



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO
ANALITICO PARA LA CUANTIFICACION DE VALPROATO
DE MAGNESIO EN TRES FORMAS FARMACEUTICAS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
LUIS CASTILLO SANTOS

MEXICO, D. F., 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente Q.F.B. Mauro Arrieta Sánchez.

Vocal Q.F.B. Raúl Cruz González.

Secretario M en C. Ramón Soto Vázquez.

Suplente M en C. Patricia Parra Cervantes.

Suplente Q.F.B. Ma. Del Rosario Benitez Velásquez.

Director de tesis. M en C. Ramón Soto Vázquez

Asesor de tesis. Q.F.B. Raúl Cruz González

Sustentante. Luis Castillo Santos.

DEDICATORIAS

**DEDICO ESTE TRABAJO A MI ESPOSA ELENA Y MI HIJA
MONICA.**

A MI MADRE.

A MIS TUTORES Y SINODALES

ATTE. LUIS.

CONTENIDO

	Página
I CONTENIDO	1
II ÍNDICE DE TABLAS Y GRÁFICAS	2
III ABREVIATURAS	3
IV RESUMEN	4
V INTRODUCCIÓN	6
VI PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
VII OBJETIVO GENERAL	23
VIII HIPÓTESIS	24
IX PARTE EXPERIMENTAL	26
X RESULTADOS	49
XI DISCUSIÓN DE RESULTADOS	65
XII CONCLUSIONES	71
XIII BIBLIOGRAFÍA	73
XIV GRÁFICAS	75

II INDICE DE TABLAS Y GRÁFICAS

Tabla No 1	Linealidad del método VM tabletas nivel de concentración 50 %.
Tabla No 2	Linealidad del método VM tabletas nivel de concentración 100 %.
Tabla No 3	Linealidad del método VM tabletas nivel de concentración de 150 %.
Tabla No 4	Linealidad del método VM suspensión nivel de concentración de 50%.
Tabla No 5	Linealidad del método VM suspensión nivel de concentración de 100%.
Tabla No 6	Linealidad del método VM suspensión nivel de concentración de 150%.
Tabla No 7	Linealidad del método VM solución nivel de concentración de 50 %
Tabla No 8	Linealidad del método VM solución nivel de concentración de 100 %
Tabla No 9	Linealidad del método VM solución nivel de concentración de 150 %
Tabla No 10	Reproducibilidad del método VM tabletas
Tabla No 11	Reproducibilidad del método VM solución
Tabla No 12	Reproducibilidad del método VM suspensión
Gráfica No 1	Linealidad del sistema (primer día) VM validación
Gráfica No 2	Linealidad del sistema (segundo día) VM validación
Gráfica No 3	Linealidad del método VM validación solución
Gráfica No 4	Linealidad del método VM validación tabletas
Gráfica No 5	Linealidad del método VM validación suspensión

III ABREVIATURAS

Ácido γ - aminobutírico	GABA
Ácido valproico	AV
Cromatografía de líquidos de alta resolución	HPLC
Food and Drug Administration.	FDA
Valproato de magnesio	VM
Valproato de sodio	V S
Coefficiente de regresión	R
Coefficiente de determinación	r ²
Desviación estándar	S
Desviación estándar relativa	CV
Límite de cuantificación	LC
Límite de detección	LD
Ley General de Salud	LGS
Modelos experimentales de epilepsia	MEP
Ordenada al origen	b
Pendiente	m
Media aritmética	X
Sistema Nervioso Central	SNC
Ultravioleta	UV

IV RESUMEN

Debido a que en la industria farmacéutica existe necesidad de reducir costos, tiempo de análisis, así como también, obtener mayor exactitud y reproducibilidad, se procedió a desarrollar y validar un método analítico para la determinación de VM por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC).

El método fue desarrollado mediante la técnica de HPLC, la validación del método se realizó siguiendo todos los parámetros incluidos en la Guía Oficial de Validaciones de la Secretaría de Salud y en el Protocolo de Validaciones del Laboratorio que lo produce.

Las variables evaluadas en la validación fueron: especificidad, linealidad y exactitud del sistema; linealidad, precisión y exactitud del método, reproducibilidad, robustez, límites de detección y cuantificación.

Cabe señalar que algunas variables como especificidad, precisión y exactitud se evaluaron en forma independiente para cada una de las presentaciones farmacéuticas.

El perfil cromatográfico de Valproato de Magnesio mediante la técnica de HPLC, mostró una señal única.

En las pruebas de estabilidad del fármaco, con una degradación de 25 %, mostraron que no existe ninguna interferencia para esta señal por la transformación del principio activo ni por presencia de algún excipiente en ninguna de las presentaciones, por lo que el método puede ser utilizado para análisis de control de calidad y estabilidad.

Con este método se logro obtener coeficientes de correlación de 0.999 para tabletas, 0.999 para solución y 0.998 para VM suspensión.

En cuanto a las pruebas de la exactitud obtenidas por la técnica de placebo añadido para las diferentes presentaciones, el análisis estadístico mostró que, la "t" de student experimental fue menor que la "t" de student teórica con un valor de significancia de 0.05%, por lo que el método es considerado exacto dentro de los valores de % de recobro de 98-102 %, para tabletas y soluciones y de 97-103 % para suspensiones.

Con respecto a la reproducibilidad del método, el coeficiente de variación para VM tabletas fue de 1.2224 %, para VM solución 0.8203 % y VM suspensión 1.1118 %. No existiendo una diferencia significativa entre los analistas ni entre los días/analistas. El límite de cuantificación de la técnica es de hasta 0.1 mg/ml (0.1%).

Los resultados obtenidos para las diferentes variables, permiten afirmar que el método es válido, aún fuera del laboratorio para todas las presentaciones comerciales de VM.

V INTRODUCCIÓN

El Valproato de Magnesio es uno de los antiepilépticos de uso primario en la clínica para el control de las crisis epilépticas generalizadas, de ausencias y tónico-clónicas generalizadas.

El Valproato de Magnesio (VM) se absorbe lentamente en el aparato digestivo en un lapso de una a cuatro horas y su biodisponibilidad es prácticamente de 100 % como ácido valpróico.

Por su importancia farmacológica y el hecho de ser uno de los productos líderes de venta para el Laboratorio Armstrong, es necesario contar con un método de cuantificación confiable y seguro para la determinación de la concentración en todas sus formas farmacéuticas.

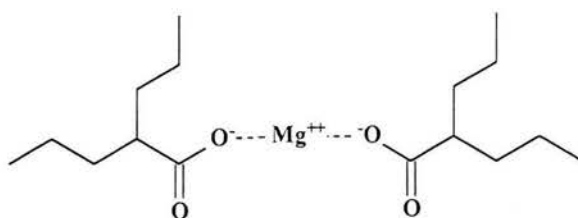


Fig. No. 1 Valproato de Magnesio

CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DEL VALPROATO DE MAGNESIO

Nombre químico: sal magnésica del ácido 2- propilpentanoico, peso molecular 310.72
fórmula condensada $C_{16}H_{30}MgO_4$ descripción: es un polvo blanco amorfo de baja solubilidad en agua (92 mg/ml) y solventes orgánicos, soluble en propilenglicol, con un punto de fusión de 211-222 °C y $pka = 4.56^1$.

El AV es un agente antiepiléptico bien establecido para el tratamiento de diversos tipos de crisis epilépticas, es utilizado en muchos países en forma de sal sódica. La sal magnésica del AV es, desde el punto de vista farmacológico, superponible al Valproato de Sodio (VS) o al propio AV, debido a que se disocia en AV e ion magnesio una vez que ha penetrado en el torrente circulatorio, además presenta las ventajas adicionales respecto a otros compuestos de una absorción más lenta y regular con lo que se evitan las oscilaciones en los niveles plasmáticos de AV observadas habitualmente cuando se administra VS y los beneficios suplementarios aportados por el catión magnesio (que tiene propiedades anticonvulsivas y sedantes en los pacientes tratados).

Los resultados obtenidos en los análisis experimentales y clínicos en VM han demostrado que se trata de un compuesto antiepiléptico de amplio espectro con buenas características farmacocinéticas y farmacodinámicas y con un perfil de seguridad aceptable en comparación con los signos tóxicos provocados por otros agentes utilizados en el tratamiento de la epilepsia. Así, aunque ocasionalmente el VM puede dar lugar a reacciones hepáticas fatales, estas son muy raras y con unas ciertas precauciones ofrecen tratamientos altamente eficaces y cómodos para diversos tipos de convulsiones epilépticas.

Como se sabe la epilepsia no es una enfermedad que responda a una causa sino un síndrome complejo que puede deberse a numerosas etiologías.

Existe una relación entre diversos tipos de convulsiones epilépticas y la actividad cerebral de un aminoácido inhibitor, el ácido γ -amino butírico GABA, a partir de lo cual se determinó en teoría que la administración de GABA tendría un efecto inhibitor de las crisis epilépticas. Sin embargo esto en la práctica es imposible, ya que no es factible mantener indefinidamente niveles elevados de GABA en el Sistema Nervioso Central (SNC) sin tener que administrarlo continuamente, por lo que la investigación se encaminó al descubrimiento de nuevos fármacos capaces de inhibir las enzimas encargadas de la degradación metabólica del GABA y por lo tanto mantener su acumulación en los espacios sinápticos durante mas tiempo.

El primer fármaco que consiguió satisfactoriamente éste efecto inhibitorio fue el ácido dipropilacético, que posteriormente recibió la denominación internacional común de AV.

El AV es uno de los agentes antiepilépticos más utilizados en todo el mundo, principalmente en monoterapia y, a diferencia de otros fármacos, está indicado en todos los tipos de epilepsia como medicamento de primera elección. El AV fue sintetizado por primera vez a finales del siglo XIX, y su actividad antiepiléptica se descubrió hasta 1963 de forma fortuita. Empezó a comercializarse en Francia en 1987 con el nombre de “Depakine” y actualmente se comercializa en todo el mundo en forma de sal sódica, debido a su elevada higroscopicidad, obliga a envasarlo en aluminio y estaño, se promovió la sustitución de sodio por magnesio con lo que se obtiene un compuesto altamente estable que se descompone a un pH menor de 6.0.

La administración de magnesio tiene además otras ventajas antiepilépticas debido a la actividad anticonvulsiva de este ión, sus funciones son similares a las del calcio por la inhibición que produce en la liberación de neurotransmisores sinápticos.

MECANISMO DE ACCIÓN

El AV inhibe las enzimas encargadas de degradar el GABA. La GABA transaminasa (γ -aminobutirato) y la enzima semialdehído succínico deshidrogenasa. También tiene un efecto activador sobre la glutamato descarboxilasa, que es la enzima que se encarga de la síntesis de GABA a partir del ácido glutámico. Con esto, el tratamiento con AV o sus sales sódica y/o magnésica aumenta los niveles cerebrales de este neurotransmisor y potencia sus efectos inhibidores postsinápticos. El GABA es un neurotransmisor cerebral con actividad inhibitoria, con lo que la acción del AV produce una disminución neta del umbral convulsivo.

