



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

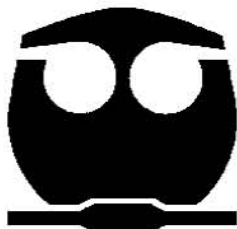
FACULTAD DE QUÍMICA

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO
PARA CUANTIFICAR CLOZAPINA Y SU
METABOLITO N-DESMETILCLOZAPINA EN PLASMA HUMANO
POR HPLC CON DETECCIÓN ULTRAVIOLETA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:
MORALES INCLÁN VANESSA



MÉXICO, D.F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente Prof. Inés Fuentes Noriega

Vocal Prof. Helgi Helen Jung Cook

Secretario Prof. Lauro Misael Del Rivero Ramírez

1er. Suplente Prof. María de Lourdes Mayet Cruz

2º. Suplente Prof. Luis Jesús García Aguirre

Sitio donde se desarrolló el tema:

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez"

Laboratorio de Neuropsicofarmacología

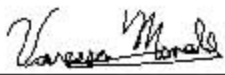
Nombre completo y firma del asesor del tema:

Helgi Helen Jung Cook



Nombre completo y firma del asesor del sustentante:

Vanessa Morales Inclán



❁ Agradecimientos ❁

A mis padres, hermanos y sobrinos, a quienes les voy agradecer toda mi vida por apoyarme en todo momento, lo aprecio mucho, aunque la mayoría de las veces no lo demuestro. Los quiero mucho y son lo más importante en mi vida; les quiero dedicar este logro que para mi significa muchísimo.

A la Dra. Helgi que me brindó la gran oportunidad de ser mi asesora de tesis, aprecio muchísimo el que me haya brindado su tiempo y haber compartido sus conocimientos conmigo, pero también por la confianza que puso en mi para la realización de esta tesis. Muchas gracias, porque en los peores momentos siempre estuvo ahí para apoyarme y porque me permitió conocer a la increíble persona que es usted.

A Carmen y Araceli porque me brindaron su ayuda desinteresada, la cual fue para mí de gran utilidad en la realización de esta tesis, quiero que sepan que pueden contar conmigo y les doy las gracias por todo.

A mis amigos CCHeros, de la facultad, a la banda, a mis amigos del Instituto de Nutrición y a los que he conocido en otros lugares, gracias por los hermosos recuerdos que me han dejado y que nunca olvidare, y por haberme enseñado el concepto y el valor de la amistad.

A los profesores Inés y Misael por el tiempo que me brindaron para la revisión de esta tesis y por las correcciones realizadas, que sirvieron para la mejora de ésta.

Al personal del laboratorio de Neuropsicofarmacología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, por su colaboración para la realización de esta tesis.

A la Fundación Armstrong por el apoyo económico recibido.

A los laboratorios Psicofarma por la ayuda otorgada.

Con todo mi cariño para ustedes

Vane ☺



ÍNDICE GENERAL

Descripción	Pág.
LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE TABLAS	VI
I) INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
II) GENERALIDADES	
2.1 Esquizofrenia	3
2.1.1 Diagnóstico	3
2.1.2 Subtipos y Fases de la Esquizofrenia	4
2.1.3 Tratamiento	5
2.2 Clozapina	7
2.2.1 Historia de la Clozapina	7
2.2.2 Propiedades químicas	9
2.2.3 Propiedades físicas	9
2.2.4 Propiedades Farmacológicas	10
2.2.4.1 Nombres comerciales	10
2.2.4.2 Indicaciones terapéuticas	10
2.2.4.3 Mecanismo de acción	10
2.2.4.4 Farmacocinética	11
2.2.4.5 Metabolismo y Eliminación	11
2.2.4.6 Otras propiedades farmacológicas de la clozapina	12
2.2.4.7 Contraindicaciones	12
2.2.4.8 Medidas especiales precautorias	13
2.2.4.9 Efectos adversos	13
2.2.4.10 Interacciones	14
2.2.4.11 Dosis y vías de administración	14



Descripción	Pág.
2.3 N-desmetilclozapina	16
2.3.1 Propiedades fisicoquímicas	16
2.3.2 Actividad Farmacológica	16
2.3.3 Farmacocinética	17
2.3.4 El probable papel de la N-desmetilclozapina en la agranulocitosis inducida por la clozapina	17
2.3.5 Probable usos terapéuticos	18
2.4 Métodos analíticos reportados para la cuantificación de clozapina y N- desmetilclozapina en plasma o suero	19
2.5 Validación de métodos bioanalíticos, comparación de la guía de validación de métodos bioanalíticos de la FDA (2001) y la NOM-177-SSA1-1998 de SSA.	22

III) PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Método analítico para la cuantificación de clozapina y N-desmetilclozapina en plasma utilizando extracción en fase sólida	25
3.2 Material y equipo	25
3.3 Preparación de soluciones	26
3.4 Preparación de las soluciones estándar, curva de calibración y puntos control para la clozapina y la N-desmetilclozapina	27
3.5 Procedimiento de extracción de las muestras del plasma	28
3.6 Condiciones cromatográficas	29
3.7 Validación del método analítico para la cuantificación de clozapina y N-desmetilclozapina en plasma	31
3.7.1 Selectividad	31
3.7.2 Exactitud	32
3.7.3 Precisión	32
3.7.3.1 Repetibilidad	32
3.7.3.2 Reproducibilidad	33



Descripción	Pág.
3.7.4 Recuperación absoluta (% Recobro)	33
3.7.5 Linealidad	34
3.7.5.1 Linealidad del Método	34
3.7.5.2 Influencia de la dilución de la muestra o del uso de un volumen más pequeño	34
3.7.6 Límite de cuantificación	35
3.7.7 Estabilidad	35
3.7.7.1 Estabilidad de la muestra analítica	36
3.7.7.1.1 Ciclos de congelación-descongelación	36
3.7.7.1.2 Estabilidad a corto plazo (temperatura ambiente)	36
3.7.7.1.3 Estabilidad a largo plazo (temperatura de congelación)	37
3.7.7.1.4 Estabilidad de la muestra bajo diferentes condiciones de luz ...	37
3.7.7.2 Estabilidad de la muestra procesada	37
3.7.7.3 Estabilidad de la solución estándar en refrigeración	38
3.7.7.4 Aplicación del método a la clínica	39

IV) RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1 Desarrollo del método analítico	40
4.1.1 Selección de las condiciones cromatográficas	40
4.1.1.1 Selección de la longitud de onda de máxima absorción (λ_{max})	40
4.1.1.2 Elección de la columna cromatográfica y fase móvil	40
4.1.2 Selección del método de extracción	41
4.1.3 Selección del estándar interno	42
4.1.4 Optimización del método analítico	43
4.2 Validación del método analítico para la cuantificación de clozapina y N-desmetilclozapina	43



Descripción	Pág.
4.2.1 Selectividad	43
4.2.2 Exactitud	46
4.2.3 Precisión	47
4.2.3.1 Repetibilidad	47
4.2.3.2 Reproducibilidad	48
4.2.4 Recuperación absoluta (% Recobro)	50
4.2.5 Linealidad	52
4.2.5.1 Linealidad del Método	52
4.2.5.2 Influencia de la dilución de la muestra o del uso de un volumen más pequeño	54
4.2.6 Límite de cuantificación	56
4.2.7 Estabilidad	57
4.2.7.1 Estabilidad de la muestra analítica	57
4.2.7.1.1 Ciclos de congelación-descongelación	57
4.2.7.1.2 Estabilidad a corto plazo (temperatura ambiente)	58
4.2.7.1.3 Estabilidad a largo plazo (temperatura de congelación)	59
4.2.7.1.4 Estabilidad de la muestra bajo diferentes condiciones de luz	60
4.2.7.2 Estabilidad de la muestra procesada	62
4.2.7.3 Estabilidad de la solución estándar en refrigeración	63
4.3 Aplicación del método a la clínica	64
V) CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	
5.1 Conclusiones	66
5.2 Recomendaciones	67
VI) BIBLIOGRAFÍA	68



LISTA DE FIGURAS

Descripción	Pág.
Figura 1. Diagrama de flujo para la preparación de las muestras	30
Figura 2. Estructuras químicas de los estándares internos probados	42
Figura 3. Cromatograma de una muestra de plasma adicionada con DMCZ y CLZ en el límite de cuantificación (40 ng/mL), adicionada con estándar interno (HPL)	44
Figura 4. Cromatograma de muestra blanco (mezcla de los 6 plasmas de los voluntarios)	44
Figura 5. Cromatograma de muestra blanco (plasma del voluntario No. 1)	44
Figura 6. Cromatograma de la selectividad del método (fármacos que se administran concomitantemente con la clozapina)	45
Figura 7. Linearidad del método analítico para cuantificar DMCZ	53
Figura 8. Linearidad del método analítico para cuantificar CLZ	53



LISTA DE TABLAS

Descripción	Pág.
Tabla 1. Productos comerciales que contienen clozapina	10
Tabla 2. Métodos en los que se emplea extracción líquido-líquido	20
Tabla 3. Métodos reportados en la literatura en los que se emplea extracción en fase sólida	21
Tabla 4. Comparación de los parámetros a evaluar entre la NOM-177-SSA1-1998 y la guía de validación de la métodos bioanalíticos de la FDA	23,24
Tabla 5. Selectividad del método (fármacos que se administran concomitantemente con la clozapina)	45
Tabla 6. Exactitud del método analítico para la cuantificación de N-desmetilclozapina	46
Tabla 7. Exactitud del método analítico para la cuantificación de clozapina	47
Tabla 8. Repetibilidad del método para la cuantificación de N- desmetilclozapina ...	47
Tabla 9. Repetibilidad del método para la cuantificación de clozapina	48
Tabla 10. Reproducibilidad del método para la cuantificación de N-desmetilclozapina	49
Tabla 11. Reproducibilidad del método para la cuantificación de clozapina	50
Tabla 12. Recobro absoluto de DMCZ en los tres niveles de concentración	51
Tabla 13. Recobro absoluto de CLZ en los tres niveles de concentración	51
Tabla 14. Recobro del HPL en los tres niveles de concentración de los analitos (CLZ y DMCZ)	52
Tabla 15. Linearidad del método analítico para la cuantificación de N-desmetilclozapina	54
Tabla 16. Linearidad del método analítico para la cuantificación de clozapina	54
Tabla 17. Respuesta cromatográfica de muestras preparadas en condiciones normales	55
Tabla 18. Influencia de la dilución en la respuesta cromatográfica	55
Tabla 19. Valores de desviación absoluta al emplear 0.5 mL de volumen de plasma	55



Descripción	Pág.
Tabla 20. Precisión y repetibilidad en el límite de cuantificación (40 ng/mL)	56
Tabla 21. Estabilidad de DMCZ a ciclos de congelación-descongelación	57
Tabla 22. Estabilidad de CLZ a ciclos de congelación-descongelación	58
Tabla 23. Estabilidad de DMCZ en plasma a corto plazo	58
Tabla 24. Estabilidad de CLZ en plasma a corto plazo	59
Tabla 25. Estabilidad de DMCZ en plasma a -30°C	59
Tabla 26. Estabilidad de CLZ en plasma a -30°C	60
Tabla 27. Estabilidad de DMCZ bajo diferentes condiciones de luz	61
Tabla 28. Estabilidad de CLZ bajo diferentes condiciones de luz	61
Tabla 29. Estabilidad de DMCZ en la muestra procesada	62
Tabla 30. Estabilidad de CLZ en la muestra procesada	62
Tabla 31. Estabilidad de las soluciones estándar de N-desmetilclozapina	63
Tabla 32. Estabilidad de las soluciones estándar de clozapina	63
Tabla 33. Estabilidad de las soluciones estándar de haloperidol	64
Tabla 34. Niveles plasmáticos de clozapina (CLZ) y N-desmetilclozapina (DMCZ) en pacientes bajo tratamiento con este fármaco	65



CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La clozapina (CLZ) es el antipsicótico atípico más estudiado, su superioridad en comparación con otros antipsicóticos se debe a tres razones, una de ellas es que en la actualidad es el único neuroléptico eficaz para tratar a aquellos pacientes que padecen de esquizofrenia resistente al tratamiento con otros antipsicóticos. La segunda razón, mediante algunos estudios se ha demostrado su eficacia para disminuir el riesgo de una conducta suicida en aquellos pacientes con esquizofrenia o con desordenes esquizoafectivos. Y la tercera es que debido a que la clozapina presenta una muy baja incidencia de producir efectos extrapiramidales, es utilizada en aquellos pacientes que presentan efectos adversos de este tipo. Este uso es de relevancia debido a que los antipsicóticos convencionales presentan una alta incidencia de producir efectos extrapiramidales y es una de las principales causas por la que los pacientes abandonan el tratamiento.

Sin embargo, el uso de la clozapina ha sido polémico debido al riesgo de causar agranulocitosis, ya que ésta puede ser mortal. Este padecimiento es reversible si el fármaco es suspendido inmediatamente cuando se inicia el desarrollo de la neutropenia, por ello su uso es controlado y se requiere un control hematológico estricto. La frecuencia con la que se presenta la agranulocitosis en pacientes bajo tratamiento con clozapina es de aproximadamente del 1 %.¹

La clozapina se asocia también a un riesgo de producir crisis convulsivas, lo cual está relacionado con la dosis, se ha observado una mayor probabilidad de prevalencia cuando las concentraciones plasmáticas son mayores a 1000 ng/mL o bien a un incremento rápido de la dosis.^{2,3}

A continuación se presentan los casos en los cuales es importante determinar las concentraciones plasmáticas de la clozapina y N-desmetilclozapina :

- a) Pacientes que no estén respondiendo al tratamiento lo cual es un indicador de los niveles bajos.
- b) Pacientes con síntomas de toxicidad lo cual es indicador de niveles altos.



- c) Cuando se sospecha una falta de cumplimiento del tratamiento.
- d) Para evaluar la dosis más baja a ser usada en la terapia de mantenimiento.
- e) Niños, ancianos y pacientes enfermos en los cuales la farmacocinética de clozapina pueda estar alterada.
- f) Cuando se administran otros medicamentos simultáneamente.

Debido a lo anteriormente expuesto se llevó a cabo el presente trabajo cuyos objetivos fueron los siguientes

- ✓ Desarrollar un método analítico para cuantificar simultáneamente clozapina y su metabolito la N-desmetilclozapina en plasma.
- ✓ Validar el método analítico de acuerdo a los criterios de aceptación establecidos en la guía de validación de métodos bioanalíticos de la FDA.
- ✓ Emplear el método validado para determinar los niveles plasmáticos de clozapina y N-desmetilclozapina en muestras de pacientes bajo tratamiento con clozapina.



CAPÍTULO II GENERALIDADES

2.1) ESQUIZOFRENIA.

La esquizofrenia es un trastorno crónico, grave e inhabilitante del pensamiento, que origina al paciente problemas en sus relaciones interpersonales en el área social y laboral, puede presentar dificultades en su arreglo personal y representa un elevado riesgo de suicidio.

La esquizofrenia es una de las principales causas de incapacidad de origen psiquiátrico en el mundo debido a las alteraciones mentales. Los daños pueden llegar a ser tan graves que el paciente pierde por completo el contacto con la realidad y, por consiguiente, de toda capacidad para funcionar laboral y socialmente.

Se estima que la esquizofrenia afecta a el 1% de la población mexicana, esta enfermedad ocupa la tercera parte de la atención que brindan los hospitales psiquiátricos en el país, debido a que en la fase aguda de la esquizofrenia, con frecuencia el paciente requiere hospitalización.⁴

La causa de la esquizofrenia se desconoce, aunque existen muchas probabilidades de que consista en una alteración neuroquímica. Los fármacos que aumentan la actividad dopaminérgica (anfetamina, cocaína) agravan la esquizofrenia o la desencadenan en algunas personas sin antecedentes de psicosis, ello condujo a postular la hipótesis de que una de las causas de la esquizofrenia sería la actividad excesiva de los sistemas dopaminérgicos. Sin embargo, está hipótesis no permite explicar la totalidad del espectro fisiopatológico de la enfermedad.⁵

2.1.1) DIAGNÓSTICO

Los síntomas característicos de la esquizofrenia se han clasificado en dos grandes categorías, síntomas positivos y negativos. Los síntomas positivos consisten en delirios, alucinaciones, habla y conducta desorganizada. Los síntomas negativos consisten en aplanamiento afectivo (una limitación de la gama e intensidad de las expresiones emocionales), alogia (una reducción de la productividad del pensamiento y el habla), y apatía.

En ausencia de un marcador biológico, el diagnóstico de la esquizofrenia consiste en



examinar el estado mental del paciente. Los criterios para el diagnóstico de la esquizofrenia establecidos en el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-IV) son los siguientes:

A) Síntomas característicos. Deben estar presentes dos (o más) de los siguientes síntomas, cada uno presente por un período mínimo de 1 mes: 1) delirios, 2) alucinaciones, 3) habla desorganizada, 4) extremadamente desarreglado o conducta catatónica (trastornos psicomotores), 5) síntomas negativos.

Nota: Se requiere sólo un síntoma del criterio A) si los delirios son extraños o las alucinaciones consisten en escuchar una voz que comenta los pensamientos o conductas de la persona, o dos o más voces que conversan uno con otra.

B) Disfunción ocupacional o social. Debe presentarse durante un tiempo significativo.

C) Duración. Los problemas deben de haber persistido en por lo menos los últimos 6 meses. En el período de estos 6 meses se deben presentar en por lo menos un mes los síntomas del criterio A, y puede incluir periodos residuales en los cuales se presenten síntomas negativos o positivos atenuados.

D) Excluir desórdenes esquizoafectivos y del humor.

E) Excluir situaciones en las que se están tomando sustancias como drogas o medicamentos.

F) Relación con el desarrollo de los desórdenes perceptuales. Si hay una historia de un desorden de autismo u otro desorden perceptual, el diagnóstico adicional de esquizofrenia es hecho sólo si se presentan prominentes alucinaciones y delirios en por lo menos un mes (o menos si es tratado exitosamente).⁶

2.1.2) SUBTIPOS Y FASES DE LA ESQUIZOFRENIA

Los subtipos de la esquizofrenia se definen según los síntomas (positivos y negativos) predominantes en el momento de la evaluación más reciente y pueden modificarse a lo largo del tiempo. De acuerdo al Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-IV) los subtipos de la esquizofrenia son el paranoide, el desorganizado, el catatónico, el indiferenciado y el residual. En el tipo paranoide la preocupación por las ideas delirantes o las alucinaciones auditivas es una característica prominente; en el tipo desorganizado destaca el habla y la conducta desorganizada y el aplanamiento afectivo o inapropiado; en el tipo catatónico hay presencia de trastornos psicomotores graves, por ejemplo, durante largos



períodos de tiempo pueden mantener posturas extravagantes o rigidez; el tipo indiferenciado es una categoría inespecífica que se utiliza cuando ninguna de las demás características de subtipo se manifiesta de manera prominente, y en el tipo residual, se produce una clara evolución progresiva, hay una ausencia de síntomas positivos prominentes pero existen signos persistentes de alteración (p. Ej. Síntomas positivos o negativos en forma atenuada). La esquizofrenia paranoide es el tipo más frecuente de esquizofrenia en la mayor parte del mundo.⁶

Esta enfermedad que a menudo es de tipo crónico puede caracterizarse mediante tres fases que se fusionan unas con otras sin que existan límites claros y absolutos entre ellas. La mayor parte de los pacientes alternan los episodios agudos con fases estables de remisión plena o parcial. Las fases de la esquizofrenia son:

-Fase aguda. Durante esta fase psicótica florida, los pacientes presentan síntomas psicóticos graves, como delirios y/o alucinaciones, y un pensamiento gravemente desorganizado, y generalmente no son capaces de cuidar a sí mismos de la forma apropiada. Los síntomas negativos pasan a ser también a menudo más intensos.

