

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

"IMPLEMENTACIÓN DE METODOLOGÍA PARA ÁCIDO VALPROICO POR
CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN Y VALIDACIÓN POR
CROMATOGRÁFIA DE GASES CON DETECTOR SELECTIVO DE MASAS EN
MUESTRAS SÉRICAS"



Para optar al título de
Químico Farmacéutico

Guatemala, Julio del 2003

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
BIBLIOTECA CENTRAL

DL
06
T(2129)

1. JUNTA DIRECTIVA

Decano	M.Sc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán
Secretaria	Licda. Jannette Magali Sandoval de Cardona
Vocal I	Licda. Gloria Elizabeth Navas Escobedo
Vocal II	Lic. Juan Francisco Pérez Sabino
Vocal III	Dr. Federico Adolfo Richter Martinez
Vocal IV	Br. Carlos Enrique Serrano
Vocal V	Br. Claudia Lucía Roca Berreondo

2. DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

Acto que dedico :

A Dios :

Por la vida, la sabiduría y guía en cada instante de mi vida.

A mis padres :

Pedro Pinzón Miranda y Estela Guadalupe Meza Martínez de Pinzón por su amor, paciencia , esfuerzos, sacrificios y que sin su apoyo no hubiese alcanzado esta meta.

A mi hermano :

Rodolfo Pinzón Meza, con mucho cariño.

A mis sobrinos :

Kevin Rodolfo y Dana Maite, por ser muy especiales en mi vida.

A mi novia :

Reina Consuelo García Guzmán, a quien amo con todo mi corazón y por ser la fuente de inspiración en mi vida.

A toda mi familia :

Cariñosamente.

A mis amigos :

Por los gratos momentos compartidos.

Agradecimientos :

A la Licenciada Fabiola Prado de Micheo por su asesoría y su incondicional apoyo y amistad en tiempos difíciles.

A la Licenciada María Antonia Pardo de Chávez por la experiencia transmitida a través de sus consejos y sugerencias.

A la Licenciada María del Carmen Samayoa por su invaluable apoyo en el laboratorio.

Al departamento de Toxicología.

A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

3. INDICE

1. Junta Directiva	1
2. Dedicatorias y Agradecimientos	2
3. Índice	3
4. Resumen	4
5. Introducción	6
6. Antecedentes	8
7. Justificaciones	12
8. Objetivos	13
9. Hipótesis	14
10. Materiales y Métodos	15
11. Resultados	22
12. Discusión de Resultados	26
13. Conclusiones	29
14. Recomendaciones	30
15. Bibliografía	31
16. Anexos	34

4. RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue validar metodologías de cuantificación de ácido valproico en suero empleando cromatografía líquida de alta resolución ó cromatografía gaseosa con detector selectivo de masas. Validar un método implica implementar el mismo y luego seguir un ordenamiento estricto de repeticiones determinando especificidad, linealidad, precisión, exactitud, límite de cuantificación que estadísticamente garanticen que los resultados obtenidos son de completa confianza.

Inicialmente se establecieron las condiciones experimentales de análisis (Anexo No.1). Para cromatografía líquida se determinó el tipo y tamaño de columna, las proporciones de los componentes de la fase móvil y las condiciones del equipo. Se llevó a cabo el procedimiento analítico (14) a partir de la preparación de derivados de ésteres de fenacilo de los ácidos valproico, como analito y caproico como estándar interno con α -bromoacetofenona. Se empleó detector ultravioleta a longitud de onda de 246 nm. Se trabajó con columna LiChrospher 100 RP 18 (5 μ m), 125 x 4 mm d.i. y como fase móvil metanol/agua (80/20). Se obtuvo buena resolución y separación de los ácidos entre si y del frente del solvente. La concentración más adecuada de ácido caproico (estándar interno) en relación a la respuesta del ácido valproico, resultó ser 8 mg%.

La especificidad del método se estableció analizando un blanco de muestra, (suero sin ácido valproico ni ácido caproico) donde no se observaron sustancias interferentes que tuvieran el mismo tiempo de retención de los compuestos en estudio.

Se hicieron ensayos preliminares con tres concentraciones de ácido valproico en solución acuosa (5, 10 y 15 mg%), comprobando la linealidad en este rango. El inconveniente de este método es el tiempo prolongado para su realización en casos de necesidad de respuesta rápida. Razón por la que en este estudio no se continuó con la validación.

En forma similar, con el método por cromatografía de gases con detector selectivo de masas, se determinaron las condiciones experimentales de análisis y las condiciones del equipo (Anexo No.2). Se usó cloroformo como solvente de extracción, para la identificación se empleó metanol como solvente de inyección. Entre varios compuestos se seleccionó ácido capríco como estándar interno, habiéndose encontrado 25 mg% como la mejor concentración.

Al comprobarse que este método requiere menor tiempo de desarrollo, se continuó con la validación. Se hicieron curvas de calibración de estándares de ácido valpróico en medio acuoso, (0.5 - 19.5mg%) y en muestras séricas con las mismas concentraciones.

La especificidad se estableció con el análisis de un suero sin ácido valpróico ni capríco. No se encontró ninguna sustancia que con el mismo tiempo de retención en relación a los ácidos valpróico y capríco, actuara como interferente.

Para la validación del método se usaron los parámetros establecidos por la USP XXIV: exactitud, precisión, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad y rango, a partir de muestras séricas a las que se les adicionaron diferentes concentraciones de ácido valpróico.

Se encontró el límite de detección cuantificable en 2 mg% y la linealidad en un rango de 2 - 14.5 mg% con un coeficiente de correlación de 0.9993. La exactitud y la precisión se determinaron calculando el porcentaje de recuperación y el coeficiente de variación de los resultados correspondientes a las concentraciones séricas ensayadas, obteniéndose un rango de 96.10% a 107.65% con un coeficiente de variación de 0.44 a 2.14, dentro del rango lineal.

En conclusión, con la metodología analítica por cromatografía gaseosa con detector selectivo de masas, se puede cuantificar ácido valpróico en muestras séricas dentro de un rango de 2 - 14.5 mg% cumpliendo con todos los parámetros de validación según la Farmacopea de los Estados Unidos (USP XXIV).

5. INTRODUCCIÓN

La epilepsia es un trastorno frecuente, afecta a muchas personas. Se han identificado más de 40 formas diferentes de epilepsia. Las convulsiones provocadas por este mal, suelen producir alteración transitoria del conocimiento, dejando al individuo en riesgo de lesión corporal y a menudo obstaculizando su vida normal. No se cuenta con profilaxia completamente eficaz, ni con métodos de curación. Para el paciente, cumplir con el régimen prescrito es una necesidad de primer orden. Se trata de una terapia a largo plazo con medicamentos que producen efectos adversos. (11)

El ácido valpróico en niveles séricos de 5 a 10 mg%, es de utilidad en la reducción de la frecuencia de las crisis tónico-clónicas y particularmente de las crisis de ausencia ó pequeño mal.

A dosis usuales los efectos adversos más comunes del ácido valpróico son náusea, vómito y otras molestias gastrointestinales como dolor abdominal y agruras; la sedación es poco frecuente. Otros efectos adversos reversibles que se desarrollan en un pequeño número de individuos, incluyen aumento de peso, mayor apetito y caída del cabello. La toxicidad idiosincrática se limita en gran parte a la hepatotoxicidad, el riesgo es mayor para los pacientes menores de dos años y para aquellos que toman múltiples fármacos. (5,16)

Con el desarrollo de tecnologías analíticas modernas, se presenta la oportunidad de poder implementar métodos con los que se obtienen ventajas como menor volumen de muestra, menor límite de detección, mejor reproducibilidad, mayor nivel de sensibilidad, disminución en el tiempo de análisis, eliminación de interferencias, que determinan un mejor resultado. De esta manera se puede satisfacer la demanda cada vez mayor de la medida de niveles séricos de ácido valpróico en el tratamiento de la epilepsia.

En el presente trabajo se implementó un método por cromatografía líquida de alta resolución es decir se estudiaron las condiciones para cuantificar ácido valpróico por esta vía, pero se encontró como obstáculo el tiempo prolongado del análisis. Ante esta situación se estudió un método para ácido valpróico por cromatografía de gases con detector selectivo de masas, el que si permitió el

análisis en un tiempo corto suficientemente adecuado para dar resultados en forma rápida, lo cual fue determinante para proceder a su validación.

La implementación y validación de un método analítico, es el proceso que establece si el mismo, cumple con el desempeño y las características de los parámetros aplicables a muestras biológicas como precisión, exactitud, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad recomendados por la USP XXIV (21). Es la forma de asegurar que el método en estudio produce resultados confiables.

6. ANTECEDENTES

El análisis cuantitativo del ácido valpróico en muestras séricas ha sido ampliamente estudiado, encontrándose diversos procedimientos que emplean cromatografía de gases con detector de ionización de llama, cromatografía líquida de alta resolución, inmunoensayo enzimático, y cromatografía gaseosa-con detector selectivo de masas. (2)

Baselt R. En 1980 estudió un método para la cuantificación de ácido valpróico en muestras séricas por cromatografía de gases, utilizó como estándar interno ácido caprónico en ácido clorhídrico y como solvente de extracción cloroformo. Trabajó con una columna SP-1000 al 10 % en Chromosorb W 100/120 mesh con un diámetro interno de 1.5 m x 2mm, a un flujo de nitrógeno de 50 ml/min. La sensibilidad encontrada fue de 5 mg/L, la linealidad entre 10 y 200 mg/L, el coeficiente de variación de 2 a 5%. La recuperación no fue establecida. (3).

Goudie, J. H. Empleó como estándar interno ácido ciclohexanocarboxílico en ácido clorhídrico y posterior extracción con acetato de etilo, inyectando la fase orgánica en el cromatógrafo de gases. Utilizó una columna SP-1000 al 3% en Gas Chrom Q 80-100 mesh a una temperatura de 175°C con un flujo de nitrógeno de 30 mL/min. (13).

Manfredi, C. y Zinterhofer, L., ensayaron un método para cuantificación de ácido valpróico y etosuximida usando ácido ciclohexanocarboxílico y α,α -dietilmetilsuccinamida como estándares internos respectivamente. Los autores trataron la muestra acidificada con carbón activado y para la extracción final de los compuestos mezcla de diclorometano/isopropanol/éter/acetato de etilo. Para evitar la pérdida de ácido valproico durante la evaporación, adicionaron acetato de etilo. Usaron cromatógrafo de gases, provisto de una columna SP-1000 al 10 % en Supelcoport 80/100, 91 cm x 2 mm de diámetro interno. El flujo de nitrógeno de 30mL/min a 190° C, isotérmico, puerto de inyección a 200°C y temperatura del detector de 300°C. Con este método se alcanzó una sensibilidad de aproximadamente 1 mg/L. El porcentaje de recuperación fue de 89% para el ácido valpróico y el coeficiente de variación de 2.7% (18).

Davison, J.P. propuso el análisis simultáneo de ácido valproico, trimetadiona y etosuximida, se cuantificaron por cromatografía de gases empleando columna de 10% OV-17 y α, α -dimetil- β -metil-succinamida como estándar interno. (7)

Debido a la alta volatilidad del ácido valproico, Gast, B. Y Thoma, J. ensayaron un método corto y con adecuada sensibilidad, empleando columna de extracción sólida "Clin-Elute[®]" (Analytichem International), en combinación con un agente metilador "Meth prep. I" (Applied Science Lab.). Obtuvieron 100% de recuperación y la linealidad encontrada fue entre 40 a 180 microgramos por mililitro. (11)

Otro método por cromatografía de gases, rápido, simple y reproducible para el análisis de ácido valproico en suero fue descrito por Petrozolin, A.K. y Ponzio, J. L. Similar a otras técnicas, usaron como estándar interno ácido ciclohexanocarboxílico y cloroformo como solvente de extracción. La separación se llevó a cabo isotérmicamente a 170°C, con detector de ionización de llama empleando columna SP-1000 al 10 % en Supelcoport 80/100 mesh y con flujo de nitrógeno de 30 mL/min. El rango de recuperación fue de 91 al 98 %, el coeficiente de variación fue por debajo del 2% y el coeficiente de correlación del 0.9996 (20)

Fullinfaw, R. O. y Marty, J. Utilizaron como estándar interno alcohol bencílico atribuyéndole como ventajas buena extracción, solubilidad en agua y ácidos y mucha estabilidad. Recomendaron realizar extracción ácida con cloroformo e inyección directa de la fase orgánica en el cromatógrafo de gases, utilizando detector de ionización de llama a 200°C, temperatura de la columna a 145°C, con flujo de nitrógeno de 50 mL/min. (9)

Otro procedimiento rápido por medio de cromatografía gaseosa para la determinación de concentraciones séricas de ácido valproico fue desarrollado por Frederick, D. L. y colaboradores. Trabajaron con suero acidificado con ácido sulfúrico extraído con cloroformo, usaron como estándar interno, ácido ciclohexanocarboxílico e inyectaron la fase orgánica directamente. Utilizaron columna de vidrio de 6 pies de largo empacada con GP 2%, SP-2510 DA, en Supelosport 100/120 mesh a temperatura de 180°C con flujo de nitrógeno de 40 mL/min. El tiempo de retención

del ácido valproico y el estándar interno fue de 0.72 minutos y 0.95 minutos respectivamente. El porcentaje de recuperación fue del 100%. (8)

