



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

ZARAGOZA

**DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO
POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE
ALTA EFICIENCIA PARA LA
CUANTIFICACIÓN DE OMEPRAZOL EN UNA
FORMULACIÓN LIQUIDA**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

VIRIDIANA FLORES DE LA CRUZ

Dr. Vicente J. Hernández Abad

DIRECTOR

M. en C. Elizabeth Gpe. Sánchez González

ASESOR





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.

INDICE

1. Introducción.....	4
2. Fundamentos.....	5
2.1 Cromatografía.....	5
2.2 CLAE o CLAR.....	6
2.3 Tipos de CLAE.....	6
2.3.1 Cromatografía quiral.....	6
2.3.2 Cromatografía de Intercambio Iónico.....	6
2.3.3 Cromatografía de afinidad.....	6
2.3.4 Cromatografía de fase normal.....	7
2.3.5 Cromatografía de fase reversa.....	7
2.3.5 Cromatografía de exclusión molecular.....	7
2.4 Partes esenciales de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución.....	7
2.4.1 Reservorio.....	7
2.4.2 Bomba.....	8
2.4.3 Inyector.....	8
2.4.4 Columna.....	8
2.4.5 Detector.....	9
2.4.5.1 Detectores más comunes.....	9
2.4.6 Registrador o Integrador.....	10
2.5 Fase móvil.....	10
2.5.1 Compatibilidad del sistema.....	10
2.5.2 Solubilidad de la muestra.....	10
2.5.3 Preparación de la fase móvil.....	10
2.6 Análisis cuantitativo.....	11
2.6.1 Determinaciones cuantitativas.....	11
2.6.1.1 Integrador computarizado.....	11
2.6.1.2 Normalización de área.....	12
2.7 Validación de métodos analíticos.....	14
2.7.1 Método analítico.....	14
2.7.2. Consideraciones al desarrollar un método analítico.....	16
2.7.3 Validación.....	17
2.7.4 Parámetros analíticos de validación.....	17
2.7.4.1 Selectividad.....	17
2.7.4.2 Linealidad.....	17
2.7.4.3 Precisión.....	18
2.7.4.4 Exactitud.....	18
2.7.4.5 Robustez.....	18
2.8 Omeprazol.....	19
2.8.1 Espectroscopia UV.....	20
2.8.2 Espectroscopia Infrarroja.....	20
2.8.3 Indicaciones terapéuticas.....	21
2.8.4 Interacciones medicamentosas.....	22
3. Planteamiento del problema.....	23
4. Objetivos.....	24
5. Hipótesis.....	25

6. Diseño experimental.....	26
7. Diagrama de Flujo.....	29
8. Metodología.....	30
8.1 Preparación de la formulación líquida de Omeprazol.....	30
8.2 Desarrollo del método analítico.....	31
8.2.1 Condiciones cromatográficas.....	31
8.2.2 Preparación de la fase móvil.....	31
8.3 Validación del método analítico.....	32
8.3.1 Validación del Sistema.....	32
8.3.2 Validación del método.....	33
9 Resultados y Análisis de Resultados.....	36
9.1 Desarrollo del método analítico	36
9.2 Validación del Sistema.....	39
9.3 Validación del Método.....	41
10. Conclusiones.....	53
11. Referencias.....	54

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad se requiere el desarrollo de métodos de análisis apropiados que cumplan con las normas de calidad, dichos métodos deben cumplir con los parámetros establecidos para su aceptación y que a su vez cumplan con las normas regulatorias que exigen que los métodos estén validados, es decir se tiene que comprobar y certificar con evidencia conveniente documentada que un método, sistema o proceso, cumple y se desarrolla tal y como estaba previsto, dentro de los intervalos definidos.

En el presente trabajo se busca desarrollar un método para la cuantificación de Omeprazol en una formulación líquida. La Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia en la actualidad es una de las técnicas más utilizadas en la Industria Farmacéutica para la cuantificación de componentes, ya que es una forma de evaluación analítica que proporciona una alta selectividad, sensibilidad y precisión.

Para garantizar la confiabilidad y funcionalidad del método analítico que se emplea en el análisis del principio activo se deben cumplir los parámetros de validación que incluyen la linealidad, precisión, repetibilidad reproducibilidad, exactitud, estabilidad de la muestra y robustez.

2. FUNDAMENTOS

1.1 CROMATOGRAFÍA¹

La cromatografía es un término general aplicado a una amplia gama de técnicas de separación.

Existen diversas definiciones del fenómeno de la cromatografía, dentro de estas destacan las siguientes.

1. Es una técnica mediante la cual los componentes en una muestra son acarreados por una fase gaseosa o líquida, y son resueltos mediante pasos de adsorción-desorción sobre la fase estacionaria.
2. Es un proceso de separación en donde una mezcla es aplicada como una zona inicialmente reducida a un adsorbente poroso estacionario, y los componentes experimentan una migración diferencial por el flujo de una fase móvil, la cual puede ser un líquido o un gas.
3. Es un proceso de separación que se lleva a cabo por una distribución de sustancias entre una fase móvil y una estacionaria. Estas sustancias pasan por el sistema cromatográfico al ser distribuidas entre la fase móvil y la fase estacionaria. Como una consecuencia, las sustancias son eluidas en la columna por orden inverso a sus coeficientes de distribución con respecto a la fase estacionaria.
4. La Unión Internacional para la Química Pura y Aplicada (1993) la clasificó como un método físico de separación, en que componentes al ser aislados están distribuidos entre dos fases, una de las cuales está en estado estacionario y la otra en movimiento en una dirección definida.
5. Keulemans ha definido la cromatografía como un proceso físico de separación en la cual los componentes a separar se distribuyen entre dos fases una de las cuales constituye la fase estacionaria, de gran área superficial, y la otra es un fluido (fase móvil) que pasa a través o a lo largo de la fase estacionaria.

Por lo tanto el proceso cromatográfico involucra la distribución de los analitos presentes en una mezcla a separar entre dos fases inmiscibles entre sí. Una de ellas es la fase estacionaria, la cual puede ser un sólido o un líquido adsorbido o enlazado covalentemente sobre un soporte poroso de gran área superficial. La fase móvil es un fluido (gas, líquido o fluido supercrítico) que se usa como portador de la mezcla.^{1,2}

2.2 CROMATOGRAFÍA DE LIQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA/RESOLUCIÓN (CLAE o CLAR)

La CLAE o CLAR (Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución) es una técnica de separación que se fundamenta en la interacción de un soluto con una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida. La separación se lleva a cabo por reparto, adsorción o procesos de intercambio iónico, dependiendo del tipo de fase estacionaria usada. Esta técnica tiene distintas ventajas sobre la cromatografía de gases para el análisis de compuestos orgánicos. Los compuestos a ser analizados son disueltos en un líquido orgánico, y la mayor parte de las separaciones se llevan a cabo a temperatura ambiente. Dado que la mayoría de los fármacos son compuestos no volátiles o térmicamente estables, pueden ser separados sin descomposición o sin la necesidad de sintetizar derivados volátiles.^{3, 4}

El tiempo de elusión de un compuesto puede ser descrito por el factor de capacidad, k' , que depende de la naturaleza química del analito, la composición y la velocidad de flujo de la fase móvil, además de la composición y el área de la superficie de la fase estacionaria. La longitud de la columna es determinante de la resolución. Sólo compuestos con diferentes factores de capacidad pueden ser separados por CLAR.

2.3. Tipos de CLAE

Los métodos cromatográficos comúnmente utilizados pueden ser divididos en:

2.3.1. Cromatografía quiral.

La separación de enantiómeros puede hacerse sobre una fase estacionaria quiral, por formación de diastereómeros vía agentes derivativos o aditivos de la fase móvil que actúan sobre la fase estacionaria. Cuando se usa como un método de prueba de impurezas, la sensibilidad es mejorada si la impureza enantiomérica eluye antes que el fármaco enantiómero.⁴

2.3.2. Cromatografía de intercambio iónico.

La separación está basada en la carga de los grupos funcionales, intercambio aniónico para una muestra con carga negativa o intercambio catiónico para una muestra con iones positivos. El gradiente de elusión por pH es común.¹

2.3.3. Cromatografía de afinidad.

La separación está basada en la interacción química específica de las especies destino. La modalidad más popular usa un amortiguador y una cantidad

adicionada de carga positiva a la muestra con separación influenciada por pH, fuerza iónica, temperatura, concentración y tipo de disolvente orgánico.¹

La cromatografía de afinidad, común para macromoléculas, emplea un ligando (molécula biológicamente activa unida covalentemente a la matriz sólida), la cual interactúa con su antígeno (analito) homólogo como un complejo reversible que puede ser eluido por cambios en las condiciones del amortiguador.¹

2.3.4. Cromatografía de fase normal.

Es una técnica cromatográfica que usa solvente orgánico para la fase móvil y una fase estacionaria polar. Aquí, los componentes menos polares eluyen más rápido que los componentes más polares.⁴

2.3.5. Cromatografía de fase reversa.

La cromatografía de fase reversa, es una técnica de fase ligada, la cual utiliza agua como el solvente base. La separación está basada en la fuerza y selectividad del solvente, también puede ser afectada por la temperatura de la columna y el pH. En general, el componente más polar eluye más rápido que los componentes menos polares.⁴

2.3.6. Cromatografía de exclusión molecular.

También conocida como filtración o permeación en gel, la separación está basada en el tamaño de las moléculas o el volumen hidrodinámico de los componentes. Las moléculas que son más grandes que los poros del material de empaque de la columna, eluyen primero, las moléculas pequeñas que entran en los poros eluyen al final y la velocidad de elución de el resto depende de sus tamaños relativos.⁵

2.4 Partes esenciales de un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia

Las partes esenciales de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución son: el reservorio para fase móvil, la bomba, el inyector, la columna, el detector y el registrador o integrador.^{1,4}

2.4.1 Reservorio para la fase móvil

Es el recipiente que contiene la fase móvil, debe ser de composición tal que no interactúe con ésta, su forma y tipo puede variar desde un frasco común hasta un sistema capaz de filtrar, termo regular y/o desgasificar el disolvente.⁴

2.4.2 Bomba

Es el dispositivo capaz de proporcionar a la fase móvil el flujo o velocidad precisa para introducirla al sistema y atraviesa la columna a presiones de hasta 6000psi.¹

Las bombas más utilizadas son las de movimiento alternado o mas reciprocantes que mantienen la velocidad constante de la fase móvil, consta de un pequeño pistón accionado por un motor que se mueve rápidamente hacia delante y hacia atrás en una cámara hidráulica, que puede variar de capacidad desde 35 hasta 400µL. No hay restricciones en el tamaño del recipiente o en el tiempo de alimentación.¹

2.4.3 Inyector

Es el dispositivo que permite introducir la muestra en solución al sistema, sin interrumpir el caudal de la fase móvil. El inyector debe ser fácil de operar, inerte al ataque químico y capaz de soportar altas presiones, debe ser preciso en cuanto a la cantidad de muestra que introduce al sistema, debe inyectar la muestra en forma de paquete compacto con el propósito de obtener una máxima eficiencia en la separación.

