

Validación de un método por cromatografía líquida de alta resolución para identificación y cuantificación de ácido valproico en soluciones orales: Fiscalización de los productos comercializados en Argentina (2022)

High performance liquid chromatography method validation for identification and quantification of valproic acid in oral solutions: Monitoring of products marketed in Argentina (2022)

Dante Navalesi¹ 

Nadia E. García¹ 

Eduardo E. Saint Martin^{1a} 

Veronica S. Llauro^{1a} 

Yanina I. Rodríguez^{1a} 

¹Instituto Nacional de Medicamentos; Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. Buenos Aires, Argentina.

^aRevisores técnicos e institucionales del artículo.

✉ Dante Navalesi
dante.navalesi@anmat.gob.ar

Recibido: 13 de mayo de 2024

Aprobado: 19 de agosto de 2024

Publicado: 2 de octubre de 2024

RESUMEN

El ácido valproico (AV) es uno de los medicamentos de primera línea para el tratamiento de la epilepsia, uno de los desórdenes neurológicos más prevalentes, en adultos y niños. Es catalogado como principio activo de estrecho rango terapéutico, lo cual implica que su uso eficaz y seguro requiere cuidadosa dosificación y monitoreo del paciente. Los principales efectos adversos severos incluyen hepatotoxicidad y pancreatitis que pueden ser fatales, siendo especialmente susceptibles los niños menores de dos años y los adultos mayores. Actualmente, el ensayo de cuantificación de AV en solución oral codificado en la Farmacopea Nacional Argentina (FNA) se realiza mediante cromatografía gaseosa (CG), la cual implica mayor complejidad en la preparación de la muestra y resulta menos accesible que la cromatografía líquida. El objetivo del presente trabajo consistió en validar una metodología de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, High-Performance Liquid Chromatography) para la identificación y cuantificación de AV en solución. Una vez validada la técnica, se llevó a cabo el análisis de todos los productos comercializados en Argentina, y se evaluaron las técnicas de control de calidad utilizadas por los laboratorios elaboradores. Las muestras analizadas resultaron dentro de especificación, mientras que a partir de la evaluación de la documentación surgieron acciones correctivas que fueron indicadas a los laboratorios. Esta técnica permite realizar un análisis rápido, sencillo y más aplicable, que podría establecerse como norma de control en la FNA.

Palabras clave: ácido valproico; cromatografía líquida de alta resolución; epilepsia; estudio de validación; vigilancia de productos comercializados.

ABSTRACT

Valproic acid (VPA) is one of the first-line drugs for the treatment of epilepsy, one of the most prevalent neurological disorders, in adults and children. It is classified as an active ingredient with a narrow therapeutic range, which implies that its effective and safe use requires careful dosing and patient monitoring. The main severe adverse effects include hepatotoxicity and pancreatitis, which can be fatal, being especially susceptible children under two years of age and older adults. Currently, the quantification assay for VPA in oral solution codified in the Argentine National Pharmacopoeia (FNA) is by gas chromatography (GC), which involves greater complexity in sample preparation and is less accessible than liquid chromatography. The objective of this work was to validate a high performance liquid chromatography methodology (HPLC) for the identification and quantification of VPA solutions. Once the technique was validated, the analysis of all products marketed in Argentina was carried out, and the quality control techniques used by the manufacturing laboratories were evaluated. The samples analysed were within specification, while corrective actions emerged from the evaluation of the documentation and were indicated to the laboratories. This technique allows for a quick, simple and more applicable analysis, which could be established as a control standard in the FNA.

Keywords: valproic acid; high performance liquid chromatography; epilepsy; validation study; product surveillance postmarketing.



Esta obra está bajo una licencia [Creative Commons Atribución 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) (CC BY 4.0).

Introducción

La epilepsia es una enfermedad neurológica caracterizada por frecuentes convulsiones, breves episodios con síntomas característicos causados por un desbalance eléctrico temporal en el cerebro. Es padecida por alrededor de 50 millones de personas en el mundo, por lo que resulta uno de los desórdenes neurológicos más prevalentes. Los síntomas experimentados durante una convulsión pueden incluir pérdida de consciencia, alteraciones motrices, sensoriales y anímicas, por lo que la epilepsia suele verse asociada a problemas físicos y psicológicos, así como también a un riesgo de muerte prematura tres veces mayor que en la población general^[1].

Las convulsiones son generadas por un repentino aumento de actividad eléctrica excesiva en el cerebro. Si bien las causas de esta hiperactivación son múltiples y complejas, se observan alteraciones en los niveles de los principales neurotransmisores excitatorios e inhibitorios, el glutamato y el ácido gamma aminobutírico (GABA), respectivamente^[2].

El principal tratamiento de la epilepsia es farmacológico a través de principios activos (PA) antiepilépticos (AEDs, Antiepileptic drugs) que son efectivas en el 70-80% de los casos. El objetivo en el uso de estos medicamentos es restaurar el balance entre los neurotransmisores actuando sobre canales iónicos, transportadores y receptores para potenciar el efecto inhibitorio de GABA o inhibir la activación causada por el glutamato^[3].

Una de las AEDs más utilizadas es el ácido valproico (ácido 2-propilpentanoico; AV) (**Figura 1**), un ácido graso ramificado de cadena corta, derivado del ácido valérico que es producido naturalmente por *Valeriana officinalis*. Fue sintetizado en 1881 por Beverly S. Burton como solvente orgánico y usado como tal hasta 1963, cuando sus propiedades antiepilépticas fueron descubiertas accidentalmente por Georg Carraz al utilizarlo como solvente en un estudio de varios compuestos herbarios con potencial efecto antiepiléptico^[4].

El primer ensayo clínico en reportar el efecto antiepiléptico del AV fue publicado en 1975^[5], sin embargo, debido a su amplio espectro, su uso se ha extendido a otras patologías como la esquizofrenia, el trastorno bipolar y la profilaxis de la migraña^[6]. Incluso, en los últimos años se lo ha propuesto como agente adyuvante en el tratamiento del cáncer, la enfermedad de Alzheimer y de infecciones latentes del VIH (virus de inmunodeficiencia humana), debido a sus efectos epigenéticos^[7].

