

Mtra. María Elena Contreras Garfias
 Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud
 PRESENTE

Por este medio le informo del término del Servicio Social, cuyos datos son los siguientes :

Fecha de Recepción	Día	Mes	Año	Fecha de Aprobación	Día	Mes	Año
--------------------	-----	-----	-----	---------------------	-----	-----	-----

Datos del Alumno

Nombre : Alex Flores Valle	
Matrícula : 2163062371	Licenciatura : Química Farmacéutica Biológica
Domicilio : Calle Oaxaca s/n. Col. La Capilla, Jonacatepec, Morelos	
Teléfono :	Celular : 7351644269
Correo Electrónico : 2163062371@alumnos.xoc.uam.m	CURP : FOVA980813HMSLLL02

Datos del Proyecto

Nombre del Proyecto : Importancia de la aplicación de la técnica analítica (CLAR) en el laboratorio de control de calidad en la industria farmacéutica.							
Lugar donde se realizó el Servicio Social : Laboratorio de Farmacia Molecular y Liberación Con							
Dependencia : Departamento de Sistemas Biológicos de la Universidad Autónoma Meropolitana l							
Entidad Federativa : Distrito Federal							
Municipio : Coyoacán	Localidad : Villa Quietud						
Fecha de Inicio	Día	Mes	Año	Fecha de Término	Día	Mes	Año
	14	05	2021		14	11	2021

PARA SER LLENADO POR LOS ASESORES

Sector: 1.- Educativo Tipo: 2.- Interno
 Orientación: 10.- Otros

FIRMAS

Dr. Javier Águila Rosas No. 43870

Asesor Interno
 Nombre, firma y No. Económico

M. en C.F. Carlos Solís Gaspar

Asesor Externo
 Nombre, firma y No. Económico

Alex Flores Valle

Alumno
 Nombre, firma

M. en C. Alma E. Ibarra Cázares 32807

Vo. Bo. de la Comisión
 Nombre y firma de la persona que autoriza

ASUNTO: CONCLUSIÓN DE SERVICIO SOCIAL
ALUMNO: ALEX FLORES VALLE

DR. JUAN ESTEBAN BARRANCO FLORIDO
Jefe del departamento de sistemas biológicos
Presente

Por medio de la presente me permito comunicar que el alumno de la licenciatura en Química Farmacéutica Biológica de esta institución, **Alex Flores Valle**, con matrícula 2163062371, **concluyó el proyecto de servicio social:** Estudio bibliográfico sobre la importancia de la aplicación de la técnica analítica (CLAR) en el laboratorio de control de calidad en la industria farmacéutica, en el Laboratorio de Farmacia Molecular y Liberación Controlada (N-106), ubicado en la Unidad Interdisciplinaria de Docencia, Investigación y Servicios (UIDIS), del Departamento de Sistemas Biológicos de la Unidad Xochimilco de la UAM.

Dicha actividad fue realizada bajo mi asesoría en el periodo comprendido de 14 de mayo al 14 de noviembre del 2021, cubriendo un total de 480 horas.

Agradeciendo su atención al presente, queda de usted.

Atentamente.



Dr. Javier Aguila Rosas
No. Eco. 43870

ASUNTO: CONCLUSIÓN DE SERVICIO SOCIAL
ALUMNO: ALEX FLORES VALLE

DR. JUAN ESTEBAN BARRANCO FLORIDO
Jefe del departamento de sistemas biológicos
Presente

Por medio de la presente me permito comunicar que el alumno de la licenciatura en Química Farmacéutica Biológica de esta institución, **Alex Flores Valle**, con matrícula 2163062371, **concluyó el proyecto de servicio social:** Estudio bibliográfico sobre la importancia de la aplicación de la técnica analítica (CLAR) en el laboratorio de control de calidad en la industria farmacéutica, en el Laboratorio de Farmacia Molecular y Liberación Controlada (N-106), ubicado en la Unidad Interdisciplinaria de Docencia, Investigación y Servicios (UIDIS), del Departamento de Sistemas Biológicos de la Unidad Xochimilco de la UAM.

Dicha actividad fue realizada bajo mi asesoría en el periodo comprendido de 14 de mayo al 14 de noviembre del 2021, cubriendo un total de 480 horas.

Agradeciendo su atención al presente, queda de usted.

Atentamente.



M. en C. F Carlos Solís Gaspar
Cedula profesional: **09055766**

No. de páginas: 41

Lugar de realización: De forma remota con apoyo del Laboratorio de Farmacia Molecular y Liberación Controlada (N-106). UAM-X

Prácticas realizadas en: Laboratorio de Farmacia Molecular y Liberación Controlada (N-106)

Proyecto genérico: Evaluación de productos relacionados con la salud

Contiene:

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Fotografías | <input checked="" type="checkbox"/> Ilustraciones |
| <input type="checkbox"/> Gráficas | <input type="checkbox"/> Mapas |
| <input checked="" type="checkbox"/> Tablas | <input type="checkbox"/> Diagramas |
| <input type="checkbox"/> Trípticos | |

Vo.Bo. Asesor:  _____

Fecha liberación texto completo: 20211213

NOTA: La versión digital de este reporte, solo podrá ser consultada en cualquier Unidad académica de la Universidad, incluyendo a Rectoría General



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO
División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Sistemas Biológicos

Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

Importancia de la aplicación de la técnica analítica (CLAR) en el laboratorio de control de calidad en la industria farmacéutica.

Flores Valle, Alex

2163062371

Asesores

Interno: Águila Rosas, Javier

Externo: Solís Gaspar, Carlos

14 de Diciembre de 2021

Sistemas Biológicos
Química Farmacéutica Biológica

Importancia de la aplicación de la técnica analítica (CLAR) en el laboratorio de control de calidad en la industria farmacéutica.

Flores Valle, Alex 2163062371

Interno: Águila Rosas, Javier
Externo: Solís Gaspar, Carlos

14 de Diciembre de 2021

41

De forma remota con apoyo del Laboratorio de Farmacia Molecular y Liberación Controlada (N-106). UAM-X

Evaluación de productos relacionados con la salud

X

X

20211213



Informe Final

Título del Proyecto de Investigación:

Estudio bibliográfico sobre la importancia de la aplicación de la técnica analítica (CLAR) en el laboratorio de control de calidad en la industria farmacéutica.

Proyecto Genérico: Evaluación de productos relacionados con la salud

Etapas: Desarrollo de métodos y técnicas analíticas para el control físico, químico, biológico y microbiológico de productos relacionados con la salud

Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

Alumno: Flores Valle Alex

Matrícula: 2163062371

Lugar de realización: De forma remota con apoyo del Laboratorio de Farmacia Molecular y Liberación Controlada (N-106). UAM-X

Inicio: 14 de mayo 21

Final 14 de noviembre del 2021

Dr. Javier Águila Rosas
Asesor interno
No. Económico 43870

M. en C.F. Carlos Solís Gaspar
Asesor externo
Ced.Prof. 09055766

Índice

I. Introducción.....	3
II. Objetivos.....	4
III. Metodología.....	4
IV. Resultados y meta alcanzada.....	5
V. Conclusiones.....	6
VI. Perspectivas.....	6
VII. Referencias	7
VIII. Anexo 1. Artículo de revisión bibliográfica	8

I. Introducción

La cromatografía de líquidos de alta resolución o rendimiento CLAR, (comúnmente llamada HPLC, high-performance liquid chromatography), es denominada también cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE). Es el tipo de cromatografía por elución más versátil y utilizada por la comunidad científica, así como a nivel industrial para separar y determinar especies en una variedad de materiales orgánicos, inorgánicos y biológicos (Skoog, D. A. *et al.*, 2015) además, permite hacer separaciones y mediciones en cuestión de minutos, por lo que se ha convertido en el pilar de los laboratorios farmacéuticos desde la década de 1970 (Christian, G. D., 2009). Una de las ventajas que ofrece la CLAR, es la separación de una gran cantidad de sustancias a temperatura ambiente. Por lo tanto, las sustancias no volátiles o térmicamente inestables se pueden someter a esta técnica, sin provocar descomposición y sin la necesidad de hacer derivados volátiles como es el caso de la cromatografía de gases (Skoog D. A. *et al.*, 2015). La gran practicidad que tiene el HPLC ha dejado por detrás a otros métodos usados con anterioridad en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) la cual cada cierto tiempo recibe actualizaciones que cambian algunos de estos métodos, lo que implica la tendente modificación en el uso del HPLC como método de valoración. Además de esto, las necesidades de la industria frente a estos requerimientos permiten que se busque la innovación en el diseño de nuevos aparatos, con distintas modificaciones, como es la presentación de un equipo portátil con menores dimensiones y mayor versatilidad entre otras mejoras (López, E. P., 2015).

Actualmente en la industria farmacéutica es importante que todas las materias que pasan a la cadena de fabricación sean examinadas en el laboratorio mediante CLAR para asegurar que cumplen con las especificaciones, asegurando la calidad en el producto final. Por lo tanto, en este trabajo se realizará una revisión bibliográfica de la importancia del uso de CLAR en la industria farmacéutica, sus ventajas, desventajas, aplicaciones, innovaciones, condiciones analíticas empleadas, insumos y costos de estos, así como nuevas técnicas de detección, fases estacionarias selectivas y todo lo que conlleva esta técnica para el análisis de principios activos antes, durante y después del proceso, para así poder obtener y garantizar productos de calidad.

II. Objetivos

II.2 Objetivo general

Recopilar información bibliográfica y describir las condiciones analíticas necesarias para el análisis de materia prima, producto en proceso y terminado en la industria farmacéutica.

II.3 Objetivos específicos

- Investigar a través de una revisión bibliográfica las diferentes innovaciones incluidas en un equipo de CLAR que existen actualmente, así como sus diferentes variantes en técnicas de detección, fases estacionarias e insumos.
- Investigar a través de una revisión bibliográfica los diferentes equipos de CLAR que existen actualmente, así como sus diferentes variantes que pueden tener y sus limitaciones.
- Recopilar y analizar información bibliográfica del desarrollo y validación de métodos cromatográficos mediante parámetros de desempeño necesarios en la industria farmacéutica para tener resultados confiables y productos de calidad.

III. Metodología

Para el desarrollo de la búsqueda de la información se utilizaron fuentes biblio y hemerográficas, como el soporte representado por la Biblioteca de la Unidad Xochimilco (BiDi-UAM), la base de datos PubMed y Google Académico para la búsqueda de artículos en revistas científicas de editoriales como: *Elsevier*, *Springer*, *ACS Journal Editorial Offices*, *SciELO*, *Oxford University Press*, *ResearchGate*, *Wiley* y *Scopus*, además, se consultaron libros para la búsqueda de los fundamentos de la técnica de CLAR.

También se recopiló información de publicaciones oficiales de instituciones gubernamentales en México como por ejemplo del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) y la Secretaría de Salud (SS), además en la búsqueda de los parámetros de desempeño para la validación de los métodos analíticos se consultaron guías de organizaciones como la Conferencia Internacional sobre armonización de requisitos técnicos para el registro de productos farmacéuticos para

uso humano (ICH) y el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México (CNQFBM), así también se revisó el Diario Oficial de la Federación (DOF) para verificar la normatividad vigente.

IV. Resultados y meta alcanzada

La consulta de información en las bases de datos, dio como resultados diversos artículos científicos, de los cuales, un total de 111 referencias bibliográficas fueron recopiladas, la mayoría fueron artículos de revistas científicas.