Kwong, T. y colaboradores describieron un procedimiento similar al citado en el párrafo anterior, emplearon como estándar interno α,α -dimetil- β -succinamida, acidificación con ácido clorhídrico y extracción con el mismo solvente. Las condiciones cromatográficas utilizadas incluyeron inyección a 130°C y flujo de nitrógeno de 25 mL/min. El tiempo de retención resultante fue de 1.13 minutos para el ácido valproico, linealidad entre 10 μ g/mL y 500 μ g/mL con una precisión del 5.0% para 50mg/L y 2.9% para 150 mg/L. (17)

Según otros autores el análisis del ácido valproico por cromatografía de gases, con derivatización formando metil, butil o fenacil ésteres del ácido, constituye un procedimiento muy largo. Por esta razón, desarrollaron un método rápido, simple y reproducible sin derivatizar, usando ácido capríco como estándar interno y éter etílico para la extracción del suero acidificado con ácido sulfúrico 18N.. Obtuvieron tiempo normal de 5.6 minutos para el ácido valproico. El coeficiente de correlación fue de 0.998 con una linealidad de 0.0 a 250.0 mg/L, el coeficiente de variación fue menor del 3% (22)

Gupta, R. N. y colaboradores en 1979, desarrollaron una metodología formando ésteres de fenacilo del ácido valproico por derivatización con α -Bromoacetofenona, comprobando que tanto el ácido valproico como el estándar interno usado no se volatilizaron durante la evaporación. La separación y cuantificación del ácido valproico fue llevada a cabo por cromatografía gaseosa obteniendo linealidad entre 10mg/L y 400 mg/L. (14)

Gupta, R. N. y colaboradores en otro trabajo en 1979, aprovechando que los derivados de ésteres de fenacilo mejoran su absorbancia en la región ultra violeta, desarrollaron una metodología por cromatografía líquida de alta resolución usando detector ultra violeta. El rango de linealidad fue de 10 a 200 mg/L y el límite de cuantificación fue de 2 mg/L. (15)

Bannister, S. J. y colaboradores describieron ensayos para cuantificar etosuximida y valproato en suero empleando la técnica de cromatografía líquida a alta resolución. La volatilidad de estos dos compuestos y la baja absorbancia fotométrica del valproato en el rango ultra violeta dificultaron su análisis, sugirieron controlar la evaporación usando un módulo de evaporación "Technicon", para proporcionar una recuperación precisa y detección a una longitud de onda de 240nm. La linealidad encontrada va de 0 a 300 mg/L con un coeficiente de variación del 5%. (1)

Gary, M. S. y colaboradores analizaron el valproato de sodio empleando una técnica de ionización-química/espectro de masas sin derivatización, el estándar interno usado fue valproato marcado [$^{13}\text{C}_2$]. Este procedimiento permitió el análisis simultáneo del valproato de sodio con otros anticonvulsivantes, determinando 40 muestras por hora. Obtuvieron un coeficiente de correlación de 0.999 (10)

7. JUSTIFICACIONES

No todos los tipos de epilepsia se controlan con un solo fármaco, cuando se utiliza la terapia multifármaco se incrementa el riesgo de efectos adversos por las interferencias entre los medicamentos y se corre el riesgo que afecten la acción terapéutica deseada. Una forma de conocer si se está en estas situaciones, es la medición de los niveles séricos de los anticonvulsivantes utilizados.

Si a pesar de la dosificación correcta y del cumplimiento del paciente en cuanto a la administración del ácido valproico, la respuesta terapéutica no es satisfactoria, la cuantificación del principio activo en el suero del paciente puede definir si el medicamento está o no presente en la cantidad suficiente para efectuar su acción.

También es importante contar en el Centro de Información y Asesoría Toxicológica, con un método validado, de alta sensibilidad, rapidez y confiabilidad que pueda y establecer la diferencia entre los niveles séricos terapéuticos y tóxicos del ácido valproico.



8. OBJETIVOS

8.1 GENERAL

8.1.1 Validar metodologías de cuantificación de ácido valproico en suero empleando cromatografía líquida de alta resolución ó cromatografía de gases con detector selectivo de masas.

8.2 ESPECIFICOS

- 8.2.1 Implementar el análisis de ácido valproico empleando cromatografía líquida de alta resolución y cromatografía de gases con detector selectivo de masas.
- 8.2.2 Validar el método para la determinación de ácido valproico en muestras séricas, que resulte con el menor tiempo de ejecución.
- 8.2.3 Permitir que el Centro de Información y Asesoría Toxicológica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, cumpla con el análisis de ácido valproico en suero, que es frecuentemente solicitado por los servicios de neurología.

9. HIPÓTESIS

9.1 Empleando cromatografía líquida de alta resolución ó cromatografía de gases con detector selectivo de masas, se puede determinar con precisión, exactitud y rapidez , la concentración de ácido valproico en muestras séricas.

10. MATERIALES Y MÉTODOS

10.1. UNIVERSO DE TRABAJO

El universo de éste trabajo para análisis de ácido valproico lo constituyen:

- Métodos de análisis empleando cromatografía líquida de alta resolución
- Métodos de análisis por cromatografía de gases con detector selectivo de masas para cuantificar ácido valpróico.
- Muestras séricas contaminadas con ácido valpróico a diferentes concentraciones.

10.2. MEDIOS

Recursos Humanos

Autor : Mario René Pinzón Meza

Asesores : Licda. Fabiola Prado de Micheo

Licda. María Antonia Pardo de Chávez

Instalaciones

Departamento de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, ubicado en 3ª. Calle 6-47 Zona 1 de la ciudad de Guatemala.

10.3 RECURSOS MATERIALES

Equipo

- Cromatógrafo Líquido de alta resolución Hewlett Packard serie 1050 provisto de un detector UV de longitud de onda variable y un integrador Hewlett Packard serie II, HP 3396.
- Columna Lichrocart 125 x 4 mm RP-18 (5µm) Merck.
- Jeringa para cromatografía de 50 µL.
- Sistema de filtración de muestras.
- Sistema de filtración de solventes.
- Sistema de desgasificación de solventes.
- Membrana millipore 0.45 µm x 13 mm para muestras.

- Membrana millipore 0.45 μm x 47 mm para solventes.
- Fase móvil: metanol/agua desionizada y destilada en vidrio. (80:20)
- Cromatógrafo de gases Hewlett Packard Modelo 5890 Serie II con detector selectivo de masas (MSD) Modelo 5971A.
- Columna HP-5 (Crosslinked 5% PH ME Siloxane), espesor del recubrimiento: 0.33 μm , longitud: 25 m de largo y diámetro interno: 0.22 mm.
- Computadora HP, con CPU HP Brio, Hewlett Packard.
- Impresora Epson Stylus C40UX
- Balanza analítica.
- Agitador eléctrico (Vortex).
- Refrigerador.
- Centrífuga SERO-FUGE II

Reactivos

- Solución concentrada de ácido valpróico (sal de magnesio) 100 mg% en agua.
- Soluciones de trabajo acuosas y séricas: 0.5 a 19.5 mg% de ácido valpróico.
- Soluciones de trabajo acuosas: 5, 10 y 15 mg% de ácido valpróico.
- Solución concentrada de estándar interno de ácido capróico: 100 mg % en ácido clorhídrico 3 M.
- Solución concentrada de estándar interno de ácido caproico: 8 mg % en ácido clorhídrico 3 M.
- Solución de trabajo de estándar interno: 25 mg% en ácido clorhídrico 3 M
- Cloroformo grado HPLC.
- Metanol grado HPLC.
- Agua desionizada y destilada en vidrio
- Ácido Clorhídrico 3 M.
- Gas Helio 99.99 %

Cristalería

- Balones volumétricos de 10 y 50 mL.
- Pipeta volumétrica de 5 mL
- Beakers de 50 mL.
- Embudos.
- Pipetas Pasteur.
- Tubos de vidrio con tapadera de rosca de 100x13m.
- Jeringa para cromatografía de gases de 10 μ L.
- Micropipetas de volumen variado.
- Tubos de 100 x 13 mm con tapón con empaque de teflón.
- Gradillas para tubos
- Succionador de hule

10.4 METODOLOGÍA

Reactivos

A) *Solución concentrada de Ácido Valpróico en agua (100mg%).*

Pesar 0.05385g de valproato de magnesio de pureza (98%), disolver con agua desionizada y destilada en vidrio, transferir a un balón volumétrico de 50 mL y aforar.

B) *Soluciones de trabajo de ácido valpróico en agua.*

0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 14, 14.5, 15, 17, 19 y 19.5 mg %

Medir en balones volumétricos de 10 mL, alícuotas de la solución concentrada de ácido valproico (100 mg%) de 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1.0, 1.4, 1.45, 1.5, 1.7, 1.9, 1.95 mL, aforar con agua desionizada y destilada en vidrio.

C) **Suero contaminado con ácido valproico (100mg %).**

Pesar 0.02693 g de valproato de magnesio (pureza 98%) transferirlo a un balón volumétrico de 25 mL, disolver y aforar con suero libre del ácido.

D) **Muestras séricas contaminadas con ácido valproico**

0.5, 1, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 14.5, 15, 17, y 19 mg %

Partiendo del suero contaminado con ácido valproico (100mg%), transferir alícuotas de 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.45, 1.5, 1.7, 1.9 mL a balones volumétricos de 10 mL y aforar con suero libre del ácido.

E) **Soluciones de trabajo para cromatografía líquida de alta resolución: 5, 10, 15 mg%**

Medir en balones volumétricos de 10 mL, alícuotas de 0.5, 1.0 y 1.5 mL de la solución concentrada de ácido valproico (100 mg%) y aforar con agua desionizada y destilada en vidrio.

F) **Solución concentrada de Ácido Caprónico: 100mg%**

Medir 54 μ L de ácido caprónico (densidad: 0.9265) en un balón volumétrico de 50 mL y aforar con ácido clorhídrico 3M.

G) **Solución de trabajo de Ácido Caprónico: 25 mg%.**

En un balón volumétrico de 100 mL medir 25 mL de la solución "concentrada" y aforar con ácido clorhídrico 3M.

H) **Solución de trabajo de Ácido Caprónico: 8 mg%.**

En un balón volumétrico de 100 mL medir 8 mL de la solución "concentrada" y aforar con HCl 3M.

I) **Ácido Clorhídrico 3 M.**

Medir 50 ml de ácido clorhídrico concentrado (densidad 1.19) y aforar en balón volumétrico de 200 ml con agua desionizada y destilada en vidrio.

PROCEDIMIENTOS :**Por cromatografía líquida de alta resolución:**

- Transferir 0.25 mL de las soluciones de trabajo a diferentes tubos de rosca de 16 x 100 mm con tapón con empaque de teflón.
- Agregar 0.25 mL de la solución de trabajo de ácido capríco (estándar interno) a cada uno y mezclar en agitador eléctrico.
- Adicionar 2 mL de pentano y agitar por 2 minutos en agitador eléctrico a velocidad media.
- Centrifugar por 5 minutos a 2500 rpm.
- Descartar el sobrenadante.
- Agregar a cada tubo, 20 μ L de trietilamina y 20 μ L de α -bromoacetofenona.
- Colocar los tubos en un bloque eléctrico múltiple a 50-55 °C por una hora; y llevar a sequedad bajo corriente de nitrógeno a la misma temperatura.
- Reconstituir el residuo con 50 μ L de metanol y mezclar en vortex, a velocidad media.
- Inyectar 20 μ L en el Cromatógrafo Líquido a una longitud de onda de 246 nm con un flujo de la fase móvil (metanol:agua 4/1) de 0.6 mL/minuto.

Por cromatografía de gases con detector selectivo de masas:

- Transferir 0.4 mL de suero y soluciones de trabajo a diferentes tubos de rosca de 100 x 13 mm con tapón con empaque de teflón.
- Agregar 0.4 mL de la solución de trabajo de ácido capríco (estándar interno) a cada uno y mezclar en agitador eléctrico.
- Adicionar a cada uno 0.6 mL de cloroformo y agitar por 30 segundos en vortex, a velocidad media.
- Centrifugar por 5 minutos a 2500 rpm.
- Descartar el sobrenadante.
- Transferir la fase de cloroformo a un tubo de rosca de 100 x 13 mm con tapón de teflón.
- Inyectar 1 μ L en el cromatógrafo de gases con detector selectivo de masas.

10.5 Análisis Estadístico:

Exactitud :

Porcentaje de recuperación, se calcula de la siguiente manera:

$$\% = \frac{\text{cantidad encontrada}}{\text{cantidad original}} \times 100$$

Se calculó la desviación estándar y el coeficiente de variación en base al porcentaje de recuperación.

Se estableció la relación lineal entre la concentración detectada y la concentración estándar u original (linealidad).

Precisión :

Se estableció con los resultados obtenidos analizando 5 muestras de cada concentración. Se determinó el promedio, la desviación estándar, el coeficiente de variación.

Especificidad :

Se determinó con el análisis de muestras de suero sin ácido valproico ni ácido capróico y en análisis de una solución acuosa sin los ácidos valproico ni vapróico .

