

Validación del método analítico por HPLC para la cuantificación de trazas del fármaco Meloxicam en equipos y áreas de fabricación

Validation of the analytical method by HPLC for the quantification of trace amounts of the drug Meloxicam in equipment and manufacturing areas

Kelly Johana Rojas¹, Natalia Afanasjeva²

Resumen

Introducción. En la industria farmacéutica la cuantificación de trazas de principios activos de los medicamentos es crucial para validar los procesos de limpieza post-fabricación, debido al riesgo de contaminación cruzada cuando se ejecuta un proceso de limpieza inadecuado. **Objetivo.** Validar una metodología analítica en condiciones del clima tropical para cuantificar trazas de medicamento antiinflamatorio no esteroideo (AINES) o Meloxicam en equipos de fabricación utilizando cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

Metodología. Se empleó una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 x 150 mm, 5 µm, Agilent) a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, donde la fase móvil consistió en un 90% de un buffer fosfato de amonio monobásico ($\text{pH}=7.0$) con 2-propanol y metanol, y un 10% de metanol, a un flujo de 1,0 mL/min, la detección se realizó a 360 nm, con un volumen de inyección de 10 µL, y como diluente se usó la misma fase móvil. **Resultados.** Para la linealidad del método empleado se obtuvo un coeficiente estadístico de correlación $R \geq 0,999$, el coeficiente de variación no superó el límite RSD de 13%, en la repetibilidad del sistema en todas las superficies evaluadas y en precisión intermedia se cumplió el criterio de $\text{RSD} < 20,0\%$. En exactitud, se encontró un porcentaje de recuperación mayor al criterio de aceptación de 50%. No se presentaron las interferencias en la determinación de especificidad. **Conclusiones.** Los estudios realizados validan la metodología analítica propuesta para la cuantificación de trazas de Meloxicam por HPLC, asegurando que es precisa, exacta, selectiva, eficaz, robusta y adecuada para su aplicación en laboratorios farmacéuticos de análisis, y la optimización de los parámetros críticos en condiciones del clima tropical, como el tipo de

1. Grupo GI-CAT, Programa de Química, Universidad del Valle, Cali-Colombia.
ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-8037-1619>
Google Scholar: <https://scholar.google.com/citations?user=Bljv-gkAAAAJ&hl=es>

2. Grupo GI-CAT, Departamento de Química, Universidad del Valle, Cali-Colombia.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6184-1458>
Google Scholar: <https://scholar.google.es/citations?user=KNi0mt0AAAAJ&hl=es>

Correspondencia: kelly.rojas@correounivalle.edu.co

filtro, tiempo y naturaleza del solvente de extracción, así como la estabilidad del método, además proporcionaron una base sólida para su implementación en el área de control de calidad.

Palabras clave: Cromatografía líquida de alta eficiencia, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, trazas, validación método analítico, estadística y datos numéricos.

Abstract

Introduction. In the pharmaceutical industry, the quantification of trace amounts of active ingredients in drugs is essential to validate post-manufacturing cleaning processes, given the risk of cross-contamination resulting from inadequate cleaning process. **Objective.** To validate an analytical methodology in tropical climate conditions to quantify traces of the non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) or Meloxicam in manufacturing equipment using high performance liquid chromatography (HPLC). **Methodology.** The analysis was carried out on Zorbax Eclipse XDB-C18 column (4.6 x 150 mm, 5 µm, Agilent) at $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. The mobile phase consisted of 90% monobasic ammonium phosphate buffer (pH 7.0) with 2-propanol and methanol, and 10% methanol, at a flow rate of 1.0 mL/min. Detection was performed at 360 nm, with an injection volume of 10 µL, and the same mobile phase was used as diluent. **Results.** The method showed excellent linearity, with a statistical correlation coefficient $R \geq 0.999$. The coefficient of variation did not exceed the RSD limit of 13% in the repeatability of the system in all the surfaces evaluated and in intermediate precision the criterion of $\text{RSD} < 20.0\%$ was fulfilled. Accuracy test yielded a recovery percentage above the acceptance criterion of 50%. There were no interferences in the specificity. **Conclusions.** The studies performed validate the proposed HPLC methodology for the quantification of Meloxicam traces by HPLC, showing that is precise, accurate, selective, efficient, robust and suitable to carry out in pharmaceutical analysis laboratories. Moreover, the optimization of critical parameters un tropical climate conditions, such as filter type, time and nature of the extraction solvent, as well as the stability of the method, also provided a solid basis for its implementation in the quality control area.

Keywords: High performance liquid chromatography, non-steroidal anti-inflammatory drugs, trace, analytical method validation, statistics and numerical data.

Introducción

En la industria farmacéutica, es crucial garantizar la adecuada limpieza de los equipos empleados en la fabricación de medicamentos debido al impacto directo en la salud de los consumidores y la necesidad de evitar la contaminación cruzada. Las entidades reguladoras como FDA en Estados Unidos y en Colombia el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA) establecen normas estrictas (1,2) para asegurar la calidad y seguridad de los productos farmacéuticos, y la validación de los procesos de limpieza tiene esencial importancia para cumplir con estos requisitos y asegurar que los equipos estén libres de contaminantes que puedan comprometer el proceso de elaboración y la calidad del producto final (3).

Para asegurar que el proceso la fabricación de los fármacos es eficaz y capaz de eliminar los posibles contaminantes, es obligatorio diseñar procedimientos de limpieza adecuados y desarrollar métodos analíticos selectivos y sensibles para cuantificar trazas de los principios activos en las superficies de los equipos, además, es de suma importancia definir puntos críticos de muestreo en la cadena de fabricación que demuestren la eliminación completa de los residuos, aunque las normativas no especifican límites de aceptación para los residuos, se suelen utilizar criterios basados en fórmulas

matemáticas, dosis terapéuticas y perfil toxicológico, manteniendo un límite general de 10 µg/mL (4,5).

El Meloxicam, Figura. 1, o 4-hidroxi-2-metil-N-(5-metil-2-tiazolil)-2H-1,2-benzotiazin-3-carboxamida, es un fármaco utilizado para tratar el dolor y la inflamación en trastornos reumáticos y osteoartritis, clasificado como un antiinflamatorio no esteroideo o (AINES)(5-8), se emplea clínicamente para el tratamiento de la osteoartritis de la articulación temporomandibular o ATM, bloqueando selectivamente la enzima ciclooxygenasa-2 (COX-2) que acelera la formación de sustancias que causan el dolor e inflamación (9) e inhibiendo la síntesis del factor inflamatorio prostaglandina-E2 (PGE2), crucial en el desarrollo e la osteoartritis (6,11). Asimismo, es importante mencionar que el Meloxicam tiene un valor de pKa de aproximadamente igual a 4.5 y es considerado un ácido débil, además es prácticamente insoluble en agua ($S=0,0006$ g/L a 25°C) y muestra mejor solubilidad en solventes orgánicos (12). Aunque tradicionalmente se ha validado la cuantificación el Meloxicam empleando la metodología analítica de espectrofotometría UV-Vis (13,14), las entidades reguladores farmacéuticas actualmente recomiendan la aplicación de métodos más robustos y más sensibles, como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que ofrece ventajas significativas en cuanto a selectividad, sensibilidad y capacidad de separación de componentes (15),

esto la convierte en una herramienta valiosa para determinar los posibles residuos de Meloxicam y demostrar la eficiencia del proceso de limpieza en las áreas y equipos de producción en la industria.

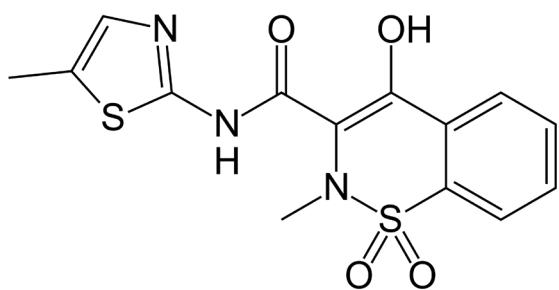


Figura 1. Estructura química del fármaco carboxamida tipo Meloxicam.

