

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**  
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA**  
**ESCUELA DE QUÍMICA**



**“DETERMINACIÓN DE PENICILINA G POTÁSICA POR  
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN COMO PARTE DEL  
PROCESO DE VERIFICACIÓN DE LIMPIEZA DE ÁREAS Y EQUIPOS DE  
UN LABORATORIO FARMACÉUTICO”**

**Trabajo de Grado:**

Br. Irene Natalia Lemus González

**Para optar el grado académico de:**

Licenciada en Ciencias Químicas.

CIUDAD UNIVERSITARIA, SAN SALVADOR, 2023

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**  
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA**  
**ESCUELA DE QUÍMICA**



**“DETERMINACIÓN DE PENICILINA G POTÁSICA POR  
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN COMO PARTE DEL  
PROCESO DE VERIFICACIÓN DE LIMPIEZA DE ÁREAS Y EQUIPOS DE  
UN LABORATORIO FARMACÉUTICO”**

**Trabajo de Grado:**

Br. Irene Natalia Lemus González

**Para optar el grado académico de:**

Licenciada en Ciencias Químicas.

CIUDAD UNIVERSITARIA, SAN SALVADOR, 2023

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**  
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA**  
**ESCUELA DE QUÍMICA**

**“DETERMINACIÓN DE PENICILINA G POTÁSICA POR  
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN COMO PARTE DEL  
PROCESO DE VERIFICACIÓN DE LIMPIEZA DE ÁREAS Y EQUIPOS DE  
UN LABORATORIO FARMACÉUTICO”**

**Trabajo de Grado:**

Br. Irene Natalia Lemus González

**Para optar el grado académico de:**

Licenciada en Ciencias Químicas.

**Asesores:**

Licda. Jennifer Beatriz Chávez Zamora

\_\_\_\_\_

MSc. Jorge Alberto Velásquez Reales

\_\_\_\_\_

CIUDAD UNIVERSITARIA, SAN SALVADOR, 2023

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**RECTOR:**

**MSc. ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO**

**SECRETARIO GENERAL:**

**MSc. FRANCISCO ANTONIO ALARCÓN SANDOVAL**

**FISCAL GENERAL:**

**Lic. RAFAEL HUMBERTO PEÑA MARÍN**

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS**

**DECANO:**

**Lic. ERNESTO AMERICO HIDALGO CASTELLANOS**

**SECRETARIO:**

**Lic. JAIME HUMBERTO SALINAS ESPINOZA**

## **AGRADECIMIENTOS**

**AGRADEZCO A DIOS Y A LA VIRGEN SANTISIMA**, por darme la oportunidad de culminar este logro en mi formación profesional.

**A MI PADRES JOSÉ GUSTAVO LEMUS MARTINEZ Y BETZABE DEL CARMEN GONZÁLEZ DE LEMUS**, por darme su apoyo incondicional y por ser mis impulsores para seguir creciendo como ser humano y como profesional.

**A MI HERMANA CORALIA BETZABE LEMUS GONZÁLEZ** por brindarme su ayuda en todo momento. **Y A MI SOBRINO GABRIELITO** gracias por tu apoyo y por prestarme la computadora para poder trabajar en mi tesis.

**A MI TIA MARIA ELENA GONZÁLEZ, (TIA NENA) Y MI PRIMA ALICIA GONZÁLEZ**, por ser pilares importantes en mi vida, por darme esas palabras de aliento, cuando mas lo necesitaba.

**A MI NOVIO JAIME EDUARDO DUEÑAS**, por siempre apoyarme en todo momento a no dejarme caer a pesar de las adversidades. **A MI HIJO MATEO DUEÑAS**, es mi motor para seguir adelante.

**A MIS ASESORES LIC. JENNIFER ZAMORA Y AL MSC. JORGE VELAZQUEZ**, gracias por toda la ayuda brindada durante la realización de este trabajo de graduación, sin su colaboración no hubiese sido posible, esta investigación.

**A MIS COMPAÑEROS DE TRABAJO**, gracias Lic. Mercy, Liseth, Romeito y Lic. Paty. Por siempre apoyarme en todo momento y estar al pendiente de la realización de este trabajo de graduación.

**IRENE NATALIA LEMUS GONZÁLEZ**

# ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS .....	I
ÍNDICE DE FIGURAS .....	II
RESUMEN .....	V
1. INTRODUCCIÓN .....	6
2. OBJETIVOS .....	7
2.1 OBJETIVO GENERAL .....	7
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	7
3. FUNDAMENTO TEÓRICO .....	8
3.1 BETALACTÁMICOS .....	8
3.2 PENICILINAS .....	9
3.2.1 ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA PENICILINA G POTÁSICA .....	10
3.2.2 MECANISMO DE ACCIÓN DE LA PENICILINA G PÓTASICA .....	10
3.3 TÉCNICA A UTILIZAR PARA LA VERIFICACIÓN DE LIMPIEZA: CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) .....	11
3.4 PRINCIPIOS DE HPLC .....	11
3.5 VENTAJAS DE HPLC .....	11
3.6 INSTRUMENTACIÓN .....	12
3.6.1 DISPOSITIVOS DE SUMINISTRO DE ELUYENTES (RESERVORIO) .....	13
3.6.2 DISPOSITIVO DE INYECCIÓN .....	13
3.6.3 HORNO Y COLUMNA .....	13
3.6.4 DETECTOR Y REGISTRADOR .....	14
3.7 APTITUD DEL SISTEMA .....	14
3.8 CALIBRACIÓN EN UN SOLO PUNTO .....	15
3.9 LIMPIEZA EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA .....	16
3.10 IMPORTANCIA DE LIMPIEZA EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA .....	17
3.11 CRITERIOS DE LÍMITES PARA UNA VERIFICACIÓN DE LIMPIEZA .....	18

3.12	PARÁMETROS DE VERIFICACIÓN PARA DETERMINAR RESIDUOS DE PENICILINA G POTÁSICA. ....	19
3.12.1	EXACTITUD .....	19
3.12.2	PRECISIÓN .....	19
3.12.2.1	PRECISIÓN DEL SISTEMA.....	20
3.12.3	PRECISIÓN DEL MÉTODO.....	20
3.12.4	ESPECIFICIDAD.....	20
3.12.5	LÍMITE DE DETECCIÓN.....	20
3.12.6	LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN .....	21
3.12.7	LINEALIDAD.....	21
4.	PARTE EXPERIMENTAL.....	22
4.1	MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPO DE LABORATORIO .....	22
4.2	TOMA DE MUESTRAS.....	22
4.3	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL .....	23
4.4	MÉTODO Y CONDICIONES DEL MÉTODO .....	23
4.5	PARÁMETROS DE VERIFICACIÓN .....	25
4.5.1	LINEALIDAD DEL SISTEMA.....	25
4.5.2	PRECISIÓN DEL SISTEMA.....	29
4.5.3	PRECISIÓN DEL MÉTODO.....	29
4.5.4	EXACTITUD (RECOBRO) / LINEALIDAD DEL MÉTODO .....	29
4.5.5	ESPECIFICIDAD.....	31
4.5.6	LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN.....	31
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	34
5.1	LINEALIDAD DEL SISTEMA .....	34
4.2	PRECISIÓN DEL SISTEMA.....	36
4.3	PRECISIÓN DEL MÉTODO .....	37
4.4	EXACTITUD.....	38
4.5	ESPECIFICIDAD .....	41
4.6	LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN .....	44
6.	CONCLUSIONES.....	48

7.	RECOMENDACIONES .....	50
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	51
9.	ANEXOS.....	55

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Grupos de Penicilinas .....	9
Tabla 2. Especificaciones de parámetros de verificación de trazas de Penicilina G Potásica .....	32
Tabla 3. Resultados obtenidos de la Linealidad del sistema. ....	34
Tabla 4. Estadísticas de la regresión del parámetro de la linealidad del sistema .....	36
Tabla 5. Resultados obtenidos de áreas y tiempos de retención de la precisión del sistema	37
Tabla 6. Resultados obtenidos de la precisión del método.....	38
Tabla 7. Resultados obtenidos de la exactitud del método.....	39
Tabla 8. Datos de la concentración con su respuesta obtenida en cada nivel de concentración.....	40
Tabla 9. Respuesta obtenida de la regresión.....	41
Tabla 10. Resultados de los tiempos de retención del placebo, estándar y muestras. ....	42
Tabla 11. Resultados obtenidos del Límite de detección y cuantificación.....	45
Tabla 12. Resumen de los resultados obtenidos de los parámetros de Validación. ....	46
Tabla 13. Datos obtenidos de la regresión de la linealidad del sistema. ....	61

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura molecular de un anillo betalactámico .....	8
Figura 2. Estructura molecular de Penicilina G Potásica. ....	10
Figura 3. Esquema de equipo de Cromatografía líquida de Alta resolución.....	12
Figura 4. Factor de Asimetría.....	15
Figura 5. Curva de regresión lineal para los datos obtenidos en la evaluación del parámetro linealidad del sistema.....	35
Figura 6. Gráfico obtenido de los resultados de Exactitud.....	41
Figura 7. Cromatograma del placebo .....	43
Figura 8. Cromatograma de estándar.....	43
Figura 9. Cromatograma de muestra de enjuague de Penicilina G Potásica .....	43
Figura 10. Cromatograma de muestra de Hisopado de Penicilina G Potásica .....	44
Figura 11. Cromatograma de Linealidad del sistema a las concentraciones de 50.0% a 120.0%.....	55
Figura 12. Cromatograma de Estándar de Penicilina G Potásica al 100.0% (0.0040 mg/mL) .....	62
Figura 13. Cromatograma de estándar 1 Penicilina G Potásica (Precisión del método) .....	65
Figura 14. Cromatogramas de Muestras 1 de Enjuague e Hisopado, para la precisión del método. ....	66
Figura 15. Cromatograma de estándar 2 Penicilina.....	68
G Potásica (Precisión del método).....	68
Figura 16. Cromatogramas de Muestras 2 de Enjuague e Hisopado, para la precisión del método. ....	70
Figura 17. Cromatograma de estándar 3 Penicilina G Potásica (Precisión del método) .....	73
Figura 18. Cromatogramas de Muestras 3 de Enjuague e Hisopado, para la precisión del método. ....	74

Figura 19. Cromatograma de estándar 4 Penicilina G Potásica (Precisión del método) .....	77
Figura 20. Cromatograma de Muestras 4 de Trazas de Penicilina G Potásica en Enjuague e Hisopado, para la precisión del método.....	78
Figura 21. Cromatograma de estándar 5 Penicilina G Potásica (Precisión del método) .....	81
Figura 22. Cromatograma de Muestras 5 de Trazas de Penicilina G Potásica en Enjuague e Hisopado, para la precisión del método.....	82
Figura 23. Cromatograma de estándar 6 Penicilina G Potásica (Precisión del método) .....	85
Figura 24. Cromatograma de Muestras 6 de Trazas de Penicilina G Potásica en Enjuague e Hisopado, para la precisión del método.....	86
Figura 25. Cromatograma de estándar 1 de Penicilina G Potásica, parámetro Exactitud ....	89
Figura 26. Cromatograma de Muestra 80.0% (0.0032 mg/mL) de Penicilina G Potásica, parámetro Exactitud.....	90
Figura 27. Cromatograma de estándar 2 de Penicilina G Potásica, parámetro de Exactitud	92
Figura 28. Cromatograma de Muestra 100.0% (0.0040 mg/mL) de Penicilina G Potásica, parámetro Exactitud.....	93
Figura 29. Cromatograma de estándar 3 de Penicilina G Potásica, parámetro de Exactitud	95
Figura 30. Cromatograma de Muestra 120.0% (0.0042 mg/mL) de Penicilina G Potásica, parámetro Exactitud.....	96
Figura 31. Cromatograma del diluyente (agua destilada) .....	98
Figura 32. Cromatograma de Estándar de Penicilina G Potásica Especificidad .....	99
Figura 33. Cromatogramas de Muestras 1 de Penicilina G Potásica, para el parámetro de Especificidad .....	100
Figura 34. Cromatogramas de Muestras 2 de Penicilina G Potásica, para el parámetro de Especificidad .....	103
Figura 35. Cromatogramas de Blanco 1 de Penicilina G Potásica, para el límite de cuantificación y detección .....	106
Figura 36. Cromatogramas de Blanco 2 de Penicilina G Potásica, para el límite de cuantificación y detección .....	107

Figura 37. Cromatogramas de Blanco 3 de Penicilina G Potásica, para el límite de cuantificación y detección .....	108
Figura 38. Cromatogramas de Blanco 4 de Penicilina G Potásica, para el límite de cuantificación y detección .....	109
Figura 39. Cromatogramas de Blanco 5 de Penicilina G Potásica, para el límite de cuantificación y detección .....	110

## RESUMEN

Los métodos validados para la limpieza en equipos y áreas en laboratorios farmacéuticos, son considerados como parte fundamental para el cumplimiento de normativas como las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y el Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA), entre otras; es por eso que en este trabajo de graduación se realizó en un Laboratorio Farmacéutico Nacional, específicamente en el área de producción de Betalactámicos, la validación de método para la limpieza de áreas y equipos del principio activo Penicilina G Potásica, en donde se analizaron por la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) los siguientes parámetros: Linealidad del sistema, linealidad del método, exactitud, especificidad, límite de detección y límite de cuantificación. Los resultados obtenidos se encontraron dentro de las especificaciones y tolerancias establecidas por dicho laboratorio, por lo que se concluyó que los resultados a obtener con el método validado son confiables.

## 1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la aplicación de principios como las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), el Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA) y la presencia de organismos como la Dirección Nacional de Medicamentos (DNM) en la industria farmacéutica están incrementando cada día más las exigencias para la calidad de los productos farmacéuticos. Hoy en día, se incrementa la existencia de métodos validados para la limpieza de equipos y áreas, esto con el fin de minimizar los riesgos de que exista una contaminación cruzada entre cada producto farmacéutico.<sup>1</sup>

La limpieza de equipos, accesorios y contenedores que están en contacto directo con los productos farmacéuticos durante su fabricación; así como de las áreas donde se fabrican, es un paso fundamental y obligatorio en todo proceso, esto con el fin de mantener la calidad de sus productos, ya que en muchos casos el mismo equipo puede ser usado para la elaboración de diferentes productos. Con la verificación de la limpieza, se está asegurando que el método de limpieza empleado reduzca el contenido de residuos de la superficie de los equipos, de las zonas en exposición comunes entre los diferentes productos y que son, por tanto, potenciales vectores de transmisión de los residuos de un producto a otro.

Todo esto se realiza para verificar la eficacia de los procedimientos de limpieza y asegurar que no existen riesgos asociados con la contaminación cruzada de los ingredientes activos, utilizando para su limpieza detergentes o desinfectantes cuando se elaboran en un mismo equipo.<sup>2</sup>

En esta investigación se realizará la determinación de trazas de betalactámicos específicamente del antibiótico Penicilina G Potásica, después de realizar la limpieza de áreas y equipos en un Laboratorio Farmacéutico, por medio de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar las trazas del antibiótico Penicilina G Potásica por medio de Cromatografía Líquida de Alta Resolución, como parte del proceso de limpieza de un laboratorio farmacéutico.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ✓ Establecer una metodología analítica para determinar las trazas de Penicilina G Potásica.
- ✓ Validar la metodología analítica para cuantificar las trazas del antibiótico Penicilina G Potásica utilizando Cromatografía Líquida de Alta Resolución, utilizando los parámetros: Linealidad, precisión del sistema, precisión del método, exactitud, especificidad, límite de detección y cuantificación.
- ✓ Aplicar la metodología analítica para verificar el proceso de limpieza de un laboratorio farmacéutico.

### 3. FUNDAMENTO TEÓRICO

#### 3.1 BETALACTÁMICOS

Los antibióticos betalactámicos, son un amplio grupo de antibióticos, siendo la característica compartida contener en su estructura molecular un anillo heterocíclico común de cuatro átomos, denominado anillo betalactámicos (figura 1), cuyo mecanismo de acción es la inhibición de la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana. Estos constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos y la más utilizada en la práctica clínica. Se trata de antibióticos de acción bactericida lenta, con actividad dependiente del tiempo, que en general tienen buena distribución y escasa toxicidad. Algunas modificaciones de la molécula original han dado lugar a compuestos con mayor espectro antimicrobiano, pero la progresiva aparición de resistencias limita su uso empírico y su eficacia en determinadas situaciones. Aun así, la penicilina continúa siendo el tratamiento de elección en un buen número de infecciones; las cefalosporinas tienen un gran abanico de indicaciones; los carbapenémicos se usan en infecciones nosocomiales y en infecciones causadas por bacterias multirresistentes, y los inhibidores de las betalactamasas permiten recuperar el espectro de actividad de las penicilinas a las que acompañan cuando la resistencia está causada por la producción de betalactamasas.<sup>3</sup>

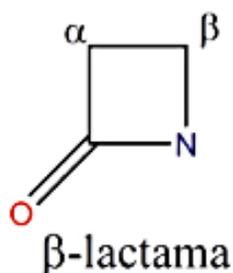


Figura 1. Estructura molecular de un anillo betalactámico

## 3.2 PENICILINAS

Son un grupo de antibióticos de origen natural y semisintético que contienen el núcleo de ácido 6-aminopenicilánico, que consiste en un anillo betalactámico unido a un anillo tiazolidínico (ver figura 2). Los compuestos de origen natural son producidos por diferentes especies del hongo *Penicillium* spp. Las penicilinas difieren unas de otras por sustituciones en la posición 6 del anillo, donde cambios en la cadena lateral pueden inducir modificaciones en la actividad antibacteriana y en las propiedades farmacocinéticas. De acuerdo con su origen y espectro de acción pueden clasificarse en 4 subgrupos (tabla 1).<sup>3-6</sup>

**Tabla 1. Grupos de Penicilinas<sup>5</sup>**

<b>GRUPO</b>	<b>SUB-GRUPO</b>	<b>ANTIBIÓTICO</b>
PENICILINAS	Naturales	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Penicilina cristalina</li> <li>- Penicilina procaínica</li> <li>- Penicilina benzatínica</li> <li>- Penicilina V</li> </ul>
	Resistente a penicilinasas	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Oxacilina</li> <li>- Meticilina</li> <li>- Nafcilina</li> <li>- Cloxacilina</li> <li>- Dicloxacilina</li> <li>- Flucoxacilina</li> </ul>
	Aminopenicilinas	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ampicilina</li> <li>- Ampicilina/Sulbactam</li> <li>- Amoxicilina</li> <li>- Amoxicilina/Clavulánico</li> <li>- Bacampicilina</li> </ul>
	Espectro extendido	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ticarcilina</li> <li>- Ticarcilina/Clavulánico</li> <li>- Carbenicilina</li> <li>- Piperacilina</li> <li>- Piperacilina/Tazobactam</li> <li>- Mezlocilina</li> </ul>

### 3.2.1 ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA PENICILINA G POTÁSICA

La penicilina en su estructura química (figura 2), tiene un anillo Tiazolidínico unido a un anillo betalactámico, una cadena lateral izquierda que es la que da las diferentes actividades antibacterianas y una cadena derecha que da las solubilidades de las penicilinas sódicas, potásicas, procaínicas y otras.<sup>7</sup>

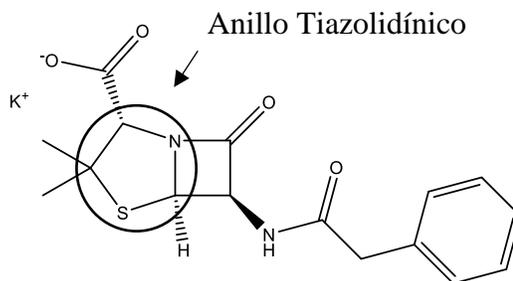


Figura 2. Estructura molecular de Penicilina G Potásica.

