

Determinación de trazas de dodecibencenosulfonato de sodio por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), en el proceso de limpieza de una industria farmacéutica.

**Daniela Andrea Polanco Gaitán
Miguel Eduardo Betancourt Gutiérrez**

**Director (a)
Jhon Jairo Ríos Acevedo, PhD.**

**Universidad Santiago de Cali
Facultad de Ciencias Básicas
Programa de Química
Cali, Colombia
2023**

Determinación de trazas de dodecibencenosulfonato de sodio por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), en el proceso de limpieza de una industria farmacéutica.

**Daniela Andrea Polanco Gaitán
Miguel Eduardo Betancourt Gutiérrez**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:
Químico.**

**Director (a)
Jhon Jairo Ríos Acevedo, PhD.**

**Línea de Investigación:
Aseguramiento de la calidad
Grupo de Investigación:
GIEMA**

**Universidad Santiago de Cali
Facultad de Ciencias Básicas
Programa de Química
Ciudad, Colombia
2023**

IMPACTOS

Relacione el (los) impacto(s) que presentó el Trabajo de Grado

IMPACTO	PRODUCTO	BENEFICIARIO(S)
Económico	Reducción de riesgos de contaminación cruzada y certificación de la planta ante los entes regulatorios	Industria Farmacéutica
Responsabilidad social	Fabricación de productos farmacéuticos seguros para el consumo humano.	Población consumidora de medicamentos
Científico	Ampliar la información científica y las investigaciones de los surfactantes como lo es el SDBS	Comunidad científica e industrias farmacéuticas

DETERMINACIÓN DE TRAZAS DE DODECILBENCENOSULFONATO DE SODIO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC), EN EL PROCESO DE LIMPIEZA DE UNA INDUSTRIA FARMACÉUTICA.

Daniela Andrea Polanco Gaitán ¹, Miguel Eduardo Betancourt Gutiérrez ², PhD. Jhon Jairo Ríos Acevedo³

Daniela.polanco02@usc.edu.co¹, miguel.betancourt00@usc.edu.co², jhon.rios04@usc.edu.co³

Línea de investigación en aseguramiento de la calidad. Grupo de Investigación en electroquímica y medio ambiente (GIEMA). Facultad de Ciencias Básicas. Universidad Santiago de Cali. Campus Pampalinda
Calle 5 # 62-00. Santiago de Cali. Colombia

RESUMEN

Este estudio tuvo como objetivo desarrollar y validar una metodología analítica para la determinación cuantitativa de trazas del tensioactivo dodecilbencenosulfonato de sodio (SDBS) por medio de la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El límite de aceptación máximo se estableció en 2,3 mg/L por cada 25 cm². La selectividad se evaluó por medio de exposición del analito en placas, dicho análisis por medio del detector de arreglo de diodos (DAD) demostró que el analito se encontraba puro espectralmente (>990 mg/L); la linealidad se evaluó en cinco niveles de concentración del 50 al 150%; el coeficiente de variación para la repetibilidad del método fue menor al 5%; los límites de detección (LOD) y cuantificación LOQ fueron 0,5870 mg/L y 1,3767 mg/L respectivamente. Con lo que se logra demostrar que la metodología es lo suficientemente confiable para determinar las trazas de dodecilbencenosulfonato de sodio en la limpieza de una industria farmacéutica.

Palabras clave: dodecilbencenosulfonato de sodio; trazas; surfactantes, HPLC

DETERMINATION OF TRACES OF SODIUM DODECYLBENZENESULFONATE BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC), IN THE CLEANING PROCESS OF A PHARMACEUTICAL INDUSTRY.

ABSTRACT

This study aimed to develop and validate an analytical methodology for the quantitative determination of traces of the surfactant sodium dodecylbenzenesulfonate (SDBS) by means of the high-performance liquid chromatography (HPLC) technique. The maximum acceptance limit was established at 2.3 mg/L per 25 cm². Selectivity was evaluated by exposing the analyte on plates. This analysis using the diode array detector (DAD) demonstrated that the analyte was spectrally pure (>990 mg/L); Linearity was evaluated at five concentration levels from 50 to 150%; the coefficient of variation for the repeatability of the method was less than 5%; the LOD and LOQ were 0.5870 mg/L and 1.3767 mg/L respectively. This demonstrates that the methodology is reliable enough to determine traces of sodium dodecylbenzenesulfonate in the cleaning of a pharmaceutical industry.

Keywords: Sodium dodecylbenzenesulfonate; traces; surfactant; HPLC.

1. INTRODUCCIÓN

La validación de limpieza es un reto analítico de gran importancia en las industrias farmacéuticas, exigido por las buenas prácticas de manufactura (BPM), el cual establece evidencia documentada que garantiza con un alto grado de seguridad que se realiza una limpieza efectiva de los equipos de fabricación evitando la adherencia de los compuestos potencialmente dañinos sobre las superficies de los equipos que están en contacto directo con los productos, como lo son ingredientes farmacéuticos activos (API), excipientes, impurezas, residuos de detergentes o agentes de limpieza derivados de un proceso de fabricación anterior al producto que se va a fabricar [1] [2]. Por

ende, es crucial en los equipos multiuso o multipropósito que se emplean para la fabricación de una gran variedad de productos de consumo humano que poseen diferentes principios activos con el fin de evitar la contaminación cruzada y las confusiones [3]. Además, se requiere el desarrollo de métodos selectivos y sensibles que permitan la cuantificación de dichos residuos sobre la superficie de los equipos después de la limpieza. Cabe resaltar que las entidades reguladoras exigen que los residuos de activos farmacéuticos sean eliminados por debajo de niveles aceptables establecidos científicamente, al igual que los residuos provenientes de los agentes de limpieza [4] [5].

En la actualidad las diferentes normas regulatorias no establecen un criterio fijo para los límites de aceptación, debido a la amplia variedad de equipos y productos utilizados en las industrias farmacéuticas, sin embargo, se sugieren pautas que justifican el cálculo de dichos límites, los cuales según la administración de drogas y alimentos de los estados unidos (FDA) deben ser prácticos, lógicos, alcanzables, verificables y científicamente justificados [6]. El instituto nacional de vigilancia de medicamentos y alimentos (INVIMA) en su guía para la validación de los procesos de limpieza menciona algunos de los métodos más utilizados para la determinación de los criterios de aceptación basados en un análisis toxicológico que aunque no están establecidos oficialmente por la FDA, han sido usados ampliamente por las industrias, entre los cuales se encuentran el método de la dosis terapéutica, dosis tóxica, criterio de las 10 mg/L y el método visual [7] [8].

Los detergentes y productos químicos de limpieza desempeñan un papel fundamental en la industria farmacéutica actual. Para una empresa dedicada a la producción de fármacos, la importancia de mantener estándares de calidad extremadamente altos y llevar a cabo controles rigurosos es innegable. En este contexto, los tensoactivos han demostrado ser herramientas indispensables para satisfacer estas exigencias en cuanto a limpieza y calidad ya que además de ser emulsificantes altamente eficaces, se han convertido en precursores esenciales en la eliminación de suciedad, residuos y cualquier tipo de sustancias no deseadas. Aunque su función principal es la limpieza, es igualmente crucial garantizar una completa eliminación de estos contaminantes. Esto se logra mediante la aplicación de metodologías y controles de calidad validados, asegurando así un proceso de limpieza efectivo y seguro en la producción farmacéutica [9].

La implementación de surfactantes aniónicos y catiónicos como agentes de limpieza en la industria farmacéutica es cada vez más utilizada debido a sus características óptimas en el barrido de remanentes y contaminantes, compuestos a base de sulfatos, sulfonatos y aminos cuaternarios son los más utilizados, pero a través de los años se han presentado una gran variedad de casos donde han ocurrido contaminaciones debido a malas implementaciones en procedimientos de limpieza, esto ha conllevado a contaminaciones en la producción, donde se ha demostrado proliferación microbiana y combinación de múltiples compuestos no deseados en el producto terminado [10].