En la literatura científica en 2008 se ha descrito (15) el método analítico para la determinación simultánea de medicamento meloxicam y relajante muscular pridinol mesilato en productos terminados, utilizando HPLC en fase reversa con detección por UV a longitud de onda a 225 nm. Este método demostró buena linealidad, repetibilidad, precisión intradiaria e intermedia, y robustez frente a cambios en el pH, el caudal y la composición de la fase móvil, así como adecuados límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) de la mezcla estudiada.

En los últimos años el grupo de investigación GI-CAT de UniValle, se ha centrado en el desarrollo de metodologías analíticas de medicamentos basadas en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Entre ellos, la valoración e identificación del (1-

(1 β , 16 α)-21-(acetiloxi)-11- hidroxi-2'-metil-5'H-pregna-1,4-dieno[17,16-d]oxazol-3,20-diona) en Deflazacort materia prima (16), un principio activo usado en medicamentos con propiedades antiinflamatorias y su función como inmunosupresor; así como la cuantificación de Fluconazol e impurezas orgánicas en materia prima por HPLC usada para optimizar el proceso de análisis en condiciones de clima tropical de Colombia (17) y metodologías analíticas por cromatografía de gases, como la desarrollada por los autores (18), donde se cuantifica clorhidrato de Memantina aplicando modificaciones para las condiciones del clima tropical húmedo, siendo estas metodologías analíticas mencionadas, trascendentales para el uso en laboratorios de control de calidad.

En 2015, los autores en Georgia (19) desarrollaron un método analítico para la determinación de trazas de fármaco Meloxicam mediante la cromatografía HPLC, además validaron el método de muestreo con hisopo, obteniendo una recuperación adecuada ($>90\%$) en las superficies, utilizando una columna tipo Luna C18 (2) con una fase móvil compuesta por una mezcla de solución A (2 g de fosfato dibásico de amonio disueltos en 1000 mL de agua grado HPLC con un ajuste de pH de $7,0 \pm 0,05$ con ácido fosfórico) y solución B (Mezcla de 650 mL de metanol y 100 mL de 2-propanol) en una proporción de (63:37), un caudal de 0,8 mL/min, temperatura de columna a 40°C, longitud de onda del detector a 254 nm y

volumen de inyección de 25 μl . La curva de calibración fue lineal en un intervalo de concentración de 0,11 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a 88 $\mu\text{g}/\text{ml}$, con límites de detección y cuantificación de 0,11 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 0,014 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente, y sin interferencias de la solución de hisopo, con estabilidad de las muestras durante 24 horas.

Además de la publicación del artículo sobre la primera propuesta analítica para cuantificar trazas de Meloxicam, en este trabajo se propone una alternativa experimental documentada que utiliza nuevas condiciones experimentales, permitiendo a la industria farmacéutica en Colombia ampliar las opciones para la cuantificación del Meloxicam como principio activo, y brindar información empírica para promover el desarrollo de nuevos métodos analíticos y/o optimización de las metodologías ya existentes con la finalidad de asegurar la calidad de los productos farmacéuticos y así, la seguridad de los consumidores (20, 21).

Materiales y métodos

Se utilizó un estándar de Meloxicam del fabricante Merck, la materia prima de Meloxicam empleada fue del fabricante Sun Pharmaceutical, la cual fue caracterizada por el mismo laboratorio, donde se realizó la validación, con una potencia del 100,0% en base húmeda. Los reactivos utilizados durante la validación incluyeron metanol

grado cromatográfico de Merck, fosfato de amonio dibásico de Fisher, 2-propanol o isopropanol de Panreac, ácido fosfórico de Honeywell y agua purificada suministrada por el laboratorio analítico en la ciudad Cali.

El material de vidrio utilizado fue clase A transparente con volúmenes de 25 mL, 50 mL y 100 mL de la marca Duran TM. Para el pesaje de los compuestos se hizo uso de una balanza analítica Secura 225D-1S Sartorius; para medición de pH un pHmetro Mettler Toledo Seven Compact S220; para la filtración de la fase móvil se empleó un equipo al vacío con una presión de 0.035 MPa y un filtro de membrana QLS™ hidrofílica de polifluoruro de vinilideno (PVDF) con tamaño de poro de 0.45 μm , un baño ultrasónico Cole Parmer 8894R-DTA.

Para la validación del método se emplearon cuatro equipos de cromatografía: Vanquish Core Thermo Scientific, Waters Alliance 2695, Waters Blue y Chromaster Merck/Hitachi. En el Vanquish Core se utilizó el software de procesamiento Chromeleon TM 7 versión 7.3, mientras que los otros cromatógrafos usaron el sistema de procesamiento Empower versión 3.0. La columna cromatográfica empleada fue una Zorbax Eclipse XDB de Agilent Technologies, con empaquetamiento C18, tamaño de poro de 80 Å, longitud de 150 mm y diámetro interno de 4.6 mm. Su selección está basada en sus características específicas que permiten

una separación adecuada del Meloxicam como analito de interés, y esta columna es conocida por expertos por su alta eficiencia y capacidad de resolución.

La temperatura del sistema se mantuvo constante a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, para evitar que las posibles fluctuaciones que pueden afectar los tiempos de retención y la resolución del analito en cuestión, el volumen de inyección de los analitos se definió a 10 μL . Que este sea consistente, fue vital para obtener picos reproducibles y precisos, minimizando la variabilidad entre inyecciones y mejorando la fiabilidad de los resultados. La detección por UV se realizó bajo una longitud de onda de 360 nm, permitiendo la máxima absorción del Meloxicam, la selección de longitud de onda adecuada siempre es crucial para maximizar la sensibilidad del método, garantizando que incluso las concentraciones más bajas del fármaco puedan ser detectadas con precisión.

Se realizó una mezcla isocrática binaria específica de solventes para la fase móvil, compuesta por un 90% (v/v) de una solución que contiene 700 mL de buffer fosfato de amonio monobásico ($\text{pH}=7.0$) mezclado con 300 mL de 2-propanol y metanol (10:65), y después con un 10% (v/v) de metanol. Esta composición se eligió basada en experimentos para optimizar la separación del Meloxicam, proporcionando una buena resolución y tiempos de retención adecuados.

La velocidad de flujo empleada para la elución del sistema cromatográfico se ajustó a 1.0 mL/min, el cual es un parámetro crítico que influye en la eficiencia de separación y en el tiempo total de análisis. Si la velocidad de flujo es adecuada, esto asegura que los picos de los compuestos analizados sean nítidos y bien definidos, mejorando la precisión y exactitud del análisis (22- 26).

Esta nueva configuración analítica del método HPLC se diseñó para maximizar la eficiencia y la precisión en la cuantificación de trazas de Meloxicam, asegurando que los resultados fueran confiables y cumplieran con los requisitos regulatorios establecidos por INVIMA y otras agencias internacionales (22, 23).