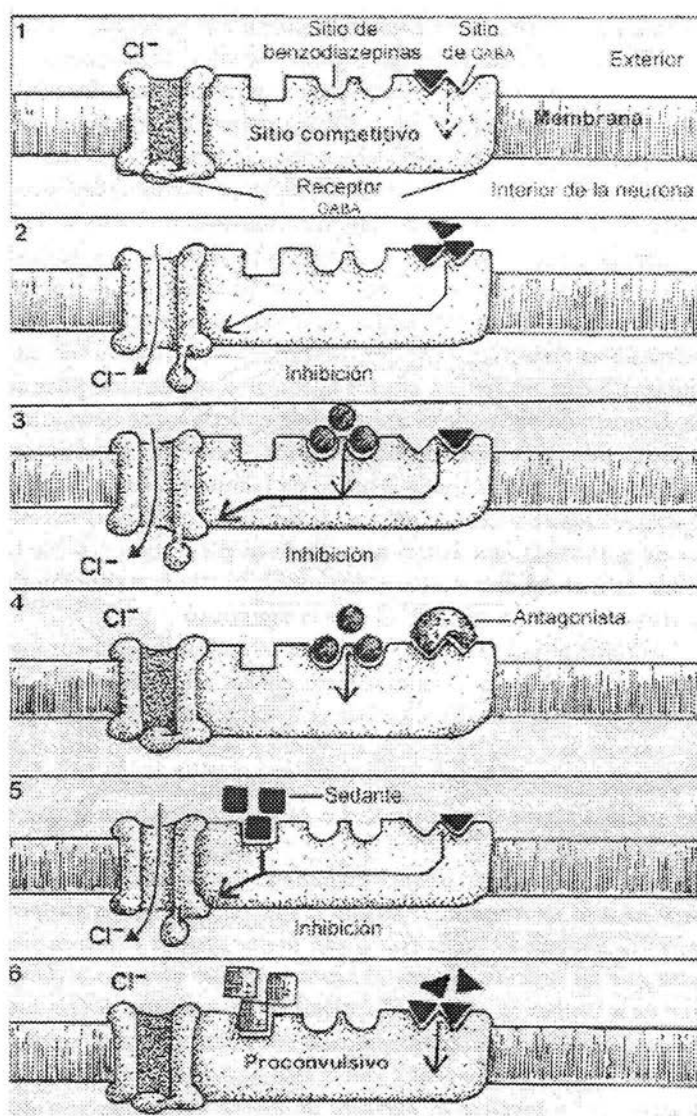
Este efecto del AV es compartido por uno de sus metabolitos principales, el ácido 2-valpróico, que se encuentra en el cerebro en concentraciones muy parecidas a los del AV y es muy estable, con lo que permanece un período de tiempo prolongado. Este hecho explica que el efecto del AV se mantenga durante un cierto lapso de tiempo después de suspender el tratamiento. Sin embargo, se ha calculado que un 90 % del efecto terapéutico total corresponde directamente al AV no metabolizado.

Se ha demostrado un efecto potenciado de la actividad inhibitoria postsináptica del GABA en neuronas de médula espinal cultivadas, con lo que el fármaco actúa directamente sobre la membrana postsináptica, modulando su excitabilidad.

El GABA y la glicina son los aminoácidos inhibidores predominantes en el cerebro; cualquier factor que impida su acción será proconvulsivo. El efecto inverso, si favorecen su acción, tendrán con efectos antiepilépticos, aunque también de sedación y en algunos de

ellos, farmacodependencia. Es el caso de los barbitúricos o derivados (fenobarbital, tiopental, primidona), de las benzodiazepinas (clonazepam, lorazepam, etc.), del valproato de magnesio, del gabapentin y la tiagabina.

Otra posibilidad de que se desarrolle la hiperexcitabilidad neuronal es que predomine la neurotransmisión excitatoria. Los principales aminoácidos excitadores en el cerebro son el glutamato y el aspartato. En oposición concertada con la inhibición, cualquier fármaco que facilite su acción es proconvulsiva.



Mecanismos que favorecen o bloquean la acción inhibitoria del GABA a nivel del receptor

son:

- 1) En sitios específicos para cada neurotransmisor se observa que si en el sitio del GABA existe un nivel bajo de éste, no se alcanza a abrir el canal del cloro (Cl^-).
- 2) El aumento en los niveles de GABA permite que se abra el canal y el cloro penetre, lo cual produce hiperpolarización en el interior de la célula.
- 3) La benzodiazepina aumenta la acción del GABA aun si el nivel de éste es bajo.
- 4) El neurotransmisor antagonista (bicuculina) evita que se abra el canal a pesar de los altos niveles de benzodiazepinas.
- 5) La presencia de valproato provoca la apertura del canal y por lo tanto favorece el efecto inhibitor.
- 6) La picrotoxina, neurotransmisor proconvulsivo, tienen este efecto porque, al ocupar un sitio que podría ocupar un sedante, evita que se abra el canal de cloro, aun si existen niveles altos de GABA en el receptor.

Se ha descrito que el AV interacciona con el paso transmembrana de los iones, con lo que modifica el potencial de reposo de las membranas neuronales y altera sus patrones de excitación/refractoriedad. en lo concerniente a este mecanismo de acción excitante del AV, la sustitución del átomo de sodio por uno de magnesio en la molécula de VM presenta aún otras ventajas, puesto que en teoría éste atraviesa mejor la barrera hematoencefálica y no interfiere con el intercambiador sodio/potasio, como si hace el VS con lo que facilita la modulación de la conductancia potásica por el componente activo del medicamento.

FARMACOCINÉTICA Y METABOLISMO

El AV y sus sales se absorben fácilmente por vía oral, con una biodisponibilidad prácticamente de 100 % y alcanzan concentraciones plasmáticas máximas de ácido libre en un plazo de 1 a 4 h, no experimentan metabolismo de primer paso hepático. La vida media del AV en sangre después de una dosis única es de 8 a 16 h en adultos sanos, con lo que no se consiguen niveles terapéuticos estables durante 24 h a menos que se administren dosis muy elevadas o preparados de absorción retardada, en cambio la vida media de este fármaco en niños menores de 2 meses puede ser de hasta 60 h. La vida media se acorta (6-8 h) en pacientes tratados simultáneamente con otros fármacos antiepilépticos.

La fijación a las proteínas plasmáticas del AV es variable. Aparentemente el 90 % del fármaco se une a las proteínas plasmáticas cuando el compuesto se encuentra a niveles terapéuticos, pero en presencia de niveles séricos elevados la fijación proteica puede ser inferior al 50 %. Como consecuencia de esta elevada fijación de proteínas, el volumen de distribución del AV es reducida, con valores entre 0.1 y 0.41 l/kg. La depuración renal depende de la fracción libre del fármaco y es mayor en los niños que en adultos y ancianos, por lo que las dosis pediátricas deben ser superiores a las de los adultos. Los valores habituales de depuración en adultos sanos son de 5 a 10 ml/min. Una vez en el torrente sanguíneo las sales de AV se hidrolizan rápidamente convirtiéndose en AV, que como ácido graso se fija altamente a las proteínas plasmáticas, especialmente a la albúmina, con fracciones libre a niveles terapéuticos (50 a 100 microgramos/ml) de 5 % a 13 %, y tiene un volumen de distribución aparente (0.13 ± 0.04 l/kg en voluntarios sanos y de 0.198 ± 0.29 l/kg en pacientes epilépticos) relativamente pequeño.

El AV penetra los eritrocitos (relación sangre/plasma = 0.28) y atraviesa la barrera hematoencefálica, quizás a través de un transportador específico, con una relación de concentraciones cerebro/plasma de 1/3. Se encuentra presente en el líquido cefalorraquídeo (5 % a 15 % de la concentración hemática), el semen (8 % de la concentración hemática) y las lágrimas (0.1 % de la concentración hemática). La concentración de AV en el cerebro no guarda una relación lineal con los niveles séricos, debido probablemente a variaciones en la fijación proteica del fármaco en el tejido cerebral. La concentración sérica del fármaco disminuye pocos minutos después de su inyección intraperitoneal o intravenosa en animales experimentales, y la disminución de estos niveles es paralela a la del plasma, lo que indica el equilibrio existente entre el AV cerebral y plasmático.

El AV se metaboliza extensamente en el hígado. Por ello, la inhibición del sistema microsomal hepático con productos experimentales como el proadifeno, potencia la actividad anticonvulsiva del AV, mientras que fármacos que potencian las enzimas microsomales hepáticas reducen la acción anticonvulsiva del AV.

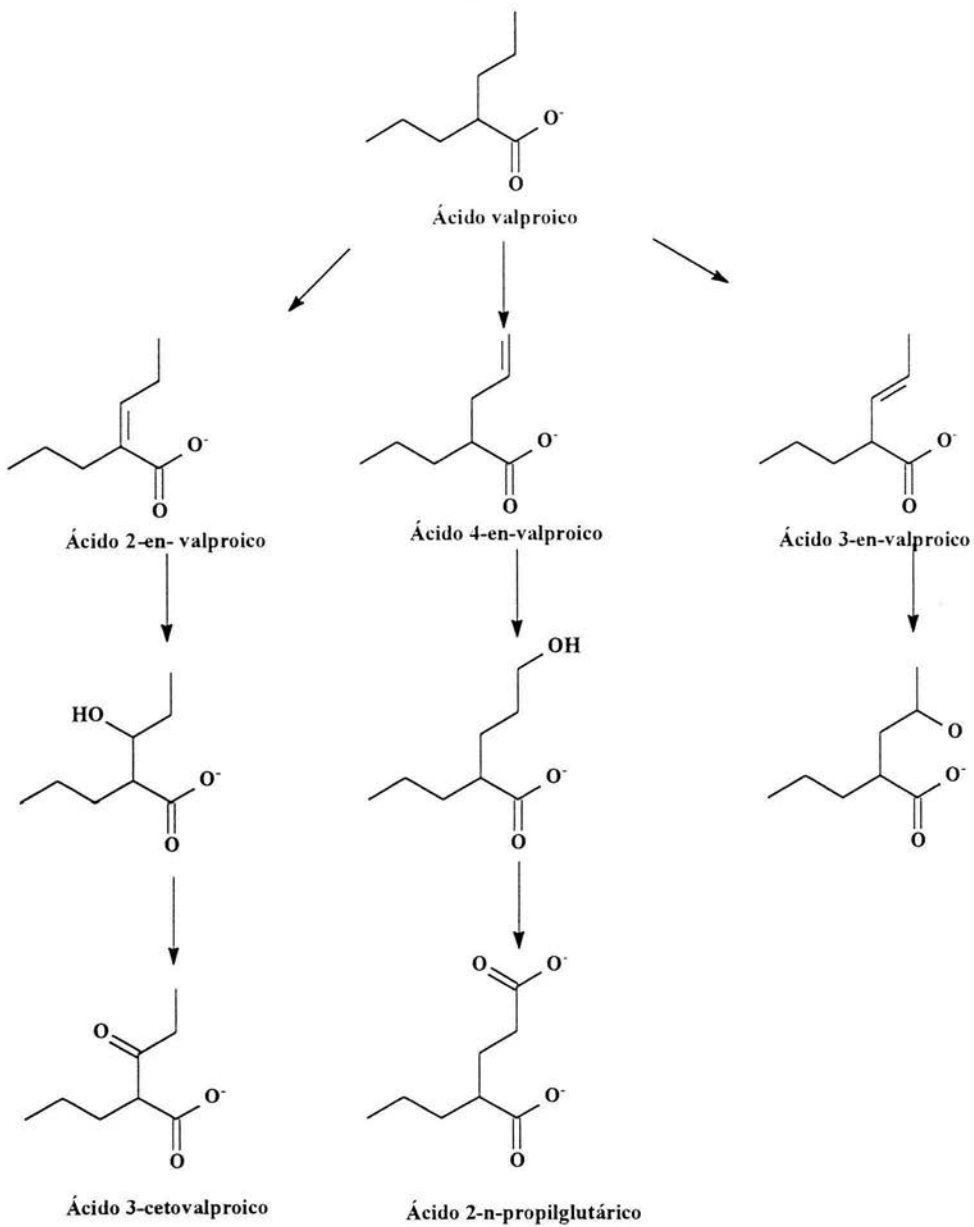


Fig. No. 2 Metabolismo de ácido valproico

CONTRAINDICACIONES

El valproato de magnesio está contraindicado en los pacientes con respuestas idiosincrásicas al mismo. No debe utilizarse en enfermos con hepatopatía grave.

REACCIONES ADVERSAS

Las reacciones del VM se deben al AV y no al magnesio, con lo que son superponibles a los obtenidos con AV o VS. Las reacciones adversas más frecuentes son alteraciones gastrointestinales que incluyen anorexia, náuseas y vómitos. Afectan aproximadamente al 16 % de los pacientes tratados. Otros efectos son la sedación, ataxia, temblores, erupciones cutáneas, alopecia, estimulación del apetito y aumento de las enzimas hepáticas. El AV ha producido en ocasiones hepatitis fulminantes fatales, también se ha observado el aumento sérico de la hormona del crecimiento.

