



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

***“OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN
MÉTODO ANALÍTICO POR CLAR ACOPLADO A
UN DETECTOR MS-MS PARA LA
CUANTIFICACIÓN DE DONEPECILO EN
PLASMA”***

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

ERIKA FLORES ARANDA



CIUDAD DE MÉXICO

AÑO 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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: Profesor: HELGI HELENE JUNG COOK

VOCAL: Profesor: JUAN MANUEL RODRIGUEZ

SECRETARIO: Profesor: MARÍA ISABEL RUIZ OLMEDO

1er. SUPLENTE: Profesor: KENNETH RUBIO CARRASCO

2° SUPLENTE: Profesor: DAVID BRAVO LEAL

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INVESTIGACIÓN FARMACOLÓGICA Y BIOFARMACÉUTICA S.A.P.I. DE C.V.

ASESOR DEL TEMA:

DRA. EN C. MARÍA ISABEL RUIZ OLMEDO

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. EN A. OMAR EMMANUEL HERNÁNDEZ PIÑA

SUSTENTANTE:

ERIKA FLORES ARANDA

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	14
2. GENERALIDADES	16
2.1. Evaluación de la bioequivalencia de un Medicamento Genérico	16
2.2. Generalidades del principio activo y propiedades fisicoquímicas	17
2.3. Clasificación ATC y clasificación biofarmacéutica	18
2.4. Propiedades farmacológicas	19
2.4.1. Farmacodinamia	19
2.4.2. Farmacocinética	19
2.5. Uso terapéutico, posología y forma de administración	20
2.6. Reacciones adversas	20
2.7. Parámetros farmacocinéticos para donepecilo	20
2.8. Método bioanalítico	23
2.9. Validación de métodos bioanalíticos	24
2.10. Fundamentos de espectrometría de masas	26
2.10.1. Introducción de la muestra	26
2.10.2. Cromatografía de líquidos de alta resolución	26
2.10.3. Fuente de ionización	27
2.10.3.1. Ionización por electrospray	27
2.10.4. Analizador	28
2.10.4.1. Analizador masas de cuadrupolo	28
2.10.5. Detector	29
2.10.6. Procesador de datos	29

3. OBJETIVOS	30
4. DESARROLLO EXPERIMENTAL	31
4.1. Optimización y validación del método bioanalítico	31
4.1.1. Optimización	31
4.1.1.1. Determinación de las condiciones de ionización	31
4.1.1.2. Determinación de las condiciones cromatográficas	31
4.1.1.3. Condiciones de extracción de la muestra plasmática	32
4.2. Validación del método analítico para cuantificar donepecilo en plasma.	32
4.2.1. Adecuabilidad del sistema	32
4.2.2. Preparación de curva de calibración y muestras control de calidad en plasma	33
4.2.3. Método de extracción	34
4.2.4. Selectividad	35
4.2.5. Efecto matriz	36
4.2.6. Prueba de acarreo	36
4.2.7. Respuesta cruzada	37
4.2.8. Curva de calibración	37
4.2.9. Precisión	38
4.2.9.1. Repetibilidad	38
4.2.9.2. Reproducibilidad	39
4.2.10. Exactitud	39
4.2.11. Reproducibilidad de la reinyección	39
4.2.12. Estabilidad	40

4.2.13. Estabilidad en solución _____	41
4.2.14. Recobro _____	42
4.3. Aplicación del método Bioanalítico al estudio de bioequivalencia _____	43
5. RESULTADOS Y ANÁLISIS _____	45
5.1. Optimización del método analítico _____	45
5.2. Validación del método _____	48
5.2.1. Adecuabilidad del sistema _____	48
5.3. Selectividad _____	49
5.4. Efecto matriz _____	50
5.5. Acarreo _____	51
5.6. Respuesta cruzada _____	52
5.7. Curva de calibración _____	52
5.8. Precisión y exactitud _____	54
5.8.1. Repetibilidad _____	54
5.8.2. Reproducibilidad _____	55
5.9. Reproducibilidad de la reinyección _____	56
5.10. Estabilidad _____	57
5.10.1. Estabilidad a corto plazo (temperatura ambiente, refrigeración y congelación) _____	57
5.10.2. Estabilidad a largo plazo _____	59
5.10.3. Estabilidad de la muestra procesada en automuestreador _____	59
5.10.4. Estabilidad de la muestra procesada en refrigeración _____	60
5.10.5. Estabilidad en extracto seco _____	60

5.10.6. Ciclos de congelación-descongelación _____	61
5.11. Estabilidad en solución _____	62
5.12. Recobro _____	64
5.13. Aplicación del método en un estudio de bioequivalencia en voluntarios sanos _____	66
6. CONCLUSIONES _____	68
7. ANEXOS _____	69
7.1. Instrumentos, equipos, material, reactivos y disolventes _____	69
7.1.1. Instrumentos y equipos _____	69
7.1.2. Material _____	69
7.1.3. Reactivos y disolventes _____	70
7.1.4. Sustancias de referencia _____	71
7.1.5. Preparación de soluciones _____	71
7.1.6. Preparación de las soluciones estándar y adecuabilidad del sistema	72
7.2. Imágenes _____	75
7.2.1. Selectividad _____	75
7.2.2. Acarreo _____	79
7.2.3. Respuesta cruzada _____	80
8. BIBLIOGRAFIA _____	83

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características y propiedades fisicoquímicas de donepecilo 18

Tabla 2. Parámetros farmacocinéticos reportados por Yihong Lu y cols., 2004....21

Tabla 3 Parámetros farmacocinéticos reportados por Almeida y cols., 2010..... 21

Tabla 4 Métodos para cuantificar donepecilo 22

Tabla 5 Comparación de NOM-177-SAA1-2013, Resolución RCD No. 27 24

Tabla 6 Condiciones evaluadas en la determinación de condiciones cromatográficas
..... 32

Tabla 7 Preparación de la curva de calibración y muestras control de calidad 33

Tabla 8 Preparación de muestras control de calidad en solución 36

Tabla 9 Condiciones para evaluar la estabilidad de donepecilo..... 41

Tabla 10 Preparación de muestras control de calidad en solución 43

Tabla 11 Condiciones cromatográficas del CLAR 46

Tabla 12 Condiciones de ionización en la interface 47

Tabla 13 Parámetros dependientes de donepecilo y donepecilo-d7 HCl (E.I.) 47

Tabla 14 Adecuabilidad de sistema para las corridas analíticas de validación 49

Tabla 15 Factor matriz normalizado para donepecilo..... 51

Tabla 16 Error relativo global de los diferentes arreglos matemáticos 52

Tabla 17 Resultados de la curva de calibración 53

Tabla 18 Parámetros de las curvas de calibración 53

Tabla 19 Resultados de la repetibilidad del método analítico 55

Tabla 20 Resultados de la reproducibilidad entre días..... 56

Tabla 21 Reproducibilidad de la reinyección (28 horas)..... 57

Tabla 22 Estabilidad de donepecilo en plasma a temperatura ambiente (15-30 °C)
21 horas 58

Tabla 23 Estabilidad de donepecilo en plasma en refrigeración (2-8 °C) 21 horas58

Tabla 24 Estabilidad de donepecilo en plasma en congelación (temperatura no
mayor a -20 °C) 88 horas 58

Tabla 25 Estabilidad a largo plazo de donepecilo en plasma en congelación (-70±10
°C) durante 63 días 59

Tabla 26 Estabilidad de donepecilo en muestra procesada en automuestreador (15 °C) 48 horas	60
Tabla 27 Estabilidad de donepecilo en muestra procesada en refrigeración (2-8 °C) 24 horas	60
Tabla 28 Estabilidad de donepecilo en extracto seco en refrigeración (2-8 °C) 15 horas	61
Tabla 29 Estabilidad de donepecilo a cuatro ciclos de congelación-descongelación (-70±10 °C).....	61
Tabla 30 Resumen de la estabilidad de donepecilo en la matriz biológica y en la muestra procesada.....	62
Tabla 31 Estabilidad de la solución estándar principal A de donepecilo (100.157 µg/mL) a temperatura ambiente (15-30 °C), refrigeración (2-8 °C) y congelación (-70±10 °C)	63
Tabla 32 Estabilidad de la solución estándar de trabajo D de donepecilo (0.100 µg/mL) a temperatura ambiente (15-30 °C), refrigeración (2-8 °C) y congelación (-70±10 °C)	64
Tabla 33 Recobro absoluto del método analítico para cuantificar donepecilo en plasma.....	65
Tabla 34 Recobro absoluto de donepecilo-d7 HCl en plasma	65
Tabla 35 Estadística descriptiva para las concentraciones plasmáticas de donepecilo con respecto al tiempo	66
Tabla 36 Parámetros farmacocinéticos para donepecilo.....	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura. 1 Estructura química de donepecilo 17

Figura. 2 Diagrama de la configuración del sistema para espectrometría de masas 26

Figura. 3 Esquema de los componentes de un HPLC..... 27

Figura. 4 Fuente de ionización por Electrospray (ESI) 28

Figura. 5 Diagrama de un analizador de masas cuadrupolo 28

Figura. 6 Diagrama del método de extracción para donepecilo y donepecilo-d7 de la matriz biológica 34

Figura. 7 Cromatograma representativo del límite inferior de cuantificación de donepecilo..... 47

Figura. 8 Espectro de masas de donepecilo, Ion precursor (380.4 m/z) Ion producto (91.0 m/z) 48

Figura. 9 Curva de calibración para cuantificar donepecilo en plasma 54

Figura. 10 Perfil farmacocinético promedio de donepecilo ± error estándar 67

Figura. 11 Cromatograma del límite inferior de cuantificación..... 75

Figura. 12 Cromatograma de la selectividad a la matriz biológica de fuentes individuales de plasma (F-1655, F-1656) 75

Figura. 13 Cromatogramas de la selectividad a la matriz biológica de fuentes individuales de plasma (F-1823, F-1827, F-1828, F1830)..... 76

Figura. 14 Cromatogramas de la selectividad a la matriz biológica de fuentes individuales de plasma hemolizado (M-335) y lipémico (L-1691) 77

Figura. 15 Cromatograma de la selectividad a fármacos de uso común 77

Figura. 16 Cromatogramas de la selectividad a fármacos de uso común 78

Figura. 17 Cromatograma del límite inferior de cuantificación para la determinación de acarreo 79

Figura. 18 Cromatogramas del acarreo para donepecilo (DNP) y donepecilo-d7 HCl (DNPD7), doble blanco (DBCO), límite superior de cuantificación (LSC) 79

Figura. 19 Cromatogramas del acarreo para donepecilo (DNP) y donepecilo-d7 HCl (DNPD7), doble blanco (DBCO) 80

Figura. 20 Cromatogramas del límite inferior de cuantificación para la determinación de respuesta cruzada 80

Figura. 21 Cromatogramas de la respuesta cruzada para donepecilo (DNP) y donepecilo-D7 HCl (DNPD7), doble blanco (DBCO), blanco (BCO) 81

Figura. 22 Cromatogramas de la respuesta cruzada para donepecilo (DNP) y donepecilo-D7 HCl (DNPD7), doble blanco (DBCO), blanco (BCO) 82

ABREVIATURAS

%	Porcentaje
\bar{x}	Promedio
\pm	Más menos
\leq	Menor o igual
\geq	Mayor o igual
μg	Microgramos
μL	Microlitro
AChE	Acetilcolinesterasa
ACN	Acetonitrilo
BCO	Blanco
CCA	Control de calidad alto
CCAS	Control de calidad alto en solución
CCB	Control de calidad bajo
CCBB	Control de calidad bajo B
CCBS	Control de calidad bajo en solución
CCD	Control de calidad diluido
CCM	Control de calidad medio
CCMS	Control de calidad medio en solución
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución líquida de alta resolución (HPLC high performance liquid chromatography)
Conc.	Concentración
CP	Estándar de calibración
CPDA	Anticoagulante de citrato fosfato dextrosa adenina (CPDA: citrate phosphate dextrose adenine)
CV %	Porcentaje del coeficiente de variación
CYP	Citocromo
D. E.	Desviación estándar
DBCO	Doble blanco
Desv. Abs.	Desviación absoluta

DNP	Donepecilo
DNP-d7	Donepecilo-d7
E.I.	Estándar interno
ER%	Error relativo
ESI	Ionización por electrospray
FMN	Factor matriz normalizado
h	Horas
Kg	Kilogramos
kV	Kilovoltio
L	Litro
LIC	Límite inferior de cuantificación
LSC	Límite superior de cuantificación
M	Molar
m/z	Relación masa-carga
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MS	Espectrometría de masas
MS-MS	Espectrometría de masas-masas
N/A	No aplica
ng	Nanogramos
°C	Grados Celsius
pH	Potencial de hidrógeno
pKa	Constante de disociación ácida
r	Coefficiente de correlación
rpm	Revoluciones por minuto
Sol.	Solución
UV	Detector de espectrofotometría ultravioleta

v/v	Relación volumen/volumen
λ	Lambda
$\Sigma ER\%$	Sumatoria del Por ciento de error relativo

1. INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, la demencia es un trastorno progresivo que deteriora la función cognitiva de las personas (OMS, 2017). La forma más común es el Alzheimer ya que tiene una prevalencia del 60 al 70% en relación al total de demencias reportadas. Generalmente los síntomas de dicha enfermedad se presentan alrededor de los 65 años de edad tanto en hombres como en mujeres y se estima que más de 13 millones de adultos mayores de 60 años han sido diagnosticados en los últimos años; las cifras proyectadas para el año 2050 indican que el número de mexicanos afectados será de más de 3.5 millones.

Al presentar este padecimiento un proceso degenerativo el objetivo del tratamiento va enfocado a promover la independencia del paciente, mantener su funcionalidad y tratar síntomas cognitivos y de conducta. Para ello, se utilizan medicamentos que inhiben a la enzima acetilcolinesterasa como el donepecilo, el cual está indicado para el tratamiento sintomático de la demencia severa a consecuencia del Alzheimer.

Es evidente que ante la alta incidencia de esta enfermedad así como de otras enfermedades que aquejan a la población mexicana se han tomado medidas para salvaguardar el bienestar de la población. Una de estas medidas es la Política de Medicamentos Genéricos, en donde la protección del paciente es la premisa principal y ello se refleja ante el establecimiento de un mercado sólidamente abastecido con medicamentos que presenten alternativas de precio, innovación y calidad, siendo todos estos seguros y eficaces y así propiciar un incremento del bienestar de las finanzas de las familias y del gobierno, para ello estudios de intercambiabilidad deben ser realizados por unidades denominadas como Tercer Autorizado, las cuales son personas físicas o morales que apoyan a la Autoridad Sanitaria para el control y vigilancia sanitarios.

Para el caso de donepecilo, el acuerdo que determina el tipo de prueba para demostrar la intercambiabilidad señala que se debe realizar una prueba tipo "C", lo cual corresponde a un estudio de bioequivalencia en humanos y debe ser realizado con base en lo descrito en la NOM-177-SSA1-2013.

Se deben obtener datos confiables de las concentraciones de muestras provenientes de un estudio de bioequivalencia y con ello determinar los parámetros farmacocinéticos que definirán la intercambiabilidad, razón por la cual el método bioanalítico debe ser validado previo al análisis de muestras de estudio.

Ante esta premisa, el presente trabajo tuvo como finalidad realizar la optimización y validación de un método bioanalítico por cromatografía líquidos de alta resolución acoplado a un detector MS-MS (LC/MS/MS) para la cuantificación de donepecilo en plasma. Dicha metodología fue aplicada para la cuantificación de muestras provenientes de un estudio de bioequivalencia para una forma farmacéutica de tabletas a una dosis de 10 mg donde demostró ser robusta y confiable.

2. GENERALIDADES

2.1. Evaluación de la bioequivalencia de un Medicamento Genérico

Actualmente la industria farmacéutica adquiere un papel importante en el ámbito del sector salud, al poseer los objetivos de investigar, desarrollar, producir y comercializar los productos que brinden a la población tratamientos eficaces y seguros para cubrir los padecimientos de mayor prevalencia, para esto en el mercado nacional se cuenta con medicamentos de referencia o innovadores, los cuales cuentan con la patente original a nivel mundial de igual manera, se tiene a los medicamentos de prueba o genéricos, que a través del Reglamento de Insumos para la Salud (RIS) se definen como equivalentes farmacéuticas ya que contiene el mismo fármaco o sustancia activa y forma farmacéutica, con igual concentración o potencia, que utiliza la misma vía de administración y que por medio de una evaluación para demostrar su intercambiabilidad, se determina que son equivalentes al medicamento de referencia (Salud 2014). Para determinar la equivalencia de un medicamento, la evaluación debe ser realizada a través de unidades conocidas como tercer autorizado, las cuales son empresas del sector privado que son autorizadas por la Secretaría de Salud para realizar con probidad, imparcialidad y de manera calificada actividades en apoyo al control sanitario (Salud, 2013).

Dichas unidades deben cumplir con la normatividad vigente en México y en otros países, por ejemplo, Brasil; deben seguir el tipo de prueba, el procedimiento y requisitos indicados para la evaluación de la equivalencia entre los dos medicamentos.

En México el Diario Oficial de la Federación cada cierto tiempo publica el acuerdo que determina el tipo de prueba para demostrar intercambiabilidad de medicamentos genéricos y en el caso de Brasil la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (ANVISA) es encargada de realizar la dicha actividad.

Para la evaluación la biodisponibilidad y la bioequivalencia se debe plantear un diseño que concuerde con los objetivos del estudio y de manera adicional se deben

tomar en cuenta aspectos relacionados a la cuantificación del analito de interés y/o sus metabolitos, la farmacodinamia del principio activo, la naturaleza del medicamento y evidentemente la vía de administración.

Para establecer la bioequivalencia los parámetros farmacocinéticos a determinar son: la concentración máxima (C_{max}) y el área bajo la curva (ABC) los cuales son indicativos de la velocidad de absorción y de la cantidad absorbida del medicamento en cuestión. El dictamen emitido se basa en el resultado de la evaluación del intervalo de confianza (IC) al 90% de las medias geométricas o promedios de los cocientes del medicamento de prueba y el de referencia para los parámetros farmacocinéticos ya mencionados con base al diseño del estudio establecido, el resultado obtenido se considera bioequivalente si se encuentran valores entre el 80% y 125% (Salud 2013) o considerando intervalos ampliados según sea el caso.

2.2. Generalidades del principio activo y propiedades fisicoquímicas

El clorhidrato de donepecilo es un compuesto heterocíclico potente y selectivo (figura 1), derivado de las n-bencilpiperidinas (Drugbank, 2017) cuyo mecanismo es inhibir la enzima acetilcolinesterasa. Sus propiedades fisicoquímicas se muestran en la tabla 1 en donde se pueden observar lo relacionado a la solubilidad y su comportamiento ácido base.

Es un medicamento aprobado para el tratamiento de la enfermedad del Alzheimer y se encuentra en el Cuadro Básico y Catálogo de Medicamentos (CSG, 2016) dentro del grupo terapéutico No.14 Neurología.

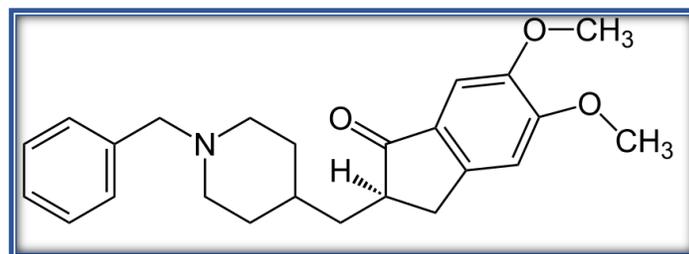


Figura. 1 Estructura química de donepecilo

Tabla 1. Características y propiedades fisicoquímicas de donepecilo

Características y propiedades fisicoquímicas	
Nombre IUPAC	2 - [(1-bencilpiperidin-4-il) metil] -5,6-dimetoxi-2,3-dihidro-1H-inden-1-ona
Fórmula condensada	C ₂₄ H ₂₉ NO ₃
Peso molecular	415.96 g/mol
Descripción física	Polvo blanco cristalino
Punto de fusión	206.72° C
Solubilidad	Agua y cloroformo: altamente soluble Ácido acético glacial y etanol: ligeramente soluble ACN: poco soluble Acetato de etilo: insoluble
Estabilidad	Es un fármaco estable a temperatura ambiente, entre 15 y 30° C y protegido de la luz y la humedad.
pKa	9.1
Coefficiente de distribución (Log D)	Reportado en octanol-agua pH Log D 1.7 0.71 4.6 0.84 6.5 2.18
Coefficiente de partición (Log P)	3.6

2.3. Clasificación ATC y clasificación biofarmacéutica

La clasificación anatómica, terapéutica, química (ATC) de donepecilo es N06DA02 (Drugbank, 2017):

- ❖ N: sistema nervioso
- ❖ N06: psicoanalépticos
- ❖ N06D: fármaco antidemencia
- ❖ N06DA: anticolinesterasas
- ❖ N06DA02: donepecilo

Respecto a la clasificación Biofarmacéutica es un principio activo Clase I alta permeabilidad, alta solubilidad (TRSL Inc, 2017).