Metodología

Preparación de las soluciones de trabajo para la validación de la metodología

Fase móvil: Se preparó una mezcla isocrática de una solución B y metanol grado HPLC en proporciones 90:10 (v/v), la solución B se compuso de 700 mL de una solución buffer de $\text{pH}=7.0$, preparada disolviendo 2.0 g de fosfato de amonio dibásico en 1000 mL de agua purificada y ajustando el pH a 7.0 ± 0.05 con una solución diluida de ácido fosfórico, además, se añadieron 300 mL de una solución A, compuesta por una mezcla de 2-propanol y metanol en propor-

ciones de 10:65 (v/v). y además la velocidad del flujo elegido fue menor de 2,0 mL/min que reportado en (24, 25), lo que disminuye el tiempo de análisis y los costos.

a) Diluente y solución de “blanco”: Se empleó la fase móvil descrita anteriormente como diluente y a partir del diluente se preparó la muestra o “el blanco” solo sin presencia de ningún otro componente.

b) Soluciones estándar 1 y 2: En un matraz volumétrico de 100 mL, se pesaron con exactitud 10,0 mg del estándar de trabajo Meloxicam, luego, se añadieron 10 mL de metanol grado HPLC y se agitó circularmente hasta garantizar la completa disolución, después de la agitación se colocó en un baño de ultrasonido durante 5 minutos, controlando que la temperatura no excediera los 25°C, y posteriormente, se añadieron 70 mL de diluente descrito anteriormente en la parte b) y la solución se sometió nuevamente al baño de ultrasonido por 15 minutos, controlando la temperatura de 25°C. Después, se completó el volumen de muestra a 100 mL con el diluente y se mezcló mediante agitación. De la solución madre resultante (con concentración de 100 µg/mL de Meloxicam) se tomó una alícuota de 1 mL y se diluyó en un matraz volumétrico de 25 mL y se completó el volumen con diluente, se agitó y se filtró a través de una membrana PVDF/L de 0.45 µm antes de transferirla a un vial para HPLC. La concentración teórica final de Meloxicam en

esta muestra a nivel de trazas fue de 4 µg/mL.

c) Solución muestra de Meloxicam: Se pesaron con exactitud 25.0 mg de la materia prima Meloxicam en un matraz volumétrico de 100 mL, se añadieron 10 mL de metanol HPLC y se agitó circularmente hasta homogeneizar la solución, la mezcla se colocó en un baño de ultrasonido durante 5 minutos, controlando que la temperatura no excediera los 25°C, luego, se añadieron 70 mL de diluente y se volvió a colocar en el equipo de ultrasonido durante 15 minutos, manteniendo la temperatura controlada. Finalmente, se completó el volumen a 100 mL con diluente y se mezcló bien, la concentración teórica final de Meloxicam en la solución muestra fue de 250 µg/mL.

Validación del método cromatográfico

Prevalidación cromatográfica (adequabilidad del sistema)

Para garantizar la confiabilidad y veracidad de los resultados que proporciona el método de análisis propuesto, se lleva a cabo la validación donde se pone a prueba que las características requeridas del método cumplan con los requisitos para aplicaciones analíticas y además soportados estadísticamente (24).

En la validación de metodología de análisis de trazas es conveniente hacer estudios preliminares completos con el fin de eva-

luar todos los parámetros de desempeño del método, para esto se realizaron una serie de pruebas que incluyeron evaluación de elección de filtros empleados, determinación de límites de cuantificación y detección de muestra, eficiencia (tiempo operacional), naturaleza química del solvente de extracción, parámetros de especificidad y selectividad, y posteriormente de determinó la linealidad, robustez, exactitud y precisión del método, porcentaje de recuperación analítica de muestras y estabilidad de las soluciones usadas. Los filtros son empleados para prolongar la vida útil de las columnas y los equipos cromatográficos empleados, sin embargo, estos no deben interferir con la identificación y/o cuantificación del analito de interés, como posibles señales interferentes por la composición química del filtro o disminución de la señal de este por la retención que pueda generarse.

Con todas estas pruebas (cada parámetro se analizó por triplicado) se buscó establecer y proponer una alternativa de un sistema cromatográfico de análisis completo y de alta calidad.

Pruebas de filtros en la etapa de prevalidación del método.

En esta prueba se evaluaron tres tipos de filtros de materiales de membranas diferentes para determinar cuál era el más adecuado para la metodología analítica buscada: fluoruro de polivinilídeno (PVDF), poli-

propileno (PP) y Nylon (NY). Los filtros fueron evaluados mediante la comparación de una muestra no filtrada, con la misma muestra que pasó a través de cada filtro y se verificó que la recuperación del analito después del paso por cada filtro estuviera entre el 95% y el 105% de contenido relativo a la muestra sin filtrar.

Determinación del límite de cuantificación (LOQ) y del límite de detección (LOD) del Meloxicam

Se evaluó la relación señal/ruido ó signal/noise (S/N) en los cromatogramas mediante la preparación de soluciones de Meloxicam a bajas concentraciones, usando la solución estándar. El importante límite de detección (LOD) se definió como la concentración mínima del analito que tuvo una relación S/N mayor al número 3 y menor a 10, mientras que para el límite de cuantificación (LOQ) fue definida la concentración con una relación S/N entre el número 10 y 30.

Eficiencia de extracción

Tiempo de extracción: se determinó el tiempo óptimo de extracción mediante el uso de ultrasonido para recuperar el principio activo del fármaco. Se evaluaron tres series de tres tiempos (10, 15 y 20 minutos) con muestras a concentraciones del límite de cuantificación y al 120% de la concentración de interés, para ambos métodos de

recuperación, por contacto del hisopo y remoción de la muestra por enjuague.

Solvente de extracción: se pusieron a prueba los solventes agua purificada y alcohol al 96%, recuperando una solución preparada a 250 µg/mL de Meloxicam sembrados en una placa de acero de dimensiones 5x5 cm, con el fin de determinar cuál solvente era el más adecuado para recuperar este principio activo (PA). La recuperación de PA se realizó mediante el método de hisopado (frotando el hisopo en forma de zigzag sobre la superficie) y del método de enjuague (añadiendo 10 mL de cada uno de los solventes mencionados de prueba directamente sobre las placas).

Especificidad y selectividad.

Se determinaron los tiempos de retención de los picos analizados mediante HPLC para muestras de diluente (“blanco”), dos placebos, sanitizantes y detergentes, asegurando que ellos no interfieran en la medición y que el pico cuantificado corresponda únicamente al compuesto principal objetivo (Meloxicam) a la hora de recuperarlo posterior a un proceso de limpieza en equipos y áreas de fabricación.

Linealidad

Se prepararon tres soluciones madres de linealidad a 100 µg/mL de Meloxicam y a partir de estas se elaboraron las tres curvas con soluciones de trabajo con concentra-

ciones del 40%, 60%, 80%, 100% y 120% relativo a la concentración analítica de trabajo (4 mg/L). Con el fin de verificar que el método sea lineal en estos intervalos de concentraciones.

Robustez

Se evaluó el método analítico mediante variaciones en el flujo de trabajo del sistema cromatográfico, con el fin de determinar la capacidad y tolerancia para permanecer consistente y confiable bajo la variación de esta condición operativa. Se verificó que no se presentaron fluctuaciones en los tiempos de retención, ni en las áreas de los picos.

Repetibilidad del método y precisión

Se examinó la aptitud del método para proporcionar resultados consistentes donde dos analistas diferentes (analista 1 y analista 2) recuperaron dos series de muestras por ambos métodos, en varias superficies de equipos como tipo de resina, acero, vidrio y pintura epólica, de dimensiones 5x5 cm, y una concentración de Meloxicam de 4 µg/mL presente sobre cada superficie. La recuperación se realizó en 6 placas de cada superficie en 2 días seguidos usando equipos HPLC diferentes: un Cromatógrafo Vanquish Core Thermo Scientific S/N:8318989 y un Cromatógrafo Líquido e2695 blue Waters S/N: H19SM4030A.

Muestra por hisopado: se aplicaron 160 µL de solución de principio activo sobre una

superficie de 5x5 cm de acero inoxidable, luego, se recuperó el analito humedeciendo un hisopo de poliéster impregnado con el solvente previamente evaluado, y se procesó en un frasco en adición de 10 mL de diluente, y sometido al baño ultrasonido durante 10 minutos. Finalmente, se filtró pasado el periodo de ultrasonido y se transfirió a un vial para análisis por HPLC haciendo uso del filtro PVDF 0.45 µm.