Existen dos diseños de inyectores: los de desplazamiento y los de aguja. Ambos pueden ser incorporados a un sistema de inyección manual o automático. Los inyectores de desplazamiento forzan la muestra hasta un loop pero presentan baja reproducibilidad cuando están parcialmente llenos. En consecuencia, es necesario cambiar físicamente el loop para cambiar los volúmenes de inyección. Los inyectores de tipo aguja conducen la muestra a través del loop. Este mecanismo puede operar con precisión con un "loop" parcialmente lleno y es, por lo tanto, más versátil. Puede ser más difícil mantener inyecciones reproducibles con un inyector de desplazamiento que con uno de aguja. Bajo la mayoría de las circunstancias, la reproducibilidad no es un problema.⁴

2.4.4 Columna

Es la parte más importante del sistema cromatográfico, pues en ella es donde se lleva a cabo la separación. Las características de la columna, el material de empaque, así como las dimensiones dependerán del tipo de separación que se desee o requiera. Las más comunes para separaciones analíticas usualmente tienen diámetros internos de 2 a 5 mm; las columnas de diámetro mayor son usadas para cromatografía preparativa. Las columnas pueden ser calentadas para dar separaciones más eficientes, pero raramente son usadas a temperaturas mayores a 60°C, debido a la degradación potencial de la fase estacionaria o la volatilización de la fase móvil.^{1, 4}

2.4.5 Detector

La función del detector en CLAE es monitorear la fase móvil que emerge de la columna. La salida del detector es una señal eléctrica que es proporcional a algunas propiedades de la fase móvil y/o solutos.

Las características importantes que debe poseer un detector ideal son:

- Sensibilidad alta y respuesta constante de la muestra.
- Responder a todos los solutos o tener especificidad constante.
- No ser afectado por cambios de temperatura y flujo de la fase móvil.
- Ser confiable, conveniente, fácil de usar y económico.
- Respuesta rápida.

2.4.5.1 Detectores más comunes¹

a) Detector de índice de refracción

Mide las diferencias de los índices de refracción del disolvente puro y la solución de la muestra que sale de la columna.

b) Detector de absorción UV/Visible

Son los detectores más utilizados para un análisis por CLAR, la fase móvil de la columna es pasada por una pequeña celda de flujo en el rayo de radiación de un fotómetro o espectrofotómetro UV/Visible, estos detectores son selectivos, esto es únicamente detectan solutos que absorben la radiación de un rango entre 190-800 nm.

c) Detector de Arreglo de fotodiodos (DAD)

En este detector la radiación policromática después de pasar por la muestra, es dispersada por una rejilla fija y cae a un arreglo de fotodiodos, cada diodo mide una banda angosta de longitudes de onda en el espectro, de esta forma se tienen todos los puntos en el espectro.

d) Detector de fluorescencia

Es el más sensible y posee alta selectividad de respuesta a compuestos fluorescentes y a sus derivados, al tener la capacidad de medir la energía emitida por los solutos excitados. El detector es tan selectivo que se utiliza para el análisis de trazas.

2.4.6 Registrador o Integrador

Es un sistema de registro de la respuesta del detector, que la transforma en un cromatograma que se integra para cuantificar la muestra.⁴

2.5. Fase móvil

En todas las formas de cromatografía, la calidad y manipulación de la fase móvil es tan crítica como cualquier parte del sistema cromatográfico. Existe una serie de factores que deben tomarse en cuenta a fin de evitar problemas durante la ejecución de la técnica.^{1, 4}

2.5.1 Compatibilidad del sistema.

Es necesario considerar las necesidades del equipo de CLAE cuando se selecciona la fase móvil. Se recomienda que la mezcla de disolventes sea miscible con la usada previamente en el equipo, de lo contrario, es necesario usar un disolvente intermediario que sea miscible en la fase previa y en la nueva. Esto requerirá purgar el sistema e introducir el nuevo disolvente, lo cual tomará alrededor de 30 minutos. Si las fases son miscibles, se necesitará de un tiempo de enjuague, pero significativamente menor, de 5 a 15 minutos.¹

2.5.2 Solubilidad de la muestra.

Cuando los componentes de la muestra son insolubles en la fase móvil puede ocurrir precipitación, bloqueo de la jeringa o de la válvula. Dependiendo del tipo de muestra, puede actuar como un grano de arena y rayar el sistema. Estas partículas pueden bloquear la cabeza de la columna, restringir el flujo de la fase móvil e incrementar la presión interna. La muestra debe ser soluble en la fase móvil, en el rango de concentración de trabajo.¹

2.5.3 Preparación de la fase móvil.

La primera rutina que se debe llevar a cabo con la fase móvil es la filtración de sus constituyentes. Los solventes comerciales para CLAR pueden contener partículas. No obstante, éstas no son visibles debido al índice de refracción del disolvente, o bien, a su tamaño. Tal contaminación ocasiona varios problemas debido a la acumulación en la cabeza de la columna, como pueden ser:

- Cambios en la velocidad de elución.
- Cambios en el factor de capacidad.
- Disminución de la selectividad.
- Picos fantasma.
- Absorción irreversible y disminución de la vida de la columna.

Es posible que las partículas se queden en el sistema de bombeo dañándolo y provocando fluctuaciones en la velocidad de flujo. Este tipo de contaminación también invade las válvulas afectando el tiempo de vida de ellas.⁴

La forma más fácil de evitar los problemas anteriores es filtrar el disolvente. Se utilizan comúnmente filtros de ésteres de celulosa con tamaño de poro de 0.22

micras para medios acuosos, y de politetrafluoroetileno con 0.2 micras para medios orgánicos.⁴

Una vez que estos han sido filtrados se recomienda realizar una desgasificación, esto para que nuestra fase móvil no lleve burbujas que puedan tapar el inyector así como dañar el detector al bajar la presión por el acumulamiento de gas.⁴

2.6 Análisis cuantitativo

El uso de la cromatografía se ha extendido en todo el mundo, en las últimas cuatro décadas, no solo por su capacidad de separar compuestos sino porque se puede realizar un análisis cuantitativo de las especies proporcionadas.

En la cromatografía en columna, el análisis cuantitativo se basa en la comparación de la altura, o del área, del pico del analito con la de uno o más patrones inyectados bajo las mismas condiciones cromatográficas. El uso de uno u otro término dependerá de las características de la banda obtenida, aunque en la actualidad con el uso de sistemas de integración de área computarizados, la precisión es muy alta para el cálculo de área, sin embargo, siempre es importante conocer otras herramientas a utilizar para calcular el área de una banda y en qué momento es mejor usar altura en vez de área.⁴

2.6.1 Determinaciones cuantitativas

2.6.1.1 Integrador computarizado⁵

Los sistemas de datos basados en computadoras en línea permiten una automatización completa. Esto incluye la adquisición y reducción de datos en forma automática y la impresión de los resultados analíticos. La señal cromatográfica, inicialmente analógica, se digitaliza por medio de un convertidor digito-analógico. Con programas se puede entonces detectar la presencia de picos, hacer correcciones por la desviación de la línea de base, calcular áreas y tiempos de retención, determinar la concentración de los componentes utilizando factores de calibración almacenados y generar un informe completo del análisis.

Las cuentas del área del pico se acumulan cuando la señal abandona la línea base. Este alejamiento de la línea base usualmente se determina por medio de la medición de la pendiente de la señal. El tiempo de retención y las alturas de la señal en el máximo de cada pico se detectan con un programa almacenado en la memoria. El final del pico de un componente se establece cuando la señal regresa a la línea base.

Durante cromatogramas isotérmicos los programas pueden aumentar automáticamente con el tiempo la sensibilidad a la pendiente, asegurando su habilidad para detectar los picos agudos iniciales y los picos bajos y chatos más retardados con la misma precisión.

En el caso de picos fusionados es posible asignar el área a cada componente proyectando perpendicularmente el mínimo del valle a la línea base corregida.

Algoritmos especiales distribuyen el área de componente en el caso de picos sobrepuestos. También en el caso de picos sobre colas de otros picos es posible distribuir las áreas de cada pico de forma coherente.

2.6.1.2 Normalización del área.⁵

Cuando se sabe que el cromatograma representa la muestra completa, que todos los componentes se han separado y que cada pico se ha resuelto completamente; se puede utilizar la normalización de las áreas para la evaluación. Para utilizar este método, se mide el área bajo cada pico individual. Sumando todas estas áreas de los picos se obtiene el área total calculada.

El porcentaje en volumen de los componentes individuales se obtiene multiplicando el área calculada individual por 100 y luego dividiéndola entre el área total calculada.

$$\%A = \frac{\text{Área de } A}{\text{Área total}} * 100$$

El método sólo es válido si el factor de respuesta de todos los componentes es el mismo, es decir iguales cantidades de distintos componentes dan la misma área. En otro caso las áreas deberían ser corregidas por un factor de respuesta de cada componente.

a) Método del patrón externo⁵

Cuando el volumen de la muestra es conocido con frecuencia se utiliza la calibración con estándares o patrones. Tiene la ventaja de que sólo se necesita, medir las áreas de los picos de interés. Es un requisito que cada vez se inyecte la misma cantidad de muestra. Los estándares necesarios deben analizarse bajo las mismas condiciones de operación que la muestra.

En la práctica, se preparan las soluciones estándar de(los) componentes de interés y se inyectan en el cromatógrafo. Para cada componente se obtiene la gráfica: área del pico en función de cantidad de componente.

Después, para el cálculo de una concentración desconocida, se obtiene el cromatograma de la muestra problema y el área de cada pico se utiliza con la gráfica anterior para obtener la cantidad.

b) Método del estándar Interno⁵

Este método es conocido como calibración relativa o indirecta, el método del patrón interno permite que varíen las condiciones de operación entre muestra y muestra y no requiere de repetibilidad en las inyecciones. El patrón interno debe ser un compuesto que pueda resolverse completamente de los picos adyacentes, que no esté presente en la muestra problema y que no produzca ningún efecto interferente.

Como en el caso anterior se preparan estándares que contienen los componentes de la muestra a analizar. A cada uno de ellos se añade una cantidad conocida del llamado patrón interno que obviamente no es uno de los componentes que se quiere analizar. Se obtienen los cromatogramas de cada estándar y se obtiene la gráfica: cociente entre el área de componente y área del patrón interno frente a cociente entre cantidad de componente y cantidad de patrón interno.

Entonces se añade una cantidad conocida del patrón interno a la mezcla desconocida. Se obtiene el cromatograma, y con el cociente entre las áreas del pico de componente a determinar y la de patrón interno en la muestra problema se obtiene (con la gráfica anterior determinada con estándares) el cociente entre cantidad de componente y cantidad de patrón interno. Como la cantidad de patrón interno añadida a la muestra problema es conocida puede calcularse la cantidad desconocida de componente. Cualquier variación en el tamaño de la muestra se evidenciará inmediatamente al comparar el área del pico del patrón interno en cromatogramas diferentes pero no afectará al resultado.

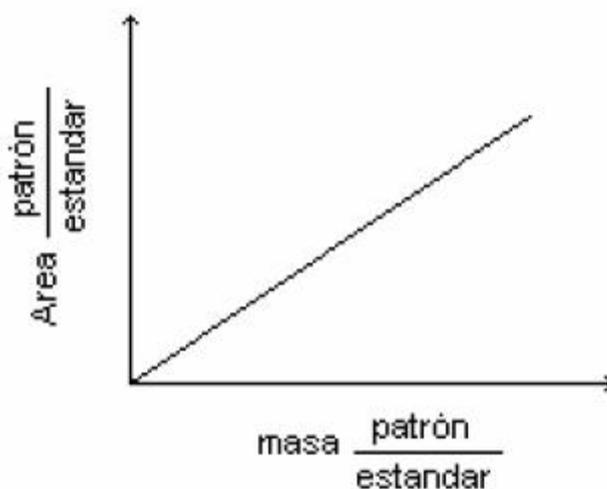


Fig. 1. Calibración relativa

De la curva mostrada en la Fig. 1 se obtiene la ecuación líneal $y=mx$, y de la siguiente ecuación se obtiene la masa de la muestra:

$$W_{analito} = \frac{Area_{patrón} * W_{estandar}}{m}$$

La ventaja de este método es que es independiente del volumen de inyección de muestra lo que es sumamente importante para aquellas técnicas cromatográficas que utilizan un método de introducción de muestra no automatizado como por ejemplo el uso de jeringas de inyección en cromatografía gaseosa.