PRECAUCIONES

Por su toxicidad, el AV y sus sales se clasifican en el grupo “D” de la “Food and Drug Administration” FDA de EU. Es decir, entre los compuestos hay indicios inequívocos de riesgo fetal en caso de administración durante el embarazo, tampoco se recomienda su utilización durante la lactancia.

INTERACCIONES FARMACOLÓGICAS

Puede interactuar con: salicilatos, ácidos grasos libres, fenobarbital, primidona y fenitoína.

POSOLOGÍA Y VÍA DE ADMINISTRACIÓN

La dosis recomendada es de 15 mg/kg/día al iniciar el tratamiento. La posología se aumentará semanalmente en 5 a 10 mg/kg/día hasta controlar satisfactoriamente las convulsiones, sin sobrepasar la dosis máxima recomendada de 60/mg/kg/día.

NOMBRE Y PRESENTACIÓN

El valproato de magnesio se comercializa en México por Armstrong Laboratorios de México S.A. de C.V., en frasco gotero de 40 ml con 200 mg por 1 ml de solución, en tabletas de 200 y 500 mg, en tabletas de 400 mg con recubrimiento entérico y en frasco de 100 ml de suspensión con 200 mg por cada 5 ml, una concentración equivalente de AV de 3,720 g/100 ml.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

La industria farmacéutica está especialmente interesada en la validación de métodos analíticos debido al gran incremento de nuevos productos relacionados con la salud y que requieren de métodos de análisis apropiados, que cumplan con las normas oficiales.

La validación del método puede definirse como el proceso por el cual se demuestra por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada. La capacidad se expresa en este caso, en términos de las siguientes variables analíticas:

Linealidad

Es la habilidad para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática definida, son proporcionales a la concentración del analito, dentro de un intervalo determinado.

Repetibilidad

Es la precisión de un método analítico, expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes, realizadas por un solo analista, usando los mismos instrumentos y método.

Reproducibilidad

Es la precisión de un método analítico, expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por diferentes laboratorios.

Especificidad

Es la capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra.

Cromatografía

Actualmente la cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAR) es el método analítico más usado en la industria farmacéutica, ha permitido al analista acceder a un nivel instrumental de alta precisión, compuesto por bombas que permiten entregar en un solo instrumento caudales muy estables, generalmente entre uno y 100 microlitros, válvulas accionadas por microprocesadores que permiten direccionar la fase móvil para automatizar procesos, integradores versátiles, aislados o conectados a una computadora que pueden permitir no solo el control global de uno o mas equipos cromatográficos sino la libre manipulación y almacenamiento de datos, generación de reportes e incluso el desarrollo automático de métodos, etc.

Básicamente, los equipos de HPLC pueden clasificarse en integrados y modulares. En los primeros, cada una de sus partes (Reservorio de Solventes, Bomba, Inyector y Detector) están reunidas en un gabinete y su intercambio o conexión con otros componentes de la misma o diferente marca es difícil. Permiten en cambio un mejor aprovechamiento del espacio y menos riesgos frente a operadores ocasionales o poco experimentados. En los segundos los módulos son instrumentos individuales que permiten no solo armar el equipo según la necesidad del analista sino aumentar su complejidad según esa necesidad varíe.

Formas de Cromatografía líquida

Cromatografía líquido-sólido ó de adsorción.

Este método emplea una fase estacionaria polar, típicamente silicagel y una fase móvil no polar, por ejemplo hexano, en general con el agregado de algún aditivo que provee selectividad.

Cromatografía líquido-líquido ó de partición

En esta modalidad las moléculas de soluto se distribuyen entre dos líquidos: uno es la fase móvil y el otro la fase estacionaria, que se encuentra homogéneamente dispersa en un soporte sólido finamente dividido. Presenta ciertos inconvenientes como son: la necesidad de presaturar la fase móvil con la fase estacionaria, la necesidad de disolver la muestra en la fase saturada con la fase estacionaria, la imposibilidad de efectuar gradientes de elución, de programar caudales o temperatura para evitar el desprendimiento de la fase estacionaria, etc.

Cromatografía de fase ligada.

Las virtudes de la cromatografía líquido-líquido eran claras, tanto como sus limitaciones. Por ello resulta también razonable pensar que reemplazando el tipo de unión de la fase estacionaria a su soporte, haciéndola perdurable por medio de una unión química covalente, el éxito del material estaría asegurado. Así, prácticamente el 90 % de las separaciones cromatográficas modernas se efectúan sobre el material químicamente modificado, el cual permite optar según el reactivo empleado para su fabricación, entre materiales altamente hidrofóbicos o altamente hidrofílicos, con un amplio rango de polaridad y de selectividad

como son Octadecilo, Octilo, Hexilo, Butilo, Etilo, Diol, Fenilo, Amino, Nitro, Amonio Cuaternario, Resto Sulfónico, etc.

Cromatografía de Intercambio iónico.

En este caso se emplean rellenos en los cuales la partícula está constituida por un polímero o por silicagel, en cada caso unida a un grupo funcional aniónico o catiónico (típicamente sulfónico para el intercambio de cationes, amonio cuaternario para el intercambio de aniones). La selección del tipo de grupo funcional permite escoger entre intercambiadores débiles y fuertes.

Cromatografía de Exclusión por tamaño.

Esta modalidad emplea materiales de porosidad controlada, que funcionan como un filtro o tamiz y clasifica las moléculas de la muestra según un orden decreciente de tamaño molecular (las moléculas más grandes son las primeras en eluir, y las más pequeñas son las últimas). Si se dispone de estándares apropiados, de peso molecular adecuado (proteínas para el análisis de proteínas, dextranos para el análisis de dextranos, etc.), puede evaluarse el peso molecular de un compuesto desconocido, o bien la distribución de pesos moleculares de un polímero sintético.

Formas Farmacéuticas

Comprimidos o tabletas

Preparado sólido que contiene él o los principios activos y aditivos, generalmente de forma discoide, ranurados y de tamaño variado, obtenido por compresión de polvos o gránulos. Existen variedad de tabletas tales como: Efervescentes, Sublinguales de acción y de liberación prolongada, Vaginales, Multicapa y Masticables.

Modo de administración:

- 1) Oral
- 2) Bucal
- 3) Intravaginal

Solución

Preparado líquido transparente y homogéneo, obtenido por disolución del o los principios activos y aditivos en agua. Y que se utiliza para el uso externo o interno. En el caso de Soluciones Inyectables, Oftálmicas y Óticas deben ser soluciones estériles.

Modo de administración:

- 1) Oral
- 2) Inyectable
- 3) Ocular
- 4) Uso externo (tópico)
- 5) Ótico

Suspensión

Sistema disperso compuesto de dos fases, los cuales contienen el o los principios activos y aditivos. Una de las fases, la continua o la externa es generalmente un líquido o un

semisólido y la fase dispersa o interna esta constituida de sólidos (principios activos) insolubles, pero dispersables en la fase externa. En caso de inyectables deben ser estériles.

Modo de administración:

- 1) Oral
- 2) Inyectable
- 3) Uso externo (tópico)
- 4) Ocular

VI PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El VM en sus diversas formas farmacéuticas comercializado por Armstrong Laboratorios de México S.A. de C.V., representa uno de sus productos líderes de venta y por su importancia requiere de un método de cuantificación mas preciso y exacto que el método volumétrico con el cual hasta la fecha es analizado, así como también es necesario el reemplazo de la técnica esperando con ello reducir costos, tiempo de análisis, mejorar la exactitud y la reproducibilidad en los resultados analíticos. Se procederá a desarrollar y validar un método analítico para la cuantificación del VM por HPLC.

VII OBJETIVO GENERAL

- Desarrollar un método analítico por la técnica de HPLC, para la cuantificación del Valproato de Magnesio como ácido valpróico en diferentes formas farmacéuticas.

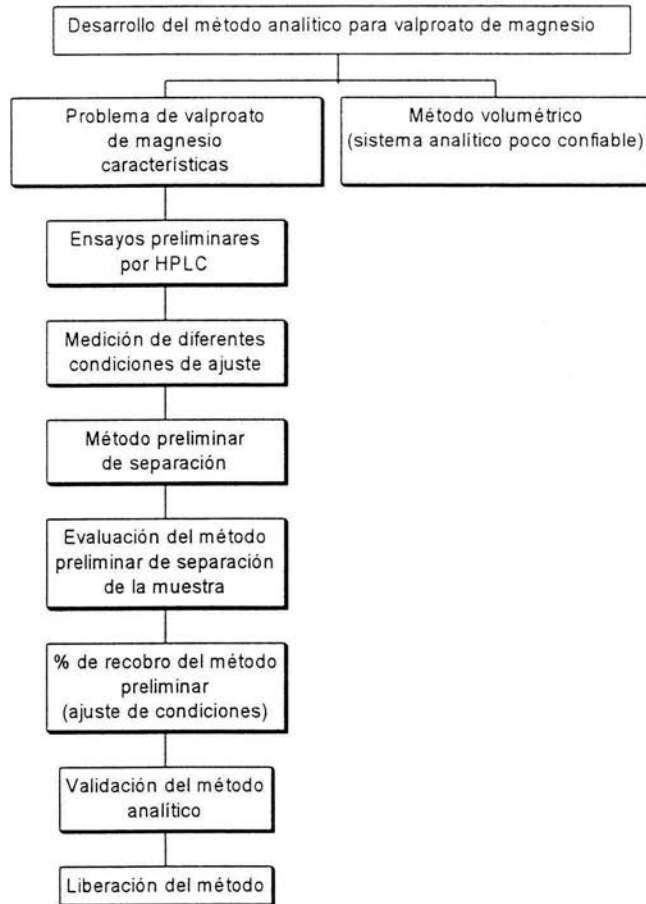
OBJETIVOS PARTICULARES

- Validar el método analítico desarrollado.
- Evaluar la linealidad del sistema del método.
- Evaluar la precisión del sistema del método.
- Evaluar la precisión del método.
- Evaluar la exactitud del método.
- Evaluar la linealidad del método.
- Evaluar la reproducibilidad del método.
- Evaluar el límite de detección y cuantificación del método.
- Evaluar la estabilidad de la muestra analítica.
- Evaluar la especificidad en estabilidad.
- Evaluar la robustez del método.

VIII HIPÓTESIS

El método de validación propuesto, cumple con todas las especificaciones marcadas por El Colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos, así como las impuestas por el Laboratorio Armstrong, teniendo como base la Guía de Validación de la Secretaría de Salud.

DIAGRAMA DE FLUJO



IX PARTE EXPERIMENTAL

Material

Vasos de precipitados de 250 ml.
Vasos de precipitados de 1000 ml.
Probetas de 500 ml.
Matraz kitazatos de boca esmerilada de 1000 ml.
Matraces volumétricos de 25 ml
Pipeta volumétrica de 5 ml
Matraces volumétricos de 1000 ml
Matraces volumétricos de 100 ml
Membranas para filtración de solvente orgánico tipo Fh .045
Micras (Millipore).
Membranas para filtración de solvente orgánico tipo Gv
de 0.45 micras y 4.7 cm de diámetro (Millipore).
Tubos de ensayo cónicos para centrifuga de 50 ml (de vidrio)

Reactivos:

Metanol HPLC (Mallinckrodt)
Acetonitrilo HPLC (Mallinckrodt)
Agua HPLC (Tecsiquin)
Fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4) (J.T.Baker) grado reactivo
Ácido fosfórico HPLC (J.T.Baker) grado reactivo
Valproato de magnesio estándar primario proporcionado por Armstrong
Laboratorios de México.

