la Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos y Temas Relacionados del Eurachem (Referente para química analítica en Europa).

RESULTADOS

El protocolo óptimo resultante del proceso de estandarización, se muestra a continuación:

Preparación de la muestra:

- Extraer 4,5 ml de sangre periférica en tubos citratados, de voluntarios sanos con 8 h de ayuno.
- Decantar dicha sangre hasta que la fracción de plasma rico en plaquetas (PRP) corresponda aproximadamente al 20% del volumen de sangre total.
- Tomar una alícuota de 10 μ l del PRP obtenido para efectuar el recuento manual de plaquetas en la cámara de Neubauer.
- Tomar una alícuota de 800 μ l de PRP y centrifugarla a 11000rpm durante 15 minutos.
- Descartar el sobrenadante (plasma pobre en plaquetas "PPP"). En este paso se puede optar por la determinación de CoQ10 en el día de extracción de la muestra o guardar el pellet de plaquetas a -55 °C para el posterior análisis de CoQ10.
- Adicionar 200 μ l de 1-propanol frío al pellet y agitar la mezcla en vórtex a máxima velocidad durante 3 min.
- Centrifugar a 10000rpm por 10 minutos.
- Tomar la fase orgánica y evaporarla a sequedad bajo atmósfera de nitrógeno.
- Reconstituir el residuo en un volumen final de 100 μ l de la fase móvil metanol: 1-propanol relación 60:40.

Condiciones cromatográficas:

- Fase móvil: metanol: 1-propanol relación 60/40.
- Flujo: 0,4 ml/min.
- Volumen de inyección 90 ul.
- Corrida isocrática.
- Temperatura de la muestra: 8°C ± 2.
- Temperatura de la columna: 25°C ± 5.
- Absorbancia: 275nm.

Instrumentación:

- Equipo de HPLC marca Alliance Waters con módulo de separación modelo W2690D/5D y detector UV con arreglo de diodos modelo W2998.
- Columna de separación Symmetry® C-18 Waters de dimensiones 2,1mm x 20mm x 3,5um.
- Precolumna Symmetry® C-18 de 5um Waters.
- Software de procesamiento de resultados cromatográficos: Empower 2.

Los parámetros más relevantes de la aplicación del protocolo óptimo (método) en las muestras de la población analizada fueron: concentración promedio de la coenzima Q10 plaquetaria de 0,69umol/L, desviación estándar de las concentraciones medidas igual a 0,32 y concentración mínima y máxima de Q10 en la población de 0,11 y 1,85umol/L, respectivamente.

Los límites de calidad establecidos a partir de la validación del método se muestran a continuación en la Tabla 1:

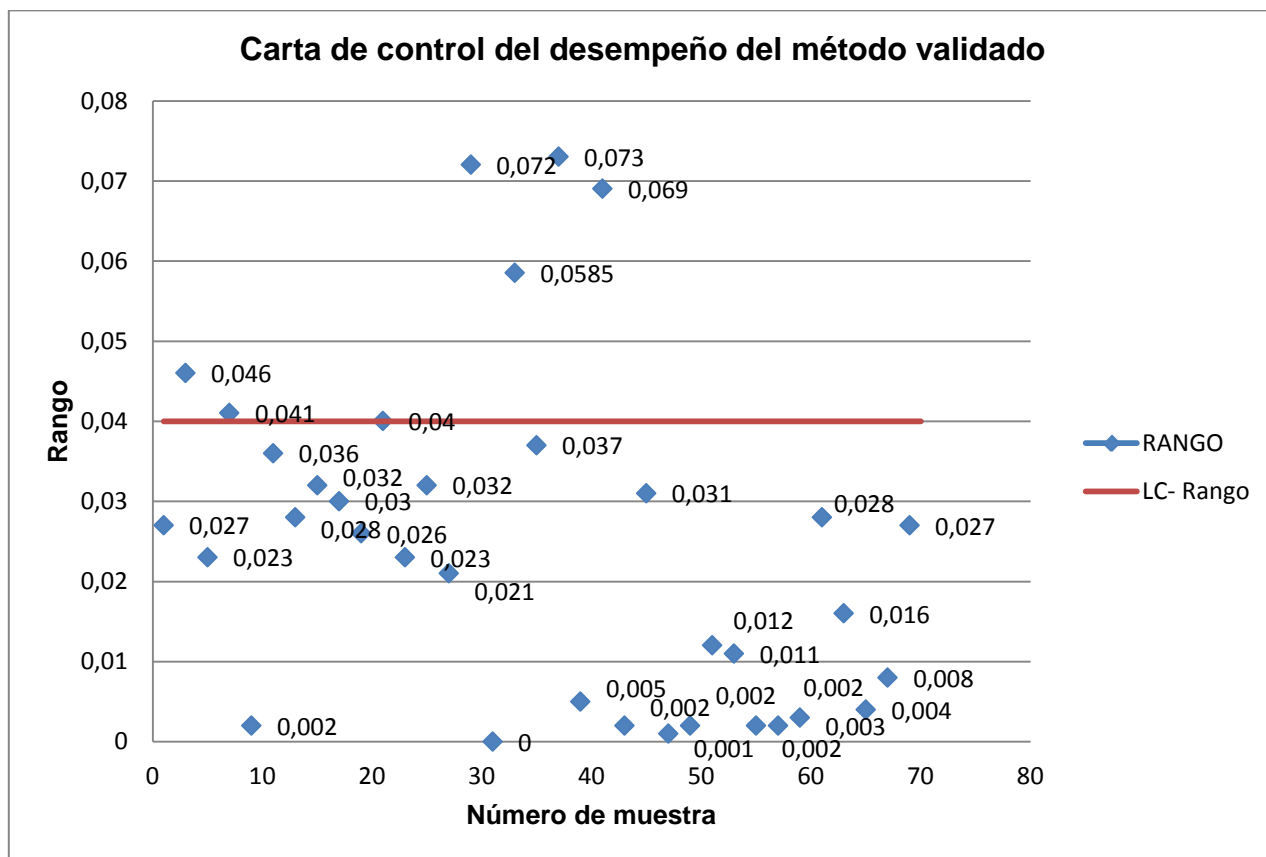
Tabla 1. Límites de calidad del método analítico para la determinación de CoQ10 en plaquetas.

Criterio		Límite		
Límite de detección (LD)		0,023umol/L +/- 0,14		
Límite de cuantificación (LC)		0,038umol/L +/- 0,14		
Rango de trabajo		(0,038 – 2) umol/L		
Porcentaje de recuperación (veracidad)		96,8%		
Robustez		(91,75 – 101,85) porciento de recuperación		
Incertidumbre		0,14		
Rango lineal y curvas de calibración				
	Pendiente (K)	Corte eje Y (AØ)	Coefficiente de correlación (R²)	
Promedio (X)	187948,46	-8186,54	0,998	
Límite inferior de control (LIC)	176159,50	-16197,60	0,997	
Límite superior de control (LSC)	199737,40	-175,45	1.00	
Precisión del método				
Rangos de aceptación	Repetibilidad		Reproducibilidad	
	0,004	0,02	0,002	0,037
	bajo	alto	bajo	Alto

Todos estos parámetros cumplieron satisfactoriamente con los límites establecidos por el Eurachem (Referente en química analítica en Europa), la ICH (Conferencia Internacional sobre Armonización de Requisitos Técnicos para el Registro de Productos Farmacéuticos para Uso Humano) y la USP (Farmacopea de los Estados Unidos), por lo que el presente método es apto para su uso.

La carta de control del método validado se indica en la Figura 1:

Figura 1. Carta de control del desempeño del método validado.