En la literatura científica, se han documentado diversas técnicas analíticas para la detección de surfactantes y su interacción con otros analitos. Sin embargo, hasta el momento, no se ha identificado ningún estudio que aborde esta cuestión específica de manera exhaustiva. La necesidad de contar con métodos precisos y altamente sensibles es esencial para respaldar la conformidad con las regulaciones gubernamentales y las normativas de calidad. Por tal razón ha surgido la necesidad de desarrollar una metodología analítica que permita la cuantificación de trazas de dodecilsulfonato de sodio a través de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Esta iniciativa busca satisfacer las exigencias y estándares establecidos en los laboratorios farmacéuticos, brindando así una herramienta valiosa para el cumplimiento normativo y la garantía de resultados confiables en la industria farmacéutica.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Sustancias químicas y reactivos

Todos los reactivos fueron de grado analítico estándar. Para el análisis por HPLC el estándar de dodecilsulfonato de sodio (sólido blanco o amarillo pálido; pureza 83%) se obtuvo de Pharmaffiliates. La muestra de detergente bio-soft D-40 se adquirió de Stepan Colombia S.A.S (Bogotá, DC, Colombia). El etanol absoluto (pureza 99,9%), acetato de amonio (pureza 98,8%), ácido acético glacial (pureza >99,8%), acetonitrilo (ACN) grado HPLC (pureza >99,9%) y 2-propanol (pureza >99,9%) se adquirieron de la marca Merck (Alemania).

Las soluciones se prepararon utilizando agua tipo I (resistividad de 18,2 MΩ cm) producida por un equipo purificador de agua Thermo scientific (modelo Smart2pure 3uv).

2.2 Materiales

Se utilizaron filtros de jeringa de polifluoruro de vinilideno (PVDF) de poro $\leq 0,22 \mu\text{m}$ x 13mm. Otros materiales usados fueron placas de 5cm x 5cm, de acero inoxidable, teflón, epóxica, vidrio, cerámica y empack (polímero termoplástico) e hisopos TX714A (TexWipe).

2.3 Instrumentación

Para los análisis se empleó un cromatógrafo líquido Thermo fisher scientific (modelo Dionex ultimate 3000) equipado con un módulo de bomba, un muestreador automático, un detector UV y DAD. El tratamiento de los datos y el control del equipo HPLC fue mediante el software (Chromeleon 7). En cada etapa de preparación de soluciones, estándares y muestras se utilizó una balanza analítica marca ohaus (modelo PR224, Estados Unidos). Para la sonicación se empleó un baño ultrasonido de branson (modelo B200).

2.4 Condiciones cromatográficas

Durante todo el estudio, se siguió una técnica de elución isocrática. La composición de la fase móvil fue Acetonitrilo: Buffer acetato de amonio pH 5,4 (70:30, v/v). Las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo mediante una columna ACCLAIM-SURFACTANT PLUS con tamaño de partícula de 5 μm y 4,6 x 150 mm de diámetro interior. La detección de muestras se controló a una longitud de onda de 225 nm. La temperatura del horno de la columna se llevó a 30 °C. El flujo de la fase móvil se fijó en 1,0 mL/min. El volumen de inyección fue de 200 μL y el tiempo de adquisición de los datos fue de 30 min.

2.5 Preparación de estándares, muestras y soluciones

2.5.1 Preparación de buffer acetato de amonio 100 mM pH 5.4

Se pesaron 7,7084 g de acetato de amonio, llevando a un volumen final de 1000 mL con agua tipo I. Luego, se ajustó el pH a 5,4 con ácido acético glacial.

2.5.2 Preparación de la fase móvil

Se mezclaron 300 mL de buffer acetato de amonio, 100 Mm pH 5,4 y 700 mL de acetonitrilo grado HPLC. Se dejó reposar la solución hasta temperatura ambiente y finalmente, se filtró a través de filtro de membrana PVDF $\leq 0,22\mu\text{m}$.

2.5.3 Preparación de la fase diluyente

Se mezclaron 500 mL de etanol absoluto y 500 mL de agua tipo I, en un frasco schott de 1000 mL dejando reposar la solución hasta temperatura ambiente.

2.5.4 Preparación de la solución estándar 2,3 mg/L

Se pesaron por duplicado el equivalente a 27,7 mg de estándar de dodecilbencenosulfonato de sodio en un balón volumétrico de 100mL, se adiciono cerca de 60 mL de diluyente y se llevó a ultrasonido por 5 min llevando a volumen con el mismo solvente. Se transfirió un alícuota de 1mL en 100 mL y se completó a volumen con la fase diluyente.

2.5.5 Solución madre de dodecilbencenosulfonato de sodio (115 mg/L)

Se pesaron directamente en un balón volumétrico de 200 mL el equivalente a 23 mg de estándar de dodecilsulfonato de sodio, se disolvió realizando lavados con fase diluyente y se llevó a ultrasonido para ayudar a disolver llevando a volumen con el mismo solvente.

2.5.6 Solución stock de detergente (2,3 mg/L de DBSS)

Se pesaron 65 mg de detergente BIO-SOFT D-40 en un balón volumétrico de 100 mL, se adicionaron 50 mL de diluyente, se agitó suavemente y se llevó volumen con el mismo solvente. Se transfirió una alícuota de 1 mL a un balón volumétrico de 100 mL y se llevó a volumen con diluyente.

2.6 Criterio máximo de aceptación

Basados en la guía para la validación de los procesos de limpieza en la fabricación de productos farmacéuticos del INVIMA, la determinación del límite máximo de aceptación se determinó mediante un análisis toxicológico teniendo en cuenta tres métodos diferentes los cuales fueron: método de la dosis tóxica, método del 10 mg/L y el método visual [11] [6].

2.7 Validación del método de análisis

De acuerdo a lo establecido en la USP, se procedió a validar esta metodología según la categoría II del apartado <1225> para la determinación de impurezas en sustancias farmacéuticas [12].

2.7.1 Aptitud del sistema analítico

La idoneidad del sistema analítico se realizó mediante la preparación de solución estándar de SDBS a 2,3 mg/L por duplicado, inyectando 5 veces el primer estándar y dos veces el segundo para realizar un chequeo antes del análisis. Los parámetros evaluados fueron la repetibilidad del sistema (%RSD), correlación de estándares, tiempo de retención, platos teóricos (N), factor de asimetría (T) y la resolución (R).

2.7.2 Selectividad

La selectividad de un método analítico se refiere a la capacidad del mismo para proporcionar respuestas debidas únicamente al analito objeto de estudio, en presencia de otras sustancias que eventualmente pueden estar presente como lo son las impurezas, excipientes y agentes de limpieza [13]. Este parámetro se evaluó mediante exposición del analito sobre las diferentes superficies y el material u objetos utilizados para el muestreo en diferentes días (0,2 y 4). Dichas condiciones fueron emuladas dentro del laboratorio.

2.7.2.0 Solución stock de analito

Se pesaron 32,5 mg de detergente BIO-SOFT D-40 en un balón volumétrico de 20 mL, se adicionaron 10 mL de diluyente, se agitó suavemente y se llevó a volumen con el mismo solvente. Luego, se transfirió una alícuota de 2 mL, a un balón volumétrico de 100 mL y se completó a volumen con fase diluyente.

2.7.2.1 Exposición del analito sobre cada superficie

Sobre la superficie de placas de 5cm x 5cm de cada material, acero inoxidable, teflón, epóxica, vidrio, cerámica y empack (polímero termoplástico), se transfirió 1 mL de la solución stock hasta que se evaporara y se recuperó por medio del método de hisopado.

2.7.2.2 Método de hisopado

Es el método por defecto para la recolección de residuos de trazas de un posible contaminante el cual se aplica para superficies duras o casi planas. Para llevar a cabo este procedimiento se inició vertiendo 5 mL de diluyente en un tubo de ensayo de 10 mL, luego se tomó un hisopo y se introdujo en el tubo de ensayo, humedeciéndolo y asegurándose de eliminar el exceso de líquido escurriéndolo por las paredes internas del tubo. Seguidamente se procedió a la recuperación utilizando un patrón de movimiento en forma de zigzag [14].