### 3.2.2 MECANISMO DE ACCIÓN DE LA PENICILINA G PÓTASICA

La Penicilina G Potásica es un antibiótico  $\beta$ -lactámico de acción principalmente bactericida. Inhibe la tercera y última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana mediante la unión a determinadas proteínas de la pared celular. Estas proteínas de unión son responsables de varios pasos diferentes en la síntesis de la pared celular y se encuentran en cantidades de varios cientos a varios miles de moléculas por célula bacteriana. La actividad intrínseca de la Penicilina G Potásica, así como las otras penicilinas contra un organismo particular depende de su capacidad para obtener acceso a la pared de la célula y poder formar estas proteínas.<sup>8</sup>

### **3.3 TÉCNICA A UTILIZAR PARA LA VERIFICACIÓN DE LIMPIEZA: CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).**

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una de las técnicas de cromatografía más utilizadas debido a su capacidad de separar analitos de distinta naturaleza presentes en una mezcla. Utiliza una presión elevada para forzar al disolvente a que pase por una columna que contiene partículas muy finas, consiguiendo así separaciones de gran resolución. El equipo HPLC, consta de un sistema de suministro de disolvente, una bomba, una válvula de inyección de muestra, una columna de alta presión, un detector, un horno para controlar la temperatura de la columna y un ordenador para controlar el equipo y visualizar los resultados.<sup>9</sup>

### **3.4 PRINCIPIOS DE HPLC**

La HPLC es uno de los tantos métodos de cromatografía para la separación y análisis de los componentes químicos de una mezcla. Básicamente, en este método participan la fase móvil y estacionaria (inmiscibles entre sí) y la muestra de interés. La fase móvil es líquida y su función es llevar la muestra a través de la fase estacionaria, que puede ser sólida o una película líquida soportada en un sólido inerte. Las distintas fuerzas químicas y físicas que actúan entre la mezcla a analizar y las dos fases determinan la retención y separación de cada uno de los componentes de la mezcla. Los componentes con mayor afinidad con la fase estacionaria se desplazarán con menor velocidad que aquellos que presentan menor afinidad. Estas diferencias de velocidades dan origen a la separación de los componentes.<sup>10</sup>

### **3.5 VENTAJAS DE HPLC**

A diferencia de otras técnicas, la HPLC cuenta con varias ventajas:

- Amplio rango de aplicabilidad debido a la alta disponibilidad de equipos, columnas y demás materiales, que la hacen capaz de analizar casi cualquier mezcla deseada.<sup>11</sup>

- Alta precisión en sus resultados ( $\pm 0.5\%$  o menor).<sup>11</sup>
- Variedad de técnicas, entre las cuales están la cromatografía por partición, adsorción, intercambio iónico y exclusión molecular.<sup>10</sup>
- Fácil manipulación de los gradientes generados en la fase móvil.<sup>10</sup>
- No es destructiva, es decir, los compuestos separados en la columna pueden ser recolectados, lo que permite el uso de la HPLC como una técnica de preparación o purificación de muestras.<sup>10</sup>
- Tiempo de separación menor a 30 min por muestra analizada.<sup>10</sup>
- Alto poder de separación con detección sensible.<sup>12</sup>
- La operación es flexible, personalizable y automatizada.<sup>12</sup>
- No está restringida por la volatilidad o estabilidad térmica de la muestra.<sup>12</sup>

### 3.6 INSTRUMENTACIÓN

Un equipo para HPLC consiste en un reservorio o dispositivos de suministro de eluyentes que contiene la primera fase, una bomba para impulsar el sistema de elución, un inyector para introducir la muestra dentro del sistema, un detector y registrador de la actividad química y física para detectar el paso de los componentes de una muestra en el orden en el que se eluyen.<sup>9</sup>

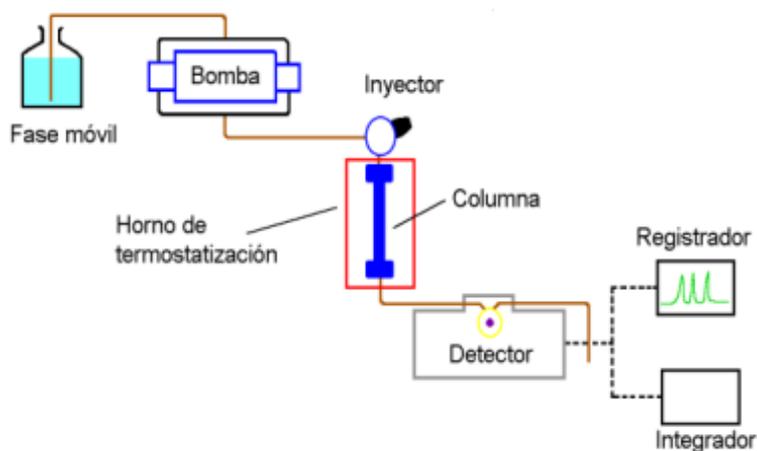


Figura 3. Esquema de equipo de Cromatografía líquida de Alta resolución.<sup>9</sup>

### **3.6.1 DISPOSITIVOS DE SUMINISTRO DE ELUYENTES (RESERVORIO)**

En el reservorio se encuentra la fase móvil. Consiste en una mezcla de sustancias polares y no polares que varían en concentración dependiendo de la muestra que se quiere analizar, la cual debe estar filtrada para evitar obstrucciones por posible material particulado. Los reservorios suelen estar hechos de vidrio; pueden requerirse uno o más, dependiendo de si se hace o no un gradiente de concentración.<sup>13</sup>

La bomba se encarga de succionar la fase móvil del reservorio para hacerla fluir por todo el sistema a una velocidad precisa y constante. Normalmente operan hasta 6000 psi, dependiendo de factores como el tiempo, tamaño de la columna, composición de la fase móvil y el flujo deseado.<sup>13</sup>

En esta investigación el tipo de bomba a utilizar es una bomba de gradiente cuaternario, el cual se compone de una cabina de disolventes opcional, un desgasificador de vacío y una bomba de gradiente de cuatro canales. Esta última comprende una válvula de partición de alta velocidad y un dispositivo de bombeo, proporcionando la generación de un gradiente mediante la mezcla a baja presión.<sup>9,13</sup>

### **3.6.2 DISPOSITIVO DE INYECCIÓN**

Los compuestos que se van a analizar se inyectan al cromatógrafo, de manera manual usando jeringas, inyector de espiral o utilizando inyectores automáticos. El sistema de inyección automático permite que la muestra sea introducida a la fase móvil presurizada de manera exacta y precisa<sup>13</sup>. Este último sistema de inyección es el que se utilizará en la investigación.

### **3.6.3 HORNO Y COLUMNA**

La columna permite la separación a partir de las interacciones del analito entre la fase móvil y la fase estacionaria.<sup>13</sup> En este caso, la columna a utilizar es la LiChrospher® RP-18, la cual

es un portador de gel de sílice esférico confiable y versátil producido tradicionalmente con propiedades de fase reversa C-18. La conexión al sistema de HPLC se realiza mediante el uso del porta cartuchos manu-CART® NT (1.51486).<sup>14</sup>

El horno se encarga de regular y mantener la temperatura dentro de la columna, ya que esta influye directamente en la retención y selectividad de la misma.<sup>11</sup>

### **3.6.4 DETECTOR Y REGISTRADOR**

El detector ubicado al final de la columna es el encargado de captar los cambios en los eluyentes de la columna y convertirlos en señales eléctricas, las cuales son recibidas por el registrador. El detector a utilizar forma parte de los detectores ultravioletas (UV), los cuáles son económicos, populares y son ampliamente utilizados en la industria. Este tipo de detector responde a sustancias que absorben radiación electromagnética. El detector de UV es principalmente utilizado en la industria farmacéutica ya que permite separar e identificar los principales componentes activos de una mezcla<sup>9</sup>. Su fundamento es la espectrofotometría de absorción de luz visible y ultravioleta de un componente a una determinada longitud de onda<sup>15</sup>. Finalmente, los sistemas informáticos, recolecta y procesa las señales recibidas del convertidor y los plasma en un cromatograma para su posterior lectura e interpretación.<sup>16</sup>

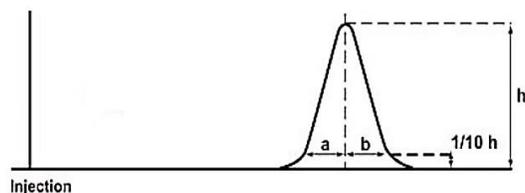
### **3.7 APTITUD DEL SISTEMA**<sup>17</sup>

Las pruebas de aptitud del sistema son una parte integral de los métodos de cromatografía de líquidos y de gases. Estas pruebas se usan para verificar que el sistema cromatográfico sea adecuado para el análisis que se pretende efectuar. Las pruebas se basan en el concepto de que el equipo, los sistemas electrónicos, las operaciones analíticas y las muestras analizadas constituyen un sistema integral que se puede evaluar como tal. Los factores que pueden afectar el comportamiento cromatográfico incluyen lo siguiente:

- Composición, fuerza iónica, temperatura y pH aparente de la fase móvil
- Velocidad de flujo, dimensiones de la columna, temperatura de la columna y presión

- Las características de la fase estacionaria, incluyendo el tipo de soporte cromatográfico (basado en partículas o monolítico), tamaño de partícula, tamaño de poro y área superficial específica.

Un pico cromatográfico ideal debería de tener una forma Gaussiana simétrica (figura 4), por lo tanto, otro parámetro a mencionar es el factor de asimetría ( $A_s$ ), que se define como la relación de los anchos  $a$  y  $b$  al 10% de la altura del pico.<sup>18</sup>



Donde:  
 $A_s$  = factor de asimetría de pico  
 $b$  = distancia desde el punto medio del pico el punto de salida o caída del mismo (medido al 10% de altura del pico)  
 $a$  = distancia desde el inicio del pico hacia el punto medio (medido al 10% de altura del pico)

Figura 4. Factor de Asimetría<sup>19</sup>

### 3.8 CALIBRACIÓN EN UN SOLO PUNTO<sup>20</sup>

El uso de una sola disolución estándar como concentración de referencia para calcular supone, la intercepción de la curva de calibración es cero y el cambio en la respuesta es constante y directamente proporcional al cambio en la concentración del analito. Los resultados analíticos se calculan a partir de la señal del analito medida o evaluada y su posición en la curva de calibración.

Utilizando un único estándar, se calcula un factor de calibración ( $CF$ )<sup>17</sup> de la siguiente manera:

$$CF = X_{std}/Y_{std}$$

Dónde:

$X_{std}$  = es la concentración estándar

$Y_{std}$  = es la respuesta analítica del estándar.

Las concentraciones se calculan de la siguiente manera:

$$\text{Concentración} = Y_r \times CF$$

Dónde:

$Y_r$  = Señal de la respuesta

CF = Factor de Calibración.

Debido a que es un método tomado por la Farmacopea de los Estados Unidos (USP, por sus siglas en inglés), se eligió la calibración metodológica de un solo punto.

### **3.9 LIMPIEZA EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA**

Se define la limpieza en la industria farmacéutica como el proceso de separación por medios físicos, mecánicos, o químicos de la suciedad depositada en los equipos utilizados en la fabricación de medicamentos.<sup>2</sup>

El proceso de limpieza reduce los residuos, lo cual no significa que los elimine totalmente. Así pues, lo que se busca es disminuir el contenido de residuos hasta un límite preestablecido y aceptable.<sup>21</sup>

Los productos farmacéuticos y sus ingredientes activos pueden ser contaminados por otros productos farmacéuticos e ingredientes activos, agentes de limpieza, microorganismos, u otros materiales como lubricantes, partículas de aire, materias primas, sustancias intermediarias y auxiliares. En muchos casos, el mismo equipo es utilizado, para la elaboración de diferentes productos subsecuentes; por lo tanto, es esencial, no solo un buen procedimiento de limpieza sino también una adecuada estrategia de validación de limpieza.

2,22

### **3.10 IMPORTANCIA DE LIMPIEZA EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA**

La limpieza es un proceso fundamental y obligatorio en cualquier industria farmacéutica para garantizar la seguridad y la calidad de los productos fabricados. Es por ello, que para realizar una verificación de limpieza en la industria farmacéutica se deben revisar de manera rigurosa diferentes parámetros.<sup>22,23</sup>

En muchas ocasiones una limpieza superficial se reduce a los residuos más visibles, pero no los elimina completamente. Lo que se pretende es definir cuál es el nivel de limpieza y desinfección aceptable y que no suponga ningún riesgo para el consumidor final. Para áreas y equipos que estén en contacto con betalactámicos, estos no deben de ser detectables al momento de ser analizado en la verificación.<sup>24</sup>

El concepto de verificación de limpieza ha recibido una creciente atención en los últimos años. Comenzó con la edición de la Guía de inspección de validación de limpieza de la FDA en julio de 1993.<sup>22</sup>

Prueba la efectividad de los procedimientos de limpieza de los equipos de fabricación, para prevenir la contaminación cruzada del siguiente producto.<sup>22</sup>

La limpieza de las áreas escogidas incluye los equipos, teniendo en cuenta que los procedimientos son específicos para el compuesto y para cada formulación farmacéutica. En todos los casos deben establecerse los límites del compuesto, así como los métodos de control.<sup>25,26</sup> El objetivo de la verificación de la limpieza es demostrar que el equipo se limpia de forma consistente de los residuos del producto fabricado, detergentes y/o microorganismos, hasta un nivel aceptable para evitar la contaminación del siguiente producto a fabricar.<sup>27</sup>

La verificación de limpieza constituye un elemento de suma importancia en la producción de medicamentos, siendo parte esencial de la garantía y calidad de manufactura del producto farmacéutico. Con la verificación se asegura que el residuo que permanece en la superficie de los equipos, luego de aplicar la limpieza establecida en los procedimientos normalizados de operación, se encuentre dentro de los niveles permisibles predeterminados<sup>27</sup>. Además

comprende la identificación y caracterización de los residuos (principio activo, excipientes, productos de degradación, preservantes, agentes de limpieza, microorganismos, entre otros), selección de los criterios para el cálculo del límite aceptable de residuo, selección y verificación del método de muestreo, selección y verificación del método analítico para la determinación de los residuos, selección y validación del procedimiento de limpieza, elaboración del informe final y de las instrucciones operacionales.<sup>27, 28, 29</sup>

Antes de iniciar un estudio factible de verificación de limpieza hay que seleccionar un analito y un límite aceptable de residuo para un ingrediente activo específico <sup>18</sup> en este caso será la materia prima, Penicilina G Potásica.

La guía de la FDA para la verificación de limpieza establece que el límite de residuo debe ser lógico basado en una comprensión del proceso, práctico en el sentido que debe ser el apropiado para la situación actual de limpieza a ser verificable por alguna técnica analítica de detección, alcanzable por el procedimiento de limpieza y lo más importante, que las industrias desarrollen un argumento científicamente racional y justificado para el límite permitido.<sup>27</sup>

### **3.11 CRITERIOS DE LÍMITES PARA UNA VERIFICACIÓN DE LIMPIEZA**

Los criterios más utilizados para establecer los límites de una verificación de limpieza son:

- **Limpieza visual** es decir que no debe quedar ni un residuo visible en el equipo después de la limpieza.
- **No más de 10 ppm** de un producto a otro (base de metales pesados en materias primas).
- **No más de 0.1%** de la dosis terapéutica del producto en la dosis máxima diaria del siguiente producto.

En esta investigación, el contenido de Penicilina G Potásica deberá estar por debajo del límite de detección, el cual no debe ser mayor a 10 ppm.<sup>18</sup>

## 3.12 PARÁMETROS DE VERIFICACIÓN PARA DETERMINAR RESIDUOS DE PENICILINA G POTÁSICA.

Las características de desempeño analíticas habituales que deben considerarse en la verificación son las siguientes:

### 3.12.1 EXACTITUD

Es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante ese procedimiento y el valor verdadero. La exactitud de un procedimiento analítico debe establecerse en todo su intervalo.<sup>17</sup>

La exactitud se calcula como el porcentaje de recuperación de la cantidad valorada con respecto a la cantidad conocida de analito añadida a la muestra, o como la diferencia entre la media de la valoración y el valor verdadero aceptado, considerando los intervalos de confianza.<sup>17, 30, 31</sup>

La Conferencia Internacional sobre Armonización (o ICH, por sus siglas en inglés) recomienda que se evalúe la exactitud utilizando un mínimo de nueve determinaciones sobre un mínimo de tres niveles de concentración, cubriendo el intervalo especificado, es decir, tres concentraciones y tres determinaciones repetidas de cada concentración.<sup>18, 30</sup>

### 3.12.2 PRECISIÓN

La precisión de un procedimiento analítico es el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el procedimiento repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea. La precisión habitualmente se expresa como la desviación estándar o la desviación estándar relativa, coeficiente de variación, de una serie de mediciones. Además, puede ser una medida del grado de reproducibilidad o de repetibilidad del procedimiento analítico en condiciones normales de operación.<sup>17, 32</sup>

- **Reproducibilidad.** Se refiere al uso del procedimiento analítico en diferentes laboratorios.
- **Repetibilidad.** Se refiere a la utilización del mismo procedimiento analítico en un laboratorio durante un periodo corto por el mismo analista y con el mismo equipo.

