

**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE QUÍMICA**



**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA  
DETERMINACIÓN DE ÁCIDO VALPROICO EN TABLETAS POR RP - HPLC CON  
DETECTOR DE ARREGLO DE DIODOS**

Trabajo Especial de Grado presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela, por la TSU. Dubraska Yudith Vega Centeno, para optar al título de Licenciada en Química, opción Básica.

Tutores: Dr. Luis Gómez

Esp. Marisabel Bor

Caracas, Octubre de 2014

Yo Profesor Luis Gómez, Investigador del Centro de Investigación de Química Analítica de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela y la Profesora Marisabel Bor Investigadora del Laboratorio Análisis de Medicamentos de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela. Certificamos que, el presente Trabajo Especial de Grado, titulado:

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA  
DETERMINACIÓN DE ÁCIDO VALPROICO EN TABLETAS POR RP- HPLC CON  
DETECTOR DE ARREGLO DE DIODOS**

Que presenta la TSU. Dubraska Yudith Vega Centeno, para aspirar al título de Licenciada en Química, ha sido realizado en el Laboratorio Análisis de Medicamentos de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, bajo nuestra dirección, durante los años 2013 y 2014, y con esta fecha autorizamos su presentación.

Caracas, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2014

---

(Tutor)

---

(Tutor)

## RESUMEN

El ácido valproico es un principio activo empleado en el tratamiento de crisis epilépticas, desorden bipolar, demencia y prevención de migrañas en seres humanos. En esta investigación, se desarrolló y validó un método analítico sencillo de aplicar, rápido, menos tóxico y más económico para la determinación cuantitativa de ácido valproico en tabletas por cromatografía líquida de alta eficiencia en fase inversa (RP-HPLC). La separación se realizó con una columna SunFire C<sub>18</sub> (5 µm, 150 x 4,6 mm), bajo una elución isocrática a temperatura ambiente, empleando una fase móvil compuesta por etanol-agua (60:40 %v/v) ajustada a pH 3,5 con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 85,7 %m/m; un volumen de inyección de 5 µL; un flujo de 0,8 mL/min y una detección UV-visible con arreglo de diodos a 212 nm.

El método propuesto resultó ser selectivo al no evidenciarse productos de degradación u otros componentes de la matriz de la muestra coeluyendo con el principio activo en estudio. Los límites de detección y cuantificación mostraron valores de 0,07 y 0,2 mg/mL, respectivamente. Se obtuvieron curvas de calibración lineales con  $R > 0,999$  en un rango de concentración de ácido valproico entre 0,5 y 3,2 mg/mL, respectivamente. Se encontró que el método era exacto al obtenerse una recuperación promedio cercana al 100 %, además resultó ser preciso al proporcionar valores de CV menores al 2 %. Finalmente, se demostró que el método no es robusto ante los cambios realizados en el pH, porcentaje de etanol y flujo de las fases móviles analizadas.

La presente metodología desarrollada y validada puede ser empleada en análisis de rutina y control de calidad de ácido valproico; ya que proporciona resultados confiables y cumple con las especificaciones establecidas en los parámetros de validación.

Los abajo firmantes asignados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: Desarrollo y validación de un método analítico para la determinación de ácido valproico en tabletas por RP- HPLC con detector de arreglo de diodos. Presentado por la TSU. Dubraska Vega, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciada en Química.

---

Dr. Luis Gómez  
(Tutor)

---

Esp. Marisabel Bor  
(Tutora)

---

Dra. Rosa Amaro  
(Jurado)

---

Dra. Katiuska Chávez  
(Jurado)

## **AGRADECIMIENTOS**

Haber alcanzado este objetivo luego de tantas vicisitudes se lo debo primeramente a Dios, por no abandonarme en aquellos momentos de oscuridad.

Junto a Dios se encuentra mi Padre (William Vega), que sin ser la persona más culta de este mundo me cuidó, guió e infundió los valores más preciados que tengo. Aunque no estés físicamente, sé que estarías orgulloso de mí. Tus valiosas y contundentes palabras son mi combustible para lograr todo aquello que parezca imposible.

A mi madre (Judith Centeno), que con su infinito amor se desveló y angustió en varias oportunidades, al trasnocharme por un informe, examen u otra evaluación. No puedo olvidar su glorioso café en esos momentos de cansancio.

A mi hermano querido (William Enrique Vega), que sin sus habilidades informáticas hubiese sucumbido en la desesperación con mi PC e impresora. Su apoyo y colaboración son invaluable.

A mis demás familiares, que entendieron mi ausencia en las celebraciones especiales. Su cariño y afecto enriquecen mi alma.

A mis amigos, que con su compañía, consejos y explicaciones hicieron más fácil el camino por esta carrera.

A mi novio (Luis Rivero), por su amor, paciencia, compañía y apoyo.

A mis profesores, en especial (José Ledezma, Héctor Franco, Patricia Baffi, Katuska Charris, María Eugenia Avilán, Miriam Regnault, Jesús Romero) y a mis tutores (Luis Gómez y Marisabel Bor), quienes han influido positivamente en mi formación personal, académica y profesional. De ellos he ganado conocimiento, seguridad y disciplina, por eso me siento fortalecida.

A todos ellos les doy las gracias y les presento mi profundo respeto. Dios los bendiga.

## ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.....	14
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1. Epilepsia.....	15
2.1.1. Definición.....	15
2.1.2. Clasificación.....	15
2.1.2.1. Crisis epilépticas parciales o focales.....	15
2.1.2.2. Crisis epilépticas generalizadas.....	16
2.1.3. Causas.....	17
2.1.4. Tratamiento.....	17
2.2. Ácido valproico (AVP).....	19
2.2.1. Estructura química e importancia del ácido valproico.....	19
2.2.2. Farmacocinética y mecanismo de acción.....	20
2.2.3. Indicaciones terapéuticas.....	21
2.2.4. Interacciones con otros medicamentos.....	21
2.2.5. Efectos secundarios.....	22
2.2.6. Impurezas o sustancias relacionadas del ácido valproico y valproato. de sodio.....	23
2.2.7. Técnicas empleadas en la determinación de ácido valproico.....	24
2.3. Validación del método analítico.....	24
2.3.1. Elementos o parámetros de validación.....	26
2.3.1.1. Linealidad del rango.....	26
2.3.1.2. Especificidad.....	27
2.3.1.3. Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ).....	28
2.3.1.4. Precisión.....	29
2.3.1.5. Exactitud.....	30
2.3.1.6. Robustez.....	31

3. ANTECEDENTES.....	34
4. JUSTIFICACIÓN.....	49
5. OBJETIVOS.....	50
5.1. Objetivo general.....	50
5.2. Objetivos específicos.....	50
6. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	51
6.1. Equipos y reactivos.....	51
6.1.1. Instrumentación.....	51
6.1.2. Reactivos y solventes.....	52
6.1.3. Materiales.....	53
6.1.4. Patrones.....	53
6.1.5. Muestras.....	54
6.2. Condiciones cromatográficas preliminares.....	54
6.2.1. Selección de los eluentes.....	55
6.2.2. Selección de la longitud de onda.....	56
6.2.3. Ensayos cromatográficos.....	57
6.3. Optimización de las condiciones cromatográficas.....	59
6.4. Validación del método analítico.....	63
6.4.1. Linealidad del rango.....	64
6.4.2. Especificidad.....	67
6.4.3. Límite de detección (LOD) y Límite de cuantificación (LOQ).....	73
6.4.4. Precisión.....	73
6.4.4.1. Precisión de sistema o repetibilidad instrumental.....	74
6.4.4.2. Precisión del método o repetibilidad de método.....	74
6.4.4.3. Precisión intermedia.....	76
6.4.5. Exactitud.....	77
6.4.6. Robustez.....	80
6.5. Determinación del contenido de ácido valproico 500 mg en los medicamentos A y B.....	83

6.6. Comparación del método analítico desarrollado con el método propuesto por la USP .....	84
7. CONCLUSIONES .....	87
8. RECOMENDACIONES.....	89
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	90
10. APÉNDICE .....	94
Apéndice A .....	94
Apéndice B .....	108
Apéndice C .....	109
Apéndice D .....	111
Apéndice E .....	114



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Antiepilépticos comunes.....	18
<b>Figura 2.</b> Medicamentos de elección acorde con el tipo de crisis epiléptica.....	21
<b>Figura 3.</b> Impurezas o sustancias relacionadas del ácido valproico y valproato de sodio .....	23
<b>Figura 4.</b> Reacción de derivatización del ácido valproico con bromuro de fenacilo, catalizada por trietilamina.....	42
<b>Figura 5.</b> Separación cromatográfica obtenida con monitoreo a 246 nm: (a) muestra de suero libre de ácido valproico, el patrón interno (PI), (b) muestra de suero de paciente con farmacoterapia de ácido valproico (61,9 µg/mL) .....	43
<b>Figura 6.</b> Cromatograma del valproato de sodio en la solución de la muestra .....	45
<b>Figura 7.</b> Cromatograma de ácido valproico, A) solución del patrón, B) solución de la muestra .....	46
<b>Figura 8.</b> Cromatograma de ácido valproico por HPLC, A) solución patrón de concentración 1,03 mg/mL, B) solución de la muestra de concentración 1,00 mg/mL .....	48
<b>Figura 9.</b> Espectro de absorción ultravioleta de ácido valproico disuelto en: (a) acetonitrilo-agua (65:35 %v/v) ajustada a pH 3,5 y (b) etanol-agua (70:30 %v/v) ajustada a pH 3,5 .....	56
<b>Figura 10.</b> Cromatograma del patrón de ácido valproico disuelto en fase móvil, (a): acetonitrilo-agua (65:35 %v/v) ajustada a pH= 3,5 [condición 1]; (b): etanol- agua (70:30 %v/v) ajustada a pH=3,5 [condición 2]. .....	58
<b>Figura 11.</b> Cromatograma de la disolución de una tableta de ácido valproico disuelto en fase móvil etanol-agua (60:40 %v/v) ajustada a pH= 3,5 .....	61

<b>Figura 12.</b> Cromatograma del patrón de ácido valproico disuelto en fase móvil etanol-agua (60:40 %v/v) ajustada a pH= 3,5 .....	62
<b>Figura 13.</b> Cromatogramas obtenidos en el estudio de la especificidad a 212 nm: (a) patrón control analizado de inmediato; (b) muestra control analizada de inmediato y (c) muestra en presencia de calor a 75 °C, analizada luego de 4 h de exposición.....	68
<b>Figura 14.</b> Cromatogramas obtenidos en el estudio de la especificidad por degradación forzada, de las muestras analizadas a 212 nm después de 7 días en reposo: (a) muestra control; (b) muestra con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ; (c) muestra con HCl 4N; (d) muestra con NaOH 4N y (e) muestra en presencia de luz blanca.....	69
<b>Figura 15.</b> Degradación del ácido valproico por hidrólisis básica .....	70
<b>Figura 16.</b> Análisis de pureza espectral del primer paso, a 212 nm: (a) patrón control; (b) muestra control; (c) muestra en presencia de calor a 75 °C; (d) muestra control a los 7 días; (e) muestra en presencia de luz; (f) muestra con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ; (g) muestra con HCl. ....	72
<b>Figura 17.</b> Cromatograma del patrón puro de ácido valproico disuelto en la fase móvil; (a) disolución acuosa de 3,5 g/L de NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ajustada a pH 3,5 con H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> - acetonitrilo en proporciones 50:50 %v/v (método USP). (b) Etanol-agua (60:40 %v/v) ajustada a pH=3,5 .....	86
<b>Figura 18.</b> Aplicaciones de la cromatografía de líquidos .....	95
<b>Figura 19.</b> Relleno de la fase químicamente enlazada.....	98
<b>Figura 20.</b> Esquema de un aparato de HPLC.....	101

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Propiedades físico-químicas del ácido valproico .....	19
<b>Tabla 2.</b> Elementos requeridos en la validación de un método analítico para formulaciones farmacéuticas .....	25
<b>Tabla 3.</b> Rango de evaluación de las variables de estudio por HPLC en la robustez....	32
<b>Tabla 4.</b> Matriz ampliada del diseño factorial completo $2^3$ y sus interacciones.....	33
<b>Tabla 5.</b> Ácido valproico materia prima y formulaciones farmacéuticas - condiciones del sistema cromatográfico .....	34
<b>Tabla 6.</b> Sustancias relacionadas del ácido valproico y valproato de sodio - condiciones cromatográficas .....	39
<b>Tabla 7.</b> Condiciones cromatográficas de trabajo .....	60
<b>Tabla 8.</b> Valores de las áreas obtenidas para las concentraciones de ácido valproico estudiadas .....	64
<b>Tabla 9.</b> Estudio de los criterios de aceptación para la linealidad.....	66
<b>Tabla 10.</b> Contenido de ácido valproico 500 mg tabletas determinado en el análisis de especificidad.....	73
<b>Tabla 11.</b> Precisión del sistema cromatográfico.....	74
<b>Tabla 12.</b> Precisión del método analítico .....	75
<b>Tabla 13.</b> Estudio de la precisión intermedia .....	77
<b>Tabla 14.</b> Porcentaje de recuperación obtenido con las cantidades de ácido valproico fortificadas y sin fortificar .....	79
<b>Tabla 15.</b> Factores y dominios experimentales a estudiar .....	81
<b>Tabla 16.</b> Resumen de las condiciones experimentales para el estudio de la robustez.	81
<b>Tabla 17.</b> Interpretación de los resultados obtenidos en la evaluación de la robustez .	82

<b>Tabla 18.</b> Determinación del contenido de ácido valproico presente en los medicamentos A y B.....	84
<b>Tabla 19.</b> Factores de respuestas asociados al cociente del área promedio obtenida y la concentración del patrón de ácido valproico para la curva de calibración del Día I.....	109
<b>Tabla 20.</b> Factores de respuestas asociados al cociente del área promedio obtenida y la concentración del patrón de ácido valproico para la curva de calibración del Día II.....	109
<b>Tabla 21.</b> Factores de respuestas asociados al cociente del área promedio obtenida y la concentración del patrón de ácido valproico para la curva de calibración del Día III.....	110
<b>Tabla 22.</b> Áreas obtenidas para el patrón de ácido valproico en la evaluación de la robustez.....	111
<b>Tabla 23.</b> Áreas obtenidas para la muestra de ácido valproico en la evaluación de la robustez.....	111
<b>Tabla 24.</b> Matriz del diseño experimental $2^3$ con los efectos asociados para cada factor .....	112
<b>Tabla 25.</b> Áreas de las muestras fortificadas y sin fortificar .....	114

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Curva de calibración de ácido valproico, (a) día I, (b) día II y (c) día III .....65
- Gráfico 2.** Cantidad añadida en función de la cantidad total de ácido valproico .....80

## 1. INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso puede verse afectado por infecciones y diferentes trastornos neurológicos. Generalmente, estas enfermedades son producidas por la invasión de un microorganismo, traumatismo craneoencefálico, tumores, interrupción del flujo de sangre al cerebro y desórdenes autoinmunes.<sup>[1,2]</sup>

Entre los trastornos neurológicos más frecuentes se encuentran las crisis epilépticas, las cuales se definen como episodios inesperados producidos por descargas eléctricas neuronales. Al respecto, la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera la epilepsia como un importante problema de salud pública que requiere atención sanitaria, ya que dependiendo de la frecuencia de estos episodios es posible que se afecte la productividad del individuo y en algunos casos puede causar la muerte. En cuanto a su tratamiento, los impactos de la enfermedad pueden reducirse mediante cirugías o con la administración de fármacos antiepilépticos, correspondiendo estos últimos los de mayor aplicación nacional.<sup>[2]</sup>

Uno de estos fármacos antiepilépticos es el ácido valproico, que en la actualidad no sólo es utilizado como antiepiléptico, sino también en el tratamiento de trastorno bipolar. Siendo común su administración bajo la forma farmacéutica de tabletas; por lo tanto, es de suma importancia la caracterización cuantitativa del mismo para garantizar la calidad del medicamento y el beneficio terapéutico en cada trastorno neurológico.<sup>[3,4]</sup>

Debido a que las monografías oficiales no reportan ninguna metodología para el análisis de ácido valproico en tabletas, el presente trabajo de investigación se centrará en el desarrollo y validación de un método analítico para la determinación de ácido valproico en tabletas, empleando la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia con detector UV-visible de arreglo de diodos.

## **2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Epilepsia**

#### **2.1.1. Definición**

La epilepsia es un trastorno crónico del sistema nervioso caracterizado por contracciones repentinas, involuntarias, breves o prolongadas de los músculos, asociadas a descargas anormales y sincrónicas de las neuronas, con o sin pérdida de la conciencia y control de esfínteres. Esta enfermedad puede afectar a personas de todos los grupos sociales sin distinción de edades. <sup>[2, 5, 6]</sup>

#### **2.1.2. Clasificación**

Las crisis epilépticas se pueden clasificar en dos grandes grupos: parciales o generalizadas. <sup>[5,7]</sup>

##### **2.1.2.1. Crisis epilépticas parciales o focales**

Son aquellas que afectan una parte de cuerpo, comenzando por un área hemisférica específica y pueden ser: simples, complejas o con evolución secundaria hacia crisis generalizadas. <sup>[5,7]</sup>

Una crisis parcial es simple cuando no se produce alteración de la conciencia; mientras que, una crisis parcial es compleja cuando está asociada con la pérdida de la conciencia. Una crisis parcial simple puede propagarse y evolucionar con el tiempo a

una crisis parcial compleja o a una crisis generalizada, denominándose crisis parcial secundaria a generalizada. <sup>[5,7]</sup>

#### **2.1.2.2. Crisis epilépticas generalizadas**

Se caracterizan por comprometer todo el cuerpo, ya que comienzan en ambos hemisferios cerebrales de manera simultánea. Se componen por crisis de ausencias, mioclónicas, tónico-clónicas y atónicas. <sup>[5,7]</sup>

Las crisis de ausencias consisten en pérdidas breves del conocimiento (alrededor de 10 segundos), se perciben por parpadeos y expresiones faciales. En cambio las crisis epilépticas mioclónicas son contracciones aisladas o múltiples, irregulares e involuntarias de los músculos del cuerpo, sin pérdida del conocimiento. <sup>[5,7]</sup>

Por otro lado, se encuentran las crisis epilépticas tónico-clónicas que se caracterizan por breves tensiones, contracciones y relajación de los músculos, con pérdida de la conciencia y con frecuencia causan la caída del paciente al suelo. La primera fase se denomina tónica porque todo el cuerpo se pone rígido y la segunda fase clónica se reconoce cuando el cuerpo de la persona sufre espasmos musculares. Durante esta crisis la persona puede llegar a morderse la lengua, los labios e incluso experimentar incontinencia urinaria. Finalmente, las crisis atónicas consisten en contracciones súbitas acompañadas por la relajación de los músculos del cuerpo, pérdida de la conciencia y caídas al suelo. <sup>[5,7]</sup>

Generalmente, las crisis epilépticas duran de uno a dos minutos y pueden estar seguidas por un periodo variable de depresión cerebral, que se manifiesta por déficits



neurológicos, como lo son: la pérdida de fuerza en las extremidades, parálisis, alteraciones sensitivas, somnolencia, cansancio, delirio y cefalea. <sup>[4]</sup>

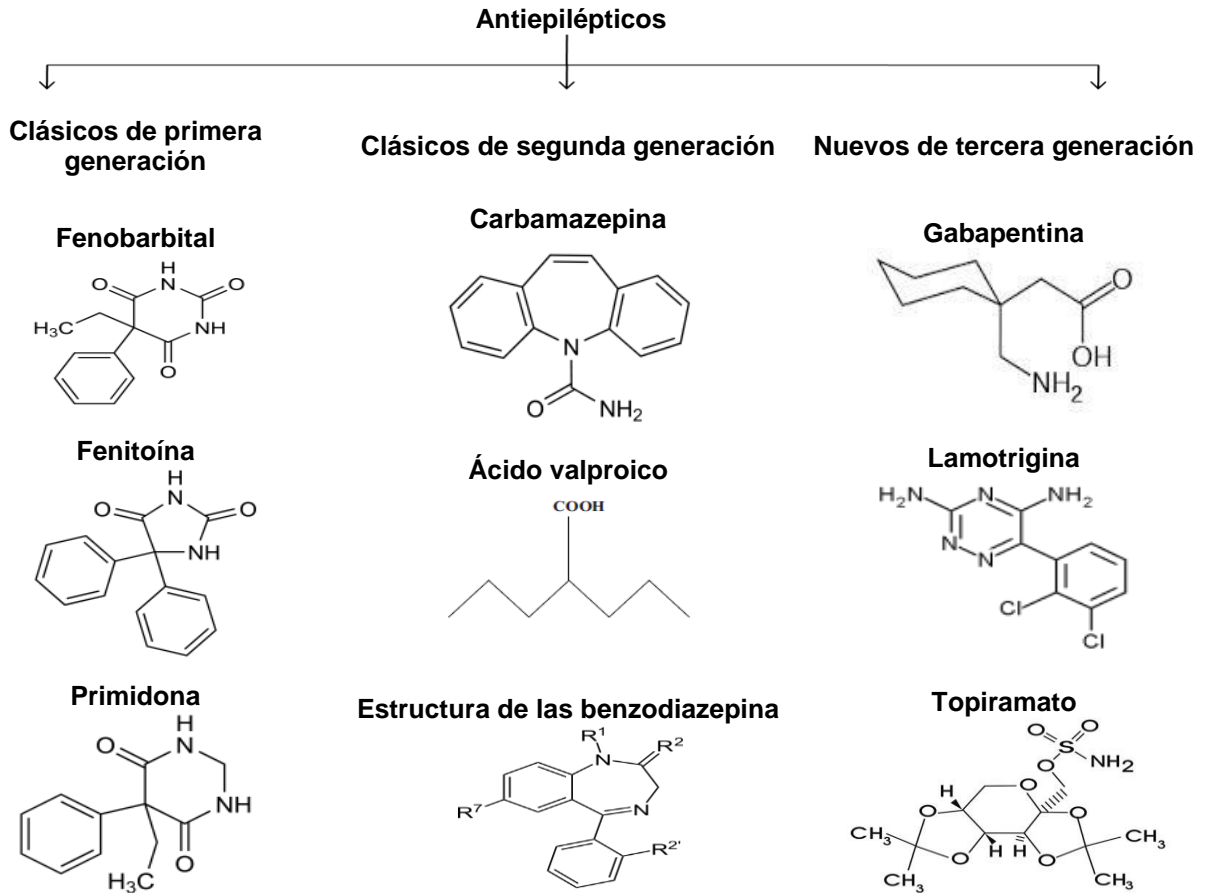
### **2.1.3. Causas**

La mayoría de las crisis epilépticas pueden ser de tipo idiopáticas, es decir, aquellas cuya causa orgánica no es identificable (origen genético y de fuerte carácter hereditario), en cambio las de tipo sintomáticas pueden originarse por: tumores, accidentes cerebrovasculares, traumatismo craneoencefálico, alteraciones genéticas con malformaciones cerebrales, infecciones cerebrales, abstinencia o abuso en el consumo de alcohol y/o fármacos. <sup>[3,4]</sup>

Cuando la causa de las crisis sea de tipo sintomática el diagnóstico clínico puede determinarse mediante una evaluación médica completa, constituida por una exploración física, exámenes de sangre, una tomografía axial computarizada y resonancia magnética nuclear; mientras que, con el electroencefalograma se detectan las alteraciones generalizadas específicas. <sup>[5]</sup>

### **2.1.4. Tratamiento**

Las crisis epilépticas pueden ser controladas mediante fármacos antiepilépticos; en el caso de los pacientes que no toleren el tratamiento farmacológico pueden recurrir a una cirugía. <sup>[2]</sup> En la figura 1, se muestran los fármacos antiepilépticos de mayor uso. <sup>[3]</sup>



**Figura 1.** Antiepilépticos comunes <sup>[6]</sup>

Los antiepilépticos clásicos de segunda generación han sustituido a los de primera generación debido a su menor toxicidad y mayor tolerabilidad durante el tratamiento; mientras que, los nuevos o de tercera generación, en ocasiones son utilizados como coadyuvantes de los antiepilépticos de segunda generación. <sup>[3]</sup>

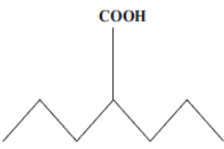
Entre este grupo de fármacos antiepilépticos se ha seleccionado al ácido valproico como principio activo de estudio por ser un medicamento de amplio espectro empleado en el tratamiento de crisis parciales y generalizadas, a diferencia de los nuevos fármacos que comúnmente son empleados en el tratamiento de crisis parciales. <sup>[3,6]</sup>

## 2.2. Ácido valproico (AVP)

### 2.2.1. Estructura química e importancia del ácido valproico

El ácido valproico (AVP) es un ácido carboxílico o ácido graso alifático de cadena corta ramificada, también conocido por su nombre I.U.P.A.C. como ácido 2-propilpentanoico (Ver tabla 1). El ácido valproico fue sintetizado en 1882 por Burton; pero su actividad anticonvulsiva fue descubierta de manera fortuita por Pierre Eymard en 1962, al emplearlo como disolvente en el ensayo de nuevas formulaciones para las terapias de epilepsia. En 1998, fue aprobada su administración para el tratamiento de desórdenes bipolares, prevención de migrañas y como monofármaco adyuvante en el tratamiento de demencias. [8,9]

**Tabla 1.** Propiedades físico-químicas del ácido valproico

Sustancia/FM	PM (g/mol) [10]	P <sub>eb</sub> (°C) [11]	P <sub>fus</sub> (°C)	$\rho$ (g/mL) [11]	pKa [10,12]	Log P (octanol/agua) [12]
 <p>Ácido Valproico (C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>)</p>	144,21	221; 120 <sup>14</sup>	---	0,904 <sup>25</sup>	4,6	2,8
<p><b>Aspecto físico</b> [8]: Líquido incoloro o amarillo pálido, transparente, ligeramente viscoso y de olor característico.</p> <p><b>Solubilidad</b> [8,10]: Ligeramente soluble en H<sub>2</sub>O (1,3 mg/mL), soluble en solventes orgánicos, como lo son: acetona, alcohol, cloroformo, éter, benceno, n-heptano, en disoluciones de hidróxido de sodio 0,1 N; pero, es ligeramente soluble en ácido clorhídrico 0,1 N.</p> <p><b>Toxicidad</b> [3]: Teratógeno (promotor de ciertos defectos de nacimiento).</p>						

El ácido valproico y sus diferentes sales valproato de sodio (C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>NaO<sub>2</sub>), valproato de magnesio (Mg(C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>O<sub>2</sub>)<sub>2</sub>) y divalproato de sodio (C<sub>16</sub>H<sub>31</sub>NaO<sub>4</sub>) se comercializan en Venezuela bajo diversas formulaciones farmacéuticas, entre estos medicamentos se encuentran: [4,13,14]

DEPAKINE 50 mg/mL, 120 mL de jarabe  
EQUIVAL 250 mg, 30 comprimidos  
EQUIVAL 500 mg, 30 comprimidos  
VALCOTE 100 mg/mL, solución inyectable  
VALCOTE 250 mg, 30 tabletas  
VALCOTE 500 mg, 30 tabletas  
VALCOTE ER 250 mg, tabletas de liberación prolongada  
VALPRON 200 mg/mL, 30 mL de solución oral  
VALPRON 50 mg/mL, 180 mL de solución oral  
VALPRON 260 mg, 30 y 50 tabletas  
VALPRON 500 mg, 60 tabletas

### **2.2.2. Farmacocinética y mecanismo de acción**

El ácido valproico se administra por vía oral, su absorción es rápida en el estómago; pero, en aquellos pacientes que sufren de irritación gástrica suele administrarse durante la ingesta de alimentos produciéndose una disminución en la velocidad de absorción de este fármaco. Su biodisponibilidad es cercana al 100 % debido a su poder lipofílico, además se une con facilidad a las proteínas. Se metaboliza en el hígado y sólo el 1 al 3 % se elimina por la orina. <sup>[4]</sup>

Actualmente, no se conoce con exactitud el mecanismo de acción del ácido valproico sobre el sistema nervioso central; sin embargo, se presume que durante las crisis epilépticas se producen una serie de descargas neuronales repentinas que disminuyen la concentración del principal neuroinhibidor del sistema nervioso central (SNC), ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA).