2.7.2.3 Exposición del analito en solución en tubo de ensayo con hisopo

En un tubo de ensayo de 10 mL con hisopo se adicionaron 4 mL de diluyente y 1 mL de la solución stock de analito, se dejó reposar por 20 minutos para la evaluación del día cero. Las muestras se almacenaron en la nevera para el análisis del segundo y cuarto día de exposición.

2.7.2.4 Exposición del analito en solución en frasco ámbar

En un frasco ámbar, se adicionaron 80 mL de diluyente y 20 mL de la solución stock de analito, se dejó reposar por 20 minutos para la evaluación del día cero. Las muestras se almacenaron en la nevera para el análisis del segundo y cuarto día de exposición.

Cabe resaltar que cada exposición se realizó por triplicado para cada día evaluado, y las diferentes placas utilizadas emulan los materiales presentes en la planta de producción que tienen contacto directo con el producto.

2.7.3 Linealidad y rango

A partir de una solución madre estándar de dodecilsulfonato de sodio con una concentración de 115 mg/L, se realizó una curva de calibración utilizando cinco niveles de concentración diferentes, cada uno analizado por triplicado. Estos niveles de concentración abarcaron un rango del 50% al 150% en relación al límite máximo permitido.

2.7.4 Precisión

La precisión se define como la medida de la cercanía de los resultados de un conjunto de mediciones, para evaluar este parámetro se tuvo en cuenta la repetibilidad del sistema a partir de una muestra de detergente a una concentración analítica de dodecilsulfonato de sodio de 2,3 mg/L (concentración máxima permitida) por otro lado, la repetibilidad del método y la precisión intermedia se evaluó analizando seis muestras de detergente en condiciones distintas es decir, utilizando equipos diferentes (HPLC) y realizando la ejecución y preparación de las mismas por dos analistas en días diferentes.

2.7.4.0 Solución muestra de detergente

Se pesaron 130 mg de detergente BIO-SOFT D-40 en un balón volumétrico de 200 mL, se adicionaron 100 mL de diluyente, agitando suavemente y llevando a volumen con el mismo solvente. Se transfirió una alícuota de 2 mL a un balón volumétrico de 200 mL y se llevó a volumen con diluyente.

2.7.5 Exactitud

Este parámetro se evaluó por medio del porcentaje de recuperación obtenido de la valoración sobre preparaciones de la muestra de detergente BIO-SOFT D-40 con cantidades conocidas de activo. Aplicando el método de adición estándar en el cual se realizaron nueve determinaciones sobre tres concentraciones que cubran el intervalo de la validación, es decir 50%, 100% y 150% por triplicado cada uno.

2.7.5.0 Muestra de detergente con estándar al 50% (preparación por triplicado)

Se transfirió una alícuota de 1 mL de solución stock de detergente a un balón volumétrico de 100 mL y 1 mL de solución estándar al 50 % llevando a volumen con fase diluyente.

2.7.5.1 Muestra de detergente con estándar al 100 % (preparación por triplicado)

Se transfirió una alícuota de 1 mL de solución stock de detergente a un balón volumétrico de 100 mL y 1 mL de solución estándar al 100 % llevando a volumen con fase diluyente.

2.7.5.2 Muestra de detergente con estándar al 150% (preparación por triplicado)

Se transfirió una alícuota de 1mL de solución stock de detergente a un balón volumétrico de 100mL y 1mL de solución estándar al 150 % llevando a volumen con fase diluyente.

2.7.6 Limite de detección y cuantificación

A partir de una solución stock de detergente con una concentración analítica de dodecibencenosulfonato de sodio de 2,3 mg/L, se realizó una curva de calibración a bajas concentraciones (por debajo del límite máximo permitido), preparando seis niveles de concentración diferentes. Estos niveles de concentración representaron el 40%, 50%, 60%, 70%, 80% y 90% del límite de limpieza.

2.7.7 Robustez

Este parámetro se determinó por medio de un diseño factorial 2^3 en el cual se realizaron los siguientes cambios:

- Se varió la temperatura cinco grados por encima y por debajo de la temperatura ya establecida inicialmente.
- Se modificó el peso del acetato de amonio 0,05 g por encima y por debajo del establecido inicialmente para la preparación del buffer.
- Se cambió el pH de la solución de acetato de amonio 0,05 por encima y por debajo de lo establecido al principio.

2.7.8 Estabilidad de las soluciones analíticas

Este parámetro se evaluó con el fin de garantizar la integridad de las soluciones, ya que de estas depende la confiabilidad de los resultados. Por tal razón se evaluó el tiempo de la estabilidad de la solución estándar de 2,3 mg/L y la solución de la muestra stock de detergente con el hisopo; se preparó por triplicado, almacenados a temperatura ambiente, estas soluciones se evaluaron en los tiempos de 0H, 24H y 48H.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para verificar que las condiciones del sistema analítico completo (analistas, reactivos, equipos y condiciones ambientales) son óptimas para llevar a cabo el análisis y garantizar la calidad de los datos generados, se evaluó la idoneidad del sistema, basados en lo establecido en el capítulo de cromatografía (621) de la farmacopea de los estados unidos (USP) [15], determinando los parámetros tales como platos teóricos, tiempo de retención, asimetría, resolución y repetibilidad del sistema medido de la sumatoria de áreas (%RSD). En la tabla 1 se pueden observar los criterios de aceptación basados en la USP implementados en diferentes estudios de validaciones de metodologías [16][17].

Tabla 1. Datos de la idoneidad del sistema para la determinación de DBSS utilizando el método propuesto

Parámetro	Criterios de aceptación [12]
Tiempo de retención	Pico 1 (SDBS C10): 13 min aproximadamente
	Pico 2 (SDBS C11): 17 min aproximadamente
	Pico 3 (SDBS C12): 20 min aproximadamente
	Pico 4 (SDBS C13): 25 min aproximadamente
Platos teóricos	Pico 1 (SDBS C10): ≥ 2500
	Pico 2 (SDBS C11): ≥ 4500
	Pico 3 (SDBS C12): ≥ 6000
	Pico 4 (SDBS C13): ≥ 7000

Asimetría	≤2,0 para cada pico
Resolución	≥1,5 para cada pico
Repetibilidad del sistema, medido de la sumatoria de áreas	%RSD ≤ 2,0

Cabe resaltar que todos los parámetros se encontraron dentro del rango aceptable, lo cual demuestra que el sistema analítico es capaz de proporcionar resultados confiables y precisos. El cromatograma representativo de la idoneidad del sistema para el análisis de trazas de SDBS se muestra en la fig. 1.