Como se observa en la Figura 1, la mayoría de las muestras corridas cumplen con el límite de reproducibilidad establecido por la validación del método. Sin embargo, existen cinco puntos con un comportamiento diferente al de la población, que por tanto exceden dicho límite, por lo que es necesario buscar las causas de esos *outliers* o valores atípicos.

DISCUSIÓN

Estandarización del método.

La primera etapa en la validación de un método analítico es la *puesta a punto* u optimización de los parámetros de influencia del mismo. A menudo se confunden los términos estandarización y validación, pues ambos son complementarios y dependientes. Sin embargo, en este estudio se consideró como estandarización del método a la optimización de todos los factores influyentes tanto en el procesamiento de las muestras, como en su cuantificación.

Los parámetros con mayor efecto en la optimización del método fueron:

La fase móvil. Partiendo de que uno de los componentes de la fase móvil original fue reemplazado por su isómero (se usó 1-propanol en lugar de 2-propanol), este parámetro fue ampliamente probado para su utilización en el presente método, observándose las siguientes ventajas en relación al protocolo original: disminución del tiempo de retención, incremento de la respuesta cromatográfica de las muestras inyectadas, expresado como la altura y el área de las mismas y mayor compatibilidad con la matriz de muestra. Sin embargo, una desventaja hallada fue el tiempo de vida media de la solución patrón preparada con este nuevo solvente, mismo que fue de dos semanas solamente antes de presentar una degradación mayor al 20% de su contenido inicial.

El flujo. Como una medida de disminución del tiempo de retención de las muestras, así como para procurar un pico cromatográfico de altura adecuada en las mismas, se probaron varios flujos, siendo el más óptimo el de 0,4ml/min, ya que permite la elución rápida de las muestras, así como la formación de un pico de características deseables, es decir, con altura y área apropiadas. Lo que es muy importante, ya que uno de los parámetros que limita la expansión y/o comercialización de servicios de análisis, es el costo de los mismos, por lo que, al obtener un método con tiempos cortos de corrida es más deseable su utilización para fines posteriores.

El volumen de partida del plasma rico en plaquetas y el volumen de reconstitución del extracto seco. Ambos parámetros fueron decisivos en la concentración de las muestras, dado que al aumentar la cantidad de plasma rico del que parte el procesamiento, se incrementa la disponibilidad de la CoQ10 a ser extraída. Asimismo, el disminuir el volumen de reconstitución del residuo seco, permite concentrar más la muestra, ya que el contenido de Q10 extraído se reparte en un volumen menor. Este proceso se desenvuelve en una relación matemática, donde a mayor volumen de partida y menor volumen de reconstitución, habrá una mayor concentración de la muestra.

Finalmente, *el volumen de inyección*, fue un parámetro clave para la visualización óptima del pico cromatográfico de la coenzima Q10 de las plaquetas en el cromatograma, ya que debido a que las cantidades medidas están en órdenes de picomol o micromol, el pico obtenido es muy pequeño, por lo que para incrementar su factor de respuesta, este parámetro fue incrementado a 90ul para su inyección.

Validación del método.

Los criterios evaluados en la validación del presente método fueron:

Exactitud. Este parámetro fue evaluado a través de la veracidad, obteniendo un resultado satisfactorio del 96,8% de recuperación de CoQ10 en una muestra, lo que cumple con los objetivos planteados en el presente proyecto de graduación, en la validación del método y está acorde con las normas internacionales del Eurachem, la ICH y la USP (ICH, 1996) (Eurachem, 2005) (USP - NF, 2008). Además, en comparación con la exactitud obtenida en el protocolo guía (Contin, 2011), que fue del 89 al 95,3% de recuperación, éste método supera dicho nivel de exactitud aún en su límite superior.