El ácido valproico inhibe la enzima (GABA transaminasa) evitando la degradación del neuroinhibidor o el bloqueo de los transportadores plasmáticos de GABA en las neuronas aumentando la concentración de GABA; además el ácido valproico se encarga de bloquear los canales de sodio y aumentar la conductancia de los canales de potasio. Los niveles terapéuticos oscilan entre 50-100 µg/mL en suero sanguíneo. <sup>[4]</sup>

### 2.2.3. Indicaciones terapéuticas

El ácido valproico se recomienda para el tratamiento de crisis epilépticas parciales y crisis generalizadas, como se indica en la figura 2. <sup>[4,6]</sup>



Figura 2. Medicamentos de elección acorde con el tipo de crisis epiléptica <sup>[6]</sup>

### 2.2.4. Interacciones con otros medicamentos

Dependiendo de la dosis de ácido valproico administrada al paciente, puede darse un aumento en las concentraciones plasmáticas de fenobarbital, bentazepam (otras benzodiazepinas), primidona, etosuximida, felbamato, dimemorfano y loratadina, cuando alguno de estos fármacos se administra conjuntamente con el ácido valproico se potencia el efecto depresor del sistema nervioso. De igual manera, se produce un aumento de los niveles séricos (concentración en suero sanguíneo) de lamotrigina en

presencia de ácido valproico; mientras que, con tiagabina se produce un aumento del 10 % de la concentración sérica de ácido valproico.

Por otro lado, el ácido valproico acompañado de analgésicos como ketoprofeno o ketorolac puede producir sangrados y problemas gastrointestinales; también, es posible que ocurran hemorragias al interactuar con antiagregantes plaquetarios o anticoagulantes (salicilato, ácido acetilsalicílico) y finalmente, se han detectado un aumento del efecto tóxico de las fenitoínas (difenilhidantoína) con riesgo de aparición de convulsiones. <sup>[4]</sup>

#### **2.2.5. Efectos secundarios**

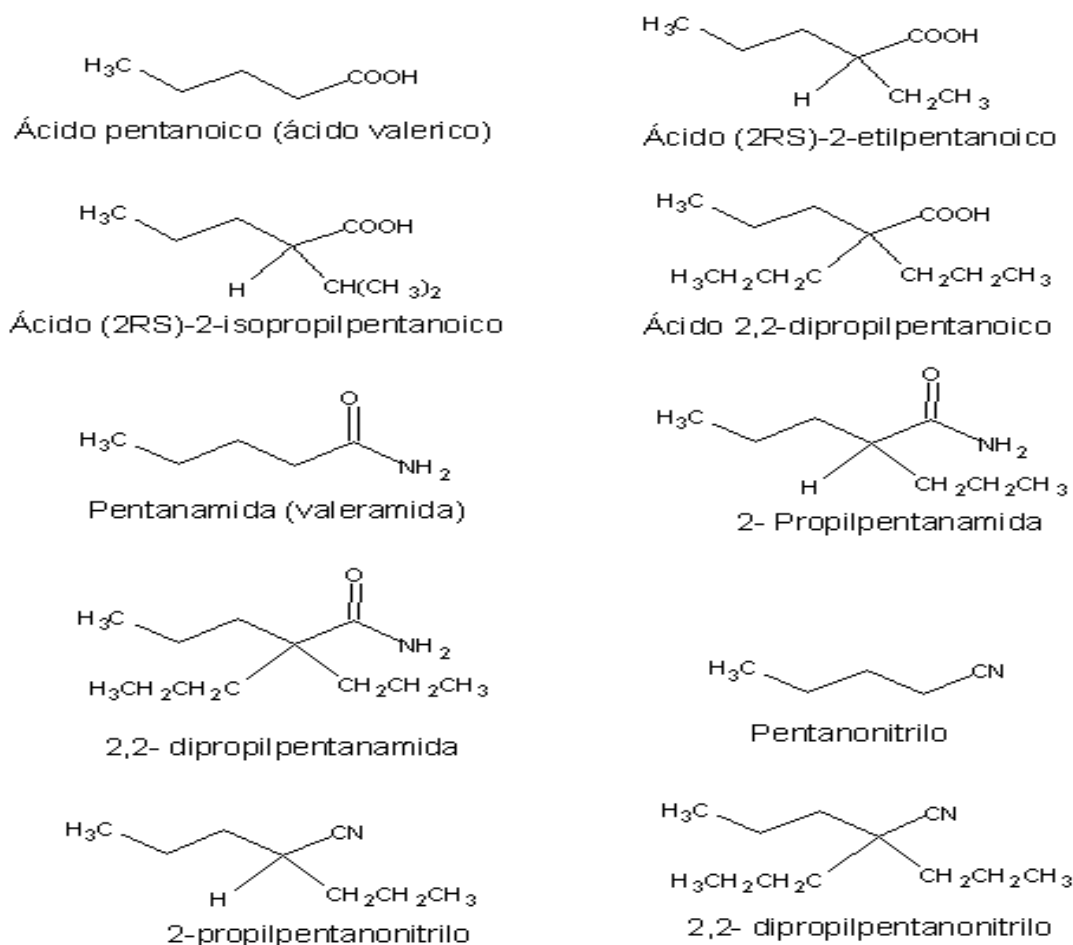
El ácido valproico puede producir a nivel cognitivo y conductual: somnolencia, mareos, alteraciones visuales, hiperactividad, agresividad, depresión, disminución de la capacidad de reacción y en consecuencia dificultad para realizar tareas.

A nivel gastrointestinal puede producir dolor abdominal, náuseas, diarrea; aumento de peso, alopecia transitoria, daño hepático (principalmente en niños) y cambios en pruebas hepáticas, por ello se recomienda evaluar el funcionamiento hepático durante las primeras fases del tratamiento y luego cada 3 a 6 meses. Las afecciones en el hígado se agravan por la producción de metabolitos hepatóxicos con la dosis y combinación con otros antiepilépticos.

Los efectos gastrointestinales causados por el ácido valproico pueden minimizarse si se administra con la comida, debiendo considerarse que la velocidad de absorción del fármaco se ve disminuida con los alimentos. <sup>[4]</sup>

## 2.2.6. Impurezas o sustancias relacionadas del ácido valproico y valproato de sodio

La Farmacopea Británica (BP) reporta un método por cromatografía de gases (GC) para la determinación de diez impurezas o sustancias relacionadas del ácido valproico o valproato de sodio. Este tipo de sustancias pueden estar presentes en la materia prima, como resultado de su degradación o como sustancias contaminantes provenientes de la síntesis del principio activo. Las estructuras de dichas impurezas pueden ser observadas en la figura 3: <sup>[15]</sup>



**Figura 3.** Impurezas o sustancias relacionadas del ácido valproico y valproato de sodio<sup>[15]</sup>

### **2.2.6.1. Técnicas empleadas en la determinación de ácido valproico**

La mayoría de los análisis de ácido valproico y sus sales reportados hasta la fecha se han realizado en matrices biológicas, tales como: plasma y suero por cromatografía (Apéndice A), específicamente, cromatografía de gases y por cromatografía líquida de alta eficiencia, en menor magnitud se encuentran estudios no menos importantes por cromatografía de capa fina y cromatografía de intercambio iónico con detector conductimétrico.

Entre otros métodos aplicados para la determinación de este principio activo se tienen: electroforesis capilar con detector de fluorescencia, métodos potenciométricos, métodos espectrofotométricos con violeta de genciana y por detección fluorimétrica con anaranjado de acridina. <sup>[8]</sup>

Por otro parte, los métodos analíticos para formulaciones farmacéuticas deben ir soportados por un protocolo de validación que permita asegurar la calidad de los procesos involucrados en la manufactura del medicamento; por esta razón, la etapa de validación es una exigencia legal en la industria farmacéutica.

### **2.3. Validación del método analítico**

La validación de un método analítico consiste en la evaluación de ciertos parámetros analíticos a través de pruebas de laboratorio; con el fin de garantizar que los resultados obtenidos bajo este procedimiento son confiables, reproducibles y cumplen con los demás requisitos para las aplicaciones analíticas diseñadas. <sup>[16,17]</sup>



Los estudios de validación constituyen una parte esencial en el análisis de los medicamentos y los métodos reportados por las monografías oficiales se consideran válidos; sin embargo, las diferencias entre las distintas formas farmacéuticas, tipo y calidad de las materias primas empleadas por cada fabricante, hacen necesario validar la metodología para cada producto en particular, elaborado o semielaborado. En la validación de un método analítico para formulaciones farmacéuticas se consideran los elementos descritos en la tabla 2. <sup>[16,18]</sup>

**Tabla 2.** Elementos requeridos en la validación de un método analítico para formulaciones farmacéuticas <sup>[16]</sup>

Elementos	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Cuantitativo	Prueba límite		
Exactitud	Sí	Sí	*	*	No
Precisión	Sí	Sí	No	Sí	No
Especificidad	Sí	Sí	Sí	*	Sí
Límite de detección	No	No	Sí	*	No
Límite de cuantificación	No	Sí	No	*	No
Linealidad	Sí	Sí	No	*	No
Rango	Sí	Sí	*	*	No

\* Puede ser requerido, dependiendo de la naturaleza de una prueba específica.

**Categoría I:** procedimientos analíticos para la cuantificación del (los) principio(s) activo(s) y demás componentes de la formulación presentes en la muestra. <sup>[16,17]</sup>

**Categoría II:** procedimientos analíticos para la determinación del contenido de impurezas o de valores límites para el control de impurezas en las sustancias medicamentosas a granel. Pueden realizarse pruebas cuantitativas o una prueba

cuantitativa para determinar si la impureza está presente en la muestra por encima o por debajo de un valor límite establecido. <sup>[16,17]</sup>

**Categoría III:** procedimientos analíticos para la determinación de las características de eficiencia o desempeño del medicamento. Ejemplos: sustancias relacionadas, prueba de disolución. <sup>[16,17]</sup>

**Categoría IV:** pruebas de identificación se realizan para asegurar la identidad de un analito en una muestra. <sup>[16,17]</sup>

Es necesario revalidar, es decir, volver a evaluar un método analítico que ha sido previamente validado, cuando se realizan cambios en: la síntesis del principio activo, la composición del producto terminado y cambios en el procedimiento analítico, como lo son: equipos o algún componente del instrumento, cambio en el tipo u origen de la columna, etc. <sup>[18]</sup>

### **2.3.1. Elementos o parámetros de validación**

#### **2.3.1.1. Linealidad del rango**

Es la capacidad de un método analítico para arrojar resultados aceptables, a partir de una relación directamente proporcional entre la concentración o cantidad del analito respecto a una señal medida dentro de un rango de trabajo establecido. <sup>[16]</sup>

La linealidad puede ser evaluada por análisis de regresión lineal, prueba de verificación de la pendiente y/o del intercepto. <sup>[20]</sup> Cuyos criterios de aceptación son:

- Con la aplicación del método de mínimos el valor del coeficiente de correlación (R) debe ser mayor o igual a 0,999. <sup>[19]</sup>
- La verificación de la pendiente o de la linealidad cumple con la t de Student cuando  $t_{experimental} > t_{tabulado}$ . Mientras que, al verificar el intercepto o la proporcionalidad con la t de Student el valor de  $t_{experimental}$  debe ser menor que el  $t_{tabulado}$ . También es posible verificar la pendiente, a través de la determinación del coeficiente de variación de los factores de respuesta (área obtenida/Concentración del analito), cuyo %CV<sub>f</sub> debe ser menor al 5 %. <sup>[20]</sup>

### 2.3.1.2. Especificidad

Consiste en evaluar la capacidad de un método de discriminar con precisión la señal del analito en presencia de interferencias, como lo son: impurezas, productos de degradación y demás componentes de la matriz de muestra. La especificidad comúnmente examina con: <sup>[16,18]</sup>

- **La interferencia del placebo:** Cuando se dispone del placebo o matriz de la muestra se suele evaluar su interferencia sobre la respuesta del analito, al compararlo contra la señal de un patrón control. <sup>[19]</sup>
- **Estudios de degradación:** Se somete la muestra a condiciones de degradación artificial o forzada, con: calor, luz, humedad, hidrólisis ácido-base y oxidación; con la finalidad de determinar su estabilidad mediante la comparación de las respuestas obtenidas contra una muestra y un patrón control. En general, recomiendan que la degradación no sea mayor del 20 % de la concentración inicial. <sup>[16, 18,19]</sup>

- **Evaluación de la pureza de la banda:** Permite demostrar que la señal obtenida corresponde a un sólo componente o existe alguna otra sustancia superpuesta con la banda del analito. <sup>[16,18,19]</sup>

### 2.3.1.3. Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)

El LOD se define como la mínima cantidad o concentración de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse con exactitud; bajo las condiciones experimentales desarrolladas. Mientras que, el LOQ representa la mínima concentración de analito que puede cuantificarse con una precisión y exactitud aceptable, bajo las condiciones experimentales desarrolladas. Tanto la determinación del LOD como LOQ se realizaron siguiendo la estimación estadística sugerida por Miller y Miller, 2002. <sup>[16, 21]</sup>

Este procedimiento consistió en emplear la ecuación de la recta (1)  $Y = a + bX$  obtenida con el método de mínimo cuadrados para el estudio de la linealidad, cuya ecuación 1 se igualó con la ecuación 2 para estimar por interpolación el LOD y para determinar el LOQ se igualó la ecuación 1 con la ecuación 3.

$$Y = a + bX \quad \text{Ecuación 1.}^{[21]}$$

$$S_{LOD} = y_b + 3S_{bl} \quad \text{Ecuación 2.}^{[21]}$$

$$S_{LOQ} = y_b + 10S_{bl} \quad \text{Ecuación 3.}^{[21]}$$

Conociendo que:  $a = y_{bl}$  y  $S_{bl} = S_{y/x}$  la estimación estadística del LOD y LOQ se redujeron a las expresiones descritas en las ecuaciones 4 y 5 respectivamente.

$S_{LOD}$  y  $S_{LOQ}$ : Señales correspondientes al LOD y LOQ, respectivamente

$a$ : Es el punto de corte en el origen

$b$ : Es la pendiente de la recta

$y_{bl}$ : Es la señal del blanco

$S_{bl}$ : Es la desviación estándar de las señales del blanco

$S_{y/x}$ : Es la desviación estándar de la regresión

$$LOD = \frac{3S_{y/x}}{b} \quad \text{Ecuación 4.}^{[21]}$$

$$LOQ = \frac{10S_{y/x}}{b} \quad \text{Ecuación 5.}^{[21]}$$

#### 2.3.1.4. Precisión

Describe el grado de concordancia de los resultados individuales obtenidos bajo las mismas condiciones experimentales. La precisión se expresa matemáticamente a través de la desviación estándar ( $s$ ); pero comúnmente se reporta en función de la desviación estándar relativa RSD o coeficiente de variación (CV). Es posible estudiar la precisión mediante la evaluación de la repetibilidad, reproducibilidad y la precisión intermedia.<sup>[16, 17]</sup>

- **Repetibilidad:** Estudia la precisión de un grupo de determinaciones realizadas tanto al patrón como a la muestra a la concentración de trabajo. Estas mediciones son realizadas por un analista, en un mismo día empleando los mismos equipos.<sup>[17,20]</sup>
- **Precisión intermedia:** Mide la dispersión de una serie de medidas provenientes de una muestra. Se realiza variando al menos una de las siguientes variables analista, días y equipos dentro de un mismo laboratorio.<sup>[17,20]</sup>

- **Reproducibilidad:** Inspecciona el desempeño de procedimiento analítico cuando se realiza en diferentes laboratorios. <sup>[17]</sup>

### 2.3.1.5. Exactitud

Se refiere a la cercanía entre los resultados obtenidos con el método analítico y el valor verdadero o de referencia. La exactitud se calcula en términos del porcentaje de recuperación ( $\%R$ ) de la cantidad de analito presente en la muestra y debe encontrarse lo más próximo posible a 100 %. <sup>[16,17]</sup> En la ecuación 6, se describe la expresión matemática para calcular el  $\%R$ . En ella, se relaciona la diferencia de la cantidad total de analito obtenida ( $Ct_{fortificada}$ ) menos la cantidad de analito presente en la porción de material de referencia interno pesada ( $Ct_{sin fortificar}$ ) entre la cantidad conocida de patrón añadido, por 100.

$$\%R = \frac{Ct_{fortificada} - Ct_{sin fortificar}}{Ct_{añadida de patrón conocido}} \times 100 \quad \text{Ecuación 6.}$$

En cuanto a los criterios de aceptación para el estudio de la exactitud, ICH (2005) y Ahuja S., Dong M. (2005) recomiendan que el porcentaje de analito recuperado para cada nivel de concentración entre 70, 100 y 130 % se encuentre dentro del rango de 98% - 102 %.

Por otro lado, AEFI (2001) sugiere también evaluar la exactitud con la prueba t de Student para el  $\%R$ . Un valor de  $t_{experimental} < t_{tabulado}$ , indica que no existen diferencias significativas entre el promedio del porcentaje recuperado y el 100 % para (n-1) grados de libertad, con un contraste de dos colas y un límite de confianza de 95 %. Bajo estas condiciones la exactitud se considera aceptable. <sup>[17,19, 20]</sup> Para determinar el valor de  $t_{calculado}$  se recurre a la ecuación 7.

$$t_{calculado} = \frac{100-\%R}{s \times \sqrt{n}}$$

**Ecuación 7.**

Siendo  $n$  el número de determinaciones realizadas y  $s$  la desviación estándar obtenida para el  $\%R$ .

### **2.3.1.6. Robustez**

Este parámetro mide la capacidad del método para continuar proporcionando resultados confiables y permanecer inalterado frente a la realización de pequeños cambios en los factores o variables de estudio. [18, 22]

De acuerdo, con el artículo de Dejaegher, B. y Vander Y. (2007) existen numerosos diseños experimentales para evaluar el parámetro de la robustez, los más comunes son: el diseño factorial completo y el diseño factorial fraccionado. Estos diseños permiten estimar la influencia de los cambios simultáneos, pequeños y deliberados, sobre los factores principales de un mismo experimento. Además, es posible estimar los efectos que producen las interacciones (combinación de factores) sobre el método analítico. [16, 21, 23]

En HPLC, los factores o variables que suelen modificarse son: pH de la fase móvil, composición de la fase móvil, flujo, longitud de onda, temperatura, lote y fabricante de la columna (Ver tabla 3). Los efectos de los factores se interpretan a través de un determinado método gráfico o un método estadístico. Entre las respuestas que pueden ser analizadas por esta vía, se tienen: factor de retención, resolución, factor de cola, número de platos teóricos, concentración hallada, áreas y altura de la banda cromatográfica. [18, 19, 23]

**Tabla 3.** Rango de evaluación de las variables de estudio por HPLC en la robustez <sup>[19]</sup>

Factores o variables	Rango
Temperatura de la columna	± 5 °C
Composición del disolvente orgánico en la fase móvil	± 5 %
Flujo de la fase móvil	± 0,2 mL/min
pH de la fase móvil	± 0,2 unidades
Concentración de la disolución de amortiguadora de la fase móvil	± 5 mM
Longitud de onda de trabajo	± 5 nm

En esta investigación, se evaluó la robustez mediante un diseño factorial completo ( $x^k$ ) que mide todas las combinaciones posibles en los niveles ( $x$ ) de los factores ( $k$ ) de cada experimento, sin omitir ninguno y sin despreciar las interacciones de orden superior. Siendo  $x$  un número primo (2, 3, 5, 7, etc.). <sup>[24,25]</sup>

Por otro lado, es conveniente aplicar un diseño  $x^k$  cuando se desee estudiar tres o menos factores, de manera que su ejecución resulte práctica y menos tediosa. <sup>[21]</sup>

Específicamente en esta investigación, se utilizó un diseño factorial completo  $2^3$  a dos (2) niveles y tres (3) factores con sus interacciones. En la tabla 4, se representa la matriz ampliada para este diseño, donde las columnas dadas para las interacciones se construyeron multiplicando los signos de los factores que intervienen en dicha interacción, para cada experimento. <sup>[23, 24, 25]</sup>



**Tabla 4.** Matriz ampliada del diseño factorial completo  $2^3$  y sus interacciones <sup>[25]</sup>

N° Experimentos	Factores principales			Interacción de factores principales			
	A	B	C	AB	AC	BC	ABC
1	-	-	-	+	+	+	-
2	-	+	-	-	+	-	+
3	-	-	+	+	-	-	+
4	+	-	-	-	-	+	+
5	+	+	-	+	-	-	-
6	+	-	+	-	+	-	-
7	-	+	+	-	-	+	-
8	+	+	+	+	+	+	+

A continuación, se exponen los antecedentes consultados de diversas fuentes, como lo son: monografías oficiales e investigaciones previas sobre las determinaciones de ácido valproico.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1. United States Pharmacopeia - National Formulary USP 37 - NF 32. (2014).<sup>[26]</sup>

La Farmacopea de Estados Unidos en ediciones anteriores sugería realizar la determinación cuantitativa de ácido valproico por CG; sin embargo, en la edición (USP 37-NF 32, 2014) propone para este principio activo un método cromatográfico por HPLC, empleando las condiciones que se describen a continuación en la tabla 5:

**Tabla 5.** Ácido valproico materia prima y formulaciones farmacéuticas - condiciones del sistema cromatográfico<sup>[26]</sup>

<b>Equipo</b>	Cromatógrafo de líquido con detector de UV a 215 nm
<b>Columna</b>	Octilsilano C <sub>8</sub> (5 µm; 150 x 4,6 mm)
<b>Fase móvil</b>	Mezcla compuesta por una disolución acuosa de 3,5 g/L de NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ajustada a pH 3,5 con H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> - acetonitrilo, en proporciones: 50:50 para materia prima. 45:55 para formulaciones farmacéuticas (cápsulas y solución oral).
<b>Concentración del analito</b>	0,5 mg/mL de ácido valproico disuelto en fase móvil
<b>Flujo</b>	1 mL/min
<b>Volumen de inyección</b>	20 µL

La adecuación del sistema se determina con la disolución patrón de 0,5 mg/mL de ácido valproico, cuya desviación estándar relativa entre las réplicas debe ser menor al 1 % y el factor de asimetría menor a 1,5. Mientras que, la resolución entre ácido valproico (0,5 mg/mL) y ácido (2*RS*)-2-(1-metiletil)-pentanoico (50 µg/mL) debe ser no menos de 2.