Requerimientos para un buen estándar interno: ^{6,7}

- Debe ser resuelto de los otros picos.
- Debe eluir cercano al pico de interés.
- Debe usarse una concentración similar al pico de interés.
- Debe ser de las mismas características estructurales.

2.7 Validación de método analítico ^{6,8,9}

2.7.1 Método Analítico

El Método analítico es aquel método de investigación que consiste en la desmembración de un todo, descomponiéndolo en sus partes o elementos para observar las causas, la naturaleza y los efectos. El análisis es la observación y examen de un hecho en particular. Es necesario conocer la naturaleza del fenómeno y objeto que se estudia para comprender su esencia. Este método nos permite conocer más del objeto de estudio, con lo cual se puede: explicar, hacer analogías, comprender mejor su comportamiento y establecer nuevas teorías. ^{6,8}

En el cuadro 1 se muestra una clasificación de los métodos analíticos mas usuales. ⁷

Cuadro 1. Clasificación de los métodos analíticos usuales

Gravimétrico	Método indirecto	Peso de compuestos conteniendo especies
	Método directo	Pérdida de peso debido a volatilización de especies
Volumétrico	Métodos de valoración	Volumen de disolución que es químicamente equivalente a las especies deseadas
	Análisis de gases	Volumen de una especie gaseosa producida o consumida
Óptico	Espectroscopía de emisión	Radiación emitida por especies
	Espectroscopía de absorción incluyendo colorimetría	Radiación absorbida por una especie
	Polarimetría	Rotación de las especies por la luz polarizada
	Refractometría	Índice de refracción de disolución de especies
	Turbidimetría, nefelometría	Dispersión de radiación por especies
Electroanalítico	Potenciometría	Potencial de un electrodo en equilibrio con las especies
	Conductimetría	Conductividad de una disolución de las especies
	Coulombimetría	Cantidad de corriente equivalente a las especies
	Polarografía	Corriente asociada con la reacción en un electrodo polarizable
	Métodos de alta frecuencia	Capacidad de una disolución de especies
Varios	Espectroscopía de masa	Relación de carga a masa de productos de descomposición de especies
	Métodos radioquímicos	Decrecimiento radioquímico de las especies
	Métodos de conductividad	Conductividad térmica de las especies
	Valoraciones entálpicas	Calor de reacción de especies

2.7.2 Consideraciones al desarrollar métodos analíticos

Antes de enfocar el papel de la instrumentación en un método analítico, el analista debe considerar otras etapas importantes para la determinación dentro de las cuales se encuentran las siguientes:

-La primera tarea es definir el problema analítico. Cuando es posible, lo anterior se hace a través de una interacción directa con la(s) persona(s) que desea(n) el análisis.⁶

-El analista debe determinar la naturaleza de la muestra, el uso final de los resultados analíticos, las especies que deben analizarse y la información requerida.⁶

-Las propiedades físicas y químicas únicas del analito, las propiedades de la matriz de la muestra, la presencia de interferencias probables que eliminan el curso de ciertas propiedades del analito como indicadores de medición, forma en la que se presenta el analito en la muestra.⁷

-Una vez que el problema se ha definido, la siguiente tarea es seleccionar el(los) método(s) apropiado(s). Algunos factores a considerar son las posibilidades y limitaciones de la técnica.⁶

- La siguiente área a considerar es el muestreo. A menudo es el paso más importante en todo el análisis, ya que hay que considerar las medidas que deben tomarse a fin de obtener las muestras requeridas para proporcionar la información deseada, así como las medidas que deben tomarse a fin de obtener las muestras requeridas que proporcionen la información deseada.⁷

-El analista debe seleccionar el(los) método(s) de estandarización más adecuado(s) para el análisis de entre los siguientes: gráficas (o curvas) de calibración, adiciones estándares, estándares internos, estándares externos, materiales de referencia, muestras de prueba y diagramas de control.⁷

- Para evaluar la precisión y los resultados de los análisis, el analista debe usar métodos estadísticos, que garanticen que los resultados obtenidos son confiables.⁷

2.7.3 Validación

Existen numerosas definiciones de Validación que expresan la misma idea “Validar es comprobar y certificar con evidencia conveniente documentada que un método, sistema o proceso, cumple y se desarrolla tal y como estaba previsto, dentro de intervalos definidos”.⁸

De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2006, en su apartado 9.12 los métodos analíticos deben ser validados, se deben contar con métodos validados para producto a granel, producto terminado y materia prima en caso de no aparecer en cualquier farmacopea internacional ni en la FEUM.⁹

2.7.4 Parámetros Analíticos de Validación

Las características de desempeño del método analítico se expresa en función de los siguientes parámetros analíticos:

2.7.4.1 Selectividad

La selectividad es la capacidad del método para evaluar únicamente el principio activo integro de forma exacta y específico, en presencia de los componentes que puedan esperar estar presentes, como por ejemplo: impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz.^{8, 10, 11}

2.7.4.2 Linealidad

La linealidad de un método analítico es su capacidad para demostrar que los resultados de la prueba son directamente proporcionales a la concentración del analito dentro de un rango dado.^{8, 10, 11}

2.7.4.3 Precisión

La precisión de un método analítico, es el grado de concordancia de los resultados de la prueba, cuando el método se aplica repetidamente a múltiples tomas de muestra homogénea.^{8, 10, 11}

La precisión puede ser medida, ya sea por el grado de reproducibilidad o de repetibilidad del método analítico, bajo condiciones operativas normales. En este contexto definimos:

- a) **Reproducibilidad:** Se refiere al uso del procedimiento analítico en diferentes laboratorios.
- b) **Precisión Intermedia.** Expresa la variación dentro de un mismo laboratorio, diferentes días, o con diferentes analistas o equipos.

2.7.4.4 Exactitud

La exactitud de un método analítico, es la proximidad entre los resultados obtenidos por ese método y el valor real.^{8, 10, 11}

2.7.4.5 Robustez

Es una medida de la capacidad del método analítico para permanecer sin alteraciones por defecto de variaciones pequeñas, pero deliberadas, en los parámetros del método y provee indicaciones acerca de su confiabilidad durante su utilización en condiciones normales.^{8, 10, 11}

En función de la aplicación analítica de un método el Cuadro 2 indica los parámetros de desempeño a estudiar.⁸

Cuadro 2. Parámetros de desempeño

PARAMETRO	VALORACIÓN	SUSTANCIAS RELACIONADAS	IDENTIFICACIÓN
ESPECIFICIDAD	√	√	√
PRECISIÓN DEL SISTEMA	√	√	X
LINEALIDAD DEL SISTEMA	√	√	X
EXACTITUD Y REPETIBILIDAD	√	√	X
LINEALIDAD DEL METODO	√	√	X
PRECISIÓN DEL MÉTODO/ PRECISIÓN INTERMEDIA	√	√	X
ESTABILIDAD DE LA MUESTRA	*	*	X
LIMITE DE DETECCIÓN	X	√	X
LIMITE DE CUANTIFICACIÓN	X	√	X
ROBUSTEZ	*	*	X
TOLERANCIA	*	*	X

*Puede ser requerido dependiendo de la naturaleza del método

2.8 Omeprazol^{11, 12, 13, 14,15, 16, 17}

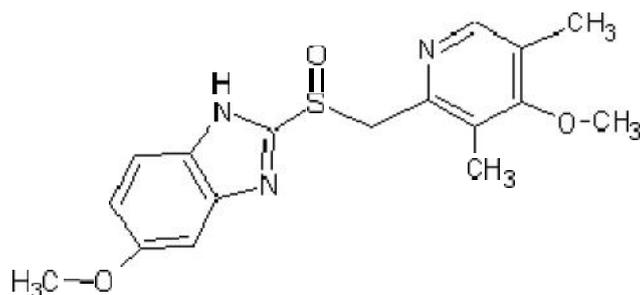


Fig. 1 Estructura de Omeprazol

Nombre científico: 5-metoxi-2-[[[(4-metoxi-3,5-dimetil-2-piridinil)-metil]sulfinil]-1H-benzoimidazol

Formula condensada: C₁₇H₁₉N₃O₃S₁

Peso molecular: 345.42 g/mol₁

Propiedades físicas

Polvo blanco o casi blanco. Muestra polimorfismo. Muy poco soluble en agua; bastante soluble en etanol y metanol; soluble en cloruro de metileno. Se disuelve en soluciones diluidas de hidróxidos alcalinos. Se debe conservar en envases herméticos a una temperatura entre 2 y 8°C. Proteger de la humedad y de la luz.

Consiste en cristales blancos que se funden alrededor de 156°C;

pKa : en piridina-N es de 4.0 y en imidazol-N es de 8.7.

2.8.1 Espectroscopia UV

En solución acuosa ácida (0.2 M H₂SO₄): 303nm, en medio básico: 276-305 nm.^{12, 16}

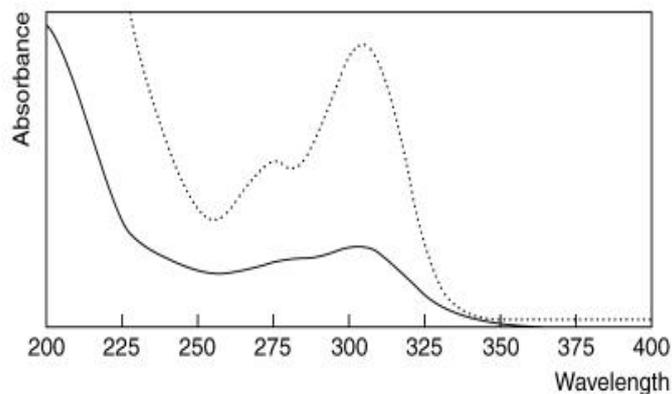


Fig. 2 Espectro UV de Omeprazol

2.8.2 Espectroscopia Infrarroja

Principales picos a la longitud de onda: 1628, 1205, 1015 cm⁻¹ (KBr disk).^{12, 16}

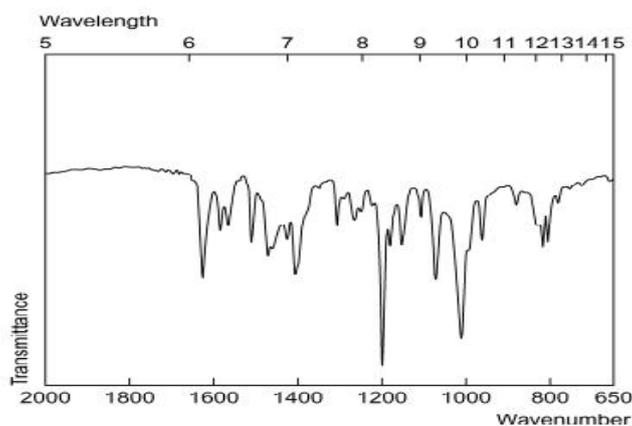


Fig.3 Espectro infrarrojo de Omeprazol

2.8.3 Indicaciones Terapéuticas

Padecimientos que cursan con enfermedad ácido-péptica como:

- a) Úlcera

Lesión en forma de cráter, circunscrita que afecta a piel o mucosas. Consecutiva a la necrosis que acompaña ciertos procesos inflamatorios, infecciosos o malignos.¹⁸

b) Úlcera péptica

Zona erosionada, claramente circunscrita en la membrana mucosa del estómago o del duodeno o en cualquier otra parte del sistema gastrointestinal, expuesta a la acción de los jugos gástricos ricos en ácido y pepsina.¹⁸

c) Úlcera duodenal,

Úlcera del duodeno. El tipo más común de úlcera péptica.¹⁹

d) Úlcera gástrica

Erosión circunscrita de la mucosa gástrica que atraviesa la *muscularis mucosae*, puede penetrar la capa muscular y perforar la pared del estómago.¹⁹

e) Úlcera péptica asociada con *Helicobacter pylori*.