### **3.12.2.1 PRECISIÓN DEL SISTEMA**

La evaluación de la precisión del sistema permite verificar que el sistema de medición funciona apropiadamente, independientemente de las condiciones ambientales. Es conveniente que antes de llevar a cabo una validación o verificación de un método analítico, se establezcan los sistemas apropiados para la operación del sistema de medición. La solución de la precisión del sistema se establece en el desarrollo del método usando un mínimo de seis determinaciones al 100% de la concentración de prueba.<sup>33</sup>

### **3.12.3 PRECISIÓN DEL MÉTODO**<sup>30</sup>

Se determina mediante el análisis de un número suficiente de alícuotas de una muestra homogénea que permita calcular estadísticamente, estimaciones validas de la desviación estándar o de la desviación estándar relativa (coeficiente de variación).

La Conferencia Internacional sobre Armonización (o ICH, por sus siglas en inglés), recomienda que se evalúe la repetibilidad utilizando un mínimo de nueve determinaciones que cubran el intervalo especificado para el procedimiento, (es decir, tres concentraciones y tres determinaciones repetidas de cada concentración).

### **3.12.4 ESPECIFICIDAD**<sup>30</sup>

Es la capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de aquellos componentes cuya presencia resulta previsible, tales como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz.

### **3.12.5 LÍMITE DE DETECCIÓN**<sup>30, 34</sup>

Es la cantidad mínima del analito que puede detectarse en una muestra, aunque no necesariamente cuantificarse, en las condiciones experimentales indicadas. Las pruebas de

límite simplemente comprueban que la cantidad de analito se encuentra por encima o por debajo de un nivel determinado.

Es un parámetro que tiene gran importancia en determinadas situaciones; por ejemplo, cuando un análisis trata de poner de manifiesto la presencia de un analito que está presente en la muestra en una concentración muy baja, como puede ser el caso de la determinación de impurezas en productos acabados, entre otros. Existen varias estrategias para abordar el cálculo del límite de detección; en el ámbito del análisis químico es muy habitual el denominado criterio  $3 \cdot s_{y/x}$ . (3 veces la desviación estándar)

### **3.12.6 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN**<sup>30</sup>

Es una característica de las determinaciones cuantitativas de compuestos que se encuentran en baja concentración de la matriz de una muestra, tales como: impurezas en fármacos a granel y productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Es la mínima cantidad de analito en una muestra que se puede determinar con precisión y exactitud aceptables en las condiciones experimentales indicadas.

### **3.12.7 LINEALIDAD**

Es la capacidad de obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente, o por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración de analito en muestras dentro de un intervalo dado.<sup>30</sup>

La Conferencia Internacional sobre Armonización (o ICH, por sus siglas en inglés), recomienda que, para establecer la linealidad, se utilicen normalmente un mínimo de cinco concentraciones.<sup>33</sup>

## **4. PARTE EXPERIMENTAL**

### **4.1 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPO DE LABORATORIO**

#### **➤ Materiales y Equipo**

- Balones volumétricos de 100.0 mL
- Pipeta volumétrica de 2.0 mL, 3.0 mL y 4.0 mL
- Pipeta volumétrica de Mohr 10 mL
- Agitadores de vidrios
- Beaker de 50 mL, 100 mL y 1000 mL
- Pipeteador mecánico.
- Baño de ultrasonido
- HPLC LC-2010 Shimadzu
- Balanza analítica, Mettler Toledo

#### **➤ Reactivos**

- Fosfato de potasio monobásico de potasio, Merck
- Metanol HPLC Merck
- Agua destilada y agua Milli Q.

### **4.2 TOMA DE MUESTRAS**

Las 6 muestras del hisopado y 6 muestras de enjuagues en limpieza de áreas y equipos de la planta de betalactámicos fueron proporcionadas por el técnico inspector encargado de la limpieza.

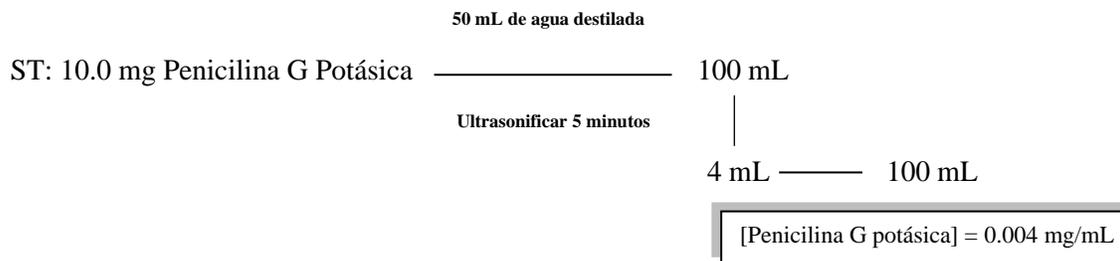
Las muestras fueron analizadas en el Laboratorio de Control de Calidad de un Laboratorio Farmacéutico.

### 4.3 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

En el análisis experimental del analito en estudio Penicilina G Potásica, se utilizó el procedimiento que tiene su fundamento en la Farmacopea de los Estados Unidos (USP, por sus siglas en inglés) 2022.

### 4.4 MÉTODO Y CONDICIONES DEL MÉTODO

- **Técnica:** HPLC
- **Reactivos**  
**Solución A:** Fosfato Monobásico de potasio 0.01M  
**Fase móvil:** Metanol y Solución A (40:60)
- **Sistema cromatográfico**  
**Columna:** 4,6mm x 10 cm, relleno L1 de 5 $\mu$ m  
**Longitud de Onda:** 220 nm  
**Velocidad de Flujo:** 1.0 mL/min  
**Volumen de Inyección:** 20  $\mu$ L
- **Preparación de las Soluciones Estándares:**
  1. Pesar aproximadamente 10.0 mg de estándar de Penicilina G Potásica (ajustado al 100% de su pureza) y transferir a un balón volumétrico de 100.0 mL.
  2. Agregar 50 mL de agua destilada y ultrasonificar por 5 minutos.
  3. Aforar siempre con agua destilada y homogenizar.
  4. Tomar una alícuota de 4 mL y transferir a un balón volumétrico de 100.0 mL y aforar con agua destilada y homogenizar.
  5. Pasar a través de filtro jeringa nylon poro 0.45  $\mu$ m.



- **Preparación de Muestra:**

1. De las muestras recolectadas del último lavado realizado en áreas y equipos, colocar la muestra directamente en un vial, pasar a través de filtro jeringa nylon poro 0.45  $\mu\text{m}$  descartando los primeros 5 mL del filtrado y colocarlos directamente en el vial previamente ambientado y debidamente identificados.
2. De las muestras recolectadas con hisopado realizado en áreas y equipos, colocar el hisopo con muestra directamente en un balón volumétrico de 10mL y agregar 5 mL de fase móvil, agitar manualmente, retirar el hisopo y aforar con fase móvil y homogenizar, colocar la muestra directamente en un vial, pasar a través de filtro jeringa nylon poro 0.45  $\mu\text{m}$  descartando los primeros 5 mL del filtrado y colocarlos directamente en el vial previamente ambientado y debidamente identificados.
3. Preparar por triplicado.

- **Procedimiento:**

1. Ambientar la columna con solvente Metanol HPLC en proporción que contiene la fase móvil aproximadamente por 1 hora. (60 Metanol HPLC: 40 agua destilada).
2. Ambientar la columna con fase móvil aproximadamente 1 hora. Cuando el sistema se haya equilibrado, hacer una inyección de la solución blanco (diluyente).
3. Inyectar por quintuplicado la primera disolución estándar y verificar los siguientes requisitos de la aptitud del sistema:
  - a) Factor de asimetría: No más de 2.0
  - b) El RSD: No más de 2.0%
4. Inyectar cada una de las dos disoluciones estándar (1 y 2), preparadas anteriormente según la preparación de la solución estándar y calcular el factor de correlación (FC).

5. El factor de correlación debe estar entre 98.0% y 102.0 %. En caso de no estar en este rango, preparar dos nuevas disoluciones estándar y repetir el numeral 4.

$$FC = 100 \times (A_2 \times W_1) / (A_1 \times W_2)$$

Donde:

$A_2$  = Área del cromatograma de estándar 2

$W_1$  = Peso del estándar 1.

$A_1$  = Área del cromatograma de estándar 1

$W_2$  = Peso del estándar 1.

6. Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (20  $\mu$ L) de disolución muestra y estándar. Registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales.
- **Criterios de Aceptación:** No más de 10 ppm.

## 4.5 PARÁMETROS DE VERIFICACIÓN

### 4.5.1 LINEALIDAD DEL SISTEMA

- Preparar una disolución madre de Penicilina G Potásica de acuerdo al procedimiento establecido en la técnica de análisis, cuya concentración permita obtener, por dilución, 5 niveles de concentración de la disolución del estándar. La concentración central debe ser igual a la que se prepara la disolución estándar al 100%.

Se realizaron los niveles de calibración como se indican a continuación:

Determinación de impureza: 50% (0.0020 mg/mL), 75% (0.0030 mg/mL), 100% (0.0040mg/mL), 110% (0.0044 mg/mL) y 120% (0.0048 mg/mL) de la concentración del estándar.

Posteriormente se debe calcular la estadística de la regresión y obtener la curva de calibración correspondiente para cada uno de los analitos.

- Fórmula para cálculo de la regresión lineal:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^{i=n} \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sqrt{\sum_{i=1}^{i=n} \{(x_i - \bar{x})^2 (y_i - \bar{y})^2\}}}$$

Dónde:

r: Coeficiente de correlación.

$\bar{x}$ : Promedio de la concentración de la disolución estándar.

$\bar{y}$ : Promedio de la respuesta de la disolución estándar.

n: número de determinaciones o mediciones.

- Fórmula para cálculo de la pendiente<sup>35</sup>:

$$b = \frac{\sum [(x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})]}{\sum (x_i - \bar{x})^2}$$

Dónde:

b: pendiente

$x_i$ : valor de x de cada dato puntual

$\bar{x}$ : promedio de los datos puntual x.

$y_i$ : valor de y de cada dato puntual

$\bar{y}$ : promedio de los datos puntual y.

- Fórmula para el cálculo de la ordenada en el origen<sup>35</sup>:

$$a = \frac{\sum y - b \sum x}{n}$$

Dónde:

a: ordenada en el origen

b: pendiente

n: número de determinaciones o mediciones

x: valor de x de cada dato puntual

y: valor de y de cada dato puntual

Para los términos que definen la curva de calibración, la normativa exige estimar los valores para los intervalos de confianza de la pendiente y la ordenada en el origen, por eso a continuación se describen las expresiones que se requieren para la realización de esos cálculos.

- Fórmula para el cálculo del error de estimación o desviación estándar<sup>35</sup>:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum(y_i - \hat{y})^2}{n - 2}}$$

Dónde:

$y_i$ : valor de y de cada dato puntual

$\hat{y}$ : valor calculado de la variable dependiente, a partir de la ecuación de regresión

n: número de datos puntuales

- Fórmula para el cálculo de la desviación estándar de la pendiente<sup>34</sup>:

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2}}$$

Dónde:

$S_{y/x}$ : error de estimación

$x_i$ : valor de x de cada dato puntual

$\bar{x}$ : promedio de los datos puntual

- Fórmula para el cálculo de la desviación estándar de la ordenada en el origen<sup>35</sup>:

$$S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum(x_i - \bar{x})^2}}$$

Dónde:

$S_{y/x}$ : error de estimación

$x_i$ : valor de x de cada dato puntual

$\bar{x}$ : promedio de los datos puntual

$n$ : número de datos puntuales

- Fórmula para el cálculo del intervalo de confianza de la pendiente<sup>34</sup>:

$$Pendiente = b \pm t_{(n-2)} \cdot S_b$$

Dónde:

$b$ : pendiente

$t$ : t student al 95%

$n$ : número de datos puntuales

$S_b$ : desviación estándar de la pendiente

- Fórmula para el cálculo del intervalo de confianza de la ordenada en el origen<sup>34</sup>:

$$Ord. \text{origen} = a \pm t_{(n-2)} \cdot S_a$$

Donde:

$a$ : ordenada en el origen

$t$ : t student al 95%

$n$ : número de datos puntuales

$S_a$ : desviación estándar de la ordenada en el origen.

#### 4.5.2 PRECISIÓN DEL SISTEMA

- Calcular el Coeficiente de Variación de los factores de respuesta (FR), obtenidos para cada nivel de la prueba de linealidad.
- Preparar de acuerdo a la técnica de análisis una disolución del estándar al 100% (0.004mg/mL) de la concentración teórica y hacer 6 inyecciones consecutivas.
- Calcular el Coeficiente de Variación de los tiempos de retención y de las áreas del pico principal obtenidas.

#### 4.5.3 PRECISIÓN DEL MÉTODO

- Preparar de acuerdo con la técnica de análisis, 6 disoluciones del estándar al 100% (0.00400 mg/mL) de la concentración teórica.
- Preparar 6 disoluciones de prueba como lo indica la técnica para la muestra en el ensayo.
- Realizar una determinación de cada disolución alternando estándar y muestra, comenzando con un estándar, hasta terminar la serie.

Fórmula para cálculo:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{i=n} (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \qquad \%RSD = \frac{s}{\bar{x}} * 100$$

Dónde:

$s$ : desviación estándar

$n$ : número de determinaciones o mediciones

$x_i$ : Concentración de estándar o muestra en mg/mL

$RSD$ : Desviación estándar relativa o Coeficiente de variación.

#### 4.5.4 EXACTITUD (RECOBRO) / LINEALIDAD DEL MÉTODO

- Preparar de acuerdo a la técnica de análisis, 3 disoluciones estándar al 100% de la concentración teórica.

- Preparar de acuerdo a la técnica de análisis por triplicado las siguientes disoluciones de prueba, tomando en cuenta la concentración teórica del estándar:
  - Agua (calidad usada en enjuague de áreas y equipos) + Principio Activo al 80% (0.0032 mg/mL)
  - Agua (calidad usada en enjuague de áreas y equipos) + Principio Activo al 100% (0.0040 mg/mL)
  - Agua (calidad usada en enjuague de áreas y equipos) + Principio Activo al 120% (0.0048 mg/mL)
- Realizar una determinación de cada disolución, de acuerdo a la siguiente secuencia:
  - Estándar 1
  - Muestra 80% (0.0032 mg/mL)
  - Muestra 100% (0.0040 mg/mL)
  - Muestra 120% (0.0048 mg/mL)

Hasta terminar las 3 series

Se realizan las determinaciones como lo indica la técnica de análisis para cada serie de muestras con referencia a su estándar respectivo, y se compara el valor real obtenido con el valor teórico esperado. Calcular el r y RSD correspondiente.

Para calcular el porcentaje de recobro de Penicilina G potásica, es tomada de la siguiente manera: <sup>19</sup>

$$\% \text{ Recobro} = (r_u/r_s) \times (C_s/C_u) \times 100$$

Dónde:

$r_u$ : respuesta del pico de Penicilina G Potásica de la solución muestra

$r_s$ : respuesta del pico de Penicilina G de la solución estándar

$C_s$ : Concentración de Penicilina G Potásica USP en la solución estándar (mg/mL)

$C_u$ : Concentración de Penicilina G Potásica USP en la solución muestra (mg/mL)

#### 4.5.5 ESPECIFICIDAD

- Preparar 2 disoluciones del estándar al 100% de la concentración (0.0040 mg/mL) teórica establecida en el método de ensayo de trazas de Penicilina G Potásica en Enjuagues de Limpieza de Áreas y Equipo.
- Preparar 2 disoluciones muestra y proseguir como lo indica el método de ensayo de Trazas de Penicilina G Potásica en Enjuagues de Limpieza en áreas y equipo.
- Preparar 2 disoluciones iguales de Agua (calidad usada en enjuague de áreas y equipo)
- Evaluar la interferencia debida al placebo (agua) y obtener los respectivos cromatogramas con los componentes individuales apropiadamente identificados, a una longitud de onda de 220 nm establecida en el método de ensayo de trazas de Penicilina G Potásica en Enjuagues de Limpieza de áreas y Equipo.

#### 4.5.6 LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

- Se utilizaron los cálculos obtenidos en el parámetro de la linealidad del sistema. (ordenada en el origen y la desviación estándar de la medida variable).
- La fórmula de error de estimación  $S_{y/x}$  fue definida en el apartado 3.5.1 de la linealidad del sistema.
- Se evalúa el nivel mínimo de analito que pueda detectarse y cuantificarse confiablemente.

