



PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

Revisión bibliográfica de la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) para el análisis y separación de nuevas moléculas con actividad biológica.

Proyecto Genérico: Obtención de materias primas, principios activos, medicamentos y productos biológicos.

Etapa: Diseño y desarrollo de formas farmacéuticas.

Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

Alumna: **Marisol Juárez Hernández**

Matricula: **2162033161**

Vo. Bo. De los Asesores

Dr. Javier Águila Rosas
Asesor interno
No. Económico 43870

Dra. Karen Rodríguez Villar
Asesor externo
No. Económico 40478

Índice

I. Introducción.....	3
II. Objetivos.....	4
III. Metodología y lugar de realización.....	4
IV. Resultados y meta alcanzada.....	5
V. Discusión.....	6
VI. Conclusión.....	7
VII. Perspectiva.....	7
VIII. Bibliografía	7
IX. Anexo 1. Artículo de revisión bibliográfica	9

I. Introducción

Entre 2013 y 2019 el *Center for Drug Evaluation and Research* (CDER), dependencia de la FDA (*Food and Drugs Administration*) aprobó 276 nuevos medicamentos terapéuticos (Willis T. & Lipkus, A., 2020). En 2015, se dio a conocer que los medicamentos quirales aceptados eran compuestos enantioméricamente puros, con una configuración absoluta (CA) bien definida (Calcaterra A. y D'acuarica I., 2018). Por lo cual, durante el descubrimiento de nuevos fármacos se considera fundamental la quiralidad, debido a la diferencia de actividades entre enantiómeros. En ocasiones un enantiómero es activo, mientras que el otro es tóxico en los sistemas biológicos. En consecuencia, las autoridades regulatorias han exigido la evaluación de cada enantiómero en el desarrollo de fármacos esteroisoméricos, debido a esto la industria farmacéutica prefiere generar compuestos enantioméricamente puros (Zhang Y., *et al.*, 2005).

En los últimos 30 años, se ha reconocido la técnica de cromatografía de alta resolución (CLAR) como una herramienta importante en el campo de la enantioseparación, debido a la rapidez, reproducibilidad y temperatura de funcionamiento suave, así como la disponibilidad de un gran número de selectores quirales (Yang Y., *et al.*, 2021). Además, es una técnica versátil y fácil de usar durante el proceso de obtención de moléculas quirales, gracias a la amplia gama de detección de sustancias químicas y el bajo tiempo de implementación (Cerra B., *et al.*, 2020).

Es preciso señalar que esta técnica enantioselectiva resulta muy flexible, ya que permite emplear detectores UV-Vis, espectrómetro de masas (MS) y quirópticos. Sin embargo, en la actualidad también se considera relevante la disponibilidad comercial de fases estacionarias quirales o conocidas como CSP, por sus siglas en inglés, capaces de resolver una amplia gama de compuestos quirales en condiciones de elución multimodal (Rosetti A., *et al.*, 2020). Con base en lo anterior, es importante realizar una revisión bibliográfica de los avances e innovaciones en la técnica CLAR para la evaluación y separación de nuevos medicamentos enantioméricos.

II. Objetivos

II.1 Objetivo general

Elaborar una revisión bibliográfica de la aplicación de la técnica CLAR para el análisis y separación de nuevas moléculas con actividad biológica.

II.2 Objetivos particulares

-Elaborar una revisión bibliográfica de las nuevas moléculas con actividad biológica para las que se empleó la técnica CLAR.

-Investigar y analizar en la bibliografía las condiciones analíticas empleadas mediante la técnica CLAR para la separación e identificación de nuevas moléculas con actividad biológica.

-Identificar los métodos analíticos más frecuentes a través de la bibliografía disponible para la cuantificación y análisis de nuevas moléculas con actividad biológica.

-Recopilar las principales innovaciones respecto a las fases estacionarias quirales a través de la bibliografía disponible para el análisis de fármacos quirales.

III. Metodología y lugar de realización

El presente proyecto se desarrolló de forma remota con apoyo del Laboratorio de Farmacia Molecular y Liberación Controlada (N-106) ubicado en el edificio N, Departamento de Sistemas Biológicos de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

La búsqueda de artículos científicos incluyó palabras clave sobre las generalidades, características, métodos de obtención y aplicaciones de moléculas quirales, nuevas entidades moleculares aprobadas, mezclas racémicas y enantiómeros individuales. Dicha investigación se realizó en diversas bases de datos, algunas de las cuales se encuentran disponibles en la Biblioteca de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco (BiDi-UAMX). Bajo el mismo esquema de trabajo se recopilaron publicaciones sobre las generalidades de la cromatografía, además de las condiciones de uso que han mostrado resultados prometedores para la cuantificación de este tipo de moléculas.

Finalmente, con la información obtenida en cada aspecto, se elaboró un artículo de revisión sustentado en el contenido de revistas internacionales.

IV. Resultados y meta alcanzada

La consulta en la base de datos de la FDA para identificar los medicamentos aprobados en el periodo de enero de 2016 a diciembre de 2020 evidenció que el 61.84% de las entidades moleculares aprobadas en años recientes, son enantiómeros individuales, con base en este dato, se investigaron los conceptos básicos relacionados con moléculas que poseen características quirales como su clasificación (Food and Drugs Administration, 2016-2020). Además, se menciona la evolución respecto a la comercialización de este tipo de moléculas, pues una vez conocidos los efectos biológicos de la administración de ambos enantiómeros, se comenzó la búsqueda de métodos para aislar la estructura con mejores atributos terapéuticos. Todo esto, conlleva a apartados donde se describen los diferentes procesos de síntesis de compuestos quirales, destacándose la técnica tipo asimétrica que dispone de una gran variedad de recursos como las moléculas órgano-catalizadoras, las cuales obtuvieron el premio nobel en química en 2020 (Chinchilla, 2020; Sanganyado *et al.*, 2017; Shen *et al.*, 2016).

Por otro lado, se identificaron los métodos principales de análisis de enantiómeros, así se profundizó sobre la cromatografía líquida de alta resolución debido a que resultó ser un instrumento versátil que ha sido empleado durante aproximadamente 30 años para la separación y purificación de estructuras quirales (Casado *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2021). Dada la relevancia de CLAR, se incluyeron conceptos estrechamente relacionados con el tema tales como su fundamento, así como los diferentes tipos de elucidación estructural que pueden ser de fase reversa, normal o mixto.

Considerando la importancia de la columna cromatográfica se investigaron sus dos componentes principales: los empaques y las fases estacionarias. En el caso de los primeros se encontró que pueden ser clasificados de acuerdo con su tamaño, estructura o material con el que fueron elaborados, mientras que las segundas pueden ordenarse considerando el tipo de elucidación para el que se diseñaron como las fases reversas y las fases estacionarias quirales. Además, se encontraron algunas formas de aumentar la vida útil de este importante aditamento como el lavado de la columna o la filtración de disolventes y muestras.

También se investigaron otros factores importantes que pueden influir en el proceso de análisis como la fase móvil, la temperatura, el pH y el tipo de elución ya sea isocrático o en gradiente. Otro tema que se consideró relevante son los detectores por lo que se mencionaron aquellos que son útiles en el reconocimiento de enantiómeros. Por último, se presentan los nuevos medicamentos con características quirales aprobados durante enero de 2019 a diciembre de 2020 y sus condiciones analíticas.

V. Discusión

De acuerdo con los resultados obtenidos, puede afirmarse que la técnica CLAR continúa siendo una de las herramientas empleadas con más frecuencia para el análisis de enantiómeros por lo que algunas de sus partes fundamentales como las fases estacionarias se mantienen en evolución constante, su revisión permite identificar la disponibilidad de una gran variedad de recursos para la separación de analitos complicados o que sirven para optimizar un proceso.

La investigación de las nuevas entidades moleculares con características quirales permitió retomar antecedentes históricos para comprender las razones por las cuales comenzaron a disminuir las aprobaciones de mezclas racémicas mientras que aumentaban las de medicamentos con enantiómeros individuales, además mediante el estudio de las condiciones analíticas se pudo reconocer que las fases tipo C18 y el detector UV-Vis son los recursos más empleados para este tipo de compuestos.

Toda la información obtenida se buscó en bases de datos como PUBMED, BIDIUAM, ELSEVIER, Wiley online library y en la FDA. Una de las limitantes durante el proceso fue que muchos de los autores no retoman conceptos simples de cromatografía, en su lugar utilizan términos técnicos que dificultan la comprensión a lo largo de los artículos, además algunos temas relacionados con la composición de las fases estacionarias requirieron más tiempo de búsqueda debido a que en muchos casos no se hacía la diferenciación entre empaque y fase estacionaria.

VI. Conclusión

Finalmente, mediante esta revisión bibliográfica se lograron identificar los principios activos con características quirales que fueron aprobados recientemente, los métodos

analíticos disponibles para su identificación, así como las condiciones empleadas usualmente para su elucidación y análisis. Además, se incluyeron las fases estacionarias quirales que son el recurso más reciente para la optimización y separación de enantiómeros. Sin embargo, es importante mencionar que pese a la gran variedad de información disponible referente al tema aún existen varias moléculas que carecen de algún artículo en donde se describa el método analítico para su estudio.

VII. Perspectiva.

La información obtenida de todos los artículos permitirá tener una noción más clara sobre los recursos disponibles y dificultades que se pueden presentar en la práctica experimental al emplear la cromatografía líquida de alta resolución como una técnica para el análisis de moléculas. También permitirá emplear los conocimientos relacionados con el lenguaje técnico para garantizar una mejor comprensión por parte del analista respecto a las actividades que se estarán realizando en la separación e identificación de enantiómeros.

VIII. Referencias

Calcaterra, A., & D'acuarica, I. (2018). The marker of chiral drugs: Chiral switches versus de novo enantiomerically pure compounds. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, 147,323-340.

Casado, N., Valimaña-Traverso, J., García, M. Á., & Marina, M. L. (2020). Enantiomeric Determination of Drugs in Pharmaceutical Formulations and Biological Samples by Electrokinetic Chromatography. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 50(6), 554–584.

Cerra, B., Macchiarulo, A., Carotti, A., Camaioni, E., Varfaj, I., Sardella, R., & Gioiello, A. (2020). Enantioselective HPLC Analysis to Assist the Chemical Exploration of Chiral Imidazolines. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(3), 640.

Chinchilla, R. (2020). Special issue: Development of asymmetric synthesis. *Molecules*, 25(6), 3–5.

Food and Drugs Administration. (15 de noviembre de 2019). *Novel drugs approvals for 2016-2020*. Recuperado de: <https://www.fda.gov/drugs/new-drugs-fda-cders-new-molecular-entities-and-new-therapeutic-biological-products/novel-drug-approvals-2016>

Rosetti, A., Ferretti, R., Zanitti, L., Casulli, A., Villani, C., & Cirilli, R. (2020). Single-run reversed-phase HPLC method for determining sertraline content, enantiomeric purity, and related substances in drug substance and finished product. *Journal of pharmaceutical analysis*, *10*(6), 610–616.

Sanganyado, E., Lu, Z., Fu, Q., Schlenk, D., & Gan, J. (2017). Chiral pharmaceuticals: A review on their environmental occurrence and fate processes. *Water Research*, *124*, 527–542.

Shen, Z., Lv, C., & Zeng, S. (2016). Significance and challenges of stereoselectivity assessing methods in drug metabolism. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, *6*(1), 1–10.

Willis, T., & Lipkus, A. (2020). Structural Approach to Assessing the innovatives of New Drugs Finds Accelerating Rate of Innovation. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, *11*(11), 2112-2119.

Yang, Y., Wang, Y., Bao, Z., Yang, Q., Zhang, Z., & Ren, Q. (2021). Progress in the Enantioseparation of β -Blockers by Chromatographic Methods. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *26*(2), 468.

Zhang, Y., Wu, D.-R., Wang-Iversos, D. B., & Tymiak, A.A. (2005). Enantioselective chromatography in drug discovery. *Drug Discovery Today*, *10*(8), 571-577.

IX. Anexo 1. Artículo de revisión bibliográfica

Review:



Aplicación de la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) para el análisis y separación de nuevas moléculas con actividad biológica.



Juárez Hernández Marisol^{1,2} Rodríguez Villar Karen² Aguila-Rosas Javier¹

¹ Laboratorio de Farmacia Molecular y Liberación Controlada (N-106), Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, Calz. del Hueso 1100, Coapa, Villa Quietud, Coyoacán, 04960 Ciudad de México, CDMX

² Laboratorio de Síntesis y Aislamiento de Sustancias Bioactivas (N-015), Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, Calz. del Hueso 1100, Coapa, Villa Quietud, Coyoacán, 04960 Ciudad de México, CDMX

Resumen

En este artículo de revisión se presentan las nuevas entidades moleculares a base de enantiómeros aprobadas por la FDA, también se describen las condiciones analíticas empleadas durante su estudio con la técnica CLAR, previo a este tema se establecen tanto términos asociados con el método de análisis, así como conceptos relacionados con los isómeros lo que facilita la comprensión de los apartados a lo largo del escrito. Además, se describe la evolución de la técnica en aspectos como las fases estacionarias que recientemente se volvieron más específicas para el reconocimiento y separación de enantiómeros.

Palabras clave: HPLC, actividad biológica, enantiómeros, racémicos.

1 Introducción

Los enantiómeros son moléculas que cuentan con una imagen especular, son muy similares en cuanto a características fisicoquímicas y presentan la misma composición atómica. No obstante, al ser administrados como un agente terapéutico su actividad biológica puede ser completamente diferente, por tal motivo las autoridades regulatorias de cada país, previo a la aprobación de nuevas entidades moleculares solicitan a las empresas farmacéuticas el análisis completo de ambas estructuras y de ser posible comercializar únicamente el compuesto con mejores atributos. Con el fin de obtener únicamente uno de

los enantiómeros se desarrolló la síntesis asimétrica que emplea diversos métodos para lograr altos rendimientos y optimizar recursos.

Una de las principales dificultades en los procesos de desarrollo de enantiómeros terapéuticos es encontrar la técnica analítica adecuada para la separación, estudio e identificación de este tipo de analitos, aunque existen varias opciones, la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) cuenta con recursos como la amplia variedad de fases estacionarias y detectores que la vuelven la más indicada para obtener excelentes resultados.

Actualmente existen varias investigaciones en donde se describen las condiciones analíticas en CLAR empleadas durante el estudio de diversos compuestos, sin embargo, tales reportes suelen realizarse para analitos específicos y la mayoría de los autores no informan si las estructuras son enantiómeros, característica que no debería pasar desapercibida dada su importancia a nivel terapéutico, además este tipo de moléculas requieren circunstancias especiales para poder diferenciar entre ambos enantiómeros.

Dada la situación anterior la presente revisión bibliográfica incluye las condiciones empleadas en CLAR para el análisis, separación y determinación de nuevas entidades moleculares con características quirales aprobadas en los años 2019-2020, lo que también permite identificar si existe alguna similitud o preferencia por parte de los analistas a la hora de examinar enantiómeros. Además, se incluye una breve descripción de las fases estacionarias quirales, creadas recientemente con el objetivo de optimizar la tarea de la separación.

2 Descubrimiento y obtención de fármacos

El descubrimiento y obtención de fármacos es un proceso complejo el cual inicia con la identificación de compuestos que se unen a un blanco terapéutico o que muestran actividad biológica (figura 1). Se estima que el proceso de desarrollo de un fármaco hasta su incorporación al mercado puede tardar aproximadamente entre 10 y 15 años, invirtiendo alrededor de 800 millones de dólares, siendo la etapa clínica la de mayor inversión económica y de tiempo (Food and Drugs Administration, 2018). El elevado costo de investigación se asocia principalmente a la gran cantidad de moléculas que fallan en una o varias etapas del

desarrollo, sobre todo considerando que en años pasados el proceso se realizaba utilizando únicamente métodos experimentales (Saldívar-González *et al.*, 2017; Wouters *et al.*, 2020).



Figura 1. Etapas principales del desarrollo de fármacos.

En la actualidad los protocolos de desarrollo de moléculas bioactivas incluyen varias estrategias como el diseño de fármacos asistido por computadora (CADD; por sus siglas en inglés), la cual involucra métodos como el acoplamiento molecular automatizado, modelado del farmacóforo y el cribado virtual. La implementación de este tipo de herramientas influyó en la reducción de costos económicos y en el número de pruebas sobre modelos animales para la determinación de características ADMET (adsorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad). Además de mejorar la velocidad del proceso de descubrimiento de fármacos (Martinez-Mayorga *et al.*, 2020; Pathania & Singh, 2021; Rosales-Hernández & Correa-Basurto, 2015)

Durante la etapa de investigación clínica se realizan pruebas de seguridad y eficacia en humanos. También, se lleva a cabo la clasificación de moléculas bioactivas de acuerdo con su potencia y selectividad, esta última relacionada con la afinidad sobre el blanco terapéutico y se mide con parámetros como la concentración inhibitoria 50 (IC50), que es la concentración de compuestos necesaria para inhibir el 50% de la actividad biológica, además de la concentración en estado estacionario (CSS), la dosis máxima tolerada y otros parámetros farmacocinéticos (Aykul & Martinez-Hackert, 2016; Daley-Yates, 2015; Goldstein *et al.*, 2021).

