

CLOZAPINA: INVESTIGACION Y DESARROLLO APLICANDO NUEVAS TECNOLOGIAS A LA FISCALIZACION

¹Farm. García, Marcela I. ; ²Lic. Villar, Nadia S.; ³Farm. Eduardo Saint Martin

¹⁻³ Departamento de Química y Física, Dirección de Fiscalización y Gestión de Riesgos, Instituto Nacional de Medicamentos; Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica; Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Palabras Clave: Clozapina, Impurezas Orgánicas, UHPLC, Desarrollo y Validación.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

En vista de los nuevos paradigmas relacionados a la Ciencia Reguladora, con la incorporación de equipamiento de Cromatografía Líquida Ultra Rápida (UHPLC), en el departamento de Química y Física del Instituto Nacional de Medicamentos se viene trabajando en la investigación y desarrollo de nuevas metodologías que permitan ampliar el análisis sobre las especialidades medicinales que así lo requieren.

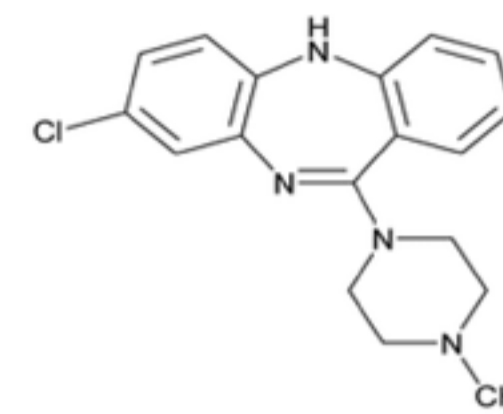
En este contexto, el presente trabajo se enfoca en el principio activo "Clozapina", un antipsicótico atípico que se utiliza en el tratamiento de la esquizofrenia resistente a otras medicaciones¹. Este principio activo se encuentra incluido en el Sistema Nacional de Farmacovigilancia Intensiva, debido a su potencial toxicidad y efectos adversos.

Hasta el momento, las metodologías vigentes en bibliografía disponible ^{2, 3,4} no permiten obtener resultados de valoración e Impurezas y/o productos de degradación para todos los productos comercializados,

debido a la interferencia de las matrices empleada en las diferentes especialidades medicinales.

Objetivos:

- Investigación y desarrollo de una Metodología Analítica por Cromatografía Líquida Ultra rápida (UHPLC) destinada a la "Valoración de Clozapina y a la Cuantificación de sus posibles productos de degradación", aplicable a todas las especialidades medicinales registradas en Argentina.



8-Chloro-11-(4-metil-1-piperazinyl)-5H-dibenzo[b,e][1,4]diazepina

MATERIALES Y MÉTODOS

Se muestrearon las tres especialidades medicinales comercializadas en el país a la fecha de realización del trabajo, en las concentraciones de 25 mg y 100 mg de Clozapina para la forma farmacéutica Comprimidos, con el fin de evaluar los requerimientos de la técnica a desarrollar.

Se emplearon solventes calidad HPLC de la marca Merck, agua de calidad miliq y estándares primarios de "Clozapina" y "Clozapina impurezas" pertenecientes a la USP⁴.

Equipos: Shimadzu Nexera- serie LC-30A-UHPLC.

Sistema cromatográfico: Columna Carbono 18 Phenomenex-kinetex 50 mm

x 2,1 mm; dp 1,7 µm; dporo 100 Å. Una mezcla de acetonitrilo (A) y buffer fosfato (B: 2,04 gr/ litro de Fosfato monoácido de potasio a pH=6,5) se emplearon como fase móvil. El gradiente de elución fue realizado a un flujo constante de 0,2 ml/min variando la concentración de las soluciones A y B en un tc de 23 min; temperatura horno 35°C y el volumen de inyección de 2 µL para la Valoración y de 4 µL para la cuantificación de los productos de degradación, λ=257 nm y las concentraciones de estándar y muestra utilizadas fueron de 0,125 mg/ml de Clozapina.

RESULTADOS

En el inicio del trabajo se comprobó experimentalmente que el método vigente en farmacopeas internacionalmente reconocidas no es apto para el análisis de todos los productos registrados, ya que para una de las formulaciones no se obtiene una resolución aceptable entre el activo y uno de los componentes de la matriz (gráfico I).