-Fase de estabilización. Durante esta fase, se reduce la intensidad de los síntomas psicóticos agudos. La duración de la fase puede ser de 6 meses o más tras el inicio de un episodio agudo.

-Fase estable. Los síntomas son relativamente estables y, en el caso de que los haya, casi siempre son menos graves que en la fase aguda. Los pacientes pueden ser asintomáticos; otros pueden presentar síntomas no psicóticos, como tensión, ansiedad, depresión o insomnio. Cuando persisten los síntomas negativos y/o positivos, o trastornos del pensamiento, a menudo están presentes en formas atenuadas no psicóticas (p ej. Ilusiones en vez de alucinaciones).²

2.1.3) TRATAMIENTO

En la actualidad no existe curación para la esquizofrenia. Sin embargo, el tratamiento puede reducir la morbilidad y la mortalidad asociadas al trastorno. Los medicamentos antipsicóticos son el principal tratamiento farmacológico para los pacientes con esquizofrenia. Además, los estabilizadores del estado de ánimo y otros agentes coadyuvantes resultan útiles con frecuencia en determinados subgrupos de pacientes.

Dada su eficacia y seguridad, los medicamentos antipsicóticos convencionales (p ej.



haloperidol, clorpromazina, loxapina) constituyen el tratamiento farmacológico de primera elección para los pacientes que se encuentran en fases agudas de la esquizofrenia. De entre la gama de efectos adversos producidos por los medicamentos convencionales, los efectos secundarios neurológicos son los más problemáticos.

Los efectos secundarios extrapiramidales agudos, se presentan al inicio del tratamiento y son reversibles al reducir la dosis, Entre ellos se encuentran:

- Parkinsonismo. Se caracteriza por los síntomas de la enfermedad del Parkinson (rigidez, temblor y bradicinesia).
- Disonía. Se caracteriza por la contracción espástica de grupos musculares aislados.
- Ataxia. Los pacientes presentan una sensación interna de agitación y una necesidad irresistible de mover diversas partes de su cuerpo.
- Síndrome neuroléptico maligno. Se produce de manera infrecuente pero puede poner en peligro la vida del paciente, se caracteriza por la tríada de rigidez, hipertermia e inestabilidad del sistema autónomo, que incluye hipertensión y taquicardia.

Los efectos secundarios extrapiramidales crónicos son signos y síntomas que se producen después de meses y años de administración de medicación antipsicótica, no presentan una dependencia clara de la dosis y pueden persistir después de suspender el empleo del fármaco. El principal es la discinesia tardía, es un trastorno de movimientos involuntarios anormales hipercinéticos, que puede afectar a la función neuromuscular en cualquier parte del cuerpo pero se observa especialmente en la región orofacial.

Cuando los pacientes no responden adecuadamente a una medicación antipsicótica, debe considerarse el uso de clozapina. También se puede utilizar en aquellos pacientes que presentan efectos secundarios intolerables, como discinesia tardía.²



2.2) CLOZAPINA

2.2.1) HISTORIA DE LA CLOZAPINA

La clozapina fue desarrollada por Sandoz Pharmaceuticals en 1960, y fue puesta a la venta en algunas ciudades de Europa a finales de 1960's, fue el primer antipsicótico atípico introducido en el mercado. El primer país que aprobó su uso fue Austria en el año de 1969.

En el año de 1975, antes de los seis meses de su introducción, en Finlandia habían sido tratados con clozapina casi 3000 pacientes, de éstos se reportaron 17 casos de neutropenia. La agranulocitosis fue mortal en 8 de ellos, 2 desarrollaron trombocitopenia y un paciente desarrolló leucemia. La incidencia de agranulocitosis durante este período fue de aproximadamente 1%. Estos informes promovieron el retiro de la clozapina del mercado en USA y en Europa.^{7,8}

En España la clozapina se empezó a comercializar en 1976, y fue retirada del mercado a finales de los años 80 debido a las muertes reportadas en Finlandia. Sin embargo, en España y otros países europeos (p. ej. Suecia, Dinamarca, Alemania, Suiza) había una población importante de pacientes esquizofrénicos que requerían el uso imprescindible de este fármaco, recayendo ante el cambio a otro fármaco antipsicótico, por ello se restringió el uso de clozapina en este tipo de pacientes.⁹

El uso de la clozapina fue discutido por la FDA por más de una década. Mediante un estudio doble ciego con casi 300 pacientes hospitalizados se demostró que la clozapina tiene una mayor efectividad para el tratamiento de la esquizofrenia resistente en comparación a la clorpromazina (antipsicótico convencional).³ El 26 de septiembre de 1989 en los EUA, el Clozaril ® (Sandoz Pharmaceuticals) fue aprobado por la FDA para su uso exclusivo en pacientes esquizofrénicos severamente enfermos que no habían respondido adecuadamente al tratamiento con antipsicóticos convencionales. Estos pacientes podían ser los que habían presentado una respuesta insuficiente o presentaban efectos adversos severos con el tratamiento con antipsicóticos convencionales. El Clozaril ® fue puesto a la venta en Febrero de 1990, bajo un sistema especial de vigilancia para asegurar un monitoreo regular de leucocitos en todos los pacientes que reciben este fármaco. Todos los pacientes tratados con Clozaril ® en los EUA, deben ser registrados en el Registro Nacional de Clozaril ® (CNR).¹

Se evaluaron los datos del CNR de febrero de 1990 a abril de 1991, se reportaron 11 555 casos de pacientes que tomaron clozapina, de los cuales 73 desarrollaron agranulocitosis, 2



de ellos murieron debido a complicaciones con una infección y 61 de ellos reanudaron el tratamiento después de 3 meses. El control hematológico obligatorio redujo el riesgo de agranulocitosis inducida por la clozapina, y con ello el número de muertes.¹⁰

La reintroducción de la clozapina al mercado español fue en el año de 1993. Para el seguimiento de los pacientes bajo tratamiento con clozapina se creó un comité y se requirió un control hematológico de cada uno de ellos, el riesgo de desarrollar una agranulocitosis en este país fue del 0.2 %.⁹

El 18 de diciembre del 2002, la FDA aprobó otro uso para la clozapina (Clozaril®, Novartis), para reducir el riesgo de una conducta suicida en aquellos pacientes con esquizofrenia o con desordenes esquizoafectivos.

El 9 de febrero del 2004, la FDA aprobó la venta el primer producto genérico de clozapina, el FazaClo® (clozapina USP, Alamo Pharmaceuticals).

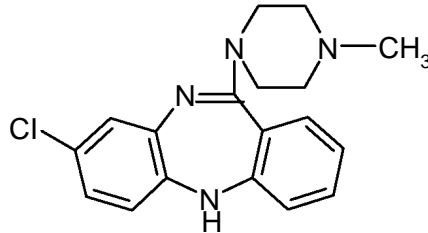
En abril del 2005, la FDA publicó una alerta en la cual indica que los pacientes ancianos tratados con antipsicóticos atípicos para la demencia, presentan una mayor probabilidad de morir en comparación con aquellos que no están tomando el medicamento, por ello no se recomienda su uso en este tipo de población. Así mismo La clozapina no ha sido aprobada por la FDA para su uso en niños.¹

En México, el 24 de Octubre de 1994, la clozapina y sus derivados químicos se adicionaron al grupo de sustancias psicotrópicas. Ello fue publicado en el Diario Oficial de la Federación. Lo anterior significa que al ser una sustancia psicotrópica, su control sanitario compete en forma exclusiva a la Secretaría de Salud y por ello requiere un permiso de importación.

El Clopsine® fue introducido al mercado nacional por Psicofarma en el año de 1997.¹¹



2.2.2) PROPIEDADES QUÍMICAS DE LA CLOZAPINA



- ✧ Nombre genérico: Clozapina
- ✧ Categoría Terapéutica: Antipsicótico
- ✧ Clase Química: Dibenzodiazepina tricíclica
- ✧ Nombre químico: [8-cloro-11-(4-metil-1-piperazinil)-5H-dibenzo[b,e]-1,4-diazepina
- ✧ Fórmula condensada: C₁₈H₁₉ClN₄
- ✧ Peso Molecular: 326.83 g/mol
- ✧ Descripción: La clozapina es un polvo amarillo cristalino o finamente cristalino, inodoro.^{12,5}

2.2.3) PROPIEDADES FÍSICAS DE LA CLOZAPINA

- ✧ Punto de fusión: 183-184°C
- ✧ Solubilidad: % p/p a 25°C: Acetona>5; Acetonitrilo 1.9; Cloroformo>20; Acetato de etilo>5, etanol absoluto 4.0; Agua <0.01.
- ✧ UV max (etanol): 215,230, 261, 297nm (ε 27400,25800, 16800, 10500)
- ✧ Coeficiente de Partición: Log P (Octanol/Agua) 0.4 pH 2; 600 (pH 7); 1000 (pH 7.4); 1500 (pH 8)
- ✧ pka₁=3.7, pka₂=7.6
- ✧ Toxicidad: Vía intravenosa LD₅₀= 61 mg/kg ratones, LD₅₀= 58 mg/kg ratas
Vía oral LD₅₀= 199 mg/kg ratones, LD₅₀= 260 mg/kg ratas^{12,5}



2.2.4) PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS

2.2.4.1) NOMBRES COMERCIALES

Tabla 1. Productos comerciales conteniendo clozapina.^{13,1}

Nombre comercial	Laboratorio	Lugar de Venta	Forma farmacéutica	Presentaciones
Clopsine	Psicofarma	México	Tabletas	30 tabletas 25 mg 30 tabletas 100 mg
Leponex	Novartis	México	Comprimidos	30 comprimidos 25 mg 30 comprimidos 100 mg
Clozaril	Novartis	EUA	Tabletas	25 y 100 mg
FazaClo	Alamo Pharmaceuticals	EUA	Tabletas	25, 50 y 100 mg

2.2.4.2) INDICACIONES TERAPÉUTICAS

La clozapina está indicada en pacientes esquizofrénicos resistentes a otros tratamientos, es decir, pacientes que no responden a por lo menos dos antipsicóticos clásicos o que no los toleran, debido a que presentan reacciones adversas neurológicas graves e intratables (efectos secundarios extrapiramidales o discinesia tardía).

La clozapina también es usada para la reducción del riesgo de una conducta suicida en personas con esquizofrenia o con desórdenes esquizoafectivos. Conducta suicida se refiere a las acciones cometidas por el paciente para ponerse en alto riesgo de muerte.

La clozapina no ha sido aprobada por la FDA para su uso en niños y en ancianos.¹³

2.2.4.3) MECANISMO DE ACCIÓN

La clozapina tiene una mayor capacidad para unirse a los receptores dopaminérgicos D₄ (en el sistema límbico y cortical), por lo que se postula que su eficacia antipsicótica es debida a ello.

A diferencia de los antipsicóticos convencionales, la clozapina tiene poca afinidad por los receptores dopaminérgicos (D₂), lo cual se relaciona con la baja ocurrencia de los efectos extrapiramidales y de discinesias tardías.

La eficacia de la clozapina no se acompaña de un porcentaje elevado de extrapiramidalismos, lo que ha hecho que se postule que el neuroléptico atípico ejerce un



efecto antidopaminérgico preferencial a nivel de sistema límbico, sin afectar estructuras nigroestriatales.

También tiene propiedades antiserotoninérgicas (antagonista de los receptores 5 HT_{2A}, 5HT_{2C}, 5HT₆ y 5HT₇), antiadrenérgicas, anticolinérgicas (antagonista de los receptores M₁) y antihistamínicas.

La unión no específica y la alta afinidad a los diversos receptores hace que la clozapina tenga sus propiedades características, pero no permite atribuir sus ventajas clínicas a un receptor concreto. Lo anterior trae como consecuencia una mayor dificultad para encontrar otros fármacos que ofrezcan beneficios similares sin la habilidad de causar agranulocitosis.^{5,9}

2.2.4.4) FARMACOCINÉTICA

La absorción de clozapina administrada por vía oral es de 90-95%. La velocidad y la magnitud de la absorción no se ven influidas por los alimentos.

La clozapina está sujeta a un metabolismo moderado de primer paso, lo que se traduce en una biodisponibilidad absoluta de 50-60%. En estado estable cuando se administra 2 veces al día, los niveles plasmáticos máximos se obtienen al cabo de 2.1 horas en promedio (intervalo: 0.4-4.2 horas),

La clozapina se une a las proteínas plasmáticas en 95% aproximadamente. El volumen de distribución es de 1.6 L/kg. Su eliminación es bifásica, con una vida media terminal de 12 horas (intervalo: 6-26 horas). Después de una dosis única de 75 mg, la vida media terminal fue de 7.9 horas; aumentó a 14.2 horas al alcanzarse un estado estable tras la administración diaria de 75 mg en por lo menos 7 días. Con un aumento de dosis de 37.5 a 75 y 150 mg administrada dos veces al día se observaron resultados linealmente proporcionales a aumentos de dosis en las concentraciones plasmáticas/tiempo del área bajo la curva, así como en las concentraciones plasmáticas mínima y máxima.¹³

2.2.4.5) METABOLISMO Y ELIMINACIÓN

La clozapina se metaboliza a través del citocromo P450 a compuestos más polares los cuales son más fáciles de eliminar. La conversión hepática por el citocromo P450 a través de la isoenzima CYP1A2 a N-desmetilclozapina es considerada la mayor ruta metabólica de la clozapina. Sus principales metabolitos son la N-desmetilclozapina y el N-óxido clozapina, pero sólo la N-desmetilclozapina es activa. Las acciones farmacológicas de la N-



desmetilclozapina se asemejan a las de la clozapina, pero son considerablemente más débiles y de más corta duración. Sólo se detectan pequeñas cantidades del fármaco inalterado en la orina y en las heces. Aproximadamente 50% de la dosis administrada se excreta en forma de metabolitos por la orina y el 30% por las heces.^{13,14}

2.2.4.6) OTRAS PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS DE LA CLOZAPINA.

La clozapina produce menos efectos extrapiramidales, en comparación con los neurolepticos clásicos. Además se asocia con una propensión significativamente menor a producir discinesia tardía. De hecho, la clozapina se ha utilizado con cierto éxito para tratar la discinesia tardía inducida por otros neurolepticos, lo que permitió que desapareciera en aproximadamente la mitad de los casos. La ventaja que ofrece la clozapina en la baja incidencia de efectos secundarios extrapiramidales agudos (en especial la ataxia y el parkinsonismo) es porque puede mejorar el porcentaje de pacientes que cumplen con el tratamiento, por lo que se reducen el riesgo de recaídas.^{15,16}

Se ha observado que la clozapina es efectiva y bien tolerada en el tratamiento agudo y a largo plazo de pacientes con trastornos bipolares o con desordenes esquizoafectivos quienes no han respondido adecuadamente a las farmacoterapias convencionales.¹⁷

Debido a que la clozapina causa sedación y somnolencia, se ha observado que es eficaz para la consolidación del sueño en pacientes psicóticos y para mejorar la continuidad del sueño.¹⁸

2.2.4.7) CONTRAINDICACIONES

No debe administrarse a pacientes con epilepsia no controlada, psicosis alcohólica o tóxica, intoxicación por fármacos o antecedentes de colapso respiratorio. Está contraindicada en pacientes con depresión de la médula ósea, con historia de granulocitopenia o agranulocitosis tóxica. En pacientes que no puedan someterse a análisis sanguíneos regulares.

Contraindicada en enfermedades renales, hepáticas o cardíacas graves (p ej. Miocarditis).

En estudios realizados en animales se ha encontrado que la clozapina llega a excretarse en la leche materna o durante el embarazo atravesando la placenta, por lo que no se recomienda la administración de clozapina en mujeres embarazadas.

No se ha establecido la seguridad y eficacia de este medicamento en niños.^{13,1}



2.2.4.8) MEDIDAS ESPECIALES PRECAUTORIAS

Debido a que la clozapina esta asociada con agranulocitosis, las siguientes medidas son obligatorias.

Se requiere hacer determinaciones de leucocitos en sangre durante los 10 días previos al tratamiento. Sólo los pacientes con cuenta de leucocitos (CL) mayor o igual a $3,500/\text{mm}^3$ y cuenta absoluta de neutrófilos (CAN) mayor o igual a $2,000/\text{mm}^3$, recibirán este medicamento.

Estas mediciones deberán ser monitoreadas semanalmente, después de iniciado el tratamiento, durante las primeras 8 semanas. Posteriormente se harán determinaciones mensuales a lo largo del tratamiento y un mes después de terminado.

La clozapina debe retirarse inmediatamente si la CL es inferior a $3000/\text{mm}^3$ y/o el CAN desciende por debajo de $1500/\text{mm}^3$ durante las primeras 18 semanas, o si la CL es menor a $2,500/\text{mm}^3$ o la CAN es menor de $1,000/\text{mm}^3$ después de las primeras 18 semanas de tratamiento. Se debe notificar al médico el desarrollo de cualquier infección o señales como fiebre, dolor de garganta o sintomatología similar a la gripe que sugiera una infección.¹³

2.2.4.9) EFECTOS ADVERSOS

Los efectos adversos que se asocian con frecuencia al uso de clozapina, suelen ser sedación o somnolencia (21%), taquicardia (17%), estreñimiento (16%), mareos (14%), hipotensión (13%), fiebre (13%) e hipersalivación (13%) Otros efectos adversos son incremento de peso, insomnio, dolor de cabeza, nauseas y vómito.³

La clozapina causa agranulocitosis en aproximadamente el 1% de los pacientes a los que se les administra. La agranulocitosis es un serio desorden de las células sanguíneas en el cual el número de leucocitos, en especial los granulocitos está muy reducido, lo que hace vulnerable al paciente a cualquier infección, por lo que una gripa común puede ser fatal. No se conoce la etiología de la agranulocitosis causada por clozapina y no es dependiente de la dosis. La agranulocitosis puede llegar a ser mortal, pero es reversible si se suspende el tratamiento de forma inmediata, por ello debe realizarse un control estricto del recuento de leucocitos. Si el recuento leucocitario es menor a 3000 mm^3 o el número absoluto de neutrófilos (NAN) es menor a $1500/\text{mm}^3$ se debe suspender de inmediato el tratamiento con clozapina. La mayoría de los casos de neutropenia se presentan entre la semana 5 y 18 de



tratamiento, aunque se han reportado casos en los que han ocurrido después de 5 años de tratamiento.¹³

Las crisis epilépticas asociadas al tratamiento con clozapina son frecuentes, ya que uno de cada 20 pacientes presenta ataques epilépticos. Las convulsiones están relacionadas directamente con concentraciones plasmáticas elevadas de clozapina: Se ha reportado que se han presentado en aquellos pacientes cuyas concentraciones séricas son mayores a 1300 ng/mL, o con dosis mayores a 600 mg/día.¹⁹

La clozapina se ha asociado a un aumento en el riesgo de una miocarditis fatal, especialmente en el primer mes de tratamiento. Los pacientes pueden presentar una fatiga inexplicable, disnea, fiebre, dolor torácico, palpitaciones otros signos y síntomas de insuficiencia cardiaca.⁸

2.2.4.10) INTERACCIONES

La clozapina puede incrementar los efectos centrales de los inhibidores de la monoamino oxidasa (IMAO).

No debe utilizarse conjuntamente con fármacos que presenten riesgo elevado de supresión de la médula ósea, entre ellos la carbamazepina.