Límite de detección :

Se obtuvo del análisis de cinco réplicas de cada concentración (0.5, 1, 2, 4, 5, 6, 8; 10, 12, 14, 14.5, 15, 17, 19 mg%). Se determinó el promedio y la desviación estándar de cada grupo de réplicas de cada concentración.

Límite de cuantificación :

Se procedió de la misma manera que para el límite de detección. En esta prueba se encontró la concentración del principio activo que es posible detectar y cuantificar.

Linealidad :

Se realizó midiendo la concentración de ácido valproico a distintas concentraciones : 3 debajo del rango normal de ácido valproico en suero, 4 adentro y 3 arriba del mismo. Esta prueba se realizó en quintuplicado y con el análisis matemático de regresión lineal (método de mínimos cuadrados).

11. RESULTADOS

Para la implementación del método cuantitativo de ácido valproico por cromatografía líquida de alta resolución se usaron dos columnas, Lichrospher 100 RP 18 (5 μ m), 125 x 4 mm d.i. y MOS Hypersil (5 μ m) 100 x 2.5 mm d.i. Como fase móvil se utilizó metanol/agua en las siguientes proporciones, 75/25; 70/30 y 80/20. Se seleccionó la primera columna y la proporción de metanol/agua 80/20. Ambas condiciones dieron como resultado una mejor resolución y separación de los ácidos valproico y caproico (estándar interno) entre sí, como del frente del solvente. Se obtuvieron tiempos de retención aproximados de 12 y 8 minutos respectivamente. (Cromatograma No. II).

Con el propósito de establecer el mejor método de extracción del ácido valproico, se hicieron ensayos empleando pentano de acuerdo al método original (14), hexano y cloroformo, prefiriendo el primero por su alta volatilidad que facilitó la evaporación después de la formación de los derivados de ésteres de fenacilo.

De las sustancias probadas como estándar interno, fenacetina, alcohol bencilico y ácido caproico, se seleccionó el tercero por que debido a su estructura química análoga, mostró un tiempo de retención adecuado con relación al del ácido valproico. Después de varios ensayos se determinó 8 mg% como concentración adecuada para el estándar interno.

Habiéndose establecido las condiciones de trabajo y la columna más conveniente (Anexo No. 1), se demostró la especificidad por medio del análisis de blanco de muestra, (suero sin ácido valproico ni ácido caproico) comprobándose que ningún compuesto interfirió con los tiempos de retención de los ácidos valproico y caproico (Cromatograma I).

Se hicieron ensayos de ácido valproico en solución acuosa, a concentraciones de 5, 10 y 15 mg% (Cromatograma No. II). En el cuadro No. 1 se presentan las relaciones de altura de ácido valproico/ácido caproico de las concentraciones ensayadas, expresadas en mg% y en gráfica No 1, la curva de calibración correspondiente, obteniéndose un coeficiente de correlación de 0.9998, con lo que se consiguió la implementación del método.

Para la implementación y validación del método por cromatografía de gases con detector selectivo de masas, se establecieron las condiciones apropiadas para obtener una buena resolución del ácido valproico y del estándar interno (ácido caproico), previa su identificación (Anexo No.2).

Se ensayaron diferentes solventes para extracción (pentano, hexano y cloroformo), con los dos primeros se observó mucha variación en las alturas de los picos en inyecciones repetidas de la misma concentración, prefiriéndose el cloroformo, como más adecuado y consistente.

Para la selección del estándar interno, se utilizaron fenacetina, alcohol bencílico y el ácido caproico, por las razones expuestas en el método por cromatografía de alta resolución, también se eligió el ácido caproico. En el espectro No. 1 se encuentran identificados los dos compuestos con un tiempo de retención de 5.61 para el ácido caproico y de 6.82 para el ácido valproico.

La especificidad se comprobó analizando muestras acuosas sin suero y muestras de suero, ambas sin ácido valproico ni ácido caproico. No se observó ningún compuesto interferente con el mismo tiempo de retención de los ácidos valproico y caproico. (Espectro No.1)

Considerando que el método por cromatografía de gases con detector selectivo de masas requiere menor tiempo que por cromatografía líquida de alta resolución, se establecieron las condiciones de trabajo (Anexo No. 2) y se procedió a su validación.

Tomando en cuenta los niveles terapéuticos del ácido valproico (5-10mg%), se establecieron puntos de referencia por debajo (0.5, 1, 2, 4 mg%) dentro (5, 6, 8, 10 mg%) y arriba (12, 14, 14.5, 15, 17, 19 mg%) de los mismos, trabajándose los estándares preparados en agua y las muestras séricas a las concentraciones indicadas en quintuplicado. (Cuadro No. 2 y 3). La concentración establecida como más adecuada de ácido caproico (estándar interno) fue de 25 mg %.

Los espectros No. II, III y IV corresponden a las concentraciones de algunos puntos de la curva de calibración del ácido valpróico en muestras acuosas y los correspondientes con muestras séricas se encuentran en los espectros No. V, VI y VII.

La linealidad se estableció en el rango de 2 a 14.5 mg% como se puede observar en el cuadro No. 6, donde se presentan los resultados obtenidos para la curva de calibración preparada con soluciones acuosas. El mismo cuadro muestra el promedio de las relaciones de las áreas del ácido valpróico/ácido caprónico de las cinco determinaciones efectuadas para cada concentración, expresando los resultados en mg %. En la gráfica No. 4, se muestra la curva de calibración correspondiente de donde se obtuvo el coeficiente de correlación con un valor de 0.9994.

Los resultados de las muestras séricas con las concentraciones de ácido valpróico estudiadas, se presentan en los cuadros No 3 y 7. Los resultados de las muestras en medio acuoso, se presentan en los cuadros No. 2 y 6. Con estos valores se determinó la linealidad en el rango de 2 mg% a 14.5% con un coeficiente de correlación de 0.9993. (Cuadro No. 7 y Gráfica No. 5).

La exactitud se determinó por el porcentaje de recuperación de las concentraciones de las muestras séricas calculadas a partir de la curva de los estándares en agua. En el cuadro No. 4 se puede observar una variación de 96.1% a 107.6% con una desviación estándar de 0.44 a 2.21 y un coeficiente de variación de 0.45 - 2.15, en el rango lineal (2 mg % a 14.5 mg %).

La precisión se determinó de acuerdo a la concordancia de los valores de las cinco réplicas de las muestras séricas entre sí. Expresada en términos de desviación estándar o de coeficiente de variación se obtuvieron valores de 0.025 a 0.22 y de 0.44 a 2.14 respectivamente, siempre dentro del rango lineal (2mg% a 14.5 mg%). (Cuadro No. 5).

En las concentraciones de 0.5, 1, 15, 17 y 19 mg%, los porcentajes de recuperación de las cinco réplicas estuvieron alejados de los valores reales, por lo que se consideraron inexactos y se rechazaron. (Gráfica No. 2 y 3)

El límite de detección cuantificable se estableció en 2 mg% , ya que a ese nivel la precisión y la exactitud todavía fueron aceptables.

Para la implementación y validación del método para ácido valpróico por cromatografía gaseosa con detector selectivo de masas (10), se ensayaron tres solventes de extracción (pentano, hexano y cloroformo), se eligió el último por observar menos variación en inyecciones cromatográficas sucesivas de una misma concentración. Otros autores, usaron diferentes solventes para la extracción. El cloroformo se emplea también para la extracción en el análisis de ácido valpróico por otros tipos de cromatografía gaseosa, (3,8,9,13,17,18). En todos los casos, es igualmente importante el uso de pequeños volúmenes, tanto de muestra como de solvente de extracción y la inyección directa del extracto sin someterlo a previa evaporación, para evitar pérdida de ácido valpróico y estándar interno usado.

Así como en cromatografía líquida, se usó ácido caprónico, como el estándar interno más adecuado para la determinación de ácido valpróico, justificando su uso por su estructura química similar, tiempo de retención y resolución. Además del ácido caprónico (3,22) algunos autores refieren ventajas de otros compuestos usados como estándares internos, ácido ciclohexanocarboxílico (8,13,18,20), alcohol bencilico (9), etc. En nuestro caso el ácido caprónico cumplió las expectativas de un estándar interno.

La linealidad quedó establecida en el rango de 2mg% a 14.5% con coeficiente de correlación de 0.9994 (Gráfica No. 4). Se considera como coeficiente de correlación ideal, un valor de 1 (22), algunos autores obtuvieron coeficientes de correlación de 0.9996(19), 0.998(21) y 0.999(9). En la literatura se citan rangos lineales en concentraciones de: 1 a 20 mg% (3), 1 a 50 mg%(16) y de 0 a 30 mg%(1). En las condiciones experimentales los niveles 0.5, 1, 15, 17 y 19mg%, se consideraron fuera del rango lineal.

El límite de detección y cuantificación se determinó en 2 mg%, igual al valor obtenido por Gupta (14). Este límite se asegura la confianza de las mediciones en el rango terapéutico (5 a 10 mg%).

La exactitud y la precisión quedaron demostradas tal y como se indica en los cuadros No. 5 y N° 6, dentro del rango lineal (2mg% - 14.5mg%) calculadas por el porcentaje de recuperación y coeficiente de variación respectivamente, en un rango de 96.1% a 107.6%; y de 0.44 a 2.14. Gast y colaboradores (11) reportan una recuperación del 100%, en un rango de 4 a 18mg%. Petrozolin y colaboradores obtuvieron una variación de 91 al 98% de recuperación, con un coeficiente de variación por debajo del 2%, en un rango de 0 a 24 mg% (20); otros autores citan valores por debajo del 3% de coeficiente de variación (22).

Por lo expuesto, se demostró plenamente que el método ensayado cumple con todos los parámetros estadísticos establecidos por la USP XXIV.

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
BIBLIOTECA CENTRAL

13. CONCLUSIONES

- 13.1 El método para cuantificación de ácido valproico por cromatografía líquida de alta resolución, estudiado en este trabajo, es útil si el tiempo de ejecución para llegar a obtener resultados no es determinante para rendir un informe, (no es el caso para este trabajo).
- 13.2 El método validado para la determinación de ácido valproico por cromatografía de gases con detector selectivo de masas es eficaz, rápido y confiable, permite resultados rápidos, los que por su carácter de validación son de completa confianza.
- 13.3 El método validado para cuantificar ácido valproico por cromatografía de gases con detector selectivo de masas, cumple con los parámetros de exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación y linealidad establecidos por la USP XXIV aplicables a muestras biológicas.
- 13.4 Se demuestra que con el método validado se pueden analizar muestras séricas en concentraciones de 2 a 14.5 mg%, en el que se encuentran los niveles séricos aceptables para obtener efectos terapéuticos deseados de ácido valproico.

14. RECOMENDACIONES

- 14.1 Utilizar el método por cromatografía de gases con detector selectivo de masas para encontrar los niveles séricos de ácido valproico en pacientes que usan el fármaco solo o combinado y asegurar que el tratamiento cumple su objetivo.

- 14.2 Divulgar el servicio de medición de niveles séricos que ofrece el Centro de Información y Asesoría Toxicológica de la Facultad de CCQQ y Farmacia, para beneficio de los pacientes bajo medicación delicada.

15. BIBLIOGRAFÍA

1. BANNISTER, S.J. et. al. 1980. Co-Determination Of Ethosuximide And Valproate By High Performance Liquid Chromatography On The Technicon FAS-LC™ SYSTEM. Clin. Chem. 26(7): 1006.
2. BASELT, R.C. 2000. Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man. Fifth ed. United States of America. Chemical Toxicology Institute. pp. 866-869.
3. BASELT, R.C. 1980. Analytical Procedures for Therapeutic Drug Monitoring and Emergency Toxicology. United States of America. Biomedical Publications. pp. 296-297.
4. BORCH, R.F. 1975. Separation of long chain fatty acids as phenacyl esters by high pressure liquid chromatography. Anal. Chem. 47(14): 2437-2439
5. CURTIS, J.M. 1998. Farmacologia Integrada. España. Editorial Harcourt. pp. 116-118.
6. CHAMBERLAIN, J. 1987. Analysis of Drug in Biological Fluids. Fourth Edition. United States of America. CRC Press. pp. 147-160.
7. DAVISON J.P. 1978. Simultaneous Quantitative Assay Of Valproate Sodium Trimethadione, & Ethosuximide By GLC. Clin. Chem. 24(6): 991.
8. FREDERICK, D.L. et. al. 1979. A Rapid Gas-Liquid Chromatographic Analysis For Valproic Acid In Serum. Clin. Chem. 25(6): 1118.
9. FULLINFAW, R.O. y MARTY, J. 1981. Gas Chromatography Of Valproic Acid, With Benzyl Alcohol As Internal Standard. Clin. Chem. 27(10): 1776.

