

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO
PARA CUANTIFICACIÓN DE DONEPEZILO EN TABLETAS
DE 10 MG

Trabajo de graduación presentado por

Melany Sofía Calderón Ramos

para optar al grado académico de Licenciada en Química Farmacéutica

Guatemala

2024

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO
PARA CUANTIFICACIÓN DE DONEPEZILO EN TABLETAS
DE 10 MG

Trabajo de graduación presentado por

Melany Sofía Calderón Ramos

para optar al grado académico de Licenciada en Química Farmacéutica

Guatemala


2024

Vo. Bo. :

(f) 
Licenciado Héctor Josué de León Maldonado
Asesor

Tribunal Examinador:

(f) 
Licenciado Héctor Josué de León Maldonado
Asesor

(f) 
Licenciado Alan Roberto Samayoa Juárez

(f) 
Dr. Élfego Rolando López García
Director
Departamento de Química Farmacéutica

Fecha de aprobación: Guatemala, 03 de diciembre 2024

AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, por darme de su apoyo aún en los momentos más difíciles de la carrera y de todo el proceso de tesis. Por permitirme avanzar en la vida y llegar hasta donde estoy hoy, cumpliendo mi sueño de ser Química Farmacéutica para apoyar a aquellos que lo necesiten. También por guiarme, darme inteligencia y sabiduría para superar cada reto que ha venido a mi vida sin dejarme sola.

A **mis padres**, Robin Calderón y Arlin de Calderón, por darme siempre la oportunidad de elegir mi camino y extender mis alas para alcanzar nuevas metas cada día. Su apoyo incondicional, su amor y todos sus consejos me han brindado herramientas en la vida para hacer todo de la mejor forma siempre honrando primeramente a Dios. También agradezco a **mis hermanas**, Aylín y Marycarmen, por abrazarme en los momentos que más necesitaba y por estar presentes en mi vida ayudándome a salir adelante.

A **mi novio**, Julio Andrés Vargas, por nunca dejarme sola, por siempre darme palabras de ánimo y por estar dispuesto a escucharme en los momentos de crisis. Le agradezco por su preocupación hacia mí, por su paciencia, su amor, sus consejos y por motivarme para ser una mejor persona y profesional. Su constancia en mi vida me permitió tomar fuerzas para superar todos los obstáculos que se presentaban y no rendirme ante ninguno de ellos.

A **mi familia**, incluidos mis suegros y mi cuñada, quienes me mostraron todo su apoyo por medio de sus oraciones. Guardo con mucho cariño todos los mensajes y llamadas para brindarme palabras de aliento aún cuando las fuerzas ya no quedaban para más.

A **Cristian Hernández, Alan Samayoa y Eddy Itzol** por ser mis mentores durante todo mi proceso de aprendizaje para realizar mi tesis. Su paciencia y la dedicación fueron claves para que pudiera seguir adelante, trazando el camino que me lleve a concluir estos últimos pasos de la carrera. Agradezco su amistad y el apoyo que me brindaron para nunca rendirme y por todos los consejos que me permitieron sentirme más segura con las decisiones de mi vida.

A **María Lucía Galván** por ser mi guía durante el proceso de escritura de mi tesis y brindarme herramientas clave para poder desenvolverme mejor. Todos los consejos y sus palabras me permitieron continuar sin rendirme, no solo en mi vida profesional, sino también en la personal.

A **mis amigos**, quienes me daban ideas y me ayudaron a buscar soluciones en cada momento. Por siempre sacarme una risa y darme acompañamiento en los momentos más tristes, pero siempre animándome a continuar y nunca rendirme.

A la **Universidad del Valle de Guatemala** por permitirme tener la oportunidad de crecer como profesional, especializándome en el área de la Química Farmacéutica. Agradezco por todos los catedráticos que estuvieron presentes durante mis años de estudio, quienes brindaron conocimientos fundamentales e importantes para mi desarrollo personal.

A **Pharmadel**, por abrirme las puertas para mi mejora profesional al brindarme la oportunidad de elaborar mi tesis en sus instalaciones. Además, por darme las herramientas y el apoyo económico para culminar con éxito mi trabajo de graduación. Agradezco por todos los conocimientos y enseñanzas de vida que aprendí durante mi estancia para desenvolverme mejor en esta nueva etapa de mi vida.

A mi asesor de tesis **Lic. Héctor de León**, mi revisor **Lic. Carlos Pineda** y al **Dr. Elfego Rolando López** por nunca dejarme sola y abrirme las puertas para desarrollar mi tesis. Agradezco su dedicación, el tiempo, por su apoyo y por ser quienes me ayudaron a salir adelante junto con muchas lecciones que guardo en mi mente y corazón.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE CUADROS	vii
LISTA DE GRÁFICOS	ix
RESUMEN	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO CONCEPTUAL	2
A. Antecedentes del problema	2
B. Justificación	3
C. Planteamiento del problema.....	4
D. Alcances y limitantes	4
1. Alcance.....	4
2. Limitantes.....	4
III. MARCO TEÓRICO.....	5
A. Validación de métodos analíticos	5
1. Principios de la validación	5
2. Documentación pertinente para validaciones.....	6
3. La validación durante el ciclo de vida de un procedimiento analítico	6
4. Parámetros a determinar	6
B. Cromatografía líquida de alta resolución.....	8
1. Principio de la cromatografía	8
2. Cromatografía líquida (HPLC).....	9

3.	Cromatogramas y su interpretación.....	10
C.	Donepezilo	11
1.	Generalidades	11
IV.	MARCO METODOLÓGICO	12
A.	Objetivo.....	12
1.	Objetivos generales	12
2.	Objetivos específicos.....	12
B.	Hipótesis	12
C.	Variables	12
1.	Dependientes	12
2.	Independientes.....	13
3.	Moderadoras.....	13
4.	De control	13
D.	Población.....	13
E.	Muestra	13
F.	Procedimiento	13
1.	Plan de investigación.....	13
2.	Desarrollo del método (cuantificación del Principio Activo)	14
3.	Validación del método propuesto.....	15
4.	Elaboración de informe final de tesis	17
G.	Diseño de investigación	17
H.	Análisis estadístico.....	17
V.	MARCO OPERATIVO	19

A.	Recolección y tratamiento de datos	19
B.	Recursos	19
1.	Recursos humanos	19
2.	Recursos materiales	19
3.	Lugar	20
C.	Aspectos económicos	20
VI.	RESULTADOS	23
VII.	DISCUSIÓN	27
VIII.	CONCLUSIONES	30
IX.	RECOMENDACIONES	32
X.	REFERENCIAS	33
XI.	ANEXOS	36
A.	Características del equipo utilizado	36
B.	Glosario	36
C.	Gráficas de linealidades	37
D.	Datos de pruebas de métodos	38
E.	Cromatogramas de referencia obtenidos	41

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura No. 1.</i> Diagrama de bloques con componentes de HPLC	10
<i>Figura No. 2.</i> Estructura química del Donepezilo.....	11

LISTA DE CUADROS

<i>Cuadro No. 1.</i> Parámetros de desempeño de los procedimientos analíticos físico-químicos y potencia microbiológica	8
<i>Cuadro No. 2.</i> Aspectos económicos para trabajo de investigación	20
<i>Cuadro No. 3.</i> Aptitud del sistema obtenido a partir del método analítico utilizando Cromatografía Líquida de Alta Resolución Chromaster 5000	23
<i>Cuadro No. 4.</i> Especificidad obtenida a partir del método analítico utilizando Cromatografía Líquida de Alta Resolución Chromaster 5000	23
<i>Cuadro No. 5.</i> Linealidad del sistema obtenida a partir del método analítico utilizando Cromatografía Líquida de Alta Resolución Chromaster 5000	24
<i>Cuadro No. 6.</i> Linealidad del método obtenida a partir del método analítico utilizando Cromatografía Líquida de Alta Resolución Chromaster 5000	24
<i>Cuadro No. 7.</i> Exactitud obtenida a partir del método analítico utilizando Cromatografía Líquida de Alta Resolución Chromaster 5000	25
<i>Cuadro No. 8.</i> Repetibilidad obtenida a partir del método analítico utilizando Cromatografía Líquida de Alta Resolución Chromaster 5000	25
<i>Cuadro No. 9.</i> Precisión intermedia obtenida a partir del método analítico utilizando Cromatografía Líquida de Alta Resolución Chromaster 5000	26
<i>Cuadro No. 10.</i> Límite de detección y cuantificación	26

<i>Cuadro No. 11.</i> Datos estadísticos de la aptitud del sistema.....	38
<i>Cuadro No. 12.</i> Datos estadísticos de la especificidad.....	38
<i>Cuadro No. 13.</i> Datos estadísticos de la linealidad del sistema	39
<i>Cuadro No. 14.</i> Datos estadísticos de la linealidad del método	39
<i>Cuadro No. 15.</i> Datos estadísticos de la exactitud	40
<i>Cuadro No. 16.</i> Datos estadísticos de la precisión	40

LISTA DE GRÁFICOS

<i>Gráfico No. 1.</i> Linealidad del sistema obtenida a partir del método analítico utilizando Cromatografía Líquida de Alta Resolución Chromaster 5000	37
<i>Gráfico No. 2.</i> Linealidad del método obtenida a partir del método analítico utilizando Cromatografía Líquida de Alta Resolución Chromaster 5000	37
<i>Gráfico No. 3.</i> Cromatograma de Estándar para Especificidad de Donepezilo	41
<i>Gráfico No. 4.</i> Cromatograma de Muestra para Repetibilidad de Donepezilo.....	41
<i>Gráfico No. 5.</i> Cromatograma de Placebo para Especificidad de Donepezilo.....	42
<i>Gráfico No. 6.</i> Cromatograma de Blanco para Especificidad de Donepezilo	42
<i>Gráfico No. 7.</i> Cromatograma de Diluyente para Especificidad de Donepezilo.....	43

RESUMEN

La validación de los métodos analíticos es el proceso por el que se evalúan características de desempeño que permitan comprobar si el procedimiento propuesto cumple con los requisitos establecidos (USP 43-NF 38, 2020). Su importancia radica en la garantía que el método desarrollado es capaz de generar resultados confiables según las condiciones que posea el laboratorio analítico (Ahumada et al., 2023).