2.4. Propiedades farmacológicas

2.4.1. Farmacodinamia

Es un inhibidor centralmente activo, no competitivo de la acetilcolinesterasa de segunda generación a base de piperidina, lo cual evita la hidrólisis de la acetilcolina en acetato y en colina (Drugbank, 2017).

Los inhibidores de la acetilcolinesterasa generan una acción colinérgica en forma indirecta, ya que prolongan la vida media de la acetilcolina endógena en su sitio de acción, generando la acumulación de la sustancia en el espacio sináptico (Mycek, 2005).

2.4.2. Farmacocinética

Donepecilo es bien absorbido en el tracto gastrointestinal y presenta una biodisponibilidad cercana al 100%, la cual no se ve afectada por los alimentos. Después de una administración oral de 5 mg, alcanza su concentración plasmática máxima en 3-4 horas, con una C_{max} entre 7.7–10.1 ng/mL (Noppamas Rojanasthien, 2012). Se sabe que es un medicamento que presenta una farmacocinética lineal en un rango de dosis de 1- 10 mg (Bhavin, 2008) y se une en un 75% a la albúmina y un 21% a la α 1-glucoproteína ácida (Drugs, 2017). Presenta un volumen de distribución de 12 L/Kg.

Se excreta principalmente en la orina de manera inalterada y se sabe que su principal vía de biotransformación es mediante el citocromo P450 enzimas CYP 2D6 y CYP 3A4 esto se evaluó mediante la administración de una dosis única de 5 mg de ^{14}C -radiomarcado, en donde la radioactividad en plasma, expresada como porcentaje de la dosis administrada demostró que se encuentra presente en el organismo en un 30% de manera inalterada, un 11% como 6-O-desmetil donepecilo el cual es el único metabolito que muestra una actividad similar al clorhidrato de donepecilo. Se identificaron 3 metabolitos más, estos no una actividad terapéutica de importancia.

El 57% del fármaco marcado fue recuperado en la orina del cual un 17% se encontró en orina y el 14.5% en heces de manera inalterada, indicando que la biotransformación y la eliminación urinaria son las vías principales de eliminación. No hay evidencia que sugiera una recirculación enterohepática. Finalmente su tiempo de vida de eliminación es de 70 horas aproximadamente.

2.5. Uso terapéutico, posología y forma de administración

Está indicado para el tratamiento sintomático de la enfermedad de Alzheimer de leve a grave moderada. El tratamiento se inicia con 5 mg/día (administrados una vez al día) la cual necesariamente debe ser administrada por vía oral por la noche, justo antes de acostarse.

La dosis de 5 mg se debe mantener durante al menos un mes con la finalidad de evaluar las primeras respuestas clínicas al tratamiento y que las concentraciones alcancen el estado estacionario. Con base en la respuesta clínica del tratamiento de la primera etapa la dosis puede aumentarse a 10 mg/día (administrados una vez al día).

2.6. Reacciones adversas

Los eventos adversos son de tipo leve y transitorio que generalmente causan náuseas, diarrea, calambres musculares, vómito y fatiga (Xie Zhiyong, 2006), algunos otros que se han documentado son: pérdida de peso, dolor de cabeza y raramente se tiene casos de bloqueos auriculoventricular, bradicardia, síncope y bloqueo sinoauricular (Medfase, 2017).

2.7. Parámetros farmacocinéticos para donepecilo

Varios ensayos de bioequivalencia y de tipo farmacocinético han sido reportados para este principio activo. Estos artículos y los ensayos realizados previamente en el laboratorio se tomaron en cuenta para el método y la curva de calibración.

Yihong Lu en el 2004 reportó un estudio farmacocinético en el que a 20 voluntarios jóvenes y sanos, en un diseño de estudio abierto, se administró una dosis oral única de 5 mg de donepecilo. Se tomaron muestras hasta 192 horas después de la

administración. Los parámetros farmacocinéticos que se obtuvieron en dicho estudio se presentan en la tabla 2.

Tabla 2 Parámetros farmacocinéticos reportados por Yihong Lu y cols., 2004

Parámetro	Valor promedio \pm DE (n=20)
C _{max} (ng/mL)	10.1 \pm 2.02
T _{max} (h)	3.10 \pm 0.55
t _{1/2} (h)	65.7 \pm 12.8
ABC _{0→192} (h*ng/mL)	485 \pm 150

Otro estudio fue realizado en el 2010 por Almeida y colaboradores, en dicho ensayo se evaluó la bioequivalencia de una nueva formulación de 10 mg frente al producto de referencia (según lo exigido por las autoridades reguladoras europeas). El diseño del estudio fue cruzado, aleatorizado, de dosis única, abierto de dos vías, las muestras plásticas se obtuvieron hasta las 288 horas después de la administración del medicamento en estudio.

Las muestras fueron analizadas por LC/MS/MS con una curva de calibración en un rango de 0.099-19.8 ng/mL.

Tabla 3 Parámetros farmacocinéticos reportados por Almeida y cols., 2010

Parámetro Farmacocinético	Producto de Referencia	Producto de Prueba
ABC _{0→288} (ng*h/mL)	674.262 \pm 205.442	706.903 \pm 221.430
ABC _{0→∞} (ng*h/mL)	723.700 \pm 234.873	760.442 \pm 56.299
C _{max} (ng/mL)	17.991 \pm 4.956	19.480 \pm 5.818
T _{max} (h)	2.29 \pm 0.92	2.58 \pm 1.13
K _e (h ⁻¹)	0.0091 \pm 0.0016	0.0090 \pm 0.0015
t _{1/2} (h)	78.55 \pm 12.57	78.94 \pm 12.32

Tabla 4 Métodos para cuantificar donepecilo

Técnica	Matriz Biológica	Método de extracción	Condiciones Cromatográficas	Referencia
LC/MS/MS	Plasma humano	Líquido-Líquido (Diclorometano : Hexano)	Fase móvil: HCOOH 0.1% :MeOH 70:30 v/v Columna: C18 4.6 x 75 mm 3.5 µm Tiempo de corrida: 4 min. Flujo: 1 mL/min Estándar interno: donepecilo d7.	Katakam Prakash 2008
LC/MS/MS	Plasma humano	Líquido-líquido Hexano: 2-propanol 97:3 v/v	Fase móvil: Acetato pH 4 :MeOH 20:80 v/v Columna: C18 (4.6 x 250 mm 5 µm) Tiempo de corrida: 15 min. Flujo: 0.8 mL/min Volumen de inyección: 40 µL Estándar interno: loratadina Ionización: Electrospray.	Yihon Lu 2004
HPLC/ UV	Plasma humano	Sólido-líquido cartuchos SPE C18	Fase móvil: KH ₂ PO ₄ 27.5 mM pH 4.5 : ACN: 2-propanol 500:220:5 v/v/v Columna: C18 4.6 x 150 mm 5 µm de fase inversa Precolumna: C18 5 µm Tiempo de corrida: 5.5 min. Flujo: 1.0 mL/min Volumen de inyección: 10 µL Estándar interno: ondansetron λ: 315 nm.	Noppamas Rojanasthien 2012
LC/MS/MS	Plasma Humano	Líquido-líquido Acetato de etilo	Fase móvil: MeOH: ACN: HCOOH 0.1% 70:10:20 v/v/v Columna: C18 150 x 2.1 mm 5 µm Precolumna: Phenomenex C18 5 µm Tiempo de corrida: 2.8 min. Flujo: 0.3 mL/min Volumen de inyección: 10 µL Estándar Interno: difenhidramina Ionización: Electrospray.	Xie Zhiyong 2006
LC/MS/MS	Plasma Humano	Líquido-Líquido Hexano	Fase móvil: ACN: CH ₃ COONH ₄ 10 mM pH 5 82: 18 v/v Columna: C18 50 x 4 mm 5 µm Tiempo de corrida: 2 min. Flujo: 0.7 mL / min Volumen de inyección: 20 µL Estándar interno: loratadina Ionización: Electrospray.	Apostolou Constantinos 2007
LC/MS/MS	Plasma Humano	Líquido-líquido Metil terbutil éter : Diclorometano 80:20 v/v	Fase móvil: ACN : CH ₃ COONH ₄ 1mM 92:8 v/v Columna: C18 50 x 4.6 mm 3.5 µm Tiempo de corrida: 2.5 minutos Flujo: 0.5 mL/min Volumen de inyección: 10 µL Estándar interno: Quetiapina Ionización: Electrospray.	Shetti P 2011
HPLC/ FLC	Plasma humano	Líquido-líquido Acetonitrilo	Fase móvil: Metanol:NaH ₂ PO ₄ 0.02 M: trietilamina pH 3.5 55:45:5 v/v/v Columna: C18 125 x 4.5 mm 3 µm Tiempo de corrida: 15 min. Flujo: 0.9 mL/min Volumen de inyección: 15 µL Estándar interno: Pindolol λ: 290 nm excitación, 315 nm emisión	Yasui Furukori 2002

2.8. Método bioanalítico

Para poder realizar estudios de bioequivalencia y/o biodisponibilidad, se debe de contar con métodos bioanalíticos los cuales se definen como: el conjunto de los procedimientos que se involucran en la obtención, tratamiento, almacenamiento y análisis de muestras biológicas para la determinación cuantitativa de una sustancia en una matriz biológica (Nerea Leal, 2009).

Para obtener dicho método es necesario contar con las condiciones óptimas para que el analito sea cuantificado y por otra parte demostrar que el proceso aplicado de preparación y manejo de la muestra sea consistente.

Se plantea dos etapas fundamentales: el desarrollo y optimización y el proceso de validación. La primera etapa consiste en el desarrollo y optimización de metodologías previamente validadas en donde se establecen condiciones de manejo, preparación y análisis de la muestra o modificaciones analíticas o experimentales que aporten una mejora sustancial al proceso con el que se cuenta, esta etapa en este caso culminó con un rubro denominado como pre-validación en donde la evaluación de la selectividad, linealidad y precisión y exactitud intra-día fueron evaluadas.

La segunda etapa es la validación del método bioanalítico que se entiende como la evidencia experimental documentada de que un procedimiento cumple con el propósito para el que fue diseñado, donde los parámetros que generalmente se evalúan son: curva de calibración para la obtención del modelo matemático en función de la respuesta, precisión y exactitud de la repetibilidad y reproducibilidad, estabilidad de la muestra en condiciones de procesamiento, resguardo y análisis, límite de cuantificación, selectividad y efecto de acarreo; las pruebas mencionadas tuvieron criterios de aceptación fundamentados en lo descrito en la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013 complementando con la RESOLUÇÃO – RDC No. 27, DE 17 de Mayo de 2012 de Brasil.

En este caso el laboratorio ya contaba con una metodología para la cuantificación de donepecilo empleando una detección de espectrometría de masas. El método

fue optimizado para la detección en un detector masas-masas lo cual ayudó a mejorar la sensibilidad del método analítico así como la selectividad de la metodología bioanalítica.

La optimización se apoyó en los datos reportados en la literatura para los parámetros farmacocinéticos y para el caso de parámetros de tipo analítico y de detección los siguientes documentos fueron de gran utilidad (Tabla 4 Métodos para cuantificar donepecilo).

2.9. Validación de métodos bioanalíticos

Para realizar la validación del método bioanalítico se deben seguir los lineamientos descritos por entidades regulatorias como COFEPRIS (Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios), ANVISA (Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria). La tabla 5 muestra los parámetros evaluados y describen las diferencias para las entidades regulatorias.

Tabla 5 Comparación de NOM-177-SAA1-2013, Resolución RCD No. 27

Parámetro evaluado	Condiciones de evaluación	
Selectividad	<p>NOM-177-SSA1-2013: No menciona el procedimiento a seguir si se presenta el incumplimiento de una o más unidades de matriz biológica (normal, lipémica y hemolizada)</p>	<p>Resolución RCD No 27: Al no cumplir una o más muestras, evaluar nuevamente otras seis fuentes y en caso de no cumplir nuevamente se debe modificar el método para eliminar interferencias</p>
Efecto matriz	<p>NOM-177-SSA1-2013: Analizar individualmente, al menos seis unidades de matriz blanco, considerando matriz biológica lipémica y hemolizada</p>	<p>Resolución RCD No 27: Si la matriz biológica es plasma analizar ocho muestras de matriz, cuatro normales, dos lipemicas y dos hemolizadas.</p>
Acarreo	<p>NOM-177-SSA1-2013 y Resolución RCD No 27: Se realiza tres inyecciones de la misma muestra blanco siendo una antes y dos después de una inyección del límite superior de cuantificación.</p>	

Curva de calibración	NOM-177-SSA1-2013: Solo indica definir un modelo matemático donde se tenga relación entre la concentración y la respuesta, debe de ser continua y reproducible	Resolución RCD No 27: Se recomienda elegir el modelo matemático más simple (modelo lineal), al no elegirlo demostrar matemáticamente que no es el apropiado. Al elegir un modelo matemático no lineal incluir 8 concentraciones
Precisión Repetibilidad	NOM-177-SSA1-2013 y Resolución RCD No 27: La prueba se realiza en un mismo día, analizando muestras control (LIC, CCB, CCM, CCA y CCD) por quintuplicado.	
Precisión Reproducibilidad	NOM-177-SSA1-2013: La prueba se realiza en tres corridas analíticas diferentes y en al menos dos días, analizando muestras control (LIC, CCB, CCM y CCA) por quintuplicado.	Resolución RCD No 27: La prueba se realiza en tres corridas analíticas y días diferentes, analizando muestras control (LIC, CCB, CCM, CCA y CCD) por quintuplicado.
Exactitud	NOM-177-SSA1-2013: Se obtiene por medio de la repetibilidad y reproducibilidad	Resolución RCD No 27: Se realiza igual que la prueba de precisión (repetibilidad y reproducibilidad)
Estabilidad de la muestra	NOM-177-SSA1-2013 y Resolución RCD No 27: Se analizan muestras control (CCB y CAA) por triplicado, inmediatamente después de su preparación y de ser sometidas a las condiciones requeridas. Esto es para determinar las condiciones de temperatura y tiempo, en las que el fármaco permanece estable en la matriz biológica durante la toma de muestra, almacenamiento, manejo y procesamiento analítico.	
Estabilidad a corto plazo	NOM-177-SSA1-2013 y Resolución RCD No 27: Las muestras se evalúan a temperatura y tiempo de procesamiento descrito en el método bioanalítico	
Estabilidad a largo plazo	NOM-177-SSA1-2013 y Resolución RCD No 27: Las muestras se evalúan bajo las condiciones de almacenamiento por un periodo de tiempo equivalente desde la obtención hasta su análisis.	
Estabilidad de la muestra procesada	NOM-177-SSA1-2013 y Resolución RCD No 27: Las muestras se evalúan bajo las condiciones de análisis.	
Estabilidad en el automuestreador	NOM-177-SSA1-2013 y Resolución RCD No 27: Las muestras procesadas se evalúan a la temperatura del inyector o automuestreador.	
Estabilidad de ciclos de congelación-descongelación	NOM-177-SSA1-2013: Deben de ser al menos 3 ciclos de congelación-descongelación.	Resolución RCD No 27: El número de ciclos debe ser igual o mayor a los que serán sometidos las muestras en estudio.
Estabilidad en solución	Se debe de demostrar la estabilidad en solución del analito de interés y estándar interno (solución de referencia principal y de trabajo) por un tiempo igual o mayor al periodo de uso o almacenamiento, que será utilizado durante el análisis de las muestras.	

Límite inferior de cuantificación (LIC), Muestras control de calidad nivel bajo (CCB), Muestras control de calidad nivel bajo B (CCBB), Muestras control de calidad nivel medio (CCM), Muestras control de calidad nivel alto (CCA), Muestra control de calidad diluido (CCD).

2.10. Fundamentos de espectrometría de masas

Los detectores de mayor uso para el análisis cuantitativo de concentraciones plasmáticas de principios activos hoy en día son los espectrómetros de masas-masas acoplados a HPLC. Dicho acoplamiento se consideran como un conjunto para la separación, la identificación y la cuantificación de la masa de los iones en fase gaseosa (Rubinson Kenneth, 2004), de las moléculas en estudio presentes en matrices líquidas o sólidas, después de realizar su ionización (Fernández Laínez 2009). No mide la masa molecular directamente, pero mide la relación masa/carga de los iones formados de las moléculas (Plascencia Villa, 2003) y está conformado de la siguiente manera:



Figura. 2 Diagrama de la configuración del sistema para espectrometría de masas

2.10.1. Introducción de la muestra

Generalmente la entrada de la muestra se da después de que esta sufre un proceso cromatográfico para la separación de los componentes (Corral Payá, 2006) en donde el espectro de masas esta acoplado a un cromatógrafo ya sea de gases o líquidos (Gomis Yagües, 2008)

2.10.2. Cromatografía de líquidos de alta resolución

La cromatografía es una técnica analítica que se basa en la separación de moléculas debido a las diferencias en su estructura y su composición (Kuppiec Tom, 2004) se caracteriza por tener dos fases: fase estacionaria, es la que permanece fija dentro del sistema y la fase móvil que es la que se desplaza a lo largo de la fase estacionaria.

La cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) o en sus siglas en ingles HPLC (high performance liquid chromatography), es usada para separar y cuantificar

compuestos que se han disuelto en solución (Kupiec Tom, 2004), es la más utilizada debido a sus aplicaciones, a su sensibilidad y a su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas. Generalmente la instrumentación para realizar dicha técnica se conforma de la siguiente manera:

Fase móvil	Bomba	Válvula inyectora	Columna
<ul style="list-style-type: none"> • Mezcla de disolventes puros 	<ul style="list-style-type: none"> • Ayuda a la fase móvil a llegar a la válvula inyectora 	<ul style="list-style-type: none"> • Consta de seis vías y permite introducir el disolvente en la columna 	<ul style="list-style-type: none"> • Tubo de acero inoxidable con diferentes longitudes, diámetros y materiales de empaquetado

Figura. 3 Esquema de los componentes de un HPLC

2.10.3. Fuente de ionización

Para realizar la cuantificación de las moléculas es necesario que estén cargadas ya sea positivamente o negativamente, esto se logra en la fuente de ionización al aplicar energía a la muestra, cabe destacar que las propiedades de la molécula a analizar, tales como peso molecular, polaridad y volatilidad (Fernández Laínez, 2009), ayuda a determinar que fuente de ionización se va a utilizar.

2.10.3.1. Ionización por electrospray

Es uno de los métodos más eficientes y sensibles, además se adapta fácilmente a la cromatografía líquida; consiste que a través del capilar (pieza que pertenece al espectrómetro) se rocíe una solución acuosa diluida del analito ya sea ácida o básica. Al momento que sale el líquido del capilar debido al incremento de la carga se va formando el cono de Taylor, cuando este se vuelve inestable se dispersa en forma de niebla cubriendo un área cada vez mayor reduciendo su tamaño, las pequeñas gotas son desolvatadas por fuerzas de coulomb y la molécula ya cargada es dirigida al detector mediante campos eléctricos apropiados en forma de gas en un ambiente de alto vacío (Plascencia Villa, 2003) (figura 4).

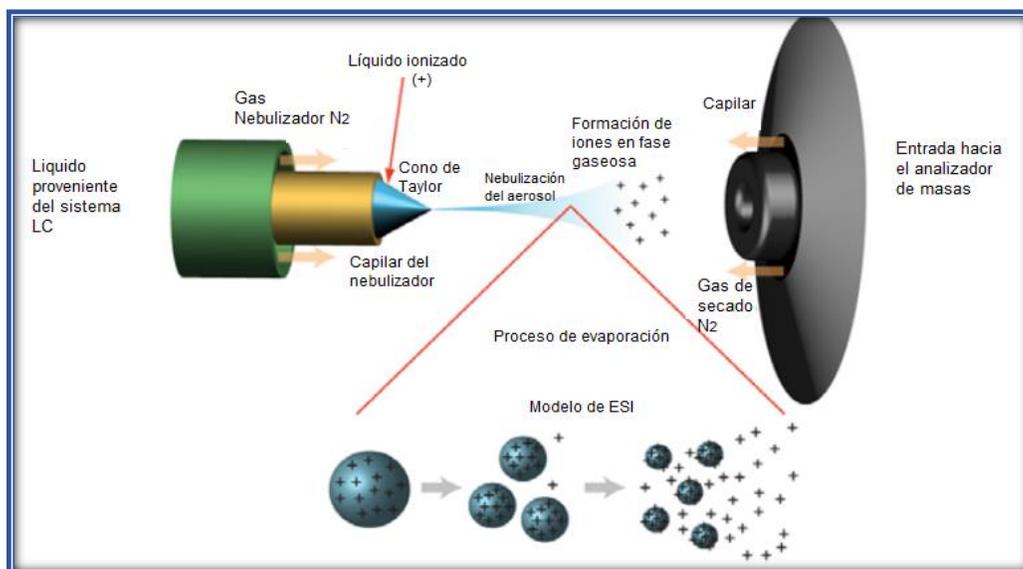


Figura. 4 Fuente de ionización por Electro spray (ESI)

2.10.4. Analizador

Su función es separar y ordenar los iones respecto a su m/z . Debe de tener la capacidad de distinguir entre masas muy pequeñas, al igual de que permitan el paso de un número suficiente de iones para producir corrientes iónicas fáciles de medir.

