



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
“ZARAGOZA”**

**Propuesta de análisis de esomeprazol
en preparados farmacéuticos por CLAR**

T E S I N A

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

ELSA ADRIANA MARTÍNEZ SÁNCHEZ

ASESOR: DR. JUAN CARLOS VÁZQUEZ LIRA



México, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS:

A mi mamá Maria Eugenia Sánchez Fernández:

Porque ella es el pilar en mi vida. Gracias mamá porque con tu comprensión, cariño, ternura, apoyo incondicional, pero sobretodo por tu fortaleza me enseñaste que todo se logra con dedicación y esfuerzo.

A mi papá Martín Martínez Cedillo:

Porque gracias a el, con sus regaños, apoyo y carácter, me enseñó a ser responsable y tenaz en las cosas que realizo en mi vida.

A mis hermanos Jorge Alberto y Javier Eduardo:

Porque siempre confiaron en mi, y estuvieron siempre impulsándome y porque muchas veces gracias a ellos llegaba a tiempo a mis clases.

A mis amigos:

Ellos me enseñaron a valorar cada momento en mi vida.

Al Dr. Juan Carlos Vázquez Lira:

Porque en todo momento recibí su apoyo incondicional, tanto en mi formación profesional, como en la elaboración de este trabajo.

A mis maestros:

Porque cada uno de ellos fue un factor importante en mi formación profesional y por querer que cada día sea mejor como profesionista y como persona.

Al Laboratorio de Investigación Farmacéutica (LIF):

Por el apoyo práctico del diplomado en Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, mediante el cual se ha desarrollado el presente trabajo como opción a titulación para la carrera de QFB

Gracias a todos ellos, hoy veo realizado mi sueño.

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

ÍNDICE.

Abreviaturas, siglas y símbolos. 1
Resumen. 5
Introducción. 6
I. Marco teórico. 8
A. Cromatografía. 8
1. Definición. 8
2. Clasificación de técnicas cromatográficas. 9
a. Cromatografía líquida. 9
b. cromatografía de gases.15
1) Cromatografía gas-sólido.16
2) Cromatografía gas-líquido.16
c. Cromatografía líquida de fluidos supercríticos.17
B. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).19
1. CLAR en fase normal.19
2. CLAR en fase reversa.21
3. CLAR de separaciones quirales.22
a. Mecanismos de retención.23
b. Fases estacionarias quirales..24
c. Fases móviles para cromatografía quiral.27

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

C. Equipo básico de CLAR.	.28
1. Deposito de disolventes.	.28
a. Características de los disolventes empleados en CLAR..	.29
2. Sistema de bombeo.	.31
a. Bombas reciprocas.	.32
b. Bombas de desplazamiento.	.32
c. Bombas neumáticas.	.33
3. Sistema de inyección.	.33
a. Inyectores de tipo jeringa.	.34
b. Válvulas de inyección..	.34
c. Inyectores automáticos.	.35
4. Columnas.	.36
a. Precolumnas.	.38
b. Tipos de fase estacionaria.	.39
c. Fuentes que dañan a una columna.	.41
5. Detectores.	.42
a. Detector de índice de refracción.	.45
b. Detector ultravioleta.	.46
1) Detector de onda fija o fotométrico.	.46
2) Detector de onda variable o espectrofotométrico.	.47
3) Detector de dispositivo de diodos.	.48
c. Detector de fluorescencia.	.49

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

d. Detector electroquímico.	.50
e. Detector de dispersión de luz (ELSD).	.52
f. Detector de espectro de masas.	.53
1) Fuentes de iones.	.55
2) Analizador de muestra.	.57
D. Cromatograma.	.61
1. Parámetros cromatográficos.	.62
E. Esomeprazol.	.71
1. Mecanismo de acción.	.72
2. Características farmacocinéticas.	.74
II. Planteamiento del problema.	.76
III. Objetivos.	.77
IV. Hipótesis.	.78
V. Metodología.	.79
VI. Resultados.	.80
VII. Discusión.	.95
VIII. Conclusión.	.106
IX. Propuestas.	.109
Referencias bibliográficas.	.110

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

ABREVIATURAS, SIGLAS Y SÍMBOLOS.

Å	Ángstrom
ACN	Acetonitrilo
As	Asimetría
ATPasa	Enzimas de Trifosfato de Adenosina
α	Factor de selectividad
BP	Brithish Pharmacopoeia
C₁₈	Octadecilo
Cd	Cadmio
CFS	Cromatografía de Fluidos Supercríticos
CG	Cromatografía de Gases
CGL	Cromatografía de Gas-Líquido
CGS	Cromatografía de Gas-Sólido
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
cm	Centímetro
Cu	Cobre
CYP3A4	Citocromo P450 3A4
CYP2C19	Citocromo P450 2C19
DC	Corriente continúa
EM	Espectrometría de masas
EP	European Pharmacopoeia

**PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS
FARMACÉUTICOS POR CLAR**

ES	Esomeprazol
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
FID	Detector de Ionización de Llama
FE	Fase estacionaria
FM	Fase móvil
g	Gramo
H⁺	Ion hidronio
h	Horas
Hg	Mercurio
IBP	Inhibidores de la Bomba de Protones
IR	Índice de Refracción
K	Constante de distribución
k'	Factor de capacidad
Kg	Kilogramos
λ	Longitud de onda
L	Litro
Loop	Rizo de inyección
M	Molaridad
m	Metro
μ	Micras
MeOH	Metanol
μL	Microlitros

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

μm	Micrómetros
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
MPa	Megapascal
N	Número de platos teóricos
Na⁺	Ion sodio
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
NPD	Detector termoiónico
P	Fósforo
P450	Citocromo P450
PEEK	Polieteretercetona
PID	Detector de fotoionización
pH	Potencial de hidrogeno
psi	Unidad de presión (equivale a 1 libra por pulgada cuadrada)
R	Resolución
RF	Potencial de Radiofrecuencia
S	Azufre
SAX	Intercambiadores aniónicos fuertes
SCX	Intercambiadores catiónicos fuertes
TCD	Detectores de conductividad térmica
THF	Tetrahidrofurano

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

t_o	Tiempo muerto
t_R	Tiempo de retención
u	Velocidad lineal
UMA	Unidad de Masa Atómica
USP	United States Pharmacopoeia
UV	Ultra Violeta
V_o	Volumen muerto
V_R	Volumen de retención
w	Ancho de pico
Zn	Zinc

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

RESUMEN:

En este trabajo se llevó a cabo un desarrollo analítico para la determinación de esomeprazol en diferentes formas farmacéuticas por medio de la técnica de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, el analito activo es el isomero S del omeprazol, el cual es prácticamente nuevo ya que su comercialización empezó en noviembre del 2000, hoy día no existe un método farmacopeico para su análisis como materia prima y por ende como forma farmacéutica. Esta propuesta de método analítico va desde la preparación de la muestra, dependiendo de la forma farmacéutica así como la elección de las condiciones cromatográficas. Por lo tanto, se obtuvo como una propuesta analítica, el siguiente método: Columna C₁₈ (250 mm x 4.6 mm, 5 μ m), un detector UV (303 nm), una fase móvil compuesta de una solución buffer pH 6.5: acetonitrilo (60:40) o también debido a su escasez y por ende su alto precio del acetonitrilo se puede remplazar por metanol, pero con una proporción de una solución buffer pH 6.5:metanol (59:41), para obtener la misma fuerza de elución; con una velocidad de flujo de 1.2 mL/min y un volumen de inyección de 15 μ L (10 μ g/mL). Reteniendo que el método cumple con la adecuabilidad del sistema y posteriormente se a su sceptible a ser ensayado y validado.

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

INTRODUCCIÓN.

El esomeprazol es un medicamento Inhibidor de la Bomba de Protones (IBP), este es prácticamente nuevo ya que su lanzamiento al mercado se realizó en el año 2000; el enantiómero activo es el S-omeprazol; es más potente que omeprazol para inhibir la secreción gástrica y produce un aumento más rápido del pH, manteniéndolo durante más tiempo por encima de 4. Está indicado en la terapia de síntomas gastrointestinales, cicatrización de lesiones y mantenimiento de la cicatrización en pacientes que requieren la reducción de la secreción de ácido. Actúa bloqueando la ATPasa-H⁺/Na⁺ de la membrana de las células parietales gástricas. Se absorbe rápidamente en intestino delgado y en hígado se transforma por acción de las isoformas del citocromo P450 CYP2C19 y, en menor grado CYP3A4, que actúan de forma distinta a como lo hacen con omeprazol lo que da lugar a una biodisponibilidad de esomeprazol mayor y una mayor área bajo la curva de la concentración plasmática.

Las presentaciones de esomeprazol disponibles son en tabletas de 20 y 40 mg; solución inyectable por vía intravenosa y en infusión.

Por esta razón, la importancia de este trabajo se basa en que no se ha reportado ningún método analítico farmacopeico (Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), British Pharmacopoeia (BP), United States Pharmacopoeia (USP), European Pharmacopoeia (EP)) para su análisis; solo existen reportes de métodos no farmacopeicos (artículos, aplicaciones técnicas, etc.) es por eso que se va a proponer un análisis por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución para su identificación y cuantificación del esomeprazol para sus diferentes formas farmacéuticas. Se utilizara esta técnica ya que en la actualidad es una de las técnicas de laboratorio más común en el análisis farmacéutico.

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

Se han reportando metodologías no farmacopeicas para la determinación del esomeprazol en tres que figuran la espectrofotometría UV, cromatografía de gases acoplado con espectrometría de masas y cromatografía de líquidos en fase reversa en conjunto con otros compuestos inhibidores de la bomba de protones.

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

I. MARCO TEÓRICO.

A. CROMATOGRAFÍA

1. DEFINICIÓN.

La cromatografía es una técnica desarrollada a principios del siglo XX, que permite la separación de sustancias que se encuentran en una mezcla. El nombre cromatografía (Kromos: color, graphes: descripción) se debe a que las primeras separaciones que se llevaron a cabo con pigmentos de plantas, las cuales se observan como bandas coloridas. En general la cromatografía es un proceso de migración diferencial en el cual los componentes de una mezcla son transportados por una fase móvil (gas, líquido o fluido supercrítico), y retenidos selectivamente por una fase estacionaria que puede ser un líquido o un sólido. ¹

De acuerdo a la USP la cromatografía puede ser definida como un proceso por el cual los solutos son separados a través de la migración diferencial en un sistema que consiste de dos o más fases, una de las cuales esta en constante movimiento en una dirección dada y en la cual la sustancia presenta diferentes movilidades por diferentes razones (adsorción, partición, solubilidad, presión de vapor, tamaño molecular o densidad de carga iónica). La cromatografía es una técnica utilizada para la separación, identificación y determinación de componentes químicos en mezclas complejas. ²

2. CLASIFICACIÓN DE TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

Por técnicas de separación cromatográficas se entienden las formas de poner en contacto la muestra problema con la fase móvil y estacionaria, la más habitual es la técnica de elución.³

La siguiente clasificación de las técnicas cromatográficas esta basada en el tipo de fase estacionaria y el tipo de equilibrio involucrado.

a. Cromatografía líquida

Como su nombre lo indica, la cromatografía de líquidos, emplea una fase móvil líquida. La gran ventaja de la cromatografía de líquidos reside en la comparación de diversas propiedades de las fases móviles con distintas fases estacionarias y diversos detectores.⁴

La cromatografía de líquidos abarca diversas técnicas y muchas de ellas se clasifican con más de un nombre. El proceso de separación cromatográfica puede definirse como la transferencia de masa entre una fase estacionaria y una móvil.⁵

La técnica de cromatografía líquida puede estar clasificada en 6 tipos basada en el tipo de equilibrio. La clasificación más común es:

- a) Cromatografía de adsorción. La fase estacionaria es sólida, sobre la cual se adsorben los componentes de la muestra. La fase móvil puede ser líquida (cromatografía sólido-líquido) o gases (Cromatografía gas-sólido). Los componentes se distribuyen entre dos fases a través de una combinación de procesos de adsorción y desorción (Figura 1). La cromatografía en capa fina y CLAR son un buen ejemplo de este tipo de cromatografía.²

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

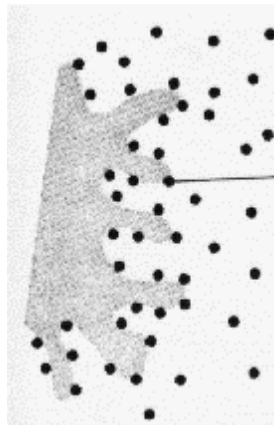


Figura 1. Cromatografía de adsorción.

- b) Cromatografía de reparto. La fase estacionaria de la cromatografía de reparto es un líquido soportado en un sólido inerte (Figura 2). Otra vez, la fase móvil puede ser un líquido (cromatografía líquido-líquido) o un gas (cromatografía de partición gas-líquido, CGL) o un fluido supercrítico (CFS).²

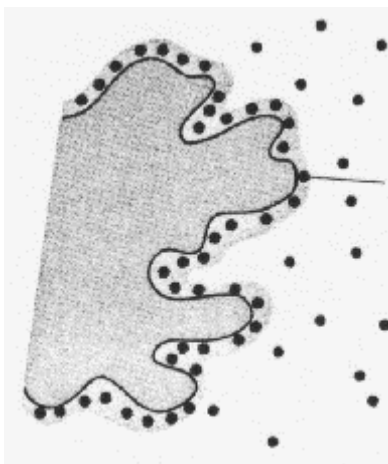


Figura 2. Cromatografía de reparto.

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

c) Cromatografía de intercambio iónico. Se utiliza para el análisis de sustancias cargadas electrónicamente. En este tipo de cromatografía se emplean fases estacionarias con grupos funcionales cargados eléctricamente. El soporte puede ser sílice, un polímero o una resina. La fase móvil contiene un amortiguador, que controla la carga de los solutos y una sal (contra ión), que compite con los solutos en su interacción con las cargas de la fase estacionaria. Las cargas permanentemente unidas al soporte cromatográfico están compensadas por contraiones, es decir, por iones libres de carga opuesta. El paso a través de la columna de una muestra, o fase móvil, con iones del mismo signo que los contraiones de la columna pueden provocar el desplazamiento de los contraiones y la retención de los iones de la muestra o fase móvil (Figura 3). La selectividad y la fuerza de elución dependen de parámetros como el tipo y concentración de iones en la fase móvil y el pH. Para una misma fase móvil, el aumento de la concentración salina disminuye la retención de los solutos, Además de la concentración del contra ión, su naturaleza también influye sobre la retención a través de la constante de equilibrio del intercambio. Su valor refleja la relación de afinidad del intercambiador iónico por el soluto y el contra ión, que generalmente es mayor para iones de mayor carga, con menor volumen hidratado y mayor polarizabilidad. De este modo la retención de los solutos de la muestra aumenta, e n general, con la naturaleza del anión en la fase móvil en el siguiente orden:

citrato < sulfato < oxalato < yoduro < nitrato < cromato < bromuro <
< sulfocianuro < cloruro < formiato < acetato < hidroxilo < fluoruro

El aumento en la retención sobre intercambiadores catiónicos aumenta con la naturaleza del ion presente en la fase móvil.

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

El pH de la fase móvil desempeña también un importante papel sobre la retención, controlando fundamentalmente la ionización de la muestra.

Los intercambiadores iónicos pueden clasificarse en catiónicos y aniónicos. Dentro de cada grupo pueden diferenciarse los intercambiadores fuertes y débiles. Los intercambiadores catiónicos fuertes (SCX) contienen generalmente grupos sulfónicos, mientras que los carboxilatos suelen estar presentes en los intercambiadores catiónicos débiles. Las sales de amonio cuaternario son los grupos funcionales más usuales en los intercambiadores aniónicos fuertes (SAX), empleándose las aminas primarias en los intercambiadores aniónicos débiles.

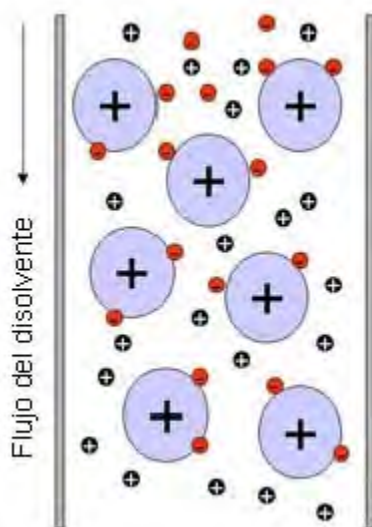


Figura 3. Cromatografía de intercambio iónico.

- d) Cromatografía de pares iónicos: Este modo de cromatografía permite la separación de solutos que se encuentran ionizados en las condiciones de trabajo. En la mayoría de las ocasiones, las separaciones se llevan a cabo en las mismas columnas que se emplean en fase reversa sin formación de pares iónicos. La fase móvil consiste en la mezcla de un tampón acuoso y

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

un modificador, a la que se le añade un contraión de carga opuesta a la del soluto.²

- e) Cromatografía de exclusión molecular: Aquí la separación de los componentes de la muestra esta basada en el tamaño efectivo de sus moléculas. El soporte cromatográfico actúa como un tamiz molecular.

La retención de las moléculas es en función de su tamaño, eluyendo en primer lugar a las moléculas mayores, que no se introducen en los poros del relleno, y correspondiendo el mayor tiempo de retención a las moléculas más pequeñas, cuyo diámetro les permite entrar y salir de los poros del relleno cromatográfico (Figura 4). A diferencia de otros tipos de cromatografía en esta la fase móvil no juega un papel importante específico en la discriminación de los solutos, si no que su misión es transportarlo a lo largo de la columna. La selección de la fase móvil se basa en su capacidad para disolver la muestra, su baja viscosidad para evitar altas presiones y su compatibilidad con el relleno cromatográfico.

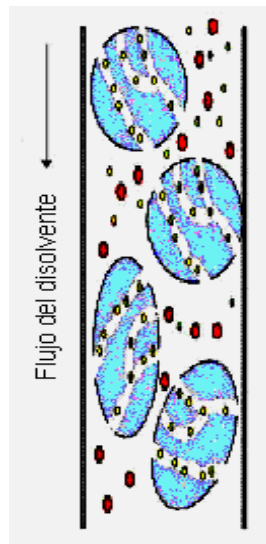


Figura 4. Cromatografía de exclusión molecular.

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

- f) Cromatografía de afinidad: Se basa en la interacción específica entre una molécula o grupo de moléculas y un ligando, que es una molécula que se fija a la fase estacionaria para interactuar con las del soluto (Figura 5). Cuando uno de los componentes del complejo, generalmente el ligando se inmoviliza en un soporte cromatográfico, la formación del complejo específico pueden utilizarse como base para la separación.⁶

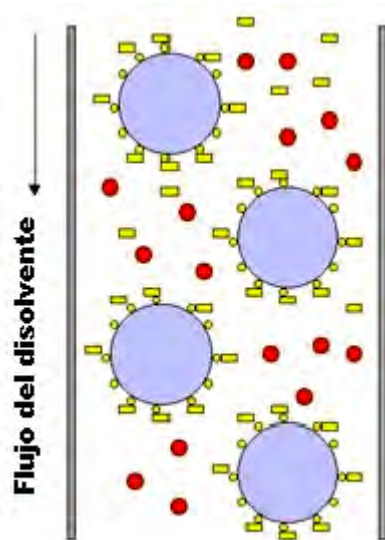


Figura 5. Cromatografía de afinidad.

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

b. Cromatografía de gases (CG).

La cromatografía de gases es una técnica muy extendida, cuyas primeras aplicaciones fueron en el control de las fracciones ligeras de las refinerías de petróleo. Su desarrollo que no ha parado desde entonces, se debe a su gran sensibilidad, a su polyvalencia, a la rapidez y a las posibilidades de automatización. Al requerirse que, para la separación de la columna, los compuestos deben estar en estado gaseoso, el análisis de los líquidos o sólidos implica poder transformarlos en vapor por calentamiento. Es sin duda el primer obstáculo antes de elegir esta técnica, puesto que limita su empleo al estudio de los compuestos moleculares termoestables y suficientemente volátiles.

En la CG la fase móvil está integrada por la mezcla a resolver y, en la mayoría de los casos, por un gas no retenible o inerte adicional, que sirve para llevar en sí o para empujar la mezcla o los componentes después de su separación. Este gas inerte recibe el nombre de gas portador que puede ser helio o nitrógeno.

La fase estacionaria puede ser un sólido, en cuyo caso la retención selectiva de los componentes de la muestra a resolver se debe a fenómenos consecutivos de adsorción y desadsorción; o por un líquido depositado sobre un soporte sólido, en cuyo caso los fenómenos son de absorción o desabsorción.

En la cromatografía de gases, la fase estacionaria determina dos vías ya sea un sólido (Cromatografía Gas-sólido) o un líquido (Cromatografía Gas – Líquido), las cuales se mencionan más adelante.

La fase móvil es origen de más posibilidades, que se desprenden de la relación entre el gas portador y la mezcla o componentes migrantes.^{7,8}

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

1) Cromatografía gas-sólido (CGS)

La fase estacionaria es un sólido poroso (grafito o gel de sílice o aluminio) y la fase móvil es un gas. Los componentes del gas problema son retenidos selectivamente por el sólido dispuesto en una columna apropiada. El gas problema es inyectado en la corriente de un gas inerte que lo conduce hasta la columna. De acuerdo con los distintos coeficientes de distribución de los componentes del problema entre el gas portador y el sólido adsorbente, se verifica una separación de los mismos, por lo que emergen de la columna a distintos tiempos, pasando finalmente por un detector que los identifica y cuantifica. Este tipo de cromatografía de gases es muy efectivo para análisis de mezclas de gases, compuestos con bajo punto de ebullición o alta presión de vapor.^{7,9}

2) Cromatografía gas-líquido (CGL)

La fase móvil es un gas y la fase estacionaria es un líquido inmovilizado por impregnación o por derivatización sobre un soporte inerte que puede ser simplemente la pared de la columna. Los componentes del gas problema son desplazados selectivamente, como en una cromatografía de reparto, por el gas portador que fluye de manera continua.^{7,9}

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

c. Cromatografía de fluidos supercríticos (CFS)

La CFS comercializada en los años 80, presenta algunas diferencias con respecto a la CG y a la CLAR. Su originalidad reside en la naturaleza de la fase móvil, que es un fluido en estado supercrítico, lo cual puede ser una ventaja para la separación de los compuestos termolábiles o de masas moleculares elevadas. Los equipos tienen un diseño híbrido entre CG y CLAR. Se pueden utilizar tanto las columnas capilares de la CG como las columnas clásicas de CLAR

La fase móvil puede ser el dióxido de carbono y la fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido derivatizado en un soporte inerte.

La utilización de fluidos supercríticos puede presentar ciertas ventajas derivadas de sus propiedades físicas intermedias entre las de los líquidos y la de los gases. En particular, la viscosidad de un fluido supercrítico como es el dióxido de carbono a 300 bares de presión, es de diez a veinte veces menor que la de un disolvente orgánico, mientras que sus propiedades solvatantes corresponden a las de un disolvente poco polar.

En la tabla 1, se muestra la clasificación de las técnicas cromatográficas y sus características de cada una de ellas.

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

Tabla 1. Clasificación de técnicas cromatográficas.