El límite de detección es la concentración de analito que genera una señal analítica ( $Y_{LD}$ ), igual a la ordenada en el origen ( $\alpha$ ) más tres veces la desviación estándar de la medida variable ( $3 \cdot s_{y/x}$ )

$$Y_{LD} = \alpha + 3 \cdot s_{y/x}$$

Una forma sencilla de determinar el límite de cuantificación es, de manera análoga al límite anterior, considerarlo la concentración de analito que genera una señal analítica ( $Y_{LC}$ ) igual a la ordenada del origen ( $\alpha$ ) más diez veces la desviación estándar de la medida variable ( $10 \cdot s_{y/x}$ )

$$Y_{LC} = \alpha + 10 \cdot s_{y/x}$$

**Tabla 2. Especificaciones de parámetros de verificación de trazas de Penicilina G Potásica**

PARÁMETRO	DETERMINACIÓN		ESPECIFICACIÓN
1. Linealidad del sistema	Concentraciones del estándar	Número de determinaciones	<b>Análisis de la regresión que demuestre:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Coeficiente de Determinación (<math>r^2</math>): <b><math>0.98 \leq r^2 &lt; 1.00</math></b></li> <li>➤ Coeficiente de correlación (<math>r</math>): <b><math>0.98 \leq r &lt; 1.00</math></b></li> <li>➤ Intervalo de Confianza para la pendiente IC(<math>\beta_1</math>): <b>No debe incluir cero</b></li> <li>➤ Intervalo de Confianza para la ordenada al origen (intercepto) IC(<math>\beta_0</math>): <b>Debe incluir cero</b></li> <li>➤ Coeficiente de variación (CV o RSD): <b><math>\leq 20.0\%</math> (Método trazas e impurezas)</b></li> </ul>
	Valoración del fármaco		
	50%	3	
	75%	3	
	100%	3	
	110%	3	
	120%	3	
2. Precisión del sistema	Se calcula el factor de respuesta para cada punto de la prueba de linealidad del sistema se determina por la múltiple inyección de una solución del estándar al 100%.		coeficiente de variación en cuanto a: <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Factor de respuesta: <b><math>\leq 2.0\%</math></b></li> <li>➤ Respuesta: <b><math>\leq 2.0\%</math></b></li> <li>➤ Tiempo de retención: <b><math>\leq 1.0\%</math></b></li> </ul>
3. Precisión del método (repetibilidad)	6 determinaciones: cada una consiste de un estándar y una muestra preparada al 100% de la concentración teórica.		<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Coeficiente de variación de las concentraciones de:</li> </ul>

		<b>≤ 25.0%</b>
5. Exactitud (recobro) // Linealidad del método	Cantidades del analito, se añaden a la matriz (al 100 % de su peso establecido en el método), para obtener niveles del 80%, 100% y 120% de la concentración teórica de la sustancia. Número de determinaciones: 9 (3 por cada nivel de concentración) 3 estándares al 100%.	Análisis de la regresión que demuestre: ➤ Coeficiente de Determinación ( $r^2$ ): <b><math>0.98 \leq r^2 &lt; 1.00</math></b> ➤ Coeficiente de correlación ( $r$ ): <b><math>0.98 \leq r &lt; 1.00</math></b> ➤ Coeficiente de variación (CV o RSD): <b><math>\leq 20.0\%</math></b> ➤ Porcentaje de recobro: <b>70.0% - 130.0%</b>
6. Especificidad	El método se prueba con la matriz, muestra y principio activo.	<b>No debe haber interferencia significativa.</b>
7. Límite de detección y cuantificación	Preparar 5 soluciones de solución estándar según el intervalo: 50%, 75%, 100%, 110% y 120% y 5 soluciones blanco.	<b>Se evalúa el nivel mínimo de analito que pueda Detectarse y Cuantificarse.</b>

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se presentan los resultados obtenidos de los parámetros de validación llevados a cabo en el presente trabajo. Mencionar que el método analítico aplicado, para la determinación de trazas de Penicilina G Potásica en muestra de hisopado y enjuague de área y equipo, se encuentra descrito en la Farmacopea de los Estados Unidos 42 (USP), y se validó de acuerdo al procedimiento interno de validación dado por el Laboratorio Farmacéutico Nacional.

### 5.1 LINEALIDAD DEL SISTEMA

En este estudio se realizó con el objetivo de encontrar el grado de linealidad que existe a lo largo de diferentes rangos de concentración, para comprobar la linealidad se realizó una curva de calibración en un intervalo de 50%-120% para el principio activo Penicilina G Potásica, los datos se muestran en la tabla 3.

**Tabla 3. Resultados obtenidos de la Linealidad del sistema.**

Nivel	Concentración del estándar (%)	Concentración real (mg/mL)	Tiempo de retención	Respuesta (Área)	% RSD (Respuesta)
1	50%	0.00200	3.8334	48377	0.09 %
			3.8124	48312	
			3.7818	48298	
2	75%	0.00300	3.7379	65359	0.5 %
			3.7820	65086	
			3.7134	65735	
3	100%	0.00400	3.8110	79758	0.2 %
			3.8101	79480	
			3.8115	79848	
4	110%	0.00440	3.8925	86432	0.01 %
			3.8793	86425	
			3.8754	86411	
5	120%	0.00480	3.8689	92432	0.2 %
			3.8707	92711	
			3.8906	92359	

Se observa que en los coeficientes de variación (RSD) en cada nivel de concentración son menores al 1.0%, esto nos indica que existe repetibilidad en la prueba, es decir, el equipo se encuentra funcionando correctamente y las muestras fueron bien preparadas.

Con las respuestas obtenidas de las áreas como de las concentraciones finales, se realizó una regresión lineal con ayuda de la herramienta de hoja de cálculo.

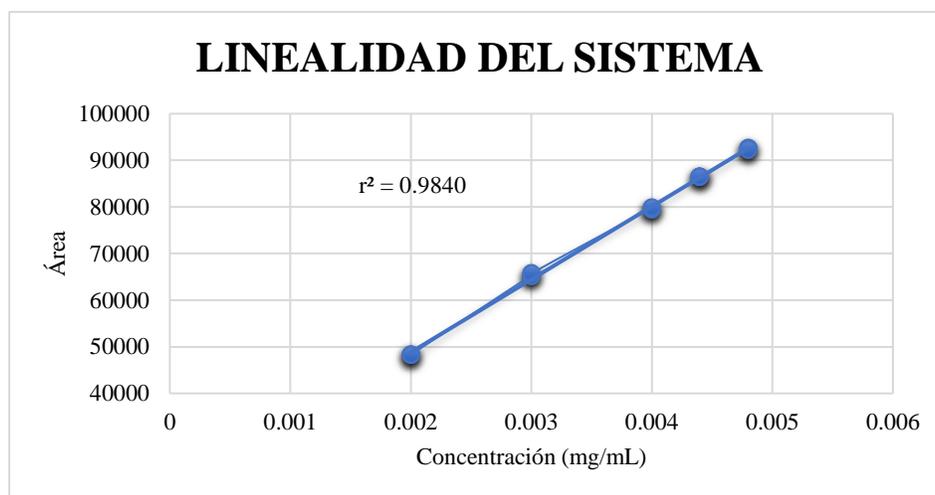


Figura 5. Curva de regresión lineal para los datos obtenidos en la evaluación del parámetro linealidad del sistema.

El valor de coeficiente de determinación ( $r^2$ ) obtenido para la Penicilina G Potásica fue de 0.9840, por lo tanto, se encuentra dentro de la especificación.

Como el valor de  $r^2$  obtenido experimentalmente es cercano a la unidad se puede decir que existe linealidad, por lo tanto, existe una fuerte correlación entre las áreas obtenidas como función de la concentración inyectada.

Dentro del parámetro de la linealidad también se calcularon los intervalos de confianza a un 95%, tanto de la pendiente como de la ordenada en el origen utilizando la t student; para la pendiente, su especificación no debe de incluir el cero, en cambio para la ordenada del origen debe de incluir el cero. Al observar en la tabla 4, ambos intervalos cumplen sus parámetros, por lo tanto, la linealidad del sistema es aceptable. A continuación, se detalla los cálculos:

$$Pendiente = b \pm t_{(n-2)} \cdot S_b$$

$$b = 15636845$$

$$S_b = 289204$$

$$Pendiente = 15636845 \pm 3.1824 \cdot 289204$$

$$Pendiente = 14716 \text{ (límite inferior)}$$

$$Pendiente = 16557 \text{ (límite superior)}$$

$$Ord. \text{ origen} = \alpha \pm t_{(n-2)} \cdot S_\alpha$$

$$\alpha = 17550$$

$$S_\alpha = 1092$$

$$Ord. \text{ origen} = 17750 \pm 3,1824 \cdot 1092$$

$$Ord. \text{ origen} = -38302 \text{ (límite inferior)}$$

$$Ord. \text{ origen} = 73402 \text{ (límite superior)}$$

**Tabla 4. Estadísticas de la regresión del parámetro de la linealidad del sistema**

<b>Ecuación de la curva de calibración</b>	$y = 15636845x + 17550$	
<b>Coefficiente de correlación múltiple (r)</b>	0.9920	
<b>Coefficiente de determinación <math>r^2</math></b>	0.9840	
<b>Intervalo de confianza</b>	<b>Inferior 95%</b>	<b>Superior 95%</b>
<b>Intercepto</b>	-38302	73402
<b>Pendiente</b>	14716	16557

## 4.2 PRECISIÓN DEL SISTEMA

Se llevó a cabo realizando 6 inyecciones consecutivas de estándar de Penicilina G Potásica al 100% de su pureza, para posteriormente calcular el promedio y la desviación estándar correspondiente, por medio del cual se evalúa la precisión del sistema. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5.

**Tabla 5. Resultados obtenidos de áreas y tiempos de retención de la precisión del sistema**

N°	Respuesta del estándar (Área)	Tiempo de retención (minutos)
1	83967	3.898
2	85075	3.883
3	85958	3.902
4	85080	3.923
5	85041	3.888
6	84872	3.897
Promedio	84998	3.899
% RSD	0.972 %	0.297 %

Se puede observar que la desviación estándar o coeficiente de variación (CV) del área de Penicilina G Potásica es de 0.972 %, por lo que cumple con la especificación que sea menor o igual de 2.0 %. Para el tiempo de retención el porcentaje de desviación estándar es de 0.297%, por lo que también cumple con la especificación que sea menor a 1.0%.

Como se cumple ambas especificaciones, nos indica que el equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución se encuentra trabajando correctamente.

### **4.3 PRECISIÓN DEL MÉTODO**

En este parámetro se evalúa la capacidad de repetibilidad que tiene el método al ser aplicado tanto a las muestras como estándares, al momento de la inyección en el equipo se alternaron seis estándares y seis muestras. En la tabla 6 se presentan los datos obtenidos.

**Tabla 6. Resultados obtenidos de la precisión del método**

Nº	Respuesta del área de estándar	Respuesta del área de la muestra (Enjuague)	Respuesta del área de la muestra (Hisopado)	Concentración del estándar (mg/mL)	Concentración de la muestra
1	63821	No detectable	No detectable	0.004	No detectable
2	64345	No detectable	No detectable	0.004	No detectable
3	64423	No detectable	No detectable	0.004	No detectable
4	65277	No detectable	No detectable	0.004	No detectable
5	60482	No detectable	No detectable	0.004	No detectable
6	60696	No detectable	No detectable	0.004	No detectable
<b>Promedio</b>	<b>63174</b>	<b>No detectable</b>	<b>No detectable</b>	<b>0.004</b>	<b>No detectable</b>
<b>% RSD</b>	<b>3.25%</b>	<b>N/A</b>	<b>N/A</b>	<b>0.0</b>	<b>N/A</b>

Se observa que la desviación estándar (%RSD) o coeficiente de variación (CV) de las áreas del estándar, se obtuvo un valor de 3.25%, por lo que cumple con la especificación la cual es  $\leq 25.0\%$ , mientras que para las muestras tanto de enjuagues e hisopados no aplica la desviación estándar, porque el equipo no detecto una señal al momento de ser analizadas. Con los resultados obtenidos podemos confirmar que el método de Penicilina G Potásica presenta precisión.

#### **4.4 EXACTITUD**

Para el estudio de este parámetro se realizaron tres lecturas de estándares (tres niveles de concentración) de Penicilina G Potásica, realizándose tres replicas para cada una de ellas,

luego se determinó el porcentaje de recuperación para evaluar la exactitud del método. En la tabla 7, se muestran los datos obtenidos.

**Tabla 7. Resultados obtenidos de la exactitud del método.**

<b>Respuesta</b>	<b>Respuesta 1</b>	<b>Respuesta 2</b>	<b>Respuesta 3</b>	<b>% RSD</b>	<b>% Recuperado</b>
Estándar 100.0% (0.0040 mg/mL)	75798	75705	76372	0.47%	
Muestras 80.0% (0.0032 mg/mL)	60549	60350	60375	0.179%	99.64 %
Muestras 100.0% (0.0040 mg/mL)	72194	72431	72352	0.190%	95.57 %
Muestras 120.0% (0.0048 mg/mL)	89897	89460	89269	0.359%	97.70 %

Como se puede observar los resultados obtenidos del porcentaje de recuperación en los tres niveles de concentración, está dentro del rango que es de 70.0%-130.0%, de la cantidad añadida, mientras que la desviación estándar o coeficiente de variación también cumple con la especificación que es menor o igual a 20.0%. Por lo tanto, podemos confirmar que el método presenta exactitud para la determinación de Penicilina G Potásica.

Para la obtención de los resultados se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Recobro} = (r_u/r_s) \times (C_s/C_u) \times 100$$

$$\text{Resultado} = (60549/75798) \times (0.004/0.0032) \times 100\% = 99.85\%$$

$$\text{Resultado} = (60350/75798) \times (0.004/0.0032) \times 100\% = 99.52\%$$

$$\text{Resultado} = (60375/75798) \times (0.004/0.0032) \times 100\% = \underline{99.56\%}$$

**99.64%**

También se realizó una regresión lineal utilizando los datos obtenidos de la tabla 7, específicamente de la concentración y la respuesta del área, en el cual se evaluaron la correlación de los datos obtenidos.

En la siguiente tabla 8, se presentan los datos utilizados en la regresión.

**Tabla 8. Datos de la concentración con su respuesta obtenida en cada nivel de concentración.**

<b>Concentración (Porcentaje)</b>	<b>Concentración (mg/mL)</b>	<b>Área</b>
80.0%	0.0032	60549
80.0%		60350
80.0%		60375
100.0%	0.0040	72194
100.0%		72431
100.0%		72352
120.0%	0.0048	89897
120.0%		89460
120.0%		89269

A continuación, se muestra en la figura 6, el gráfico elaborado con las concentraciones teóricas vs el área, en la cual se puede evidenciar el comportamiento de la curva, así como en la tabla 9 se muestra la respuesta de la regresión.

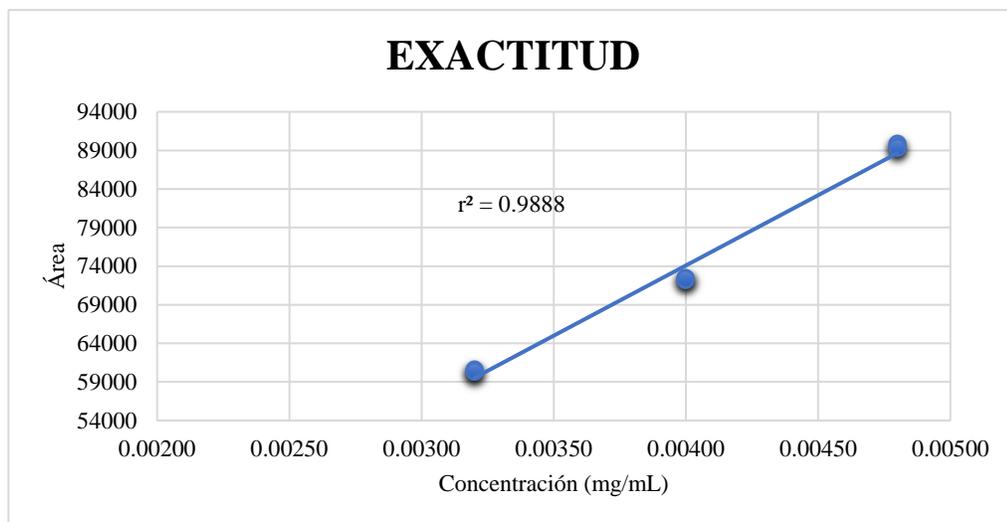


Figura 6. Gráfico obtenido de los resultados de Exactitud

**Tabla 9. Respuesta obtenida de la regresión**

Estadística de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple (r)	<b>0.9943</b>
Coefficiente de determinación (r <sup>2</sup> )	<b>0.9888</b>

Como se observa en el gráfico, las señales obtenidas para las diferentes concentraciones de la Penicilina G Potásica representan una línea recta con un coeficiente de determinación (r<sup>2</sup>) de 0.9888 y un coeficiente de correlación (r) de 0.9944. Se puede afirmar que el método presenta ajuste lineal con relación de la señal del instrumento con respecto a la concentración del analito.

#### 4.5 ESPECIFICIDAD

Para el estudio de la especificidad, se analizaron los cromatogramas del placebo (agua destilada), cromatograma del estándar de la Penicilina G Potásica y cromatograma de las muestras (hisopado y enjuagues). Se realizaron dos inyecciones del placebo, dos inyecciones

del estándar y dos inyecciones de la muestra a analizar. Primero se analizó el cromatograma del placebo, es decir del agua destilada (figura 7), con el fin de demostrar que no existe interferencias, con el pico cromatográfica de la Penicilina G Potásica, luego se analizó el cromatograma del estándar (figura 8). Por último, se analizaron los cromatogramas de las muestras, y se observa (figuras 9 y 10) que no hay interferencia con el pico de interés. En la tabla 10, se muestran los tiempos de retención obtenidas del placebo, principio activo y muestras.