El empleo simultáneo de clozapina con fenitoína u otros inductores enzimáticos pueden acelerar el metabolismo de la clozapina y reducir su concentración plasmática. El metabolismo de la clozapina está mediado, principalmente, por la isoenzima CYP1A2 del citocromo P450. El empleo simultáneo de fármacos que inhiban o actúen como sustrato de esta isoenzima puede alterar la concentración plasmática de clozapina.¹³

2.2.4.11) DOSIS Y VÍA DE ADMINISTRACIÓN

Vía de administración: Oral.

Tratamiento inicial en adultos. Iniciar con 12.5 mg una o dos veces al día. Si es bien tolerado, la dosis puede ser aumentada con incrementos diarios de 25 a 50 mg, llegando a un nivel máximo de dosis de hasta 300 mg/día en un intervalo de 2 a 3 semanas. Los ajustes o incrementos subsecuentes se hacen una o dos veces por semana con incrementos de entre 50 a 100 mg.

Uso en ancianos: Iniciar con 12.5 mg una vez el primer día y limitar los aumentos posológicos posteriores a 25 mg/día.



Intervalo de dosis terapéuticas: En la mayoría de los pacientes la actividad antipsicótica la clozapina es eficaz en dosis de 300-450 mg/día, pero algunos pueden requerir dosis menores y otros, dosis de hasta 600 mg/día. La dosis total diaria puede repartirse de forma desigual y la mayor porción se puede tomar a la hora de acostarse. La dosis máxima puede ser de hasta 900 mg/día (en cuyo caso se permiten aumentos que no excedan de 100 mg). Sin embargo, dosis superiores a 450 mg/día pueden incrementar la incidencia de reacciones adversas (particularmente las convulsiones).¹³

En un estudio de 51 pacientes con esquizofrenia resistente bajo tratamiento con clozapina, se puso de manifiesto que el porcentaje de respuesta a clozapina aumenta al prolongarse la duración del ensayo, el valor promedio de la duración del tratamiento de prueba fue de 10.3 ± 8.1 meses, y el 60.8% de los pacientes respondieron. Se ha sugerido que para obtener una adecuada respuesta a clozapina, la duración del ensayo debe ser por lo menos de 6 a 12 meses antes de decidir discontinuar el tratamiento con clozapina debido a una respuesta insuficiente.²⁰

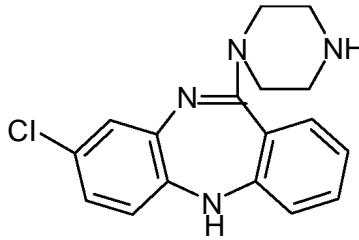
Dosis de mantenimiento: Una vez logrado el máximo beneficio terapéutico, a muchos pacientes se los puede mantener de manera eficaz con dosis inferiores. En estos casos se recomienda reducir progresivamente la dosis, el tratamiento debe mantenerse como mínimo durante seis meses. Si la dosis diaria no excede de 200 mg, una administración por la noche podría ser suficiente.

Finalización del tratamiento: Cuando se tenga previsto suspender el tratamiento con clozapina se debe reducir la dosis paulatinamente a lo largo de 1 a 2 semanas. Cuando sea necesario interrumpir bruscamente el tratamiento (por ejemplo, debido a una leucopenia), el médico debe de observar cuidadosamente al paciente, ya que hay evidencia de que la discontinuación abrupta de clozapina se puede asociar a un severo aumento de los síntomas esquizofrénicos.¹³



2.3) N-DESMETILCLOZAPINA

2.3.1) PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LA N-DESMETILCLOZAPINA



- ❖ Nombre químico: [8-cloro-11-piperazinil-5H-dibenzo[b,e]-1,4-diazepina
- ❖ Nombre genérico: N-desmetilclozapina, Norclozapina, Normetilclozapina
- ❖ Fórmula condensada: $C_{17}H_{17}ClN_4$
- ❖ Peso Molecular: 312.8 g/mol
- ❖ Condiciones de almacenamiento: Sensible a la luz, almacenar a temperatura ambiente.
- ❖ Descripción: Polvo cristalino amarillo. Principal metabolito de la clozapina, es el único metabolito farmacológicamente activo.

2.3.2) ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA

La N-desmetilclozapina es un antagonista del receptor de serotonina $5HT_2$ y del receptor de dopamina D_2 , aunque su actividad farmacológica es mucho menor a la observada para la clozapina.

Es un parcial agonista de los receptores muscarínicos colinérgicos M_1 (contribuyen a la liberación de acetilcolina cortical y de dopamina). Se ha encontrado que la clozapina es un antagonista de los receptores M_1 . La disminución de la unión a el receptor M_1 o de los receptores M_1 ha sido encontrada en estudios postmortem de pacientes esquizofrenicos. Debido a el agonismo M_1 de la N-desmetilclozapina se ha sugerido que puede ser efectiva para el tratamiento de los desórdenes cognitivos de la esquizofrenia (p ej. atención, aprendizaje y memoria).²¹



2.3.3) FARMACOCINÉTICA

La N-desmetilclozapina se une a las proteínas plasmáticas en un 90% aproximadamente.²²
El tiempo de vida media de eliminación de la N-desmetilclozapina es de 13 horas.²³

2.3.4) EL PROBABLE PAPEL DE LA N-DESMETILCLOZAPINA EN LA AGRANULOCITOSIS INDUCIDA POR LA CLOZAPINA.

Se ha reportado que la clozapina puede causar agranulocitosis pero las causas aún no son conocidas, por ello, Gerson y colaboradores realizaron un análisis de formación de colonias (estudio in vitro) por medio del cual se evaluó la toxicidad de varios metabolitos de la clozapina en la producción de leucocitos y eritrocitos. En este estudio se encontró que la toxicidad producida por varios metabolitos de la clozapina y por la clozapina misma, ocurre a concentraciones mayores a 10 veces las concentraciones normales que se encuentran en el plasma (mayores a 10 µg/mL). Pero los resultados obtenidos para la N-desmetilclozapina fueron sobresalientes, ya que la LD₅₀ para las células producidas por las vías mieloide (neutrófilos y macrófagos) y eritroide (eritrocitos) fueron únicamente de 3 a 6 veces la concentración plasmática que se encuentra normalmente en los pacientes bajo tratamiento con clozapina (CFU-GM 2.5µg/mL y BFU-E 3.2 µg/mL). Para estudiar la probabilidad de que la N-desmetilclozapina y la clozapina fueran metabolizadas por las células de la médula ósea (células progenitoras, CFU) para incrementar su citotoxicidad o que fueran tóxicas para las células progenitoras, a células de la médula ósea de pacientes sanos, se le adicionaron directamente la N-desmetilclozapina y la clozapina y las incubaron 12 horas, posteriormente las lavaron y fueron analizadas para BFU-E y CFU-GM. De acuerdo a los resultados no se encontró un incremento de la toxicidad.

También compararon la citototoxicidad en células de médula ósea de pacientes con agranulocitosis aguda inducida por clozapina contra la médula ósea de donadores normales, pero se encontró que la médula ósea del paciente con agranulocitosis inducida por clozapina no fue más sensible a la clozapina o a la N-desmetilclozapina que el sujeto normal.

Este estudio sugiere que la N-desmetilclozapina es más tóxica que la clozapina y probablemente se metaboliza a otro compuesto más inestable, el cual es tóxico para los precursores hematopoyéticos de las vías eritroide y mieloide. Esto aumenta la posibilidad de que la causa de la agranulocitosis pueda estar relacionada a un metabolismo o



farmacocinética alterada de la clozapina y ello pueda producir altas concentraciones de N-desmetilclozapina o compuestos derivados que lleguen a la médula ósea. Además, este estudio indica que dado que la N-desmetilclozapina también puede afectar la vía eritroide de la hematopoyesis, ello podría explicar la presencia de anemia en algunos pacientes, sin embargo se requieren más estudios in vivo para comprobar los resultados obtenidos.²⁴

Se ha encontrado que la neutropenia inducida por la clozapina puede ser reversible sin la necesidad de retirar el fármaco, si se administra concomitantemente el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF). Se reportó el caso de un joven esquizofrénico de 17 años que no respondía al tratamiento con antipsicóticos convencionales, se le administró clozapina y se observó una respuesta favorable, pero desarrolló una severa neutropenia, el tratamiento con clozapina se suspendió pero se observó una recaída, por lo cual se decidió Reiniciar el tratamiento con clozapina pero se le administró concomitantemente el factor G-CSF, esto permitió una rápida normalización de la cuenta de sus glóbulos blancos.²⁵

2.3.5) PROBABLES USOS TERAPÉUTICOS

Se ha propuesto el uso de la N-desmetilclozapina como agente purgante de células leucémicas para mejorar los resultados de los trasplantes autólogos, eliminando las células malignas. Basándose en los resultados in Vitro⁵, la toxicidad de la N-desmetilclozapina está limitada a los precursores (leucocitos) pero no a las células progenitoras de la médula ósea, además la neutropenia que produce es reversible al suspender el tratamiento, por ello se sugiere que se realice un estudio in Vitro en el cual se utilice a la N-desmetilclozapina como agente quimioterapéutico de células leucémicas.²⁶



2.3) MÉTODOS ANALÍTICOS REPORTADOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CLOZAPINA Y N-DESMETILCLOZAPINA EN PLASMA O SUERO.

Existen a la fecha varios métodos reportados en revistas internacionales para la cuantificación simultánea de clozapina y N-desmetilclozapina en plasma, los cuales utilizan cromatografía de líquidos de alta resolución con detección ultravioleta. En la tabla 2, se presenta un resumen de los métodos que emplean extracción líquido-líquido²⁷⁻³³ y en la tabla 3 se presenta un resumen de los métodos que emplean extracción en fase sólida.³⁴⁻³⁷ Además en algunos casos se incluyen las concentraciones plasmáticas cuando se aplicaron estos métodos en muestras de pacientes.



Tabla 2. Métodos analíticos para cuantificar clozapina en los que se emplea extracción líquido-líquido.

Referencia	Método de extracción							Niveles plasmáticos en pacientes		
	Extracción	Fase móvil, flujo	Estándar interno, λ (nm)	Fase estacionaria, temperatura	Rango Lineal (ng/mL)	% recobro	Tr (min)	Dosis (mg/día)	No. pacientes	Niveles plasma (ng/mL)
Guillon C y colab (Francia, 1996, 1999)	1)Acetato de etilo 2)HCl 0.1M	ACN:buffer fosfatos pH 7.0 (48:52v/v). Flujo 1.5mL/min	Loxapina, λ =254nm	Kromasil Ultrabase C ₁₈ (250x4.6, 5 μ m) 50°C	CLZ:50-2000 DMCZ,OCZ: 50-500	CLZ: 73 DMCZ: 80 LOX:73	CLZ:11 DMCZ:4.9 LOX:20	100-500	25	CLZ: 68.5-1590 DMCZ: 61-680
Shen Y.L. y colab (Taiwán, 2002)	1)acetato de etilo:hexano:isopropanol (16:3:1) 2)Evaporar y reconstituir con metanol	Metanol:agua: dimetilamina (60:40:0.04v/v) Flujo 0.9mL/min	Antraquinona λ =280nm	Symmetry C ₁₈ (150X3.9, 5 μ m) Temp ambiente	5-1000	Mayor al 95.7%	CLZ:19 DMCZ:9.5 ANT:16	-	-	-
Fabrazzo M. y colab (Italia, 1996)	1)NaOH 400mM 2)Acetato de etilo 3)HCl 100mM	ACN:KH ₂ PO ₄ 30mM (45:55) conteniendo 2g hexanosulfonato pH 2.7 Flujo 1.5 mL/min	Tripolidina λ =254nm	Spherisorb C ₆ (250X4.6, 5 μ m) 30°C	NR	NR	CLZ = 4.5 EI=5.5	NR	18	CLZ:136.5-675 DMCZ: 119.8-704.6
Fang Ma y Chyan E. (EUA, 1998)	1)buffer borato 1M pH9 +cloroformo	Metanol:ACN: buffer acetatos 28.6mM pH2.6 (10:20:70) Flujo 0.3mL/min	α -hidroximidazolam λ =230nm	Symmetry C ₁₈ (150X2.1,5 μ m) Temp ambiente	25-1000	CLZ:68-83 DMCZ: 46-57	CLZ:4.5 DMCZ:3.5 EI:8	-	-	-
Edno L. y colab (Francia, 1997)	1)NaOH 0.33M 2)Hexano:OH isoamilico (98.5:1.5) 3)HCl 0.1M	Agua:ACN:Pic B5:dietilamina (63:37:2.5:0.04) Pic B5:agua, metanol, pentano, ác. sulfónico y ác acético Flujo 1.7mL/min	Loxapina λ =245nm	Ecotube Nucleosil C ₈ (125X4.6,5 μ m) 56°C	10-900	CLZ:88 DMCZ: 85	CLZ:8.7 DMCZ:4.16 LOX:12.7	150-600	11	CLZ: 316.8 \pm 168.5 [79-623] DMCZ: 174.6 \pm 84.5 [52-295]
Aymard N y colab (Francia, 1998)	1)n-hexano 2)HCl 0.1M	ACN:buffer fosfatos 0.05M pH 3.8 (50:50) Flujo 1.0mL/min	Clorohaloperidol λ =240nm	Spherisorb C ₁₈ (125X4.6,5 μ m) Temp ambiente	10-500	NR	NR	300-900	12	CLZ: 319 \pm 113 [170-556] DMCZ: 187 \pm 68 [60-278]



Tabla 3. Métodos analíticos para cuantificar clozapina en los que se emplea extracción en fase sólida.

Referencia	Método de extracción						Niveles plasmáticos en pacientes		
	Cartucho fase sólida, estándar interno	Extracción	Fase móvil, flujo, λ (nm)	Fase estacionaria, temperatura	% recobro, rango lineal (ng/mL)	Tr (min)	Dosis (mg/día)	No. pacientes	Niveles plasma (ng/mL)
Akerman Kori (Finlandia, 1997)	-Bond Elut C ₁₈ (100mg) - 200 μ L de Protriptilina	1)Activar con metanol y agua 2)1mL muestra+ std interno 3)Lavar con agua, 10%metanol en 0.25M HCl y ACN 4)Eluir con ácido acético 10mM, dietilamina 5mM en metanol 5)Evaporar y reconstituir en 100 μ L de fase móvil, inyectar 40 μ L	ACN:Metanol: 10mM fosfato dibásico de potasio pH 3.7 (30:2:100) -flujo 1.5mL/min - λ =220nm	-Select B C ₈ (125X4, 5 μ m) Temperatura ambiente	% recobro CLZ = 86 DMCZ = 90 CLZ 12-4412 DMCZ 11-4196	DMCZ=4 CLZ=5 Std int=8.5	NR	333	CLZ= 520ng/mL (media) DMCZ= 334ng/mL (media)
Gupta Ram (Canadá, 1995)	-Bond Elut C ₁₈ (1mL) -50 μ L de Amoxapina	1)Activar con HCl 1M, metanol y agua 2)0.5mL muestra, std interno, adicionar ACN 3)Lavar con agua y ACN. 4)Eluir con Metanol conteniendo 1/100mL de 35%Ácido perclorico 5) Inyectar 15 μ L.	- 0.1% Perclorato tetrametilamonio en agua:ACN (73:27) pH 4.2 - Flujo 2mL/min - λ =245nm	Ultrasphere Octyl (150X4.6, 5 μ m) Temperatura ambiente	% recobro 86-96 CLZ, DMCZ y Amoxapina CLZ y DMCZ 15.8-2000	DMCZ=5.3 CLZ=7.3 Amoxapina =15.8	-	-	-
Palego Lionella,y colab (Italia, 2001)	-Oasis fase reversa -50 μ L de Dibenzepina	1)Activar con metanol y agua 2)1mL muestra, std interno 3)Lavar con 5%v/v metanol en agua 4)Eluir con metanol 5)Evaporar y reconstituir en 600 μ L fase móvil, inyectar 100 μ L.	- ACN:Agua con 0.5%v/v TEMED y 0.01%v/v trietilamina (37:63) ajustar a pH 6.5 con ácido acético - Flujo 1.5mL/min λ =254nm	-Symmetry C ₁₈ (250X4.6, 5 μ m) - 20-22°C	% recobro CLZ = 95 DMCZ = 97 CLZ y DMCZ 25-1000	DMCZ=3.5 CLZ=7.1 Std int=2.8	-	-	-
Weigmann Harald (Alemania, 1992)	-Bond Elut C ₁₈ -Imipramina	1)Activar con metanol y agua 2)1mL plasma, 100 μ L std interno y 1mL 0.2M KCl pH 12.0 3)Lavar 50% metanol en agua 4)Eluir con 0.01M ácido acético en metanol 5)Evaporar, reconstituir en fase móvil. Inyectar 100 μ L	- ACN:agua que contiene 0.4%v/v TEMED (40:60) ajustar a pH 6.5 - Flujo 1.5mL/min - λ = 254nm	-ODS Hypersil C ₁₈ (250X4.6, 5 μ m) Temperatura ambiente	% recobro CLZ = 85 DMCZ = 78 CLZ 10-2000 DMCZ 10-500	DMCZ=6.4 CLZ=8 Std int=13.5	75 a 300	16	CLZ= 74-524 DMCZ= 80-337



2.5) VALIDACIÓN DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS, COMPARACIÓN DE LA GUÍA DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS DE LA FDA (2001) Y LA NOM-177-SSA1-1998 DE SSA.

El término validación se refiere a la evidencia experimental documentada de que un procedimiento cumple con el propósito para el cual fue diseñado. Entre las normas que establecen los parámetros para realizar la validación de un método bioanalítico se encuentran la NOM-177-SSA1-1998 (México) y la guía de validación de métodos bioanalíticos de la FDA (EUA). En la NOM-177-SSA1-1998 se establecen las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable, y solamente el apartado 9 se refiere a la validación de métodos bioanalíticos, la desventaja que tiene es que el desarrollo de algunas pruebas no es claramente descrito. En cambio, la guía de validación de métodos bioanalíticos de la FDA (mayo 2001) es una norma especializada en este tema.

En la tabla 4 se describe cada uno de los parámetros a evaluar en la validación, de acuerdo a lo establecido en las normas de la SSA y de la FDA. Todas las muestras a analizar se deben preparar en la matriz biológica, a excepción de las utilizadas en la recuperación absoluta y en la estabilidad de la solución estándar, ya éstas deben prepararse en solución.

Algunas de las discrepancias entre ambas normas se describen a continuación:

La NOM-177 no establece los criterios para elegir los puntos control, únicamente indica que tienen que ser uno bajo, uno medio y uno alto, y se deben encontrar dentro del rango de trabajo. En cambio la guía de la FDA es más específica, ya que indica que uno de los puntos control debe estar dentro de 3 veces el límite de cuantificación (nivel bajo), otro cerca de el valor medio del rango (nivel medio) y otro cerca del límite superior (nivel alto).

En caso de que se diluya la muestra, la guía de la FDA indica que se debe demostrar su precisión y exactitud para que tengan validez los resultados. En cambio, la NOM-177 indica que es permitido realizar una dilución de la muestra si se utiliza la misma matriz biológica.

En la guía de la FDA se describe más claramente como realizar las pruebas de estabilidad de las muestras plasmáticas, de las soluciones estándar y de las muestras preparadas.

Adicionalmente, la guía de validación de métodos bioanalíticos de la FDA exige preparar un mayor número de muestras en cada prueba en comparación a la NOM-177-SSA1-1998, con lo cual se tiene una menor variabilidad de los datos causada por el muestreo.