Clasificación general	Técnicas específicas	Fase estacionaria	Tipo de equilibrio
Cromatografía de líquidos (CL) (fase móvil: líquida)	Líquido-líquido	Líquido adsorbido sobre un sólido	Distribución entre líquidos inmiscibles
	Líquido-fase unida químicamente	Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el líquido y la superficie enlazada
	Líquido-sólido o adsorción	Sólido	Adsorción
	Afinidad	Sólido inerte derivatizado con anticuerpos o enzimas	Interacción específica (Tipo llave-cerradura) Intercambio iónico
	Intercambio iónico	Resina de intercambio iónico	Distribución/exclusión
	Exclusión por tamaño	Líquido en los intersticios de un sólido polímero	
Cromatografía de gases (CG) (fase móvil: gas)	Quiral	Soporte inerte y fase móvil quiral o ciclodextrinas	Interacción por el tipo de estereoquímica
	Gas-líquido	Líquido adsorbido entre un sólido	Distribución entre un gas y un líquido
Cromatografía de fluidos supercríticos (CFS) (fase móvil: fluido supercrítico)	Gas-sólido	Sólido	Adsorción
		Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el fluido supercrítico y la superficie enlazada

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

B. CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)

La CLAR es una técnica analítica versátil ampliamente utilizada para el análisis de fármacos, biomoléculas, polímeros y muchos compuestos orgánicos e iónicos.

La CLAR es una forma moderna de la cromatografía de líquidos empleando columnas empacadas con partículas pequeñas en contacto con una fase móvil impulsada por una bomba a alta presión.¹¹

Existe también una clasificación de esta dependiendo de las fases estacionarias y los equilibrios involucrados en la separación; de esta forma pueden dividirse en:

1. CLAR EN FASE NORMAL

También conocido como cromatografía líquido-sólido o cromatografía de adsorción; es el modo de separación tradicional basada en la adsorción / desorción del analito en una fase estacionaria polar (generalmente de sílice o alúmina). La figura 8, muestra un diagrama esquemático de parte de una partícula porosa de sílice con grupos silanol (Si-OH) que residen en la superficie y dentro de sus poros. Los analitos polares migran lentamente a través de la columna debido a las interacciones fuertes con los grupos silanoles. La cromatografía en fase normal es particularmente útil para la separación de compuestos no polares y sus isómeros, así como para el fraccionamiento de muestras complejas de los grupos funcionales. Una gran desventaja de este modo es la fácil contaminación de las superficies polares por los componentes de la muestra.¹¹

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

En cromatografía normal los analitos menos polares eluyen primero debido a que son más solubles en la fase móvil. Cuando más polar es la fase móvil, menor es el tiempo de retención. La elección de la fase estacionaria se hace de tal manera que la polaridad de ésta se aproxime a la de los componentes de la mezcla a separar, siendo la fase móvil de polaridad distinta; sin embargo, si la polaridad de la fase estacionaria y del analito son excesivamente parecidas los tiempos de retención se hacen muy elevados. Por el contrario, si la polaridad del analito y la de la fase móvil son parecidas y la de la fase estacionaria distinta, los tiempos de retención se hacen muy cortos y la separación no resulta adecuada.⁴

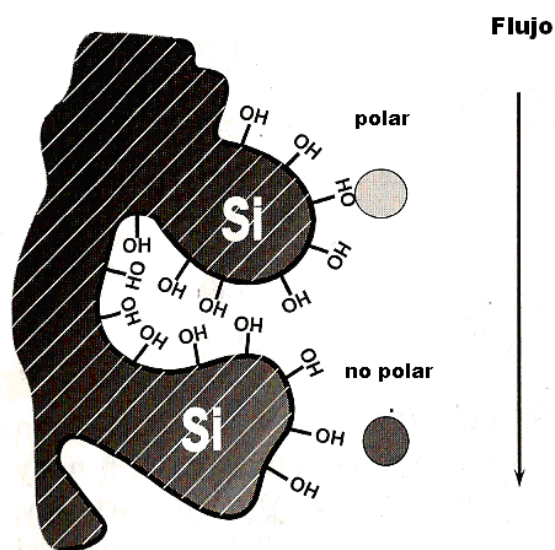


Figura 8. Cromatografía en fase normal

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

2. CLAR EN FASE REVERSA.

La separación se basa en los coeficientes de reparto de los analitos entre una fase móvil polar y una fase estacionaria hidrofóbica (no polar). Las primeras fases estacionarias son las partículas sólidas recubiertas con líquidos no polares.

Estos fueron rápidamente reemplazados por la unión covalente de los grupos hidrófobos, como C18 (octadecilo) en soporte de sílice (Figura 9).¹¹

Los grupos orgánicos enlazados ejercen un efecto similar al que produciría una capa sumamente delgada de disolvente orgánico en la superficie de las partículas de sílice. De este modo, los solutos se reparten entre el recubrimiento superficial y la fase móvil, a semejanza de una extracción líquido-líquido. Además, a medida que la cadena de carbonos es más larga, estas capas se vuelven más orgánicas. Como resultado, las cadenas más prolongadas interactúan con más fuerza con los solutos que se disuelven preferencialmente en una fase orgánica.⁴

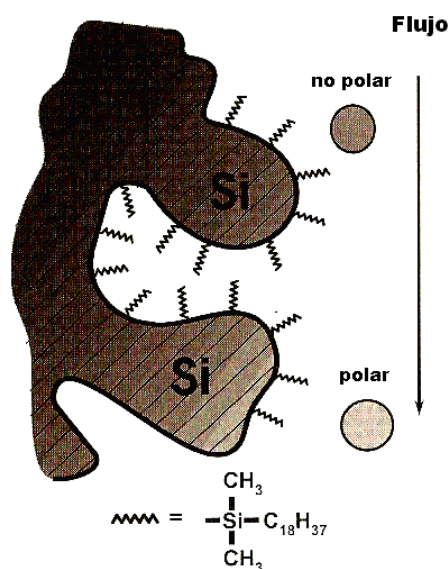


Figura 9 Cromatografía de fase reversa (Sílices modificadas)

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

Conforme aumenta el carácter hidrofóbico de los solutos, la retención aumenta. Generalmente, a menor polaridad de la fase móvil, mayor es su fuerza de elución.

Características de la cromatografía de fase reversa:

- Análisis de compuestos no iónicos, iónicos e ionizables que pueden ser separados en la misma columna y con la misma fase móvil.
- La fuerza de atracción superficie no polar-soluto es débil.
- La adsorción irreversible, frecuentemente es sílice, raramente ocurre.
- La fase móvil predominante es acuosa.
- El orden de elución es predecible, en función de la hidrofobicidad del analito y de su ionización.¹²

3. CLAR DE SEPARACIONES QUIRALES

En las separaciones quirales los enantiómeros son separados sobre la base de estereoselectividad. La cromatografía quiral se ha desarrollado con la necesidad de fármacos racémicos. Muchos fármacos quirales se han utilizado como sus racematos debido a sus dificultades en la síntesis estereoselectiva y su purificación. Como sólo uno de los enantiómeros puede presentar el efecto farmacológico, y el otro no muestra efectos secundarios, el desarrollo de métodos analíticos para la separación y determinación de los enantiómeros en fármacos y en muestras biológicas, tales como el suero y plasma, es un área de creciente interés y utilidad práctica.

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

a. MECANISMOS DE RETENCIÓN.

Los compuestos enantioméricos no se pueden separar directamente en los sistemas normales de cromatografía. Si los enantiómeros se combinan con un selector quiral (reactivo enantiomérico), sin embargo, se forman los diastereoisómeros que pueden mostrar diferencias en las propiedades de unión y por lo tanto pueden ser separados por cromatografía. Los principios de estas separaciones se enuncian en la tabla 2.

Tabla 2. Separación de compuestos enantioméricos.¹³

Principio	Selector quiral	Unión del sustrato	Fase sólida
Derivado diastereoisomérico	Precolumna	Covalente	No quiral
Complejo diastereoisomérico	En fase líquida	Reversible	No quiral
Complejo diastereoisomérico	Unido a la fase sólida	Reversible	Quiral

Hay tres formas comúnmente utilizadas para la separación de enantiómeros por CLAR. De estos, dos se basan en la cooperación con los materiales de la columna en fase reversa. Un enfoque es derivatizar la muestra antes de la separación, lo que lleva a la formación de productos diastereoisoméricos de los dos enantiómeros que pueden ser separados por CLAR convencional, mientras que el otro utiliza los selectores quirales en la fase móvil. El tercer enfoque implica el uso de fases estacionarias quirales.

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

b. FASES ESTACIONARIAS QUIRALES.

El uso de fases estacionarias quirales es una técnica que se basa en la formación transitoria de diastereoisómeros temporales entre los enantiómeros de la muestra y la fase estacionaria quiral. Las diferencias en la estabilidad entre los diastereoisómeros se reflejan en los cambios de los tiempos de retención, el enantiómero que forma el complejo menos estable se eluye primero. Las fases estacionarias quirales pueden clasificarse en 5 grupos distintos sobre la base del mecanismo de retención y son las siguientes:

1. Las fases quirales con cavidades (mecanismo de inclusión, Figura 10): Las fases estacionarias más frecuente que se aprovechan de los mecanismos de inclusión son los derivados de la celulosa. Sin embargo, fases quirales como ciclodextrinas, polímeros sintéticos, tales como geles de poliacrilamida también se utilizan con frecuencia. El mecanismo de inclusión es un mecanismo popular y ha sido aplicado a la separación de una gran variedad de fármacos, incluyendo barbitúricos, fármacos adrenergicos, antihistamínicos, atropina, y la cocaína.

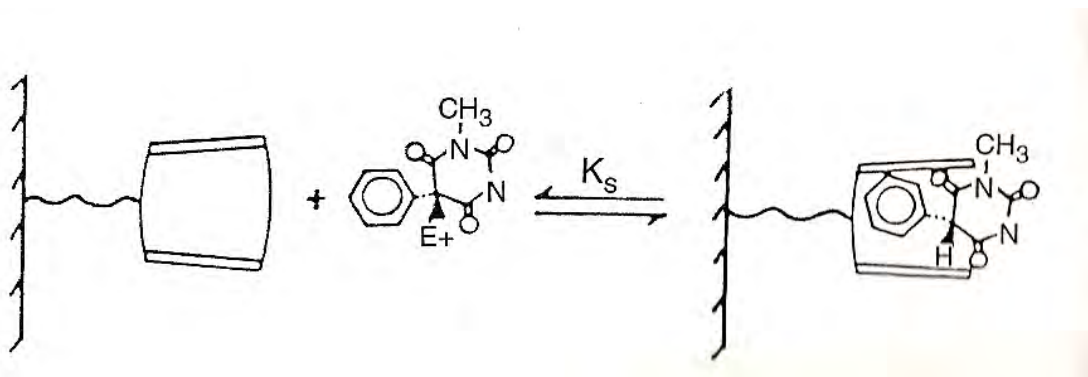


Figura 10. Mecanismo de inclusión¹³

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

2. Fases de afinidad quiral: Con las fases de afinidad quiral, las proteínas presentan interacciones enantioselectivas con una gran variedad de fármacos. Así, la resolución sobre la afinidad de las fases estacionarias quirales se debe a las interacciones de los enantiómeros con las proteínas en condiciones de servidumbre al soporte sólido. Las proteínas típicas que se utilizan para la separación quiral de afinidad incluyen la albúmina sérica bovina y la albúmina sérica humana. Las principales interacciones que son responsables del reconocimiento quiral son del tipo hidrofóbico y coulombico, pero el espaciador hidrofóbico de la proteína que une al soporte sólido puede afectar significativamente la retención y la separación de los enantiómeros. Los cambios en las propiedades de la fase móvil, tales como el tipo y la concentración de un modificador o pH, puede utilizarse para afectar a la retención y la separación de los enantiómeros.
3. Fases quirales basadas en la formación de múltiples enlaces de hidrogeno: El mecanismo de retención en las fases quirales que se basa en la formación de múltiples enlaces de hidrógeno implica la formación de "pares de bases y triples enlaces de hidrógeno entre los solutos y las fases estacionarias quirales.
4. Fases quirales π -donante y π -receptor: Con estas fases estacionarias, el reconocimiento quiral se basa en la interacción π - π y enlaces de hidrógeno.
5. Fases quirales cromatográficas de ligando de intercambio: Estas se resuelve sobre la base de su capacidad de complejos de metales de transición, como el cobre (Cu), Zinc (Zn) y cadmio (Cd). Los analitos se extraen de la fase estacionaria por el uso de un metal de transición en la fase móvil.

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

En la tabla 3, se muestran ejemplos de selectores quirales de cada una de las categorías antes mencionadas.

Tabla 3. Selectores quirales unidos a la fase sólida.¹³

Principio	Selector quiral (ejemplo)	Fase móvil	Sustrato (ejemplo)
inclusión	Triacetilcelulosa	Orgánica	Compuestos aromáticos
	β -Ciclodextrina	Polar	Amidas, Imidas
Afinidad	Albúmina	Acuosa	Compuestos ácidos
	α_1 -Ácido glicoproteínico	Acuosa	Aminas, ácidos carboxílicos
múltiples enlaces de H	Poli metacrilato	Orgánica	Compuestos aromáticos
π -donante/receptor	(R)-N-(3,5-Dinitrobenzoil)fenilglicina	Orgánica	Amidas, imidas cíclicas
Ligando	L-Prolina amida + Cu(II)	Acuosa	Aminoácidos

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

c. FASES MÓVILES PARA CROMATOGRAFÍA QUIRAL

Debido a que las fases estacionarias quirales en general son caras, y a veces tienen una vida limitada, se sigue en la búsqueda de aditivos quirales. La combinación de un gran número de fases aquirales con el apoyo de muchos aditivos como selectores quirales pueden conducir a una amplia variedad de opciones para la separación de enantiómeros. Los aditivos pueden incluir los derivados de aminoácidos, ciertas proteínas y la inclusión de agentes complejantes como ciclodextrinas y éteres.

El uso de agentes derivatizantes quirales, para producir pares de diastereoméricos depende de la disponibilidad de los agentes de derivatización de alta pureza. Desafortunadamente, las velocidades de reacción de los enantiómeros con estos agentes a menudo son diferentes entre sí, lo que resulta en la formación de diastereoisómeros en proporciones que difieren de las de los enantiómeros presentes en el racemato. Los agentes de derivatización fueron utilizados originalmente para la resolución de los fármacos y sus metabolitos en matrices biológicas, pero ahora son ampliamente utilizados en gran número de campos.¹³

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

C. EQUIPO BÁSICO DE CLAR

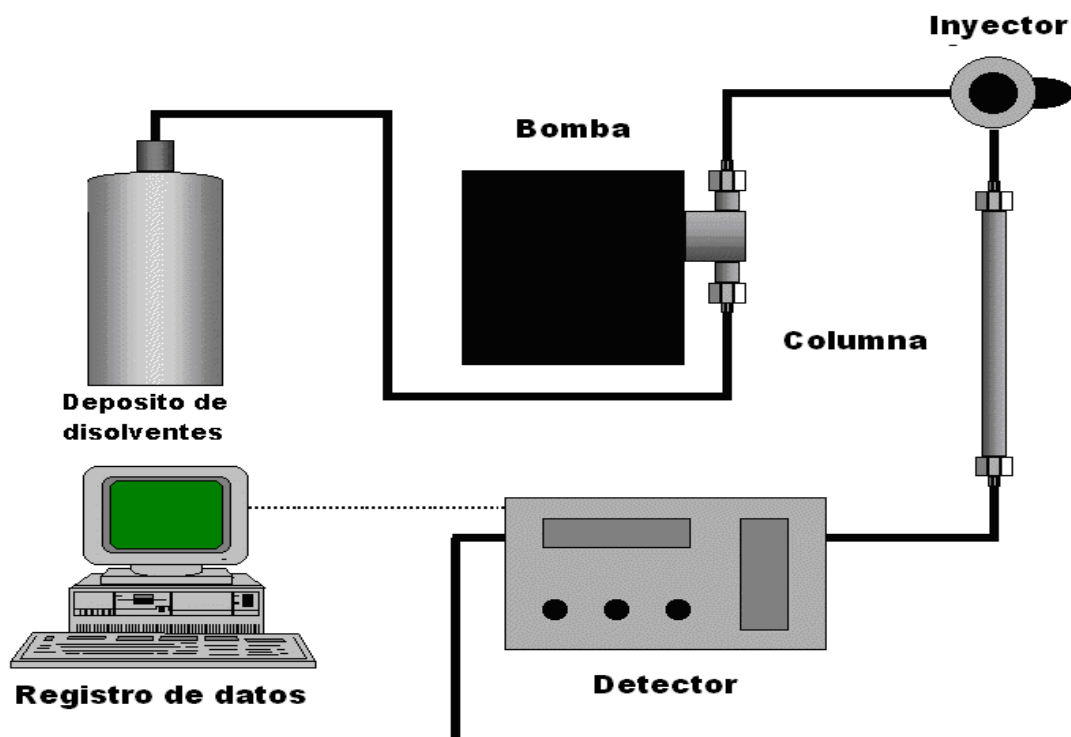


Figura 11. Equipo básico de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

La figura 11, muestra los componentes fundamentales de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución, los cuales se describen a continuación:

1. Depósito de disolventes

Un aparato moderno de CLAR está equipado con uno o más recipientes de vidrio o de acero inoxidable, cada uno de los cuales contiene de 200 a 1000 mL de un disolvente. Los recipientes, a menudo se equipan con un sistema para eliminar los gases disueltos en general oxígeno y nitrógeno que interfieren formando burbujas en la columna y en los sistemas de detección. Estas burbujas provocan ensanchamiento de bandas y a menudo interfieren en el funcionamiento del detector.

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

La fase móvil puede ser un disolvente puro o una mezcla de disolventes. Una forma conveniente de tratar los disolventes antes de introducirlos en el recipiente, consiste en filtrarlos a vacío a través de un filtro (millipore) de tamaño de poro de $0.45\ \mu\text{m}$, para eliminar la materia en suspensión (Figura 12).¹⁴



Figura 12. Sistema de filtración en CLAR

a. Características de los disolventes empleados en CLAR

Las siguientes características son las más adecuadas para los disolventes empleados en CLAR:

- Disponible comercialmente
- Pureza y Estabilidad. En la actualidad se cuenta con productos de calidad de pureza cromatográfica. Bajo contenido de impurezas.
- Disolver la muestra
- Miscible con otros disolventes para formar mezclas útiles
- No degradar o disolver la fase estacionaria
- Tener baja viscosidad para reducir las caídas de presión
- Ser compatible con el detector utilizado. Transparencia óptica (cuando se emplean detectores UV).^{15, 16}

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

La elección de la fase estacionaria se hace de tal forma que la polaridad de ésta se aproxime a la de los componentes de la mezcla a separar, siendo la fase móvil de polaridad distinta; sin embargo, si la polaridad de la fase estacionaria y del analito son excesivamente parecidas los tiempos de retención se hacen muy elevados.

En la práctica es preciso armonizar estos intereses para obtener tiempos de retención razonables, lo que lleva a elegir en primer lugar la fase estacionaria en función de los analitos y posteriormente realizar ensayos para seleccionar la fase móvil más adecuada. El objetivo final de la elección ha de ser mejorar la resolución de la columna, en cromatografía líquida la variable que más influye es el factor de capacidad.

Las fases móviles de fase reversa están constituidas por mezclas de disolventes polares, en general agua, y un modificador orgánico (MeOH, ACN, THF), con o sin agregado de sales inorgánicas u orgánicas (Tabla 4).¹⁷

Tabla 4. Características básicas de los disolventes más utilizados como fases móviles en CLAR.¹⁷

Disolvente	δ . Polaridad	Viscosidad (cp)	Longitud de onda de corte (λ ,nm)
Hexano	14.9	0.31	190
Tolueno	18.1	0.58	285
Tetrahidrofurano	18.6	0.47	220
Cloroformo	19.0	0.57	245
Acetato de etilo	19.6	0.44	260
Dioxano	20.4	1.54	220
Acetonitrilo	23.9	0.37	190
Etanol	25.9	1.20	210
Metanol	29.4	0.60	205
Agua	47.8	1.0	190

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

2. SISTEMA DE BOMBEO

Como consecuencia de las grandes presiones y debido al pequeño tamaño de partícula utilizado en las columnas de CLAR, las bombas deben ser empleadas para lograr tasas aceptables de flujo de eluyente. Las bombas pueden ser clasificadas de acuerdo con el flujo de salida constante y debe ser capaz de suministrar hasta 7000 psi. Están construidas con materiales que son resistentes a los disolventes orgánicos y soluciones amortiguadoras de uso común como agentes de elución.¹⁸

La misión del sistema de bombeo es proporcionar a la columna un flujo de fase móvil controlado, reproducible y constante. Además las bombas empleadas en CLAR deben cumplir las siguientes condiciones:

- Estar construidas con un material inerte a la fase móvil
- Poder trabajar a presiones elevadas
- Suministrar flujos adecuados al diámetro de la columna empleada y libre de pulsaciones para no disminuir la sensibilidad de la detección.⁶

Se utilizan tres tipos de bombas, entre las que figuran: bombas recíprocas, bombas de jeringa o de desplazamiento y bombas neumáticas o de presión constante.

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

a. BOMBAS RECIPROCAS.

Las bombas reciprocas, que se utilizan en aproximadamente el 90% de los sistemas de CLAR comerciales, consisten por lo general, en una pequeña cámara en la que el disolvente es impelido por el movimiento de vaivén de un pistón accionado por un motor de arrastre. Dos válvulas con cierre de bola, que se abren y cierran alternativamente, controlan el flujo del disolvente hacia dentro y hacia fuera de un cilindro. El disolvente está en contacto directo con el pistón. También se puede comunicar la presión al disolvente mediante un diafragma flexible, el cual a su vez se bombea hidráulicamente por un pistón de vaivén. Las bombas reciprocas tienen la desventaja de que producen un flujo pulsado, que se ha de amortiguar dado que su presencia se manifiesta como ruido en la línea base del cromatograma. Entre sus ventajas se pueden citar su pequeño volumen interno (35 a 400 μL), sus altas presiones de salida (por encima de los 10.000psi), su fácil adaptación a la elución con gradiente, y sus caudales constantes, que son prácticamente independientes de la contrapresión de la columna y de la viscosidad del disolvente

b. BOMBAS DE DESPLAZAMIENTO

Consisten por lo general en jeringas, equipadas con un émbolo que se activa por un mecanismo de tornillo accionado mediante un motor paso a paso. Las bombas de desplazamiento también producen un flujo que tiende a ser independiente de la viscosidad y de la contrapresión. Además, el flujo que resulta está libre de pulsaciones. Las desventajas incluyen una capacidad de disolvente limitada (aprox. 250 mL) y una notable incomodidad para el cambio de disolventes.

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

c. BOMBAS NEUMÁTICAS

En las bombas neumáticas más simples, la fase móvil se encuentra en un recipiente plegable colocado en una vasija que puede presurizarse mediante gas comprimido. Las bombas de este tipo son baratas y están exentas de impulsos; aunque tienen una limitada capacidad y presión de salida, y además el caudal depende de la viscosidad del disolvente y de la contrapresión de la columna. Además no son utilizables en la elución con gradiente y están limitadas a presiones menores de unos 2.000 psi.¹⁴

3. SISTEMA DE INYECCIÓN

Es un dispositivo que permite la introducción de la muestra en solución sin interrumpir el caudal de disolventes a través del sistema.

