

Desarrollo de un Método Analítico Aplicable al Control de la Calidad de Tabletas de Clonazepam

Caridad M. García PEÑA *, Alfredo Fernández SERRET,
María R. GARCIGA & Vivian Martínez ESPINOSA

*Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM),
Ave. 26 N° 1605 e/ Boyeros y Puentes Grandes. Plaza de la Revolución, La Habana, Cuba.*

RESUMEN. Se desarrolló y validó un método analítico alternativo para el control de la calidad de las tabletas de clonazepam 2 mg sin lactosa por espectrofotometría UV, el cual no es aplicable a los estudios de estabilidad, ya que este método resulta más rápido, más sencillo y económico. Además se validó el método analítico reportado para el estudio de estabilidad por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), comparándose ambos métodos estadísticamente. Ambos métodos resultaron específicos, lineales, precisos y exactos en el rango de concentraciones estudiadas.

SUMMARY. "Development of an analytic method applied in the quality control of Clonazepam tablets". An alternative analytic method for the quality control of clonazepam 2 mg tablets without lactose for ultraviolet spectrophotometry was developed and validated. The method is not applicable to stability studies, for it is quicker, simpler and more economic. The analytic method reported for the study of stability by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was also validated and statistically compared with the developed method. Both methods were specific, linear, precise, and exact in the range of the studied concentrations.

INTRODUCCIÓN

El clonazepam es una benzodiazepina y actúa en general como depresor del sistema nervioso central (SNC), produciendo todos los niveles de depresión del mismo, desde una leve sedación hasta hipnosis o coma dependiendo de la dosis. Está indicado para el tratamiento solo o, como coadyuvante en la mayoría de las formas clínicas de la epilepsia, particularmente las ausencias típicas y atípicas. Es útil en el tratamiento de la epilepsia infantil, crisis mioclónicas y de ausencia. En las encefalopatías epilépticas crónicas del niño: llámese síndrome de West o síndrome de Lennox-Gastaut, así como en la epilepsia crónica parcial; las crisis focales y las crisis complejas del adulto. Se indica también para el tratamiento del desorden o trastorno de pánico ¹.

Existen reportes de métodos analíticos por espectrofotometría ultravioleta para formulaciones de clonazepam inyectable debido a que es un producto que absorbe intensamente en la re-

gión del ultravioleta ². Para las tabletas de clonazepam aparecen reportes de métodos analíticos por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) ³.

La espectrofotometría ultravioleta es un poderoso instrumento en una variedad de problemas analíticos, aunque en muchas oportunidades tiene el inconveniente de la falta de especificidad, debido a la interferencia que se encuentra en los productos de degradación, los cuales en ocasiones pueden presentar un espectro idéntico al componente sin degradar y en otras las concentraciones a determinar es muy pequeña y está por debajo del límite de sensibilidad del método o dentro de su error experimental ³.

La CLAR ha dado la posibilidad al analista de usar esta herramienta para solucionar los inconvenientes de los métodos espectrofotométricos en los estudios de estabilidad, pues además de presentar una alta sensibilidad y exactitud, es en esencia un método separativo, lo que permite medir con gran selectividad el compuesto dese-

PALABRAS CLAVE: Clonazepam, Cromatografía Líquida de Alta Resolución, Espectrofotometría ultravioleta.
KEY WORDS: Clonazepam, Liquid Chromatography of High Resolution, ultraviolet spectrophotometry.

* Autor a quien debe enviarse la correspondencia: E-mail: cinfa@infomed.sld.cu

ado, siempre y cuando se encuentre un sistema cromatográfico que asegure una adecuada separación³.

La validación es el proceso establecido para la obtención de pruebas documentadas de que el método es lo suficientemente fiable para producir el resultado⁴⁻⁶. Los parámetros analíticos que pueden ser considerados en la validación de un método analítico, según se expresa en la United States Pharmacopoeia (USP 26, USP 27), son exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, rango, tolerancia y robustez.