Equipo:

Balanza analítica marca Mettler modelo 200

Ultrasonido marca Branson modelo 20200

Centrífuga marca IEC modelo Centra 8

Bomba Pye Unicam Phillips Modelo Pu 4015

Detector de longitud de onda variable

(Pye Unicam Phillips) Modelo Pu 4025

Integrador (Spectra Physics) Modelo Sp 4290

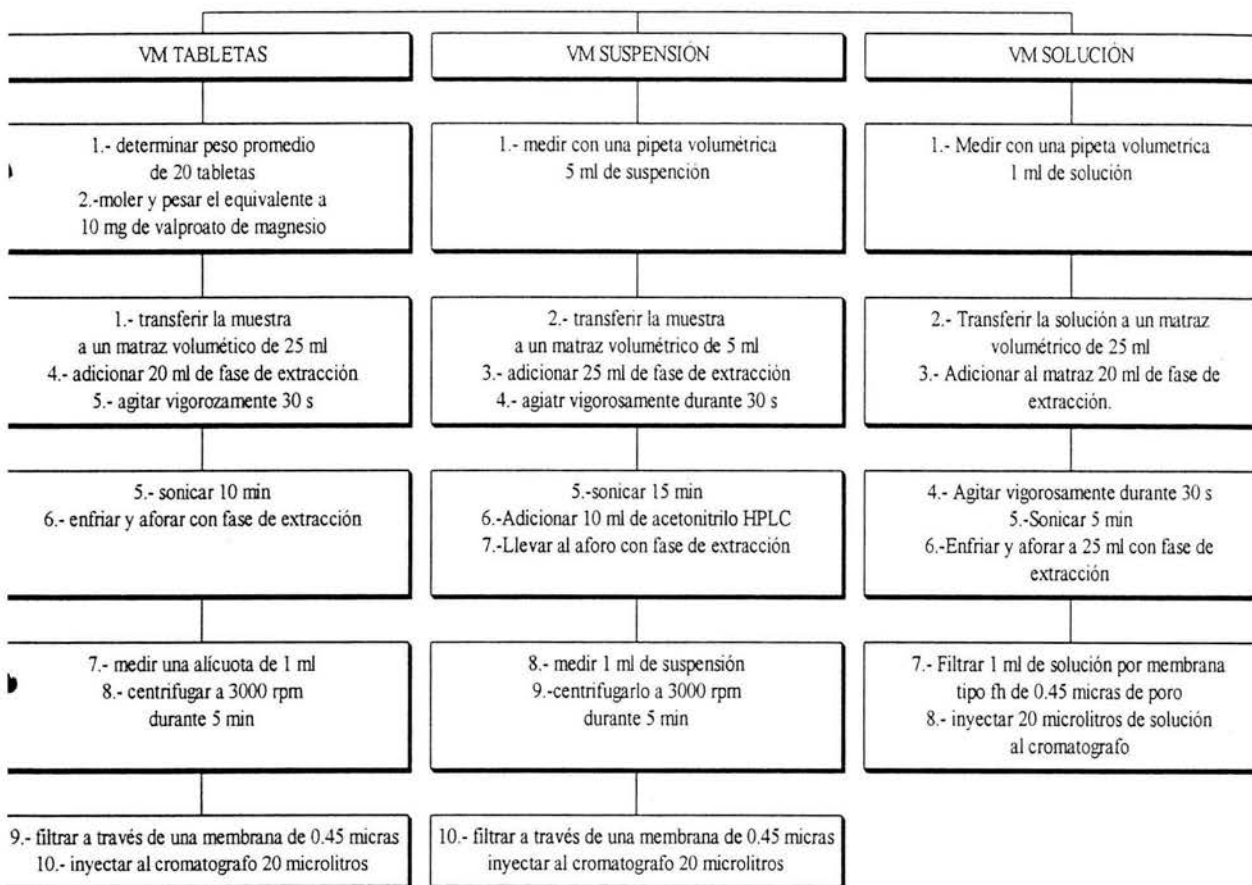
Columna analítica empacada con silicagel modificada (C18) de
10 micras de tamaño de partícula Micro Bondapack C 18 de 30 cm por
3.9 mm Waters.

Inyector manual con loop fijo de 20 microlitros (Rheodyne)

FORMAS Y PRESENTACIONES FARMACEUTICAS DE VALPROATO DE
MAGNESIO

PRINCIPIO ACTIVO	FORMA FARMACÉUTICA	PRESENTACIÓN (mg)
VALPROATO DE MAGNESIO	TABLETAS	200
		400
		500
VALPROATO DE MAGNESIO	SUSPENSIÓN	200mg/5 ml
VALPROATO DE MAGNESIO	SOLUCIÓN	200 mg/ml

Proceso de extracción de las diferentes presentaciones farmacéuticas de VM



Procedimiento a seguir:

1. Especificidad
2. Especificidad en estabilidad
3. Adecuabilidad del sistema
4. Precisión del sistema
5. Linealidad del sistema
6. Exactitud, precisión y linealidad del método
7. Reproducibilidad del método
8. Precisión diaria del método
9. Tolerancia del sistema
10. Estabilidad de la muestra
11. Límites de detección y cuantificación
12. Robustez

Precisión del Sistema

1. - Analizar con el método analítico bajo estudio por sextuplicado, la solución estándar correspondiente al 100 % de principio activo establecido en la linealidad.
2. - Calcular el promedio (\bar{x}), desviación estándar y desviación estándar relativa.

Criterio de aceptación

La precisión del sistema se considera satisfactoria si el coeficiente de variación es menor o igual a 2.0 %.

Especificidad en Estabilidad

En el caso de análisis de un principio activo ó fármaco de ser posible se debe contar con las materias primas, subproductos de síntesis y productos de degradación, de ser así la estabilidad y selectividad puede controlarse simplemente por la adición de un 2 % de cada posible interferencia a la sustancia de referencia y verificando su completa separación cromatográfica (para métodos cromatográficos) en caso de que los productos de descomposición sean desconocidos o no puedan aislarse, el camino que se debe seguir es el siguiente:

- **Evaluar la estructura química** del principio activo y proponer caminos de degradación de la muestra, como se indica.
- **Termólisis** calentar una cantidad medida de muestra, a 105 °C durante 4 - 6 horas.
- **Hidrólisis** por el calentamiento a reflujo con agua por 1 -2 horas.
- **Hidrólisis alcalina** calentar una cantidad establecida de muestra y someterla a reflujo con NaOH 1N durante 1 - 2 horas.
- **Hidrólisis ácida** calentar una cantidad conocida de muestra y someterla a reflujo con HCl 1N durante 1 - 2 horas.
- **Fotólisis** exponer una cantidad conocida de muestra a la luz UV y a la luz solar directa, evaluar.
- **Oxidación** calentar una cantidad de muestra en Baño María, adicionar H₂O₂ ó burbujear oxígeno (10 gotas).

De ser necesario neutralizar la condición para evitar el daño de equipo y evaluar con la técnica ó método propuesto, en general no se recomienda una degradación mayor al 25 %

de la concentración inicial, de modo que es posible repetir algunos de los ensayos empleando condiciones más suaves o más drásticas.

Especificidad

1. - Analizar por duplicado muestras de placebo del producto con el método analítico propuesto, así como sustancia de referencia del principio activo.
2. - Identificar las señales de (los) principio (s) activo (s) excipientes, etc.
3. - En caso de contar con los posibles compuestos de síntesis o degradación, preparar muestras con placebo añadido y comprobar que ninguna señal interfiere con la señal del principio activo.

Operaciones estadísticas básicas para validación de métodos analíticos

Promedio

Desviación estándar

Desviación estándar relativa

Análisis de varianza.

Evaluación de pruebas de validación

Evaluación de la exactitud del método

Evaluación de la linealidad

Evaluación de la reproducibilidad del método

Evaluación de la precisión del método

Robustez del método

Linealidad del Sistema

1. - Diseñar de acuerdo a las características de la técnica analítica, las condiciones de trabajo para obtener una curva de calibración con un grupo de por lo menos 8 soluciones de una misma sustancia de referencia, en un intervalo de concentraciones del 50 % - 150 % del principio activo.
2. - Realizar análisis por duplicado de cada concentración de trabajo, con sustancia de referencia de potencia conocida, de acuerdo al método analítico bajo estudio.
3. - Representar gráficamente en papel milimétrico el área en función de la concentración de los mg/ml, y trazar la recta de acuerdo al método de regresión lineal
4. - Tabular área vs concentración.
5. - Obtener el valor de la pendiente (m), ordenada al origen (b), coeficiente de correlación (r), coeficiente de determinación (r^2), error estándar de la regresión y la sensibilidad.

Criterio de aceptación.

El sistema será considerado "lineal" sí:

Pendiente	$m \approx 1$
ordenada al origen:	$b \approx 0$
Coefficiente de regresión	$r = 0.99$
Coefficiente de determinación	$r^2 > 0.98$

Exactitud, Precisión y Linealidad del Método

El estudio de recobro podrá realizarse por el método de placebo añadido o adición de estándar.

1. -Método del placebo añadido:

- (a) Establecer la cantidad de principio activo correspondiente al 50 %, 80 %, 100 %, 120 % y 150 % de la cantidad etiquetada.
- (b) Pesar para cada concentración, por sextuplicado, una cantidad constante de placebo.
- (c) Adicionar a cada placebo una cantidad exactamente pesada de principio activo de pureza conocida, correspondiente a la concentración estudiada.
- (d) Analizar cada una de las muestras con el método analítico bajo estudio.

2. - Método de adición estándar:

- (a) Establecer la cantidad de principio activo correspondiente al 50 %, 80 %, 100 %, 120 % y 150 % de la cantidad etiquetada.
- (b) Pesar una cantidad constante de producto determinado, por sextuplicado, para cada concentración a evaluar.
- (c) Adicionar a cada placebo una cantidad exactamente pesada de principio activo de pureza conocida, correspondiente a la concentración estudiada.
- (d) Analizar las muestras antes y después de adicionar el principio activo con el método analítico bajo estudio.

3. - Reporte de los mg adicionados, mg recuperados, desviación estándar relativa (d_{er}), intervalo de confianza y prueba "t" de student.
4. - Considerar satisfactoria la exactitud y precisión del método si cumple con los siguientes criterios de evaluación:

Sí la "t" experimental es menor o igual a la "t" teórica el método analítico se considera exacto.

Sí la "t" experimental es mayor que la "t" teórica, el método se considera no exacto.

Con $n-1$ grados de libertad y 0.05 de nivel de significación.

<u>Forma Farmacéutica</u>	% Recobro	Desviación estándar
Soluciones, cápsulas y tabletas	98.0 - 102	<2.0 %
Suspensiones y semisólidos	97.0 - 103	< 3.0 %
<u>Método Analítico</u>		
Cromatografía líquida de alta Resolución	98.0 - 102	< 2.0 %
Volumétrico	97.0 - 103	< 3.0 %
Espectrofotométrico	98.0 - 102	< 2.0 %
Microbiológico	95.0 - 105	< 5.0 %
Materias Primas	98.5 - 101.5	< 1.5 %

5. - Calcular en cada concentración estudiada, el valor promedio de los mg recuperados y mg adicionados.
6. - Graficar los mg recuperados en función de los mg adicionados y trazar la mejor recta que pase por los puntos de acuerdo al método de regresión lineal.
7. - Calcular el valor de la Pendiente (m), Ordenada al origen (b), Coeficiente de correlación (r) y Coeficiente de determinación (r^2).

Criterio de aceptación

Considerar satisfactoria la linealidad del método si cumple con lo siguiente:

Pendiente : m aprox. = 1

Ordenada al origen: b aprox. = 0

Coefficiente de regresión: $r > 0.99$

Coefficiente de determinación: $r^2 > 0.98$

Reproducibilidad del Método

1. - Proporcionar a 2 Químicos analistas una muestra del producto en estudio, con una concentración de aproximadamente el 100 % de principio activo.
2. - Solicitar se analice la muestra por triplicado, en dos días distintos.
3. - Registrar los 6 valores obtenidos por cada Químico y analizar si existen diferencias significativas entre los Químicos y días de análisis mediante un análisis de varianza
4. - Calcular el valor promedio de los 12 resultados, Desviación estándar y Desviación estándar relativa.

Criterio de aceptación

Considerar el método analítico satisfactorio si no existe diferencia significativa entre los químicos, días y la desviación estándar relativa en técnicas por cromatografía líquida de alta resolución no es mayor al 2 % o mayor a 3 % en otras técnicas.