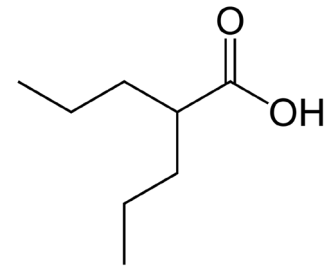


Figura 1: Estructura química del ácido valproico.

Si bien su mecanismo de acción no se conoce por completo, sus efectos se atribuyen al aumento de los niveles de GABA por aumento de la síntesis, inhibición de la degradación y la disminución de la recaptación neuronal. Adicionalmente, bloquea canales de sodio, de calcio voltaje-dependientes y de potasio voltaje-dependientes, disminuyendo la excitación neuronal^[6].

El AV es uno de los medicamentos de primera línea para el tratamiento de la epilepsia no solo en adultos, sino también en niños debido a que no genera dificultades en el aprendizaje ni cognitivas como otras AEDs^[8].

En cuanto a los efectos adversos de las AEDs, estos ocurren entre un 40% y un 50% de los pacientes tratados con monoterapias, mientras que los riesgos son mayores al aplicar una politerapia de más de una AED u otros medicamentos no asociados a la epilepsia. Los más comunes son los efectos dosis dependiente, llamados neurológicos, que incluyen mareos, fatiga, dolor de cabeza, visión doble o borrosa, pérdida de concentración y memoria, y falta de coordinación. En el caso particular del

AV, los principales efectos adversos severos incluyen hepatotoxicidad y pancreatitis que pueden ser fatales, siendo especialmente susceptibles los niños menores de dos años y los adultos mayores^[9]. Los pacientes con potencialidad gestacional presentan dos riesgos adicionales: la disminución de la eficacia de los anticonceptivos hormonales y la teratogenicidad de algunas AEDs, especialmente del AV^[10]. Este efecto teratogénico está causado por metabolitos tóxicos e implica un mayor riesgo de malformaciones congénitas como espina bífida, labio leporino, anomalías cardíacas e hipospadias, y déficits neurocognitivos como menor cociente intelectual, trastornos del espectro autista y trastorno por déficit de atención con hiperactividad^[11].

La Disposición ANMAT N° 556/2009, cataloga al AV como principio activo de estrecho rango terapéutico, lo cual significa que el cociente entre la dosis letal media (DL50) y la dosis eficaz media (DE50) es menor de 2^[13]. Esto implica que su uso eficaz y seguro requiere cuidadosa dosificación y monitoreo del paciente.

Además, el AV está incluido en la vigésimo segunda edición de la lista modelo de medicamentos esenciales de la Organización Mundial de la Salud (OMS)^[14], en la cual se incluyen los principios activos prioritarios para constituir un sistema de salud básico. En este listado, la prioridad se establece en base a su relevancia médica, seguridad y relación costo-beneficio. El ensayo de cuantificación de AV en solución oral se encuentra actualmente codificado en la Farmacopea Nacional Argentina (FNA) por el método de cromatografía gaseosa (CG)^[15], sin embargo, debido a que los laboratorios no siempre disponen de un cromatógrafo de gases, realizan sus análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, High-Performance Liquid Chromatography). Adicionalmente, el método actual requiere extracciones previas a la preparación de la solución muestra utilizando n-heptano, lo cual no solo implica una mayor complejidad en la realización del ensayo, aumentando los tiempos y costos de análisis, sino un riesgo ambiental

dada la toxicidad de este solvente para la vida acuática^[16].

La farmacovigilancia comprende todas las actividades relacionadas a la detección, análisis y prevención de efectos adversos y cualquier otro problema asociado a medicamentos, con el propósito de mejorar el cuidado de los pacientes y la salud pública, así como contribuir a la evaluación de riesgos y beneficios vinculados al uso de medicamentos^[17]. Debido a los frecuentes efectos tóxicos hepáticos asociados a dosis terapéuticas de AV, siendo especialmente riesgoso en niños menores a 2 años, resulta relevante la fiscalización de los productos comercializados en el país que contienen este principio activo. La forma farmacéutica solución oral fue elegida en particular dado que favorece una mayor adherencia por la simplicidad en su administración, particularmente en aquellos casos en los que existen problemas de deglución, como la población pediátrica y la tercera edad.

El objetivo del presente trabajo, llevado a cabo en el año 2022, fue validar un método por HPLC de identificación y cuantificación rápido, sencillo y de mayor aplicabilidad de AV en solución oral, que pueda ser establecido como norma de control en la FNA. Además, se llevó a cabo la fiscalización de especialidades medicinales que contienen AV en solución oral comercializadas en Argentina, mediante el análisis de los productos y las técnicas utilizadas para su control de calidad por los laboratorios elaboradores, siguiendo objetivos primordiales de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) como la farmacovigilancia y la detección de medicamentos subestándar.

Materiales y métodos

Muestreo de materia prima, productos y documentación de los laboratorios

Se realizaron inspecciones a los cinco laboratorios elaboradores de AV en solución oral, y se muestrearon tres lotes vigentes de producto. A los fines de esta publicación, se

identificó a cada laboratorio con las letras A, B, C, D y E. Al momento de la realización de este trabajo, durante el año 2022, los cinco productos comercializados se elaboraban con una concentración de AV de 5 g/100 ml en frascos de 120 ml.

Se solicitaron 50 g de materia prima activa y la siguiente documentación: Certificado de autorización de comercialización del producto con modificatorias, método de control vigente de producto terminado y materia prima, declaración jurada de validación o verificación, según corresponda, del método analítico de producto terminado, fórmula cuali-cuantitativa del producto terminado, el listado de lotes vigentes en el mercado y los certificados de liberación local y del proveedor de la materia prima activa empleada para la elaboración de los lotes muestreados, así como del producto terminado.