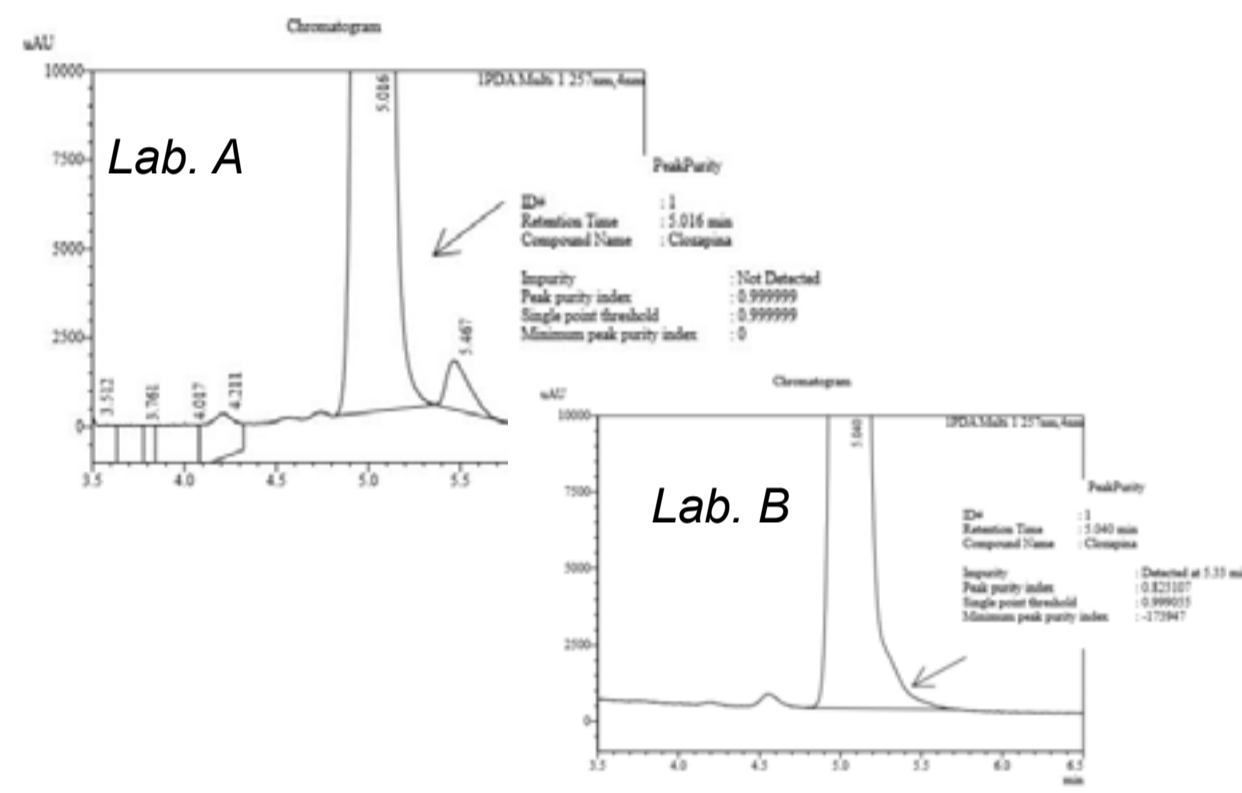


Gráfico I: La muestra del laboratorio B no se resuelve correctamente

Se procedió a desarrollar y validar una nueva metodología para lo cual se evaluaron los parámetros de acuerdo a lo indicado en la tabla I.