Precisión Diaria del Método

1. - Analizar una muestra del producto con el método bajo estudio por cuadruplicado durante tres días distintos.
2. - Registrar los valores obtenidos y calcular el valor promedio (\bar{x}) de los doce resultados
Desviación estándar y Desviación estándar relativa.
3. - Calcular el Error cuadrado medio, Error cuadrado de los días, Varianza total, Gran media y la Desviación estándar relativa.

4. - Considerar el método analítico satisfactorio si la desviación estándar relativa es menor o igual a 3.0 %.

Tolerancia del Sistema

1. - Establecer los puntos críticos necesarios a investigar de acuerdo a las características del método analítico estudiado.
2. - Si la técnica analítica es por cromatografía de líquidos o gases, podría requerir estudiar:
 - a) Condiciones experimentales: Variar la composición de la fase móvil, pH, Temperatura, Tiempo de reacción, Temperatura del inyector.
 - b) Tipo de columnas.
3. - Describir el diseño experimental para la evaluación de cada una de las condiciones consideradas críticas.
4. - Efectuar con las condiciones modificadas, la determinación de acuerdo al método analítico.
5. - Comprobar mediante la prueba "t" student y establecer el efecto de la variación del sistema.

Estabilidad de la Muestra.

1. - Determinar de acuerdo al método los puntos del procedimiento analítico en los que es escrita la estabilidad del principio activo.
- 2.- Elegir condiciones y/o periodos de almacenamiento de las muestras (temperatura ambiente, refrigeración).
3. - Preparar para cada condición y/o período de almacenamiento tres muestras.
4. - Analizar las muestras con el sistema analítico.
5. - Comparar los resultados de cada condición mediante la prueba “t” student.
- 6.- Se determina por la comparación de los resultados de 3 muestras analizadas por duplicado contra los obtenidos de las mismas muestras después de permanecer por un tiempo determinado en diferentes condiciones (temperatura 40° C, temperatura ambiente, temperatura 4° C y luz directa).

Criterio de aceptación

Si la "t" teórica de la muestra es mayor que la "t" experimental, la muestra es estable en ambas condiciones.

Si la "t" teórica es menor que la "t" experimental establezca las condiciones adecuadas de almacenamiento de la muestra.

La muestra se considera estable si no difiere en más de:

2 % Para métodos cromatográficos

3 % Para métodos titrimétricos y espectrofotométricos

Límite de Detección y Límite de Cuantificación.

1. - Adicionar a una cantidad constante de placebo, 1, 3, 5, 10, 15, 20 y 25 % de principio activo.
2. - Analizar las muestras con el método analítico.
3. - Graficar la respuesta analítica medida en función de la concentración adicionada.

Robustez

Robustez de un método analítico corresponde a los estudios que indican el grado de confiabilidad del ensayo ante cambios de variables comunes, estas variables se escogen dependiendo de las características del analito y de la matriz, el objetivo final es el de identificar rangos y límites donde el método es totalmente confiable y reproducible.

Criterio de aceptación

Para decidir si un parámetro tiene influencia sobre el resultado, se compara la diferencia obtenida para el cambio efectuado sobre ese parámetro y el producto de la desviación estándar de la precisión del método. La diferencia significativa no se acepta mayor de 2 %.

Metodología

Buffer de fosfato 0.1 M pH = 3

Pesar exactitud 13.6 g de NaH_2PO_4 , transferirlos a un matraz volumétrico de 1000 ml, disolver con agua HPLC, adicionar 5 ml de ácido fosfórico concentrado agitar y llevar a la marca con agua HPLC.

Fase de extracción

Medir exactamente con una probeta 500 ml de acetonitrilo HPLC, 5 ml de ácido fosfórico concentrado y 600 ml de metanol HPLC, vertirlos en un vaso de precipitados de 1000 ml, mezclar y dejar enfriar a temperatura ambiente, guardar en recipientes de vidrio color ámbar y tapón esmerilado.

Fase móvil

Medir exactamente con una probeta 500 ml de acetonitrilo HPLC, transferirlos a un matraz kitazatos de 1000 ml.

Adicionar 500 ml de buffer de fosfatos 0.1 m pH = 3 (exactamente medidos con una probeta), agitar y filtrar con ayuda del sistema de filtración de fase móvil por membrana gv de 0.45 micras, degasificar con sistema de vacío durante 10 min.

Condiciones del equipo cromatográfico

Detector

Longitud de onda: 220 nm

Sensibilidad : 0.08 A.U.F.S.

Bomba

Flujo : 2 ml/min.

Integrador

Velocidad de carta: 0.5 cm/min

Atenuación : 64

Nivel de ruido PT: 1200

Solución patrón de referencia

Pesar con exactitud 100 mg de valproato de magnesio patrón de referencia de pureza conocida y transferirlos a un matraz aforado de 25 ml, adicionar 20 ml de fase de extracción y sonicar durante 5 min, enfriar y llevar a la marca con fase de extracción, filtrar por membrana tipo fh de 0.45 micras por 2.5 cm de diámetro e inyectar.

Solución patrón de referencia

Para uniformidad de dosis

Valproato de magnesio 500 mg.

Pesar con exactitud 125 mg de valproato de magnesio patrón de referencia de pureza conocida, transferirlos a un matraz de 25 ml, adicionar 20 ml de fase de extracción, sonicar durante 5 min. Enfriar y llevar a la marca. Filtrar por membrana tipo fh de 0.45 micras por 2.5 cm de diámetro.

Solución patrón de referencia

Para uniformidad de dosis para

Valproato de Magnesio de 400 y 200 mg.

Pesar con exactitud 200 mg de valproato de magnesio patrón de referencia de pureza conocida, transferirlos a un matraz de 100 ml, adicionar 80 ml de fase de extracción, sonicar 5 min., enfriar y llevar a la marca, filtrar por membrana tipo fh de 0.45 micras por 2.5 cm de diámetro e inyectar.

Valoración

Pesar 20 tabletas y determinar su peso promedio, desprender las tabletas de su capa de recubrimiento, molerlas en un mortero hasta polvo fino. Pesar el equivalente a 10 mg de valproato de magnesio y transferirlos a un matraz de 25 ml, adicionar 20 ml de fase de extracción, agitar brevemente y sonicar 10 min. Enfriar y llevar a la marca con fase de extracción.

Agitar vigorosamente y transferir la muestra a un tubo de centrifuga de 50 ml, sellar y centrifugar a 3000 r.p.m. durante 3 min, filtrar la muestra por membrana fh de 0.45 micras de poro y 2.5 cm de diámetro, desechar los primeros mililitros e inyectar.

Cálculos

$$\frac{Am (Pst) (Potst) Dilm (Pp)}{Ast \quad Dilst \quad Pm} = \text{mg/tab Valproato de Magnesio}$$

Donde:

Am : Área de la muestra

Ast : Área del patrón de referencia

Potst: Potencia de patrón de referencia / 100

Pm: Peso de la muestra en miligramos

Pst: Peso del patrón de referencia en miligramos

Pp: Peso promedio del lote

Dilm: Dilución de la muestra

Dilst: Dilución de patrón de referencia

Uniformidad de contenido

Desprender de su cubierta 10 tabletas y pesar los núcleos en forma independiente, transferir cada uno a un matraz de 100 ml, adicionar 10 ml de fase de extracción y moler la tableta con ayuda de un agitador de vidrio hasta que no existan grumos, agregar 70 ml de fase de extracción y sonicar durante 10 min., enfriar a temperatura ambiente y llevar a la marca con

fase de extracción, tomar una fracción y centrifugar a 3000 r.p.m. durante 3 min. Filtrar por membrana de tipo fh de 0.45 micras por 2.5 cm de diámetro e inyectar.

Cálculos

$$\frac{Am (Pst) (Potst) Dil_m Pp}{Ast \quad Dilst \quad Pm} = \text{mg/tab}$$

Donde

Pst:	Peso del patrón de referencia
Ast:	Área del patrón de referencia
Pm:	Peso de la muestra
Am:	Área de la muestra
Dilst:	Dilución de patrón de referencia
Potst:	Potencia de patrón de referencia / 100
Dilm:	Dilución de la muestra
Pp:	Peso promedio del lote

Preparación de la muestra para Valproato de Magnesio suspensión

Medir con exactitud 5 ml de VM Suspensión, transferirlos a un matraz de 50 ml, adicionar 25 ml de fase de extracción, agitar vigorosamente y sonicar durante 15 min (con agitaciones esporádicas), adicionar 10 ml de acetonitrilo, enfriar y aforar con fase de extracción.

Tomar una fracción de 1 ml, centrifugar a 3000 r.p.m. durante 5 min, filtrar por membrana fh de 0.45 micras de poro y 2.5 cm de diámetro e inyectar.

Cálculos

$$\frac{Am (Pst) Potst Dilm (Vf)}{Ast Dilst Pm} = \text{Mg de valproato de magnesio en 5 ml}$$

Donde

Am:	Área de la muestra
Ast:	Área del patrón de referencia
Pm:	Peso de la muestra en mg
Pst:	Peso del patrón de referencia en mg
Potst:	Potencia de patrón de referencia / 100
Dilst:	Dilución de patrón de referencia
Dilm:	Dilución de la muestra
Vf:	Volumen final de reporte (mg en 5 ml)

Preparación de la muestra para Valproato de Magnesio solución

Tomar una pipeta de 1 ml de VM Solución, medio con exactitud, transferirlo a un matraz volumétrico de 25 ml, adicionar 20 ml de fase de extracción, agitar y sonicar durante 5 min, enfriar y aforar, filtrar por membrana fh de 0.45 micras de poro e inyectar.

Cálculos

$$\frac{Am \cdot Pst \cdot Potst \cdot Dilm}{Ast \cdot Dilst \cdot 1 \text{ MI}} = \text{mg / ml de Valproato de Magnesio}$$

Donde

Am:	Área de la muestra
Ast:	Área del patrón de referencia
Pst:	Peso del patrón de referencia en mg
Dilst:	Dilución de patrón de referencia
Dilm:	Dilución de la muestra
1 ml:	1 ml de muestra
Potst:	Potencia de patrón de referencia / 100

Evaluación de la Exactitud del Método.

a.- Tabular los resultados analíticos, obtenidos en la exactitud del método. Calcular los mg recuperados de principio activo, en cada análisis utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{mg recuperados} = \frac{rp \cdot rsd \cdot dfm \cdot p}{rsd \cdot dfsd}$$

rp	=	Respuesta analítica del problema
rsd	=	Respuesta analítica de la sustancia de referencia
msd	=	Peso de la sustancia de referencia (mg)
dfm	=	Factor de dilución de la muestra
dfs	=	Factor de dilución de la sustancia de referencia
p	=	Potencia de la sustancia de referencia / 100

X RESULTADOS

Linealidad del sistema

$$m = 5330.421$$

$$b = -5471.782$$

$$r = 0.9997$$

$$r^2 = 0.9995$$

El método es perfectamente lineal en la relación mg/área

Precisión del sistema

$$x = 540825.2$$

$$s = 536.99$$

$$\text{c.v.} = 0.0993$$

El método es altamente preciso

Linealidad del método para VM tabletas

$$m = 1.0917$$

$$b = 1.0163$$

$$r = 0.9998$$

$$r^2 = 0.9996$$

Existe una alta relación entre la cantidad de mg adicionada y la cantidad de mg recuperada.

Linealidad de método de VM solución

$$m = 0.9986$$

$$b = 0.0535$$

$$r = 0.9999$$

$$r^2 = 0.9999$$

Existe una alta relación entre la cantidad de mg adicionados y la cantidad de mg recuperados.

Linealidad de método de VM suspensión

$$m = 1.0119$$

$$b = -0.6701$$

$$r = 0.9996$$

$$r^2 = 0.9994$$

Existe una alta relación entre la cantidad de mg adicionados y la cantidad de mg recuperados.

Reproducibilidad (precisión) del método de VM tabletas

Coeficiente de variación total (c.v.t) = 1.2224

Repetibilidad = 2.1597

Reproducibilidad vía analista = 1.6006

Reproducibilidad interanalista = 1.600

No existe efecto ni del día ni del analista en la determinación.