Metodología analítica y preparación de soluciones

La metodología utilizada fue la de la monografía "Valproic Acid Oral Solution" de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP)^[18]. La misma indica una fase móvil compuesta por acetonitrilo y solución amortiguadora de fosfato monobásico de sodio en agua 3,5 g/l en una proporción 45:55 ajustada a pH 3,5 con ácido fosfórico, diluyente acetonitrilo y agua (45:55), flujo de 1 ml/min y volumen de inyección de 20 µl. Si bien la técnica USP no indica una temperatura para el horno de la columna, esta se fijó en 35 °C para evitar las fluctuaciones debido al ambiente. Se modificó la fase estacionaria utilizada, que en la técnica corresponde a una columna C8, y se utilizó una C18 dado que se comprobó mediante análisis comparativos que este cambio proporciona una mayor resolución entre AV y su Compuesto Relacionado B. A partir de ensayos preliminares realizados, se determinó que el AV eluye a un tiempo de retención aproximado de 8 minutos, por lo que el tiempo de corrida se estableció en 16 minutos.

Para la realización de este trabajo, se utilizó un estándar de referencia USP de ácido

valproico (2-Propylvaleric acid, USP Catalog No.: 1708707), lote R051T0, con un título de 0,998 mg/mg sobre droga tal cual, conteniendo 500 mg. Adicionalmente, se utilizó un estándar de referencia USP de Compuesto Relacionado B de ácido valproico (2RS)-2-(1-methylethyl) pentanoic acid, USP Catalog No.: 1708718), lote R12370, para uso cualitativo, conteniendo 50 mg.

Para la preparación de soluciones, se utilizaron acetonitrilo calidad HPLC marca Merck (CAS-No. 75-05-08) y agua ultra pura. Tanto la fase móvil como las soluciones a inyectar en el cromatógrafo fueron filtradas con membranas de nylon de 0,45 µm.

La columna cromatográfica utilizada fue Phenomenex Luna C18 encapada de 150 mm de largo, 4,6 mm de diámetro interno y 5 µm de diámetro de partícula (Part N° 00F-4252-E0).

Se utilizó un equipo Shimadzu con controlador SCL-10AVP, detector de arreglo de diodos SPD-M10AVP, inyector automático SIL-10ADVP, bombas LC-20AT, horno de columna CTO-10A y software LabSolutions.

Se prepararon soluciones concentradas de los estándares de referencia USP de AV (2,5 mg/ml) y de Compuesto Relacionado B de AV (0,25 mg/ml). A partir de 2 ml de cada solución concentrada, se preparó la solución de aptitud (0,5 mg/ml de AV y 50 µg/ml de compuesto relacionado B). A lo largo de todo el trabajo, las soluciones estándar (0,5 mg/ml de AV) se prepararon a partir de la solución concentrada de estándar. Finalmente, se preparó una solución de placebo representativo que contenía los excipientes de todos los productos disponibles en el mercado.

Validación del método de identificación y cuantificación de ácido valproico

Según la FNA en su Capítulo <1130> "Validación de métodos analíticos", la cuantificación de soluciones orales de AV corresponde a ensayos de Categoría I: "métodos analíticos para la cuantificación de los componentes mayoritarios de las materias primas o de los principios activos (incluyendo conservantes) en productos

farmacéuticos^[19]. Los atributos necesarios para validar un método correspondiente a esta categoría son exactitud, linealidad, precisión y especificidad.

Para llevar a cabo la verificación, se utilizó la materia prima provista por uno de los laboratorios, cuyo contenido de AV fue determinado preparando tres muestras independientes.

Exactitud y linealidad

La exactitud y la linealidad fueron evaluadas en conjunto preparando muestras sintéticas con materia prima y placebo representativo, en cinco niveles de concentración según la **Tabla 1**.

En cada nivel de concentración, las muestras fueron preparadas por triplicado e inyectadas por triplicado. Adicionalmente, se preparó un blanco de diluyente, un blanco de placebo, dos soluciones estándar, que fueron inyectadas una por quintuplicado y otra por triplicado para evaluar los requisitos de aptitud del sistema, y una solución de aptitud que se inyectó para evaluar la resolución entre el AV y su compuesto relacionado B, también como parte de la aptitud del sistema.

Para la exactitud, a partir de los resultados obtenidos se calculó el porcentaje de recuperación media según la siguiente fórmula: $\% \text{ Recuperación media} = (\text{Valor medio hallado en la cuantificación} / \text{valor agregado}) \times 100$.

Los resultados fueron evaluados estadísticamente mediante una Prueba t de Student y de regresión. En el caso de la linealidad,

con los resultados obtenidos se graficó la respuesta (área del pico en el cromatograma) en función de la masa de muestra agregada para obtener una recta que fue evaluada mediante un análisis estadístico de regresión.

Precisión

En cuanto a la precisión, se evaluaron dos aspectos: la repetibilidad y la precisión intermedia. La repetibilidad fue determinada para el instrumento, realizando seis inyecciones de una misma solución estándar y para el método, preparando seis muestras a partir de un mismo producto. La precisión intermedia se examinó modificando ciertas variables como el analista, el equipo y la columna utilizados, y el día de ensayo.

Para evaluar la precisión se utilizó una muestra homogénea de un producto terminado. Se determinó el peso específico del mismo mediante el uso de un picnómetro. Para las determinaciones, dos analistas diferentes prepararon seis muestras cada uno. Se utilizó como blanco la solución de placebo preparada para el análisis de exactitud y linealidad. Se prepararon dos soluciones estándar que fueron inyectadas una por sextuplicado y otra por triplicado para evaluar la repetibilidad del instrumento y los requisitos de aptitud del sistema. La solución de aptitud se utilizó para evaluar la resolución entre el AV y su compuesto relacionado B. Como blanco se inyectó el diluyente. A partir de los resultados obtenidos, se calculó el coeficiente de variación de las

TABLA 1: COMPOSICIÓN DE LAS MUESTRAS SINTÉTICAS UTILIZADAS PARA LA EVALUACIÓN DE LA EXACTITUD Y LA LINEALIDAD.

Nivel	Concentración	Materia Prima	Placebo
80%	0,4 mg/ml	80 mg	2 ml
90%	0,45 mg/ml	90 mg	2 ml
100%	0,5 mg/ml	100 mg	2 ml
110%	0,55 mg/ml	110 mg	2 ml
120%	0,6 mg/ml	120 mg	2 ml

inyecciones repetidas de una misma solución estándar (repetibilidad del instrumento) y de la totalidad de las muestras analizadas en conjunto (precisión intermedia).