Por otro lado, mediante esta recopilación y análisis de información, se realizó una revisión bibliográfica tipo artículo incluida en el anexo 1 de este informe final, la cual fue en dividida en secciones; la primera sección aborda el panorama actual de la industria farmacéutica tomando puntos como la importancia de esta en el país, las técnicas analíticas aplicadas al control de calidad de los medicamentos, así como los medicamentos manufacturados en el país para distintos padecimientos, de los cuales, resaltan los antibióticos (tabla 1 Anexo 1), mismos que fueron tomados para ejemplificar el uso de la CLAR en la última sección. La segunda sección describe la técnica de CLAR, abordando su fundamento y características que la distingue entre sus distintas aplicaciones actuales, las cuales se muestran en la tabla 2 del Anexo 1; mientras que, en la tercera sección se describen las condiciones analíticas empleadas en el análisis de medicamentos como el tratamiento de la muestra, la importancia de la fase móvil y la fase estacionaria, así como otros factores importantes que influyen en el desempeño de la columna, como la temperatura, el pH y el tamaño de partícula.

Las secciones siguientes, abordan el análisis de las moléculas separadas por la técnica CLAR y describen la clasificación de los detectores que pueden ser empleados. Por último, como particularidades, la información se centra en la innovación y variantes de la técnica de cromatografía de líquidos, como son la de fase normal, fase reversa e interacción hidrofílica (esta última como alternativa), tomando en cuenta sus ventajas y desventajas (tabla 3 Anexo 1), además se incluye la selección de la columna según el tipo de cromatografía, siendo la de fase reversa la más utilizada por la industria farmacéutica; información que fue corroborada en la recopilación de las aplicaciones de la CLAR mostradas en la tabla 5 del anexo 1.

El tomar en cuenta las generalidades y el cuidado del equipo empleado en la cromatografía líquida de alta resolución, brinda información sobre los módulos fundamentales de un cromatógrafo, así como las precauciones que deben tomarse al realizar un análisis para garantizar que brinde resultados confiables. No obstante, debido a la normatividad mexicana vigente, también se abordó sobre el desarrollo y validación de métodos cromatográficos empleados en la industria farmacéutica.

V. Conclusión

La elaboración de un estudio bibliográfico sobre la importancia de la aplicación de la técnica analítica (CLAR) en el laboratorio de control de calidad en la industria farmacéutica sirvió para reforzar y obtener conceptos nuevos acerca de esta técnica, así como para desarrollar y mejorar las habilidades de análisis de un medicamento, el cual se aborda desde la identificación hasta la resolución de problemas analíticos. Así mismo la recopilación de los fundamentos y parámetros de desempeño necesarios en una validación es parte necesaria de una constante actualización como profesionalista.

VI. Perspectivas

La temática de esta revisión brinda una actualización de un profesional químico farmacéutico biológico que busque una oportunidad laboral en la industria farmacéutica, mediante la obtención de un panorama actual de lo que representa la técnica de CLAR. Siendo un químico que desea incorporarse a la industria farmacéutica como analista, es parte importante que tenga conocimiento sobre CLAR, para llevarlo a cabo en la práctica experimental y que de acuerdo con la asesoría externa, puede ser un factor que favorezca la incorporación al campo laboral.

VII. Referencias

1. Christian, G. D. (2009). *Química analítica* 6a. ed. mcgraw-hill interamericana. México., 21, pp. 604-625
2. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México (CNQFBM) (2002). *Guía de Validación del Método Analítico*.
3. Diario Oficial de la Federación. (2015) Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2015, Buenas prácticas de fabricación de medicamentos.
4. ICH Guideline Q2 (R1) (2021) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Guidance for Industry. |<https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/q2r1-validation-analytical-procedures-text-and-methodology-guidance-industry>
5. López, E. P. (2015). Propuesta de diseño e innovación de un producto, basado en el rediseño de un HPLC. *Pensamiento Actual*, 15(25), 99-111.
6. Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2015). *Fundamentos de química analítica*. 9a. ed. Cengage Learning. México 6(33), pp.912-934

VIII. Anexo 1. Artículo de revisión bibliográfico

Review:

Importancia de la aplicación de la técnica analítica (CLAR) en el laboratorio de control de calidad en la industria farmacéutica.



Alex Flores Valle^{1,2}, Carlos Solís Gaspar², Javier Águila Rosas¹

¹Laboratorio de Farmacia Molecular y Liberación Controlada, División de Ciencias Biológicas y de Salud Departamento de Sistemas Biológicos Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. Calz. Del Hueso 1100, Coapa, Villa Quietud, Coyoacán, 04960 Ciudad de México, CDMX.

²Laboratorios Vanquish S.A. de C.V. Calle 9 Este 28, Civac, 62000 Cuernavaca, Morelos.

Resumen

La calidad de los productos farmacéuticos tiene un gran impacto en la salud de los pacientes, por lo que para garantizar que los productos son de calidad, se someten a pruebas analíticas antes de que pueda llegar al mercado, por esto la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), cada vez es más empleada por la industria farmacéutica. Esto es favorecido por la gran demanda de medicamentos, debido a que dentro de las ventajas que ofrece esta técnica, está el amplio rango de aplicabilidad debido a la alta disponibilidad de columnas, fases o detectores, que la hacen capaz de analizar muestras con diferentes propiedades químicas para poder identificar el principio activo, las impurezas e incluso cuantificar la cantidad de principio activo. Esta revisión describe algunos de los principios de CLAR, las condiciones analíticas empleadas, así como el tratamiento que debe recibir la muestra y factores involucrados en la resolución. No obstante, los métodos analíticos deben ser validados en base a parámetros establecidos por organizaciones internacionales y/o nacionales, con la finalidad de encontrar las mejores condiciones analíticas para garantizar que cumple con parámetros de desempeño que reflejen datos confiables y reproducibles. Finalmente, se incluye una recopilación de un grupo de medicamentos como son los antibióticos en donde se muestra la aplicación de la técnica.

Palabras clave

CLAR, Medicamentos, Control de calidad, Validación

1.Introducción:

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), (comúnmente llamada HPLC, por sus siglas en inglés (*high-performance liquid chromatography*), es denominada también cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE). Es el tipo de cromatografía por elución más versátil y utilizada por la comunidad científica, así como a nivel industrial para separar e identificar especies en una variedad de materiales orgánicos, inorgánicos y biológicos (Skoog, D. A., *et al.*, 2015) además, permite hacer separaciones y mediciones en cuestión de minutos, por lo que se ha convertido en el pilar de los laboratorios farmacéuticos desde la década de 1970 (Christian, G. D., 2009). Una de las ventajas que ofrece la CLAR, es la separación de una gran cantidad de sustancias a temperatura ambiente. Por lo tanto, las sustancias no volátiles o térmicamente inestables pueden ser analizados bajo esta técnica, ya que no provoca la descomposición del analito y no hay necesidad de hacer derivados volátiles como es el caso de la cromatografía de gases (Skoog, D. A., *et al.*, 2015). La gran practicidad que tiene la CLAR está dejando por detrás técnicas usadas con anterioridad, tal es el caso de la

espectroscopia de UV-visible, sin embargo, hoy en día no ha dejado de ser una de las técnicas mayormente empleadas. En México la Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (CPFEUM), el cual es el cuerpo colegiado asesor de la Secretaría de Salud, tiene por objeto participar en la elaboración, revisión y actualización permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) la cual es el documento expedido por la Secretaría que consigna los métodos generales de análisis y los requisitos sobre identidad, pureza y calidad de los fármacos, aditivos, medicamentos, productos biológicos y demás insumos para la salud. La revisión y actualización se da en lapsos que no excedan 3 años, mediante suplementos o ediciones. En las últimas actualizaciones de la FEUM se ve una tendencia al uso constante de CLAR en las pruebas de valoración del principio activo. Además de esto, las necesidades de la industria frente a estos requerimientos permiten que se busque la innovación en el diseño de nuevos aparatos, con distintas modificaciones, como es la presentación de un equipo portátil con menores dimensiones y mayor versatilidad entre otras mejoras (López,

E. P., 2015). Actualmente en la industria farmacéutica es importante que todas las materias que pasan a la cadena de fabricación sean examinadas en el laboratorio y en su mayoría es mediante CLAR para asegurar que cumplen con las especificaciones y garantizar la calidad en el producto final. Por lo tanto, en esta revisión bibliográfica, se aborda sobre la importancia del uso de CLAR en la industria farmacéutica, incluyendo sus ventajas, desventajas, aplicaciones e innovaciones, así como condiciones analíticas empleadas, insumos y nuevas técnicas de detección, es de importancia para llevar garantizar medicamentos de calidad.

2. La actualidad y avances de la industria farmacéutica

La industria farmacéutica es el sector que se dedica al descubrimiento, desarrollo, fabricación y comercialización de medicamentos que ha tomado una gran importancia en la vida cotidiana al ser uno de los pilares del sector salud, ya que genera un flujo continuo de nuevos productos que salvan vidas y mejoran la calidad de vida. (Scherer, F. M., 2000). Cabe resaltar que es una de las industrias más intensivas en investigación del

mundo buscando las mejores soluciones a las problemáticas actuales.

Por otro lado, la creciente demanda de medicamentos pone en evidencia el gran papel que está tomando la industria dentro del sector salud, principalmente buscando nuevas moléculas que sean capaces de dar solución a enfermedades que aquejan a la población, además de buscar una mejor respuesta de estos en los tratamientos actuales, tal es el caso de la resistencia microbiana a los antibióticos (Hughes, D., & Andersson, D. I., 2017). La industria se ha adaptado a las diversas necesidades de los pacientes, entre estas destaca primordialmente el diseñar nuevas formas farmacéuticas que faciliten la administración de medicamentos, recientemente se han patentado y autorizado algunas formas innovadoras de entrega de fármacos, algunas ya muy conocidas como las matrices poliméricas, tabletas osmóticas, formas micelares, entre otras (Zuñiga-Hidalgo, T. *et al.*, 2013), sin embargo los avances de la tecnología farmacéutica apunta hacia la innovación en sistemas tipo acarreador como son los liposomas, nano micelas, dendrímeros, coacervados, nanopartículas y

nanoestructuras como las metal orgánicas conocidas como MOF (Devi, N. *et al.*, 2017, Chen, W., & Wu, C., 2018; Li, M. *et al* 2019; Jo, M. J., *et al.*, 2020) por mencionar alguna, y con esto llegar a la población que presenta complicaciones en su modo de empleo actual. Además, por la posición socioeconómica del país es importante buscar nuevas formulaciones que puedan disminuir el impacto económico de la producción de medicamentos y por ende su precio en el mercado para facilitar el acceso a toda la población que los requiera.

Desarrollar un medicamento es un proceso muy largo y costoso, por lo tanto, para que un medicamento pueda llegar al mercado, es necesario que pase diversas etapas, las cuales incluyen desde el descubrimiento del mismo, pasando por las etapas de desarrollo preclínico (ensayos en animales), desarrollo clínico (ensayos en humanos, etapas I, II y III) hasta la vigilancia tras su comercialización (Zurita-Cruz, *et al.*, 2019, Ritter, J. M. *et al.*, 2020). No obstante, los medicamentos antes de ser liberados para su comercialización, es necesario que hayan sido manufacturados por procesos validados para cumplir con la normatividad del país, de igual forma

también deben ser validados los análisis de control de calidad de la materia prima y del producto terminado para garantizar al consumidor que el medicamento que adquiere es de calidad (Klang, M. G., & Williams, L. A., 2016).

2.1 La importancia de la industria farmacéutica en México

El crecimiento de la industria farmacéutica en México está relacionado con el incremento del gasto de salud que se ha dado durante la última década en el país, principalmente impulsado por el aumento de la población y del gasto público en salud que esto conlleva, además del envejecimiento de la población y aumento de las enfermedades no transmisibles (ENT) por ejemplo de enero a junio del año 2021, el mayor porcentaje de notificación fue de úlceras, gastritis y duodenitis (28.2%) seguidos por los casos de hipertensión arterial (15.4%) y obesidad (14.8%) (Secretaría de Salud, 2021). La industria farmacéutica en México no sólo ocupa un lugar importante en la salud, sino también dentro de la rama económica, dado que es el segundo mercado más grande de América Latina y el doceavo a nivel

mundial según el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), en el 2017. Asimismo, 14 de las 15 principales empresas a nivel internacional se encuentran ubicadas en el país, por lo que México se ha posicionado como uno de los principales centros manufactureros a nivel mundial y es un importante fabricante de productos farmacéuticos de alta tecnología, incluyendo antibióticos, antiinflamatorios y tratamientos contra el cáncer, entre otros (Pérez, G., 2013).