Muestra por enjuague: se aplicaron 320 µL de solución muestra de Meloxicam en una superficie de 5x5 cm de acero inoxidable, la recuperación se realizó con 10 mL de agua purificada, enjuagando la placa y procesando en un frasco con 10 mL de diluente, y procediendo exactamente como las muestras recuperadas con hisopo.

La cantidad de principio activo sembrado en ambos métodos fue equivalente a la concentración definida de interés o de 4 µg/mL de Meloxicam.

Estabilidad

Se llevó a cabo un estudio para evaluar, si el analito de interés permanece estable en la muestra durante un período específico y bajo condiciones determinadas (temperatura ambiente). Se evaluó la estabilidad de las trazas del compuesto activo dopando 12 hisopos con 160 µL de la solución muestra de Meloxicam (4 mg/L), almacenados en frascos plásticos con tapa. Se reconstituyeron 6

frascos con hisopos, con 10 mL de diluente (fase móvil) para análisis inmediato (T_0) y se almacenaron los 6 frascos restantes con hisopos a temperatura ambiente (20°C – 25°C), que posteriormente se emplearon para análisis a las 86 horas (T_1).

Se compararon los resultados obtenidos por HPLC para verificar la estabilidad de las soluciones preparadas.

Resultados

Los resultados obtenidos se presentan en las Tablas 1-5 y 7-9, los cálculos estadísticos en la Tabla 6 y los cromatogramas en las Figuras 2 y 3.

Tabla 1. Resultados de la prueba de filtros para la cuantificación de trazas de Meloxicam.

Tipo de filtro	Cantidad de recuperación de analito Meloxicam, %	Desviación estándar relativa, RSD, (%)
1. PVDF/L, 0,45 µm	96,3	1,5
2. Nylon, 0,45 µm	91,5	0,4
3. Nylon, 0,22 µm	89,2	3,9

Tabla 2. Resultados del límite de cuantificación (LOQ) y límite detección (LOD) para Meloxicam.

Parámetro	Área promedio del pico cromatográfico	S/N (Señal/ruido ó signal/noise)	Concentración de Meloxicam ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Límite de cuantificación (S/N 10-30)	0,3305	23,9	0,72
Límite de detección (S/N 3-10)	0,1043	7,5	0,24

Tabla 3. Resultados del tiempo de extracción para Meloxicam en el límite de cuantificación (LQ) y al 120% de la concentración.

Tiempo de extracción, min	Promedio para límite de cuantificación LQ ($0,72 \mu\text{g}/\text{mL}$)	Desviación estándar relativa, RSD, %	Promedio para la concentración de Meloxicam de análisis al 120 % ($4,2 \mu\text{g}/\text{mL}$)	Desviación estándar relativa, RSD al 120%
5	98,3	6,3	103,0	3,4
10	98,7	1,7	106,2	0,7
15	98,3	2,3	144,5	22,2
20	98,7	2,4	106,7	5,5

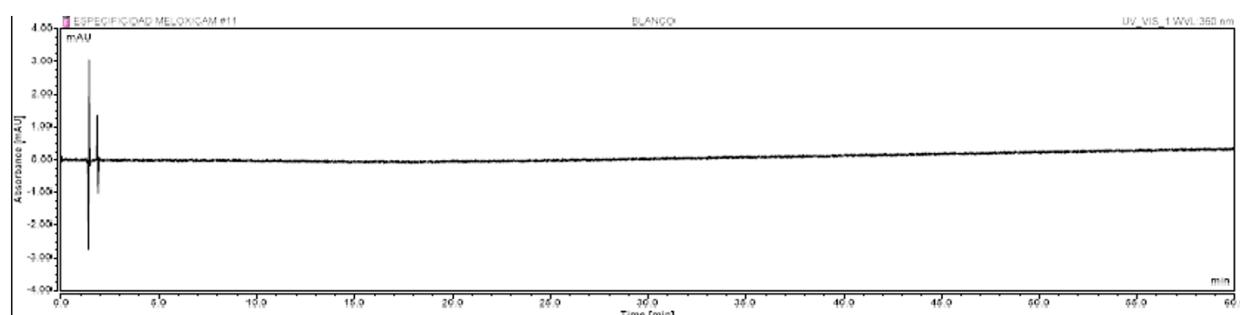
Tabla 4. Resultados de la prueba de solvente de extracción para Meloxicam evaluando agua purificada y etanol al 96%.

Solvente	Método de enjuague	Cantidad de recuperación promedio de muestra de Meloxicam, (%)	Desviación estándar relativa ó repetitividad RSD, (%)
Agua purificada	Hisopado	80,6	6,3
Agua purificada	Enjuague	56,2	16,7
Etanol 96%	Hisopado	78,8	8,6
Etanol 96%	Enjuague	31,5	18,2

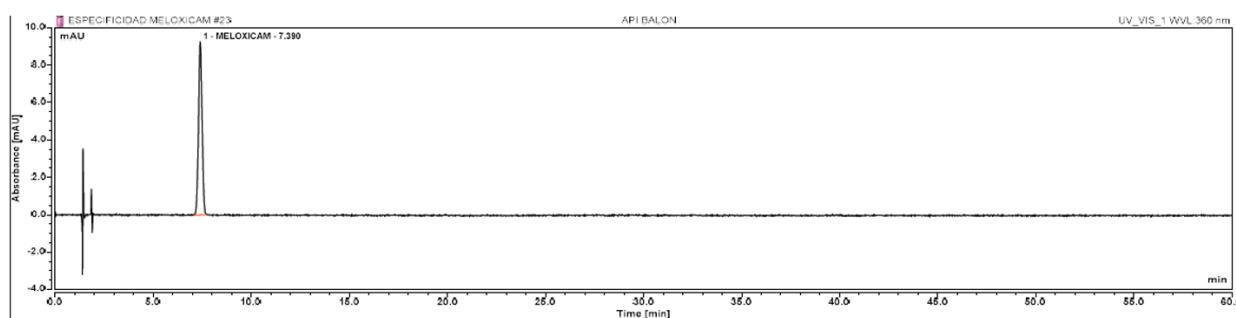
Tabla 5. Resultados de la prueba de especificidad y selectividad para Meloxicam.

Tipo de muestra	Presencia de señales (Si/No)	Tiempo de retención, (min)
“Blanco” (diluente)	Si	1,4
		1,8
Meloxicam	Si	7,3 a 7,4
Placebo	No	No aplica
Detergente	No	No aplica
Sanitizante 1	No	No aplica
Sanitizante 2	No	No aplica

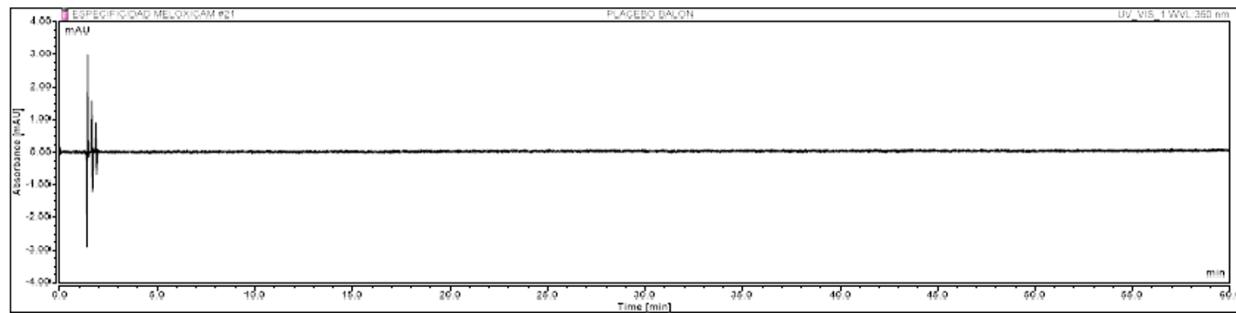
a.