Especificidad

La molécula de AV posee una alta estabilidad intrínseca dada por la ausencia de grupos lábiles susceptibles a hidrólisis, oxidación o fotólisis (**Figura 1**), hecho confirmado por la ausencia de un método de sustancias relacionadas en su monografía tanto en FNA como en USP. Por este motivo, no se realizaron degradaciones forzadas para evaluar la especificidad sino que se evaluó la interferencia que pudieran causar los excipientes mediante el placebo representativo. Además, se evaluó la pureza de pico sobre las muestras sintéticas preparadas para los atributos exactitud y linealidad, y sobre las muestras de precisión, para descartar interferencias de los excipientes o impurezas.

Adicionalmente, otro indicio de la especificidad del método es la comprobación de su exactitud.

Estabilidad de la solución estándar

Por último, se evaluó la estabilidad de la solución estándar, para lo cual se realizaron corridas en diferentes días de una misma preparación, conservada en matraz color caramelo en la heladera, a lo largo de 14 días. A partir del conjunto de resultados obtenidos, se calculó el coeficiente de variación porcentual, el cual se estableció que debía ser menor a 1% dado que este es uno de los requisitos de aptitud del sistema en la monografía de la USP.

Análisis de muestras

Una vez validada la técnica analítica, se llevó a cabo el análisis de las muestras de producto terminado de los laboratorios.

En primer lugar, se midió el peso específico de cada producto utilizando un picnómetro. Luego, las muestras fueron preparadas por duplicado para cada lote de producto con una concentración de 0,5 mg/ml. Se prepararon dos soluciones estándar y una solución de aptitud.

Análisis de documentación

El análisis de la documentación aportada por los laboratorios consistió en evaluar principalmente dos aspectos. En primer lugar, se evaluó que las metodologías de análisis fueran las adecuadas, tanto para la materia prima como para el producto terminado, es decir que se ajustaran a las normas y las farmacopeas propuestas como referencia. En el caso de los laboratorios que utilizaran métodos propios, se evaluó también que los mismos se encontraran validados. En segundo lugar, se evaluó que los resultados declarados en los certificados de liberación de la materia prima y de los lotes de los productos estuvieran dentro de especificación.

Resultados

Este trabajo fue llevado a cabo modificando la columna codificada en la monografía de USP con una fase estacionaria C8 a una C18, debido a que arrojó una mayor cantidad de platos teóricos y mayor resolución entre AV y el Compuesto Relacionado B de AV, tal como se observa en la **Figura 2**.

Validación del método de identificación y cuantificación de ácido valproico

A partir del análisis de muestras sintéticas en cinco niveles de concentración, en la exactitud se obtuvo un porcentaje de recuperación media de 100,3% con un coeficiente de variación de 0,38%, ambos valores se encuentran dentro de los límites especificados según bibliografía en 98-102% y menor a 2%, respectivamente^[20]. Además, el análisis estadístico permitió determinar que el valor hallado no resultó significativamente distinto al valor teórico (**Tabla 2**). En la **Figura 3A** se muestra una superposición de cromatogramas representativos de cada nivel de concentración y en la **Figura 3B** la regresión lineal de los datos obtenidos.

Para evaluar la linealidad, se utilizaron los resultados obtenidos con las muestras sintéticas a distintas concentraciones. Se graficó la

respuesta en función de la masa agregada de muestra y se realizó un test de regresión lineal (Figura 4). En la Tabla 2 se puede observar que el coeficiente de determinación R^2 resultó mayor a la especificación, según bibliografía de 0,997, y el análisis estadístico corroboró este resultado^[20]. Como se explicó anteriormente, la precisión se evaluó mediante la repetibilidad con inyecciones repetidas de una misma solución estándar, en las cuales se obtuvo un coeficiente de variación porcentual de 0,28%. La precisión intermedia se evaluó calculando el coeficiente de variación

porcentual de todos los resultados obtenidos en dos días por dos analistas con dos equipos, el cual resultó en 1,83%. Ambos valores se encuentran dentro de la especificación (Tabla 2). Finalmente, la especificidad fue comprobada analizando la ausencia de otros componentes en el tiempo de retención del AV debido al placebo, y a partir de la pureza de pico, en diferentes muestras a lo largo de la verificación. Mediante este análisis no se detectó la presencia de ninguna interferencia (Tabla 2). Además, como se mencionó anteriormente, la comprobación

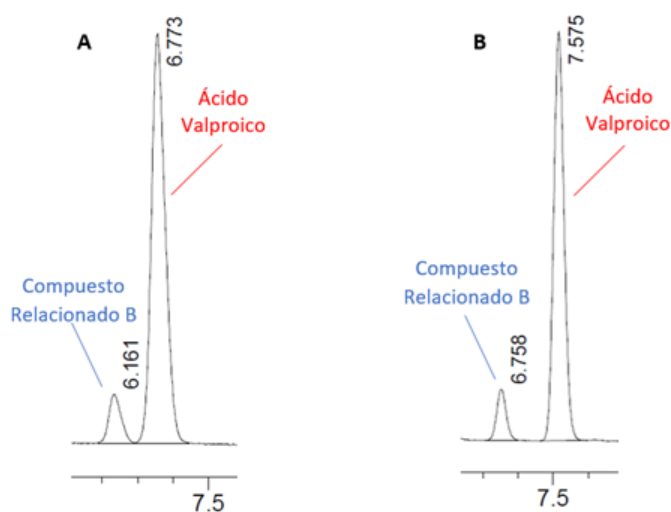


Figura 2: Extractos de cromatogramas representativos de dos soluciones de aptitud corridas con: a. columna C8, y b. columna C18.