En el tratamiento de las muestras para la formulación en cápsulas: se debe pesar no menos de 20 cápsulas en un balón aforado apropiado para obtener una concentración

0,5 mg/mL de ácido valproico, diluir y llevar a volumen con fase móvil. Colocar en el ultrasonido 5 minutos. Alternadamente agitar la solución resultante por 1 h y finalmente, centrifugar por 10 minutos una porción de esta solución. [26]

Por otro lado, para las formulaciones farmacéuticas en solución oral, generalmente se diluye con fase móvil hasta obtener una disolución de ácido valproico de concentración igual a 0,5 mg/mL. [26]

El criterio de aceptación (Ver ecuación 8) para las determinaciones de ácido valproico por HPLC en materia prima y para formulaciones farmacéuticas (cápsulas y solución oral) es de 98 - 102 % (materia prima) y 90 - 110 % (formulaciones farmacéuticas). [26]

$$\text{Concentración porcentual de AVP} = \frac{R_U \times C_S}{R_S \times C_U} \times 100 \quad \text{Ecuación 8. [26]}$$

(Aplicable tanto a materia prima como a formulaciones farmacéuticas)

$R_U$ : Respuesta de la banda de AVP muestra

$R_S$ : Respuesta de la banda de la disolución estándar

$C_S$ : Concentración mg/mL de AVP patrón USP

$C_M$ : Concentración mg/mL de AVP disolución de la muestra

**Ácido valproico materia prima - preparación de las soluciones para determinar la pureza cromatográfica** [16]

**Solución de aptitud del sistema:** Mezclar cantidades apropiadas de ácido butírico, ácido valérico y el compuesto relacionado A del ácido valproico USP (ácido dialilacético  $C_8H_{12}O_2$ ) en ácido valproico para obtener una solución con concentraciones de aproximadamente 1,0; 1,0 y 0,1  $\mu$ L por mL, respectivamente. [16, 26]

**Solución muestra:** Emplear ácido valproico materia prima. <sup>[16, 26]</sup>

**Condiciones del sistema cromatográfico:** Emplear un cromatógrafo de gases con un detector de ionización a la llama, una columna de 60 m × 0,32 mm recubierta internamente con una capa de 0,3 μm de espesor de polietilenglicol esterificado con ácido tereftálico (conocido comercialmente como Carbowax 20M-TPA). Se emplea helio como gas transportador con un caudal de aproximadamente de 150 mL/min y una relación flujo dividido de 100:1. Mantener el inyector y el detector a 240 y 260 °C respectivamente. La temperatura de la columna se equilibra a 145 °C durante 48 minutos; posteriormente, se incrementa linealmente a razón de 5 °C/min hasta 190 °C, mantener esta temperatura hasta el final de la corrida. <sup>[16, 26]</sup>

Bajo estas condiciones inyectar 0,5 μL de la solución de aptitud del sistema y registrar las respuestas de las bandas. Los tiempos de retención relativos deben ser aproximadamente 0,38 para ácido butírico; 0,52 para ácido valérico; 1,64 para el compuesto relacionado A y 1,0 para ácido valproico. <sup>[16, 26]</sup>

Asimismo, la resolución  $R_s$  entre las bandas de ácido butírico y ácido valérico no debe ser menor de 23,0; la eficiencia de la columna para la banda de ácido valérico no debe ser menor de 100.000 platos teóricos; el factor de asimetría para la banda de ácido valérico no debe ser mayor de 1,5. La banda del compuesto relacionado A debe eluir entre los 41 y 50 minutos y debe tener una respuesta no menor de 0,01 % respecto a la banda de ácido valproico.

Finalmente, inyectar en el cromatógrafo aproximadamente 0,5 μL de la solución muestra, registrar el cromatograma, medir la respuesta de la banda y calcular el porcentaje de cada impureza en la porción de ácido valproico a través de la siguiente ecuación: <sup>[16]</sup>

Porcentaje de cada impureza en la porción de AVP =  $\frac{r_i}{r_s} \times 100$  **Ecuación 9.** <sup>[16]</sup>

$r_i$ : Respuesta de la banda de cada impureza

$r_s$ : Suma de las respuestas de todas las bandas.

No debe contener más de 0,1 % de cada impureza y no más de 0,3 % de impurezas totales.

### 3.2. British Pharmacopoeia BP. [CD-ROM]. (2009). <sup>[15]</sup>

#### **Valproato de sodio solución oral y para tabletas con o sin cubierta entérica – análisis de pureza** <sup>[15]</sup>

Reporta para el análisis de pureza de valproato de sodio un criterio de aceptación de 98,5 a 101,0 %, tanto para formulaciones en solución oral y para tabletas con o sin cubierta entérica. La determinación de la pureza en estas formulaciones farmacéuticas se realiza disolviendo 0,1500 g en 25 mL de anhídrido acético. Valorar con ácido perclórico 0,1 M. Esta determinación se realiza considerando que 1 mL de ácido perclórico 0,1 M equivale a 16,62 mg de  $C_8H_{15}NaO_2$ .

#### **Valproato de sodio solución oral y para tabletas con o sin cubierta entérica - preparación de soluciones para la determinación de sustancias relacionadas** <sup>[15]</sup>

**Solución estándar interno:** Disolver 10 mg de ácido butírico en n-heptano y diluir a 200 mL con el mismo solvente.

**Preparación de la muestra (a):** Disolver 0,500 g de la sustancia problema en 10 mL de agua, añadir 5 mL de ácido sulfúrico diluido entre 9,5 a 10,5 %m/m, extraer con tres porciones de 20 mL de n-heptano, añadir 10,0 mL de la solución de estándar interno. Mezclar las fracciones de capa orgánica extraídas y secar con sulfato de sodio anhidro. Filtrar y evaporar el solvente a temperatura ambiente, usando un rotaevaporador. Recoger el residuo con n-heptano y diluir a 10,0 mL con el mismo disolvente. Diluir 1,0 mL de esta solución a 10 mL con n-heptano.

**Preparación de la muestra (b):** Disolver 40 mg de la sustancia problema en 100 mL de agua. A 10 mL de esta solución se añaden 0,5 mL de ácido sulfúrico diluido entre 9,5 a 10,5 %m/m y se extrae con tres de porciones de 5 mL de n-heptano, secar con sulfato sódico anhidro. Filtrar y concentrar a un volumen de 10 mL utilizando un rotaevaporador.

**Solución de referencia (a):** Disolver 0,250 g de ácido 2-(1-metiletil)-pentanoico CRS (sustancia de referencia certificada por BP como impureza C) en 5,0 mL con la solución de muestra (b) y diluir a 10 mL con n-heptano. 1,0 mL de esta solución se diluye a 10 mL con n-heptano.

**Solución de referencia (b):** Realizar esta preparación siguiendo el procedimiento previamente descrito para la muestra (b) empleando valproato de sodio CRS (sustancia de referencia certificada por BP) en lugar de la sustancia problema (Ver tabla 6).

**Tabla 6.** Sustancias relacionadas del ácido valproico y valproato de sodio - condiciones cromatográficas<sup>[15]</sup>

<b>Equipo:</b>	Cromatógrafo de gases con detector de ionización a la llama
<b>Columna:</b>	0,53 mm x 30 m de sílice fundida, fase estacionaria: macrogol 20.000 2-nitrotrefalato (espesor de película de 0,5 micras).
<b>Flujo del gas de arrastre:</b>	8 mL/min de He
<b>Temperatura de la columna</b>	De 0 - 10 min a 130 °C De 10 - 30 min de 130 – 190 °C
<b>Temperatura del puerto de inyección y del detector</b>	220 °C
<b>Volumen de inyección</b>	1 µL

Realizar la adecuación del sistema con la solución de referencia (a). Entre las bandas de la impureza C y ácido valproico debe existir una resolución mínima de 3,0.

**Límites:**

**Para cualquier impureza:** el área de la banda para cada impureza debe ser menor a (0,1 %) del área de estándar interno.

**Impureza total:** el área total de las bandas de impurezas no debe excederse más de 0,3 % del área de estándar interno.

**Límite despreciable de impurezas:** el área de la banda de la impureza debe ser 0,1 veces el área del estándar interno (0,01 %).

### **Ácido valproico materia prima- análisis de pureza<sup>[15]</sup>**

El procedimiento establecido por BP para la valoración de la materia prima de ácido valproico se realiza por método potenciométrico, disolviendo 0,100 g de AVP en 25,0 mL de etanol al 95 %, se añade agua y se titula con hidróxido de sodio al 0,1 M y finalmente, se determina el punto final potenciométricamente considerando que 1 mL de hidróxido de sodio al 0,1 M equivale a 14,42 mg de  $C_8H_{16}O_2$ . Para la materia prima, la BP reporta un criterio de aceptación entre 99,0 - 101,0 %.

### **Ácido valproico materia prima- preparación de soluciones para la determinación de sustancias relacionadas**

**Solución estándar interno:** Disolver 10 mg de ácido butírico en n-heptano y diluir a 200 mL con el mismo disolvente.

**Solución de la muestra:** Disolver 0,250 g de la sustancia problema hasta 5,0 mL con la solución de estándar interno. Diluir 1,0 mL de esta solución a 10,0 mL con n-heptano.

**Solución de referencia:** Disolver 20 mg de la sustancia problema, 20 mg de ácido 2-(1-metiletil)-pentanoico CRS (sustancia de referencia certificada por BP como impureza C) en n-heptano y llevar a 10 mL con el mismo disolvente. Diluir 1 mL de esta solución a 10 mL con n-heptano.

Este análisis cromatográfico se desarrolla bajo las condiciones previamente descritas en la tabla 6.



**3.3. Antunes<sup>a</sup> V., Nagel<sup>a</sup> V., Linden<sup>a</sup> R., Orosco<sup>b</sup> H., Hermes<sup>b</sup> D. Centro Universitario Feevale<sup>a</sup>, Laboratorio Weinmann<sup>b</sup>, Brasil. (2009).<sup>[27]</sup>**

Determinación de ácido valproico en suero por cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD), después de la derivatización con bromuro de fenacilo. Este estudio lo realizaron con el propósito de monitorear la dosis terapéutica de ácido valproico en la sangre de 66 pacientes, para un control adecuado de las convulsiones y evitar la toxicidad en los pacientes.<sup>[27]</sup>

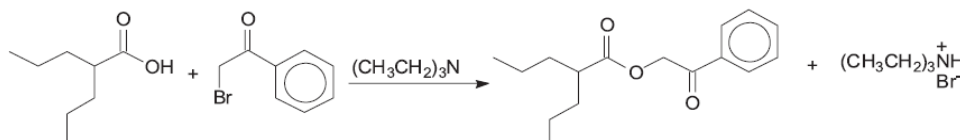
Para ello, utilizaron una columna Shimpack CLC-ODS (5  $\mu$ m, 150 x 4,6 mm), el sistema cromatográfico fue controlado por el programa VP clase 6.13 SP2 Shimadzu. La fase móvil estaba compuesta por una mezcla de disolución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM ajustada a pH 2,3 con ácido orto-fosfórico 85 %m/m y acetonitrilo (40:60, %v/v), el flujo de la fase móvil fue de 2,0 mL/min con una elución isocrática, durante el análisis la columna se mantuvo a 30 °C. La detección se realizó a 246 nm.

La disolución de derivatización se preparó disolviendo 100 mg de bromuro de fenacilo en 10 mL de acetonitrilo; la disolución madre del patrón interno de ácido 1-ciclohexenoico se preparó disolviendo 470  $\mu$ L de la sustancia en 10 mL de acetonitrilo, 100  $\mu$ L de esta solución se diluyó a 10 mL con acetonitrilo (solución diluida del patrón interno).

Las muestras de sangre fueron recolectadas de pacientes bajo tratamiento farmacológico con ácido valproico y de esta sangre tomaron 250  $\mu$ L de suero al que le añadieron 50  $\mu$ L de la solución diluida del patrón interno, 250  $\mu$ L de ácido sulfúrico 1 M y 2,2 mL de n-hexano. Agitaron la mezcla en un vórtex durante 30 segundos y

posteriormente, centrifugaron a 2000 rpm durante 10 minutos. 2 mL de la fase orgánica la transfirieron al tubo de evaporación le agregaron 20  $\mu\text{L}$  de trietilamina y 20  $\mu\text{L}$  de la disolución de derivatización. La mezcla resultante se homogeneizó mediante agitación con un vórtex durante 30 segundos y fue llevada a la estufa por 1 h a 50  $^{\circ}\text{C}$ , bajo un flujo ligero de aire hasta la evaporación completa del disolvente. El residuo seco fue disuelto en 200  $\mu\text{L}$  de fase móvil, de ello inyectaron 25  $\mu\text{L}$  en el sistema HPLC-DAD.

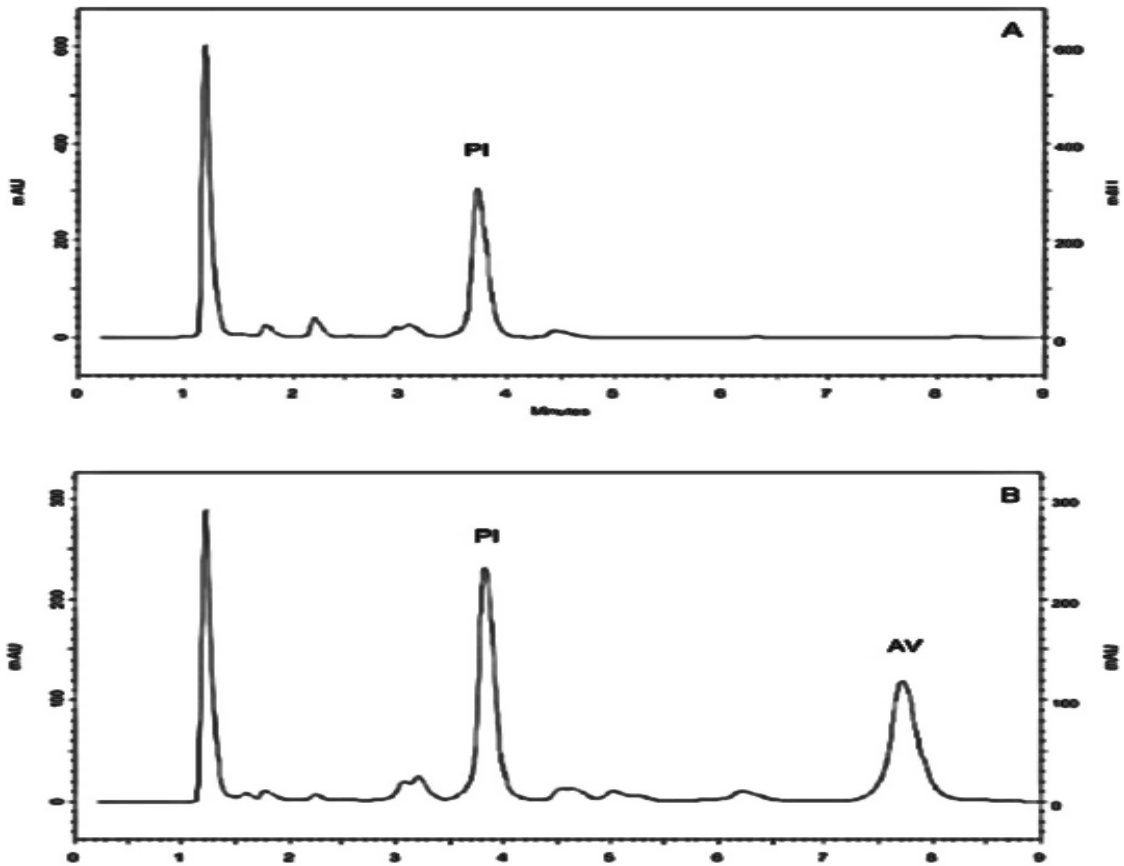
En la figura 4, puede visualizarse la actuación del ácido valproico como nucleófilo al sustituir el bromo del bromuro de fenacilo. La catálisis de esta reacción se llevó a cabo en medio básico con trietilamina para facilitar la desprotonación del ácido y estabilizar al grupo dejante  $\text{Br}^-$ .



**Figura 4.** Reacción de derivatización del ácido valproico con bromuro de fenacilo, catalizada por trietilamina <sup>[27]</sup>

El tiempo total para el análisis por HPLC fue de 9 minutos, la banda de ácido valproico mostró un tiempo de retención medio de 7,4 minutos y el patrón interno mostró un tiempo de retención promedio de 3,5 minutos (figura 5). Al analizar la pureza espectral y la similitud de las bandas con los espectros de referencias a través de las rutinas disponibles en el sistema de HPLC –DAD, no observaron interferencias y demostraron que el método era selectivo.

Por otro lado, encontraron que las concentraciones de ácido valproico eran estables cuando se mantienen las muestras de suero refrigerado en un intervalo de 14 días, resultando una diferencia entre antes y después del almacenamiento por debajo del 5 %.



**Figura 5.** Separación cromatográfica obtenida con monitoreo a 246 nm: (a) muestra de suero libre de ácido valproico, el patrón interno (PI), (b) muestra de suero de paciente con farmacoterapia de ácido valproico (61,9  $\mu\text{g/mL}$ )<sup>[27]</sup>

La curva de calibración ( $Y = 0,0133X - 0,0025$ ) la obtuvieron a partir de la relación entre las áreas de las bandas del derivado fenacilo de ácido valproico y el patrón interno (Y) y las concentraciones de ácido valproico añadido (X). El método mostró una linealidad adecuada con un  $R^2 = 0,9999$  dentro de un rango de 2 a 300  $\mu\text{g/mL}$  de ácido valproico. Además, determinaron la exactitud entre 101 y 115 %, la precisión intra-ensayo fue de 4,53 - 8,15 % y la precisión inter-ensayo estuvo entre 3,15 y 6,77 % demostrando una repetibilidad adecuada a partir de análisis de varianza ANOVA; mientras que, el límite de cuantificación fue de 2,0  $\mu\text{g/mL}$  inferior a los niveles terapéuticos.

Finalmente, encontraron que el método desarrollado y validado era preciso y exacto, con una sensibilidad adecuada para la monitorización terapéutica del ácido valproico, lo que permite la determinación fiable de este principio activo en laboratorios con equipo de HPLC y detectores espectrofotométricos. Al comparar los resultados obtenidos por HPLC y el método de la norma de inmunoensayo enzimático competitivo (IEC) no observaron diferencias significativas.

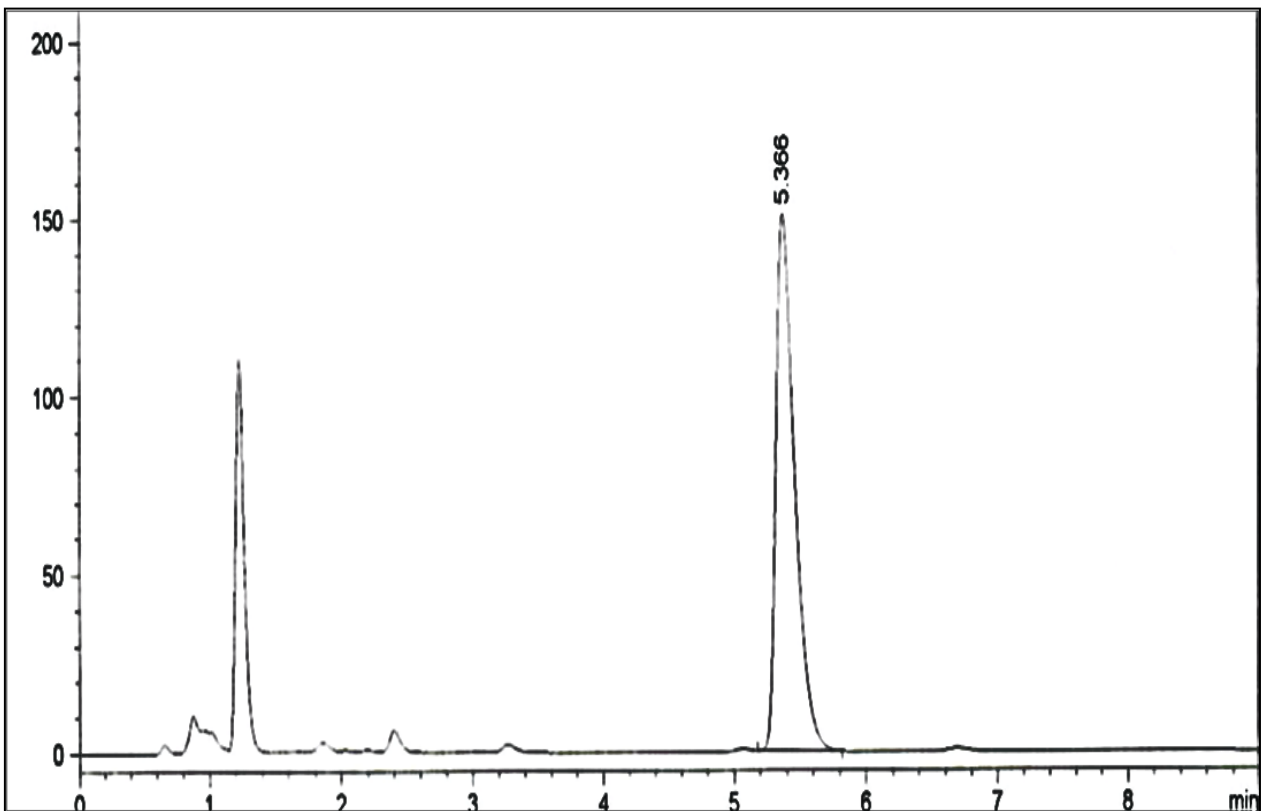
**3.4. Gupta<sup>a</sup> R., Singh<sup>b</sup> U., Kumar<sup>b</sup> S., Moothan<sup>c</sup>, B. HIMT College of Pharmacy<sup>a</sup>, Dr. K. N. Modi Institute of Pharmaceutical Education and Research<sup>b</sup>, Analytical Development Laboratory<sup>c</sup>, India. (2009).<sup>[28]</sup>**

Estos autores desarrollaron una metodología para la determinación de valproato de sodio en tabletas por RP-HPLC sin previa derivatización. Para ello emplearon una columna Nova-pak fenil (4  $\mu$ m, 150  $\times$  3,9 mm) bajo una elución isocrática con una fase móvil compuesta por acetonitrilo - buffer fosfato (30:70, %v/v) ajustada a pH 2,5 con ácido fosfórico, a un flujo de 1,2 mL/min; tanto la disolución del patrón de valproato de sodio como las muestras fueron disueltas en fase móvil, colocadas por 30 minutos en ultrasonido y se inyectaron 50  $\mu$ L de estas disoluciones a una concentración de 1,0 mg/mL de valproato de sodio. Esta detección se realizó por UV a 210 nm a 45 °C, monitorearon y controlaron el análisis con el programa Chem-Station.

A partir de estas condiciones cromatográficas obtuvieron un tiempo de retención alrededor de 5,37 minutos (figura 6). El método resultó ser preciso, reproducible y lineal bajo el intervalo de concentración de 50-1500  $\mu$ g/mL con un R = 0,9999. La media de las desviaciones estándar relativas inter e intra-ensayo (RSD) resultaron menos del 2,0 %; mientras que la recuperación de valproato de sodio la encontraron en el intervalo de 99,3 a 101,1 %. Los resultados de la robustez demostraron que el contenido de este

fármaco no se vio afectado por los cambios realizados; por ende concluyeron que el método era robusto.

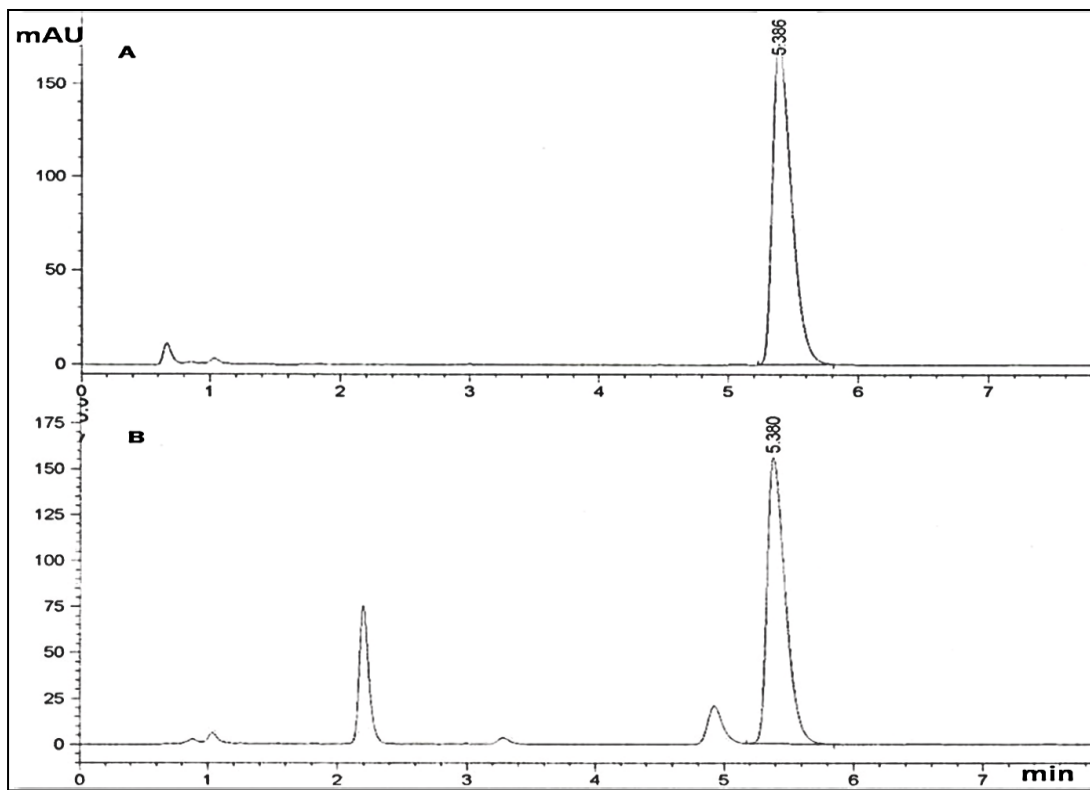
Cabe destacar, que el modo de preparación de la solución de buffer fosfato en esta investigación fue una mezcla de tampón A (0,0019 M de ácido cítrico monohidratado y 0,028 M de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  anhidro) y tampón B (0,05 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 0,0425 M de NaOH) en volúmenes iguales.