10. GARY, M.S. et. al. 1980. Measurement of Sodium Valproate in Serum by Direct-Insertion Chemical-Ionization/Mass Spectrometry. Clin. Chem. 25(1): 147-149.
11. GAST, B. y THOMA, J. 1979. GLC Analysis Of Valproic Acid Using An Estuve Extraction And On-Column Methylation. Clin. Chem. 25(6): 1118.
12. GOODMAN Y GILMAN. 1996. LAS BASES FARMACOLOGICAS DE LA TERAPEUTICA. México. 9ª.edición. Editorial Mcgraw-Hill Interamericana. Tomo I pp. 491- 498, 507 - 509.
13. GOUDIE, J.H. 1980. Improved Extraction of Valproic Acid from Serum before Chromatography. Clin. Chem. 26(13): 1929.
14. GUPTA, R.N. et.al. 1979. Valproic Acid in Plasma, as Determined by Liquid Chromatography. Clin. Chem. 25(11): 1984-1985.
15. GUPTA, R.N. et.al. 1979. Gas-Chromatographic Analysis for Valproic Acid as Phenacyl Esters. Clin. Chem. 25(7): 1303-1305.
16. KATZUNG, B. 1996. FARMACOLOGIA, Básica y clínica. 6ª ed. México. Editorial El Manual Moderno, S.A. pp. 441, 442, 455, 456, 460.
17. KWONG, T. et.al. 1980. A Rapid Gas-Liquid Chromatographic Assay For Valproic Acid In Serum. Clin. Chem. 26(7): 1053.
18. MANFREDI, C. y ZINTERHOFER L. 1982. Simplified Gas Chromatography of Valproic Acid and Ethosuximide. Clin. Chem. 28(1): 246.
19. MARROQUÍN REYES, C.W. 2001. Niveles Séricos de Benzodiacepinas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución. Guatemala. 57 p. Tesis Licenciado Químico Farmacéutico. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Escuela de Química Farmacéutica.

20. PETROZOLIN, A.K. y PONZO, J.L. . 1982. An Improved Gas Chromatographic Determination Of Valproic Acid In Serum. Clin. Chem. 28(7): 1588.
21. The United States Pharmacopea 24, The National Formulary. 1999. Twenty four. Edition United States of America. pp. 2149 - 2152.
22. TOSONI, S. et.al. 1983. Gas-Chromatographic Determination of Valproic Acid in Serum Without Derivatization. Clin. Chem. 29(5): 990.
23. WILLARD, H. et.al. 1991. Métodos Instrumentales de Análisis. 7ª. Ed. México. Editorial Iberoamérica. pp. 581-599.

ANEXOS

ÍNDICE DE ANEXOS

<i>TEMA</i>	<i>PÁGINA</i>
1. Condiciones de trabajo para análisis de ácido valpróico por HPLC	36
2. Condiciones de trabajo para análisis de ácido valpróico por CG/EM	37
3. Cuadro No. 1 (Valores obtenidos curva de calibración por HPLC)	38
4. Cuadro No. 2 (Valores obtenidos curva de calibración solución acuosa por CG/EM)	39
5. Cuadro No. 3 (Valores obtenidos curva de calibración muestras séricas por CG/EM)	40
6. Cuadro No. 4 (Tratamiento estadístico en muestras séricas por CG/EM)	41
7. Cuadro No. 5 (Tratamiento estadístico en muestras séricas por CG/EM)	43
8. Cuadro No. 6 (Linealidad en medio acuoso por CG/EM)	45
9. Cuadro No. 7 (Linealidad en muestras séricas por CG/EM)	46
10. Cromatograma No. I (Especificidad por HPLC)	47
11. Cromatograma No. II (Curva de calibración medio acuoso por HPLC)	48
12. Espectro de masas No. I (Especificidad por CG/EM)	49
13. Espectro de masas No. II (Curva estándar muestra acuosa 2mg% por CG/EM)	50
14. Espectro de masas No. III (Curva estándar muestra acuosa 6mg% por CG/EM)	51
15. Espectro de masas No. IV (Curva estándar muestra acuosa 14.5mg% por CG/EM)	52
16. Espectro de masas No. V (Curva estándar muestras séricas 2mg% por CG/EM)	53
17. Espectro de masas No. VI (Curva estándar muestra séricas 8mg% por CG/EM)	54
18. Espectro de masas No. VII (Curva estándar muestra acuosa 14mg% por CG/EM)	55
19. Gráfica No. 1 (Curva de calibración solución acuosa por HPLC)	56
20. Gráfica No. 2 (Curva de calibración solución acuosa por CG/EM)	57
21. Gráfica No. 3 (Curva de calibración muestras séricas por CG/EM)	58
22. Gráfica No. 4 (Linealidad en medio acuoso por CG/EM)	59
23. Gráfica No. 5 (Linealidad en muestras séricas por CG/EM)	60

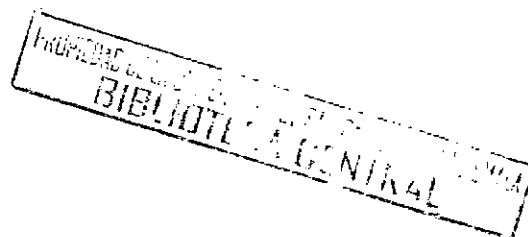
HPLC : Cromatografía líquida de alta resolución

CG/EM : Cromatografía de gases con detector selectivo de masas

ANEXO No. 1

CONDICIONES DE TRABAJO PARA ANÁLISIS DE ÁCIDO VALPRÓICO POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCION

- ◆ Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución Hewlett Packard serie 1050 provisto de un detector UV de longitud de onda variable y un integrador Hewlett Packard serie II, HP 3396.
- ◆ Columna Lichrospher 100 RP 18 (5 μ m), 125 x 4 mm d.i.
- ◆ Fase móvil: Metanol/agua 80:20
- ◆ Flujo: 0.6 ml/minuto
- ◆ Atenuación: 4
- ◆ Velocidad del papel: 0.3 cm/minuto
- ◆ Temperatura: 20°C
- ◆ Longitud de Onda : 246 nm



ANEXO No. 2

CONDICIONES DE TRABAJO PARA ANALISIS DE ÁCIDO VALPRÓICO POR CROMATOGRFÍA DE GASES CON DETECTOR SELECTIVO DE MASAS

- ◆ Cromatógrafo de gases Hewlett Packard Modelo 5890 Serie II con detector selectivo de masas (MSD) Modelo 5971A.
- ◆ Columna HP, CPU HP Brio, Hewlett Packard, Impresora Epson Stylus C40X
- ◆ RAMPA :
 - Inyector B: 250 °C
 - Detetector B: 280 °C
 - Temperatura inicial: 70 °C
 - Tiempo final: Cero
 - Tiempo total de corrida: 8.50 minutos

CUADRO No. 1

VALORES OBTENIDOS PARA CURVA DE CALIBRACIÓN DE ÁCIDO VALPRÓICO EN
SOLUCIÓN ACUOSA
POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

No.	Estándar en mg%	Relación altura ácido valpróico / ácido caprónico
1	5	0.9022
2	10	1.8611
3	15	2.8389

$$y = a + bx$$
$$y = 0.18773x$$
$$r = 0.9998$$

CUADRO No. 2

VALORES OBTENIDOS PARA CURVA DE CALIBRACIÓN DE ÁCIDO VALPRÓICO EN SOLUCIÓN ACUOSA POR CROMATOGRAFÍA GASEOSA CON DETECTOR SELECTIVO DE MASAS

No.	Estándar en mg%	Relación área ácido valpróico / área ácido caprónico					X
		1	2	3	4	5	
1	0.5	0.04199	0.0426	0.04208	0.04301	0.04250	0.4244
2	1	0.08021	0.07952	0.08110	0.08034	0.08056	0.08035
3	2	0.1698	0.1720	0.1693	0.1705	0.1703	0.1704
4	3	0.2473	0.2444	0.2337	0.2450	0.2399	0.2421
5	4	0.3070	0.3364	0.3157	0.3149	0.3210	0.3190
6	5	0.3975	0.4086	0.4022	0.3940	0.3977	0.4000
7	6	0.4785	0.4725	0.4837	0.4764	0.4804	0.4783
8	8	0.6739	0.6609	0.6648	0.6594	0.6608	0.6640
9	10	0.8487	0.7957	0.7888	0.8223	0.7874	0.8086
10	14	1.1290	1.1299	1.1301	1.1295	1.1321	1.1301
11	14.5	1.1591	1.1599	1.1589	1.160	1.1613	1.1598
12	15	1.2441	1.0561	1.2883	1.1882	1.2172	1.1988
13	17	1.3721	1.3214	1.3808	1.3393	1.3864	1.3600
14	19	1.5523	1.4968	1.5063	1.5540	1.5068	1.5232
15	19.5	1.6430	1.6648	1.5475	1.6915	1.6700	1.6434

$$y = a + bx$$

$$y = 0.08109$$

$$r = 9981$$

X = Promedio de la relación área ácido valpróico / área de ácido caprónico

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
BIBLIOTECA CENTRAL

CUADRO No. 3

VALORES OBTENIDOS PARA CURVA DE CALIBRACIÓN DE ÁCIDO VALPRÓICO EN MUESTRAS SÉRICAS POR CROMATOGRAFÍA GASEOSA CON DETECTOR SELECTIVO DE MASAS.

No.	Estándar en mg%	Relación altura área valpróico / altura estándar					X
		1	2	3	4	5	
1	0.5	0.04151	0.04226	0.04018	0.03832	0.04047	0.04055
2	1	0.06977	0.06764	0.07015	0.06810	0.06845	0.06882
3	2	0.1614	0.1635	0.1626	0.1614	0.1658	0.1629
4	4	0.2728	0.2722	0.2761	0.2796	0.2853	0.2772
5	5	0.3464	0.3402	0.3461	0.3381	0.3445	0.3431
6	6	0.4178	0.4085	0.3992	0.4053	0.4089	0.4079
7	8	0.5557	0.5563	0.5523	0.5449	0.5478	0.5514
8	10	0.7035	0.7153	0.7025	0.7001	0.6952	0.7033
9	12	0.8010	0.8144	0.8300	0.8053	0.8069	0.8115
10	14	0.9563	0.9630	0.9722	0.9529	0.9572	0.9603
11	14.5	0.9813	0.9885	0.9918	0.9851	0.9821	0.9858
12	15	0.9556	0.9584	0.9475	0.9090	0.8857	0.9312
13	17	1.0999	1.0620	1.0045	1.0427	0.993	1.0404
14	19	1.1360	1.1248	1.1429	1.1285	1.1163	1.1300

$$y = a + bx$$

$$y = 0.06445$$

$$r = 0.9922$$

X = Promedio de la relación área ácido valpróico / área de ácido caprónico

CUADRO No. 4**TRATAMIENTO ESTADÍSTICO****CURVA DE CALIBRACIÓN DE ÁCIDO VALPRÓICO EN MUESTRAS SÉRICAS
POR CROMATOGRAFÍA GASEOSA CON DETECTOR SELECTIVO DE MASAS****EXACTITUD**

Porcentaje de recuperación : $\frac{\text{Concentración encontrada}}{\text{Concentración original}} \times 100$

No.	Concentración teórica mg%	Concentración encontrada mg%	% de recuperación	Tratamiento estadístico
1	0.5	0.35	70	X = 67.6% $\delta n - 1 = 3.85$ CV = 5.70
2	0.5	0.36	72	
3	0.5	0.33	66	
4	0.5	0.31	62	
5	0.5	0.34	68	
1	1	0.77	77	X = 75.80% $\delta n - 1 = 1.64$ CV = 2.16
2	1	0.74	74	
3	1	0.78	78	
4	1	0.75	75	
5	1	0.75	75	
1	2	2.13	106.5	X = 107.6% $\delta n - 1 = 1.24$ CV = 1.15
2	2	2.16	108.0	
3	2	2.15	107.5	
4	2	2.13	106.5	
5	2	2.19	109.5	
1	4	3.78	94.50	X = 96.1% $\delta n - 1 = 1.96$ CV = 2.04
2	4	3.77	94.25	
3	4	3.83	95.75	
4	4	3.88	97.00	
5	4	3.96	99.00	
1	5	4.87	97.40	X = 96.44% $\delta n - 1 = 1.09$ CV = 1.13
2	5	4.78	95.60	
3	5	4.87	97.40	
4	5	4.75	95.00	
5	5	4.84	96.80	
1	6	5.93	98.83	X = 96.37% $\delta n - 1 = 1.69$ CV = 1.75
2	6	5.79	96.50	
3	6	5.80	96.67	
4	6	5.65	94.17	
5	6	5.74	95.67	

1	8	7.97	99.62	X = 98.82% $\delta n - 1 = 0.93$ CV = 0.94
2	8	7.98	99.75	
3	8	7.92	99.00	
4	8	7.81	97.62	
5	8	7.85	98.12	
1	10	10.16	101.6	X = 102.8% $\delta n - 1 = 2.21$ CV = 2.15
2	10	10.33	103.30	
3	10	10.14	101.40	
4	10	10.11	101.10	
5	10	10.64	106.40	
1	12	11.61	96.75	X = 98.00% $\delta n - 1 = 1.38$ CV = 1.41
2	12	11.80	98.33	
3	12	12.03	100.25	
4	12	11.67	97.25	
5	12	11.69	97.42	
1	14	13.91	99.36	X = 99.74% $\delta n - 1 = 0.80$ CV = 0.80
2	14	14.00	100.00	
3	14	14.14	101.00	
4	14	13.85	98.93	
5	14	13.92	99.43	
1	14.5	14.28	98.48	X = 98.91% $\delta n - 1 = 0.44$ CV = 0.45
2	14.5	14.38	99.17	
3	14.5	14.43	99.52	
4	14.5	14.33	98.83	
5	14.5	14.29	98.55	
1	15	14.11	94.07	X = 91.59% $\delta n - 1 = 3.26$ CV = 3.56
2	15	14.15	94.33	
3	15	13.98	93.20	
4	15	13.40	89.33	
5	15	13.05	87.00	
1	17	16.29	95.82	X = 90.50% $\delta n - 1 = 3.87$ CV = 4.28
2	17	15.71	92.41	
3	17	14.84	87.29	
4	17	15.42	90.71	
5	17	14.67	86.29	
1	19	16.83	88.58	X = 88.07% $\delta n - 1 = 0.78$ CV = 0.89
2	19	16.66	87.68	
3	19	16.92	89.05	
4	19	16.72	88.00	
5	19	16.54	87.05	