2.10.4.1. Analizador masas de cuadrupolo

Este analizador consiste en cuatro barraras paralelas de sección hiperbólica en la cara interna, a las que se les aplica un potencial combinado de corriente continua y de radiofrecuencia que crea en su interior un campo denominado cuadrupolar (Abián Joaquín, 2008).

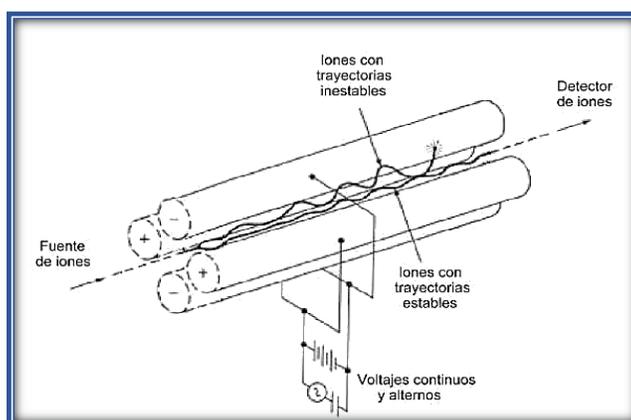


Figura. 5 Diagrama de un analizador de masas cuadrupolo

Los iones son introducidos en el campo cuadrupolar mediante la aplicación de un potencial, con lo que empiezan a oscilar en un plano perpendicular a las cuatro barras (Abián Joaquín, 2008) (figura 5), actuando como un filtro, ya que solo llegan los iones que fueron seleccionados y los demás se van perdiendo en el camino; por ende la trayectoria de los iones depende directamente de su relación m/z .

2.10.5. Detector

Su función es registrar y amplificar la señal proveniente del analizador de masas, está constituido por un cátodo emisor que al recibir el impacto producido por las partículas cargadas emiten electrones, éstos a su vez son acelerados hacia un dinodo emitiendo más electrones al tener el impacto de cada electrón. Lo mencionado se repite varias veces lográndose una corriente fuertemente amplificada. Los detectores pueden ser de varios tipos; los más utilizados son el electromultiplicador y el fotomultiplicador.

2.10.6. Procesador de datos

La información que se recibe del detector se registra en forma de espectro de masas, que es una representación gráfica de los iones separados por su valor de m/z y ajustados de acuerdo al porcentaje de las especies más abundantes y estables en la muestra.

Para realizar esta actividad se debe de contar con un software, tal como el Analyts® del sistema API SCIEX 3200 el cual fue utilizado en este presente estudio.

3. OBJETIVOS

GENERALES

- ✓ Optimizar y validar un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a un detector de masas-masas para la cuantificación de donepecilo en plasma humano.

PARTICULARES

- ✓ Determinar las condiciones de ionización, parámetros cromatográficos y técnica de extracción de donepecilo y su estándar deuterado.
- ✓ Determinar las modificaciones experimentales requeridas para evaluar los parámetros de desempeño ante la actualización de los lineamientos descritos por las entidades regulatorias Mexicana y Brasileña.
- ✓ Validar el método analítico conforme a lo indicado en la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013 complementando con la RESOLUÇÃO RCD N. ° 27, emitida por ANVISA para su aplicación en estudios de biodisponibilidad y/o bioequivalencia.

4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1. Optimización y validación del método bioanalítico

4.1.1. Optimización

Para realizar la optimización con satisfacción se consideraron las propiedades fisicoquímicas de donepecilo, de igual forma los métodos ya reportados con anterioridad (tabla 4 Métodos para cuantificar donepecilo en plasma), con el fin de evaluar diferentes condiciones de ionización, cromatográficas y de extracción permitiendo así una mejor sensibilidad, selectividad y una mayor intensidad en la respuesta en espectrometría de masas-masas.

4.1.1.1. Determinación de las condiciones de ionización

Con una solución de 100 ng/mL (Solución D 0.1 µg/mL) de donepecilo se realizó el escaneo para encontrar la relación masa/carga del analito de interés, al tener el valor del ion precursor se optimizó el voltaje declustering potential y entrance potential para tener una mayor intensidad en la respuesta, posteriormente se procedió al análisis MS/MS para localizar el ion producto con la ayuda de los parámetros collision energy y collision cell exit potential.

De la misma forma se realizó el escaneo para ionizar y fragmentar el estándar interno a utilizar.

4.1.1.2. Determinación de las condiciones cromatográficas

Las condiciones cromatográficas para obtener la adecuada separación e identificación de los analitos se describen en la tabla 6.

Tabla 6 Condiciones evaluadas en la determinación de condiciones cromatográficas

Condición cromatográfica	Evaluación de variables
Columna cromatográfica	Polaris C18 A 4.0 x 150 mm; 5 µm Zorbax C18 4.6x 150 mm; 5 µm
Proporción fase móvil (acuoso: orgánico)	50:50 v/v 55:45 v/v 60:40 v/v 65:35 v/v
Velocidad de flujo	0.4 mL/min 0.7 mL/min 1.0 mL/min

4.1.1.3. Condiciones de extracción de la muestra plasmática

Una vez verificado el método previo y a la revisión bibliográfica se realizaron ensayos en lo relacionado a esta evaluación. Se emplearon las condiciones establecidas anteriormente.

4.2. Validación del método analítico para cuantificar donepecilo en plasma.

A continuación se describen los resultados obtenidos a partir de los ensayos realizados para las pruebas de validación.

4.2.1. Adecuabilidad del sistema

La adecuabilidad del sistema fue evaluada mediante una la solución AD1 la cual se describe en el apartado de anexos 7.1.6 Preparación de las soluciones estándar y adecuabilidad del sistema, donde previo a cada corrida analítica se realizaron 6 inyecciones consecutivas de 5 µL. Los datos se procesaron y se determinó el promedio la desviación estándar y el CV%.

Criterio de aceptación: El coeficiente de variación (CV%) obtenido para la respuesta analítica de donepecilo y el estándar interno no debe ser mayor al 10%.

4.2.2. Preparación de curva de calibración y muestras control de calidad en plasma

Para la preparación de los estándares de calibración y las muestras control de calidad se realizó un proceso denominado como evaluación de soluciones, este proceso implica realizar el pesaje por duplicado para la preparación de soluciones principales (soluciones stock), las cuales se diluyen a una concentración tal que la respuesta obtenida sea igual a la respuesta que se obtiene al analizar un límite superior de cuantificación. Ambas soluciones son analizadas cromatográficamente por sextuplicado y se obtiene el porcentaje de diferencia de las réplicas analizadas el cual no debe superar el 10%. La finalidad de este proceso es evaluar que el analista está realizando adecuadamente el proceso de pesaje y al dar cumplimiento, cualquiera de las dos soluciones preparadas puede ser utilizada para la preparación de estándares de calibración y controles de calidad.

Tabla 7 Preparación de la curva de calibración y muestras control de calidad

DNP Soln. D (0.1 µg/mL) (µL)	DNP Soln. C (1.0 µg/mL) (µL)	DNP Soln. B (10 µg/mL) (µL)	Volumen HCOOH 0.1 % : ACN 50:50 v/v (µL)	Conc. En Sistema DNP (ng/mL)	Alícuota de muestra en sistema (µL)	Volumen de plasma (µL)	Conc. En plasma DNP (ng/mL)	Nivel
60	-	-	940	6	50	950	0.3	CP1 ó LIC
120	-	-	880	12	50	950	0.6	CP2
180	-	-	820	18	50	950	0.9	CCB
-	100	-	900	100	50	950	5.0	CP3
-	200	-	800	200	50	950	10.0	CP4
-	300	-	700	300	50	950	15.0	CCBB
-	400	-	600	400	50	950	20.0	CP5
-	-	60	940	600	50	950	30.0	CP6
-	-	70	930	700	50	950	35.0	CCM
-	-	80	920	800	50	950	40.0	CP7
-	-	110	890	1100	50	950	55.0	CCA
-	-	120	880	1200	50	950	60.0	CP8
-	-	140	860	1400	50	950	70.0	CP9 ó LSC
-	-	200	800	2000	50	950	100.0	CCD

Estándar de calibración (CP), Límite inferior de cuantificación (LIC), Límite superior de cuantificación (LSC), Muestras control de calidad nivel bajo (CCB), Muestras control de calidad nivel bajo B (CCBB), Muestras control de calidad nivel medio (CCM), Muestras control de calidad nivel alto (CCA), Muestra control de calidad diluido (CCD), Concentración (Conc.), donepecilo (DNP), Solución (Soln.).

4.2.3. Método de extracción

Para realizar la extracción de donepecilo y de donepecilo-d7 (E. I.) de la matriz biológica se empleó el siguiente método:

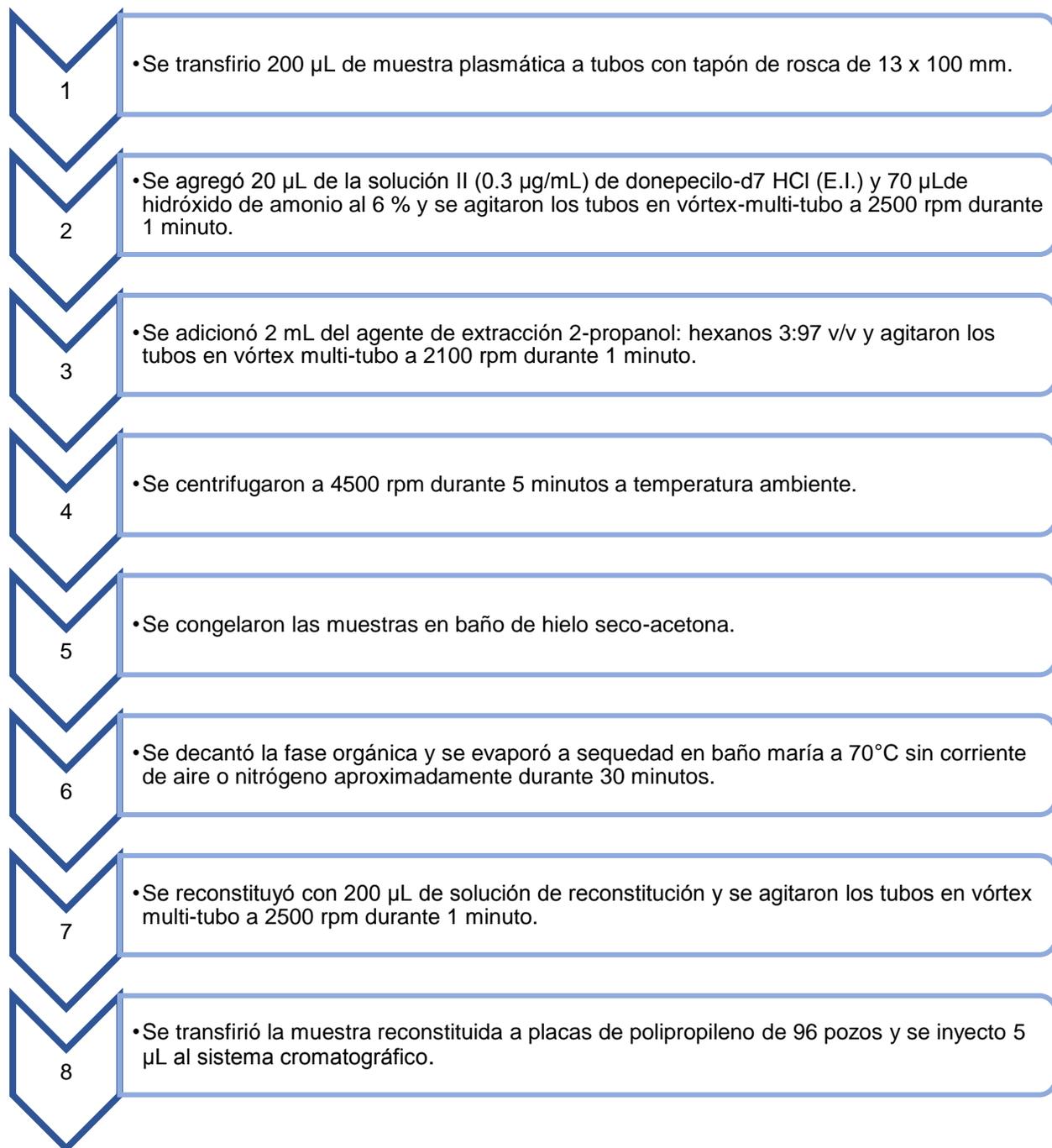


Figura. 6 Diagrama del método de extracción para donepecilo y donepecilo-d7 de la matriz biológica

Para las muestras de blanco de reactivos (fase de reconstitución), doble blanco (plasma sin la adición de EI) y blanco (plasma con la adición de EI) se realizó la siguiente preparación.

- Blanco de reactivos: Solución de reconstitución (ácido fórmico al 0.1%: ACN 65:35 v/v). Se preparó de acuerdo a lo indicado en el inciso 7 “Preparación de soluciones”, se transfirieron 200 μ L a placa de polipropileno de 96 pozos o vial y se inyectó 5 μ L al sistema cromatográfico.
- Doble blanco: Se colocaron 200 μ L de una mezcla de plasmas (mínimo seis folios individuales) libre del analito en tubos con tapón de rosca de 13 x 100 mm y se procedió como se indica en el punto 3 del método de extracción.
- Blanco: Se colocó 200 μ L de una mezcla de plasmas (mínimo seis folios individuales) libre del analito en tubos con tapón de rosca de 13 x 100 mm y se procedió como se indica en el punto 2 del método de extracción.

A continuación se mencionan los parámetros evaluados durante la validación y la forma en que llevaron a cabo.

4.2.4. Selectividad

La evaluación de la matriz biológica en el mismo anticoagulante de las muestras en estudio y fármacos de uso común se evaluaron de la siguiente manera:

- Matriz biológica: Se procesaron y analizaron como dobles blancos de seis fuentes individuales de matriz biológica provenientes de voluntarios sanos, una fuente lipémica y una fuente hemolizada.
- Fármacos de uso común: Se procesaron y analizaron muestras doble blanco agregando soluciones de los siguientes analitos: paracetamol (20 μ g/mL), naproxeno (50 μ g/mL), ácido salicílico (300 μ g/mL), cafeína (4 μ g/mL), nicotina (50 ng/mL).

Adicionalmente para ambos casos se procesaron cinco muestras equivalentes a la concentración del límite inferior de cuantificación.

El método es selectivo cuando la respuesta analítica de las interferencias próximas al tiempo de retención de donepecilo es menor al 20% para el LIC y del 5% para el estándar interno del valor promedio de las 5 réplicas.

4.2.5. Efecto matriz

Se procesaron como doble blanco fuentes individuales de la matriz biológica de al menos seis voluntarios sanos, dos fuentes hemolizadas y dos fuentes de plasma lipémico, hasta el paso de evaporación y se reconstituyeron con 200 μL de la solución que contiene donepecilo y donepecilo-d7 HCl, equivalente a la concentración del CCB y CCA en solución como se indica en la siguiente tabla:

Tabla 8 Preparación de muestras control de calidad en solución

DNP Soln. D (0.1 $\mu\text{g/mL}$) μL	DNP Soln. B (10 $\mu\text{g/mL}$) μL	DNP-d7 Sol I (0.3 ng/mL) μL	Volumen de aforo Soln. reconstitución	Conc. DNP en solución ng/mL	Conc. DNP-d7 en solución ng/mL	Nivel
90	-	1000	10	0.9	30	CCBS
-	55	1000	10	55	30	CCAS

Muestra control de calidad nivel bajo en solución (CCBS), Muestras control de calidad nivel alto en solución (CCAS), Solución (Soln.), Concentración (Conc.), donepecilo (DNP), donepecilo-D7 HCl (DNP-D7), Estándar interno (E.I.)

Con las respuestas analíticas correspondientes, se calculó el factor matriz normalizado (FMN) comparando las respuestas analíticas de donepecilo y donepecilo-d7 HCl (E.I.), mediante la fórmula indicada a continuación. La evaluación da cumplimiento cuando el %CV del FMN es \leq al 15%.

$$FMN = \frac{\text{Respuesta del analito en la matriz} / \text{respuesta del estandar interno en la matriz}}{\text{Respuesta del analito en la solución} / \text{respuesta del estandar interno en solución}}$$

4.2.6. Prueba de acarreo

Se procesó una muestra doble blanco, un límite superior de cuantificación y cinco muestras con una concentración equivalente al límite inferior de cuantificación siendo la secuencia de inyección para el doble blanco una antes y dos después de una inyección a la concentración equivalente del LSC. Se determinó la respuesta

tanto para el analito como para el estándar interno. Los resultados se compararon con respecto a la respuesta promedio de los 5 LIC. En caso de existir una interferencia al tiempo de retención del analito y de su estándar interno en las muestras doble blanco posteriores a la inyección del LSC, esta no debe ser mayor al 20% para el LIC y del 5% para el estándar interno.

4.2.7. Respuesta cruzada

La prueba no está indicada en la NOM-177-SSA1-2013 y en la RESOLUÇÃO RCD N.º 27, emitida por ANVISA, pero debido a que el tema fue desarrollado en Investigación Farmacológica y Biofarmacéutica S. A. P. I. de C. V, se realizó conforme a lo siguiente.

Se procesó un doble blanco, una muestra a una concentración equivalente al LSC sin donepecilo-d7 HCl (E.I.) y una muestra blanco (con donepecilo-d7 HCl). Las cuales se inyectaron de manera alternada. A cada una de ellas se le monitoreo la transición tanto de donepecilo como del estándar interno. De manera paralela 5 muestras con concentración equivalente al LIC se prepararon y analizaron.

En caso de existir una interferencia al tiempo de retención de donepecilo y de su estándar interno (donepecilo-d7) esta deberá ser menor al 20% para el LIC y del 5% para el estándar interno.

4.2.8. Curva de calibración

Se procesaron y analizaron tres curvas de calibración a partir de una solución de reciente preparación a las concentraciones de 0.3, 0.6, 5.0, 10, 20, 30, 40, 60 y 70 ng/mL. Junto con una muestra blanco y una doble blanco. Se graficó en el eje de las ordenadas el área relativa (donepecilo/ donepecilo-d7) y en el eje de las abscisas la concentración nominal de donepecilo, se realizaron la correspondiente regresión lineal a diferentes ponderaciones ($1/x$, $1/x^2$, $1/y$, etc.). Posteriormente se determinó la concentración recuperada (experimental) interpolando la respuesta analítica (relación de áreas de donepecilo/donepecilo-d7 HCl (E.I.)) obtenida en la ecuación de la línea recta generada.

Se calculó y evaluó el error relativo (ER%) y para cada ponderación se sumaron los valores absolutos del ER%, en donde el modelo que mejor se ajuste será aquel que tenga la $\Sigma ER\%$ global más bajo.

$$ER\% = \left| \frac{\text{Concentración recuperada} - \text{concentración nominal}}{\text{concentración nominal}} \right| \times 100$$

El modelo matemático se acepta si en cada una de las curvas analizadas, se obtiene un coeficiente de correlación (r) mayor o igual a 0.99, además la concentración recuperada de los puntos que comprendan la curva debe ser \leq al 15% respecto a la concentración nominal, a excepción del LIC donde se considera que no debe ser mayor al 20 %.

De igual forma no deben existir interferencias próximas al tiempo de retención para donepecilo y para donepecilo-d7 en las muestras blanco y doble blanco con el mismo criterio que se evalúa para la selectividad.

4.2.9. Precisión

4.2.9.1. Repetibilidad

Se prepararon, procesaron y analizaron cinco replicas (en un mismo día de trabajo) a las siguientes concentraciones 0.3, 0.9, 15, 35, 55, 100 ng/mL, las cuales representan una concentración que corresponde a los niveles LIC, CCB, CCBB, CCM, CCA y CCD (muestras control de calidad), para el control de calidad diluido se realizó considerando un factor de dilución de 2, donde se preparó tomando 100 μ L de la muestra CCD y se adicionó 100 μ L de la matriz biológica libre de fármaco.