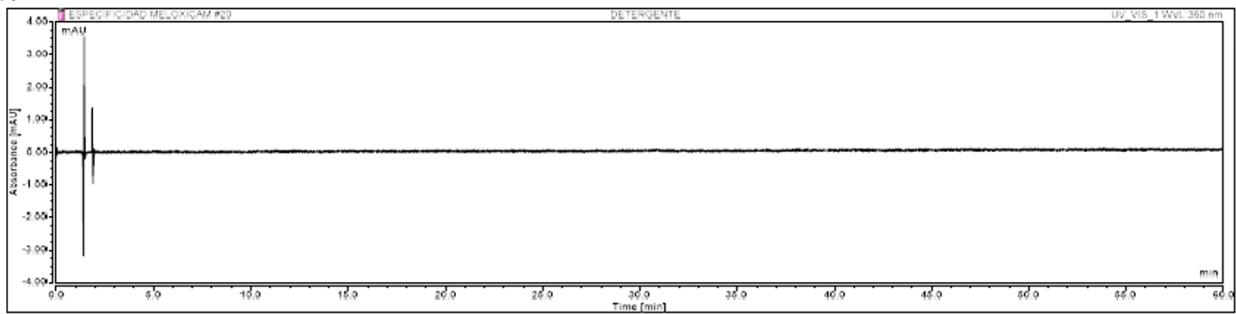
b.



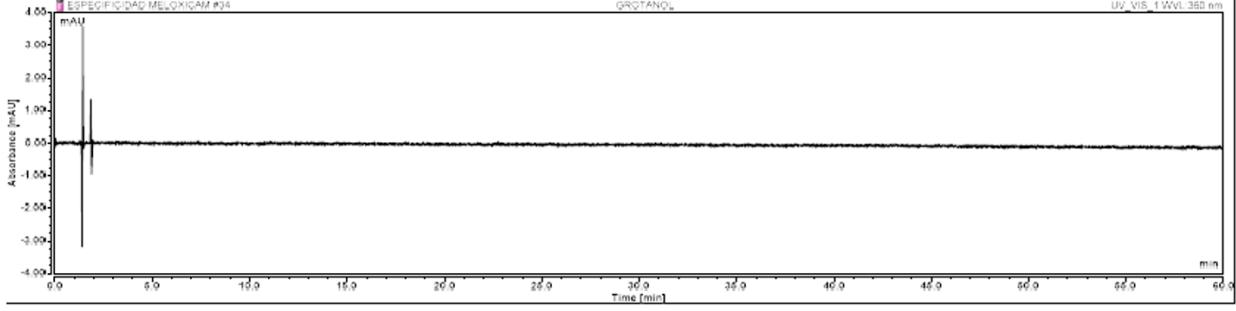
c.



d.



e.



f.

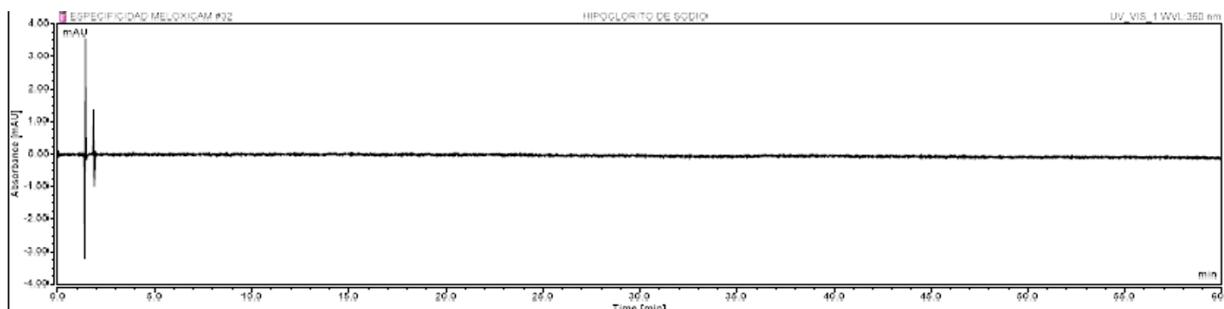


Figura 2. Cromatogramas de la prueba de especificidad: a) "blanco" o diluente, b) Meloxicam o principio activo, c) placebo, d) detergente, e) sanitizante 1, f) sanitizante 2.

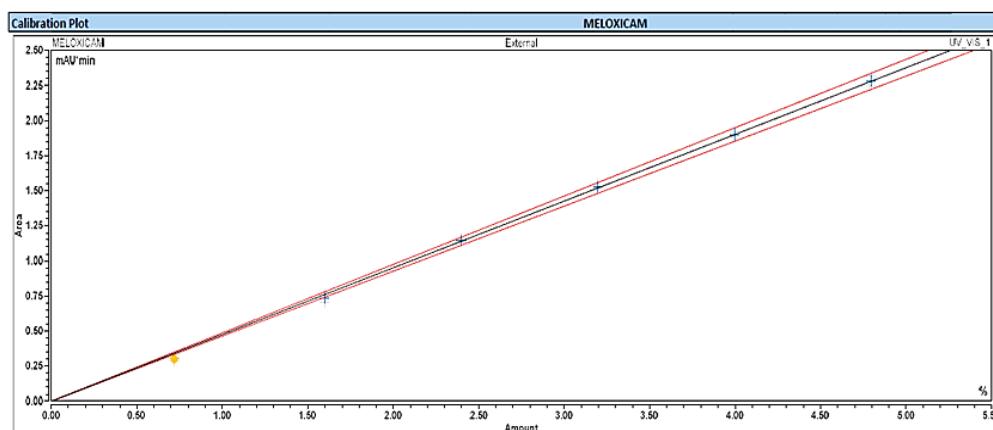


Figura 3. Resultados de linealidad de Meloxicam para concentraciones de 40, 60, 80, 100 y 120% respecto a la concentración analítica de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Tabla 6. Resultados estadísticos de la prueba de linealidad de la metodología analítica empleada.

Parámetro evaluado	Valor encontrado
Ecuación recta de regresión	$Y = (0,4869) X - (3,983 \times 10^{-2})$
Pendiente	0,4869
Desviación estándar de la pendiente	$3,783 \times 10^{-3}$
Límite superior 95% de la pendiente	$4,949 \times 10^{-1}$
Límite inferior 95% de la pendiente	$4,789 \times 10^{-1}$
Valor del t de test Student de la pendiente	44,98
Intercepto	$-3,983 \times 10^{-2}$
Desviación estándar del intercepto	$1,176 \times 10^{-2}$
Límite superior 95% del intercepto	$-1,489 \times 10^{-2}$
Límite inferior 95% del intercepto	$-6,476 \times 10^{-2}$
Valor del t de student del intercepto	-3,386
Suma residual de cuadrados	$7,902 \times 10^{-3}$

Parámetro evaluado	Valor encontrado
Desviación estándar residual	2,222 x 10 ⁻²
Error estándar relativo	1,689 %
Coeficiente de correlación (r)	0,9995

Tabla 7. Parámetros de adecuabilidad para la cuantificación de trazas de Meloxicam en la prueba de robustez.

Parámetro	Criterio	Flujo 0,9 mL/min	Flujo nominal de trabajo 1,0 mL/min	Flujo 1,1 mL/min
Platos teóricos, N	≥1000	8755	8897	8072
Asimetría (Tailing Factor)	0,7 – 2,5	1,0	1,2	1,0
Desviación estándar relativa, RSD, %	≤13,0%	0,7	1,0	1,1
Factor de capacidad, k	≥ 2,0	20,0	20,4	17,1
Tiempo de retención (min)	6,5 – 11,7	10,5	10,7	9,07
Correlación entre estándares	90%–110%	104,9	105,2	104,8

Tabla 8. Valores obtenidos en el análisis de la precisión y recuperación en superficies para dos analistas en función de diferentes superficies: acero mediante el método del enjuague (acero + enjuague) y acero mediante hisopado (acero + hisopo).