Helicobacter pylori produce gastritis aguda, gastritis atral, úlcera gástrica y duodenal, en niños y adultos, y se asocia con cáncer gástrico. Tiene forma de bastón curvo, con flagelos; es microaerofílico, catalasa y oxidasa positiva. *Helicobacter pylori* se localiza en el epitelio del estómago. Secreta ureasa, que produce amonio y bicarbonato, con lo que neutraliza el pH ácido; además produce peptidasa, lipasa, fosforilasa A, lo que permite penetrar en la capa protectora.¹⁷

f) Enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE)

Desplazamiento retrógrado del contenido del estómago hacia el esófago. El jugo gástrico es ácido y por tanto produce dolor urente en el esófago. Los episodios repetidos de reflujo pueden causar esofagitis, estenosis esofágica péptica o úlcera esofágica.¹⁹

g) Dispepsia

Sensación de molestia gástrica vaga que se siente después de la ingesta. Combina sensaciones de plenitud, ardor meteorismo y náuseas.¹⁹

h) Síndrome de Zollinger-Ellison

Trastorno caracterizado por la aparición de úlceras pépticas graves, como hipersecreción gástrica, elevación de los niveles de gastrina en suero y presencia de un gastrinoma pancreático o duodenal.¹⁹

i) Gastropatía relacionada con el uso crónico de AINEs.¹⁷

2.8.5 Interacciones Medicamentosas

En la metabolización hepática del omeprazol, también desempeña un importante papel el sistema enzimático del citocromo P-450, pudiendo existir interacciones con sustancias que utilicen la misma vía metabólica. Hasta ahora, los estudios realizados demuestran una reducción en el aclaramiento de fármacos, como diazepam, fenitoína o R-warfarina.^{13, 18}

No se han descrito, sin embargo, interacciones con el propranolol, S-warfarina o teofilina. Se ha descrito la existencia de un pequeño porcentaje de individuos en que el metabolismo hepático del omeprazol está prolongado de forma sustancial, probablemente como consecuencia de una alteración hereditaria en la isoenzima del citocromo P-450 encargada de su metabolización.^{11, 18}

En estos casos se triplica el tiempo de vida media plasmática y se multiplica por 10 la curva de concentración plasmática/tiempo. Sin embargo, si se emplean dosis habituales, aunque esté disminuida la capacidad remanente para metabolizar el omeprazol, es suficiente para impedir la acumulación del fármaco. Hace falta caracterizar completamente a esta población, pero es previsible anticipar que presentarán altos grados de hiposecreción y, potencialmente, estarán más expuestos a los riesgos de la hipoclorhidria. Todo ello requerirá mayor cuidado por parte del clínico, pero no implica necesariamente una dosificación más reducida salvo en tratamiento prolongados con dosis altas, sobre todo en pacientes ancianos o con insuficiencia hepática.^{11, 18}

3. Planteamiento del Problema

La Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia es una de las técnicas más utilizadas dentro de los métodos analíticos debido a su alta selectividad, sensibilidad y precisión. Puesto que en el Laboratorio de Investigación Farmacéutica no se cuenta con un método analítico para la cuantificación de Omeprazol en una formulación líquida se pretende desarrollar y validar dicho método para ser utilizado en proyectos de docencia dentro de la carrera de Q.F.B.

4. Objetivos

Objetivo General

Desarrollar y Validar un método analítico por CLAE para la cuantificación de omeprazol en una formulación líquida.

Objetivos Específicos

- Diseñar un método analítico para cuantificar omeprazol en una formulación líquida.

5. Hipótesis

El método analítico desarrollado por CLAE permite cuantificar de manera efectiva, confiable y sencilla el omeprazol en la formulación líquida cumpliendo los parámetros de validación. Dicho método puede ser utilizado en proyectos de docencia dentro de la carrera de Q.F.B.

6. Diseño Experimental

En los cuadros 3, 4 y 5 se muestran los reactivos, materiales y equipo utilizados.

Cuadro 3. Lista de reactivos, marca y lote

REACTIVO	MARCA	LOTE	PUREZA
Fosfato monobásico de potasio	J.T. Baker	C13C00	99.4%
Fosfato dibásico de potasio	J.T. Baker	B14C13	99.9%
Hidróxido de Sodio	J.T. Baker	B14C70	99.3%
Ácido fosfórico	J.T. Baker	G38806	88%
Metanol grado HPLC	J. T. Baker	J34C34 J10C29 H33C24	99.9%
Agua desionizada grado HPLC	-----	-----	-----
Propilparabeno	N.F. (Spectrum)	LH0015	99-100.5%
Solución buffer de fosfato pH 7	J. T. Baker	G02C33	pH a 25°C 7.01
Solución buffer de Biftalato pH 4	J. T. Baker	G03C11	pH a 25°C 4.02
Solución buffer de Borato pH 10	J. T. Baker	E48C14	pH a 25°C 10.03
Omeprazol	Helm de México	OME0040699	-----
Sacarina Sódica	Sehyex	SS235897	99.3%
Carboximetilcelulosa	Farmacia Paris	-----	-----
Bicarbonato de Sodio	HELM de México SA	S109042	99.5%
Esencia de fresa cremosa	Deiman	1361DO6259	99.7-100.3%

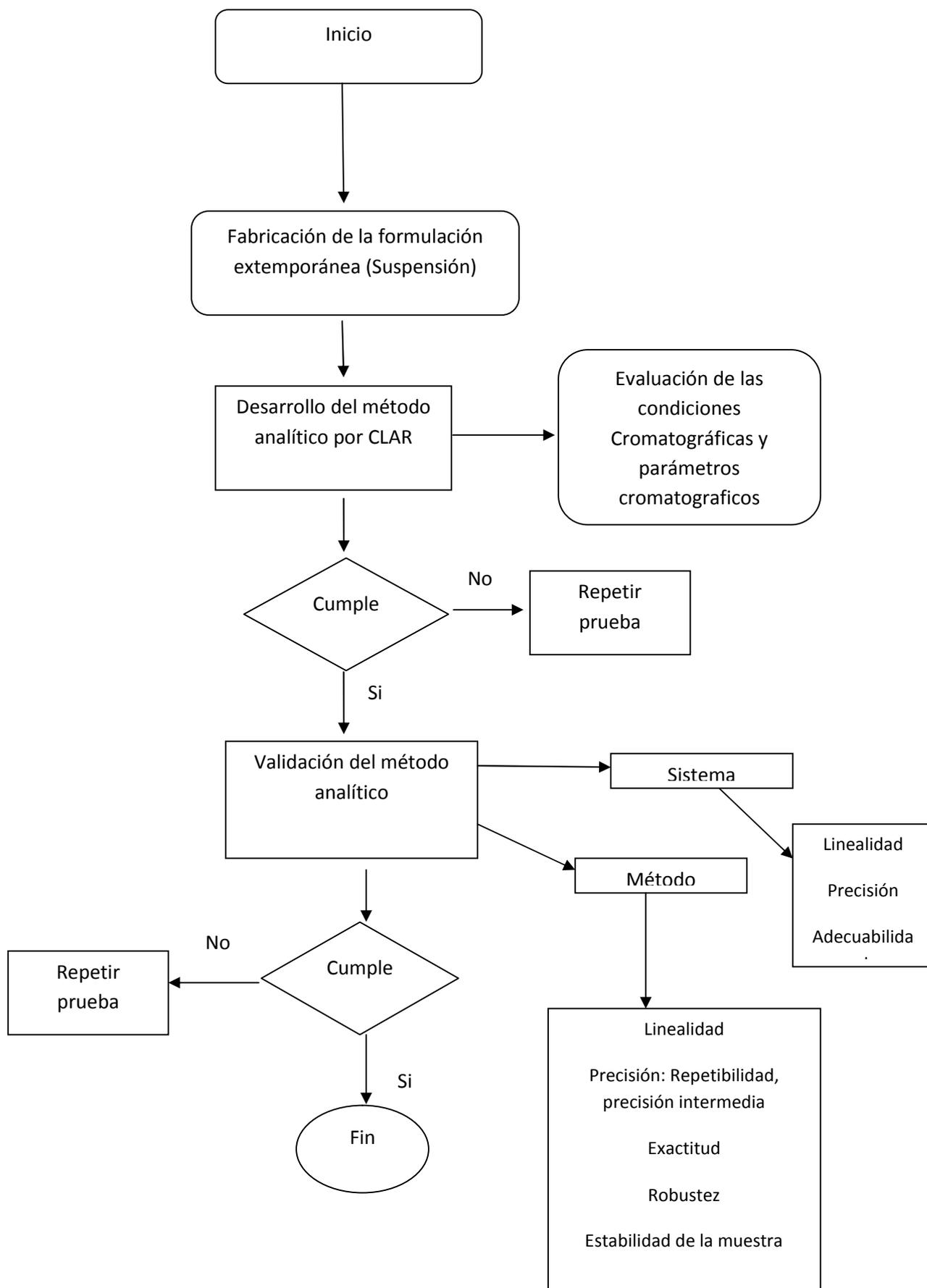
Cuadro 4. Lista de material, capacidad y marca

MATERIAL	CAPACIDAD	MARCA
Bureta	25 mL	Pyrex
Pipeta volumétrica	1,2,5,10 mL	Pyrex, Kimax
Vaso de precipitado	50, 100, 250, 1000 mL	Pyrex, Kimax
Matraz volumétrico	10, 25, 50, 100 mL	Pyrex, Kimax
Reservorio	1 L	Wheaton
Equipo de filtración	1L	Millipore
Viales para automuestreador Varian 410	2 mL	Varian
Columna C18 150 x 4.6 mm 5µm	-----	Thermo SCIENTIFIC
Probeta	100, 500, 1000 mL	Pyrex
Soporte Universal	-----	-----
Pinzas para bureta	-----	-----
Barra magnética	-----	-----
Embudo de vidrio	Chico	P.K.México
Vaso de acero Inoxidable	500, 1000 mL	-----
Espátula de acero inoxidable	-----	-----

Cuadro 5. Lista de equipo y marca

EQUIPO	MARCA
Cromatógrafo con automuestreador	Varian Prostar Modelo 410
Detector UV (305 nm)	Varian Prostar Modelo 325
Des-ionizador	Milli-Q Millipore Synthesis
Bomba ternaria de baja presión	Varian Prostar Modelo 240
Balanza analítica	OHAUS Explorer Pro Modelo EP214C
Sonicador	VRW MoDec 75D
Potenciómetro	Conductronic
Microbalanza	METTLER MT5
Parrilla de agitación y calentamiento	Thermolyne Cimarec 2
Bomba de vacío	GAST

7. Diagrama de flujo



8. Metodología

8.1 Preparación de la Formulación líquida de Omeprazol^{20, 21, 22, 23}

Se preparo a una concentración de 2 mg/mL

Cuadro 6. Formulación Líquida

Forma farmacéutica	Excipientes	Cantidad empleada %
Suspensión	omeprazol	0.2
	bicarbonato de sodio	8.4
	carboximetilcelulosa	1
	Esencia de fresa cremosa	0.5
	sacarina sódica	0.2
	Agua c.b.p.	100mL

Cantidad a preparar 500 mL

Modo de preparación²⁰

Equipo e instrumentos:

- Vasos de acero inoxidable de 500 mL
- Espátula de acero inoxidable
- Balanza analítica

Precauciones de operación

- Mantener la velocidad (manual) de agitación, constante durante todo el proceso de fabricación.