Con la ayuda de una curva de calibración de reciente preparación y procesamiento, se calculó la concentración obtenida para cada nivel interpolando la respuesta analítica. En el caso del CCD, la concentración que se obtuvo fue multiplicada por 2. Finalmente se obtuvo el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de la concentración recuperada. El coeficiente de variación para cada nivel de las muestras debe ser menor del 15%, y para el LIC menor al 20%.

4.2.9.2. Reproducibilidad

Se realizó igual que la prueba de repetibilidad a diferencia a que se lleva a cabo en 3 días de trabajo. De igual forma los cálculos y criterios de repetibilidad se aplican a la reproducibilidad tomando en cuenta todos los datos de contracción recuperada de los diferentes días de trabajo.

4.2.10. Exactitud

Con los datos de repetibilidad y reproducibilidad se calculó la desviación de la concentración obtenida respecto al valor nominal.

$$\% \text{ desviación} = \left| \frac{\text{Concentración nominal} - \text{concentración recuperada}}{\text{concentración nominal}} \right| \times 100$$

El valor promedio del % desviación debe estar dentro del 15% del valor nominal correspondiente, a excepción del LIC que es del 20%.

4.2.11. Reproducibilidad de la reinyección

La prueba mencionada no está indicada en la en la NOM-177-SSA1-2013 y en la RESOLUÇÃO RCD N. ° 27, emitida por ANVISA. Solo es necesaria para los métodos analíticos que sean evaluados conforme a lo indicado en la Guideline on bioanalytical method validation emitida por la European Medicines Agency (EMA). Sin embargo se tiene contemplada esta prueba para garantizar que el equipo permanece estable durante una corrida analítica equivalente al tiempo de un día de análisis.

Durante un día de validación se preparan estándares de calibración y muestras control de calidad por quintuplicado a las concentraciones CCB, CCM y CCA (repetibilidad) y de manera adicional muestras blanco, doble blanco o controles de calidad adicionales. Dichas muestras son analizadas en una corrida analítica en el siguiente orden adecuabilidad del sistema, selectividad muestras preparadas correspondientes a la repetibilidad, controles de calidad y/o muestras blanco y la

reinyección de la selectividad los estándares de calibración y muestras control de calidad muestras que se inyectaron al principio de la corrida. La evaluación consiste en que el sistema cromatográfico realice un análisis de muestras al menos por un periodo igual o mayor correspondiente a un día de análisis rutinario de muestras desconocidas, razón por la cual se hace trabajar al sistema de manera continua y entre la evaluación de repetibilidad inicial y terminal muestras plasmáticas se intercalan para darle continuidad al sistema y sobre todo asemejar las condiciones de una corrida analítica.

Para determinar el cumplimiento de la prueba se calculó la concentración recuperada de cada control de calidad reinyectado interpolando la respuesta analítica en la correspondiente curva reinyectada. Esto se realizó para comparar los resultados de las muestras reinyectadas respecto a los resultados obtenidos en la inyección original, se determinó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de la concentración recuperada para cada nivel, así como el % de desviación de la concentración recuperada de las muestras reinyectadas con respecto a las muestras originales.

$$\% \text{ desviación} = \left| \frac{\text{Concentración recuperada original} - \text{concentración recuperada inyectada}}{\text{concentración recuperada original}} \right| \times 100$$

El CV% de la concentración recuperada en cada nivel de las muestras control de calidad deberá estar dentro del 15 %. El valor promedio del % de desviación no debe ser mayor al 15 %, con respecto a la concentración de la inyección original (inicial).

4.2.12. Estabilidad

Se evaluó la estabilidad de donepecilo durante su manejo, toma de muestra, almacenamiento, procesamiento analítico, entre otros, en condiciones de temperatura y tiempo establecido.

Para cada estabilidad se evaluaron por triplicado muestras control de calidad a la concentración 0.9 y 55 ng/mL (representan los niveles CCB y CCA), y para obtener

la concentración se interpolaron en una curva de calibración de reciente preparación. Como se muestra en la tabla 9, las condiciones de estabilidad para el proceso y análisis se realizaron de la siguiente forma:

Tabla 9 Condiciones para evaluar la estabilidad de donepecilo

Estabilidad	Condiciones
Corto plazo en la matriz biológica	<ul style="list-style-type: none"> Las muestras se almacenaron a: ✓ Temperatura ambiente (15-30°C) ✓ Refrigeración (2-8°C) ✓ Congelación (no mayor a -20 °C)
Largo plazo en la matriz biológica	Bajo las condiciones de almacenamiento en las que se mantendrán las muestras del estudio (-70°C ±10°C), por un periodo de tiempo igual o mayor al que transcurre desde la obtención de la muestra hasta su análisis.
Muestra procesada	<ul style="list-style-type: none"> Las muestras procesadas se almacenaron: ✓ Automuestreador (10° C) ✓ Refrigeración (2-8° C)
Extracto seco	Las muestras se procesaron sin aplicar el paso de reconstitución, permanecieron evaporadas y se almacenaron en refrigeración (2-8 ° C)
Ciclos de congelación-descongelación	Se almacenaron a temperatura de congelación -70° C ± 10° C por al menos 12 horas, se descongelaron completamente a temperatura ambiente y se volvieron a congelar por al menos 12 horas bajo las mismas condiciones. Se repitió este proceso hasta someter las muestras a 4 ciclos congelación-descongelación.

Las concentraciones obtenidas en cada nivel se compararon contra las concentraciones nominales. El promedio de cada nivel debe ser \leq al 15% en relación a la concentración nominal. La temporalidad evaluada bajo estas condiciones se reporta en el apartado correspondiente para cada evaluación (5.10 Estabilidad).

4.2.13. Estabilidad en solución

Para demostrar que la solución principal (stock) y de trabajo (estándar) de donepecilo son estables a condiciones de almacenamiento de refrigeración (2-8°C), temperatura ambiente (15-30 °C) y congelación (-70 ± 10 °C), se realizó un mínimo de tres inyecciones de estas soluciones a un tiempo superior de una semana.

Para efectuar la evaluación se consideró una dilución apropiada equivalente a la respuesta del LSC, tomando en cuenta el intervalo de medición del detector utilizado, por esta razón se realizó lo siguiente:

- Solución estándar principal de donepecilo A (100 µg/mL): Se realizó el proceso de dilución hasta la concentración de la solución D (0.1 µg/mL) de donepecilo, y se inyectó 5 µL de esta solución por triplicado al sistema cromatográfico.
- Solución estándar de trabajo de donepecilo D (0.1 µg/mL). Se inyectó directamente de esta solución 5 µL por triplicado al sistema cromatográfico.

Debido a que el estándar interno es un derivado deuterado de donepecilo, no se evaluó la estabilidad de esta solución.

Para la determinación de la estabilidad se compararon valores promedio de la respuesta analítica con respecto a los valores promedio de las soluciones recién preparadas de donepecilo y se calculó el % de desviación donde no debe ser mayor al 10% del valor promedio obtenido con las soluciones recién preparadas.

$$\% \text{ desviación} = \left| \frac{\text{Respuesta analítica promedio (recién preparada)} - \text{Respuesta analítica promedio (estabilidad)}}{\text{Respuesta analítica promedio (recién preparada)}} \right| \times 100$$

4.2.14. Recobro

La prueba de recuperación absoluta (recobro) no está mencionada en la NOM-177-SSA1-2013 y en la RESOLUÇÃO RCD N.º 27, solo es requerida en la Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation emitida por la Food and Drug Administration.

Para evaluar el recobro del método, se prepararon soluciones equivalentes (tabla 10) a la concentración de los controles de calidad alto, medio y bajo (CCBS, CCMS y CCAS) junto con 5 muestras en plasma a cada nivel de concentración las cuales fueron procesadas y analizadas.

Tabla 10 Preparación de muestras control de calidad en solución

DNP Soln. D (0.1 µg/mL) µL	DNP Soln. B (10 µg/mL) µL	DNP-d7 Sol I (0.3 ng/mL) µL	Volumen de aforo Soln. reconstitución	Conc. DNP en solución ng/mL	Conc. DNP-d7 en solución ng/mL	Nivel
90	-	1000	10	0.9	30	CCBS
-	35	1000	10	35	30	CCMS
-	55	1000	10	55	30	CCAS

Muestra control de calidad nivel bajo en solución (CCBS), Muestra control de calidad nivel medio en solución (CCMS), Muestras control de calidad nivel alto en solución (CCAS), Solución (Soln.), Concentración (Conc.), donepecilo (DNP), donepecilo-d7 HCl (DNP-d7), Estándar interno (E.I.)

Para la evaluación del parámetro de desempeño se compararon las respuestas obtenidas en plasma en relación a la respuesta obtenida en solución, tanto para el analito de interés como para DNP-d7. Los valores promedio individuales de donepecilo no deben desviarse del promedio total en más del 15%.

$$\%Recobro = \frac{\text{Respuesta del analito en matriz biologica}}{\text{Respuesta del analito en solución}} \times 100$$

4.3. Aplicación del método Bioanalítico al estudio de bioequivalencia

Una vez validada la metodología se realizó el análisis de muestras provenientes de un estudio de bioequivalencia, cuyo protocolo fue evaluado y aprobado por COFEPRIS en donde el tamaño de la muestra había sido establecida con un valor de 19 y con 14 tiempos a evaluar en un diseño cruzado en condiciones de ayuno después de la administración de una dosis única de donepecilo de 10 mg en tableta.

Las muestras se analizaron conforme a lo descrito en el método analítico previamente aprobado por el área de aseguramiento de la calidad.

Además a lo establecido por la NOM-177-SSA1-2013, las muestras en estudio deben ser analizadas conforme a un calendario establecido y respetando lo indicado por el método analítico.

Cada corrida analítica estaba compuesta por:

- Adecuabilidad del sistema
- Selectividad
- Curva de calibración
- Acarreo (Al final de la curva de calibración, a la mitad de la corrida analítica y al final de la corrida analítica)
- Controles de calidad (Control de calidad bajo, control de calidad bajo B, control de calidad medio y control de calidad diluido por duplicado, se distribuyen homogéneamente entre las muestras de voluntarios)
- Muestras plasmáticas de voluntarios

Todas las muestras se procesaron bajo las mismas condiciones descritas en el método analítico.

Los criterios de aceptación para una corrida analítica son los siguientes:

- ✓ Cumplir criterios de selectividad, curva de calibración, controles de calidad y acarreo.
- ✓ Por lo menos el 75% o 6 estándares de calibración deben cumplir con el criterio del $\pm 15\%$ de la concentración recuperada (interpolada) con respecto a la nominal y para el límite inferior de cuantificación del 20%
- ✓ Controles de calidad se establece que el 67% de todas las muestras y el 50% en cada nivel de concentración debe cumplir con el criterio del $\pm 15\%$ de la concentración recuperada (interpolada) con respecto a la nominal.
- ✓ Las pruebas de acarreo dos de las tres ocasiones deben de cumplir con los criterios de aceptación.
- ✓ En las curvas de calibración se da el seguimiento de la pendiente (m) donde el coeficiente de variación no debe ser mayor al 20%

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS

5.1. Optimización del método analítico

Como ya se mencionó previamente, la metodología desarrollada y validada previamente por el Tercer Autorizado presentaba las siguientes condiciones:

- 1) Parámetros de desempeño evaluados bajo la NOM-177-SSA1-1998.
- 2) La cuantificación se realizaba en un detector de espectrometría de masas.
- 3) Estándar interno análogo (nevirapina).
- 4) Tiempo de corrida de 7.5 minutos.
- 5) Se presentaron interferencias en algunas muestras de voluntarios que generaron un re-análisis de muestras en estudio debida a componentes endógenos.
- 6) Anticoagulante de heparina de sodio.
- 7) Intervalo de trabajo establecido bajo documentos bibliográficos.

Si bien el método bioanalítico era robusto presentaba algunos puntos de mejora y consideraciones que debían ser tomadas en cuenta para ser aplicado a futuros estudios de bioequivalencia ante las nuevas exigencias de la NOM-177-SSA1-2013 y el avance tecnológico que hoy en día existe en el ámbito de la espectrometría de masas.

Para optimizar la metodología se realizaron las siguientes modificaciones: en primera instancia, el laboratorio patrocinador solicitó que la metodología analítica contara con un estándar interno deuterado, lo cual confiere ventajas en la cuantificación de los métodos y es recomendado por entidades como ANVISA, por lo que el método bioanalítico puede ser utilizado para el análisis de estudios para Brasil. Adicionalmente el detector utilizado fue de espectrometría de masas-masas el cual le confirió ventajas a la metodología de selectividad y sensibilidad.

Otras dos consideraciones que debieron ser modificadas fue el tipo de anticoagulante del método el cual fue modificado a CPDA y según lo recomendado por los lineamientos la validación y el análisis de las muestras debe ser realizado en el mismo anticoagulante que las muestras provenientes de estudio.

Como se puede observar en la figura 7 el fármaco de interés presenta un tiempo de retención de 1.8 minutos, de manera adicional se colocó un Split ante la respuesta cromatográfica obtenida y con ello el tiempo de corrida se redujo a 3 minutos, así eliminando interferencias que se presentaban en el método previo a pesar de poseer la misma técnica de extracción.

Adicionalmente se evaluaron las condiciones de ionización para el ión precursor así como la estabilidad del ión fragmentado se determinó que el patrón de fragmentación reportado en literatura coincidía con el patrón de fragmentación que se utilizó en la presente metodología (Figura 8).

Finalmente y no menos importante, el método en cuestión estableció su intervalo de trabajo tomando como base la Cmax de un estudio previamente realizado por el tercero a la misma concentración y forma farmacéutica.

Tabla 11 Condiciones cromatográficas del CLAR

Condiciones cromatográficas	
Detector	Masas-Masas
Columna	Polaris C18 A 4.0 x 150 mm, 5 µm
Fase móvil	Ácido fórmico 0.1 %: ACN (65:35 v/v)
Fase de lavado (v/v)	Agua grado cromatográfico: metanol grado cromatográfico 20:80 v/v
Velocidad de flujo (mL/min)	1 mL
Volumen de inyección (µL)	5
Temperatura columna (°C)	40
Temperatura automuestreador (°C)	15
Split	Tubería de salida (1/16 x 0.005 x 0.15 m)
Tiempo de retención aproximado (min)	Donepecilo 1.8
	Donepecilo-d7 HCl 1.78

Tabla 12 Condiciones de ionización en la interface

Condiciones de la interface	
Curtain gas (psi)	50
Collision Gas (L/min)	10
Ion spray voltaje	5500
Temperatura	450
Ion source gas 1 (psi)	50
Ion source gas 2 (psi)	30

Tabla 13 Parámetros dependientes de donepecilo y donepecilo-d7 HCl (E.I.)

Condiciones de las señales		
	Donepecilo	Donepecilo-d7 HCl
Interface	ESI	ESI
Polaridad	Positivo	Positivo
Precursor Ion	380.300	387.300
Product Ion	91.200	98.3
Dwell	600	600
DP (volts)	50	50
EP (volts)	5	10
CE (volts)	60	70
CXP (volts)	4	4
CEP (volts)	21.26	21.49

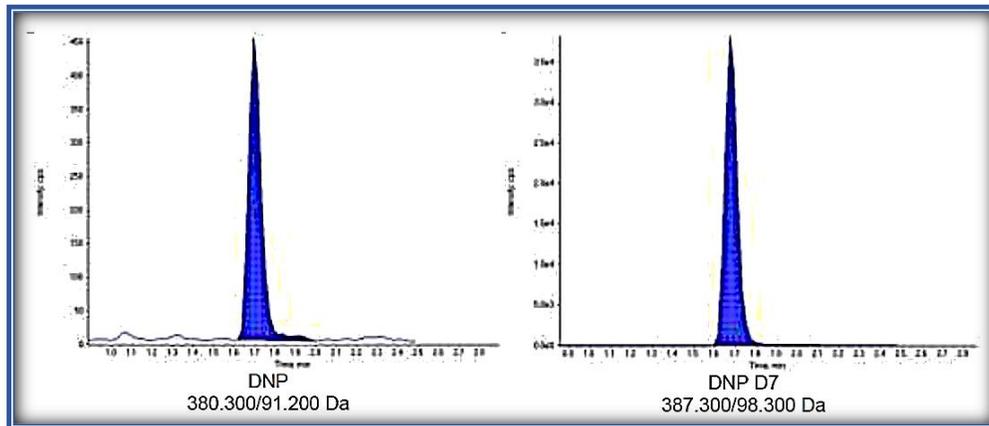


Figura. 7 Cromatograma representativo del límite inferior de cuantificación de donepecilo

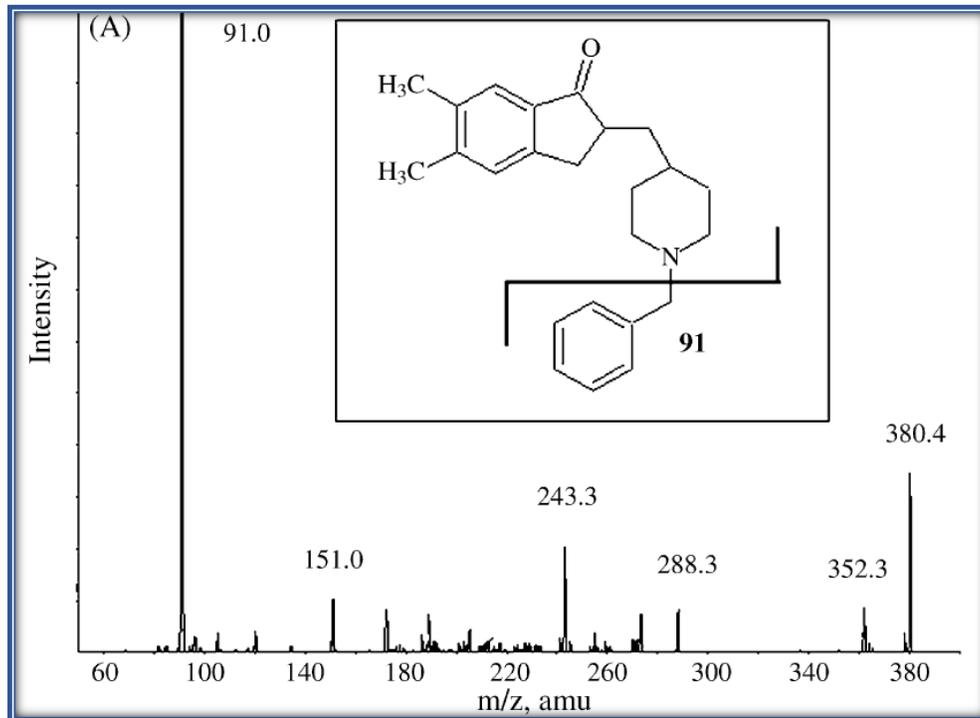


Figura. 8 Espectro de masas de donepezilo, Ion precursor (380.4 m/z) Ion producto (91.0 m/z)

5.2. Validación del método

En este apartado se describen los resultados obtenidos de los parámetros de desempeño descritos en las normas de México y Brasil que fueron realizados a lo largo de la validación del método bioanalítico.

5.2.1. Adecuabilidad del sistema

Durante cada día de trabajo se evaluó la adecuabilidad del sistema. El objetivo de este ensayo fue determinar que las condiciones del instrumento utilizado fueron óptimas, para ello, se inyectaron 6 muestras de la solución AD1 de manera consecutiva (ver apartado Anexo 7.3 preparación de soluciones), los resultados promedio para las respuestas de ambos analitos en estudio se muestran a continuación:

Tabla 14 Adecuabilidad de sistema para las corridas analíticas de validación

Día de validación	donepecilo			donepecilo-d7 (E.I.)			Relación de áreas	C.V. % Área relativa
	\bar{X} Área	\bar{X} tiempo de retención (min)	C.V.% tiempo de retención	\bar{X} Área	\bar{X} tiempo de retención (min)	C.V.% tiempo de retención		
1	208845.931	1.694	0.037	160593.090	1.675	0.038	1.301	1.587
2	233060.265	1.689	0.037	171618.193	1.670	0.045	1.358	1.711
3	213189.643	1.649	0.050	161726.629	1.631	0.046	1.318	1.093
4	217952.338	1.646	0.031	166508.754	1.628	0.050	1.309	1.697
5	188912.399	1.645	0.033	149955.137	1.627	0.039	1.260	2.228
6	196302.022	1.659	0.050	161670.182	1.640	0.046	1.214	1.568
7	192349.767	1.648	0.091	152787.781	1.630	0.072	1.259	1.776
8	211615.575	1.648	0.547	172784.784	1.629	0.571	1.225	1.878

Coeficiente de variación (C.V. %)

Los resultados fueron procesados empleando el software del equipo y se obtuvo el promedio de la respuesta, su desviación estándar y con ello se calculó la precisión mediante el coeficiente de variación. Las especificaciones del instrumento indican que la respuesta no debe tener una variación superior al 10% después de la inyección de muestras repetidas, como se puede observar en la tabla 14 en los diferentes días de trabajo la variación no superó este valor.