**Figura 6.** Cromatograma del valproato de sodio en la solución de la muestra <sup>[28]</sup>

3.5. Gupta<sup>a</sup> R., Singh<sup>b</sup> U., Kumar<sup>c</sup> S., Iqbal<sup>a</sup> K., Sethia<sup>c</sup> S. HIMT College of Pharmacy<sup>a</sup>, Regional College of Pharmacy<sup>b</sup>, Dr. K. N. Modi Institute of Pharmaceutical Education and Research<sup>c</sup>, India. (2010). [29]

Estimaron el contenido de ácido valproico en cápsulas de gelatina blanda a partir de las condiciones cromatográficas antes descritas para la determinación de valproato de sodio en tabletas. Obtuvieron que el ácido valproico eluyó aproximadamente a 5,38 minutos (figura 7); además observaron una buena relación lineal ( $R = 0,9994$ ) en el rango de 10 a 1500  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente. La recuperación del ácido valproico se encontró entre 98,6 y 100,5 %.



**Figura 7.** Cromatograma de ácido valproico, A) solución del patrón, B) solución de la muestra [29]

Por otro lado, al someter el método a pequeños cambios de flujo, pH de la fase móvil, proporción de la fase móvil y la temperatura del horno de la columna, el método resultó ser robusto con una RSD < 1,0 %. Con el ensayo del contenido de ácido valproico encontraron  $(100,100 \pm 0,282)$  % para  $n = 6$ . Destacando que este método ofrece menor tiempo de ejecución, debido a la simplicidad de la preparación de la muestra sin la formación de un derivado que requiere un tiempo más largo de análisis y no hubo necesidad de emplear patrón interno.

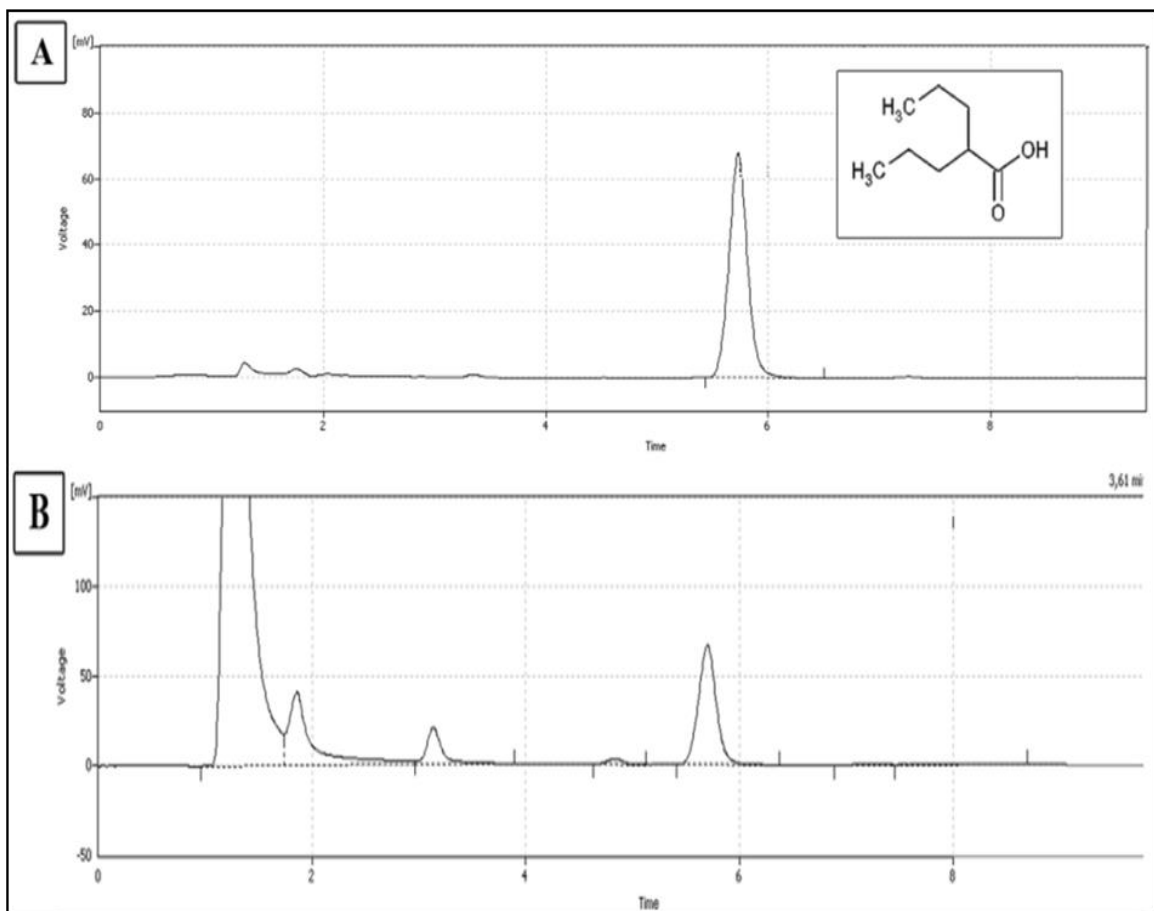
**3.6. De Souza<sup>a</sup> P., Machado<sup>b</sup> J., Mazzei<sup>c</sup> A., Costa<sup>d</sup> J., Leandro<sup>c</sup> K. Ministério da Defesa - Comando da Marinha<sup>a</sup>, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro<sup>b</sup>, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde-Fundação Oswaldo Cruz<sup>c</sup>, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca<sup>d</sup>; Rio de Janeiro. (2013).<sup>[22]</sup>**

Desarrollaron y validaron un método para la determinación de ácido valproico en formulaciones farmacéuticas por cromatografía de líquida de alta eficiencia y establecieron los siguientes parámetros cromatográficos: columna Lichrospher® C<sub>18</sub> (5 µm, 250 x 4 mm) usada en los estudios de validación; mientras que, en la robustez utilizaron una columna Hypersil BDS C<sub>18</sub> (5 µm, 250 x 4 mm). Emplearon un flujo 1,0 mL/min; bajo la elución isocrática de una fase móvil compuesta por acetonitrilo y una disolución acuosa de ácido trifluoroacético 0,05 %v/v; (55:65) pH 2,3; volumen de inyección 25 µL; longitud de onda 210 nm y la temperatura de la columna durante análisis se mantuvo a 25 °C.

Tanto el patrón como las muestras de ácido valproico 250 mg cápsulas se disolvieron en fase móvil y fueron llevados a ultrasonido por 30 minutos, siendo la concentración de

trabajo aproximadamente igual a 1,00 mg/mL a un tiempo de retención alrededor de 5,8 minutos (Ver figura 8).

Los datos fueron procesados con la versión 5.5 del software (Varian ®) con estas condiciones obtuvieron una adecuada linealidad ( $R^2 = 0,9998$ ) a concentraciones de 0,7 y 1,3 mg/mL, las desviaciones estándar relativas (RSD) para la repetibilidad fueron 0,68 % y 1,23 % para la precisión intermedia; la recuperación se encontró entre 99,42 y 101,55 % (RSD 0,14 a 0,74 %). Finalmente, encontraron que el método es robusto al someterlo a las pequeñas variaciones.



**Figura 8.** Cromatograma de ácido valproico por HPLC, A) solución patrón de concentración 1,03 mg/mL, B) solución de la muestra de concentración 1,00 mg/mL [30]



#### 4. JUSTIFICACIÓN

Debido a que el ácido valproico es un fármaco empleado en el tratamiento de crisis epilépticas y desorden bipolar, su cuantificación es necesaria para garantizar la calidad del medicamento y el beneficio terapéutico en cada trastorno neurológico.

La mayoría de las cuantificaciones de este principio activo se han realizado por cromatografía de gases, ya que es una sustancia volátil. Actualmente, una de las monografías oficiales como es la Farmacopea de los Estados Unidos (USP 37 - NF 32, 2014) sugiere realizar la determinación de ácido valproico materia prima y formulaciones farmacéuticas (cápsulas y solución oral) por cromatografía líquida de alta eficiencia.<sup>[26]</sup>

Esta instrumentación resulta una alternativa viable para estudiar no sólo compuestos volátiles, sino también aquellos no volátiles; mientras que, con el detector de arreglo de diodos es posible determinar la presencia de productos de degradación e impurezas que puedan estar coeluyendo con el analito de interés.

Por esta razón y debido a que se dispone de un cromatógrafo de líquidos con detector de arreglo de diodos, se pretende desarrollar y validar un método para la determinación de ácido valproico en tabletas por HPLC, con la finalidad de ofrecer un método alternativo que permita reducir el uso de disolventes tóxicos para el medio ambiente y el analista.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. Objetivo general**

- Desarrollar y validar un método analítico para la determinación de ácido valproico en tabletas, utilizando la técnica de RP-HPLC con detector de arreglo de diodos.

### **5.2. Objetivos específicos**

- Establecer las condiciones cromatográficas preliminares mediante la simulación y ajuste de las condiciones descritas en la literatura para el ácido valproico.
- Optimizar las condiciones cromatográficas y aplicar el procedimiento analítico a la muestra de ácido valproico en tabletas.
- Validar el método analítico desarrollado por HPLC para ácido valproico en tabletas.
- Evaluar la pureza espectral de los cromatogramas obtenidos.
- Determinar el contenido de ácido valproico en tabletas en dos medicamentos diferentes.
- Comparar el método analítico desarrollado por HPLC con el método propuesto por la USP 37 - NF 32, 2014.

## 6. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### 6.1. Equipos y reactivos

#### 6.1.1. Instrumentación

- Cromatógrafo de Líquidos de Alta Eficiencia, Waters formado por:
  - Bomba cuaternaria 600E.
  - Automuestreador 717 Plus
  - Detector de UV-visible con arreglo de diodos 996 PDA (Apéndice B).
  - La adquisición y procesamiento de los datos del sistema cromatográfico se controló por el programa Millennium<sup>32</sup>.
  
- En la etapa preliminar de esta investigación se utilizó una columna  $\mu$ Bondapak<sup>TM</sup> C<sub>18</sub> (10  $\mu$ m, 300 x 3,9 mm) serial 0206930223616, PAT N° WAT027324; mientras que, en la etapa de desarrollo y validación se empleó una columna SunFire<sup>TM</sup> C<sub>18</sub> (10  $\mu$ m, 300 x 3,9 mm), PAT N° 186002559 Lote: 0150312221.
  
- Espectrofotómetro UV-Visible, Shimadzu modelo UV-1201.
  
- Balanzas electrónicas, Mettler-Toledo, modelo AG245 de capacidad máxima (210,0000  $\pm$  0,0001) g y marca Adventurer OHAUS, modelo AR3130 de capacidad máxima (310,000  $\pm$  0,001) g.
  
- pH-metro, Thermo Orion, modelo 420A<sup>+</sup>.
  
- Bomba de vacío Gast, modelo DQA-P104-AA.

- Ultrasonido Branson, modelo 5200.
- Plancha de agitación magnética y calentamiento Barnstead Thermolyne, modelo sp131325.
- Agitador mecánico Vórtex, modelo Genie 2 Daigger.

### 6.1.2. Reactivos y solventes

- Agua de 18 M $\Omega$  ultrapura, NanoPure marca Barnstead abastecido por el equipo purificador de agua cascada RO MK2- Pall Corporation.
- Ácido orto-fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) al 85,7 %m/m, lote: 992844 suministrado por Fisher Scientific.
- Acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN) al 100,0 %m/m grado HPLC; T (210 nm): 30 %, lote: 2856A51478 fabricado por Chrom AR<sup>®</sup>.
- Etanol absoluto (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH) al 99,8 %m/m grado HPLC Chromasolv<sup>®</sup>; T (210 nm): 20 %; lote: 7263A proveniente de Sigma Aldrich.
- Etanol (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH) al 90,6 %m/m, clase 1b, grado HPLC; A (210 nm): 0,44; lote: 053546 proporcionado por Fisher Scientific.
- Metanol (CH<sub>3</sub>OH) al 99,9 %m/m grado HPLC; A (210 nm): 0,04; lote: SZBA295M fabricado por Sigma Aldrich.

- Fosfato monobásico de sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) al 98-100,5 %m/m; lote: 60040 fabricado por Riedel de Haën.
- Peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) al 35 %m/m, lote: 1019A marca Riedel de Haën.  
Hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ) con una pureza > 99 %m/m, lote: B0079398 716 elaborado por Merck.
- Ácido clorhídrico al 37 %m/m, lote: 40490 marca Riedel de Haën.

### **6.1.3. Materiales**

- Membranas filtrantes EM Nylon 0,45  $\mu\text{m}$ .
- Equipo de filtración de vidrio para fase móvil marca Milipore.
- Equipo de filtración metálico para filtrar muestras

### **6.1.4. Patrones**

Patrón de ácido valproico al 100 % de pureza, suministrado por Global Pharma Care, Lote: 0100000008984.

### **6.1.5. Muestras**

Se analizaron dos medicamentos que contenían como único principio activo al ácido valproico. Ambos productos se encontraban vigentes para la fecha de estudio, en actual comercialización y expendio en Venezuela. La declaración de estos medicamentos es la siguiente:

- Medicamento A, contiene ácido valproico 500 mg en tabletas recubiertas. Fabricado y distribuido en Venezuela por Laboratorios A.
- Medicamento B, contiene divalproato ácido de sodio que equivale a 500 mg de ácido valproico en comprimidos entéricos. Fabricado en Chile y distribuido en Venezuela por Laboratorios B.

### **6.2. Condiciones cromatográficas preliminares**

Este ensayo de carácter preliminar, se realizó con el propósito de establecer si era posible la retención adecuada del analito de interés empleando los equipos e insumos disponibles en nuestro laboratorio. Para ello, se combinaron informaciones de las fuentes consultadas y sobre esta base se ensayaron diferentes eluentes, proporciones, flujos, pH, etc.

Cabe destacar, que los ensayos preliminares se realizaron sobre una columna cromatográfica de largo tiempo de uso, con el objetivo de preservar la columna a utilizar en las condiciones cromatográficas definitivas.

### 6.2.1. Selección de los eluentes

En esta primera etapa, se realizaron pruebas de solubilidad de un patrón puro de ácido valproico en los diferentes eluentes recomendados por la literatura. Dichos eluentes son aquellos frecuentemente empleados para la separación de este tipo de compuestos por HPLC, como lo son: agua, metanol, etanol y acetonitrilo.

Mediante una simple apreciación visual, se encontró que el ácido valproico resultó soluble en los disolventes orgánicos mencionados anteriormente; mientras que, en agua resultó parcialmente soluble con ayuda de agitación mecánica y ultrasonido. La menor solubilidad del ácido valproico en agua se debe número de átomos de carbono que impiden la solvatación efectiva en este medio, resultando más afín en disolventes de menor polaridad que el agua.

En base a lo antes expuesto, se probó la solubilidad del ácido valproico en mezclas compuestas por mayor cantidad de disolvente orgánico (metanol, etanol y acetonitrilo) en comparación con el acuoso. Para ello, se prepararon patrones de 12,5 mg/mL de ácido valproico disuelto en las mezclas 65:35 y 70:30 %v/v. Se observó solubilidad completa para las mezclas: acetonitrilo-agua (65:35 %v/v) y etanol-agua (70:30 %v/v); mientras que, en el resto de las mismas se observó turbidez, por lo tanto fueron descartadas.

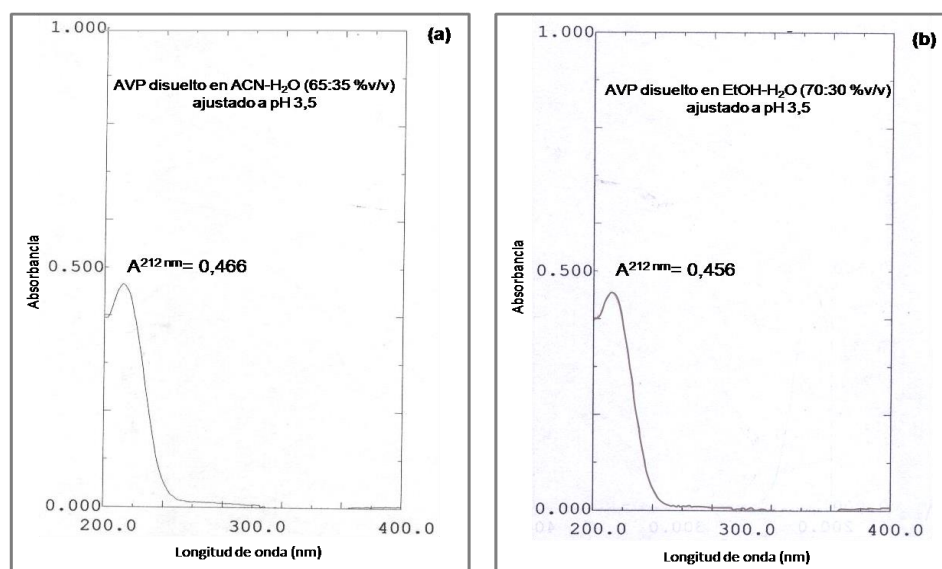
Debido a que el pKa del ácido valproico es 4,6 se procedió a disminuir el pH de las mezclas seleccionadas a 3,5 con  $H_3PO_4$  al 85,7 %m/m, con la finalidad de favorecer el estudio del ácido valproico bajo la forma de su especie no disociada (protonada).

Una vez escogidos los eluentes, fue necesario medir la longitud de onda de trabajo del ácido valproico para ambas mezclas de eluentes.

### 6.2.2. Selección de la longitud de onda

Se realizó el análisis espectrofotométrico con la finalidad de determinar la longitud de máxima absorción del ácido valproico disuelto en las mezclas de acetonitrilo-agua (65:35 %v/v) y etanol-agua (70:30 %v/v) ajustadas a pH 3,5. La longitud de onda escogida fue empleada en la medición por HPLC.

Para este estudio, se diluyeron cada una de las disoluciones madres de ácido valproico en sus correspondientes diluyentes hasta conseguir un valor cercano a la absorbancia ideal de 0,434<sup>[31]</sup>. El valor de concentración final obtenido para ambas disoluciones fue de 0,7 mg/mL de ácido valproico y el barrido de longitudes de onda se muestra en la figura 9.



**Figura 9.** Espectro de absorción ultravioleta de ácido valproico disuelto en: (a) acetonitrilo-agua (65:35 %v/v) ajustada a pH 3,5 y (b) etanol-agua (70:30 %v/v) ajustada a pH 3,5



Debido a que, el ácido valproico posee un grupo funcional carboxilo capaz de aportar pares de electrones  $\pi$  no enlazante y sufrir transiciones electrónicas  $n \rightarrow \pi^*$ , el máximo de absorción generalmente se desplaza hacia longitudes de onda cortas conforme aumenta la polaridad del disolvente; es decir, en la medida que el par de electrones no enlazante esté más solvatado por el disolvente, la energía del orbital  $n$  disminuye. En consecuencia, se produce un aumento de la energía requerida para la transición  $n \rightarrow \pi^*$  y la banda de absorción se origina a menores longitudes de onda. <sup>[32]</sup>

Sin embargo, los espectros de absorción UV para ambas disoluciones dieron similares, lo que indica que el efecto anterior es poco perceptible con los diluentes empleados, resultando una longitud de onda de máxima absorción de 212 nm.

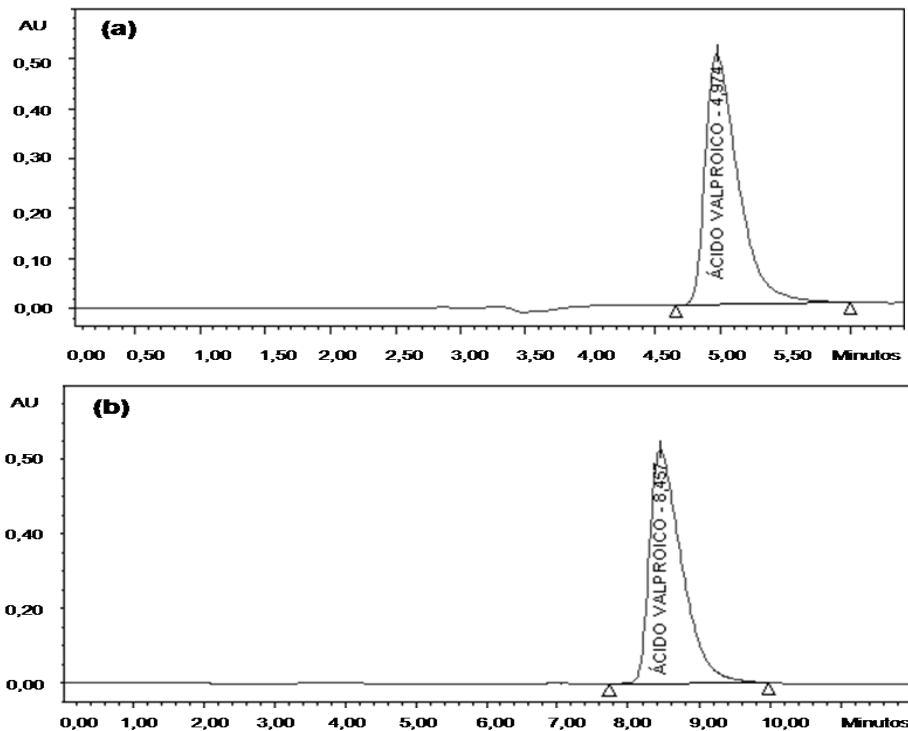
### 6.2.3. Ensayos cromatográficos

En la búsqueda de condiciones cromatográficas preliminares se utilizaron patrones puros de ácido valproico. Para ello, se preparó una disolución de 20 mg/mL de ácido valproico, disuelto en sus correspondientes fases móviles: acetonitrilo-agua (65:35 %v/v) y etanol-agua (70:30 %v/v) ajustadas a pH= 3,5 con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. En este ensayo, se empleó una columna  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub> (10  $\mu$ m, 300 x 3,9 mm) de largo tiempo de uso con un número de platos teóricos de 1612 respecto al acenafteno.

Después de llevar a cabo diferentes corridas variando el flujo y gradientes de las mezclas anteriores, se optó por una elución isocrática a temperatura ambiente, un volumen de inyección de 10  $\mu$ L, una longitud de onda de 212 nm y un flujo de 0,8 mL/min para el eluyente acetonitrilo-agua (65:35 %v/v) y 0,5 mL/min para el eluyente etanol-agua (70:30 %v/v), las cuales denominamos condición 1 y condición 2,

respectivamente. Los cromatogramas obtenidos en ambas condiciones se muestran en la figura 10.

En la medición de los tiempos de retención ( $t_R$ ), en la condición 1 se obtuvo una banda de ácido valproico a un  $t_R$  de 4,97 minutos y con la condición 2 se consiguió un  $t_R$  de 8,46 minutos. En esta última condición no fue posible obtener un menor tiempo de retención ya que a un flujo superior de 0,5 mL/min se obtenía una mayor elevación de la presión dentro la columna, lo que podría afectar algún componente del equipo. Esta elevación de la presión se debe a la mayor viscosidad que presenta el etanol con respecto al acetonitrilo; además de la posible pérdida de eficiencia de la columna. Esto pudo confirmarse al apreciar lo ancho y asimétrico de las bandas cromatográficas para ambos eluentes.



**Figura 10.** Cromatograma del patrón de ácido valproico disuelto en fase móvil, (a): acetonitrilo-agua (65:35 %v/v) ajustada a pH= 3,5 [condición 1]; (b): etanol-agua (70:30 %v/v) ajustada a pH=3,5 [condición 2].

De acuerdo con el resultado obtenido en el análisis cromatográfico preliminar, se seleccionó aquella condición más acorde y responsable con el ambiente; es decir, una fase móvil compuesta por el disolvente orgánico de menor toxicidad y menos costoso. Por esta razón, se descartó el uso de la fase móvil que contenía acetonitrilo y se continuó el curso de la investigación empleando la condición 2, compuesta por etanol-agua (70:30 %v/v) ajustada a pH 3,5. Seguidamente, se procedió a optimizar el método cromatográfico.

### **6.3. Optimización de las condiciones cromatográficas**

Para la búsqueda de las condiciones cromatográficas de trabajo, se empleó una muestra que contenía ácido valproico en tabletas, con la finalidad de observar si algún componente de la muestra coeluye con el analito de interés.

En función de los resultados obtenidos en la primera fase del análisis cromatográfico, se procedió a replicar la condición 2 en una columna nueva, SunFire C<sub>18</sub> (5 µm, 150 x 4,6 mm) con un número de platos teóricos de 13893 respecto al acenafteno.