En el presente trabajo nos trazamos como objetivo desarrollar un método analítico alternativo para el control de la calidad que fuera rápido, sencillo y barato. Además demostrar si existen diferencias significativas entre el método desarrollado y el reportado en la Farmacopea de los Estados Unidos, USP 26, y validar ambos métodos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras utilizadas para el desarrollo de este trabajo fueron identificadas como lotes 3001, 3002, 3003; fabricados en la UCTB Tecnologías Básicas.

Validación del método analítico para la cuantificación por CLAE

En el ensayo se empleó un cromatógrafo (Knauer) con detector UV/VIS (Knauer) ajustado a 254 nm, un dosificador de 50 µL e integrador (Shimadzu CR 8 A). La separación se realizó isocráticamente sobre una columna Lichropher 100, RP- 8 (5 µm). La fase móvil utilizada consistió en una mezcla desgasificada de Solución de Fosfato de amonio anhidro dibásico a 6,6 mg/mL y llevar a pH 8,0 con ácido fosfórico 1 N ó hidróxido de sodio 1 N; metanol: tetrahidrofurano (60:52:13) con una velocidad de flujo de 1,0 mL/min. Estas condiciones cromatográficas aparecen reportadas en la USP 25 para la valoración de las tabletas de clonazepam.

Con el objetivo de evaluar la especificidad del método se analizó la sustancia de referencia química (de calidad USP, con un 100% de pureza), el placebo y una muestra sometida a condiciones drásticas de pH y oxidación: hidrólisis ácida (HCl 3 N), hidrólisis básica (NaOH 3 N) y a la luz durante 3 días.

Para el estudio de la linealidad de la respuesta del detector se preparó una curva de calibración, utilizando 5 niveles de concentración, con soluciones patrón de clonazepam en un

rango de concentraciones entre 8 a 24 µg/mL, que representan el 60, 80, 100, 120 y 140% de la concentración teórica del principio activo en la solución.

Se evaluó la precisión del método. La repetibilidad se estudió sobre la base de 8 determinaciones y se efectuaron valoraciones por dos analistas en dos días diferentes para comprobar la precisión intermedia del método. En el estudio de la exactitud se empleó el método de recuperación, preparando muestras con diferentes niveles de Clonazepam que representaban el 80, 100 y 120% de la concentración teórica del principio activo en la solución, según la formulación propuesta. Con el objetivo de verificar la relación lineal de la respuesta analítica con respecto a los diferentes niveles de concentración utilizados se realizó el estudio de linealidad a través de los coeficientes de variación de los factores de respuesta $C.V_f$, los cuales deben de ser menor que el 5%. Además se realiza la prueba de proporcionalidad utilizando el estadígrafo t-Student, con el objetivo de demostrar la proporcionalidad de la señal obtenida. También se determinó la influencia del factor concentración en la variabilidad de la respuesta obtenida, a través de la prueba de Cochran ($G_{calculada}$ debe ser menor que $G_{tabulada}$)⁴⁻⁶.

Validación del método analítico para la cuantificación por Espectrofotometría ultravioleta

En el desarrollo del método analítico por Espectrofotometría Ultravioleta se utilizó un Espectrofotómetro Spectronic® Génesis™ 2PC. Para la cuantificación se disolvió una cantidad precisa de la sustancia de referencia en alcohol isopropílico, de modo que se obtuviera una solución con una concentración final de 20 µg/mL. Las muestras fueron preparadas pesando el equivalente a 10 mg de principio activo, trasvasándolo a un matraz aforado de 100 mL, añadiéndole 50 mL de alcohol isopropílico, sonificando 10 min y luego se llevó a volumen con el mismo solvente. En un paso posterior se tomó una alícuota de 5 mL de la solución preparada anteriormente, trasvasándola a un matraz aforado de 25 mL y llevando a volumen con alcohol isopropílico. De esta manera la solución de referencia química y la muestra tuvieron una concentración de 20 µg/mL, que representa el 100%.