Ensayo	Cantidad de recuperación de Meloxicam, (%)				
	Acero + hisopo	Acero, enjuague	Vidrio	Pintura epoxica	Resina
Analista 1-serie 1	96,0	45,3	93,7	69,4	32,9
Analista 2-serie 1	90,8	42,5	86,8	72,6	14,1
Analista 1-serie 2	89,1	29,0	91,6	63,1	27,1
Analista 2-serie 2	84,8	31,0	87,0	65,2	28,7
Promedio	90,2	37,0	89,8	67,6	25,7
Factor de recuperación: [Obtenida]/[Esperada]	0,90	No cumple	0,90	0,68	No cumple
Constante de recuperación:	1,11		1,11	1,48	

Tabla 9. Resultados de la estabilidad de las muestras en el tiempo inicial (tiempo cero T_0) y en el tiempo uno T_1 (pasadas 86 horas)

Tipo de muestra recolectada	Almacenamiento	Estabilidad de la muestra de Meloxicam a 86 h	Cantidad de recuperación de Meloxicam a las 86 h respecto al tiempo inicial (%)
Hisopado	Almacenadas	Principio activo (Api)	95,5
		Api + placebo	97,4
		Placebo	No se presentan señales que puedan interferir en la cuantificación e identificación de Meloxicam
	Reconstituidas	Api	94,0
		Api + placebo	96,6
		Placebo	No se presentan señales que puedan interferir en la cuantificación e identificación de Meloxicam
Enjuague	Almacenadas	Api	102,4
		Api + placebo	101,9
		Placebo	No se presentan señales que puedan interferir en la cuantificación e identificación de Meloxicam
	Reconstituidas	Api	104,0
		Api + placebo	100,8
		Placebo	No se presentan señales que puedan interferir en la cuantificación e identificación de Meloxicam

Discusión

Prueba de filtros

Los resultados de la prueba de filtros para la cuantificación de trazas de Meloxicam mostraron (Tabla 1) que el filtro de jeringa de PVDF/L (fluoruro de polivinilideno) 0,45 µm presentó el porcentaje de recuperación más alto con un promedio de recuperación de 96,3%, indicando que no causa pérdidas del analito por retención por debajo del límite establecido, y además se obtiene un RSD o desviación estándar

relativa de 1,5%, indicando una alta precisión debido a que el filtro proporciona una recuperación repetible muy buena al filtrar el principio activo Meloxicam. El segundo filtro de Nylon de 0,45 µm presentó una recuperación ~5% menor (91,5%) pero una excelente precisión de RSD de 0,4%, mientras que el tercer filtro de Nylon de 0,22 µm tuvo la recuperación más baja comparado con otros filtros, tanto el de tamaño de poros de 0,45 µm como el tamaño de 0,22 µm. El filtro tipo PVDF/L demostró ser más eficaz y consistente, esto sugiere que el filtro PVDF/L 0,45 µm es el más adecuado

para la metodología analítica debido a su alta recuperación y baja dispersión en los resultados. Hallazgos similares se han reportado en estudios recientes (27,28) de validación de filtros usados en cromatografía para cuantificación de trazas donde el filtro PVDF/L muestra una mejor recuperación frente a membranas de nylon en métodos cromatográficos aplicados a matrices farmacéuticas complejas.

Límite de detección y cuantificación (LOD y LOQ) del medicamento Meloxicam

El límite de cuantificación (LOQ) de Meloxicam del método se estableció en 0,72 µg/mL, Tabla 2, con una relación señal ruido (S/N) de 23,9 que se encontraba en el rango requerido del parámetro establecido de 10-30 (23), indicando que a esa concentración es identificable la señal con respecto al ruido. El límite de detección (LOD) se determinó en 0,24 µg/mL, Tabla 2, con un valor S/N de 7,5, demostrando que el método es capaz de detectar Meloxicam desde esta concentración y por encima de ella, con una relación señal ruido aceptable de lo exigido (S/N 3-10) (23). Estos valores son comparables a los reportados en métodos cromatográficos usados para laboratorios de control de calidad; en estudios previos se han reportado límites de cuantificación (LOQ) en rangos cercanos a 0,5 – 1,0 µg/mL (26). Por lo tanto, los resultados obtenidos demuestran que la sensibilidad obteni-

da permite detectar con amplitud el límite de aceptación establecido ($\leq 4\mu\text{g/mL}$) una vez aplicadas las correcciones de recuperación e incertidumbre asociadas al muestreo.

Tiempo de extracción

El tiempo de mejor extracción con ultrasonido para recuperar el Meloxicam fue de 10 minutos, Tabla 3, ya que presentó recuperaciones cercanas al 100% para ambas concentraciones evaluadas de LQ y para el 120% de la concentración del fármaco. En la parte de prueba de adición se encontró una baja variación en la recuperación de Meloxicam en las muestras, lo cual se ve reflejado en el valor de RSD o desviación estándar relativa (%), siendo 1,7 % para LQ y 0,7 % para 120% ambos valores son aceptables dentro del margen, resaltando que este tiempo es más favorable para minimizar la variabilidad y asegurar una recuperación adecuada del principio activo. Las series de tiempos experimentados de 15 y 20 minutos presentaron una variabilidad inaceptable, especialmente a los 15 minutos, con un promedio de recuperación elevado y un RSD o desviación de 22,2% en los porcentajes de recuperación obtenidos, indicando poca repetibilidad de las muestras al emplear este tiempo de ultrasonido. Estas pruebas fueron descartadas (29). Con los resultados obtenidos se evidencia que existe un comportamiento consistente con la literatura (30), donde los autores describen que la extracción por ultrasonido

puede generar efectos adversos o una creciente variabilidad cuando se extiende innecesariamente.

Influencia de la naturaleza del solvente de extracción

La comparación entre agua purificada y etanol al 96% como solventes de extracción indicó que el agua purificada proporcionó una mejor recuperación en el método de hisopado (80,6% con RSD o desviación estándar relativa de 6,3 % en comparación con el etanol, Tabla 4. Sin embargo, para el método de enjuague, ambos solventes presentaron recuperaciones bajas (56,2% para agua purificada y 31,5% para etanol), sugiriendo que el método de hisopado es más eficaz para la recuperación de trazas de Meloxicam. Los resultados obtenidos coinciden con estudios realizados que muestran que el agua usada como solvente en el método de hisopado maximiza la recuperación en superficies metálicas, mientras que los solventes orgánicos generan mayores pérdidas por evaporación o la interacción con el hisopo, lo consistente con la (31).

Especificidad y selectividad

La especificidad y selectividad de la metodología analítica se confirmó mediante la identificación de los tiempos de retención de los picos obtenidos por HPLC , Tabla 5, las señales de blanco no interfirieron con la cuantificación del analito de interés, y las muestras dopadas con Meloxicam mostraron un pico distintivo entre 7,3 y 7,4 minutos, Figura 2, lo cual valida la capacidad del método para discriminar entre el analito y otros componentes potencialmente interferentes.

Linealidad y resultados estadísticos de metodología propuesta

La metodología analítica mostró una excelente linealidad en el rango evaluado de concentraciones del medicamento Meloxicam (0,72 µg/mL a 4,8 µg/mL) con un coeficiente de correlación R de 0,999 y el cálculo de los parámetros estadísticos , Tabla 6 y Figura 3, las trazas mostraron una distribución aleatoria sin patrón sistemático, confirmando la ausencia de error sistemático y la idoneidad de la curva de calibración lo que respalda el valor obtenido en el coeficiente de correlación que exhibe que el modelo elegido es aproximadamente 100% lineal (16,17,18). Resultados semejantes han sido reportados recientemente (32) para validaciones de AINEs, con correlaciones superiores a 0,998 en rangos de concentración similares.