Reproducibilidad (precisión) del método de VM suspensión

c.v.t. = 1.1118

Repetibilidad = 2.0798

Reproducibilidad día/analista = 0.9561

Reproducibilidad interanalista = 0.9561

No existe efecto ni del día ni del analista en la determinación.

Reproducibilidad (precisión) del método de VM tabletas

c.v.t. = 0.8203

Repetibilidad = 1.5949

Reproducibilidad día/analista = 1.5949

Reproducibilidad interanalista = 1.5949

No existe efecto ni del día ni del analista en la determinación.

Exactitud del método de VM tabletas

$$x = 101.005$$

$$s = 0.5856$$

$$\text{c.v.} = 0.5798$$

$$\text{Repetibilidad} = 1.5057$$

$$t_{\text{cal}} = 0.9103$$

$$t_{\text{teor}} = 2.015$$

Exactitud del método de VM solución

$$x = 99.45$$

$$s = 0.3822$$

$$\text{c.v.} = 0.4833$$

$$\text{Repetibilidad} = 0.9827$$

$$t_{\text{cal}} = 0.0523$$

$$t_{\text{teor.}} = 2.015$$

Exactitud del método de VM suspensión

$$x = 101.1567$$

$$s = 0.8492$$

$$\text{c.v.} = 0.8395$$

$$\text{Repetibilidad} = 2.1832$$

$$t_{\text{cal}} = 0.3489$$

$$t_{\text{teor.}} = 2.015$$

Límite de cuantificación

VM tabletas 200 mcg/ml

VM solución 200 mcg/ml

VM suspensión 200 mcg/ml

Límite de detección

VM tabletas 20 mcg/ml

VM solución 20 mcg/ml

VM suspensión 20 mcg/ml

Estabilidad de la muestra analítica

Es estable en refrigeración durante 48 horas.

Es inestable a temperatura ambiente a 25° C después de 8 horas de exposición en sistema abierto.

Especificidad en estabilidad

La muestra de VM tabletas fue estable (no presentó degradación) con digestión ácida, digestión alcalina y oxidación.

Pero fue inestable a temperatura mayor de 40° C

VM Solución

Estable en digestión ácida y alcalina.

Inestable en condiciones de oxidación y temperatura mayor a 40° C.

VM Suspensión

Estable en digestión ácida y alcalina.

Inestable en digestión alcalina y temperatura mayor a 40° C.

El método permite una separación adecuada de los compuestos de degradación, por lo cual es un buen método para el estudio de estabilidad.

Tablas de resultados

Tabla. No. 1

Linealidad del método

Valproato de Magnesio Tabletas

Nivel de concentración 50 %

mg Adicionados	mg Recuperados	% Recobro
56.50	56.00	99.12
52.00	52.23	100.45
48.60	47.79	98.33
55.80	55.50	99.51
51.80	50.44	97.38
48.00	47.70	99.40

Tabla. No. 2

Linealidad del método

Valproato de Magnesio Tabletas

Nivel de concentración 100 %

mg Adicionados	mg Recuperados	% Recobro
110.80	113.22	101.07
107.20	108.96	101.64
117.00	118.18	101.01
113.30	114.24	100.83
100.00	99.99	99.99
105.90	107.58	101.49

Tabla. No. 3

Linealidad del método

Valproato de Magnesio Tabletas

Nivel de concentración 150 %

mg Adicionados	mg Recuperados	% Recobro
147.50	149.38	101.27
156.10	156.7	100.38
160.70	160.77	100.04
153.60	155.16	101.01
150.30	151.75	100.84
157.40	158.96	100.99

Tabla. No. 4

Linealidad del método

Valproato de Magnesio Suspensión

Nivel de concentración 50 %

mg Adicionados	mg Recobrados	% Recobro
50.87	49.82	97.93
50.30	49.55	98.52
51.50	51.95	100.88
48.90	50.12	102.49
49.80	49.95	100.30
50.70	50.01	98.63

Tabla. No. 5

Linealidad del método

Valproato de Magnesio Suspensión

Nivel de concentración 100 %

mg Adicionados	mg Recobrados	% Recobro
102.20	102.21	100.00
114.50	115.67	101.02
100.50	100.96	100.45
106.40	107.90	101.47
100.80	103.15	102.33
99.20	100.85	101.67

Tabla. No. 6

Linealidad del método

Valproato de Magnesio Suspensión

Nivel de concentración 150 %

mg Adicionados	mg Recobrados	% Recobro
153.50	156.70	102.00
154.40	155.75	100.87
150.90	149.82	99.28
148.90	150.05	100.77
150.80	148.30	98.34
155.50	153.20	98.52

Linealidad del método**VM solución****Nivel de concentración del 50%**

mg adicionados	mg recuperados	% de recobro
55.32	55.11	99.62
49.89	49.90	100.02
50.65	50.91	100.51
52.18	52.22	100.07
49.90	49.82	99.83
50.03	50.01	99.96

Linealidad del método**VM solución****Nivel de concentración del 100%**

mg adicionados	mg recuperados	% de recobro
108.11	108.25	100.12
100.26	99.90	99.64
105.15	104.93	99.79
102.76	102.82	104.05
104.34	104.29	99.95
100.41	100.24	99.83

Linealidad del método**VM solución****Nivel de concentración del 150%**

mg adicionados	mg recuperados	% de recobro
150.03	150.06	100.01
149.89	149.60	99.80
151.26	151.05	99.86
150.07	149.96	99.92
152.86	152.97	100.07
150.32	149.96	99.76

Tabla. No. 10

Reproducibilidad del método

Valproato de Magnesio Tabletas

VM Tabletas	Analista 1 % Recobro	Analista 2 % Recobro
Día 1	100.94 101.02 101.75	101.13 101.41 99.65
Día 2	100.70 99.17 99.03	97.68 101.09 99.56

Tabla. No. 11

Reproducibilidad del método

Valproato de Magnesio Solución

VM Solución	Analista 1 % Recobro	Analista 2 % Recobro
Día 1	93.27	94.55
	94.30	94.26
	94.80	92.33
Día 2	93.47	93.48
	93.05	93.49
	93.89	92.51

Tabla. No. 12

Reproducibilidad del método

Valproato de Magnesio Suspensión

VM Suspensión	Analista 1	Analista 2
	% Recobro	% Recobro
Día 1	101.60	99.66
	99.99	98.74
	100.16	98.74
Día 2	100.76	102.16
	98.95	100.40
	100.66	99.07

XI DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos son plenamente satisfactorios, ya que la evaluación del método desarrollado cumple perfectamente con cada uno de los parámetros de la validación que exige la Secretaría de Salud.

Precisión del Sistema.

La precisión del sistema se realizó con el reactivo puro proporcionado por Armstrong Laboratorios de México. Se hicieron las inyecciones repetidas de una solución estándar correspondiente al 100 % del principio activo de VM. Las áreas fueron altamente reproducibles, obteniéndose un coeficiente de variación de 0.0993 %, muy por debajo del máximo permisible que es del 2 %, considerando el sistema altamente preciso. Para lograr la precisión fue necesario dejar estabilizar el equipo por lo menos una hora monitoreando continuamente la línea base. Es importante utilizar material y equipo calibrado, así como condiciones de análisis controladas para obtener resultados reproducibles.

Límite de detección.

Una vez estabilizado el equipo se realizaron las diluciones necesarias del VM. Las diferentes concentraciones se inyectan al cromatógrafo en orden descendente, el pico correspondiente al VM fue disminuyendo hasta prácticamente confundirse con la línea base. Las áreas fueron graficadas para obtener el límite de detección que para cada una de

las presentaciones farmacéuticas se establece en 20mcg/ml, que en área corresponde aproximadamente a tres veces el nivel de ruido de la línea base, esta concentración no puede ser observada pero no cuantificada con exactitud y precisión ya que esta en el límite de la sensibilidad del equipo.

Límite de cuantificación

El procedimiento para obtener el límite de cuantificación es muy similar al realizado para determinar el límite de detección, se realizan diluciones del VM partiendo de una concentración alta para así disminuir la señal (área del pico) y obtener un área cuantificable con precisión y exactitud aceptables.

Se considera que el límite de cuantificación es aproximadamente 10 veces el valor el límite de detección.

Para VM el límite de detección para las diferentes presentaciones farmacéuticas se estableció en 200 mcg/ml, que para las concentraciones comerciales de las diferentes presentaciones farmacéuticas de VM es muy aceptable.

Estabilidad de la muestra.

Esta prueba indica bajo que condiciones el principio activo VM es estable y las condiciones a las que descompone o se transforma y estadísticamente el resultado ya no es confiable

En este caso el VM fue analizado por triplicado, manteniéndolo en refrigeración a 4 °C y analizado alas 24, 48 y 72 h. Se observa que VM es estable hasta por 48h ,despues de este tiempo decae la señal por debajo de un 2 % en comparación con un estándar recién

preparado. También se observó que la señal debida al VM disminuye por abajo del 2 % cuando se expone por más de 8 horas en un sistema abierto expuesto a la luz directa. Esto indica que el VM descompone o se transforma por acción del tiempo, temperatura y luz directa, por ello las soluciones estándar deben prepararse preferentemente el mismo día.

Especificidad en estabilidad.

Para realizar esta determinación la muestra en sus diferentes presentaciones y en una concentración conocida fue sometida a distintas condiciones que se supone generan inestabilidad química del principio activo VM (hidrólisis ácida, hidrólisis básica, oxidación y calor).

La muestra fue analizada antes y después de ser expuesta, midiéndose su degradación al ser inyectadas al cromatógrafo y comparando las áreas de VM con respecto a un estándar reciente de igual concentración.

En el caso de VM en su presentación de tabletas, se observa que es inestable a temperaturas mayores a 40 °C, siendo estable a la hidrólisis ácida, alcalina y oxidación.

Para la presentación de VM en solución es estable a la hidrólisis ácida y alcalina pero se degrada por oxidación con H₂O₂ y temperatura mayor a 40 °C.

VM en su presentación de suspensión es estable en hidrólisis ácida y alcalina, pero es inestable cuando se somete a oxidación y temperaturas mayores a 40 °C.

El VM en sus diferentes presentaciones es estable en condiciones de trabajo normales, pero en presencia de oxidantes o alta temperatura mayor a 40 °C, se degrada por abajo del 25 % permitido, entonces se considerará que el producto ya no cumple con las condiciones legales para su comercialización.

Exactitud, Precisión y Linealidad del método.

Linealidad del método para VM en tabletas

Se analizó por sextuplicado VM a partir de tabletas en concentración de 50 mg. Encontrándose una alta reproducibilidad en las áreas de los picos con recobros altos, indicativo de que el proceso de extracción de VM es efectivo y las condiciones del equipo son adecuadas para este análisis.

Linealidad del método para VM en solución.

VM en solución presenta una alta linealidad ya que los recobros al inyectar la muestra por sextuplicado de una concentración de 50mg son altamente reproducibles y se aproximan al valor teórico.

Linealidad del método para VM en suspensión.

Existe un recobro y una reproducibilidad en las áreas de los cromatogramas para VM en suspensión altos, lo cual lleva a una relación de área vs concentración lineal.

Las suspensiones son una presentación farmacéutica de difícil manejo, sin embargo, siguiendo el método de extracción descrito en forma cuidadosa se obtienen recobros altos y constantes.

Precisión del método para VM en la presentación de tabletas, solución y suspensión.

Los resultados muestran que existe una alta reproducibilidad de las áreas de la señal que corresponde a VM en un mismo día así como entre días diferentes, ello indica que cualquier analista en cualquier día al seguir el método de análisis logrará resultados confiables para cualquiera de las formas farmacéuticas que se estudiaron.

Esta determinación es de las más importantes para definir si el método propuesto es correcto, ya que el desarrollo y validación del método no debe continuar hasta lograr una alta precisión, entre inyecciones de VM extraído de las diferentes presentaciones farmacéuticas.

Exactitud del método para VM tabletas

Los resultados muestran una exactitud del método analítico alta ya que el valor de recobro es muy próximo al valor real de 100 mg/ml, además de que no se rebasa el coeficiente de variación máximo de 2 %.