Por lo anteriormente descrito decidimos realizar la validación de acuerdo a los lineamientos descritos en la guía de validación de métodos bioanalíticos de la FDA.^{38, 39}



Tabla 4. Comparación de los parámetros a evaluar entre la NOM-177-SSA1-1998 y la guía de validación de la métodos bioanalíticos de la FDA

Prueba	NOM-177-SSA1-1998 (SSA, México)		Guía para la validación de Métodos Analíticos (FDA, EUA)	
	Condiciones de prueba	Criterio de aceptación	Condiciones de prueba	Criterio de aceptación
SELECTIVIDAD	Muestras blanco de la matriz biológica en por lo menos 6 voluntarios. Evaluar posibles interferencias (p. ej. metabolitos, productos de degradación y cualquier otro fármaco administrado concomitantemente).	No deben existir interferencias en la cuantificación del compuesto por analizar.	Muestras blanco de la matriz biológica en por lo menos 6 fuentes. Evaluar posibles interferencias (p. ej. metabolitos, productos de degradación y cualquier otro fármaco administrado concomitantemente).	No deben existir interferencias en la cuantificación del compuesto por analizar.
EXACTITUD	Usar datos de repetibilidad y reproducibilidad	El valor promedio debe estar dentro del ± 15 del valor nominal de concentración	3 puntos control por quintuplicado	El valor promedio debe estar dentro del ± 15 del valor nominal de concentración
PRECISIÓN Repetibilidad	3 puntos control por quintuplicado (mismo día)	%CV no debe ser mayor que el 15%	3 puntos control por quintuplicado	%CV no debe ser mayor que el 15%
PRECISIÓN Reproducibilidad	3 puntos control por duplicado, durante 3 días	%CV no debe ser mayor que el 15%	3 puntos control por quintuplicado	%CV no debe ser mayor que el 15%
RECUPERACIÓN ABSOLUTA (% RECOBRO)	3 puntos control por triplicado, en solución y en la matriz biológica	No necesariamente debe ser el 100%, pero debe ser reproducible en cada nivel de concentración.	3 puntos control, en solución y en la matriz biológica	No necesariamente debe ser el 100%, pero debe ser reproducible en cada nivel de concentración.
LINEALIDAD	Usar mínimo 5 concentraciones, incluir el LC y conc. máxima del rango. Definir un modelo que describa la relación matemática entre concentración y respuesta.	Esta relación debe ser continua y reproducible a lo largo del rango.	Usar mínimo 6 concentraciones, incluir el límite de cuantificación. Elegir el modelo matemático más simple, que describa la relación concentración-respuesta	El %desv abs debe ser menor a el 15%, a excepción en el LC, en el cual el % desv abs debe ser menor al 20%. Al menos 4 de 6 muestras deben cumplir con este criterio.
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	Concentración más baja, por quintuplicado	El valor promedio debe estar dentro del ± 20 del valor nominal, %CV no mayor que el 20%	Preparar la concentración más baja, por quintuplicado.	El valor promedio debe estar dentro del ± 20 del valor nominal, %CV no mayor del 20%. Debe ser mínimo 5 veces la respuesta del blanco

NOTA: %CV= coeficiente de variación, %desv abs = por ciento de desviación absoluta, NE: no especificado, LC =límite de cuantificación



Tabla 4 (continuación) . Comparación de los parámetros a evaluar entre la NOM-177-SSA1-1998 y la guía de validación de la métodos bioanalíticos de la FDA

Prueba	NOM-177-SSA1-1998 (SSA, México)		Guía para la validación de Métodos Analíticos (FDA, EUA)	
	Condiciones de prueba	Criterio de aceptación	Condiciones de prueba	Criterio de aceptación
LÍMITE DE DETECCIÓN	Determinar la concentración más baja en la matriz biológica, que puede distinguirse del ruido.	Se debe sustentar científicamente el criterio empleado para establecerlo	-	-
ESTABILIDAD	3 puntos control por duplicado.	El valor promedio debe estar dentro del ± 15 del valor nominal de concentración	Puntos control bajo y alto, por triplicado	El valor promedio debe estar dentro del ± 15 del valor nominal de concentración
	<u>Ciclos de congelación-descongelación.</u> Someter la muestra a 2 ciclos de congelación antes de analizar las muestras	Cumplir con criterios de exactitud y repetibilidad	<u>Ciclos de congelación-descongelación.</u> Someter la muestra a 3 ciclos de congelación antes de analizar las muestras	
	-	-	<u>Estabilidad a corto plazo.</u> Mantenerlas a temperatura ambiente de 4 a 42 horas, y posteriormente analizarlas	
	<u>Almacenamiento.</u> Mantener bajo las condiciones y durante el tiempo que se almacenarán las muestras en el estudio	Cumplir con criterios de exactitud y repetibilidad	<u>Estabilidad a largo plazo.</u> Mantener bajo las condiciones y durante el tiempo que se almacenarán las muestras en el estudio	
	<u>Otros.</u> Evaluar otros factores a los que puede ser sometidas las muestras.	Cumplir con criterios de exactitud y repetibilidad	<u>Estabilidad de la solución estándar.</u> Evaluar la solución estándar de los analitos y del estándar interno a temp. ambiente durante 6 horas. Si van a ser almacenadas para su posterior uso evaluar su estabilidad.	
	-	-	<u>Estabilidad de la muestra procesada.</u> Debe evaluarse el tiempo de residencia en el automuestreador.	
TOLERANCIA	Evaluar la tolerancia del método a pequeñas, pero deliberadas modificaciones (p ej. pH, disolventes, fase móvil).	Debe cumplir los criterios de exactitud y precisión	-	-



CAPITULO III PARTE EXPERIMENTAL

3.1 MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CLOZAPINA Y N-DESMETILCLOZAPINA EN PLASMA UTILIZANDO EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

3.2 MATERIAL Y EQUIPO

✓ **Estándares**

- Clozapina. Novartis. Estándar secundario, Lote 0207000176 (CLZ)
- N-desmetilclozapina. Sigma, Lote 064K4034 (DMCZ)
- Haloperidol. Janssen-Cilag. Estándar secundario, Lote No.0102550 (HPL)

✓ **Reactivos**

- Metanol RA, J. T. Baker
- Acetonitrilo grado HPLC, J. T. Baker (ACN)
- Agua HPLC obtenida a partir de agua destilada y desionizada con equipo Milli Q-Waters System.
- Ácido acético glacial, J. T. Baker
- Cloruro de potasio, Sigma (KCl)
- Acetato de Sodio trihidratado, Merck.
- Nitrógeno industrial (N₂)

✓ **Material y equipo.**

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Agilent serie 1100 equipado con detección UV y arreglo de diodos
- Balanza analítica Sartorius, modelo i 1800
- Potenciómetro
- Milli-Q Water System Millipore con membrana de 0.45 µm de porosidad
- Agitador vórtex thermolyne Maxi Mix II
- Micropipetas automáticas Gibson



- Repipeteador electrónico Eppendorf
- Sistemas de filtración Millipore
- Columna X- Terra RP-18, 5 μ m, 250 x 4.6 mm (Waters)
- Cartuchos SPE Strata C18-E

3.3 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

✓ **Solución amortiguadora de acetatos 0.01 M, pH 5.0.**

Se disolvieron 0.9 g de acetato de sodio trihidratado, en suficiente agua HPLC para obtener 1000 mL, se utilizó ácido acético glacial para ajustar el pH a 5.0.

✓ **Solución de cloruro de potasio 0.1 M.**

Se disolvieron 3.8 g de cloruro de potasio (KCl) en suficiente agua destilada para obtener 500 mL.

✓ **Solución de ácido acético glacial 0.01 M en metanol.**

Se adicionó con micropipeta 150 μ L de ácido acético glacial y se adicionó suficiente metanol RA hasta obtener 250 mL.

✓ **Mezcla metanol - agua (40:60 v/v)**

Se mezclaron 40 mL de metanol RA con 60 mL de agua destilada.

✓ **Mezcla acetonitrilo- agua (40:60 v/v)**

Se midió con una probeta 40 mL de acetonitrilo HPLC y 60 mL de agua destilada por separado, y posteriormente se mezclaron.

✓ **Plasma humano**

El plasma que se utilizó para la preparación de las curvas patrón y los puntos control se encontraba libre de pirógenos y con sello de sangre segura para las pruebas VDRL, VIH y hepatitis.



3.4 PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES ESTÁNDAR, CURVA DE CALIBRACIÓN Y PUNTOS CONTROL PARA LA CLOZAPINA Y LA N-DESMETILCLOZAPINA.

✓ **Solución estándar de haloperidol. Concentración 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (estándar interno).**

Se pesaron con exactitud 1 mg de haloperidol (HPL), se transfirieron cuantitativamente a un matraz volumétrico de 10 mL, se disolvieron y llevaron al aforo con metanol (concentración 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). De la solución anterior se transfirió una alícuota de 1 mL a un matraz volumétrico de 10 mL y se llevó al aforo con metanol (concentración 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

✓ **Solución estándar de clozapina. Concentración 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.**

Se pesaron con exactitud 1 mg de clozapina, se transfirieron cuantitativamente a un matraz volumétrico de 10 mL, se disolvieron y llevaron al aforo con metanol.

✓ **Solución estándar de N-desmetilclozapina. Concentración 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.**

Se pesaron con exactitud 1 mg de N-desmetilclozapina, se transfirieron cuantitativamente a un matraz volumétrico de 10 mL, se disolvieron y llevaron al aforo con metanol.

✓ **Solución estándar de clozapina y N-desmetilclozapina. Concentración 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$.**

Se tomó una alícuota de 1 mL de la solución estándar de clozapina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y 1 mL de la solución estándar de N-desmetilclozapina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), se transfirieron a un matraz volumétrico de 5 mL y se llevaron al aforo con una mezcla de metanol - agua destilada (1:1 v/v) para obtener una concentración final de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

✓ **Preparación de la curva de calibración de clozapina y N-desmetilclozapina en plasma**

De la solución estándar de clozapina y N-desmetilclozapina (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), se tomó con micropipeta una alícuota de 640 μL se transfirió a un matraz volumétrico de 10 mL y se llevó al aforo con plasma, la solución anterior tiene una concentración de 1280 ng/mL. Posteriormente, se realizaron las siguientes diluciones:

- Tubo 1. Del matraz anterior se tomó una alícuota de 4 mL (solución de 1280 ng/mL) y se añadieron 4 mL de plasma (concentración final 640 ng/mL de CLZ y DMCZ).



- Tubo 2. Del tubo 1 se tomó una alícuota de 4 mL y se añadieron 4 mL de plasma (concentración final 320 ng/mL de CLZ y DMCZ).
- Tubo 3. Del tubo 2 se tomó una alícuota de 4 mL y se añadieron 4 mL de plasma (concentración final 160 ng/mL de CLZ y DMCZ).
- Tubo 4. Del tubo 3 se tomó una alícuota de 4 mL y se añadieron 4 mL de plasma (concentración final 80 ng/mL de CLZ y DMCZ).
- Tubo 5. Del tubo 4 se tomó una alícuota de 4 mL y se añadieron 4 mL de plasma (concentración final 40 ng/mL de CLZ y DMCZ).

✓ **Preparación de los puntos control en plasma o en metanol**

- **Control Alto.** Se transfirieron con una micropipeta 480 μ L de la solución estándar de clozapina y N-desmetilclozapina (20 μ g/mL) a un matraz aforado de 10 mL y se llevó al aforo con metanol RA o plasma. Concentración 960 ng/mL.
- **Control Medio.** Se tomaron 3 mL del control alto (960 ng/mL CLZ y DMCZ) y se añadieron 3 mL de metanol RA o plasma. Concentración 480 ng/mL.
- **Control Bajo.** Se tomó 1 mL del control alto (960 ng/mL CLZ y DMCZ) y se añadieron 7 mL de metanol RA o plasma. Concentración 120 ng/mL.

3.5 PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS DEL PLASMA

- 1) Se acondicionaron los cartuchos de extracción en fase sólida con metanol y con solución de cloruro de potasio 0.1 M.
- 2) Se colocó 1.0 mL de la muestra y se adicionaron 100 μ L de la solución estándar de haloperidol (10 μ g/mL) como estándar interno.
- 3) Se realizó un lavado con solución de cloruro de potasio 0.1 M, posteriormente con una mezcla metanol – agua destilada (40:60 v/v), y por último se utilizó una mezcla de acetonitrilo – agua destilada (40:60 v/v),
- 4) Se eluyó la muestra con solución de ácido acético glacial 0.01 M en metanol.
- 5) Se llevó a sequedad en un baño María bajo corriente de nitrógeno.



- 6) Se reconstituyó la muestra con una mezcla de acetonitrilo : solución amortiguadora de acetatos 0.01 M pH 5.0 (40:60). Se inyectaron 100 μ L del sobrenadante en el cromatógrafo.

En la figura 1 se muestra el diagrama de la metodología empleada para la extracción de la clozapina y de la N-desmetilclozapina del plasma.

3.6 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

- ✓ Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Agilent serie 1100 equipado con:
 - Bomba cuaternaria
 - Degasificador
 - Detector con detección UV y arreglo de diodos
 - Automuestreador
 - Computadora HP
- ✓ Fase móvil: 63 % Solución amortiguadora de acetatos 0.01 M, pH 5.0
37 % Acetonitrilo grado HPLC
- ✓ Velocidad de Flujo: 1.0 mL/min
- ✓ Longitud de onda: 230 nm
- ✓ Temperatura: ambiente
- ✓ Columna: X- Terra RP-18, 5 μ , 250 x 4.6 mm (Waters)
- ✓ Volumen de inyección: 100 μ L
- ✓ Respuesta medida: Alturas relativas (analito/estándar interno)
- ✓ Tiempo de corrida: 12.0 min

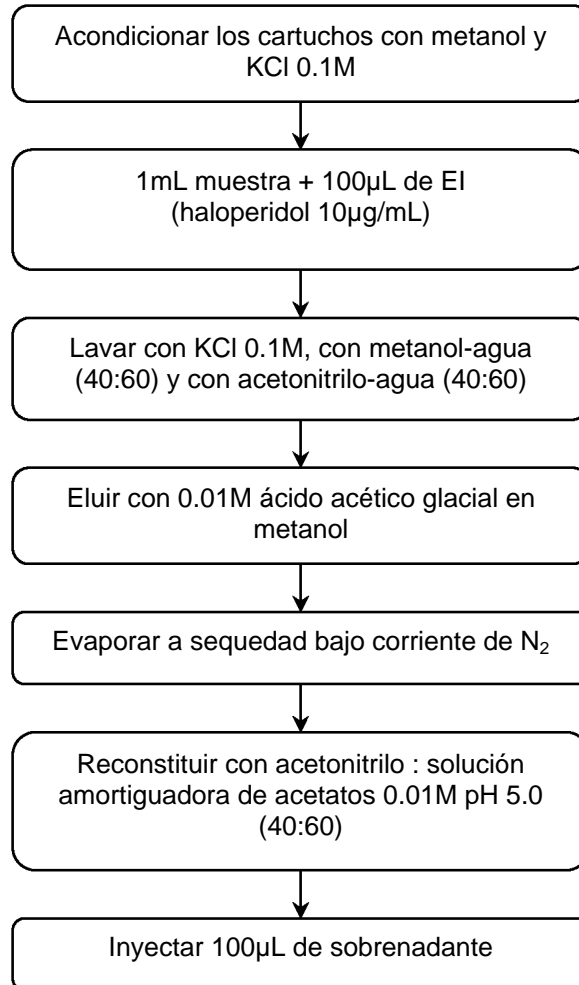


Figura 1. Diagrama de flujo para la preparación de las muestras.



3.7 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CLOZAPINA Y N-DESMETILCLOZAPINA EN PLASMA

En cada corrida analítica se realizó una curva de calibración en plasma de acuerdo a lo descrito en los puntos 3.4 y 3.5, preparada el mismo día de análisis. Para cada una de las determinaciones se calculó la relación de alturas de los analitos de interés entre el estándar interno (DMCZ/HPL o CLZ/HPL), posteriormente se graficó la relación de alturas contra la concentración. Se calculó la pendiente (m), la ordenada al origen (b) y el coeficiente de determinación (r^2) para cada uno de los analitos. La ecuación de la recta obtenida se utilizó para el cálculo de la concentración recuperada de cada una de las muestras preparadas en la corrida analítica, la concentración recuperada se obtuvo interpolando los valores de la relación de alturas (CLZ/HPL o DMCZ/HPL) en la curva de calibración correspondiente a cada analito, considerando como incógnita la concentración del analito.

3.7.3 SELECTIVIDAD

Para evaluar la selectividad del método se analizaron las siguientes muestras:

- Muestras blanco de plasma obtenidas de seis voluntarios diferentes.
- Muestra blanco de plasma obtenida de la mezcla de los plasmas de los 6 voluntarios.
- Muestra blanco de la mezcla de plasmas, adicionando clozapina y N-desmetilclozapina en el límite de cuantificación, y el estándar interno (haloperidol).
- Muestra blanco de un plasma lipémico.
- Muestras de la mezcla de plasma blanco, adicionando los posibles fármacos que se administran concomitantemente con la clozapina (adicionar clozapina y N-desmetilclozapina en el límite de cuantificación, el estándar interno y 50 μ L de una solución metanólica conteniendo 10 μ g/mL de cada uno de los fármacos a evaluar).
- Muestras blanco en metanol adicionando 50 μ L de una solución de 10 μ g/mL en metanol de cada uno de los fármacos a evaluar, para conocer el tiempo de retención de cada uno de los fármacos.

El método es selectivo si no se presentan interferencias en el tiempo de retención de los analitos de interés y el estándar interno (N-desmetilclozapina, clozapina y haloperidol).



3.7.3 EXACTITUD

Para determinar la exactitud se prepararon por quintuplicado, los tres puntos control (bajo, medio y alto) con concentraciones de 120 ng/mL, 480 ng/mL y 960 ng/mL de CLZ y DMCZ en la matriz biológica, de acuerdo al procedimiento descrito en el apartado 3.4 y 3.5.

De cada una de las determinaciones se calculó la concentración recuperada y posteriormente se determinó el valor promedio en cada uno de los niveles de concentración.

Con los valores promedio se obtuvo el % desviación absoluta empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{Desv. Absoluta} = \left(\frac{\text{Concentración Nominal} - \text{Concentración recuperada}}{\text{Concentración Nominal}} \right) \times 100$$

Donde:

Concentración nominal = Concentración teórica, en este caso puede ser 120 ng/mL, 480 ng/mL o 960 ng/mL.

Concentración recuperada = Concentración promedio obtenida interpolando la relación de alturas (CLZ/HPL o DMCZ/HPL) en la curva de calibración preparada el mismo día de análisis.

El método es exacto si el valor promedio de en cada nivel de concentración está dentro del 15% del valor nominal de concentración, es decir, el % desviación absoluta es menor o igual a el 15%.

3.7.3 PRECISIÓN

3.7.3.1 REPETIBILIDAD

Se prepararon por quintuplicado los tres puntos control con concentraciones de 120 ng/mL, 480 ng/mL y 960 ng/mL de CLZ y DMCZ en plasma, de acuerdo al procedimiento descrito en el apartado 3.4 y 3.5.

De cada una de las determinaciones se calculó la concentración recuperada. Se determinó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación para cada nivel de concentración. El coeficiente de variación se obtuvo mediante la siguiente fórmula:



$$\% CV = \left(\frac{\text{Desviación estándar}}{\text{Promedio}} \right) \times 100$$

El método es repetible, si el coeficiente de variación (% CV) es menor al 15 %.