2.2 La manufactura de productos farmacéuticos en México

La industria farmacéutica es una actividad económica estratégica en el país. Esta se dedica a la fabricación de productos farmacéuticos, los cuales se pueden separar en dos actividades, la fabricación de materias primas para la industria farmacéutica que representa el 5.7 %, y la fabricación de preparaciones farmacéuticas que es la que más destaca con un 94.3% de la producción bruta (INEGI, 2016).

En el año 2014, se tiene el último registro a través de una encuesta, sobre los productos farmacéuticos más producidos (Tabla 1), los antibióticos son los que ocupan la mayor cantidad

de volumen, seguidos de los medicamentos para el sistema digestivo y metabolismo en comparación a los demás productos.

Actualmente en el año 2021 no se conocen las cifras exactas de los medicamentos más producidos y vendidos en el mercado local, probablemente los analgésicos sean uno de los grupos de medicamentos que logren destacar debido a una desviación por el uso constante de estos, resultante de la emergencia sanitaria por COVID-19 (Song, Y., *et al.*, 2020).

No obstante, debido a la gran demanda actual de medicamentos, es importante recordar que la calidad es algo que debe estar implícita, con la finalidad de asegurar la eficacia de estos, cumpliendo su propósito. Es por ello que, la industria farmacéutica somete a los medicamentos bajo la normativa vigente (NOM-059-SSA1-2015) y actualizada las pruebas que permitan asegurar la eficacia hacia el paciente mediante la calidad requerida (Klang, M. G., & Williams, L. A., 2016).

Tabla 1. Volumen de producción productos farmacéuticos, 2014 (Extraído de INEGI, 2016).

Volumen de producción productos farmacéuticos, 2014	
Productos farmacéuticos	% de Volumen de producción
Antibióticos	22.3
Medicamentos para el sistema digestivo y metabolismo	14.9
Analgésicos	9.0
Medicamentos para el sistema cardiovascular	6.8
Medicamentos para el sistema respiratorio	6.3
Medicamentos para el sistema nervioso	5.9
Vitaminas y compuestos vitamínicos	5.8
Suplementos y complementos alimenticios	5.7
Medicamentos para el sistema locomotor	4.3
Medicamentos dermatológicos	3.6
Medicamentos de uso veterinario	3.5
Antiparasitarios	3.2
Medicamentos para el sistema hematopoyético	1.6
Vacunas	0.2
Antivirales	0.7
Oncológicos	0.7
Otros	0.7

2.3 Las técnicas analíticas aplicadas al control de calidad de los productos farmacéuticos

La industria farmacéutica se encuentra dividida en distintos departamentos y/o áreas, los cuales tienen la finalidad de garantizar la calidad de los medicamentos (Rodríguez, H., & De Lucia, M. L. (2021). Entre estas áreas se encuentran aseguramiento de calidad, quien es el encargado de la parte documental principalmente y de la inspección de las muestras que son tomadas tanto de materia prima como del producto en distintas etapas del proceso, otro departamento con gran importancia es el control de calidad, puesto que es el encargado de recibir las muestras y someterlas a distintos tests mediante análisis instrumental (Elser, C., & Richmond, F. J., 2019). Los análisis realizados son de carácter cuantitativo y son de acuerdo con los procedimientos recomendados en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) bajo la normativa mexicana regulada por la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS). Por lo tanto, en esta bibliografía se encuentran las pruebas que son requeridas, como son los ensayos de

identidad mediante espectrofotometría de infrarrojo (IR) y ensayos de impurezas para la detección de algún residuo proveniente de la obtención de la materia prima que constituirá la forma farmacéutica, además también se encuentran ensayos de valoración, los cuales se encargan de cuantificar el principio activo; dentro de esta última podemos encontrar distintas técnicas instrumentales de análisis, las cuales son indicadas según las características de la molécula a cuantificar. Uno de los equipos más usados para cuantificar el principio activo de los medicamentos es la CLAR, el cual con cada actualización de las monografías de la FEUM va tomando más importancia gracias a las numerosas ventajas que aporta comparado con el uso del espectrofotómetro de UV-vis, una de las ventajas que aporta es la disminución de tiempo en la realización de un gran número de muestras.

3. La cromatografía líquida de alta resolución como técnica idónea en el análisis de medicamentos

La cromatografía es un método físico de separación, en el que los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una estacionaria y una móvil, en una dirección definida, la

separación es llevada a cabo en una columna, a una presión relativamente alta para hacer pasar a través de la columna moléculas, separándolas según sus propiedades químicas. (Ettre, L. S., 1993, Sahu, P. K. *et al.*,2018). La separación de analitos en CLAR es el resultado del equilibrio de distribución de los componentes de una mezcla entre la fase estacionaria y la fase móvil, es decir la separación se lleva a cabo a través de su retención en la columna cromatográfica, la cual está condicionada por la polaridad y al salir de ésta, los componentes de la mezcla ya separados son conducidos por la fase móvil en el orden en que emergieron, para pasar a través de un detector en línea que monitorea la concentración y el tiempo de retención en la columna de cada componente separado en el eluyente y genera un cromatograma que muestra cada compuesto en forma de picos simétricos con un tiempo de retención característico que sirve para poder identificar el compuesto, el cual se denomina tiempo de retención (t_r) (FEUM, 2014). Este parámetro se mide desde el momento en que se inyecta la muestra hasta el momento en que aparece la cresta del pico en el cromatograma (FEUM, 2014). La CLAR es la técnica analítica más

utilizada para el análisis cuantitativo de productos farmacéuticos, biomoléculas, polímeros y otros compuestos orgánicos (Ornaf, R. & Dong, M., 2005), el éxito de esta técnica depende de la combinación correcta de cada una de las condiciones de operación, es decir la preparación de la muestra, la fase móvil, el tipo de columna, la longitud y diámetro de la columna, la velocidad de flujo de la fase móvil, el tipo de detector, entre otros y es gracias a esto, que existe una gran cantidad de métodos y técnicas como se observa en la tabla 2, dichas técnicas son capaces de separar analitos en una enorme variedad de muestras y matrices, brindando información cualitativa y cuantitativa cada vez más completa y mejor (Giddings, J. C., *et al.*, 1965, Mandrioli, M. *et al.*, 2019). Pese a la gran cantidad de componentes en CLAR, existen características fundamentales que siempre están presentes, entre ellas, la fase móvil y la fase estacionaria, además tienen que ser de polaridad opuesta, de lo contrario la fase móvil puede disolver el relleno de la columna; en segundo lugar, los analitos deben ser totalmente solubles en la fase móvil es decir su polaridad debe ser igual que ésta, para que puedan ser arrastrados e

interactúen con la fase estacionaria; en tercer lugar, ha de existir propagación de los analitos a lo largo de la columna saliendo de la columna antes del final del análisis (elución), por último, los analitos se deben separar, a esto se le conoce como migración diferencial (Karger, B.L., 1973; Rodriguez, E. L. *et al.*, 2020).

Tabla 2. Tipos de CLAR (Recuperado de García, A. & Yusa, D. J., 2016).

Tipos de CLAR		
Nombre	Diámetro de la columna	Velocidad de flujo
Semipreparativa	4-7 mm	2-10 mL/min
Preparativa	7.5-21 mm	10-50 mL/min
Industrial	>21 mm	50-1000 mL/min
Analítica	3.2-4.6 mm	0.5-2 mL/min
Narrowbore	1.5-3.2 mm	100-500 µL/min
CLAR micro	0.5-1.5 mm	10-100 µL/min
CLAR capilar	150-500µm	1-10 µL/min
CLAR nano	10-150 µm	10-1000 nL/min

4. Condiciones analíticas empleadas en el análisis de medicamentos

Existe una gran cantidad de factores que pueden afectar el análisis de materia prima, producto en proceso o producto terminado, dichos factores pueden interferir en los resultados que se obtienen a través del cromatograma,

como modificar los tiempos de retención o la generación de picos que pueden dificultar la identificación y/o cuantificación del principio activo (Awotwe-Otoo, D. *et al.*, 2012). A continuación, se profundizan los factores con mayor relevancia.

4.1 Tratamiento de la muestra

La preparación de la muestra es el procedimiento realizado para convertir de una matriz real o problema, en este caso proveniente de un medicamento, en una muestra adecuada para el análisis. Este proceso cambia casi inevitablemente las interacciones de los compuestos con su entorno químico. Por lo que, estas interacciones están determinadas por las propiedades físicas y químicas tanto de los analitos como de las matrices, y afectan la aplicabilidad de diferentes técnicas de preparación de muestras y métodos analíticos, así como su eficiencia y reproducibilidad (Paschke, A. 2003). Es muy importante tener información sobre las propiedades del analito como coeficiente de reparto octanol-agua ($\log K_{ow}$), debido a que el $\log K_{ow}$ es un indicador de la lipofilia del compuesto, teniendo en cuenta que un $\log K_{ow}$ alto es típico de los compuestos hidrófobos,

mientras que un K_{ow} bajo significa un compuesto soluble en agua (Díaz-Cruz, M. S. *et al.*, 2003), otra propiedad de importancia es la constante de disociación ácida (pK_a), puesto que la mayoría de los productos farmacéuticos tienen propiedades ácidas y/o básicas; su velocidad de ionización depende de las constantes de disociación ácida (es decir, valores de pK_a) y está controlada por el pH de la solución (Mooney, K. G., *et al.*, 1981;(Caliaro, G. A., & Herbots, C. A., 2001)) . Con la información necesaria, se puede elegir la mejor opción para analizar productos farmacéuticos, por lo tanto, el valor de pK_a permite ajustar el valor de pH de la solución de muestra y $\log K_{ow}$ muestra la afinidad de los productos farmacéuticos por el agua (compuestos polares / no polares) (Pavlović, D. M. *et al.*,2007).

La introducción de la muestra al sistema cromatográfico es un punto crítico. Las válvulas de inyección automática en la CLAR, más comunes no están diseñadas para funcionar a alta presión. Por lo que, una bomba debe distribuir el disolvente de forma uniforme y reproducible a una presión de 6000 psi o 400 bar y flujo de 0.1-10 mL/min (Shoykhet, K., *et al.*, 2019). El proceso de inyección debe estar relativamente libre de pulsos para

proteger la columna de fluctuaciones extremas de presión. Los rangos de volumen de inyección típicos, en aplicaciones de control de calidad con una precisión de 0.2 a 0.5% de coeficiente de variación, son de 2–1000 µL a 6000 psi (Paul, C., *et al.*, 2019), sin embargo, el rango de volumen de inyección típico para análisis cuantitativo es de 5 a 50 µL. Todo esto implica la necesidad de un ciclo de inyección rápido con una alta capacidad de muestra, además de una inyección de bajo volumen que dé como resultado un mínimo de problemas de arrastre, pero con una mayor sensibilidad (Swartz, M. E., 2005).