Exactitud del método para VM en su presentación de solución.

Esta determinación presenta un buen comportamiento para una concentración de 100 mg/ml. Se tiene una desviación estándar muy baja y un coeficiente de variación que no rebasa el 2 % permitido para métodos cromatográficos.

Exactitud del método para VM suspensión

VM en su presentación de suspensión presenta una alta exactitud, lo cual indica que el método de extracción es el adecuado, lo cual tiene como resultado que los valores reales presenten una alta exactitud respecto a los valores teóricos y avalan el método analítico

utilizado, aunque es la forma farmacéutica de VM en que se debe ser más cuidadoso para su extracción.

Robustez del método.

Nuestro método además de ser altamente confiable para las diferentes presentaciones de VM ya mencionadas, presenta ventajas adicionales al incluirse en la validación un arreglo de control de variables como robustez del método, dicho ensayo se realizó variando algunas condiciones con el objetivo de manejar rangos de tolerancia y como puede verse en los resultados no existe diferencia significativa al cambiar el empaque de la columna (C 18 a C 8), composición de la fase móvil (metanol / tetrahidrofurano por acetonitrilo), para esto se mantuvo la preparación de la muestra intacta y los cambios fueron solo con respecto al método cromatográfico pero se mantuvieron los factores de factor de capacidad 'k dentro de un rango 2.0 - 5.0 con una selectividad de 1.20 - 2.50 y una resolución adecuada para el sistema.

Estas modificaciones fueron evaluadas en un porcentaje de recobro y no produjeron un error mayor a 1.5 % en los resultados de diferentes muestras y menos del 1.0 % en la misma muestra.

Consideramos que para casos extremos y con el fin de no entorpecer ni alterar el trabajo y de ofrecer resultados igualmente confiables que pueden ser utilizados y que previamente fueron evaluados por porcentajes de recobro, los resultados de estos métodos alternativos quedan incluidos dentro de la validación y cumplen con los parámetros ya descritos (factor de capacidad, factor de selectividad y factor de resolución), esto le confiere al método una ventaja adicional con respecto a una validación convencional ya que es mucho más tolerante y robusto al tener la flexibilidad de manejar rangos y no solo valores estrictos.

XII CONCLUSIONES

De acuerdo con el trabajo Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de valproato de magnesio en tres formas farmacéuticas, se concluye lo siguiente:

La linealidad del sistema presenta un modelo perfectamente normal en relación mg/área, es altamente preciso, existe una alta relación entre la cantidad de VM en mg adicionada y la cantidad recuperada para cada una de las presentaciones farmacéuticas estudiadas.

En el caso de la precisión del método (reproducibilidad), se observa que no existe efecto del día ni del analista en la determinación de VM para cada presentación farmacéutica.

Se obtienen límites de detección y de cuantificación que permiten un buen seguimiento de la concentración de VM durante su producción y como control de calidad antes de salir al mercado.

En el estudio de estabilidad de VM para cada forma farmacéutica se establecen las condiciones óptimas para cada análisis y almacenamiento de acuerdo con lo establecido por la Secretaría de Salud.

El presente trabajo permitió cumplir con los objetivos iniciales, se logró desarrollar y validar el método en sus tres formas farmacéuticas (tabletas, solución y suspensión) en sus diversas concentraciones, cumpliendo con lo dispuesto por la Secretaría de Salud, el Manual de Procedimientos del Laboratorio que lo produce y lo establecido por El Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, A.C.

Por lo anterior, la cromatografía de líquidos de alta resolución queda establecida como una técnica analítica altamente confiable, así logramos pasar de una técnica de cuantificación poco confiable (volumétrica) a una de mayor exactitud, con la ventaja de que se disminuyen

costos y tiempo de análisis, generando un resultado confiable. Dándole al cliente un producto con calidad y la confianza de que durante su elaboración se cumplió con los requerimientos establecidos por la Ley.

Los que realizamos este desarrollo y validación, logramos llevar a la práctica los conocimientos adquiridos durante nuestra formación profesional, así como los conocimientos sobre cromatografía de líquidos de alta resolución, logrando con ello un trabajo que se verá reflejado en un mejor funcionamiento del Laboratorio, un producto con calidad respaldada en una validación, así como en la salud de los pacientes que utilicen el valproato de magnesio.

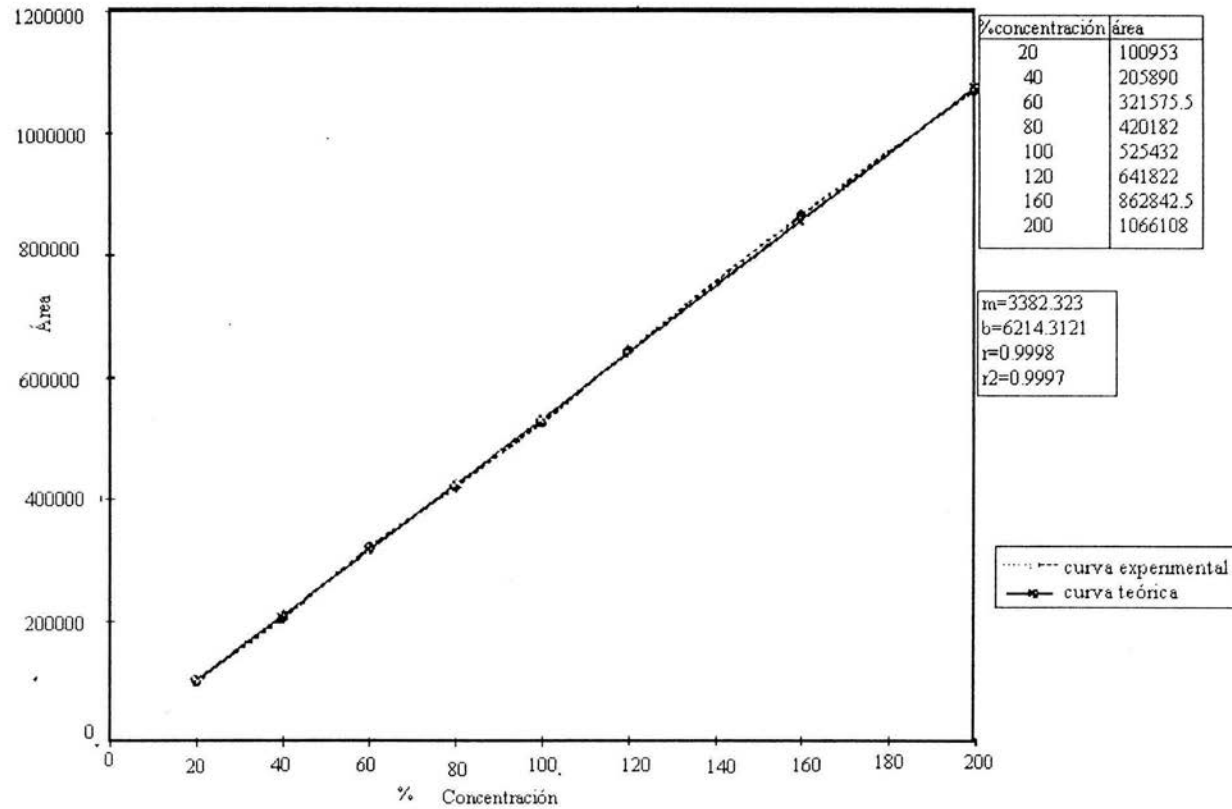
Finalmente, podemos concluir que el método está ampliamente respaldado por valores estadísticos, los cuales fueron obtenidos en forma sistemática, confiable y reproducible por lo que el método analítico para la determinación de valproato de magnesio en todas sus presentaciones comerciales queda validado para su utilización como método de cuantificación.

XIII BIBLIOGRAFÍA

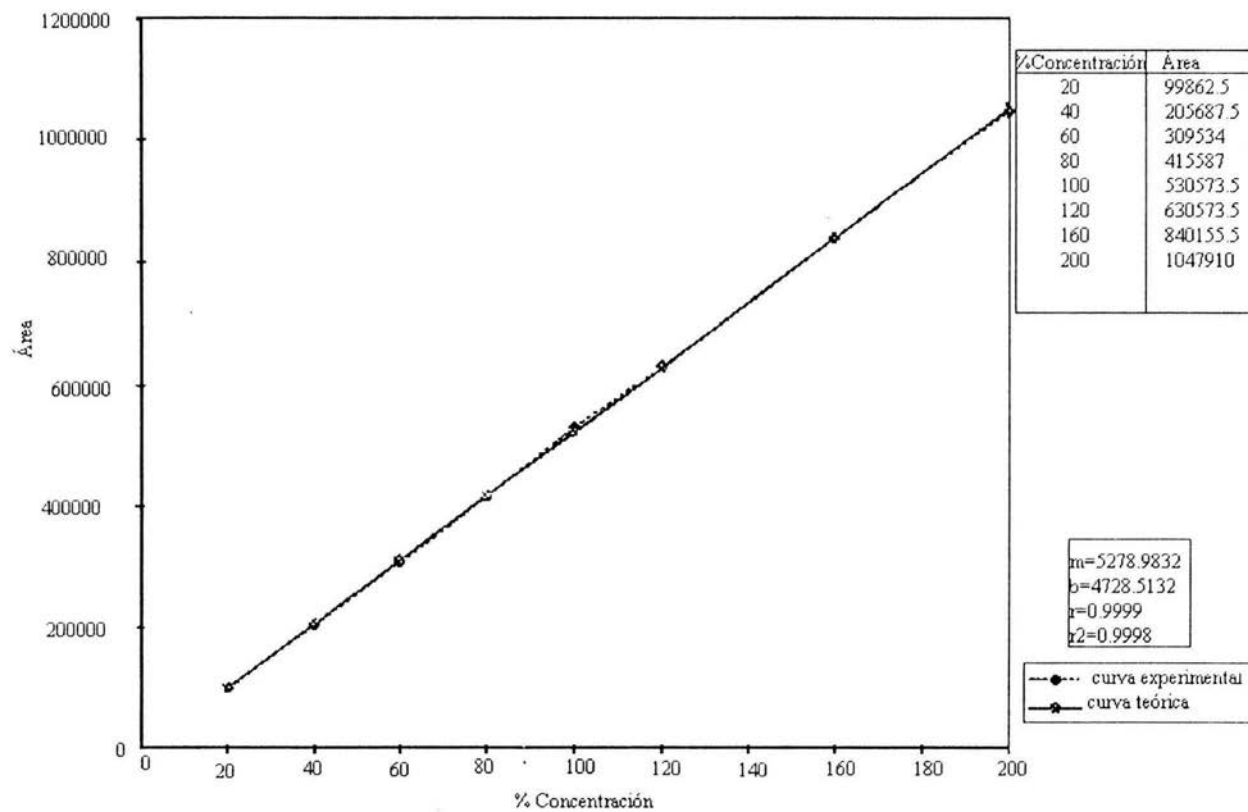
- Guía de validación Oficial de Métodos Analíticos de la SSA.
- Protocolo de Validación de Laboratorios Armstrong de México S.A. de C.V.
- Introducción a la HPLC. Teoría y Práctica. Merck, México 1992.
- Guía de Validación de Métodos Analíticos. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, Edición 2002.
- Berridge J.C: Techniques for the Automated Optimization of HPLC. Separations Wiley, Chichester. 3(2), 1985.
- Vanderwielen A. J. Hardwidge, E.A: Guidelines for Assay Validation. The Upjohn Company, Pharm. Tech. 6(13): 66 - 76, 1981.
- Guerra, J: Validation Of Analytical Methods By Fda Laboratories. Pharma Technology, Pag. 74 –80 .1986.
- Current Concepts for The Validation Of Compendial Assay Pharmacopeia Forum. The United States. Pharmacopeia/Convention, Inc. 1986.
- Rutherford B.S: General Method Validation Guidelines for Pharmaceutical Samples , J. Chrom. Vol. 25, 1987.