3.7.3.2 REPRODUCIBILIDAD

Se analizaron por quintuplicado los tres puntos control con concentraciones de 120 ng/mL, 480 ng/mL y 960 ng/mL de CLZ y DMCZ en plasma durante tres días diferentes. Para cada día de análisis se preparó una curva de calibración, las muestras se procesaron de acuerdo al procedimiento descrito en el apartado 3.4 y 3.5. De cada una de las determinaciones individuales se obtuvo la relación de alturas (DMCZ/HPL y CLZ /HPL), posteriormente se calculó la concentración recuperada interpolando los datos en la curva de calibración preparada el mismo día de análisis. Se calculó la cantidad recuperada promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación utilizando los datos de los 3 días.

El método es reproducible si el coeficiente de variación (%CV) en cada nivel de concentración no es mayor que el 15%.

3.7.5.2 RECUPERACIÓN ABSOLUTA (% RECOBRO)

Se prepararon por quintuplicado los puntos control bajo, medio y alto (120 ng/mL, 480 ng/mL y 960 ng/mL, de clozapina y N-desmetilclozapina) en plasma y en metanol de acuerdo al procedimiento descrito en el apartado 3.4 y 3.5.

Se obtuvo para cada una de las determinaciones (muestras en metanol y plasma) la relación de alturas entre los analitos de interés y el estándar interno (DMCZ/HPL o CLZ/HPL). Posteriormente se determinó el porcentaje de recobro de cada nivel de concentración comparando el promedio de la respuesta obtenida en plasma con respecto a la obtenida en metanol a la misma concentración. Lo anterior se describe en la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Recobro} = \frac{\text{Promedio relación alturas en plasma}}{\text{Promedio relación alturas en metanol}} \times 100$$

Para el cálculo del % recobro del estándar interno (haloperidol) se analizaron por triplicado los puntos control bajo, medio y alto en plasma y en metanol, en los cálculos se utilizaron las alturas del haloperidol. Se calculó el porcentaje de recobro del haloperidol en los tres niveles de concentración de los analitos (clozapina y N-desmetilclozapina) comparando el promedio



de las alturas del haloperidol en plasma con respecto a la obtenida en metanol a la misma concentración de los analitos. Lo anterior se indica en la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Recobro} = \frac{\text{Promedio alturas de HPL en plasma}}{\text{Promedio alturas de HPL en metanol}} \times 100$$

El criterio de aceptación es que el porcentaje de recobro de los analitos (clozapina y N-desmetilclozapina) y del estándar interno no necesariamente debe ser del 100%, pero deberá ser reproducible en el rango de concentraciones utilizado.

3.7.7 LINEALIDAD

3.7.7.1.1 LINEALIDAD DEL MÉTODO

Para determinar la linealidad del método se preparó una curva de calibración en plasma en el intervalo de concentraciones de 40 ng/mL a 1280 ng/mL, de acuerdo con el procedimiento descrito en el punto 3.4. Se analizaron por triplicado cada una de las concentraciones de la curva de calibración y se procesaron de acuerdo a lo descrito en el punto 3.5. Se graficó la relación de alturas de los analitos entre el estándar interno (CLZ/HPL o DMCZ/HPL) contra la concentración (ng/mL), utilizando todos los datos y por un ajuste de mínimos cuadrados se determinó el coeficiente de determinación (r^2), la pendiente (m) y la ordenada al origen (b). Se calculó la concentración recuperada y el % desviación absoluta de cada uno de los datos. El criterio de aceptación es que el % desviación absoluta debe ser menor a el +/-15 % en cada uno de los puntos, a excepción del límite de cuantificación, donde la desviación no debe ser mayor del +/-20 % del valor nominal. En cada una de las curvas al menos 4 de los 6 puntos deben cumplir con este criterio, incluyendo el límite de cuantificación y la concentración más alta.

3.7.5.2 INFLUENCIA DE LA DILUCIÓN DE LA MUESTRA O DEL USO DE UN VOLÚMEN MÀS PEQUEÑO

a) Dilución de la muestra. Se preparó la concentración alta de los puntos control en plasma al doble de esta concentración (960 y 1920 ng/mL CLZ y DMCZ). Se tomó 1 mL de la concentración de 960 ng/mL y se analizó según lo descrito en el apartado 3.5. Esta prueba se realizó por triplicado.



Se realizó una dilución 1:2 de la concentración de 1920 ng/mL (para obtener una concentración 960 ng/mL), de la solución anterior se tomó 1 mL y se analizó según lo descrito en el apartado 3.5 Esta prueba se realizó por triplicado.

b) Uso de un volumen más pequeño de muestra. Se tomaron 0.5 mL de la concentración de 1920 ng/mL y se analizó según lo descrito en el apartado 3.5 (la prueba se realizó por triplicado). En la misma corrida analítica se preparó una curva de calibración de acuerdo a lo descrito en el apartado 3.4 y 3.5.

Se obtuvo la relación de alturas de los analitos entre el estándar interno (DMCZ/HPL y CLZ/HPL) y se calculó la concentración recuperada de cada una de las determinaciones. Se obtuvo el % desviación absoluta de las muestras diluidas tomando como referencia el valor promedio de las muestras con concentración de 960 ng/mL (muestras sin diluir). A continuación se muestra un ejemplo para el cálculo del % desviación absoluta en el caso de la DMCZ.

$$\% \text{Desv. Absoluta} = \left(\frac{(\text{Conc. recuperada } 960 \text{ ng/mL}) - (\text{Conc. recuperada muestra diluida})}{(\text{Conc. recuperada } 960 \text{ ng/mL})} \right) \times 100$$

Los resultados de una muestra diluida son confiables si el valor promedio es menor o igual a el ± 15 % del valor promedio de la concentración de 960 ng/mL (sin diluir).

3.7.6 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Se analizó por quintuplicado la concentración más baja del rango (40 ng/mL) de CLZ Y DMCZ en plasma. Se calculó el coeficiente de variación y el porcentaje de desviación absoluta. Se considera que el punto tiene validez como límite de cuantificación, si su valor promedio cae dentro del ± 20 % del valor nominal y si el coeficiente de variación no es mayor al 20%. La respuesta del analito en el límite de cuantificación debe ser cuando menos 5 veces la respuesta del blanco.

3.7.7 ESTABILIDAD

Por medio de las pruebas de estabilidad se determinan las condiciones a las cuales la clozapina y la N-desmetilclozapina permanecen estables, durante su almacenamiento o proceso.



Para cada una de las determinaciones de las pruebas de estabilidad se calculó la concentración recuperada, esto se realizó interpolando la relación de alturas (DMCZ/HPL o CLZ/HPL) en la curva de calibración preparada en cada día de análisis. En la prueba de estabilidad de la solución estándar en refrigeración no se determinó la concentración recuperada debido a que las muestras se encontraban en metanol. En este caso para el cálculo se utilizó la relación de alturas (CLZ/HPL o DMCZ/HPL) y la altura del haloperidol. En todas las pruebas se calculó la desviación absoluta utilizando el valor promedio de la concentración recuperada en cada nivel de concentración, empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{Desv. Absoluta} = \left(\frac{(\text{Conc recuperada}_{\text{original o referencia}}) - (\text{Conc recuperada}_{\text{prueba}})}{(\text{Conc recuperada}_{\text{original o referencia}})} \right) \times 100$$

El criterio de aceptación para las pruebas de estabilidad está definido por los valores de la desviación absoluta, el valor promedio no deberá ser mayor al 15% con respecto al valor original o al de referencia.

3.7.7.1 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALÍTICA

3.7.7.1.1 CICLOS DE CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN

Se prepararon por triplicado los puntos control bajo y alto en plasma (120 y 960 ng/mL CLZ y DMCZ), se realizaron 2 series. Una de las series se sometió a tres ciclos de congelación-descongelación, la temperatura de congelación fue de $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. La otra serie sirvió como referencia, ésta fue congelada durante todo el tiempo en que se realizaron los ciclos de congelación-descongelación de la otra serie, y ambas series fueron analizadas conjuntamente.

3.7.7.1.2 ESTABILIDAD A CORTO PLAZO (TEMPERATURA AMBIENTE)

Se prepararon por triplicado los puntos control bajo y alto en plasma (120 y 960 ng/mL de CLZ y DMCZ), de acuerdo a lo descrito en el punto 3.4, se prepararon 2 series. Una de las series se procesó inmediatamente, de acuerdo a lo descrito en el punto 3.5, ésta fue considerada como las 0 horas. La otra serie se mantuvo durante 24 horas a temperatura ambiente, transcurrido ese tiempo se procesó de acuerdo a lo descrito en el punto 3.5.



Se calculó el % desviación absoluta, utilizando como referencia, el valor promedio de las concentraciones recuperadas de las muestras que se analizaron a las 0 horas.

3.7.7.1.3 ESTABILIDAD A LARGO PLAZO (TEMPERATURA DE CONGELACIÓN)

Se prepararon por triplicado los puntos control bajo y alto en plasma (120 y 960 ng/mL CLZ y DMCZ), de acuerdo a lo descrito en el punto 3.4, posteriormente se sometieron a congelación (-30°C) durante 60 días. Transcurridos los 60 días se realizó su análisis de acuerdo a lo descrito en el punto 3.5. Para tener un punto de referencia se prepararon puntos control frescos, para ello en el mismo día de análisis de las muestras de los 60 días se preparó por triplicado los puntos control bajo y alto en plasma (120 y 960 ng/mL CLZ y DMCZ) de acuerdo a lo descrito en el apartado 3.4.y 3.5, los cuales correspondieron a los 0 días.

3.7.7.1.4 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE LUZ

Se prepararon por triplicado los puntos control alto y bajo en plasma (120 y 960 ng/mL CLZ y DMCZ), se realizaron 3 series. La primera serie se mantuvo bajo luz solar durante 6 horas. La segunda serie se mantuvo durante luz artificial durante 6 horas. La tercera serie se protegió de la luz durante 6 horas. Una vez finalizado el tiempo de exposición a la luz se procesaron de acuerdo a lo descrito en el punto 3.5.

Se calculó el % desviación absoluta, utilizando como referencia, el promedio de las concentraciones recuperadas de las muestras que se mantuvieron en condiciones de oscuridad.

3.7.7.2 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA PROCESADA

Se prepararon por triplicado los puntos control bajo y alto en plasma (120 y 960 ng/mL CLZ y DMCZ), se realizaron 2 series. Ambas series fueron procesadas inmediatamente de acuerdo al apartado 3.5. Una de las series se inyectó en el cromatógrafo inmediatamente (0 horas). La otra serie se mantuvo en el automuestreador durante 24 horas y transcurrido ese tiempo se inyectó en el cromatógrafo.

Se calculó el % desviación absoluta, utilizando como referencia, el valor promedio de las concentraciones recuperadas de las muestras que se analizaron a las 0 horas.



3.7.7.3 ESTABILIDAD DE LA SOLUCIÓN ESTÁNDAR EN REFRIGERACIÓN

a) Estabilidad de las soluciones estándar de CLZ y DMCZ

Se prepararon soluciones estándar de 100 µg/mL de CLZ, DMCZ y HPL en metanol de acuerdo a lo descrito en el punto 3.4, posteriormente se analizó por quintuplicado el punto control medio (480 ng/mL de CLZ y DMCZ) en metanol, que correspondió al día cero.

Se prepararon diferentes soluciones estándar en metanol con concentración de 100 µg/mL de CLZ y DMCZ, pero fueron almacenadas en refrigeración y protegidas de la luz durante 89 días (3 meses) y 280 días (9 meses). En la misma corrida analítica se analizaron las soluciones estándar del día cero y las soluciones estándar con diferentes períodos bajo refrigeración.

Se obtuvo la relación de alturas de los analitos entre el estándar interno (DMCZ/HPL y CLZ/HPL) de todas las muestras, y se calculó el valor promedio. El día cero se utilizó como punto de referencia para el cálculo del % desviación absoluta de cada una de las soluciones estándar almacenadas en refrigeración durante diferentes períodos de tiempo. A continuación se muestra un ejemplo para el cálculo del % desviación absoluta de una solución estándar almacenada en refrigeración, para la clozapina:

$$\% \text{Desv. Absoluta} = \left(\frac{(\text{Promedio CLZ/HPL}_{\text{día cero}}) - (\text{CLZ/HPL}_{\text{refrigeración}})}{(\text{Promedio CLZ/HPL}_{\text{día cero}})} \right) \times 100$$

b) Estabilidad de la solución estándar de haloperidol (estándar interno)

Para determinarla se analizó por quintuplicado una concentración de 1 µg/mL, ésta correspondió al día cero.

Se preparó una solución estándar en metanol con concentración de 100 µg/mL. Ésta se almacenó en refrigeración y protegida de la luz durante 265 días (9 meses). Una vez transcurrido el período establecido, se realizó una dilución de 1 mL en 10mL de metanol y se inyectó una alícuota de 100 µL al cromatógrafo. Esta determinación se realizó por quintuplicado. En la misma corrida analítica se analizaron las soluciones estándar de haloperidol del día cero y las soluciones estándar con diferentes períodos bajo refrigeración.

Para los cálculos se utilizó la altura del haloperidol. El valor promedio de la altura del haloperidol del día cero se utilizó como punto de referencia para el cálculo del % desviación



absoluta de cada una de las soluciones estándar almacenadas en refrigeración durante diferentes períodos de tiempo.

3.7.7.4 APLICACIÓN DEL MÉTODO A LA CLÍNICA

Se realizó un estudio en pacientes para aplicar el método analítico desarrollado, para ello se analizaron las muestras de 28 pacientes, de 20 a 58 años (media 36 años), con dosis de 25 a 500 mg/día (media 230 mg/día). A todos ellos se les tomó una muestra de sangre en el estado estacionario. Las muestras se centrifugaron y se guardaron en congelación hasta el momento de su análisis.



CAPITULO IV

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1 DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO

Debido a que se deseaba implementar un método analítico que cuantificara simultáneamente clozapina y N-desmetilclozapina en plasma por cromatografía de líquidos de alta resolución, se inicio el trabajo reproduciendo en el laboratorio algunas de las técnicas reportadas en la literatura internacional (vease tablas 2 y 3), pero los métodos no eran lineales, precisos o exactos en los rangos de concentraciones establecidos, o en otros casos las técnicas de extracción no eran las adecuadas, ya que se obtenían muestras muy sucias.

Como lo anterior no dio buenos resultados, en el laboratorio se buscaron las condiciones cromatográficas adecuadas para la identificación de ambos compuestos, posteriormente se desarrollo un método de extracción y se validó el método analítico.

4.1.1 SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

4.1.1.1 SELECCIÓN DE LA LONGITUD DE ONDA DE MÁXIMA ABSORCIÓN (λ max)

Para seleccionar la longitud de onda, nos basamos en la propiedad fisicoquímica de la clozapina de absorber en el UV a 215, 230, 261 y 297 nm¹² y en lo reportado por otros métodos analíticos, ya que en estos últimos las longitudes de onda más empleadas son 230 y 254 nm (véase tabla 2 y 3). Considerando lo anterior, decidimos probar las longitudes de onda de 230 y 254 nm. Se eligió trabajar con la longitud de onda de 230 nm debido a que con ella se obtuvo una mayor altura para los picos de los analitos y una menor interferencia de los compuestos endógenos del plasma.

4.1.1.2 ELECCIÓN DE LA COLUMNA CROMATOGRÁFICA Y FASE MÓVIL

Se probaron tres columnas cromatográficas con características similares, las cuales fueron:

- X-Terra RP C₁₈, 4.6 X 250 mm D.I., 5 μ m (Waters)
- X-Terra MS C₁₈, 4.6 X 150 mm D.I., 5 μ m (Waters)



- Gemini RP C₁₈, 4.6 X 250 mm D.I., 5 µm (Phenomenex)

Para cada columna se buscaron las condiciones cromatográficas óptimas para la separación de los picos de clozapina y N-desmetilclozapina cambiando la proporción de la fase móvil (constituida por acetonitrilo, solución amortiguadora y/o metanol) y la velocidad de flujo.

La columna que dio mejores resultados fue la X-Terra RP C₁₈, 4.6 X 250 mm D.I., 5 µm (Waters) ya que permitió una adecuada separación de los compuestos de interés.

El pH 5.0 fue el más adecuado, cuando se utilizó una solución amortiguadora de acetatos 0.01 M.

Las condiciones cromatográficas obtenidas son las siguientes:

- ✓ Fase móvil: 63 % Solución amortiguadora de acetatos 0.01 M, pH 5.0
37 % Acetonitrilo grado HPLC
- ✓ Velocidad de Flujo: 1.0 mL/min
- ✓ Temperatura: ambiente
- ✓ Volumen de inyección: 100 µL
- ✓ Tiempo de corrida: 12.0 min

Las condiciones cromatográficas anteriores permitieron que los picos de los compuestos de interés presentarán una adecuada separación (resolución mayor a 2), una buena forma de los picos (simetría cercana a 1, no presentaban coleo), bajos tiempos de retención de los analitos y no había interferencia de los compuestos endógenos del plasma. Lo anteriormente descrito es de importancia debido a que una buena forma de los picos de los compuestos de interés nos asegura una adecuada integración y con ello una cuantificación confiable.

4.1.2 SELECCIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN

Debido a que se deseaba implementar un método de extracción que fuera rápido y fácil de realizar, y con el cual se obtuviera un buen recobro de ambos analitos (clozapina y N-desmetilclozapina), se probaron dos diferentes métodos de extracción, los cuales fueron extracción líquido-líquido y extracción en fase sólida.

En la extracción líquido-líquido se probaron diferentes disolventes orgánicos y también se probaron mezclas de éstos, los utilizados fueron acetato de etilo, hexano, diclorometano, isopropanol, alcohol isoamílico y éter isopropílico. La mezcla con la que se obtuvo un mayor porcentaje de recobro para ambos analitos, y con la que se extraía una menor cantidad de



componentes endógenos del plasma fue la constituida por hexano:diclorometano:alcohol isoamílico, el % recobro para la N-desmetilclozapina fue de 87 y para la clozapina fue de 77. Para optimizar el método de extracción líquido-líquido se modificaron otros parámetros como la agitación, el volumen de disolvente y la centrifugación, pero debido a que los resultados obtenidos en la extracción líquido-líquido no eran reproducibles, se decidió utilizar una extracción en fase sólida.

En la extracción en fase sólida se modificó el lavado de los cartuchos, para ello se probaron diferentes soluciones amortiguadoras con diferentes pH y diferentes disolventes orgánicos. El mejor método de extracción consistió en cargar la muestra en un cartucho C₁₈, posteriormente lavarlo con una solución de KCl, con una mezcla metanol:agua (40:60 v/v) y con una mezcla acetonitrilo:agua (40:60 v/v), y por último eluir la muestra con una solución de ácido acético glacial 0.01 M en metanol.

4.1.2 SELECCIÓN DEL ESTÁNDAR INTERNO

Para seleccionar el estándar interno se probaron compuestos que tuvieran propiedades fisicoquímicas similares a la clozapina y a la N-desmetilclozapina, principalmente su estructura química y solubilidad. Los estándares internos que se probaron fueron el haloperidol, la imipramina y la amitriptilina (véase figura 2).

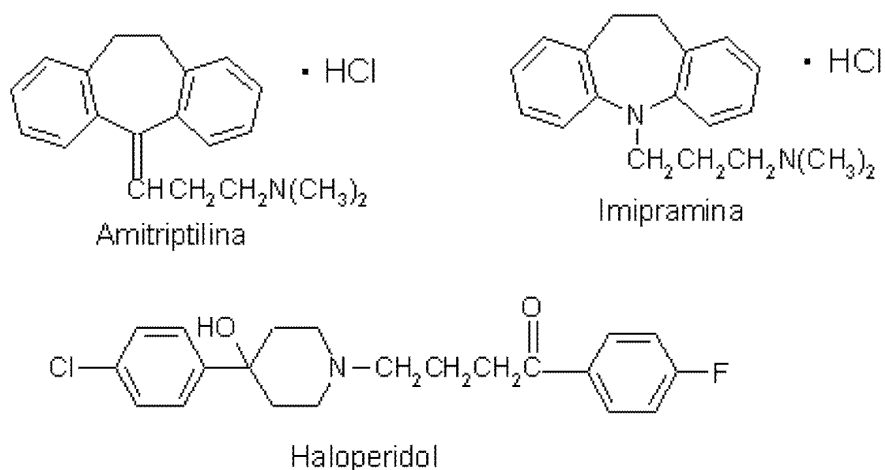


Figura 2. Estructuras químicas de los estándares internos probados.