5.3. Selectividad

La evaluación de la selectividad consiste en la determinación de la influencia de ciertos componentes contenidos en la matriz biológica que interfieran con la cuantificación del analito de interés. Generalmente estas interferencias se deben a una variación de los componentes endógenos presentes en la matriz biológica o en el plasma hemolizado y/o lipémico los cuales pueden obtenerse durante la etapa clínica. Para tal fin la entidad Brasileña define un documento conocido como la Nota técnica 4, en donde se describen ensayos de validación posteriores a la etapa clínica, uno de ellos es la determinación de la selectividad post-estudio clínico, en donde se deben evaluar de manera conjunta o separada los medicamentos administrados en la fase clínica. Para los efectos de la presente validación este

ensayo no fue realizado ya que no se presentaron efectos adversos que propiciaran la administración de un medicamento diferente al estudiado.

Se demostró la selectividad del método a la matriz biológica de 6 fuentes individuales, una fuente lipémica y otra hemolizada así como a medicamentos de uso “común” paracetamol, naproxeno, ácido salicílico, cafeína, nicotina a una concentración equivalente al Cmax de la dosis comúnmente administrada y se determinó que en ninguna de estas evaluaciones las interferencias próximas al tiempo de retención para los analitos de interés fueron mayores al 20% respecto al límite inferior de cuantificación y del 5% para donepecilo-d7 HCl (figuras 11, 12, 13, 14, 15, 16 sección 7.2.1 Anexo).

5.4. Efecto matriz

Al utilizar la técnica de espectrometría de masas para el análisis, se debe de evaluar el efecto que cause la matriz, ya que las sustancias endógenas pueden causar problemas en el momento de que se realiza la ionización por electrospray al cambiar las propiedades de las gotas de rocío por la presencia de solutos no volátiles y así modificando la formación y la evaporación de dichas gotas, originando una disminución en la sensibilidad, exactitud o precisión del método analítico.

Por esta razón se evaluó el efecto matriz teniendo en cuenta los lineamientos que establece tanto la NOM-177-SSA1-2013 y la Resolución RCD No 27. En la tabla 15 se presentan los resultados obtenidos al analizar seis fuentes individuales de plasma, dos fuentes lipemicas y dos fuentes hemolizadas, dado que el valor del FMN fue menor al 15% garantizando que no existe tal efecto.

Tabla 15 Factor matriz normalizado para donepecilo

Muestra	FMN control de calidad bajo (0.901 ng/mL)	FMN control de calidad alto (55.087 ng/mL)
F-1655	1.044	1.016
F-1656	0.971	1.003
F-1823	1.016	1.004
F-1827	0.966	1.001
F-1828	1.026	0.999
F-1830	1.011	1.012
H-M335	0.945	0.991
H-1689	1.014	1.013
L-1691	0.966	0.985
L-1692	1.042	0.981
Promedio	1.000	1.001
Desv. Est.	0.035	0.012
CV %	3.528	1.176

Desviación estándar (D.E.), porcentaje del coeficiente de variación (C.V. %), porcentaje de desviación absoluta (Desv. Abs. %).

5.5. Acarreo

La prueba de acarreo se realiza con la finalidad de garantizar que en el sistema cromatográfico, ya sea en la aguja al momento de tomar la muestra, en la válvula del inyector o en la columna no queden residuos del analito después de una inyección del límite superior de cuantificación, porque al tener estos problemas al inyectar un doble blanco se tendrá respuesta por parte de los analitos de interés, ocasionando que el método no sea preciso y exacto y por ende tener resultados que no sean confiables.

En las figuras No. 17, 18 y 19 en sección 7.2.2 Anexos, se muestra los resultados obtenidos en la prueba, donde no se presenta interferencias cercanas al tiempo de retención del analito de interés, antes y después de la inyección del límite superior de cuantificación.

5.6. Respuesta cruzada

La prueba se realiza al utilizar una técnica de espectrometría de masas para el análisis, para evaluar que no exista un rompimiento molecular semejante a los analitos de interés.

En la figura 20, 21 y 22 en sección 7.2.2 Anexos se observa que no se presenta respuesta en los tiempos de retención de los analitos, dependiendo de cada inyección. Por lo tanto se consideró al sistema selectivo para la cuantificación de donepecilo.

5.7. Curva de calibración

La prueba se realiza con la finalidad de determinar el modelo matemático que mejor se adapte a la relación entre la respuesta analítica del instrumento con respecto a las concentraciones conocidas de donepecilo, esto se determina por medio de un ajuste a través de una regresión lineal por mínimos cuadrados a la ecuación $y=mx+b$, donde “y” es la respuesta analítica (relación de áreas de donepecilo/donepecilo-D7) obtenida para su respectiva concentración nominal “x” de donepecilo.

El mejor modelo que presentó un $\Sigma ER\%$ menor fue el modelo matemático $1/x^2$, esto se observa en la tabla 16.

Tabla 16 Error relativo global de los diferentes arreglos matemáticos

Ponderación	$\Sigma ER\%$
Ninguna	250.644
1/x	68.369
1/x ²	58.631
1/y	68.296

El método fue lineal en el intervalo designado (0.3-70 ng/mL) al cumplir con el criterio coeficiente de correlación (r) mayor o igual a 0.99, para las tres curvas

evaluadas. Otros métodos reportados presentan los siguientes intervalos (0.1-15 ng/mL) con un r de 0.9998 (Yihong Lu, 2004), (0.1-20.0 ng/mL) con un r de 0.9968 (Zhiyong Xie, 2006), (2.0-100 ng/mL) con un r de 0.9950 (Noppamas Rojanasthien, 2012), la diferencia de los diferentes rangos se atribuye a la C_{max} reportada en cada artículo.

Para cada punto de la curva de calibración se dio cumplimiento con los criterios establecidos para precisión y exactitud

A continuación en las tablas 17 y 18 se presentan los resultados de la linealidad del método para la cuantificación de donepecilo en plasma.

Tabla 17 Resultados de la curva de calibración

Concentración nominal (ng/mL)	0.300	0.601	5.008	10.016	20.031	30.047	40.063	60.094	70.110
Concentración Promedio (ng/mL)	0.293	0.621	5.076	9.983	20.641	30.436	39.432	58.254	68.859
D. E.	0.003	0.018	0.091	0.136	0.331	0.406	0.834	0.608	0.887
C. V. %	1.041	2.835	1.793	1.362	1.604	1.333	2.115	1.044	1.289
Desv. Abs %	2.222	3.383	1.358	0.333	3.047	1.295	1.575	3.062	1.785

Desviación estándar (D.E.), porcentaje del coeficiente de variación (C.V. %), porcentaje de desviación absoluta (Desv. Abs. %).

Tabla 18 Parámetros de las curvas de calibración

	Pendiente	Ordenada	r
Promedio	0.038	0.00025	0.9996
D. E.	0.00049		
C. V. %	1.300		

Desviación estándar (D.E.), porcentaje del coeficiente de variación (C.V. %).

En la figura 9 se presenta las 3 curvas de calibración para cuantificar donepecilo en plasma:

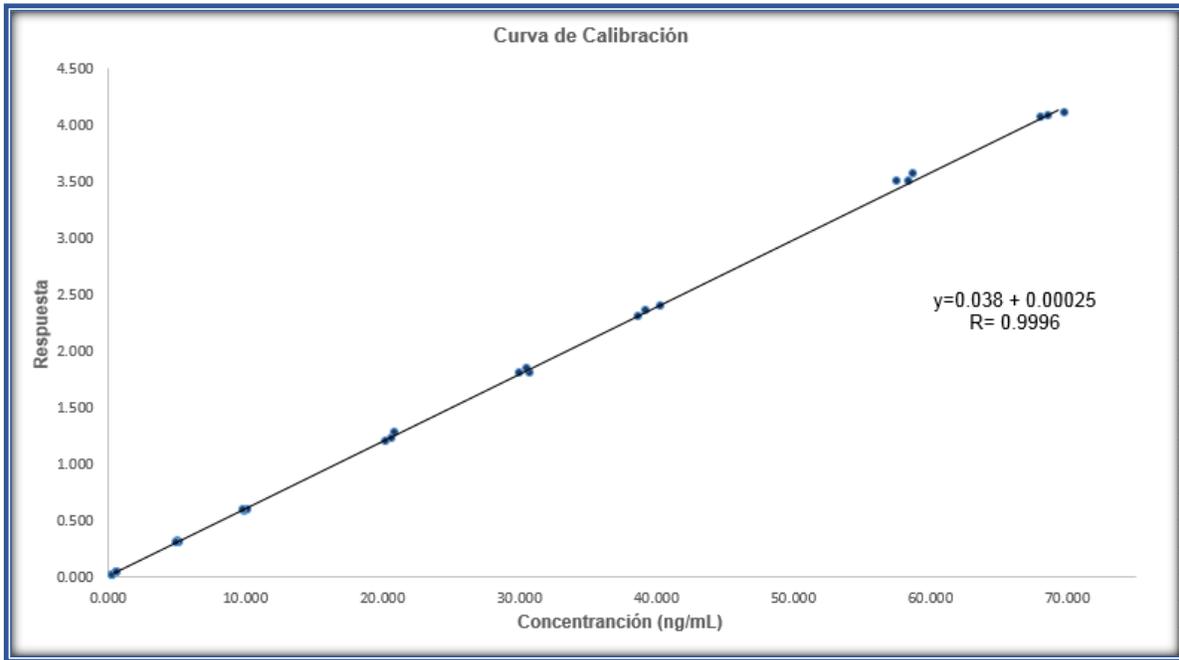


Figura. 9 Curva de calibración para cuantificar donepecilo en plasma

5.8. Precisión y exactitud

5.8.1. Repetibilidad

En la tabla 19 se observa que el método analítico fue repetible bajo las mismas condiciones de trabajo en un intervalo corto de tiempo, ya que los puntos controles de calidad bajo, bajo B, medio, alto y diluido presentan un coeficiente de variación % menor al 2.5 % y para el límite inferior de cuantificación se presenta un resultado menor al 4%. De igual forma la desviación absoluta % para el LIC y el CCB fue menor al 6%, para el CCBB y el CCM fue menor al 9% y para el CCA y CCD fue menor al 7.5%.

Por lo que el método cumple con precisión y exactitud intradia al tener un C.V. % y una Desv. Abs. % menor al 15% para cada nivel de las muestras control y para el LIC menor al 20%.

Tabla 19 Resultados de la repetibilidad del método analítico

Muestra	LIC (0.300 ng/mL)	CCB (0.901 ng/mL)	CCBB (15.024 ng/mL)	CCM (35.055 ng/mL)	CCA (55.087 ng/mL)	CCD (100.157 ng/mL)
Promedio	0.282	0.848	13.789	32.038	51.640	93.004
D. E.	0.011	0.012	0.261	0.470	1.025	1.880
C. V. (%)	3.819	1.427	1.892	1.469	1.986	2.022
Desv. Abs. %	5.867	5.927	8.220	8.608	6.257	7.142

Límite inferior de cuantificación (LIC), Control de calidad bajo (CCB), Control de calidad bajo B (CCBB), Control calidad medio (CCM), Control de calidad alto (CCA), Control de calidad diluido (CCD), Desviación estándar (D.E.), porcentaje del coeficiente de variación (C.V. %), porcentaje de desviación absoluta (Desv. Abs. %).

5.8.2. Reproducibilidad

En la tabla 20 se observa que el método analítico fue reproducible bajo diferentes días de trabajo, al presentar poca variabilidad en los resultados obtenidos, donde en los puntos controles de calidad bajo B, medio, alto y diluido presentan un coeficiente de variación % menor al 6% y para el límite inferior de cuantificación y control calidad bajo se presentó un resultado menor al 9%. De igual forma una desviación absoluta % para todos los controles y para el límite inferior de cuantificación se presentó un resultado menor al 4.5%

Por lo que el método cumple con precisión y exactitud inter día al tener un C.V. % y una Desv. Abs. % menor al 15% para cada nivel de las muestras control y para el LIC menor al 20%.

Tabla 20 Resultados de la reproducibilidad entre días

Muestra	LIC (0.300 ng/mL)	CCB (0.901 ng/mL)	CCBB (15.024 ng/mL)	CCM (35.055 ng/mL)	CCA (55.087 ng/mL)	CCD (100.157 ng/mL)
Promedio Día 1	0.282	0.848	13.789	32.038	51.640	93.004
Promedio Día 2	0.315	0.943	15.084	33.443	54.624	97.883
Promedio Día 3	0.291	0.921	15.591	35.280	54.918	100.478
Promedio	0.296	0.904	14.821	33.587	53.727	97.121
D. E.	0.024	0.077	0.821	1.543	1.718	3.894
C. V. (%)	8.201	8.494	5.540	4.594	3.197	4.010
Desv. Abs. %	1.311	0.326	1.350	4.188	2.468	3.031

Límite inferior de cuantificación (LIC), Control de calidad bajo (CCB), Control de calidad bajo B (CCBB), Control de calidad medio (CCM) Control de calidad alto (CCA), Control de calidad diluido (CCD), Desviación estándar (D.E.), porcentaje del coeficiente de variación (C.V. %), porcentaje de desviación absoluta (Desv. Abs. %).

5.9. Reproducibilidad de la reinyección

En la tabla 21 se presenta los resultados de las muestras originales y de las muestras reinyectadas después de permanecer a la temperatura del automuestrador (15° C) durante un tiempo de 28 horas. Apreciando que la reinyección de las muestras control de calidad (bajo, medio y alto) presentan resultados de coeficiente de variación y desviación absoluta menores al 15% respecto a la concentración promedio obtenida de la inyección original, cumpliendo con los criterios de aceptación.

Tabla 21 Reproducibilidad de la reinyección (28 horas)

Concentración recuperada de las muestras originales			
Muestra	CCB (0.901 ng/mL)	CCM (35.055 ng/mL)	CCA (55.087 ng/mL)
Promedio	0.943	33.443	54.624
D. E.	0.117	0.693	0.611
C. V. (%)	12.451	2.073	1.118
Concentración recuperada de las muestras reinyectadas			
Promedio	0.944	34.999	55.341
D. E.	0.092	0.949	1.478
C. V. (%)	9.785	2.712	2.671
Desv. Abs. %	0.127	4.652	1.313

Control de calidad bajo (CCB), Control de calidad medio (CCM), Control de calidad alto (CCA), Desviación estándar (D.E.), porcentaje del coeficiente de variación (C.V. %), porcentaje de desviación absoluta (Desv. Abs. %).

5.10. Estabilidad

Las estabildades evaluadas fueron las siguientes:

5.10.1. Estabilidad a corto plazo (temperatura ambiente, refrigeración y congelación)

En las tablas 22, 23 y 24 se muestran los resultados de los tiempos donde la matriz biológica fue estable 21 horas a una temperatura ambiente (15-30°C), 21 horas en refrigeración (2-8°C) y 88 horas en congelación (temperatura no mayor a -20 °C).

En artículos reportados (Xie Zhiyon 2006, Katakam Prakash 2013) solo demuestran la estabilidad a temperatura ambiente durante un periodo de 19 horas y 4 horas.

Tabla 22 Estabilidad de donepecilo en plasma a temperatura ambiente (15-30 °C) 21 horas

Muestra	CCB (0.901 ng/mL)	CCA (55.087 ng/mL)
Promedio	0.941	56.058
D. E.	0.006	0.239
C. V. (%)	0.664	0.426
Desv. Abs. %	4.440	1.762

Control de calidad bajo (CCB), Control de calidad alto (CCA), Desviación estándar (D.E.), porcentaje del coeficiente de variación (C.V. %), porcentaje de desviación absoluta (Desv. Abs. %).

Tabla 23 Estabilidad de donepecilo en plasma en refrigeración (2-8 °C) 21 horas

Muestra	CCB (0.901 ng/mL)	CCA (55.087 ng/mL)
Promedio	0.927	53.782
D. E.	0.056	0.683
C. V. (%)	6.044	1.271
Desv. Abs. %	2.849	2.370

Control de calidad bajo (CCB), Control de calidad alto (CCA), Desviación estándar (D.E.), porcentaje del coeficiente de variación (C.V. %), porcentaje de desviación absoluta (Desv. Abs. %).

Tabla 24 Estabilidad de donepecilo en plasma en congelación (temperatura no mayor a -20 °C) 88 horas

Muestra	CCB (0.901 ng/mL)	CCA (55.087 ng/mL)
Promedio	0.895	56.131
D. E.	0.017	0.531
C. V. (%)	1.903	0.946
Desv. Abs. %	0.629	1.896

Control de calidad bajo (CCB), Control de calidad alto (CCA), Desviación estándar (D.E.), porcentaje del coeficiente de variación (C.V. %), porcentaje de desviación absoluta (Desv. Abs. %).

5.10.2. Estabilidad a largo plazo

Como lo menciona la NOM-177-SSA1-2013, su propósito es comprobar que el compuesto por analizar en una matriz biológica, conserve sus características desde el momento del muestreo hasta el análisis de todas las muestras. En la tabla 25 se presentan los resultados al evaluar la estabilidad durante 63 días, al presentar una desviación absoluta menor al 15% con respecto a la concentración nominal.

En el artículo reportado por Xie Zhiyon demostró que era estable durante un periodo de 45 días a una temperatura de -20 °C. Los resultados del presente trabajo muestran que donepecilo fue estable al menos por 63 días.

Tabla 25 Estabilidad a largo plazo de donepecilo en plasma en congelación (-70±10 °C) durante 63 días

Muestra	CCB (0.901 ng/mL)	CCA (55.087 ng/mL)
Promedio	0.861	57.339
D. E.	0.033	0.419
C. V. (%)	3.791	0.730
Desv. Abs. %	4.477	4.087

Control de calidad bajo (CCB), Control de calidad alto (CCA), Desviación estándar (D.E.), porcentaje del coeficiente de variación (C.V. %), porcentaje de desviación absoluta (Desv. Abs. %).

5.10.3. Estabilidad de la muestra procesada en automuestreador

Las muestras permanecen estables en el automuestreador hasta 48 horas a una temperatura de 15 °C (tabla 27) sin presentar degradación, lo cual ayuda a diseñar corridas que duren aproximadamente ese tiempo, o en caso de ocurriera algún inconveniente con el sistema cromatográfico (falla eléctrica), durante ese periodo de tiempo se evaluarían que las muestras no se verían afectadas.

Tabla 26 Estabilidad de donepecilo en muestra procesada en automuestreador (15 °C) 48 horas

Muestra	CCB (0.901 ng/mL)	CCA (55.087 ng/mL)
Promedio	0.898	56.890
D. E.	0.025	0.734
C. V. (%)	2.735	1.290
Desv. Abs. %	0.333	3.274

Control de calidad bajo (CCB), Control de calidad alto (CCA), Desviación estándar (D.E.), porcentaje del coeficiente de variación (C.V. %), porcentaje de desviación absoluta (Desv. Abs. %).

5.10.4. Estabilidad de la muestra procesada en refrigeración

En la tabla 28 se presenta que la muestra procesada fue estable durante un tiempo de 24 horas a una temperatura de 2-8 °C, al tener una desviación absoluta menor al 15% con respecto a la concentración nominal.

Tabla 27 Estabilidad de donepecilo en muestra procesada en refrigeración (2-8 °C) 24 horas

Muestra	CCB (0.901 ng/mL)	CCA (55.087 ng/mL)
Promedio	0.950	53.447
D. E.	0.040	1.065
C. V. (%)	4.205	1.993
Desv. Abs. %	5.438	2.977

Control de calidad bajo (CCB), Control de calidad alto (CCA), Desviación estándar (D.E.), porcentaje del coeficiente de variación (C.V. %), porcentaje de desviación absoluta (Desv. Abs. %).

5.10.5. Estabilidad en extracto seco

Se realizó dicha prueba porque el método de extracción empleado fue líquido-líquido y es necesario determinar si la muestra procesada antes de ser reconstituida y almacenada a una temperatura de refrigeración (2-8° C) permanece estable. En la tabla 29 se observa que las muestras durante 15 horas a una temperatura de 2-8 °C en extracto seco fueron estables, al tener una desviación absoluta menor al 15% con respecto a la concentración nominal.