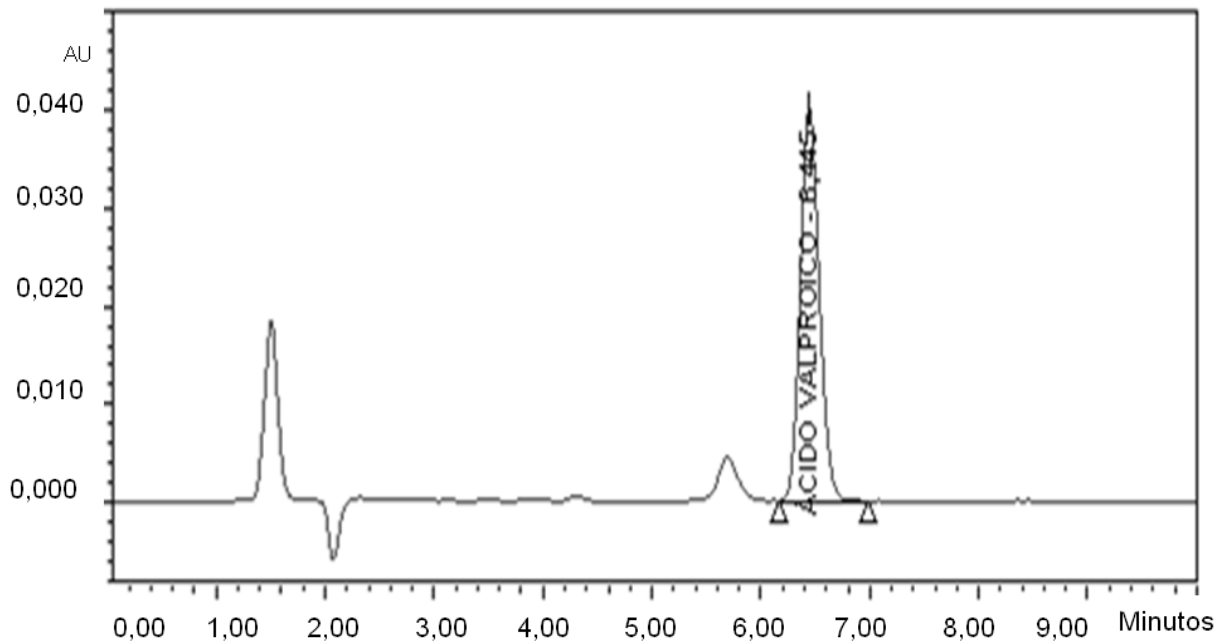
A pesar de haber obtenido resultados satisfactorios con la condición cromatográfica 2, se consideró realizar modificaciones del volumen de inyección, flujo y la proporción del disolvente orgánico para obtener mejoras en cuanto al factor de retención ( $k$ ) del analito de interés y la resolución del ácido valproico respecto a los componentes de la matriz de la muestra.

Después de diversos ensayos se optaron por las condiciones de trabajo expuestas en la tabla 7 y el cromatograma de la muestra de ácido valproico en tableta se observa en la figura 11.

**Tabla 7.** Condiciones cromatográficas de trabajo

<b>Columna</b>	SunFire C <sub>18</sub> (5 µm, 150 x 4,6 mm)
<b>Fase móvil</b>	Etanol-agua (60:40 %v/v) ajustada a pH 3,5 con H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> al 85,7 %m/m
<b>Flujo de la fase móvil</b>	0,8 mL/min
<b>Volumen de inyección</b>	5 µL
<b>Longitud de onda</b>	212 nm
<b>Concentración del analito</b>	2,5 mg/mL de ácido valproico
<b>Temperatura</b>	Ambiente
<b>Presión de sistema</b>	(1900 ± 100) psi
<b>Tiempo de corrida</b>	10 minutos

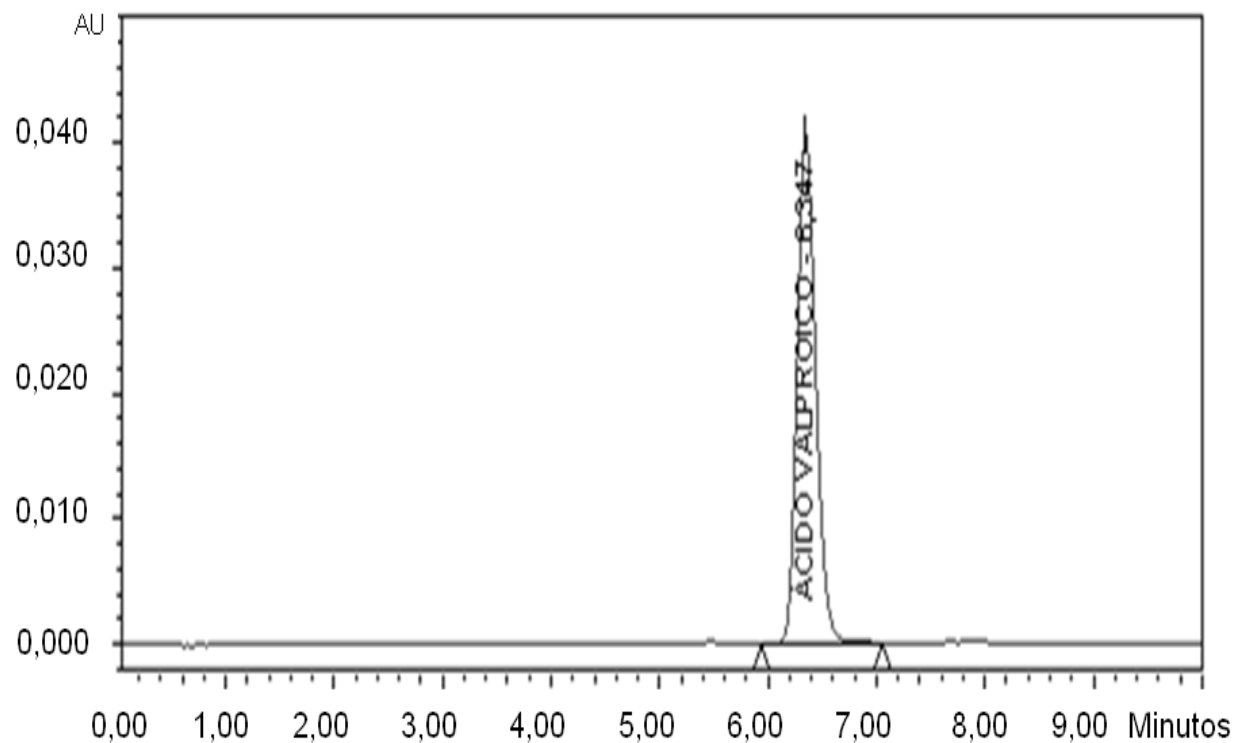
En la figura 11, se evidencia una banda aguda y simétrica a un  $t_R$  de aproximadamente 6,4 minutos atribuida al ácido valproico. Una banda a 1,5 minutos posiblemente atribuida a uno o varios compuestos de la muestra que eluyen a un  $t_R$  corto, probablemente el tiempo muerto. Una segunda banda invertida a 2,1 minutos asociada a un compuesto con un coeficiente de absortividad menor a la mezcla de eluentes. Adicionalmente, aparece una tercera banda a un  $t_R$  de 5,6 minutos, suficientemente resuelta con la banda de interés.



**Figura 11.** Cromatograma de la disolución de una tableta de ácido valproico disuelto en fase móvil etanol-agua (60:40 %v/v) ajustada a pH= 3,5

En base a un tiempo muerto de 1,5 minutos se obtuvo un valor de  $k$  aceptable de 3,2 para un tiempo total de análisis de 10 minutos, acompañado de un factor de asimetría promedio de 1,2.

Cabe destacar, que el eluyente presenta absorción a la longitud de onda de trabajo (cutoff), sin embargo, la corrida comienza en un valor de absorción cero, ya que el equipo establece automáticamente el auto cero al momento de iniciar la elución. Debido a que etanol presenta un valor de absorbancia cercano a la longitud de onda de trabajo, fue necesario apreciar cuanto podía ser la pérdida de la relación señal/ruido (S/N) por el efecto de la absorción del eluyente. Para ello, se preparó un patrón puro de 2,5 mg/mL de ácido valproico y se evaluó el área de la banda, bajo las condiciones cromatográficas anteriormente descritas. En la figura 12, se muestra el cromatograma obtenido en esta prueba.



**Figura 12.** Cromatograma del patrón de ácido valproico disuelto en fase móvil etanol-agua (60:40 %v/v) ajustada a pH= 3,5

En la figura 12, se observa que el patrón de 2,5 mg/mL de ácido valproico, posee un área de banda grande respecto a la señal de fondo del eluente, lo que implica que pudiéramos medir concentraciones cuatro veces más diluidas ( $\cong 0,5$  mg/mL), cantidad bastante inferior para una tableta al ser disuelta y diluida.

#### 6.4. Validación del método analítico

Una vez seleccionadas las condiciones experimentales descritas en la tabla 7, se procedió a realizar la validación según la USP 30- NF 25 (2007).

El protocolo de validación para las formulaciones farmacéuticas, exige la verificación rutinaria de los siguientes parámetros cromatográficos: área, tiempo de retención, número de platos teóricos, factor de retención y factor de asimetría <sup>[16]</sup>. El propósito es asegurar que el sistema cromatográfico se encuentre en óptimas condiciones para realizar los respectivos estudios. Los valores de dichos parámetros deben estar en el orden del 2 % como coeficientes de variación.

Por otro lado, la evaluación de algunos parámetros de validación debe realizarse con patrones puros de ácido valproico, mientras que otros, deben estimarse con muestras, cuyos valores de ácido valproico se encuentren declarados por el fabricante.

En aquellos casos, donde se empleó muestra para la evaluación de ciertos parámetros de validación, se procedió a preparar un material de referencia interno. Para ello, se adquirió una cantidad suficiente de tabletas comerciales de ácido valproico, cuyo rótulo declaraba una posología de 500 mg del principio activo en estudio. Se tomó una cantidad representativa de las tabletas y sometió a molienda. Una vez homogeneizada se guardó en un desecador hasta el momento de su uso.

### 6.4.1. Linealidad del rango

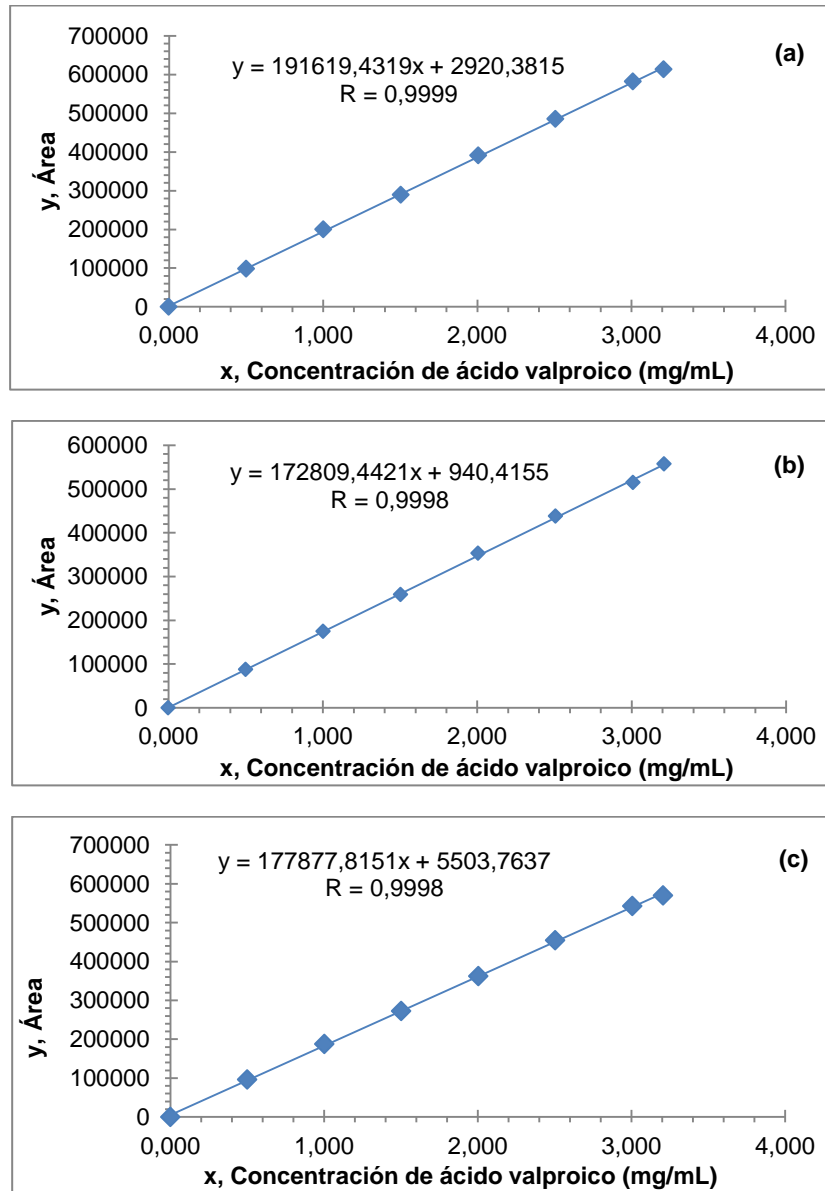
Para evaluar la linealidad del sistema de medida, se prepararon tres curvas de calibración en diferentes días. Cada curva estuvo compuesta por siete concentraciones diferentes, ubicadas en un rango aproximado de 0,5 a 3,2 mg/mL de ácido valproico. Finalmente, se inyectó en el cromatógrafo 5  $\mu$ L de cada patrón por triplicado y se construyó cada curva de calibración (Ver tabla 8).

Los resultados se analizaron por regresión lineal y con la prueba de verificación de la pendiente se estudió el %CV<sub>f</sub>. En el gráfico 1, se muestran las curvas de calibraciones (a, b y c) obtenidas los días I, II y III respectivamente.

**Tabla 8.** Valores de las áreas obtenidas para las concentraciones de ácido valproico estudiadas

Concentración del patrón de AVP (mg/mL)	Áreas		
	Día I	Día II	Día III
0,502	98076	87449	96606
1,004	199832	174440	187989
1,505	289654	258664	272838
2,01	390721	352714	362316
2,51	484781	437704	454318
3,01	581655	514578	542237
3,21	613385	557040	569723





**Gráfico 1.** Curva de calibración de ácido valproico, (a) día I, (b) día II y (c) día III

Con estas curvas de calibración se observa que el método propuesto es lineal en el rango de concentración establecido, ya que se obtuvieron coeficientes de correlación  $> 0,999$ . [17,22]

Por otro lado, es posible verificar la pendiente, a través de la determinación del coeficiente de variación de los factores de respuestas (área obtenida del patrón/ concentración de analito cuyo  $\%CV_f$  no debe ser mayor del 5 %.

En la tabla 9, se muestran los  $\%CV_f$ , ver factores de respuestas en el Apéndice C. Para cada curva de calibración se obtuvo un  $\%CV_f$  menor al 5 %, en consecuencia, existe una correlación lineal significativa entre las áreas obtenidas y la concentración de ácido valproico, lo que indica que el método cumple con el criterio de aceptación para este análisis. <sup>[20]</sup>

**Tabla 9.** Estudio de los criterios de aceptación para la linealidad

Parámetro analítico de la linealidad	Curva de calibración, analista I		
	Día I	Día II	Día III
Ecuación de la recta	$y = 191619,4319x + 2920,3815$ $S_{y/x}=3477$ $S_b=1122$ $S_a=2287$	$y = 172809,4421x + 940,4155$ $S_{y/x}=3796$ $S_b=1226$ $S_a=2497$	$y = 177877,8151x + 5503,7637$ $S_{y/x}=4174$ $S_b= 1349$ $S_a=2746$
R	0,9999	0,9998	0,9998
$CV_f < 5 \%$	1,4	0,9	2,8

$S_{y/x}$ : Desviación estándar de la regresión,  $S_b$ : Desviación estándar de la pendiente y  $S_a$ : Desviación estándar del punto de corte.

Finalmente, la linealidad no se vio afectada por la variabilidad de las condiciones operativas y ambientales dadas en los diferentes días de estudio.

### 6.4.2. Especificidad

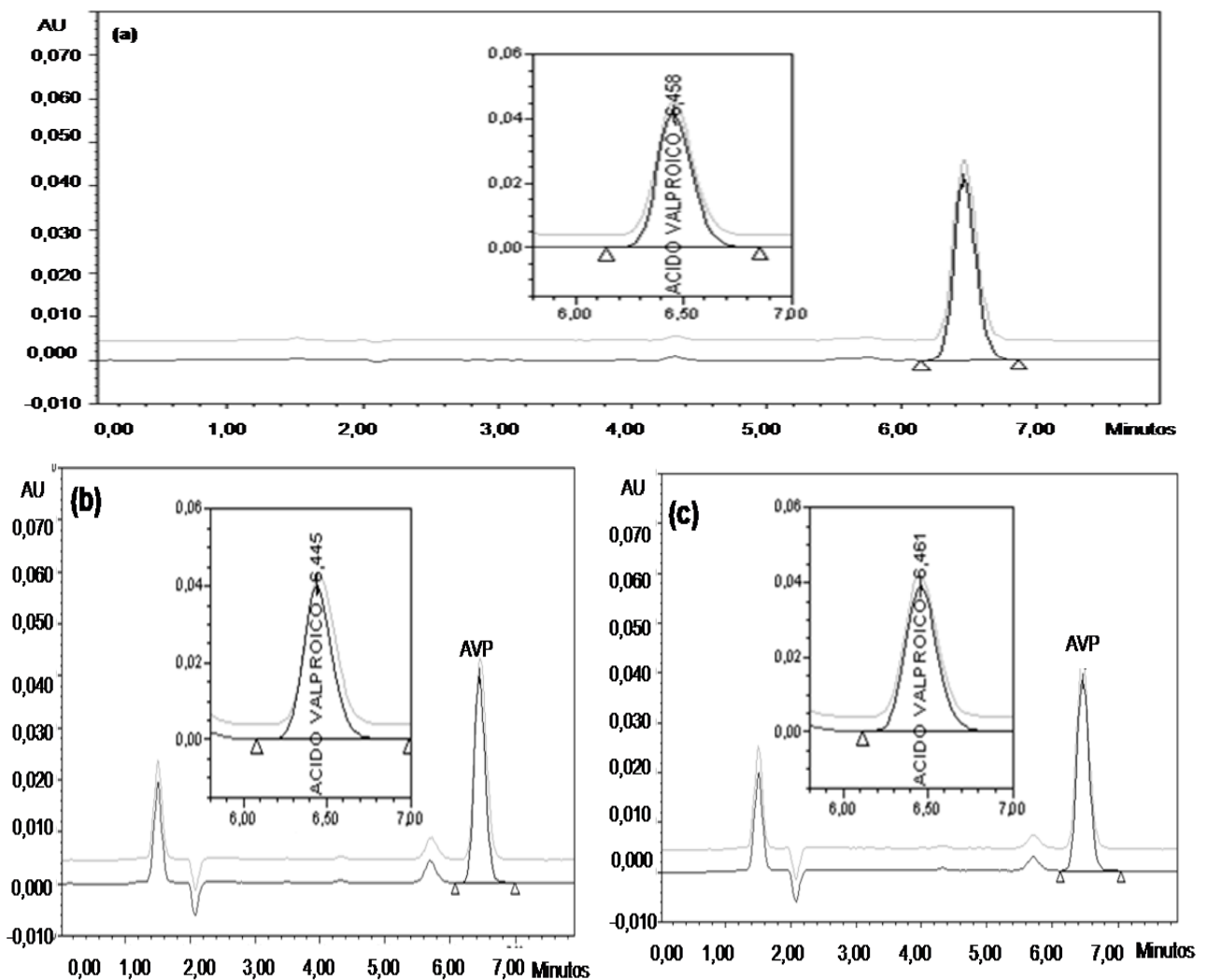
Para determinar la especificidad, se pesó una cantidad determinada del material de referencia interno con una precisión del 0,01 mg, para someterlo a cada una de las siguientes condiciones de degradación forzada: <sup>[16,18]</sup>

- Fotólisis con luz blanca durante 7 días.
- Termólisis con baño de agua a 75 °C durante 4 h.
- Hidrólisis ácida con 10 mL de una disolución acuosa de HCl 4N y se dejó en reposo durante 7 días.
- Hidrólisis básica con 10 mL de una disolución acuosa de NaOH 4N y se dejó en reposo durante 7 días.
- Oxidación con 10 mL de peróxido de hidrógeno al 35 %m/m y se dejó en reposo durante 7 días.

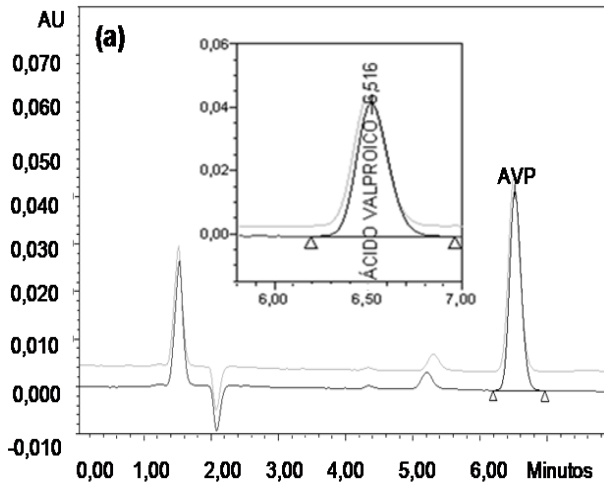
Una vez concluido el tiempo de exposición para cada uno de los experimentos, se transfirió a un balón aforado de 25 mL con ayuda de 10 mL de fase móvil. La mezcla resultante se agitó por 10 minutos en un vórtex y luego 10 minutos en ultrasonido; finalmente, se llevó a volumen con fase móvil. Adicionalmente, se preparó dos muestras y un patrón control de 2,5 mg/mL de ácido valproico para comparar los cromatogramas antes y después de la degradación artificial.

Posteriormente, una alícuota de la disolución resultante se filtró por una membrana de nylon de 0,45 µm y se analizó por duplicado en el cromatógrafo.

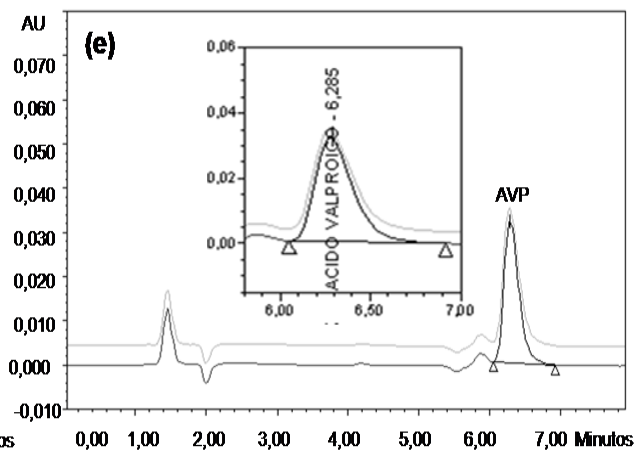
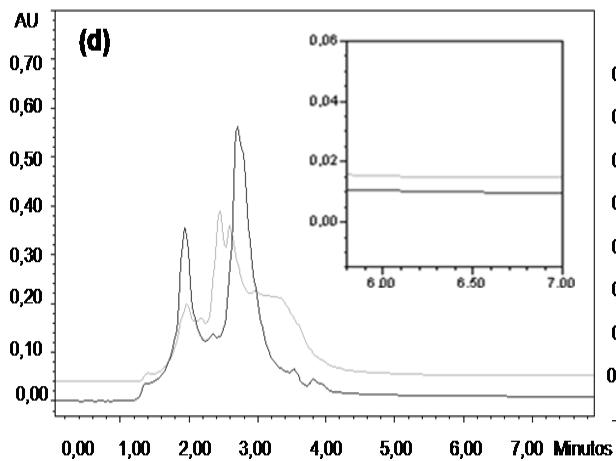
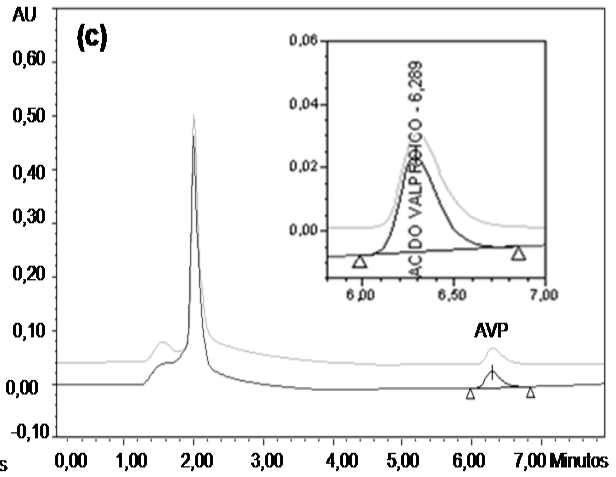
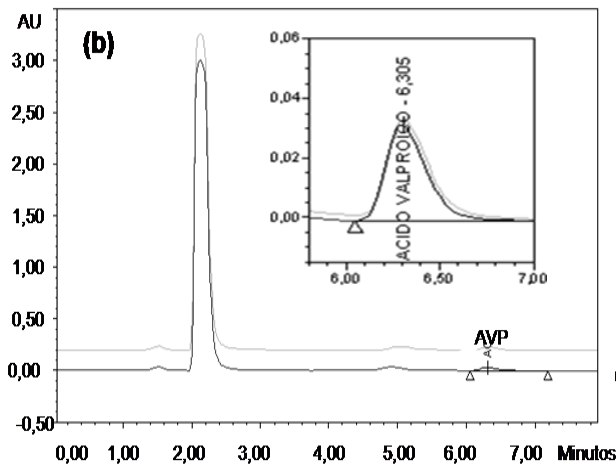
En la figura 13, se puede visualizar en el cromatograma (a) del patrón control la ausencia de impurezas; a diferencia del cromatograma (b) de la muestra control que presenta una impureza desconocida que eluye antes del pico de interés. La presencia y ubicación de esta impureza se mantienen en el cromatograma (c) de la muestra sometida a calor; lo que indica que la impureza está contenida en la matriz de la muestra y el método es capaz de separarla de la banda de interés.