El haloperidol, la imipramina y la amitriptilina tuvieron tiempos de retención adecuados, los cuales fueron 9.4, 9.0 y 10.3 min respectivamente, que no interferían con la señal de los



compuestos de interés. Se decidió trabajar con el haloperidol debido a que fue el único que presentó un porcentaje de recobro alto y reproducible (99%).

4.1.4 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Una vez que se encontró el método de extracción y las condiciones cromatográficas adecuadas se decidió probar la utilización de una precolumna de fase reversa, ya que el uso de una precolumna protege la columna cromatográfica, aumentando su tiempo de vida.

Se realizaron pruebas con las siguientes precolumnas:

- Bondapak C₁₈ 10 µm (poro 125Å) (Waters)
- Spherisorb C₁₈ (10 X 4.6 mm) (Waters)

Se decidió no utilizar precolumna debido a que los tiempos de retención aumentaban y a que los picos se ensanchaban o se partían.

4.2 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACION DE CLOZAPINA Y N DESMETILCLOZAPINA EN PLASMA

4.2.1 SELECTIVIDAD

Para comprobar que los componentes endógenos del plasma no interfieren con las señales de los analitos de interés (CLZ, DMCZ y HPL), se analizaron seis blancos de plasma obtenidos de diferentes donadores sanos, una muestra blanco con la mezcla de los seis plasmas y un plasma lipémico. En las Figuras 3,4 y 5 se muestran los cromatogramas representativos de los blancos de plasma y una muestra de plasma adicionada con clozapina y N-desmetilclozapina en el límite de cuantificación.

No se observaron interferencias significativas, debido a que las alturas de los picos de los compuestos endógenos del plasma que salían a los mismos tiempos de retención que los compuestos de interés, fueron muy bajas.

También se analizó un plasma lipémico debido a que la clozapina y la N-desmetilclozapina son compuestos no polares, y probablemente en el proceso de extracción los lípidos del plasma podrían extraerse simultáneamente y producir una interferencia. Experimentalmente no se encontraron interferencias con las señales de la clozapina, la N-desmetilclozapina y el haloperidol.

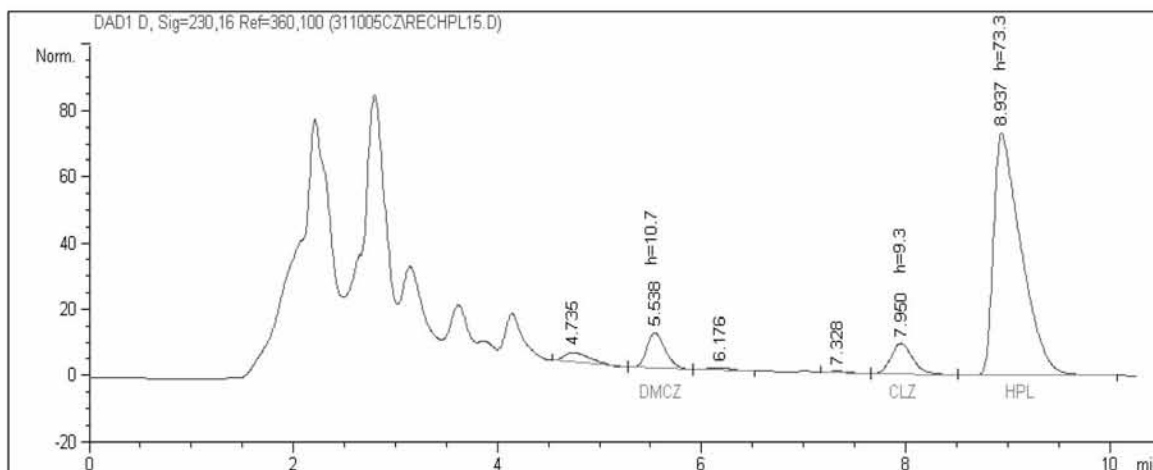


Figura 3. Cromatograma de una muestra de plasma adicionada con DMCZ y CLZ en el límite de cuantificación (40 ng/mL), adicionada con estándar interno (HPL).

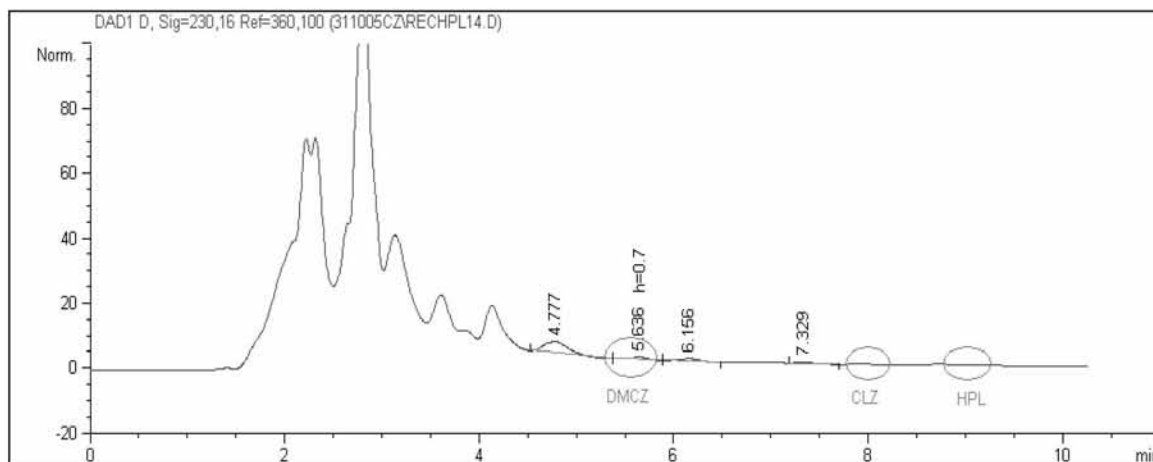


Figura 4. Cromatograma de muestra blanco (mezcla de los 6 plasmas de los voluntarios).

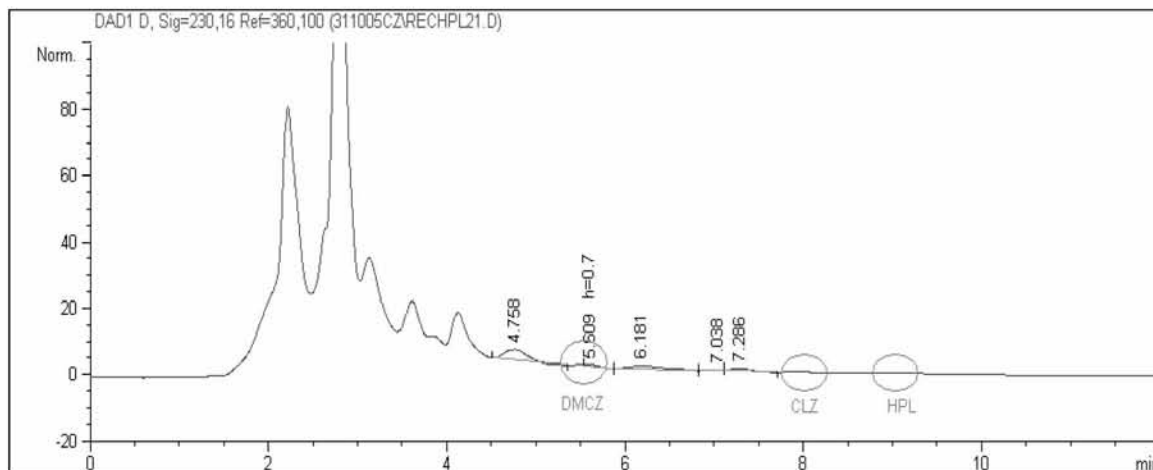


Figura 5. Cromatograma de muestra blanco (plasma del voluntario No. 1).



También se analizó la posible interferencia debida a los fármacos que se administran concomitantemente con la clozapina, los resultados se reportan en la tabla 5.

Tabla 5. Selectividad del método (fármacos que se administran concomitantemente con la clozapina).

Compuesto	Uso/ Acción	pka	Tr	% Recobro
Cafeína	Estimulante del SNC	13.9	2.8	NI
N-desmetilclozapina	-	NE	5.7	97*
Carbamazepina	Antiepiléptico	NE	7.2	-
Clozapina	Antipsicótico	3.7; 7.6	7.7	91*
Oxacepam	Sedante débil	NE	9.0	-
Imipramina	Antidepresivo	9.4	9.0	105
Haloperidol	Antipsicótico	8.3	9.4	99*
Amitriptilina	Antidepresivo	9.4	10.3	73
Fluoxetina	Antidepresivo	NE	12.4	105
Clomipramina	Antidepresivo	NE	15.1	79
Diazepam	Antiepiléptico, sedante	3.7; 3.2	20.1	33

NOTA: * Los cálculos se reportan en el punto 4.2.4, NI: No identificable, debido a que el pico sale conjuntamente con las señales del plasma, NE: Datos no encontrados en la literatura.

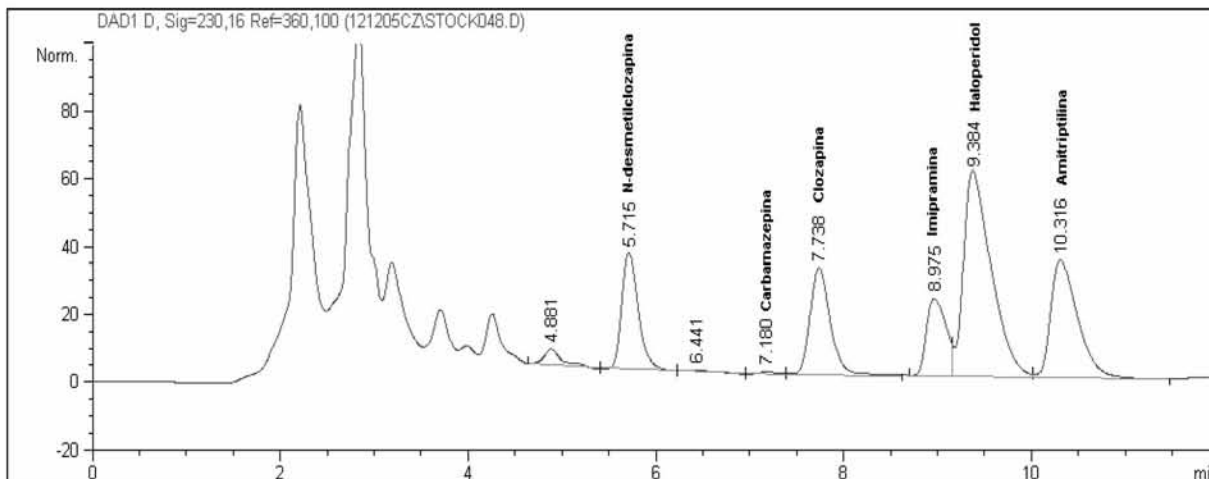


Figura 6. Cromatograma de la selectividad del método (fármacos que se administran concomitantemente con la clozapina).

Debido a que la señal de la imipramina sale muy cercana a la del haloperidol, se calculó la resolución entre ambos picos, mediante la siguiente fórmula:

$$R_s = \frac{2 (Tr_2 - Tr_1)}{Wb_1 + Wb_2}$$



Donde:

R_s = Resolución

Tr_1 = Tiempo de retención del compuesto 1 (min)

Tr_2 = Tiempo de retención del compuesto 2 (min)

Wb_1 = Ancho del pico en su base del compuesto 1

Wb_2 = Ancho del pico en su base del compuesto 2

La resolución entre los picos de la imipramina y el haloperidol fue de 1.4, lo cual nos indica que la separación entre éstos es aceptable. Por lo tanto el método es confiable cuando se analicen muestras de pacientes que se encuentren bajo tratamiento concomitante de clozapina e imipramina, aunque es muy poco usual que un paciente se encuentre tomando estos fármacos simultáneamente.

Por lo anteriormente descrito se puede decir que el método es selectivo, ya que es capaz de identificar y cuantificar los analitos de interés en presencia de otros compuestos que pudiera estar presentes en la muestra plasmática, como son compuestos endógenos del plasma, lo cual se demostró analizando muestras blanco de plasma de siete fuentes diferentes, o de otros fármacos que se estén administrando concomitantemente con la clozapina.

4.2.2 EXACTITUD

En la tabla 6 se reportan los resultados de exactitud para la N-desmetilclozapina, y en la tabla 7 se reportan los resultados de exactitud para la clozapina.

Tabla 6. Exactitud del método para la cuantificación de N-desmetilclozapina.

No. Réplica	Punto bajo (120 ng/mL)		Punto medio (480 ng/mL)		Punto alto (960 ng/mL)	
	Concentración recuperada DMCZ (ng/mL)	% Desviación absoluta	Concentración recuperada DMCZ (ng/mL)	% Desviación absoluta	Concentración recuperada DMCZ (ng/mL)	% Desviación absoluta
1	118.7	1.1	450.4	6.2	917.5	4.4
2	117.0	2.5	417.2	13.1	998.0	4.0
3	119.2	0.6	470.3	2.0	927.9	3.3
4	113.0	5.8	453.5	5.5	981.0	2.2
5	119.2	0.6	442.8	7.8	895.9	6.7
Promedio	117.4	2.1	446.8	6.9	944.0	1.7



Tabla 7. Exactitud del método para la cuantificación de clozapina.

No. Réplica	Punto bajo (120 ng/mL)		Punto medio (480 ng/mL)		Punto alto (960 ng/mL)	
	Concentración recuperada CLZ (ng/mL)	% Desviación absoluta	Concentración recuperada CLZ (ng/mL)	% Desviación absoluta	Concentración recuperada CLZ (ng/mL)	% Desviación absoluta
1	115.9	3.4	465.2	3.1	902.5	6.0
2	115.6	3.7	443.8	7.5	946.3	1.4
3	115.6	3.7	466.4	2.8	953.4	0.7
4	116.5	2.9	463.9	3.4	992.0	3.3
5	117.6	2.0	445.3	7.2	914.1	4.8
Promedio	116.2	3.1	456.9	4.8	941.7	1.9

El método es exacto debido a que la desviación absoluta del valor promedio de las concentraciones recuperadas es menor al 15% para ambos analitos. Lo anterior nos indica que hay concordancia entre los valores obtenidos experimentalmente y los valores reales.

4.2.3 PRECISIÓN

4.2.3.1 REPETIBILIDAD

Los resultados de repetibilidad para la N-desmetilclozapina se reportan en la tabla 8, y en la tabla 9 se reportan los resultados para la clozapina.

Tabla 8. Repetibilidad del método para la cuantificación de N-desmetilclozapina.

No. Réplica	Punto bajo (120 ng/mL)	Punto medio (480 ng/mL)	Punto alto (960 ng/mL)
	Concentración recuperada DMCZ (ng/mL)	Concentración recuperada DMCZ (ng/mL)	Concentración recuperada DMCZ (ng/mL)
1	118.7	450.4	917.5
2	117.0	417.2	998.0
3	119.2	470.3	927.9
4	113.0	453.5	981.0
5	119.2	442.8	895.9
Promedio	117.4	446.8	944.0
Desv std	2.649	19.361	43.486
% CV	2.3	4.3	4.6



Tabla 9. Repetibilidad del método para la cuantificación de clozapina.

	Punto bajo (120 ng/mL)	Punto medio (480 ng/mL)	Punto alto (960 ng/mL)
No. Réplica	Concentración recuperada CLZ (ng/mL)	Concentración recuperada CLZ (ng/mL)	Concentración recuperada CLZ (ng/mL)
1	115.9	465.2	902.6
2	115.6	443.8	946.3
3	115.6	466.4	953.4
4	116.5	463.9	992.0
5	117.6	445.3	914.1
Promedio	116.2	456.9	941.7
Desv std	0.854	11.314	35.295
% CV	0.7	2.5	3.8

El método es repetible para ambos analitos debido a que el coeficiente de variación obtenido de las cinco concentraciones recuperadas en cada nivel de concentración es menor al 15 %, lo cual nos indica que hay poca variabilidad en los resultados obtenidos al aplicar el método repetidas veces, bajo las mismas condiciones analíticas (mismo día de trabajo, condiciones idénticas de analista, equipo y laboratorio).

4.2.3.2 REPRODUCIBILIDAD

Los resultados de reproducibilidad para la N-desmetilclozapina se reportan en la tabla 10, y en la tabla 11 se reportan los correspondientes a la clozapina.



Tabla 10. Reproducibilidad del método para la cuantificación de N-desmetilclozapina.

		Punto bajo (120 ng/mL)	Punto medio (480 ng/mL)	Punto alto (960 ng/mL)
Día	No. Réplica	Concentración Recuperada DMCZ (ng/mL)	Concentración Recuperada DMCZ (ng/mL)	Concentración Recuperada DMCZ (ng/mL)
1	1	111.4	466.4	951.3
	2	115.5	442.0	881.2
	3	111.3	435.4	821.0
	4	112.8	478.0	944.7
	5	87.7	449.5	943.8
2	1	118.7	450.4	917.5
	2	117.0	417.2	998.0
	3	119.2	470.3	927.9
	4	113.0	453.5	981.0
	5	119.2	442.8	895.9
3	1	117.1	453.9	916.9
	2	109.0	457.3	923.5
	3	121.0	449.5	908.0
	4	130.4	447.7	890.4
	5	111.0	491.7	906.7
	Promedio	114.3	453.7	920.5
	Desv std	9.09	17.90	42.37
	%CV	8.0	4.0	4.6

**Tabla 11.** Reproducibilidad del método para la cuantificación de clozapina.

		Punto bajo (120 ng/mL)	Punto medio (480 ng/mL)	Punto alto (960 ng/mL)
Día	No. Réplica	Concentración Recuperada CLZ (ng/mL)	Concentración Recuperada CLZ (ng/mL)	Concentración Recuperada CLZ (ng/mL)
1	1	117.9	498.2	1025.5
	2	126.9	461.2	998.8
	3	123.0	506.1	831.9
	4	122.0	470.5	955.6
	5	111.2	469.2	1101.4
2	1	115.9	465.2	902.6
	2	115.6	443.8	946.3
	3	115.6	466.4	953.4
	4	116.5	463.9	992.0
	5	117.6	445.3	914.1
3	1	120.2	485.4	932.7
	2	108.4	487.8	973.8
	3	120.7	473.5	955.5
	4	128.2	456.8	950.6
	5	113.8	491.4	950.8
	Promedio	118.2	472.3	959.0
	Desv std	5.41	18.26	59.76
	%CV	4.6	3.9	6.2

El método es reproducible porque el coeficiente de variación obtenido de las concentraciones recuperadas de muestras analizadas en tres diferentes días de trabajo, fue menor al 15 %. Por medio de lo anterior podemos decir que al aplicar el método repetidas veces, bajo diferentes condiciones de trabajo (diferentes días) obtendremos resultados con poca variabilidad entre ellos.