Parámetro	Criterio de aceptación Valoración/ Impurezas Orgánicas	Resultados Valoración	Resultados Impurezas Orgánicas
LINEALIDAD Cc 0,125 mg/ml			
		(50%-150%)	(0,125%-2,0%)
Homogeneidad de Varianzas (para aplicar ANOVA)	Cexp < C tabla 0,841 / 0,727	C exp: 0,546	C exp: 0,374
Coefficiente de regresión lineal R ²	> 0,991 / > 0,95	0,999934	0,999804868
Estadístico tr para la pendiente. (Ho: la pendiente es igual a 0)	t calculado > t tabla; 2,306/ 2,179	350,607	258,09
Estadístico tr para la ordenada al origen	t calculado < t tabla 2,306/ 2,179	-5,4379	-3,61
Bondad de ajuste	< 2,0% / < 5,0%	MIN: 98,07- MAX:100,2	MIN: 96,75- MAX:101,75
Homocedasticidad	FR promedio. CV%<2 / CV%< 5%	0,91	0,84
EXACTITUD (100%-120%-130%)			
Test de igualdad de Varianzas	Valor de Tabla (α=0,05; K=2, n=6): 0,877		0,594
RSD para las 12 determinaciones	< 2,0 %		0,9
RSD para cada nivel de trabajo	< 2,0 %		< 1,2
Recuperación individual	Entre 97,0-103,0 %		99,30-101,7
Recuperación porcentual promedio	Entre 98,0-102,0 %		100,8
PRECISION INTERMEDIA			
	Analista1- Dia1	Analista 2- Dia 2	
n	6	6	
Promedio	97,65	98,15	
RSD%	1,71	1,33	
RSD % entre promedios		0,37	
Fexp < F tabla : 5,05		2,05	
LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN			
Límite de Detección	0,0076 µg/ml (equivalente al 0,006%)		
Límite de Cuantificación	0,025 µg/ml (equivalente al (0,02%)		

Tabla I

Se llevaron a cabo diferentes degradaciones forzadas observándose, en todos los casos, la no interferencia de los degradados frente al activo. Se trabajó particularmente durante el desarrollo de la metodología en el gradiente de fase móvil para la resolución entre las impurezas 2 y 3 provenientes de la degradación ácida.

Por otro lado, se pudo comprobar que no existen diferencias significativas entre la degradación del principio activo y los productos terminados.