El inyector debe reunir ciertas características, entre las que se encuentran:

- Facilidad de operación
- Inerte al ataque químico y capaz de soportar altas presiones sin producir fugas
- Preciso en cuanto a la cantidad de muestra introducida en el sistema.
- No debe provocar diluciones importantes de la solución inyectada.
- En casos especiales puede requerirse que opere a altas temperaturas.¹⁶

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

Un factor muy importante para obtener una buena resolución en la separación es la adecuada introducción de la muestra en el sistema. La manera ideal de introducir o inyectar la muestra es en forma de “paquete” pequeño ya que esto ayuda en la obtención de picos simétricos y angostos.¹

Dentro de los sistemas de inyección hay que distinguir los de tipo jeringa, las válvulas de inyección y los inyectoros automáticos.⁶

a. INYECTORES DE TIPO JERINGA.

Son similares a los de septum empleados en CG, son baratos y fáciles de construir y, utilizados de forma adecuada, pueden proporcionar para columnas de mediana calidad e eficiencias superiores a la de las válvulas de inyección. Sin embargo, están prácticamente en desuso debido a la dificultad de su utilización y de la obtención de reproducibilidades aceptables, la producción de fugas a presiones elevadas a la sobrepresión que se produce por acumulación de fragmentos de la junta de inyector en la entrada de la columna.⁶

b. VÁLVULAS DE INYECCIÓN.

El sistema de introducción de muestra más generalizado es la válvula de inyección, generalmente de 6 vías. Existen varios diseños, como son las válvulas con un rizo de inyección (loop) externo y otras empleadas para pequeños volúmenes de inyección en las que los loop están grabados en el interior de la válvula. Ambas válvulas funcionan de manera similar. En la figura 13 se encuentra representado el esquema de funcionamiento de una válvula de 6 vías con loop. Dos de las vías, las correspondientes a las posiciones 1 y 4, se encuentran

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

conectadas entre si por el loop. En la fase de carga, con ayuda de una jeringa se introduce la muestra en el loop a presión ambiente mientras la fase móvil pasa por la columna. Para realizar la inyección se gira el rotor de la válvula de modo que, impulsada por la fase móvil, la muestra contenida en el loop pasa al interior de la columna. Estas válvulas son muy reproducibles y permiten trabajar a presión elevada. Su desventaja respecto a las de tipo jeringas es su mayor presión.

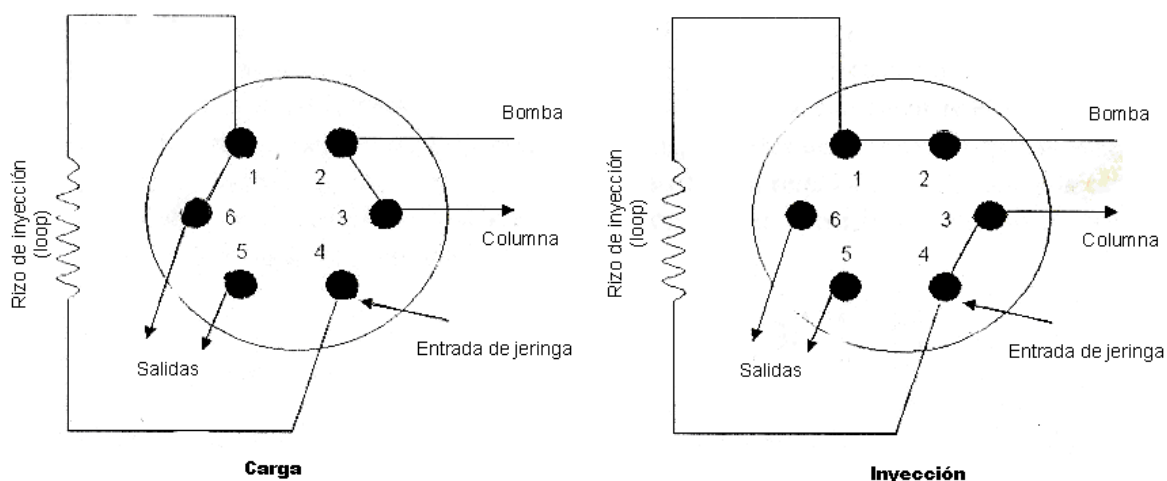


Figura 13. Esquema de funcionamiento de una válvula de inyección de 6 vías.⁶

c. INYECTORES AUTOMÁTICOS.

El precio es aún más elevado para este tipo de inyector, estando justificado su uso para análisis de rutina con elevado número de muestras o en sistemas automatizados de optimización de procesos. La mayoría de estos inyectores están basados en el empleo de una válvula de inyección controlada por un sistema robótico. Además de la elevada repetibilidad y comodidad de uso, estos sistemas permiten la adición automática de reactivos en la muestra y el control de la temperatura de inyección.⁶

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

4. COLUMNAS

Se considera a la columna como la parte fundamental de la cromatografía ya que aquí se va a llevar a cabo la separación. El material de empaque seleccionado al igual que las dimensiones de la columna dependerán del tipo de separación que se desee hacer. Si el objeto de la separación es aislar sustancias de una mezcla, se emplean columnas preparativas en las que las partículas del empaque son de dimensiones mayores que en las columnas analíticas y tanto la longitud como el diámetro interno son mayores ya que deben tener la capacidad de contener cantidades elevadas de la muestra. Las más comunes son las fabricadas con acero inoxidable aunque también las hay de vidrio y de polímero PEEK (Polieteretercetona). La longitud puede ser de 10 centímetros (cm) a 1 metro (m), (Figura 14). Al aumentar la longitud aumenta el número de platos teóricos y por lo tanto, se obtiene una mayor resolución aunque en ocasiones es más importante el tipo de empaque y el tamaño de partícula de éste, ya que al elevar el área superficial del empaque, se aumenta la interacción del soluto con la fase estacionaria.

La eficiencia de las columnas se ha elevado mediante dispositivos y técnicas de empaque que mejoran el contacto del soluto con la fase estacionaria en su paso en la fase móvil. Uno de estos sistemas consiste en la compresión radial de una columna hecha de un material flexible disminuyendo así los espacios vacíos que quedan entre la pared de la columna y las partículas.

Por lo que respecta a las columnas analíticas y su relleno, este puede ser a base de partículas de óxidos (silicio, aluminio, zinc o titanio) o un polímero orgánico (poliestireno-divinilbenceno o metacrilatos). Se debe considerar la influencia de la geometría de la partícula en el empaque de la columna y por tanto en la eficiencia de la separación (partícula irregular o esférica). Se debe considerar también la

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

porosidad de la partícula y la influencia que el tamaño del poro puede tener, sobre todo en separaciones basadas en la diferencia de pesos moleculares. Se considera que el tamaño promedio de un poro de partículas de sílice para aplicaciones analíticas es de $100 \text{ \AA} \pm 20 \text{ \AA}$. Aunado al tamaño de poro está el número de poros que cada partícula presenta, lo cual le va a dar cierto grado de rigidez (poco porosa será mecánicamente muy resistente; muy porosa presentará mayor superficie de separación pero será más frágil). Una sílice con un volumen de poro específico de 1 mL/g se considera un material promedio.

Otro parámetro importante asociado a la partícula es su tamaño; generalmente partículas de gran tamaño se emplean en cromatografía preparativa, en tanto que partículas pequeñas se emplean en separaciones muy rápidas. Los tamaños de partícula disponibles comercialmente pueden dividirse en 4 grupos:

- ◆ $>10 \text{ }\mu\text{m}$, para técnicas preparativas.
- ◆ $10 \text{ }\mu\text{m}$, cromatografía semi-preparativa.
- ◆ $5 \text{ }\mu\text{m}$, es el tamaño más común en técnicas analíticas.
- ◆ $3 \text{ }\mu\text{m}$, para separaciones muy rápidas.

En el caso de los materiales empleados en la fase reversa, se debe considerar también la densidad de cadenas alifáticas unidas a la sílice base, los grupos silanoles libres y si estos han tenido un tratamiento posterior para ser desactivados (endcapping).

Las dimensiones de las columnas analíticas oscilan de los 30 milímetros (mm) a los 300mm de longitud, y entre 0.5mm a 4.6mm de diámetro.

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

Otra manera de mejorar la eficiencia y resolución es el empleo de termostatos que mantienen una temperatura constante a lo largo de la columna. Cuando se tienen valores de k' muy semejantes entre dos o más analitos, es conveniente el empleo de temperatura para lograr una mejoría en la selectividad y eficacia.¹



Figura 14. Columnas para CLAR

a. PRECOLUMNAS

En muchas ocasiones, para aumentar la vida de la columna analítica, se coloca atrás una precolumna que elimina no sólo la materia en suspensión y los contaminantes de los disolventes sino también componentes de la muestra que se unen irreversiblemente a la fase estacionaria.

La composición del relleno de la precolumna debe ser semejante a la de la columna analítica; sin embargo el tamaño de partícula es por lo común mayor para minimizar la caída de presión. Cuando la precolumna se contamina, se vacía, se rellena de nuevo o se reemplaza por otra nueva del mismo tipo.¹⁴

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

b. TIPOS DE FASE ESTACIONARIA

Los tipos de adsorbentes en CLAR pueden ser clasificados en función de su porosidad, estos se mencionan a continuación:

- Partículas con licho poroso: que consisten en esferas de vidrio o de polímeros, no porosas con un diámetro de 30 a 40 μm . En la superficie de estas se deposita una capa delgada y porosa de sílice. Las áreas superficiales de estas partículas varían de 5 a 15 μ^2/g . Por lo general, los rellenos peliculares se utilizan ampliamente en las precolumnas y no en las columnas.
- Partícula porosa: están formados por micropartículas porosas con diámetros entre 3 y 10 μm , con una área superficial grande y con la menor dispersión posible con respecto a un tamaño determinado. Las partículas son de sílice. Las sílices con poros grandes tienen áreas superficiales específicas bajas y viceversa.
- Sílices modificadas (con fase enlazada): A pesar de tener una capacidad de adsorción elevada, las partículas de sílice se utilizan cada vez menos en el análisis. Sus características evolucionan con el transcurso del tiempo. Para muchas aplicaciones debe rehidratarse parcialmente (3 a 8 % de agua) para acondicionarla. Para disminuir su polaridad, a menudo excesiva se aprovecha la reactividad de los grupos silanoles presentes en la superficie para fijar moléculas orgánicas a través de enlaces covalentes. El gel de sílice modificado de este modo, se convierte en utilizable por un líquido, y los mecanismos de separación ponen en juego los coeficientes de reparto y no los coeficientes de adsorción.⁷

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

- Polímeros macroporosos: Los polímeros de poliestireno-divinilbenceno macroporosos tienen canales grandes, adicionalmente a los microporos, que ofrecen a los iones un acceso fácil a los grupos funcionales del intercambiador. Son apropiadas para realizar separaciones en medios no acuosos.¹²

Los materiales utilizados como fase estacionaria deben cumplir ciertos parámetros para ser elegidos como una opción adecuada, de esta manera a continuación se enumeran los más importantes:

1. Las partículas deben ser esféricas y estar disponibles en diámetros de partículas que van desde 3 hasta 10 micrómetros (μm).
2. Las partículas deben resistir las presiones típicas encontradas en CLAR (900-3000psi ó 6.1-20.5 MPa), pero lo ideal sería hasta 4000psi (27.2MPa) y que su volumen no se afecte con la naturaleza del eluyente.
3. Las partículas deben tener una porosidad en el rango de 50 -70% que se extiende al 80% para la cromatografía de exclusión por tamaño.
4. Las partículas no deben contener poros inferiores a $\sim 60\text{\AA}$ de diámetro y debe tener una distribución uniforme del tamaño del poro.
5. Las partículas deben estar disponibles con una gama de diámetros de poro medio de $\sim 60\text{-}1000\text{\AA}$.
6. La superficie interna de la materia deberá ser homogénea.

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

7. La superficie puede ser susceptible de modificación para proporcionar una gama de funcionalidades.
8. El material de empaque debe ser químicamente inerte al pH y la composición del eluyente del método analítico.¹³

c. FUENTES QUE DAÑAN A UNA COLUMNA

Las fuentes principales que pueden causar daño, muchas veces de forma irreversible a la columna son:

- Obstrucción por partículas pequeñas en los disolventes o fases móviles.
- Obstrucción por materiales no eluidos en las muestras.
- Variación de las características de retención por incremento de materiales no eluidos.
- pH inadecuado.
- Temperatura elevada
- Golpeteo o caída de la columna.¹³

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

5. DETECTORES

Existen varios tipos de detectores, probablemente, más que de cualquier otro componente del sistema de CLAR. Casi todas las formas de detección cualitativa y cuantitativa de medición disponibles para el químico analítico ha sido probado y / o adaptado para CLAR. Esto abarca desde los métodos clásicos de recolección de efluentes seguido por métodos instrumentales gravimétricos, volumétricos, o de otro tipo de medida que simplemente con la adaptación de un instrumento de análisis particular puede ser parte del sistema de CLAR.

Esto ha abierto la puerta para que el usuario pueda medir las numerosas propiedades de los solutos de interés, y hace que el desarrollo de métodos y análisis sea más fácil y versátil.

El detector es probablemente el segundo componente más importante en CLAR con respecto al mantenimiento y solución de problemas. Su capacidad, por ejemplo, para responder a las variaciones de flujo, las burbujas de gas en el sistema de bombeo, las fugas, los gradientes de temperatura a través del instrumento, y la fluctuación de la presión. Su sensibilidad a estos cambios generalmente se considera una carga para el usuario. Sin embargo, el cromatógrafo puede detectar estos efectos y sus causas, puede poner estas señales para uso valioso en el mantenimiento y en la corrección de problemas del sistema.

La función de un detector en CLAR es monitorear la columna de los efluentes y ofrecer un medio para la detección de los solutos en él. Los detectores funcionan de acuerdo a muchos principios fisicoquímicos diferentes, pero todas las salidas son una señal eléctrica que es proporcional a alguna propiedad de cualquiera de los analitos.

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

El detector, para ser utilizado en CLAR debe reunir las siguientes características:

- Alta sensibilidad
- Buena estabilidad y reproducibilidad
- Un corto tiempo de respuesta independiente de la velocidad de flujo
- Volumen interno pequeño
- Respuesta lineal en varios ordenes de magnitud
- Poco sensible a los cambios de temperatura y presión
- De alta exactitud
- Puede ser selectivo o específico
- No destructivo (si es de tipo preparativo el método analítico)

Lamentablemente no hay un detector realmente universal, que responda a estos criterios, todavía no se ha desarrollado para CLAR, a pesar de la espectrometría de masas, los sistemas electro-detección y de dispersión láser.

Los distintos enfoques para la detección de soluto que se han llevado a cabo han dado lugar al desarrollo de una amplia gama de detectores que se pueden clasificar de la siguiente manera:

- Los detectores que controlan una propiedad específica del soluto que no es compartida con el disolvente, por ejemplo, absorción ultravioleta y fluorescencia. La posesión de estas propiedades por el soluto permite su detección en el efluente.
- Sistemas de detección que controlan una propiedad mayor por parte del eluyente, por ejemplo, índice de refracción, constante dieléctrica y la densidad; en este caso el soluto modifica el valor en base a la propiedad asociada con el disolvente.

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

- Los detectores que funcionan por desolvatación, es decir, se separa el disolvente del eluyente, permitiendo la detección posterior, por ejemplo, espectrometría de masas (EM) o el evaporativo de dispersión láser.
- La derivatización pre o post -columna implicando la reacción química del analito permite la mejora de la selectividad.¹⁸

Las principales características funcionales de los detectores se presentan en la tabla 5.

Tabla 5. Algunos tipos de detectores usados en CLAR.

Detector	Clasificación	Sensibilidad (g)
Índice de refracción	Universal	10^{-6}
Ultravioleta/Visible	Selectivo	10^{-9}
Fluorescencia	Selectivo	10^{-10}
Electroquímico	Selectivo	10^{-12}
Espectrometría de masas	Universal	10^{-9}
Absorción atómica	Selectivo	10^{-9}

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

a. DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRACCIÓN.

Los detectores de índice de refracción miden esta propiedad en el eluyente de la columna, generalmente con relación a la propia fase móvil. La mayor ventaja de estos detectores es su universalidad. Sus principales inconvenientes son que no permiten trabajar en gradiente y que su sensibilidad es limitada porque son muy susceptibles a pequeñas variaciones de presión, temperatura, lo que produce un elevado valor del ruido, existen varios métodos para medir la variación del índice de refracción: el del ángulo crítico, el basado en el efecto Christiansen, el interferométrico, el del ángulo de desviación y el de reflexión, siendo estos dos últimos los más utilizados.¹⁸

Los detectores basados en el método del ángulo de desviación funcionan según el principio de Descartes, siendo el ángulo formado por el haz luminoso con el eje óptico del sistema, función de la diferencia del índice de refracción de los líquidos contenidos en las células de medida y de referencia

Aquellos detectores basados en el método de reflexión funcionan según el principio de Fresnel. En estos sistemas, la diferencia de índices de refracción entre el líquido contenido en las células de medida y de referencia está relacionada con la variación de intensidad de un haz luminoso que sale en una dirección fija tras ser reflejado en la interfase de las células de medida y de referencia.¹⁸

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

b. DETECTOR ULTRAVIOLETA.

Es el detector más empleado en CLAR. Posee buena sensibilidad y rango lineal, y permite detectar analitos en el orden de los nanogramos (ng). No es destructivo y puede emplearse con gradiente de elución, con la única limitante de que la fase móvil sea transparente en la longitud de onda de trabajo. En general permiten cambiar el volumen de su celda, típicamente con volúmenes de 2 a 12 μl . Es un detector muy poco sensible a los cambios de flujo y de temperatura. El detector UV opera en el rango 190 a 350 nm, y en algunos equipos se puede extender a la zona visible (350 a 700 nm) recibiendo así el nombre de detector UV/Visible. La concentración del analito en la muestra se determina por aplicación de la ley de Beer $A = a \cdot b \cdot C$, donde A es la absorbancia, a es la absorptividad molar del analito, b es el camino óptico de la celda medido en cm y C es la concentración de analito en la muestra expresada en moles/L.¹⁶

Existen tres tipos de detectores UV: los de longitud de onda fija, los de longitud de onda variable y los de dispositivo de diodos.

1) DETECTOR DE ONDA FIJA O FOTOMÉTRICO

Este detector opera a longitudes de onda prefijadas, determinadas por las líneas de emisión de la lámpara, habitualmente de Hg a baja presión. Como longitudes de onda de trabajo reutilizan las bandas de emisión, especialmente de 254 nm. El verdadero monocromador del instrumento es la propia emisión de la lámpara pero, para eliminar líneas de otras longitudes de onda lejanas a la línea de trabajo se utilizan filtros de interferencia. Además de la longitud de onda de 254 nm, suelen emplearse filtros que permiten trabajar a 313, 334, 365 nm. El empleo de filtros de óxidos de fósforo permite trabajar incluso

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

a 280 nm. La lámpara de Hg no emite a 280 nm, pero estos filtros, al ser irradiados emiten a esa longitud de onda (figura 15).

El cambio de lámpara permite incluso trabajar a otras longitudes de onda, por ejemplo a 214 nm con una lámpara de Zn, a 229 nm con una lámpara de Cd.¹⁶

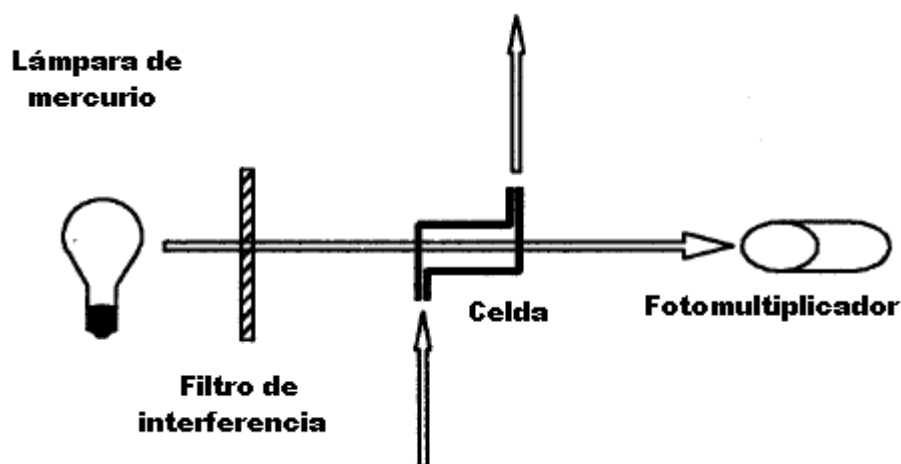


Figura 15. Detector de onda fija o fotométrico¹⁶

2) DETECTOR DE ONDA VARIABLE O ESPECTROFOTOMÉTRICO

Este detector es simplemente un espectrofotómetro, en el cual se reemplaza el compartimiento de celdas removibles por una celda de flujo en arreglo especial.

Es mucho más versátil que el detector de longitud de onda fija ya que al tener red de difracción permite seleccionar libremente la longitud de onda de trabajo.

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

Podremos escoger así la longitud de onda de máxima absorción del analito para aumentar la sensibilidad de medición. Emplea una lámpara de emisión continua, de Deuterio o de Xenón. La luz emitida por la lámpara se enfoca en un monocromador, habitualmente una red holográfica de difracción, y la luz monocromática escogida se dirige hacia la celda de medida y de allí hacia el fotomultiplicador (figura 16).¹⁶

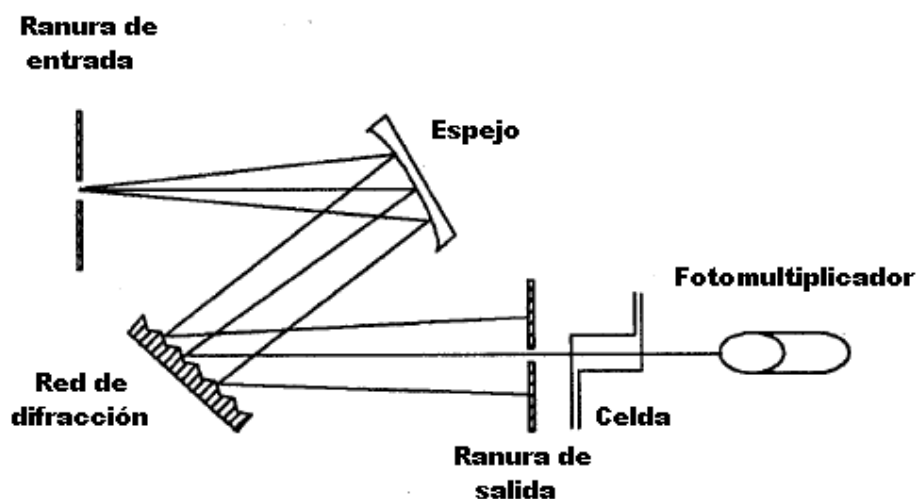


Figura 16. Detector de onda variable o espectrofotométrico¹⁶

3) DETECTOR DE DISPOSITIVO DE DIODOS.

Uno de los últimos adelantos en los detectores UV es el denominado de ordenamiento de fotodiodos. En los dispositivos “convencionales”, la red de difracción se ubica antes de la celda, la que recibe luz monocromática seleccionada por la red. En los detectores de ordenamiento de fotodiodos se emplea un sistema óptico invertido: la celda se ilumina con luz “blanca”, es decir, no monocromada y la luz emergente de la celda llega a la red de difracción y allí

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

es dispersada hacia el elemento fotosensible. En lugar de una fotocelda se emplea un conjunto de fotodiodos montados en un chip de silicio. De esta forma, se consigue medir no sólo la luz transmitida a una longitud de onda, sino todo el espectro de absorción del eluido en tiempo real (ventaja múltiple).