4.2 La importancia de la fase móvil

Un factor importante por controlar es la fase móvil (eluyente), esta es un fluido que transporta la muestra a través de la fase estacionaria (columna) (Ettre, L. S., 1993; Kommareddy, S. *et al.*, 2021), la cual debe ser de polaridad opuesta a la muestra y a la columna. Es de gran importancia seleccionar la elución correcta que se va a utilizar para garantizar resultados confiables (Nikolin, B. *et al.*, 2004). Dentro de la fase móvil, existen características

importantes que deben cuidarse, como la concentración y la selectividad de los solventes orgánicos, la polaridad del solvente o porcentaje de contenido de solvente orgánico, debido a que controla el tiempo de retención del analito y usar diferentes solventes orgánicos como metanol, acetonitrilo o tetrahidrofurano, puede afectar de manera dramática la selectividad de los solventes (Ornaf, R. & Dong, M., 2005).

La CLAR se puede realizar en modo isocrático o en gradiente. En el modo isocrático, la composición de la fase móvil no cambia durante el transcurso de la ejecución, es decir la masa total de analito en ambas fases no cambia, dando como resultado un factor de retención constante y la eficiencia es cuantificada por el número de platos teóricos (N) (Moody, H. W., 1982; Saad, A. S. *et al.*, 2019), calculados a partir de un cromatograma por la ecuación 1.

Ecuación 1:

$$N = 16 \left(\frac{\text{Tiempo de Retención (Tr)}}{\text{Anchura de la base del pico (Wb)}} \right)^2$$

Sin embargo, este no es el caso en forma de gradiente, donde la polaridad de la fase móvil aumenta durante la ejecución. Esto aumenta la masa total de analito en la fase móvil y, por lo tanto, disminuye el factor de retención (Schoenmakers P. J. *et al.*, 1978; Mulabagal, V., *et al.*, 2020).

Finalmente resulta como eficiencia, la medida de la capacidad de pico (P), la cual se obtiene a partir del número de picos (n) que se pueden separar en un determinado tiempo y con una determinada resolución, por lo tanto, la capacidad de picos depende de diferentes factores, como la longitud de la columna (a mayor longitud, mayor eficiencia) y el tamaño de partícula (menor tamaño, mayor eficiencia) (Baeza-Baeza, J. J., & García-Alvarez-Coque, M. C., 2020).

4.3. La importancia de la fase estacionaria y sus componentes

La fase estacionaria es una de las dos fases que forman un sistema cromatográfico, la cual se encuentra unida químicamente dentro de la columna (Ornaf, R. & Dong, M., 2005), la fase debe recubrirse o unirse a partículas de un soporte sólido, generalmente un material poroso o estructuras de soporte monolíticas. Algunos materiales han encontrado un uso generalizado para ser empleados como soportes sólidos estacionarios, estos son, el sílice y polímeros sintéticos como el copolímero de estireno- divinilbenceno, así como algunos polisacáridos (Miller, J. M., 2005). La fase estacionaria tiene

características que pueden influir en parámetros importantes como la eficiencia o la resolución de la columna, dichas características son el tamaño de partícula, temperatura (principalmente cuando se trata de moléculas sensibles como proteínas) y pH (Ettre, L. S., 1993; Ndiripo, A., & Pasch, H., 2020), por eso el conocimiento de estas características toman peso en la selección de la fase estacionaria, además de considerar la naturaleza fisicoquímica de la muestra que se desea analizar.

4.3.1 El tamaño de partícula y la presión de trabajo.

La evolución de la CLAR ha dictado la reducción del tamaño de partícula de los empaques de la columna, empleando empaques que van de los 1.5 a 5 μm , en comparación con los empleados en la década de 1960, de alrededor de 100 μm (Snyder, L. R., 2000). Cuando las partículas de distintas distribuciones de tamaño empacadas en columnas de igual diámetro tienen en esencia la misma difusión longitudinal, las partículas de mayor tamaño poseen mayor transferencia estancada de la fase móvil porque la molécula del soluto debe recorrer una trayectoria más larga en los poros, aumentando el

ensanchamiento de las bandas. Por lo que, la disminución en el tamaño de partícula ha llevado a que los tiempos de separación disminuyan de horas a minutos, e incluso hasta segundos (Wu, N. & Clausen, A. M., 2007). Los empaques de menor tamaño de partícula proporcionan una mayor eficiencia de la columna y requieren una longitud más corta para una separación determinada, esto último se ve el impacto aun mayor, en una técnica alterna como la cromatografía de líquidos de ultra alta resolución (conocida como UHPLC), sin embargo, la presión a la que un equipo de CLAR puede trabajar va de 400 a 1000 bar (Carr, P. W. *et al.*, 2009), cabe mencionar que esta es una estimación, puesto que la presión de trabajo de cada equipo depende del mismo, es decir de sus características y la sensibilidad que pueda tener. Cuando se determina la eficiencia de la columna que se va a requerir se debe considerar el tamaño de partícula del empaque y la longitud de la columna, además, de la presión requerida para lograr la velocidad lineal óptima ya que es inversamente proporcional al cuadrado del diámetro de la partícula (Figura 1) (Hara, T., 2013).

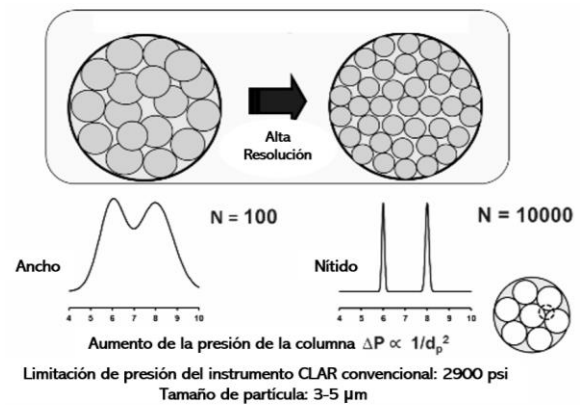


Figura 1. Ilustración de una columna de HPLC llena de partículas (recuperado de Hara, T., 2013).

4.3.2. El factor del pH involucrado en el uso de la columna cromatográfica

La sílice es la base de una columna cromatográfica, debido a que constituye a más del 90% de los empaques de las columnas empleadas en la cromatografía líquida de fase normal y de fase reversa (Berthod, A., 1991; Nag, M. *et al.*, 2020). Sin embargo, debido a la disolución de la sílice, las soluciones acuosas de ácido fluorhídrico y básico no deben utilizarse. El rango de pH de trabajo seguro en una fase móvil oscila entre los 2 y 9. Por debajo del valor de pH 2, los enlaces sílice-carbono de los empaques derivatizados se pueden romper por hidrólisis; mientras que por encima de un valor de pH 9, la sílice se solubiliza lentamente en silicato. El rango del valor de pH de trabajo aumenta cuando la densidad de unión

y/o la pureza de la sílice son altas. Una pequeña adición de silicato de sodio a la fase móvil reduce en gran medida la disolución de la sílice a un pH elevado (pH 12) en técnicas cromatográficas manuales (Miller, N. T. & DiBussolo, J. M., 1990) pero no aplicado en la automatización.

El tiempo de vida útil de la columna cromatográfica depende principalmente del pH, debido a que las columnas con sustratos de sílice fallan rápidamente si se usa una fase móvil de pH básico. Esto se sustentó desde un estudio realizado por Horváth en 1977, el cual probó eluyentes a diferentes pH, recomendando que las columnas enlazadas C₁₈ no deben usarse con eluyentes por encima de pH 7, debido a que la solubilidad de la sílice se favorece con el aumento de este (Atwood, *et al.*, 1979). Por otro lado, la separación de péptidos y proteínas a través de columnas cromatográficas a un valor de pH 2, ha demostrado que el dimetil octadecilsilano es susceptible a destrucción rápida en tales condiciones (Köhler, J. & Kirkland, J. J., 1987). Sin embargo, actualmente los fabricantes de columnas han realizado y patentado diversas innovaciones, las cuales incluyen un empaquetamiento con mayor tolerancia a los cambios de pH

empleados en las corridas analíticas, ampliando el criterio de uso y la vida útil de la misma, siendo un factor de competencia de valor agregado en el mercado de insumos cromatográficos.

4.3.3 La temperatura como factor involucrado en el análisis cromatográfico

La temperatura de trabajo de la columna cromatográfica depende de su especificación y del analito a analizar. Los péptidos y proteínas se analizan en un rango de temperatura de 5 a 65 °C (o más según sea el caso) y en diferentes composiciones de eluyente, además de forma isocrático en incrementos de 5 °C, sin permitir más de 0.5 °C de fluctuación en la temperatura (Boysen, R. I. & Hearn, M. T., 2001). Por otro lado, en un sistema líquido bifásico, la temperatura afecta la composición de las fases e influye en sus propiedades físicas tales como densidad, viscosidad y tensión interfacial. El efecto de la temperatura elevada sobre la separación entre 25 y 40 °C provoca cambios en los equilibrios líquido-líquido de los sistemas de disolventes y las propiedades físicas de las fases, así como en la retención de la fase estacionaria, eficiencia de la columna y resolución de la separación (Roehrer,

S. & Minceva, M., 2019). Es por esto que se deben considerar las especificaciones de la columna para tener un control apropiado de la temperatura para evitar la desestabilización del sistema bifásico.

No obstante, en los últimos años, se ha hecho un esfuerzo para desarrollar métodos analíticos de CLAR que sean a temperatura ambiente para que puedan ser reproducibles en cualquier área de trabajo y adaptables para los analitos analizados como lo son los medicamentos, debido a que algunos fármacos pueden ser lábiles a la temperatura. Por lo tanto, se trata de que sea un factor menos variable cuando se requiere optimizar el método o aumentar la resolución de las muestras analizadas (Bogni, A. *et al.*, 2020).

4.3.4 Otros factores involucrados en la resolución de los analitos

La resolución (R_s) proporciona una medida cuantitativa de la capacidad de la columna para separar dos analitos (Foley, J. P., 1991), es decir nos indica que tan separados están dos picos cromatográficos en relación con su anchura. La R_s se calcula a través de la ecuación 2, donde se muestra t_{R1} y t_{R2} , los cuales son los tiempos de

retención de los dos máximos (el máximo 1 se eluye primero) y W_b es el ancho de la línea base de los máximos.

Ecuación 2:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \left(\frac{k'}{1+k} \right) \cdot (a - 1)$$

Factor de
Factor de
Factor de
eficiencia
retención
selectividad

o de capacidad
o retención relativa

$$R_s = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{(W_{b1} + W_{b2})/2}$$

Sin embargo, la resolución se ve influida por dos efectos principales que intervienen en el mecanismo de separación: físico (cinéticos) y químico (termodinámicos). Los efectos físicos se relacionan con factores como la eficiencia de la columna, generalmente medida por el recuento de platos (N), y los químicos se relacionan con la retención o capacidad de la columna y con la selectividad o retención relativa (Rizzi, A., 1998, Tijssen, R. 1998).

Se puede decir que la resolución satisfactoria corresponde a los valores de R_s en el rango de 1-1.5, pero esto depende en parte de la relación de la altura del pico, para definir un valle entre dos máximos de igual altura es necesaria una resolución de 0.6, un

valor de 1 causa un traslape de 2.3% de dos máximos de igual ancho, y se considera lo mínimo en una separación para permitir una buena cuantificación. Una resolución de 1.5 origina un traslape de 0.1% para máximos de igual ancho e igual altura (Christian, G.D., 2009). Las separaciones con R_s mayores que 1 pero menores que 1.5 son adecuadas (suficientes) y se consideran óptimas (Tijssen, R. 1998).

Las columnas empacadas de partículas pequeñas (3-10 μm) que funcionan para dar valores de k' de soluto de aproximadamente 1-10, proporcionan una resolución excelente. Los efectos químicos, como los describe el factor de selectividad, no se comprenden tan bien ni son tan predecibles como los efectos físicos. Por lo general, no es posible a partir de principios básicos predecir la influencia de la composición de la fase móvil o la temperatura sobre las características de retención relativa de diferentes compuestos. Sin embargo, los cambios en la selectividad química son la variable más importante que conduce a separaciones adecuadas. (Glajch, J. L. & Kirkland, J. J., 1983).