4.2.4 RECUPERACIÓN ABSOLUTA (% RECOBRO)

En el cálculo de la recuperación absoluta de los analitos, se utilizó el valor promedio de las 5 determinaciones de las relaciones de alturas (DMCZ/HPL o CLZ/HPL) en cada nivel de



concentración, los resultados de la recuperación absoluta de los analitos se muestran en las tablas 12 y 13.

Tabla 12. Recobro absoluto de DMCZ en los tres niveles de concentración

Réplica	Punto bajo (120 ng/mL)		Punto medio (480 ng/mL)		Punto alto (960 ng/mL)	
	Metanol DMCZ/HPL	Plasma DMCZ/HPL	Metanol DMCZ/HPL	Plasma DMCZ/HPL	Metanol DMCZ/HPL	Plasma DMCZ/HPL
1	0.43	0.39	1.72	1.74	3.52	3.58
2	0.38	0.40	1.78	1.64	3.55	3.31
3	0.44	0.39	1.72	1.62	3.49	3.08
4	0.41	0.39	1.66	1.78	3.34	3.55
5	0.38	0.30	1.78	1.67	3.51	3.55
promedio	0.41	0.37	1.73	1.69	3.48	3.42
%recobro		91.6		97.7		98.1

NOTA: Se obtuvo un % CV = 3.8 de los valores de % recobro para la DMCZ.

Tabla 13. Recobro absoluto de CLZ en los tres niveles de concentración

Réplica	Punto bajo (120 ng/mL)		Punto medio (480 ng/mL)		Punto alto (960 ng/mL)	
	Metanol CLZ/HPL	Plasma CLZ/HPL	Metanol CLZ/HPL	Plasma CLZ/HPL	Metanol CLZ/HPL	Plasma CLZ/HPL
1	0.40	0.35	1.61	1.53	3.29	3.16
2	0.42	0.38	1.65	1.41	3.27	3.08
3	0.45	0.37	1.60	1.55	3.12	2.56
4	0.41	0.36	1.63	1.44	3.08	2.95
5	0.42	0.33	1.70	1.44	3.20	3.40
promedio	0.42	0.36	1.64	1.48	3.19	3.03
%recobro		85.0		90.2		95.0

NOTA: Se obtuvo un % CV = 5.5 de los valores de % recobro para la CLZ.

Para el cálculo de la recuperación absoluta del estándar interno se utilizaron las alturas del haloperidol, los resultados se muestran en la tabla 14.



Tabla 14. Recobro absoluto del HPL en los tres niveles de concentración de los analitos (CLZ y DMCZ).

	Punto bajo de CLZ y DMCZ (120 ng/mL)		Punto medio de CLZ y DMCZ (480 ng/mL)		Punto alto de CLZ y DMCZ (960 ng/mL)	
Réplica	altura HPL metanol	altura HPL plasma	altura HPL metanol	altura HPL plasma	altura HPL metanol	altura HPL plasma
1	77.4	76.5	75.4	76.5	71.8	69.5
2	72.1	75.3	76.8	77.9	75.6	68.9
3	70.9	74.8	76.3	74.9	77.6	69.1
promedio	73.5	75.5	76.2	76.4	75.0	69.2
%recobro		102.8		100.4		92.2

NOTA: Se obtuvo un % CV = 5.6 de los valores de % recobro para el HPL.

Al analizar los datos de recobro de los analitos (clozapina y N-desmetilclozapina) y del estándar interno se encontró que en todos los casos éste fue alto. Dado que el coeficiente de variación fue menor al 15% en el rango de concentraciones se demostró que el recobro también fue reproducible.

4.2.5 LINEALIDAD

4.2.5.1 LINEALIDAD DEL MÉTODO

En las figuras 7 y 8 se presentan los resultados respectivos de la linealidad del método para cuantificar clozapina y N desmetilclozapina en plasma.

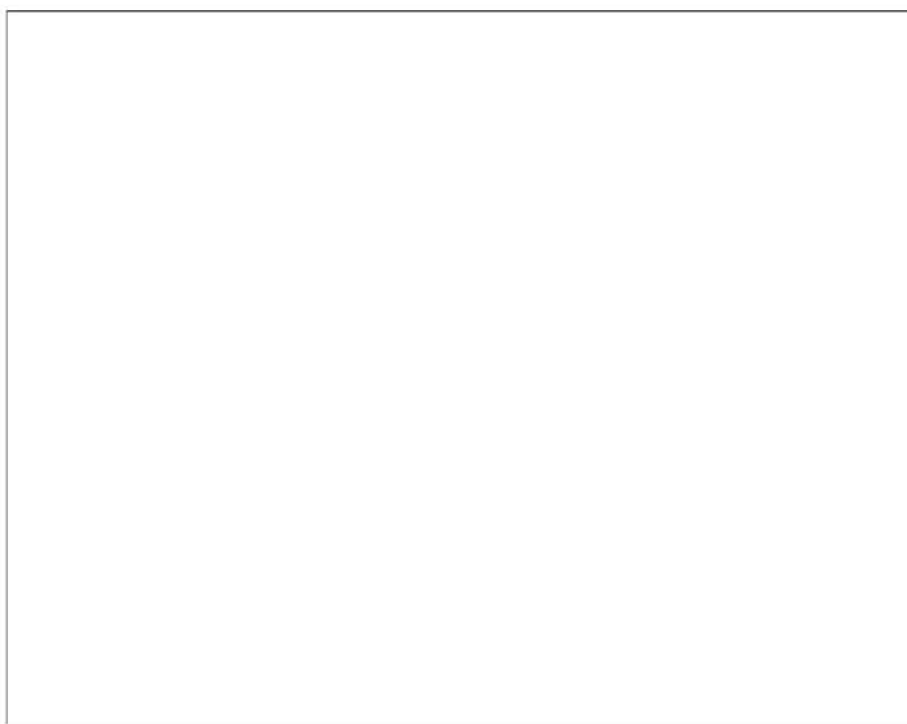


Figura 7. Linearidad del método analítico para cuantificar DMCZ.

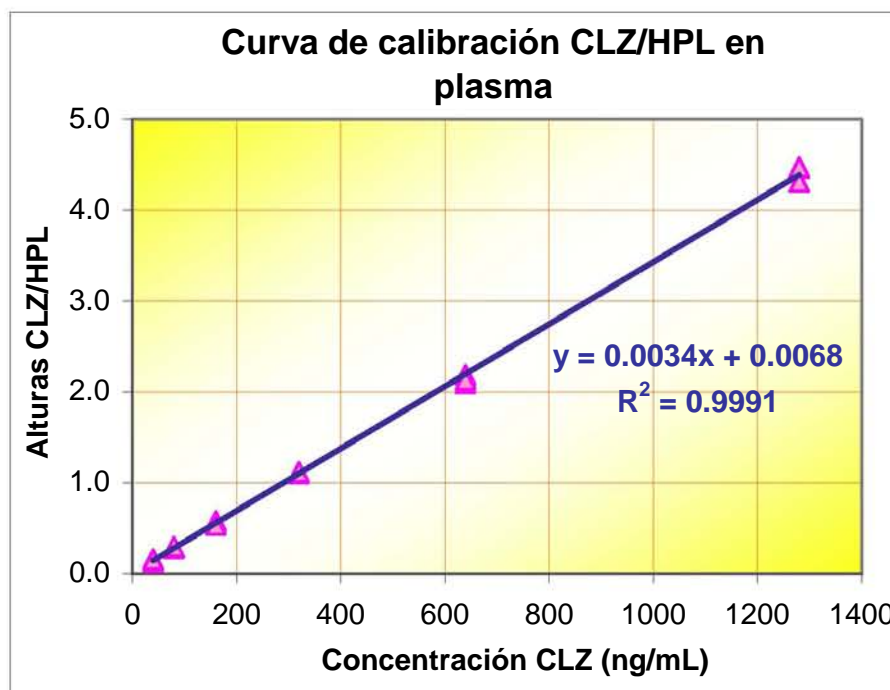


Figura 8. Linearidad del método analítico para cuantificar CLZ.



Los datos obtenidos de la regresión lineal se utilizaron para obtener la concentración recuperadas y el % desviación absoluta de cada una de las determinaciones, en la tabla 15 se muestran los resultados de N-desmetilclozapina y en la tabla 16 se muestran los resultados para la clozapina.

Tabla 15. Linealidad del método analítico para la cuantificación de N-desmetilclozapina.

Concentración nominal DMCZ (ng/mL)	Replica 1 Concentración DMCZ	Replica 2 Concentración DMCZ	Replica 3 Concentración DMCZ	Replica 1 % Desv Absoluta	Replica 2 % Desv Absoluta	Replica 3 % Desv Absoluta
40	44.1	41.4	44.2	10.2	3.6	10.4
80	83.5	88.8	88.2	4.4	11.0	10.3
160	166.3	164.5	145.5	3.9	2.8	9.1
320	314.1	307.6	324.7	1.8	3.9	1.5
640	572.1	642.5	636.7	10.6	0.4	0.5
1280	1304.4	1274.1	1257.9	1.9	0.5	1.7

Tabla 16. Linealidad del método analítico para la cuantificación de clozapina.

Concentración nominal CLZ (ng/mL)	Replica 1 Concentración CLZ	Replica 2 Concentración CLZ	Replica 3 Concentración CLZ	Replica 1 % Desv Absoluta	Replica 2 % Desv Absoluta	Replica 3 % Desv Absoluta
40	45.1	37.5	42.1	12.7	6.3	5.1
80	78.4	84.5	85.9	2.0	5.7	7.3
160	166.6	168.8	156.0	4.1	5.5	2.5
320	327.9	323.3	327.5	2.5	1.0	2.4
640	614.9	641.8	625.5	3.9	0.3	2.3
1280	1309.6	1314.1	1265.7	2.3	2.7	1.1

El método es lineal para ambos analitos debido a que todas las determinaciones fueron menores al 15% de desviación absoluta y en el límite de cuantificación (40 ng/mL de CLZ y DMCZ) fueron menores al 20%.

4.2.5.2 INFLUENCIA DE LA DILUCIÓN DE LA MUESTRA O DEL USO DE UN VOLUMEN MÁS PEQUEÑO

Los resultados en los que se se utiliza una muestra diluida (dilución 1:2) en comparación con una muestra preparada bajo condiciones normales, se muestran en las tablas 17 y 18 mientras que en la tabla 19 se muestra la influencia del uso de un volumen más pequeño de muestra.



Tabla 17. Respuesta cromatográfica de muestras preparadas en condiciones normales

Concentración nominal (ng/mL)	Concentración recuperada DMCZ	Concentración recuperada CLZ
960	865.1	792.7
960	982.2	919.4
960	918.9	901.3
Promedio	922.0	871.1
Desv std	58.61	68.51
%CV	6.4	7.9

Tabla 18. Influencia de la dilución en la respuesta cromatográfica

Concentración nominal (ng/mL)	N-desmetilclozapina		Clozapina	
	Concentración recuperada DMCZ	% Desviación absoluta DMCZ	Concentración recuperada CLZ	% Desviación absoluta CLZ
1920 (dil 1:2)	908.1	1.5	919.1	5.5
1920 (dil 1:2)	951.9	3.2	965.4	10.8
1920 (dil 1:2)	954.0	3.5	903.1	3.7
Promedio	938.0	1.7	929.2	6.7
Desv std	25.95		32.35	
%CV	2.8		3.5	

Tabla 19. Valores de desviación absoluta al emplear 0.5 mL de volumen de plasma

Concentración nominal (ng/mL)	N-desmetilclozapina		Clozapina	
	Concentración recuperada DMCZ	% Desviación absoluta DMCZ	Concentración recuperada CLZ	% Desviación absoluta CLZ
1920 (0,5mL)	940.3	2.0	958.6	10.0
1920 (0,5mL)	907.7	1.6	928.7	6.6
1920 (0,5mL)	979.4	6.2	956.0	9.7
Promedio	942.5	2.2	947.8	8.8
Desv std	35.87		16.58	
%CV	3.8		1.8	

Los resultados anteriores demuestran que el método es exacto y repetible, cuando se utiliza un volumen de muestra de 0.5 mL y también cuando se utiliza una muestra diluida 1:2. Es exacto debido a que el valor promedio de las muestras diluidas se encuentra dentro del 15% del valor promedio de la muestra sin diluir y es repetible debido a que el coeficiente de variación obtenido de las 3 réplicas de las muestras diluidas es menor al 15%.



Es de importancia conocer que se puede diluir la muestra y obtener resultados confiables debido a que en algunas ocasiones en la práctica se presentan casos en los que no se puede obtener un volumen de muestra plasmática de 1 mL pero si uno de 0.5 mL, o bien los niveles plasmáticos de clozapina o N-desmetilclozapina son mayores a el punto más alto de la curva de calibración y por ello se tiene que realizar una dilución 1:2 o utilizar un volumen de 0.5 mL de muestra para poder realizar el análisis de las muestras plasmáticas de estos pacientes.

4.2.6 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

En la tabla 20 se muestran los resultados del % desviación absoluta y el coeficiente de variación para la clozapina y N-desmetilclozapina en el límite de cuantificación (40 ng/mL).

Tabla 20. Precisión y repetibilidad en el límite de cuantificación (40 ng/mL).

Concentración nominal DMCZ ó CLZ(ng/mL)	N-desmetilclozapina		clozapina	
	Concentración recuperada DMCZ	% Desviación absoluta	Concentración recuperada CLZ	% Desviación absoluta
40	40.5	1.2	32.7	18.2
40	39.9	0.2	32.7	18.3
40	41.7	4.2	34.0	15.1
40	38.7	3.3	32.8	18.0
40	40.9	2.3	33.9	15.3
Promedio	40.3	0.9	33.2	17.0
Desv std	1.12		0.65	
% CV	2.8		2.0	

Se consideró como límite de cuantificación la concentración de 40 ng/mL para ambos analitos (clozapina y N-desmetilclozapina) debido a que a esta concentración el coeficiente de variación fue menor al 20% y el % desviación absoluta fue menor al 20%. A esta concentración no se observaron compuestos endógenos del plasma que interfirieran significativamente. Así mismo, la respuesta de los analitos fue cinco veces mayor a la respuesta del blanco de plasma (las alturas de los analitos fueron DMCZ= 10.7 y CLZ= 9.3)



4.2.7 ESTABILIDAD

Las pruebas de estabilidad se realizan para determinar las condiciones a las cuales la clozapina y la N-desmetilclozapina permanecen estables, durante su almacenamiento o proceso.

4.2.7.1 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALÍTICA

4.2.7.1.1 CICLOS DE CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN

En la tabla 21 se muestran los resultados de estabilidad para la N-desmetilclozapina y en la tabla 22 se encuentran los correspondientes a la clozapina, cuando las muestras plasmáticas fueron sometidas a ciclos de congelación-descongelación.

El % desviación absoluta se calculó tomando como referencia al valor promedio de la concentración recuperada de la serie que se mantuvo en congelación.

Tabla 21. Estabilidad de DMCZ a ciclos de congelación-descongelación

Condiciones almacenamiento		Congelación	3 Ciclos cong-descong	%Desv Abs DMCZ
Concentración nominal DMCZ (ng/mL)	Réplica	Concentración recuperada DMCZ (ng/mL)	Concentración recuperada DMCZ (ng/mL)	
120	1	117.8	122.2	3.0
	2	129.1	127.2	1.0
	3	130.8	118.8	5.6
Promedio		125.9	122.7	2.5
960	1	1070.3	987.7	4.4
	2	1074.7	886.4	14.2
	3	955.2	972.6	5.9
Promedio		1033.4	948.9	8.2

**Tabla 22.** Estabilidad de CLZ a ciclos de congelación-descongelación

Condiciones almacenamiento		Congelación	3 Ciclos cong-descong	%Desv Abs CLZ
Concentración nominal CLZ (ng/mL)	Réplica	Concentración Recuperada CLZ (ng/mL)	Concentración recuperada CLZ (ng/mL)	
120	1	112.2	125.6	10.7
	2	110.9	126.3	11.3
	3	117.5	113.2	0.3
Promedio		113.5	121.7	7.2
960	1	979.4	958.9	1.8
	2	1009.0	894.6	8.4
	3	941.4	960.4	1.7
Promedio		976.6	938.0	4.0

De acuerdo a los resultados obtenidos, la clozapina y la N-desmetilclozapina fueron estables al someter las muestras plasmáticas a tres ciclos de congelación-descongelación, debido a que el valor promedio se encontró dentro del 15% del valor promedio de las muestras que se mantuvieron bajo congelación.

4.2.7.1.2 ESTABILIDAD A CORTO PLAZO (TEMPERATURA AMBIENTE)

En la tabla 23 se presentan los resultados de la estabilidad a corto plazo para la N-desmetilclozapina, y en la tabla 24 se muestran los correspondientes a la clozapina.

Tabla 23. Estabilidad de DMCZ en plasma a corto plazo

Tiempo bajo temperatura ambiente		0 horas	24 horas	%Desv Abs DMCZ
Concentración nominal DMCZ (ng/mL)	Réplica	Concentración recuperada DMCZ (ng/mL)	Concentración recuperada DMCZ (ng/mL)	
120	1	106.6	111.3	0.2
	2	122.7	113.3	1.6
	3	105.2	117.5	5.4
Promedio		111.5	114.0	2.3
960	1	936.1	934.2	6.5
	2	836.9	960.1	9.4
	3	858.8	987.5	12.6
Promedio		877.3	960.6	9.5

**Tabla 24.** Estabilidad de CLZ en plasma a corto plazo

Tiempo bajo temperatura ambiente		0 horas	24 horas	%Desv Abs CLZ
Concentración nominal CLZ (ng/mL)	Réplica	Concentración recuperada CLZ (ng/mL)	Concentración recuperada CLZ(ng/mL)	
120	1	105.1	104.3	2.4
	2	113.9	108.1	1.2
	3	101.6	113.5	6.2
Promedio		106.9	108.7	1.7
960	1	926.6	916.6	2.7
	2	874.9	951.3	6.6
	3	875.1	947.1	6.2
Promedio		892.2	938.3	5.2

Basándonos en los resultados anteriores, se encontró que, dado que los valores de variación no fueron mayores al 15 % del valor promedio de las muestras que se procesaron inmediatamente (0 horas), la clozapina y la N-desmetilclozapina son estables a temperatura ambiente durante 24 horas en plasma.

4.2.7.1.3 ESTABILIDAD A LARGO PLAZO (TEMPERATURA DE CONGELACIÓN)

Los resultados de estabilidad a largo plazo se muestran en la tabla 25 para la N-desmetilclozapina y en la tabla 26 se muestran para la clozapina.

Tabla 25. Estabilidad de DMCZ en plasma a -30°C.

Tiempo en congelación		0 días	60 días	%Desv Abs DMCZ
Concentración nominal DMCZ (ng/mL)	Réplica	Concentración recuperada DMCZ(ng/mL)	Concentración recuperada DMCZ (ng/mL)	
120	1	106.5	91.2	10.4
	2	101.6	90.5	11.1
	3	97.4	98.0	3.7
Promedio		101.8	93.2	8.4
960	1	960.0	909.7	4.9
	2	980.0	845.1	11.7
	3	930.5	903.5	5.6
Promedio		956.8	886.1	7.4



Tabla 26. Estabilidad de CLZ en plasma a -30°C.

Tiempo en congelación		0 días	60 días	%Desv Abs CLZ
Concentración nominal CLZ (ng/mL)	Réplica	Concentración recuperada CLZ (ng/mL)	Concentración recuperada CLZ (ng/mL)	
120	1	106.3	102.0	0.8
	2	100.6	99.0	2.1
	3	96.6	105.6	4.4
Promedio		101.2	102.2	1.0
960	1	934.4	955.5	1.4
	2	944.3	892.9	5.3
	3	948.7	1002.4	6.4
Promedio		942.5	950.2	0.8

De los resultados de estabilidad se encontró que el valor promedio de la concentración recuperada estaba dentro del 15% del valor promedio de las muestras procesadas inmediatamente, lo cual demuestra que las muestras plasmáticas conteniendo clozapina y N-desmetilclozapina son estables a -30°C durante 60 días.