Para poder controlar y procesar toda esta información es necesario la presencia de una computadora con el software adecuado. Los primeros equipos eran muy caros, pero la reducción de costos de la electrónica los ha colocado en valores razonables.

Es un detector muy útil para realizar el desarrollo de los métodos analíticos por CLAR, ya que permite asegurar, dentro de ciertos límites, la integridad de un pico cromatográfico.¹⁶

c. DETECTOR DE FLUORESCENCIA

Un detector de fluorescencia monitorea la luz fluorescente emitida en el eluato por medio de una celda de flujo con la irradiación de una luz de excitación en un ángulo recto. Es selectivo y extremadamente sensible, pero se limita a los compuestos con fluorescencia innata o por derivatización pre o post columna. Un detector de fluorescencia puede ser un espectrofotómetro de fluorescencia regular equipada con una celda de flujo pequeña aunque la mayoría son construidos específicamente para CLAR. Un detector de fluorescencia consiste en una fuente de xénón, un monocromador de excitación, un monocromador de emisión, una celda de flujo, y un fotomultiplicador para amplificar los fotones emitidos. La lámpara de xénón puede ser una fuente continua o una menor fuente de potencia pulsada. La fuente pulsada se está volviendo más común, y a que tiene más energía en la región del UV y ahora también puede medir la fosforescencia, quimioluminiscencia y bioluminiscencia. Los equipos más caros tienen un doble monocromador, que puede ser

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

programado para optimizar la detección de múltiples componentes. Los filtros que se utilizan en lugar de monocromadores disminuyen el costo del equipo. La sensibilidad es mayor a menudo mediante la ampliación de las rendijas ópticas (por ejemplo, hasta 20 nm en ancho de banda espectral).¹¹

d. DETECTOR ELECTROQUÍMICO

Los detectores electroquímicos que se basan en la oxidación o reducción del analito, puede ser aplicado al análisis de compuestos selectivos como los fenoles, aminas, grupos nitro, alcoholes, entre otros. Sin embargo, la adsorción de moléculas reactivas en la superficie de los electrodos puede reducir la conductividad. Para resolver este problema se aplica una tensión pulsada, que limpia la superficie del electrodo entre las mediciones. Por otro lado la detección conductimétrica consiste en medir los cambios en la conductividad de una solución acuosa entre dos electrodos, la cual se emplea en la cromatografía de iones para la detección de analitos ionizados.¹⁹

Es un detector muy sensible, unas 1000 veces más sensible que el detector UV, y altamente selectivo. La selectividad se debe, no sólo a que detecta compuestos capaces de ser oxidados y reducidos, sino que pueden reducirse el número de esos compuestos detectados por una cuidadosa elección del potencial aplicado.

Este detector emplea tres electrodos: el electrodo de trabajo, el de referencia y el auxiliar (figura 17). La reacción redox es inducida en el electrodo de trabajo, mientras el electrodo auxiliar provee la carga de neutralización complementaria. Entre estos electrodos se fija el voltaje apropiado para la detección. El electrodo de referencia, por su parte produce un potencial fijo y estable contra el cual se mide el potencial del electrodo de trabajo, y un potenciostato provee una diferencia de potencial estable entre el electrodo de trabajo y el auxiliar. Un

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

amplificador de corriente de nanoamperes produce una señal de salida, proveniente del flujo de corriente entre los electrodos auxiliar y de referencia, causado por la transferencia de electrones del proceso de oxidación-reducción.

Su principal limitación está dada por el tipo de fase móvil a emplear, que necesariamente debe ser conductiva, limitando su campo de aplicación a la cromatografía de fase reversa e intercambio iónico. Por otra parte, es evidente su naturaleza destructiva respecto del analito.

Como fases móviles se emplean amortiguadores (ya que deben ser conductoras), en general de fosfatos, de concentración total no mayor de 0.02M para permitir el empleo de modificadores orgánicos.

La desgasificación es muy importante en el modo "reductivo", ya que la presencia de aire disuelto en la fase móvil da lugar al gasto de potencial en la reducción de ese oxígeno, generando señales ruidosas y baja sensibilidad de detección. En estos casos se recomienda la desgasificación continua, en general por burbujeo de helio.¹⁶

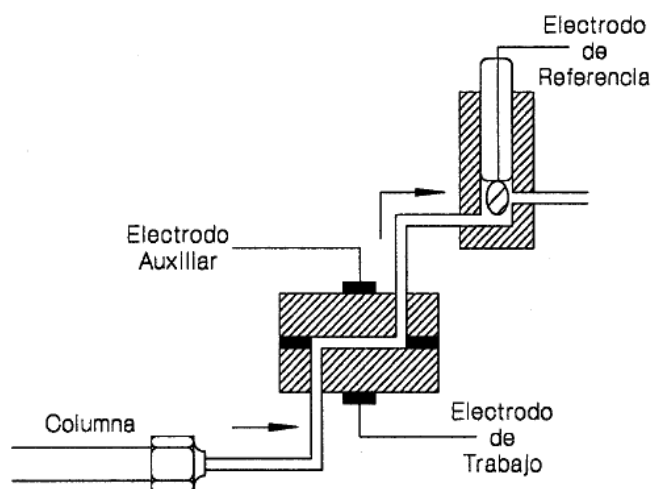


Figura 17. Esquema de un electrodo de un detector electroquímico.¹⁶

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

e) DETECTOR DE DISPERSIÓN DE LUZ POR EVAPORACIÓN (ELSD)

Este detector es relativamente simple en diseño y funcionamiento, y es de interés debido a su potencial aparente como un detector universal. La fase móvil pasa a través de un nebulizador, donde se convierte en un fino rocío en el aire o nitrógeno, (Figura 18). Estas partículas pequeñas, son gotas de alta concentración de soluto, esta nube pasa a través de una luz o rayo láser y la luz dispersada se detecta en ángulo recto a través de fotodiodos de silicio. El mecanismo de dispersión de la luz es complejo y es el resultado de una serie de mecanismos diferentes de dispersión, reflexión y refracción. La contribución relativa de estos procesos depende del radio de la gota en comparación con la longitud de onda del detector.

Así, el grado de dispersión de la luz y la sensibilidad del detector depende de la radio de las gotitas en suspensión.

El ELSD responde a cualquier soluto no-volátil y por lo tanto se acercan a un detector universal. La sensibilidad es mayor utilizando láser como fuentes de luz con límites de detección de 5 g por cada 25 mL; una mejora considerable en comparación con la detección de IR. Además, los ELSD no son tan sensibles a las condiciones ambientales como la temperatura, la presión y el flujo del eluyente.¹⁸

Este detector se utiliza para los analitos de absorbanza baja (por ejemplo, azúcares, triglicéridos).¹¹

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

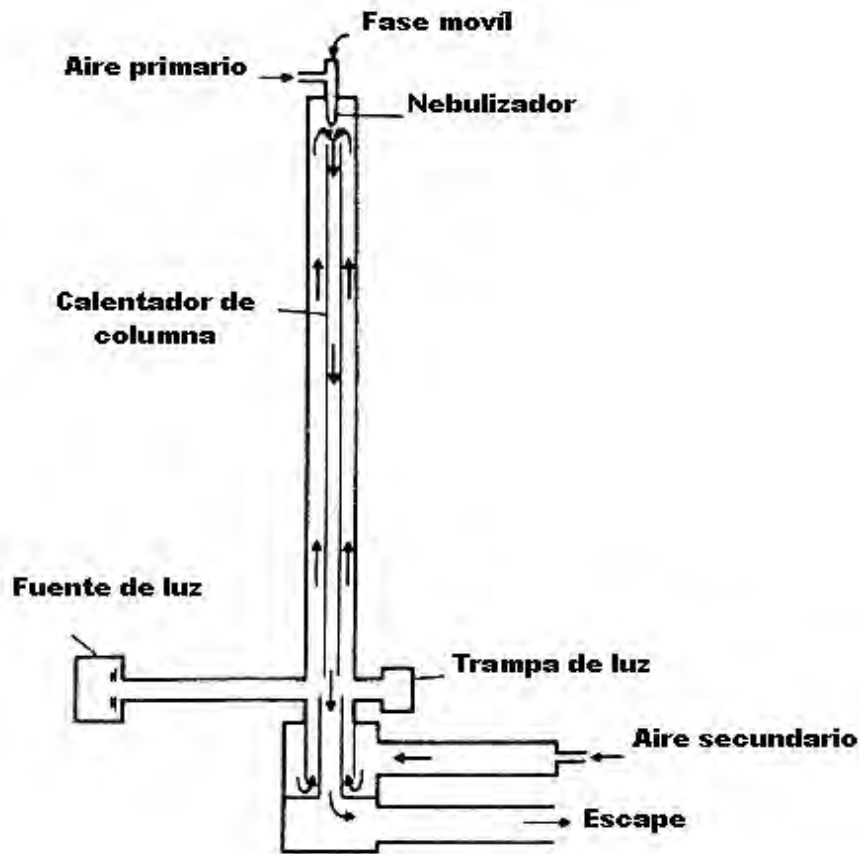


Figura 18. Detector ELSD¹¹

f) DETECTOR DE ESPECTRÓMETRO DE MASAS (EM)

Un espectrómetro de masas es un detector universal que se utiliza para el análisis de compuestos con pesos moleculares hasta más de 100.000 UMA. Puede ser utilizado para confirmar la identidad de los compuestos. Aunque el detector de espectrómetro de masas no es la más sensible de los detectores en CLAR.¹³

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

El detector de E M s e basa e n que un a peq ueña c antidad d el co mpuesto a analizar, está ionizada, las especies portadoras de carga eléctrica resultantes son sometidas a la acción de un campo eléctrico y/o magnético. El estudio de las trayectorias seguidas, permite determinar la relación masa-carga de los iones, así como, eventualmente, su naturaleza. Este detector destruye el compuesto analizado.⁷

Entre estos detectores se distinguen:

- Multiplicador de electrones de díodos separados. Los iones positivos golpean un cátodo de conversión que libera iones que a continuación son multiplicados por una quincena de síndodos colocados en cascada. Estos detectores son muy sensibles.
- Multiplicador de electrones de díodo continuo. Los iones son desviados a un colector cuya entrada, con forma de cono y construido en vidrio dopado con plomo, hace el papel de cátodo de conversión. Los electrones liberados son atraídos hacia un electrodo positivo. Los sucesivos choques de los electrones sobre la pared provocan su multiplicación.
- Detectores de microcanales. Constituidos por la suma de un número muy grande de microcanaltrones, dispuestos en modo de columna, funcionan como si se tratara de una placa fotográfica electrónica. Cada detector está formado de una porción de micro tubo (25 μm de diámetro) recubierto interiormente de un material semiconductor funcionando como un síndodo continuo. La avalancha de electrones secundarios emitidos se recupera por un ánodo. Este sistema permite registrar simultáneamente iones de diferentes masas.⁷

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

1) Fuente de iones

Históricamente, los iones para análisis de masas se producían por bombardeo de los componentes de muestras gaseosas con electrones de elevada energía. Sin embargo, durante las dos últimas décadas se han desarrollado varias nuevas fuentes de iones que ofrecen ciertas ventajas sobre la clásica fuente de haz de electrones.

Existen dos categorías de fuentes de iones, la primera corresponde a las fuentes de fase gas en las que la muestra es primero volatilizada y a continuación los componentes gaseosos son ionizados de diversas maneras, algunos ejemplos se mencionan a continuación:

- **Ionización por impacto de electrones (EI).** Es el método más utilizado para compuestos en estado gaseoso. La ionización viene provocada por las colisiones con electrones obtenidos por efecto termoiónico. Al chocar con una molécula neutra se arranca uno de sus electrones, lo que implica la formación de un ion portador de una carga elemental positiva.⁷
- **Ionización química (CI).** Los átomos gaseosos de la muestra se ionizan al colisionar con los iones producidos al bombardear con electrones un exceso de gas reactivo (normalmente metano, monóxido de carbono o isobutano). Normalmente se utilizan iones negativos, aunque la ionización química de iones negativos se utiliza ocasionalmente en aquellos analitos que contienen átomos muy electronegativos.

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

La segunda categoría de fuentes es la de fuentes de desorción, en este caso, la energía se transmite a la muestra sólida o líquida, de maneras muy diversas produciendo la ionización y la transferencia de iones de la fase condensada al estado gaseoso iónico. La mayor ventaja de la ionización por desorción es que permite el examen de moléculas no volátiles y térmicamente inestables tales como las que se encuentran normalmente en bioquímica. A continuación se mencionan las principales:

- **Desorción/ionización por láser asistida por una matriz (MALDI).** Esta técnica nos permite calcular pesos moleculares exactos de biopolímeros polares en un intervalo de masas moleculares de varios cientos de miles de Daltons. En esta técnica se mezcla una disolución acuosa/alcohólica de la muestra con un exceso de una sustancia matriz que absorbe la radiación. La disolución resultante se evapora en la superficie de una sonda metálica que se utiliza para la introducción de la muestra. La mezcla sólida se expone a la acción de un haz de láser pulsante, provocando la sublimación del analito a iones que son introducidos en un espectrómetro de tiempo de vuelo para el análisis de masas.
- **Ionización por electronebulización (ESI/MS).** Esta técnica se ha convertido en una de las más importantes para el análisis de biomoléculas de pesos superiores a 100.000 Daltons. Se realiza en condiciones atmosféricas de presión y temperatura. La disolución de la muestra se bombardea a través de una aguja capilar de acero inoxidable a un flujo de algunos microlitros por minuto. La niebla de finas gotitas cargadas resultantes pasa a través de un capilar de desolvatación donde se produce la evaporación del disolvente y de las moléculas del analito y donde estas adquieren la carga. Debido a que las gotitas se vuelven más pequeñas por la evaporación del disolvente, su densidad aumenta produciéndose la desorción de los iones en la atmósfera gaseosa.

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

- **Fuentes de bombardeo con átomos rápidos (FAB).** Con este tipo de fuentes, las muestras en un estado condensado, a menudo en una matriz de una disolución de glicerol, se ionizan por bombardeo con átomos de xenón o argón de elevada energía. Tanto los iones positivos como negativos del analito son expulsados de la superficie de la muestra por un proceso de desorción.
- **Desorción por plasma (PD).** La muestra en disolución se introduce en el plasma y la aspiración por parte de los iones formados por efecto del vacío en el analizador de masas se hace por un orificio muy pequeño horadado en el eje de un cono metálico refrigerado. Todos los enlaces químicos son destruidos, pero de este modo se accede a las concentraciones elementales.
- **Ionización por termonebulización (TS).** La ionización por termonebulización se usa para elementos reactivos. Una muestra es depositada encima de una cinta metálica y una corriente eléctrica calienta el metal a altas temperaturas. La cinta es revestida de grafito que reduce la desfragmentación.⁷

2) Analizadores de masa

Lo ideal es que el analizador fuera capaz de distinguir entre diferencias muy pequeñas de masa. Además, deberían permitir el paso del número suficiente para producir corrientes iónicas fáciles de medir. Estas dos propiedades no son compatibles y se debe de llegar a un equilibrio, existen diferentes tipos de analizadores de masas:

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

- **Analizadores de tiempo de vuelo (TOF).** Se basa en la medida del tiempo que tardan los iones generados y acelerados con igual energía en la fuente de iones, en alcanzar un electrodo colector situado a una distancia prefijada. Como los iones poseen la misma energía pero diferentes masas alcanzarán el colector a diferentes tiempos, dependiendo de su masa, carga y energía cinética (Figura 19).

En el pasado, y debido a las limitaciones de tipo electrónico y de software, su uso fue muy limitado debido a su escaso poder de resolución y rango de masas. Sin embargo, en la última década, y debido precisamente a los enormes avances en el campo de la microelectrónica y el software ha recibido un increíble impulso, hasta el punto de que actualmente, junto con los analizadores de cuadrupolo, es el analizador más ampliamente utilizado.

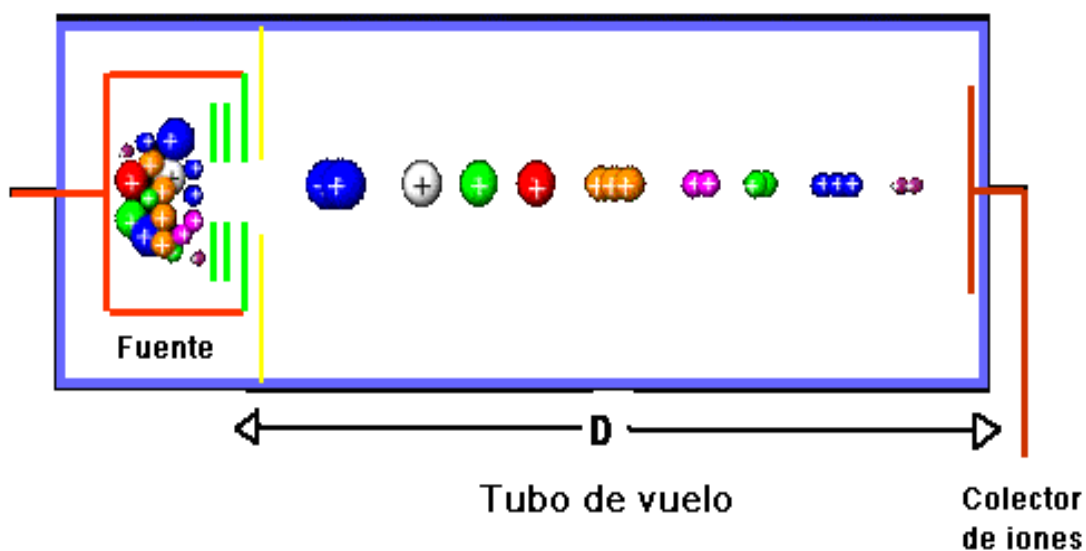


Figura 19. Detector de tiempo de vuelo

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

- **Analizadores de cuadrupolo.** Consiste en cuatro rodillos paralelos a los que se aplica una corriente continua (DC) sobre la que se superpone un potencial de radiofrecuencia (RF). El campo creado en los rodillos actúa a modo de filtro y determina que iones alcanzarán el detector. Los iones, en esta región de campo variable, oscilarán dependiendo del campo de radiofrecuencia aplicado así como de su relación masa/carga, por lo que sólo determinados iones alcanzaran el detector. De este modo, un espectro de masas se conseguirá barriendo (scanning) el campo RF dentro de un rango de frecuencias (Figura 20). El analizador de cuadrupolo es uno de los más extendidos hoy día. Su principal desventaja es la imposibilidad de realizar análisis de alta resolución, masas exactas, así como su limitación en cuanto a rango de masas.

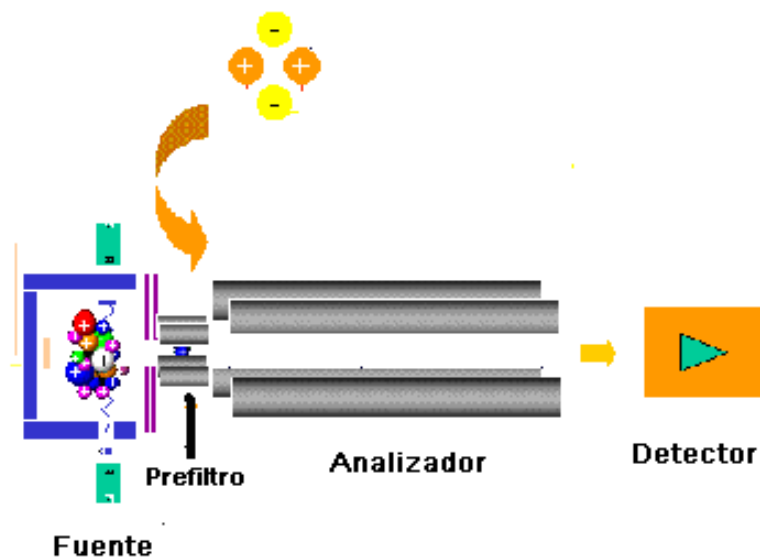


Figura 20. Analizador de cuadrupolo.

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

- **Analizador de trampa de iones (IT).** Concebido al mismo tiempo que el analizador de cuadrupolo su física es muy similar. Los iones generados en la fuente son “atrapados”, durante un cierto tiempo, en un campo de radiofrecuencia dentro de un anillo toroidal situado entre dos electrodos hiperbólicos. Mediante la aplicación simultánea de corrientes DC y RF se consigue “atrapar” y mantener dentro del anillo central los iones procedentes de la fuente de iones. Una vez allí, dichos iones pueden ser extraídos a voluntad aplicando corrientes de radiofrecuencia variables hasta valores de resonancia y expulsados a través del anillo de salida. La posición de los anillos exteriores puede ser modificada para una mayor eficiencia de transmisión (Figura 21).²⁰

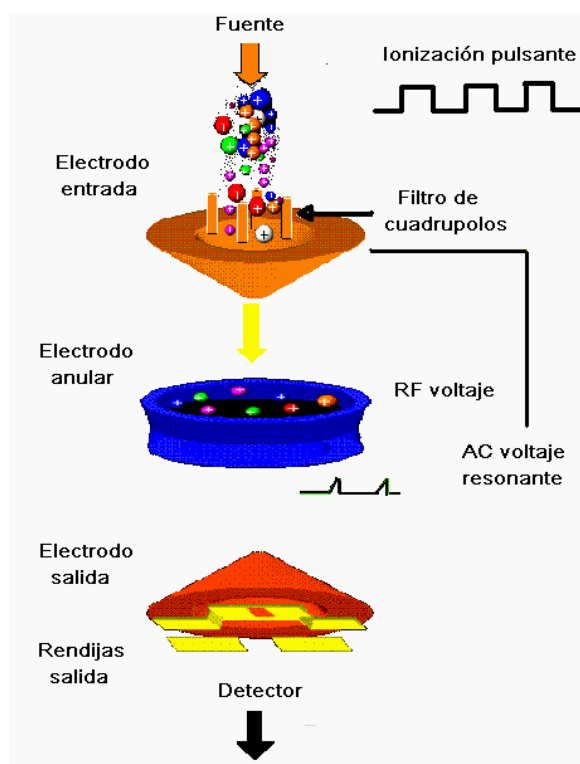


Figura 21. Analizador de trampa de iones

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

D. EL CROMATOGRAMA

Es un grafico que representa la respuesta del detector, a la concentración de un analito en el efluente o fase móvil. El Cromatograma se obtiene a través de un integrador o sistema computarizado y la forma que se obtiene es una distribución parecida a un pico gaussiano, donde el máximo del pico representa el volumen o tiempo de retención según se grafique en función de volumen o tiempo. (Figura 22).¹⁶

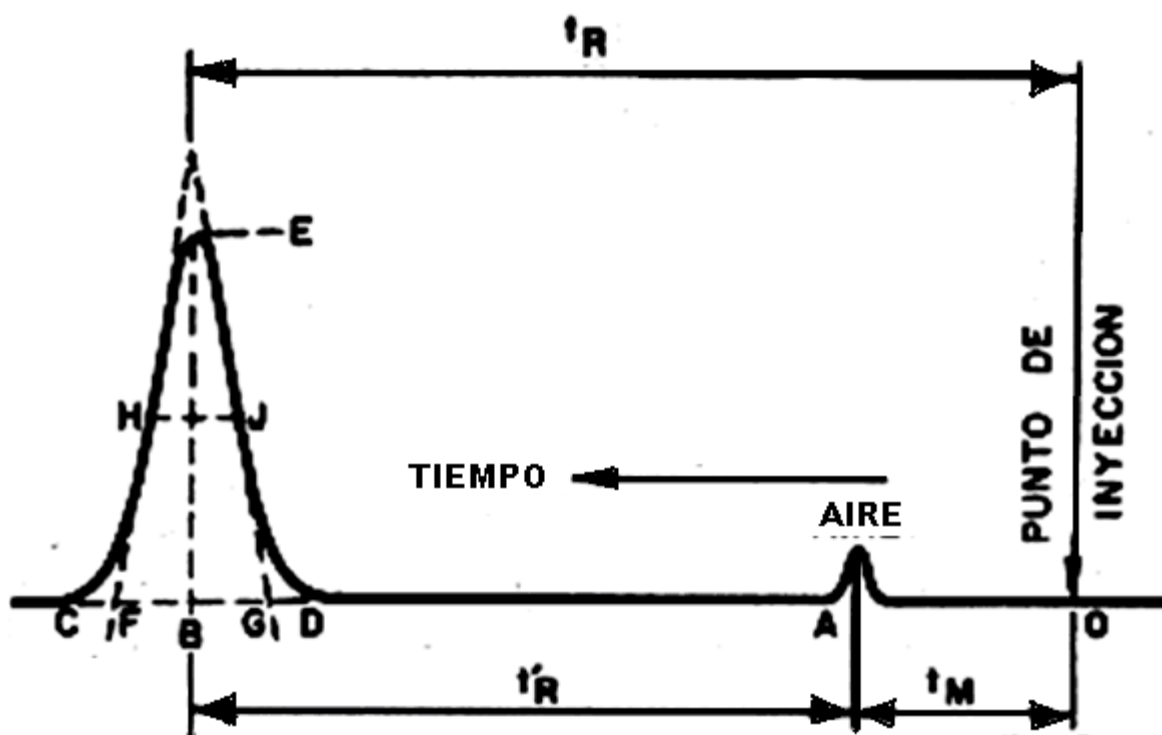


Figura 22. Cromatograma.¹⁶

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

1. PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS.

Estos parámetros definen en forma matemática las características del proceso cromatográfico y son obtenidos a través del Cromatograma.