No obstante, los efectos de la selectividad química se comprenden

poco, debido a que el factor de retención depende de diferentes parámetros, tales como pH, temperatura, composición de la fase móvil (fracciones de volumen de solvente polar) y fase estacionaria. Se ha descrito que muchas ecuaciones relacionan el factor de retención (k') con uno o más de estos parámetros, denominándolos modelos de retención. El modelado de retención ajusta los datos experimentales para medir la eficiencia con referente a la anchura de los picos (Broeckhoven & Desmet, 2021).

5. El análisis de las moléculas separadas por la técnica CLAR provenientes de los medicamentos

La obtención de los datos de las muestras es a través de un dispositivo que realiza medidas del cambio de composición del efluente, en régimen de flujo continuo de acuerdo con la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) es decir del detector cromatográfico. Estos detectores son capaces de medir bajas concentraciones de los analitos y sus propiedades moleculares, con aceptable sensibilidad, precisión y linealidad. Los detectores se pueden clasificar en tres tipos (IUPAC, 1997):

1) los universales, los cuales responden a todos los cambios de una propiedad física común a todas las especies analizadas, sean analitos o contaminantes de la columna excepto a la fase móvil, ejemplo de estos son los detectores refractométricos (Ching, C. B., *et al.*, 1993), 2) los detectores selectivos, que responden a un grupo relacionado de componentes de la muestra en el efluente de la columna como, por ejemplo, absorber la radiación de una longitud de onda dada y 3) los específicos, que responde a un solo componente de la muestra o a un número limitado de componentes que tienen características químicas similares siendo insensibles a otros analitos, metabolitos o contaminantes. Es por lo que a continuación se profundiza sobre los detectores empleados para diversos analitos y en especial en la industria farmacéutica.

5.1 Los detectores empleados en el análisis de fármacos

Existen diferentes tipos de detectores para la CLAR, estos se basan en la medición de la absorción de luz (detector fotométrico) (Huber, J. F. K & van Vught, G., 1965), como son el espectrofotómetro de UV (Jentoft, R. E. & Gouw, T. H., 1968) y el de

fluorescencia (Wróblewski, K., *et al.*, 2019); también existen los que se basan en la medición del índice de refracción (detector refractométrico) (Bombaugh, K. J. & Little, J. N., 1964), así como de ionización de gas por radiación o llama (Magss, R. J., 1968). Otros son mediante el cambio de temperatura debido a la sorción (detector calorimétrico) (Hupe, K. P. & Bayer, E., 1967) y por emisión radiactiva (detector radiométrico) (Wan, D. *et al.*, 2014), así como reacción electroquímica (detector polarográfico) (Hanekamp, H. B. *et al.*, 1980).

Los detectores más utilizados en la industria farmacéutica empleados en la determinación cuantitativa de contenido de formulaciones farmacéuticas, son los de UV-Vis, detector de diodos array (DAD) y dispersión de luz evaporativa (ELS) (Martino, R. *et al.*, 2010).

6. Las variantes e innovación de la técnica de cromatografía de líquidos empleada para el análisis de medicamentos

Históricamente la cromatografía de líquidos se ha podido subdividir según el tipo de proceso de equilibrio que se maneje, algunos ejemplos para el

equilibrio son: adsorción , intercambio iónico (separación basada en cargas eléctricas) y exclusión por tamaño (separación basada en el tamaño molecular), y de partición, dentro de esta última se encuentra dividida en de fase normal, fase reversa e interacción hidrofílica (Galea, *et al.*, 2016), las cuales se describen a continuación.

▪ **Cromatografía de fase normal**

La cromatografía en fase normal usa una fase estacionaria polar de siloxano unido con un grupo funcional polar ciano <diol <amino <dimetilamino (Snyder, L. R. *et al.*, 1997) con una fase móvil no polar como n-hexano, cloruro de metileno o cloroformo. El componente menos polar eluye primero; aumentar la polaridad de la fase móvil disminuye el tiempo de elución. (Snyder, L. R. *et al.*, 2011).

Esta forma de cromatografía es muy baja la incidencia en el análisis de muestras analíticas, por lo que solo algunos casos específicos de medicamentos podrían analizarse a través de esta técnica.

▪ **Cromatografía de fase reversa**

La popularidad de la cromatografía de fase reversa en la industria farmacéutica se debe en gran parte a su compatibilidad de la fase móvil con la sustancia farmacéutica polar típica, las eficiencias más altas asociadas con este modo, los tiempos de reequilibrio más cortos y la capacidad de ejecutar métodos de gradiente que cubren un amplio rango de polaridad, lo que le permite separar compuestos no polares, polares, ionizables e iónicos, a veces al mismo tiempo. Las fases móviles están compuestas por una proporción acuosa (a menudo tamponada) y un disolvente orgánico miscible en el medio acuoso, tal es el caso del metanol o acetonitrilo, los cuales deben contar una elevada pureza (Snyder, L. R. *et al.*, 2010).

Esto permite su uso en el control de reacciones, la calificación de intermedios sintéticos y las pruebas de estabilidad y liberación de la sustancia farmacéutica.

Tabla 3. Ventajas y desventajas de la CLAR en fase normal respecto a la fase reversa (recuperado y modificado de Snyder, L. R. *et al.*, 2011

Ventajas	Desventajas
1. Es posible realizar cambios muy importantes en la selectividad de la separación cambiando la fase móvil o el relleno de la columna (especialmente para los rellenos inorgánicos como la sílice).	1. Las muestras iónicas se separan más fácilmente mediante fase reversa.
2. Las columnas son bastante estables cuando se utilizan fases móviles no acuosas.	2. El control de la concentración del disolvente puede ser menos predecible que en fase reversa.
3. Muchos compuestos orgánicos son más solubles en disolventes de fase normal (una ventaja especial en la CLAR preparativa).	3. El número de platos de la columna en fase normal a veces es menor que en fase reversa.
4. La caída de presión es menor debido a los solventes de menor viscosidad.	4. Los disolventes de bajo punto de ebullición son más propensos a la evaporación y la formación de burbujas, especialmente a temperaturas más altas.
5. Útil para muestras que pueden descomponerse en soluciones acuosas.	5. La retención puede ser variable debido a la absorción de agua por el relleno de sílice de la columna.
	6. Mayor costo de compra y eliminación de disolventes orgánicos

6.1 La cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC) como alternativa

La cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC), es una técnica de cromatografía líquida de fase normal, con una fase móvil acuosa, es decir los disolventes polares contienen agua como componente menor de la fase móvil y la fase estacionaria es polar (Alpert, A. J., *et al.*, 1990) este tipo de cromatografía sirve para separar solutos polares no ionizados como péptidos, aminoácidos, carbohidratos (Alpert, A. J. *et al.*, 1994, Churms, S. C., 1996). Las columnas se utilizan normalmente con un gradiente

orgánico decreciente o un gradiente de sal creciente. El orden de elución es de menos polar a más polar.

6.2 La selección de las columnas cromatográficas de acuerdo con los tipos de cromatografía

Existe una gran cantidad de empaques disponibles para cada tipo de técnica cromatográfica que se vaya a realizar, es decir para el caso de cromatografía de fase reversa existen más de 600 columnas disponibles en el mercado (Dehouck *et al.*, 2004), la clasificación de columnas no es posible con un solo parámetro, tal como lo

describe Dehouck en su estudio para clasificar de manera racional las columnas mediante un número mínimo de parámetros de prueba de columna, si bien es cierto que existen diferentes pruebas que permiten medir ciertas características de la columna como es la hidrofobicidad, Engelhardt describe un procedimiento de prueba estándar que se utilizó para caracterizar las columnas de fase reversa con respecto a su hidrofobicidad y la actividad silanofílica de los grupos silanol accesibles. En su artículo también menciona que utilizaron una mezcla de eluyente sin tampón para diferenciar las fases estacionarias con respecto a su actividad silanofílica. (Engelhardt *et al.*, 1997).

Además, existen otro tipo de pruebas que no son destructivas que destacan las propiedades de la fase estacionaria, tal es el caso de la eficiencia de la columna, la actividad del silanol, la capacidad de intercambio iónico, la selectividad estérica y la cantidad de impurezas metálicas (Dehouck *et al.*, 2004).

Debido a que existe una gran cantidad de parámetros que sirven para medir la selectividad de una columna, un estudio realizado por Viski y colaboradores en el 2003, describen parámetros que permiten mantener la

clasificación de columnas de tipo C18, los cuales se pueden determinar con 3 métodos cromatográficos reproducibles.

Una de las marcas más reconocidas de empaques es ACE C18, en 2012 las columnas RP-HPLC eran las más populares y representaban el 93% de las columnas utilizadas en la industria y en la investigación (Majors, 2012), lo cual se mantuvo desde el 2007 (Majors, 2007) de todas las separaciones por CLAR, especialmente en aplicaciones farmacéuticas, siendo C18 y C8 las fases más populares.

7. Generalidades y su cuidado del equipo de cromatografía líquida de alta resolución empleado para el análisis de los medicamentos

Para el funcionamiento del equipo de CLAR son necesarios cinco módulos que deben estar presentes, los cuales se muestran en la figura 2, estos componentes esenciales son: 1) el reservorio del solvente que contiene la fase móvil, 2) la bomba de alta presión utilizada para empujar la fase móvil a través de la columna compacta; la cual puede ser isocrática, binaria o cuaternaria, 3) el inyector que generalmente contiene un *loop* (bucle)

de muestra, utilizado para introducir la muestra en la fase móvil, y 4) la columna, comúnmente un tubo de acero inoxidable de 10 a 30 cm de largo, 3 o 4 mm de diámetro interno, con empaque de pequeñas partículas como ya se mencionó en las secciones anteriores (McNair, H. M., 1982), además de 5) un detector como los ya mencionados, el cual está conectado a un procesador de los datos, que genera los cromatogramas con los cálculos.

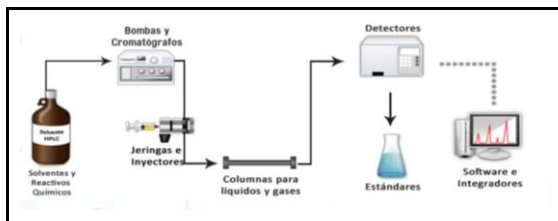


Figura 2. Diagrama general de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución.

Por otro lado, la CLAR es un método costoso y sofisticado que requiere un alto costo de mantenimiento (Shakila R. J. *et al.*, 2001). Parte del mantenimiento que se debe dar son condiciones de limpieza para operar el equipo. De manera general, al llevar a cabo una nueva corrida cromatográfica se debe de realizar la purga de los canales o líneas. Para purgar las líneas, se debe establecer el valor porcentual del eluyente, generalmente es del 100%, así como un tiempo definido y necesario para garantizar que la línea se encuentre purgada completamente. Si bien se debe purgar

cada una de las líneas que constituye el sistema cromatográfico, opcionalmente solo se pueden purgar aquellas líneas que van a ser utilizadas y no es necesario realizar una purga diaria a menos que el sistema no haya estado en funcionamiento durante mucho tiempo. La fase móvil por emplear debe ser filtrada y desgasificada antes de su uso y las líneas deben sumergirse correctamente en el solvente. Además, deben limpiarse las botellas o frascos de disolventes y siempre se tiene que verificar el crecimiento de hongos o cualquier suciedad antes de su uso (Jaiswal, A. K. *et al.*, 2017). En caso de existir residuos microbianos, generalmente bacterias, al romper la pared celular quedan sus secreciones poliméricas y fragmentos celulares de lipopolisacáridos, que pueden generar picos en los cromatogramas (Berry, V. N., 1982). Para eliminarlos, se debe retirar la columna y lavar el sistema (pero no el detector) con una solución de hidróxido de sodio 0.5 M y luego con abundante agua. Posterior a esto, el instrumento se puede desengrasar eficazmente lavando todas las líneas de disolvente con metanol al 100%, seguido de diclorometano al 100% y luego de nuevo con metanol al 100% (Williams, S., 2004). Todo esto para el

uso continuo del equipo en los diferentes análisis que se necesitan llevar a cabo en las diferentes áreas de la industria farmacéutica.