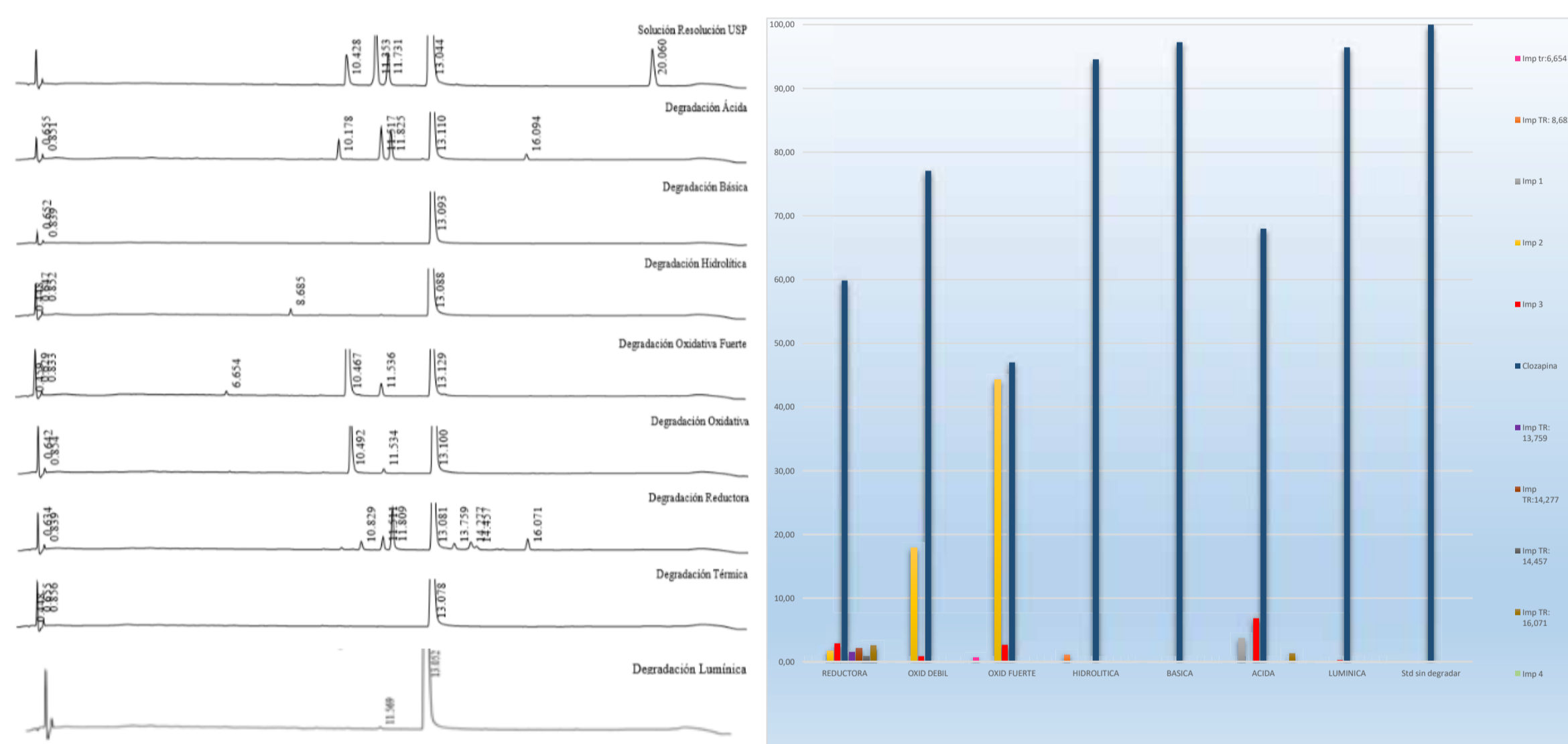


Gráfico II: Especificidad del método

Gráfico III: Especificidad, proporción de degradados

Adicionalmente, se realizó una comparación de perfiles cromatográficos del método desarrollado con la metodología codificada en farmacopea USP (TLC) para la detección de los degradados. Se observó que no es factible la detección y cuantificación de impurezas que si se lograron con la metodología desarrollada, gráfico IV.