Para los principios activos presentes en los productos finales se debe establecer una metodología reproducible para su cuantificación. Para el caso del Donepezilo, el método fue tomado a partir de la monografía del principio activo presente en la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) y se realizaron cambios pertinentes para su adecuabilidad a las condiciones del laboratorio en el que se analiza el producto final.

Esta molécula es importante debido a su implementación al catálogo de productos de la empresa fabricante.

El trabajo que se presenta a continuación permitió desarrollar y validar un método analítico para la cuantificación de Donepezilo en tabletas de 10 mg. A partir de los resultados obtenidos se puede determinar que se cumplió con los objetivos planteados para la investigación. Los resultados se evalúan desde la adecuabilidad hasta los límites de cuantificación y detección, siendo en total 9 parámetros con sus respectivos criterios de aceptación a partir de un análisis estadístico

I. INTRODUCCIÓN

El desarrollo del producto farmacéutico (Donepezilo 10 mg tabletas) del laboratorio donde se efectuará el trabajo de investigación, requiere de diferentes procesos para su producción y comercialización. Para esto, el área analítica se encarga del desarrollo y validación del método analítico que brinde resultados confiables que se encuentren dentro de los parámetros establecidos.

La validación es el proceso por el cual, se utilizan la experimentación dentro del laboratorio para evaluar las características del método y si este cumple con los requisitos establecidos (USP 43-NF 38, 2020). Esto es importante ya que garantiza que el procedimiento desarrollado es capaz de generar resultados confiables según las condiciones que posea el laboratorio analítico (Ahumada et al., 2023).

El proceso de validación de un método debe coincidir con lo solicitado en el Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA). En este, se presentan características a evaluar para conocer si el método que se desarrolla debe ser validado. Además, se añade información complementaria para la presentación de la validación; desde la documentación, hasta los parámetros que deben aceptarse (RTCA 11.03.39:06, 2006). Se utilizan como guías las farmacopeas, principalmente la de Estados Unidos, el RTCA y el manual de procedimientos para el desarrollo del método.

El propósito fundamental de este trabajo es validar el método analítico para la cuantificación Donepezilo 10 mg en tabletas por medio de cromatografía líquida de alta resolución. Su importancia radica en la adecuación del método para su análisis en las instalaciones de control de calidad para su cuantificación rutinaria de forma eficaz.

II. MARCO CONCEPTUAL

A. Antecedentes del problema

El Donepezilo es una molécula investigada por más de 15 años para el tratamiento de la demencia y el Alzheimer. Su desarrollo fue ejecutado por el Dr. Sugimoto, con apoyo de la empresa Eisai en Tokio Japón desde el año 1983. En el momento, se sugirió que la acetilcolina, un neurotransmisor, se encontraba relacionado con el descenso de las funciones de memoria en pacientes con Alzheimer. Posteriormente, se descubrió un compuesto que inhibía la actividad de la acetilcolinesterasa, el cual, es una enzima que se encarga de catalizar la hidrólisis de la acetilcolina. Finalmente, en el año 1997 se lanzó el medicamento en Estados Unidos con el nombre comercial Aricept (Sugimoto, 1998).

En el 2009, Barot y Patel implementaron un método para la cuantificación de Donepezilo Clorhidrato por medio de cromatografía líquida. El procedimiento incluía una columna Inertsil C8-3, 25 cm x 4.6 mm, 5 μ en el modo isocrático. Se utilizó como fase móvil una proporción de buffer:metanol:trietilamina (550:450:5) v/v, con ajuste de pH con ácido ortofosfórico a 2.5 y un flujo de 1.0 mL/min. El método fue analizado a 271 nm y con un detector de matriz de fotodiodos. La metodología fue validada por medio de la determinación de la sensibilidad, exactitud y precisión. Se concluyó que el método es aplicable para una rutina de control de calidad para Donepezilo HCl en tabletas.

Posteriormente, en el 2013, se desarrolló otro método para la cuantificación de Donepezilo Clorhidrato en tabletas por medio de una fase reversa en HPLC. El procedimiento requirió de una columna de fase reversa C-18 con detección UV en 268 nm. Su fase móvil consistió en buffer fosfato (0.01M), metanol y acetonitrilo (50:30:20) v/v y con ajuste de pH de 2.7 con ácido fosfórico. El método propuesto es aprobado para realizar los ensayos de Donepezilo en tabletas (Liew et al., 2013).

Actualmente, en las farmacopeas, se encuentra una metodología validada para la cuantificación de Donepezilo 10 mg en tabletas. Sin embargo, estas pueden llegar a ser modificadas en casos en los que no se obtengan los resultados esperados; en caso que esto llegase a suceder, la metodología propuesta debe ser justificada y validada.

B. Justificación

Debido a la incorporación de un nuevo producto en el catálogo de medicamentos del laboratorio, se ha solicitado al departamento de investigación y desarrollo la formulación de tabletas de Donepezilo 10 mg. Para su análisis, el área analítica del departamento será la responsable del ensayo para la cuantificación del principio activo según la información brindada por farmacopeas aprobadas. De ser necesario, se tomará en consideración el desarrollo y validación de un método que brinde resultados confiables y reproducibles.

Para esto, se utilizará como guía la Farmacopea de los Estados Unidos (USP - por sus siglas en inglés), el cual, presenta como método de cuantificación el análisis por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC – por sus siglas en inglés). La monografía presentada en la farmacopea establece los preparandos de las soluciones a elaborar, además de las condiciones en las que debe configurarse el equipo para brindar los datos necesarios.

La información recolectada a partir de la experimentación permitirá establecer un método que proporcione datos específicos para el Donepezilo 10 mg en tabletas de forma eficaz. A largo plazo, esta metodología será transferida al área de control de calidad para el análisis del producto terminado, una vez fabricado en el área de producción.

Implementar la metodología es crucial para la empresa, ya que debe ser específica para el producto a analizar, considerando los cambios necesarios para la obtención de resultados de calidad. Además, la estandarización del método permitirá evitar errores y garantizar la reproducibilidad de los datos, independientemente del encargado de realizar el análisis.

C. Planteamiento del problema

¿Cumple el método analítico que se propone para la cuantificación de Donepezilo en tabletas de 10 mg, con los parámetros de validación establecidos por la farmacopea de los Estados Unidos USP 46 NF y el Reglamento Técnico Centroamericano?

D. Alcances y limitantes

1. Alcance

A partir del estudio se pretende desarrollar y validar un método analítico que permita cuantificar la concentración de Donepezilo en tabletas de 10 mg por medio de una cromatografía líquida de alta resolución. Para esto, se evaluarán los parámetros provistos por la documentación oficial del Laboratorio basados en la USP y el RTCA como lo son: la aptitud del sistema, especificidad, linealidad del sistema, linealidad del método, exactitud, precisión y el límite de identificación y cuantificación.

2. Limitantes

Los resultados obtenidos serán válidos únicamente para tabletas de 10 mg de Donepezilo fabricados por el laboratorio a cargo.

III. MARCO TEÓRICO

A. Validación de métodos analíticos

1. Principios de la validación

La validación de un procedimiento analítico es un proceso que, por medio de estudios de laboratorio, se evalúan características de desempeño para comprobar si se cumple con los requisitos establecidos (USP 43-NF 38, 2020). Para la validación de un método de análisis se debe de considerar que estos deben estar correctamente documentadas según las Buenas Prácticas de Documentación y sustentadas experimentalmente para garantizar que el desempeño es el adecuado (Franco, 2002). Para conocer los procedimientos que son objeto de validación, se debe clasificar el análisis entre las cuatro categorías establecidas.

La primera abarca las pruebas cuantitativas de contenido del (los) principio(s) activo(s) en la muestra que se analiza. La segunda determina el contenido de impureza o los límites de estos; pueden llegar a ser cuantitativas o cualitativas. La tercera categoría se clasifica como las pruebas físicoquímicas de desempeño como lo son las pruebas de disolución. Por último, la cuarta es la prueba de identificación del analito en la muestra obtenida, la cual, se compara con un estándar de referencia a través de métodos cromatográficos, de reactividad química o pruebas microcristalinas. Además, se consideran las pruebas microbiológicas para asegurar la calidad del medicamento y que cumpla con los parámetros de este (Committee for Medicinal Products for Human Use, 2023).

Debido a que todos los detalles deben ser documentados, se toma en cuenta que los estudios deben proveer suficiente información acerca del procedimiento y los objetivos de esto. A partir de esto, se elabora un protocolo que contenga: el propósito del análisis, las características de desempeño a validar y los criterios asociados. Por último, los resultados deben ser resumidos en un informe de validación (World Health Organization, 2018).

2. Documentación pertinente para validaciones

Estos documentos deben ser evaluados por la Autoridad Reguladora y para esto se debe de contar con:

- a. Descripción detallada del procedimiento analítico.
- b. Descripción de parámetros de desempeño que fueron evaluados
- c. Análisis estadístico para verificación de parámetros
- d. Resumen de resultados instrumentales
- e. Resumen de resultados de validación
- f. Conclusiones

Se debe de tener toda la documentación en orden y tener una verificación completa de los resultados obtenidos para evitar que esta documentación sea rechazada (Committee for Medicinal Products for Human Use, 2023).