Línea base: Es la proporción del cromatograma donde sólo se aprecia la elución de la fase móvil sin señal debido al soluto.

Volumen muerto (V_0): Es el volumen total de la fase móvil entre el punto de inyección y el de detección. Comprende al volumen que la fase móvil puede ocupar entre las partículas y la pared de la columna, en el interior de las tuberías, uniones, matemáticamente se representa como:

$$V_0 = 0.65(\pi D^2 L/4)$$

Donde:

D= diámetro de la columna

L= Longitud de la columna

Volumen de retención (V_R): Volumen de fase móvil necesaria para que se produzca la elución de un soluto y pueda ser detectado.

$$V_R = t_0 F$$

Donde:

t_0 = tiempo muerto

F= Velocidad de flujo

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

Tiempo muerto (t_0): Es el tiempo de retención de una sustancia no retenida en la fase estacionaria.

Velocidad lineal (u): La velocidad lineal, de la fase móvil, se mide con el tiempo de tránsito de un soluto no retenido, t_0 . Las unidades resultantes de la velocidad lineal son cm/s. ¹⁶

$$u = L/t_0$$

Donde:

L = longitud de la columna

T_0 =Tiempo muerto

Tiempo de retención (t_R): Es el tiempo medido entre la inyección y la elución de la concentración máxima de un soluto al ser detectado.

Tiempo de retención relativo (t'_R): Diferencia entre el tiempo de retención del analito y el volumen muerto de la columna es decir, el tiempo que un analito es retenido en la columna comparado con un compuesto no retenido. Matemáticamente se representa por:

$$t'_R = t_R - t_0$$

Donde:

t_R = tiempo de retención

t_0 = tiempo muerto

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

Constante de distribución (K): Es el parámetro físico-químico que cuantifica la relación de concentración de cada compuesto entre las dos fases presentes. Se representa matemáticamente como: ⁷

$$K = C_S / C_M$$

K = Concentración de soluto en la FE/ Concentración de soluto en la FM

Donde:

FE: Fase estacionaria

FM: Fase móvil

Factor de capacidad (k'): Es el cociente entre el número de moles de soluto en la fase estacionaria y el número de moles del soluto en la fase móvil y está relacionado con el coeficiente de distribución entre ambas fases. Matemáticamente se obtiene de la siguiente manera:

k' = No de moles de soluto en la FE/ No de moles de soluto en la FM.

Donde:

FE= Fase estacionaria

FM= Fase móvil

Puede demostrarse que K' es proporcional al tiempo de retención del soluto y se calcula para el pico enésimo como:

$$K' = (t_R - t_0) / t_0$$

Donde:

t_R= tiempo de retención

t₀= tiempo muerto

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

Factor de selectividad (α): Es el cociente entre los factores de capacidad de un par de picos (Figura 23). Si no existe separación, α es igual a la unidad y su valor aumenta cuando aumenta la separación. Matemáticamente se representa como:

$$\alpha = k'_2/k'_1 \quad \text{o} \quad \alpha = t_{R2}/t_{R1}$$

Donde:

k'_1 = Factor de capacidad del pico 1

k'_2 = Factor de capacidad del pico 2

t_{R2} = Tiempo de retención del pico 2

t_{R1} = Tiempo de retención del pico 1

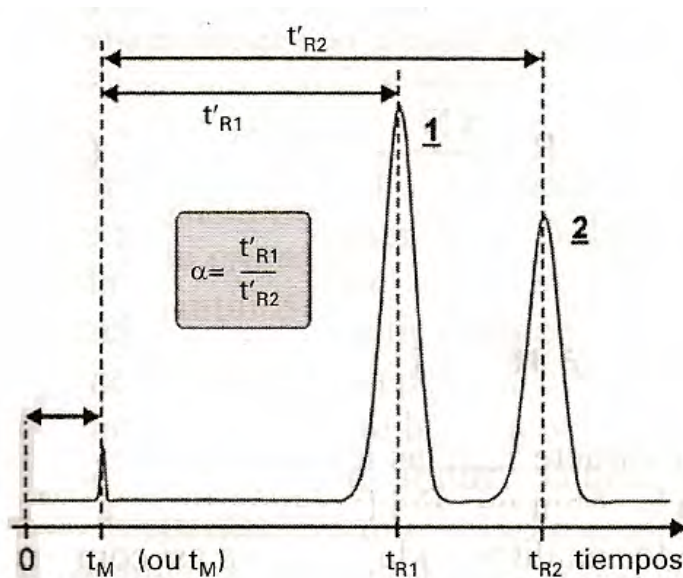


Figura 23. Factor de selectividad entre dos compuestos adyacentes⁷

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

Ancho de pico (w): Esta medición se puede efectuar con varios objetivos: para calcular la eficiencia de la columna (platos teóricos), la resolución, para el cálculo manual del área del pico y en algunos integradores electrónicos se ingresa como dato de ajuste de integración.

El ancho de pico puede tomarse en varias posiciones (a varias alturas) como se puede observar en la figura 24 y si la señal fuera totalmente gaussiana, las apreciaciones que resultan de esta medición serían equivalentes. Sin embargo, como esta condición raramente se cumple, debe indicarse cuáles es el método empleado. En general el ancho de pico suele tomarse:

- Al 60.6% de la altura de pico (w_i). En este lugar se encuentran los puntos de inflexión y en una distribución normal, la sección horizontal de la curva corresponde a dos desviaciones estándar (2σ).
- Al 50% de la altura de pico (w_h , ancho de pico a media onda).
- En la base del pico (w_b). Este valor se obtiene prolongando la línea base por debajo del pico y midiendo el segmento de esta línea delimitado por la extrapolación de las ramas ascendente y descendente del pico.
- Para obtener un mayor reflejo de la asimetría sobre la medición, no es infrecuente encontrar medidas tomadas en otros sectores del pico.

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

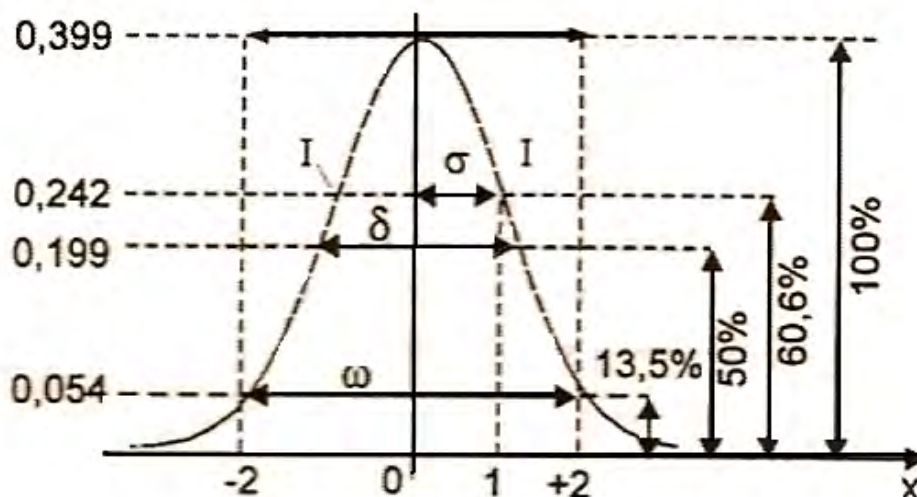


Figura 24. Representación grafica de las diferentes posiciones o alturas en las que puede medirse en ancho de pico.⁷

Resolución (R): la resolución es un término usado para describir el grado de separación entre las bandas de dos sustancias (Figura 25).¹³

$$R = \frac{1}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) (N^{1/2}) (K' / (1 + K'))$$

Donde:

α = Factor de separación

N = Numero de platos teóricos

k' = Factor de capacidad

También puede obtenerse con otra relación matemática:

$$R = (t_{R2} - t_{R1}) / (1/2 (w_{h2} + w_{h1}))$$

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

Donde:

t_{R1} = tiempo de retención del pico 1

t_{R2} = tiempo de retención del pico 2

w_{h1} = Ancho del pico 1 a la mitad de altura

w_{h2} = Ancho de pico 2 a la mitad de altura

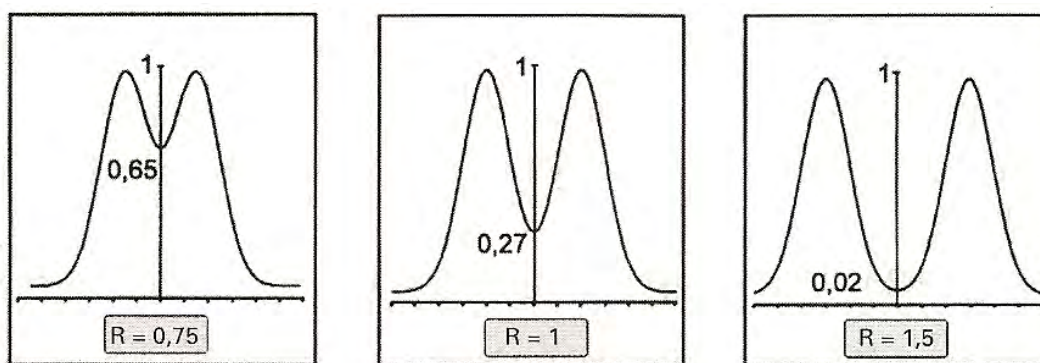


Figura 25. Resolución. Simulación de picos cromatográficos más o menos aproximadas a dos curvas gaussianas idénticas. Se puede observar tanto visualmente como en valores de R. A partir de R mayor a 1.5, se considera que los picos están resueltos. ⁷

Platos teóricos (N): Es la medida de la eficiencia de la columna. No 10 Por lo tanto su poder separativo se mide en función de su número de platos teóricos. El número de platos teóricos, puede calcularse en función del ancho de pico como:

11, 16

$$N = t_R^2 / \sigma_t^2$$

Donde:

t_R = tiempo de retención

σ_t = desviación estándar del pico

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

Otra manera de obtenerse es:

$$N = 16 t_R^2 / w_b^2$$

Donde:

t_R = tiempo de retención

w_b = ancho de pico en la base.

ó

$$N = 4 t_R^2 / w_i^2$$

Donde:

t_R = tiempo de retención

w_i = ancho de pico al 60.7% de altura

Sin embargo la forma más común emplea la siguiente relación:

$$N = 5.54 t_R^2 / W_h^2$$

Donde:

t_R = tiempo de retención

W_h = ancho de pico a mitad de la altura.

Asimetría (As): La asimetría (tailing) es una de las formas más comunes de alejamiento de la curva gaussiana y su medición es importante puesto que puede llevar, de acuerdo a su magnitud, a errores considerables de cuantificación, e incluso a oscurecer picos adyacentes. Si bien no existe un criterio único para el cálculo de asimetría, las formulas empleadas con mayor frecuencia son:

$$As_{10\%} = b/a \quad \text{ó} \quad As_{5\%} = b'/a'$$

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

Donde **a** y **b** son las medidas entre las líneas que une el máximo del pico con la línea base y los extremos anterior y posterior, tomados al 10% de su altura. Por su parte **a'** y **b'** son los mismos parámetros tomados al 5% de dicha altura (Figura 26).¹⁶

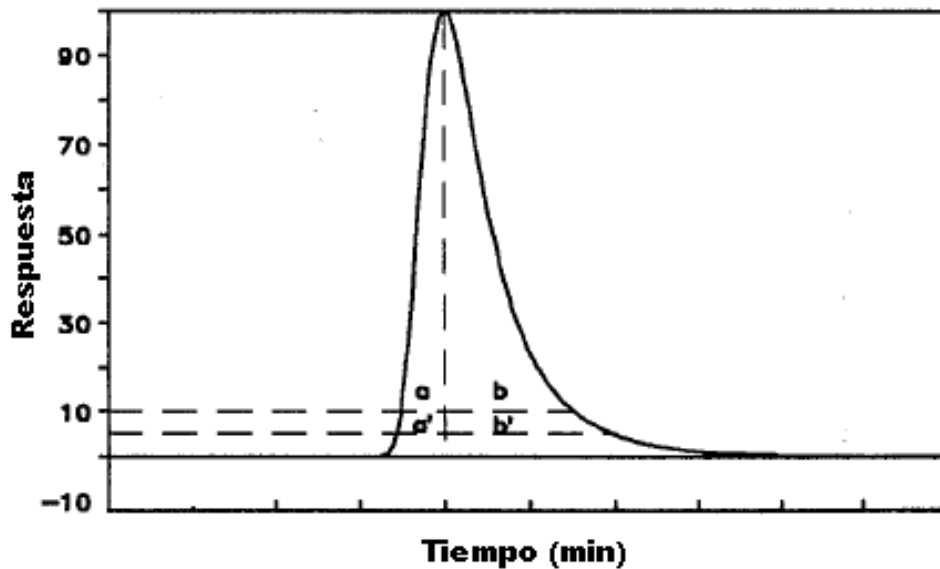


Figura 26. Representación de un pico asimétrico y las zonas de medición de asimetría.⁷

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

E. ESOMEPRAZOL

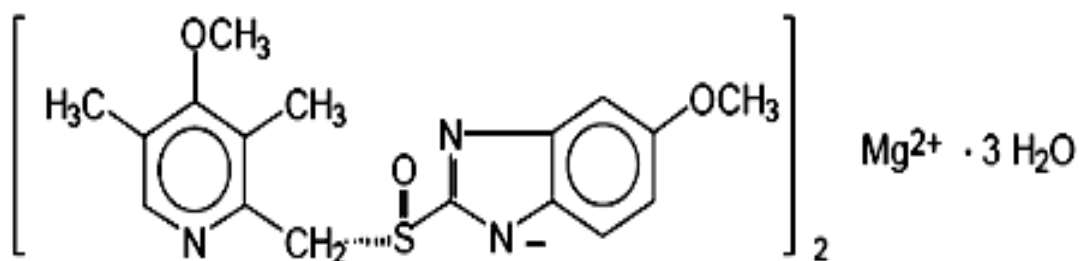


Figura 27. Estructura del esomeprazol.²¹

El esomeprazol es el S-isómero del omeprazol, que es una mezcla de la S-y R-isómeros. Su fórmula molecular es bis (5- metoxi-2-[(S) - [(4-metoxi-3, 5 -- dimetil-2-piridil) metil] su (finil)-1H-benzimidazol-1-il) t rihidrato de magnesio, con peso molecular de 767,2 g/mol como trihidrato y 713,1g/mol en la sustancia anhidra (Figura 27). Es más potente que el omeprazol para inhibir la secreción gástrica y produce un aumento más rápido del pH, manteniéndolo durante más tiempo por encima de 4. Esto permite que pueda ser utilizado para tratar a enfermos con enfermedad por reflujo gastroesofágico. Actúa bloqueando la ATPasa-H⁺/Na⁺ de la membrana de las células parietales gástricas. Se absorbe rápidamente en el intestino delgado y en el hígado se transforma por acción de las isoformas del citocromo P450 CYP2C19 y, en menor grado CYP3A4, que actúan de forma distinta a como lo hacen con omeprazol lo que da lugar a una biodisponibilidad de esomeprazol mayor y una mayor área bajo la curva de la concentración plasmática. Es bien tolerado y disponible por vía intravenosa para administrar en inyección en 3 min o en infusión.

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

La estabilidad de esomeprazolato de magnesio es una función del pH, que se degrada rápidamente en un medio ácido, pero tiene una buena estabilidad en condiciones alcalinas. A pH 6,8 (Solución amortiguadora), su vida media es de alrededor de 19 h a 25 ° C y alrededor de 8 h a 37 ° C.

1. MECANISMO DE ACCIÓN.

El esomeprazol bloquea la ATPasa-H⁺/Na⁺ presente en la superficie de la membrana de las células parietales de la mucosa gástrica, que representa la vía final común de la secreción ácida, independientemente de cuál sea el agente secretado (acetilcolina, gástrica o histamina) (figura 28). La función fisiológica de la ATPasa-H⁺/Na⁺ (114 KDa) es intercambiar H⁺ por Na⁺ en una proporción 1:1, siendo capaz de promover la secreción de protones incluso contra gradientes (pH = 1) un millón de veces superiores a las concentraciones de H⁺ existentes en la célula parietal en condiciones fisiológicas (pH = 7,4).

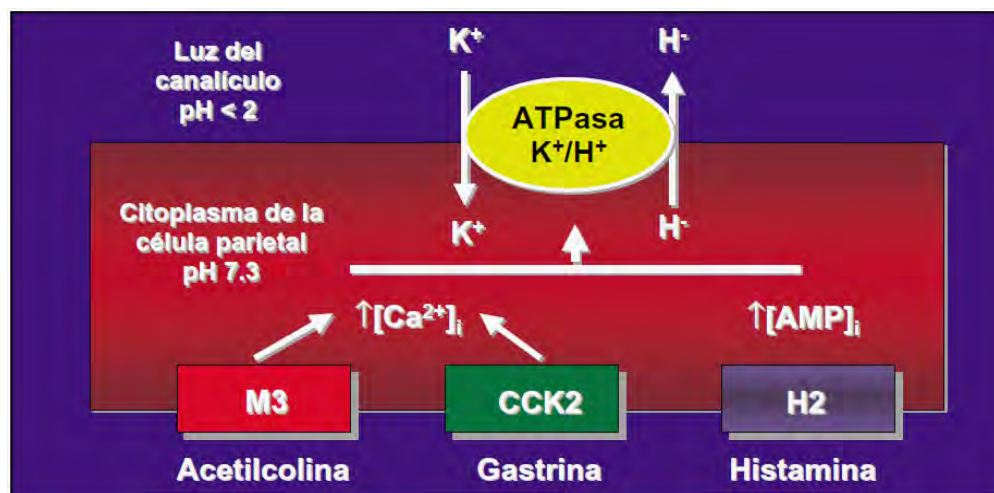


Figura 28. La ATPasa K⁺/H⁺ es la vía final de la secreción de ácido clorhídrico por la célula parietal gástrica. CCK2: receptores para colecistocinina. [Ca²⁺]_i: concentración de calcio intracelular. H2: receptores histaminérgicos H2. M3: receptores muscarínicos M3.²¹

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

Como otros Inhibidores de la Bomba de Protones (IBP), el esomeprazol es una base débil muy liposoluble, que tras absorberse en el intestino delgado atraviesa con facilidad las membranas celulares y alcanza la célula parietal gástrica (pH = 7,4). En la figura 29 se muestra que desde aquí, difunde a los espacios canaliculares, donde el pH ácido (2,0-3,0) protona al esomeprazol y lo convierte en un derivado sulfenamido muy hidrofílico, que ya no es capaz de atravesar la membrana de la célula parietal y que, por tanto, se acumula en la luz del canaliculo parietal. A este nivel, forma puentes disulfuro con los residuos de cisteína localizados en las posiciones 321, 813 y 892 de la cadena a de la ATPasa- H^+/Na^+ , formándose así un complejo que inhibe de forma irreversible, no competitiva y dosis-dependiente la actividad del enzima.

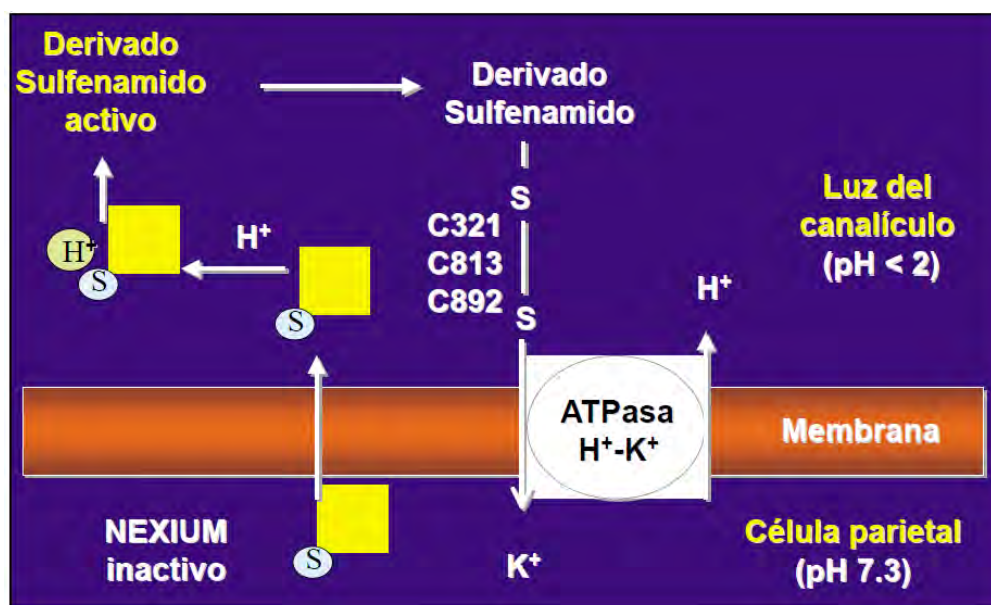


Figura 29. Mecanismo de acción de los IBP.²¹

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

Una vez inhibida la ATPasa- H^+/Na^+ de la célula parietal, la recuperación de la actividad enzimática implica la síntesis de nuevas moléculas de la enzima por la célula parietal. Este proceso requiere más de 18 h, lo que explicaría por qué el esomeprazol al igual que otros IBP, mantienen el pH gástrico por encima de 4 más tiempo a lo largo del día que otros fármacos utilizados en el control de la secreción gástrica ácida (p.ej. antihistamínicos H_2 , anticolinérgicos). De hecho, los efectos del esomeprazol pueden llegar a durar hasta 4 días tras la administración de una dosis única. En pacientes infectados por *Helicobacter pylori*, el esomeprazol reduce la motilidad de la bacteria, su adhesión a las células epiteliales y la destrucción de ésta y a su vez el paso de la forma cocoide a la espiral. También inhibe la ureasa y la ATPasa- H^+/Na^+ que crean el medio ácido ($pH < 3$) que facilita la supervivencia de la bacteria en estómago y duodeno.