**Figura 13.** Cromatogramas obtenidos en el estudio de la especificidad a 212 nm: (a) patrón control analizado de inmediato; (b) muestra control analizada de inmediato y (c) muestra en presencia de calor a 75 °C, analizada luego de 4 h de exposición.



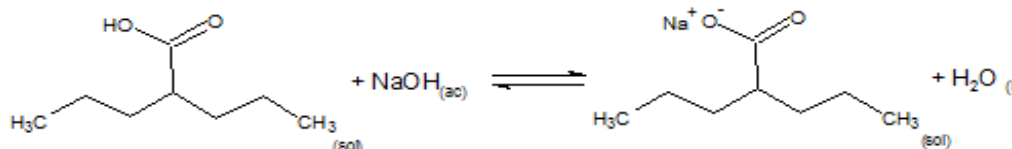
**Figura 14.** Cromatogramas obtenidos en el estudio de la especificidad por degradación forzada, de las muestras analizadas a 212 nm después de 7 días en reposo: (a) muestra control; (b) muestra con  $H_2O_2$ ; (c) muestra con HCl 4N; (d) muestra con NaOH 4N y (e) muestra en presencia de luz blanca.



En la figura 14, se presenta el cromatograma (a) de la muestra control expuesta 7 días en reposo. Al ser comparada esta imagen con la obtenida para la muestra control analizada de inmediato (figura 13), se observa que la muestra es estable frente a las condiciones estudiadas, ya que no se aprecian otras impurezas o productos de degradación.

En lo que respecta, a los cromatogramas (b y c) de las muestras sometidas a oxidación e hidrólisis ácida, respectivamente, se evidencia que el reactivo empleado en cada una de estas pruebas ocasiona un aumento en la señal de la banda, obtenida a las cercanías de tiempo muerto [Ver cromatograma (a) de la muestra control] posiblemente esta impureza se ha degradado bajo estas condiciones. Sin embargo, la banda correspondiente al ácido valproico se obtiene en órdenes de áreas similares a la muestra control.

Por otro lado, en el cromatograma (d) de la muestra sometida a hidrólisis básica, no se observa la banda característica del ácido valproico, debido a que los moles de este ácido se han neutralizado con los moles de hidróxido de sodio. Dando lugar a la formación de la sal de valproato de sodio y agua. Esta reacción se detalla en la figura 15.



**Figura 15.** Degradación del ácido valproico por hidrólisis básica

Finalmente, en el cromatograma (e) de la muestra expuesta a la luz durante 7 días, se puede observar que una de las impurezas presentes en la matriz de la muestra eluye

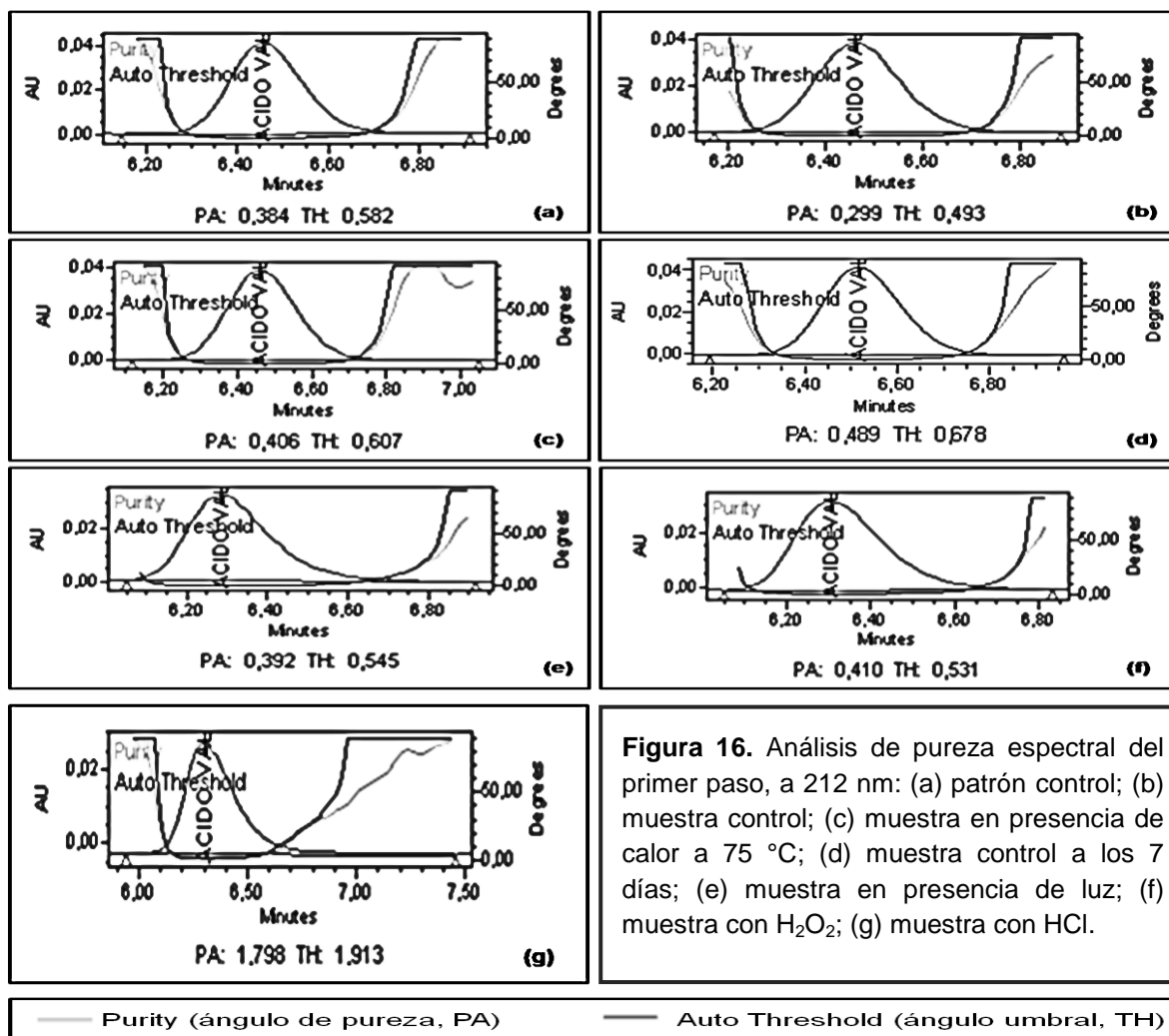
cerca de la banda del ácido valproico; sin embargo, esta impureza no coeluye con la banda cromatográfica del analito de interés. Hecho que se demostró al realizar el análisis de pureza de esta banda. También se evidencia un aumento del área bajo la banda debido a la ligera cola que conlleva a cierta asimetría de la misma.

Cabe destacar, que los detalles y resultados obtenidos con el análisis de pureza del estudio de la especificidad, se describen a continuación:

Mediante el detector de arreglo de diodos, se obtuvieron los gráficos de pureza de la banda cromatográfica correspondiente al ácido valproico. Estos gráficos pueden evaluarse hasta 4 pasos. Con la realización de cada paso se busca obtener diferencias espectrales poco significativas, entre cada punto de la banda cromatográfica y el espectro del ápice de la misma.

En los gráficos de pureza obtenidos para las muestras sometidas a luz blanca, calor a 75 °C, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 35 %m/m y HCl 4N, se obtuvo una constante aparición de la línea del ángulo de pureza (Purity, PA) por debajo del ángulo umbral (Auto Threshold, TH), lo que indica la ausencia de impurezas coeluyendo con el analito de interés, en consecuencia no existen diferencias espectrales significativas en la banda cromatográfica. Estos gráficos se muestran en la figura 16.

A partir del estudio de este parámetro analítico, se encontró que la respuesta obtenida corresponde única y exclusivamente al principio activo de ácido valproico; siendo el método propuesto capaz de discriminar y separar la señal del analito de interés de la señal de los otros componentes presentes en la matriz de la muestra.



\*Condición aceptada valor del PA < TH

Por otra lado, no se apreció una degradación drástica del analito bajo las condiciones de luz, calor, HCl y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ya que el contenido de ácido valproico presente en la muestra se encontró dentro del intervalo de 90 -110 % (Ver tabla 10); es decir, que la cantidad de analito degradado no debe superar el 20 % respecto a la cantidad presente en la muestra control.<sup>[19]</sup> En consecuencia, el método es específico y el medicamento analizado es estable a las condiciones de degradación forzadas por las que fue sometido, exceptuando aquella que por su estructura química es neutralizado en medio básico.



**Tabla 10.** Contenido de ácido valproico 500 mg tabletas determinado en el análisis de especificidad

ID	Condición de degradación forzada	$C_{AVP/tab}$ (mg/tab)	$\frac{C_{AVP/MRI}}{Ct_{declarado}} \times 100$
(a)	Patrón control	----	----
(b)	Muestra control	504,2	100,8
(c)	Calor a 75 °C	530,2	106,0
(d)	Muestra control a los 7 días	505,9	102,2
(e)	Luz	485,6	97,1
(f)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 35 %m/m	501,6	100,3
(g)	HCl 4N	476,1	95,2
(h)	NaOH 4N	----	----

$C_{AVP/tab}$ : Concentración de ácido valproico por tableta. Esta determinación se realizó empleando la curva de calibración del día I.

#### 6.4.3. Límite de detección (LOD) y Límite de cuantificación (LOQ)

A las curvas de calibración obtenidas en la sección 6.4.1, se le determinó la pendiente y la desviación estándar de la regresión. Con estos valores se estimó estadísticamente la concentración mínima detectable y la concentración mínima cuantificable de ácido valproico, empleando las ecuaciones 4 y 5 respectivamente. <sup>[18,21]</sup> A partir de este cálculo, se encontró un LOD=0,07 mg/mL y un LOQ=0,2 mg/mL.

#### 6.4.4. Precisión

En esta investigación, la precisión se estudió mediante la evaluación de la repetibilidad y la precisión intermedia.

#### 6.4.4.1. Precisión de sistema o repetibilidad instrumental

Se evaluó inyectando seis veces una disolución patrón de ácido valproico de 2,5 mg/mL. Con ello, se obtuvo un  $(\overline{t_R})$  de 6,28 minutos y un CV de 0,12 %; mientras que, el promedio obtenido de las áreas dio 479783 con un CV igual a 1 % (Ver tabla 11).

Según la USP 37-NF 32, se considera que el método propuesto es preciso a nivel de la repetibilidad, ya que valores de los coeficientes de variación tanto del tiempo de retención como para las áreas del patrón de ácido valproico dieron menores al 2 %, lo que representa una conformidad en este ámbito.

**Tabla 11.** Precisión del sistema cromatográfico

Réplica	$t_R$ (min)	Áreas
1	6,29	489372
2	6,29	482833
3	6,28	482137
4	6,27	476848
5	6,28	473553
6	6,29	473951
$\bar{X}$	6,28	479783
$s$	0,01	6136
CV (%)	0,12	1

#### 6.4.4.2. Precisión del método o repetibilidad de método

Consistió en preparar seis réplicas con el material de referencia interno (al 0,01 mg) a una concentración de 2,5 mg/mL de ácido valproico en función de la posología

declarada por el fabricante del medicamento. Se transfirió a un balón aforado de 25 mL con ayuda de 15 mL de fase móvil. La mezcla resultante se agitó por 10 minutos en un vórtex y luego 10 minutos en ultrasonido. Finalmente, se llevó a volumen con fase móvil.

Posteriormente, una alícuota de la disolución resultante se filtró por una membrana de nylon de 0,45  $\mu\text{m}$  y se analizó por duplicado, bajo las mismas condiciones de analista, laboratorio, día y equipos. La concentración de ácido valproico se determinó empleando la curva de calibración del día I.

En la tabla 12, se muestran las cantidades pesadas del material de referencia, las áreas obtenidas y las concentraciones de ácido valproico encontradas para cada una de las disoluciones preparadas. Además, puede evidenciarse que el método desarrollado presenta una concordancia aceptable ( $CV < 2\%$ ), cuando se inyecta repetidamente en el cromatógrafo una determinada alícuota de cada réplica.

**Tabla 12.** Precisión del método analítico

Réplica	( $C_{t_{MRI}} \pm 0,01$ ) mg	$\bar{Áreas}$	$C_{AVP/MRI}$ (mg/mL)	$C_{AVP/tab}$ (mg/tab)	CV (%)
1	98,98	475127	2,46	492,7	1,4
2	98,38	466558	2,42	483,8	0,7
3	98,40	460877	2,39	477,8	0,2
4	98,39	465100	2,41	482,3	1,9
5	99,46	473091	2,45	490,7	1,8
6	98,96	474988	2,46	492,6	1,2
			$\bar{X}$	486,7	
			s	6,2	
			CV (%)	1,3	

$C_{t_{MRI}}$ : Cantidad pesada del material de referencia interno

$C_{AVP/MRI}$ : Concentración de ácido valproico en la porción empleada del material de referencia

#### 6.4.4.3. Precisión intermedia

La precisión intermedia se puede evaluar realizando variaciones en alguna de las siguientes condiciones días, analistas y equipos. <sup>[21]</sup>

En esta investigación, se estudió la precisión intermedia en diferentes días. Para ello, se preparó por triplicado réplicas del material de referencia interno (al 0,01 mg) a una concentración de 2,5 mg/mL de ácido valproico en función de la posología declarada por el fabricante del medicamento. Se transfirió a un balón aforado de 25 mL con ayuda de 15 mL de fase móvil. La mezcla resultante se agitó por 10 minutos en un vórtex y luego 10 minutos en ultrasonido, finalmente se llevó a volumen con fase móvil.

Posteriormente, una alícuota de la disolución resultante se filtró por una membrana de nylon de 0,45  $\mu\text{m}$  y se analizó por duplicado.

A partir de la curva de calibración del día I, se determinó por interpolación de las áreas la concentración de ácido valproico de cada réplica.

La concentración promedio de ácido valproico obtenida para cada día de análisis fue de 505,1; 501,9 y 469,9 mg/tab, respectivamente. Los coeficientes de variación asociados a estas concentraciones dieron menor al 2 %, lo que indica que la metodología desarrollada para este principio activo es precisa (Ver tabla 13).

**Tabla 13.** Estudio de la precisión intermedia

<b>Concentración de ácido valproico por tableta (mg/tab)</b>			
<b>Réplica</b>	<b>Día I</b>	<b>Día II</b>	<b>Día III</b>
1	506,0	507,5	467,9
2	509,6	496,1	472,7
3	499,8	502,0	469,2
$\bar{x}$	505,1	501,9	469,9
<i>s</i>	5,0	5,7	2,4
<i>CV</i> (%)	1,0	1,1	0,5

A pesar que, se evidencian cambios en la concentración de ácido valproico por tableta para los diferentes días de estudio, se obtuvo una concentración porcentual (porcentaje de ácido valproico en base a lo declarado por el fabricante 500 mg) de 101,0 %; 100,4% y 94,0% para los días I, II y III, respectivamente. Estos porcentajes se encuentran dentro del criterio de aceptación de la USP de 90 – 110 %, lo que indica que el método es aceptable en este aspecto.

Además, el método no es afectado por variabilidades operacionales ni ambientales, al realizarse el estudio de la precisión intermedia en diferentes días de trabajo.

#### **6.4.5. Exactitud**

Para determinar la exactitud se empleó el método de patrón añadido a una muestra que previamente se le ha determinado su concentración. Para ello, El material de referencia interno se contaminó con una cantidad determinada de un patrón de concentración conocida y se midió el porcentaje de recuperación.

Para determinar la concentración de ácido valproico en el material de referencia interno, se empleó el método desarrollado. Para ello, se pesó nueve veces una cantidad determinada del material de referencia interno (al 0,01 mg) y fue transferido a un balón aforado de 25 mL con ayuda de 15 mL de fase móvil. La mezcla resultante se agitó por 10 minutos en un vórtex y 10 minutos en ultrasonido, finalmente, se llevó a volumen con fase móvil.

De acuerdo con el reporte del fabricante la concentración de ácido valproico después del tratamiento anterior debe estar en el orden de 5 mg/mL, en vista de ello se diluyó 5 mL en 20 mL, para inyectar por duplicado 5  $\mu$ L en el cromatógrafo.

Se obtuvo una concentración de 636 mg/g de ácido valproico en el material de referencia interno con un CV de 2 %.

Para la preparación de las muestras fortificadas, se pesó por triplicado una cantidad determinada del material de referencia interno (al 0,01 mg) para cada nivel de concentración del 80 %, 100 % y 130 %. Seguidamente, se contaminó con un patrón de ácido valproico de 25 mg/mL añadiendo alícuotas de 3 mL, 5 mL y 8 mL para el nivel de 80 %, 100 % y 130 %, respectivamente.

Cada una de las cantidades fortificadas se transfirió a un balón aforado de 25 mL con ayuda de 10 mL de fase móvil. La mezcla resultante se agitó por 10 minutos en un vórtex y 10 minutos en ultrasonido luego se llevó a volumen. Finalmente, se realizó una dilución de 5 mL en 20 mL, para la inyectar por duplicado 5  $\mu$ L en el cromatógrafo.

En la tabla 15, se muestran para cada nivel de concentración las cantidades de: material de referencia interno (de 636 mg/g), ácido valproico en cada réplica, ácido

valproico añadido con el patrón, ácido valproico fortificado (ver valores de las áreas en el apéndice E) y los porcentajes de recuperación obtenidos.

Se encontró un porcentaje de ácido valproico recuperado entre 99,6 % y 100,2 % (Ver tabla 14) cuyos valores se encuentran dentro de los límites de 98 - 102 % respectivamente. De igual manera, al evaluar la recuperación con la t de Student, se obtuvo un  $t_{\text{tabulado}}$  mayor que el  $t_{\text{experimental}}$  para ocho grado de libertad, con un contraste de dos colas y una probabilidad  $\alpha = 0,05$ . En consecuencia, el valor obtenido con el método propuesto se aproxima de manera aceptable al valor de referencia de 100 %.

**Tabla 14.** Porcentaje de recuperación obtenido con las cantidades de ácido valproico fortificadas y sin fortificar

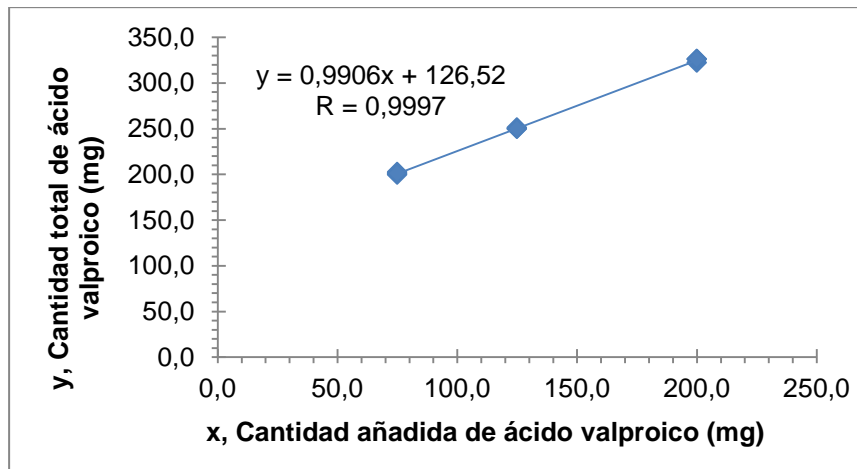
Nivel de concentración	(Ct <sub>MRI</sub> ± 0,01) mg	Ct <sub>AVP sin fortificar</sub> (mg)	Ct <sub>AVP añadido</sub> (mg)	Ct <sub>AVP fortificada</sub> (mg)	%R	$\overline{\%R}$	CV (%)
80,1 %	197,87	125,8	75,03	199,46	98,2	100,2	1,9
	197,82	125,8	75,03	202,31	102,0		
	197,84	125,8	75,03	200,98	100,2		
99,7%	197,52	125,6	125,05	251,09	100,4	99,7	0,6
	197,53	125,6	125,05	250,07	99,6		
	197,55	125,6	125,05	249,72	99,3		
129,4 %	197,45	125,5	200,08	322,09	98,2	99,6	1,1
	197,54	125,6	200,08	326,04	100,2		
	197,57	125,6	200,08	326,18	100,3		
				$\bar{X}$	99,8		
				s	1,2		
				CV (%)	1,2		
				* $t_{\text{experimental}}$	0,051		
				** $t_{\text{tabulado}}$	2,306		

\* $t_{experimental}$  (n=9)

\*\* $t_{tabulado}$  (n-1, LC= 95 % y 2 colas)

En lo que respecta, al estudio de la linealidad para la exactitud (Ver gráfico 2) se obtuvo un coeficiente de determinación de  $0,9997 > 0,95^{[20]}$ . Por lo tanto, las cantidades totales de ácido valproico (fortificada) son directamente proporcionales a las cantidades añadidas de ácido valproico.

**Gráfico 2.** Cantidad añadida en función de la cantidad total de ácido valproico



#### 6.4.6. Robustez

A partir de la matriz mostrada en la tabla 4, se estudió la influencia de los factores: flujo, pH y composición del disolvente orgánico (%etanol) en la fase móvil, empleando el diseño factorial completo  $2^3$ . Para ello, se establecieron los dominios experimentales a dos niveles, un nivel superior (+) y un nivel inferior (-) respecto al valor nominal o condiciones originales del método analítico desarrollado (Ver tabla 15).



**Tabla 15.** Factores y dominios experimentales a estudiar

Variables o factores		Valor nominal del método desarrollado	Nivel (-)	Nivel (+)
<b>A</b>	pH	3,5	3,3	3,7
<b>B</b>	%Etanol	60	55	65
<b>C</b>	Flujo	0,8	0,6	1,0

Para el análisis de la robustez, se preparó un patrón y una réplica del material de referencia interno a una concentración 2,5 mg/mL de ácido valproico. Se transfirió a un balón aforado de 25 mL con ayuda de 15 mL de fase móvil. La mezcla resultante se agitó por 10 minutos en un vórtex y 10 minutos en ultrasonido luego se llevó a volumen con fase móvil etanol-agua (60:40 %v/v) ajustada a pH 3,5. Se inyectaron cinco veces 5 µL tanto de la disolución del patrón como de la muestra.

Este desarrollo cromatográfico se llevó a cabo en una columna SunFire C<sub>18</sub> (5 µm, 150 x 4,6 mm) a 212 nm empleando las condiciones experimentales de: fase móvil y flujo descritas en la tabla 16.

**Tabla 16.** Resumen de las condiciones experimentales para el estudio de la robustez

Flujo	0,6 mL/min	1,0 mL/min	Fase móvil
<b>Experimentos</b>	1	3	Etanol-agua (55:45 %v/v) ajustada pH=3,3 con H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> al 85,7 %m/m
	2	7	Etanol-agua (65:35 %v/v) ajustada pH=3,3 con H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> al 85,7 %m/m
	4	6	Etano-agua (55:45 %v/v) ajustada pH=3,7 con H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> al 85,7 %m/m
	5	8	Etanol-agua (65:35 %v/v) ajustada pH=3,7 con H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> al 85,7 %m/m

Por otro lado, se determinó el efecto de cada factor (pH, %etanol y flujo) y sus interacciones (Ver tabla 17) con la concentración porcentual de ácido valproico respecto a los 500 mg declarados por el fabricante.

**Tabla 17.** Interpretación de los resultados obtenidos en la evaluación de la robustez

Factor (i)	$ E_i $	Veredicto
<b>A</b>	0,57	conforme
<b>B</b>	0,63	conforme
<b>C</b>	0,11	conforme
<b>AB</b>	4,39	No conforme
<b>AC</b>	1,64	conforme
<b>BC</b>	1,45	conforme
<b>ABC</b>	0,49	conforme

A: pH, B: %Etanol y C: flujo

Estos efectos fueron interpretados mediante la aplicación del algoritmo de Dong (Ver Apéndice D), cuyo criterio de aceptación establece que el valor absoluto del efecto de cada factor ( $E_i$ ) es significativo cuando es mayor o igual que el error crítico ( $E_{\text{crítico}}$ ).<sup>[23,25]</sup>

Mediante la aplicación del algoritmo de Dong se encontró  $E_{\text{crítico}} = 2,34$  determinado con un  $t_{\text{crítico}} = 2,447$  para 6 grados de libertad, con un contraste de dos colas y un LC= 95 %.

De este análisis, se pudo interpretar que el efecto  $E_{AB}$  dio mayor que el  $E_{\text{crítico}}$ ; es decir, que la interacción de los factores A y B es significativa. Por ende, el método no se considera robusto bajo las condiciones analizadas y el método no es capaz de continuar proporcionando resultados confiables con esta interacción.