Robustez

La evaluación del parámetro de robustez del método propuesto para análisis de Meloxicam ante variaciones en el flujo cromatográfico de trabajo en HPLC (0,9 mL/min a 1,1 mL/min) mostró, Tabla 7, que el método propuesto es robusto y cumple con los parámetros de adecuabilidad del sistema, como

el número de platos teóricos, factor de asimetría, RSD,% y factor de capacidad, lo que indica que el método es resistente a pequeñas variaciones en las condiciones de análisis, garantizando la consistencia y precisión de los resultados. Además, la velocidad del flujo de la columna elegido fue menor de 2,0 mL/min que reportado en (25, 26), lo que disminuye el tiempo de análisis y los costos.

Prueba de recuperación de principio activo Meloxicam en diferentes tipos de superficies

La prueba de recuperación en diferentes tipos de materiales de superficies mostró, Tabla 8, variabilidad en los porcentajes de recuperación del medicamento Meloxicam, especialmente en superficies como resina y pintura epólica, donde no se cumplió el criterio de aceptación (porcentaje de recuperación superior al 50%), en contraste, las recuperaciones en acero y vidrio fueron aceptables, destacando la necesidad de optimizar los métodos de recuperación para diferentes tipos de superficies como la de acero por el método de enjuague y resina para asegurar la eficacia del método analítico. El comportamiento observado anteriormente es análogo a otros estudios que reportan recuperaciones menores en materiales poliméricos (33) confirmando que los porcentajes de recuperación son dependientes del tipo de superficie y que los porcentajes de recuperación más altos se presentan en el acero inoxidable.

Estabilidad.

La estabilidad de las muestras evaluadas en condiciones de almacenamiento y reconstitución demostró, Tabla 9, que no hubo interferencias significativas en la cuantificación e identificación de Meloxicam, las muestras almacenadas y reconstituidas mostraron recuperaciones consistentes, confirmando la estabilidad del analito bajo las condiciones estudiadas, lo cual es crucial para la validez del método en aplicaciones reales.

En conjunto, todos estos resultados validan la metodología analítica utilizada para la cuantificación de trazas de Meloxicam, asegurando su precisión, robustez y capacidad para ser aplicada en un entorno de laboratorio para análisis confiables.

Conclusiones

La prueba de filtros es un parámetro crucial para asegurar la precisión del método analítico lo cual demostró que el filtro de jeringa de fluoruro de polivinilideno es el más adecuado para la cuantificación de trazas de Meloxicam, debido a su alta tasa de recuperación (96,3%) y baja variabilidad estadística (desviación relativa fue de 1,5%).

Para detectar Meloxicam en bajas concentraciones o trazas se establecieron los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) de 0,24 µg/mL y 0,72 µg/mL, lo que garantiza la sensibilidad y precisión del

método analítico empleado. El tiempo de ultrasonido de 10 minutos comparando con la propuesta en literatura (32) se identificó como el mejor para la recuperación del principio activo Meloxicam, proporcionando los resultados más consistentes y con menor dispersión para las concentraciones evaluadas, esta optimización del tiempo de extracción asegura también que el proceso sea eficiente y reproducible.

El agua purificada se eligió como el solvente de extracción más eficaz para el método de hisopado, logrando una recuperación superior (80,6%) en comparación con el etanol concentrado. El método de enjuague mostró una eficacia limitada de muestreo, mostrando que el uso del método de hisopado resultó ser mejor para obtener resultados precisos.

En la prueba de especificidad se logró demostrar que la metodología analítica utilizada es específica y selectiva para Meloxicam, pudiendo discriminar adecuadamente el analito de otras posibles interferencias externas como diluyentes, sanitizantes y detergentes, además el método mostró una linealidad satisfactorio con un coeficiente estadístico de correlación $R \geq 0,999$ en el rango de concentraciones de 0,72 $\mu\text{g/mL}$ a 4,8 $\mu\text{g/mL}$, indicando una relación directa y consistente entre la concentración de Meloxicam y la respuesta analítica.

La robustez del método propuesto se confirmó ante variaciones en el flujo del sistema (0,9 mL/min a 1,1 mL/min), cumpliendo

con los parámetros de adecuabilidad del sistema y asegurando la confiabilidad del método bajo condiciones variables. Las pruebas de recuperación mostraron variabilidad en los resultados de acuerdo al tipo de superficie. Se obtuvieron resultados satisfactorios en materiales tipo acero y vidrio.

Las pruebas de estabilidad demostraron que el Meloxicam permanece estable bajo condiciones de almacenamiento y reconstitución, con recuperaciones consistentes y sin interferencias significativas, garantizando la validez del método para aplicaciones en la cuantificación de Meloxicam en muestras reales de la producción.

Los estudios realizados y los cálculos de resultados estadísticos validan la metodología analítica propuesta para la cuantificación de trazas de Meloxicam por HPLC, asegurando que es precisa, robusta y adecuada para su aplicación en laboratorios farmacéuticos de análisis. La optimización de los parámetros críticos, como el tipo de filtro, tiempo y solvente de extracción, así como la robustez y estabilidad del método, proporcionan una base sólida para su implementación en el área de control de calidad. Al comparar con la publicación de la literatura (34), en este método se utilizó como fase móvil de la columna 2-propanol y metanol (un 10% de metanol) en vez de 30% de metanol en (34). Al disminuir el tiempo de ultrasonido hasta 10 min, se disminuye el tiempo de análisis comparando con (34).

Esta validación de la metodología propuesta de cuantificación de trazas en condiciones del clima tropical proporcionó una alternativa analítica y amplió algunos de los procedimientos para realizar el análisis en ausencia de información específica sobre la cuantificación de trazas en la farmacopea.

Conflicto de interés. El manuscrito no presenta conflicto de interés.

Fuente de financiación. El proyecto no tuvo financiación externa. Se recibieron aportes de las entidades participativas, apoyo en horas de trabajo en especie (uso de equipos y muestras suministrados por parte de la empresa).

Agradecimientos. A los químicos L. Enríquez y V. Messa por su asesoría profesional.

Referencias

1. López A E, Ramírez G, Iglesias G A. Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos: una muerte anunciada. NOVA [Internet]. 2004 Dec. 31 [Consultado 07 Jul 2024]; 2(2). Disponible en: <https://revistas.unicolmayor.edu.co/index.php/nova/article/view/26>
2. Resolución 00001606 del Ministerio de Salud y Protección Social del 02 de mayo de 2014.
3. Office of Regulatory Affairs. Validation of Cleaning Processes (7/93). U.S. Food and Drug Administration. [Internet]. 2014. [Consultado 07 Jul 2024] Disponible en: <https://www.fda.gov/inspections-compliance-enforcement-and-criminal-investigations/inspection-guides/validation-cleaning-processes-793>
4. Dubey N, Dubey N, Mandhanya M, Jain D K. Cleaning level acceptance criteria and HPLC-DAD method validation for the determination of Nabumetone residues on manufacturing equipment using swab sampling. J Pharm Anal. [Internet]. 2012 Dec [Consultado 10 Jul 2024]; 2 (6):478-483. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2095177912000524>
5. Flores M, Sosa R M, Bernès S. Meloxicam hydrochloride. IUCrData. [Internet]. 2023 Mar [Consultado 11 Jul 2024] ;8(3):1. Disponible en: <https://iucrdata.iucr.org/x/issues/2023/03/00/bx4023/index.html>
6. Khalil NY, Aldosari KF. Chapter six-Meloxicam. Profiles Drug Subst. Excip. Relat. Methodo I. [Internet]. 2020 Mar [Consultado 08 Jul 2024]. 45: 159-197. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871512519300214>
7. Fleischmann R, Iqbal I, Slobodin G. Meloxicam. Expert opin Pharmacother. [Internet]. 2005 Feb. [Consultado 08 Jul 2024], 3(10) :1501-1512. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/citedby/10.1517/14656566.3.10.1501?scroll=top&needAccess=true>
8. Ahmed M, Khanna D, Furst D. Meloxicam in rheumatoid arthritis. Expert Opin Drug Metab Toxicol. [Internet]. 2005 Nov. [Consultado 08 Jul 2024], 1(4): 739-751. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1517/17425255.1.4.739?src=recsys>.
9. Bekker A, Kloeppling C, Collingwood S. Meloxicam in the management of post-operative pain. J. Anaesthesiol. Clin. Pharmacol.. [Internet]. 2018 Dic. [Consultado 08 Jul 2024], 34(4): 450-457. Disponible en: https://journals.lww.com/joacp/fulltext/2018/34040/Meloxicam_in_the_management_of_post_operative.4.asp
10. Bruyère O, Honvo G, Veronese N, et al. An updated algorithm recommendation for the management of knee osteoarthritis from the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases (ESCEO). Semin Arthritis Rheum. [Internet]. 2019 Dec. [Consultado 12 Jul 2024] ;49(3):337-350. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0049017219300435>