X Media
 $\delta n - 1$ Desviación estándar
CV Coeficiente de variación

CUADRO No. 5**TRATAMIENTO ESTADÍSTICO****CURVA DE CALIBRACIÓN DE ÁCIDO VALPRÓICO EN MUESTRAS SÉRICAS
POR CROMATOGRAFÍA GASEOSA CON DETECTOR SELECTIVO DE MASAS****PRECISIÓN**

No.	Concentración teórica mg%	Concentración encontrada mg%	Tratamiento estadístico
1	0.5	0.35	X = 0.34 $\bar{\sigma}_{n-1} = 0.022$ CV = 6.47
2	0.5	0.36	
3	0.5	0.33	
4	0.5	0.31	
5	0.5	0.34	
1	1	0.77	X = 0.76 $\bar{\sigma}_{n-1} = 0.016$ CV = 2.10
2	1	0.74	
3	1	0.78	
4	1	0.75	
5	1	0.75	
1	2	2.13	X = 2.15 $\bar{\sigma}_{n-1} = 0.025$ CV = 1.16
2	2	2.16	
3	2	2.15	
4	2	2.13	
5	2	2.19	
1	4	3.78	X = 3.84 $\bar{\sigma}_{n-1} = 0.078$ CV = 2.03
2	4	3.77	
3	4	3.83	
4	4	3.88	
5	4	3.96	
1	5	4.87	X = 4.82 $\bar{\sigma}_{n-1} = 0.054$ CV = 1.12
2	5	4.78	
3	5	4.87	
4	5	4.75	
5	5	4.84	
1	6	5.93	X = 5.78 $\bar{\sigma}_{n-1} = 0.10$ CV = 1.73
2	6	5.79	
3	6	5.80	
4	6	5.65	
5	6	5.74	

1	8	7.97	X = 7.91 $\delta n - 1 = 0.074$ CV = 0.94
2	8	7.98	
3	8	7.92	
4	8	7.81	
5	8	7.85	
1	10	10.16	X = 10.28 $\delta n - 1 = 0.22$ CV = 2.14
2	10	10.33	
3	10	10.14	
4	10	10.11	
5	10	10.64	
1	12	11.61	X = 11.76 $\delta n - 1 = 0.17$ CV = 1.45
2	12	11.80	
3	12	12.03	
4	12	11.67	
5	12	11.69	
1	14	13.91	X = 13.96 $\delta n - 1 = 0.11$ CV = 0.79
2	14	14.00	
3	14	14.14	
4	14	13.85	
5	14	13.92	
1	14.5	14.28	X = 14.34 $\delta n - 1 = 0.063$ CV = 0.44
2	14.5	14.38	
3	14.5	14.43	
4	14.5	14.33	
5	14.5	14.29	
1	15	14.11	X = 13.74 $\delta n - 1 = 0.49$ CV = 3.57
2	15	14.15	
3	15	13.98	
4	15	13.40	
5	15	13.05	
1	17	16.29	X = 15.39 $\delta n - 1 = 0.66$ CV = 4.29
2	17	15.71	
3	17	14.84	
4	17	15.42	
5	17	14.67	
1	19	16.83	X = 16.06 $\delta n - 1 = 0.84$ CV = 5.23
2	19	16.66	
3	19	16.92	
4	19	16.72	
5	19	16.54	

X Media
 $\delta n - 1$ Desviación estándar
CV Coeficiente de variación

CUADRO No. 6**CURVA DE CALIBRACIÓN DE ESTÁNDARES DE ÁCIDO VALPRÓICO EN MEDIO ACUOSO POR CROMATOGRAFÍA GASEOSA CON DETECTOR SELECTIVO DE MASAS.****LINEALIDAD**

Aplicación de la Regresión Lineal a los resultados de los estándares.

No.	Estándar en mg%	Relación área ácido valpróico / área ácido capróico					X
		1	2	3	4	5	
1	2	0.1698	0.1720	0.1693	0.1705	0.1703	0.1704
2	3	0.2473	0.2444	0.2337	0.2450	0.2399	0.2421
3	4	0.3070	0.3364	0.3157	0.3149	0.3210	0.3190
4	5	0.3975	0.4086	0.4022	0.3940	0.3977	0.4000
5	6	0.4785	0.4725	0.4837	0.4764	0.4804	0.4783
6	8	0.6739	0.6609	0.6648	0.6594	0.6608	0.6640
7	10	0.8487	0.7957	0.7888	0.8223	0.7874	0.8086
8	14	1.1290	1.1299	1.1301	1.1295	1.1321	1.1301
9	14.5	1.1591	1.1599	1.1589	1.160	1.1613	1.1598

$$y = a + bx$$

$$y = 0.08065x$$

$$r = 0.9994$$

CUADRO No. 7**CURVA DE CALIBRACIÓN DE ESTÁNDARES DE ÁCIDO VALPRÓICO EN MUESTRAS SÉRICAS POR CROMATOGRAFÍA GASEOSA CON DETECTOR SELECTIVO DE MASAS****LINEALIDAD**

Aplicación de la regresión lineal a los resultados de las muestras séricas.

No.	Estándar en mg%	Relación altura ácido valpróico / altura estándar					X
		1	2	3	4	5	
1	2	0.1614	0.1635	0.1626	0.1614	0.1658	0.1629
2	4	0.2728	0.2722	0.2761	0.2796	0.2853	0.2772
3	5	0.3464	0.3402	0.3461	0.3381	0.3445	0.3431
4	6	0.4178	0.4085	0.3992	0.4053	0.4089	0.4079
5	8	0.5557	0.5563	0.5523	0.5449	0.5478	0.5514
6	10	0.7035	0.7153	0.7025	0.7001	0.6952	0.7033
7	12	0.8010	0.8144	0.8300	0.8053	0.8069	0.8115
8	14	0.9563	0.9630	0.9722	0.9529	0.9572	0.9603
9	14.5	0.9813	0.9885	0.9918	0.9851	0.9821	0.9858

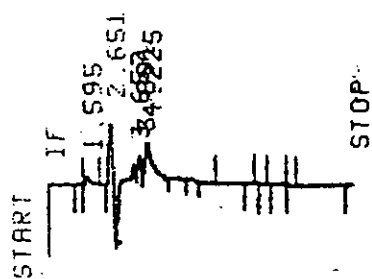
$$y = a + bx$$

$$y = 0.01356 + 0.06727x$$

$$r = 0.9993$$

CROMATOGRAMA I ESPECIFICIDAD POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

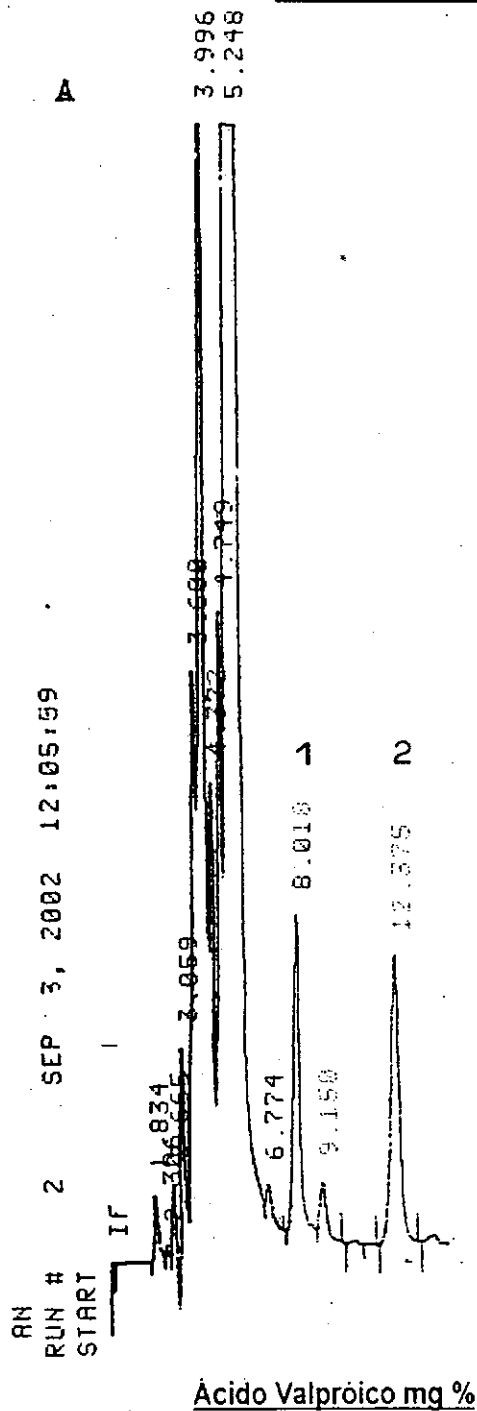
* RUN # 7 SEP 3. 2002 14:01:41



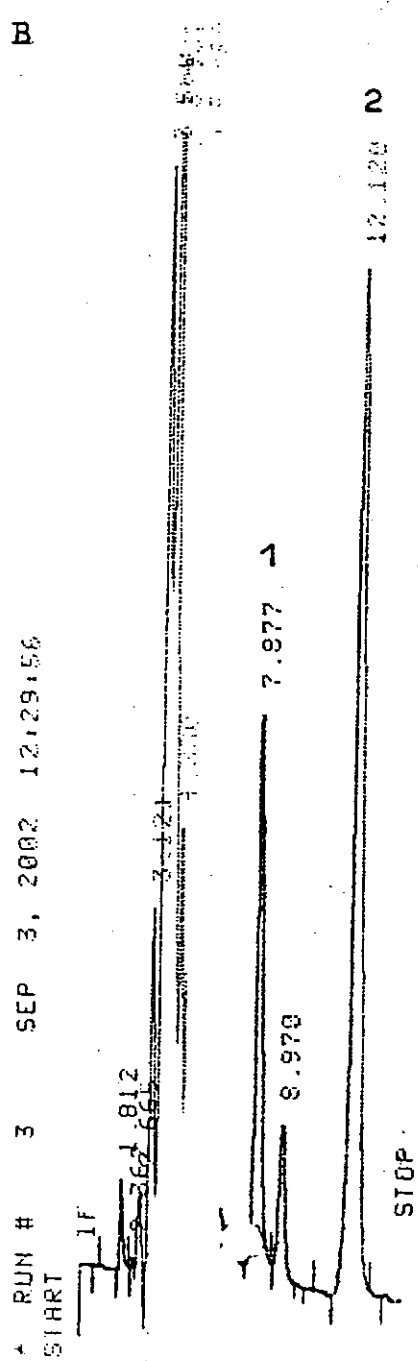
INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
BIBLIOTECA CENTRAL

CROMATOGRAMA II

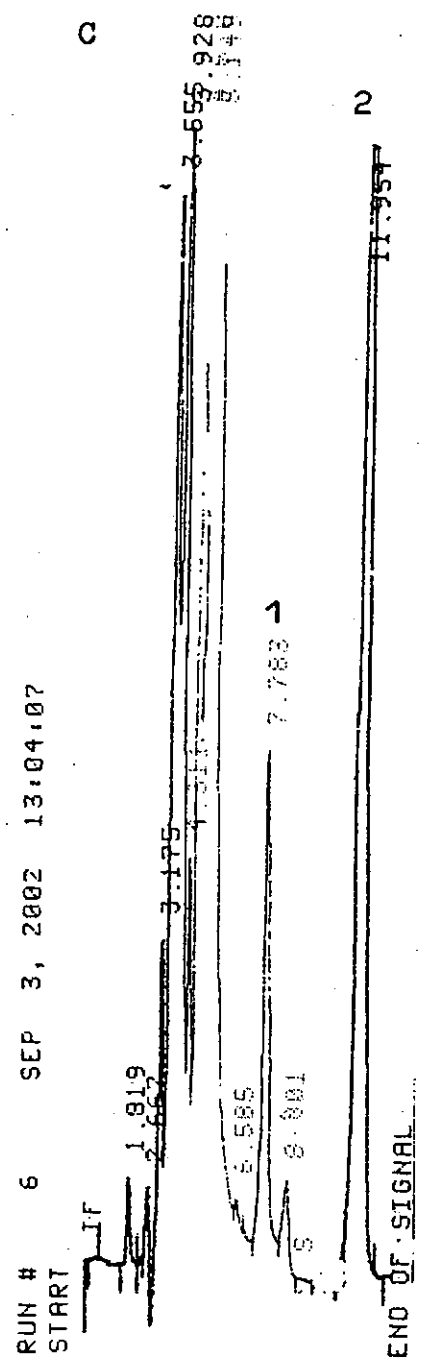
CURVA ESTANDAR DE ÁCIDO VALPRÓICO EN MEDIO ACUOSO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN



A = 5 mg %
B = 10 mg %
C = 15 mg %



Acido Caproico (estándar interno) : 8 mg %
1 = Acido Caproico
2 = Acido Valproico



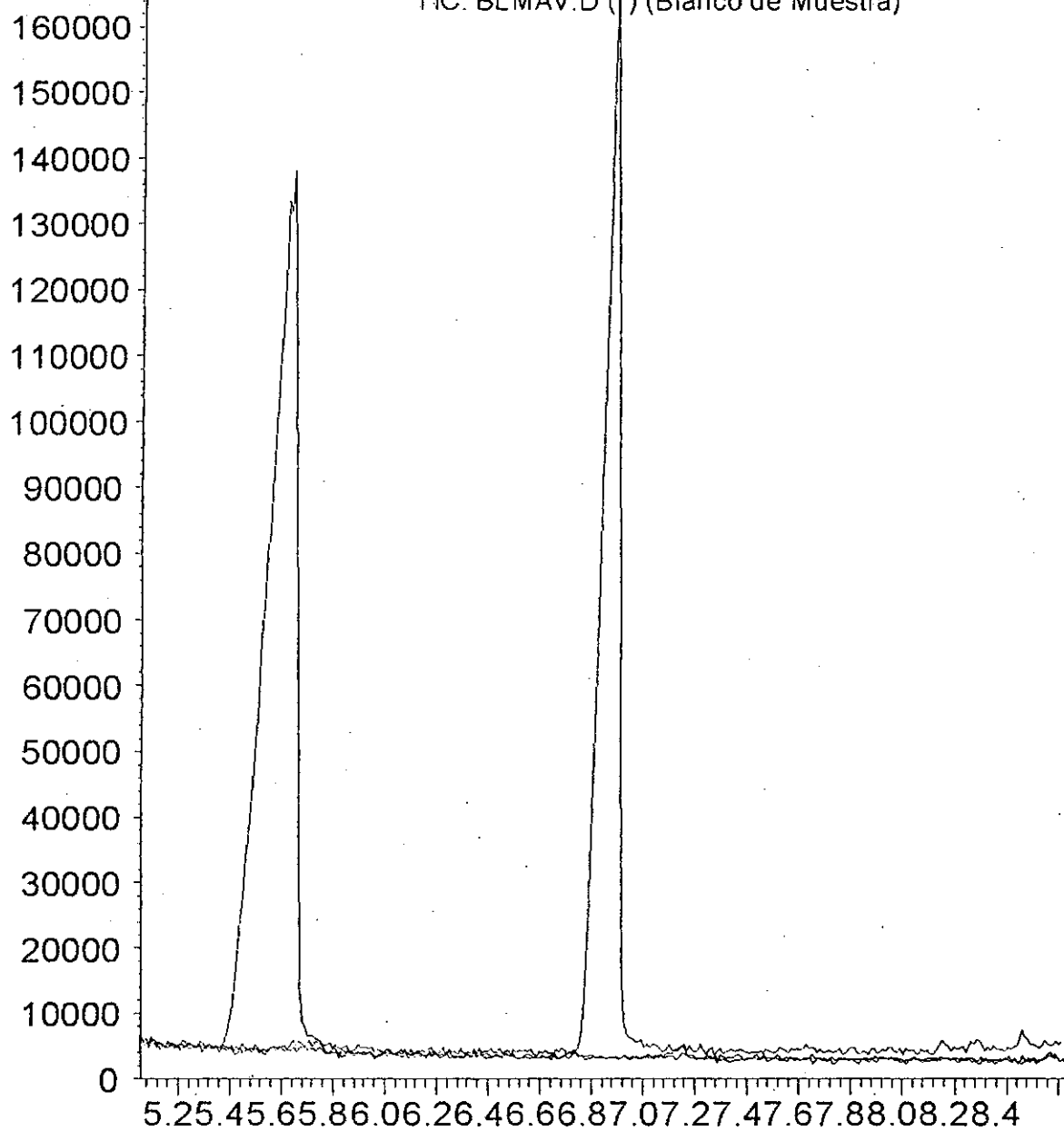
ESPECTRO DE MASAS I
ESPECIFICIDAD POR
CROMATOGRAFÍA GASEOSA/ESPECTOMETRÍA DE MASAS

Abundan

TIC: BLRAV.D (Blanco de Reactivos)

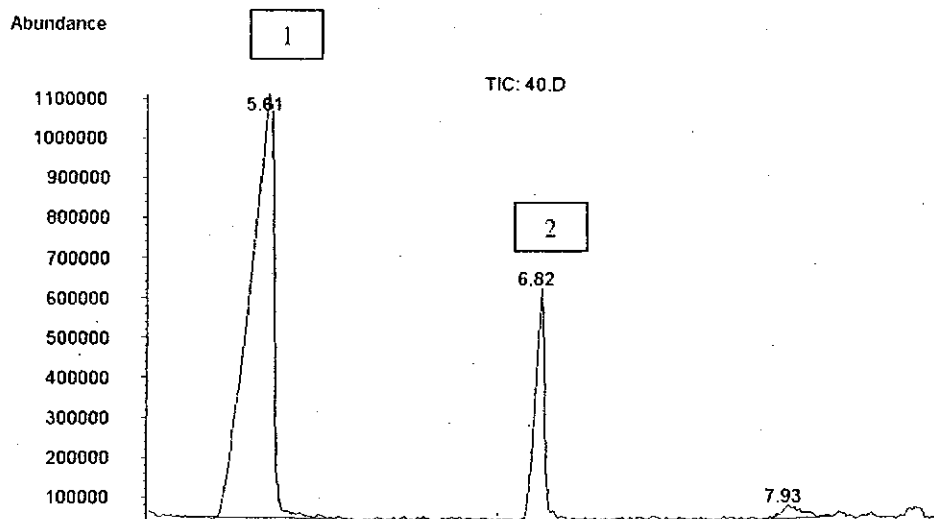
TIC: 109.D (*) (Ácido Caprónico y Valprónico)

TIC: BLMAV.D (*) (Blanco de Muestra)



Time--

ESPECTRO DE MASAS No. II
Curva estándar de ácido valproico en muestras acuosas
2 mg % por Cromatografía gaseosa / espectrometría de masas



Area Percent Report

Data File : C:\HPCHEM1\DATA\105.D Vial: 2
 Acq On : 19 Agos 2002 09:02 Operator: mca
 Sample : 2% Inst : GC/MS Ins
 Misc : Multiplr: 1.00
 Sample Amount: 0.00
 MS Integration Params: autoint1.e

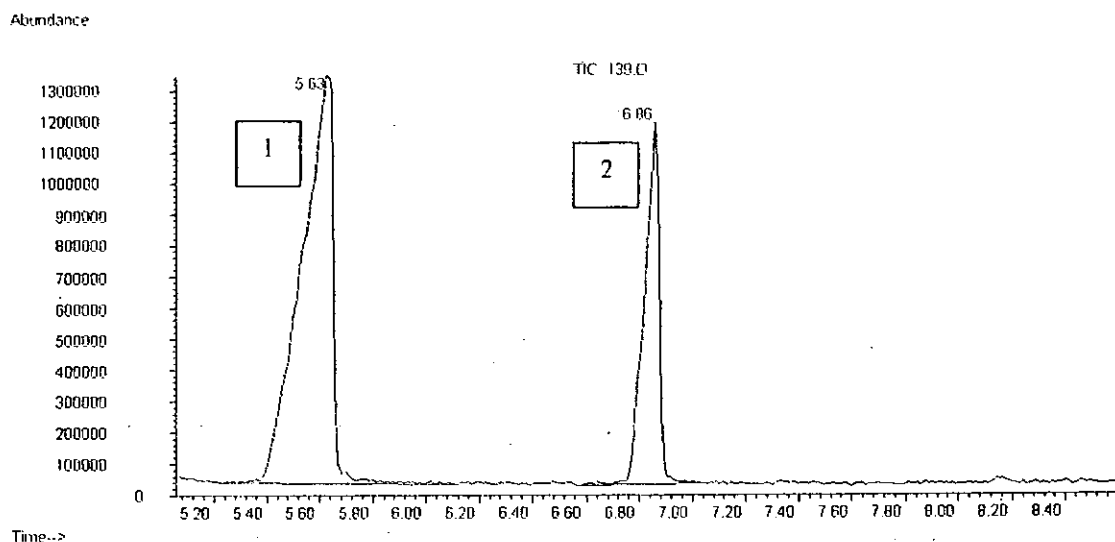
Method : C:\HPCHEM1\METHODS\VALPRO.M (Chemstation Integrator)
 Title : feno
 Signal : TIC

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	peak area	peak %	peak % max	% of total
1	5.608	13	51	78	BV	1047200	80115279	100.00%	80.181%	
2	6.824	146	162	187	BV	565569	17650340	22.03%	17.665%	
3	7.930	251	263	280	PV	31654	2152630	2.69%	2.154%	
Sum of corrected areas:						99918249				

40.D VALPRO.M Tue Oct 01 10:24:55 2002

1. Ácido Capróico
2. Ácido Valproico

ESPECTRO DE MASAS No. III
Curva estándar de ácido valpróico en muestras acuosas
6 mg % por Cromatografía gaseosa / espectrometría de masas



Area Percent Report

Data File : CA\HPCHEM\1\DATA\139.D Vial: 1
 Acq On : 20 Sep 2002 12:01 Operator: mca
 Sample : std 6% Inst : GC/MS Ins
 Misc : Multiplr: 1.00

Sample Amount: 0.00

MS Integration Params: autoint1.e

Method : CA\HPCHEM\1\METHODS\VALPRO.M (Chemstation Integrator)

Title : feno

Signal : TIC

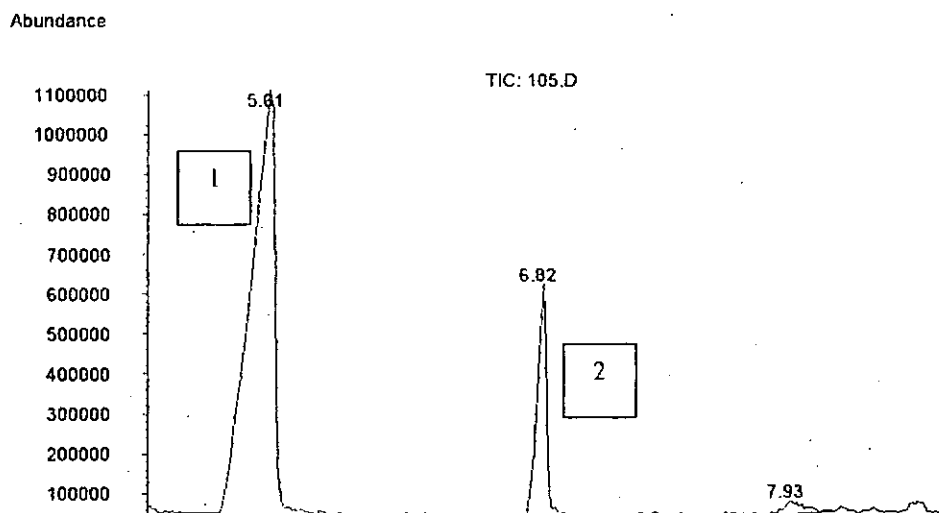
peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	peak area	peak % max	% of total
1	5.634	17	54	98	BV 2	1311946	109343163	100.00%	70.531%
2	6.861	140	166	185	PV	1150701	45684871	41.78%	29.469%

Sum of corrected areas: 155028033

139.D VALPRO.M Tue Oct 01 14:20:47 2002

1. Ácido Caprónico
2. Ácido Valprónico

ESPECTRO DE MASAS No. V
Curva estándar de ácido valproico en muestras séricas
2 mg % por Cromatografía gaseosa / espectrometría de masas



Area Percent Report

Data File : C:\HPCHEM\1\DATA\105.D Vial: 1
 Acq On : 19 Sep 2002 10:02 Operator: mca
 Sample : 2% muestra Inst : GC/MS Ins
 Misc : Multiplr: 1.00

Sample Amount: 0.00

MS Integration Params: autoint1.e

Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\VALPRO.M (Chemstation Integrator)