2. Características farmacocinéticas

El esomeprazol es un profármaco que a pH ácido se activa dando lugar a un derivado sulfonamido hidrófilo que no se absorbe; por este motivo se administra por vía oral con recubrimiento entérico. El esomeprazol se absorbe intensa y rápidamente en el intestino delgado y pasa al torrente sanguíneo, siendo su biodisponibilidad por esta vía (65%) superior a la de omeprazol (53%); además, su biodisponibilidad aumenta tras administración repetida, siendo del 85% al cabo de 5 días de tratamiento. Su acción aparece al cabo de 1 h y alcanza concentraciones plasmáticas máximas al cabo de 1-2 h. Se une a proteínas plasmáticas en un 97%, presenta un pobre volumen de distribución (0,22 L/Kg) y una semivida de 0,8 h. El esomeprazol se biotransforma en el hígado a través de las isoformas del citocromo P450 CYP2C19 (dando lugar a derivados hidroxilados y desmetilados) y, en menor grado, del CYP3A4 (que produce una sulfona de esomeprazol), eliminándose casi el 80% de la dosis administrada en forma de

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

metabolitos inactivos por orina (sólo un 1% sin biotransformar) y el 20% restante por bilis. El 95% del fármaco administrado se recupera del organismo a las 48 h de su administración, lo que indica que no existe el peligro de que el esomeprazol se acumule tras administración repetida una vez al día. No se ha demostrado que esomeprazol se interconvierte en R-omeprazol en el organismo.²¹

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El esomeprazol es ampliamente utilizado en México para el tratamiento de la gastritis este fármaco es relativamente nuevo, es el S- isomero del omeprazol y reduce la secreción del ácido gástrico a través de un mecanismo de acción específico y selectivo. Su importancia radica en que el esomeprazol es más potente que el omeprazol para inhibir la secreción gástrica estimulada por gastrina durante 24 h y mantener el pH gástrico por encima de 4. Ello condujo al desarrollo de esomeprazol con el objetivo de aumentar la tasa de éxitos del tratamiento supresor de la producción de ácido con respecto a la conseguida con otros IBP ya comercializados. Por tanto, esomeprazol (S-omeprazol) es el primer IBP desarrollado como enantiómero.

Dado que es un medicamento de reciente introducción aun no se reporta ningún método analítico farmacopeico para su análisis y cuantificación, solo existen métodos analíticos no farmacopeicos basados en espectrofotometría con detección UV, cromatografía de gases con espectrometría de masas; cromatografía de líquidos en fase reversa para determinar el esomeprazol en conjunto con otros compuestos IBP.

Por esta razón se va a proponer un método analítico por CLAR para determinar el esomeprazol en preparados farmacéuticos.

La importancia de esto radica en que el método propuesto sea una base para ser optimizado, ensayado y posteriormente validado para que pueda proponerse como un método adecuado para la identificación y cuantificación de esomeprazol.

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

OBJETIVOS

- Proponer una metodología de preparación de muestra dependiendo del tipo de forma farmacéutica.
- Proponer el tipo de columna analítica, fase móvil y detección para la identificación y cuantificación del esomeprazol por CLAR

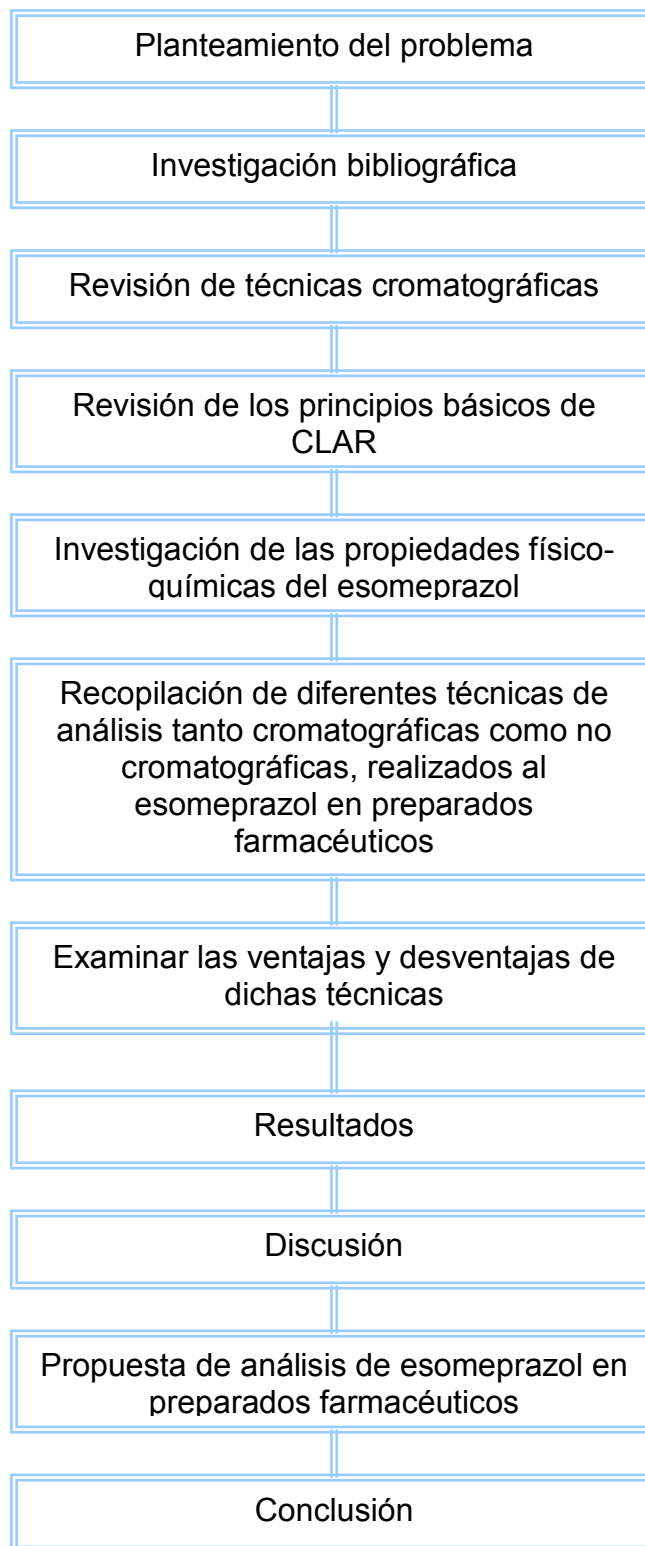
PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

HIPÓTESIS

A través de un estudio teórico fisicoquímico del esomeprazol es posible proponer un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), para la detección del principio activo en diferentes formas farmacéuticas.

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

V. METODOLOGÍA



PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

VI. RESULTADOS

Para determinar la longitud de onda utilizada para la propuesta de análisis de esomeprazol en preparados farmacéuticos por CLAR se revisaron los siguientes artículos: **Determinación espectrofotométrica de esomeprazol de magnesio en tabletas usando ácido 5-sulfasalícílico y N-bromosuccinamida²² y por otra parte el Desarrollo y validación estadística de un método espectrofotométrico para la estimación del esomeprazol en tabletas²³**

En el primero se describe un método espectrofotométrico sencillo y sensible para la determinación de esomeprazol de magnesio en formas farmacéuticas. En este artículo cabe resaltar los espectros obtenidos del esomeprazol en metanol y en cloroformo como se muestran más adelante (Figura 30 y 31)

El equipo utilizado para la determinación es un espectrofotómetro Shimadzu UV-visible con celdas de cuarzo.

Para la preparación de la muestra se pesaron 20 mg de polvo de esomeprazol y se transfirió a un matraz volumétrico de 100 mL, se disolvió y aforó con metanol. Por otra parte se pesaron 50 mg de polvo de esomeprazol y se transfirió a un matraz volumétrico de 100 mL, se disolvió y aforó con cloroformo. Posteriormente se realizó un barrido de las muestras para observar la longitud de onda en la cual absorbe más el esomeprazol.

A continuación se muestran los espectros de absorción obtenidos con los dos disolventes utilizados:

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

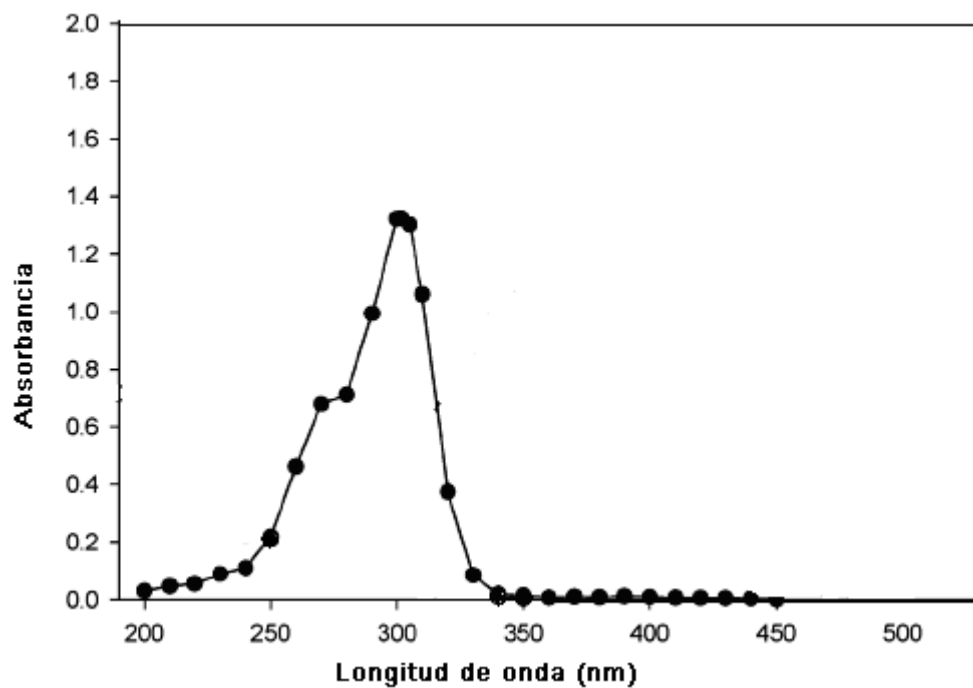


Figura 30. Espectro de absorción del esomeprazol en metanol.²²

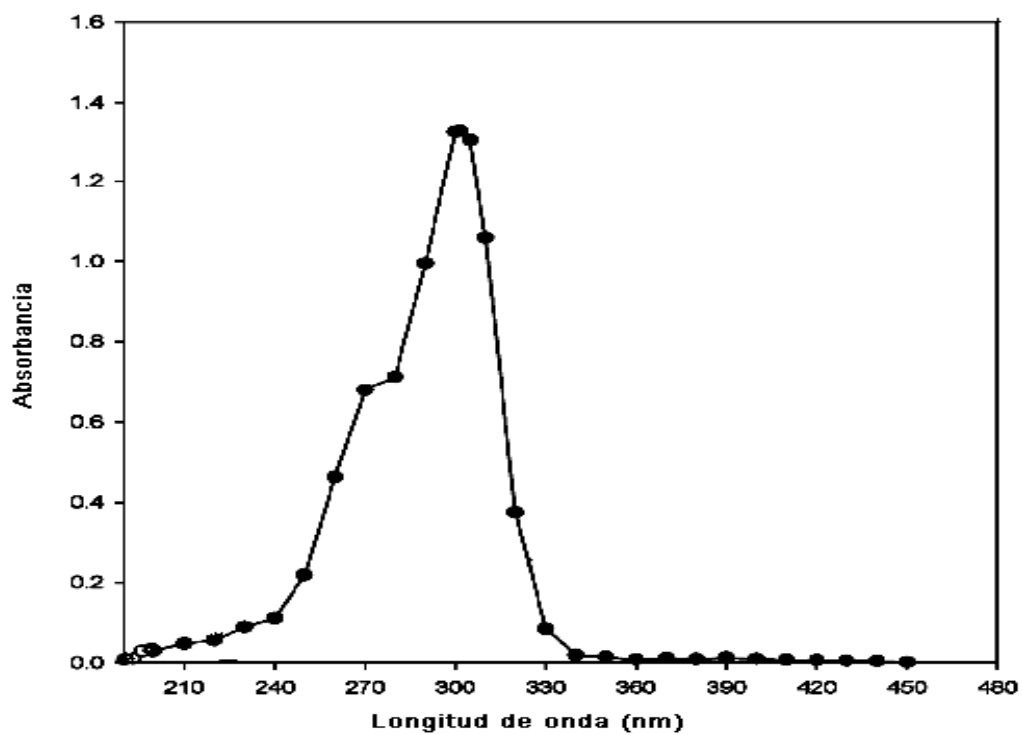


Figura 31. Espectro de absorción del esomeprazol en cloroformo.²²

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

Como se puede observar la máxima absorción del esomeprazol se da en la longitud de onda de 301.5 nm aproximadamente tanto como en metanol como en cloroformo.

En el segundo artículo se menciona que el esomeprazol tiene la máxima absorbancia a 303 nm y es un método sencillo, preciso y económico. El equipo utilizado fue el espectrofotómetro Shimadzu UV-1700 UV/VIS con una celda de cuarzo de 1 cm.

Para la preparación de la solución estándar se pesaron 5 mg de esomeprazol y fueron transferidos a un matraz volumétrico de 100 mL, se disolvió y aforó con metanol para obtener una concentración de 50 µL/mL. Se tomó una alícuota de la solución anterior y se diluyó en agua destilada para obtener la misma concentración.

Para el método espectrofotométrico de orden cero las soluciones se sometieron a un barrido en un rango de 200 a 400 nm y los picos fueron observados a 218 nm y 303 nm (figura 32). La longitud de onda seleccionada para el análisis de este fármaco fue de 303 nm. El fármaco absorbe cumpliendo la ley de Lambert-Beer en el rango de 5-35 µg/mL.

Al utilizar el área bajo la curva, se empleó el valor integrado de absorbancia con respecto un rango de longitud de onda seleccionado (294 nm – 310 nm) Figura 33. Este rango de longitud de onda se utilizó con el fin de obtener la linealidad entre el área bajo la curva y la concentración.

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

Para la preparación de la muestra se pesaron 10 tabletas, se trituraron hasta polvo fino y pesaron una cantidad de polvo equivalente a 5 mg de esomeprazol (ES). Se transfirió a un matraz volumétrico de 100 mL y se disolvió con metanol, a continuación se sonó por 30 minutos y se aforó con el mismo disolvente. Posteriormente se filtró la disolución a través de papel filtro Whatman No 41 para retirar la materia no disuelta. Esta dilución se realizó para obtener la concentración de 50 µg/mL y se realizaron por sextuplicado.

Los espectros de absorción obtenidos de los dos métodos se muestran a continuación:

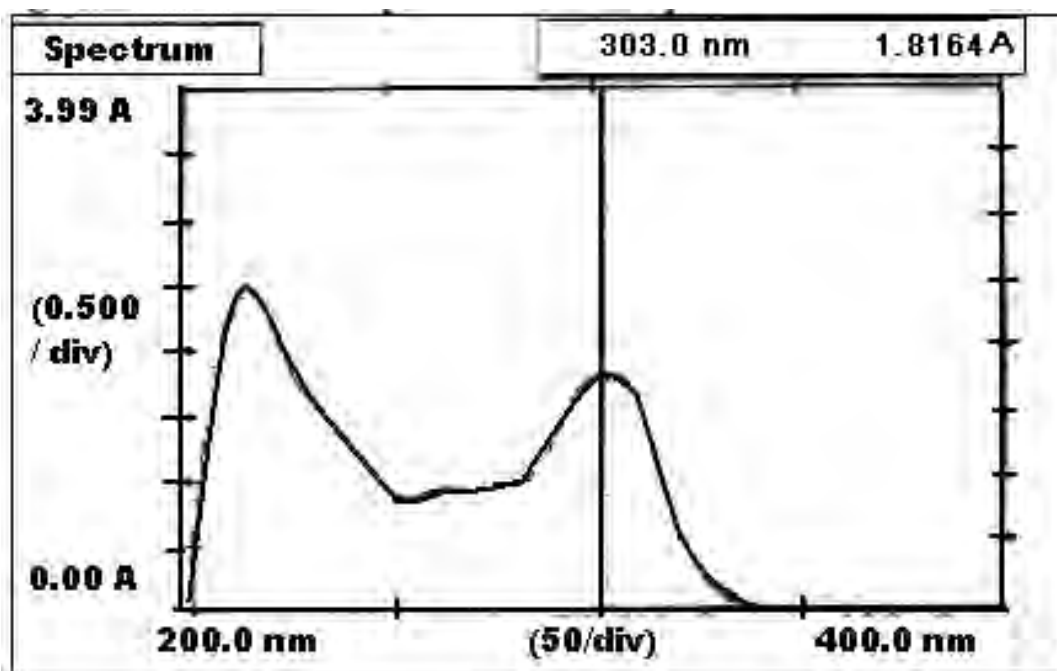


Figura 32. Espectro de esomeprazol con el método de orden cero.²³

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

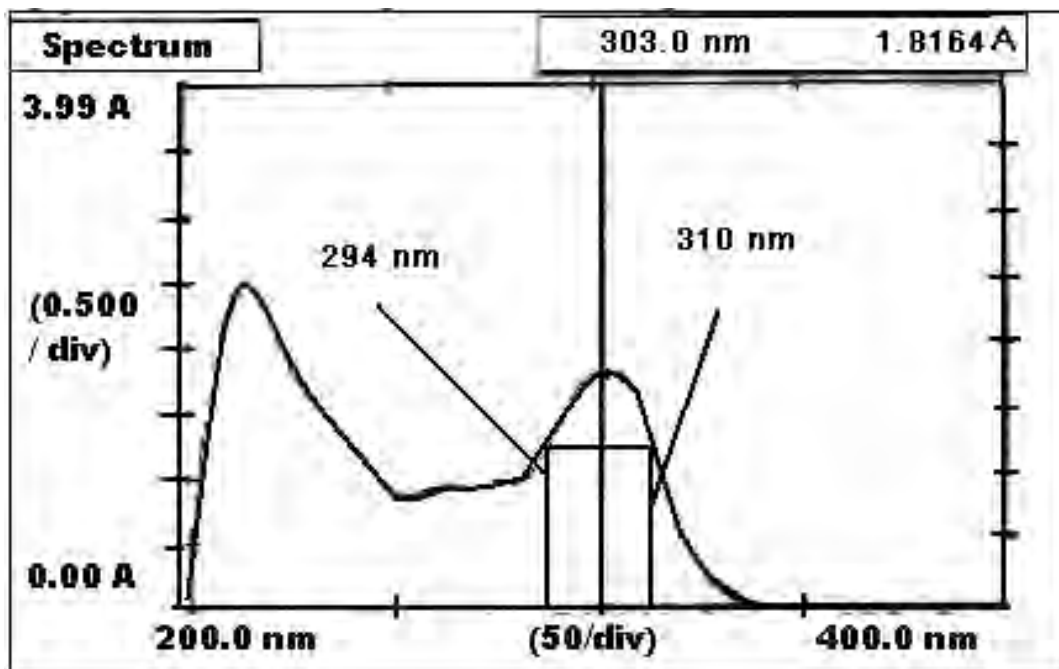


Figura 33. Espectro de absorción de esomeprazol con el método de área bajo la curva.²³

Los resultados que se obtuvieron en el artículo para la estimación del esomeprazol en tabletas resultaron ser simples, exactos y reproducibles. El fármaco absorbe en función de la ley de Lambert-Beer en el rango de 5-35mg en los dos métodos. La precisión del método fue evaluada mediante estudios de recuperación en tres niveles diferentes, es decir 50%, 100% y 150%. Los valores de la desviación estándar es satisfactoria y los estudios de recobro fueron cerca de 100%. La desviación estándar relativa es menor de 2 indicando la precisión del método. Por lo tanto estos dos métodos pueden ser utilizados para el análisis de esomeprazol tanto en granel como en forma farmacéutica.

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

Para determinar las condiciones cromatográficas se emplearon varios artículos, el primero está titulado: **Determinación de pantoprazol, rabeprazol, esomeprazol, domperidona e itoprida en productos farmacéuticos por cromatografía de líquidos en fase reversa usando una fase móvil simple.**²⁴

El método por CLAR en fase reversa es sencillo, simple y preciso para determinar medicamentos IBP con las siguientes condiciones, tomando en cuenta sólo al esomeprazol:

El equipo utilizado en este estudio fue el cromatógrafo LC-10AT VP (Shimadzu corporation, Switzerland), con un detector UV (λ 210 nm). Los compuestos fueron separados con una columna Hypersil BDS C₁₈ (250 mm x 4.6 mm, tamaño de partícula 5 μ m), usando una fase móvil (72:28) (Solución amortiguadora pH 6.2 (0.05 M): Acetonitrilo), con una velocidad de flujo: 1 mL/min y un volumen de inyección de 20 μ L.

Para la preparación de la solución amortiguadora se pesaron 6.8 mg de fosfato de potasio de dihidrógeno (NaH₂PO₄), previamente secado por 2 horas a 120 \pm 5 °C y se disolvió con agua tratada y se ajustó a un pH de 6.2 \pm 0.02 con ácido acético/amoniaco.

Para la preparación de la solución stock se pesaron 40 mg de esomeprazol y fueron transferidos a un matraz volumétrico de 100 mL, disolvió y ajustó con metanol. Se tomó una alícuota de 1 mL de la solución anterior y se diluyó en 100 mL de fase móvil.

Para la solución estándar se obtuvo una concentración de 4,000 ng/mL y las soluciones fueron usadas inmediatamente después de la preparación.

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE Eesomeprazol EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

La solución del estándar interno se preparó pesando 4 mg de pantoprazol, se transfirió a un matraz volumétrico de 100 mL y se diluyó y aforó con metanol. A continuación se tomó una alícuota de 1 mL y se transfirió a un matraz volumétrico de 100 mL de fase móvil para obtener una concentración de 400 ng/mL. Las soluciones fueron usadas inmediatamente después de su preparación.

Para la preparación de la muestra se pesaron 20 tabletas, se trituraron hasta polvo fino y pesaron una cantidad de polvo equivalente a 40 mg de esomeprazol (ES). A continuación se transfirió a un matraz volumétrico de 100 mL y disolvió con metanol y sonicó por aproximadamente 5 min, se enfrió a temperatura ambiente y se aforó con el mismo disolvente. Posteriormente se filtró la disolución a través de una membrana de nylon 0.20 μm para retirar la materia no disuelta. Se tomó una alícuota de 1 mL del filtrado y se transfirió a un matraz volumétrico de 100 mL y se aforó con fase móvil. Se inyectaron 20 μL de muestra.