**Tabla 10. Resultados de los tiempos de retención del placebo, estándar y muestras.**

<b>Muestras</b>	<b>Tiempo de retención (minutos)</b>
Placebo	2.907
Estándar	3.874
Muestras de trazas de Penicilina G Potásica de hisopado	No detectable
Muestras de trazas de Penicilina G Potásica de Enjuague	No detectable

<Chromatogram>

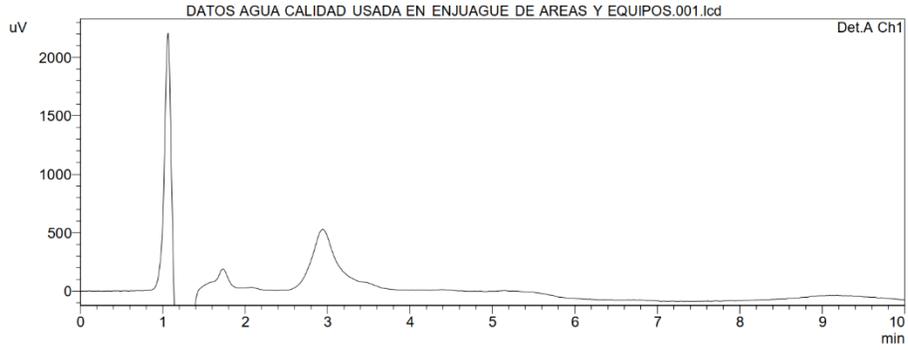


Figura 7. Cromatograma del placebo

<Chromatogram>

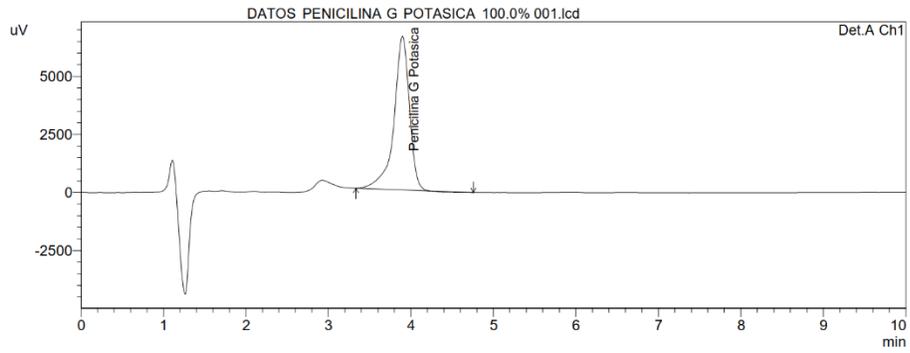


Figura 8. Cromatograma de estándar

<Chromatogram>

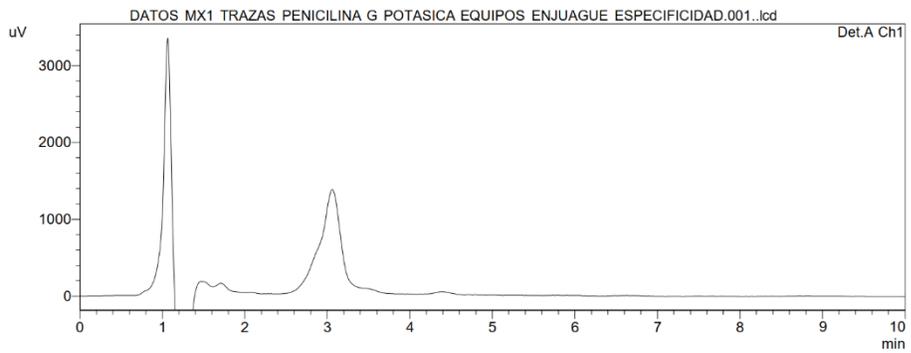


Figura 9. Cromatograma de muestra de enjuague de Penicilina G Potásica

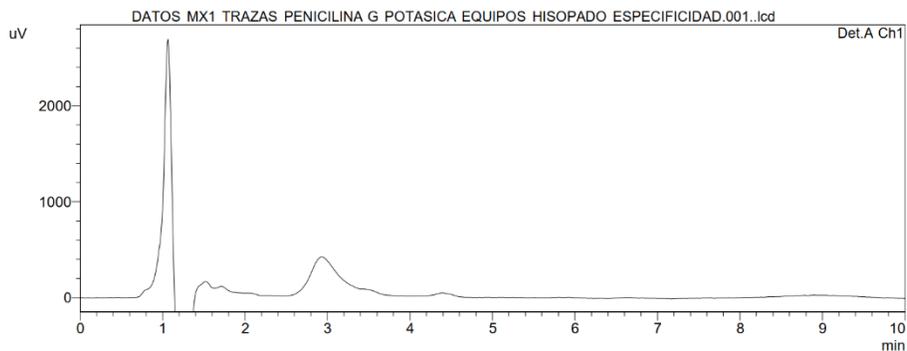


Figura 10. Cromatograma de muestra de Hisopado de Penicilina G Potásica

El tiempo obtenido de la Penicilina G Potásica fue de 3.874 minutos, el tiempo de retención del placebo, agua destilada, fue de 2.907 minutos. Por lo que se observa que hay una pequeña diferencia entre el tiempo de retención del principio activo y del placebo, por lo tanto, ninguna señal interfiere en la cuantificación de la Penicilina G Potásica, decir es un método específico para la determinación del principio activo.

#### 4.6 LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Una de las ventajas de utilizar métodos instrumentales de análisis como la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), es que son capaces de detectar y determinar cantidades de analito mucho más pequeñas que otros métodos. Uno de los principales problemas que se presentan cuando se trabaja a bajos niveles de concentración es a la hora de informar sobre la presencia o ausencia de un analito determinado; por esta razón, es muy importante llevar a cabo la determinación tanto del límite de detección como del límite de cuantificación. Esto se realizó utilizando la desviación estándar del intercepto y la pendiente de la curva de calibración normal elaborada con los datos obtenidos de los estándares de Penicilina G Potásica en el parámetro de la linealidad. Los datos se pueden observar en la tabla 4.

A continuación, en la tabla 11, se presentan los resultados obtenidos, como se observa los valores encontrados son muy pequeños, lo que indica que el límite de detección y cuantificación se encuentran alejados de la concentración de trabajo.

Para la realización de los cálculos se utilizaron dos ecuaciones las cuales fueron:

$$\text{Ecuación 1: } Y_{LD} = \alpha + 3 \cdot s_{y/x}$$

$$Y_{LD} = 17550 + 3(656.43)$$

$$Y_{LD} = 191519.29$$

$$LD = \frac{\alpha + 3 \cdot s_{y/x}}{b}$$

$$LD = 0.00012 \frac{mg}{mL}$$

$$\text{Ecuación 2: } Y_{LC} = \alpha + 10 \cdot s_{y/x}$$

$$Y_{LC} = 17550 + 10(656.43)$$

$$Y_{LC} = 24114.3$$

$$LC = \frac{\alpha + 10 \cdot s_{y/x}}{b}$$

$$LC = 0.00042 \frac{mg}{mL}$$

**Tabla 11. Resultados obtenidos del Límite de detección y cuantificación.**

<b>Límite de detección</b>	0.00012 mg/mL
<b>Límite de cuantificación</b>	0.00042 mg/mL

En la tabla 12 se muestra un resumen de los resultados obtenidos de los parámetros de validación estudiados para la determinación de trazas de Penicilina G Potásica.

**Tabla 12. Resumen de los resultados obtenidos de los parámetros de Validación.**

PARÁMETRO	ESPECIFICACIÓN	RESULTADOS				CUMPLE		
						SI	NO	
1. LINEALIDAD DEL SISTEMA	➤ COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN ( $R^2$ ): $0.98 \leq r^2 < 1.00$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Coeficiente de correlación (<math>r</math>) = 0.9920</li> <li>• Coeficiente de determinación (<math>r^2</math>) = 0.9840</li> <li>• Intervalo de Confianza para la pendiente IC(B1): 14716 -16557</li> </ul>				√		
	➤ COEFICIENTE DE CORRELACIÓN (R): $0.98 \leq r < 1.00$	<b>Intervalo de Confianza para la ordenada al origen (intercepto) IC(B0): -38302, 73404</b>						
	➤ INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA PENDIENTE IC(B1): <b>NO DEBE INCLUIR CERO</b>	[nivel]	Respuesta 1	Respuesta 2	Respuesta 3			RSD
		0.00200234 mg/mL 50%	48377	48312	48298			0.09%
	➤ INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA ORDENADA AL ORIGEN (INTERCEPTO) IC(B0): <b>DEBE INCLUIR CERO</b>	0.00300351 mg/mL 75%	65359	65086	65735			0.5%
		0.00400468 mg/mL 100%	79758	79480	79848			0.2%
	➤ COEFICIENTE DE VARIACIÓN (CV O RSD): $\leq 20.0\%$ ( <b>MÉTODO TRAZAS E IMPUREZAS</b> )	0.004405148 mg/mL 110%	86432	86425	86411			0.01%
	0.004805616 mg/mL 120%	92432	92711	92359	0.02%			
2. PRECISIÓN DEL SISTEMA	COEFICIENTE DE VARIACIÓN EN CUANTO A:	Factor de respuesta: RSD = 1.7%				√		
		Respuesta: RSD = 0.1%						
		Tiempo de retención: RSD = 0.2%						
	• FACTOR DE RESPUESTA: $\leq 2.0\%$	N°	Tiempo de retención (min)	Respuesta de estándar CRA de Penicilina G Potásica (Área)				
	• RESPUESTAS: $\leq 2.0\%$	1	3.898	83967				
		2	3.883	85075				
	• TIEMPO DE RETENCIÓN: $\leq 1.0\%$	3	3.902	85958				
	4	3.923	85080					
	5	3.888	85041					

		6	3.897	84872					
<b>3. PRECISIÓN DEL MÉTODO</b>	COEFICIENTE DE VARIACIÓN DE:  • RESPUESTAS Y FACTORES DE RESPUESTA: ≤ 25.0%	Respuesta de estándares		RSD = 1.0%		√			
		Respuesta de muestras impurezas:		RSD = N/A					
		N°	Respuesta Estándares (Penicilina G Potásica)	Respuesta Muestras (CRA de Penicilina G Potásica)	mg / unidad (CRA de Penicilina G Potásica)			% (CRA de Penicilina G Potásica)	
		1	87220	No presenta	N/A			N/A	
		2	87954	No presenta	N/A			N/A	
		3	88001	No presenta	N/A			N/A	
		4	87955	No presenta	N/A			N/A	
		5	87626	No presenta	N/A			N/A	
		6	88412	No presenta	N/A	N/A			
<b>5. EXACTITUD (RECOBRO)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PORCENTAJE DE RECOBRO: 70.0% - 130.0%</li> <li>• COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN (<math>r^2</math>): ≥ 0.98 y &lt; 1.00</li> <li>• COEFICIENTE DE CORRELACIÓN (r): ≥ 0.98 y &lt; 1.00</li> <li>• COEFICIENTE DE VARIACIÓN: ≤ 20.0%</li> </ul>	- $r^2 = 0.9888$					√		
		- r = 0.9943							
		[nivel]	Respuesta Trazas 1	Respuesta Trazas 2	Respuesta Trazas 3	RSD			% recobro
		80%	60549	60350	60375	0.18			99.65%
		100%	72194	72431	72352	0.2			95.57%
		120%	89897	89460	89269	0.4	97.70%		
<b>6. ESPECIFICIDAD</b>	NO DEBE HABER INTERFERENCIA	NO EXISTE INTERFERENCIA SIGNIFICATIVA					√		
<b>7. LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN</b>	SE EVALUO EL NIVEL MÍNIMO DE ANALITO QUE PUEDA DETECTARSE Y CUANTIFICARSE CONFIABLEMENTE.	<b>Límite de Cuantificación</b>		0.00042 mg/mL		√			
		<b>Límite de Detección</b>		0.00012 mg/mL					

## 6. CONCLUSIONES

- El método analítico validado cumple con los parámetros establecidos, por lo tanto, se evidencia que el método es válido para la cuantificación e identificación del principio activo Penicilina G Potásica.
- Se estableció que la metodología analítica para la determinación de Penicilina G Potásica presenta linealidad en el intervalo de concentración estudiada, desde 50.0% a 120.0%, obteniéndose el coeficiente de determinación  $r^2 = 0.984$  y  $0.988$  tanto para el sistema como para el método, respectivamente; por lo tanto, ambos valores se encuentran dentro de los límites establecidos, los cuales son  $0.98 \leq r^2 < 1.00$ .
- Los resultados obtenidos para la precisión del sistema y del método fueron satisfactorios, ya que los valores obtenidos de RSD de los factores de respuesta fueron menores al 1.0 %, lo que indica que el sistema y el método son precisos.
- La metodología analítica cumple con las especificaciones de exactitud, evaluándose mediante inyecciones de tres niveles de concentración conocidas 80% (0.0032 mg/mL), 100% (0.0040 mg/mL), 120% (0.0048 mg/mL) para posteriormente calcular el porcentaje de recuperación con su desviación estándar relativa, obteniéndose los valores dentro de los límites establecidos, por el laboratorio farmacéutico nacional que es de 70.0% a 130.0%.
- Al determinar el Límite de Detección se obtuvieron valores de 0.00012 mg/mL y el Límite de Cuantificación 0.00042 mg/mL respectivamente, lo que nos muestra que los resultados se encuentran por debajo de la concentración de trabajo. Por lo que hace que el método validado para el laboratorio farmacéutico nacional sea muy sensible.

- El método aplicado para la verificación de limpieza en áreas y equipos en la planta betalactámicos es efectivo, ya que el límite de detección y el límite de cuantificación para la determinación de Penicilina G Potásica se encuentran por debajo de la concentración establecida por el laboratorio farmacéutico nacional que fue de 0.004 mg/mL.

## **7. RECOMENDACIONES**

- Se recomienda que se realice la precisión intermedia, para evaluar la precisión por dos analistas y comparar que los resultados obtenidos reflejen que no existen trazas de Penicilina G Potásica.
  
- Recomendar al laboratorio farmacéutico, monitorear con mayor frecuencia las trazas de Penicilina G Potásica, para verificar si la limpieza realizada en la planta de producción se está haciendo correctamente.
  
- Realizar el estudio de la estabilidad de las muestras de enjuague e hisopado de trazas de Penicilina G Potásica, para verificar que las condiciones a las cuales pueden ser sometidas no alteren o degraden las muestras.
  
- Se recomienda al Laboratorio Farmacéutico Nacional que se utilice el método validado propuesto siguiendo las indicaciones, para obtener resultados confiables.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Servellón C. y Trujillo F. (2018). Aplicación de guía de Buenas Prácticas de Manufactura de acuerdo a la normativa vigente en planta farmacéutica de fabricación de productos sólidos. Págs. 18-20.
2. Pérez García, M.D, Protocolo para la Evaluación de la calidad del proceso de limpieza de tanques utilizados para la elaboración de jarabes farmacéuticos. Proyecto de trabajo especial de grado para optar al título Especialistas en Sistemas de la calidad. Caracas, Venezuela, junio 2012.
3. Gudiol, C. S. (2009 de Febrero de 2009). ELSEVIER. Recuperado el 12 de Septiembre de 2021, de <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-pdf-S0213005X08000323>
4. Yao J, Moellering, Murray Microbiology y col. ASM press. R. Antibacterial Agents en Manual of Clinical Microbiology. Washington 1999.
5. American Society for Microbiology. Capítulos de antimicrobianos. En: Mandel, Douglas, Bennet, editors. Principles and Practice of Infectious diseases. WB Saunders; 2000 Philadelphia.
6. Munive, A. A. (2013). Microbiología aplicada al paciente crítico. Bogota: Editorial Distribuna.
7. Gomez, J. G.-T. (2015). Los betalactámicos en la práctica clínica. Servicio de Medicina Interna-Infeciosas, pag. 1-9.
8. HOYRx. (s.f.). Recuperado el 25 de Octubre de 2021, de <https://hojrx.com/medicamento/>
9. Passaro Catarina, C.R. (2019). Guía sobre principios básicos de cromatografía y sus aplicaciones. SENNOVA. Pág. 29.

10. Fallon, A., Booth, R., y Bell, L. (1987). Applications of HPLC in biochemistry (1.<sup>a</sup> Ed.). EE. UU. Elsevier Science Ltd.
11. Snyder, L., Kirkland, J., y Dolan, J. (2010). Introduction to modern liquid chromatography (3.<sup>a</sup> Ed.). Hoboken, EE. UU. John Wiley & Sons Inc.
12. Dong, M. (2013). The essence of modern HPLC: advantages, limitations, fundamentals, and opportunities. LCGC North America, 31(6), 472-479
13. Daniela, S., & Yovanny, M. (2018), Principios Básicos de la cromatografía líquida de alto rendimiento para la separación y análisis de mezclas. Bogotá. Fundación Universidad de América.
14. Merck Millipore. (14 de Junio de 2022). Obtenido de [https://www.merckmillipore.com/GT/es/product/LiChrospher-100-RP-18-5-m-LiChroCART-250-4,MDA\\_CHEM150833?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F](https://www.merckmillipore.com/GT/es/product/LiChrospher-100-RP-18-5-m-LiChroCART-250-4,MDA_CHEM150833?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F)
15. Weston, A., y Brown, P. (1997). HPLC and CE: principles and practice. San Diego, EE. UU.: W.B. Saunders Company.
16. Giri, D. (2015). High performance liquid chromatography (HPLC): principle, types, instrumentation and applications. Laboratory Info. Recuperado de <https://laboratoryinfo.com/hplc/>
17. USP 2021, Validación de Métodos Analíticos <621> <1225> <1226> . Recuperado el 3 noviembre de 2021, <https://login.usp.org/cas/login?service=https%3A%2F%2Fonline.uspnf.com%2Fcas%2Flogin>

18. Procedimiento interno en base de Laboratorio Farmacéutico.
19. Zamora, T. (2021, Mayo 4). *Slideshare*. Obtenido de <https://es.slideshare.net/tizzamora/sesion-4-v-247761761>.
20. Cuadros-Rodríguez, L., Gámiz-Gracia, L, Almansa López, E., Bosque-Sendra, J. (2001). Calibración en procesos de medición química. Tendencias en química analítica, pág.623.
21. Revista EnFarma (2021), [On Line] <https://enfarma.lat/index.php/articulos/544-validacion-de-limpieza-de-equipos-en-la-industria-farmaceutica>
22. Fredric Robin. The basic facts of cleaning validation [en línea]. QA- Validation Department Novo pharm Ltd. Canada 2010. Disponible: <http://pharmaceuticalvalidation.blogspot.com/2010/02/basic-facts-of-cleaning-validation.html>
23. Pozuelo, P. (30 de Abril de 2015). BETELGEUX. Recuperado el 24 de Octubre de 2021, de <https://www.betelgeux.es/blog/2015/04/30/sistema-de-limpieza-cip/>
24. INTERNATIONAL, A. (24 de Septiembre de 2016). Recuperado el 2021 de Octubre de 24, de <https://www.aibinternational.com/es-aibi/Blog-saber-alimentario/PostId/756/sugerencia-de-la-semana-cip-vs-cop>
25. Forsyth RJ, Haynes DV. Validación de limpieza de una instalación de investigación farmacéutica, *Pharm Technol*. 1998;22(1): 33-9
26. Destin A. Establecimientos de los criterios de aceptación científicamente justificados para la validación de limpieza de productos farmacéuticos terminados. *Pharm Technol*. 1999; 19 (2) 33-8.