2.1 Descubrimiento de nuevas moléculas bioactivas

La actividad biológica se define como el efecto o los efectos que una molécula ejerce sobre el sistema huésped, teniendo como blanco terapéutico, enzimas o receptores localizados en células, tejidos u órganos. El efecto observado puede ser beneficioso o tóxico y en algunos casos está relacionado con la dosis, es decir, a menor concentración puede

exhibir un efecto terapéutico y a concentraciones altas manifestarse como tóxico, a esto se le denomina ventana terapéutica (Nantasenamat *et al.*, 2010). Por lo tanto, una molécula bioactiva es aquella molécula capaz de unirse a un blanco terapéutico y desencadenar una respuesta biológica. Además, estas moléculas deben cumplir con criterios farmacocinéticos y farmacodinámicos, así como un perfil ADMET seguro para considerarse como candidatos a fármacos y continuar con el proceso de desarrollo hasta llegar al mercado (Gfeller *et al.*, 2014).

De manera particular, los isómeros juegan un rol importante durante la etapa de descubrimiento y desarrollo de moléculas bioactivas, ya que sus diferencias estructurales implican importantes variaciones en la respuesta biológica. Por ello, es importante identificar los posibles productos isoméricos y evaluarlos por separado, así como diseñar metodologías de síntesis selectivas y desarrollar métodos analíticos para su separación y análisis.

3 Isómeros y su actividad biológica

Los isómeros son moléculas con fórmulas moleculares idénticas, pero con disposición espacial diferente, su separación ha sido un área activa en la química analítica. La actividad biológica exhibe especificidad isomérica que se manifiesta en una amplia gama de procesos fisiológicos como la producción de metabolitos secundarios, azúcares y los aminoácidos que tienden a existir en la forma *levo* (L) (Dodds *et al.*, 2017; Terry *et al.*, 2020).

3.1 Clasificación de los isómeros

Los isómeros representan una amplia gama de heterogeneidad estructural y se clasifican en función de las diferencias en la conectividad o en la estereoquímica, de modo que existen dos categorías principales de isómeros: isómeros constitucionales (o estructurales) y estereoisómeros, como se muestra en la figura 2 (Agranat *et al.*, 2002; Dodds *et al.*, 2017).

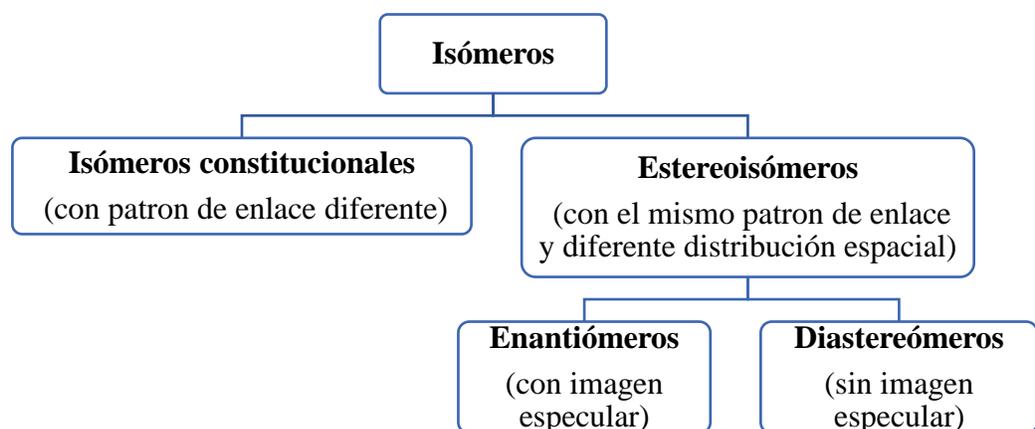


Figura 2. Clasificación básica estereoquímica (Recuperado de Agranat *et al.*, 2002).

Los isómeros constitucionales son aquellos con la misma fórmula, pero conectividad distinta, por ejemplo: la D-Leucina y D-*ter*-Leucina con fórmula molecular ($C_6H_{13}NO_2$) que difieren en el grupo isobutil o *ter*-butil (Figura 3A) y los tres isómeros del dihidroxibenceno con la fórmula $C_6H_6O_2$: catecol, resorcinol e hidroquinona que tienen un grupo hidroxilo en posición diferente (figura 3B) (Dodds *et al.*, 2017; Terry *et al.*, 2020).

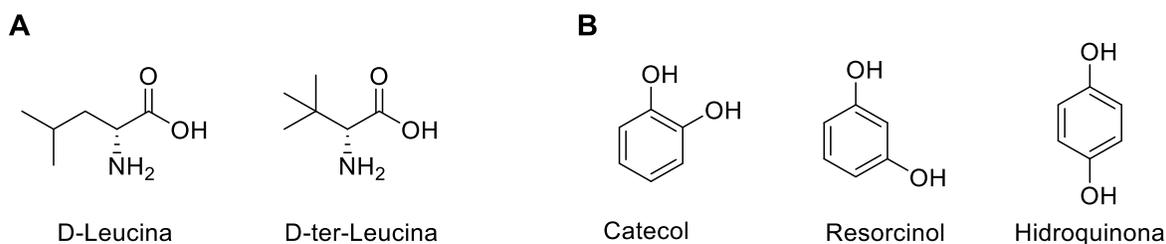


Figura 3. Ejemplos de isómeros constitucionales (Recuperado de Dodds *et al.*, 2017; Singh Sekhon, 2013).

Los estereoisómeros son isómeros que tienen la misma conectividad entre sus átomos, pero difieren en la orientación o distribución espacial de sus sustituyentes (Mather L., 2005; Singh Sekhon, 2013).

Los estereoisómeros geométricos *cis-trans* son moléculas que cuentan con enlaces dobles o son alicíclicos. Se clasifican de acuerdo con la posición de los sustituyentes, si se encuentran dispuestos en la misma dirección su conformación es *cis* (Figura 4A) y si lo hacen en direcciones opuestas son denominados *trans* (Figura 4B) (Smith, 2009)

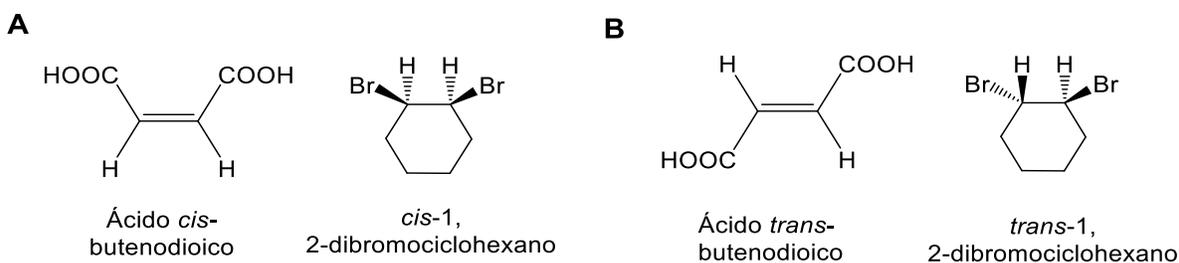


Figura 4. Ejemplos de isómeros geométricos, A) configuración *cis* de un alqueno y de un cicloalcano, B) configuración *trans* de un alqueno y de un cicloalcano (Recuperado de Smith, 2009).

La quiralidad es una característica propia de cada molécula que les permite tener una imagen especular, generalmente esta propiedad se presenta cuando hay un átomo central de carbono unido a cuatro sustituyentes diferentes (Mather L., 2005; Singh Sekhon, 2013).

Los enantiómeros son dos moléculas no superponibles entre sí, ambas tienen los mismos centros quirales, pero la configuración de los sustituyentes es diferente, figura 4. Sus propiedades fisicoquímicas son similares y giran la luz polarizada en direcciones opuestas. Las mezclas equimolares de enantiómeros se llaman racematos y debido a que contienen ambos isómeros en las mismas cantidades su rotación óptica es nula (Mather L., 2005; Sanganyado *et al.*, 2017).

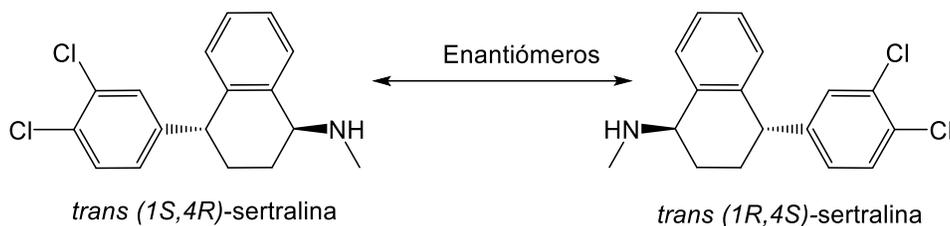


Figura 5. Enantiómeros de la sertralina (Recuperado de Sanganyado *et al.*, 2017).

Los diastereómeros o diastereoisómeros son moléculas que no tienen imágenes especulares debido a que algunos de sus centros quirales tienen la misma configuración mientras que los demás no lo hacen (figura 6) y sus propiedades fisicoquímicas son completamente diferentes (Mather L., 2005; Sanganyado *et al.*, 2017).

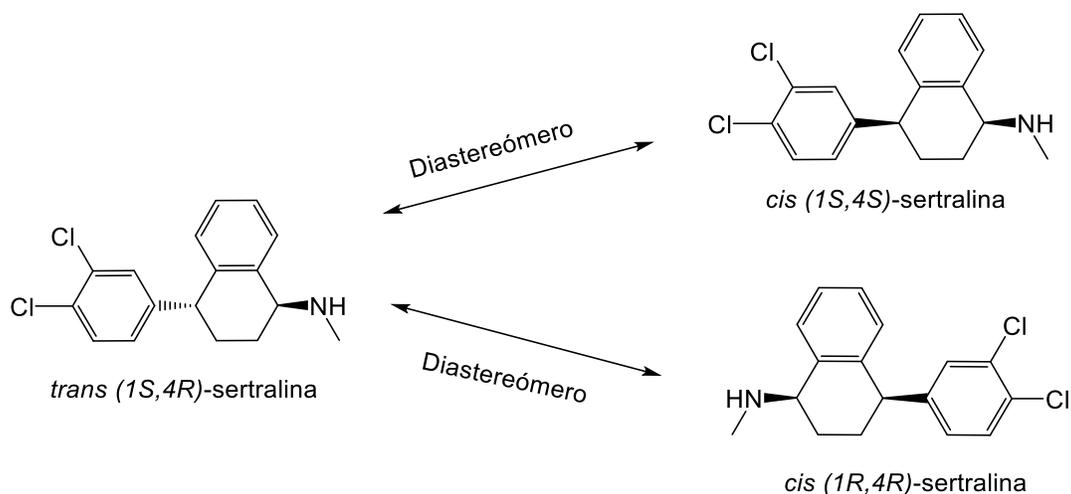


Figura 6. Diastereómero de la sertralina (Recuperado de Sanganyado *et al.*, 2017).

La nomenclatura de enantiómeros y diastereoisómeros más común es el sistema *R/S*, donde las reglas de Cahn-Ingold-Prelog se usan para priorizar los grupos sustituyentes unidos alrededor del centro quiral (el sustituyente con el número atómico más alto tiene prioridad), si la secuencia de prioridad es en el sentido de las agujas del reloj, el centro quiral tendrá una configuración *R*, de lo contrario se define como una configuración *S*. Alternativamente, los enantiómeros también se identifican según la dirección en la que giran una luz polarizada, con (+) cuando la luz polarizada gira en el sentido de las agujas del reloj y (-) en el sentido contrario de las agujas del reloj (Sanganyado *et al.*, 2017).

3.2 Importancia de los isómeros en los medicamentos

Los enantiómeros presentan la misma composición atómica y propiedades fisicoquímicas, sin embargo, pueden mostrar diferentes actividades biológicas, farmacocinéticas y farmacodinámicas, ya que poseen reconocimiento estereo-específico para ciertos receptores y sitios activos. En este sentido la actividad biológica o farmacológica deseada puede ser activa en uno de los enantiómeros, mientras que para el otro enantiómero pueden ocurrir diferentes situaciones como las que se alistan a continuación (Casado *et al.*, 2020; Shen *et al.*, 2016):

- Puede estar inactivo
- Puede mostrar la misma actividad
- Puede ser activo, pero con menor intensidad
- Puede tener una actividad totalmente diferente

- Puede ser tóxico

Considerando estas diferentes posibilidades en 1992 las autoridades reguladoras de Estados Unidos, Europa, Japón y China recomendaron que las empresas farmacéuticas realicen la investigación de cada enantiómero por separado en farmacología, toxicología y metabolismo además de compararse con el fármaco racémico durante el desarrollo de nuevos fármacos y si es posible comercializar el eutómero (isómero que tiene una afinidad alta por el receptor) en lugar del racemato (mezcla de enantiómeros con diferente actividad biológica) (Sanganyado *et al.*, 2017; Shen *et al.*, 2016).

3.2.1 Enantiómeros comparados con mezclas racémicas empleados en los medicamentos.

Desde que se dio a conocer la importancia de caracterizar los medicamentos racémicos los enantiómeros individuales han sido un tema relevante que se retoma desde diferentes perspectivas como: la contaminación del medio ambiente (Sanganyado *et al.*, 2017), aspectos farmacológicos (Shen *et al.*, 2016), métodos de detección (Casado *et al.*, 2020) y las tendencias en el mercado (Calcaterra & D'Acquarica, 2018).

Los datos más recientes de enero de 2016 a diciembre de 2020 tomados de la base de datos de la FDA indican que se aprobaron 228 entidades moleculares nuevas, de las cuales se consideraron solo aquellas que no fuesen productos biológicos (células, enzimas, anticuerpos monoclonales o inmunoglobulinas). También se descartaron los agentes de diagnóstico, quedando un total de 152 moléculas, de las cuales 94 (61.84%) son enantiómeros individuales, 1 es una mezcla racémica que corresponde al 0.66% y el resto son estructuras aquirales. Durante este periodo, se observó una disminución importante en el número de fármacos aprobados como racematos hasta el punto de existir solo una aprobación en 2017, mientras el desarrollo de fármacos como enantiómeros únicos ha sido una tendencia en crecimiento, figura 7.

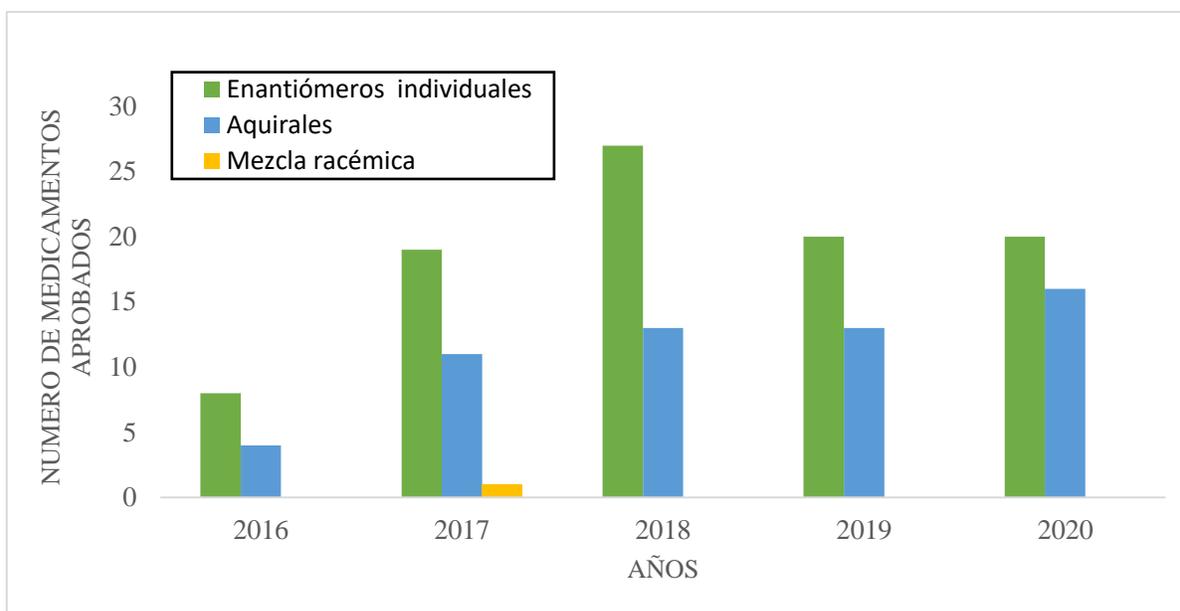


Figura 7. Nuevas entidades moleculares aprobadas por la FDA entre 2016-2020.

El predominio de fármacos como enantiómeros únicos en el mercado, incluso cuando existen racematos bien caracterizados, es atribuido principalmente a las ventajas durante la administración, ya que presentan una menor variabilidad interindividual, requieren dosis más bajas, proporcionan un mayor margen de seguridad, provocan menos interacciones farmacológicas, así como menos efectos secundarios (Casado *et al.*, 2020).