3. La validación durante el ciclo de vida de un procedimiento analítico

Durante el periodo de utilidad de la documentación obtenida se puede considerar realizar cambios por diferentes motivos. Depende de cómo estos afectan a los resultados, se debe de realizar una revalidación parcial o total, justificando a detalle los cambios que se realizan (UNODC, 2010).

Existe otro concepto importante que debe tomarse en cuenta, el cual es el rango reportable; esta deriva desde la especificación y el objetivo que se tiene para el análisis. Se tiene una confirmación del rango por medio de una demostración experimental analítica al presentar resultados exactos, precisos y aceptables (CIPAM, 2005).

4. Parámetros a determinar

Las metodologías analíticas que se determinan deben de aprobar diferentes parámetros que confirman el desempeño de estos. Se consideran los siguientes: especificidad, rango, exactitud, precisión, límite de detección y cuantificación, linealidad, y robustez.

La especificidad de un método analítico se demuestra por medio de la ausencia de interferencia o comparando los resultados con un procedimiento ortogonal. En algunos casos, este parámetro se encuentra dada por principios científicos subyacentes del procedimiento.

Además de la especificidad, también puede ser evaluada la selectividad en casos que el procedimiento analítico no sea específico. Los datos que se utilizan para esta evaluación son: la identificación, ensayo, pureza e impurezas (Committee for Medicinal Products for Human Use, 2023).

El rango es un intervalo entre el menor y el mayor resultado en el que el procedimiento posee un nivel adecuado de respuesta, exactitud y precisión. Este puede ser validado desde la evaluación directa de resultados obtenidos utilizando un modelo de calibración según los requerimientos. Los resultados que se evalúan normalmente son las concentraciones de la muestra o los niveles de pureza presentes en el instrumento que se utiliza (Committee for Medicinal Products for Human Use, 2023).

Exactitud y precisión pueden ser evaluados de forma individual considerando los criterios de aceptación predefinidos, aunque también pueden serlo de forma combinada. La exactitud puede ser establecida a partir del rango reportable del método analítico que se evalúa. Sin embargo, se tiene material de comparación, estudio de picos, procedimiento ortogonal u otras comparaciones que permiten definir la exactitud (Committee for Medicinal Products for Human Use, 2023).

Por otro lado, los límites de detección se definen como la cantidad mínima que se requiere del analito para que pueda ser detectado en la muestra. En cambio, el límite de cuantificación determina la cantidad mínima de analito en relación a la cantidad absoluta o concentración en la que se obtiene una respuesta medible (Committee for Medicinal Products for Human Use, 2023).

La linealidad del método es la capacidad tanto del sistema como del método para proporcionar resultados directamente proporcionales a la concentración del analito. La diferencia entre estos es que para el sistema se evalúa si este permite tener una lectura confiable del principio activo. En cambio, la del método evalúa la capacidad de cuantificación de la muestra específicamente (Committee for Medicinal Products for Human Use, 2023).

Cuadro No. 1

Parámetros de desempeño de los procedimientos analíticos físico-químicos y potencia microbiológica

Categoría de prueba Parámetro de desempeño	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
	Principio(s) activo(s)	Prueba de límite Cuantitativa	Prueba de límite Cualitativa	Físico químico desempeño	Identificación
Exactitud	SI	SI	*	*	NO
Precisión	SI	SI	NO	SI	NO
Especificidad	SI	SI	SI	*	SI
Límite de Detección	NO	NO	SI	*	NO
Límite de Cuantificación	NO	SI	NO	*	NO
Linealidad	SI	SI	NO	*	NO
Intervalo	SI	SI	*	*	NO

(RTCA 11.03.39:06, 2006)

B. Cromatografía líquida de alta resolución

1. Principio de la cromatografía

El principio de la cromatografía tiene sus raíces en la historia desde 1906, cuando se empleó para separar pigmentos de extractos vegetales según su capacidad de filtración a través de una columna rellena de un sólido poroso. Posteriormente se definió como el método físico de separación en el cual los componentes se distribuyen entre dos fases: una fase móvil que fluye a través o a lo largo de la fase estacionaria (Skoog et al., 2015).

Este proceso implica que los componentes de una mezcla en fase móvil se desplazan a través de una fase estacionaria. La efectividad de la separación depende crucialmente de la selección adecuada de ambas fases. Las sustancias que tienen menor afinidad con la fase móvil se mueven más lentamente, mientras que las más afines a esta se desplazan más rápidamente a través de la fase estacionaria (Pássaro et al., 2016).

La cromatografía es ampliamente utilizada en áreas como biología, química y bioquímica, entre otras disciplinas. En la industria, se aplica para el análisis de compuestos orgánicos en sectores tan diversos como agroquímicos y productos farmacéuticos. En este último campo, la cromatografía se emplea para el control de calidad de materias primas, procesos y productos terminados, asegurando la ausencia de contaminantes y la correcta concentración del principio activo (Sgariglia et al., 2010).

La clasificación de la cromatografía se basa en diversos criterios, siendo el más fundamental el estado físico de la fase móvil, que puede ser gaseoso o líquido. La cromatografía de gases requiere que tanto la fase móvil como la mezcla a separar estén en estado gaseoso, implicando a menudo un proceso de volatilización del analito. En contraste, la cromatografía líquida es más común debido a su versatilidad y simplicidad (Skoog et al., 2015).

La fase estacionaria puede ser sólida o líquida según las propiedades requeridas. Las fases estacionarias sólidas porosas son preferidas por su capacidad para tener una mayor movilidad a la fase móvil. En cambio, si se utilizase una fase estacionaria líquida, aunque sean inmiscibles entre sí, podría haber trazas de esta en la fase móvil (Skoog et al., 2015).

2. Cromatografía líquida (HPLC)

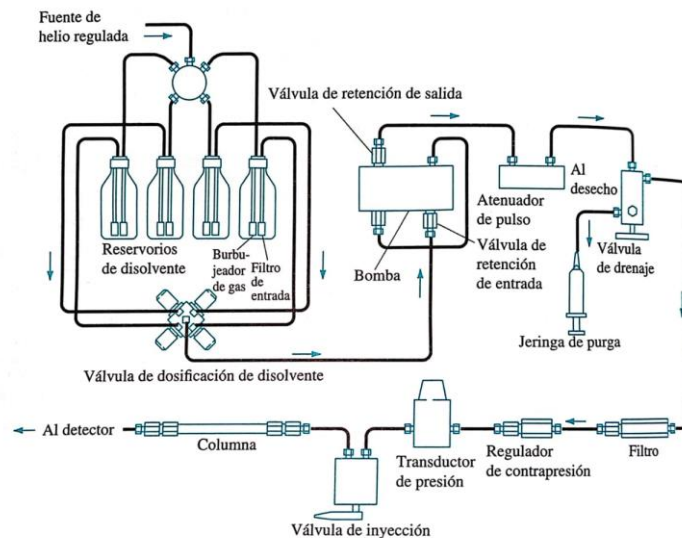
La cromatografía líquida de alta resolución o HPLC (por sus siglas en inglés) posee como fase móvil un disolvente líquido que contiene a la muestra como una mezcla de solutos. Su clasificación se basa en la forma de separación o según el tipo de fase estacionaria que se utilice. La primera es la líquido-líquido (partición), la segunda líquida-sólido (adsorción), la tercera de intercambio iónico, la cuarta sería de exclusión molecular, la quinta de afinidad y la sexta sería el quiral (Volonté, 2013).

Un componente importante de este método son las columnas; usualmente estos son de acero inoxidable, o poliméricas y es en ellas en las que se empaca la fase estacionaria. Se toma en consideración el largo y el diámetro interno afecta directamente a la separación. Según el analito con el que se esté realizando la metodología se presenta en su monografía el tipo de columna que se utiliza (USP 43-NF 38, 2020).

Tanto la fase móvil como las especificaciones del equipo son únicos en cada monografía. La fase móvil se define como el solvente o mezcla de solventes que se inyecta en la columna y son separados según si interacción con la fase estacionaria. Entre las especificaciones se encuentra el reservorio donde se encuentra la fase móvil, una bomba para inyectar la fase a la columna, el inyector de la muestra, la columna, el detector y el equipo recolector de datos (USP 43-NF 38, 2020).

Figura No. 1

Diagrama de bloques con componentes de HPLC



(Skoog et al., 2015)

3. Cromatogramas y su interpretación

La presentación de los datos se realiza por medio de un cromatograma, el cual, es una representación gráfica del detector de respuesta, la concentración del analito u otras mediciones cuantitativas. El volumen de permanencia, el tiempo de retención y el volumen de retención son tres conceptos a tomar en cuenta en los gráficos. El primero es el volumen entre el punto donde los eluyentes tienen contacto y la punta de la columna. El segundo es el tiempo requerido para la elución de un componente no retenido. El último es el volumen de fase móvil que se requiere para la elución de un componente no retenido (USP 43-NF 38, 2020).

Existen otros datos importantes que deben tomarse en cuenta como lo es el número teórico de platos, el cual mide la eficiencia de la columna que se utiliza durante la metodología. La porción en la que un solo componente eluye de la columna se considera como el pico; existen casos en los que la separación no es completa y dos o más componentes eluyen como un pico no resuelto. Para estos casos se utiliza el parámetro del radio pico a valle, empleado como un criterio idóneo del sistema para sustancias relacionadas (USP 43-NF 38, 2020).