11. Jones P, Lamdin R. Oral cyclo-oxygenase 2 inhibitors versus other oral analgesics for acute soft tissue injury: systematic review and meta-analysis. *Clin Drug Investig.* [Internet]. 2010 Jul [Consultado 12 Jul 2024]; 30: 419-437. Disponible en:<https://link.springer.com/article/10.2165/11533350-00000000-00000>
12. Silva E, Pimentel R, Bonfilio R, et al. Dissolution test optimization for meloxicam in the tablet pharmaceutical form. *Braz. J. Pharm. Sci.* [Internet]. 2009 Mar. [Consultado 12 Jul 2024]. 45(1): 67-73. Disponible en:<https://www.scielo.br/j/bjps/a/ZX6PjkTMfNJ4b8CG4Jm8j9K/?lang=en>
13. Çelik RS, Bayrak B, Kadioğlu Y. Development and validation of HPLC-UV method for determination of meloxicam in tablet dosage formulation. *Pharmata* 2023;3(3):59-63.
14. Vasyuk SO, Korzhova AS. Spectrophotometric determination of meloxicam in medicinal products. Current issues in pharmacy and medicine:science and practice. 2025; 18(2), 160-167.
15. Vignaduzzo SE, Castellano PM, Kaufman TS. Method development and validation for the simultaneous determination of meloxicam and pridinol mesylate using RP-HPLC and its application in drug formulations. *J Pharm Biomed Anal.* [Internet]. 2008 Jan [Consultado 12 Jul 2024]; 22;46(2):219-225. Disponible en:<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708507005250>
16. Parga, M., Afanasjeva, N. Validación de método cromatográfico por HPLC de la valoración e identificación del (1-(1 β , 16 α)-21-(acetiloxi)-11-hidroxi-2'-metil-5'H-pregna-1,4-dieno[17,16-d]oxazol-3,20-diona) en Deflazacort materia prima. NOVA. [Internet]. 2023 May. [Consultado 08 Jul 2024]; 21(40): 119-139. Disponible en:<https://revistas.unicolmayor.edu.co/index.php/nova/article/view/2120>
17. Castillo JA, Afanasjeva N. Validación de la metodología para cuantificar el fluconazol y sus impurezas orgánicas en materia prima por cromatografía líquida de alta resolución. *Biomed.* [Internet] 2023 Ago [Consultado 07 Jul 2024]; 43 (Sp. 1):229-44. Disponible en: <https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/6850>
18. Tamayo W, Afanasjeva N. Validación de un método analítico por cromatografía de gases para la cuantificación de memantina clorhidrato. *Rev Cubana Farm.* 2023 [Consultado 07 Jul 2024]; 56 (2). Disponible en :<https://revfarmacia.sld.cu/index.php/far/article/view/898>
19. Rubashvili I, Karukhnishvili N, Loria K, Dvali N. Validation of swab sampling and HPLC methods for determination of Meloxicam residues on pharmaceutical manufacturing equipment surfaces for cleaning validation. *Turk J Pharm Sci.* [Internet]. 2015. [Consultado 10 Jul 2024]; 12(3): 287-298. Disponible en:https://jag.journalagent.com/z4/download_fulltext.asp?pdif=tjps&plng=eng&un=TJPS-43531
20. Yapar EA, Özdemirhan ME. An Overview on Pharmacopoeias in the World and Monograph Elaboration Techniques. *Univers J Pharm Res.* [Internet]. 2020 Jul. [Consultado 12 Jul 2024]; 5(3): 57-64. Disponible en:<https://www.ujpronline.com/index.php/journal/article/view/418>
21. Pereda RD, Alfonso OI, Suarez PY, et al. Quality defects during the marketing of pharmaceutical products and the role of regional regulatory authorities. *Rev Cubana Farm.* 2021. [Consultado 12 Jul 2024], 54(3): 1-16. Disponible en:<https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenI.cgi?IDarticulo=114130.0>
22. European Medicines Agency. ICH Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, June 1995 CPMP/ICH/381/95.
23. European Medicines Agency ICH guideline Q2(R2) on validation of analytical procedures. 31 March 2022 EMA/ CHMP/ICH/82072/2006 Committee for Medicinal Products for Human Use.
24. Daksh S, Goyal A. Analytical Method Development and Validation: A Review. *Chemistry Research Journal*, 2020, 5(3):173-186
25. Kazusaki M, Ueda S, Takeuchi N, Ohgami Y. Validation of analytical procedures by high-performance liquid chromatography for pharmaceutical análisis. *Chromatography*, 2012, 33 (2), 65-73.
26. Ahmad R, Hailat M, Zakaraya Z. et al. Validation of an HPLC Method for the Determination of Meloxicam and Pantoprazole in a Combined Formulation. *Analytica*, 2022, 3(2),161-177; Disponible en: <https://doi.org/10.3390/analytica3020012>

27. Guimaraes GJ, Bartlett MG. Managing nonspecific adsorption to liquid chromatography hardware: A review. *Anal Chim Acta*. 2023; 1250:340994.
28. Aichinger G, Puntscher H, Marko D. et al. Microfiltration results in the loss of analytes and affects the in vitro genotoxicity of a complex mixture of *Alternaria* toxins. *Food Chem Toxicol*. 2020; 141:111401.
29. Ramadan HS, Belal F, et al. Deducción of full factorial design technique HPLC for the simultaneos análisis of meloxicam and esomeprazol en their laboratory prepared tablets. *Sci Rep*, 2025, 15,12922,1-17.
30. Carreira-Casais A, Otero P. et al. Benefits and drawbacks of ultrasound-assisted extraction for the recovery of bioactive compounds from marine algae. *Int J Environ Res Public Health*. 2021; 18(17):9153.
31. Ramandi SL, McCarthy D, McCabe C, et al. Evaluation of swab and rinse sampling procedures for cleaning validation in pharmaceutical manufacturing. *J Pharm Innov*. 2020, 15(4):403-411.
32. Kowalska M, Woźniak M. et al. Management of validation of HPLC method for determination of acetylsalicylic acid impurities in a new pharmaceutical product. *Sci Rep*. 2022, 12(1):1-11.
33. Nozal MJ, Bernal JL, et al. Development and validation of a liquid chromatographic method for determination of lacidipine residues on surfaces in the manufacture of pharmaceuticals. *J Chromatogr A*. 2004; 1024(1-2):115-22.
34. Khatki SS, Bandgar IS, Gumate DS, et al. Development and validation of UV Spectrophotometric method of Meloxicam. *IJRAR*, April 2025, 12 (2), 686-691.

© 2025 – Kelly Johana Rojas, Natalia Afanasjeva.



This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). Use, distribution, or reproduction in other forums is permitted, provided that the original author and copyright owner are credited and the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution, or reproduction is permitted that does not comply with these terms.