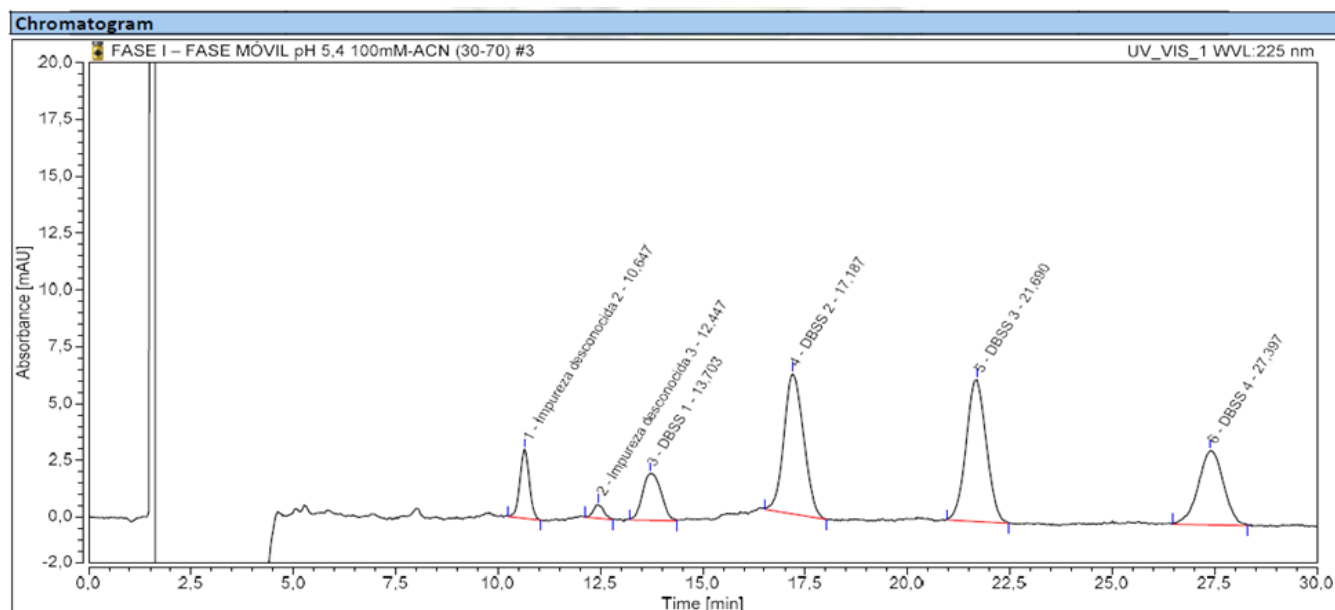


Fig. 1. Perfil cromatográfico de la idoneidad del sistema

En el análisis de trazas la selectividad no se determinó por degradaciones forzadas, debido a que las condiciones a las cuales se expone el analito son principalmente de exposición en las diferentes superficies y con el material u objetos utilizados para el muestreo. Dicho parámetro se evaluó por medio de la pureza del pico correspondiente al SDBS, de acuerdo a lo establecido por el consejo internacional para la armonización de requisitos técnicos de productos farmacéuticos para uso humano (ICH) en la guía Q2(R1) [18], la cual no establece un valor específico de pureza espectral, en su lugar proporciona directrices generales acerca de la evaluación de dicho parámetro. Por tal razón, el criterio de aceptación para la pureza espectral de cada pico debe ser >950 mg/L dicho criterio se estableció según parámetros internos de la compañía, los resultados obtenidos se observan en la tabla 2.

Tabla 2. Datos obtenidos del análisis de pureza espectral

Superficie	Día	Pureza Máxima (mg/L)
Placa acero inoxidable	0	996,33
	2	997,08
	4	998,00
Placa teflón plástico	0	996,84
	2	990,67
	4	998,00
Placa vidrio	0	994,42
	2	995,67
	4	997,67
Placa epóxica	0	990,33

	2	992,00
	4	998,50
Placa cerámica	0	993,83
	2	986,42
	4	996,67
Placa empack	0	997,25
	2	995,33
	4	997,83
Tubo de ensayo + hisopo	0	994,83
	2	996,25
	4	997,08
Frasco ámbar	0	991,17
	2	995,25
	4	997,33

De acuerdo a lo anterior se logró determinar que el pico de dodecilbencenosulfonato de sodio no presenta interferentes, además el análisis por DAD de las muestras, demostró que dicho pico se encuentra puro espectralmente con una pureza máxima >950 cumpliendo con lo establecido internamente, por lo tanto, el método posee la selectividad apropiada para la determinación de dichas trazas.

Por otro lado, la linealidad del método se evaluó por regresión lineal. Las soluciones estándar se analizaron en un rango de concentraciones del 50% al 150% distribuido proporcionalmente en cinco niveles de concentración 1.15; 1.73; 2.3; 2.88 y 3.45 mg/L según lo recomendado por la ICH Q3A para análisis de impurezas [19] [20]. En la fig. 2. se muestra la curva de calibración obtenida en función del área total de las señales cromatográficas frente a la concentración del estándar de SDBS, la cual corresponde a una línea recta con la siguiente ecuación de regresión: $y = 0,116909x - 0,08034$ y un coeficiente de correlación (r) el cual fue de 0,9926, mayor al criterio de aceptación para impurezas el cual debe ser $\geq 0,980$, lo cual nos indica una fuerte correlación entre la concentración del analito y la respuesta del método.

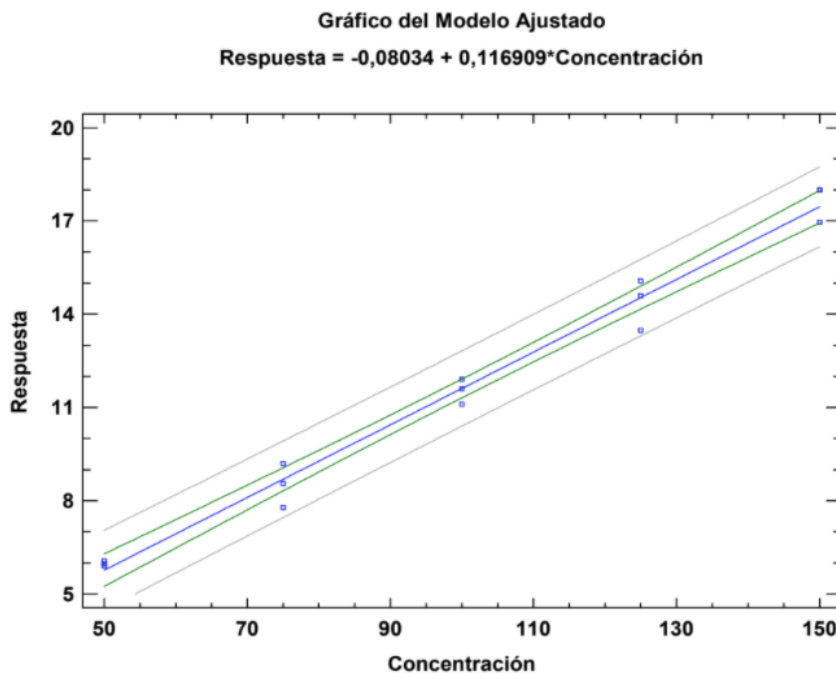


Tabla 3. Resultados del análisis estadístico (ANOVA)

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	256,269	1	256,269	869,97	0,0000
Residuo	3,82946	13	0,294574		
Total (Corr.)	260,098	14			

Para corroborar la linealidad del método se realizó un estudio estadístico de varianzas ANOVA (ver tabla 3) en el cual se obtuvo una F calculado o razón F de 869,97 y un F tabulado de 4,67 debido a que F Experimental (razón F) es mayor a F Tabulado, es decir que el valor P es menor a 0,05, por tal razón existe una relación estadísticamente significativa entre respuesta y concentración con un nivel de confianza del 95% se acepta la hipótesis alternativa y por ende se corrobora que el modelo lineal es el adecuado para describir los datos [21].

La precisión de método se estableció según las indicaciones de la ICH, en la cual se realizaron seis análisis o determinaciones (n=6) al 100% de la concentración de trabajo por el mismo analista, en el mismo instrumento y dentro de un periodo corto de tiempo [18], los resultados obtenidos se observan en la tabla 4.

Tabla 4. Resultados de la precisión del método

Preparación	Concentración (mg/L)
1	2,1747
2	2,2406
3	2,2590
4	2,2144
5	2,3263
6	2,2822
Promedio	2,2495
Desviación estándar	0,052859047
Coefficiente de variación	2,35%

La estimación de la repetibilidad del método se realizó con el coeficiente de variación (desviación estándar relativa), obteniendo un resultado de 2,35% menor al criterio de aceptación establecido del 5% para análisis de impurezas y/o productos de degradación según la asociación de químicas analíticas oficiales (AOAC) [22].

Es importante resaltar que el objetivo de la precisión intermedia es determinar la variación que se puede presentar en el día a día en un mismo laboratorio, por ende, se evaluó la influencia en la precisión de los datos bajo condiciones operativas diferentes tales como: diferentes analistas, equipos y días los resultados se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Resultados de la precisión intermedia

Analista 1 (concentración mg/L)	Analista 2 (concentración mg/L)
2,1747	2,1822
2,2406	2,1529
2,2590	2,1388
2,2144	2,2239
2,3263	2,3250
2,2822	2,2302
Promedio = 2,2495	Promedio = 2,2089
Desviación estándar (S) = 0,052859047	Desviación estándar (S) = 0 067706301
Varianza (S²) = 0,002794079	Varianza (S²) = 0 004584143
Coefficiente de variación (CV) = 2,35%	Coefficiente de variación (CV) = 3,07%

Los coeficientes de variación para la precisión intermedia, obtenidos por los analistas 1 y 2 fueron del 2,35% y del 3,07% respectivamente. Estos valores cumplieron con los criterios establecidos los cuales no deben exceder el 5% [23]. Adicional a esto se realizó un análisis de varianza (ANOVA) como segundo parámetro de aceptación en el cual se obtuvo un F calculada de 1,34 mucho menor a la F tabulada de 4,96, por tal razón no existe diferencia significativa entre los analistas 1 y 2 [24].