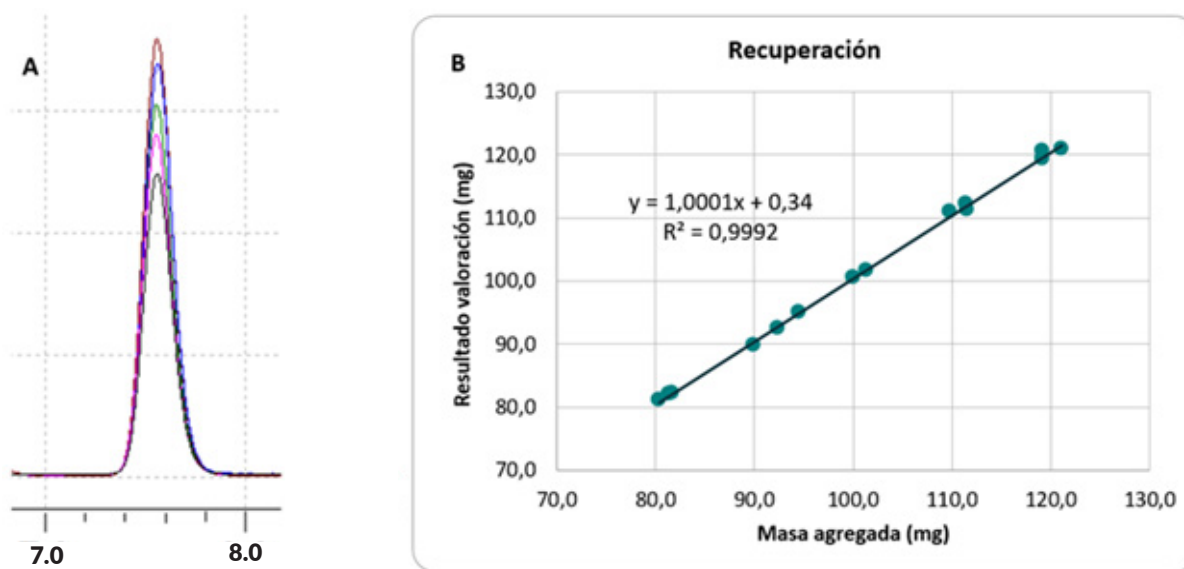


Figura 3: a. Superposición de cromatogramas de las muestras M1-1 de cada nivel de concentración. b. Gráfico de contenido, obtenido como resultado de la cuantificación en función de masa agregada y su regresión lineal.

de la exactitud del método proporciona otro indicio de la ausencia de interferencias. A modo de ejemplo, se muestran los cromatogramas del placebo representativo (Figura 5A) y de una muestra del producto, utilizada para evaluar el atributo precisión (Figura 5B). Al comparar ambos cromatogramas, se puede ver que al tiempo de retención del AV no se observan picos correspondientes al placebo ni al diluyente. En la figura 5B, la ausencia de ciertos picos del placebo representativo en el cromatograma se debe a que el primero corresponde al peor caso, dado que fue preparado con los excipientes presentes en todos los productos, no solo en el utilizado para la validación.

En la Figura 6 se muestra el gráfico de pureza del pico de AV en la muestra mencionada, en el cual se puede observar que no se detectaron impurezas, y el software arroja un índice de pureza de 0,999995.

A continuación, se presenta en la Tabla 2 un resumen de los atributos evaluados con sus requerimientos según bibliografía y resultados^[20].

Estabilidad de la solución estándar

El cálculo de los coeficientes de variación porcentual de todos los resultados obtenidos en tres días diferentes para cada estándar arrojó valores de 0,74% y 0,63%, en ambos casos en valores menores a 1%, por lo que se considera que las soluciones son estables durante al menos 14 días, conservadas en heladera.

Análisis de muestras

A continuación se presentan los resultados obtenidos en la cuantificación de los productos comercializados en el país, utilizando el método validado previamente. Se puede observar en la Tabla 3 que todas las muestras analizadas resultaron dentro de la especificación de 90,0-110,0% sobre el valor declarado.

Análisis de documentación

El análisis de la documentación aportada por los laboratorios consistió en evaluar que en las metodologías de análisis, tanto para la materia prima como para el producto terminado, se realizaran todos los ensayos necesarios de

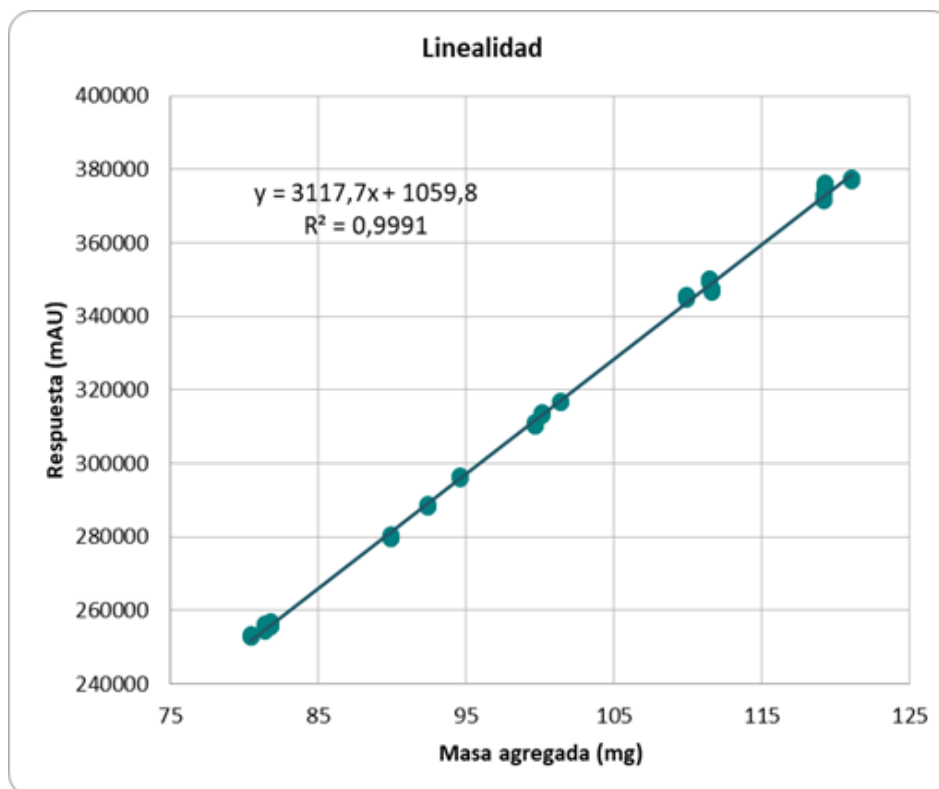


Figura 4: Gráfico de respuesta (área del pico en el cromatograma) en función de masa agregada y su regresión lineal.