Title : feno

Signal : TIC

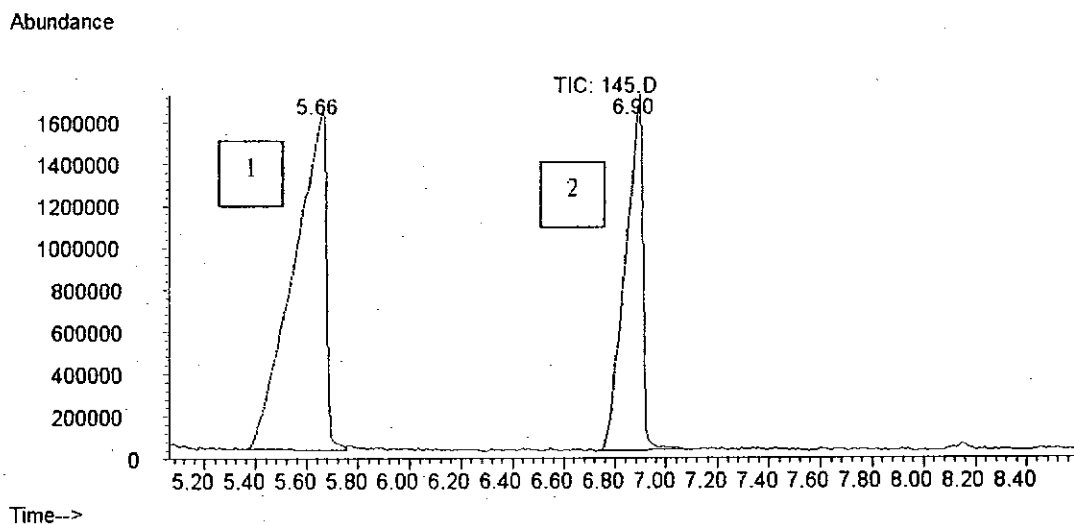
peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	peak area	peak % max	% of total
1	5.608	13	51	78	BV	1047200	80115279	100.00%	80.181%
2	6.824	146	162	187	BV	565569	17650340	22.03%	17.665%
3	7.930	251	263	280	PV	31654	2152630	2.69%	2.154%

Sum of corrected areas: 99918249

105.D VALPRO.M Tue Oct 01 10:24:55 2002

1. Acido Capróico.
2. Acido Valproico.

ESPECTRO DE MASAS No. VI
Curva estándar de ácido valproico en muestras séricas
8 mg % por Cromatografía gaseosa / espectrometría de masas



Area Percent Report

Data File : C:\HPCHEM\1\DATA\145.D Vial: 1
 Acq On : 20 Sep 2002 13:25 Operator: mca
 Sample : 8 % m (2) Inst : GC/MS Ins
 Misc : Multiplr: 1.00
 Sample Amount: 0.00
 MS Integration Params: autoint1.e

Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\VALPRO.M (Chemstation Integrator)

Title : feno

Signal : TIC

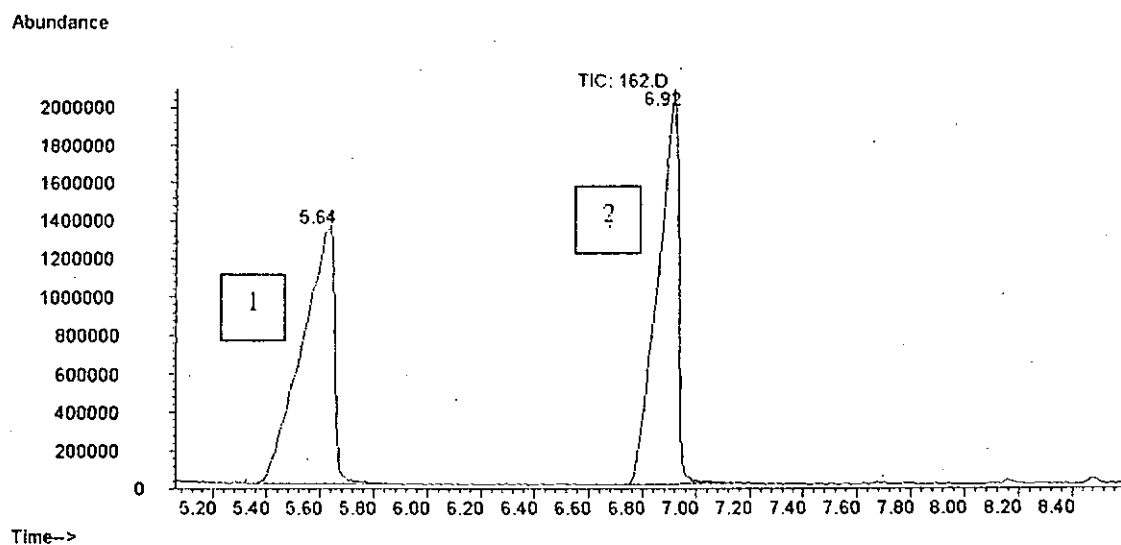
peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	peak area	peak % max.	% of total
1	5.661	27	56	64	PV	1623388	141558493	100.00%	64.254%
2	6.899	154	169	190	PV	1648889	78751265	55.63%	35.746%

Sum of corrected areas: 220309758

145.D VALPRO.M Tue Oct 01 14:25:16 2002

1. Ácido Caproico.
2. Ácido Valproico.

ESPECTRO DE MASAS No. VII
Curva estándar de ácido valproico en muestras séricas
14 mg % por Cromatografía gaseosa / espectrometría de masas



Area Percent Report

Data File : C:\HPCHEM\1\DATA\162.D

Vial: 1

Acq On : 23 Sep 2002 9:36

Operator: mca

Sample : muestra 14 % 5

Inst : GC/MS Ins

Misc :

Multiplr: 1.00

Sample Amount: 0.00

MS Integration Params: autoint1.e

Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\VALPRO.M (Chemstation Integrator)

Title : feno

Signal : TIC

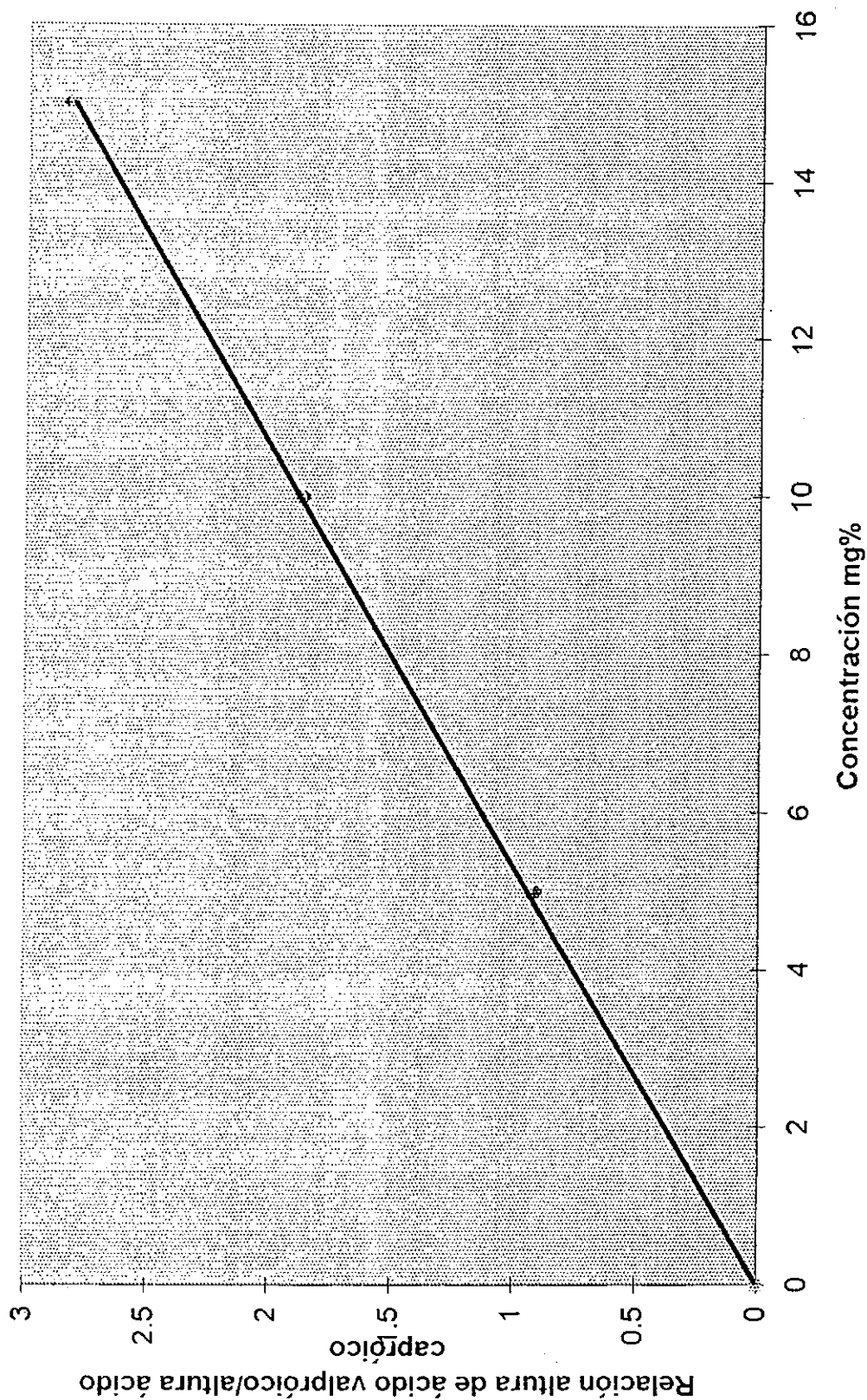
peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	peak area	peak % max	% of total
1	5.638	29	54	76	PV	1351752	113721072	100.00%	50.943%
2	6.920	155	171	191	BV	2050862	109508946	96.30%	49.057%

Sum of corrected areas: 223230018

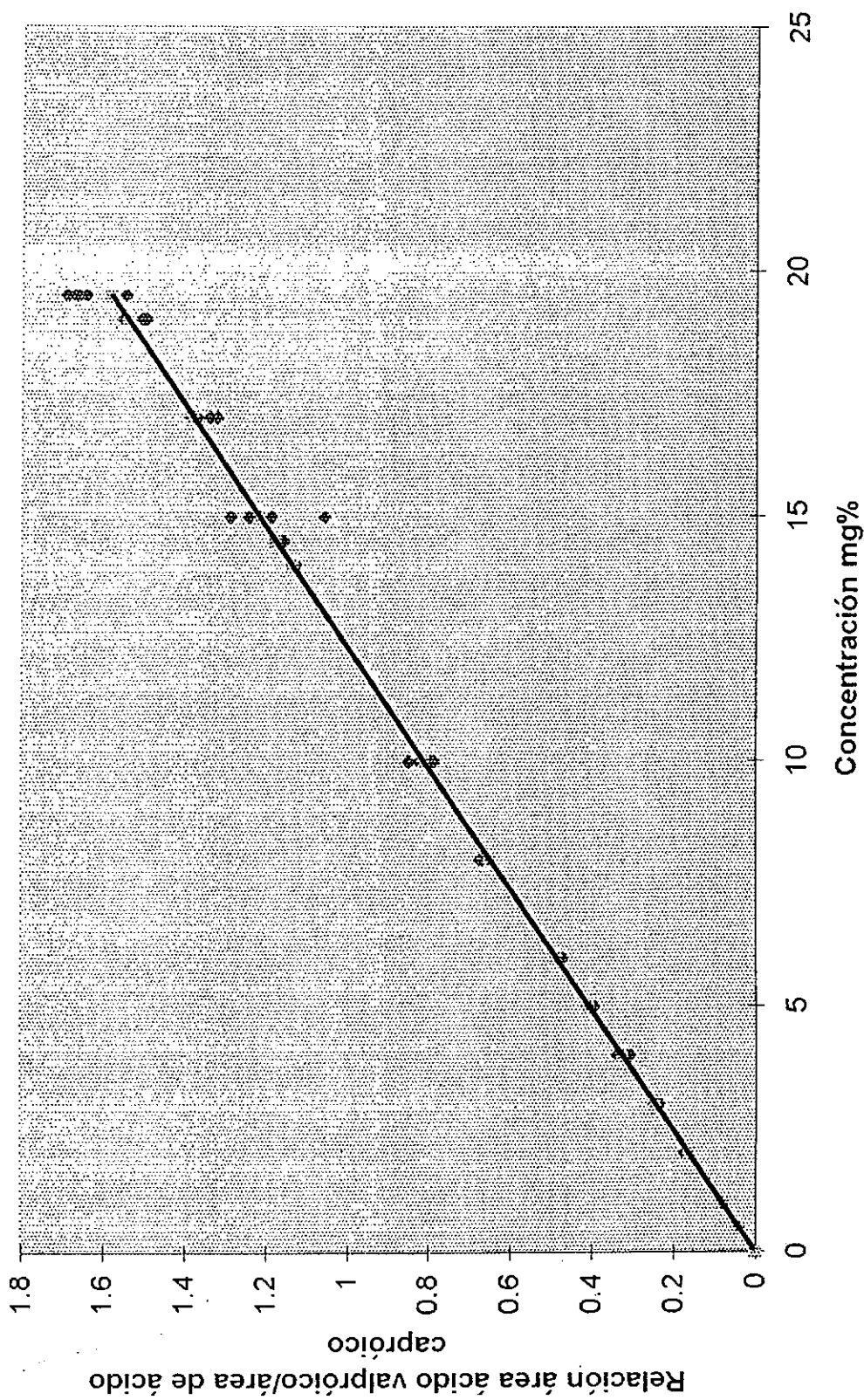
162.D VALPRO.M Tue Oct 01 14:54:00 2002

1. Ácido Caproico.
2. Ácido Valproico.