Los cromatogramas que se obtuvieron en el análisis fueron los siguientes:

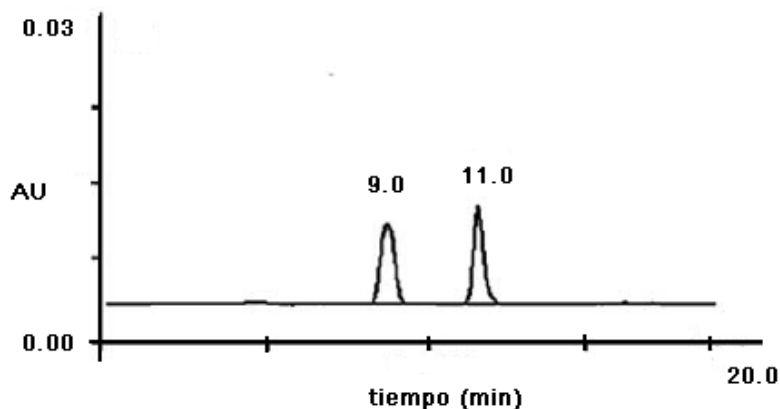


Figura 34. Cromatograma del esomeprazol (11.0 min), utilizando pantoprazol como estándar interno (9.0 min).²⁴

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

Tabla 6. Resultados de los parámetros de adecuabilidad del sistema

Parámetros	Esomeprazol
Tiempo de retención \pm DER	11.0 \pm 0.01
Numero de platos teóricos \pm DER	7540 \pm 0.06
Asimetría \pm DER	1.09 \pm 0.01

Se menciona en este artículo que para optimizar los parámetros de CLAR, se realizaron varias proporciones de la fase móvil, obteniendo una separación satisfactoria y un pico asimétrico para los IBP con la fase móvil compuesta por una solución amortiguadora pH 6.2: Acetonitrilo (72:28 v/v). La cuantificación se logra con detección UV 210 nm. Como se puede observar se utiliza una fase móvil común para la separación de 5 diferentes fármacos en su forma farmacéutica.

En el artículo sólo reportan parámetros de adecuabilidad del sistema como son N y As indicándonos que el equipo funciona adecuadamente y que la determinación se realizó en las condiciones descritas. Ya que el valor de N es mayor a 2000 y As es menor a 2.

Por otro lado en el artículo titulado **Desarrollo y validación de un método por CLAR para la determinación de esomeprazol en tabletas**²⁵ en donde la proporción de los disolventes cambia así como también el pH de la solución amortiguadora utilizada.

El método desarrollado y validado es simple, sencillo y preciso para el análisis de esomeprazol en tabletas. El método referido utilizó un cromatógrafo Thermo Separation Products Liquid Chromatograph (TX, USA), con un programa SN – 4000, un detector UV-3000 (λ 205 nm), una Columna Phenomenex C₁₈ (250 mm x 4.6 mm, tamaño de partícula 5 μ m) y precolumna: Phenomenex (4x3 mm).

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

Para la determinación cromatográfica se utilizó una fase móvil (60:40) (Acetonitrilo: Solución amortiguadora pH 7). Con una velocidad de flujo de 1 mL/min y un volumen de inyección de 20 μ L.

Para la preparación de la solución stock se pesaron 50 mg de esomeprazol y fueron transferidos a un matraz volumétrico de 50 mL, se disolvió y aforó con metanol. Posteriormente se tomó una alícuota de 1 mL de la solución anterior y se diluyó en 10 mL de fase móvil. Se tomó una alícuota de la solución anterior y lo diluyeron en 10 mL de fase móvil. Para que finalmente se obtuviera una concentración de 10 μ g/mL.

Para la solución de estándar interno (Lanzoprazol) se realizó lo mismo para obtener la misma concentración.

Para la preparación de la muestra se pesaron 20 tabletas, se trituraron hasta polvo fino y pesaron una cantidad de polvo equivalente a 100 mg de esomeprazol (ES). Posteriormente se transfirió a un matraz volumétrico de 100 mL y disolvió con 75 mL de metanol y se agitó por 20 min y enseguida se sonicó por 20 min más y después se aforó con el mismo disolvente. Después se centrifugó por 10 min a 3000 rpm, y se tomó una alícuota de 0.1 mL del sobrenadante y fue diluido en 10 mL de la fase móvil. Se tomó 1 mL de la solución anterior y 0.8 mL de la solución estándar y se transfirieron a un matraz volumétrico de 10 mL y se aforó con fase móvil, por último se inyectó 20 μ L de muestra.

En la figura 35, se muestra el cromatograma del esomeprazol y el estándar interno (Lanzoprazol) con tiempos de retención de 3.64 ± 0.07 y 4.31 ± 0.09 min., respectivamente:

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

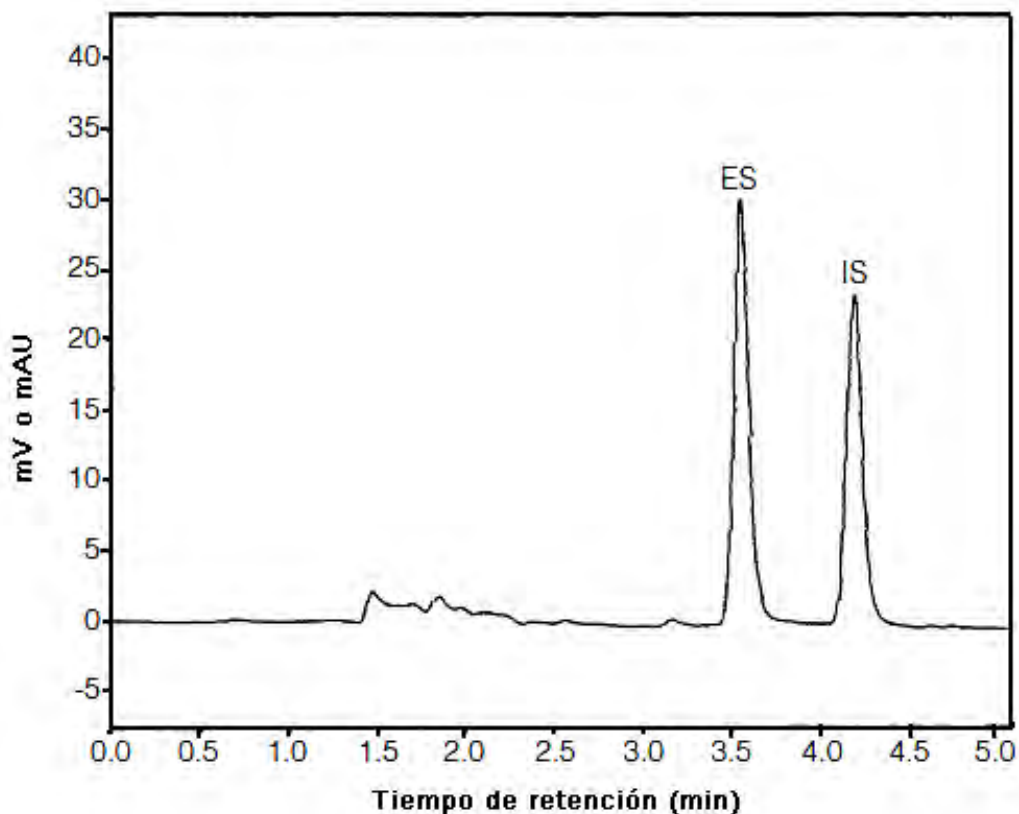


Figura 35. Cromatograma del esomeprazol y el estándar interno (Lanzoprazol).²⁵

En este artículo no se menciona la adecuabilidad del sistema, pero se concluye con los parámetros de validación que el método propuesto es selectivo, preciso, exacto, robusto y por lo tanto adecuado para el análisis del ES en tabletas.

En este artículo se puede observar que la proporción de los solventes para el análisis fue mayor el acetonitrilo que la solución amortiguadora, este cambio se puede notar en el tiempo de retención ya que es menor en este método acortando así nuestro tiempo de análisis y recordemos que a este pH de 7 el esomeprazol está totalmente ionizado siendo más afín a la fase móvil.

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

En el siguiente artículo titulado **Preparación de sólidos de dispersión de zinc de esomeprazol y su estudio farmacocinético**²⁶ se toma en cuenta sólo las condiciones cromatográficas y la fase móvil utilizada.

El estudio farmacocinético se llevó a cabo con el método por CLAR para determinar la cantidad de esomeprazol en la sangre. El análisis fue desarrollando utilizando un cromatógrafo: Agilent 1100 (Agilent, America), con detector UV (λ 306 nm) y una columna Phenomenex Luna C₁₈ (250 mm x 4.6 mm, tamaño de partícula 5 μ m)

Para la determinación cromatográfica se utilizó una fase móvil (51:49) (Metanol: Acetato de amonio 0.02 M), con una velocidad de flujo: 1 mL/min y un volumen de inyección de 50 μ L

Para la preparación de la muestra de plasma se colocaron 500 μ L de plasma en un tubo de ensayo conteniendo 100 μ L de etanol y se adicionó como estándar interno carbamacepina (47 μ L/mL). Posteriormente se adicionaron y mezclaron 200 μ L de Na₂HPO₄ y 3 mL de CH₂Cl₂. Tomaron una alícuota de 2 mL de la fase orgánica y se transfirió a un tubo de ensayo y lo evaporaron hasta sequedad en un flujo de nitrógeno a 35°C. El residuo fue disuelto en 200 μ L de fase móvil y se inyectó la muestra.

En este artículo no muestran cromatogramas ya que sólo se utilizó CLAR para el estudio farmacocinético. Por lo tanto no se mencionan los resultados cromatográficos. Pero se puede observar que utilizaron metanol en vez de acetonitrilo y una solución de acetatos, por lo que el pH utilizado fue ácido, es por eso que en este caso utilizan una proporción mayor de metanol que la solución acuosa, esto se debe a que el esomeprazol en este pH está más en su forma

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

molecular y necesitan más fuerza de elución para que este pueda eluir en un tiempo de análisis razonable.

En otro estudio se obtuvieron resultados basados en un artículo intitulado **Determinación de esomeprazol y sus dos principales metabolitos en plasma humano, de rata y perro por cromatografía líquida con detección de espectrometría de masas.**²⁷

Este método fue desarrollado para la determinación cuantitativa de esomeprazol y sus dos principales metabolitos. Se propone este método ya que reduce el tiempo de análisis. El método se llevó a cabo con un cromatógrafo: Perkin-Elmer 200, un detector de Espectrometría de Masas (EM), una Columna Hypersil BDS C₈ (50 mm x 4.6 mm, Tamaño de partícula 3 μm) y una precolumna Optiguard CN (15 x 1 mm)

El análisis cromatográfico se llevó a cabo con una fase móvil (25:0.1:10:65) (Acetonitrilo: ácido fórmico: acetato de amonio 0.1M: Solución amortiguadora pH 3.8) y una velocidad de flujo: 0.75 mL/min y un volumen de inyección de 15 μL. En este caso se usó un detector de espectrometría de masa el cual fue MDS Sciex triple cuadrupolo.

Para la preparación de la muestra se tomó una alícuota de 25 μL de plasma combinados con 75 μL de plasma humano con fármaco libre, fueron transferidos a un tubo de ensayo y mezclado con 50 μL de metanol al 20 % en solución amortiguadora de carbonatos pH 9.3 (0.01M), 50 μL de estándar interno, 25 μL de fosfato diácido de sodio. Esta mezcla tuvo un pH final de 6 – 6.7 y se extrajo con 2 mL de metil tert-butil y eter- diclorometano (3:2, v/v) en una placa-mezcla por 15 min. Posteriormente se centrifugo a 2200 rpm por 5 min.

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

Se procedió a congelar la fase acuosa, mediante la colocación del tubo en un baño que contiene una mezcla de etanol y hielo seco, la fase orgánica se transfirió a un nuevo tubo de centrifuga y se evaporó a sequedad bajo flujo de nitrógeno a 25°C. Los residuos se disolvieron en 500 μL de metanol al 20% en una solución amortiguadora de carbonatos pH 9.3 (0.1 M) por sonicación durante 1 min y después por vortex también por 1 min y finalmente se inyectó 15 μL de muestra.

Se logró concluir que el método de análisis se desarrolló con éxito, obteniendo un tiempo de análisis corto, a continuación se muestran los cromatogramas de la determinación de esomeprazol en plasma humano:

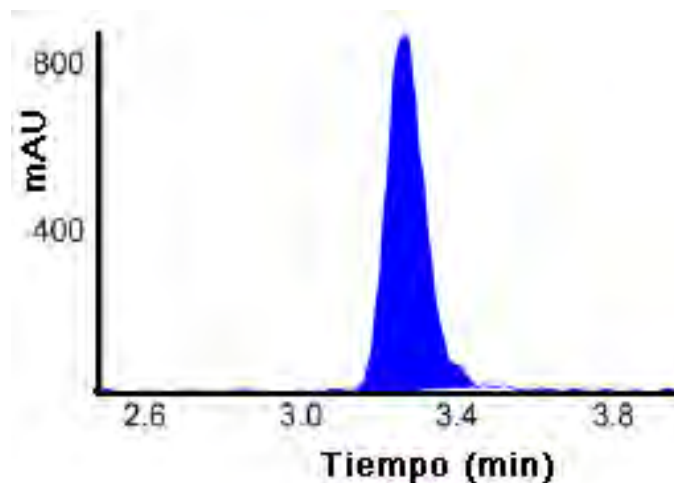


Figura 36. Cromatograma de esomeprazol en plasma humano.²⁷

Como se puede observar la asimetría del pico no es buena ya que presenta cola, el ancho de pico es muy amplio, aunado a esto el artículo no presenta ningún dato de adecuabilidad del sistema, sólo consideran la cuantificación de esomeprazol en el plasma. El método reportado presenta linealidad, exactitud y precisión.

Y por último otro artículo refiere una diferente proporción de disolventes, pH más elevado y un flujo mayor para determinar el analito de interés, referido por Luo H. et al.²⁸

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

El objetivo de este artículo fue determinar los regímenes de dosificación del esomeprazol en el tratamiento de la enfermedad por reflujo gastroesofágico con una mínima influencia del polimorfismo de la CYP2C19 a través de un estudio farmacocinético y farmacodinámico, llevándose a cabo la cuantificación del fármaco por CLAR utilizando una columna Hypersil Phenyl (250 mm x 4.6 mm, tamaño de partícula 5 μ m), un detector UV (λ 302 nm)

Las condiciones cromatográficas fueron una proporción de fase móvil de (20:80) (Acetonitrilo: Solución amortiguadora de fosfato de amonio dihidrógeno). Esta solución amortiguadora con un pH final de 7.5 (0.05 M) ajustada a ese pH con una solución de hidróxido de amonio, una velocidad de flujo: 1.2 mL/min, un volumen de inyección de 100 μ L y una longitud de onda de 302 nm

Para la preparación de la muestra de sangre se extrajeron 8 mL de sangre venosa en un tubo con heparina en determinados tiempos del estudio. Estas muestras de plasma fueron centrifugadas a 3500 rpm durante 10 min. El plasma fue transferido a nuevos tubos y etiquetados y almacenados a -30°C para garantizar una estabilidad óptima hasta el momento del análisis por CLAR. Para la determinación por CLAR, se toma una alícuota de 1 mL del plasma y esta es enriquecida con 100 μ L de una solución interna (fenacetina 40 mg/mL) y 100 μ L de hidróxido de sodio 1 N. La mezcla se extrajo con 6 mL de acetato de etilo/ diclorometano (5 / 1, v/ v) y se centrifugó a 3500 rpm durante 10 min.

El sobrenadante fue transferido a otro tubo y se evapora a sequedad mediante un flujo de nitrógeno a 50°C . El residuo se reconstituyó con 250 μ L de la fase móvil. Finalmente se inyectaron 100 μ L del sobrenadante.

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

En este artículo se utiliza CLAR para determinar la concentración del esomeprazol en la sangre a diferentes tiempos con regimenes de dosis diferentes, por lo que no se presenta los cromatogramas así como los resultados cromatográficos de este.

Este artículo como se dijo anteriormente maneja un pH de 7.5, indicando que el esomeprazol esta completamente ionizado, por lo que tiene más afinidad a la fase móvil que en este caso tiene una fuerza de elución intermedia para que el esomeprazol no salga en el tiempo muerto.

A continuación se muestra una tabla comparativa de las condiciones cromatográficas empleadas en los artículos revisados. De esta forma, se plantea el método analítico propuesto:

Tabla 7. Condiciones cromatográficas empleadas en los métodos analíticos de los artículos referidos

Condición cromatográfica	Fase móvil	Proporción de la fase móvil	Volumen de inyección	Longitud de la columna	Tamaño de partícula	Longitud de onda	Velocidad de flujo	Tiempo de retención*
Referencia								
22	-----	-----	-----	-----		301.5	-----	-----
23	-----	-----	-----	-----		303	-----	-----
24	Sol. amortiguadora pH 4.7: Acetonitrilo	72:28	20µL	250mm x 4.6mm	5 µm	210 nm	1 mL/min	11 min
25	Sol. amortiguadora pH 7: Acetonitrilo	40:60	20µL	250mm x 4.6mm	5 µm	205 nm	1 mL/min	3.5 min
26	Acetato de amonio: Metanol	49:51	50µL	250mm x 4.6mm	5 µm	306 nm	1 mL/min	-----
27	Sol. amortiguadora pH 3.8: Acetonitrilo: Ácido fórmico: Acetato de amonio	65:25:10:0.1	15µL	50mm x 4.6mm	3 µm	-----	0.75 mL/min	3.3 min
28	Sol. amortiguadora pH 7.5: Acetonitrilo	80:20	100µL	250mm x 4.6mm	5 µm	302 nm	1.2 mL/min	-----

Condición a ensayar

* El tiempo de retención dependerá del tipo de equipo cromatográfico y conexiones posteriores del final de la columna al detector

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

VII. DISCUSIÓN

En la tabla 7 se pueden observar las condiciones empleadas en cada método y nos da una visión de que condiciones se van a emplear en la propuesta de análisis de esomeprazol en preparados farmacéuticos.

Ahora bien para la mejor comprensión de estos datos es importante mencionar el comportamiento de ionización de la molécula de esomeprazol (Figura 37). Es importante mencionar que tiene dos valores de pK_a uno de 4 y el otro de 8.8 obteniendo la siguiente gráfica que nos indica en cada pH su grado de ionización.

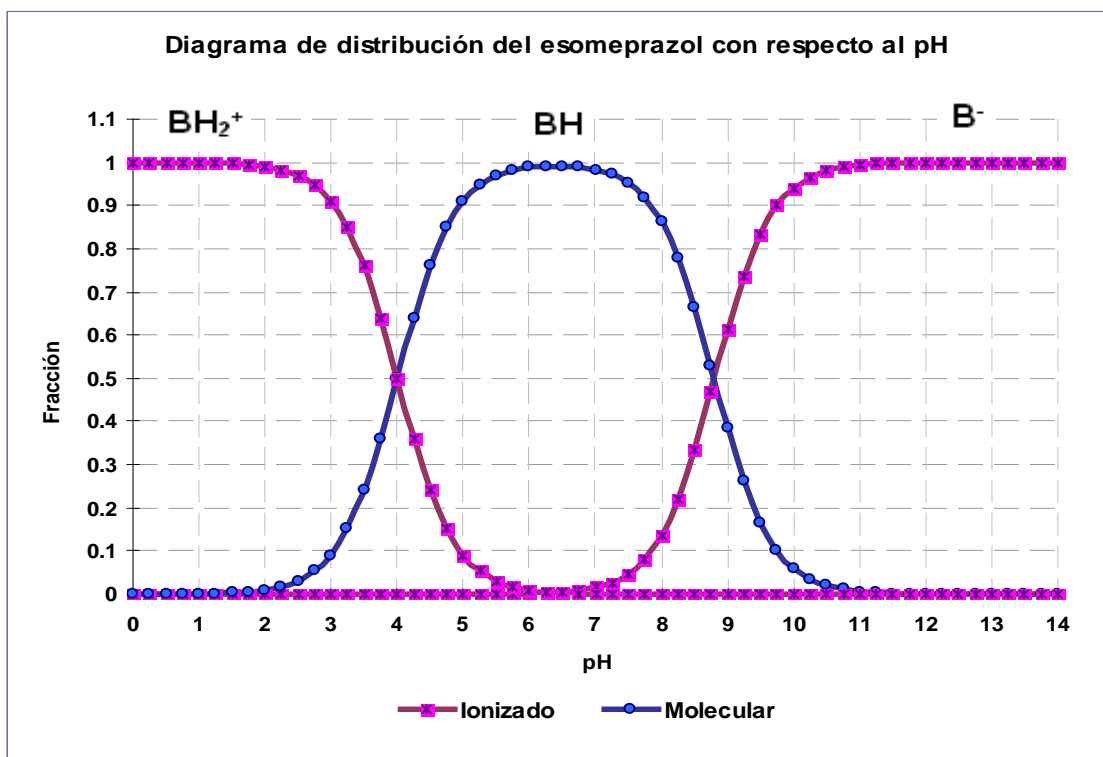


Figura 37. Ionización del esomeprazol en función del pH

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

De esta forma las condiciones cromatográficas varían considerablemente en cada método mencionado, analicemos el método del artículo referido por Patel B et al.²⁴: Se tiene un pH de 4.7 por lo que el esomeprazol está aproximadamente un 15 % ionizado (Figura 37) , y utilizan una proporción de disolvente en donde el acetonitrilo se encuentra en menor proporción, dando una fuerza a la fase móvil baja pero suficiente para poder eluir el esomeprazol en un tiempo de análisis razonable.

En el método del artículo referido por Onal A, se utiliza un pH de 7 por lo que el esomeprazol se encuentra casi el 100% molecular, por tanto tiene más afinidad a la fase estacionaria; y por ende se utiliza más proporción de acetonitrilo que de fase acuosa, con la finalidad de tener una fuerza polar mayor para que el ES pueda ser analizado, se puede observar en la figura 35 que con esta proporción de disolventes el tiempo de análisis es corto (3.5 min).

En el artículo que tiene como autor Xie Y, et al.²⁶ utilizan como fase móvil, un amortiguador de acetatos y aunque no mencionen el pH es posible que esté al menos en un valor de 4.7, por lo que el esomeprazol está parcialmente ionizado, realizan el cambio de acetonitrilo por metanol, y como se observa se necesita mayor proporción de este disolvente para poder eluir la muestra, desafortunadamente no se muestran cromatogramas para observar el tiempo de retención y por supuesto parámetros que nos indiquen la eficiencia del método. En este también se utiliza una absorbancia de 306 nm por lo cual el esomeprazol absorbe bien a esa longitud de onda.

En el artículo referido por Hultman I, et al.²⁷, la solución amortiguadora utilizado fue de 3.8, lo que nos indica que hay aproximadamente un 60 % ionizado teniendo mayor afinidad por la fase móvil, por tanto la proporción de acetonitrilo está en menor cantidad ya que se necesita en poca proporción para eluir el ES, también

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

se puede observar que se utiliza una columna mucho mas corta obteniendo así un tiempo de retención corto de aproximadamente 3.3, por lo que el tiempo de análisis es corto para este método. El detector utilizado para este método es uno de espectrometría de masas con un analizador de cuadrupolo, por lo que en este artículo no se menciona una longitud de onda en la cual absorbe el ES.