Tabla 28 Estabilidad de donepecilo en extracto seco en refrigeración (2-8 °C) 15 horas

Muestra	CCB (0.901 ng/mL)	CCA (55.087 ng/mL)
Promedio	0.854	55.873
D. E.	0.048	0.303
C. V. (%)	5.669	0.543
Desv. Abs. %	5.253	1.427

Control de calidad bajo (CCB), Control de calidad alto (CCA), Desviación estándar (D.E.), porcentaje del coeficiente de variación (C.V. %), porcentaje de desviación absoluta (Desv. Abs. %).

5.10.6. Ciclos de congelación-descongelación

En la tabla 30 se demuestra que al realizar cuatro ciclos de congelación-descongelación, con un periodo mínimo de 12 horas entre cada ciclo y a una temperatura de $-70 \pm 10^{\circ} \text{C}$, las muestras no presentaron degradación, al tener una desviación absoluta menor al 15% con respecto a la concentración nominal.

La prueba se ejecuta ya que las muestras se tienen que congelar y descongelar para el análisis y si en dado caso se requiere su reanálisis se aplica otro ciclo, por esta razón es recomendable demostrar la estabilidad de al menos 3 ciclos como lo indica la NOM-177-SSA1-2013.

Tabla 29 Estabilidad de donepecilo a cuatro ciclos de congelación-descongelación ($-70 \pm 10^{\circ} \text{C}$)

Muestra	CCB (0.901 ng/mL)	CCA (55.087 ng/mL)
Promedio	0.945	57.120
D. E.	0.067	0.888
C. V. (%)	7.097	1.554
Desv. Abs. %	4.846	3.691

Control de calidad bajo (CCB), Control de calidad alto (CCA), Desviación estándar (D.E.), porcentaje del coeficiente de variación (C.V. %), porcentaje de desviación absoluta (Desv. Abs. %).

En la tabla 31 se presenta el resumen de los resultados de % de desviación absoluta obtenida para cada prueba de estabilidad. Se demostró que todos los valores cumplen con el criterio establecido al ser menores al 15% con respecto a la concentración nominal.

Tabla 30 Resumen de la estabilidad de donepecilo en la matriz biológica y en la muestra procesada

Estabilidad	Condición y tiempo de almacenamiento	Desv. Abs. %	
		CCB (0.901 ng/mL)	CCA (55.087 ng/mL)
Corto plazo	Temperatura ambiente (15-30°C), 21 horas	4.440	1.762
	Refrigeración (2-8°C), 21 horas	2.849	2.370
	Congelación (no mayor a -20 °C), 88 horas	0.629	1.896
Largo plazo	Congelación (-70 ± 10° C), 63 días	4.477	4.087
Muestra procesada	Automuestreador (15 °C), 48 horas	0.333	3.274
	Refrigeración (2-8°C), 24 horas	5.438	2.977
Extracto seco	Refrigeración (2-8°C), 15 horas	5.253	1.427
Ciclos de congelación-descongelación	Congelación (-70 ± 10° C), 4 ciclos de congelación-descongelación	4.846	3.691

Control de calidad bajo (CCB), Control de calidad alto (CCA), porcentaje de desviación absoluta (Desv. Abs. %).

5.11. Estabilidad en solución

La razón de la prueba es para demostrar que el analito de interés no sufra degradación al estar en solución, en caso de no ocupar una solución de referencia de manera inmediata. En las tablas 32 y 33 se presentan los resultados para la estabilidad de la solución de donepecilo de mayor concentración (100.157 µg/mL) y

para la solución de menor concentración (0.100 µg/mL), a temperaturas, ambiente (15-30 °C), refrigeración (2-8 °C) y congelación (-70± 10 °C).

Se encontró que ambas soluciones cumplen con estabilidad al ser evaluadas con un periodo de almacenamiento de 8 días y 20 días (solo aplica para la solución que fue almacenada a una temperatura de refrigeración) teniendo una desviación absoluta menor al 10 % entre las soluciones para evaluarla estabilidad y las de reciente preparación, por lo que cumplen con los criterios. Debido que se utilizó un estándar interno derivado deuterado de donepecilo, los tiempos evaluados de estabilidad en las condiciones indicadas también se aplican para donepecilo-d7 HCl.

Tabla 31 Estabilidad de la solución estándar principal A de donepecilo (100.157 µg/mL) a temperatura ambiente (15-30 °C), refrigeración (2-8 °C) y congelación (-70±10 °C)

Temperatura	Muestra de la solución estándar principal A de donepecilo (100.157 µg/mL)	Área promedio	D.E.	C.V. %	Desv. Abs. %
Ambiente (15-30° C)	Recién preparada	635168.587	5980.037	0.941	5.652
	Almacenada por 8 días	599266.511	4140.095	0.691	
Refrigeración (2-8° C)	Recién preparada	638806.510	16700.080	2.610	4.612
	Almacenada por 8 días	609343.574	10863.705	1.783	
	Recién preparada	549721.870	5603.670	1.020	1.729
	Almacenada por 20 días	559226.180	10182.806	1.821	
Congelación (-70 ± 10° C)	Recién preparada	638658.304	12413.849	1.944	3.345
	Almacenada por 8 días	617298.328	11822.009	1.915	

Desviación estándar (D.E.), porcentaje del coeficiente de variación (C.V. %), porcentaje de desviación absoluta (Desv. Abs. %).

Tabla 32 Estabilidad de la solución estándar de trabajo D de donepecilo (0.100 µg/mL) a temperatura ambiente (15-30 °C), refrigeración (2-8 °C) y congelación (-70±10 °C)

Temperatura	Muestra de la solución estándar de trabajo D de donepecilo (0.100 µg/mL)	Área promedio	D.E.	C.V. %	Desv. Abs. %
Ambiente (15-30° C)	Recién preparada	636223.745	7373.239	1.159	1.216
	Almacenada por 8 días	628485.559	14933.346	2.376	
Refrigeración (2-8° C)	Recién preparada	637067.019	8755.441	1.374	1.567
	Almacenada por 8 días	627085.439	13248.912	2.112	
	Recién preparada	533656.436	5457.936	1.023	4.220
	Almacenada por 20 días	556178.788	3566.765	0.641	
Congelación (-70 ± 10° C)	Recién preparada	652527.929	11242.741	1.723	3.916
	Almacenada por 8 días	626972.597	6657.167	1.062	

Desviación estándar (D.E.), porcentaje del coeficiente de variación (C.V. %), porcentaje de desviación absoluta (Desv. Abs. %).

5.12. Recobro

Para esta prueba se menciona que no es necesario obtener el 100% del porcentaje de recobro, pero si es indispensable demostrar, tanto para el analito de interés como para el estándar interno, a diferentes niveles de concentración (baja, media y alta) que dicho parámetro sea preciso y reproducible.

El recobro se define como el cociente de la respuesta de donepecilo (área de donepecilo obtenida después de aplicar la técnica de extracción en el fluido biológico), entre la respuesta obtenida en muestras en solución a concentraciones equivalentes, las cuales no fueron sometidas al proceso de extracción (muestras en sistema), en la tabla 34 se presentan los resultados obtenidos para donepecilo, donde se observa que el promedio global de las tres concentraciones es de 83.484% (baja, media y alta), es un recobro alto y constante además presenta un coeficiente de variación para cada punto control menor al 15%, lo que nos indica

que es reproducible en el intervalo de concentraciones estudiado, de igual forma para el estándar interno se obtuvo un recobro del 90.636%.

En otros métodos reportados se presenta un recobro de 51.6% (Katakam Prakash 2013), 99.4% (Yihong Lu 2004) y 66.4% (Zhiyong Xie 2006), existe una variabilidad entre los resultados (el obtenido y los reportados), esto se debe principalmente a los diferentes procesos de extracción de donepecilo en plasma, ya que de esto depende cuanto se recupere del analito y de igual forma de las condiciones cromatográficas en cada uno de los métodos.

Tabla 33 Recobro absoluto del método analítico para cuantificar donepecilo en plasma

Nivel de concentración	Áreas		% Recobro	Porcentaje de desviación
	Sistema	Método		
Promedio Control de Calidad Bajo (0.901 ng/mL)	6571.174	5542.607	84.347	1.035
Promedio Control de Calidad Medio (35.0551 ng/mL)	244347.292	198749.890	81.339	2.569
Promedio Control de Calidad Alto (55.087 ng/mL)	372254.133	315538.871	84.764	1.534
Promedio Global			83.484	

Tabla 34 Recobro absoluto de donepecilo-d7 HCl en plasma

Concentración	Áreas		Porcentaje de recobro
	Sistema	Método	
Promedio Donepecilo D7 HCl 29.400 ng/mL	181442.360	164452.334	90.636

5.13. Aplicación del método en un estudio de bioequivalencia en voluntarios sanos

El método analítico validado para cuantificar donepecilo en plasma fue aplicado en un estudio de 19 voluntarios, con 672 muestras plasmáticas, se realizaron 6 corridas analíticas con 112 muestras cada una.

Durante el análisis de muestras desconocidas el método bioanalítico demostró ser selectivo ya que no se presentaron interferencias en el tiempo de retención para el analito de interés y estándar interno. Al igual se cumplió con los criterios establecidos para curva de calibración, controles de calidad y prueba de acarreo.

En la tabla 35 se presentan los resultados obtenidos de las concentraciones plasmáticas de donepecilo con respecto al tiempo.

Tabla 35 Estadística descriptiva para las concentraciones plasmáticas de donepecilo con respecto al tiempo

Tiempo (h)	N	Media (ng/mL)	Desv. Est. (ng/ mL)	Error Est (ng/mL)	Min (ng/mL)	Mediana (ng/mL)	Max (ng/mL)	CV%
0	19	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-
0.5	19	0.607	1.038	0.238	0.000	0.000	3.700	170.955
1	19	10.301	7.429	1.704	0.000	7.542	22.882	72.119
2	19	18.774	6.050	1.388	9.927	17.477	30.118	32.225
3	19	16.981	3.209	0.736	12.236	17.356	22.437	18.971
4	19	13.714	2.411	0.553	8.658	13.807	18.509	17.577
5	19	11.892	2.033	0.466	8.872	11.619	15.453	17.096
6	19	10.377	1.877	0.431	7.340	10.327	14.725	18.086
8	19	8.890	1.427	0.327	6.357	8.954	11.803	16.055
12	19	6.959	1.266	0.291	5.057	6.913	9.235	18.198
16	19	5.675	0.951	0.218	4.209	5.727	7.584	16.766
24	19	4.498	1.366	0.313	0.000	4.783	6.451	30.373
48	19	3.121	0.759	0.174	1.690	3.388	4.179	24.330
72	19	2.050	0.641	0.147	0.745	2.135	3.206	31.287

Número de Voluntarios en estudio (N), Desviación estándar (D.E.), Error estadístico (Error Est.) Mínima concentración (Min), Máxima concentración (Max), porcentaje del coeficiente de variación (C.V. %).

En la figura 10 se muestra la gráfica de concentración plasmática promedio con respecto al tiempo después de la administración de 10 mg de donepecilo.

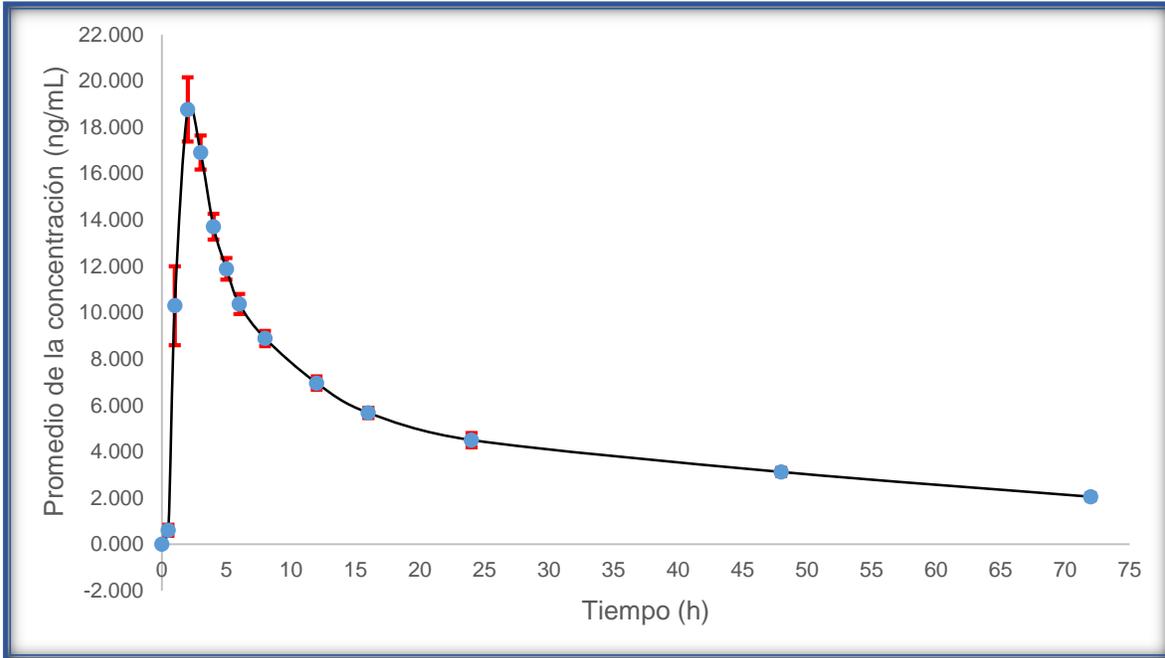


Figura. 10 Perfil farmacocinético promedio de donepecilo \pm error estándar

Se presenta la siguiente tabla con los resultados de los parámetros farmacocinéticos de donepecilo.

Tabla 36 Parámetros farmacocinéticos para donepecilo

Variable	Media	Desv. Est.
t_{max} (h)	2.053	0.705
C_{max} (ng/mL)	20.533	5.060
ABC_{0-t} (h*ng/mL)	350.121	62.902

6. CONCLUSIONES

Se optimizó y validó un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) acoplado a un detector de espectrometría de MS-MS para la cuantificación de donepecilo en plasma con CPDA, conforme a lo indicado en la NOM-177-SSA1-2013 y en la RESOLUÇÃO RCD N.º 27, emitida por ANVISA.

El método bioanalítico fue selectivo, lineal, preciso y exacto en el intervalo de concentraciones de 0.3 a 70 ng/mL.

Se evaluó la estabilidad del analito a corto plazo bajo condiciones de proceso, de análisis, a ciclos de congelación y descongelación del analito en la matriz biológica y la estabilidad de las soluciones estándar y de trabajo del analito de interés al igual que su estándar interno.

El método bioanalítico fue utilizado para un estudio de bioequivalencia de dos preparados orales con 10 mg de donepecilo, resultando ser confiable cumpliendo con los criterios y requisitos establecidos en la normatividad de las entidades regulatorias y capaz de obtener un perfil farmacocinético

7. ANEXOS

7.1. Instrumentos, equipos, material, reactivos y disolventes

7.1.1. Instrumentos y equipos

- Agitador vórtex marca Thermo Scientific, modelo M37615.
- Agitador vórtex multi-tubo, marca VWR, modelo 945063.
- Balanza analítica marca Ohaus, modelo EP214C.
- Baño de ultrasonido marca Crest ultrasonics, modelo 1875TA.
- Centrifuga marca Hettich modelo Rotanta 460.
- Congelador marca Frigidaire, modelo GLFC1326FW1.
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Shimadzu.
- Detector MS-MS, marca ABSciex modelo API 3200.
- Estación de procesamiento de datos, marca Dell.
- Micropipeta volumen fijo de 200 μ L marca Hirschmann Laborgeräte, modelo 9475507.
- Micropipeta volumen variable de 100-1000 μ L marca Eppendorf, modelo Research.
- Micropipeta volumen variable de 10-100 μ L marca Eppendorf, modelo Research.
- Pipeta repetidora electrónica marca Eppendorf, modelo Research Plus.
- Refrigerador marca Tor Rey modelo R-16.
- Sistema desionizador de agua Purelab flex marca ELGA.
- Ultracongelador marca REVCO modelo ULT2186-5-A40.

7.1.2. Material

- Charola para pesar.
- Espátula.
- Frascos de vidrio con tapa de rosca de: 100, 500, 1000 y 2000 mL.
- Gradillas.
- Guantes de nitrilo.
- Matraces volumétricos clase A: 10, 20, 1000 mL.

- Microtubos de 2 mL.
- Pipetas Pasteur.
- Placas de polipropileno de 96 pozos.
- Probeta graduada de 100, 500 y 1000 mL.
- Puntas para micropipeta 100-1000 μ L.
- Puntas para micropipeta 200 μ L.
- Puntas para pipeta repetidora.
- Recipiente resistente a bajas temperaturas.
- Tubos con tapón de rosca 13 x 100 mm.
- Tubos de vidrio silanizados de 16 x 100 mm.
- Vasos de precipitados de polipropileno: 50, 100, 250, 500 y 1000 mL.
- Vasos de precipitados de vidrio: 100, 250 y 1000 mL.
- Viales para automuestreador.

7.1.3. Reactivos y disolventes

- 2-propanol grado reactivo $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$, CAS 110-54-3, CAS 67-63-0 J. T. Baker.
- Acetona grado reactivo, ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$), CAS 67-64-1, Tecsiquim.
- Acetonitrilo grado cromatográfico (CLAR) (ACN), (CH_3CN), CAS 75-05-8, Honeywell o J. T. Baker.
- Ácido Fórmico grado reactivo (pureza 98-100%), (CH_2O_2) CAS 64-18-6, Merk.
- Agua grado cromatográfico (CLAR), (H_2O), CAS 7732-18-5 obtenida del sistema desionizador de agua.
- Hexanos grado cromatográfico (C_6H_{14} , CLAR), CAS 110-54-3, J. T. Baker.
- Hidróxido de amonio grado reactivo 28-30%, (NH_4OH), CAS 1336-21-6, J. T. Baker.
- Hielo seco (CO_2), CAS 124-38-9.
- Metanol grado cromatográfico (CLAR), (MeOH), (CH_3OH), CAS 67-56-1, Honeywell o J. T. Baker.

7.1.4. Sustancias de referencia

- Donepecilo HCl sustancia de Referencia Primaria, USP lote G0K230, potencia 99.8%.
- Donepecilo-d7 HCl (E.I.) Sustancia de Referencia Primaria, TCR, lote 1-MRS-49-2, potencia 98 %.

7.1.5. Preparación de soluciones

- Solución de ácido fórmico al 0.1% en agua grado cromatográfico (componente acuoso de la fase móvil).

Se transfirió 1 mL de ácido fórmico concentrado a un matraz volumétrico de 1L conteniendo previamente 250 mL de agua grado cromatográfico, se llevó a volumen con el mismo disolvente y se mezcló. Se filtró y desgasificó en baño de ultrasonido durante 15 minutos.

- Disolvente acetonitrilo grado cromatográfico (componente orgánico de la fase móvil).

Se transfirió 1 L de acetonitrilo grado cromatográfico a un frasco con tapón de rosca de 1 L. Se filtró y desgasificó en baño de ultrasonido durante 15 minutos.

- Solución de lavado agua grado cromatográfico: metanol grado cromatográfico 20:80 v/v.

Se midió en una probeta 100 mL de agua grado cromatográfico y 400 mL de metanol grado cromatográfico, se transfirió a un frasco de vidrio con tapa de rosca de 1 L y se mezcló homogéneamente.

- Solución de hidróxido de amonio al 6%.

Se midió 10 mL de hidróxido de amonio (28-30 %), se transfirió a un matraz volumétrico de 50 mL conteniendo previamente 10 mL

de agua, se llevó a volumen con el mismo disolvente y se mezcló homogéneamente.

- Agente de extracción 2-propanol: hexanos 3:97 v/v
Se midió en una probeta graduada 970 mL de hexanos grado cromatográfico y 30 mL de 2-propanol grado cromatográfico, se transfirió a un frasco de vidrio con tapa de rosca de 1 L y se mezcló homogéneamente.
- Solución reactivo ácido fórmico al 0.1%: acetonitrilo grado cromatográfico 50:50 v/v.
Se midió en una probeta graduada 50 mL de ácido fórmico al 0.1% en agua grado cromatográfico y 50 mL de acetonitrilo grado cromatográfico, se transfirió a un frasco de vidrio con tapa de rosca de 100 mL y se mezcló homogéneamente.
- Solución de reconstitución ácido fórmico al 0.1%: acetonitrilo grado cromatográfico 65:35 v/v.
Se midió en una probeta graduada 65 mL de ácido fórmico al 0.1% en agua grado cromatográfico y 35 mL de acetonitrilo grado cromatográfico, se transfirió a un frasco de vidrio con tapa de rosca de 100 mL y se mezcló homogéneamente.