Procedimiento de fabricación

- Se surtió 1 g del omeprazol y se agrego al vaso de acero inoxidable
- Se agregó al vaso de acero inoxidable 42g de bicarbonato de sodio y se adicionaron 200mL de agua, se agito hasta solubilizar.
- Se añadió 1g de sacarina sódica y se mezclo.
- Una vez incorporados se agregaron 5 g de carboximetilcelulosa poco a poco con agitación constante hasta completa incorporación.
- Una vez que se incorporo la carboximetilcelulosa ,se adiciono 1.5 mL de esencia de fresa cremosa y se agito, se completo el volumen para 500mL
- Se envaso seguidamente, en frasco ámbar, llenando solo hasta poco más de la mitad.

8.2 Desarrollo del Método Analítico

8.2.1 Condiciones cromatográficas

De acuerdo a la bibliografía consultada ^{3,5, 24,25} para el desarrollo del método analítico se probaron las siguientes condiciones:

- Equipo: Cromatógrafo Varian Prostar con automuestreador Modelo 410
- Columna : Thermo Scientific C 18
- Sistema : Isocrático
- Longitud de onda: 305 nm
- Temperatura: ambiente
- Flujo: 1mL/ min
- Volumen de inyección: 50 µL
- Fase móvil tres proporciones diferentes: (50:50); (45:55) y (60:40)

Buffer de fosfatos pH 7 0.01 M: Metanol

- Tiempo de corrida: 10 min.

Se preparo una solución de omeprazol y propilparabeno a una concentración de 40 µg/mL utilizando fase móvil para solubilizar.

8.2.2 Preparación de la fase móvil ^{3,5,24,25}

Buffer de fosfatos pH 7 0.01 M

Se peso en un matraz volumétrico de 1L 3.7553g de fosfato monobásico de potasio y 3.8690g de fosfato dibásico de potasio, se ajusto pH con ácido fosfórico llevando a volumen con agua.

FASE MOVIL

Se utilizo una mezcla desgasificada y filtrada de:

Buffer de fosfatos pH 7: metanol HPLC con las siguientes proporciones: (50:50), (45:55), (60:40).

Para garantizar que el método es selectivo para los analitos (omeprazol y estándar interno) y que no existan problemas como ruido en la línea base, cambios en la fase móvil o se puedan encimar los tiempos de retención, así como una mala resolución de los cromatogramas, primero se corrieron por separado las muestras y finalmente se probaron juntos los analitos.

8.3 Validación del método analítico

8.3.1 Validación del Sistema

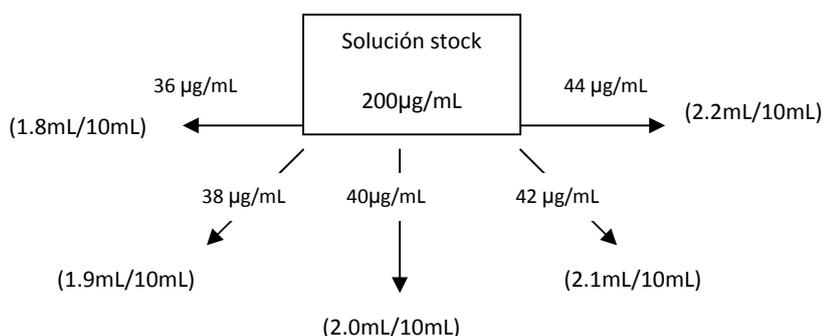
a) Linealidad y Precisión del Sistema ^{8, 11}

Se evaluaron 3 curvas con 5 niveles de concentración partiendo de una solución stock

Preparación de la solución stock

Se pesaron 20 mg de omeprazol se transfirió a un matraz volumétrico de 100 mL y se aforo con fase móvil. Obteniendo una concentración final de 200 µg/mL

Obtención de las concentraciones:



Preparación del estándar interno

Se utilizó como estándar interno propilparabeno, se pesaron 4 mg de propilparabeno el cual se transfirió a un matraz volumétrico de 10 mL llevando al aforo con metanol HPLC, se tomó una alícuota de 1 mL de esta solución y se transfirió a un matraz de 10 mL se aforo con fase móvil, esta solución tuvo una concentración de 40 µg/mL.

Se adicionó el estándar interno a las soluciones de omeprazol en una cantidad de 2 mL antes de realizar el aforo.

Se inyectaron las soluciones preparadas en el mismo día, en las condiciones señaladas en la metodología especificada en el desarrollo del método analítico.

Una vez obtenidos los cromatogramas, se calculó la respuesta para cada uno de ellos, la cual se obtuvo con el área bajo la curva del fármaco entre el área bajo la curva del estándar interno.

Se llevó a cabo la correlación de la respuesta vs. la concentración del analito y se obtuvo el coeficiente de variación, pendiente y ordenada al origen de la curva.

Los criterios de aceptación que se tomaron fueron una $r^2 = 0.98$, y un Coeficiente de variación en cada nivel de concentración menor o igual a 2%. Con los resultados obtenidos se determinó si todo el sistema analítico funcionaba correctamente.

b) Adecuabilidad^{8,11}

Se inyectó por quintuplicado una solución de la muestra al 100%.

Se calculó el Coeficiente de Variación el cual debe ser menor o igual al 2% del analito y se procedió a reportar el Factor de capacidad $K' > 2$, la Resolución $(R) > 2$ y número de platos teóricos $(N) > 2000$

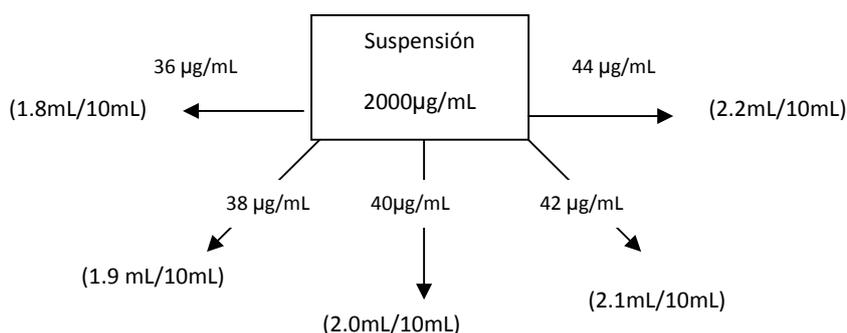
8.3.2 Validación del método^{8, 11}

a) Intervalo de trabajo

El intervalo de trabajo que se estableció fue en función de la especificación marcada en farmacopea 9ª ed. 2008, la cual indica que es de 90-110%. El intervalo se constituyó por cinco niveles, con puntos intermedio en común.

Las concentraciones establecidas fueron: 36, 38, 40, 42 y 44 $\mu\text{g/mL}$

Obtención de las concentraciones:



b) Linealidad

Se prepararon cinco niveles de concentración por cuadruplicado, preparadas por pesadas independientes a las concentraciones establecidas en el rango.

Se determino el valor de la pendiente, ordenada al origen, coeficiente de regresión lineal el cual no debe ser mayor o igual a 0.98 y el coeficiente de variación que debe ser menor al 2%.

c) Precisión

1. Repetibilidad

Se determino el coeficiente de variación, el cual debe ser menor al 2%, de 6 determinaciones al 100% de la concentración de ensayo.

2. Precisión intermedia

Se analizó por triplicado una muestra homogénea en dos días diferentes cumpliendo el siguiente formato.

Cuadro 7. Precisión Intermedia

	ANALISTA 1	ANALISTA 2
DÍA 1		
DÍA 2		

Se calculó el contenido de cada muestra reportando el coeficiente de variación total.

d) Exactitud

Se determinó el % de recobro y el coeficiente de variación en una muestra realizada por sextuplicado.

e) Estabilidad de la muestra

Se determinaron tres condiciones de almacenamiento

- a) Temperatura ambiente 25 °C
- b) Refrigeración 5°C
- c) Luz (blanca)

Para que la muestra se considere estable en las diferentes condiciones evaluadas, los resultados obtenidos deben cumplir con una F_{cal} menor a F_{tab} .

f) Robustez

Para evaluar este parámetro se consideró el cambio de lote del metanol grado HPLC, así como el cambio de pH de la fase móvil.

Se prepararon soluciones correspondientes al 100% por triplicado para cada cambio considerado.

Se calculó la diferencia absoluta entre el promedio de cada condición instrumental respecto a la condición normal de operación.

9. Resultados y Análisis de Resultados

9.1 Desarrollo del método analítico

En este proyecto el objetivo fue Desarrollar y Validar un método analítico por CLAE para la cuantificación de omeprazol en una formulación líquida, se planteo un método para el omeprazol, utilizando propilparabeno como estándar interno, se empleó como fase móvil una solución buffer de fosfatos pH 7 0.01 M y metanol en proporciones de (50:50), (55:45), (60:40), con una velocidad de flujo de 1mL/min a una longitud de onda de 305 nm con un volumen de inyección de 50 μ L. Las muestras se prepararon a una concentración de 40 μ g/mL, se eligió una buffer de fosfatos debido a la solubilidad que poseen en agua lo cual no causara una obstrucción parcial en la columna y por ende no provocara una baja eficiencia en la misma así como no afectara su vida media, las sales de fosfatos también son indetectables casi invisibles en UV lo cual no causa interferencia con el analito de interés, y se observa en el siguiente cromatograma.

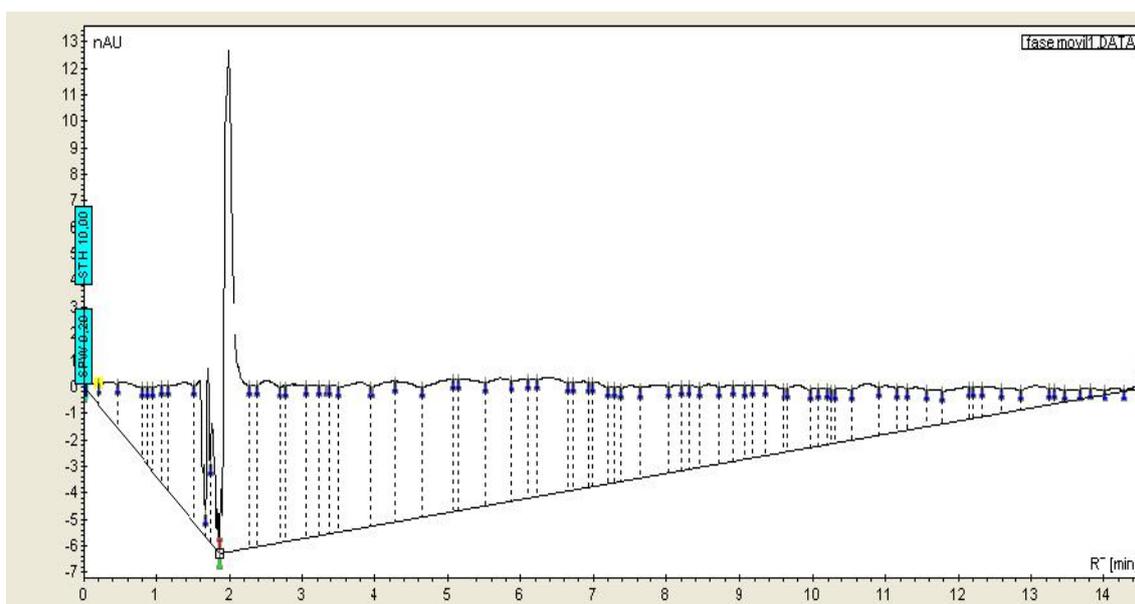


Fig.5 Cromatograma de fase móvil buffer de fosfatos pH 7 0.01M: metanol

Los resultados que se obtuvieron inyectando juntos los analitos con las proporciones de metanol- buffer de 50:50; 45:55 y 40:60 se presentan a continuación:

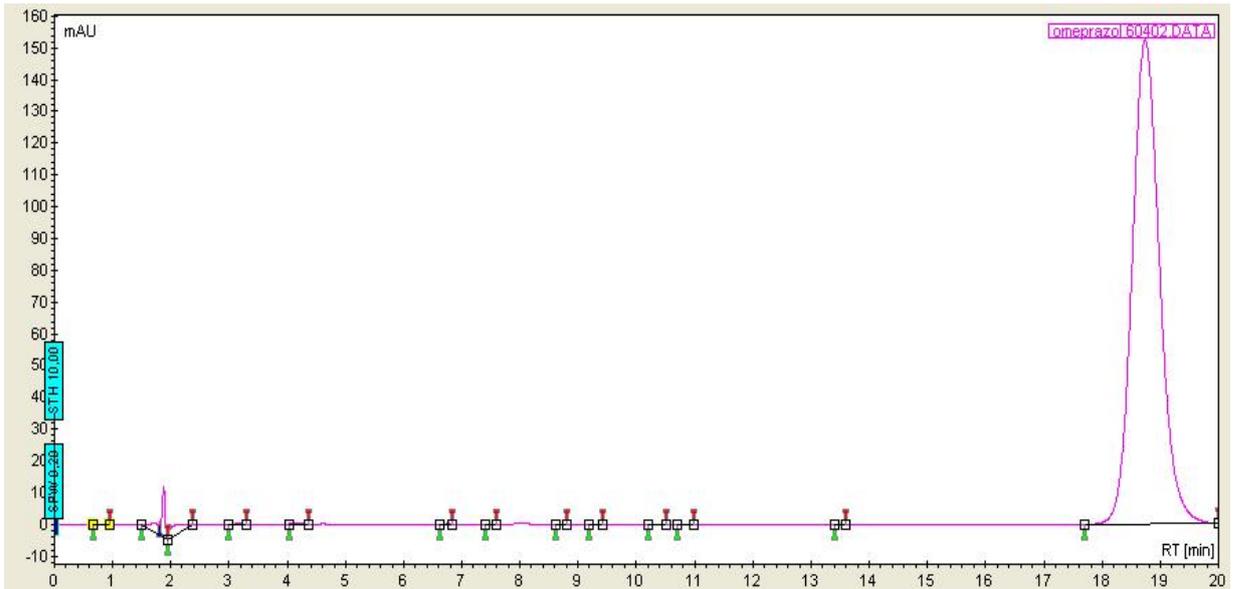


Fig.6 Cromatograma de Omeprazol y propilparabeno, fase móvil buffer de fosfatos pH 7 0.01 M: metanol en una proporción de 60:40

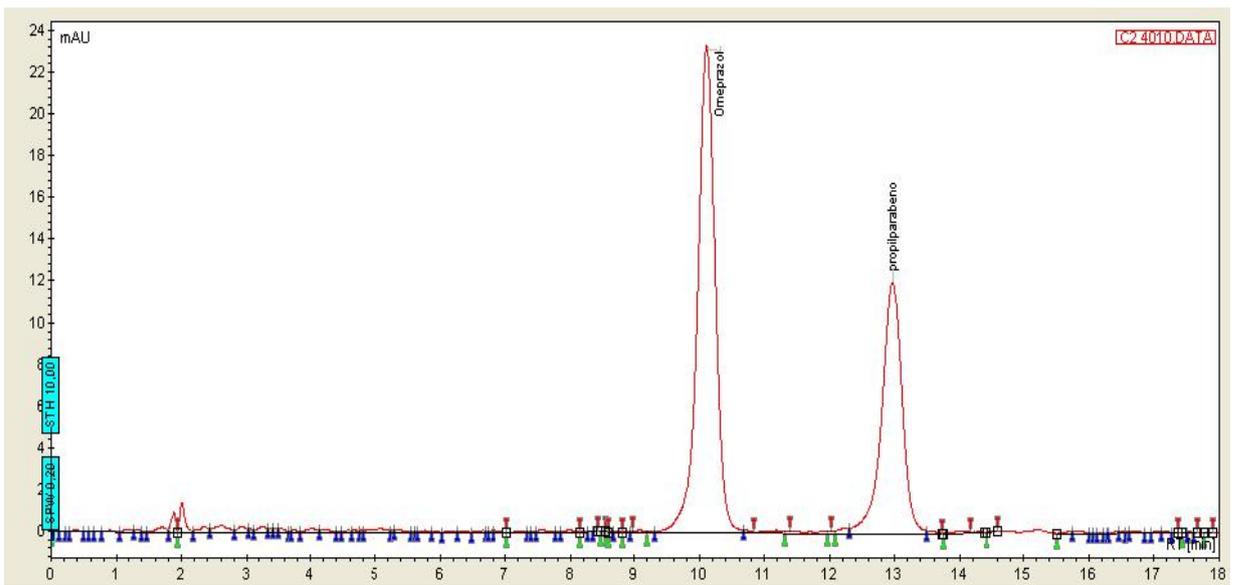


Fig.7 Cromatograma de omeprazol y propilparabeno, fase móvil buffer de fosfatos pH 7: metanol en una proporción de 55:45

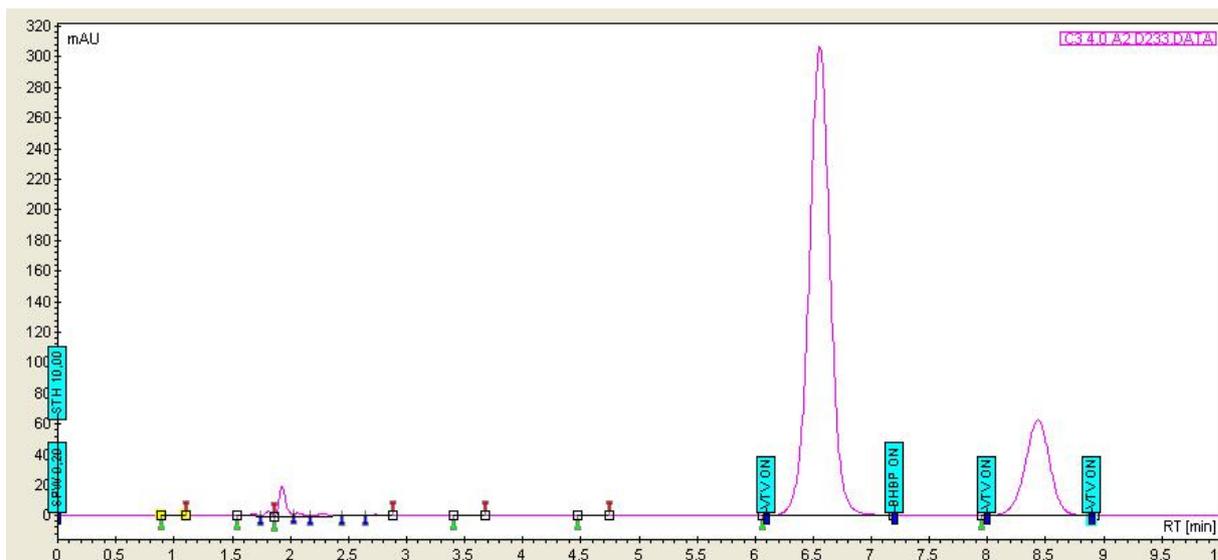


Fig.8 Cromatograma de omeprazol y propilparabeno, fase móvil buffer de fosfatos pH 7: metanol en una proporción de 50:50

Se observa en el cromatograma de la Fig. 6 un solo pico que corresponde al del omeprazol con un tiempo de retención de 18.74 min. Un tiempo demasiado largo ya que se programo un tiempo de corrida de 20 min como máximo, por ello que no se encuentre el pico del estándar interno (propilparabeno), debido a esto queda descartada esta proporción de fase móvil ya que para los fines establecidos es un tiempo excesivo de corrida esto también se debe a la polaridad de la fase móvil ya que el metanol al tener una polaridad baja y siendo este el que se encontraba en menor proporción provoca que nuestros analitos se retengan, y den dichos tiempos por tal motivo se decidió subir la proporción de metanol (cromatograma Fig 7) se observa que el omeprazol tiene un tiempo de retención de 9.21 min y el estándar interno (propilparabeno) un tiempo de 12.98 min los cuales no entran en el rango de 10 minutos de corrida propuestos, comparando estas dos proporciones se puede notar que entre mayor sea la proporción de metanol la polaridad incrementara gradualmente dando tiempos de retención menores debido a que se da un equilibrio entre la fase móvil y estacionaria, por lo tanto las muestras serán trasladadas por la fase estacionaria provocando que los analitos no se retengan demasiado en la columna, es así que se decidió probar la proporción 50:50(cromatograma Fig 8) dando como resultado que el omeprazol saliera a los 6.55 min y el propilparabeno a los 8.43 min y a que solo se necesitaba recorrer un poco los picos para obtener un tiempo de 10 min. Finalmente fue esta proporción la que fue factible para la validación.

9.2 VALIDACIÓN DEL SISTEMA

a) Linealidad y Precisión del sistema

En la siguiente tabla se muestran los resultados de la linealidad y precisión del sistema.

Cuadro 8. Linealidad y Precisión del sistema

CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO	CUMPLE
Coeficiente de determinación mayor o igual a 0.98	0.99	SI
Coeficiente de variación menor o igual al 2%	1.72 %	SI

Con los datos de linealidad se realizó una gráfica de la linealidad del sistema relacionando la concentración contra la respuesta del equipo (área bajo la curva).

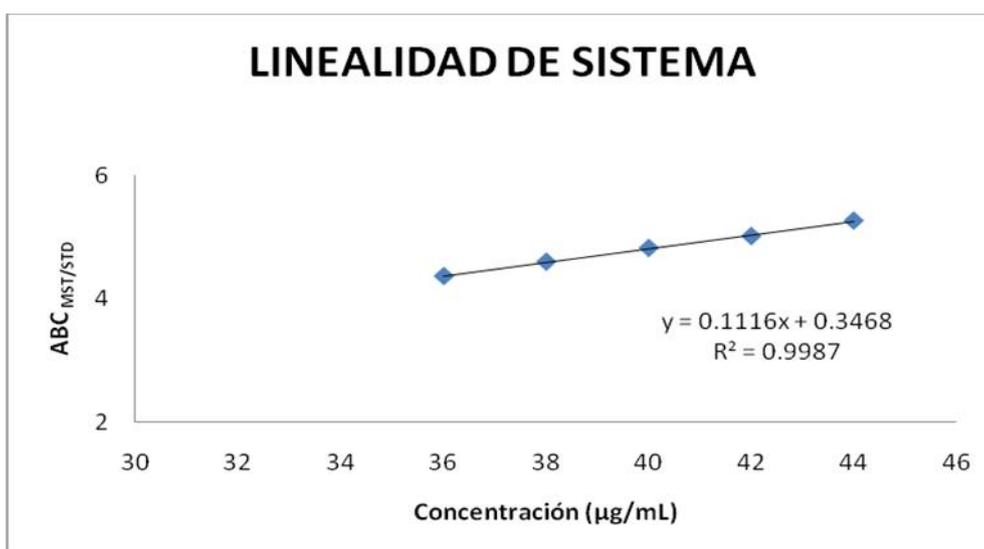


Fig. 9 Linealidad del Sistema

El cumplimiento de las pruebas realizadas, indican que la respuesta medida por el equipo (áreas bajo la curva) para la cuantificación de omeprazol son precisas y que a su vez existe una relación lineal entre la concentración de la muestra y

la respuesta medida por el equipo, esto nos garantiza que nuestro equipo se encuentra en buenas condiciones para su uso.

b) Adecuabilidad

Cuadro 9. Adecuabilidad del sistema

CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO	CUMPLE
Resolución (R) > 2	3.18	SI
Factor de capacidad (K') > 2	2.65	SI
No. Platos teóricos > 2000	7324.47	SI

Cuadro 10. Resultados de la Adecuabilidad

ÁREA	K'	NTP USP	RESOLUCIÓN	SELECTIVIDAD
57.4	2.69	7405.28	3.69	1.25
57.2	2.65	7197.20	3.35	1.22
57.4	2.63	7281.39	3.23	1.22
57.4	2.64	7390.54	3.28	1.23
57.3	2.64	7324.47	3.18	1.22
PROMEDIO	2.65	7324.47	3.18	1.22
n	Σy	DE	MEDIA	CV
5	286.7	0.08944272	57.34	0.155986605

El cumplimiento de las pruebas realizadas, indican que el sistema de medición funciona apropiadamente, independientemente de las condiciones ambientales. Garantizando que este se encuentra en buenas condiciones.