Con el objetivo de evaluar la especificidad del método se prepararon muestras de sustancia de referencia química de clonazepam, placebo,

muestra de clonazepam. Las mismas fueron sometidas a condiciones drásticas de pH y luz, realizándose el escaneo de las soluciones correspondientes, entre 200 y 500 nm.

En el estudio de la linealidad de la respuesta del detector se preparó una curva de calibración, utilizándose para el mismo 5 niveles de concentración, con solución patrón de clonazepam en un rango de concentraciones de 12 hasta 28 ug/ml que representan el 60, 80, 100, 120 y 140% de la concentración teórica del principio activo en la solución. La longitud de onda empleada para el estudio fue 310 nm.

Se evaluó la precisión del método. La repetibilidad se estudió sobre la base de 6 determinaciones, efectuándose valoraciones por dos analistas en dos días diferentes para comprobar la precisión intermedia del método, utilizando para el estudio los estadígrafos F-Fischer y t-Student, con el objetivo de determinar la existencia de diferencias significativas entre las precisiones alcanzadas por ambos analistas y entre las medias obtenidas, respectivamente. Primeramente, se realizó la prueba de Fischer verificándose la homogeneidad de las varianzas alcanzadas por diferentes analistas, debiéndose obtener un valor calculado menor que el tabulado. En el caso del estadígrafo t-Student se debe obtener también un valor calculado menor que el tabulado.

En el estudio de la exactitud se empleó el método de recuperación, preparando muestras con diferentes niveles, que representan el 80,

100 y 120% de la concentración teórica del principio activo en la solución.

Comparación estadística

Con el objetivo de realizar una comparación estadística entre los resultados por CLAR y los obtenidos por el método analítico alternativo desarrollado por espectrofotometría UV se realizó un estudio del t-Student para determinar si existían diferencias significativas entre los dos métodos.

RESULTADOS

Validación del método analítico para la cuantificación por CLAE

La Figura 1 muestra los resultados obtenidos en el estudio de especificidad del método. Como se observa en el cromatograma correspondiente a la muestra placebo (A) no se obtuvo ninguna señal en la zona de interés, al ser comparado con la señal obtenida para la solución estándar de referencia (B) y de la muestra de clonazepam tabletas (C), lo cual indica que los excipientes o sustancias auxiliares de la solución no interfieren en la determinación del principio activo. En cuanto a las muestras sometidas a condiciones drásticas de: hidrólisis básica, hidrólisis ácida y a la luz se observan en los cromatogramas (D, E, F) la aparición de picos secundarios, atribuible a un posible producto de degradación, el cual no interfiere en la determinación del principio activo. Simultáneamente se realizó un escaneo al pico correspondiente al