La evaluación de la exactitud se realizó por medio del porcentaje de recuperación (ver anexo 1, ecuación 3) obtenido de la valoración sobre preparaciones de la muestra con cantidades conocidas de activo, es decir aplicando el método de adición de estándar, el cual se emplea cuando la muestra no es bien conocida. Dichas preparaciones se distribuyeron en los niveles extremos y medio del rango de concentraciones de la linealidad con tres preparaciones de cada uno. Los resultados se pueden observar en la tabla 6.

Tabla 6. Valores de concentración para evaluación de la exactitud

Muestra	Área M. sin std	Área M. con std al 50%	Área corregida M. al 50%	Área M. con std al 100%	Área corregida M. al 100%	Área M. con std al 150%	Área corregida M. al 150%
1	14,0074	19,5478	5,5718	25,3783	11,4023	31,1821	17,2061
2	14,0040	19,6861	5,7101	25,4853	11,5093	30,4915	16,5155
3	13,9166	19,8803	5,9043	25,5375	11,5615	30,4977	16,5217
Promedio	13,9760	19,7047	5,7287	25,4670	11,4910	30,7238	16,7478
Concentración experimental (mg/L)	/	/	1,12	/	2,24	/	3,27
Concentración teórica (mg/L)	/	/	1,15	/	2,30	/	3,45

* M hace referencia a la muestra y std a estándar

La evaluación de la exactitud es un proceso mediante el cual se determina qué tan cerca están los resultados obtenidos de un valor verdadero o conocido. En el contexto de la adición estándar, la evaluación de la exactitud implica comparar la cantidad de analito determinada en la muestra con la cantidad de analito agregada como estándar, en el método desarrollado, se utilizó un enfoque de prueba de recuperación utilizando este principio, para soluciones de concentración conocidas se adicionaron 0,50,100 y 150% del estándar, véase la tabla 7. Se obtuvo como resultado de recuperación promedio un 96.4620%, el cual se encuentra dentro del criterio de aceptación de mínimo 90% [22], no se determinó un límite superior debido a que la norma no lo especifica cuando se trabaja con trazas. En ninguno de los puntos medidos del adicionado se obtuvo un valor inferior a lo especificado, lo que demuestra una óptima recuperación, estos resultados también demuestran una verificación de la precisión y un posible indicio de cualquier sesgo o interferencia que pueda estar presente en la muestra, se puede ver en la varianza de los grupos que la evaluación del 50% y 150% se obtuvieron 8,0305 y 5,0393 respectivamente, valores muy superiores con respecto al 100% que se obtuvo 0,4740, esto se explica en la dispersión de los datos, en este último punto se obtuvo una variabilidad menor. Se realiza una prueba G de Cochran para evaluar la homogeneidad de las varianzas del conjunto de datos utilizando la ecuación 4 (ver anexo 1), se concluye que, las varianzas de las concentraciones utilizadas son equivalentes, el factor concentración no influye sobre la valoración (tabla 8).

Tabla 7. Evaluación de la exactitud por recuperación

Ensayo	Concentración (%)	Concentración experimental (mg/L)	Concentración teórica (mg/L)	Porcentaje de recuperación	Varianza de los grupos
1	50	1.087108	1.150000	94.5311 %	
2	50	1.114091	1.150000	96.8775 %	8.0305
3	50	1.151981	1.150000	100.1723 %	
4	100	2.224690	2.300000	96.7257 %	0.4740

5	100	2.245566	2.300000	97.6333 %	
6	100	2.255751	2.300000	98.0761 %	
7	150	3.357063	3.450000	97.3062 %	
8	150	3.222320	3.450000	93.4006 %	5.0393
9	150	3.223530	3.450000	93.4357 %	
Suma	900.0000	19.8821	20.7000	868.1584	N/A
Promedio	100.0000	2.2091	2.3000	96.4620	N/A
Desviación(S)	43.3013	0.9322	0.9959	2.2627	N/A
Varianza (S²)	1875.0000	0.8691	0.9919	5.1197	N/A
%RSD	0.4330	0.4220	0.4330	2.3457	N/A

Porcentaje de recuperación

Recuperación mínima esperada	90%	cumple, la recuperación (96.4620%) es mayor al 90%
------------------------------	-----	--

Tabla 8. Homocedasticidad de varianzas

H ₀ : la recuperación media no es significativamente diferente del 100%	H ₀ : Las varianzas de los grupos son equivalentes entre sí
H ₁ : la recuperación media es significativamente diferente del 100%	H ₁ : Las varianzas de los grupos no son equivalentes entre sí
$t_{exp} = (90 - 96,4620 \times \sqrt{9}) / 2,3457 = 8,2647$	$G_{exp} = (8,0305) / (8,0305 + 0,4740 + 5,0393) = 0,5929$
T teórico ($\alpha: 0,05/2$; g.l.: 8) = 2,3060	G teórico ($\alpha: 0,05/2$; k: 3; n: 3) = 0,8709
Como el valor t_{exp} (8,2647) es mayor que el valor t teórico se concluye que existe suficiente evidencia para rechazar la hipótesis nula. Por lo tanto, la recuperación es significativamente diferente del 90%	Como el valor G_{exp} (0,5929) es menor que el valor G teórico se concluye que no existe suficiente evidencia para rechazar la hipótesis nula. Por lo tanto, el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

El estudio se completa con un test t para evaluar si la recuperación es significativamente diferente del 90%, para ello se usa la ecuación 5 (Ver anexo 1), donde se determinó que t_{exp} es menor a $t_{teórico}$, lo que significa que no existe diferencia significativa entre la recuperación media y el 90%, véase la tabla 8. Por lo tanto, el método analítico tiene la exactitud requerida para el rango de concentraciones de 50 a 150 %. Finalmente, aplicando las ecuaciones 6 y 7 (Ver anexo 1) se determinó que los intervalos de confianza cumplen con los parámetros establecidos véase la tabla 9, por lo tanto, el método no posee sesgo.

Tabla 9. Determinación de intervalos de confianza.

Estimación lineal			
Pendiente (m)	0,934743913	0,059211222	Intercepto (b)
S _m	0,01873031	0,046531408	S _b

Intervalo de confianza de la pendiente

$$0,9347 \pm (0,0187 \times 2,3646) = 0,9347 \pm 0,0443$$

Como el límite no incluye el cero se concluye que el método no presenta sesgo

Intervalo de confianza del intercepto

$$0,059211 \pm (0,046531 \times 2,3646) = 0,05921 \pm 0,11003$$

Como el límite incluye el cero, se concluye que el método no presenta sesgo

Se determinaron los límites de detección y cuantificación teóricos preparando una curva de calibración a bajas concentraciones. Para los niveles de concentración, se obtuvieron las respuestas mostradas en la tabla 10.

Tabla 10. Curva de calibración a bajas concentraciones.

Concentración (%)	Respuesta (Área)	Concentración experimental (mg/L)	Concentración teórica (mg/L)
40	5,8965	1,0578	0,9200
50	7,1714	1,2865	1,1500
60	8,4351	1,5132	1,3800
70	9,7563	1,7502	1,6100
80	11,6600	2,0917	1,8400
90	11,8121	2,1190	2,0700
Promedio	7,1677	1,6364	1,4950

El LOD y LOQ del método HPLC desarrollado se calculó en función de las relaciones señal-ruido siguiendo las ecuaciones 8 y 9 (Ver anexo 1), esto se determinó a partir de los datos obtenidos y la estimación lineal sobre la curva a bajas concentraciones, véase la tabla 11. Para el cálculo del LOD se optó por usar el principio de comparación de la concentración predicha del analito con el nivel crítico, esto con el fin de determinar el valor mínimo a partir del cual la concentración predicha se considera causada por el analito, como se buscó un riesgo pequeño de contraer un falso negativo, se utilizaron todas las probabilidades de error, es por esto que en la ecuación 8 utilizamos rangos de percentiles. Como conocemos la desviación estándar de la concentración neta, y los valores, se utilizaron las distribuciones normales correspondientes valores t de una distribución t-Student, es por esto que en la tabla 11 vemos valores utilizando $t_{1-\alpha; n-2}$ y $t_{1-\beta; n-2}$ n-2 grados de libertad [25].