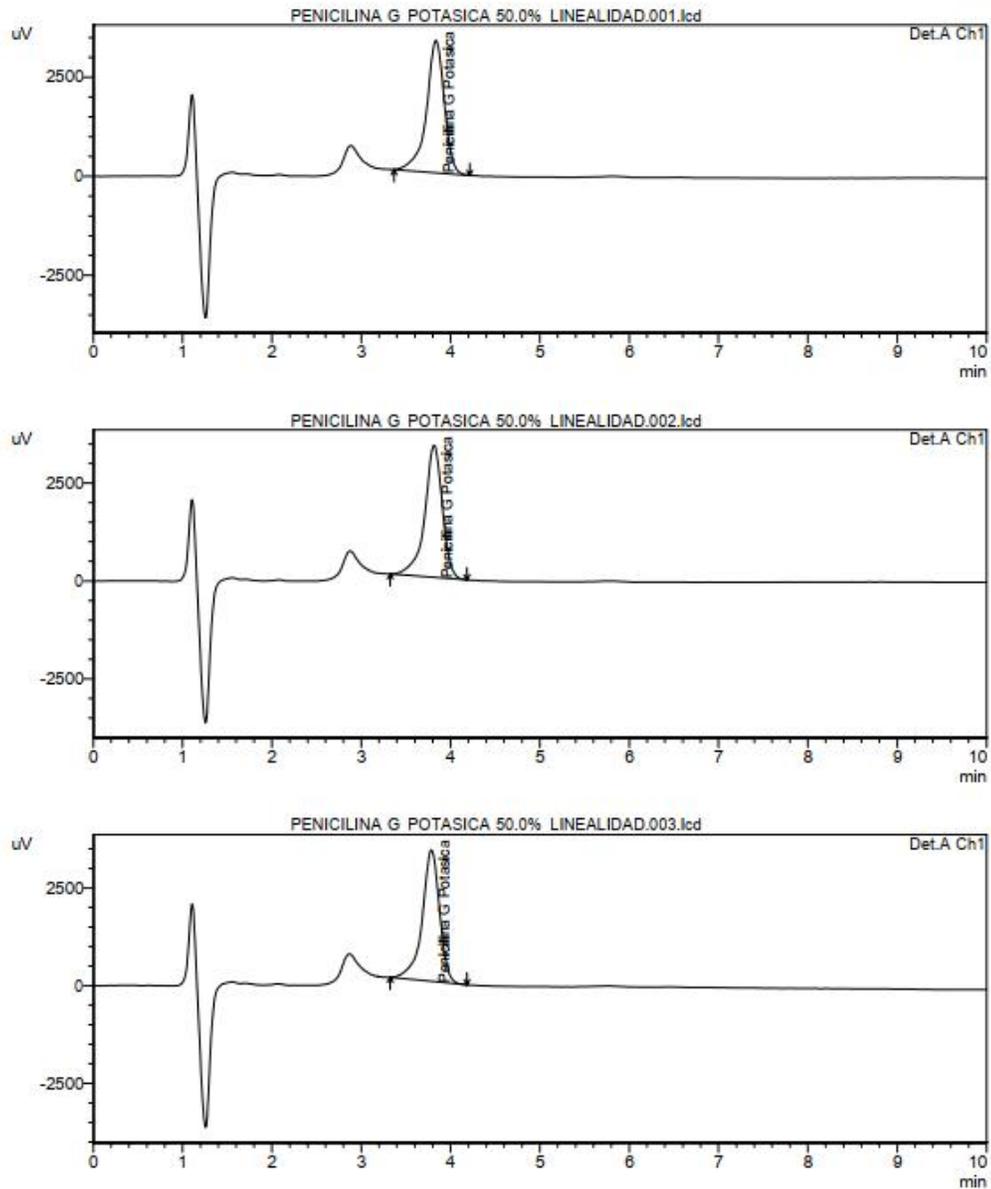
27. Lopez Marzo, A. M., & Pierre Marzo, R. A. (Enero-Abril de 2005). *Imbiomed*. Recuperado el 21 de Julio de 2021, de Revista Cubana de Farmacia: <https://www.imbiomed.com.mx/ejemplar.php?id=3467>
28. Redmond A, Roche J. Cleaning Validation, How clean is clean? Athlone Institute of Technology. Disponible en: <http://www.irishscientist.ie/p98b.htm>
29. Agalloco PJ. Cleaning procedures. Points to consider in Validation of Equipment. *J Parent Sci Technol*. 1992; 46(5):163-8.
30. Productos Farmacéuticos. Validación de Métodos Analíticos para la Evaluación de la Calidad de los Medicamentos. Reglamento Técnico Centroamericano 11.03.39: 06. COMIECO- XL, 2006.
31. Organismos Salvadoreño de Acreditación, G9.6 Validación de Métodos Analíticos Físicoquímicos, El Salvador, 2010.
32. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), ICH, Complementary Guideline on Methodology dated 6 November 1996 incorporated in November 2005.
33. Eurolab España. P.P. Morillas y colaboradores. Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados (1ª ed. 2016).
34. Moreno Ramirez, Morillo Velarde, C.H (2022). Calidad y seguridad en el laboratorio. España: Editorial Síntesis, S.A.
35. Limeres, C. (11 de enero de 2012). Regresión lineal simple, Universidad de Santiago de Compostela. [http://eio.usc.es/eipc1/BASE/BASEMASTER/FORMULARIOS-PHP-DPTO/MATERIALES/Mat\\_50140116\\_Regr\\_%20simple\\_2011\\_12.pdf](http://eio.usc.es/eipc1/BASE/BASEMASTER/FORMULARIOS-PHP-DPTO/MATERIALES/Mat_50140116_Regr_%20simple_2011_12.pdf)

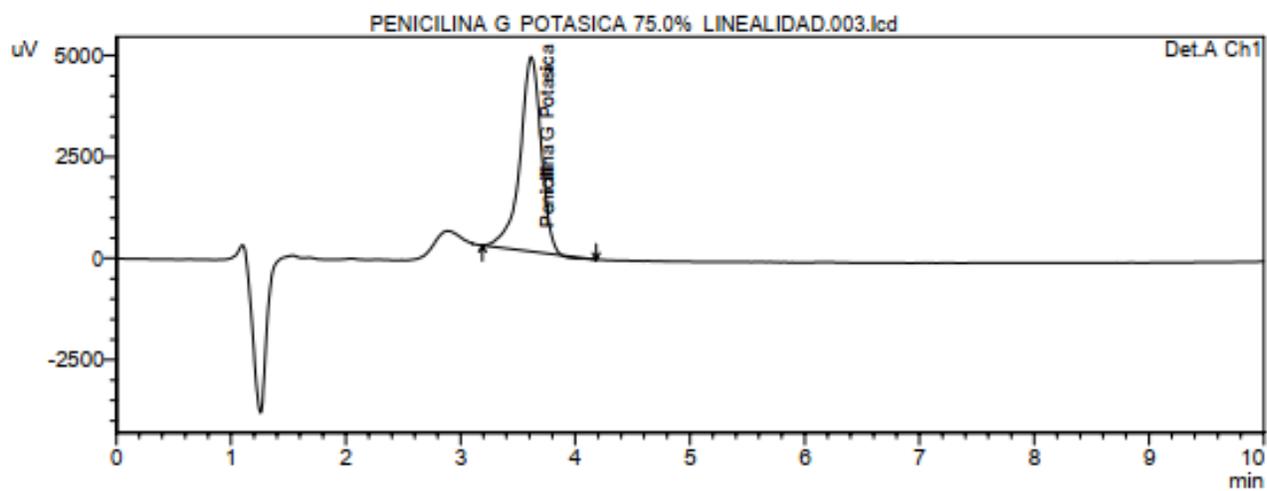
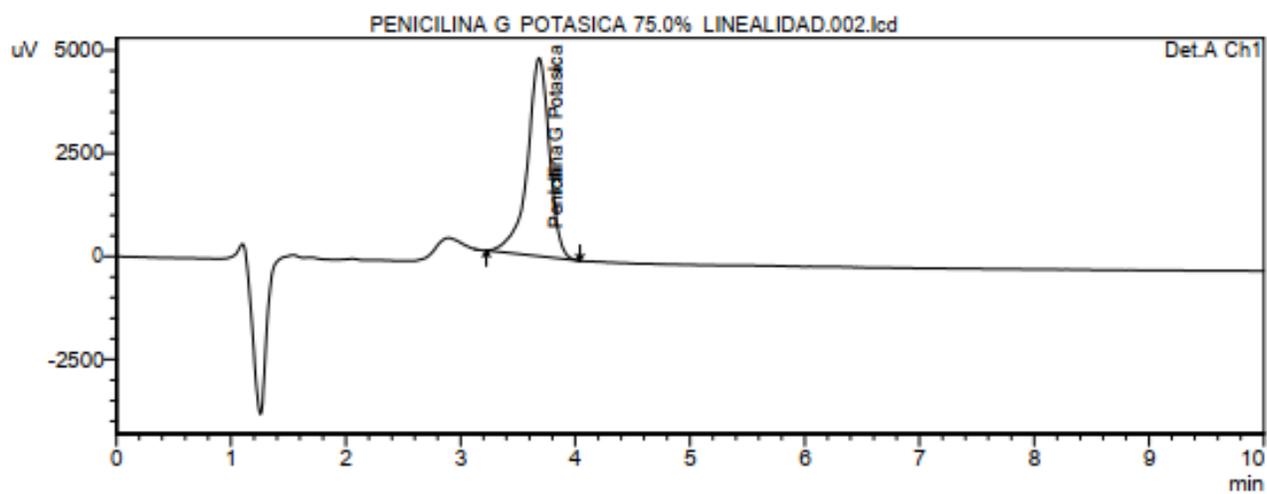
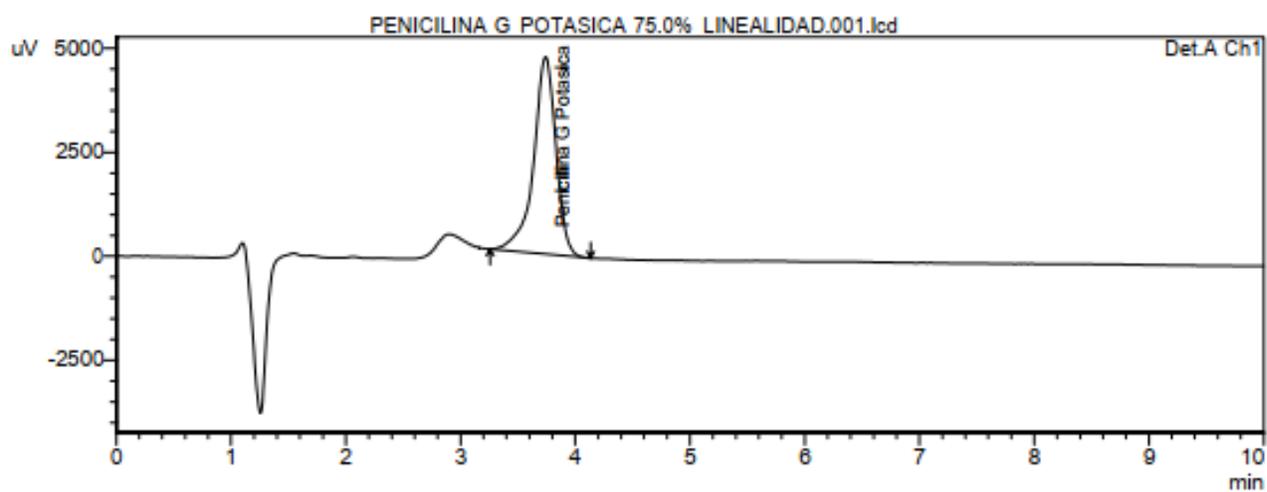
## 9. ANEXOS

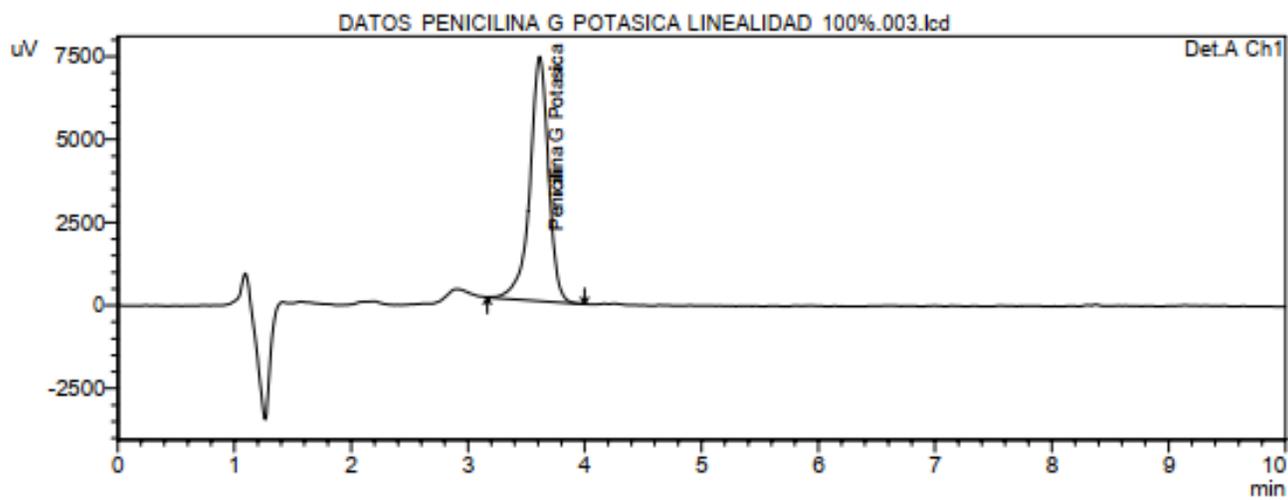
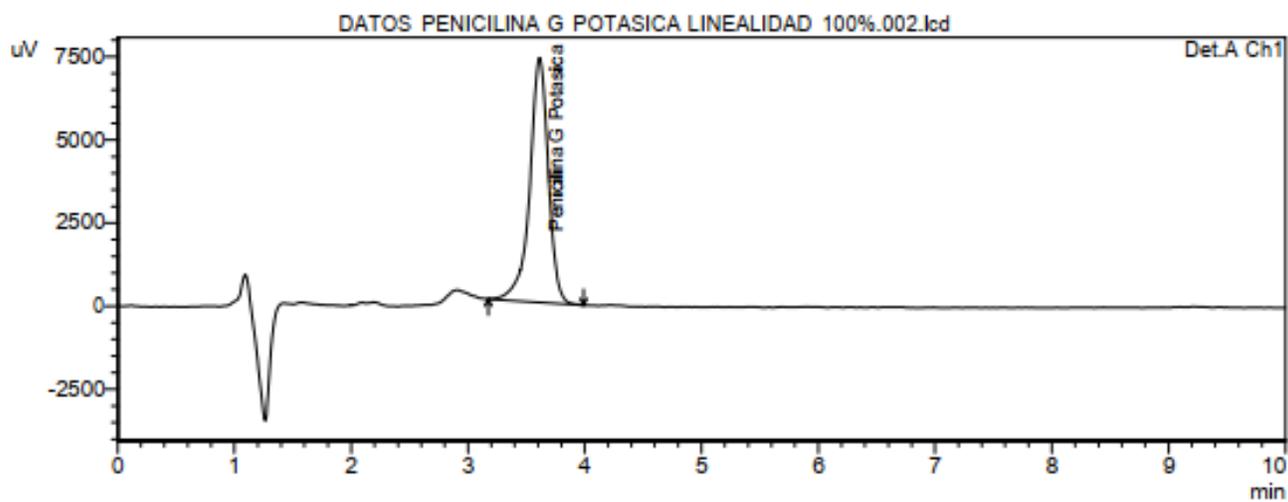
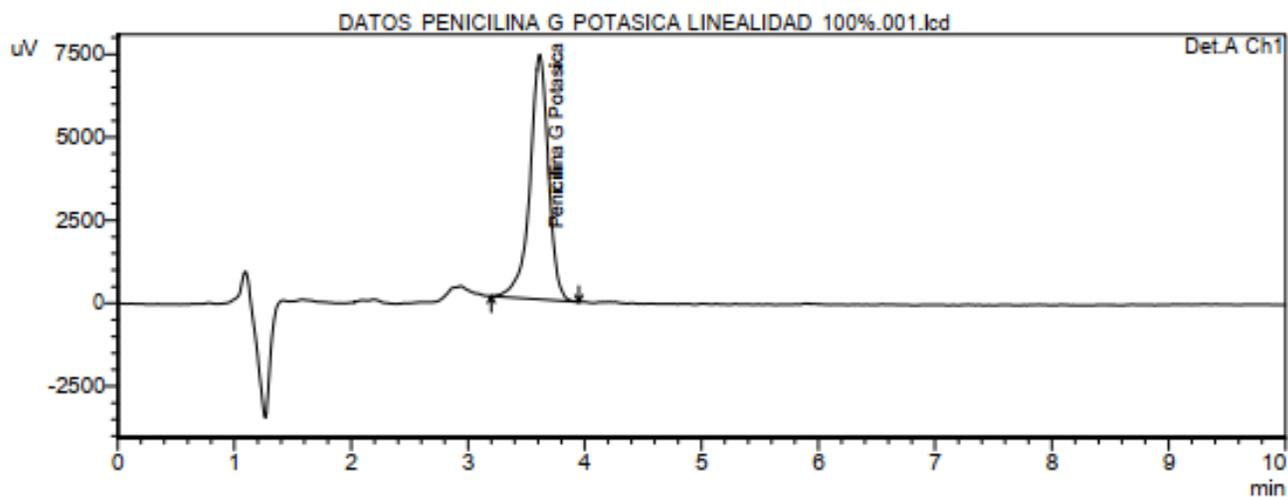
### ANEXOS 1. LINEALIDAD DEL SISTEMA