- John K. Taylor: Validation Of Analytical Methods. Anal. Chem (6) 600 – 608, 1983.
- Taylor J. And Kratochvil B: Validation Of Analytical Methods. Anal. Chem. (53) 925- 930a, 1981.
- Letterman H: Method Validation Procedures In An Otc Firm. Pharm. Tech. 4 (8). 45 – 49, 1980.
- Susan M. Ficarro, Kirt A. Shan: Validation Of High Performance Liquid Chromatography And Gas. Chromatography Assay Pharmaceutical Manufacturing. 25 – 27,1984.
- Programa de análisis estadístico SAEVMA 1.0.
- Wayne W. Daniel Bioestadística Base para el análisis de las Ciencias de la Salud cuarta edición, Limusa Wiley. 2002.
- Harrison: Carbamacepina y ácido valproico. Principios de medicina interna. Decimotercera ed.vol II. Mc Graw Hill Interamericana, pag.2780, España, 1994.
- Susan M.Ficarro, Kirt A.Shan: Validation of High Performance Liquid Chromatography and Gas Chromatography.Farmaceutical Manufacturing, 25-27, 1984.
- Drugs of Today. Valproato de magnesio antiepiléptico de amplio espectro. F. Rubio Donnadieu. vol. 30, suplemento 7. edit. J. R. Prous, S.A., Barcelona, 1994.

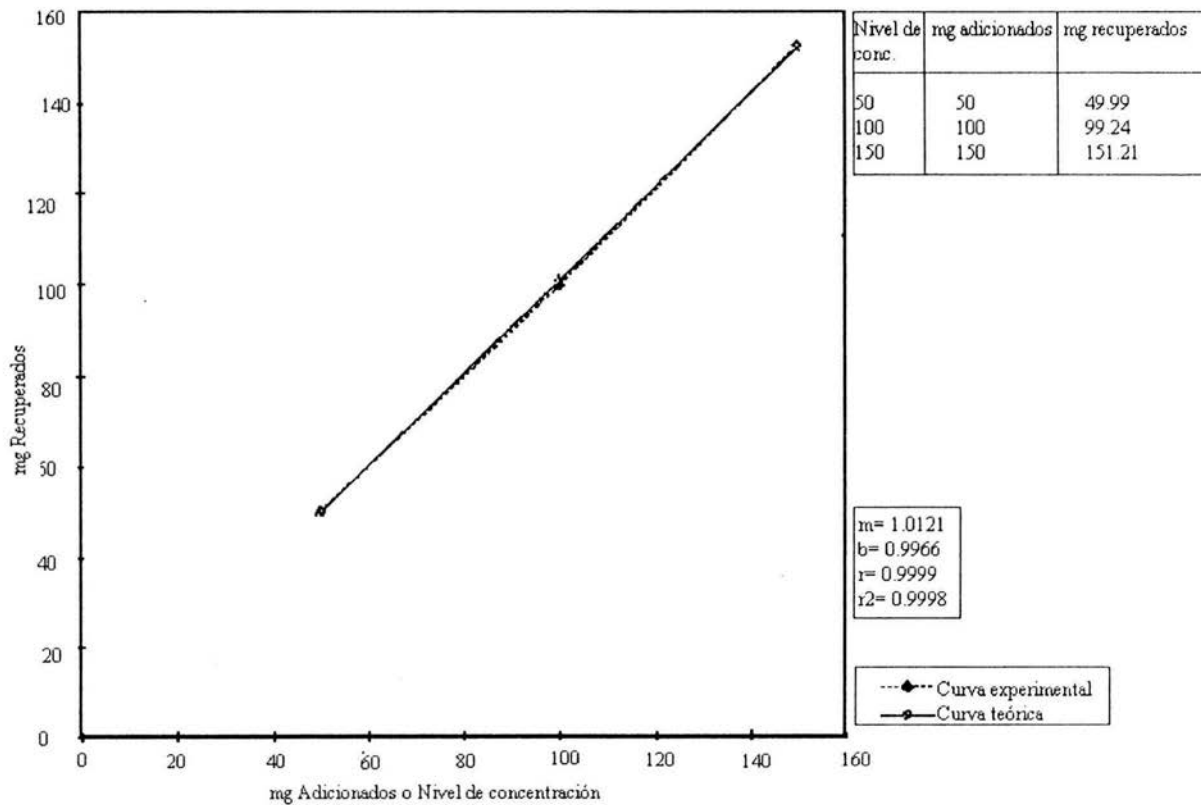
Gráfica No. 1 Linealidad del sistema (primer día) VM, validación



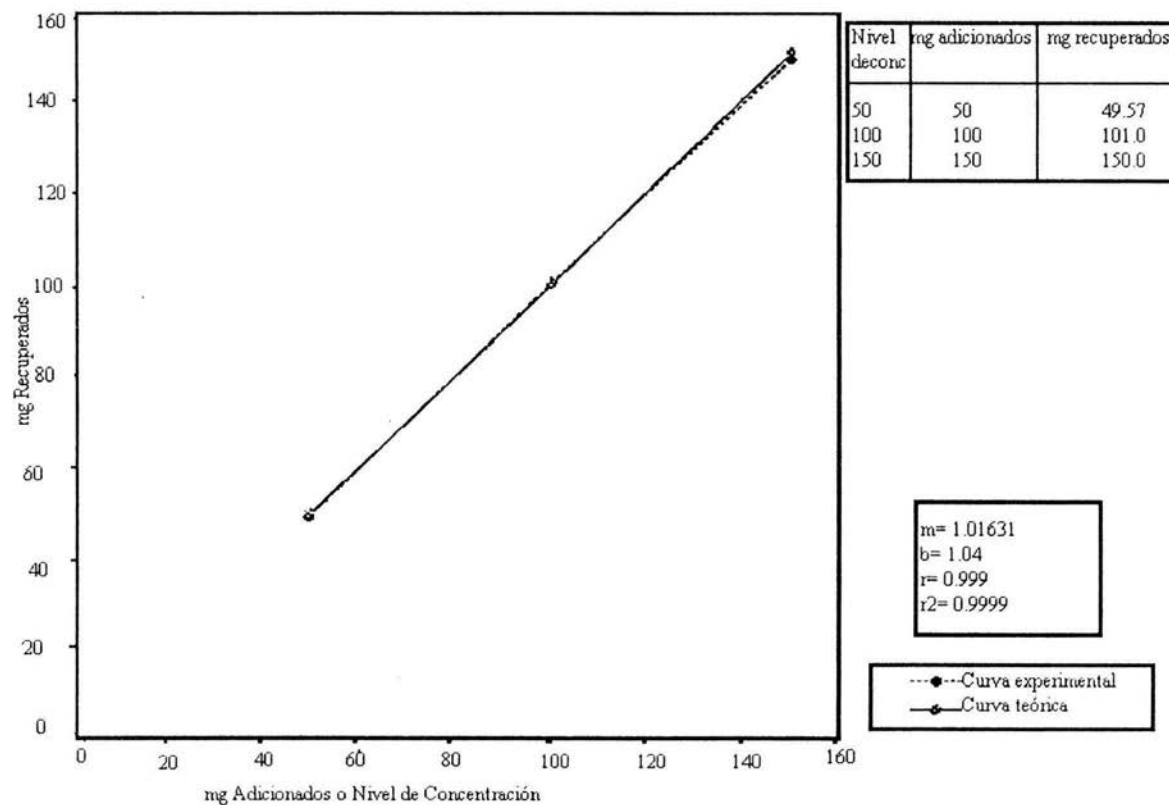
Gráfica No. 2 Linealidad del sistema (segundo día) VM validación



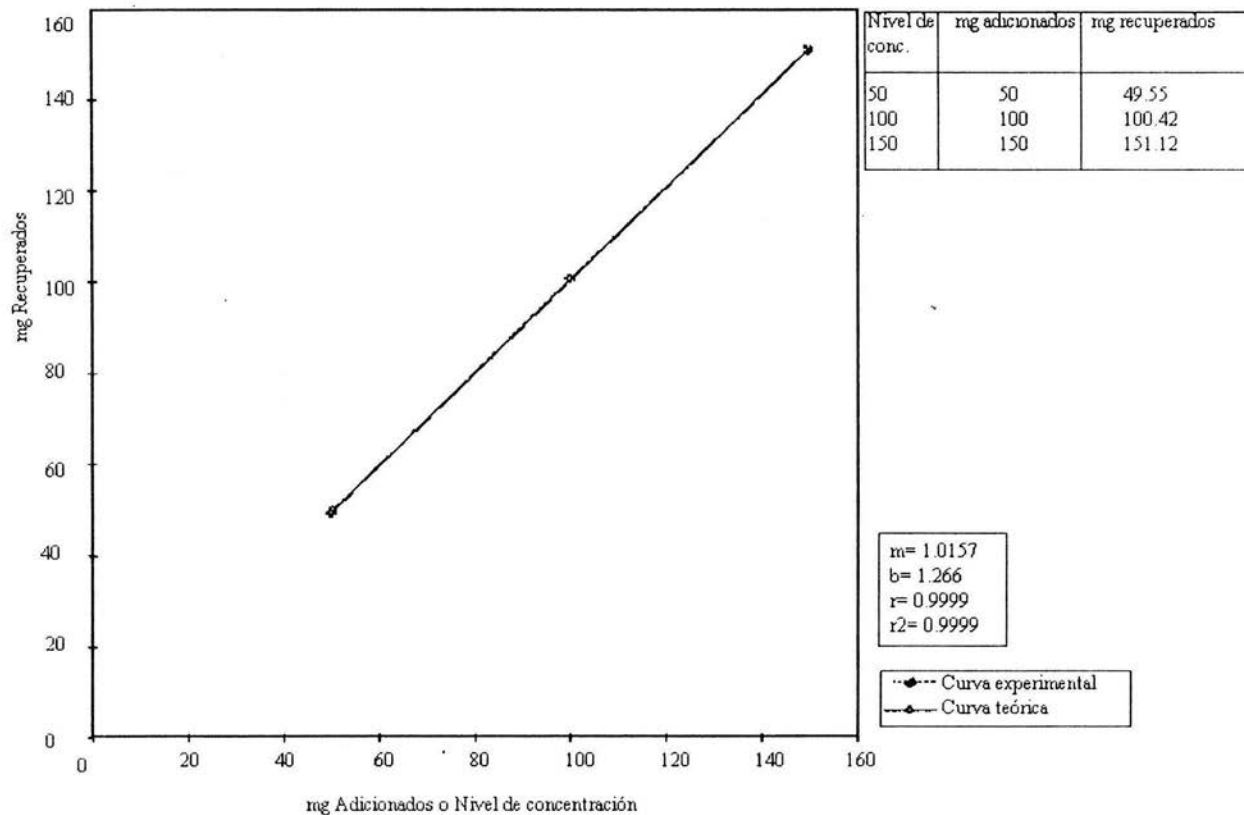
Gráfica No. 3 Linealidad del método VM, validación F.F. solución



Gráfica No. 4 Linealidad del método VM, validación F.F. Tabletas



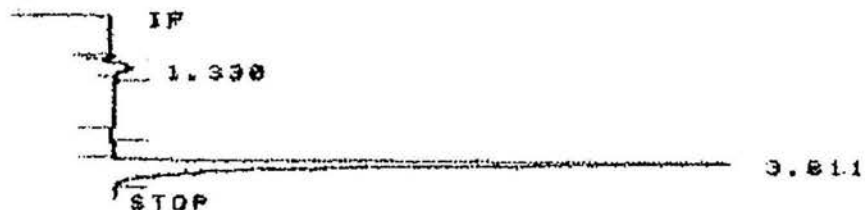
Gráfica No. 5 Linealidad del método VM, validación F.F. suspensión



ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

*
*
*
*

* RUN # 62 JAN 16, 1996 22:17:40
START



RUN# 62 JAN 16, 1996 22:17:40

ATP 600 LOTE 044-A ANALIZO. ORLANDO J.J.

AREA%

RT	AREA	TYPE	WIDTH	AREA%
1.330	226649	PV	.250	4.68548
3.611	4412586	GB	.173	95.11453

TOTAL AREA=4639235
MUL FACTOR=1.0000E+00