Para más detalles en cuanto a los resultados obtenidos y modelo de cálculo para la robustez (Ver Apéndice D).

### **6.5. Determinación del contenido de ácido valproico 500 mg en los medicamentos A y B**

El método desarrollado y validado se aplicó en la determinación del contenido de ácido valproico presente en los medicamentos A y B. De cada medicamento se tomó una cantidad representativa de las tabletas y se sometió a molienda. Se pesó por triplicado una cantidad determinada de cada material de referencia interno (al 0,01 mg). Se transfirió a un balón aforado de 25 mL con ayuda de 15 mL de fase móvil. La mezcla resultante, se agitó por 10 minutos en un vórtex y luego 10 minutos en ultrasonido. Finalmente, se llevó a volumen con fase móvil.

Posteriormente, una alícuota la disolución resultante se filtró por una membrana de nylon de 0,45  $\mu\text{m}$  y se analizó por duplicado.

Para esta cuantificación, se estableció como criterio de aceptación una concentración porcentual de ácido valproico entre 90 - 110 %, obtenida a partir de la relación entre la cantidad de ácido valproico encontrada y los 500 mg declarados por el fabricante del medicamento por 100. Este criterio de aceptación, se fundamentó en las especificaciones establecidas por la USP 37- NF-32 para la formulación de cápsulas y solución oral.

En la siguiente tabla, se puede evidenciar que la concentración porcentual de ácido valproico tanto en el medicamento A como en el medicamento B se encuentra dentro del criterio de aceptación (Ver tabla 18). Quedando demostrado que el método analítico

puede ser empleado como procedimiento alternativo para el análisis de rutina y control de ácido valproico bajo la formulación de tabletas.

**Tabla 18.** Determinación del contenido de ácido valproico presente en los medicamentos A y B

Medicamento A	$(Ct_{MRI} \pm 0,01) \text{ mg}$	$\overline{\text{Áreas}}$	$C_{AVP/MRI} \text{ (mg/mL)}$	$C_{AVP} \text{ (mg/tab)}$	$\frac{Ct_{AVP}}{Ct_{declarado}} \times 100$
A-1	99,36	455439	2,529	504,1	100,8
A-2	99,40	450244	2,500	498,1	99,6
A-3	99,54	455047	2,527	502,7	100,5
			$\bar{X}$	501,6	100,3
			$s$	3,2	0,6
			$CV \text{ (\%)}$	0,6	0,6

Medicamento B	$(Ct_{MRI} \pm 0,01) \text{ mg}$	$\overline{\text{Áreas}}$	$C_{AVP/MRI} \text{ (mg/mL)}$	$C_{AVP} \text{ (mg/tab)}$	$\frac{Ct_{AVP}}{Ct_{declarado}} \times 100$
B-1	132,97	435123	2,415	482,6	96,5
B-2	132,96	434597	2,412	482,0	96,4
B-3	132,99	434390	2,411	481,7	96,3
			$\bar{X}$	482,1	96,4
			$s$	0,45	0,1
			$CV \text{ (\%)}$	0,09	0,1

## 6.6. Comparación del método analítico desarrollado con el método propuesto por la USP

Al momento de iniciar esta investigación, se disponía de una monografía oficial USP 30-NF 25 de 2007, que sugería la determinación de ácido valproico en materia prima y formulaciones farmacéuticas (cápsulas y solución oral) por cromatografía de gases.

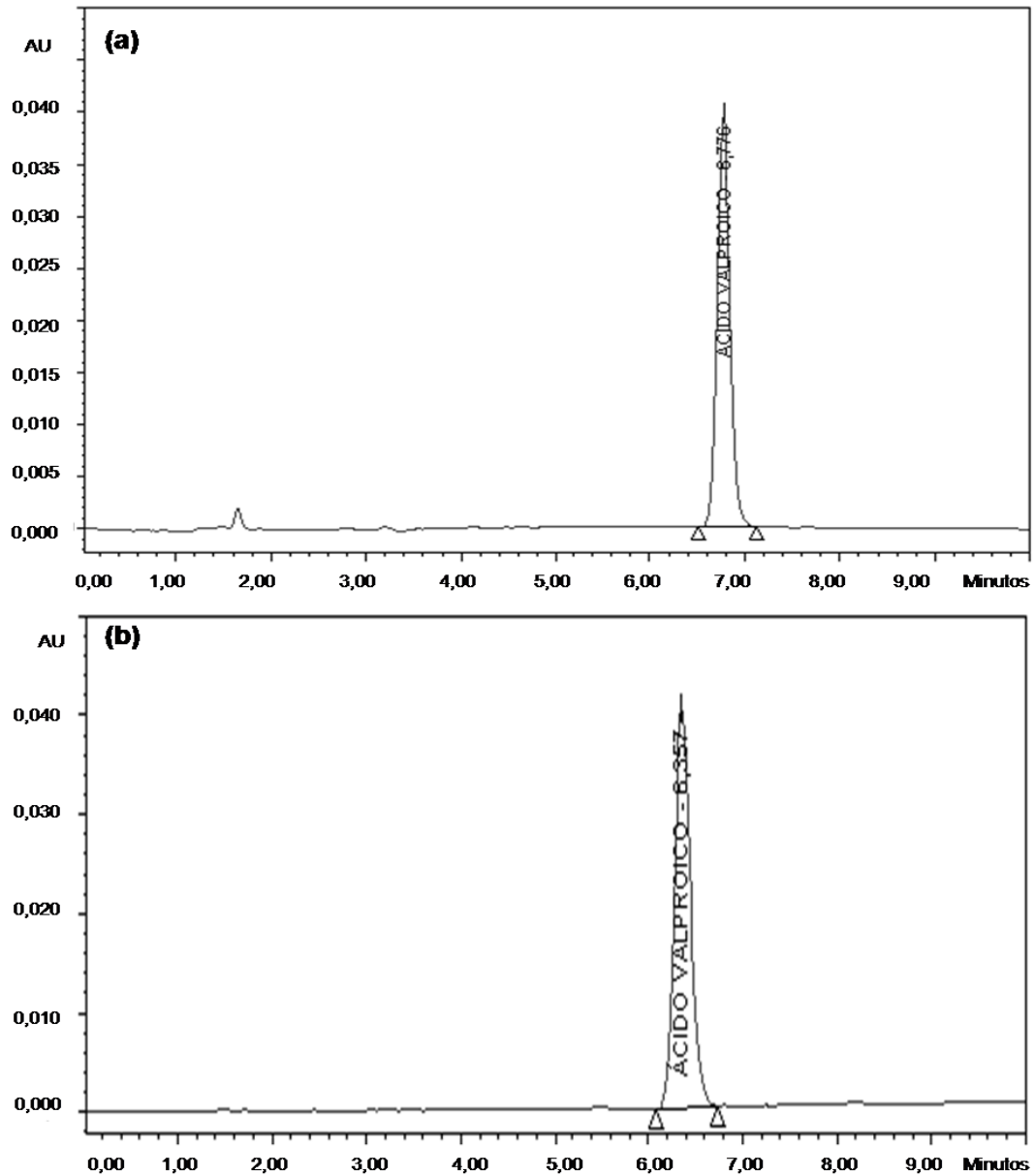
Después de haber iniciado el desarrollo del método cromatográfico para la determinación del ácido valproico en tabletas, se pudo tener acceso a una edición más

actualizada de la monografía oficial USP 37-NF 32 de 2014 descrita en los antecedentes, en la que actualmente se orienta la cuantificación de este analito por HPLC.

No obstante, las condiciones cromatográficas recomendadas por la USP 37-NF 32 de 2014, no se encuentran establecidas para la formulación farmacéutica de ácido valproico en tabletas.

Por esta razón, se procedió a tratar de replicar a modo comparativo las condiciones cromatográficas dadas por esta monografía oficial, empleando la columna SunFire C<sub>18</sub> (5 µm, 150 x 4,6 mm) en lugar de una columna C<sub>8</sub> de iguales dimensiones; en vez de una concentración de 0,5 mg/mL de ácido valproico y un volumen de inyección 20 µL, se inyectaron 5 µL de una disolución de 2,5 mg/mL de ácido valproico disuelto en una fase móvil compuesta por una disolución acuosa de 3,5 g/L de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ajustada a pH 3,5 con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 85,7 %m/m y acetonitrilo en proporciones 50:50 %v/v. Con ello se obtuvo una presión de 730 psi, un  $t_R$  de 6,799 minutos, con una área 362007 y una intensidad de pico de 0,038 (figura 17).

Mediante una inspección visual de los cromatogramas obtenidos, se encontró similares resultados entre el método desarrollado y el método reportado por la Farmacopea de los Estados Unidos (USP 37) para materia prima, cápsulas y solución oral. Sin embargo, el método desarrollado ofrece un disolvente orgánico menos tóxico para el ambiente y el operador; además, que el etanol es más económico que el acetonitrilo; sin despreciar que el uso de disoluciones amortiguadoras disminuye la vida útil de la columna y se corre el riesgo de precipitaciones dentro del sistema.



**Figura 17.** Cromatograma del patrón puro de ácido valproico disuelto en la fase móvil; (a) disolución acuosa de 3,5 g/L de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ajustada a pH 3,5 con  $\text{H}_3\text{PO}_4$  - acetonitrilo en proporciones 50:50 %v/v (método USP). (b) Etanol-agua (60:40 %v/v) ajustada a pH=3,5

## 7. CONCLUSIONES

- Se desarrolló un método analítico para la determinación cuantitativa de ácido valproico en tabletas por cromatografía líquida de alta eficiencia en fase inversa (RP-HPLC). Las condiciones cromatográficas de trabajo fueron las siguientes: una columna SunFire C<sub>18</sub> (5 µm, 150 x 4,6 mm), bajo una elución isocrática a temperatura ambiente con una fase móvil compuesta por etanol-agua (60:40 %v/v) ajustada a pH 3,5 con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; un volumen de inyección de 5 µL; un flujo de 0,8 mL/min y una detección UV-visible con arreglo de diodos a 212 nm.
- Se validó el método desarrollado para la determinación cuantitativa de ácido valproico en tabletas por HPLC, resultando ser selectivo al responder única y exclusivamente al principio activo determinado y la respuesta analítica del ácido valproico no se vio afectada por los productos de degradación u otras especies presentes en la matriz de la muestra.
- Se estimó estadísticamente el límite de detección y el límite de cuantificación del ácido valproico, los valores obtenidos fueron: 0,07 mg/mL y 0,2 mg/mL, respectivamente.
- La metodología presentó una linealidad adecuada entre 0,5 mg/mL y 3,2 mg/mL, con un coeficiente de correlación mayor a 0,999.
- En el estudio de la exactitud con las muestras fortificadas y sin fortificar se encontraron porcentajes de recuperación dentro de los criterios de aceptación de 98 - 102 %, para los niveles de concentración de 80,1 %; 99,7 % y 129,4% de ácido valproico.

- El método desarrollado resultó preciso, ya que al evaluar la repetibilidad y la precisión intermedia se obtuvieron coeficientes de variación menores al 2 %.
- El efecto producido por las interacciones de los factores AB (pH - %etanol) resultó significativo. Por lo tanto, el método analítico no es robusto ante las condiciones analizadas de pH, %etanol y flujo.
- Finalmente, el método propuesto ofrece un tiempo de retención aceptable con una simetría adecuada para realizar análisis de rutina de ácido valproico en tabletas, siendo capaz de proporcionar resultados confiables. Además, resulta sencillo de aplicar, rápido, menos tóxico y más económico.



## 8. RECOMENDACIONES

- Repetir la evaluación de la precisión intermedia en diferentes días y determinar la concentración de ácido valproico por tableta con la curva de calibración preparada para cada día de análisis.
- Repetir la evaluación de la robustez ajustando los niveles de los factores A y B, de manera que la interacción entre ambos resulte insignificante.
- Revalidar el método propuesto por la USP con la formulación farmacéutica de ácido valproico en tabletas.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] The University of Chicago Medicine. Visión General de los Trastornos del Sistema Nervioso. [Base de datos en Internet]. Chicago: Online Library. [Consultado el 23 de Diciembre de 2013]. Disponible en: <http://www.uchospitals.edu/online-library/content=S03892>
- [2] Organización Mundial de la Salud, OMS. Epilepsia. [Monografía en Internet]. Centro de Prensa, Nota descriptiva N° 999, OMS; Octubre de 2012. [Consultado el 4 de Enero de 2014]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/es/>
- [3] Armijo J. Fármacos antiepilépticos y anticonvulsivos, 1998. [Consultado el 18 de Febrero de 2014]. Disponible en: <http://www.sisman.utm.edu.ec/libros/FACULTAD%20DE%20CIENCIAS%20DE%20LA%20SALUD/CARRERA%20D%20ENFERMER%20C3%8DA/03/Farmacologia/MASSON/04890512.pdf>
- [4] Vademécum. P.R. Vademécum Medicamentos de uso en Venezuela. 5ª Ed. Bogotá: Licitelco; 2007.
- [5] Valsecia M., Malgor L. Drogas anticonvulsivantes o antiepilépticas. [Monografía en internet]. Corrientes - Argentina: UNNE; 2000. [Consultado el 3 de Enero de 2014]. Disponible en: [http://med.unne.edu.ar/catedras/farmacologia/temas\\_farma/volumen5/4\\_convulsiv.pdf](http://med.unne.edu.ar/catedras/farmacologia/temas_farma/volumen5/4_convulsiv.pdf)
- [6] Marín A., Jaramillo J., Gómez J., Gómez U. Manual de pediatría ambulatoria/ Manual of Ambulatory Pediatrics. Bogotá: Médica Internacional; 2008.
- [7] Yusta A. Crisis convulsivas. Concepto, clasificación y etiología. Emergencias. 2005; 17: S68-S73.
- [8] Alsarra I., Al-Omar M., Belal F. Valproic Acid and Sodium Valproate: Comprehensive Profile. Elsevier. 2005; (32): 209-240.
- [9] Löscher W. The discovery of valproate. Milestones in Drug Therapy. 1999; 1-3.
- [10] The Index Merck. An Encyclopedia of Chemical, Drugs and Biologicals. 14ª Ed. New York: Merck Research Laboratories; 2006.

- [11] Lide D. CRC Handbook of Chemistry and Physics. 87<sup>a</sup> Ed. Florida: Advisory Board; 2006.
- [12] Moffat A., Osselton M., Widdop B. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. [CD-ROM]. 3<sup>a</sup> Ed. Londres: Pharmaceutical Press; 2005.
- [13] Cámara de Industriales del Estado Aragua – CIEA. Lista de Equivalentes Genéricos de los Medicamentos de Marca; 2013. [Documento en línea]. [Consultado el 4 de Enero de 2014]. Disponible en: <http://www.ciea.org.ve/fotos/documentos/lista%20equivalentes56173.pdf>
- [14] Medizzine. Ácido valproico, información para pacientes. [Base de datos en Línea] Portal hispano de medicina, medicamentos y plantas medicinales; 2009. [Consultado el 4 de Enero de 2014]. Disponible en: <http://www.medizzine.com/pacientes/medicamentos/V/valproico.php>
- [15] British Pharmacopoeia BP. [CD-ROM]. 6<sup>a</sup> Ed. Londres: Advisory Bodies; 2009.
- [16] Farmacopea de los Estados Unidos (United States Pharmacopeia, USP). United States Pharmacopeia. The United States Pharmacopeia - National Formulary USP 30 - NF 25 The official Compendia of Standards. [CD-ROM]. Rockville: The Board of Trustees; 2007.
- [17] International Conference on Harmonisation. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). [Monografía en Internet]. 4<sup>a</sup> Ed. Ginebra: ICH; 2005. [Consultado el 4 de Enero de 2014]. Disponible en: [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf)
- [18] Quattrocchi O., Abelaira S., Laba, R. Introducción a la HPLC aplicación y práctica. Buenos Aires: Artes Gráficas Farro S.A.; 1992.
- [19] Ahuja S., Dong M. Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC. Volumen 6. San Diego Estados Unidos: Elsevier; 2005.
- [20] Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria-AEFI Validación Métodos Analíticos; 2001. [Documento en línea] Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/47159911/Validacion-Metodos-Analiticos-AEFI> (Consultado el 18/07/14).

- [21] Miller J.N., Miller J.C. Estadística y Quimiometría para química analítica. 4<sup>a</sup> Ed. Madrid: Prentice Hall; 2002.
- [22] Center for Drug Evaluation and Research, CDER-FDA. Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods [Monografía en Internet]. Rockville: FDA; 1994. [Consultado el 4 de Enero de 2014]. Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM134409.pdf>
- [23] Dejaegher B., Vander Heyden Y. Ruggedness and robustness testing. Journal of Chromatography A, Volumen 1158, Edición 1-2, (2007) 138–157.
- [24] Breyfogle F. Statistical Methods for Testing, Development, and Manufacturing. Canada: John Wiley & Sons, Inc.; 1992.
- [25] Ahuja S., Jimidar M. Capillary Electrophoresis Methods for Pharmaceutical Analysis. Volumen 9. San Diego Estados Unidos; Elsevier; 2009.
- [26] Farmacopea de los Estados Unidos (United States Pharmacopeia, USP). The United States Pharmacopeia - National Formulary USP 37 - NF 32 The official Compendia of Standards. [Online]. Rockville: The United State Pharmacopeial Convention USP; 2014.
- [27] Antunes V., Nagel V., Linden R., Orosco H., Hermes D. Determinação de ácido valpróico em soro por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), após derivatização com brometo de fenacila. Quim. Nova. 2009. 32(5): 1227-1230.
- [28] Gupta R., Singh U., Kumar S., Moothan B. Estimation of Sodium Valproate in Tablet Dosage Form by RP-HPLC without Prior Derivatization: Application to Dissolution Studies. IJPSSDR. 2009; 1(2): 103-106.
- [29] Gupta R., Singh U., Kumar S., Iqbal K., Sethia S. Reverse Phase High Performance Liquid Chromatographic method for the estimation of Valproic acid in bulk drug and soft gelatin capsules. Der Pharma Chemica. 2010; 2(1): 22-27.
- [30] De Souza P., Machado J., Mazzei A., Costa J., Leandro K. Development and validation of a method for the determination of valproic acid in pharmaceutical

- formulations by high performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD). *Vigilância Sanitária em Debate*. 2013; 1(1): 52-58.
- [31] Olsen E. *Métodos ópticos de análisis*. Barcelona España: Editorial Reverté, S.A.; 1990.
- [32] Skoog D., Holler F., Nieman T. *Principio de Análisis Instrumental*. 5ª Ed. Madrid: McGraw-Hill; 2001.
- [33] Regnault M. *Análisis de medicamentos*. Caracas: Universidad Central de Venezuela; 2004.
- [34] Stamatis D. (2002): *Six Sigma and Beyond: Design of Experiments*, Volumen 5. Boca Ratón, Florida: CRC Press LLC.
- [35] Vander Heyden Y., Nijhuis A., Smeyers-Verbeke J., Vandeginste B. Massart D. *Guidance for Robustness/Ruggedness Tests in Method Validation* J Pharm Biomed Anal. Volumen 24, Edición 5-6; (2001): 723-53.

## 10. APÉNDICE

### Apéndice A: Cromatografía

La cromatografía es una técnica de separación ampliamente usada en el estudio cualitativo y cuantitativo de mezclas de sustancias que son distribuidas de manera dinámica y diferencial entre dos fases. Consta de una fase móvil que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico en constante movimiento y es inmisible con la fase estacionaria que permanece fija dentro de un sistema (columna). La separación cromatográfica de una mezcla de sustancias puede darse en una determinada dirección bajo diferentes mecanismos basados en la capacidad de adsorción, partición, solubilidad, presión de vapor, tamaño molecular o carga iónica. <sup>[16,32]</sup>

Debido a esta versatilidad la cromatografía es empleada por la industria farmacéutica y demás entes gubernamentales asociados al sector salud, para el control de materias primas, productos intermedios, medicamentos y demás análisis de rutina que garanticen la calidad de los medicamentos. Estos procedimientos analíticos se orientan por las monografías oficiales USP, BP, entre otras que son normas de calidad para diversas formulaciones medicamentosas. <sup>[16,32]</sup>

### Clasificación de los métodos cromatográficos

La clasificación de los métodos cromatográficos puede darse de acuerdo al tipo de fase móvil, fase estacionaria y los equilibrios dados al momento de separarse los componentes de la mezcla entre estas fases (figura 18). Entre ellas se tienen:

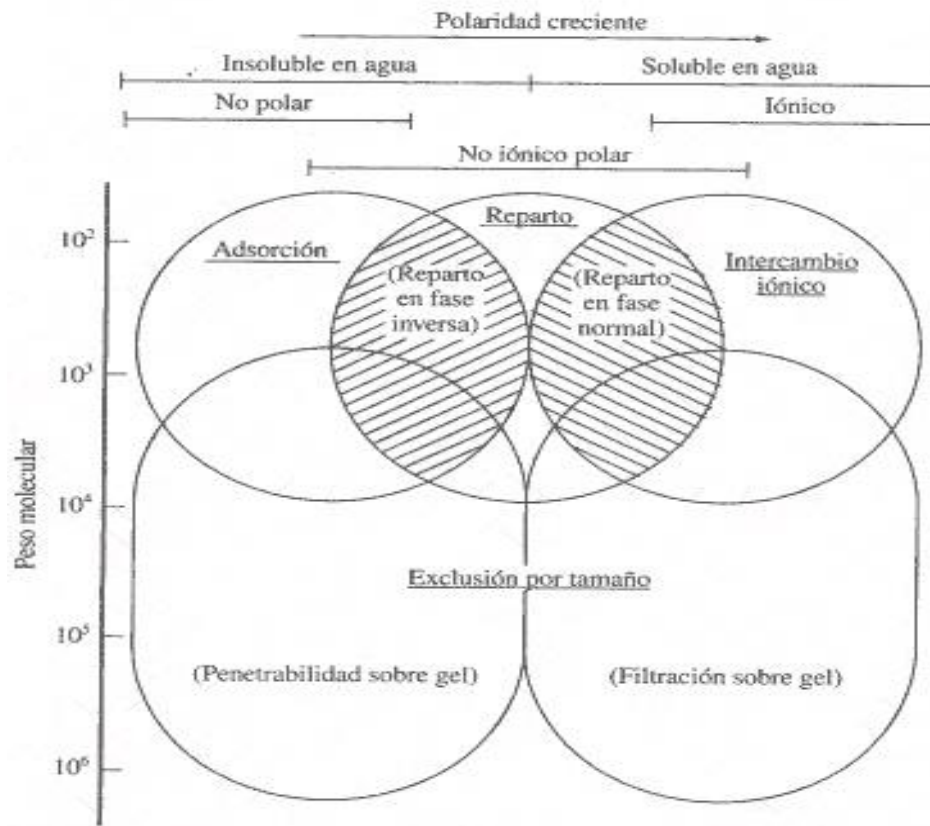


Figura 18. Aplicaciones de la cromatografía de líquidos <sup>[31]</sup>

### Cromatografía de adsorción

Se basa en la separación de una sustancia mediante una fase estacionaria sólida compuesta por un adsorbente como: sílica gel, alúmina o tierras de diatomeas y una fase móvil gaseosa o líquida, cuya adsorción se relaciona bajo las diferentes interacciones entre las fuerzas intermoleculares establecidas por los componentes de una mezcla con la fase estacionaria. Las isothermas de distribución suelen ser con la forma de Langmuir o anti-Langmuir (tipo exponencial). <sup>[16,32]</sup>

### **Cromatografía de exclusión**

También llamada cromatografía de penetración por geles o filtración sobre geles, está basada en las separaciones de compuestos de acuerdo a su tamaño molecular. Las sustancias de menor peso molecular son retenidas por más tiempo; mientras que, las de mayor tamaño son excluidas de la fase estacionaria que es un material poroso o inerte compuesto por partículas poliméricas o de sílice con un tamaño de intersticios característicos que permite o excluyen la entrada en él de las moléculas de la sustancia según su tamaño con ayuda de una fase móvil líquida. <sup>[16,32]</sup>

### **Cromatografía de intercambio iónico**

Es un proceso de separación para especies ionizables y solubles en agua (componente de la fase móvil), mientras que, la fase estacionaria es un sólido reticulado que posee iones en sus nodos donde se intercambian los componentes de la mezcla con más o menos facilidad. La fase estacionaria es una resina orgánica sintéticas de tipo iónica: catiónica (separa compuestos básicos), aniónico (separa compuestos ácidos). <sup>[16,32]</sup>

### **Cromatografía de reparto**

Implica la distribución selectiva de una sustancia a través de su solubilidad entre dos fases inmiscibles, donde la fase estacionaria es un líquido o una fase unida químicamente sobre una superficie sólida y la fase móvil puede ser un gas o un líquido, donde el tiempo de retención del soluto en la fase estacionaria depende de la constante de distribución, la isoterma de reparto de este tipo de cromatografía es lineal. <sup>[16,32]</sup>

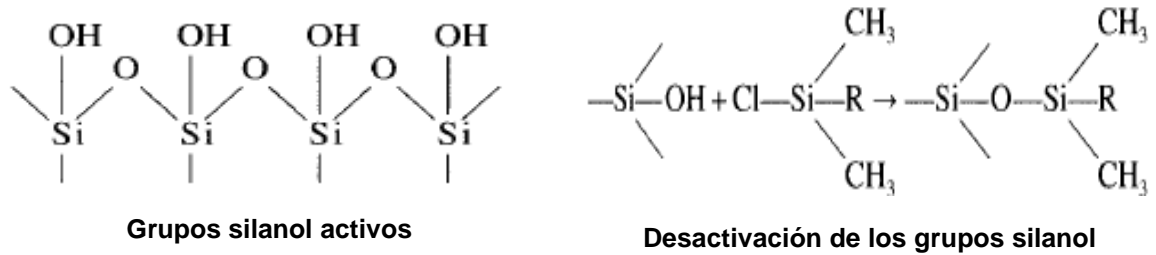


## Fundamentos de la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

En este trabajo se propone el desarrollo de un método analítico para la determinación de ácido valproico en tabletas por RP-HPLC, esta técnica pertenece al tipo de cromatografía de reparto en fase inversa cuya fase móvil es líquida y la fase estacionaria unida químicamente es de tipo fase reversa, a continuación se describen detalladamente cada una de esta modalidades cromatográficas.