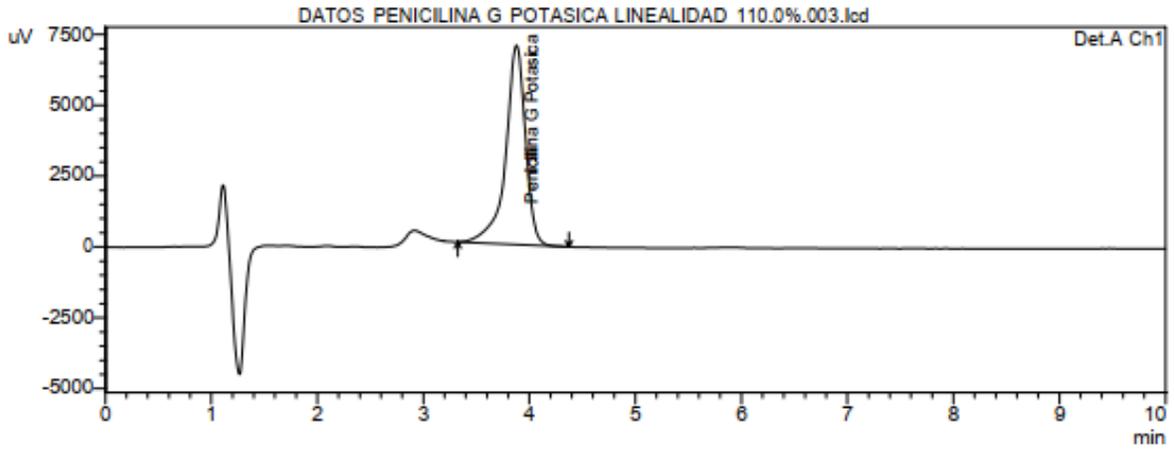
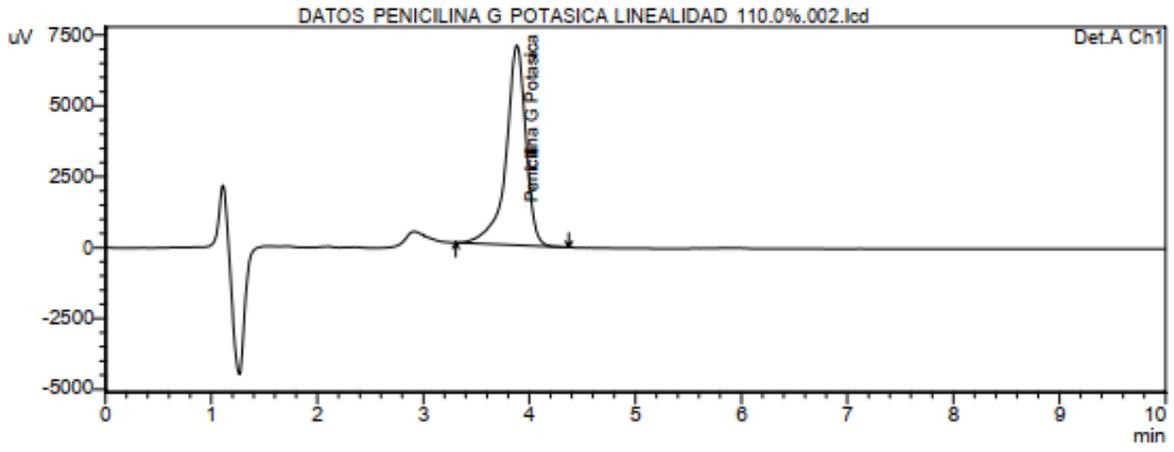
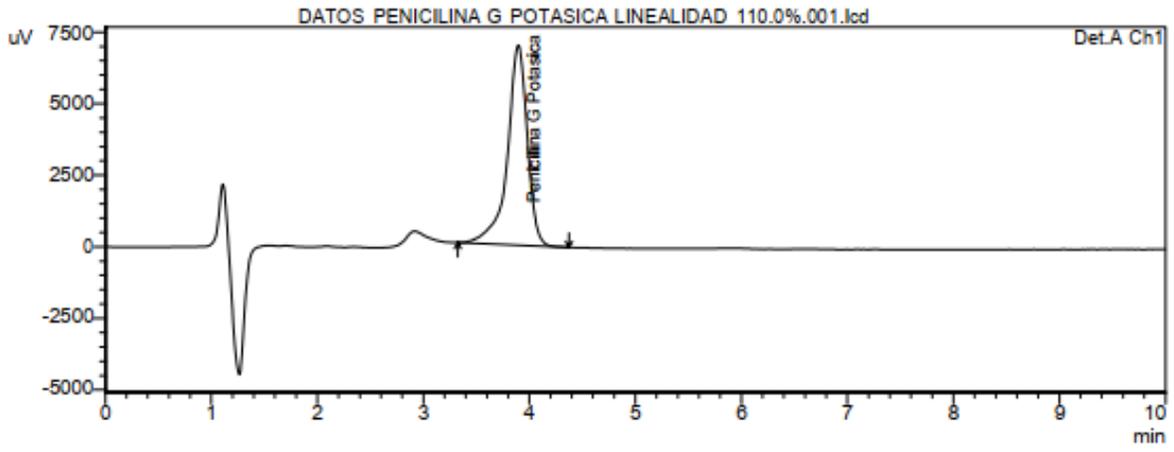
Figura 11. Cromatograma de Linealidad del sistema a las concentraciones de 50.0% a 120.0%.

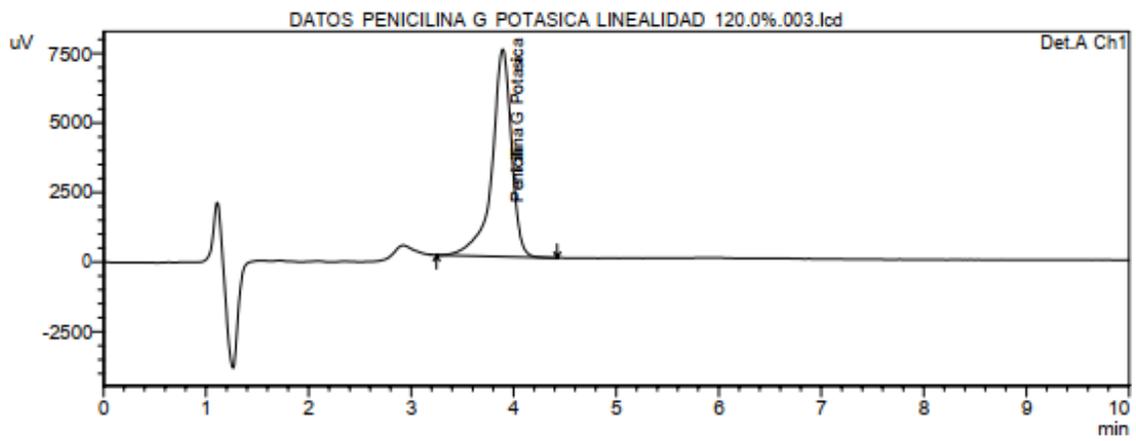
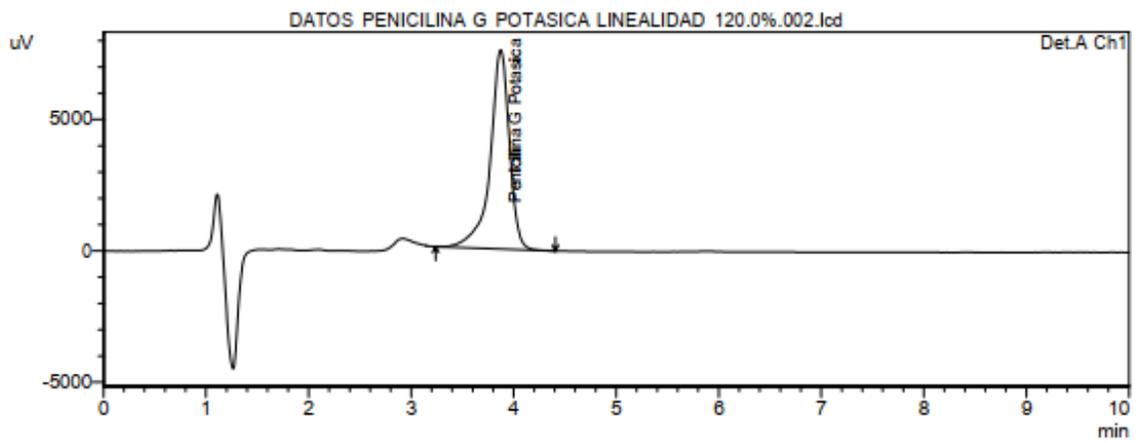
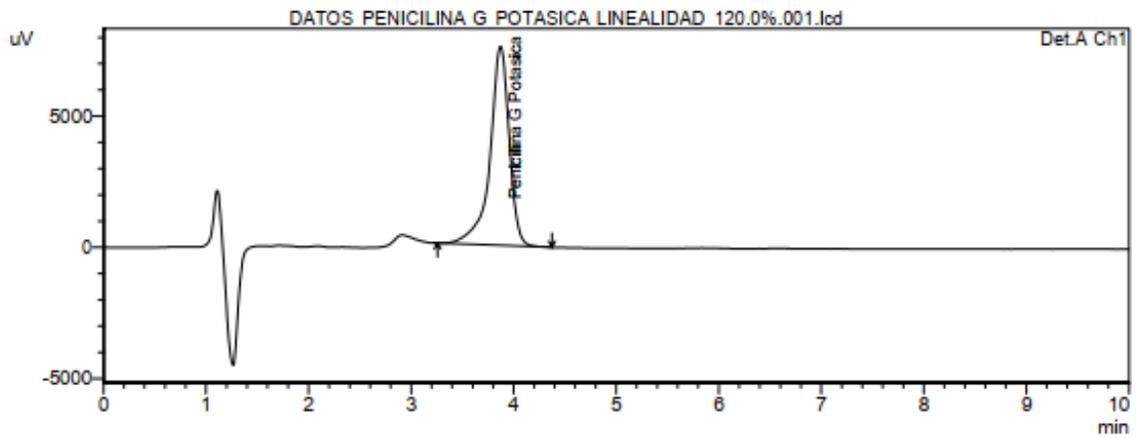
<Chromatogram>











## <Summary Report>

<< Detector A >>

ID#1 Compound Name: Penicilina G Potasica

Title	Ret. Time	Area	Theoretical Plates/meter
PENICILINA G POTASICA 50.0% LINEALIDAD.001.lcd	3.8334	48377	12784.4
PENICILINA G POTASICA 50.0% LINEALIDAD.002.lcd	3.8124	48312	12808.8
PENICILINA G POTASICA 50.0% LINEALIDAD.003.lcd	3.7818	48298	12874.4
PENICILINA G POTASICA 75.0% LINEALIDAD.001.lcd	3.7379	65359	12756.5
PENICILINA G POTASICA 75.0% LINEALIDAD.002.lcd	3.7820	65086	12797.8
PENICILINA G POTASICA 75.0% LINEALIDAD.003.lcd	3.7134	65735	12987.3

Title	Ret. Time	Area	Theoretical Plates/meter
DATOS PENICILINA G POTASICA LINEALIDAD 100%.001.lcd	3.8110	79758	17222.1
DATOS PENICILINA G POTASICA LINEALIDAD 100%.002.lcd	3.8101	79480	17128.9
DATOS PENICILINA G POTASICA LINEALIDAD 100%.003.lcd	3.8115	79848	17093.9
DATOS PENICILINA G POTASICA LINEALIDAD 110.0%.001.lcd	3.8925	86432	15406.7
DATOS PENICILINA G POTASICA LINEALIDAD 110.0%.002.lcd	3.8793	86425	15422.4
DATOS PENICILINA G POTASICA LINEALIDAD 110.0%.003.lcd	3.8754	86411	15450.9
DATOS PENICILINA G POTASICA LINEALIDAD 120.0%.001.lcd	3.8689	92432	15400.2
DATOS PENICILINA G POTASICA LINEALIDAD 120.0%.002.lcd	3.8707	92711	15368.7
DATOS PENICILINA G POTASICA LINEALIDAD 120.0%.003.lcd	3.8906	92359	15502.7
Average	3.8247	74468	14733.7
%RSD	0.0554	26.115	11.783
Maximum	3.8925	92711	17222.1
Minimum	3.7134	48298	12756.5
Standard Deviation	0.1266	31404	1733.1

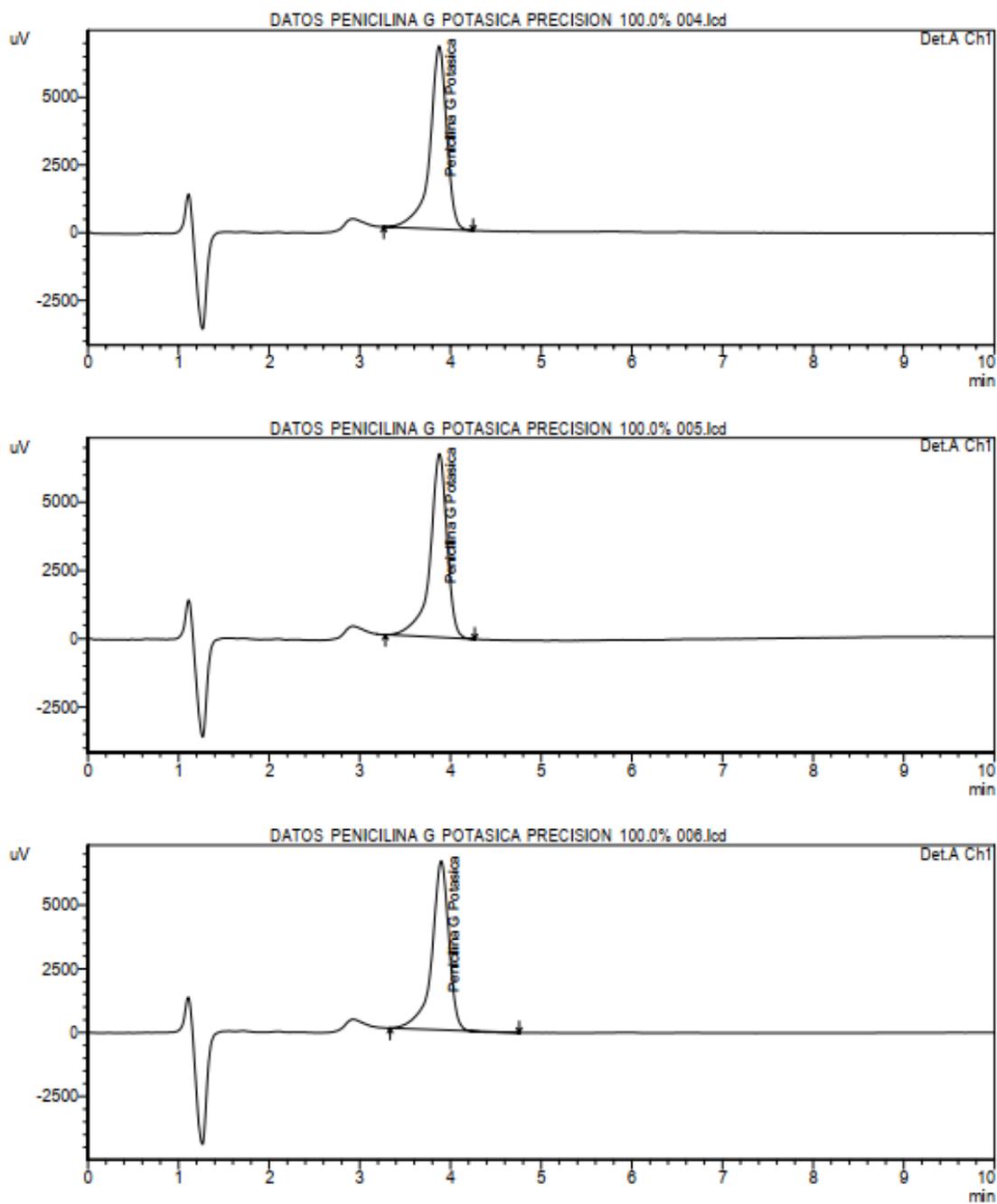
Tailing Factor	Vial#
0.86	2
0.86	2
0.87	2
0.85	3
0.86	3
0.87	3
0.90	4
0.89	4
0.90	4
0.82	5
0.82	5
0.82	5
0.82	6
0.82	6
0.81	6
0.85	
0.031	
0.90	
0.81	
0.03	

**Tabla 13. Datos obtenidos de la regresión de la linealidad del sistema.**

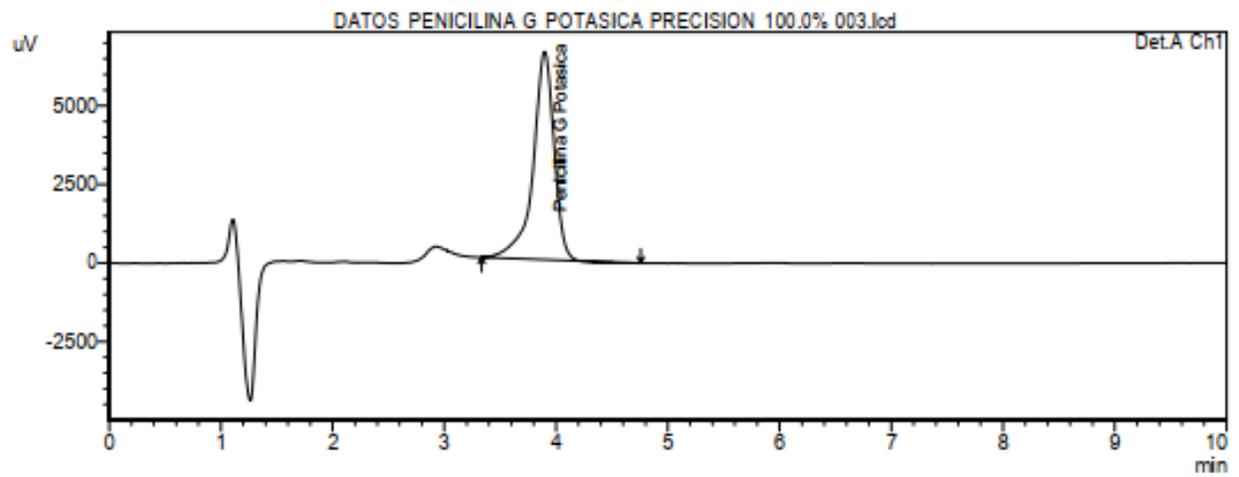
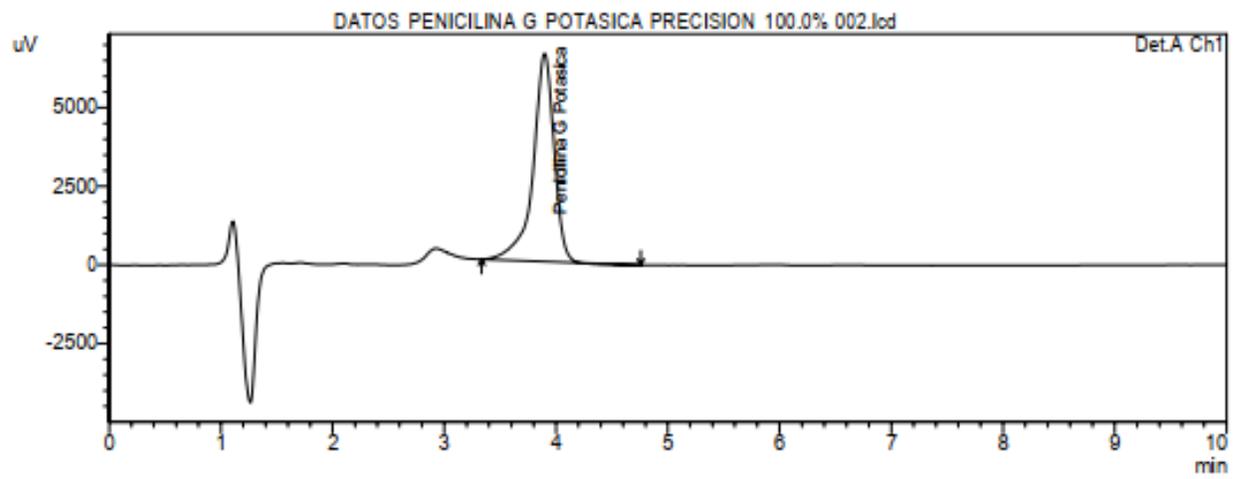
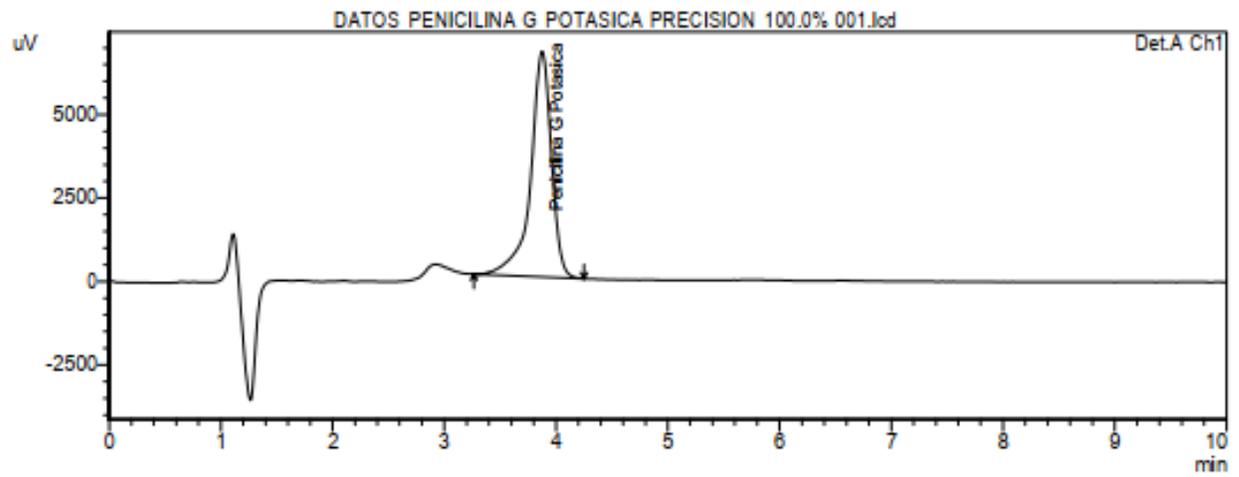
Nivel %	Concentración Real mg/mL	Àrea	FR ESTÁNDAR
50%	0.00200	48377	4.1342E-08
50%	0.00200	48312	4.1398E-08
50%	0.00200	48298	4.1410E-08
75%	0.00300	65359	4.5900E-08
75%	0.00300	65086	4.6093E-08
75%	0.00300	65735	4.5638E-08
100%	0.00400	79758	5.0152E-08
100%	0.00400	79480	5.0327E-08
100%	0.00400	79848	5.0095E-08
110%	0.00440	86432	5.0907E-08
110%	0.00440	86425	5.0911E-08
110%	0.00440	86411	5.0919E-08
120%	0.00480	92432	5.1930E-08
120%	0.00480	92711	5.1774E-08
120%	0.00480	92353	5.1974E-08
		Media	4.8051E-08
		%RSD	8.4
		desviada al origen	0.0