9.3 VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Linealidad del Método

Cuadro11. Linealidad del Método

CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO	CUMPLE
Coefficiente de determinación mayor o igual a 0.98	0.98	SI
Coefficiente de variación menor o igual al 2%	1.55 %	SI

Con los datos de linealidad se realizó una gráfica de la linealidad del sistema relacionando la concentración contra la respuesta del equipo (área bajo la curva).

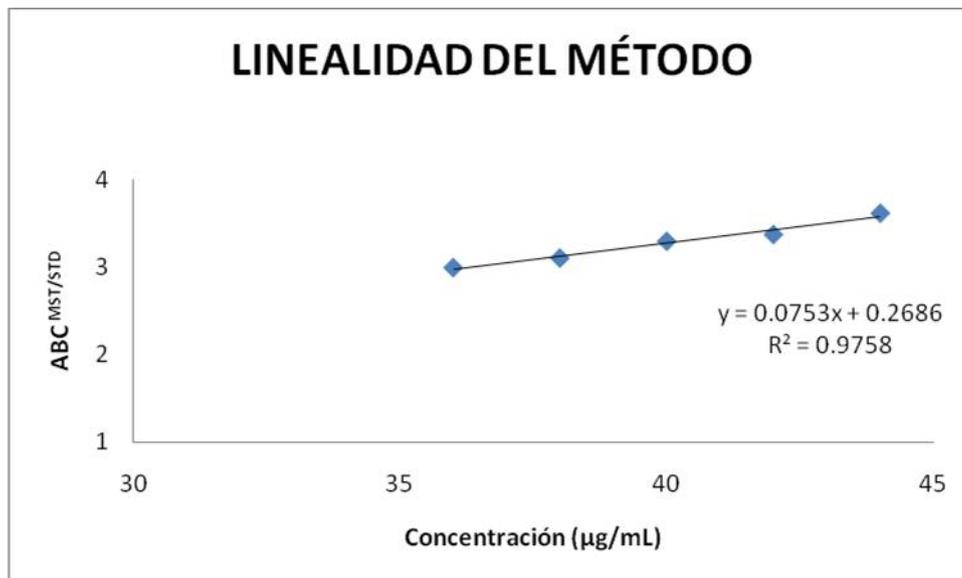


Fig. 10 Linealidad del Método

a) Prueba de hipótesis para la ordenada al origen

$$H_0: b=0$$

$$H_a: b \neq 0$$

Estadígrafo de contraste t de student

r^2	b	m	S^2x	Sy^2	n	\bar{X}
0.98	0.2686	0.0753	10	0.05806241	20	40

$$t_{cal} = \frac{b - \beta_0}{\left(\frac{S_y}{x} \times \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{x^2}{(n-1)S^2x}} \right)}$$

$$S_{\frac{y}{x}} = \sqrt{\frac{n-1(S^2y - m^2S^2x)}{n-2}}$$

$$S_{\frac{y}{x}} = \sqrt{\frac{20-1(0.05806241 - (0.07527237^2 \times 10))}{20-2}}$$

$$S_{\frac{y}{x}} = 0.15870051$$

$$t_{cal} = \frac{0.026864098 - 0}{\left(0.15870051 \times \sqrt{\frac{1}{20} + \frac{40^2}{(20-1)10}} \right)}$$

$$t_{cal} = 0.581601161$$

Criterio de aceptación

$$t_{cal} \quad t_{tabl.}$$

$$\alpha=0.05 \quad 1-\alpha/2$$

$$t_{tabl.0.975,18}=2.10092204$$

$$t_{cal} \quad t_{tabl.}$$

0.581601161 2.10092204

Por consiguiente, se acepta H_0 , comprobándose que la ordenada al origen es igual a cero, con un nivel de significancia de 0.05.

b) Prueba de hipótesis para la pendiente

$H_0: m=0$

$H_a: m \neq 0$

Estadígrafo de contraste t de student

r^2	b	m	S^2x	S^2y/x	n
0.98	0.2686	0.0753	10	0.0251858	20

$$t_{cal} = \frac{m - \beta_1}{S_b}$$

$$S_b = \sqrt{\frac{S^2y/x}{n - 1(S^2x)}}$$

$$S_b = \sqrt{\frac{0.0251858}{20 - 1(10)}} = 0.011513345 \quad t_{cal} = \frac{0.07527237 - 0}{0.011513345} = 6.537836745$$

Criterio de aceptación

$t_{cal} \quad t_{tabl}$

6.537836745 2.10092204

Por consiguiente, se rechaza H_0 , comprobándose que la pendiente es diferente a cero, con un nivel de significancia de 0.05.

c) Análisis de varianza para la Regresión Lineal

Ho: El área bajo la curva no depende de la concentración

Ha: El área bajo la curva depende de la concentración

F.V.	SC	g.l.	MC	F _{cal}	F _{tabl} (0.975,1,18)
Regresión	1567788016	1	1567788016	726.861314	5.98
Error	38824716.3	18	2156928.68		

Criterio de aceptación

$$F_{cal} > F_{tabl}$$

$$\alpha=0.05$$

$$726.861314 > 5.98$$

Se rechaza Ho, por consiguiente el área bajo la curva depende linealmente de la concentración, con un nivel de significancia de 0.05.

En la linealidad del método se puede observar que el coeficiente de determinación que se obtuvo fue de 0.98 y el coeficiente de variación de 1.55% esto nos indica que el método es lineal teniendo una distribución prácticamente homogénea.

Precisión del Método

Repetibilidad

Cuadro 12. Repetibilidad del Método

CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO	CUMPLE
Coeficiente de variación menor o igual al 2%	1.55 %	SI

Dado que el parámetro de CV cumple el método resultado ser muy preciso en términos de repetibilidad.

Precisión intermedia

Cuadro 13. Precisión Intermedia

CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO	CUMPLE
F_{cal} F_{tabl} $F_{tabl}: 7.57$	A: 3.01369896 7.57 D: 2.1844121 7.57 AD: 0.30887379 7.57	SI

ABC		
	A1	A2
D1	4.39590255 4.54375 4.44519016	4.39545202 4.40498615 4.38189845
D2	4.44004462 4.50056625 4.52572075	4.40697674 4.44574944 4.50931677

Prueba de hipótesis

a) H_0 : no hay efecto del analista

H_a : si hay efecto del analista

b) H_0 : no hay efecto del día

H_a : si hay efecto del día

c) H_0 : no hay efecto del analista/día

H_a : si hay efecto del analista/día

Análisis de Varianza

F.V	g.l.	SC	MC	Fcal	F tablas
A	1	0.00784358	0.007843584	3.01369896	7.57
D	1	0.00568525	0.005685246	2.1844121	
AD	1	0.00080389	0.000803888	0.30887379	
e	8	0.02082115	0.002602644		

Criterio de aceptación

$$F_{cal} < F_{tabl}$$

Para:

Analista

3.01369896 < 7.57 Ho se acepta: no hay efecto del analista

Día

2.1844121 < 7.57 Ho se acepta: no hay efecto del día

Interacción

0.30887379 < 7.57 Ho se acepta: no hay efecto del analista/día

Se cumple el criterio de aceptación para la precisión intermedia. Lo cual indica que el método es preciso ya sea cambiando de analista y cambiando de día, bajo las mismas condiciones.

Exactitud

Cuadro 14. Exactitud del Método

CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO	CUMPLE
% de Recobro de 98-102%	98.25-101.11 %	SI

Se cumple el criterio de aceptación indicando que el método es exacto ya existe la proximidad entre los resultados obtenidos por ese método y el valor real.

Estabilidad de la muestra

Cuadro 15. Estabilidad de la muestra

CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO REFRIGERACIÓN 5°C	RESULTADO LUZ BLANCA	RESULTADO T. AMBIENTE 25°C
F_{cal} F_{tabl} F_{tabl} 7.26	0.022 7.26	102.11 7.26	0.84 7.26
CUMPLE	SI	NO	SI

Prueba de hipótesis

Ho: no existe diferencia significativa entre la muestra de análisis y la condición de almacenamiento

Ha: existe diferencia significativa entre la muestra de análisis y la condición de almacenamiento

a) Refrigeración

Horas	0	6	24
ABC	4.38189845	4.34082192	4.34495913
	4.37305987	4.38189845	3.92680464
	4.39545202	4.32987439	4.57380816

F.V	g.l.	SC	MC	F _{cal}	F _{tabl}
Tratamiento	2	0.01615031	0.00807516	0.2232366	7.26
Error	6	0.21703849	0.03617308		
Total	8	0.2331888			

B) Luz blanca

Horas	0	6	24
ABC	4.38189845	4.41514649	4.09376637
	4.37305987	4.39269912	4.0767624
	4.39545202	4.32987439	4.03962461

F.V	g.l.	SC	MC	F _{cal}	F _{tabl}
Tratamiento	2	0.19384711	0.09692356	102.113937	7.26
Error	6	0.00569502	0.00094917		
Total	8	0.19954214			

c) Temperatura ambiente

Horas	0	6	24
ABC	4.38189845	4.3455842	4.50931677
	4.37305987	4.41514649	4.44004462
	4.39545202	4.35365184	4.33389262

F.V	g.l.	SC	MC	F _{cal}	F _{tabl}
Tratamiento	2	0.00527367	0.00263683	0.84319738	7.26
Error	6	0.01876311	0.00312719		
Total	8	0.02403678			

Criterio de aceptación

$$F_{cal} \quad F_{tabl}$$

Para:

Refrigeración: 0.02232 7.26

Ho se acepta no existe diferencia significativa entre la muestra de análisis y la condición de almacenamiento.

Luz blanca: 102.113937 7.26

Ho se rechaza, bajo las condiciones de estudio existe diferencia significativa entre la muestra de análisis y la condición de almacenamiento.

Temperatura ambiente: 0.84319738 7.26

Ho se acepta no existe diferencia significativa entre la muestra de análisis y la condición de almacenamiento.