GRÁFICA No. 1
CURVA DE CALIBRACIÓN DE ÁCIDO VALPRÓICO EN SOLUCIÓN ACUOSA POR
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN



GRÁFICA No. 2
CURVA DE CALIBRACIÓN DE ÁCIDO VALPRÓICO EN SOLUCIÓN ACUOSA
POR CROMATOGRAFÍA DE GASES CON DETECTOR SELECTIVO DE MASAS



GRAFICA No. 3
CURVA DE CALIBRACIÓN DE ÁCIDO VALPRÓICO EN MUESTRAS SÉRICAS POR
CROMATOGRFÍA DE GASES CON DETECTOR SELECTIVO DE MASAS

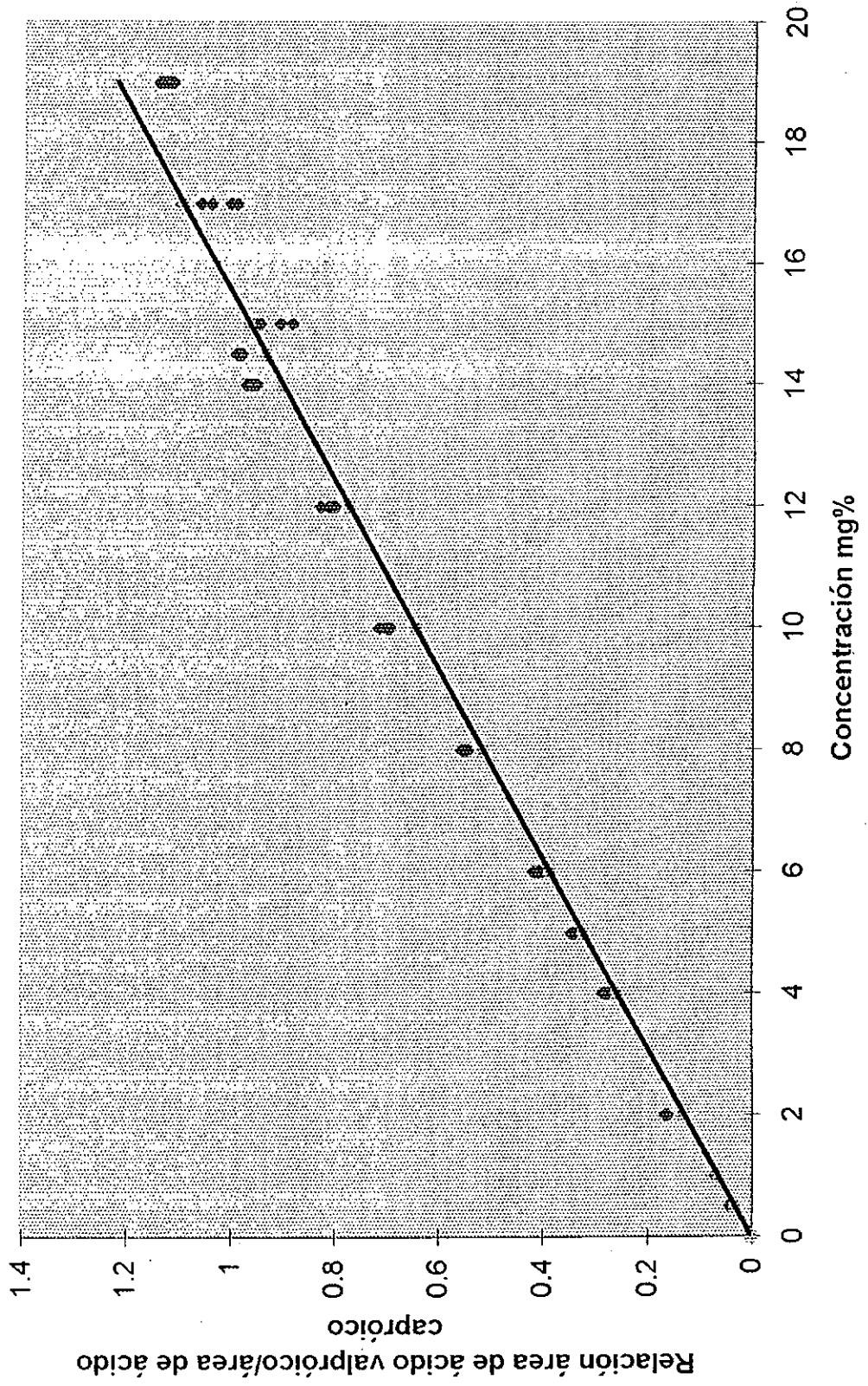
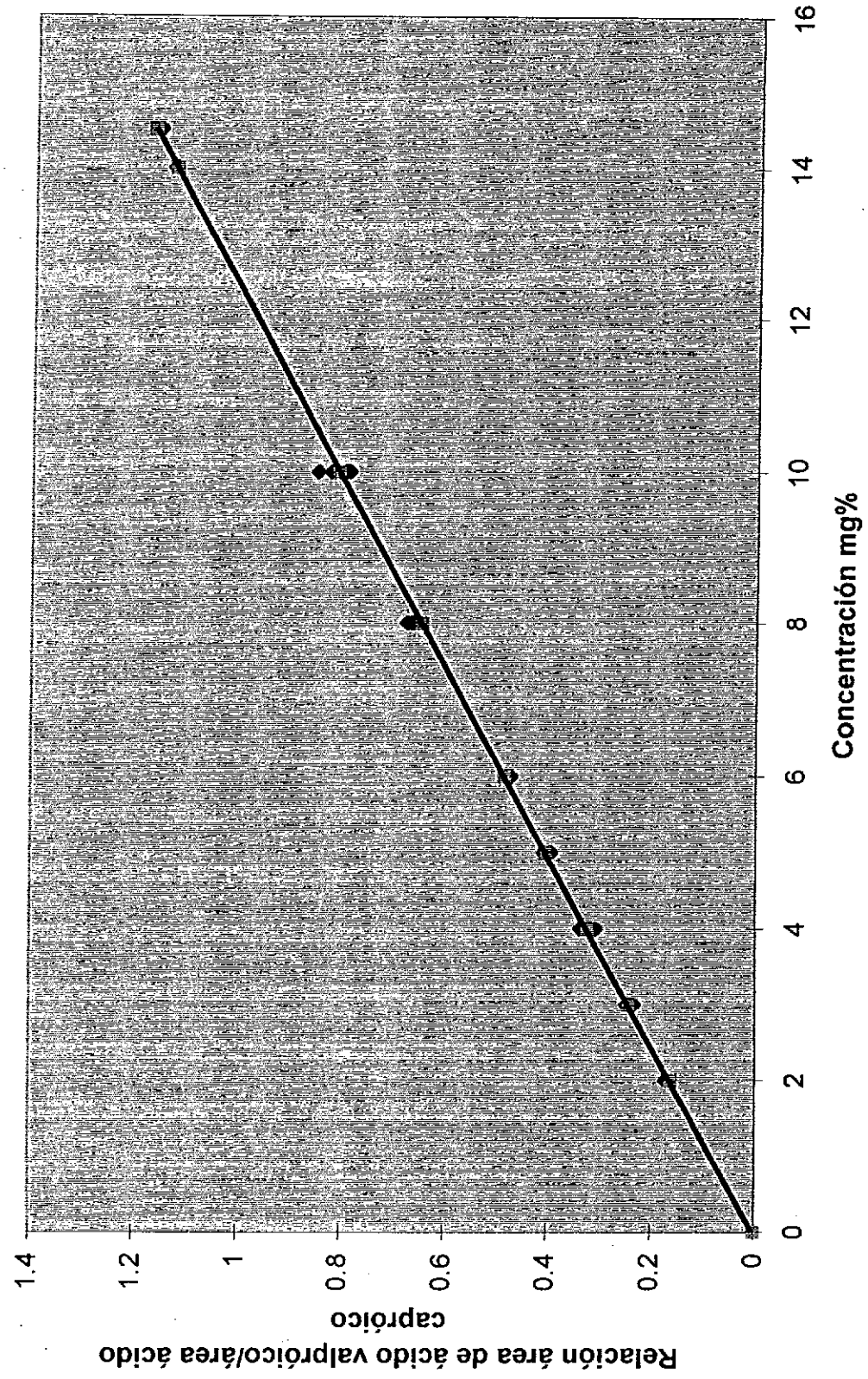
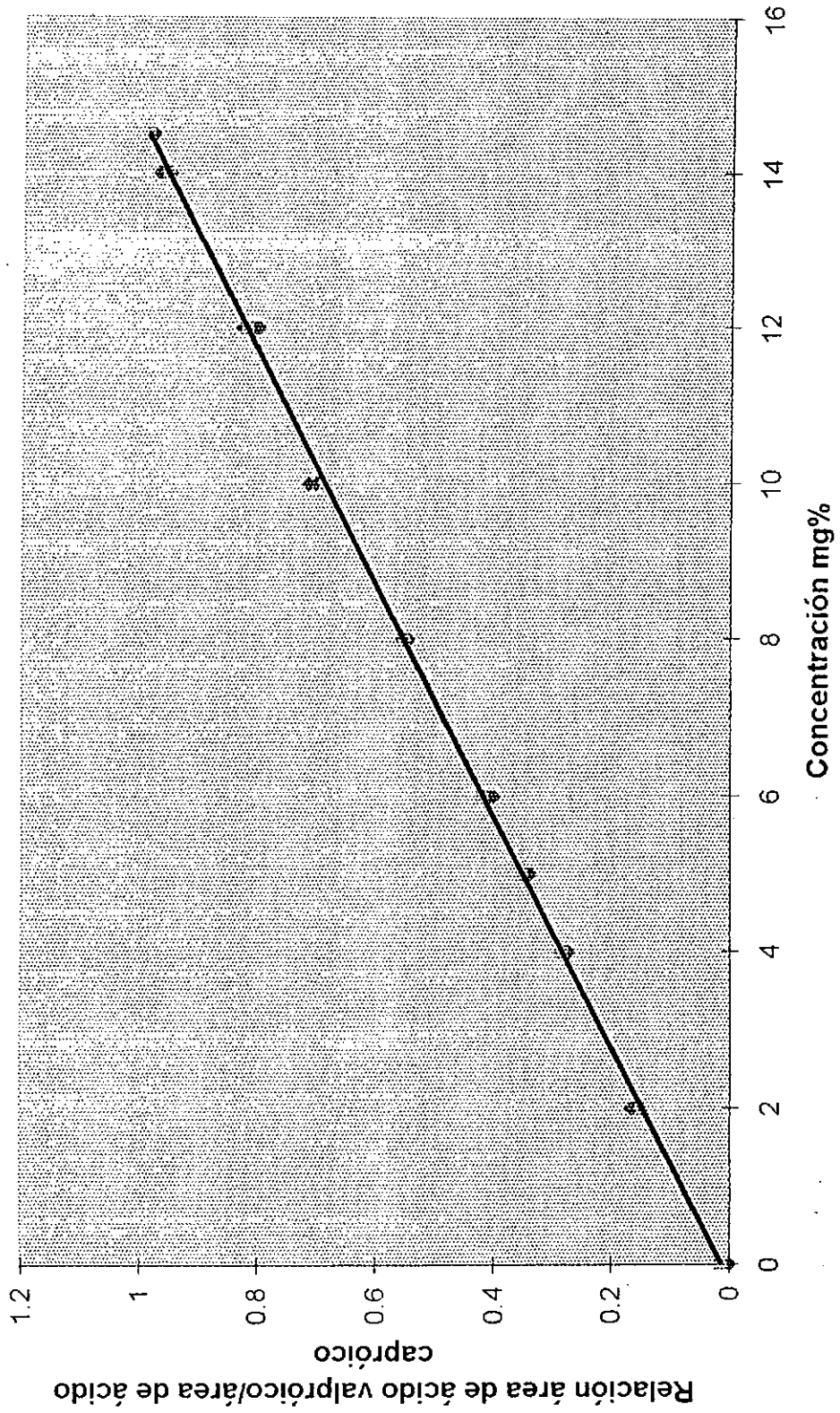
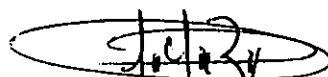


GRÁFICO No. 4
CURVA REGRESIÓN LINEAL DE ÁCIDO VALPRÓICO EN MEDIO ACUOSO POR
CROMATOGRFÍA DE GASES CON DETECTOR SELECTIVO DE MASAS

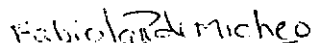


GRÁFICA No. 5
CURVA REGRESIÓN LINEAL DE ÁCIDO VALPRÓICO EN MUESTRAS SÉRICAS
POR CROMATOGRFÍA DE GASES CON DETECTOR SELECTIVO DE MASAS





Mario René Pinzón Meza
Autor



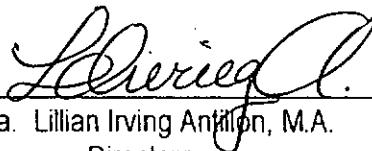
Licda. Fabiola Prado de Micheo
Asesora



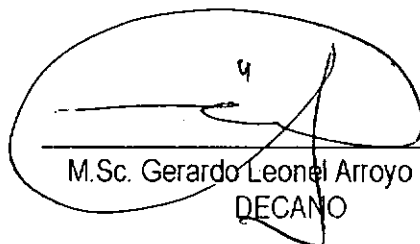
Licda. María Antonia Pardo de Chávez
Asesora



Licda. Julia Amparo García Bolaños
Revisora



Licda. Lillian Irving Antillon, M.A.
Directora



M.Sc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán
DECANO