7.1.6. Preparación de las soluciones estándar y adecuabilidad del sistema

- Solución estándar principal de donepecilo (100 µg/mL). Solución A.
Se pesó con exactitud 2.2 mg de sustancia de referencia de donepecilo clorhidrato (equivalente a 2 mg de donepecilo base) y se transfirió a un matraz volumétrico de 20 mL, se disolvió y se llevó a volumen con metanol grado cromatográfico.

- Solución estándar de trabajo de donepecilo (10 µg/mL). Solución B.
Se transfirió cuantitativamente 1 mL de la solución A (100 µg/mL) de donepecilo a un matraz volumétrico de 10 mL y se llevó a volumen con solución reactivo ácido fórmico al 0.1% en agua grado cromatográfico: acetonitrilo grado cromatográfico 50/50 v/v.
- Solución estándar de trabajo de donepecilo (1 µg/mL). Solución C.
Se transfirió cuantitativamente 1 mL de la solución B (10 µg/mL) de donepecilo a un matraz volumétrico de 10 mL y se llevó a volumen con solución reactivo ácido fórmico al 0.1% en agua grado cromatográfico: acetonitrilo grado cromatográfico 50/50 v/v.
- Solución estándar de trabajo de donepecilo (0.1 µg/mL). Solución D.
Se transfirió cuantitativamente 1 mL de la solución C (1 µg/mL) de donepecilo a un matraz volumétrico de 10 mL y se llevó a volumen con solución reactivo ácido fórmico al 0.1% en agua grado cromatográfico: acetonitrilo grado cromatográfico 50/50 v/v.
- Solución estándar principal de donepecilo-d7 HCl E.I. (100 µg/mL). Solución I.
Se pesó con exactitud 2 mg de sustancia de referencia de donepecilo-d7 HCl, se transfirió a un matraz volumétrico de 20 mL, se disolvió y se llevó a volumen con metanol cromatográfico.
- Solución estándar de trabajo de donepecilo-d7 HCl E.I. (0.30 µg/mL). Solución II.
Se transfirió cuantitativamente 60 µL de la solución I 100 µg/mL) de donepecilo-d7 HCl a un matraz volumétrico de 20 mL y se llevó a volumen con solución reactivo ácido fórmico al 0.1% en agua grado cromatográfico: acetonitrilo grado cromatográfico 50/50 v/v.

- Solución para evaluar la adecuabilidad del sistema (donepecilo 35 ng/mL, donepecilo-d7 HCl (E.I.) 30 ng/mL). Solución AD1.

Se transfirió cuantitativamente 70 μ L de la solución B (10 μ g/mL) de donepecilo y 2000 μ L de la solución II (0.3 μ g/mL) de donepecilo-d7 HCl (E.I.) a un matraz volumétrico de 20 mL y se llevó a volumen con solución de reconstitución. Se dividió la solución en alícuotas de 1.5 mL en microtubos de 2 mL y se almacenaron a $-70^{\circ}\text{C}\pm 10^{\circ}\text{C}$. Se descongeló un tubo cada día de trabajo a temperatura ambiente.

7.2. Imágenes

7.2.1. Selectividad

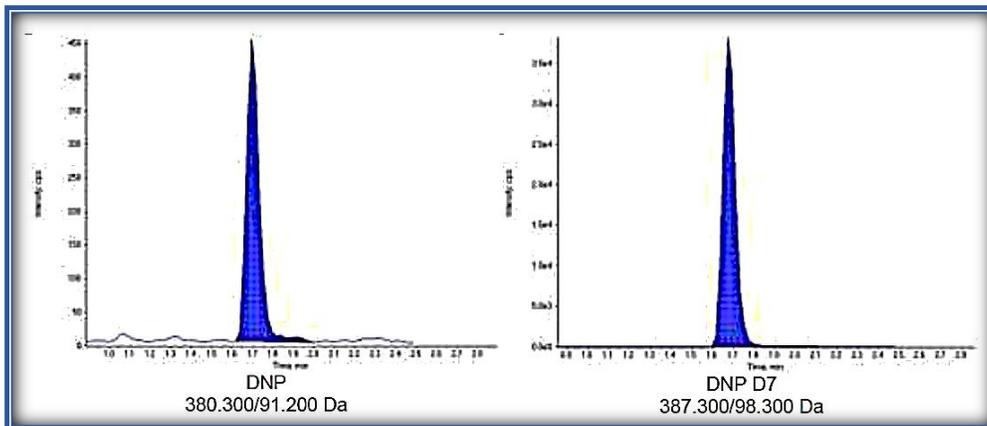


Figura. 11 Cromatograma del límite inferior de cuantificación

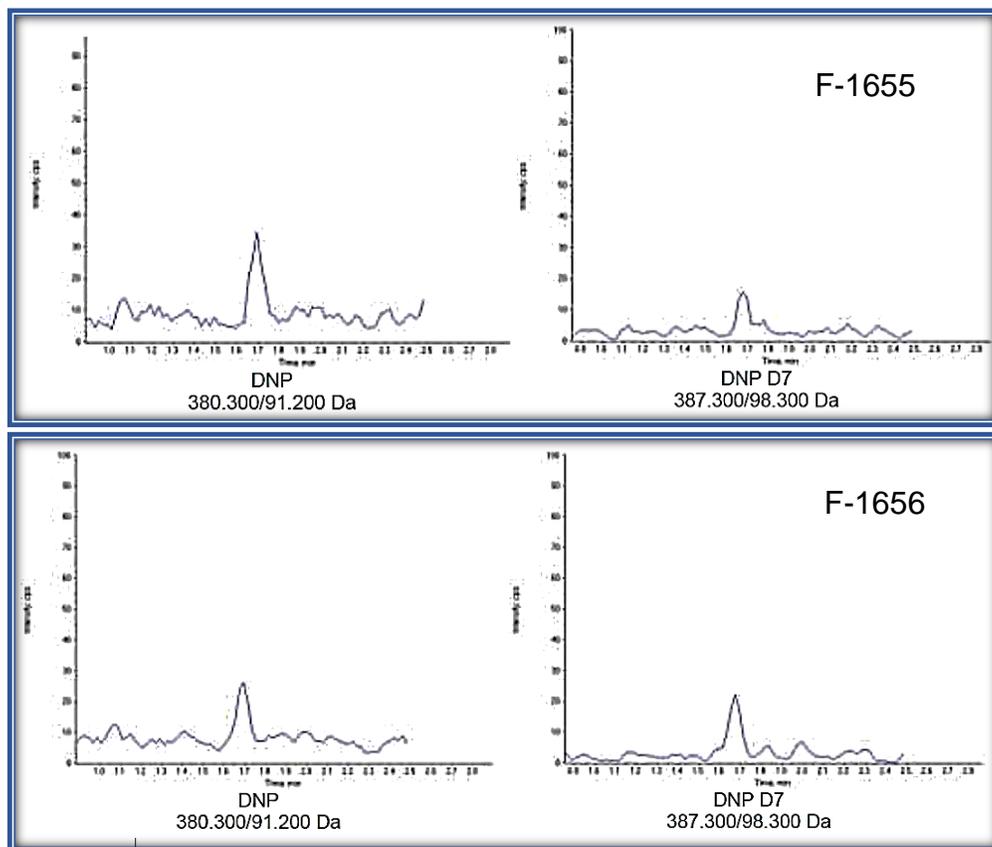


Figura. 12 Cromatograma de la selectividad a la matriz biológica de fuentes individuales de plasma (F-1655, F-1656)

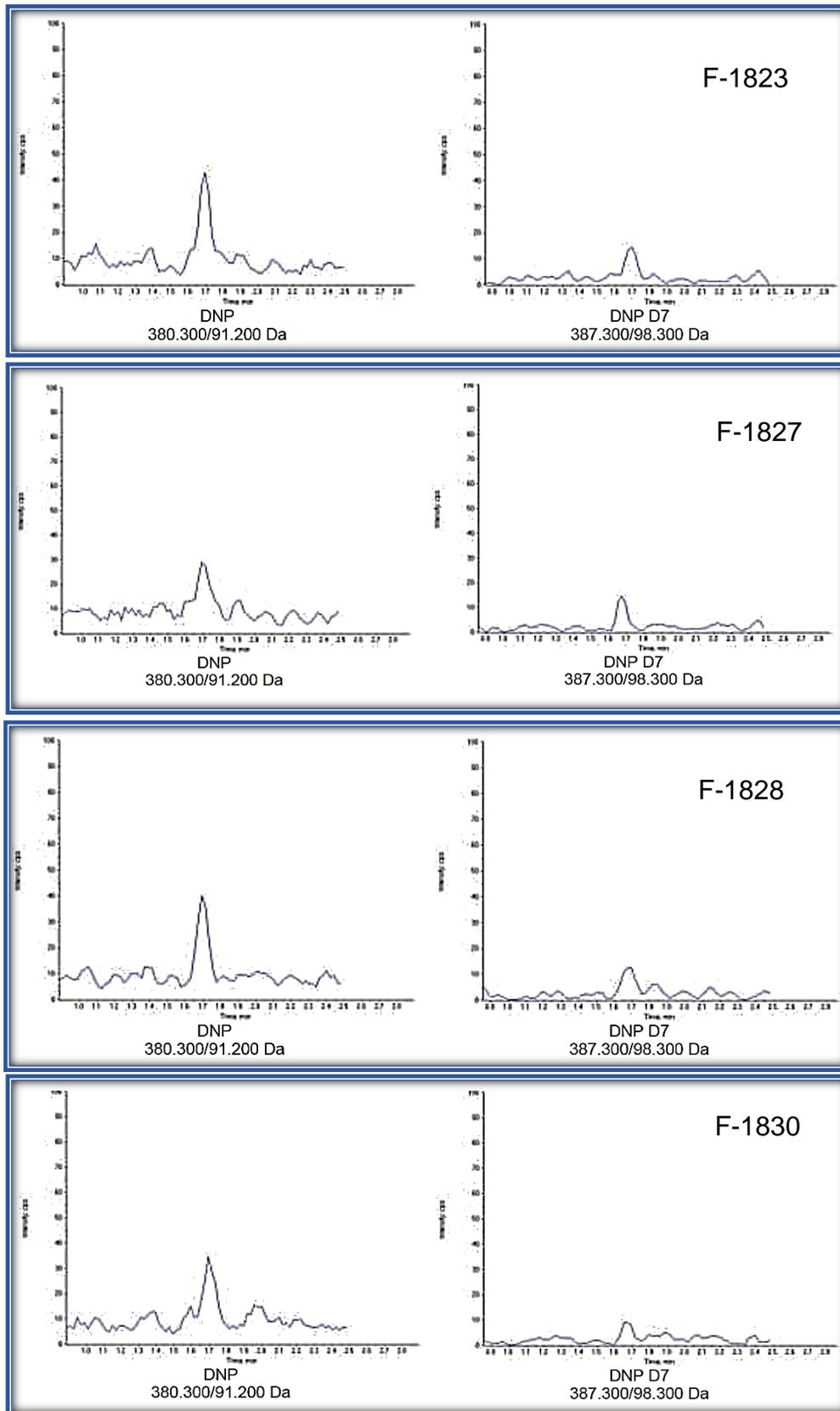


Figura. 13 Cromatogramas de la selectividad a la matriz biológica de fuentes individuales de plasma (F-1823, F-1827, F-1828, F1830)

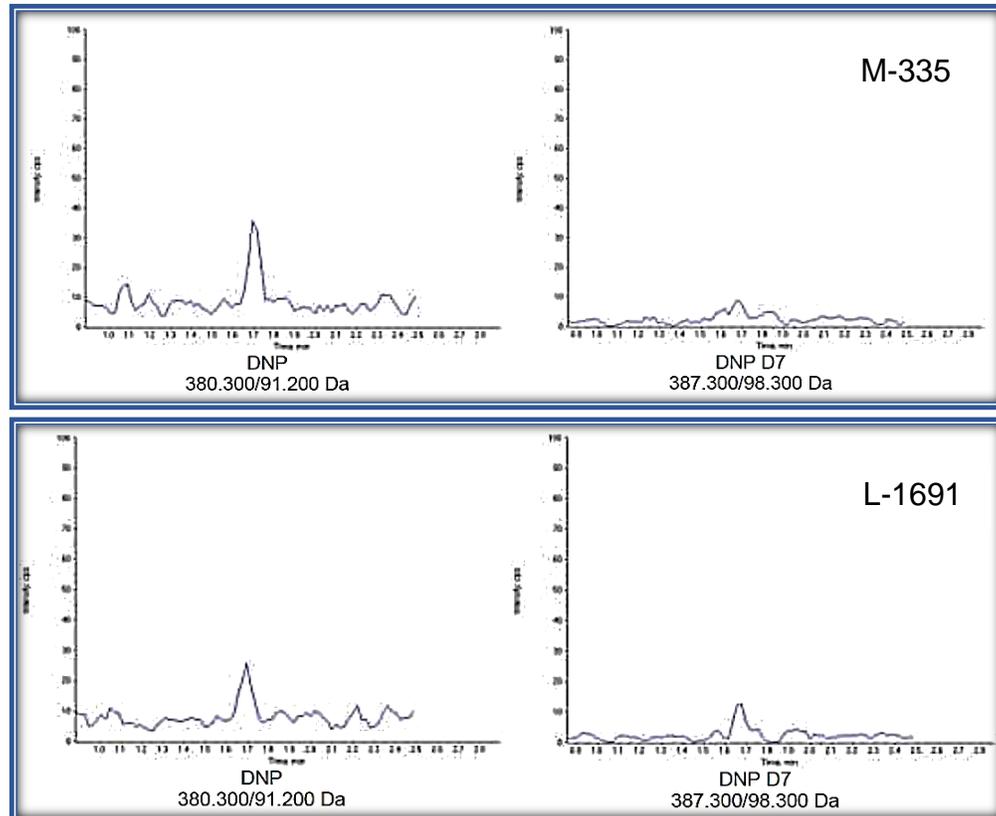


Figura. 14 Cromatogramas de la selectividad a la matriz biológica de fuentes individuales de plasma hemolizado (M-335) y lipémico (L-1691)

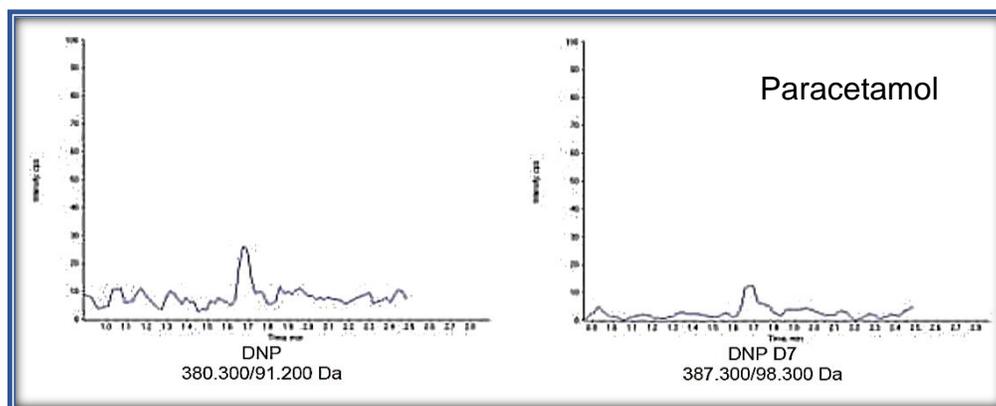


Figura. 15 Cromatograma de la selectividad a fármacos de uso común

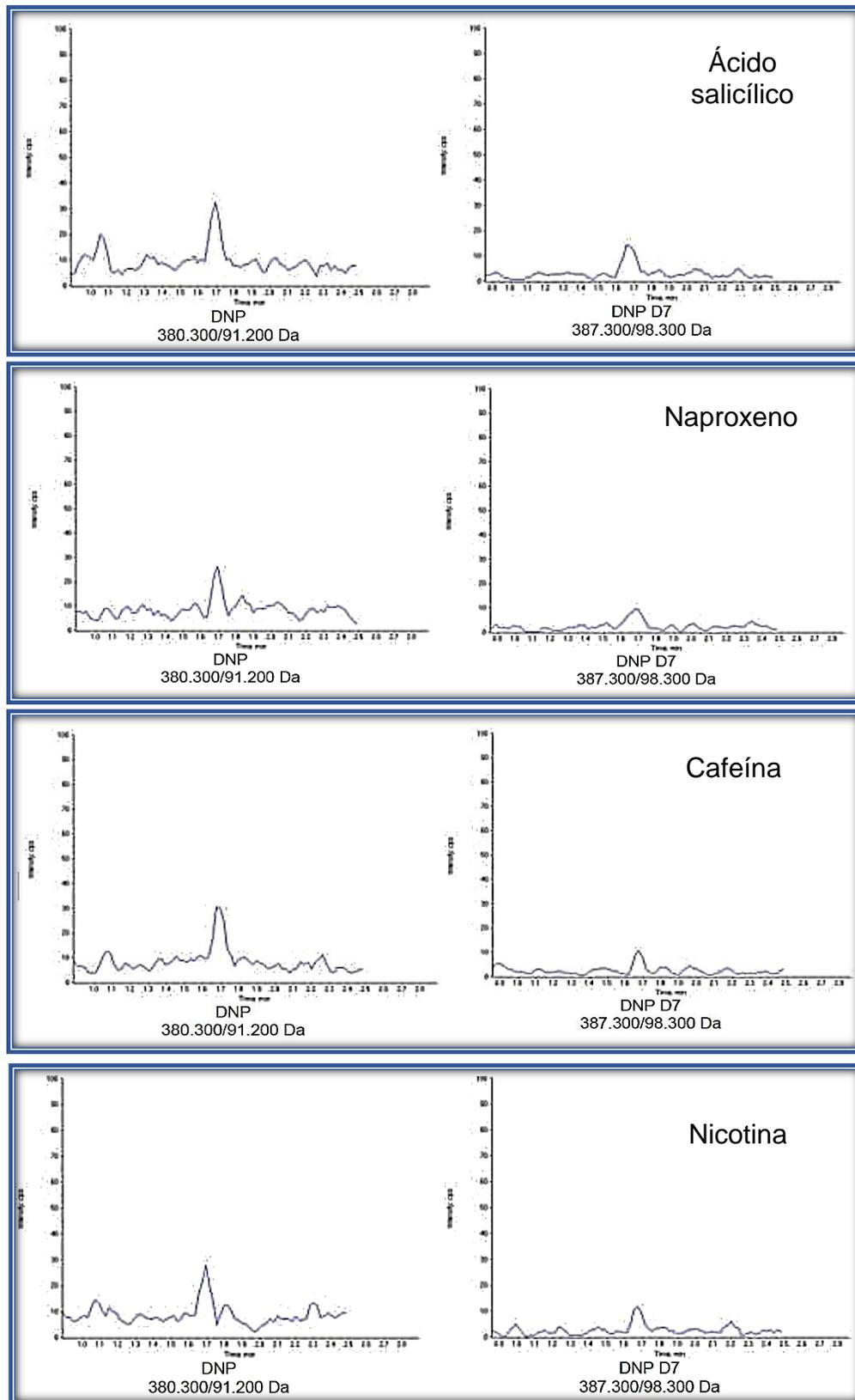


Figura. 16 Cromatogramas de la selectividad a fármacos de uso común

7.2.2. Acarreo

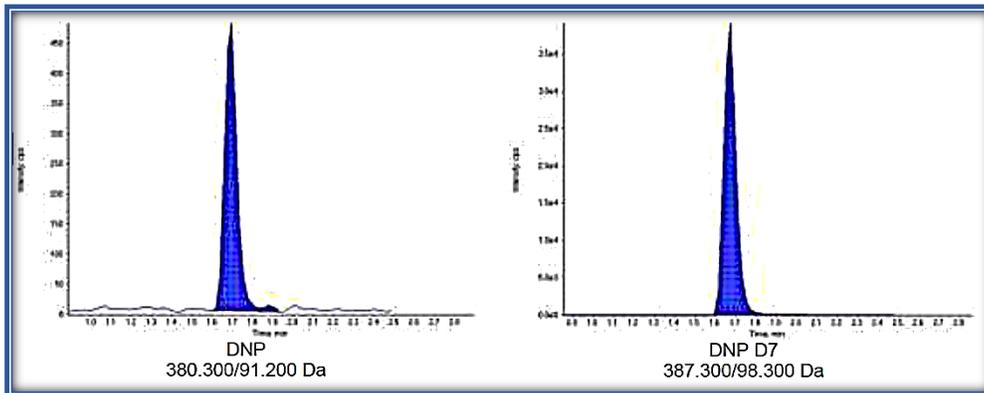


Figura. 17 Cromatograma del límite inferior de cuantificación para la determinación de acarreo