C. Donepezilo

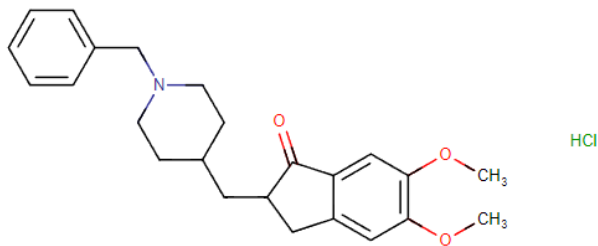
1. Generalidades

El Donepezilo, también conocido como E2020, es una sal derivada de piperidina con actividad neurocognitiva. Inhibe de forma reversible la acetilcolinesterasa, bloqueando la hidrólisis de la acetilcolina y aumentando su actividad (Pubchem, 2024). Este medicamento se encuentra indicado para tratar la demencia o Alzheimer para mejorar las funciones mentales como la memoria, atención, capacidad social, hablar, entre otros. Es importante recalcar que, aunque permite controlar los síntomas de la enfermedad, este no brinda una cura (CIMA, 2023).

Entre las características principales se conoce que este se presenta como un polvo blanco con una estructura cristalina. Su fórmula empírica es $C_{24}H_{29}NO_3HCl$, un peso molecular de 415.96 y punto de fusión 218-220 °C (Barot & Patel, 2009). Se conoce que es muy soluble en cloroformo, soluble en agua y ácido acético, levemente soluble en etanol y en acetonitrilo, y prácticamente insoluble en etil acetato y n-hexano. Por último, otra característica importante es su pKa, el cual, es 8.34 (Drugbank, 2020).

Figura No. 2

Estructura química del Donepezilo



(Drugbank, 2020)

IV. MARCO METODOLÓGICO

A. Objetivo

1. Objetivos generales

- a. Validar un método analítico para la cuantificación Donepezilo 10 mg en tabletas utilizando cromatografía líquida de alta resolución.
- b. Demostrar que el método es apto para la cuantificación de Donepezilo 10 mg en tabletas.

2. Objetivos específicos

- a. Cuantificar mediante cromatografía líquida de alta resolución, Donepezilo en tabletas que contengan 10 mg.
- b. Verificar que la metodología analítica cumple con los parámetros de validación propuestos en el manual alineado a la USP.

B. Hipótesis

Hipótesis nula (H_0): La metodología analítica propuesta en la USP 46 – NF 41, no puede validarse a partir de los criterios de aceptación de los parámetros presentes en la documentación oficial de la empresa fabricante basadas en la USP y el RTCA, de tabletas de Donepezilo 10 mg.

Hipótesis alternativa (H_a): La metodología analítica propuesta en la USP 46- NF 41, puede validarse a partir de los criterios de aceptación de los parámetros presentes en la documentación oficial de la empresa fabricante basadas en la USP y el RTCA, de tabletas de Donepezilo 10 mg.

C. Variables

1. Dependientes

Concentración de Donepezilo

2. Independientes
Tabletas producidas por el laboratorio fabricante
3. Moderadoras
Calidad de materia prima
Proceso de manufactura
Excipientes
4. De control
Estándar BP

D. Población

Ensayos y lotes piloto de tabletas de Donepezilo de 10 mg formuladas y producidas en el laboratorio a cargo.

E. Muestra

La muestra se compone de 40 tabletas de Donepezilo 10 mg de tres lotes piloto diferentes.

F. Procedimiento

1. Plan de investigación

- a. Elaborar el plan de investigación a partir de la bibliografía necesaria para el entendimiento de la validación, su importancia y su desarrollo. Para esto, se requirió de información de la Farmacopea de los Estados Unidos y el Reglamento Técnico Centroamericano, los cuales, especifican los parámetros que deben evaluarse para validar una metodología.
- b. Investigar acerca del principio activo que se utilizará, en este caso, el Donepezilo. Es importante conocer su mecanismo de acción e información relacionada a su solubilidad, la constante de disociación ácida (pKa), puntos de fusión, entre otros datos fisicoquímicos.
- c. Establecer objetivos, hipótesis, la población y muestra, variables y el procedimiento a utilizar para la metodología analítica. También se debe de tomar en cuenta el análisis de los datos, el programa a emplear (tiempo a utilizar para realizar) y el costo para implementar el método.

2. Desarrollo del método (cuantificación del Principio Activo)

a. Preparación de soluciones

- 1) Diluyente (ácido clorhídrico 37% en metanol): en un balón de 250 mL colocar 187.5 mL de metanol y 62.5 mL de ácido clorhídrico.
- 2) Fase móvil: disolver en un beaker de 1000 mL, 2.5 g de 1-decanosulfonato de sodio en 650 mL de agua y añadir 1 mL de ácido perclórico. Por último, añadir 350 mL de acetonitrilo. De ser necesario, ajustar con ácido perclórico a un pH de 1.8.
- 3) Solución estándar (0.4 mg/mL): agregar 40 mg de Donepezilo Clorhidrato USP ER en un beaker de 100 mL y añadir 60 mL de diluyente. Mezclar hasta que disuelva y trasvasar a un balón de 100 mL. Posteriormente aforar balón con diluyente hasta 100 mL.
- 4) Solución muestra (0.4 mg/mL): pesar y triturar con un mortero 10 tabletas de Donepezilo Clorhidrato. Pesar el equivalente a 40 mg a partir del peso y la cantidad etiquetada. Colocar las tabletas en un beaker de 100 mL y agregar 75 mL de diluyente para posteriormente colocarlo en un baño ultrasónico por 20 minutos. Mezclar por 30 segundos y dejar enfriar a temperatura ambiente y agregar 25 mL de diluyente. Dejar asentar los sólidos por unos minutos y pasar por un filtro, descartando los primeros 2-3 mL del filtrado.

(USP 46-NF 41, 2023)

b. Sistema cromatográfico

- 1) Sistema de cromatografía líquida de alta resolución
- 2) Detector: UV 271 nm
- 3) Columna: 4.6 mm x 15 cm; 5 µm de empaque L1
- 4) Temperatura de columna: 35°
- 5) Rango de flujo: 1.4mL/min
- 6) Volumen de inyección: 20 µL

(USP 46-NF 41, 2023, p. 46)

c. Cuantificación

Calcular porcentaje de cantidad etiquetada de Donepezilo Clorhidrato en la porción tomada de tabletas.

Cálculo 1. Ecuación para porcentaje de Donepezilo Clorhidrato en muestra

$$\% \text{ de PA} = \frac{A_{MX}}{A_{STD}} * CSTD * PP * \frac{250}{W_{mx}} * \frac{25}{5} * \frac{W_x}{etq} * 100$$

Donde:

A MX	=	Área de la muestra
A STD	=	Área del estándar
CSTD	=	Concentración del estándar en mg/mL
PP	=	Pureza del estándar
W _{mx}	=	Peso de la muestra en mg
W _x	=	Peso promedio de la tableta recubierta en mg
etq	=	Cantidad etiquetada por tableta recubierta en mg

(Laboratorios y Droguería Pharmadel S.A., 2021)

d. Análisis de resultados

Se analiza y se discute acerca del resultado obtenido para conocer si el método de cuantificación brinda datos favorables para continuar con la validación del método.

3. Validación del método propuesto

a. Curva de calibración

La curva de calibración con patrones estándar de Donepezilo de 0.24, 0.32, 0.4, 0.48 y 0.56 mg/mL. Para ello, se tomó la cantidad de Donepezilo USP ER (24, 32, 40, 48 y 56 mg respectivamente) y se agrega a un balón de 100 mL. Posteriormente, se afora con diluyente y se filtra directamente mientras se trasvasa a vial para HPLC.

b. Ensayos

A partir de lo que menciona el Reglamento Técnico Centroamericano, el ensayo se clasificaría como categoría I debido a que se hará una cuantificación del analito. Para los parámetros, se tomó como guía principal los mencionados en la guía para validaciones de la empresa.

- 1) Aptitud del sistema: se realiza con seis repeticiones de lecturas sucesivas de solución estándar de referencia a la concentración de trabajo especificada

- 2) Especificidad: se toman seis muestras de placebo, seis de producto muestra y seis de estándar tratados con HCl 0.1N, NaOH 0.1N, bisulfito de sodio al 3%, agua oxigenada al 30%, agua y un blanco. Ajustar el pH a los matraces según especificación
- 3) Linealidad del sistema: la linealidad se determina empleando una serie de mínimo 5 puntos de datos de estándar a distintas concentraciones que estén distribuidas regularmente y que cubran del 60% al 140% del intervalo de la concentración de trabajo al 100% se trabajan 3 réplicas por concentración. Se determina: la ecuación de regresión lineal calculada por el método de mínimos cuadrados basada en resultado de lecturas versus la concentración del analito. Se evalúa con $p = 0.05$. Calcular: ecuación de la recta, coeficiente de correlación r , coeficiente de determinación r^2 , gráfica de linealidad, intervalo de confianza para la pendiente e incluir el intervalo de linealidad.
- 4) Linealidad del método: realizar diluciones de la solución muestra con concentraciones entre el 80% - 120% de la concentración de trabajo, realizar lecturas por triplicado. Se prepara mediante la adición de estándar y placebo. Determinar: ecuación de la regresión lineal calculada por el método de mínimos cuadrados basada en cantidad recuperada versus concentración. Se evalúa con $p = 0.05$. Calcular: ecuación de la recta, coeficiente de determinación r^2 , gráfica de linealidad, intervalo de confianza para la pendiente, intervalo de confianza para la ordenada en el origen, intervalo de confianza para la media poblacional del porcentaje de recobro IC e incluir el intervalo de linealidad.
- 5) Exactitud: determinado por medio del método de adición de estándar a tres concentraciones diferentes 80%, 100% y 120%. Se lee por triplicado.
- 6) Precisión: se determina mediante la repetibilidad y precisión intermedia.
 - a) Repetibilidad: se realizan seis determinaciones de muestras de un mismo lote y preparar de manera independiente según el procedimiento de análisis. Calcular: porcentaje de recuperación para cada muestra y la media, desviación estándar y coeficiente de variación.