A pesar del incremento de enantiómeros puros aprobados, un número considerable de medicamentos quirales de uso clínico todavía se utilizan como racematos. Las dos razones principales son que: los fármacos racémicos requieren menores costos de producción y la segunda razón es la dificultad de alcanzar el parámetro de 99% de pureza enantiomérica, establecido por el *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH), a pesar de los grandes avances en el desarrollado de técnicas de separación (Casado *et al.*, 2020; Song *et al.*, 2020).

3.3 Estereoselectividad en el metabolismo de fármacos

Hasta ahora se han revisado algunas de las características, así como las razones principales por las cuales se encuentran a la venta los fármacos racémicos y los enantiómeros. A continuación, se describen algunas cualidades metabólicas de los fármacos que también son un aporte importante durante el desarrollo de medicamentos racémicos o enantioméricos.

El metabolismo es el proceso más estereoselectivo debido a la participación del sistema enzimático, pues cuenta con una amplia gama de sustratos y presentan una gran sensibilidad estereoquímica, es decir, diferentes afinidades por los enantiómeros de un fármaco quiral. Según de dónde se produzca la discriminación quiral en el metabolismo del fármaco, la estereoselectividad metabólica se puede clasificar en; estereoselectividad del sustrato, estereoselectividad del producto y estereoselectividad sustrato-producto (Shen *et al.*, 2016).

3.3.1 Estereoselectividad del sustrato en el metabolismo del fármaco

La estereoselectividad del sustrato se refiere al fenómeno en donde dos enantiómeros se metabolizan a diferentes velocidades, manteniendo el número y configuración de los centros quirales. El antidepresivo mianserina se utiliza como racemato y; la enzima CYP2D6, miembro de los citocromos P450, se encarga de catalizar la reacción de hidroxilación con selectividad sobre el enantiómero (*S*), dando como resultado el metabolito (*R,S*) 8-hidroximianserina. Mientras que CYP1A se encarga de catalizar la reacción de *N*-desmetilación con selectividad por el enantiómero (*R*), dando como resultado el metabolito (*R,S*) *N*-desmetilmianserina. Es importante mencionar que ambas reacciones muestran enantioselectividad de sustrato opuesta y que el enantiómero (*S*) es el de mayor actividad *in vivo*. En la figura 8 se puede observar que el centro quiral no se ve afectado por la catálisis en ninguno de los casos (Shen *et al.*, 2016; Testa, 2015).

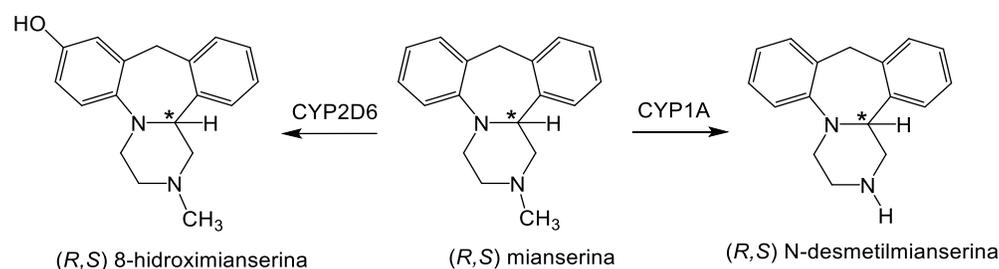


Figura 8. Ejemplo de estereoselectividad del sustrato, mianserina y sus productos después de las reacciones de hidroxilación (izquierda) y *N*-desmetilación (derecha) * centro quiral (Recuperado de Testa, 2015).

3.3.2 Estereoselectividad del producto en el metabolismo del fármaco

La estereoselectividad del producto generalmente ocurre en las moléculas que contienen un elemento pro-quiral, es decir, son estructuras que carecen de centros estereogénicos, pero pueden convertirse en isómeros por acción de los citocromos P450 (CYP). Estas enzimas

catalizan reacciones de conjugación con moléculas endógenas preformadas y los metabolitos de configuración distinta son producidos a diferentes velocidades por CYP específicos. Teniendo en cuenta la variabilidad interindividual de enzimas, la estereoselectividad del producto puede inducir las diferentes actividades farmacológicas en diferentes pacientes o especies (Shen *et al.*, 2016; Testa, 2015). Por ejemplo, la fenitoína es un fármaco anticonvulsivo que posee un centro pro-quiral (tiene dos sustituyentes iguales) y al ser metabolizado por los distintos CYP, ocasiona la oxidación de unos de los fenilos generando enantiómeros. La principal ruta metabólica de la fenitoína es la hidroxilación catalizada por CYP2C9, la cual produce hasta el 95% de la configuración (*S*), figura 9 (Coelho *et al.*, 2021).

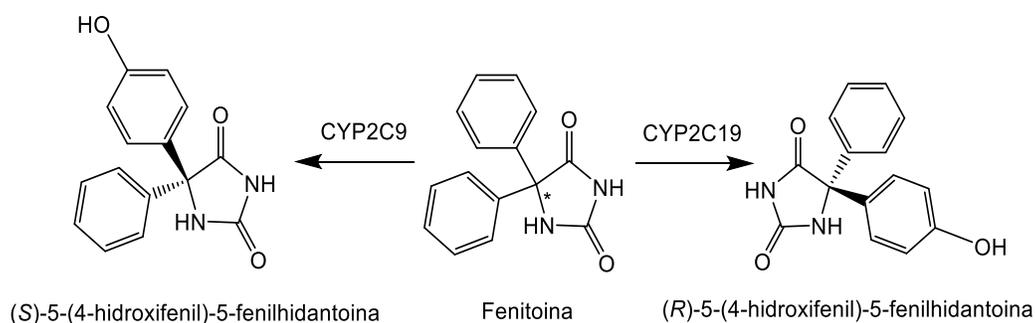


Figura 9. Ejemplo de estereoselectividad de producto. *Centro pro-quiral (Recuperado de Coelho *et al.*, 2021).

3.3.3 Estereoselectividad sustrato-producto en el metabolismo del fármaco

La estereoselectividad sustrato-producto se produce durante el metabolismo, dando lugar a una reacción de inversión del centro estereogénico. El ejemplo más común es el caso del ibuprofeno antiinflamatorio no esteroideo (AINE), cuando este se administra como racemato, figura 10. El enantiómero *R* (enantiómero inactivo) es seleccionado de manera específica por la enzima acil coenzima A (acil-CoA) ligasa de cadena larga, para catalizar la reacción de conjugación y obtener a (*R*)-ibuprofeno-CoA. Posteriormente la 2-metilacil-CoA, 2-epimerasa se encarga de catalizar la reacción donde sucede la inversión quiral para dar lugar a (*S*)-ibuprofenoil-CoA. Finalmente, las tioesterasas de acil-CoA actúan sobre el metabolito anterior para liberar al enantiómero (*S*)-ibuprofeno (enantiómero activo) (Coelho *et al.*, 2021; Testa, 2015).

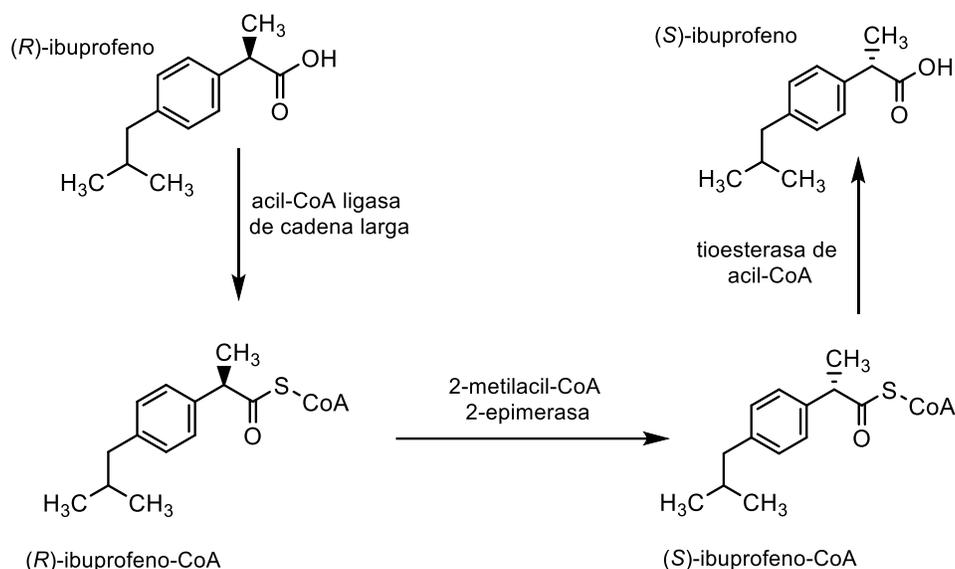


Figura 10. Ejemplo de estereoselectividad sustrato-producto. Inversión del centro quiral de (R)-ibuprofeno inactivo, para obtener (S)-ibuprofeno enantiómero activo (Recuperado de Testa, 2015).

4 Obtención de moléculas quirales para el desarrollo de medicamentos

4.1 Productos naturales como fuente de quiralidad

Los productos naturales (PN) o metabolitos secundarios son entidades químicas provenientes de organismos vivos como plantas, hongos y microorganismos que suelen realizar la biosíntesis de moléculas quirales de forma específica, es decir, que solo producen un enantiómero ya sea *R* o *S* (Finelfield *et al.*, 2012; Zask & Ellestad, 2018).

El área farmacéutica se ha visto beneficiada de la extracción y caracterización de estos recursos pues muchos de los PN poseen acción farmacológica en el tratamiento de enfermedades como el cáncer, infecciones, esclerosis múltiple, cardiovasculares, etc. (Atanasov *et al.*, 2021) Además, al conocer la diversidad estructural de los metabolitos, los científicos las toman como bases para el desarrollo de nuevas moléculas (Mathur & Hoskins, 2017).

4.1.1 Obtención de moléculas mediante semisíntesis

La semisíntesis es un punto intermedio entre los PN y la síntesis química, este método consiste en realizar una modificación estructural a una molécula proveniente de la naturaleza mediante reacciones químicas, de tal manera que se obtiene lo que podría denominarse una molécula híbrida. Ejemplo de ello, es la simvastatina (figura 11A) de origen semisintético

que se encuentra estrechamente relacionado con la lovastatina figura 11B) producto natural aislado del hongo *Aspergillus terreus*, ambas pertenecen al grupo de las estatinas y sirven para controlar los niveles de colesterol (Chopra & Dhingra, 2021; Mathur & Hoskins, 2017).

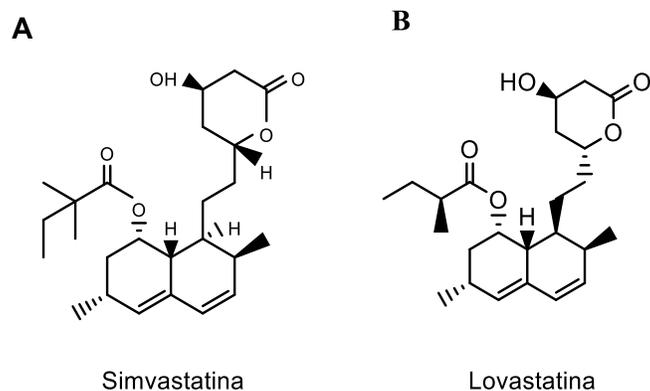


Figura 11. Ejemplo de moléculas semisintéticas a) simvastatina y b) lovastatina (Recuperado de Chopra & Dhingra, 2021).

4.2 Obtención de fármacos mediante diferentes síntesis de compuestos quirales

4.2.1 Síntesis convencional

La síntesis de fármacos se lleva a cabo en varios tipos de reactores bajo condiciones físicas altamente controladas, tales como el pH, la temperatura, la presión, la concentración de cada reactivo y el tiempo. Estos parámetros pueden afectar el rendimiento y los resultados de una reacción química determinada, es por ello que durante este proceso es común obtener mezclas racémicas (Gesmundo *et al.*, 2018; Murray *et al.*, 2013; Nguyen *et al.*, 2006).

4.2.2 Síntesis asimétrica

La síntesis de compuestos quirales ha adquirido mayor relevancia a lo largo de los años, sobre todo después de determinar las ventajas terapéuticas que ofrece la administración de enantiómeros puros, lo que impulsó a muchas ramas de la química a buscar los mejores métodos para la obtención del eutómero (Chinchilla, 2020).

Los enantiómeros puros pueden obtenerse mediante resolución quiral y por síntesis asimétrica, la primera consiste en separar los componentes de una mezcla racémica, mientras que la segunda emplea catalizadores o auxiliares que inducen la quiralidad en un sitio determinado de la molécula (Calcaterra & D'Acquarica, 2018; Heravi *et al.*, 2016).

Los auxiliares quirales son moléculas con actividad óptica que al adherirse temporalmente al compuesto inicial tienen efectos estéricos lo que contribuyen en una o más etapas de una reacción enantioselectiva. Aunque existe una gran variedad de ellos se consideran de mayor relevancia los auxiliares de Corey, los de Enders y las oxazolidonas de Evans, los cuales participan en diversas reacciones entre las que destacan: la α -alquilación, ciclo adición conjugada de Diels-Alder, adiciones de Michel, alquilación conjugada y oxidaciones (Díaz-Muñoz *et al.*, 2019; Heravi *et al.*, 2016).

Por otro lado, los catalizadores químicos son moléculas que realizan la combinación de dos reactivos sin formar parte del producto final. Durante la síntesis asimétrica se pueden emplear catalizadores metálicos u organocatalizadores (Chinchilla, 2020; Noyori, 2003). Los catalizadores metálicos están constituidos por un ligando quiral y por un metal de transición como el rutenio, el rodio o el paladio; actualmente también se están utilizando metales como el hierro, el cobre y el níquel. Al igual que los auxiliares, estos complejos pueden emplearse en una gran variedad de reacciones como la alquilación, la reacción de Diels-Alder, la hidrogenación, entre otras (Fu *et al.*, 2020; Hayler *et al.*, 2019; Higashida *et al.*, 2020).

Los organocatalizadores son moléculas orgánicas de bajo peso molecular, que pueden provenir de recursos naturales como los alcaloides del árbol cinchona que participan en las reacciones de adición de Michael, la reacción de Strecker, la reacción de Henry, etc (Vijaya *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2017). Otros ejemplos serían las aminas quirales, carbenos, ácidos quirales u organofosfinas quienes catalizan reacciones para la fusión entre ciclopentanos y arenos moléculas de importancia biológica. Recientemente han sido considerados como una alternativa a los catalizadores metálicos debido a que no son tóxicos, ofrecen procesos robustos y son más gentiles con el medio ambiente (Satpathi *et al.*, 2018). Además, como dato interesante, el premio nobel de química de este año fue otorgado a Benjamin List y a David McMillan por el desarrollo de un catalizador de este tipo.

Es importante mencionar que el rendimiento de una reacción estereoespecífica dependen en gran medida de las condiciones bajo las cuales se haya llevado a cabo el proceso, sin embargo, en los artículos consultados para cada uno de los métodos se consideran exitosos los que se encuentran dentro del intervalo que va desde el 75% hasta el 99% con excesos de enantiómeros de 89-100%.

4.2.3 Biocatálisis o biotransformación

La biocatálisis se ha vuelto muy atractiva debido a las características del proceso que involucra el uso de reactores multipropósito estándar, dentro de los cuales se pueden aplicar técnicas de inmovilización del catalizador (generalmente enzimas) para su reutilización durante varios ciclos. Se lleva a cabo en condiciones generalmente acuosas lo que evita el uso de disolventes tóxicos, a temperatura ambiente y a presión atmosférica; además los biocatalizadores se derivan de recursos que son renovables, biocompatibles y biodegradables que proporcionan quimio-, regio- y estereo- selectividad. Al final se obtienen altos rendimientos que generan menos desechos y subproductos. Todas las cualidades mencionadas convierten a la biocatálisis en una alternativa económica y energéticamente eficiente (Jiang & Fang, 2020; Patel, 2018).

La variedad de enzimas que son útiles en la resolución de mezclas racémicas o en la producción de enantiómeros es muy amplia, entre ellas se incluyen oxidorreductasas, hidrolasas, transferasas, liasas, isomerasas y ligasas. Actualmente algunas empresas como Codexis y Novozys ofrecen servicios de ingeniería enzimática y comercializan una gran diversidad de biocatalizadores para las empresas farmacéuticas (Li *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2018).

5 Métodos de identificación y separación de moléculas quirales

5.1 Métodos de elucidación estructural

Las moléculas quirales como ya se revisó a lo largo de los párrafos anteriores son cada vez más relevantes, de manera que existe un progreso constante en el desarrollo de técnicas para diseñar nuevas estructuras biológicamente activas, también en las reacciones de síntesis asimétrica que cuentan con una amplia variedad de recursos que ayudan a obtener un solo enantiómero.