Tabla 11. Datos para determinar los límites

Curva de calibración a bajas concentraciones			Datos necesarios para el cálculo		
Determinación	Cantidad (mg/L)	Respuesta	$(x_i - \bar{x})^2$	Estadístico	Resultado
1	0.9200	1.05777	0.3306	Cantidad de datos (n)	6
2	1.1500	1.28647	0.1190	Pendiente (m)	0.988640994
3	1.3800	1.51316	0.0132	Error estándar residual (s)	0.071923684
4	1.6100	1.75017	0.0132	$t_{1-\alpha; n-2} = t_{0,95; 4}$	2.132
5	1.8400	2.09167	0.1190	$t_{1-\beta; n-2} = t_{0,95; 4}$	2.132
6	2.0700	2.11896	0.3306	Promedio	1.4950
Suma	8.9700	9.8182	0.9258	N/A	N/A
Promedio	1.4950	1.6364	0.1543	N/A	N/A

Estimación de límites de detección y cuantificación teóricos

$$\text{LOD} = (2.132 + 2.132) \times (0.0719 / 0.9886) \times \sqrt{[1 + (1/6) + 1.4950^2 / 0.9258]} = 0.5870 \text{ (mg/L)}$$

$$\text{LOQ} = (10) \times (0.0719 / 0.9886) \times \sqrt{[1 + (1/6) + 1.4950^2 / 0.9258]} = 1.3767 \text{ (mg/L)}$$

Se obtuvieron valores para el LOD igual a 0.5870 mg/L y para el LOQ igual a 1.3767 mg/L. Estos valores de límites se comprobaron preparando y cuantificando una muestra, esta fue expuesta a las condiciones del muestreo (tubo de ensayo + hisopo) a la concentración teórica de los límites. En la tabla 12 se presentan los resultados.

Tabla 12. Comprobación de los límites de detección y cuantificación.

Límite de detección (mg/L)	Límite de cuantificación (mg/L)
0,6577	1,4067
0,6707	1,3777
0,6478	1,3826
0,6678	1,4132
0,6679	1,4181
0,6535	1,4625
Promedio= 0,6600	Promedio= 1,4100
Desviación estándar= 0,01	Desviación estándar= 0,03
CV= 1,40%	CV= 2,16%

Se realizó como criterio para el LOQ la evaluación por medio de recuperación, se obtuvo un promedio de 102,18% tal como se muestra en la tabla 13, está dentro del rango establecido que es de 80%-120% debido a que se trabajan con matrices de trazas y concentraciones por debajo de 10 mg/L.

Tabla 13. Porcentaje de recuperación obtenido

Muestra	Concentración teórica (mg/L)	Concentración experimental (mg/L)	% Recuperación
1	1,3800	1,4067	101,93
2	1,3800	1,3777	99,83
3	1,3800	1,3826	100,19
4	1,3800	1,4132	102,41
5	1,3800	1,4181	102,76
6	1,3800	1,4625	105,98
			Promedio = 102,18

La determinación de la robustez del método analítico se realizó por medio de un diseño factorial 2^3 , es decir ocho puntos experimentales, dos niveles y tres factores principales y sus interacciones. Los ensayos realizados y la matriz resultante aplicada se encuentran detallados en las tablas 14, 15 y 16.

Tabla 14. Variaciones para la evaluación del parámetro de robustez.

Variación	Intervalo de variación	Variación máxima (+)	Variación mínima (-)
A	(3,8542 ± 0,05) g	3,9042 g	3,8042 g
B	(5,40 ± 0,05)	5,45	5,35
C	(30,0 ± 5,0) °C	35,0 °C	25,0 °C

Tabla 15. Ensayos para la evaluación del parámetro de robustez.

Ensayo	Peso NH ₄ CH ₃ CO ₂ (g)	pH de la sln NH ₄ CH ₃ CO ₂	Temperatura (°C)
1	3,8042	5,35	25,0
2	3,9042	5,35	25,0
3	3,8042	5,45	25,0
4	3,9042	5,45	25,0
5	3,8042	5,35	35,0
6	3,9042	5,35	35,0
7	3,8042	5,45	35,0
8	3,9042	5,45	35,0

Tabla 16. Matriz resultante

Ensayo	Factores			Interacciones			
	A	B	C	AB	AC	BC	ABC
1	-	-	-	+	+	+	-
2	+	-	-	-	-	+	+
3	-	+	-	-	+	-	+
4	+	+	-	+	-	-	-
5	-	-	+	+	-	-	+
6	+	-	+	-	+	-	-
7	-	+	+	-	-	+	-
8	+	+	+	+	+	+	+

Dichos factores se estudiaron para evaluar la capacidad del método para permanecer inalterado ante pequeñas variaciones en ciertos parámetros, los cuales son susceptibles a errores sistemáticos y/o aleatorios desde un punto de vista estadístico, con el fin de lograr establecer cuales factores deben ser controlados durante la ejecución de un análisis rutinario [25] [26], los resultados se pueden observar en la tabla 17.

Tabla 17. Resultados obtenidos de la robustez.

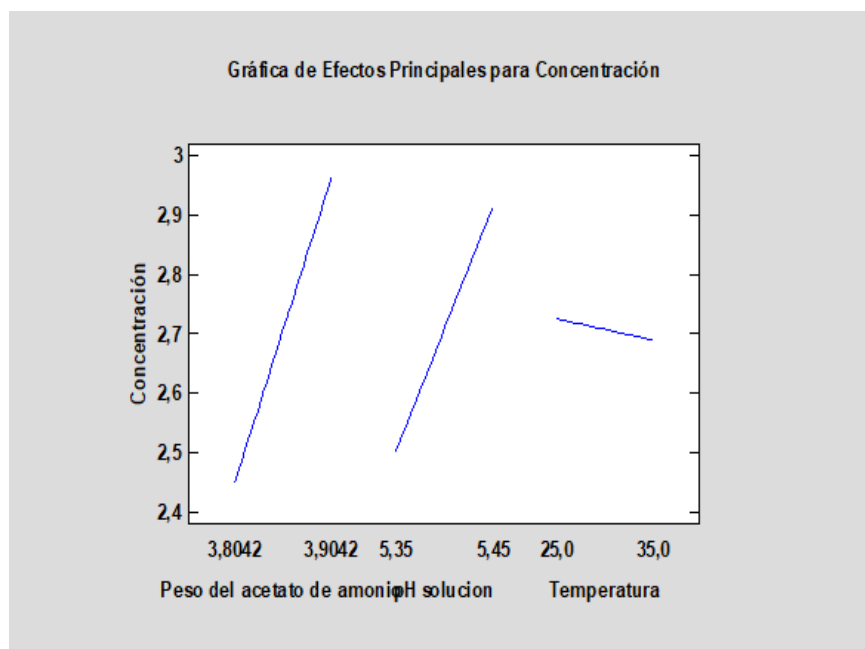
Ensayo	Área	Concentración (mg/L)
1	19,1308	3,5511
2	19,3839	3,5550
3	13,4152	2,3580
4	12,8575	2,3829
5	13,1305	2,2601
6	12,9810	2,2800
7	17,5344	2,5871
8	17,9476	2,6800

A partir de los resultados obtenidos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para cada uno de los efectos estimados y sus interacciones (Ver tabla 18).