- b) Precisión intermedia: en días distintos se realizan seis determinaciones de muestras de un mismo lote y preparar de manera independiente según el proceso de análisis. Calcular el porcentaje de recuperación para cada muestra y calcular la media. También incluir cálculos de la media, desviación estándar y coeficiente de variación para todas las condiciones evaluadas
7. Límite de identificación y cuantificación: con los resultados obtenidos de linealidad, calcular el límite de detección con base en la curva y la desviación estándar de regresión.

(Laboratorios y Droguería Pharmadel S.A., 2021)

c. Análisis de resultados

Se realizan los análisis según lo especificado en la sección H correspondiente al apartado del análisis estadístico.

4. Elaboración de informe final de tesis

- a. Se redacta en el documento todos los hallazgos obtenidos en la sección de resultados y se discute sobre estos para aprobar o rechazar el método propuesto para la cuantificación de Donepezilo Clorhidrato.
- b. Por último, se redactan las conclusiones y se incluyen en los anexos los cromatogramas, gráficos, figuras, entre otros materiales visuales que puedan apoyar la decisión final acerca de la metodología

G. Diseño de investigación

El presente estudio es de tipo mixto: cuantitativo, transversal y experimental. Cuantitativo debido a que el enfoque principal de la investigación es conocer la cantidad del principio activo se obtiene a partir de las muestras. Transversal debido a que será en un tiempo determinado de estudio. Por último, se define como experimental ya que solo se tomará de información base lo mencionado por la monografía; de ser necesario, se cambiará el método para adaptarse a los insumos del laboratorio.

H. Análisis estadístico

Se utilizarán los parámetros establecidos en el instructivo para validaciones de la empresa para determinar que el método cumple con los requisitos solicitados.

1. Aptitud del sistema: basadas en el concepto de que el equipo, el sistema electrónico, las operaciones analíticas y las muestras a analizar constituyen un sistema integral que puede evaluarse. Criterio de aceptación: coeficiente de variación ≤ 2.0 .
2. Especificidad: se define como la capacidad del método para identificación del analito de forma confiable en presencia de otras sustancias químicas que puedan encontrarse presente en la muestra. Criterio de aceptación: no se presenta interferencia con el principio activo.
3. Linealidad del sistema: capacidad del sistema de brindar resultados directamente proporcionales a la concentración en la muestra dentro de un rango. Criterio de aceptación: coeficiente de correlación $r \geq 0.9900$ y coeficiente de determinación $r^2 \geq 0.9800$.
4. Linealidad del método: capacidad del método de brindar resultados directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango. Criterio de aceptación: coeficiente de correlación $r \geq 0.9900$ y coeficiente de determinación $r^2 \geq 0.9800$.
5. Exactitud: proximidad entre el valor que es aceptado normalmente como valor real y valor experimental. Criterio de aceptación: intervalo de confianza 95%-105%, coeficiente de variación del porcentaje de recobro $\leq 2.0\%$.
6. Precisión: grado de concordancia entre valores de una serie repetida de muestras bajo condiciones establecidas. Criterio de aceptación: coeficiente de variación ≤ 6.0
 - a. Repetibilidad: concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas realizadas en las mismas condiciones.
 - b. Precisión intermedia: medida de precisión de los resultados de un método en condiciones diferentes de analista, día o lote.
7. Límite de identificación y cuantificación: define la cantidad mínima del analito que proporciona una respuesta para el método. También se define como la cantidad mínima de analito en términos de cantidad absoluta o concentración que proporciona una respuesta medible.

(Laboratorios y Droguería Pharmadel S.A., 2021)

V. MARCO OPERATIVO

A. Recolección y tratamiento de datos

Los datos serán analizados por medio del software Microsoft Excel 2013 versión 15.0.4420.1017. Se analizaron los datos tomando, por cada criterio, un criterio de aceptación. Durante el proceso se incluye la propuesta de hipótesis para determinación de la aprobación o rechazo del método propuesto según la ICH. Además, se calcula el porcentaje de Donepezilo Clorhidrato en la cantidad de muestra analizada.

B. Recursos

1. Recursos humanos

Autora: Melany Sofía Calderón Ramos

Asesor principal: Lic. Héctor de León

Asesor metodológico: Lic. Cristian Hernández

Revisor: Lic. Carlos Humberto Pineda

2. Recursos materiales

Equipo

- a. Equipo de computación con el programa Microsoft Excel año 2013, versión 15.0.4420.1017
- b. Fuentes primarias
- c. Cuaderno de notas y lapicero
- d. Tabletas de Donepezilo 10 mg del ensayo
- e. Tabletas de Donepezilo 10 mg del lote piloto
- f. Balanza analítica OHAUS modelo px224/e
- g. Cromatógrafo líquido de alta resolución Chromaster 5000

Materiales y cristalería de laboratorio

- a. Estándares: Donepezilo

b. Reactivos:

- 1) Agua HPLC
- 2) Acetonitrilo HPLC
- 3) Metanol HPLC
- 4) 1-decanosulfonato de sodio
- 5) Ácido perclórico

c. Cristalería

- 1) Balones volumétricos de 25, 100 y 1000 mL
- 2) Pipetas volumétricas de 3, 4, 5, 6 y 7 mL
- 3) Viales HPLC
- 4) Beaker de 100 mL
- 5) Varilla de vidrio
- 6) Espátula
- 7) Baño ultrasónico
- 8) Probetas de 500 y 1000 mL

3. Lugar

Laboratorios y Droguería Pharmadel S.A., Departamento de Investigación y Desarrollo,
Área Analítica

C. Aspectos económicos

Cuadro No. 2

Aspectos económicos para trabajo de investigación

	Material	Capacidad	Costo individual (Q)	Cantidad	Fuente de financiamiento
	Estándar Donepezilo	-	1023.36	200 mg	Laboratorios y Droguería Pharmadel S.A.
Reactivos	Agua HPLC	-	775.85	1 L	Laboratorios y Droguería Pharmadel S.A.
	Acetonitrilo HPLC	-	667.23	2 L	Laboratorios y Droguería Pharmadel S.A.

	Material	Capacidad	Costo individual (Q)	Cantidad	Fuente de financiamiento
	Metanol HPLC	-	1505.15	1 L	Laboratorios y Droguería Pharmadel S.A.
	1-decanosulfonato de sodio	-	710.53	10 g	Laboratorios y Droguería Pharmadel S.A.
	Ácido perclórico	-	2154.67	10 mL	Laboratorios y Droguería Pharmadel S.A.
Depreciación de equipo	HPLC chromaster	-	8333.00	1	Laboratorios y DrogueríaQ Pharmadel S.A.
	Balones volumétricos	25 mL	215	15	Laboratorios y Droguería Pharmadel S.A.
	Balones volumétricos	100 mL	240	2	Laboratorios y Droguería Pharmadel S.A.
	Balones volumétricos	250 mL	288	1	Laboratorios y Droguería Pharmadel S.A.
	Balones volumétricos	1000 mL	300	2	Laboratorios y Droguería Pharmadel S.A.
Cristalería y materiales de laboratorio	Pipetas volumétricas	3 mL	21	1	Laboratorios y Droguería Pharmadel S.A.
	Pipetas volumétricas	4 mL	30	2	Laboratorios y Droguería Pharmadel S.A.
	Pipetas volumétricas	5 mL	45	5	Laboratorios y Droguería Pharmadel S.A.
	Pipetas volumétricas	6 mL	53	2	Laboratorios y Droguería Pharmadel S.A.
	Pipetas volumétricas	7 mL	64	1	Laboratorios y Droguería Pharmadel S.A.
	Viales	-	201.72	50	Laboratorios y Droguería Pharmadel S.A.

Material	Capacidad	Costo individual (Q)	Cantidad	Fuente de financiamiento
Beaker	-	135	3	Laboratorios y Droguería Pharmadel S.A.
Varilla de vidrio	-	11.36	1	Laboratorios y Droguería Pharmadel S.A.
Espátula	-	20	1	Laboratorios y Droguería Pharmadel S.A.
Baño ultrasónico	-	4755.96	1	Laboratorios y Droguería Pharmadel S.A.
Probeta	500 mL	232	1	Laboratorios y Droguería Pharmadel S.A.
Probeta	1000 mL	468	1	Laboratorios y Droguería Pharmadel S.A.

VI. RESULTADOS

Cuadro No. 3

Aptitud del sistema obtenido a partir del método analítico utilizando cromatografía líquida de alta resolución Chromaster 5000

	Media	Desviación estándar	Coefficiente de variación
Tiempo de retención	1.98	0.00	0.20
Área	1355571.33	1763.60	0.13
Platos teóricos	2000.33	79.59	3.98

Datos experimentales a partir del software OpenLab versión 2.1 y Microsoft Excel 2013 versión 15.0.4420.1017.

Cuadro No. 4

Especificidad obtenida a partir del método analítico utilizando cromatografía líquida de alta resolución Chromaster 5000

No.	Longitud de onda	Análisis	Área
1	271	Estándar	1357817
2		Muestra	1437241
3		Placebo	0
4		Blanco	0
5		Diluyente	0

Datos experimentales a partir del software OpenLab versión 2.1 y Microsoft Excel 2013 versión 15.0.4420.1017.

Cuadro No. 5

Linealidad del sistema obtenida a partir del método analítico utilizando cromatografía líquida de alta resolución Chromaster 5000

Concentración (mg/mL)	Porcentaje	Coefficiente de correlación	Coefficiente de determinación	Intervalo de confianza
0.0066	60%			
0.0088	80%			
0.0110	100%	0.9999	0.9998	121208260% -123437074%
0.0132	120%			
0.0154	140%			

Datos experimentales a partir del software OpenLab versión 2.1 y Microsoft Excel 2013 versión 15.0.4420.1017.