La configuración absoluta también es una característica importante durante el desarrollo de un fármaco nuevo, su correcta determinación permite que los procesos de síntesis sean más eficientes. Tradicionalmente se usa la cristalografía de rayos X, la resonancia magnética nuclear (RMN) y el dicroísmo circular vibratorio, siendo este último el de mayor relevancia (He *et al.*, 2011).

El dicroísmo circular vibratorio consiste en hacer incidir un haz de luz infrarroja polarizada sobre la muestra, dando como resultado el coeficiente de determinación molar $\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R$, el cual puede ser: cero para una mezcla racémica, positivo para la configuración *R* y negativo para la configuración *S*. Este valor se obtiene de la diferencia entre los índices de absorbancia de la luz polarizada hacia la izquierda (ε_L) y hacia la derecha (ε_R) (He *et al.*, 2011; Krupová *et al.*, 2020).

5.2 Métodos analíticos para la separación de moléculas quirales

Los métodos analíticos son indispensables para separar o determinar la pureza de una gran variedad de muestras, el análisis de moléculas quirales se puede realizar por cromatografía de gases, electroforesis capilar, cromatografía de fluidos supercríticos, cromatografía líquida de ultra alto rendimiento, cromatografía de capa fina o por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), esta última se ha reconocido como una de las herramientas de enantioseparación más importantes durante los últimos 30 años debido a su rapidez, reproducibilidad y temperatura de funcionamiento suave, así como la disponibilidad de un gran número de fases estacionarias quirales (CSP, por sus siglas en inglés) (Casado *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2021). Además, es una técnica versátil y fácil de usar durante el proceso de obtención de moléculas quirales, gracias a la amplia gama de detección de sustancias químicas y el bajo tiempo de implementación (Cerra *et al.*, 2020). Es por estas razones que a continuación se describen algunas de sus características generales aplicables para la separación de isómeros.

6 Fundamentos de la cromatografía líquida de alta resolución

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) es una técnica analítica de gran utilidad para la separación, análisis y purificación de una gran variedad de analitos presentes en diversas muestras químicas (Tome *et al.*, 2019; Žuvela *et al.*, 2019). En términos generales este método consiste en la inyección de una muestra que fluirá a través del sistema hasta el punto de detección. Se emplea una fase móvil líquida que fluye a alta presión para separar los componentes a lo largo de la columna que contiene la fase estacionaria, la interacción de estos elementos ocasiona la salida de los analitos en distintos momentos (Poole & Poole, 2009; Ken Broeckhoven *et al.*, 2019).

6.1 Factores que influyen durante la aplicación de la técnica CLAR

▪ Temperatura

La temperatura es un parámetro que debe mantenerse constante para garantizar su reproducibilidad durante los análisis cromatográficos y suele establecerse por encima de la temperatura ambiente (Chen, 2019). Además, su aumento ocasiona la reducción de la viscosidad de la fase móvil, lo que disminuye la contrapresión de la columna permitiendo la utilización de caudales más rápidos y fases estacionarias con un tamaño de partícula más pequeño, además de incrementar la solubilidad del soluto esto contribuye a una mayor eficiencia y tiempos de ejecución más cortos (Lippert *et al.*, 2007; Zafar *et al.*, 2021).

▪ pH

El pH de la fase móvil puede provocar un cambio en el grado de ionización y retención de moléculas con características ácido-base (Espinosa *et al.*, 2002; Secilmis-Canbay *et al.*, 2012). Para controlar este efecto en la fase móvil se añaden soluciones amortiguadoras también conocidas como buffers o modificadores orgánicos, durante su selección es importante considerar el grado de ionización e hidrofobicidad del soluto, esto con el fin de evitar la formación de compuestos insolubles o reacciones secundarias no deseadas (Subirats *et al.*, 2007; Han *et al.*, 2012).

6.2 El factor de la fase móvil para optimizar la separación de moléculas

La fase móvil es una mezcla de disolventes que se encarga de la migración diferencial o elución de los componentes de una muestra a través de una columna por interacciones con la fase estacionaria (Wen *et al.*, 2019; Haddad *et al.*, 2021).

El tiempo de retención es una característica que se encuentra estrechamente relacionado con el fas móvil, además depende de factores como el pH, la temperatura y la composición de la fase móvil (fracciones de volumen de solvente). Se han escrito muchas ecuaciones llamadas modelos de retención que describen teóricamente los efectos de las condiciones sobre la elución, esto con el fin de encontrar la correcta combinación de los factores mencionados para la obtención de picos definidos en periodos de tiempo más cortos (Jandera & Hájek, 2018; Den Uijl *et al.*, 2021)

6.3 Tipos de elución a la que es sometida la fase móvil para la separación de moléculas

- **Elución isocrática**

La elución isocrática consiste en mantener la composición de la fase móvil constante durante todo el análisis, es adecuada para muestras que contienen un grupo limitado de analitos, dentro de un rango de polaridades pequeño o moderado. Presenta algunas ventajas; como mayor simplicidad, menor costo, instrumentación más simple y no es necesario reequilibrar la columna entre inyecciones consecutivas (García-Álvarez-Coque *et al.*, 2006; Jandera, 2006; Navarro-Huerta *et al.*, 2019). Cuando las polaridades del analito cubren un amplio rango de polaridades pueden suceder dos situaciones: en primer lugar, se produciría un cromatograma en el que la mayoría de los solutos retenidos eluyen en los momentos adecuados, pero los primeros picos presentarán una resolución deficiente o incluso se perderán en el frente del disolvente, en segundo lugar podría suceder lo contrario, dando lugar a un cromatograma donde los solutos menos retenidos están bien resueltos pero los solutos más retenidos eluirán en tiempos excesivamente largos, con picos amplios que tienen problemas de sensibilidad (Navarro-Huerta *et al.*, 2019).

- **Elución en gradiente**

Una solución para los solutos que cubren un rango amplio de polaridad es la elución en gradiente cuyo objetivo principal es obtener una resolución adecuada para todos los componentes de la muestra, aumentando la retención de los solutos mal retenidos y reduciéndola para los fuertemente retenidos. Para cumplir este propósito, la fuerza de elución de la fase móvil debe ser inicialmente baja y volverse más fuerte a medida que avanza la separación mediante un programa preestablecido, esto se puede lograr aumentando el porcentaje de disolvente orgánico a través del tiempo (Jandera, 2006; Navarro-Huerta *et al.*, 2019).

Los programas de gradiente que pueden emplearse son muy amplios, en la práctica los gradientes consisten generalmente en incrementos lineales simples de un factor experimental o varios segmentos de pendiente diferente, que pueden ser lineales o curvilíneos, además los gradientes inversos con concentración decreciente del componente de la fase móvil fuerte se utilizan a menudo para restaurar las condiciones iniciales antes de la siguiente inyección de muestra (García-Álvarez-Coque *et al.*, 2006; Jandera, 2006).

Algunas ventajas de este procedimiento son: la fase móvil suele ser lo suficientemente fuerte como para eliminar las impurezas de la muestra al final del gradiente, el número de picos que pueden resolverse en cierto intervalo de tiempo es considerablemente mayor que en cromatografía líquida isocrática, las velocidades de migración de las bandas a lo largo de la columna aumentan y todos los compuestos de la muestra eluyen eventualmente con factores de retención instantáneos muy similares en el momento en que abandonan la columna (Jandera, 2006). La supresión de los anchos de banda de los picos de elución tardía se encuentra relacionada con un aumento en la altura de los picos y una selectividad de retención mejorada. Sin embargo, estos efectos beneficiosos ocasionan la deriva y ruido de la línea base, que suelen ser más frecuentes en cromatogramas de elución en gradiente que isocrática (Jandera, 2006).

6.4 Formas de elucidación de moléculas a través de la técnica CLAR

En la técnica CLAR se puede clasificar de acuerdo al tipo de elucidación, en la cual se encuentra el sistema de cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa o RP-HPLC por sus siglas en inglés y esta consiste en una fase estacionaria hidrófoba y una fase móvil polar en donde los analitos se retienen principalmente por interacciones hidrófobas (Dong & Boyes, 2018). Por otro lado, la cromatografía en fase normal (NP-HPLC, por sus siglas en inglés) utiliza adsorbentes hidrófilos, mientras que la fase móvil consiste en una mezcla de disolventes orgánicos no polares y los componentes de la muestra se retienen por interacciones hidrófilas (Jandera, 2002).

Un enfoque alternativo o complementario a la cromatografía de modo único es la técnica CLAR de modo mixto. Como su nombre indica utiliza más de una forma de interacciones entre las fases estacionarias y los solutos, además puede lograr más de un tipo de separación en una sola columna cromatográfica (Lujun Wang *et al.*, 2016).

La cromatografía de modo mixto ofrece buenos resultados, pero tienen algunas dificultades. Debido a que cuando se involucran múltiples mecanismos de retención, se deben controlar muchas variables para producir un método robusto y repetible. (Lujun Wang *et al.*, 2016; Bell, 2021).

6.5 El factor de la fase estacionaria para optimizar la separación de moléculas

El desarrollo de métodos en cromatografía se centra en el deseo de lograr un rendimiento óptimo en un conjunto de condiciones experimentales e instrumentales. Uno de los aspectos más importantes es la selección de la columna, que incluye consideraciones tanto para la fase estacionaria que interactúa con los analitos como la arquitectura de las estructuras del empaque para la fase (Godinho *et al.*, 2020).

6.5.1 Fases estacionarias para cromatografía reversa empleadas en la separación de moléculas

El desarrollo de octadecilmetilclorosilano (ODS, por sus siglas en inglés) material monomérico con el que se elaboró la primera columna cromatográfica C₁₈, fue tan efectivo que actualmente los enlaces de fase inversa continúan utilizando un silano monofuncional para maximizar la cobertura del ligando, este tipo de compuestos producen una densidad de ligando de alrededor de 3-4 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ en una superficie típica de sílice (Bocian & Buszewski, 2012). Actualmente los materiales de relleno de fase inversa contienen dos o tres centros de adsorción: un grupo hidrófobo de alquilo (C₄, C₈, C₁₈, C₃₀, etc.) o arilo, que a su vez puede estar unido a un grupo o cadena funcional polar (fenilo, amida -NH₂, -CN y -NO₂) (figura 12) y los grupos silanol polares residuales en la estructura principal de la partícula.

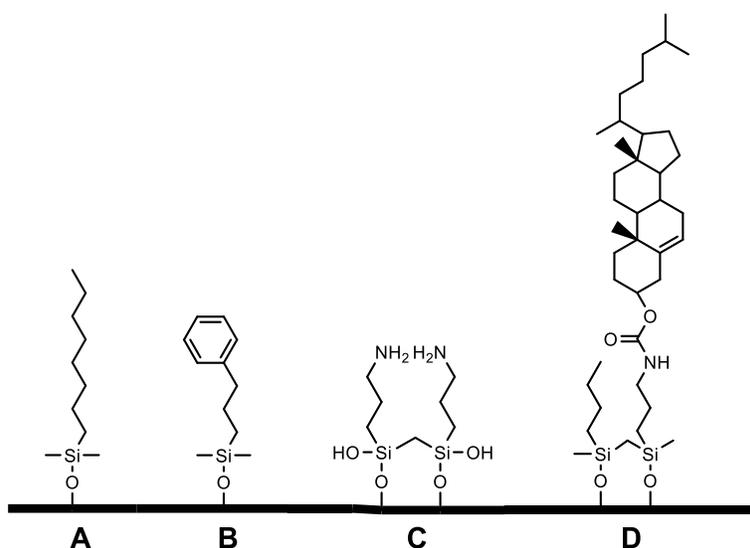


Figura 12. Diferentes tipos de fases estacionarias ligadas utilizadas en cromatografía líquida: Octil A), fenil-propil B), amino-propil C) y amino-colesterol D) (Recuperado de Bocian & Buszewski, 2012).

En la figura 13 se pueden observar algunas de las construcciones más recientes que se basan en la fase C18. El elemento A) muestra un ODS monofuncional convencional y la fase más común disponible en el mercado. El elemento B) muestra un silano bifuncional que se forma cuando un dicloro o un dialcoxisilano se une químicamente a la sílice; se cree que esta doble unión aumenta la estabilidad del ligando a valores de pH más bajos. El elemento C) muestra un silano “voluminoso” en el que un grupo isopropilo o isobutilo impide que el enlace siloxano se separe por hidrólisis a valores de pH bajos. El elemento D) muestra una fase donde se injerta un organosilano bidentado en una partícula de sílice, protegiendo la superficie de la disolución a pH alto. Esta última técnica de puentes “reticulación” puede extenderse de una a varias capas protectoras orgánicas e inorgánicas, proporcionando estabilidad a la fase de manera general. El elemento E) muestra una cadena de alquilo muy parecida a sus contrapartes C 18 pero contiene un grupo polar (amida, urea, éter, sulfonamida y carbamatos) introducido entre el material de soporte y la cadena alifática unida, se cree que el grupo polar interactúa con los silanoles en la superficie de la matriz sólida, reduciendo su actividad, tal fenómeno tiene un efecto beneficioso, particularmente en la separación de compuestos polares y básicos. Otra ventaja de este tipo de lecho es la capacidad de trabajar incluso cuando la fase móvil tiene un contenido muy bajo de modificador orgánico (Žuvela *et al.*, 2019; Lopez *et al.*, 2020).

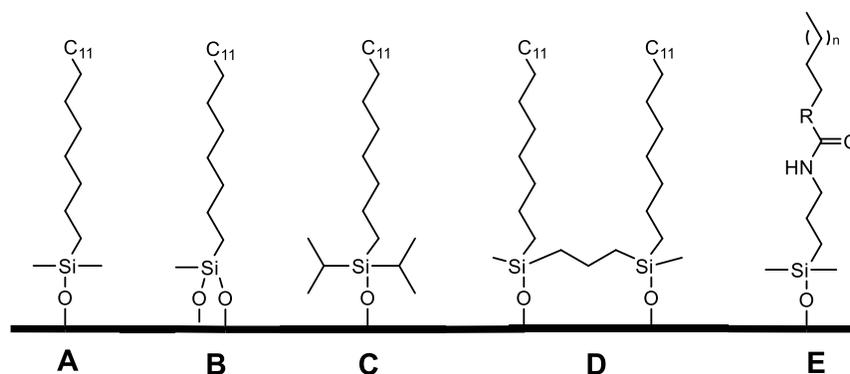


Figura 13. Construcción de fases estacionarias C18. A) octadecilsilano monofuncional, B) silano bifuncional, C) silano “voluminoso”, D) organosilano bidentado y E) cadena de alquilo con un grupo polar en la cadena (Recuperado de Lopez *et al.*, 2020).

6.6 Tipos de materiales de empaque de las columnas para la separación de moléculas

La sílice sigue siendo el material más popular para la unión con fases estacionarias, está constituido por un polímero amorfo de silicio y oxígeno. Su popularidad se debe a ventajas como su estabilidad física, una estructura y morfología de poros bien definidos y controlable (totalmente porosa, superficialmente porosa o monolítica) (Lopez *et al.*, 2020).

La superficie de este polímero contiene silanoles reactivos (Si-OH) que ofrecen una serie de posibilidades para la síntesis de fases ligadas químicamente, sin embargo, dado que la cobertura no se logra al 100%, los grupos residuales participan en el mecanismo de retención y pueden cambiar la concentración local de componentes eluyentes en la fase móvil y estacionaria, afectando de manera negativa la separación de analitos polares, especialmente compuestos básicos y biopolímeros (Bocian & Buszewski, 2012; Lopez *et al.*, 2020). Por tal motivo se han desarrollado soportes más estables como la sílice tipo “C” que consiste en reemplazar los grupos OH de la superficie por SiH; las partículas híbridas de etileno con puente o BEH, por sus siglas en inglés, se obtienen mediante copolimerización de tetraetoxisilano y 1,2-bis (trietoxisilil) etano, estas partículas brindan una buena resistencia mecánica a altas presiones y una mayor resistencia a la hidrólisis a pH altos; las partículas híbridas de superficie cargada (CSH, por sus siglas de inglés) incorporan en la superficie de BEH un número definido de grupos amina, los soportes de este tipo reducen las colas de los picos para las moléculas básicas en las fases móviles ácidas de baja fuerza iónica; recientemente las partículas de sílice de alta resistencia (HSS, por sus siglas en inglés) se ha desarrollado como una alternativa a las partículas BEH y CSH debido a que tienen una mayor posibilidad de interacciones de intercambio iónico, mejorando la retención de compuestos básicos (Gritti & Guiochon, 2013; Borges & Volmer, 2015; Žuvela *et al.*, 2019; Kadlecová *et al.*, 2020).

Como alternativa a las partículas de sílice se han empleado óxidos inorgánicos, por ejemplo, el zirconio, la alúmina y el titanio. Todos estos sustratos tienen en común su estabilidad de pH tanto bajo como alto, sin embargo, es importante considerar que muestran actividad acida y básica de Lewis, por lo tanto, se puede esperar un comportamiento significativamente diferente en cuanto a selectividad y retención de los sustratos (Claessens & Van Straten, 2004; Borges & Volmer, 2015; Žuvela *et al.*, 2019).