Por último el artículo que tiene como autor Luo H, et al.²⁸ utiliza un pH de 7.5 indicando que el esomeprazol se encuentra cercano al 100 % en estado molecular teniendo mayor afinidad a la fase estacionaria y utilizando una proporción del 20% de acetonitrilo, teniendo una fuerza de elución pequeña pero que probablemente es la necesaria para poder eluir el esomeprazol en un tiempo de análisis razonable.

Un punto importante que hay que resaltar es la longitud de columna utilizada y la velocidad de flujo, en todos los métodos la longitud de la columna es de 250 mm x 4.6 mm, el tiempo muerto que le corresponde a este tamaño de columna es de 2.7 min, tomando en cuenta que la velocidad de flujo sea de 1 mL/ min. Por tanto se puede observar que para el método mencionado en el artículo con referencia 25, el esomeprazol eluye poco después del tiempo muerto, pero observando el cromatograma se puede notar que no hay problema ya que no se ve alguna señal de un soluto no retenido, pero aún así esta muy cerca del tiempo muerto.

Por otra parte en el método desarrollado en el artículo referido por Hultman Ia, et al.²⁷, menciona una velocidad de flujo 0.75 mL/ min modificando así el tiempo muerto a 0.72 min, ya que se está utilizando una columna de 50mm; observando en el cromatograma que el esomeprazol es eluido en un tiempo de análisis corto y sin tener el riesgo de que salga en tiempo muerto.

Ahora como se puede observar sólo un artículo reporta los parámetros de adecuabilidad del sistema, por ende no es posible saber si el método cumple con

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

estos parámetros y como ya sabemos estos nos van a indicar en el momento de reproducir el método, que el sistema, ya sea analista, reactivos e instrumentos son adecuados para llevar a cabo la determinación para la que se ha establecido y validado el método. La adecuabilidad del sistema no sólo nos va a demostrar que el sistema se encuentra en perfectas condiciones para realizar el análisis sino que también va a permitir establecer el criterio de modificación de las condiciones analíticas descritas en el procedimiento, recordando que estas modificaciones se encontraran siempre dentro de los límites establecidos durante el estudio de robustez.

Estas pruebas de adecuabilidad del sistema deben encontrarse vinculadas de forma directa a las características del método analítico para el que se estableció, ya que debe reflejar su viabilidad en el momento de emplearlo.²⁹

Los parámetros que se deben de evaluar para el estudio de adecuabilidad y los criterios de aceptación de cada uno son los siguientes:³⁰

- $CV \leq 2\%$
- $k' \geq 2\%$
- $N > 2000$
- $As \leq 2$
- $R \geq 2$

Por lo tanto estas pruebas de adecuabilidad del sistema debieron ser parte integral del procedimiento de análisis en cada uno de los métodos mencionados, pero sólo se mencionan en un sólo método y sólo 2 parámetros. Recordando que estos resultados nos permiten demostrar que los equipos funcionan correctamente y que las determinaciones se realizaron en las condiciones descritas durante la validación.²⁹

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

De esta forma los métodos propuestos deberán cumplir las siguientes condiciones:

A. pH de 3.0

En este pH el esomeprazol se encuentra mayormente ionizado, teniendo así mayor afinidad por la fase móvil, todo esto se muestra a continuación:

$$\text{Esomeprazol } pK_{a1} = 4 \quad \text{pH} = 3.0$$

Para esto tenemos la ecuación de **Henderson-Hasselbalch**:

$$\text{pH} = \text{pka} + \log \frac{[\text{B}^-]}{[\text{BH}_2^+]}$$

Por lo tanto tenemos:

$$3.0 = 4.0 + \log \frac{[\text{BH}]}{[\text{BH}_2^+]}$$

$$3.0 - 4.0 = \log \frac{[\text{BH}]}{[\text{BH}_2^+]}$$

Utilizando base 10 para eliminar el logaritmo

$$10^{-1} = 10^{\log \frac{[\text{BH}]}{[\text{BH}_2^+]}}$$

$$10^{-1} [\text{BH}_2^+] = [\text{BH}]$$

Sustituyendo en la siguiente ecuación:

$$[\text{BH}_2^+] + [\text{BH}] = 100$$

Tenemos:

$$[\text{BH}_2^+] + 10^{-1} [\text{BH}_2^+] = 100$$

$$1.1 [\text{BH}_2^+] = 100$$

$$[\text{BH}_2^+] = 100/1.1$$

$$[\text{BH}_2^+] = 90.90 \% \longrightarrow \text{Forma ionizada}$$

$$[\text{BH}] = 9.09 \% \longrightarrow \text{Forma molecular}$$

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

Pero por otro lado el esomeprazol presenta otro pka obteniendo lo siguiente:

B. pH de trabajo 6.8

En este pH el esomeprazol se encuentra mayormente molecular, teniendo así mayor afinidad por la fase estacionaria, esto es por si la preparación de la muestra no es la adecuada y contenga impurezas muy polares, estas no eluyen junto con el ES, ya que con este pH el ES tardara mas en eluir, todo esto se muestra a continuación: Esomeprazol $pka_2 = 8.8$ pH = 6.8

Para esto tenemos la ecuación de **Henderson-Hasselbalch**:

$$pH = pka + \log [B^-] / [BH]$$

Por lo tanto tenemos:

$$6.8 = 8.8 + \log [B^-] / [BH]$$

$$6.8 - 8.8 = \log [B^-] / [BH]$$

Utilizando base 10 para eliminar el logaritmo

$$10^{-2} = \cancel{10^{\log}} [B^-] / [BH]$$

$$10^{-2} [BH] = [B^-]$$

Sustituyendo en la siguiente ecuación:

$$[BH] + [B^-] = 100$$

Tenemos:

$$[BH] + 10^{-2} [BH] = 100$$

$$1.01[BH] = 100$$

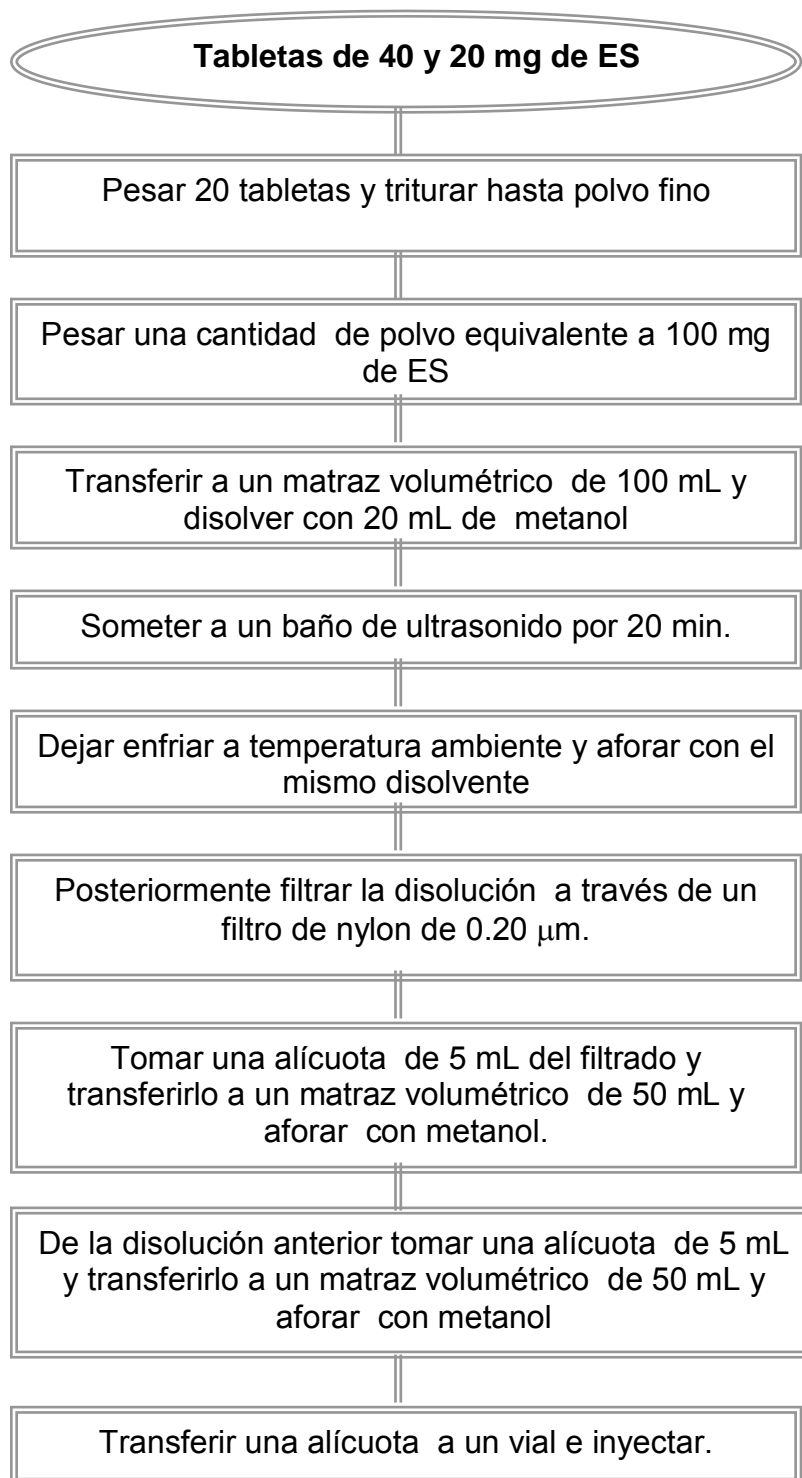
$$[BH] = 100/1.01$$

$$[BH] = 99.01 \% \longrightarrow \text{Forma molecular}$$

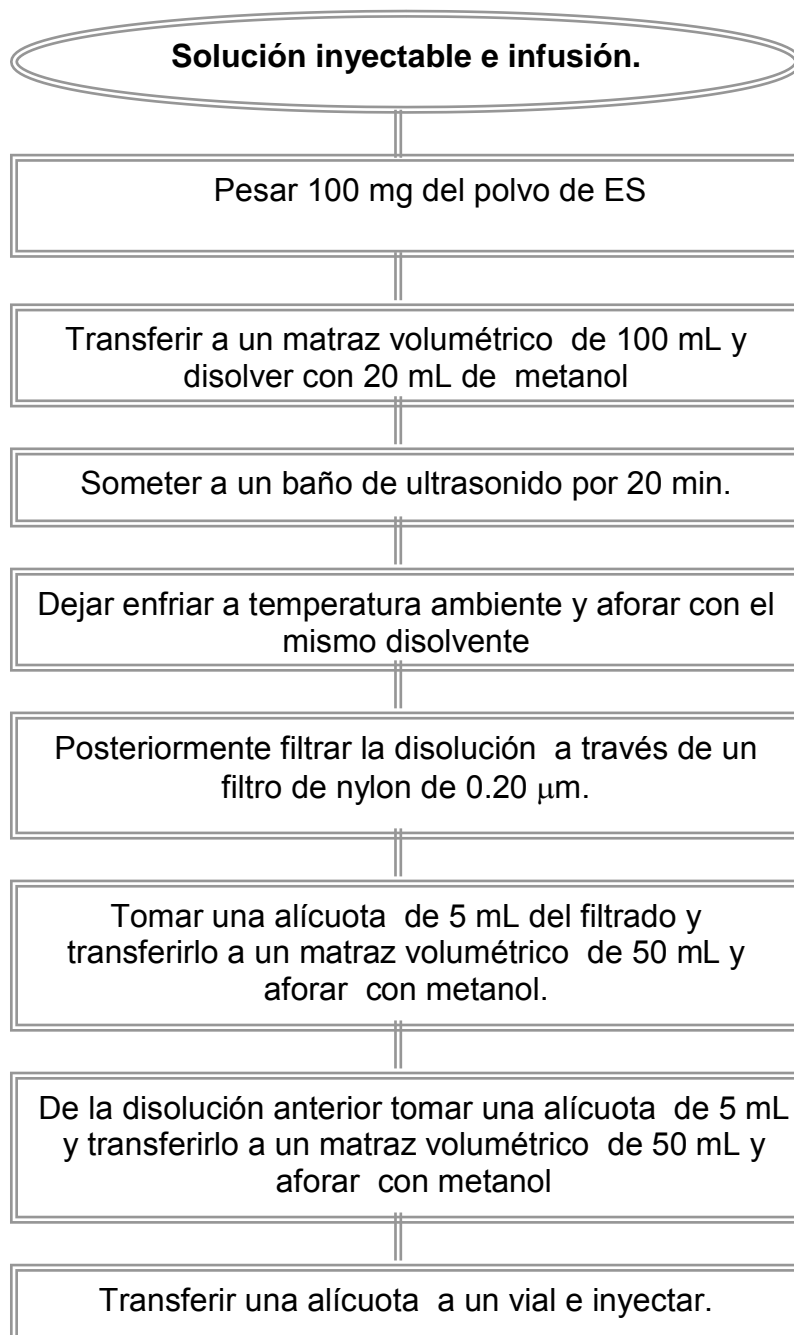
$$[B^-] = 0.99 \% \longrightarrow \text{Forma ionizada}$$

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

C. Preparación de la muestra



PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR



PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

Cada frasco ampula contiene:

Esomeprazol sódico equivalente a 40 mg de ES

▲ La solución para inyección IV se prepara agregando al vial 5 mL de NaCl al 0.9% para uso intravenoso.

▲ La solución para infusión se prepara disolviendo el contenido de un frasco de ES en hasta 100 mL de solución de cloruro de sodio al 0.9% para administración IV.

Con estas disoluciones se pretende obtener una concentración de 10 µg/mL de ES, como se muestra a continuación:

$$(100 \text{ mg}/100 \text{ mL}) \times (5 \text{ mL}/50 \text{ mL}) \times (5 \text{ mL}/50 \text{ mL}) = 0.01 \text{ mg/mL} = 10 \text{ µg/mL}$$

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

D. Justificación del cambio de disolvente

A finales del 2008 se encontró un aviso de las empresas suministradoras del acetonitrilo informando que el suministro de este disolvente iba a ser reducido y controlado debido a su escasez. El acetonitrilo es empleado en la mayoría de los métodos de análisis. Es por eso que hoy en día en nuestro país este disolvente ha elevado su precio, por lo que, viendo esta problemática y utilizando este disolvente en el método, se propone reemplazarlo por metanol, pero obteniendo la misma fuerza de elución, para esto se adecua la fuerza con la siguiente ecuación:

$$\Theta_c = \Theta_b [S_b/S_c]$$

Donde:

Θ_c = Fuerza de elución a ensayar

Θ_b = Fuerza de elución inicial

S_b = Fuerza de disolvente 1

S_c = Fuerza del disolvente 2

Para esta ecuación se requiere de la siguiente tabla que nos indica la fuerza de disolventes principales:

Tabla 8. Fuerza de disolventes

Agua	0
Metanol	3
Acetonitrilo	3.1
Acetona	3.4
Dioxano	3.5
Etanol	3.6
Isopropanol	4.2
THF	4.4

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

Por lo tanto sustituyendo en la ecuación, utilizando una solución amortiguadora pH 3.0:

$$\Theta_c = 40 [3.1/3.0] = 41.33$$

Resulta que la proporción de la fase móvil con la misma fuerza de polaridad sería (58:42) (Solución amortiguadora pH 3.0: MeOH)

Ahora utilizando una solución amortiguadora pH 6.8:

$$\Theta_c = 60 [3.1/3.0] = 62$$

Resulta que la proporción de la fase móvil con la misma fuerza de polaridad sería (38:62) (Solución amortiguadora pH 6.8: MeOH)

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

VIII. CONCLUSIÓN

Con base en las ventajas y desventajas de los métodos analíticos revisados, las propuestas para el análisis de esomeprazol en preparados farmacéuticos por CLAR es:

Equipo

- Cromatógrafo Varian Prostar con automuestreador Modelo 410
- Programa Galaxy Workstation
- Detector UV (λ 302 nm)
- Columna C₁₈ (250x 4.6 mm, 5 μ m)
- Bomba
- Sonicador
- Equipo de filtración
- Balanza analítica
- Potenciómetro
- Placa de agitación

Material

- Matraces volumétricos 100 y 10 mL
- Vasos de precipitado 100 mL
- Agitador magnético
- Micropipetas de 10 -100 μ L
- Puntillas
- Depósitos de disolventes
- Viales para automuestreador
- Charolas para pesar
- Acrodiscos de 0.20 μ m
- Espátula

Reactivos

- Metanol grado HPLC
- Acetonitrilo grado HPLC
- Agua grado HPLC
- Tabletas de esomeprazol 40 y 20 mg
- Solución inyectable e infusión de esomeprazol 40 mg
- Ortofosfato ácido de sodio (Na₂HPO₄)
- Hidróxido de sodio (NaOH)

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

Metodología

Condiciones cromatográficas.

A. Utilizando acetonitrilo y una solución amortiguadora pH 3.0 como fase móvil

Fase móvil (60:40) (Solución amortiguadora pH 3.0:Acetonitrilo)

Solución amortiguadora pH 3.0 (0.05M)

Velocidad de flujo: 1.2 mL/min

Volumen de inyección: 15 μ L

Longitud de onda: 303 nm

Tiempo muerto 2.7 min

B. Utilizando metanol y una solución amortiguadora pH 3.0 como fase móvil

Fase móvil (58:42) (Solución amortiguadora pH 3.0:Metanol)

Solución amortiguadora pH 3.0 (0.05M)

Velocidad de flujo: 1.2 mL/min

Volumen de inyección: 15 μ L

Longitud de onda: 303 nm

Tiempo muerto 2.7 min

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

C. Utilizando acetonitrilo y una solución amortiguadora pH 6.8 como fase móvil

Fase móvil (40:60) (Solución amortiguadora pH 6.8:Acetonitrilo)

Solución amortiguadora pH 6.8 (0.05M)

Velocidad de flujo: 1.2 mL/min

Volumen de inyección: 15 μ L

Longitud de onda: 303 nm

Tiempo muerto 2.7 min

D. Utilizando metanol y una solución amortiguadora pH 6.8 como fase móvil

Fase móvil (38:62) (Solución amortiguadora pH 6.8:Metanol)

Solución amortiguadora pH 6.8 (0.05M)

Velocidad de flujo: 1.2 mL/min

Volumen de inyección: 15 μ L

Longitud de onda: 303 nm

Tiempo muerto 2.7 min

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

IX. PROPUESTAS

- Realizar el ensayo del método sugerido
- Llevar a cabo la adecuabilidad del sistema
- Validar el método

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS.

1. Secretaria de salud. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Vol I. 9^a ed. México D.F.; 2008.p. 276-291.
2. Remington: The science and practice of pharmacy. 21^a ed. Editorial Lippincott Williams & Wilkins; 2005.p. 599-631.
3. Harris D. Análisis químico cuantitativo. México: Editorial Iberoamericana; 1992.p. 625, 650-659.
4. Rubinson J. Química analítica contemporánea. México: Prentice Hall; 2000.p.406-429.
5. Varcacel M. Técnicas analíticas de separación. Barcelona: Reverte S.A.; 1988.p. 335-385, 437-459.
6. Dobrio M, García P, Cifuentes A, José C, Frutos M, Herraiz M, Martines I, Sanz J. Cromatografía y electroforesis en columna. España, Barcelona: Springer-verlag Iberica; 2000.p. 145-184.
7. Rouessac F. Métodos y técnicas instrumentales modernas. Análisis químico. España: Mc Graw Hill; 2003.p. 7-27.
8. Bender G. Métodos instrumentales de análisis en química clínica. España: Editorial Acribia S.A.; 1992.p. 225-235.
9. Barriel F, Siro J, Lucena F, Hernández J. Química analítica cualitativa. 17^a ed. España, Madrid: Editorial Paraninfo; 2000.p.323-331.
10. Harold F, Reyes J. Análisis químico e instrumental moderno. España, Barcelona: Editorial Reverte S.A.; 1983.p. 348-355.
11. Dong M. Modern HPLC for practicing scientists. EUA: Wiley-Interscience; 2006.p. 1-13, 15-32.
12. Willard H. Métodos Instrumentales de análisis. México: Grupo editorial iberoamericana; 1991.p.505-517, 603-608.
13. Weston A, Brown P. HPLC and CE. Principles and practice. EUA: Academic Press; 1997.p. 1-108.

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

14. Skoog H. Principios de análisis instrumental. 5^a ed.: Mc Graw Hill; 2001.p. 16-33, 785-821.
15. Lough W. High Performance Liquid Chromatography. Fundamental principles and practice. Blackie academia and professional; 1996.p. 50-59.
16. Quatrocchi O , Andrizz S , Loba R . Introducción a la HPLC: Análisis cuantitativo. Argentina, Buenos Aires: Artes Gráficas Farro S.A; 1992.p. 10-35.
17. Sadek P. The HPLC Solvent guide. EUA: A Willey-Interscience; 1996.p. 2-31.
18. Braithwaite A , Smith F. Chromatographic Methods. 5^a ed. Boston: Klower Academic Publishers; 1999.p. 258-362.
19. Hanai T. HPLC a practical guide. Japon: Royal Society of Chemistry; 1999.p. 18-30.
20. <http://niobio.grasa.csic.es/jrios/weblab/analizador.html>
21. Tamargo J. Farmacología del esomeprazol. Departamento de farmacología. Facultad de medicina. Universidad Complutense. Madrid; 2005.p. 59-66.
22. Rahman N , Bano Z , Najmul S . Spectrophotometric determination of esomeprazole magnesium in commercial tablets using 5-sulfasalicylic acid and N-bromosuccinimide. Journal of the Chinese Chemical Society. 2008; (55): 557-566.
23. Shamkant P , Pandurang D , Banudas K. Development and statistical validation of spectrophotometric method for estimation of esomeprazole in tablet dosage form. Research Chem. 2009; (2): 154-156.
24. Patel B , Suhagia B , Patel M. Determination of pantoprazole, rabeprazole, esomeprazole, domperidone and itopride in pharmaceutical products by reversed phase liquid chromatography using single mobile phase. Chromatographia. 2007; (65): 743-748.
25. Önal A , Öztunc A. Development and validation of high performance liquid chromatographic method for the determination of esomeprazole in tablets. Journal of food and drug analysis. 2006 (14): 12-18.

PROPUESTA DE ANÁLISIS DE ESOMEPRAZOL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS POR CLAR

26. Xie Y , Xie P , Song X , Tang X . Preparation of esomeprazole zinc solid dispersion and study on its pharmacokinetics. International journal of pharmaceuticals. 2008; (360):53-57.
27. Hultman I, Stenhoff H, Liljeblad M. Determination of esomeprazole and its two main metabolites in human, rat and dog plasma by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. Journal of chromatography B. 2007; 848: 317-322.
28. Luo H , Chang C , Sheu M , Chen Y , Ho H. Optimal dose regimens of esomeprazole for gastric acid suppression with minimal influence of the CYP2C19 polymorphism. Eur J Clin Pharmacol. 2009; (65): 55-64.
29. Ortega L, García J, García T, Illera M, Lizando M, Lluch A, Validación de métodos analíticos. AEFI; 2001.p. 106-113.
30. Swartz M, Kull I . Analytical method validation: back to basics, part I. Chromatography online.com. Nov 2009: 1-7.