8. El cuidado de las fases estacionarias mediante el uso de pre-columnas como factor para aumentar la vida útil en el análisis de medicamentos

Las pre-columnas o también llamadas columnas de protección, como su nombre lo indica, se colocan antes de la columna y tienen como propósito principal proteger la columna cromatográfica para extender su vida útil. La vida útil de la columna de protección afecta directamente en el costo y la calidad del análisis (Lee, B. D., 2016). Las columnas pequeñas pre empacadas se utilizan comúnmente para estimar los parámetros de ejecución óptimos para escala piloto en la industria farmacéutica y de producción, también son ampliamente utilizadas por la industria biofarmacéutica para separaciones preparativas de proteínas, otras biomoléculas (Schweiger, S. & Jungbauer, A., 2018). Las pre-columnas modernas tienen un diámetro interno (DI) de 0.45-1 cm, con una longitud que va de 25-60 cm, contienen

partículas pequeñas de aproximadamente 15 μm o menos, que dan como resultado decenas de miles de platos teóricos por metro. Se pueden operar a velocidades de flujo de hasta 1 mL/min dando tiempos de ejecución menores a 20 min (Irvine, G. B., 1997), ejemplo de esto es la pre-columna *MediaScout® RoboColumns®* (Atoll, Weingarten, Alemania), diámetro interno: 0.5 cm, longitud de la columna: 1.2 cm (Susanto, A. *et al.*, 2008).

Otras matrices empleadas en las pre-columnas son las perlas de polímero de poliestireno-divinilbenceno de 5 μm con dimensiones de 15 cm \times 0.46 cm. (Mohammad, J. *et al.*, 1999). La precolumna puede causar una reducción en la eficiencia de la columna, por ello, se sugiere que en columnas analíticas de corta longitud, se reduzca su uso, preferiblemente reducir el diámetro interno; cuando son pre columnas de sílice, la fase móvil debe contener suficiente agua u otros modificadores para asegurar que la precolumna no pueda ser más activa que la columna principal, y cuando es el caso de fases reversas, la pérdida de eficiencia se puede reducir utilizando menos empaques de retención en la precolumna que en la columna principal (Lundanes, E. *et al.*, 1983).

9. El desarrollo y validación de métodos cromatográficos empleados en la industria farmacéutica

La validación de los métodos analíticos es un proceso de gran relevancia en la industria farmacéutica, puesto que es un requerimiento establecido por la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2015, Buenas prácticas de fabricación de medicamentos, la cual define a la validación como “la evidencia documental generada a través de la recopilación y evaluación científicas de los datos obtenidos en la calificación y de las pruebas específicas, a lo largo del todo el ciclo de vida de un producto, cuya finalidad es demostrar la funcionalidad, consistencia y robustez de un proceso dado en cuanto a su capacidad para entregar un producto de calidad”.

Existen diferentes organizaciones que brindan guías sobre los parámetros de desempeño de la validación, entre estas se encuentran las internacionales como el Consejo Internacional para la Armonización de Requisitos Técnicos para Productos Farmacéuticos de Uso Humano (ICH) que actualizó la guía ICH Q2(R1), en

2021, así como la instancia de Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (*Food Drug Administration*, FDA) publicada en el 2015 y las guías nacionales como el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México (CNQFBM) publicada en 2002. A partir de estas guías, la industria farmacéutica nacional se orienta para llevar a cabo la validación de los métodos analíticos empleados en las diversas áreas de la manufactura y control de calidad, por lo que es indispensable conocer los parámetros de desempeño que se describen a continuación.

9.1 Parámetros de desempeño en la validación de métodos empleados en el análisis de medicamentos

▪ Adecuabilidad del sistema

De primera instancia, un parámetro que es básico en la validación de un método analítico es la adecuabilidad, la cual verifica que el equipo de CLAR opera con base a criterios preestablecidos, que permitan asegurar la confiabilidad de los resultados que brinda el método en un análisis de un medicamento. Los criterios de aceptación varían de guía a

guía, pero de acuerdo con la establecida por el CNQFBM son: coeficiente de variación (CV) menor a 2% para la respuesta analítica, una resolución (R_s) mayor a 2, un factor de coleccionamiento (T) menor a 2, además de un factor de capacidad (K) entre 2 y 10, así como un número de platos teóricos (N) mayor a 2000 y el factor de selectividad (α) mayor a 1.

- **Linealidad**

Una vez iniciada la validación, la linealidad es el parámetro que se encarga de asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática definida, sean proporcionales a la concentración del analito, dentro de un intervalo determinado.

Este parámetro se realiza por triplicado con 5 niveles de concentración de la solución de referencia. La concentración central debe ser igual a la que se prepara la solución de referencia del fármaco con respecto al método, siendo también la concentración que represente el 100% en la muestra procesada para su medición. Por lo tanto, para aceptar la linealidad, se debe obtener un coeficiente de determinación r^2 mayor o igual a 0.98.

- **Especificidad**

Este parámetro determina la capacidad de un método analítico para obtener una respuesta que sea única del analito de interés o fármaco, en relación con otros componentes que llegara a tener la muestra como pueden ser productos de degradación o impurezas.

- **Exactitud**

Este parámetro de desempeño nos muestra la concordancia entre un valor obtenido empleando el método cromatográfico y el valor de referencia del fármaco. Este proporciona un indicador de cualquier error sistemático o sesgo en el método. Y se obtiene generalmente a partir de experimentos de recuperación al agregar cantidades conocidas de los compuestos activos de fármaco de trabajo a las muestras reales y se informan como porcentaje de recobro, las cuales deben estar entre el 98 y 102%.

- **Precisión**

Es este parámetro incluido en una validación, muestra el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el

procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto o medicamento. La repetibilidad, la precisión intermedia y la reproducibilidad son los tres niveles de precisión. La repetibilidad y la reproducibilidad del método se miden con la desviación estándar y el CV. Este parámetro indica los errores aleatorios o intermedios en el método, y la precisión de un procedimiento analítico generalmente se expresa como la varianza, la desviación estándar o el coeficiente de variación de una serie de mediciones.

- **Robustez**

Finalmente, la robustez es la capacidad del método analítico de mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas, en los parámetros normales de operación del método analítico, como factores instrumentales

(temperatura de la columna, presión en la columna, velocidad de flujo, etc.) y/o factores no instrumentales (pH de fases, volúmenes de solventes orgánicos para extracción) indispensables para la valoración de un fármaco contenido en un medicamento y así comprobar su calidad.

10. La aplicación de la técnica de CLAR en medicamentos.

La CLAR es una técnica usada en una amplia gama de medicamentos, por lo general se pueden clasificar en grupos de medicamentos, para fines prácticos en la tabla 5 se recopila características de distintas aplicaciones de la CLAR que van desde: contenido, pruebas de impurezas hasta identificación, para algunos medicamentos pertenecientes al grupo de los antibióticos (Abdelrahman, M. M. *et al.*, 2018).

Tabla 4. Parámetros de desempeño para la validación de métodos analíticos (Recuperado de CNQFBM, 2002).

Parámetro de desempeño	Contenido/ Potencia/ Valoración	Pruebas de Impurezas		Identificación
		Contenido/ Valoración	Límite	
Precisión / Adecuabilidad del sistema	Si	Si	Si	*
Linealidad del sistema	Si	Si	No	No
Especificidad	Si	Si	Si	Si
Exactitud y Repetibilidad	Si	Si	No	No
Linealidad del método	Si	Si	No	No
Precisión del método o precisión intermedia	Si	Si	No	No
Límite de detección	No	No	Si	No
Límite de cuantificación	No	Si	No	No
Robustez	*	*	*	No

* Puede ser requerido dependiendo de la naturaleza del método

Tabla 5. Recopilación de parámetros analíticos de CLAR aplicados en métodos validados de antibióticos

Principio activo	Columna		Detector	Linealidad (µg/mL)		Precisión (CV)	Exactitud	Límite de cuantificación	Límite de detección	Adecuabilidad				Referencia
	Marca	Tamaño		r ²	rango					Rs	a	k	N	
Amoxicilina	Phenomene x Luna C18	250 mm x 4.6 mm, 5.0 µm	DAD	0.99	0.03 - 0.1 mg/mL	3.7-7.2% y 5.3-7.6%,	76.1 a 81.6%	103.0 mg/kg.	51.2 mg/kg	-	-	2	-	(Patyra, E., & Kwiatek, K. 2020)
Amoxicilina y ácido clavulánico	Thermo Hypersil Zorbax BDS C18	250 mm x 4.6 mm, 3.0 µm	PAD	0.9996	0.805, y 0.400 - 1.186 y 0.601 mg/mL	0.05% y 0.06%	99.7–100.5% y 99.0–100.5%	-	-	-	-	-	-	(Bellur Atici, E. <i>et al.</i> , 2017)
Ampicilina	C ₁₈ -ODS a Phenomene x	250 mm x 4.6 mm. 5 µm	UV-VIS	0.9998	5–40 µg/mL	0.530 %	100.266-100.454 %	4.75 µg/mL	1.56 µg/mL	2.39	2.3	1.03	-	(Abdelrahman, M. M. <i>et al.</i> , 2018)
Cefalexina	Waters µBondapak® C18	250 x 4.6 mm, 10 µm	UV-VIS	0-9997	30-300 µg/mL	0.13–0.30%	102.71-104.77%	21.58 µg/mL	7.12 µg/mL	-	-	-	2785	(Elkady, E. F., & Abbas, S. S., 2011)
Cefoperazona			UV-VIS	0.9997	30-300 µg/mL	0.07-0.14%	102.29-103.37%	21.31 µg/mL	7.03 µg/mL	-	-	-	3168	

Ceftriaxona			UV-VIS	0.9999	30-300 µg/mL	0.19-0.91%	101.42-101.7%	14.47 µg/mL	4.77 µg/mL	-	-	-	2201	
Ceftazidima			UV-VIS	0.9998	30-300 µg/mL	0.11-0.12%	101.29-102.09%	20.72 µg/mL	6.84 µg/mL	-	-	-	3106	
Cefepima			UV-VIS	1	30-300 µg/mL	0.03-0.15%	99.56-100.06%	4.89 µg/mL	1.61 µg/mL	-	-	-	-	
Pefloxacino	Eclipse XDB C18	4.6 × 150 mm, 5 µm	DAD	0.9996	0.05-20 µg/mL	0.97%	99.7%	0.086 µg/mL	0.025 µg/mL	-	-	6	9700	(Asu, S. P. <i>et al.</i> , 2021)
Ofloxacino			DAD	0.9999	0.05-20 µg/mL	0.86%	99.9%	0.042 µg/mL	0.011 µg/mL	8.62	-	8.7	11514	
Norfloxacino			DAD	0.9994	0.05-20 µg/mL	0.91%	99.7%	0.075 µg/mL	0.022 µg/mL	3.5	-	10	12827	
Ciprofloxacino			DAD	0.9998	0.05-20 µg/mL	0.81%	100.1%	0.079 µg/mL	0.023 µg/mL	3.7	-	11.6	14003	
Moxifloxacino			DAD	0.9999	0.05-20 µg/mL	0.85%	99.6%	0.051 µg/mL	0.01 µg/mL	28.14	-	19.9	25692 ⁸	
Clarithromicina	Discovery C18	250 × 4.6 mm, 5 µm	UV-VIS	0.9995	2.5-100 µg/mL	1.473%	98.921-101.88%	3.43 × 10 ⁻² µg/mL	1.132 × 10 ⁻² µg/mL	8.26	1.86	5.5	8534	(Darwish, K. M. <i>et al.</i> , 2013)

DAD= Detector de diodo array, PAD=Detector amperométrico de pulsos.