Cuadro No. 6

Linealidad del método obtenida a partir del método analítico utilizando cromatografía líquida de alta resolución Chromaster 5000

Concentración (mg/mL)	Porcentaje	Coefficiente de correlación	Coefficiente de determinación	Intervalo de confianza	Intervalo de confianza del intercepto
0.0088	80%				
0.0110	100%	1.0000	0.9999	0.9938- 1.0068	-0.00005624% -0.00008941%
0.0132	120%				

Datos experimentales a partir del software OpenLab versión 2.1 y Microsoft Excel 2013 versión 15.0.4420.1017.

Cuadro No. 7

Exactitud obtenida a partir del método analítico utilizando cromatografía líquida de alta resolución Chromaster 5000

Concentración (mg/mL)	Porcentaje	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Intervalo de confianza
0.0088	80%			
0.0110	100%	0.1152%	0.1152%	99.95%-
0.0132	120%			100.13%

Datos experimentales a partir del software OpenLab versión 2.1 y Microsoft Excel 2013 versión 15.0.4420.1017.

Cuadro No. 8

Repetibilidad obtenida a partir del método analítico utilizando cromatografía líquida de alta resolución Chromaster 5000

No.	Porcentaje de Donepezilo Clorhidrato	Coefficiente de variación
1	105.20%	
2	106.79%	
3	106.18%	
4	105.69%	0.7494
5	105.11%	
6	104.62%	

Datos experimentales a partir del software OpenLab versión 2.1 y Microsoft Excel 2013 versión 15.0.4420.1017.

Cuadro No. 9

Precisión intermedia obtenida a partir del método analítico utilizando cromatografía líquida de alta resolución Chromaster 5000

No.	Porcentaje de Donepezilo Clorhidrato	Coefficiente de variación
1	101.63%	1.9184
2	104.16%	
3	102.99%	
4	102.62%	
5	101.11%	
6	101.09%	

Datos experimentales a partir del software OpenLab versión 2.1 y Microsoft Excel 2013 versión 15.0.4420.1017.

Cuadro No. 10

Límite de detección y cuantificación

Límite de detección	Límite de cuantificación
0.00005	0.00015

Datos experimentales a partir del software OpenLab versión 2.1 y Microsoft Excel 2013 versión 15.0.4420.1017.

VII. DISCUSIÓN

El objetivo principal del presente estudio fue validar un método analítico para la cuantificación de Donepezilo 10 mg en tabletas utilizando cromatografía líquida de alta resolución. Para esto, se debe de cuantificar el principio activo y verificar la metodología analítica propuesta para conocer si cumple con los parámetros propuestos en el manual de la empresa, la cual, se encuentra alineada a los requisitos de la USP. Al observar la monografía de la USP, este menciona diferentes parámetros a tomar en cuenta durante el análisis del principio activo a evaluar. Sin embargo, por diferentes motivos, algunos de ellos tuvieron que ser modificados para adaptarlos a las condiciones actuales del laboratorio.

La primera modificación fue la fase móvil debido a que la monografía hace mención del uso del 1-decanosulfonato de sodio. Este reactivo es considerado un tensioactivo aniónico que permite la separación de moléculas con carga positiva. Se conoce que el Donepezilo es una molécula que, en condiciones ácidas y con ayuda del tensioactivo, puede separarse de forma eficiente para tener una mejor resolución de picos (Merck, 2022). Sin embargo, se hizo el cambio en la fase debido a la ausencia de este reactivo en el laboratorio en el que se analizó. Como fase final se tomó una proporción 65:35 buffer-acetonitrilo, el cual, también brindó gráficos con una resolución clara de los picos a analizar.

Además, la fase debe tener un pH de 1.8 pero no se contaba con columnas que fueran compatibles con fases menores de 2.0. Se disminuyó el buffer hasta 2.3, lo cual, permitió que el medio de disolución proveyera una acidez eficiente para que la molécula pueda disociarse efectivamente y poder ser visible en los cromatogramas obtenidos. Este puede ser considerado un cambio significativo debido a que el capítulo general <791> de la USP provee información sobre la variación de pH que es aceptable para considerarse significativo; en este se estipula un ± 0.2 del valor establecido. Se debe a que el pH es mayor

al valor máximo permitido para considerarse insignificante que este es considerado un cambio del procedimiento (USP 46-NF 41, 2023).

Para el primer parámetro establecido, aptitud del sistema (Cuadro No. 3), se efectúan seis repeticiones para determinar la estadística del tiempo de retención, el área y los platos teóricos. En el caso del tiempo de retención y el área, se evalúa el resultado obtenido por el coeficiente de variación, siendo el criterio de aceptación menor o igual a 2%.

Al observar los datos obtenidos se puede determinar que ambos cumplen con la medida de dispersión permitidos. Para los platos teóricos se utiliza la media, tomando un criterio de aceptación de más de 1000. Dado que el resultado final fue de 2000.33 se puede concluir que el parámetro cumple.

El segundo parámetro a evaluar fue la especificidad (Cuadro No. 4), obteniendo resultados cromatográficos de cinco analitos: estándar, muestra, placebo, blanco y diluyente. Los datos finales del área permiten concluir que el método no demuestra interferencia de los excipientes, el agua (blanco) y el diluyente (HCl 0.1 N).

La linealidad del sistema (Cuadro No. 5) se determina empleando una serie de 5 puntos del estándar en diferentes concentraciones representadas en porcentajes (60, 80, 100, 120 y 140). Los cálculos estadísticos incluyen el coeficiente de correlación, coeficiente de determinación y el intervalo de confianza; los criterios de aceptación serían: mayor o igual a 0.9900, mayor o igual a 0.9800 y la ausencia del cero respectivamente. A partir de los resultados presentados en el cuadro correspondiente se determina que los tres cálculos cumplen con su especificación.

En el Cuadro No. 6 se presentan los resultados obtenidos de la linealidad del método, los cuales corresponden a: el coeficiente de correlación, coeficiente de determinación, el intervalo de confianza para la pendiente y el intervalo de confianza para el intercepto. Los criterios de aceptación respectivos serían: mayor o igual a 0.9900, mayor o igual a 0.9800, el límite debe incluir la unidad y el último debe de incluir el cero. Los datos finales demuestran que el parámetro es aprobado según los criterios establecidos para este.

Para el parámetro de la exactitud se debe de hacer una lectura a tres concentraciones diferentes que deben de cumplir con un intervalo de confianza entre el 95-105%, un

coeficiente de variación menor o igual al 2.0% y la desviación estándar. En el Cuadro No. 7 se presentan los datos finales en lo que se determina que los criterios de aceptación del intervalo y el coeficiente cumplen con lo requerido. Por otro lado, la desviación nos permite concluir que la dispersión de los datos es poco significativa.

En el caso de la precisión se toma en cuenta dos procesos que permiten determinar si este cumple o no, los cuales son: la repetibilidad y la precisión intermedia. En ambos casos se toma el coeficiente de variación como el resultado válido para conocer si el parámetro es aceptable. En este contexto, se conoce que el resultado debe ser menor o igual a 6.0. A partir de lo que se observa en el Cuadro No. 8 y 9 se puede concluir que este parámetro cumple con el criterio establecido.

Por último, el límite de identificación y de cuantificación se determinan para conocer cual es la cantidad mínima que proporciona una respuesta y la cantidad mínima que proporciona una respuesta medible para el método propuesto. Los datos se calculan a partir de la curva presente en la linealidad del método y la desviación estándar.

VIII. CONCLUSIONES

- A. Se validó un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución con detector UV, el cual, cumple con los requisitos establecidos por el instructivo de la empresa cuyos parámetros se encuentran alineados a los del RTCA y la USP para la cuantificación de Donepezilo 10 mg en tabletas.
- B. El método analítico puede ser validado debido a cambios significativos en la fase móvil a comparación del procedimiento presentado en la monografía USP para el Donepezilo.
- C. En la aptitud del sistema se determina que cumple debido a que el tiempo de retención y el área poseen un coeficiente de variación menor o igual al 2%. Además, los platos teóricos también cumplen con el criterio de aceptación siendo mayores a 1000.
- D. Se determina que la especificidad cumple al evaluar los datos obtenidos del cromatograma y demostrar que no hay interferencia entre estos.
- E. Para la linealidad del sistema se toma en cuenta el coeficiente de correlación, el coeficiente de determinación y el intervalo de confianza; dado que los datos obtenidos son mayores o iguales a 0.9900, mayores o iguales a 0.9800 y la ausencia del cero respectivamente se puede concluir que estos cumplen.
- F. En la linealidad del método se evalúa el coeficiente de correlación, el de determinación, y los intervalos de confianza de la pendiente y el intercepto. Se

determina que los resultados obtenidos cumplen con los criterios de aceptación de cada uno de los parámetros estadísticos.

- G. La exactitud cumple con el intercalo de confianza, el coeficiente de variación y la desviación estándar establecidos.
- H. Se determinó la repetibilidad y la precisión intermedia como el parámetro general de precisión. A partir de los datos obtenidos se puede determinar que los dos análisis cumplen con el criterio de aceptación del coeficiente de variación estipulado.
- I. Tanto el límite de identificación como el de cuantificación proporcionan una respuesta medible para el analito (Donepezilo) en el método propuesto.