6.6.1 Estructura de los diferentes tipos de empaque

▪ Partículas no porosas

En los párrafos anteriores se describen algunos de los materiales empleados para la síntesis de empaques, como se menciona la variedad de estos se debe a las necesidades dependientes de las características de los analitos que se desea separar. A continuación, se describen algunas partículas con diferentes morfologías, porosidad y tamaños, cualidades a considerar para la correcta separación de analitos.

Las partículas de sílice no porosas, eran populares hace aproximadamente 20 años y podían medir de 1.5-3.0 μm (Xu & Stewart, 1999). La separación se producía en la superficie, debido a la corta trayectoria de difusión la transferencia de masa era más rápida y el ensanchamiento de la banda era adecuado. Sin embargo, debido a la baja superficie específica de la fase estacionaria; la retención, la selectividad y por tanto la resolución era limitada (Miyabe, 2008; Hayes *et al.*, 2014).

▪ Partículas totalmente porosas (PTP)

Las partículas totalmente porosas son un tema muy debatible dentro de la técnica CLAR constantemente se realizan artículos en donde se compara su desempeño con las partículas superficialmente porosas (PSP), hasta hace unos años se empleaban partículas de 2.5-5.0 μm en equipos que soportaban como máximo una presión de 400 bar (Kahsay *et al.*, 2014; Perrenoud *et al.*, 2014; Ken Broeckhoven *et al.*, 2017; Felletti *et al.*, 2020). Su principal ventaja es un área de superficie específica mucho mayor en comparación con PSP, sin embargo, esta característica se correlaciona con una mayor resistencia al flujo (Schure *et al.*, 2017; K. Broeckhoven & Desmet, 2021). Actualmente las nuevas tecnologías han permitido la introducción de la cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UHPLC, por sus siglas en inglés) que solo difiere en la instrumentación que puede soportar hasta 1500 bar y columnas empaquetadas con partículas menores a 2.0 μm , en estas condiciones se pueden producir picos muy estrechos teniendo entonces una funcionalidad comparable con PSP, aún con ello es importante mencionar que no se pueden descartar condiciones como la velocidad de flujo, los diferentes tamaños de partículas, su porosidad, entre otros factores para obtenerlos picos ideales (Ken Broeckhoven *et al.*, 2017; Felletti *et al.*, 2020).

- **Partículas superficialmente porosas (PSP)**

Como se mencionó en el párrafo anterior las partículas núcleo con capa mejor conocidas como partículas superficialmente porosas (PSP) han sido de los progresos más significativos para la técnica CLAR, sobre todo considerando que la implementación de las nuevas tecnologías como UHPLC representan costos económicos, la utilización de estas columnas fueron la mejor alternativa para obtener buenos resultados en equipos tradicionales comparables con partículas totalmente porosas de 0.2 μm en UHPLC. Las partículas superficialmente porosas están constituidas por un núcleo sólido como se muestra en la figura 14A que puede ser de sílice o de otros materiales el cual está rodeado de una o varias capas de partículas más pequeñas figura 14B (Gumustas *et al.*, 2019; Felletti *et al.*, 2020).

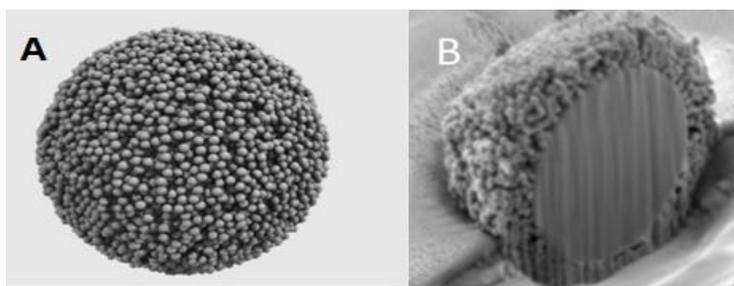


Figura 14. A) Estructura de una partícula núcleo capa y B) microscopía electrónica de barrido de PSP realizada a partir del método multicapa vista a partir de un corte transversal (Recuperado de Schure *et al.*, 2017).

Las ventajas de usar PSP como materiales de empaque incluyen menos dispersión de remolinos debido a un lecho empacado más homogéneo, menos difusión longitudinal, así como mejor transferencia de masa sólido-líquido comparado con PTP gracias a su menor porosidad de partículas y a la presencia de un núcleo sólido (Gritti *et al.*, 2012).

Sus métodos de elaboración dan como resultado superficies de partículas externas rugosas que pueden limitar el rendimiento de las columnas, especialmente a altas velocidades de fase móvil debido a que generan una resistencia de transferencia de masa durante el análisis de moléculas grandes (Fekete *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2016). El diámetro de este tipo de partículas se encuentran disponibles con tamaños de 5 μm , 2,7 μm , 2,6 μm y 1,7 μm , 1,3 μm o menores (Gritti & Guiochon, 2011; Gumustas *et al.*, 2019).

- **Monolitos**

Una columna monolítica consiste en una sola pieza de material poroso que se sella herméticamente contra la pared interna de un tubo, el material que forma esta única pieza porosa puede ser un polímero orgánico o sílice (Staniak *et al.*, 2020).

Los monolitos de sílice se pueden modificar químicamente para obtener la fase estacionaria deseada, como la fase inversa, la interacción hidrófila y el intercambio iónico (Guiochon, 2007).

Generalmente, el material poroso se caracteriza por una distribución bimodal del tamaño de los poros, es decir que está constituido por dos tipos de poros (figura 15A); el modo de gran tamaño se conoce como macroporos (figura 15B), el modo de tamaño pequeño como mesoporo (figura 15C). Los primeros están interconectados para formar los canales para el flujo de convección de la fase móvil, mientras que los segundos conforman el esqueleto de la fase estacionaria (Guiochon, 2007; Staniak *et al.*, 2020).

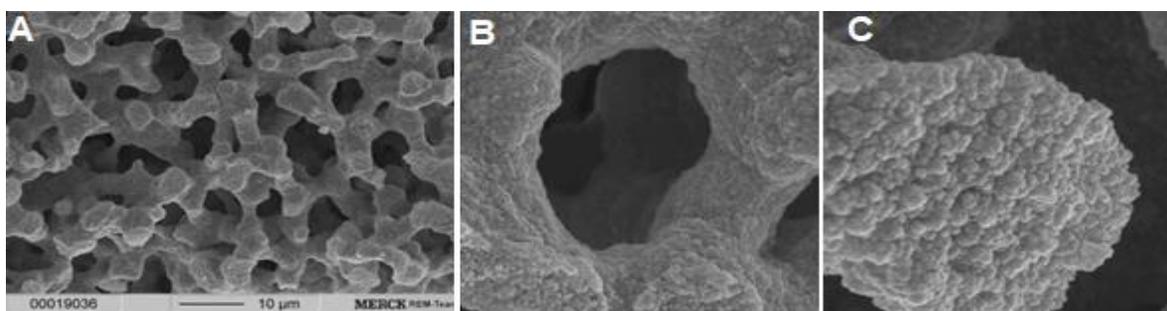


Figura 15. A), Microscopia electrónica de barrido de la estructura porosa de sílice monolítica típica, B) vista ampliada de la entrada de un macroporo y C) estructura mesoporo del esqueleto de una columna de sílice monolítica (Recuperado de Guiochon, 2007).

Las columnas monolíticas tienen como ventaja su alta porosidad que conduce a una alta permeabilidad, lo que permite una separación más rápida a través de una longitud larga, con esto se logran análisis con tiempos cortos a presiones bajas en comparación con las columnas empaquetadas de partículas, además proporcionan una baja resistencia a la transferencia de masa. En conjunto estas dos características logran una alta resolución de columna. Sin embargo, presentan ciertas restricciones de aplicación, como un rango de trabajo de pH más estrecho entre 2 y 8, especialmente para columnas a base de sílice y la reproducibilidad de las columnas puede ser inconsistente (Khoo & Leow, 2021).

Como se ha demostrado en los apartados 6.5 y 6.6 existe una amplia variedad de fases estacionarias para los diferentes modos cromatográficos, tan solo en la farmacopea de los Estados Unidos de América (USP) se encuentran registradas 858 fases de cromatografía

liquida C18, por lo tanto la selección puede ser un tanto complicada, se espera que la constante evolución de programas computacionales sea determinante en la simulaciones moleculares para la comprensión de mecanismos complejos de retención (Lopez *et al.*, 2020; Žuvela *et al.*, 2019).

6.7 Precolumnas

Una columna de protección o precolumna es una versión más pequeña de la columna analítica (a menudo con el mismo material de empaque y diámetro, pero con longitudes del orden de 5-10 mm) se coloca antes de la columna principal y su función es protegerla de la degradación al atrapar cualquier material agresivo o fuertemente retenido. La columna de protección se puede reemplazar por una nueva después del análisis de aproximadamente 50-100 muestras. (Dolan, 2005; Stoll, 2017; Young & Dolan, 2003).

6.8 Limpieza y almacenamiento de columnas cromatográficas

Una vez que ha concluido el análisis de una muestra la columna cromatográfica se lava ya sea para realizar otro análisis o para ser almacenada. Existen consideraciones importantes dentro de este proceso como; lavar la columna con solventes que no tengan un pH muy alto o bajo debido a que la fase estacionaria podría hidrolizarse de la columna a $\text{pH} < 2$ y la sílice se disuelve a $\text{pH} > 8$. Los materiales nuevos a base de sílice han hecho que el daño químico sea menor, sin embargo, cuando la columna no posee esa característica lo mejor es mantener el pH entre 2.5-7-5 (Dolan, 2005; Pettersson *et al.*, 2007).

De manera más específica para las columnas de fase reversa que suelen utilizar acetonitrilo en la fase móvil y las sales de fosfato como buffer, se debe considerar que son incompatibles entre sí por lo que lavar la columna con un 100% de acetonitrilo ocasiona la precipitación de las sales dentro de ella, en el tubo de conexión y en la bomba. La solución parece fácil, debido a la solubilidad, lo ideal sería utilizar agua para eliminar los agentes amortiguadores, no obstante, esta acción ocasionaría que la fase estacionaria se “deshumedezca” lo que significa que el agua se eliminaría de la fase unida y en ocasiones de los poros de las partículas, lo que llevaría a una pérdida dramática de retención si la columna se utiliza en ese estado. Para evitar estas complicaciones se aconseja primero lavar los amortiguadores con aproximadamente 10 volúmenes de columna de fase móvil que contenga

aproximadamente un 10% de disolvente orgánico en agua. Este procedimiento evitara tanto la precipitación como la deshumectación (Stoll, 2017; Swartz, 2010).

Respecto al almacenamiento, en 2017 Stoll revisó 30 hojas de cuidados para columnas en donde encontró que 35% recomendaban reservar la columna en acetonitrilo o metanol puro, mientras que el resto recomendaban conservar la columna con una mezcla de solvente orgánico y agua donde la proporción recomendada oscilo entre 80:20 y 50:50, en este punto hay que considerar que los filtros de acero inoxidable que retienen las partículas en el lecho de la columna, pueden erosionarse más rápido si únicamente se utiliza solvente puro que con la adición de una pequeña cantidad de agua. Al final depende de la aplicación de la columna pues en varios casos, el almacenamiento no afecta el rendimiento de la columna, lo ideal sería revisar el desarrollo del método para evitar problemas a futuro.

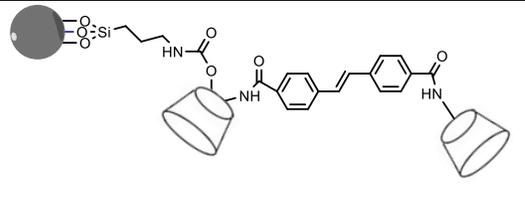
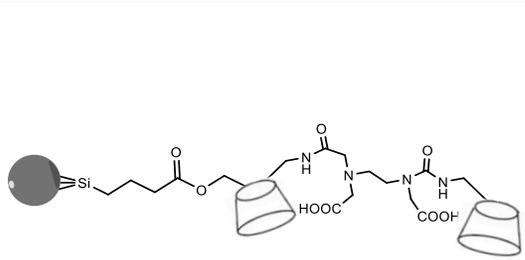
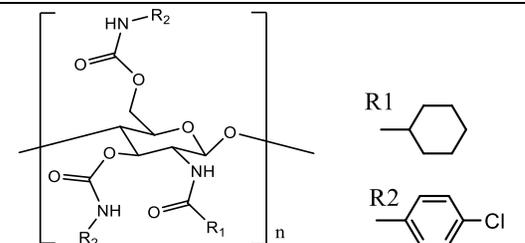
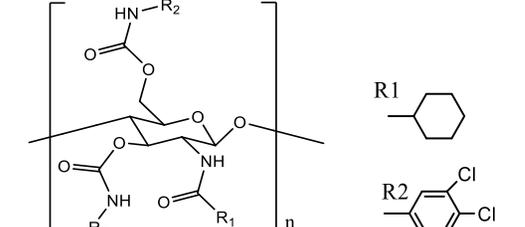
6.9 Fases estacionarias quirales empleadas para la separación de moléculas en una mezcla racémica

La fase estacionaria quiral para CLAR es un elemento clave durante el proceso de separación e identificación de los compuestos de una mezcla racémica. Es necesario que cuente con átomos que le permitan más interacciones con uno de los enantiómeros, lo que ocasiona la formación transitoria de un diastereómero dando como resultado diferencias en los tiempos de retención, es decir, el isómero con más afinidad por la fase estacionaria tiene un tiempo de retención mayor en comparación con su imagen especular quien al no poder interactuar del mismo modo eluye primero (Tarafder & Miller, 2021). Las interacciones dipolo-dipolo, los enlaces de hidrógeno, los enlaces pi (π - π), impedimento estérico y complejos de inclusión, son los factores principales que controlan la formación de complejos diastereómeros temporales (Batista *et al.*, 2018).

Existe una amplia variedad de selectores quirales como los derivados de proteínas, ciclodextrinas, ciclofuranos, intercambiadores de iones, éteres corona, intercambiadores de ligandos, entre otros. Sin embargo, los que se emplean con más frecuencia son los derivados de polisacáridos, los antibióticos macrólidos y los tipos Pirkle; su popularidad se debe a su versatilidad, ya que para la separación de varios analitos se puede emplear el modo reversa, normal o polar orgánico (Scriba, 2016; Teixeira *et al.*, 2019). En la Tabla 1 se describen algunos ejemplos de CPS desarrolladas recientemente para la separación e identificación de fármacos quirales conocidos.

Tabla 1. Nuevas fases estacionarias quirales desarrolladas para el análisis de fármacos.

Tipo de CSP	Estructura	Características del empaque			Componentes del selector quiral	Fármacos	Referencia
		Material de empaque	Tamaño de la partícula (µm)	Tamaño del poro Å			
Pirkle		Sílice	5	80	variantes de (S) - N - (1-aryl-allyl) -3,5-dinitrobenzamidás	AINES Ibuprofeno ketoprofeno naproxeno flurbiprofeno suprofeno fenoprofeno lorazepam oxazepam temazepam	(Knežević <i>et al.</i> , 2019)
Mixta		Sílice	9	100	Derivado de L-hidroxiprolina 1-octeno mercaptopropilo	β-bloqueador Atenolol	(Bai & Chen, 2021)

A base de ciclodextrina		Sílice SBA-15	3.2	240	Bis (β-ciclodextrinas) con puente diamido de 4,4'-etilbeno	Antiparasitario prazicuantel Antihistamínico trimeprazina	(Shuang, Zhang, <i>et al.</i> , 2020)
					Bis (β-ciclodextrinas) con puente de etilendiamina dicarboxietil diamido	Bloqueadores metoprolol atenolol esmolol propranolol carteolol carvedilol arotinolol labetalol	(Shuang, Liao, <i>et al.</i> , 2020)
A base de polisacáridos		Sílice	7	1000	Bis (cloro fenil carbamato)-(N-ciclohexilformamida de quitosano	Barbitúrico mefobarbital Antidepresivo citalopram	(Tang <i>et al.</i> , 2018)
					Bis (3,4-diclorofenilcarbamato)-(N-ciclohexilformamida) de quitosano	Antifúngico voriconazol	

Debido a que no hay ningún producto universal, la amplia disponibilidad de CSP es un factor que puede causar dificultades previo al análisis de un enantiómero determinado, afortunadamente se ha mencionado que el conocimiento del fundamento permite realizar de manera consciente el cribado de información respecto a la fase móvil y la CPS para un analito determinado lo que le permite al analista optimizar los recursos y obtener buenos resultados (Tarafder & Miller, 2021).

6.10 Detección de las moléculas activas quirales en un sistema CLAR

En un sistema CLAR, el detector es el componente responsable de convertir un atributo físico o químico en una señal correspondiente a la concentración o identidad de masa de los analitos separados (Swartz, 2010). Por un lado, están los detectores universales, capaces de responder a casi cualquier analito, independientemente de la fase móvil y por el otro están los detectores selectivos que solo pueden detectar compuestos con ciertas características (Magnusson *et al.*, 2015).