11. Conclusión

La CLAR resulta tener una gran relevancia dentro de los métodos de análisis que garantizan la calidad de los productos farmacéuticos. Para garantizar que los métodos analíticos utilizados en la industria cumplen con su propósito deben ser validados en base a parámetros establecidos por organizaciones internacionales y/o nacionales, con la finalidad de encontrar las mejores condiciones analíticas. La constante actualización y avances en los parámetros e insumos analíticos la posiciona como método de elección en la determinación y valoración de productos farmacéuticos.

12. Referencias

1. Abdelrahman, M. M., Naguib, I. A., Elsayed, M. A., & Zaazaa, H. A. (2018). Chromatographic Methods for Quantitative Determination of Ampicillin, Dicloxacillin and Their Impurity 6-Aminopenicillanic Acid. *Journal of chromatographic science*, 56(3), 209–215.
2. Alpert, A. J. (1990). Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *Journal of chromatography A*, 499, 177-196
3. Alpert, A. J., Shukla, M., Shukla, A. K., Zieske, L. R., Yuen, S. W., Ferguson, M. A. & Orlando, R. (1994). Hydrophilic-interaction chromatography of complex carbohydrates. *Journal of chromatography A*, 676(1), 191-202.
4. Asu, S. P., Sompalli, N. K., Mohan, A. M., & Deivasigamani, P. (2021). Chromatographic Separation of Fluoroquinolone Drugs and Drug Degradation Profile Monitoring through Quality-by-Design Concept. *Journal of chromatographic science*, 59(1), 55–63.
5. Atwood, JG, Schmidt, GJ y Slavin, W. (1979). Mejoras en la vida útil de la columna de cromatografía líquida y la flexibilidad del método al saturar la fase móvil con sílice. *Journal of Chromatography A*, 171, 109-115.
6. Awotwe-Otoo, D., Agarabi, C., Faustino, P. J., Habib, M. J., Lee, S., Khan, M. A., & Shah, R. B. (2012). Application of quality by design elements for the development and optimization of an analytical method for protamine sulfate. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 62, 61–67.
7. Baeza-Baeza, J. J., & García-Alvarez-Coque, M. C. (2020). Peak dispersion in gradient elution: An insight based on the plate model. *Journal of chromatography. A*, 1613, 460670.
8. Bellur Atici, E., Yazar, Y., Ağtaş, Ç., Ridvanoğlu, N., & Karlığa, B. (2017). Development and validation of stability indicating HPLC methods for related substances and assay analyses of amoxicillin and potassium clavulanate mixtures. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 136, 1–9.
9. Berry, V. N. (1982). *Universal liquid chromatography methods*. *Journal of Chromatography A*, 236(2), 279–296.
10. Berthod, A. (1991). Silica: backbone material of liquid chromatographic column packings. *Journal of Chromatography A*, 549, 1-28.
11. Bogni, A., Laera, L., Cucchi, C., Seregni, E., & Pascali, C. (2020). Tetrabutylammonium HPLC analysis: shortcomings in the Ph. Eur. method. *Journal of labelled compounds & radiopharmaceuticals*, 63(4), 203–208.
12. Bombaugh, K. J., & Little, J. N. (1964). An investigation of liquid-liquid chromatography with a recording detector. *Journal of Chromatography A*, 16, 47-54.

13. Boysen, R. I., & Hearn, M. T. (2001). HPLC of peptides and proteins: standard operating conditions. *Current protocols in molecular biology*, 54(1), 10-13.
14. Broeckhoven, K., & Desmet, G. (2021). Methods to determine the kinetic performance limit of contemporary chromatographic techniques. *Journal of Separation Science*, 44(1), 323–339.
15. Caliaro, G. A., & Herbots, C. A. (2001). Determination of pK(a) values of basic new drug substances by CE. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 26(3), 427–434.
16. Carr, P. W., Wang, X., & Stoll, D. R. (2009). Effect of pressure, particle size, and time on optimizing performance in liquid chromatography. *Analytical chemistry*, 81(13), 5342–5353.
17. Ching, C. B., Hidajat, K., & Rao, M. S. (1993). *Liquid chromatographic studies for essential fatty acids on a commercial alkyl phenyl bonded silica column*. *Chromatographia*, 35(7-8), 399–402.
18. Christian, G. D. (2009). *Química analítica* 6a. ed. mcgraw-hill interamericana. México., 21, pp. 604-625
19. Churms, S. C. (1996). *Recent progress in carbohydrate separation by high-performance liquid chromatography based on hydrophilic interaction*. *Journal of Chromatography A*, 720(1-2), 75–91.
20. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México (CNQFBM) (2002). *Guía de Validación del Método Analítico*.
21. Darwish, K. M., Salama, I., Mostafa, S., & El-Sadek, M. (2013). RP-HPLC/pre-column derivatization for analysis of omeprazole, tinidazole, doxycycline and clarithromycin. *Journal of chromatographic science*, 51(6), 566–576.
22. Dehouck, P., Visky, D., Heyden, Y. V., Adams, E., Kovács, Z., Noszál, B., Massart, D. L., & Hoogmartens, J. (2004). Characterisation of reversed-phase liquid-chromatographic columns by chromatographic tests: Comparing column classification based on chromatographic parameters and column performance for the separation of acetylsalicylic acid and related compounds. *Journal of Chromatography A*, 1025(2), 189–200.
23. Devi, N., Sarmah, M., Khatun, B., & Maji, T. K. (2017). Encapsulation of active ingredients in polysaccharide-protein complex coacervates. *Advances in colloid and interface science*, 239, 136–145.
24. Diario Oficial de la Federación. (2015) Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2015, Buenas prácticas de fabricación de medicamentos.
25. Díaz-Cruz, M. S., López de Alda, M. J., & Barceló, D. (2003). *Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge*. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22(6), 340–351.
26. Elkady, E. F., & Abbas, S. S. (2011). Development and validation of a reversed-phase column liquid chromatographic method for the determination of five cephalosporins in pharmaceutical preparations. *Journal of AOAC International*, 94(5), 1440–1446.
27. Elser, C., & Richmond, F. J. (2019). Validation Master Plans: Progress of Implementation in the Pharmaceutical Industry. *Therapeutic innovation & regulatory science*, 53(3), 354–363.
28. Engelhardt, H., Arangio, M., & Lobert, T. (1997). A chromatographic test procedure for reversed-phase HPLC column evaluation. *LC GC*, 15(9), 856-866.
29. Ettre, L. S. (1993). Nomenclature for chromatography (IUPAC Recommendations 1993). *Pure and Applied Chemistry*, 65(4), 819-872.

30. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) 11 ed. México; 2014. Secretaría de Salud, Comisión permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.
31. FDA draft guidance (2015). Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. U.S. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/analytical-procedures-and-methods-validation-drugs-and-biologics>
32. Foley, J. P. (1991). *Resolution equations for column chromatography*. *The Analyst*, 116(12), 1275.
33. Galea, C., Mangelings, D., & Vander Heyden, Y. (2015). Characterization and classification of stationary phases in HPLC and SFC – a review. *Analytica Chimica Acta*, 886, 1–15.
34. García, A. & Yusa, D. J. (2016). HPLC INSTRUMENTAL. *Colección Manual de referencia. Editorial Universitat Politècnica de València*. 2. pp. 5-11
35. Giddings, J. C., Gudzinowicz, B. J., Snyder, L. R., Kaiser, R., & Dekker, M. (1965). *Chromatographic Science. Dynamics of Chromatography Part I Principles and Theory*. 2, pp. 29-37
36. Glajch, J. L., & Kirkland, J. J. (1983). Optimization of selectivity in liquid chromatography. *Analytical chemistry*, 55(2), 319-336.
37. Hanekamp, H. B., Voogt, W. H., Bos, P., & Frei, R. W. (1980). A pulse polarographic detector for HPLC; determination of nitrazepam. *Journal of Liquid Chromatography*, 3(8), 1205-1217.
38. Hara, T. (2013). *Study on preparation and characterization of monolithic silica capillary columns for high separation efficiency in high performance liquid chromatography* (Doctoral dissertation, Universitätsbibliothek).
39. Horváth, C., Melander, W., & Molnar, I. (1977). Liquid chromatography of ionogenic substances with nonpolar stationary phases. *Analytical Chemistry*, 49(1), 142-154.
40. Huber, J. F. K., & van Vught, G. (1965). *Messung von Diffusionskoeffizienten in Gasen und Flüssigkeiten nach der Arbeitsweise der Chromatographie. Berichte Der Bunsengesellschaft Für Physikalische Chemie*, 69(9-10), 821–826.
41. Hughes, D., & Andersson, D. I. (2017). Evolutionary Trajectories to Antibiotic Resistance. *Annual review of microbiology*, 71, 579–596.
42. Hupe, K. P., & Bayer, E. (1967). A micro adsorption detector for general use in liquid chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, 5(4), 197-201.
43. ICH Guideline Q2 (R1) (2021) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Guidance for Industry. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/q2r1-validation-analytical-procedures-text-and-methodology-guidance-industry>
44. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2016). Estadísticas a propósito de la Industria farmacéutica *Censos Económicos 2014*. https://inegi.org.mx/contenidos/productos/pr_od_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/nueva_estruc/702825088583.pdf último acceso 20/09/2021
45. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2017). Industria Farmacéutica. Situación macroeconómica. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/119065/Sector_Industria_Farmacaceutica.pdf. último acceso 20/09/2021
46. Irvine, G. B. (1997). *Size-exclusion high-performance liquid chromatography of peptides: a review*. *Analytica Chimica Acta*, 352(1-3), 387–397.

47. IUPAC. (1997). *Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book")*. Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford. Online version (2019-) created by S. J. Chalk. ISBN 0-9678550-9-8.
48. Jaiswal, A. K., Choudhary, P., Tyagi, S., & Gupta, M. (2017). Standard operating procedure (SOP) of – high performance liquid chromatography system (HPLC). *Int. J. Med. Lab. Res.* 2(3), 67-75.
49. Jentoft, R. E., & Gouw, T. H. (1968). *High-resolution liquid chromatograph*. *Analytical Chemistry*, 40(6), 923–927.
50. Jo, M. J., Jin, I. S., Park, C. W., Hwang, B. Y., Chung, Y. B., Kim, J. S., & Shin, D. H. (2020). Revolutionizing technologies of nanomicelles for combinatorial anticancer drug delivery. *Archives of pharmacal research*, 43(1), 100–109.
51. Karger, B.L., Snyder, L.R. y Horváth, C. (1973) *An Introduction to Separation Science*. New York Wiley & Sons. 4(7), pp:136-142
52. Klang, M. G., & Williams, L. A. (2016). Quality Control Analytical Methods: Method Validation. *International journal of pharmaceutical compounding*, 20(5), 381–386.
53. Kommareddy, S., Nigam, R. S., & Kumar, S. (2021). Development and validation of a stability-indicating RP-HPLC method for the identification, determination of related substances and assay of dimethyl fumarate in drug substance. *Annales pharmaceutiques francaises*, 79(2), 179–193.
54. Köhler, J., & Kirkland, J. J. (1987). Improved silica-based column packings for high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 385, 125-150.
55. Kumar, S., Negi, S., & Maiti, P. (2017). Biological and analytical techniques used for detection of polyaromatic hydrocarbons. *Environmental science and pollution research international*, 24(33), 25810–25827.
56. Lee, B. D. (2016). Reuse of HPLC Guard Column by Ultrasonic Cleaning. *Journal of the Korean Applied Science and Technology*, 33(3), 459-465.
57. Li, M., Du, C., Guo, N., Teng, Y., Meng, X., Sun, H., Li, S., Yu, P., & Galons, H. (2019). Composition design and medical application of liposomes. *European journal of medicinal chemistry*, 164, 640–653.
58. López, E. P. (2015). Propuesta de diseño e innovación de un producto, basado en el rediseño de un HPLC. *Pensamiento Actual*, 15(25), 99-111.
59. Lundanes, E., Døhl, J., & Greibrokk, T. (1983). Guard Columns in HPLC: An Examination of the Effect of MPLC™ Cartridge Guard Columns on Column Efficiencies and Some Theoretical Aspects of the Use of Guard Columns. *Journal of Chromatographic Science*, 21(5), 235-240.
60. Mandrioli, M., Tura, M., Scotti, S., & Gallina Toschi, T. (2019). Fast Detection of 10 Cannabinoids by RP-HPLC-UV Method in *Cannabis sativa* L. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(11), 2113
61. Maggs, R. J. (1968). *A commercial detector for monitoring the eluent from liquid chromatographic columns*. *Chromatographia*, 1(1-2), 43–48.
62. Majors, R. E. (2007). Current Trends in HPLC Column Usage. *LCGC North Am.*, 25, 532–544
63. Majors, R. E. (2012). Current Trends in HPLC Column Usage. *LC-GC Asia Pacific*, 15(1), 1–15.
64. Martino, R., Malet-Martino, M., Gilard, V., & Balayssac, S. (2010). *Counterfeit drugs: analytical techniques for their identification*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398(1), 77–92.
65. McNair, H. M. (1982). *Equipment for HPLC--V*. *Journal of Chromatographic Science*, 20(12), 537–550.