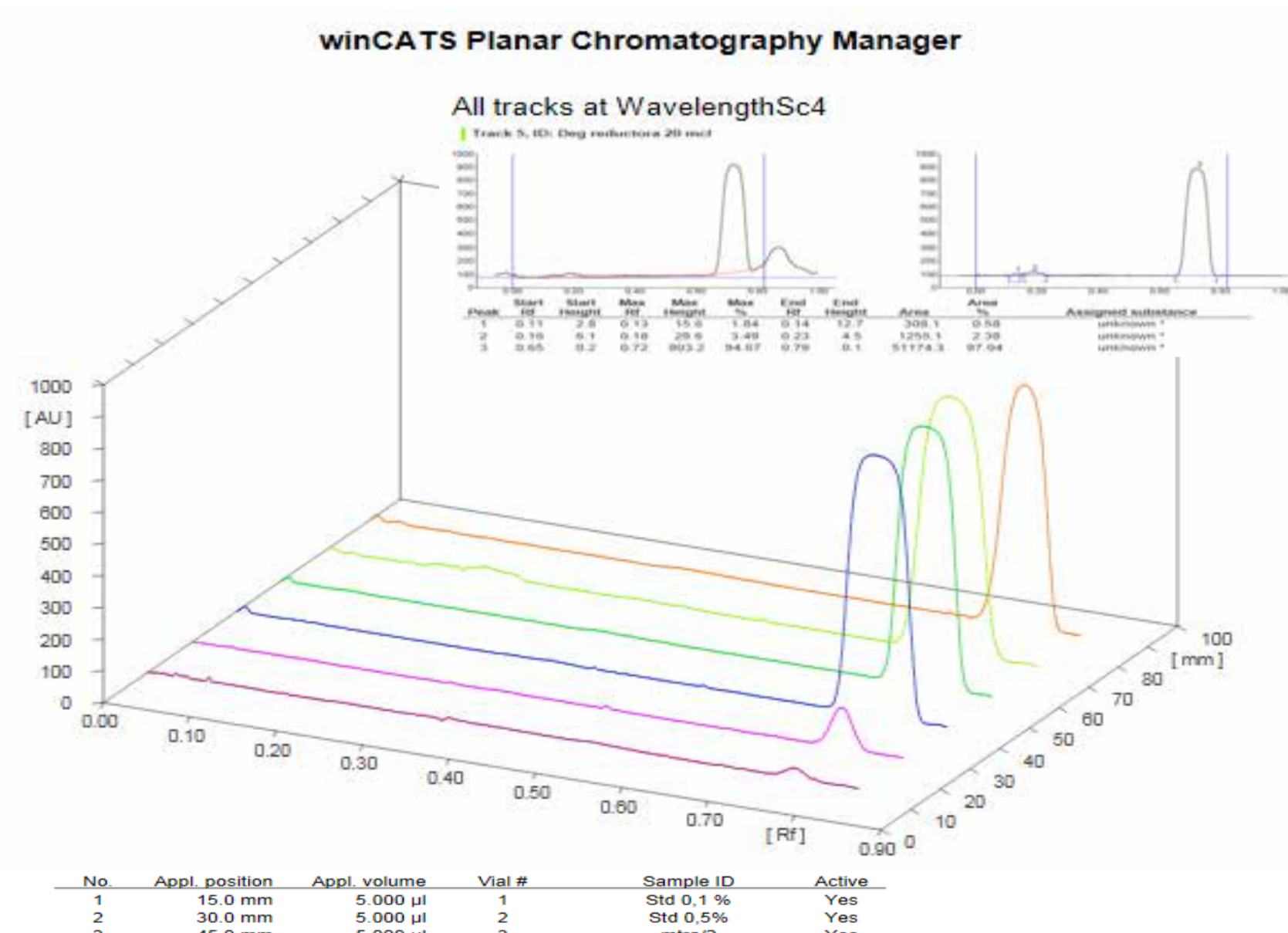


Gráfico IV: En las calles 5 y 6 correspondiente a Degradación Reductora se detectan únicamente 2 degradados.

CONCLUSIÓN

Se desarrolló y validó una metodología que permite el análisis de todas las especialidades medicinales disponibles en el mercado, con la misma se obtienen en un sólo ensayo resultados de "Valoración e Impurezas Orgánicas de Clozapina". La metodología propuesta fue validada cumpliendo con las especificaciones y test estadísticos establecidos, ver tabla I, para todos los atributos estudiados: selectividad, especificidad, precisión del sistema, respetabilidad, precisión intermedia y reproducibilidad, exactitud, linealidad y rango, límite de detección y cuantificación, retención en filtros, estabilidad de las soluciones y robustez. Dado que el método es altamente específico para el estudio de productos de degradación, resulta muy valioso como indicativo de estabilidad durante el periodo de vida útil de los productos.

El estudio de las degradaciones forzadas realizadas y el estudio de los límites

de detección y cuantificación permitió evidenciar la presencia de los productos de degradación conocidos y otros desconocidos que, hasta el momento, por la técnica de cromatografía en capa delgada (TLC) codificada en farmacopea, no se lograban detectar ni cuantificar.

Lo antes descrito nos brinda una mayor información para responder ante las notificaciones recibidas a través del sistema nacional de farmacovigilancia y llevar a cabo un seguimiento más exhaustivo a lo largo del tiempo para estos productos.

Adicionalmente, los resultados obtenidos del análisis efectuado con esta metodología, sobre las especialidades medicinales registradas, nos permiten asegurar la seguridad, calidad y eficacia de los productos que se encuentran en el mercado actualmente.

BIBLIOGRAFIA

- S. Warnez, S. Alessi-Severini, Clozapine: a review of clinical practice guidelines and prescribing trends, Psychiatry 14 (2014) 1–5.
- Zahid Zaheer et al. Stability-indicating High Performance Thin Layer Chromatographic Determination of Clozapine in Tablet Dosage Form. J. Pharm. Sci. & Res. Vol.1(4), 2009, 158-166.
- Robert Skibinski et al. Characterization of forced degradation products of clozapine LC-DAD/ESI-Q-TOF. J.Pharm. & Biomed Anal. Vol 131(2016) 272-280.
- United States Pharmacopeial and National Formulary (USP 41- NF 36). <Clozapine tablets> ; 2018.
- Farmacopea Argentina. 7 ed.
- European Pharmacopoeia 9.0 <Clozapine> pag. 2139

Correo electrónico de contacto: analitica@anmat.gov.ar