Hay muchos tipos de detectores para CLAR, por lo que las características deseadas en un detector son; alta sensibilidad, respuesta predecible y reproducible, amplio rango dinámico (es decir respuesta que aumenta linealmente con la cantidad de soluto), y que la temperatura y el flujo de la fase móvil no afecten en la respuesta, además que no contribuyan al ensanchamiento de la banda extra-columna, confiable y conveniente de usar, no destruya al analito, que proporcione información cualitativa y cuantitativa sobre el pico detectado y por último, que proporcione una respuesta rápida, sin embargo, ningún detector tiene todas esas propiedades, a través de los años se han diseñado varios dispositivos que cumplen con uno u otro desafío (Zhang *et al.*, 2019).

En los siguientes párrafos se describirán las propiedades más relevantes de algunos de los detectores que se emplean comúnmente para CLAR, sobre todo para el análisis de moléculas quirales.

▪ Detectores ultravioleta-visible (UV/Vis)

El detector UV-Vis acoplado a CLAR se usa ampliamente en análisis farmacéuticos y control de calidad, debido a que es robusto, sensible, tiene un amplio rango de linealidad, es fácil de usar requiere poco mantenimiento y es relativamente accesible en comparación con otros detectores (Zhang *et al.*, 2019).

El mecanismo del detector Ultravioleta-Vis consiste en hacer incidir un haz de luz sobre una solución diluida de analito, cuya concentración es emitida como absorbancia por la fracción de luz transmitida a través de la celda siguiendo la ley de Beer- Lambert: $A = \epsilon lc$ donde A es la absorbancia, ϵ es el coeficiente de absorción molar ($\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), l es la longitud de la trayectoria de la celda de flujo (cm) y c es la concentración de la solución (mol dm^{-3}) (Essentials, 2018).

La mayoría de las bandas de absorción de UV corresponden a transiciones de electrones en las moléculas del analito. Varios de los detectores de UV-Vis operan en el rango de longitud de onda de 190 a 800 nm (Zhang *et al.*, 2019). Normalmente se utilizan tres tipos de detectores UV para CLAR: detector de longitud de onda fija, detector de longitud de onda variable y detector de matriz de fotodiodos (PDA o DAD por sus siglas en inglés). El detector de longitud de onda fija generalmente utiliza una lámpara de vapor de mercurio como fuente, la línea de emisión de salida que se usa es de 254 nm (Swartz, 2010). El detector de onda variable utiliza una fuente de deuterio y un monocromador para permitir la selección de una longitud de onda particular en la región UV-Vis para la detección selectiva y la luz transmitida es registrada por un solo fotodiodo. En el detector de matriz de fotodiodos (DAD) la luz policromática es dirigida a través de la celda de flujo y la luz transmitida es guiada hacia un policromador donde una matriz de fotodiodos registra simultáneamente señales de múltiples longitudes de onda. Es el detector más popular para CLAR debido a su versatilidad para sintonizar diferentes longitudes de onda y recolectar simultáneamente el espectro UV de un compuesto para la identificación de solutos. Los espectros recogidos a lo largo del perfil de pico se pueden utilizar para determinar la pureza o para evaluar si hay coelución con otros compuestos (Vehovec & Obreza, 2010).

Es importante elegir buffers y disolventes que tengan un corte de UV (longitud de onda a la que el componente puro tiene una absorbancia de 1 unidad en una celda de 1 cm de longitud de trayectoria con agua como referencia) bajo para limitar la señal de fondo y aumentar la sensibilidad de detección (Essentials, 2018).

Una limitación importante de la radiación UV es que las moléculas con cromóforos UV pobres o nulos no pueden analizarse mediante UV. Esto incluye compuestos en las clases de polímeros, lípidos, aminoácidos, carbohidratos e iones inorgánicos, que carecen de cromóforos UV significativos (Zhang *et al.*, 2019).

- **Espectrómetro de masas**

La espectrometría de masas es una técnica importante para la detección de compuestos orgánicos e inorgánicos, ya que puede proporcionar información sobre el peso molecular y detalles estructurales. (Bianchi *et al.*, 2018).

Una vez que la muestra ha sido separada en sus componentes correspondientes, estos son introducidos por un nebulizador en la fuente de ionización, donde a través de diferentes manipulaciones física y químicas, se proporciona una carga a las partículas de interés. Estos materiales cargados se introducen en el analizador de masas que separa los iones en función de su relación masa/carga (m/z). Los iones se pueden detectar cuando chocan con un multiplicador de electrones o inducen una corriente al orbitar dentro de un electrodo (Zhang *et al.*, 2019).

Al parecer la fuente de ionización es uno de los componentes del detector que más influyen en los resultados, de manera que existe la electropulverización, la ionización química a presión atmosférica y la ionización por láser a presión atmosférica que se emplean considerando las características de la molécula que se desea analizar como el tamaño y la polaridad, sin embargo, la baja fragmentación de las estructuras limita la caracterización de compuestos. Con el fin de mejorar esta desventaja se creó la ionización de electrones este método permite el análisis de moléculas pequeñas a medianas con un amplio rango de polaridad y con alto grado de reproducibilidad, también proporciona un patrón de fragmentación bueno con una cantidad significativa de información estructural que permite una identificación de estructuras a nivel de isómero (Palma *et al.*, 2010; Swartz, 2010; Bianchi *et al.*, 2018).

La espectrometría en masas es una herramienta empleada en diversas áreas, por tal motivo siempre se están buscando alternativas en cuanto a la fuente de ionización y los analizadores con el fin de optimizar su uso y perfeccionar los resultados.

Con el objetivo de mejorar la visión estructural de los metabolitos la espectrometría de masas en tándem, comúnmente abreviado como MS/MS consiste de manera general en ionizar la muestra por alguno de los métodos mencionados, posteriormente pasa por un primer espectrómetro MS1 en donde los componentes de la muestra se separan y ordenan de acuerdo con su m/z , luego los iones pasan por la celda de colisión en donde se generan fragmentos como producto de su choque con un gas inerte; los fragmentos generados pasan por un segundo espectrómetro MS2, los cuales

se pueden correlacionar con las moléculas seleccionadas en el MS1. La información sobre las estructuras de los metabolitos depende del método de MS en tándem empleado como los espectrómetros de masa en cuadrupolo (Q), tiempo de vuelo (TOF), sector electrónico (ES), transformada de Fourier (FT-ICR), entre otros (Fernández-Lainez *et al.*, 2009; Heiles, 2021).

▪ **Detector de fluorescencia**

La detección de la fluorescencia o FD por sus siglas en inglés es una técnica muy sensible, casi sin fondo, limitada principalmente por el rendimiento cuántico de fluorescencia del analito y la complejidad de la matriz, que pueden causar interferencias, extinción o auto-fluorescencia (Andrews *et al.*, 2017). La detección de los fluorocromos se logra mediante la excitación UV con una sola longitud de onda y la dispersión de todo el espectro de emisión de fluorescencia (por ejemplo, la fluorescencia emitida por láser) o excitando la muestra en un amplio rango de longitudes de onda y detectando en todo el espectro de luz emitida una función de la longitud de onda de excitación con un detector de banda ancha (espectroscopia de excitación por fotoluminiscencia). En muestras líquidas, las bandas de excitación y emisión son amplias, lo que dificulta la distinción de los fluorocromos en las mezclas (Geng *et al.*, 2018).

El detector de manera general cuenta con una lámpara de xenón que puede cubrir de 250-1050 nm, además de una rejilla óptica como monocromador que cuenta con varios reflectores o un filtro óptico, luego la luz se dirige a la celda de flujo y la muestra que emite fluorescencia es captada por un amplificador. Debido a que las distancias que recorre la luz en estos sistemas son largas se pierde la eficiencia óptica, para solucionar dicho problema los científicos han modificado varias partes del detector como las fuentes de luz que en ocasiones se sustituyen por lámparas LED, también los reflectores son acomodados en diferentes ángulos para lograr la excitación de las moléculas (Andrews *et al.*, 2017; Geng *et al.*, 2018; Ferguson *et al.*, 2021).

La información de estos tres detectores tiene relevancia debido a que son empleados con más frecuencia para el análisis de moléculas quirales, sin embargo, existen otros detectores que pueden acoplarse a CLAR como los detectores a base de aerosol o RMN.

7 Análisis mediante CLAR de moléculas nuevas aprobadas por la FDA

Con respecto a las moléculas con uno o más centros quirales, es un tema que ha tenido grandes avances en cuanto a desarrollo instrumental en la técnica CLAR, un claro ejemplo de ello son las

fases estacionarias antes mencionadas, capaces de diferenciar entre los componentes de una mezcla racémica y los detectores acoplados que ayudan a elucidar la estructura de las moléculas de interés. Por lo que, el desarrollo de nuevas moléculas se encuentra estrechamente relacionado con esta herramienta ya que permite la elucidación estructural en las distintas etapas de síntesis, así como la separación con elevados porcentajes de pureza (arriba de 90%).

La FDA a lo largo de cada año se encarga de revisar las nuevas solicitudes para la aprobación de nuevas entidades moleculares (NEM), es importante mencionar que de acuerdo con la descripción de su base de datos, las moléculas se pueden clasificar como primeras en su clase lo que significa que *“son productos nuevos e innovadores que nunca se han utilizados en la práctica clínica”* o pueden ser entidades iguales o relacionadas con productos previamente aprobados que *“contienen restos activos que no han sido aprobados previamente por la FDA, ya sea como un medicamento de un solo ingrediente o como parte de un producto combinado; estos productos proporcionan con frecuencia nuevas terapias importantes para los pacientes”* (FDA, 2020).

De enero de 2019 a diciembre de 2020 se admitieron 69 fármacos de los cuales 40 eran enantiómeros individuales mientras que el resto eran aquirales, de los enantiómeros aceptados 28 correspondían a medicamentos que fueron previamente aprobados y 12 fueron clasificados como primeros en su clase. De cada uno de estos fármacos se realizó una búsqueda en bases de datos como PUBMED, BIDIUAM, ELSEVIER y Wiley online library mediante palabras clave como análisis, HPLC y el nombre del principio activo (API, por sus siglas en inglés). El resultado de esta investigación se presenta en la Tabla 2, resaltando en cada columna las condiciones analíticas bajo las cuales se analizó cada molécula que fue aprobada por la FDA.

Tabla 2. Condiciones analíticas empleadas en la técnica CLAR para en análisis de NEM 2019-2020

Molécula activa	Tipo de muestra	Nombre y características de la columna	Modo de separación	Fase móvil	Temperatura °C	pH	Flujo mL/ min	Detector	Tipo de elución	Referencia
Entidades previamente aceptadas 2019										
Cenobamato	Tabletas	Gemini-C18 (150 x 4.6 mm) 3 µm	Reversa	A: ácido trifluoroacético al 0.05% en agua B: ácido trifluoroacético al 0.04% en acetonitrilo/ alcohol isopropílico 78:28 v/V	35	—	1	UV-vis	Gradiente	(Ferrari <i>et al.</i> , 2020)
Cefiderocol	Plasma sanguíneo	Kinetex de bifenilo (150 x 4.6 mm) 5 µm	Reversa	Buffer de fosfatos y acetonitrilo	30	2.6	1	UV-Vis	Gradiente	(Mernissi <i>et al.</i> , 2021)
Lefamulin	Plasma sanguíneo	Kinetex-C18 (30 x 2.1 mm) 2.6 µm	Reversa	A: ácido fórmico al 0.1 % en agua B: ácido fórmico al 0.1 % en metanol	40	—	0.5	MS/MS	Gradiente	(Strickmann <i>et al.</i> , 2021)
Lemborexant	Tabletas	Kromasil-C18 (150 x 4.6 mm) 3.5 µm	Reversa	Metanol y agua 75:25 v/v	27	2.7	1	UV-Vis	Isocrático	(Muralikrishna <i>et al.</i> , 2020)
Darolutamida	Plasma sanguíneo	X-Terra phenyl (150 x 3.9 mm) 5 µm	Reversa	A: acetato de amonio 10 mM B: acetonitrilo	40	4.8	0.20-1.20 conforme avanza el tiempo	PDA	Gradiente	(Zakkula <i>et al.</i> , 2019)

Alpelisib	Plasma sanguíneo	Capcell pack-C18 MGIII (250 X 4.6 mm) 5 µm	Reversa	Buffer de fosfato de potasio 10 mM y acetonitrilo 59:41 v/v	40	6.6	1	FD	Isocrático	(Seo <i>et al.</i> , 2021)
Siponimod	Producto de síntesis	Zorbax Eclipse Plus-C18 (150 x4.6 mm) 5 µm	Reversa	ácido fórmico al 0.5% en acetonitrilo y agua 65:35 v/v	—	3	1.2	UV-Vis	Isocrático	(Sartawi <i>et al.</i> , 2020)
Solriamfetam	Producto de síntesis	Lux Amylose-1 [amilosa tris (3,5-dimetilfenilcarbamato)] (150 x 4.6 mm)	Orgánico polar	Di etilamina al 0.05% y metanol	20	—	0.6	UV-Vis	Isocrático	(Köteles <i>et al.</i> , 2020)
Entidades moleculares primeras en su clase 2019										
Pretomanida	Estándar de referencia	Luna C18(2) (150 x4.6 mm) 5 µm, 100Å	Reversa	A: buffer de fosfato de trietilamina B: metanol	15	2.5	1	PDA	Gradiente	(Momin <i>et al.</i> , 2017)
Entidades moleculares previamente aceptadas 2020										
Nifurtimox	Citosol hepático	Hewlett-Packard-C18 Hypersil (20 cm x 2.1 mm) 5µm	Reversa	metanol al 60% y agua	40	—	0.2	PDA	Isocrático	(Díaz <i>et al.</i> , 2004)

Lurbnectedin	Plasma sanguíneo-orina	Achrom ACE-C18 (30 x 2.1 mm) 3 µm	Reversa	A: ácido fórmico al 0.1% en agua-acetonitrilo (90:10 v/v) B: ácido fórmico al 0.1% agua-acetonitrilo (10:90 v/V)	50	—	0.6	MS-MS	Gradiente	(van Andel <i>et al.</i> , 2018)
Artesunate	Tabletas	C18-Promosil ODS (150 x 4.6 mm) 5 µm	Reversa	Etanol y agua 65:35 v/v	—	4.5	1	UV-Vis	Isocrático	(Saeed <i>et al.</i> , 2020)
Ozanimod	Producto de síntesis	Lux amylose-1 (150 x 4.6 mm) 5 µm	Orgánico polar	2-propanol y metanol 70:30 v/v	25	—	0.2	PDA	Isocrático	(Horváth <i>et al.</i> , 2020)
Pralsetinib	Plasma sanguíneo	Acquity UPLC BEH-C18 (30 x 2.1 mm) 1.7 µm	Reversa	A: Hidróxido de amonio al 0.02% en agua B: Metanol	40	—	0.6	MS/MS	Gradiente	(Şentürk <i>et al.</i> , 2020)
Decitabina y cedazurina	Tabletas	X-Terra-C18 (250 x 4.6 mm) 5 µm	Reversa	Buffer de ácido ortofosfórico al 0.1% y metanol 40:60 v/v	—	6.5	1	PDA	Isocrático	(Ishaq <i>et al.</i> , 2020)
Rimegepant	Estándar de referencia	Waters-C18 (250 x 4.6 mm) 5 µm	Reversa	Buffer de ortofosfato de dihidrógeno potásico en metanol 30:70 v/V	—	7	0.8	PDA	Isocrático	(Kumar & Chandrasekhar, 2021)

Avaprinib	Producto de síntesis	Xterra-C18 (150 x 4.6 mm) 5 µm	Reversa	Ácido fórmico al 0.1% en agua y acetonitrilo 40:60	—	—	1	UV-Vis	Isocrático	(Singh <i>et al.</i> , 2020)
Entidades moleculares primeras en su clase 2020										
Lonafarnib	Producto de síntesis	Luna fenil-hexilo (250 x 4.6 mm) 5µm	Reversa	A: acetato de amonio 20 mM B: acetonitrilo	40	6,0	1	MS	Gradiente	(Tong <i>et al.</i> , 2006)
Remdesevir	Estándar de referencia	Agilent Zorbax Eclipse SB-C18 (250 x 4.6 mm) 5µm	Reversa	Acetonitrilo y agua (acidificada con ácido orto- fosfórico) 55:45 (v/v)	—	4,0	—	PDA-FD	Isocrático	(Hamdy <i>et al.</i> , 2021)
Tirbanibulin	Producto de síntesis	Agilent- C18 (150 x 4.6 mm) 5 µm	Reversa	Metanol y agua 72:28 v/v	25	—	1	UV-Vis	Isocrático	(Lun Wang <i>et al.</i> , 2021)

La información recopilada respecto a las condiciones de análisis empleadas durante la aplicación de la técnica CLAR que se muestra en la tabla anterior, corresponde a un total de 16 fármacos pertenecientes al grupo de los previamente aprobados por la FDA y 4 clasificados como primeros en su clase. Con relación a los 20 principios activos faltantes, algunos medicamentos como Lactitol, Remimazolam (previamente aprobadas 2020), Upadacitinib (previamente aprobada 2019) y Selinexor (entidad molecular primera en su clase 2019) fueron analizados por UHPL; del resto presentes en la Tabla 3 existen artículos relacionados con cada uno de ellos, sin embargo, la información disponible se encuentra asociada a información que incluye comparaciones entre APIs que cuentan con similar mecanismo de acción, así como su determinación de dosis-respuesta y algunos de ensayos clínicos fase III. Sin embargo, hay algunos autores que reportan métodos de síntesis y que se menciona la utilización de CLAR después de cada paso dentro del proceso de obtención, pero no mencionan la descripción detallada de las condiciones analíticas.