66. Miller, J. M. (2005). *Chromatography: concepts and contrasts*. John Wiley & Sons. 3(1). pp.67-68
67. Miller, N. T., & DiBussolo, J. M. (1990). Studies on the stability of n-alkyl-bonded silica gels under basic pH conditions. *Journal of Chromatography A*, 499, 317-332.
68. Mohammad, J., Jäderlund, B., & Lindblom, H. (1999). New polymer-based prepacked column for the reversed-phase liquid chromatographic separation of peptides over the pH range 2–12. *Journal of Chromatography A*, 852(1), 255-259.
69. Moody, H. W. (1982). *The evaluation of the parameters in the van Deemter equation*. *Journal of Chemical Education*, 59(4), 290.
70. Mooney, K. G., Mintun, M. A., Himmelstein, K. J., & Stella, V. J. (1981). *Dissolution Kinetics of Carboxylic Acids I: Effect of pH Under Unbuffered Conditions*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 70(1), 13–22.
71. Nag, M., Kar, A., Chanda, J., & Mukherjee, P. K. (2020). RP-HPLC analysis of methanol extract of *Viscum articulatum*. *Journal of Ayurveda and integrative medicine*, 11(3), 277–280.
72. Neue, U. D. (2005). *Theory of peak capacity in gradient elution*. *Journal of Chromatography A*, 1079(1-2), 153–161. Nikolin, B., Imamović, B.,
73. Medanhodžić-Vuk, S., & Sober, M. (2004). High performance liquid chromatography in pharmaceutical analyses. *Bosnian journal of basic medical sciences*, 4(2), 5–9.
74. Mulabagal, V., Annaji, M., Kurapati, S., Dash, R. P., Srinivas, N. R., Tiwari, A. K., & Babu, R. J. (2020). Stability-indicating HPLC method for acyclovir and lidocaine in topical formulations. *Biomedical chromatography : BMC*, 34(3), e4751.
75. Ndiripo, A., & Pasch, H. (2020). Retention of polypropylene stereoisomers in solvent gradient interaction chromatography on porous graphitic carbon as influenced by temperature and mobile phase composition. *Journal of chromatography. A*, 1618, 460865.
76. Ornaf, R. M., & Dong, M. W. (2005). 2 *Key concepts of HPLC in pharmaceutical analysis*. *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC*, 1 9–45.
77. Paschke, A. (2003). Consideration of the physicochemical properties of sample matrices—an important step in sampling and sample preparation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22(2), 78-89.
78. Patyra, E., & Kwiatek, K. (2020). In-house Validation Method for Quantification of Amoxicillin in Medicated Feedingstuffs with the Use of HPLC-DAD Technique. *Journal of veterinary research*, 64(3), 433–438.
79. Paul, C., Steiner, F., & Dong, M. W. (2019). HPLC autosamplers: Perspectives, principles, and practices. *LC-GC North Am*, 37(8), 514-529.
80. Pavlović, D. M., Babić, S., Horvat, A. J. M., & Kaštelan-Macan, M. (2007). *Sample preparation in analysis of pharmaceuticals*. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26(11), 1062–1075.
81. Pérez, G. (2013). Industria Farmacéutica Unidad de Inteligencia de Negocios. Secretaría de economía, ProMéxico inversión y comercio.
82. Ritter, J. M., Flower, R. J., Henderson, G., Loke, Y. K., MacEwan, D., & Rang, H. P. (2020). *Rang Y Dale. Farmacología*. Elsevier.
83. Rizzi, A. en *Retention and selectivity*. Corradini, D., Eksteen, E., Eksteen, R., Schoenmakers, P., & Miller, N. (1998). *Handbook of HPLC*. Dekker: New York. (Vol. 78).

84. Roehrer, S., & Minceva, M. (2019). Influence of temperature on the separation performance in solid support-free liquid-liquid chromatography. *Journal of chromatography. A*, 1594, 129–139.
85. Rodriguez, E. L., Poddar, S., Iftekhhar, S., Suh, K., Woolfork, A. G., Ovbude, S., Pekarek, A., Walters, M., Lott, S., & Hage, D. S. (2020). Affinity chromatography: A review of trends and developments over the past 50 years. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 1157, 122332.
86. Rodriguez, H., & De Lucia, M. L. (2021). A Proposal of a Combined Convergence Regulatory Strategy Applied to Post-approval Changes by Latin American Countries, Reducing Workload and Allowing Continuous Improvement to Guarantee the Quality, Safety, and Efficacy of Medicines. *Frontiers in medicine*, 8, 768376.
87. Sahu, P. K., Ramiseti, N. R., Cecchi, T., Swain, S., Patro, C. S., & Panda, J. (2018). An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 147, 590–611.
88. Scherer, F. M. (2000). Chapter 25 The pharmaceutical industry. *Handbook of Health Economics*, 1297–1336.
89. Schoenmakers, P. J., Billiet, H. A. H., Tussen, R., & De Galan, L. (1978). Gradient selection in reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 149, 519-537.
90. Schweiger, S., & Jungbauer, A. (2018). Scalability of pre-packed preparative chromatography columns with different diameters and lengths taking into account extra column effects. *Journal of Chromatography A*, 1537, 66–74.
91. Secretaria de Salud, (2021). *Panorama Epidemiológico de las Enfermedades No Transmisibles en México*. Dirección de Vigilancia Epidemiológica de Enfermedades No Transmisibles. México.
92. Shakila, R. J., Vasundhara, T. S., & Kumudavally, K. V. (2001). A comparison of the TLC-densitometry and HPLC method for the determination of biogenic amines in fish and fishery products. *Food chemistry*, 75(2), 255-259.
93. Shoykhet, K., Broeckhoven, K., & Dong, M. W. (2019). Modern HPLC Pumps: Perspectives, Principles, and Practices. *LC GC North America*, 37(6), 374.
94. Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2015). *Fundamentos de química analítica*. 9a. ed. Cengage Learning. México 6(33), pp.912-934
95. Snyder, L. R. (2000). Peer Reviewed: HPLC: Past and Present. *Analytical Chemistry*, 72(11), 412 A–420 A.
96. Snyder, L. R., Carr, P. W., Dolan, J. W., & Majors, R. E. (2010). New Horizons in Reversed-Phase Chromatography Selectivity. *LC-GC Asia Pacific*, 13(2), 1–10.
97. Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Dolan, J. W. (2011). *Introduction to modern liquid chromatography*. John Wiley & Sons. 7, pp. 293- 345.
98. Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Glajch, J. L. (1997). *Practical HPLC method development*. 2nd ed. John Wiley & Sons., New York, 1997, pp 295.
99. Song, Y., Zhang, M., Yin, L., Wang, K., Zhou, Y., Zhou, M., & Lu, Y. (2020). COVID-19 treatment: close to a cure? A rapid review of pharmacotherapies for the novel coronavirus (SARS-CoV-2). *International journal of antimicrobial agents*, 56(2), 106080.

100. Susanto, A., Knieps-Grünhagen, E., von Lieres, E., & Hubbuch, J. (2008). High throughput screening for the design and optimization of chromatographic processes: assessment of model parameter determination from high throughput compatible data. *Chemical Engineering & Technology: Industrial Chemistry-Plant Equipment-Process Engineering-Biotechnology*, 31(12), 1846-1855.
101. Swartz, M. E. (2005). *UPLC™: An Introduction and Review. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 28(7-8), 1253–1263.
102. Hara, T. (2013). *Study on preparation and characterization of monolithic silica capillary columns for high separation efficiency in high performance liquid chromatography*. (Doctoral dissertation, Universitätsbibliothek).
103. Tijssen, R., Corradini, D., Eksteen, E., Eksteen, R., Schoenmakers, P., & Miller, N. (1998). The Mechanisms and Importance of Zone-Spreading, u E. *Handbook of HPLC*, Dekker: New York. 78, 55-142.
104. Visky, D., Vander Heyden, Y., Iványi, T., Baten, P., De Beer, J., Kovács, Z., Noszál, B., Dehouck, P., Roets, E., Massart, D. L., & Hoogmartens, J. (2003). Characterisation of reversed-phase liquid chromatographic columns by chromatographic tests: Rational column classification by a minimal number of column test parameters. *Journal of Chromatography A*, 1012(1), 11–29.
105. Wan, D., Huang, L., Pan, Y., Wu, Q., Chen, D., Tao, Y., ... & Yuan, Z. (2014). Metabolism, distribution, and excretion of deoxynivalenol with combined techniques of radiotracing, high-performance liquid chromatography ion trap time-of-flight mass spectrometry, and online radiometric detection. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(1), 288-296.
106. Wei Chen & Chunsheng Wu. (2018). Synthesis, functionalization, and applications of metal-organic frameworks in biomedicine. *Dalton Trans.*, 47, pp. 2114-2133
107. Williams, S. (2004). Ghost peaks in reversed-phase gradient HPLC: a review and update. *Journal of Chromatography A*, 1052(1-2), 1-11.
108. Wróblewski, K., Petruczynik, A., Tuzimski, T., Przygodzka, D., Buszewicz, G., Kołodziejczyk, P., & Tutka, P. (2019). *Comparison of Various Chromatographic Systems for Analysis of Cytisine in Human Serum, Saliva and Pharmaceutical Formulation by HPLC with Diode Array, Fluorescence or Mass Spectrometry Detection. Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(14), 2580.
109. Wu, N., & Clausen, A. M. (2007). *Fundamental and practical aspects of ultrahigh pressure liquid chromatography for fast separations. Journal of Separation Science*, 30(8), 1167–1182
110. Zurita-Cruz, Jessie Nallely, Barbosa-Cortés, Lourdes, & Villasis-Keever, Miguel Ángel. (2019). De la investigación a la práctica: fases clínicas para el desarrollo de fármacos. *Revista alergia México*, 66(2), 246-253.
111. Zúñiga-Hidalgo, T., León-Rosario, G., Hernández-Baltazar, E., & Melgoza-Contreras, L. M. (2013). Impacto del recubrimiento estético sobre la liberación de tabletas osmóticas bicompartimentales de Nifedipino. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 44(3), 52-59.