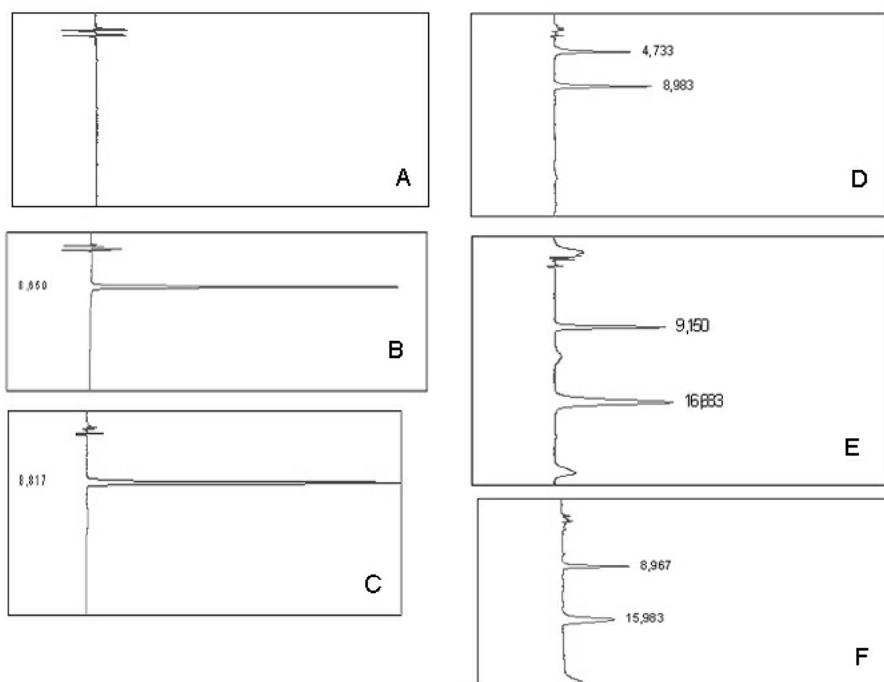


Figura 1. Resultados del estudio de especificidad del método.

A- Cromatograma de la muestra placebo.

B- Cromatograma de la sustancia de referencia química.

C- Cromatograma de la muestra de Clonazepam en la tableta.

D- Cromatograma de la muestra sometida a hidrólisis básica.

E- Cromatograma de la muestra sometida a hidrólisis ácida.

F - Cromatograma de la muestra sometida a la luz.

Parámetros	CLAE	UV	Límites
Linealidad del sistema	$y = 1,2376 X + 0,68092$ $r = 0,99696$	$Y = 0,03885 + 0,0052 x$ $r = 0,9998$	$y = a x + b$ $r \geq 0,99000$
	C.V $f = 1,2\%$	C.V $f = 0,73\%$	C.V $f < 5,0\%$
	$T_{\text{calculada}} = 22,16$ $t_{\text{tabulada}} = 3,18$	$t_{\text{calculada}} = 22,22$ $t_{\text{tabulada}} = 3,18$	$t_{\text{calculada}} > t_{\text{tabulada}}$
Exactitud	$y = 0,9576 X + 0,2456$ $r = 0,99941$	$Y = 37,8708 X - 4,7044$ $r = 0,99705$	$y = a x + b$ $r \geq 0,99000$
	C.V $f = 1,58\%$	C.V $f = 4,52\%$	C.V $f < 5,0\%$
	99,98%	99,87%	98,0 - 102,0%
	$T_{\text{calculada}} = 2,54$ $t_{\text{tabulada}} = 3,18$	$T_{\text{calculada}} = 0,56$ $t_{\text{tabulada}} = 3,18$	$t_{\text{calculada}} < t_{\text{tabulada}}$
	$G_{\text{calculada}} = 0,7025$ $G_{\text{tabulada}} = 0,8709$	$G_{\text{calculada}} = 0,8580$ $G_{\text{tabulada}} = 0,8709$	$G_{\text{calculada}} < G_{\text{tabulada}}$

Tabla 1. Estudio de la linealidad del sistema y exactitud. C.V f : coeficiente de variación de los factores de respuesta; r: coeficiente de correlación; t: estadígrafo t-Student; G: estadígrafo G Cochran.

Analista 1		Analista 2	
Día 1	Día 2	Día 1	Día 2
101,7	102,6	101,3	100,3
102,1	101,2	102,8	101,9
102,9	103,5	102,8	99,0
100,3	100,3	99,8	102,8
99,3	101,3	100,0	101,7
102,4	99,8	100,4	100,7
Media= 101,5%	Media= 101,4%	Media= 101,1%	Media= 101,0%
C.V= 1,35%	C.V= 1,36%	C.V= 1,33%	C.V= 1,30%
CV $\leq 1,5\%$	CV $\leq 1,5\%$	CV $\leq 1,5\%$	CV $\leq 1,5\%$
$t_{\text{cal}} = 1,08$ $t_{\text{tab}} = 2,33$		$F_{\text{cal}} = 2,59$ $F_{\text{tab}} = 5,05$	

Tabla 2. Estudio de la precisión del método analítico por CLAE. C.V: coeficiente de variación; t: estadígrafo t-Student; F: estadígrafo F-Fischer.

principio activo en un rango de 200 a 500 nm, obteniéndose una pureza del 99,9%.