El tiempo que se dejaron las muestras fue de 0, 6 y 24, horas. Se eligieron esos tiempos debido a que el omeprazol es susceptible de degradación-transformación en medios de reacción ácida y neutra. La vida media de degradación del omeprazol en soluciones acuosas a valores de pH inferiores a cuatro es menor de 10 minutos, a pH neutros la vida media es de 14 horas y a pH mayores a este se mantiene estable²², de acuerdo con el resultado obtenido el omeprazol resultó ser estable en la condición de refrigeración (5°C) y a temperatura ambiente ya que cumple con los parámetros establecidos, sin embargo el resultado en luz blanca, no los cumple. Esto se debe a que el omeprazol al ser sensible a la luz blanca sufrió degradación, pudiéndose cuantificar ya no omeprazol si no alguno de sus productos, sin embargo al ser refrigerado(5°C) nos garantiza que el omeprazol no cambiará en gran medida al ser almacenado por mínimo 24 hrs. Por ello la muestra debe ser conservada en refrigeración (5°C) y protegida de la luz, antes de su análisis, y ser analizada en un plazo de no más de 24 horas siempre y cuando tenga un pH neutro.

Robustez

Cambio de lote en Metanol

Cuadro 16. Robustez en cambio de Lote en el metanol

CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO	CUMPLE
La diferencia absoluta de la media aritmética de la condición dada, respecto a la media de la condición normal no debe ser mayor de 2%	1.95%	SI

Cambio de pH en fase móvil

Cuadro 17. Robustez en cambio de pH en la fase móvil

CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO	CUMPLE
La diferencia absoluta de la media aritmética de la condición dada, respecto a la media de la condición normal no debe ser mayor de 2%	5.98%	NO

De acuerdo a los resultados obtenidos en la robustez se determinó que un cambio de lote en el metanol al preparar la fase móvil no afecta nuestros resultados sin embargo, se debe ser cuidadoso con la pureza del metanol en este caso siempre se debe utilizar un grado HPLC para asegurar que no se vea afectado el método así como el equipo utilizado, en su lugar un cambio de pH si afecta el método utilizado esto se debe a que el pH en especial juega un papel importante ya que una modificación pequeña en el pH puede ocasionar que los tiempos de retención no sean constantes y esto puede originar un cambio en la eficiencia y resolución de los picos obtenidos como se muestra en los siguientes cromatogramas:

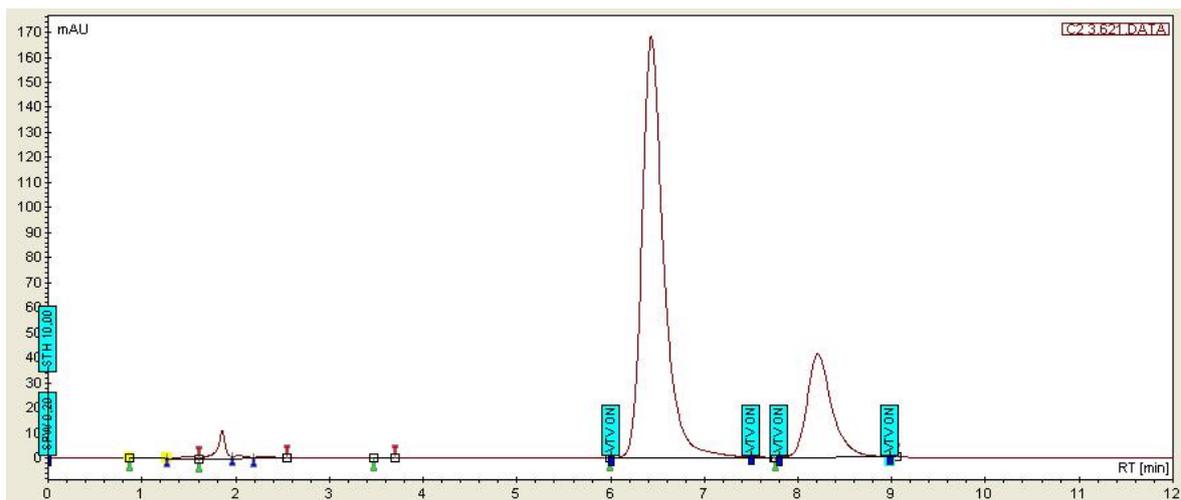


Fig.11 Cromatograma de omeprazol y propilparabeno, fase móvil buffer de fosfatos pH 7.08: metanol en una proporción de 50:50

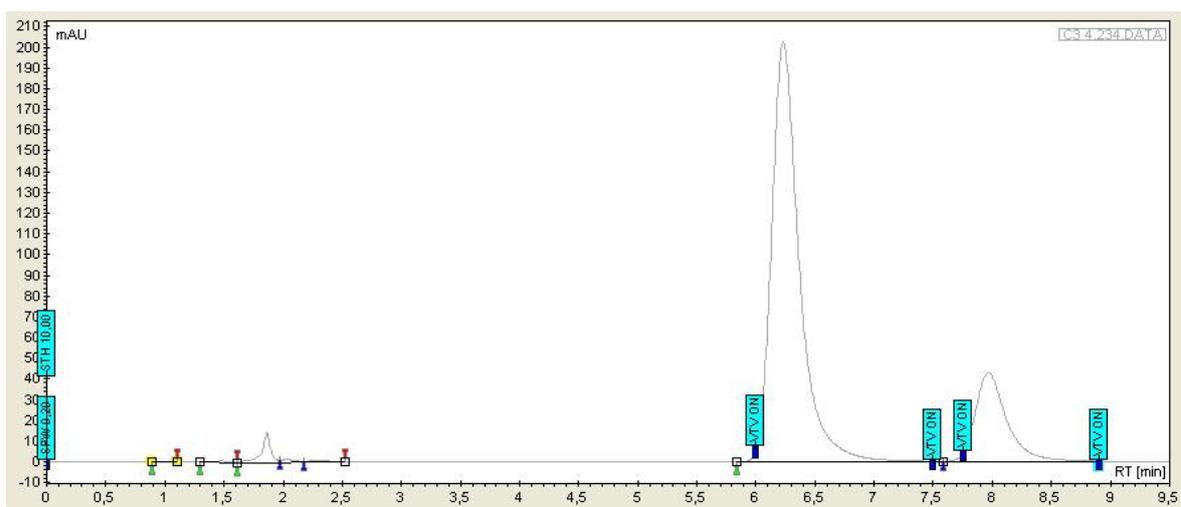


Fig.12 Cromatograma de omeprazol y propilparabeno, fase móvil buffer de fosfatos pH 7.1: metanol en una proporción de 50:50

Cuadro 18. RESUMEN DE RESULTADOS

VALIDACIÓN DEL SISTEMA	PARAMETRO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO		CUMPLE	
	LINEALIDAD	r^2 0.98		0.99		SI
PRECISIÓN	C.V. 2%		1.72		SI	
VALIDACIÓN DEL METODO	LINEALIDAD	r^2 0.98	0.98		SI	
		C.V. 2%	1.55		SI	
	PRECISIÓN	C.V. 2%	1.55		SI	
	REPETIBILIDAD	C.V. 2%	1.55%		SI	
	PRECISIÓN INTERMEDIA	F_{cal} F_{tabl} F_{tabl} : 7.57	A: 3.01 7.57			SI
			D: 2.18 7.57			
			AD: 0.30 7.57			
	EXACTITUD	% Recobro 98-102%	96.25-101.11%		SI	
	ESTABILIDAD DE LA MUESTRA	F_{cal} F_{tabl} F_{tabl} 7.26	Refrigeración 5°C	0.02 7.26		SI
			Luz blanca	102.11 7.26		NO
T. ambiente 25°C			0.84 7.26		SI	
ROBUSTEZ	La diferencia absoluta de la media aritmética de la condición dada, respecto a la media de la condición normal no debe ser mayor de 2%	Cambio de lote	1.95%		SI	
		Cambio de pH	5.96%		NO	

10.

CONCLUSIONES

-Se logró desarrollar el método analítico por CLAE para la cuantificación de Omeprazol en una formulación líquida.

-El método analítico propuesto cumplió con los parámetros de validación demostrando que dicho método es confiable, específico y capaz de cuantificar el activo de esta forma el proyecto puede ser utilizado en prácticas de docencia dentro de la carrera de Q.F.B.

1. Hernández Abad V.J., Mendoza Mata M.T., Mora Guevara J.L.A., Sánchez González G.E. Introducción a las técnicas cromatográficas instrumentales más utilizadas en el análisis farmacéutico. México: UNAM FES Zaragoza; 2008.
2. Luun G. HPLC, methods for pharmaceutical análisis. USA: Edith John Wile and Sons, 1997.
3. Espinosa M., Ruiz S., F. Sanchez R. F., Bosch O. C. Analytical methodologies for the determination of omeprazole: An overview. J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2007; 44:831-844.
4. Quattrocchi O., Abelara S., Laba A. Introducción a la HPLC. Aplicación y practica .Argentina: Farros S.A.; 1992.
5. Braithwaite A., Smith F. J. Chromatographic Methods. 5ª ed. USA: Kluwer Academic Publisher; 1999.
6. Rubinson K.A., Rubinson J.F. Análisis instrumental. España: Pearson Educación S.A; 2001
7. Harris D. Análisis químico cuantitativo. 3ªed. España: Editorial Reverté; 2007
8. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. Guía de Validación México: Colegio Nacional de Químicos farmacéuticos Biólogos. 2002.
9. Norma Oficial Mexicana NOM-059. Buenas Prácticas de Fabricación para Establecimientos de la Industria Químico Farmacéutica dedicadas a la fabricación de Medicamentos. (Diario oficial de la Federación 31 de julio de 1998).
10. International Conference Harmonitation. Validation of Analytical Procedures Methodology. USA: ICH (Text on Validation of Analytical Procedures; Q2B); 1996.
11. United States Pharmacopeia 30, United States Pharmacopeia Convention INC: Canada, 2001.

-
12. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 9ª. Ed. México. Secretaría de Salud Pública, Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 2008.
 13. Katzung, B. Farmacología Humana. 10ª ed. México: El Manual Moderno; 2007
 14. Martindale. Guía completa de consulta farmacoterapéutica. 3ª ed. Barcelona: Pharma; 2008
 15. Remington G.A. The science and practice of pharmacy. 20th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2006.
 16. Rosensntein S.E. Diccionario de especialidades farmacéuticas. PLM. 48ª ed. México; 2002.
 17. Velázquez, B. Farmacología Básica y Clínica. 18ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2009.
 18. Molero Gómez, R. Utilización terapéutica del omeprazol. Farm Hosp 1997; 21 (5): 243-256
 19. Sierra J.F., Ruiz MA., Gallardo V. Medicamentos disponibles en pediatría para el tratamiento de la enfermedad por reflujo gastroesofágico. Ars Pharm 2004; 45(1):73-80.
 20. Atienza M. Marín R. Formulación en farmacia pediátrica. 3ª ed. España; 2005.
 21. Barone M. Manual de pediatría hospitalaria. 14ª ed; 1998.
 22. Ruiz M. A, Gallardo L., Sierra J. inventores; Universidad de Granada Hospital Real, Suspensión extemporánea de omeprazol para vía oral. patente 2 283 172. 2008 Ago 16.
 23. Aulton M. Farmacia: la ciencia del diseño de las formas farmacéuticas. 2ª ed. Madrid: Elsevier; 2004.
 24. Castro D., Moreno M.A., Torrados, Lastres J.L. Comparison of derivatives spectrophotometric and liquid chromatography methods for determination of omeprazole in aqueous solution during stability studies. Bromed. Anal. 1999; 21: 291-298.

25.Sastry C.,Yerrayya P., Murty S. Spectrophotometric methods for determination of omeprazole in bulk form and pharmaceutical phormulations. Talanta 1997; 44: 715-719.