Tabla 3. NEM aprobados por la FDA sin descripción detallada de análisis CLAR

Entidades moleculares previamente aceptadas		Entidades moleculares primeras en su clase	
2019	2020	2019	2020
Imipenem, cilastatina y relebactam	Fluoroestradiol F18	Brexanolona	Osilodrostato
Elexacaftor / ivacaftor / tezacaftor	Remimazolam	Tafamidis meglumine	Clascoterone
Zanubrutinib	Oliceridina	Istradefylline	Setmelanotide
Tosilato de lumateperona	Berotralstat	Tenapanor	
Ubrogepant	Vibegron		

8 Conclusión

Es importante resaltar que el método CLAR continúa siendo una de las técnicas analíticas que se emplea con más frecuencia para el estudio de las NEM con características quirales, así mismo prevalece la elucidación estructural mediante la fase reversa con columnas C18 y sus derivados, mientras que los detectores empleados para este tipo de moléculas son el UV-Vis, PDA y MS-MS.

Por otro lado, el requisito de una elevada pureza en la obtención de nuevos fármacos quirales exigido por instituciones regulatorias como la FDA puede ser cumplido exitosamente por el método CLAR o en algunos casos específicos por alternativas como la cromatografía de fluidos supercríticos y la cromatografía líquida de ultra alto rendimiento. Sin embargo, sigue siendo poca la información sobre la adaptación de estas metodologías para varias de las NEM aprobadas en los últimos años por lo que su análisis y determinación es una ventana de oportunidad en el área de la química analítica.

Referencias

- Agranat, I., Caner, H., & Caldwell, J. (2002). Putting chirality to work: The strategy of chiral switches. *Nature Reviews Drug Discovery*, 1(10), 753–768.
- Andrews, N. L. P., Ferguson, T., Rangaswamy, A. M. M., Bernicky, A. R., Henning, N., Dudelzak, A., Reich, O., Barnes, J. A., & Looock, H. P. (2017). Hadamard-Transform Fluorescence Excitation-Emission-Matrix Spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 89(16), 8554–8564.
- Atanasov, A. G., Zotchev, S. B., Dirsch, V. M., Orhan, I. E., Banach, M., Rollinger, J. M., Barreca, D., Weckwerth, W., Bauer, R., Bayer, E. A., Majeed, M., Bishayee, A., Bochkov, V., Bonn, G. K., Braidy, N., Bucar, F., Cifuentes, A., D'Onofrio, G., Bodkin, M., ... Supuran, C. T. (2021). Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(3), 200–216.
- Aykul, S., & Martinez-Hackert, E. (2016). Determination of half-maximal inhibitory concentration using biosensor-based protein interaction analysis. *Analytical Biochemistry*, 508, 97–103.
- Bai, H., & Chen, L. (2021). Simultaneous separation of atenolol enantiomers and its acid/alkaline degradation impurities on mixed-mode chiral ligand exchange stationary phases. *Chirality*, 33(10), 710–721.
- Batista, A. N. L., dos Santos, F. M., Batista, J. M., & Cass, Q. B. (2018). Enantiomeric mixtures in natural product chemistry: Separation and absolute configuration assignment. *Molecules*, 23(2), 1–18.
- Bell, D. S. (2021). Modern trends in mixed-mode liquid chromatography (LC) columns.

LC-GC North America, 39(2), 56–60.

- Bianchi, F., Riboni, N., Termopoli, V., Mendez, L., Medina, I., Ilag, L., Cappiello, A., & Careri, M. (2018). MS-Based Analytical Techniques: Advances in Spray-Based Methods and EI-LC-MS Applications. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2018.
- Bocian, S., & Buszewski, B. (2012). Residual silanols at reversed-phase silica in HPLC - A contribution for a better understanding. *Journal of Separation Science*, 35(10–11), 1191–1200.
- Borges, E. M., & Volmer, D. A. (2015). Silica, hybrid silica, hydride silica and non-silica stationary phases for liquid chromatography. Part II: Chemical and thermal stability. *Journal of Chromatographic Science*, 53(7), 1107–1122.
- Broeckhoven, K., & Desmet, G. (2021). Advances and Innovations in Liquid Chromatography Stationary Phase Supports. *Analytical Chemistry*, 93(1), 257–272.
- Broeckhoven, Ken, De Vos, J., & Desmet, G. (2017). Particles, pressure, and system contribution: The holy trinity of ultrahigh-performance liquid chromatography. *LC-GC Europe*, 30(11), 618–625.
- Broeckhoven, Ken, Shoykhet, K., & Dong, M. W. (2019). Modern HPLC Pumps: Perspectives, Principles, and Practices. *LCGC North America*, 37(6), 374–384.
- Calcaterra, A., & D'Acquarica, I. (2018). The market of chiral drugs: Chiral switches versus de novo enantiomerically pure compounds. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 147, 323–340.
- Casado, N., Valimaña-Traverso, J., García, M. Á., & Marina, M. L. (2020). Enantiomeric Determination of Drugs in Pharmaceutical Formulations and Biological Samples by Electrokinetic Chromatography. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 50(6), 554–584.
- Cerra, B., Macchiarulo, A., Carotti, A., Camaioni, E., Varfaj, I., Sardella, R., & Gioiello, A. (2020). Enantioselective HPLC analysis to assist the chemical exploration of chiral imidazolines. *Molecules*, 25(3), 1–12.
- Chen, L. C. (2019). High-temperature liquid chromatography and the hyphenation with mass spectrometry using high-pressure electrospray ionization. *Mass Spectrometry*, 8(2), 1–13.
- Chinchilla, R. (2020). Special issue: Development of asymmetric synthesis. *Molecules*,

25(6), 3–5.

- Chopra, B., & Dhingra, A. K. (2021). Natural products: A lead for drug discovery and development. *Phytotherapy Research, March*, 4660–4702.
- Claessens, H. A., & Van Straten, M. A. (2004). Review on the chemical and thermal stability of stationary phases for reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1060(1-2), 23–41.
- Coelho, M. M., Fernandes, C., Remião, F., & Tiritan, M. E. (2021). Enantioselectivity in drug pharmacokinetics and toxicity: Pharmacological relevance and analytical methods. *Molecules*, 26(11).
- Daley-Yates, P. T. (2015). Inhaled corticosteroids: Potency, dose equivalence and therapeutic index. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 80(3), 372–380.
- den Uijl, M. J., Schoenmakers, P. J., Pirok, B. W. J., & van Bommel, M. R. (2021). Recent applications of retention modelling in liquid chromatography. *Journal of Separation Science*, 44(1), 88–114.
- Diaz-Muñoz, G., Miranda, I. L., Sartori, S. K., de Rezende, D. C., & Alves Nogueira Diaz, M. (2019). Use of chiral auxiliaries in the asymmetric synthesis of biologically active compounds: A review. *Chirality*, 31(10), 776–812.
- Díaz, E. G., de Mecca, M. M., & Castro, J. A. (2004). Reactions of Nifurtimox with critical sulfhydryl-containing biomolecules: Their potential toxicology relevance. *Journal of Applied Toxicology*, 24(3), 189–195.
- Dodds, J. N., May, J. C., & McLean, J. A. (2017). Investigation of the Complete Suite of the Leucine and Isoleucine Isomers: Toward Prediction of Ion Mobility Separation Capabilities. *Analytical Chemistry*, 89(1), 952–959.
- Dolan, J. W. (2005). Extending column life. *LC-GC Europe*, 18(12), 642–649.
- Dong, M. W., & Boyes, B. E. (2018). Modern trends and best practices in mobile-phase selection in reversed-phase chromatography. *LC-GC Europe*, 31(10), 572–583.
- Espinosa, S., Bosch, E., & Rosés, M. (2002). Retention of ionizable compounds on HPLC. 12. The properties of liquid chromatography buffers in acetonitrile-water mobile phases that influence HPLC retention. *Analytical Chemistry*, 74(15), 3809–3818.
- Essentials, T. H. E. (2018). How it Works: UV Detection for HPLC. *LGC EUROPE*.

Solutions for Separation Scientist., 31(12), 686.

- Fekete, S., Oláh, E., & Fekete, J. (2012). Fast liquid chromatography: The domination of core-shell and very fine particles. *Journal of Chromatography A*, 1228, 57–71.
- Felletti, S., De Luca, C., Lievore, G., Pasti, L., Chenet, T., Mazzocanti, G., Gasparrini, F., Cavazzini, A., & Catani, M. (2020). Investigation of mass transfer properties and kinetic performance of high-efficiency columns packed with C18 sub-2 μm fully and superficially porous particles. *Journal of Separation Science*, 43(9–10), 1737–1745.
- Ferguson, T., Bernicky, A., Kozin, I., & Loock, H. P. (2021). HPLC-Detector based on Hadamard-transform fluorescence excitation-emission-matrix spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 93(23), 8116–8121. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c01037>
- Fernández-Lainez, C., Vela-Amieva, M., & Ibarra-González, I. (2009). Espectrometría de masas en tándem: una nueva herramienta para el estudio de la metabolómica en pediatría. *Acta pediátrica de México*, 30(5), 258–263.
- Ferrari, L., Nisman, A., Pegan, A., & Ursino, J. (2020). An Ex Vivo Evaluation of Cenobamate Administered via Enteral Tubes. *Drugs in R and D*, 20(2), 125–133.
- Finefield, J. M., Sherman, D. H., Kreitman, M., & Williams, R. M. (2012). Enantiomeric natural products: Occurrence and biogenesis. *Angewandte Chemie - International Edition*, 51(20), 4802–4836.
- Food and Drugs Administration. (15 de noviembre de 2019). *Novel drugs approvals for 2016-2020*. Recuperado de: <https://www.fda.gov/drugs/new-drugs-fda-cders-new-molecular-entities-and-new-therapeutic-biological-products/novel-drug-approvals-2016>.
- Food and Drugs Administration. (01 de marzo de 2018). *The drug development Process*. Recuperado de: <https://www.fda.gov/patients/learn-about-drug-and-device-approvals/drug-development-process>.
- Fu, B., Takeda, R., Zou, Y., Konno, H., Moriwaki, H., Abe, H., Han, J., Izawa, K., & Soloshonok, V. A. (2020). Asymmetric synthesis of (S)- α -(octyl)glycine via alkylation of Ni(II) complex of chiral glycine Schiff base. *Chirality*, 32(12), 1354–1360.
- García-Álvarez-Coque, M. C., Torres-Lapasió, J. R., & Baeza-Baeza, J. J. (2006). Models and objective functions for the optimisation of selectivity in reversed-phase liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 579(2), 125–145.
- Geng, X., Wang, N., Gao, Y., Ning, H., & Guan, Y. (2018). A novel HPLC flow cell

integrated UV light emitting diode induced fluorescence detector as alternative for sensitive determination of aflatoxins. *Analytica Chimica Acta*, 1033, 81–86.

- Gesmundo, N. J., Sauvagnat, B., Curran, P. J., Richards, M. P., Andrews, C. L., Dandliker, P. J., & Cernak, T. (2018). Nanoscale synthesis and affinity ranking. *Nature*, 557(7704), 228–232.
- Gfeller, D., Grosdidier, A., Wirth, M., Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2014). SwissTargetPrediction: A web server for target prediction of bioactive small molecules. *Nucleic Acids Research*, 42(W1), 32–38.
- Godinho, J. M., Naese, J. A., Toler, A. E., Boyes, B. E., Henry, R. A., DeStefano, J. J., & Grinias, J. P. (2020). Importance of Particle Pore Size in Determining Retention and Selectivity in Reversed Phase Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1634.
- Goldstein, M. J., Peters, M., Weber, B. L., & Davis, C. B. (2021). Optimizing the Therapeutic Window of Targeted Drugs in Oncology: Potency-Guided First-in-Human Studies. *Clinical and Translational Science*, 14(2), 536–543.
- Gritti, F., & Guiochon, G. (2011). Theoretical investigation of diffusion along columns packed with fully and superficially porous particles. *Journal of Chromatography A*, 1218(22), 3476–3488.
- Gritti, F., & Guiochon, G. (2013). Effect of the pH and the ionic strength on overloaded band profiles of weak bases onto neutral and charged surface hybrid stationary phases in reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1282, 113–126.
- Gritti, F., Tanaka, N., & Guiochon, G. (2012). Comparison of the fast gradient performance of new prototype silica monolithic columns and columns packed with fully porous and core-shell particles. *Journal of Chromatography A*, 1236, 28–41.
- Guiochon, G. (2007). Monolithic columns in high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1168(1–2), 101–168.
- Gumustas, M., Zalewski, P., Ozkan, S. A., & Uslu, B. (2019). The History of the Core–Shell Particles and Applications in Active Pharmaceutical Ingredients Via Liquid Chromatography. En *Chromatographia* (Vol. 82, Número 1). Springer Berlin Heidelberg.
- Haddad, P. R., Taraji, M., & Szücs, R. (2021). Prediction of Analyte Retention Time in

Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry*, 93(1), 228–256.

- Hamdy, M. M. A., Abdel Moneim, M. M., & Kamal, M. F. (2021). Accelerated stability study of the ester prodrug remdesivir: Recently FDA-approved Covid-19 antiviral using reversed-phase-HPLC with fluorimetric and diode array detection. *Biomedical Chromatography*, May, 1–11.
- Han, S. Y., Liang, C., Zou, K., Qiao, J. Q., Lian, H. Z., & Ge, X. (2012). Influence of variation in mobile phase pH and solute pKa with the change of organic modifier fraction on QSRRs of hydrophobicity and RP-HPLC retention of weakly acidic compounds. *Talanta*, 101, 64–70.
- Hayes, R., Ahmed, A., Edge, T., & Zhang, H. (2014). Core-shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1357, 36–52.
- Hayler, J. D., Leahy, D. K., & Simmons, E. M. (2019). A Pharmaceutical Industry Perspective on Sustainable Metal Catalysis. *Organometallics*, 38(1), 36–46.
- He, Y., Wang, B., Dukor, R. K., & Nafie, L. A. (2011). Determination of absolute configuration of chiral molecules using vibrational optical activity: A review. *Applied Spectroscopy*, 65(7), 699–723.
- Heiles, S. (2021). Advanced tandem mass spectrometry in metabolomics and lipidomics—methods and applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 413(24), 5927–5948.
- Heravi, M. M., Zadsirjan, V., & Farajpour, B. (2016). Applications of oxazolidinones as chiral auxiliaries in the asymmetric alkylation reaction applied to total synthesis. *RSC Advances*, 6(36), 30498–30551.
- Higashida, K., Brüning, F., Tsujimoto, N., Higashihara, K., Nagae, H., Togni, A., & Mashima, K. (2020). Monohydride-Dichloro Rhodium(III) Complexes with Chiral Diphosphine Ligands as Catalysts for Asymmetric Hydrogenation of Olefinic Substrates. *Chemistry - A European Journal*, 26(40), 8749–8759.
- Horváth, S., Eke, Z., & Németh, G. (2020). Utilization of the hysteresis phenomenon for chiral high-performance liquid chromatographic method selection in polar organic mode. *Journal of Chromatography A*, 1625, 461280.
- Ishaq, B. M., Reddy, L. S. S., Venu, S., Sreenivasulu, M., & Prakash, K. V. (2020). RP-

HPLC-PDA Method Development, Validation and Stability Studies of the Novel Antineoplastic Drug Combination - Decitabine and Cedazuridine. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 32(32), 10–16.