Tabla 18. Análisis de varianza para la concentración

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Peso del acetato de amonio	0,520091	1	0,520091	1536,16	0,0162
B: pH Solución	0,335467	1	0,335467	990,84	0,0202
C: Temperatura	0,00250451	1	0,00250451	7,40	0,2243
AB	1,19507	1	1,19507	3529,80	0,0107
AC	0,000884411	1	0,000884411	2,61	0,3527
BC	0,0011049	1	0,0011049	3,26	0,3219
Error Total	0,000338567	1	0,000338567		
Total (Corr.)	2,05546	7			

De acuerdo al análisis de varianza efectuado para la Concentración, si F calculado es mayor que F crítico se rechaza la hipótesis nula asociada a la ausencia de influencia del factor en la variable de respuesta; por ende, se acepta la hipótesis alternativa que ratifica la influencia. Para el caso del factor A denotado como peso del acetato de amonio; el F calculado (Razón F) es de 1536,16 que es claramente mayor que el F crítico de 161,45; por lo que existe una evidencia estadísticamente significativa de que este factor influye en la variable de respuesta; esto es corroborado con el valor de probabilidad de la significancia equivalente a 0,0162 correspondiente con un nivel de confianza del 98,38% ; tal es el caso del factor B denotado como el pH de la solución presenta un F calculado de 990,84 evidentemente mayor que el F crítico de 161,45; lo que demuestra que existe una evidencia estadísticamente significativa de que este factor influye sobre la concentración obtenida del analito; esta afirmación es respaldada por el p valor de 0,0202 correspondiente a un coeficiente de significancia del 97,98%. De igual forma es evidente que la interacción de estos dos factores; la interacción AB influye notablemente sobre la variable de respuesta, lo que es ratificado por el valor de F calculado de 3529,80 y el p valor arrojado en la tabla ANOVA de 0,0107; por esta razón se puede afirmar que con un nivel de confianza del 98.93 %, la interacción entre el pH de la solución y el peso del acetato de amonio influyen sobre la concentración del analito, la variabilidad puede mostrarse en la fig.3. A nivel general estas apreciaciones explican que los tres efectos (A y B) como principales y AB como efecto de interacción tienen un valor-P menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0%.

**Fig. 3.** Efectos principales para concentración

Otra forma de expresar dichos resultados es por medio de un diagrama de Pareto (ver fig. 4), en el cual se observan los factores o combinaciones ordenados de mayor a menor efecto. Los factores que superen la franja azul se denominan factores significativos y son aquellos que no se pueden variar tal es el caso del peso del acetato de amonio, el pH de la solución y la interacción entre ambos (AB).

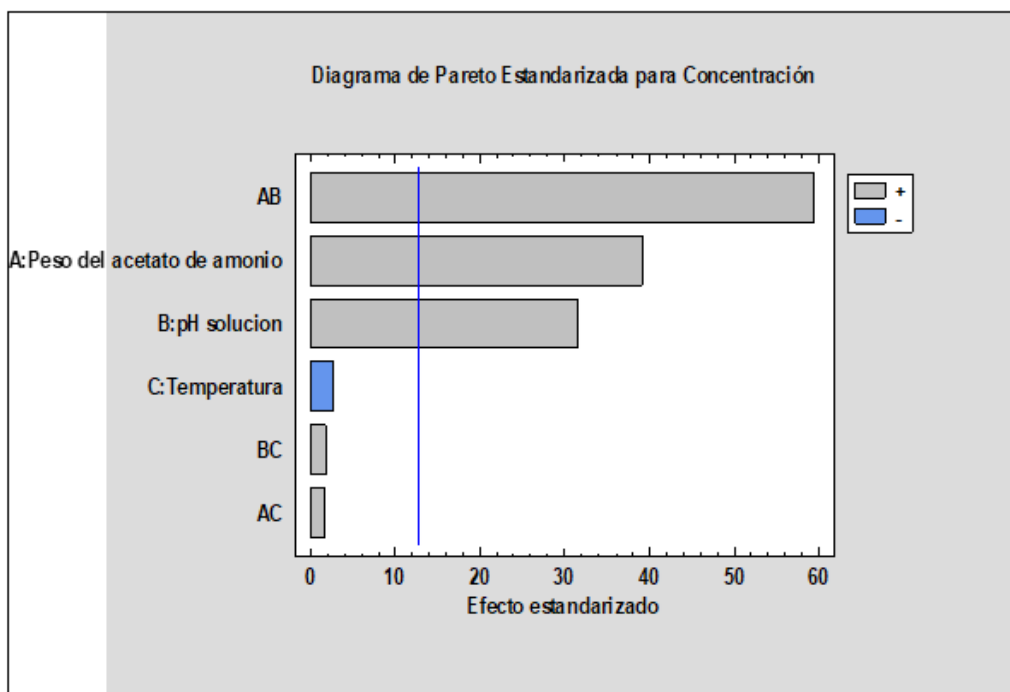


Fig. 4. Diagrama de Pareto

Los resultados de estabilidad del estándar de SDBS y la solución stock de detergente en hisopo a temperatura ambiente se muestran en la tabla 19. El criterio de aceptación fue el porcentaje de sesgo (Anexo 1, ecuación 10), es decir se estimó la diferencia del promedio de los picos en los tiempos de 24 y 48 H respecto al pico de las soluciones inicial (tiempo 0) el cual no debe ser menor al 98% ni mayor al 102%.

Tabla 19. Resultados del estudio de estabilidad de las soluciones analíticas.

Tiempo	Estándar 1		Estándar 2		Solución hisopo	
	Área promedio	%Sesgo	Área promedio	%Sesgo	Área promedio	%Sesgo
0H	12,4632	N/A	12,4708	N/A	11,7210	N/A
24H	12,3814	99,3%	12,1740	97,6%	11,5446	98,5%
48H	12,4965	100,3%	12,4728	100,0%	11,6383	99,3%

Los resultados nos demuestran que dichas soluciones son estables durante las 48 horas y no presentan interferencias por residuos a temperatura ambiente ya que se encuentra dentro del criterio establecido.

4. CONCLUSIONES

La evaluación de remanencia de trazas en los métodos aplicados en diversas áreas, como la industria farmacéutica, y el uso de estrategias de cuantificación hacia un analito específico como residuo o traza de estudio están ganando gradualmente importancia. En este estudio, se describe la validación de una metodología de análisis de nivel de trazas de dodecilbencenosulfonato de sodio en el proceso de limpieza de una industria farmacéutica por HPLC.

Cuando se examinan los datos, se puede ver que se obtuvieron resultados favorables con respecto a los criterios establecidos. Además, los hallazgos muestran que la metodología presentada en este artículo tiene el potencial de ser aplicable a gran escala con el fin de realizar análisis de control de calidad de rutina del surfactante dodecilbencenosulfonato de sodio como traza. El método HPLC desarrollado y validado permite el análisis a niveles bajos y con criterios de aceptación óptimos y reproducibles, la técnica propuesta se ha aplicado eficazmente en superficies emuladas en laboratorio de una industria farmacéutica. En comparación con otras técnicas de determinación de trazas, estas separaciones por cromatografía son selectivas y por ende más precisas, este enfoque no solo es ventajoso, sino que también presenta un método bueno, efectivo y rápido. La visión de la técnica desarrollada demuestra que podría utilizarse adecuadamente para el control periódico de superficies multipropósito farmacéuticos.

5. AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al laboratorio farmacéutico por su apoyo e interés en facilitar instrumentación e insumos para el desarrollo de este trabajo final, también a la Universidad Santiago de Cali por su colaboración en términos de enfoque y educación, al PhD Jhon Jairo Ríos como mentor y maestro, el cual hizo posible el desarrollo de esta técnica con su paciencia, conocimiento y experiencia. Finalmente, agradecimientos a todas las personas que apoyaron directa o indirectamente al desarrollo de este trabajo.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] E. Hakak zade y A. Mollahosseini, “*Application of reusable flat-membrane in electro-membrane extraction for tamsulosin hydrochloride determination in cleaning validation samples of sterile production line equipment by RP-HPLC*”, Iran University of Science and Technology, Narmak, Tehran, Iran, vol. 161, pp. 105793–105793, junio 2021, doi: 10.1016/j.ejps.2021.105793
- [2] H. Machado, G. Oliveira, L. Oliveira, “*Validación de limpieza en la industria farmacéutica: Revisión. Desafíos*”, Revista Interdisciplinaria de la Universidad Federal de Goiás, 9(2), 201–209, Brasil, mayo 2022, doi: 10.20873/uftv9-13794
- [3] C. Vera Vélez, “Validación de limpieza de una línea multi-producto” (trabajo fin de master), Morelos, Universidad Autónoma del estado de Morelos, Cuernavaca, 2022.
- [4] S. J. Beula, S. R., R. Y., V. M. y V. G., “*A Review on Cleaning Validation-Regulatory Guidelines for The Pharmaceutical Industry*”, Asian J. Pharmaceutical Res., pp. 167–170, mayo de 2022, doi: 10.52711/2231-5691.2022.00026
- [5] D. A. Salade, K. S. Arote, P. H. Patil, P. S. Patil, and A. R. Pawar, “*A Review on Pharmaceutical Cleaning Validation*,” *Asian Journal of Pharmaceutical Analysis*, pp. 197–202, Department of Quality Assurance, Kisan Vidya Prasarak Sanstha's, Aug. 2022, doi: 10.52711/2231-5675.2022.00033
- [6] Office, “*Validation of Cleaning Processes (7/93)*,” *U.S. Food and Drug Administration*, 2022. Disponible en: <https://www.fda.gov/inspections-compliance-enforcement-and-criminal-investigations/inspection-guides/validation-cleaning-processes-793> [Fecha de consulta: 29-agosto de 2023].
- [7] Fourman GL, Mullen MV. “*Determining Cleaning Validation Acceptance Limits for Pharmaceutical Manufacturing Operations*”. Pharm Technol, pág, 54-60 1993;17
- [8] EMA, “*Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP) Guideline on setting health based exposure limits for use in risk identification in the*

manufacture of different medicinal products in shared facilities,”, European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use, 2014.

[9] M. Álvarez C, “Vista de La industria de los surfactantes: tendencias mundiales y perspectivas para Colombia,” Grupo de Transferencia Tecnológica – Interfase, Universidad Industrial de Santander Colombia, pag 341-345, 2023.

[10] Pochteca Ecuador “Surfactantes, ¿Qué son y dónde se utilizan?” Jul. 26, 2022. Disponible en: <https://ecuador.pochteca.net/que-son-los-surfactantes-y-donde-se-utilizan/> [Fecha de consulta: 15-septiembre de 2023].

[11] INVIMA “Guía para la validación de los procesos de limpieza en la fabricación de productos farmacéuticos.” ASS-AYC-GU012, Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos, Bogotá DC, 2022.

[12] U.S, USP. “Validación de Procedimientos Compendiales” Capítulo General, <1225> USP-NF, Washington, DC: US. United States Pharmacopeial, 2023

[13] M. A. Akl, Mohamed, and A. Ramadan, “Validation of an HPLC-UV method for the determination of ceftriaxone sodium residues on stainless steel surface of pharmaceutical manufacturing equipments,” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 55, no. 2, pp. 247–252, May 2011, doi: 10.1016/j.jpba.2011.01.020.

[14] L. A. González, “Validación de un procedimiento de limpieza en el área de producción de semisólidos y del equipo de emulsificación que trabaja con betametasona en una industria farmacéutica,” Universidad de San Carlos de Guatemala, 2015.

[15] U.S, USP. “Cromatografía” Capítulo General, <621> USP-NF, Washington, DC: US. United States Pharmacopeial, 2023

[16] D. M. Mustafa, N. Magdy, and Noha, “The first validated stability-indicating HPLC/DAD method for quantitation of Vericiguat in its pharmaceutical formulation; Application to degradation kinetic studies,” *Talanta*, vol. 259, pp. 124498–124498, Jul. 2023, doi: 10.1016/j.talanta.2023.124498.

[17] M. A. Mangukiya, P. V. Bagwe, A. A. Desai, and S. V. Joshi, “Development and Validation of Stability indicating HPLC method for determination of related substances and assay of Monobenzene drug substance,” *Journal of the Indian Chemical Society*, vol. 100, no. 9, pp. 101060–101060, Junio, 2023, doi: 10.1016/j.jics.2023.101060.

[18] ICH Q2 (R1), “Validation of analytical procedures:text and methodology,” ICH Harmonized Tripartite Guidelines,2005.

[19] L. Merino, Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición, “Aspectos generales sobre la validación de métodos” Instituto de salud pública, Santiago Chile pág 45-48, 2010

[20] ICH Q3 (R2), “Impurities in new drug substances, Guidance for industry,” ICH Harmonized Tripartite idelines,2008.

[21] P. Mishra, U. Singh, Chandra Kant Pandey, P. Mishra, and G. Pandey, “Application of student’s t-test, analysis of variance, and covariance,” *Annals of Cardiac Anaesthesia*, vol. 22, no. 4, pp. 407–407, Junio, 2019, doi: 10.4103/aca.aca_94_19.

[22] L. Aguirre Ortega, J. Pérez Cuadrado, T. García Junca, M. Pujol Forn, “Validación de Métodos Analíticos Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria,” *Academia.edu*, Jan. 28, 2015. https://www.academia.edu/10365264/Validacion_de_Metodos_Analiticos_Asociacion_Espanola_de_Farmaceuticos_de_la_Industria [Fecha de consulta: 23-agosto de 2023].

[23] N. Echeverri, J. Carlos, Q. Díaz, “Desarrollo y validación de un método analítico por espectrofotometría UV/VIS, para la cuantificación de polifenoles en la materia prima ortiga”, Trabajo de grado, Tesis, Univ. Antioquia, El Carmen de Viboral, 2022.

[24] R. Boqué, “El límite de detección de un método analítico.” Grupo de Quimiometría y Cualimetría Universitat Rovira i Virgili, Tarragona. Disponible en: <http://www.quimica.urv.cat/quimio/general/lod.pdf> [Fecha de consulta: 24-agosto de 2023].

[25] H. Gutiérrez, R. De la Vara Salazar, “Análisis y Diseño de Experimentos”. McGraw-Hill Interam. Ed 2. S.A. C.V. pag 183-200, 2008.

[26] S. Fernández Bao, “Diseños de experimentos: diseño factorial”, trabajo fin de master, Universidad politécnica de Catalunya (UPC), Barcelona, 2020.

ANEXO 1: INFORMACIÓN ADICIONAL DEL FORMATO

Ecuaciones

Correlación de estándares

$$\text{Correlación de estándares} = \frac{\sum \text{de áreas promedio STD 2}}{\sum \text{de áreas promedio STD 1}} \times \frac{W \text{ STD 1}}{W \text{ STD 2}} \quad (1)$$

Calculo de las concentraciones.

$$\frac{\sum \text{area picos muestra}}{\text{promedio de } \sum \text{area picos std}} \times \frac{W_{std} \times P_{std} \times 1 \text{ mL}}{100 \text{ mL} \times 100 \text{ mL}} \times 1000 \text{ mL} \quad (2)$$

Porcentaje de recuperación

$$\% \text{Recuperacion} = \frac{\text{Valor expeerimental}}{\text{Valor teórico}} \times 100 \quad (3)$$

Prueba de cochran

$$G_{exp} = \frac{\text{Varianza maxima}}{\sum V \text{varianzas}} \quad (4)$$

Prueba t experimental

$$t_{exp} = \frac{|100 - \%R| \times \sqrt{n}}{CV} \quad (5)$$

Intervalo de confianza de la pendiente

$$m \pm S_m \times t_{teórico}(\alpha: 0,05; g. l: n - 2) \quad (6)$$

Intervalo de confianza del intercepto

$$b \pm S_b \times t_{teórico}(\alpha: 0,05; g. l: n - 2) \quad (7)$$

Determinación del límite de detección

$$\text{LOD} = (t_{1-\alpha:n-2} + t_{1-\beta:n-2}) \times \frac{S}{m} \times \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{X}^2}{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}} \quad (8)$$

Determinación del límite de cuantificación

$$\text{LOQ} = (10) \times \frac{S}{m} \times \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{X}^2}{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}} \quad (9)$$

Determinación del %de sesgo

$$\% \text{sesgo} = \frac{\text{Respuesta promedio de la solución a 12 o 24 horas}}{\text{Respuesta promedio de la solución a 0 horas}} \times 100 \quad (10)$$