Precisión. Los límites obtenidos para muestras de concentraciones bajas y altas, en condiciones de repetibilidad (0,004 - 0,02) y reproducibilidad (0,002 - 0,037), se mantuvieron dentro del rango de aceptación propuesto en los objetivos de la validación del método, mismo que fue establecido como cualquier valor menor o igual a una diferencia absoluta entre dos mediciones del mismo mesurando de 0,05. Por lo que el presente método tiene niveles de precisión aceptables y congruentes con los establecidos por el Eurachem y la USP (Eurachem, 2005) (USP - NF, 2008).

En relación con el protocolo guía, este método también tiene rangos de aceptación más exigentes, siendo los rangos establecidos por Contin de: 0,04 a 0,057 y de 0,043 a 0,063, en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad, respectivamente.

Robustez. Este criterio se estableció entre el 91,75 y el 101,85 por ciento de recuperación, lo que cumple con el objetivo de validación planteado para este parámetro, que fue del 90 al 110 por ciento, según lo recomendado por el Eurachem. Normalmente el límite superior de este rango se establece sobre el 100% de recuperación, ya que se considera que en el sistema de cuantificación de las muestras pueden existir elementos traza de corridas anteriores que estén en la capacidad de relacionarse con la muestra analizada, así como por los errores sistemáticos inherentes del aparato de medición usado.

Sensibilidad. Los dos criterios que determinaron la sensibilidad del presente método analítico fueron: límite de detección de $0,023\mu\text{mol/L} \pm 0,002$ (5,31 picomol/1E9 plaquetas) y límite de cuantificación de $0,038\mu\text{mol/L} \pm 0,002$ (8,04 picomol/1E9 plaquetas), que en relación con los límites obtenidos por Contin

(2011): límite de detección de 21 picomol/1E9 plaquetas y límite de cuantificación de 84 picomol/1E9 plaquetas, demuestran mucha mayor sensibilidad en las mediciones, por lo que éste método es capaz de medir concentraciones a niveles muy bajos, casi indetectables, con niveles de precisión y exactitud adecuados.

Linealidad. De acuerdo al coeficiente de correlación promedio de las cuatro curvas probadas en condiciones de reproducibilidad, mismo que fue de 0,998, se establece que las respuestas cromatográficas del método son perfectamente lineales a las concentraciones del principio activo, por lo que, pueden ser utilizadas con absoluta seguridad para cuantificar la coenzima Q10 de las plaquetas. Este coeficiente de correlación cumple con los límites establecidos por el Eurachem, la ICH y la USP (ICH, 1996) (Eurachem, 2005) (USP - NF, 2008).

Confirmación de identidad: selectividad/especificidad. Para garantizar que la respuesta cromatográfica se debe únicamente al compuesto analizado (Eurachem, 2005), se corrieron todos los componentes implicados en el procesamiento y cuantificación de la muestra, juntos y por separado, de lo que se observó que éstos no produjeron ninguna respuesta (pico cromatográfico) al tiempo de retención del analito de interés. Por lo que, se puede aseverar que éste método no presenta interferencias en sus mediciones.

Incertidumbre. La incertidumbre de medición de un método analítico, caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente atribuidos al mesurando (Ventura, 2008). El valor de la incertidumbre expandida es usualmente utilizado para expresar los resultados de un método con un nivel de confianza del 95% de que su valor verdadero se encuentre dentro de dicho nivel de incertidumbre (Schmid, 2000).

En este método la incertidumbre expandida fue de 0,14, lo que cumple con el límite establecido por el Eurachem, mismo que acepta una incertidumbre menor o igual a 0,30.

Muestras.

En este estudio, no se encontraron correlaciones significativas entre la edad, género o número de plaquetas de los individuos analizados con la concentración intracelular de coenzima Q10 de los mismos, por lo que, mayores experimentaciones serán necesarias para ratificar o negar dichas observaciones.