4.2.7.1.4 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE LUZ

Los resultados de la estabilidad de la muestra bajo diferentes condiciones de luz se reportan en la tabla 27 para la N-desmetilclozapina, y en la tabla 28 para la clozapina.

**Tabla 27.** Estabilidad de DMCZ bajo diferentes condiciones de luz

Condiciones en las que se encontraba la muestra		oscuridad	luz solar	luz artificial	luz solar	luz artificial
Concentración nominal DMCZ (ng/mL)	Réplica	Concentración recuperada DMCZ (ng/mL)	Concentración recuperada DMCZ (ng/mL)	Concentración recuperada DMCZ (ng/mL)	%Desv Abs DMCZ	%Desv Abs DMCZ
120	1	114.6	96.6	102.3	15.1	10.1
	2	115.5	107.0	103.0	5.9	9.4
	3	111.1	108.2	101.3	4.8	10.9
Promedio		113.7	103.9	102.2	8.6	10.1
960	1	874.2	849.3	885.0	7.9	4.1
	2	901.7	902.8	839.1	2.1	9.0
	3	991.3	923.9	911.2	0.2	1.2
Promedio		922.4	892.0	878.4	3.3	4.8

Tabla 28. Estabilidad de CLZ bajo diferentes condiciones de luz

Condiciones en las que se encontraba la muestra		oscuridad	luz solar	luz artificial	luz solar	luz artificial
Concentración nominal CLZ (ng/mL)	Réplica	Concentración recuperada CLZ (ng/mL)	Concentración recuperada CLZ (ng/mL)	Concentración recuperada CLZ (ng/mL)	%Desv Abs CLZ	%Desv Abs CLZ
120	1	114.6	117.1	107.0	3.9	5.1
	2	111.6	111.3	108.0	1.3	4.2
	3	111.9	115.5	114.1	2.4	1.2
Promedio		112.7	114.6	109.7	1.7	2.7
960	1	885.7	903.8	913.8	3.1	2.0
	2	945.9	931.0	833.1	0.2	10.7
	3	966.7	957.8	889.6	2.7	4.6
Promedio		932.7	930.9	878.9	0.2	5.8

Se evaluó la exposición a diferentes condiciones de luz debido a que en las etiquetas de los estándares de clozapina y N-desmetilclozapina se indica que deben almacenar en condiciones de oscuridad, pero según lo reportado por otros autores que han desarrollado métodos analíticos, no se ha evaluado el efecto de la luz en la estabilidad de los analitos, ni se indica si se debe trabajar en condiciones de oscuridad. Basándonos en los resultados descritos anteriormente, podemos asegurar que las muestras plasmáticas pueden permanecer durante 6 horas bajo condiciones de luz artificial o solar sin que se degrade la clozapina o la N-desmetilclozapina.



4.2.7.2 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA PROCESADA

Los resultados de la estabilidad de la muestra procesada para la N-desmetilclozapina se encuentran en la tabla 29, y para la clozapina se reportan en la tabla 30.

Tabla 29. Estabilidad de DMCZ en la muestra procesada

Tiempo en que permanecieron en el automuestreador		0 horas	24 horas	%Desv Abs DMCZ
Concentración nominal DMCZ (ng/mL)	Réplica	Concentración recuperada DMCZ(ng/mL)	Concentración recuperada DMCZ (ng/mL)	
120	1	106.6	117.1	5.0
	2	122.7	110.0	1.4
	3	105.2	113.3	1.6
Promedio		111.5	113.5	1.8
960	1	936.1	984.0	12.2
	2	836.9	1005.9	14.7
	3	858.8	944.0	7.6
Promedio		877.3	978.0	11.5

Tabla 30. Estabilidad de CLZ en la muestra procesada

Tiempo en que permanecieron en el automuestreador		0 horas	24 horas	%Desv Abs CLZ
Concentración nominal CLZ (ng/mL)	Réplica	Concentración recuperada CLZ (ng/mL)	Concentración recuperada CLZ (ng/mL)	
120	1	105.1	108.0	1.0
	2	113.9	103.4	3.3
	3	101.6	105.3	1.5
Promedio		106.9	105.6	1.2
960	1	926.6	901.7	1.1
	2	874.9	916.8	2.8
	3	875.1	892.6	0.1
Promedio		892.2	903.7	1.3

Mediante la prueba de estabilidad de la muestra procesada se encontró el valor promedio de la concentración recuperada se encontró dentro del 15% del valor promedio de las muestras que se analizaron a las 0 horas, lo que demuestra que la CLZ y DMCZ en solución de reconstitución en viales es estable durante un período de 24 horas en el automuestreador a temperatura ambiente.



4.2.7.3 ESTABILIDAD DE LA SOLUCIÓN ESTÁNDAR EN REFRIGERACIÓN

Los resultados de la estabilidad de las soluciones estándar (100 µg/mL) para la N-desmetilclozapina, para la clozapina y el haloperidol se muestran en las tablas 31, 32 y 33.

Tabla 31. Estabilidad de las soluciones estándar de N-desmetilclozapina.

Tiempo en refrigeración	0 días	89 días (3 meses)	280 días (9 meses)	89 días (3 meses)	280 días (9 meses)
Concentración nominal DMCZ (ng/mL)	Alturas DMCZ/HPL	Alturas DMCZ/HPL	Alturas DMCZ/HPL	%Desv Abs DMCZ	%Desv Abs DMCZ
480	2.06	1.92	2.21	10.6	2.9
480	2.02	2.15	2.00	0.1	6.9
480	2.15	2.19	2.11	1.8	2.0
480	2.19	1.96	2.18	8.7	1.7
480	2.32	2.25	2.05	4.5	4.7
Promedio	2.15	2.09	2.11	2.6	1.8

Tabla 32. Estabilidad de las soluciones estándar de clozapina.

Tiempo en refrigeración	0 días	89 días (3 meses)	280 días (9 meses)	89 días (3 meses)	280 días (9 meses)
Concentración nominal CLZ (ng/mL)	Alturas CLZ/HPL	Alturas CLZ/HPL	Alturas CLZ/HPL	%Desv Abs CLZ	%Desv Abs CLZ
480	2.06	1.98	2.15	5.1	3.2
480	1.98	2.04	2.08	2.1	0.2
480	2.08	2.00	2.15	3.9	3.3
480	2.09	1.97	2.14	5.4	2.6
480	2.21	2.06	2.13	1.3	2.0
Promedio	2.09	2.01	2.13	3.5	2.2



Tabla 33. Estabilidad de las soluciones estándar de haloperidol.

Tiempo en refrigeración	0 días	265 días (9 meses)	265 días (9 meses)
Replica	Altura HPL	Altura HPL	%Desv abs
1	58.8	59.1	4.3
2	61.5	59.5	3.7
3	62.4	60.6	1.9
4	63.3	63.3	2.5
5	62.8	64.5	4.4
Promedio	61.8	61.4	0.6

De acuerdo a los resultados anteriormente expuestos, las soluciones estándares de clozapina y N-desmetilclozapina (100 µg/mL en metanol) que fueron almacenadas en refrigeración y protegidas de la luz durante 9 meses permanecieron estables, ya que el valor promedio de las relaciones de alturas de estas muestras se encontró dentro del 15% del valor promedio de la relación de alturas de las muestras que se procesaron inmediatamente (0 días). De igual modo, la solución estándar de haloperidol (100 µg/mL en metanol) que fue almacenada en refrigeración y protegida de la luz durante 9 meses fue estable, ya que el % desviación absoluta del valor promedio de las alturas fue menor al 15%,

Debido a que los fármacos que se emplean en este método son controlados y de costo elevado, resultaría muy difícil y costoso preparar una solución estándar de cada uno de los fármacos para cada día de análisis, por ello se comprobó experimentalmente que las soluciones estándar en metanol de los analitos y del estándar interno pueden ser utilizadas durante 9 meses, pero se deben almacenar en refrigeración y protegidas de la luz.

4.3 APLICACIÓN DEL MÉTODO A LA CLÍNICA

En la tabla 34 se muestran los niveles plasmáticos de CLZ y DMCZ obtenidos en las muestras analizadas. Los niveles de clozapina y de N-desmetilclozapina presentaron una gran variabilidad interindividual, con valores de 42.6 – 784.0 ng/mL (media 338.6 ng/mL) para clozapina y no cuantificables – 508.5 ng/mL (media 180.0 ng/mL) para la N-desmetilclozapina. En todos los pacientes los niveles de clozapina fueron más altos que los del metabolito.



Tabla 34. Niveles plasmáticos de clozapina (CLZ) y N-desmetilclozapina (DMCZ) en pacientes bajo tratamiento con este fármaco

# Paciente	Dosis/peso (mg/día/Kg)	Niveles plasmáticos DMCZ (ng/mL)	Niveles plasmáticos CLZ (ng/mL)
1	1.4	NC	173.6
2	4.7	60.9	107.3
3	4.5	172.2	549.0
4	5.4	309.6	453.1
5	2.4	40.2	80.5
6	3.5	73.3	161.3
7	2.3	83.7	150.7
8	6.5	428.9	665.0
9	3.4	60.7	200.8
10	1.1	NC	42.6
11	4.4	323.3	550.4
12	3.4	86.5	159.2
13	1.6	77.0	135.7
14	1.4	102.7	284.2
15	2.9	257.2	704.8
16	1.7	89.6	215.4
17	2.8	280.5	784.0
18	3.6	52.4	85.3
19	4.8	508.5	650.3
20	0.4	370.8	620.5
21	0.3	NC	76.3
22	2.5	124.5	356.0
23	5.6	322.3	733.3
24	6.7	80.7	248.7
25	1.6	109.1	164.8
26	3.8	217.5	369.9
27	3.1	179.4	612.2
28	3.0	87.7	144.7

NOTA: NC = no cuantificable



CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

Se desarrolló un método analítico para cuantificar clozapina y N desmetilclozapina, empleando una técnica de extracción en fase sólida, la cual es sencilla y rápida.

El método analítico desarrollado para la cuantificación de clozapina y N-desmetilclozapina en plasma fue validado de acuerdo a la guía de validación de métodos bioanalíticos de la FDA, demostró ser:

- ✓ Lineal, preciso y exacto en el rango de concentraciones de 40 – 1280 ng/mL para la clozapina y para la N-desmetilclozapina.
- ✓ El % recobro para la CLZ, DMCZ y HPL fue mayor al 85 %.
- ✓ Selectivo, no se presentaron interferencias del plasma, ni de otros fármacos que pueden tomarse concomitantemente con la clozapina (cafeína, carbamazepina, oxacepam, imipramina, amitriptilina, fluoxetina, clomipramina y diazepam).
- ✓ La muestra analítica fue estable a tres ciclos de congelación-descongelación, a temperatura ambiente por 24 horas (estabilidad a corto plazo) y en congelación (-30°C) durante 60 días (estabilidad a largo plazo).
- ✓ Exacto y repetible cuando se diluye la muestra, particularmente cuando se utiliza un volumen de muestra de 0.5 mL y cuando se utiliza una muestra diluida 1:2.
- ✓ Las soluciones estándar de CLZ, DMCZ y HPL fueron estables cuando se mantuvieron protegidas de la luz y en refrigeración durante 9 meses.
- ✓ Las muestras procesadas fueron estables durante un período de 24 horas en el automuestreador

El método desarrollado fue adecuado para el análisis de muestras plasmáticas de pacientes bajo tratamiento con clozapina



5.2 RECOMENDACIONES

Aún cuando hay nuevos antipsicóticos atípicos, no se ha encontrado alguno que ofrezca una mayor eficacia que la clozapina para el tratamiento de la esquizofrenia resistente. Por ello sería de gran utilidad realizar estudios en la población mexicana con un número mayor de pacientes con el fin de buscar si hay una relación entre los niveles plasmáticos de clozapina y N-desmetilclozapina con la respuesta terapéutica y poder establecer el margen terapéutico de la población mexicana en la fase aguda y en la fase estable de la esquizofrenia, ya que en ésta última, la dosis de clozapina es disminuida para evitar los efectos adversos a largo plazo.

Además se podría comprobar en estudios in vivo si hay una relación directa entre los niveles de N-desmetilclozapina y la agranulocitosis inducida por el tratamiento con clozapina.



CAPÍTULO VI BIBLIOGRAFÍA

- 1) <http://www.fda.gov> (Food and Drug Administration). Palabra clave: clozapine
- 2) Guía clínica para el tratamiento de la esquizofrenia. Editorial Ars Medica. España, 2001.
- 3) Kane J, Honigfeld G, Singer J, et al. Clozapine for the treatment-resistant schizophrenic. A double-blind comparison with chlorpromazine. Arch Gen Psychiatric. (1988) 45:789-796
- 4) <http://www.salud.gob.mx> (Secretaría de Salud). Palabra clave: Esquizofrenia
- 5) Gennaro Alfonso R. Remington Farmacia. Tomo I y II. 20ª edición. Editorial Panamericana. Argentina, 2003.
- 6) American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV-TR). Fourth Edition. Washington, DC, American Psychiatric Association, 1994.
- 7) Idäppään-Heikkilä J, et. al. Agranulocytosis during treatment with clozapine. European Journal of Clinical Pharmacology (1977)11:193-198
- 8) Csernansky J.G. Antipsychotics. Editorial Springer Germany, 1996.
- 9) García Ribera Carles. Nuevos antipsicóticos atípicos. Editorial Masson. España, 1996.
- 10) Alvir JM, Lieberman JA, Safferman AZ, Schwimmer JL, Schaaf JA. Clozapine-induced agranulocytosis. Incidence and risk factors in the United States. N Engl J Med. 1993 15;329(3):162-7.
- 11) <http://www.farmacopea.org.mx/legisla/legal4.asp> (Lista de los psicotrópicos, página de la FEUM)
- 12) The Merck Index. 13th edition. Merck & Co, INC. USA, 2001.
- 13) Diccionario de especialidades Farmacéuticas. Edición 51. Thompson PLM. México, 2005.
- 14) Prior Trevor, et al. Drug metabolism and atypical antipsychotics. European Neuro-Psychopharmacology. (1999) 9 : 301-309.
- 15) Gerlach J, Peacock L. Motor and mental side effects of clozapine. J Clin Psychiatry. (1994) Sep;55 Suppl B:107-9.



- 16) Tamminga CA, Thaker GK, Moran M, Kakigi T, Gao XM. Clozapine in tardive dyskinesia: observations from human and animal model studies. J Clin Psychiatry. 1994 Sep;55 Suppl B:102-6.
- 17) McElroy SL, et al Clozapine in the treatment of psychotic mood disorders, schizoaffective disorder, and schizophrenia. J Clin Psychiatry. (1991)52(10):411-414.
- 18) Armitage Roseanne, Cole Darwynn , Suppes Trisha, Ozcan Mehmet E. Effects of clozapine on sleep in bipolar and schizoaffective disorders. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry. (2004) Vol 28, Issue 7:1065-1070
- 19) Simpson GM, Cooper TA. Clozapine plasma levels and convulsions. Am J Psychiatry. 1978;135(1):99-100.
- 20) Meltzer HY. A prospective study of clozapine in treatment-resistant schizophrenic patients. I. Preliminary report. Psychopharmacology (Berl). 1989;99 Suppl:S68-72.
- 21) Li Zhu, Huang Mei, Ichikawa Junji, Dai Jin and Meltzer Herbert Y. N-Desmethylclozapine, a Major Metabolite of Clozapine, Increases Cortical Acetylcholine and Dopamine Release. In Vivo Via Stimulation of M1 Muscarinic Receptors. Neuropsychopharmacology (2005) 30(11):1986-95.
- 22) Schaber G, et al. Pharmacokinetics of clozapine and its metabolites in psychiatric patients: plasma protein binding and renal clearance. Br J Clin Pharmacol (1998) 46: 453-459.
- 23) Guitton C., Abbar M., Kinowski J.M., Chabrand P., Bressolle F. Multiple-dose pharmacokinetics of clozapine in patients with chronic schizophrenia. J Clin Psychopharmacol (1998) 18 (6): 470-476.
- 24) Gerson S, Arce C y Meltzer H. N-desmethylclozapine: a clozapine metabolite that suppresses haemopoiesis. Br Journal of Haematology. (1994) 86: 555-561.
- 25) Sperner-Unterweger B, Czeipek I, Gaggl S, Geissler D, Spiel G, Fleischhacker WW. Treatment of severe clozapine-induced neutropenia with granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF). Remission despite continuous treatment with clozapine. Br J Psychiatry. 2001 Aug;179 :180.
- 26) Ratna S., Sastry P.S.R.K. N-desmethyl clozapine as purging agent of leukemic cell in vitro. Medical Hypotheses (2005) 64: 568-571
- 27) Guitton C, Kinowski JM, Aznar R, Bressolle F. Determination of clozapine and its major metabolites in human plasma and red blood cells by high-performance liquid



- chromatography with ultraviolet absorbance detection. Journal of Chromatography B. (1997) 690:211-22.
- 28) Guitton C, Kinowski JM, Abbar M, Chabrand P, Bressolle F. Clozapine and metabolite concentrations during treatment of patients with chronic schizophrenia. J Clin Pharmacol. (1999) 39:721-728.
- 29) Shen Y. L., Wu H. L., Ko W. K., Wu S. M. Simultaneous determination of clozapine, clozapine N-oxide, N-desmethylclozapine, risperidone, and 9-hydroxyrisperidone in plasma by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. Analytica Chimica Acta, (2002) 460: 201-208
- 30) Fabrazzo M, Esposito G, Fusco R, Maj M. Effect of treatment duration on plasma levels of clozapine and N-desmethylclozapine in men and women. Psychopharmacology (1996)124:197-200.
- 31) Fang Ma and Chyan E. Lau. Determination of clozapine and its metabolite, N-desmethylclozapine, in serum microsamples by high-performance liquid chromatography and its application to pharmacokinetics in rats. Journal of Chromatography B, (1998) 712: 193-198
- 32) Edno L., Combourieu I., Cazenave M. and Tignol J. Assay for quantitation of clozapine and its metabolite N-desmethylclozapine in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis (1997) 16: 311-318
- 33) Aymard Nicole, et al. Pharmacoclinical strategy in neuroleptic resistant schizophrenic patients treated by clozapine: Clinical evolution, concentration of plasma and red blood cell clozapine and desmethylclozapine, whole blood serotonin and tryptophan. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry (1999) 23: 25-41
- 34) Akerman Kari K. Analysis of clozapine and norclozapine by high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography B (1997) 696: 253-259
- 35) Gupta RN. Column liquid chromatographic determination of clozapine and N-desmethylclozapine in human serum using solid-phase extraction. Journal of Chromatography (1995) 673:311-315.
- 36) Palego Lionella, et al. Simultaneous analysis of clozapine, clomipramine and their metabolites by reversed-phase liquid chromatography. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry (2001) 25 : 519-533



- 37) Weigmann Harald and Hiemke Christoph. Determination of clozapine and its major metabolites in human serum using automated solid-phase extraction and subsequent isocratic high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. Journal of Chromatography: Biomedical Applications (1992) 583: 209-216
- 38) Secretaría de Salud. NOM-177-SSA1-1998. Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas. (<http://www.economia.gob.mx/work/normas/noms/1999/177ssa1.pdf>)
- 39) FDA Guidance. Bioanalytical Method Validation. May 2001. (<http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf>)