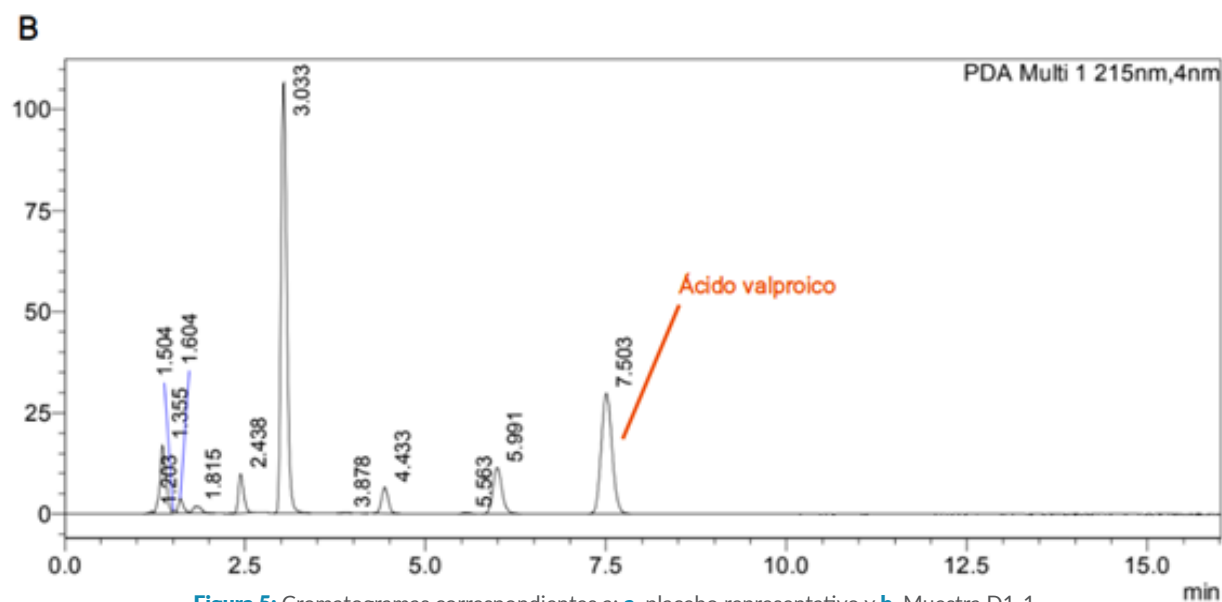
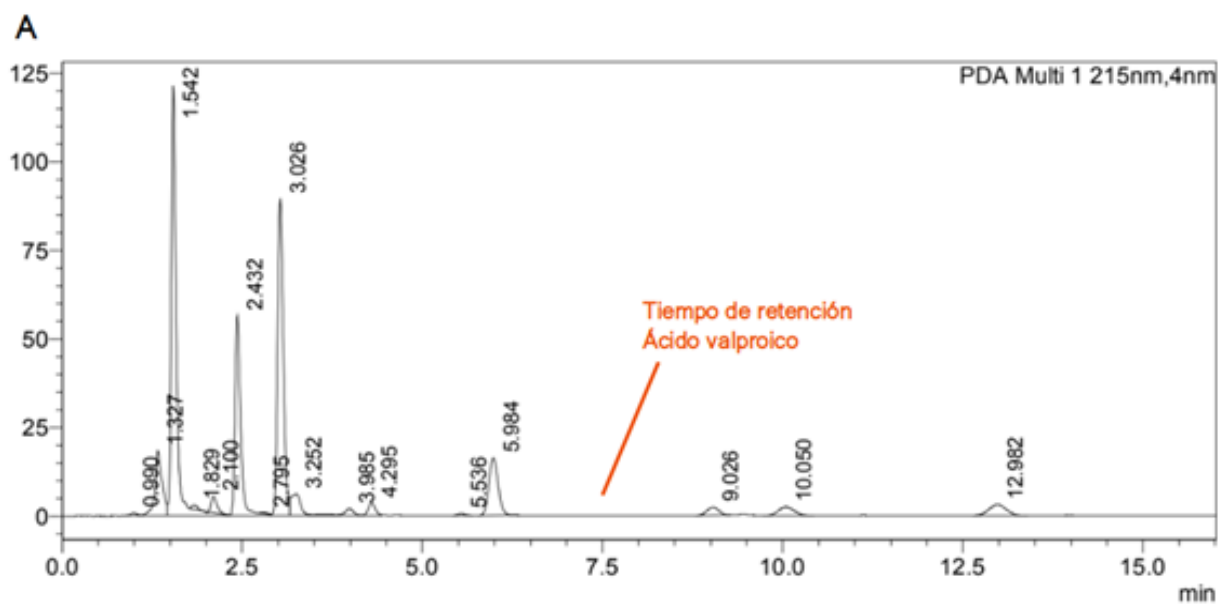


Figura 5: Cromatogramas correspondientes a: a. placebo representativo y b. Muestra D1-1.