- Jandera, P. (2002). Gradient elution in normal-phase high-performance liquid chromatographic systems. *Journal of Chromatography A*, 965(1–2), 239–261.
- Jandera, P. (2006). Can the theory of gradient liquid chromatography be useful in solving practical problems? *Journal of Chromatography A*, 1126(1–2), 195–218.
- Jandera, P., & Hájek, T. (2018). Mobile phase effects on the retention on polar columns with special attention to the dual hydrophilic interaction–reversed-phase liquid chromatography mechanism, a review. *Journal of Separation Science*, 41(1), 145–162.
- Jiang, W., & Fang, B. (2020). Synthesizing Chiral Drug Intermediates by Biocatalysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 192(1), 146–179.
- Kadlecová, Z., Kalíková, K., Ansorge, M., Gilar, M., & Tesařová, E. (2020). The effect of particle and ligand types on retention and peak shape in liquid chromatography. *Microchemical Journal*, 159(August), 105466.
- Kahsay, G., Broeckhoven, K., Adams, E., Desmet, G., & Cabooter, D. (2014). Kinetic performance comparison of fully and superficially porous particles with a particle size of 5 μm : Intrinsic evaluation and application to the impurity analysis of griseofulvin. *Talanta*, 122, 122–129.
- Khoo, H. T., & Leow, C. H. (2021). Advancements in the preparation and application of monolithic silica columns for efficient separation in liquid chromatography. *Talanta*, 224, 121777.
- Knežević, A., Novak, J., & Vinković, V. (2019). New brush-type chiral stationary phases for enantioseparation of pharmaceutical drugs. *Molecules*, 24(4).
- Köteles, I., Foroughbakhshfasaei, M., Dobó, M., Ádám, M., Boldizsár, I., Szabó, Z. I., & Tóth, G. (2020). Determination of the Enantiomeric Purity of Solriamfetol by High-Performance Liquid Chromatography in Polar Organic Mode Using Polysaccharide-Type Chiral Stationary Phases. *Chromatographia*, 83(7), 909–913.
- Krupová, M., Kessler, J., & Bouř, P. (2020). Recent Trends in Chiroptical Spectroscopy: Theory and Applications of Vibrational Circular Dichroism and Raman Optical Activity.

ChemPlusChem, 85(3), 561–575.

- Kumar, H. M. S., & Chandrasekhar, K. B. (2021). Stability Indicating Analytical Method Development and Validation for the Estimation of Rimegepant in Bulk and Its Tablets Using Rp-HPLC. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 33(4), 41–49.
- Li, G., Wang, J. bo, & Reetz, M. T. (2018). Biocatalysts for the pharmaceutical industry created by structure-guided directed evolution of stereoselective enzymes. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 26(7), 1241–1251.
- Lippert, J. A., Johnson, T. M., Lloyd, J. B., Smith, J. P., Johnson, B. T., Furlow, J., Proctor, A., & Marin, S. J. (2007). Effects of elevated temperature and mobile phase composition on a novel C18 silica column. *Journal of Separation Science*, 30(8), 1141–1149.
- Lopez, D. A., Green, A., & Bell, D. S. (2020). What is on your HPLC particle? A look at stationary phase chemistry synthesis. *LC-GC North America*, 38(9), 488–493.
- Magnusson, L. E., Risley, D. S., & Koropchak, J. A. (2015). Aerosol-based detectors for liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1421, 68–81.
- Martinez-Mayorga, K., Madariaga-Mazon, A., Medina-Franco, J. L., & Maggiora, G. (2020). The impact of chemoinformatics on drug discovery in the pharmaceutical industry. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 15(3), 293–306.
- Mather, L. (2005). Stereochemistry in anaesthetic and analgetic drug. *Minerva Anesthesiol*, 71, 507–5016.
- Mathur, S., & Hoskins, C. (2017). Drug development: Lessons from nature. *Biomedical Reports*, 6(6), 612–614.
- Mernissi, T., Bodeau, S., André, C., Zahr, N., Mary, A., Dupont, H., Kontar, L., Lemaire-Hurtel, A. S., & Bennis, Y. (2021). An HPLC assay for the therapeutic drug monitoring of cefiderocol in critically ill patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 76(6), 1643–1646.
- Miyabe, K. (2008). Evaluation of chromatographic performance of various packing materials having different structural characteristics as stationary phase for fast high performance liquid chromatography by new moment equations. *Journal of Chromatography A*, 1183(1–2), 49–64.
- Momin, M. A. M., Thien, S. J., Krittaphol, W., & Das, S. C. (2017). Simultaneous HPLC

assay for pretomanid (PA-824), moxifloxacin and pyrazinamide in an inhaler formulation for drug-resistant tuberculosis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 135, 133–139.

- Muralikrishna, M., Nagavalli, S., Anjali, P., Deep, B. P., Tejada, D., & Naik, K. P. (2020). Method development and validation of lemborexant in bulk and its pharmaceutical dosage form by reverse phase – high performance liquid. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 9(14), 1372–1380.
- Murray, P. M., Tyler, S. N. G., & Moseley, J. D. (2013). Beyond the numbers: Charting chemical reaction space. *Organic Process Research and Development*, 17(1), 40–46.
- Nantasenamat, C., Isarankura-Na-Ayudhya, C., & Prachayasittikul, V. (2010). Advances in computational methods to predict the biological activity of compounds. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 5(7), 633–654.
- Navarro-Huerta, J. A., Gisbert-Alonso, A., Torres-Lapasió, J. R., & García-Alvarez-Coque, M. C. (2019). Benefits of solvent concentration pulses in retention time modelling of liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1597, 76–88.
- Nguyen, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2006). Chiral Drugs: An Overview. *International Journal of biomedical science:IJBS*, 2(2), 85–100.
- Noyori, R. (2003). Asymmetric Catalysis: Science and Opportunities (Nobel Lecture 2001). *Advanced Synthesis and Catalysis*, 345(1–2), 15–32.
- Palma, P., Giorgio, F., Helga, T., & Cappiello, A. (2010). Towards a universal detector for small molecule applications: Direct-EI in LC-MS. *LC GC Europe*, 23(3), 1–11.
- Patel, R. N. (2018). Biocatalysis for synthesis of pharmaceuticals. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 26(7), 1252–1274.
- Pathania, S., & Singh, P. K. (2021). Analyzing FDA-approved drugs for compliance of pharmacokinetic principles: should there be a critical screening parameter in drug designing protocols? *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 17(4), 351–354.
- Perrenoud, A. G. G., Farrell, W. P., Aurigemma, C. M., Aurigemma, N. C., Fekete, S., & Guillarme, D. (2014). Evaluation of stationary phases packed with superficially porous particles for the analysis of pharmaceutical compounds using supercritical fluid

chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1360, 275–287.

- Pettersson, S. W., Collet, E., & Andersson, U. (2007). Chemical stability of reversed phase high performance liquid chromatography silica under sodium hydroxide regeneration conditions. *Journal of Chromatography A*, 1142(1 SPEC. ISS.), 93–97.
- Poole, C. F., & Poole, S. K. (2009). Foundations of retention in partition chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1216(10), 1530–1550.
- Rosales-Hernández, M. C., & Correa-Basurto, J. (2015). The importance of employing computational resources for the automation of drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 10(3), 213–219.
- Saeed, M. A., Ansari, M. T., Ch, B. A., & Zaman, M. (2020). RP-HPLC method for the determination and quantification of artesunate. *Journal of Chromatographic Science*, 58(8), 695–699.
- Saldívar-González, F., Prieto-Martínez, F. D., & Medina-Franco, J. L. (2017). Descubrimiento y desarrollo de fármacos: un enfoque computacional. *Educacion Quimica*, 28(1), 51–58.
- Sanganyado, E., Lu, Z., Fu, Q., Schlenk, D., & Gan, J. (2017). Chiral pharmaceuticals: A review on their environmental occurrence and fate processes. *Water Research*, 124, 527–542.
- Sartawi, Z., Waeber, C., Schipani, E., & Ryan, K. B. (2020). Development of electrospun polymer scaffolds for the localized and controlled delivery of siponimod for the management of critical bone defects. *International Journal of Pharmaceutics*, 590(August), 119956.
- Satpathi, B., Mondal, A., & Ramasastry, S. S. V. (2018). Organocatalytic Strategies for the Synthesis of Cyclopenta-Fused Arenes and Heteroarenes. *Chemistry - An Asian Journal*, 13(13), 1642–1653.
- Schure, M. R., Maier, R. S., Shields, T. J., Wunder, C. M., & Wagner, B. M. (2017). Intraparticle and interstitial flow in wide-pore superficially porous and fully porous particles. *Chemical Engineering Science*, 174, 445–458.
- Scriba, G. K. E. (2016). Chiral recognition in separation science – an update. *Journal of Chromatography A*, 1467, 56–78.

- Secilmis-Canbay, H., Cubuk-Demiralay, E., Alsancak, G., & Ozkan, S. A. (2012). The combined effect of the organic modifier content and pH of the mobile phase on the chromatographic behavior of some arylpropionic and arylacetic acids to optimize their liquid chromatographic determinations. *Chromatographia*, 75(13–14), 711–720.
- Şentürk, R., Wang, Y., Schinkel, A. H., Beijnen, J. H., & Sparidans, R. W. (2020). Quantitative bioanalytical assay for the selective RET inhibitors selpercatinib and pralsetinib in mouse plasma and tissue homogenates using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1147(March), 122131.
- Seo, S. W., Kim, J. M., Han, D. G., Geum, D., Yun, H., & Yoon, I. S. (2021). A sensitive HPLC-FLD method for the quantification of alpelisib, a novel phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, in rat plasma: Drug metabolism and pharmacokinetic evaluation in vitro and in vivo. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1163(December 2020), 122508.
- Shen, Z., Lv, C., & Zeng, S. (2016). Significance and challenges of stereoselectivity assessing methods in drug metabolism. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(1), 1–10.
- Shuang, Y., Liao, Y., Zhang, T., & Li, L. (2020). Preparation and evaluation of an ethylenediamine dicarboxyethyl diamido-bridged bis(β -cyclodextrin)-bonded chiral stationary phase for high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1619, 460937.
- Shuang, Y., Zhang, T., & Li, L. (2020). Preparation of a stilbene diamido-bridged bis(β -cyclodextrin)-bonded chiral stationary phase for enantioseparations of drugs and pesticides by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1614, 460702.
- Singh Sekhon, B. (2013). Exploiting the Power of Stereochemistry in Drugs: An Overview of Racemic and Enantiopure Drugs. *Journal of Modern Medicinal Chemistry*, 1, 10–36.
- Singh, T. G., Vadlakonda, J. B., & Gupta, R. M. (2020). Analytical method development and validation of avapritinib by rp-hplc method. *World journal pharmacy and pharmaceutical sciences*, 9(10), 1834–1840.
- Smith, S. W. (2009). Chiral toxicology: It's the same thing only different. *Toxicological Sciences*, 110(1), 4–30.

- Song, L., Pan, M., Zhao, R., Deng, J., & Wu, Y. (2020). Recent advances, challenges and perspectives in enantioselective release. *Journal of Controlled Release*, 324(May), 156–171.
- Staniak, M., Wójciak, M., Sowa, I., Tyszczyk-Rotko, K., Strzemiński, M., Dresler, S., & Myslinski, W. (2020). Silica-based monolithic columns as a tool in HPLC—An overview of application in analysis of active compounds in biological samples. *Molecules*, 25(14).
- Stoll, D. (2017). Column care for the long haul—considerations for column storage. *LC-GC Europe*, 30(7), 352–357.
- Strickmann, D. B., Faber, J., & Klaassen, T. (2021). Development, validation, and application of an LC–MS/MS method for the quantification of the novel antibiotic drug lefamulin (Xenleta®) and its main metabolite 2R-hydroxy lefamulin in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 205.
- Subirats, X., Rosés, M., & Bosch, E. (2007). On the effect of organic solvent composition on the pH of buffered HPLC mobile phases and the pKa of analytes - A review. *Separation and Purification Reviews*, 36(3), 231–255.
- Sun, H., Zhang, H., Ang, E. L., & Zhao, H. (2018). Biocatalysis for the synthesis of pharmaceuticals and pharmaceutical intermediates. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 26(7), 1275–1284.
- Swartz, M. (2010). HPLC detectors: A brief review. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 33(9–12), 1130–1150.
- Tang, S., Liu, J. De, Chen, W., Huang, S. H., Zhang, J., & Bai, Z. W. (2018). Performance comparison of chiral separation materials derived from N-cyclohexylcarbonyl and N-hexanoyl chitosans. *Journal of Chromatography A*, 1532, 112–123.
- Tarafder, A., & Miller, L. (2021). Chiral chromatography method screening strategies: Past, present and future. *Journal of Chromatography A*, 1638.
- Teixeira, J., Tiritan, M. E., Pinto, M. M. M., & Fernandes, C. (2019). Chiral stationary phases for liquid chromatography: Recent developments. *Molecules*, 24(5).
- Terry, J. P., Akrobotu, P. D., Negre, C. F. A., & Mniszewski, S. M. (2020). Quantum isomer search. *PLoS ONE*, 15(1), 1–21.
- Testa, B. (2015). Types of stereoselectivity in drug metabolism: A heuristic approach.

Drug Metabolism Reviews, 47(2), 239–251.

- Tome, T., Žigart, N., Časar, Z., & Obreza, A. (2019). Development and Optimization of Liquid Chromatography Analytical Methods by Using AQbD Principles: Overview and Recent Advances. *Organic Process Research and Development*, 23(9), 1784–1802.
- Tong, W., Chowdhury, S. K., Su, A. D., Feng, W., Ghosal, A., & Alton, K. B. (2006). Identification of unstable metabolites of Lonafarnib using liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry, stable isotope incorporation and ion source temperature alteration. *Journal of Mass Spectrometry*, 41(11), 1430–1441.
- van Andel, L., Rosing, H., Lubomirov, R., Avilés, P., Fudio, S., Tibben, M. M., Nan-Offeringa, L., Schellens, J. H. M., & Beijnen, J. H. (2018). Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for the quantification of lurbinedin in human plasma and urine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 158, 160–165.
- Vehovec, T., & Obreza, A. (2010). Review of operating principle and applications of the charged aerosol detector. *Journal of Chromatography A*, 1217(10), 1549–1556.
- Vijaya, P. K., Murugesan, S., & Siva, A. (2016). Highly enantioselective asymmetric Henry reaction catalyzed by novel chiral phase transfer catalysts derived from cinchona alkaloids. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 14(42), 10101–10109.
- Wang, Lujun, Wei, W., Xia, Z., Jie, X., & Xia, Z. Z. (2016). Recent advances in materials for stationary phases of mixed-mode high-performance liquid chromatography. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 80, 495–506.
- Wang, Lun, Zheng, Y., Li, D., Yang, J., Lei, L., Yan, W., Zheng, W., Tang, M., Shi, M., Zhang, R., Cai, X., Ni, H., Ma, X., Li, N., Hong, F., Ye, H., & Chen, L. (2021). Design, Synthesis, and Bioactivity Evaluation of Dual-Target Inhibitors of Tubulin and Src Kinase Guided by Crystal Structure. *Journal of Medicinal Chemistry*, 64(12), 8127–8141.
- Wei, T. C., Mack, A., Chen, W., Liu, J., Dittmann, M., Wang, X., & Barber, W. E. (2016). Synthesis, characterization, and evaluation of a superficially porous particle with unique, elongated pore channels normal to the surface. *Journal of Chromatography A*, 1440, 55–65.
- Wen, Y., Amos, R. I. J., Talebi, M., Szucs, R., Dolan, J. W., Pohl, C. A., & Haddad, P. R. (2019). Retention prediction using quantitative structure-retention relationships combined

with the hydrophobic subtraction model in reversed-phase liquid chromatography. *Electrophoresis*, 40(18–19), 2415–2419.

- Wouters, O. J., McKee, M., & Luyten, J. (2020). Estimated Research and Development Investment Needed to Bring a New Medicine to Market, 2009-2018. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 323(9), 844–853.
 - Xu, X., & Stewart, J. T. (1999). HPLC analysis of haloperidol and its related compound in the drug substance and a tablet dosage form using a non-porous silica octadecylsilane column. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 22(12), 1857–1866.
 - Yang, Y., Wang, Y., Bao, Z., Yang, Q., Zhang, Z., & Ren, Q. (2021). Progress in the enantioseparation of β -blockers by chromatographic methods. *Molecules*, 26(2).
 - Young, C. S., & Dolan, J. W. (2003). Success with evaporative light-scattering detection. In *LC GC Europe* (Vol. 16, Número 3, pp. 132–137).
 - Zafar, S., Perveen, S., & Qamar, S. (2021). Discontinuous Galerkin scheme for solving non-isothermal and non-equilibrium model of liquid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 44(1–2), 52–69.
 - Zakkula, A., Kiran, V., Todmal, U., Sulochana, S. P., & Mullangi, R. (2019). RP-HPLC-UV Method for Simultaneous Quantification of Second Generation Non-Steroidal Antiandrogens Along with their Active Metabolites in Mice Plasma: Application to a Pharmacokinetic Study. *Drug Research*, 69(10), 537–544.
 - Zask, A., & Ellestad, G. (2018). Biomimetic syntheses of racemic natural products. *Chirality*, 30(2), 157–164.
 - Zhang, K., Kurita, K. L., Venkatramani, C., & Russell, D. (2019). Seeking universal detectors for analytical characterizations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 162, 192–204.
 - Zhao, B. L., Li, J. H., & Du, D. M. (2017). Squaramide-Catalyzed Asymmetric Reactions. *Chemical Record*, 17(10), 994–1018.
- Žuvela, P., Skoczylas, M., Jay Liu, J., Baczek, T., Kaliszan, R., Wong, M. W., & Buszewski, B. (2019). Column Characterization and Selection Systems in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Chemical Reviews*, 119(6), 3674–3729.