IX. RECOMENDACIONES

- A. Se recomienda utilizar un estándar certificado que sea confiable y que su pureza sea mayor del 95% para la validación del método.
- B. El uso del Donepezilo debe llevarse a cabo con equipo de seguridad debido a que puede afectar negativamente en el sistema nervioso e incluso llevar a la muerte.
- C. Para tener un estudio más completo se puede complementar con un análisis de disolución y de uniformidad de contenido.
- D. Utilizar otros análisis de fuentes confiables podría proveer información que pueda ser de utilidad para el desarrollo del método.
- E. Para el desarrollo es necesario comprender las características fisicoquímicas del principio activo para poder establecer cambios efectivos en la metodología.

X. REFERENCIAS

- Ahumada, D., Paredes, C., Abella, J., & González, I. (2023). *Validación de métodos de análisis químico cuantitativo*.
https://hub.unido.org/sites/default/files/publications/Validacion-de-metodos-en-analisis-quimico-cuantitativo_compressed.pdf
- CIMA. (2023). *Donepezilo Clorhidrato*.
https://cima.aemps.es/cima/dochtml/p/74174/Prospecto_74174.html#6
- CIPAM. (2005). *Buenas prácticas de validación*.
<https://online.fliphtml5.com/xruk/saqf/#p=3>
- Committee for Medicinal Products for Human Use. (2023). *ICH Q2 (R2) Guideline on validation of analytical procedures*.
https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q2r2-guideline-validation-analytical-procedures-step-5-revision-1_en.pdf
- Drugbank. (2020). *Donepezil Hydrochloride*.
<https://go.drugbank.com/salts/DBSALT000938>
- Franco, A. (2002). *Guía para validar métodos analíticos nuevos o modificados para productos farmacéuticos* [Título universitario, Universidad San Carlos de Guatemala]. http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_0293.pdf
- Laboratorios y Droguería Pharmadel S.A. (2021). *Validación de Metodologías Analíticas*.
- Liew, K., Peh, K., & Fung, Y. (2013). *RP-HPLC analytical method development and optimization for quantification of donepezil hydrochloride in orally disintegrating tablet*. 26(5), 961-966.
- Merck. (2022). *1-decanosulfonato de sodio*.
<https://www.sigmaaldrich.com/GT/es/product/sigma/d3412#product-documentation>

- Pássaro, C., Rivera, C., Román, M., Cardona, L., Muñoz, L., David, D., Quinceno, J., & Rojas, L. (2016). *Guía sobre principios básicos de cromatografía y sus aplicaciones*.
https://repositorio.sena.edu.co/bitstream/handle/11404/4694/guia_cromatograf%Ea.pdf;jsessionid=BA1DD38959E5943D1D1B5B266E548A28?sequence=1
- Pubchem. (2024). *Donepezil Hydrochloride*.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Donepezil-Hydrochloride>
- RTCA 11.03.39:06. (2006). *Productos Farmacéuticos. Validación de métodos analíticos para la evaluación de la calidad de los medicamentos*.
- Sgariglia, M., Soberón, J., Sampietro, D., & Vattuone, M. (2010). *Cromatografía: Conceptos y aplicaciones*. 2(1), 1-6.
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2015). *Fundamentos de química analítica / Douglas A. Skoog, Donald M. West, F. James Holler, Stanley R., Crouch ; traducción Dr. Eugenio de la Mora Lugo, M. en C. Jesús Miguel Torres Flores (E. de la Mora Lugo, Trad.; Novena edición)*. Cengage Learning.
- Sugimoto, H. (1998). *Alzheimer's Disease Treatment-The Aricept R&D Story*.
<https://www.eisai.com/company/profile/history/products/aricept/index.html>
- UNODC. (2010). *Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos*.
https://www.unodc.org/documents/scientific/Validation_Manual_STNAR41_Ebook_S.pdf
- USP 43-NF 38. (2020). *United States Pharmacopeia and National Formulary*.
- USP 46-NF 41. (2023). *United States Pharmacopeia and National Formulary*.
- Volonté, M. (2013). *Cromatografía Líquida de Alta Resolución*.
https://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/150656/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y

World Health Organization. (2018). *Annex 10. Stability testing of active pharmaceutical ingredients and finishes pharmaceutical products.*

https://cdn.who.int/media/docs/default-source/medicines/norms-and-standards/guidelines/regulatory-standards/trs1010-annex10-who-stability-testing-of-active-pharmaceutical-ingredients.pdf?sfvrsn=7cb7a4c9_4&download=true

XI. ANEXOS

A. Características del equipo utilizado

1. Balanza analítica
Balanza OHAUS PR Series
2. Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución
 - a. Detector UV Chromaster 5410
 - b. Horno Chromaster 5310
 - c. Automuestreador Chromaster 5260
 - d. Bomba Chromaster 5160

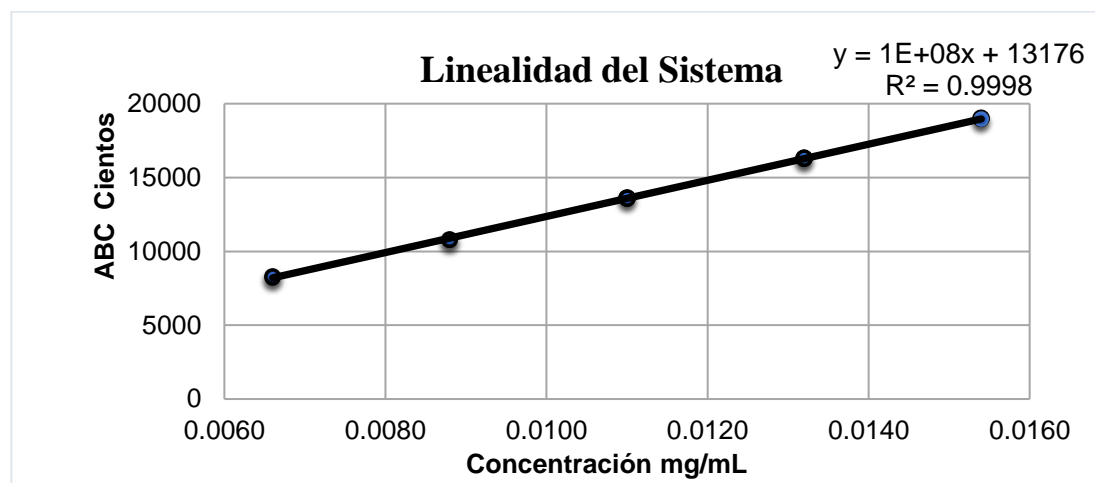
B. Glosario

1. Aptitud del sistema: Pruebas desarrolladas para la verificación del sistema cromatográfico y su adecuación para el análisis a efectuar (Laboratorios y Droguería Pharmadel S.A., 2021).
2. Especificidad, selectividad: Capacidad para la identificación o cuantificación de los analitos de interés (Laboratorios y Droguería Pharmadel S.A., 2021).
3. Exactitud: Proximidad de los resultados obtenidos mediante el método y valor verdadero (Laboratorios y Droguería Pharmadel S.A., 2021).
4. Linealidad: Capacidad de obtención de resultados que sean proporcionales a la concentración de analito en las muestras (Laboratorios y Droguería Pharmadel S.A., 2021).
5. Precisión: Grado de concordancia entre la serie de mediciones individuales de múltiples muestreos (Laboratorios y Droguería Pharmadel S.A., 2021).
6. Validación: Establecimiento de evidencia documentada de un método analítico que brinda un alto grado de seguridad para obtención de resultados precisos y exactos (Laboratorios y Droguería Pharmadel S.A., 2021).

C. Gráficas de linealidades

Gráfico No. 1

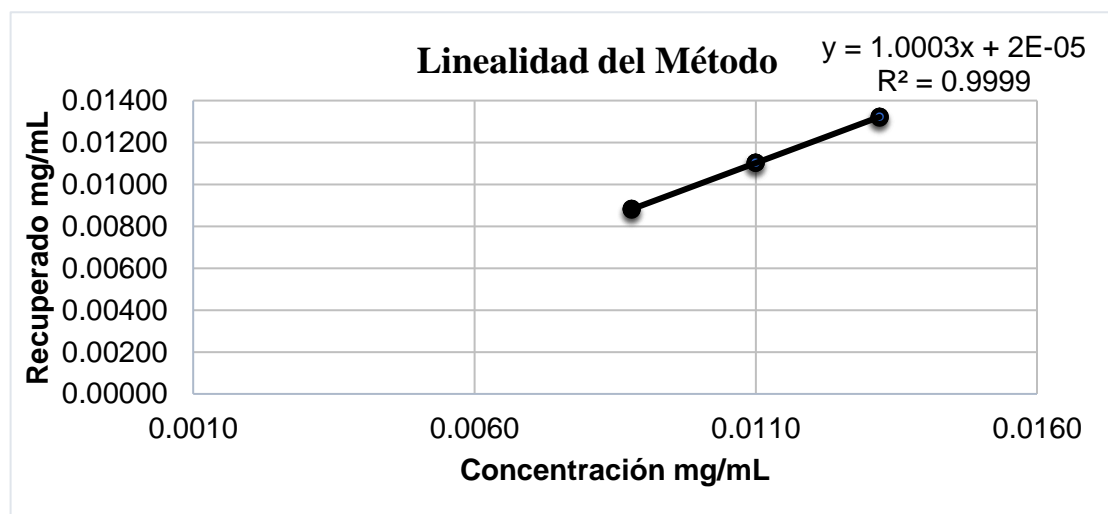
Linealidad del sistema obtenida a partir del método analítico utilizando cromatografía líquida de alta resolución Chromaster 5000



Datos experimentales a partir del software OpenLab versión 2.1 y Microsoft Excel 2013 versión 15.0.4420.1017.

Gráfico No. 2

Linealidad del método obtenida a partir del método analítico utilizando cromatografía líquida de alta resolución Chromaster 5000



Datos experimentales a partir del software OpenLab versión 2.1 y Microsoft Excel 2013 versión 15.0.4420.1017.