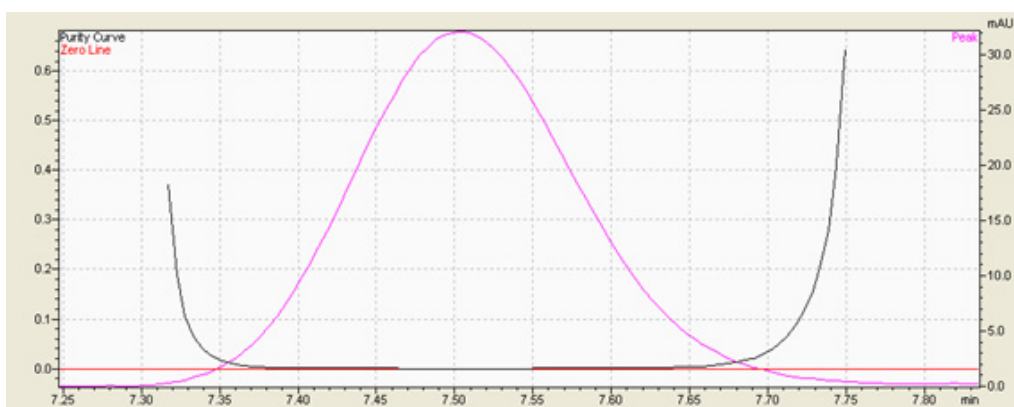


Figura 6: Gráfico de pureza del pico de ácido valproico en una muestra utilizada en el ensayo de precisión.

manera correcta y que las especificaciones estipuladas se ajustaran a lo codificado en farmacopea. Y por otro lado, que los resultados declarados en los certificados de liberación de la materia prima y de los lotes de los productos estuvieran dentro de especificación. Se observó que las técnicas de análisis de materia prima son adecuadas para garantizar su calidad y los resultados aportados en los certificados de liberación se encuentran dentro de los criterios de aceptación, los cuales se ajustan a farmacopea.

Con respecto a las técnicas de análisis de producto terminado, todos los laboratorios realizan los ensayos de densidad, pH, identificación y cuantificación. Adicionalmente, si bien no se encuentra codificado, dos de los cinco laboratorios realizan el ensayo de sustancias relacionadas con especificaciones para impurezas individuales no especificadas e impurezas totales. Se evaluaron también los métodos de cuantificación empleados y se observó que dos de los laboratorios utilizan el método codificado en la USP, mientras que los tres restantes emplean metodologías propias validadas. En relación a los criterios de aceptación, dos laboratorios mantienen

la especificación codificada de 90,0-110,0% sobre el valor declarado, otros dos adoptan una especificación más estricta (95,0-105,0%) y uno lo establece en 95,0-105,0% para la liberación del producto y en 90,0-110,0% durante la vida útil. Finalmente, al evaluar los certificados de liberación de los lotes muestreados, se corroboró que todos los resultados se encuentran dentro de especificación, excepto para uno de los lotes del laboratorio B que fue entregado incompleto ya que no presentaron los resultados de los ensayos de densidad y pH. Estos resultados faltantes fueron solicitados al laboratorio y aportados posteriormente, resultando dentro de especificación.

En la **Tabla 4** se resumen los ensayos realizados por cada laboratorio y en caso de observarse correcciones, se indican en la última columna junto con los ensayos adicionales que los laboratorios realizan al producto. En el caso del laboratorio B se detectaron errores en la descripción del ensayo de sustancias relacionadas y sus especificaciones, por lo que estas acciones correctivas fueron comunicadas al laboratorio que aportó la documentación subsanada.

TABLA 2: ESPECIFICACIONES Y RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO Y SU ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Atributo	Requerimiento	Resultado
Exactitud	Porcentaje de recuperación entre 98% y 102%	100,3%
	Coefficiente de variación < 2%	0,38%
	Estadístico $t_{\text{calc}} < t_{\text{tabla}}$	0,233 < 2,145
Linealidad	Coefficiente de determinación $R^2 > 0,997$	0,9991
	Estadístico $F_{\text{calculado}} > F_{\text{crítico}}$	44467,87 > 3,62x10 ⁻⁶⁵
	IC95% de la pendiente no incluye al 0	IC95% = (3092,13; 3151,89)
	IC95% de la ordenada al origen incluye al 0	IC95% = (-2470,87; 3642,49)
Precisión	Precisión intermedia: Coeficiente de variación de todas las muestras < 2%	1,83%
	Repetibilidad: Coeficiente de variación de inyecciones repetidas < 1,5%	0,28%
Especificidad	No se detectan interferencias espectrales ni co-eluciones al comparar con el placebo, cumple pureza de pico y el método es exacto	No se detectan interferencias espectrales ni co-eluciones, el pico resulta puro y el método es exacto

TABLA 3: RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE PRODUCTOS TERMINADOS. ¹ PORCENTAJE SOBRE EL VALOR DECLARADO; ² COEFICIENTE DE VARIACIÓN PORCENTUAL.

Laboratorio	Lote	Peso específico (g/mL)	% SVD ¹	CV% ²
A	22277QA	1,3017	99,8	0,49
	31512QA		100,5	0,47
	36130QA		100,7	1,09
B	00480	1,0705	102,9	1,66
	04261		100,9	0,21
	070X1		100,4	0,54
C	2BOIP	1,3086	99,9	0,21
	2BOJT		101,9	0,39
	2BOKY		100,2	0,32
D	CX5W	1,2663	99,5	1,94
	CZ9I		100,5	0,11
E	01249	1,2668	102,4	0,30
	01823		100,1	0,02
	01968		101,9	0,20

TABLA 4: RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE PRODUCTO TERMINADO PRESENTADAS POR LOS LABORATORIOS. REFERENCIAS: ¹ CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN; ² ESPECTROSCOPÍA ULTRAVIOLETA.

LABORATORIO	ENSAYO					OBSERVACIONES Y ACCIONES CORRECTIVAS
	Densidad	pH	Identificación	Cuantificación (Especificación)	Sustancias relacionadas	
A	x	x	Colorimetría y HPLC ¹	USP (95-105%)	-	Ensayos adicionales: Color, claridad, presencia de material extraño, olor y sabor.
B	x	x	Colorimetría y HPLC ¹	Método propio (95-105%)	X	Ensayos adicionales: Aspecto y contenido extraíble del envase. Acciones correctivas: Se encontraron errores en la descripción del ensayo de sustancias relacionadas y las especificaciones del mismo no coincidían con la farmacopea de referencia.
C	x	x	HPLC ¹	Método propio (90-110%)	X	Ensayos adicionales: Aspecto, índice de refracción, sacarimetría, turbidez y color.
D	x	x	HPLC ¹	Método propio (95-105% para liberación, 90-110% durante la vida útil)	-	Ensayos adicionales: Aspecto y control de volumen.
E	x	x	HPLC ¹ y UV ²	USP (90-110%)	-	No realizan ensayos adicionales.