En la Tabla 1 se reportan los resultados del estudio de la linealidad del sistema y de exactitud. El resultado del estudio de precisión del método desarrollado aparece reportado en la Tabla 2.

Validación del método analítico para la cuantificación por UV

Los resultados obtenidos en el estudio de especificidad del método realizado a 310 nm, al placebo, la sustancia de referencia química, la muestra de Clonazepam se muestra en la Tabla 3. En la Tabla 1 se reportan los resultados del estudio de la linealidad del sistema y la exactitud. El resultado del estudio de precisión del método desarrollado aparece reportado en la Tabla 4.

		Absorbancia (310 nm)		
Placebo	0,002	0,003	0,003	
Sustancia de referencia química	0,402	0,399	0,405	
Muestra		0,394	0,390	0,398

Tabla 3. Estudio de especificidad por Espectrofotometría ultravioleta.

Comparación estadística

Los resultados de la comparación estadística de los resultados obtenidos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución y el método analítico desarrollado por Espectrofotometría ultravioleta se aprecian en la Tabla 5.

Analista 1		Analista 2	
Día 1	Día 2	Día 1	Día 2
101,4	100,8	100,3	102,9
102,0	99,5	101,1	99,3
100,9	101,1	103,4	101,8
101,2	98,3	102,9	102,5
99,3	100,8	102,3	100,5
103,6	102,0	100,1	101,8
Media= 101,4 %	Media= 100,4 %	Media= 101,6 %	Media= 101,4 %
C.V= 1,38 %	C.V= 1,31 %	C.V= 1,36 %	C.V= 1,32 %
CV ≤ 1,5 %	CV ≤ 1,5 %	CV ≤ 1,5 %	CV ≤ 1,5 %
t calculada = 1,95 t tabulada = 2,33		F calculada = 3,58 F tabulada = 5,05	

Tabla 4. Estudio de la precisión por Espectrofotometría. C.V: coeficiente de variación; t: estadígrafo t-Student; F: estadígrafo F-Fischer.

CLAE (%)	Espectrofotometría (%)	Límites
101.7	101.4	C.V $f < 5.0\%$ $t_{calculada} < t_{tabulada}$
102.1	102.0	
102.9	100.9	
100.3	101.2	
99.3	99.3	
102.4	103.6	
Media= 101.5%	Media= 101.4%	
C.V= 1.35%	C.V= 1.38%	
S=1.37	S=1.40	
t calculada = 1.02 t tabulada = 2.33		

Tabla 5. Comparación estadística. C.V: coeficiente de variación; t: estadígrafo t-Student; S: varianza.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el estudio de especificidad, reflejado en la Tabla 3, al analizar la muestra placebo, la solución de referencia, la muestra del producto terminado, indican que los excipientes no interfieren en la determinación del principio activo con estos resultados se demuestra la especificidad del método para el control de la calidad al no observarse absorbancia del placebo a la longitud de onda máxima del principio activo. Sin embargo, al analizarse las muestras sometidas a condiciones drásticas se observaron interferencias de los productos de degradación a la longitud de máxima absorbancia del clonazepam, se demuestra que el método no es específico para el estudio de estabilidad de las tabletas.

Como se puede apreciar en la Fig. 1, el método reportado por CLAR resulta específico al no presentarse interferencias de picos adicionales

en la zona de elusión del producto principal. El escaneo realizado con el objetivo de determinar la pureza del pico de clonazepam, en el rango de 200 a 500 nm demostró que no existían solapamiento de otros productos de degradación. Las curvas de calibración de los métodos validados para el control de la calidad y el estudio de estabilidad de las tabletas de clonazepam resultaron ser lineales. Al aplicar la prueba del intercepto a cada uno de los métodos, ambos resultaron ser no significativos ya que la $t_{calculada}$ fue mayor que la $t_{tabulada}$ por lo que se rechaza la hipótesis nula de que el intercepto es igual a cero, para ambos métodos. En la prueba de linealidad mediante el coeficiente de variación de los factores de respuesta CV_f , se obtuvieron coeficientes de variación menor del 5% demostrándose el cumplimiento de la linealidad en el intervalo de concentraciones estudiados para ambos métodos validados.