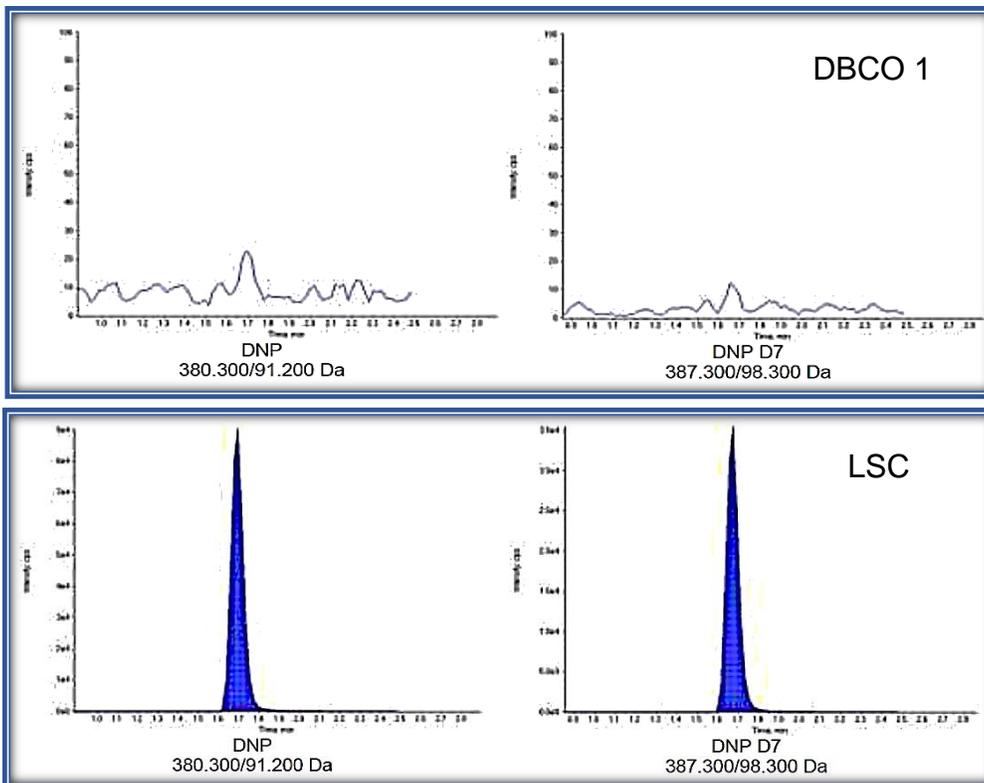


Figura. 18 Cromatogramas del acarreo para donepecilo (DNP) y donepecilo-d7 HCl (DNP D7), doble blanco (DBCO), límite superior de cuantificación (LSC)

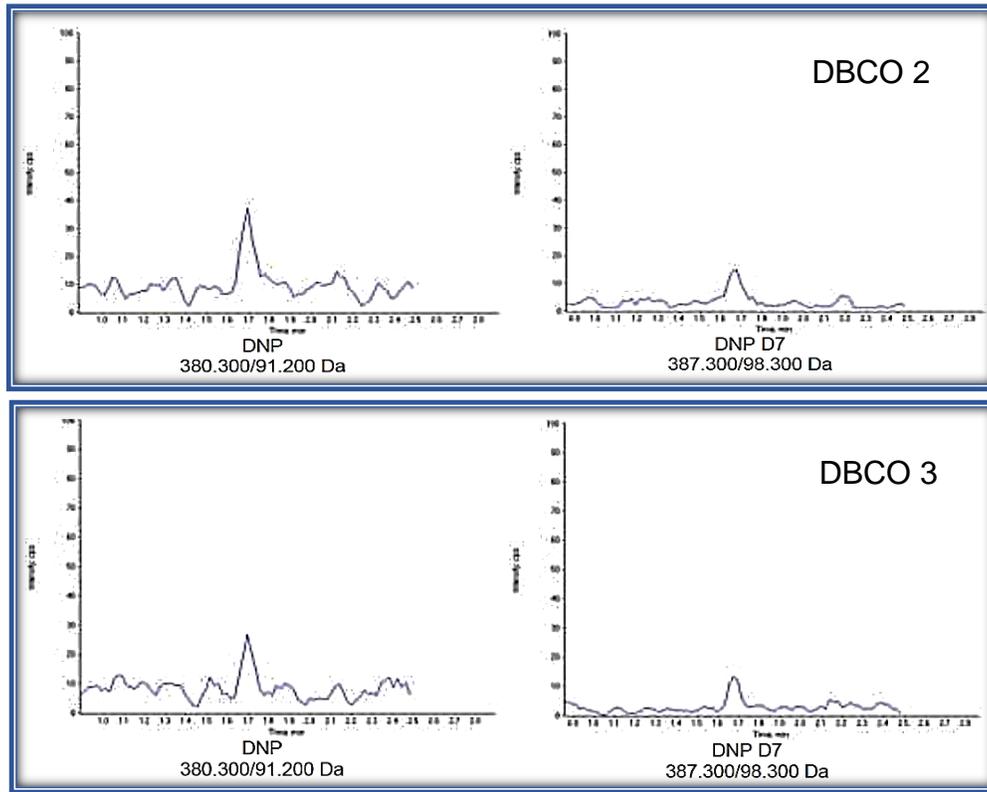


Figura. 19 Cromatogramas del acarreo para donepecilo (DNP) y donepecilo-d7 HCl (DNP D7), doble blanco (DBCO)

7.2.3. Respuesta cruzada

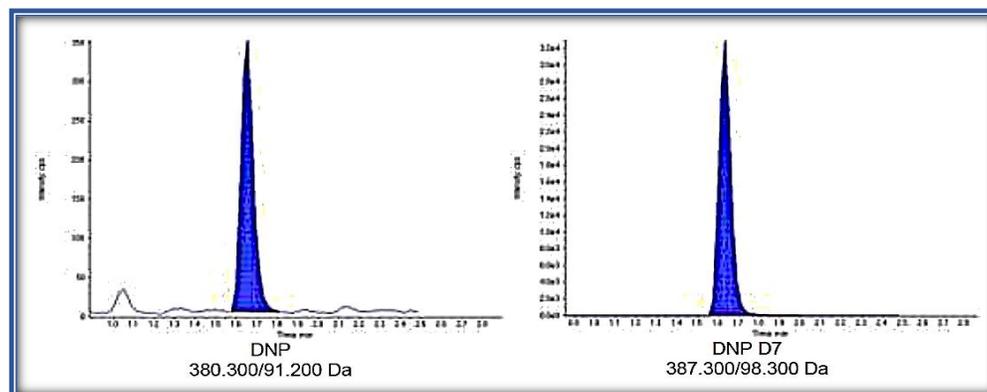


Figura. 20 Cromatogramas del límite inferior de cuantificación para la determinación de respuesta cruzada

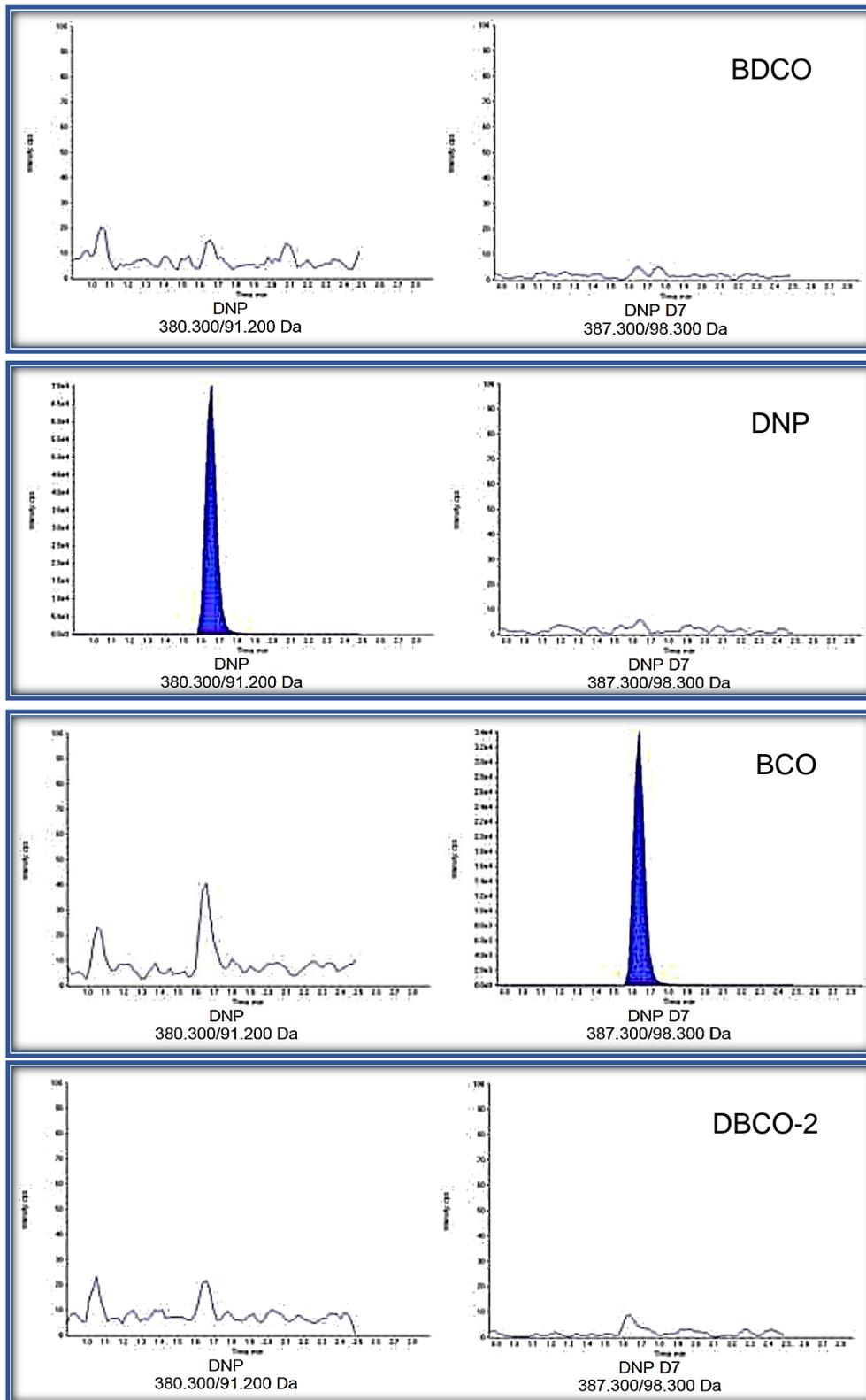


Figura. 21 Cromatogramas de la respuesta cruzada para donepecilo (DNP) y donepecilo-D7 HCl (DNP D7), doble blanco (BDCO), blanco (BCO)

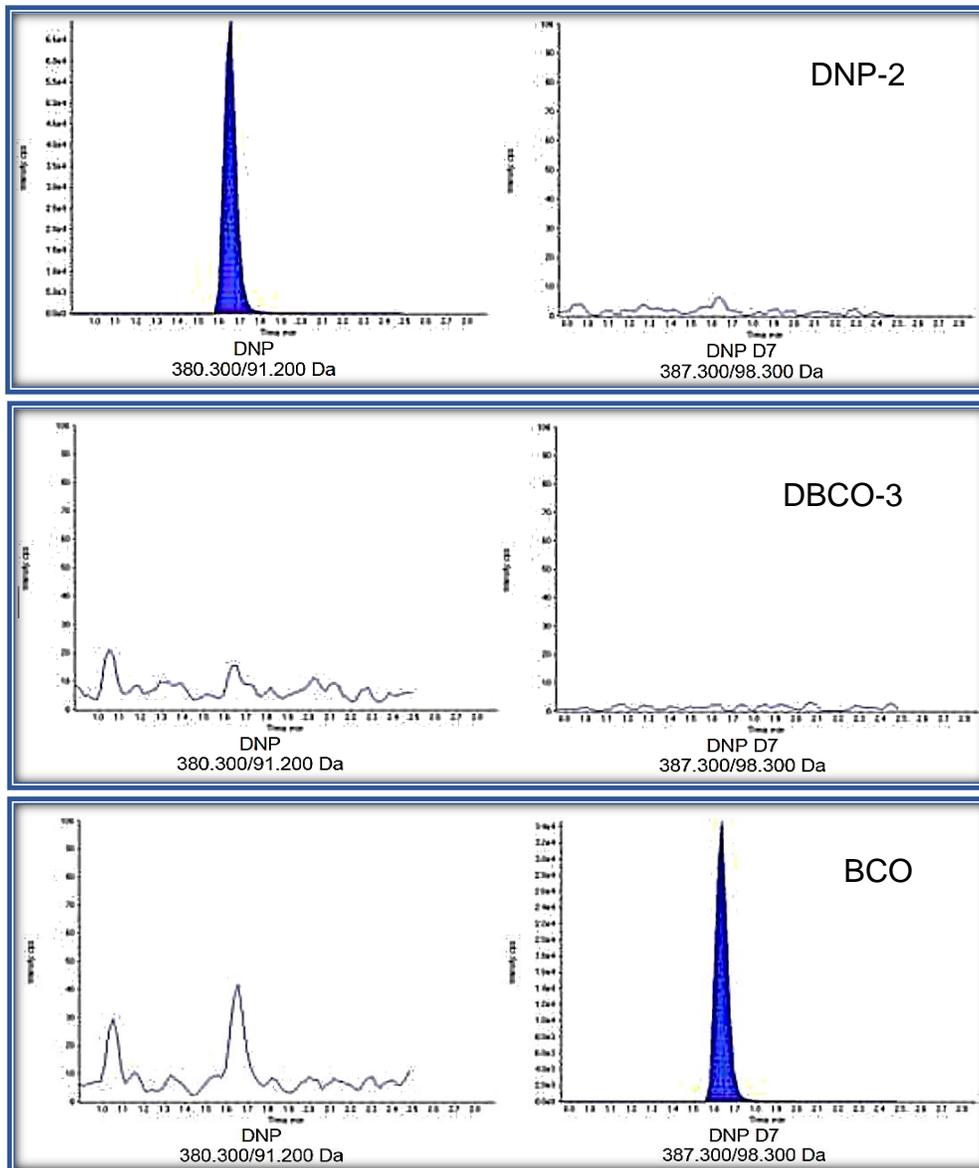


Figura. 22 Cromatogramas de la respuesta cruzada para donepecilo (DNP) y donepecilo-D7 HCl (DNP D7), doble blanco (DBCO), blanco (BCO)

8. BIBLIOGRAFÍA

Abián Joaquín, Carrascal Monserrat, Gay Marina, Introducción a la espectrometría de masas para la caracterización de péptidos y proteínas en proteómica, Laboratorio de proteómica CSIC/UAB, Instituto de investigaciones biomédicas de Barcelona IIBB-CSIC, Numero 2, Diciembre 2008

Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (ANVISA). RESOLUÇÃO RDC No. 27 Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. 27 mayo 2012.

Almeida Susana, Filipe Augusto, Neves Rita, 2010 “Bioequivalence study of two different Tablet formulations of donepezil using truncated areas under the curve”, *Arzneimittelforschung*; 60(3):116-123.

Apostolou Constantinos, Dotsikas Yannis, 2007, “Quantitative determination of donepezil in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry employing an automated liquid-liquid extraction based on 96-well format plates. Application to a bioequivalence study”, *Journal of Chromatography B*, Vol. 848, 239-244 pp.

COFEPRIS (21 de febrero de 2008) Acuerdo por el que se adiciono y modifiko la relación de especialidades farmacéuticas susceptibles de incorporarse al Catálogo de Medicamentos Genéricos. *DOF* (Diario Oficial de la Federación).

COFEPRIS (4 de abril de 2013), Comunicado de prensa No. 180, Aprueban 33 nuevos genéricos para prevenir y tratar enfermedades crónicas. Consultado: Octubre 2017, http://www.salud.gob.mx/ssa_app/noticias/datos/2013-04-04_6244.html

Consejo de Salubridad General (2016). Cuadro básico y catálogo de medicamentos. México.

Corral Payá A. 2006. "Fundamentos y funciones de la espectrometría de masas", *Universidad de Valencia. Facultad de Farmacia*. Versión en línea disponible en <http://mural.uv.es/caloon/>

Donepezil, Medsafe, [en línea], consultado: abril 2017, <http://www.medsafe.govt.nz/profs/datasheet/d/donepeziltab.pdf>

Drugbank, 2017 [Página Web], consultado: abril 2017, <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00843>.

Drugs (Aricept), Drugs.com, [en línea], consultado: abril 2017, <https://www.drugs.com/pro/aricept.html>.

European Medicines Agency. Science Medicines Health. Guideline on bioanalytical method validation. 21 julio 2011.

FDA Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. Septiembre 2013.

Fernández Laínez C. Vela Amieva M., Ibarra Gonzales I, 2009, "Espectrometría de masas en tándem: una nueva herramienta para el estudio de la metabólica en pediatría". *Acta Pediátrica México*; 30 (5) 258-2.

Gomis Yagües, V., 2008. "Técnicas instrumentales en el análisis industrial: Espectrometría de masas", *Universidad de Alicante. Departamento de Ingeniería Química*. Versión en línea disponible en rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8249/4/T5masas.pdf

Katakam Prakash, Katakuntla Rama Rao, 2013, "Development and validation of a liquid chromatography mass spectrometry method for the determination of donepezil in human plasma", *Journal of pharmacy research*, Vol. 7, 720-726 pp.

Kupiec Tom, 2004, "Quality Control Analytical Methods: High-Performance Liquid Chromatography", *International Journal of Pharmaceutical Compounding*, Vol. 8 No. 3, 223-227 pp.

Mohammed A. Abonassif, Mohammed M. Hefnawy, 2011, "Determination of donepezil hydrochloride in human plasma and pharmaceutical formulations by

HPLC with fluorescence detection”, *Pharmaceutical Chemistry Department College of Pharmacy, Acta Pharm.* 61, 403-413 pp.

Mycek Mary J., Harvey Richard A., Champe Pamela C., *Farmacología, Anticolinesterasas*, Segunda edición, Mc Graw Hill, 2005 pag 48.

Nerea Leal, 2009, “Desarrollo y Validación de Técnicas Analíticas,” [en Línea], consultado: Marzo 2017, http://www.plataformadeoncologia.com/imagenes/Dra_%20Leal.pdf

Noppamas Rojanasthien, Siriluk Aunmuang, 2012, “Bioequivalence study of donepezil hydrochloride tablets in healthy male volunteers”, *International Scholarly Research Network Pharmacology*, Article ID 527679, 4 pag.

Organización Mundial de la Salud, abril 2012, *Demencia* [página web], consultado: octubre 2017, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/es/>

Plascencia Villa G. 2003, “Maestría en ciencias bioquímicas, Curso de métodos: espectrometría de masas”, *Instituto de biotecnología, UNAM*. Versión en línea disponible en http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/Spec_Masas.pdf.

Rubinson Kenneth A., Rubinson Judith F., *Análisis Instrumental*, Pearson Prentice Hall, España, 2004, pp 522.

Salazar Vallejo Michel, *Tratado de Psicofarmacología: bases y aplicación clínica*, Capítulo 18 Inhibidores de la acetilcolinesterasa, Donepezilo, Segunda edición, Buenos Aires Madrid Médica Panamericana, 2009, 263-265 pp.

Secretaría de Salud (2014), *Reglamento de Insumos para la Salud (RIS) Estados Unidos Mexicanos*.

Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Diario Oficial de la Federación 20 de noviembre del 2013.

Shetti P., Venkatachalam A. 2011, "Development and validation of novel LC-MS method for quantification of donepezil from human plasma", *International Journal of PharmTech Research*, vol. 3, No.3, pp 1667-1674

Tiwari Gaurav, Tiwari Ruchi, 2010, "Bioanalytical method validation: An updated review" [en línea], *Pharmaceutical Methods*, Department of Pharmaceutics, Pranveer Singh Institute of Technology, Kalpi road, Bhauti, Kanpur - 208 020, Uttar Pradesh, India, 2010, vol. 1 no. 1 pp. 25-38, consultado: Abril 2017, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3658022/>

TRSL Inc., 2017 BCS DataBase Search. Consultado: Octubre 2017, <http://tsrlinc.net/results.cfm>

Xie Zhiyong; LIAO Qiongfeng; 2006 "Rapid and sensitive determination of donepezil in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: application to a pharmacokinetic study", *Rapid Commun. Mass Spectrom.* Vol 20 3193-3198 pp.

Yihong Lu, Hongmei Wen, 2004, "Determination of donepezil hydrochloride (E2020) in plasma by liquid chromatography- mass spectrometry and its application to pharmacokinetic studies in healthy, young, Chinese subjects", *Journal of chromatographic science*, Vol 42, 234- 237 pp.

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”