Conclusión

Mediante la realización de este trabajo se comprobaron todos los atributos necesarios para validar una técnica de identificación y cuantificación de ácido valproico en solución oral por cromatografía líquida de alta resolución. Al modificar la columna codificada en la Farmacopea de los Estados Unidos, se arribó a un nuevo método que permite una mejor separación de los compuestos analizados y mayor número de platos teóricos.

Utilizando la técnica validada, se analizaron todos los productos comercializados en el mercado nacional, obteniéndose resultados que cumplen con las especificaciones, comprobando así su calidad. De esta manera, se cumplió con uno de los objetivos de esta administración, la fiscalización de especialidades medicinales comercializadas en Argentina, en este caso de un ingrediente farmacéutico activo con estrecha ventana terapéutica, presente en el listado de medicamentos esenciales de la OMS. Además, como se mencionó anteriormente, la forma farmacéutica fue elegida debido a que es la indicada para poblaciones especialmente vulnerables como la pediátrica y geriátrica.

Por otro lado, se evaluó la documentación provista por los laboratorios elaboradores. En la misma se analizaron las técnicas de control de materia prima y producto terminado, comparando las metodologías de los ensayos de competencia de este servicio con las descritas en las farmacopeas mencionadas como referencia por los laboratorios. En caso de observarse correcciones, dichas observaciones fueron indicadas a los laboratorios, los cuales enviaron la documentación subsanada.

Por último, se corroboró en los certificados de liberación el cumplimiento de las especificaciones en los ensayos realizados a los lotes muestreados.

Como se mencionó previamente, contar con esta metodología resulta importante para proporcionar a los laboratorios elaboradores, así como a esta administración, una técnica

rápida y sencilla para el control de productos que contienen ácido valproico en solución oral, que podría reemplazar la actualmente codificada en la Farmacopea Argentina. Este nuevo método será propuesto para su inclusión en la monografía de ácido valproico en solución oral de la Farmacopea Argentina.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no poseer conflictos de interés.

Bibliografía

1. World Health Organization. Epilepsy Fact Sheet [Internet]. 2022 [citado 1 jul 2022]. Disponible en: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>
2. Akyuz E, Polat AK, Eroglu E, Kullu I, Angelopoulou E, Paudel YN. Revisiting the role of neurotransmitters in epilepsy, An updated review. Life Sciences. 2021;265:118826. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118826>
3. Löscher W, Klitgaard H, Twyman RE, Schmidt D. New avenues for antiepileptic drug discovery and development. Nature Reviews Drug Discovery. 2013;12(10):757-776. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrd4126>
4. Nisar T, Sutherland-Foggio H, Husar W. Serendipitous antiepileptics. The Lancet Neurology. 2019;18(11):995. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s1474-4422\(19\)30360-6](http://dx.doi.org/10.1016/s1474-4422(19)30360-6)
5. Richens A, Ahmad S. Controlled trial of sodium valproate in severe epilepsy. British Medical Journal. 1975;4(5991):255-256. DOI: <https://doi.org/10.1136/bmj.4.5991.255>

6. Chateauvieux S, Morceau F, Dicato M, Diederich M. Molecular and therapeutic potential and toxicity of valproic acid. *Journal of Biomedicine Biotechnology*. 2010;2010:479364. DOI: <https://doi.org/10.1155/2010/479364>
7. Terbach N, Williams RSB. Structure-function studies for the panacea, valproic acid. *Biochemical Society Transactions*. 2009;37(5):1126-1132. DOI: <https://doi.org/10.1042/bst0371126>
8. Buck ML. Valproic Acid in the Treatment of Pediatric Seizures. *Pediatric Pharmacotherapy*. 1997;3(3).
9. Rahman M, Nguyen H. Valproic Acid [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [citado 1 jul 2022]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32644538/>
10. St Louis EK. Minimizing AED adverse effects, improving quality of life in the interictal state in epilepsy care. *Current Neuropharmacology*. 2009;7(2):106-114. DOI: <https://doi.org/10.2174/157015909788848857>
11. Błaszczuk B, Miziak B, Pluta R, Czuczwar SJ. Epilepsy in Pregnancy—Management Principles and Focus on Valproate. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(3):1369. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23031369>
12. Argentina, ANMAT. Disposición ANMAT 556/2009 [Internet]. 2009 [citado 3 jul 2022]. Disponible en: https://www.anmat.gob.ar/webanmat/legislacion/medicamentos/Disposicion_ANMAT_556-2009.pdf
13. Argentina, ANMAT. Disposición ANMAT 3185/99 [Internet]. 1999 [citado 3 jul 22]. Disponible en: https://www.anmat.gob.ar/webanmat/Legislacion/Medicamentos/Disposicion_ANMAT_3185-1999.pdf
14. World Health Organization. WHO Model Lists of Essential Medicines [Internet]. 2021 [citado 1 jul 2022]. Disponible en: <https://www.who.int/groups/expert-committee-on-selection-and-use-of-essential-medicines/essential-medicines-lists>
15. Comisión permanente de la Farmacopea Argentina. *Farmacopea Argentina*. 7ª Edición. Argentina: Ministerio de Salud. 2013. Vol 3. Ácido valproico, solución oral.
16. Supelco. Ficha de datos de seguridad de n-Heptano EMPLURA [Internet]. 2023 [citado 1 abr 2023]. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/AR/es/sds/mm/1.04365>
17. World Health Organization. The importance of pharmacovigilance, Safety monitoring of medicinal products. United Kingdom: World Health Organization; 2002.
18. The United States Pharmacopeial Convention. *United States Pharmacopeia: Valproic Acid, Oral Solution*; 2021.
19. Comisión permanente de la Farmacopea Argentina. *Farmacopea Argentina*. 7ª Edición. Argentina: Ministerio de Salud. 2013. Vol 1. Capítulo <1130>, Validación de métodos analíticos.
20. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. Validación de métodos analíticos. España: AEFI; 2001. Parte II Validación de métodos de análisis en materias primas y especialidades farmacéuticas; p. 41-133.