D. Datos de pruebas de métodos

Cuadro No. 11.

Datos estadísticos de la aptitud del sistema

Tiempo de retención	Área	Platos teóricos	
Media	1.98	1355571.33	2000.33
Desv. Std	0.00	1763.60	79.59
C.V.	0.20	0.13	3.98

Cuadro No. 12

Datos estadísticos de la especificidad

No.	Longitud de onda	Análisis	Área
1		Estándar	1357817
2		Muestra	1437241
3	271.00	Placebo	0
4		Blanco	0
5		Diluyente	0

Cuadro No. 13.

Datos estadísticos de la linealidad del sistema

Parámetro	Resultado
n	15
Pendiente	122322667
Ordenada	13176
Coefficiente de correlación (r)	0.9999
Coefficiente de determinación (r ²)	0.9998
Límite Superior	123437074
Límite Inferior	121208260

Cuadro No. 14.

Datos estadísticos de la linealidad del método

Parámetro	Resultado
n	9
Pendiente	1.0003
Ordenada	0.0000
Coefficiente de correlación (r)	1.0000
Coefficiente de determinación (r ²)	0.9999
Límite Superior de la pendiente	1.0068
Límite Inferior de la pendiente	0.9938
Límite Superior del intercepto	0.00008941
Límite Inferior del intercepto	-0.00005624

Cuadro No. 15.

Datos estadísticos de la exactitud

Parámetro	Resultado
n	9
Media	100.04%
Desviación Estándar	0.1152%
Coefficiente de Variación	0.1152%
Límite Superior	100.13%
Límite Inferior	99.95%

Cuadro No. 16.

Datos estadísticos de la precisión

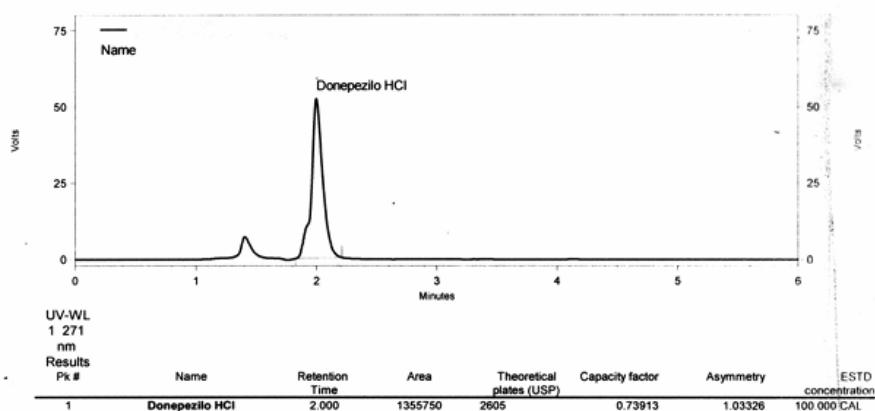
	Parámetro	Resultado
	n	6
Repetibilidad	Media	105.60
	Desviación Estándar	0.79
	Coefficiente de Variación	0.75
	Media	103.93
Precisión intermedia	Desviación Estándar	1.9939
	Coefficiente de Variación	1.9184

E. Cromatogramas de referencia obtenidos

Gráfico No. 3.

Cromatograma de estándar para especificidad de Donepezilo

Identificación de la muestra : STD 100% - Donepezilo BP 4604
Volumen de Inyeccion : 20 uL

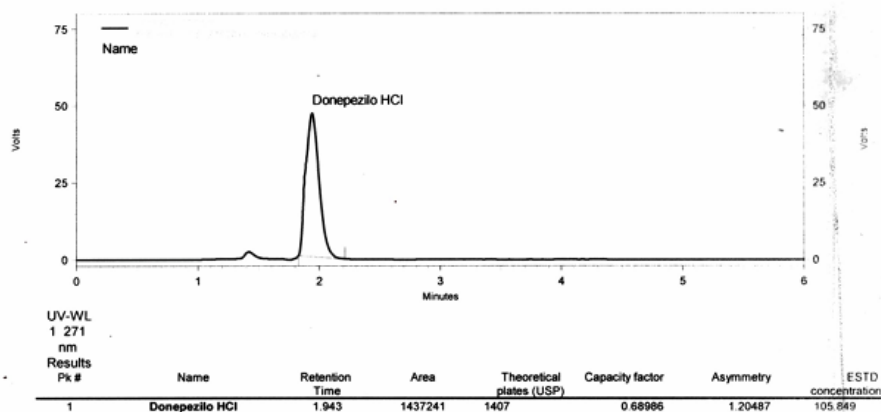


El Estándar se compone de una solución de Estándar de Donepezilo en el que se pesó un equivalente a lo establecido para la Muestra y fue diluido en HCl 0.1 N.

Gráfico No. 4.

Cromatograma de muestra para repetibilidad de Donepezilo

Identificación de la muestra : MX 100% - LPL24050 01 Repetibilidad
Volumen de Inyeccion : 20 uL

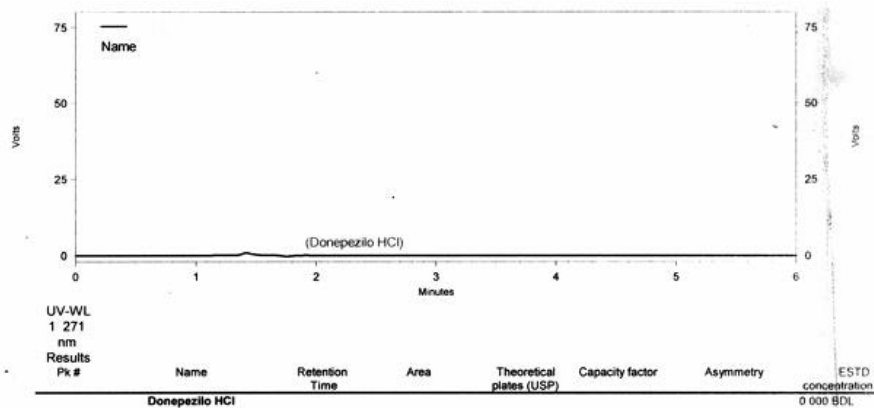


La Muestra es una solución de un peso calculado de Donepezilo a partir de el polvo obtenido de la maceración de 10 tabletas recubiertas con el principio activo y fue diluido en HCl 0.1 N.

Gráfico No. 5.

Cromatograma de placebo para especificidad de Donepezilo

Identificación de la muestra : PCB QD
Volumen de Inyección : 20 uL

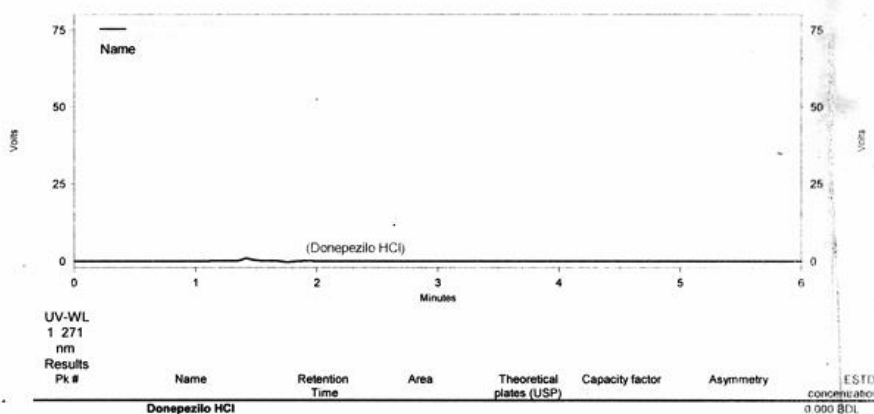


El Placebo se elaboró a partir de una solución de un peso equivalente al de la Muestra a partir de la mezcla de excipientes que no contuvieran el principio activo en la formulación y fue diluido en HCl 0.1 N.

Gráfico No. 6.

Cromatograma de blanco para especificidad de Donepezilo

Identificación de la muestra : BLANCO QD
Volumen de Inyección : 20 uL

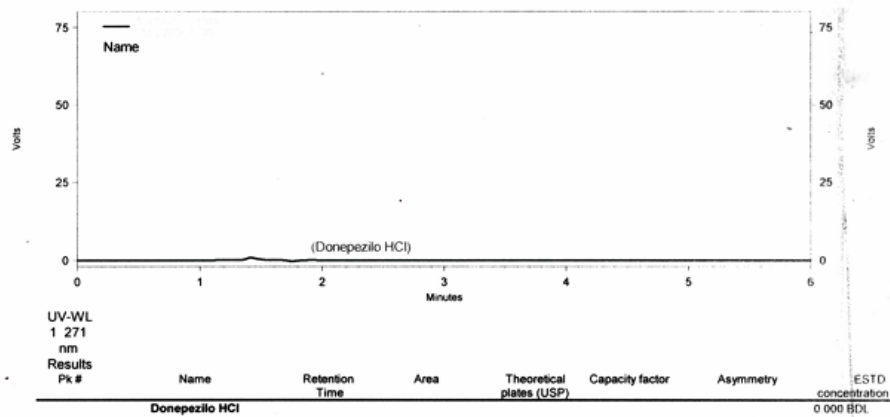


El Blanco se elaboró a partir de una solución de HCl en agua 0.1 N según lo necesario para la elaboración de todas las muestras y análisis respectivos.

Gráfico No. 7.

Cromatograma de diluyente para especificidad de Donepezilo

Identificación de la muestra : DILUYENTE QD
Volumen de Inyeccion : 20 uL



El Diluyente se compone de la proporción de HCl en agua para obtener una solución con concentración de 0.1 N.