En los estudios de repetibilidad se obtuvo un coeficiente de variación adecuado lo que nos demuestra la buena precisión de los métodos. Los valores obtenidos para los estudios de la precisión intermedia demostraron que no existen diferencias significativas entre las precisiones alcanzadas por los analistas en diferentes días para una probabilidad de 0,05% ya que el valor de $F_{calculada}$ es menor que la $F_{tabulada}$. Al realizar la prueba de Student para ambos métodos, el valor calculado resultó ser menor que el tabulado, lo cual demuestra que no existen diferencias significativas entre las medias alcanzadas con un nivel de significación de un 5%.

En los estudios de exactitud realizados para los dos métodos validados, los valores de porcentaje de recobro estuvieron dentro de los lími-

tes establecidos para los métodos espectrofotométricos (98-102%) y los valores del coeficiente de variación para cada uno de los niveles de concentración estudiados resultaron ser menor que el 5%. En la influencia del factor concentración sobre la variabilidad de los resultados de la exactitud al aplicar la p concentraciones empleadas son equivalentes y nos indican que la concentración no influye en la variabilidad de éstos. No existieron diferencias significativas entre las recuperaciones medias y el 100% de recuperación al aplicar la prueba de Student, ya que la $t_{calculada}$ fue menor que la $t_{tabulada}$, por lo que el método es exacto. La curva de recuperación reportada de mg teóricos contra los mg prácticos demostró un comportamiento lineal. La prueba de significación del intercepto resultó no significativo y el valor de la pendiente no difiere significativamente de la unidad. Los valores alcanzados de la pendiente, el intercepto y el coeficiente de correlación demostraron la exactitud y linealidad del método.

Al analizar estadísticamente los resultados obtenidos de los métodos analíticos por CLAE y el desarrollado por Espectrofotometría ultravioleta, para la cuantificación de las tabletas de clonazepam 2 mg sin lactosa para el control de la calidad y estudio de estabilidad, se pudo comprobar que no existen diferencias significativas entre los resultados, al ser la t calculada menor que la t tabulada.

CONCLUSIONES

Se desarrolló un método analítico alternativo por espectrofotometría UV para el control de la calidad del clonazepam tabletas 2 mg sin lacto-

sa, no aplicable al estudio de estabilidad, comparándose estadísticamente con el método reportado por CLAR para el estudio de estabilidad, demostrándose que no existían diferencias significativas. Ambos métodos resultaron lineales, precisos, exactos y específicos en el intervalo de concentraciones establecidas.

El método analítico propuesto para el control de la calidad de las tabletas de clonazepam 2 mg sin lactosa es más económico, más sencillo y más rápido que el método cromatográfico reportado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Martindale the Extra Pharmacopoeia (1989) 28th edition. London, pp.1224-6.
2. Cromatografía en la Química Clínica (1988) "HPLC" en "Reactivos Merck": pp. 3-16.
3. Quattrocchi O.A. & R.F. Laba (1992) "Introducción a la HPLC" en "Aplicación y práctica". Ed. Artes Gráficas Farro S.A, Buenos Aires, págs. 106-22,284,302-28.
4. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (1989) Validación de Métodos Analíticos. Sección Catalana de A.E.F.I. Comisión de normas de buena fabricación y control de la calidad, págs. 1-94.
5. United States Pharmacopoeia 23 Ed. (1995) "Validation of compendial methods" Pharmacopoeial Convention, Rockville, Mack Printing, pp. 1982-4.
6. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use (1995) *Validation of analytical procedures*, ICH-Q2A, Genève.