La cromatografía de reparto puede subdividirse en función a la forma como se retiene la fase estacionaria sobre un soporte sólido y en función a esto se tienen: la cromatografía líquido-líquido donde la retención de la fase estacionaria se realiza por adsorción física, pero implica pérdidas de esta fase por disolución en la fase móvil. Por ello, actualmente se encuentra sustituida por la cromatografía de fase unida químicamente, como su nombre lo indica la fase estacionaria se une al soporte mediante una reacción química. [32]

La mayoría de los empaques de las columnas en cromatografía de fase unida químicamente se preparan con partículas de sílice porosa de diámetros de 3, 5 o 10  $\mu\text{m}$ , que se hidroliza por calentamiento con HCl 0,1 M formándose los grupos silanoles  $8 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ , El 4  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$  de los grupos OH de los silanoles son recubiertos por un proceso de silanización con un organoclorosilano, esto le confiere a la columna cierta polaridad haciendo que las sustancias básicas se retengan y sus picos tengan cola, esto se reduce bloqueado los grupos silanoles no recubierto con clorotrimetilsilano (Ver figura 19). [32]



**Figura 19.** Relleno de la fase químicamente enlazada <sup>[32]</sup>

### **Cromatografía en fase normal**

La fase estacionaria es un líquido de elevada polaridad (agua, glicol o  $\beta$ ,  $\beta$ 'oxidipropionitrilo) soportados en una superficie de sílice o alúmina, mientras que, en la fase móvil se utilizan disolventes relativamente no polares (n-hexano, éter dietílico o cloroformo). En consecuencia, el componente menos polar de la muestra eluirá más rápidamente que los más polares. Los rellenos de este tipo de fase estacionaria están químicamente enlazados a un grupo R, cuyo orden creciente de polaridad es el siguiente: ciano ( $-\text{C}_2\text{H}_4\text{CN}$ ) < diol ( $-\text{C}_3\text{H}_6\text{OCH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OH}$ ) < amino ( $-\text{C}_3\text{H}_6\text{NH}_2$ ) < los dimetilaminopropil ( $-\text{C}_3\text{H}_6\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ). <sup>[32]</sup>

### **Cromatografía en fase inversa**

Se emplea una fase estacionaria cuyo recubrimiento esta enlazado a grupos funcionales apolares (hidrocarburos) y la fase móvil polar puede estar compuesta por disolventes tales como: agua, metanol, acetonitrilo. Generalmente, los grupos R del siloxano en estos recubrimientos son cadenas  $\text{C}_8$  (n-octilo) o  $\text{C}_{18}$  (octadecilsilano): Por ende, conforme aumenta la longitud de la cadena aumenta el tiempo de retención de los componentes de la muestra, además debido a la estructura físico-química de este tipo

de relleno se debe trabajar con intervalos de pH entre 2 y 8 ya que de lo contrario puede producirse la hidrólisis o destrucción de los grupos siloxanos. [32]

En el análisis cromatográfico suele aplicarse una prueba de rutina denominada adecuación o aptitud del sistema en la que se determina la repetibilidad de la inyección mediante la verificación de los valores aceptados para cada parámetro cromatográfico (factor de retención, factor de selectividad, resolución, factor de cola y número de platos teóricos) que indican la adecuada operación del sistema cromatográfico. A continuación se describen estos parámetros cromatográficos: [16]

**Factor de retención ( $k$ ):** es una medida del grado de retención o velocidad de residencia de los analitos dentro de la columna. Generalmente, el valor aceptado es de  $2 < k < 10$ . [22, 32, 33]

$$k = \frac{((t_R)_A - t_M)}{t_M} = \frac{KV_S}{V_M} \quad \text{Ecuación 10.}^{[31]}$$

**Factor de selectividad ( $\alpha$ ):** Indica la posición relativa entre una especie más retenida (B) y la especie menos retenida (A) en una columna a través de sus factores de retención. [32]

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} \quad \text{Ecuación 11.}^{[31]}$$

**Resolución ( $R_s$ ):** Constituye la capacidad de separación de dos analitos dentro de una columna. Generalmente, el valor aceptado de  $R_s > 2$ . [22]

$$R_s = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B} \quad \text{Ecuación 12. [18]}$$

**Factor de cola o factor de asimetría ( $T$ ):** Representa el límite máximo de asimetría que puede presentar un pico cromatográfico. Varía en la medida que el frente (sobrecarga de la columna) o la cola (retención del analito en la fase estacionaria) del pico sea más pronunciada. La asimetría del pico es responsable de una disminución en la resolución, límites de detección y precisión. Cuyo criterio de aceptación es  $T \leq 2$ , [16, 22,33]

$$T = \frac{W_{0,05}}{2f} \quad \text{Ecuación 13. [16]}$$

**Número de platos teóricos ( $N$ ):** Representa el número de equilibrios que el analito establece con la fase móvil y la fase estacionaria durante su recorrido por la columna. Por tanto, es considerado una medida de la eficiencia de la columna. Generalmente, se halla entre  $2000 < N < 20000$ . [22,33]

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{W} \right)^2 = \frac{L}{H} \quad \text{Ecuación 14. [31]}$$

$(t_R)_A, (t_R)_B$ : Tiempo de retención, especies A y B.

$t_M$ : Tiempo de migración, especies no retenidas.

$K$ : Coeficiente de distribución

$V_S$ : Volumen de la fase estacionaria

$V_M$ : Volumen de la fase móvil

$W_A, W_B$ : Anchuras de picos, especies A y B

$W_{0,05}$ : Anchura del pico al 5 % de la altura

$f$ : es la distancia entre el borde simétrico del pico y el centro del mismo medida al 5 % de la altura del pico de la línea base

$L$ : Longitud del relleno de la columna

$H$ : Altura de plato

## Instrumentación para cromatografía de líquidos

Los instrumentos para el análisis por HPLC presentan el siguiente esquema, el cual se presenta en la figura 20:

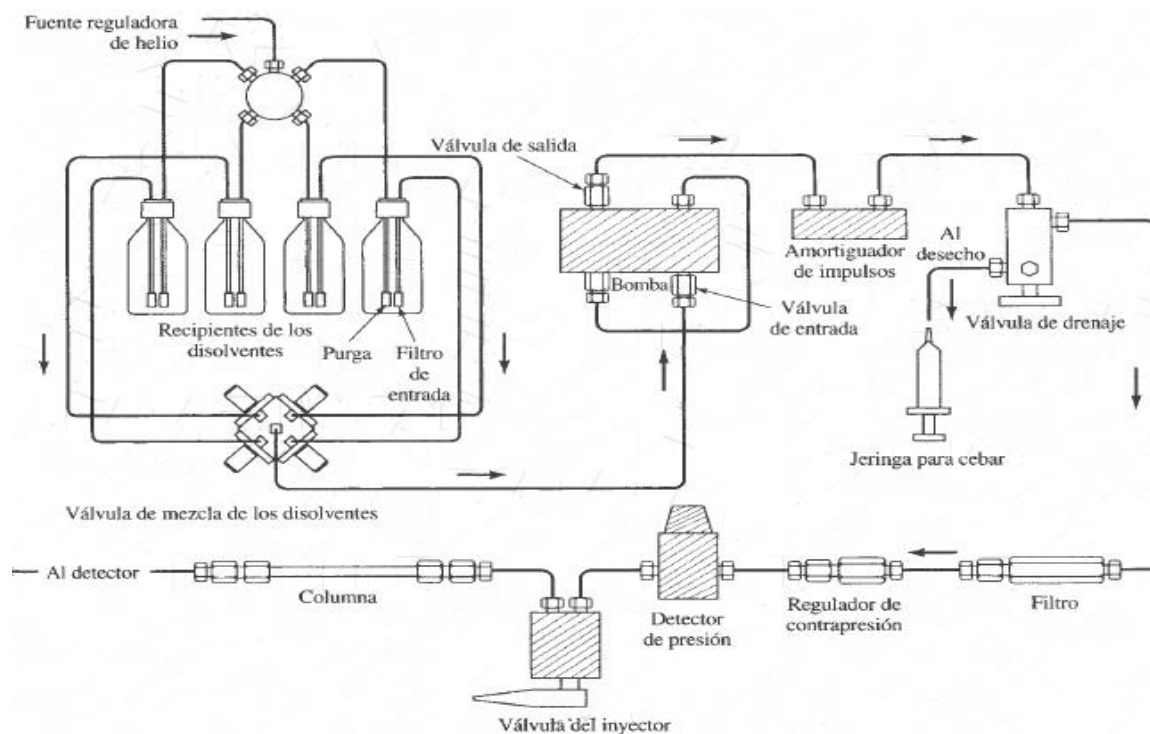


Figura 20. Esquema de un aparato de HPLC <sup>[32]</sup>

A continuación se describirá cada uno de los componentes de un HPLC:

### **Recipientes para la fase móvil**

Son los reservorios donde se almacena la fase móvil a emplear en el análisis cromatográfico. Es necesario garantizar que la fase móvil está libre de partículas en suspensión y gases disueltos, ya que su presencia puede causar obstrucción del sistema cromatográfico, además de generar el ensanchamiento de las bandas. Por esta razón, los solventes utilizados en la preparación de la fase móvil deben ser reactivos líquidos grado HPLC, filtrados por membrana 0,45  $\mu\text{m}$ . Los gases disueltos pueden ser eliminados mediante filtración al vacío, ultrasonido, calentamiento o desgasificación con un gas inerte de baja solubilidad como el helio.

También existen sistemas de desgasificación en línea, los cuales cuentan con unas membranas permeables que permiten la eliminación de gases disueltos. Si se cuenta con un solo reservorio, es necesario preparar la fase móvil previamente, lo cual obliga a realizar una elución isocrática, mientras que, en una elución con gradiente se utilizan dos o más recipientes, el uso de este tipo de sistemas permiten la preparación de la fase móvil *in situ*, lo cual permite variar la composición de la fase móvil en forma lineal o exponencial en el tiempo. <sup>[32,33]</sup>

### **Sistema de bombeo**

Se encarga de promover el desplazamiento de la fase móvil por el sistema cromatográfico, mediante un flujo libre de pulsaciones a intervalos de flujo entre 0,1 y 10 mL/min, siendo capaz de generar presiones por encima de 6000 psi. Las bombas deben

estar construidas con materiales inertes, resistentes a la corrosión tales como: acero inoxidable o teflón. A continuación, se describen algunos tipos de bombas: <sup>[32,33]</sup>

### **Bombas recíprocas**

Las bombas recíprocas consisten en una cámara de volumen interno entre 35 y 400  $\mu\text{L}$ . Poseen pistones que trabajan alternadamente con movimientos sincronizados, los cuales permiten el llenado y el vaciado de la cámara. La desventaja que presenta este tipo de bombas está relacionada con las pulsaciones del flujo, este problema se refleja en una línea base inestable y eventualmente puede contribuir con la formación de burbujas de aire en algunos disolventes. <sup>[32,33]</sup>

### **Bombas de desplazamiento**

Las bombas de desplazamiento son cámaras en forma de jeringa cuyo embolo realiza movimientos a una velocidad constante, generando un flujo libre de pulsaciones. <sup>[32]</sup>

### **Bombas neumáticas**

Las bombas neumáticas presentan una cabina que contiene un gas comprimido capaz de proporcionar altas velocidades de flujo libre de pulsaciones; sin embargo, es dependiente de la viscosidad del disolvente y de la contrapresión de la columna. Debido a esto su utilidad es limitada ya que no es recomendable su uso en la elución con gradiente. <sup>[32,33]</sup>

## Sistema de inyección de muestra

Debe proporcionar reproducibilidad en la introducción de la muestra en la columna, para evitar el ensanchamiento de las bandas. Antiguamente, se empleaba un sistema de inyección manual con jeringas con bucles intercambiables de volumen entre 5 a 500  $\mu\text{L}$ , pero actualmente son poco usados ya que proporcionan una reproducibilidad de la inyección mayor al 2 % por ello han sido reemplazados por sistema de inyección automáticos. <sup>[32,33]</sup>

## Columnas cromatográficas

Las columnas cromatográficas representan el corazón de la cromatografía, ya que portan a la fase estacionaria, en la cual se dará el proceso de separación de los componentes de una muestra.

Las columnas en HPLC se caracterizan por presentar longitudes de 10 a 30 cm con un diámetro interno entre 4 y 10 mm; mientras que, el relleno o empaque puede ser pelicular o de partículas porosas. El relleno pelicular está compuesto por bolas de vidrio o de polímero no poroso  $\text{Ø} = 30$  a  $40 \mu\text{m}$  constituidas por una capa delgada y porosa de sílice, alúmina o una resina de poliestireno - divinilbenceno) este relleno generalmente se utiliza en precolumnas. El relleno con partículas porosas se compone de micropartículas de sílice o alúmina, de una resina de poliestireno - divinilbenceno  $\text{Ø} = 3$  a  $10 \mu\text{m}$ . <sup>[32]</sup>

En ocasiones la vida de las columnas cromatográficas puede alargarse o protegerse empleando una precolumna, como su nombre lo indica se coloca delante de la columna con el propósito de eliminar las partículas en suspensión, contaminantes de los disolventes o de la muestra. <sup>[32, 33]</sup>



## Detectores

Son dispositivos que identifican, registran e indican los cambios de una variable. Las características más resaltantes que un detector debe poseer son:<sup>[32]</sup>

- Adecuada sensibilidad, reproducibilidad y estabilidad
- Respuesta lineal
- Tiempo de respuesta corto
- Manejo sencillo
- Respuesta selectiva y altamente predecible
- Volumen interno mínimo para reducir el ensanchamiento de la banda

## Tipos de detectores en cromatografía de líquidos

La clasificación de los detectores en cromatografía de líquidos está basada según la propiedad medida en: la disolución o en el soluto.

Detectores basados en la medida de una propiedad ( $\eta_D$ ,  $\epsilon$ ,  $\rho$ ) de la disolución, es decir, que responde a una propiedad de la fase móvil se tiene:

### Detectores de índice de refracción

Son detectores universales que responden a casi todos los solutos, pero poseen baja sensibilidad y requieren mantenerlo bajo temperatura constante debido a que son sensibles a los cambios de temperatura.

Detectores basados en la medida de una propiedad (UV, fluorescencia) del soluto o de la intensidad de la dispersión que no son propias de la fase móvil.

### **Detector de fluorescencia**

Consta de un haz de excitación que puede ser una fuente de mercurio o xenón acompañado de algunos elementos dispersantes de la radiación (filtros o monocromador) que permiten seleccionar la longitud de onda. Con ello se obtiene la separación y determinación de los componentes fluorescentes de las muestras y aquellas especies que tienen baja absorbancia pueden detectarse mediante derivados fluorescentes con la finalidad que absorban la radiación electromagnética a una determinada longitud de onda y emitan radiación fluorescente a longitud de onda más larga. <sup>[32]</sup>

### **Detectores electroquímicos**

Aquellas especies que contienen grupos funcionales que pueden oxidarse o reducirse son detectarse por amperimetría, voltimetría y/o conductimetría. <sup>[32]</sup>

### **Detector de luz dispersada tras evaporación (ELSD)**

La respuesta es prácticamente la misma para todos los solutos no volátiles, es más sensible que el de índice de refracción. El eluyente de la columna se nebuliza y después se evapora para obtener partículas finas del analito que pasan a través de un haz láser. <sup>[32]</sup>

### **Detector por espectrometría de masa**

La muestra al salir de la columna es ionizada, luego estos iones son separados de acuerdo a su relación masa/carga. <sup>[32]</sup>

## **Detectores de absorbancia**

Miden la diferencia de la cantidad de luz radiante absorbida entre la muestra y la fase móvil dispuestas en una celda de flujo. Un detector de absorbancia UV con filtros cuenta con una longitud de onda de trabajo entre 195 a 370 nm, comúnmente la más utilizada es 254 nm. Otro detector de absorbancia UV con monocromadores abarcan la radiación ultravioleta y la visible de UV y VIS (195 - 700 nm) lo que permite realizar el barrido de longitudes de onda de la radiación de interés, en este tipo de detector UV/Vis se encuentra el detector de arreglo de diodos. <sup>[32]</sup>

## **Apéndice B:** Detector arreglo de diodos

Consta de una lámpara de deuterio que sirve tanto para la región ultravioleta como para la visible, esta luz atraviesa la muestra y luego incide sobre la red de difracción holográfica que dispersa la luz y la dirige hacia el fotodiodo en serie, cada diodo reciben una longitud de onda en particular; lo que permite realizar determinaciones simultáneas de múltiples componentes de una muestra; además ofrece mayor velocidad en la obtención de los espectros lo que se minimiza la posibilidad de fotodescomposición de la muestra. <sup>[32,33]</sup>

Debido a sus pocos componentes ópticos, hay menor pérdida de la radiación. El sistema no contiene partes en movimiento por ello no requiere calibración constante. Los equipos de HPLC dotados con este tipo de detectores se hallan conectados a una computadora para almacenar rápidamente la información correspondiente al rango de longitudes de onda. <sup>[32,33]</sup>

El detector de arreglo de diodos proporciona información sobre la homogeneidad espectral del pico y un espectro único para cada compuesto, siendo ampliamente utilizado para el análisis farmacéutico al momento de determinar contaminantes a bajas concentraciones. Además que consta de un comando de análisis de pureza de pico capaz de detectar cualquier impureza que pudiese estar coeluyendo con el pico del ácido valproico. <sup>[33]</sup>

**Apéndice C:** Factores de respuestas obtenidos con las curvas de calibración preparadas los diferentes días de análisis de la linealidad

**Tabla 19.** Factores de respuestas asociados al cociente del área promedio obtenida y la concentración del patrón de ácido valproico para la curva de calibración del Día I

<b>Cp<sub>AVP</sub> (mg/mL)</b>	<b><math>\overline{\text{Área}}</math></b>	<b>Factores de respuestas</b>
0,502	98076	195441
1,004	199832	199107
1,51	289654	192403
2,01	390721	194652
2,51	484781	193209
3,01	581655	193182
3,21	613385	190988
	$\bar{X}$	194140
	<i>s</i>	2626
	<i>CV<sub>f</sub></i> (%)	1,4

**Tabla 20.** Factores de respuestas asociados al cociente del área promedio obtenida y la concentración del patrón de ácido valproico para la curva de calibración del Día II

<b>Cp<sub>AVP</sub> (mg/mL)</b>	<b><math>\overline{\text{Área}}</math></b>	<b>Factores de respuestas</b>
0,502	87449	174340
1,003	174440	173883
1,50	258664	171893
2,01	352714	175795
2,51	437704	174523
3,01	514578	170979
3,21	557040	173520
	$\bar{X}$	173562
	<i>s</i>	1637
	<i>CV<sub>f</sub></i> (%)	1

**Tabla 21.** Factores de respuestas asociados al cociente del área promedio obtenida y la concentración del patrón de ácido valproico para la curva de calibración del Día III

<b>Cp<sub>AVP</sub> (mg/mL)</b>	<b><math>\overline{\text{Área}}</math></b>	<b>Factores de respuestas</b>
0,501	96606	192810
1,002	187989	187599
1,50	272838	181514
2,00	362316	180782
2,51	454318	181350
3,01	542237	180370
3,21	569723	177669
	$\bar{X}$	183156
	<i>s</i>	5203
	<i>CV<sub>f</sub></i> (%)	2,8

## Apéndice D: Modelo de cálculo para la determinación de la robustez

**Tabla 22.** Áreas obtenidas para el patrón de ácido valproico en la evaluación de la robustez

Experimento	Réplica					$\overline{Area}$	CV (%)
	1	2	3	4	5		
1	720615	716127	729246	713582	707691	717452,2	1,1
2	749430	741212	738724	796766	787460	762718,4	3,6
3	394268	416594	411336	425480	402908	410117,2	2,9
4	726645	731460	731026	734949	735597	731935,4	0,5
5	775402	776856	783372	782583	779787	779600,0	0,4
6	371804	380156	384673	385702	385388	381544,6	1,5
7	400898	396508	396222	399021	400048	398539,4	0,5
8	374808	379895	384252	375947	371766	377333,6	1,3

**Tabla 23.** Áreas obtenidas para la muestra de ácido valproico en la evaluación de la robustez

Muestra	Réplica					$\overline{Area}$	CV (%)	$C_{AVP/tab}$ (mg/tab)
Experimento	1	2	3	4	5			
1	723308	727368	725422	721572	712828	722099,6	0,8	509,9
2	775820	784343	782669	780477	783903	781442,4	0,5	519,0
3	387947	386445	391184	415865	408051	397898,4	3,3	491,5
4	752583	752992	757288	759995	763122	757196,0	0,6	524,1
5	777389	750604	761903	776414	735977	760457,4	2,3	494,2
6	396010	396177	397191	396447	398438	396852,6	0,3	526,9
7	401343	404257	414921	407940	416811	409054,4	1,6	520,0
8	374808	379895	384252	375947	371766	377333,6	1,3	506,6
							$\bar{X}$	511,5
							$s$	13,4
							CV (%)	2,6

**Tabla 24.** Matriz del diseño experimental  $2^3$  con los efectos asociados para cada factor

Experimento	Factores principales			Interacciones entre factores principales				$\frac{C_{AVP/tab}}{500 mg} \times 100$		
	A	B	C	AB	AC	BC	ABC			
1	-	-	-	+	+	+	-	102,0		
2	-	+	-	-	+	-	+	103,8		
3	-	-	+	+	-	-	+	98,3		
4	+	-	-	-	-	+	+	104,8		
5	+	+	-	+	-	-	-	98,8		
6	+	-	+	-	+	-	-	105,4		
7	-	+	+	-	-	+	-	104,0		
8	+	+	+	+	+	+	+	101,3		
$ E_i $	0,57	0,63	0,11	4,39	1,64	1,45	0,49	$\bar{X}$	102,3	
A: pH, B: %Etanol, y C: flujo									<i>s</i>	2,7
									<i>CV (%)</i>	3,8

### Determinación del efecto $E_i$ para cada factor del diseño experimental

$$E_i = \frac{\sum Y(+)}{N/2} - \frac{\sum Y(-)}{N/2}$$

**Ecuación 15.** <sup>[35]</sup>

$\sum Y(+)$  y  $\sum Y(-)$  :Corresponde a la sumatoria de las respuestas del factor  $i$  para los niveles superior (+) e inferior (-)

$N$ : Número de experimentos del diseño.



### Interpretación estadística del efecto ( $E_i$ )

Cuando el valor absoluto del efecto  $|E_i|$  es mayor o igual que el efecto crítico  $E_{crítico}$ , la influencia de este factor se considera significativa. Generalmente, el  $E_{crítico}$  se calcula con un nivel de confianza al 95 % ( $\alpha = 0,05$ ) para un contraste de 2 colas.

### Determinación del efecto crítico $E_{crítico}$

$$E_{crítico} = t_{crítico} \times (SE)_e \quad \text{Ecuación 16.}^{[35]}$$

$t_{crítico}$ : Valor de  $t_{(1-\frac{\alpha}{2}, df)}$  se encuentra tabulado para un determinado un grado de libertad ( $df$ )

$(SE)_e = s_1$ : Error estándar o margen de error de los efectos

### Determinación del error estándar por el algoritmo de Dong

Se halla la mediana de los efectos y con este valor se calcula error inicial estimado ( $s_0$ ) en base a todos los efectos,  $s_0 = 1,5 \times \text{mediana}|E_i|$ . Todo aquel  $|E_i| > 2,5s_0$  no es considerado en la estimación de  $(SE)_e$

$$(SE)_e = \sqrt{\frac{\sum(E_k)^2}{m}} \quad \text{Ecuación 17.}^{[35]}$$

$m = df$ : Número de factores cuyos  $|E_i| < 2,5s_0$

$\sum(E_k)^2$ : Suma de los cuadrados del valor absoluto de todos aquellos efectos  $< 2,5s_0$

## Apéndice E: Modelo de cálculo para la determinación de la exactitud

**Tabla 25.** Áreas de las muestras fortificadas y sin fortificar

	$(C_{MRI} \pm 0,01)$ mg	Áreas	
		fortificadas	sin fortificar
<b>80 %</b>	197,87	389724	244606
	197,82	390591	248685
	197,84	388037	248704
<b>100 %</b>	197,52	483590	248851
	197,53	482657	247319
	197,55	480183	244166
<b>130 %</b>	197,45	619160	238218
	197,54	637938	239475
	197,57	622706	232767

$C_{MRI}$ : Cantidad pesada del material de referencia interno. Esta determinación se realizó empleando la curva de calibración, día I.