En cuanto a la carta de control establecida para evaluar el desempeño del método validado con las 35 muestras de individuos ecuatorianos sanos con edades de 18 a 30 años de edad, se puede decir, que aunque la mayor parte de muestras cumplieron con el límite de reproducibilidad (0,04), existieron 5 muestras atípicas que no siguieron este comportamiento, por lo que excedieron el límite anteriormente mencionado. Estas muestras anómalas según Grubbs (1969), pudieron deberse a un mal funcionamiento transitorio del aparato de medición, cambios en el comportamiento del sistema, el error humano o errores sistemáticos del instrumento. Más debido a la experiencia, se concluye que ésta variación se debió a la falta de estabilización de la botella dosificadora de 1-propanol, luego de aumentar su contenido.

CONCLUSIONES

El protocolo óptimo HPLC, estandarizado y validado para la medición de coenzima Q10 en plaquetas, cumple con las normas internacionales más reconocidas en la reglamentación de métodos analíticos tales como las dadas por el Eurachem, la ICH (Conferencia Internacional sobre Armonización de Requisitos Técnicos para el Registro de Productos Farmacéuticos para Uso Humano) y la USP (Farmacopea de los Estados Unidos), por lo que es apto para su uso. Este protocolo constituye un método sencillo, con requerimiento de pequeños volúmenes del material de análisis, altamente sensible, preciso y exacto en sus mediciones, además de rápido en la cuantificación de los resultados, por lo que será útil para el diagnóstico y seguimiento apropiado de las patologías que involucran la deficiencia de la coenzima Q10.

BIBLIOGRAFÍA

- Barshop, B. G. (2007). Analysis of coenzyme Q in human blood and tissues. *Mitochondrion* 7, S89-S93.
- Beal, M. (1999). Coenzyme Q10 administration and its potential for treatment of neurodegenerative diseases. *Biofactors*. 9, 261 - 266.
- Bhagavan, H. a. (2006). Coenzyme Q10: Absorption, tissue uptake, metabolism and pharmacokinetics. *Free Radical Research* 40(5), 445–453.
- Brandt U, O. J. (1997). Role of deprotonation events in ubihydroquinone: cytochrome c oxidoreductase from bovine heart and yeast mitochondria. *Biochemistry*.36, 11234–40.

Contin, M. D. (2011). Sistema cromatográfico miniaturizado para la determinación de coenzima Q10 en plasma, músculo y plaquetas. *cta bioquím. clín. latinoam. vol.45 no.2*, 1-2.

Crane, F. (2000). Biochemical functions of coenzyme Q10. *J Am Coll Nutr*, 20 (6): 591-8.

Eurachem. (2005). *Métodos analíticos adecuados a su propósito*. México: Eurachem.

ICH. (1996). International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of analytical procedures. Geneva.

Langsjoen, P. H. (1999). Overview of the use of CoQ10 in cardiovascular disease. *BioFactors*. 9, 273–284.

Munkholm, H. H. (1999). Coenzyme Q10 treatment in serious heart failure. *BioFactors* 9, 285–289.

Niklowitz, P. M. (2004). Simultaneous analysis of coenzyme Q10 in plasma, erythrocytes and platelets: comparison of the antioxidant level in blood cells and their environment in healthy children and after oral supplementation in adults. *Clin Chim Acta*, 342: 219-26.

Okun JG, L. P. (1999). Three classes of inhibitors share a common binding domain in mitochondrial complex I (NADH: ubiquinone oxidoreductase). *J Biol Chem*. 274, 2625– 30.

Schmid, W. L. (2000). Guía para estimar la incertidumbre de medición. *Centro Nacional de Metrología, División de Óptica y Radiometría*, 2-4.

USP - NF. (2008). Chapter <1225> – Validation of Compendial Methods. En U. NF, *USP 32. Spanish Edition*. (págs. 233-254). EEUU: USP Editors.

Ventura, G. L. (2008). *Cálculo de la incertidumbre de la medición*. México: Centro de Salud Pública.

Zhang Y, A. F. (1995). Uptake of dietary coenzyme Q supplement is limited in rats. *J Nutr*. 125(3), 446-53.