## ANEXO 2. PRECISIÓN DEL SISTEMA

Figura 12. Cromatograma de Estándar de Penicilina G Potásica al 100.0% (0.0040 mg/mL)



<Chromatogram>



<Summary Report>

<< Detector A >>

ID#1 Compound Name: Penicilina G Potasica

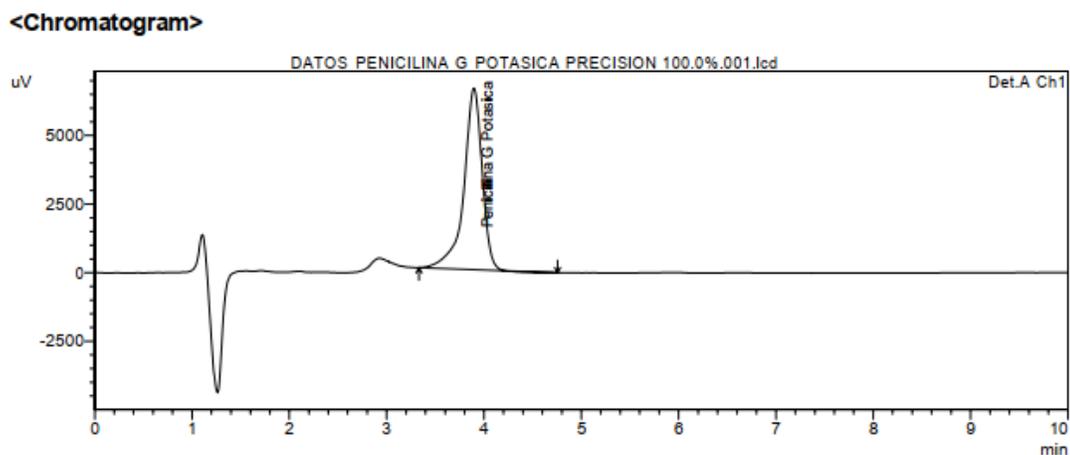
Title	Ret. Time	Area	Conc.	Units	Vial#	Tailing Facto
DATOS PENICILINA G POTASICA PRECISION 1	3.898	83967	0.004	mg/mL	2	0.805
DATOS PENICILINA G POTASICA PRECISION 1	3.883	85075	0.004	mg/mL	3	0.814
DATOS PENICILINA G POTASICA PRECISION 1	3.902	85958	0.004	mg/mL	4	0.810
DATOS PENICILINA G POTASICA PRECISION 1	3.923	85080	0.004	mg/mL	5	0.805
DATOS PENICILINA G POTASICA PRECISION 1	3.888	85041	0.004	mg/mL	6	0.803
DATOS PENICILINA G POTASICA PRECISION 1	3.897	84872	0.004	mg/mL	7	0.811
Average	3.898	84998	0.004			0.809

Title	Ret. Time	Area	Conc.	Units	Vial#	Tailing Facto
%RSD	0.297	0.972	0.004			0.691
Maximum	3.923	87610	0.004			0.814
Minimum	3.883	85990	0.004			0.803
Standard Deviation	0.012	843	0.00			0.006

Theoretical Plate#
12357.974
12309.593
12309.593
12357.974
12355.974
12309.593
12333.450
1.120
12357.974
12309.593
26.145

### ANEXO 3. PRECISIÓN DEL MÉTODO

Figura 13. Cromatograma de estándar 1 Penicilina G Potásica (Precisión del método)



#### <Summary Report>

<< Detector A >>

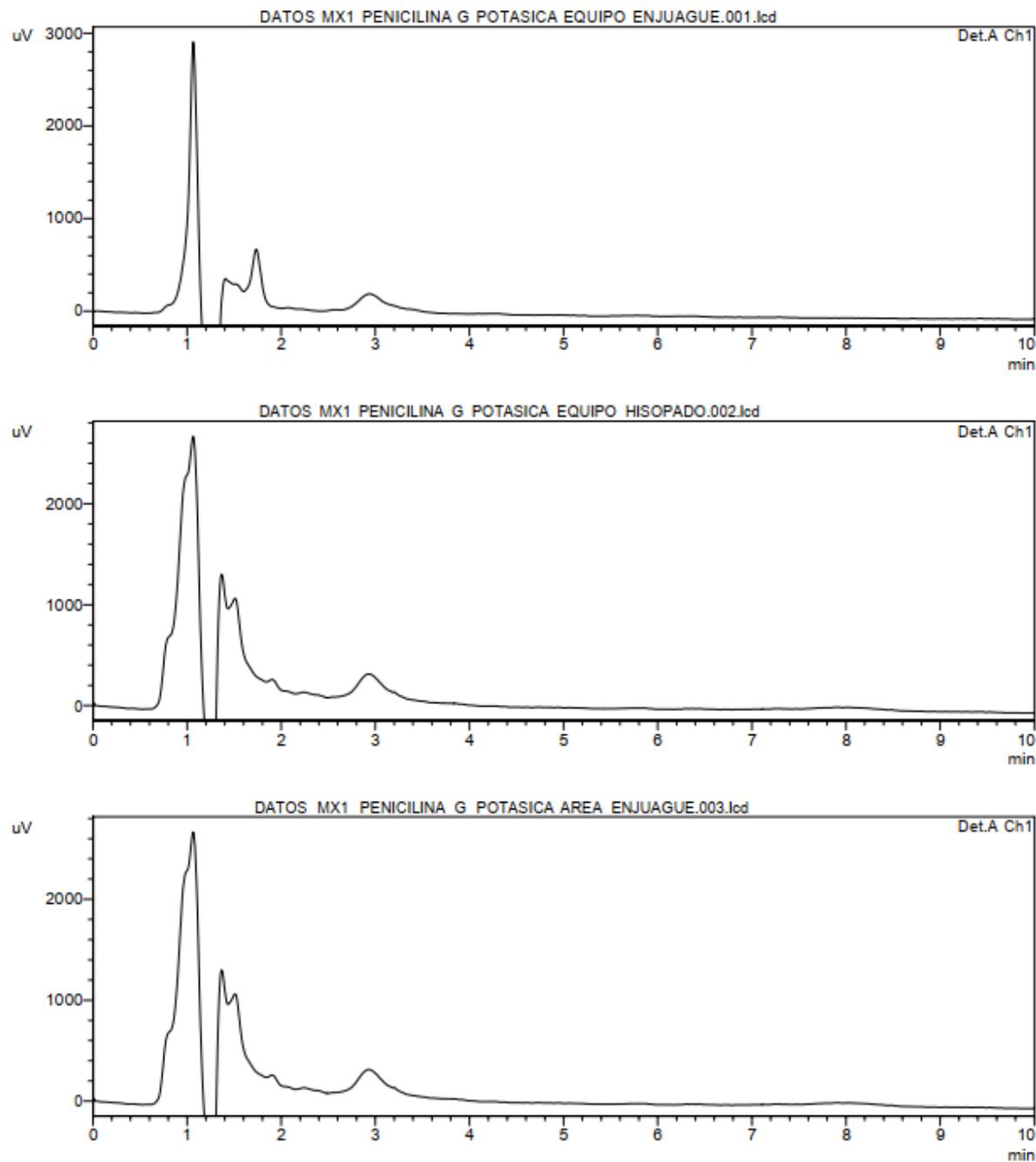
ID#1 Compound Name: Penicilina G Potásica

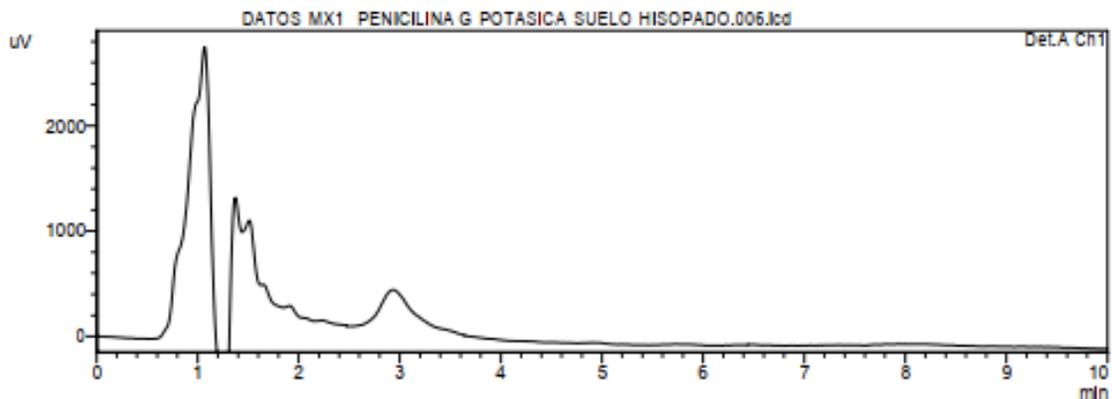
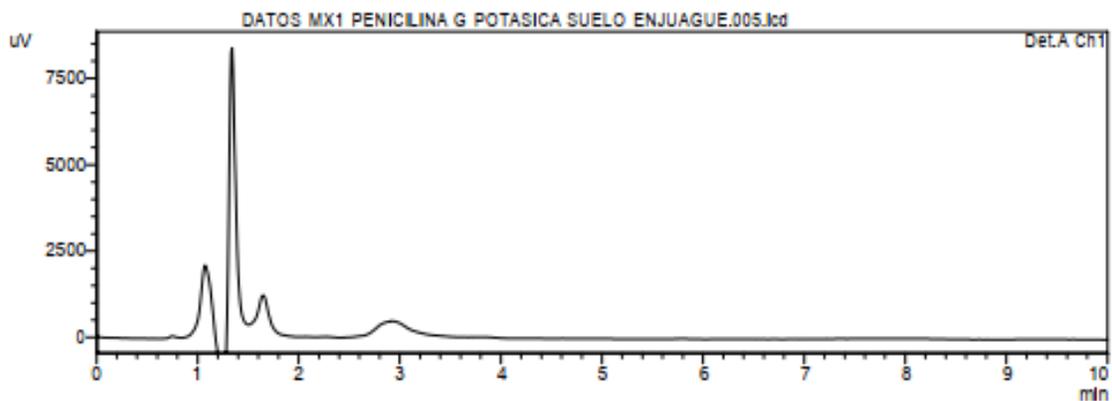
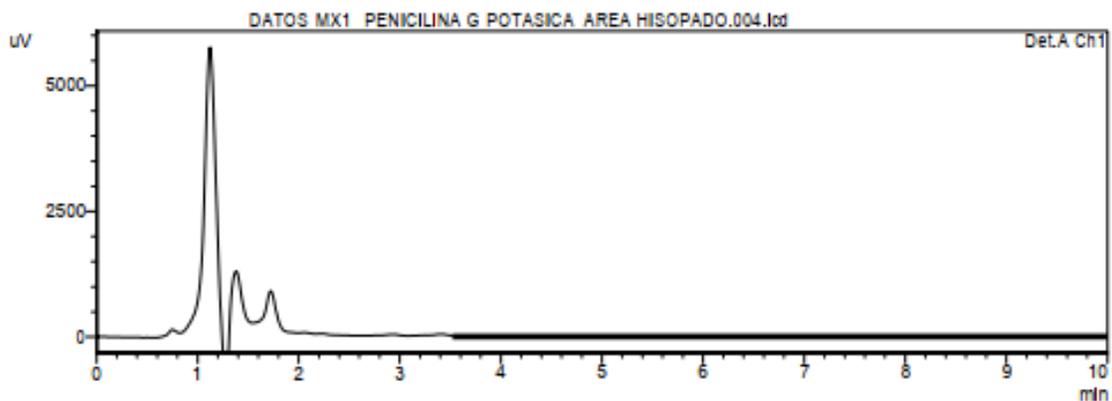
Title	Ret. Time	Area	Conc.	Units	Vial#	Tailing Factor
DATOS PENICILINA G POTASICA PRECISION 10	3.890	86101	0.00	mg/mL	3	0.811
Average	3.890	86101	0.00			0.811
%RSD	0.000	0.000	0.000			0.000
Maximum	3.890	86101	0.00			0.811
Minimum	3.890	86101	0.00			0.811
Standard Deviation	0.000	0	0.00			0.000

Theoretical Plate#
12519.223
12519.223
0.000
12519.223
12519.223
0.000

Figura 14. Cromatogramas de Muestras 1 de Enjuague e Hisopado, para la precisión del método.

<Chromatogram>





<Summary Report>

<< Detector A >>

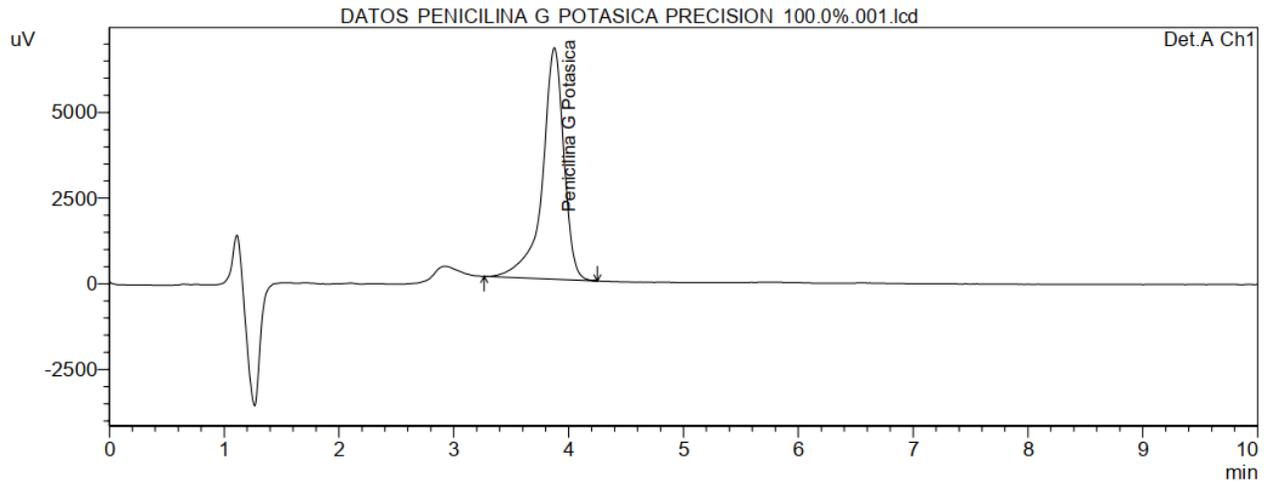
ID#1 Compound Name: Penicilina G Potasica

Title	Ret. Time	Area	Conc.	Val#	Tailing Factor	Theoretical Plate#
DATOS MX1 PENICILINA G POTASICA EQUIPO	0.000	0	0.000	4	0.000	0.000
DATOS MX1 PENICILINA G POTASICA EQUIPO	0.000	0	0.000	5	0.000	0.000
DATOS MX1 PENICILINA G POTASICA AREA	0.000	0	0.000	6	0.000	0.000
DATOS MX1 PENICILINA G POTASICA AREA	0.000	0	0.000	7	0.000	0.000
DATOS MX1 PENICILINA G POTASICA SUELO	0.000	0	0.000	8	0.000	0.000
DATOS MX1 PENICILINA G POTASICA SUELO	0.000	0	0.000	9	0.000	0.000
Average	0.000	0	0.000		0.000	0.000
%RSD	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000
Maximum	0.000	0	0.000		0.000	0.000
Minimum	0.000	0	0.000		0.000	0.000
Standard Deviation	0.000	0	0.000		0.000	0.000

Figura 15. Cromatograma de estándar 2 Penicilina

G Potásica (Precisión del método)

<Chromatogram>



<Summary Report>

<< Detector A >>

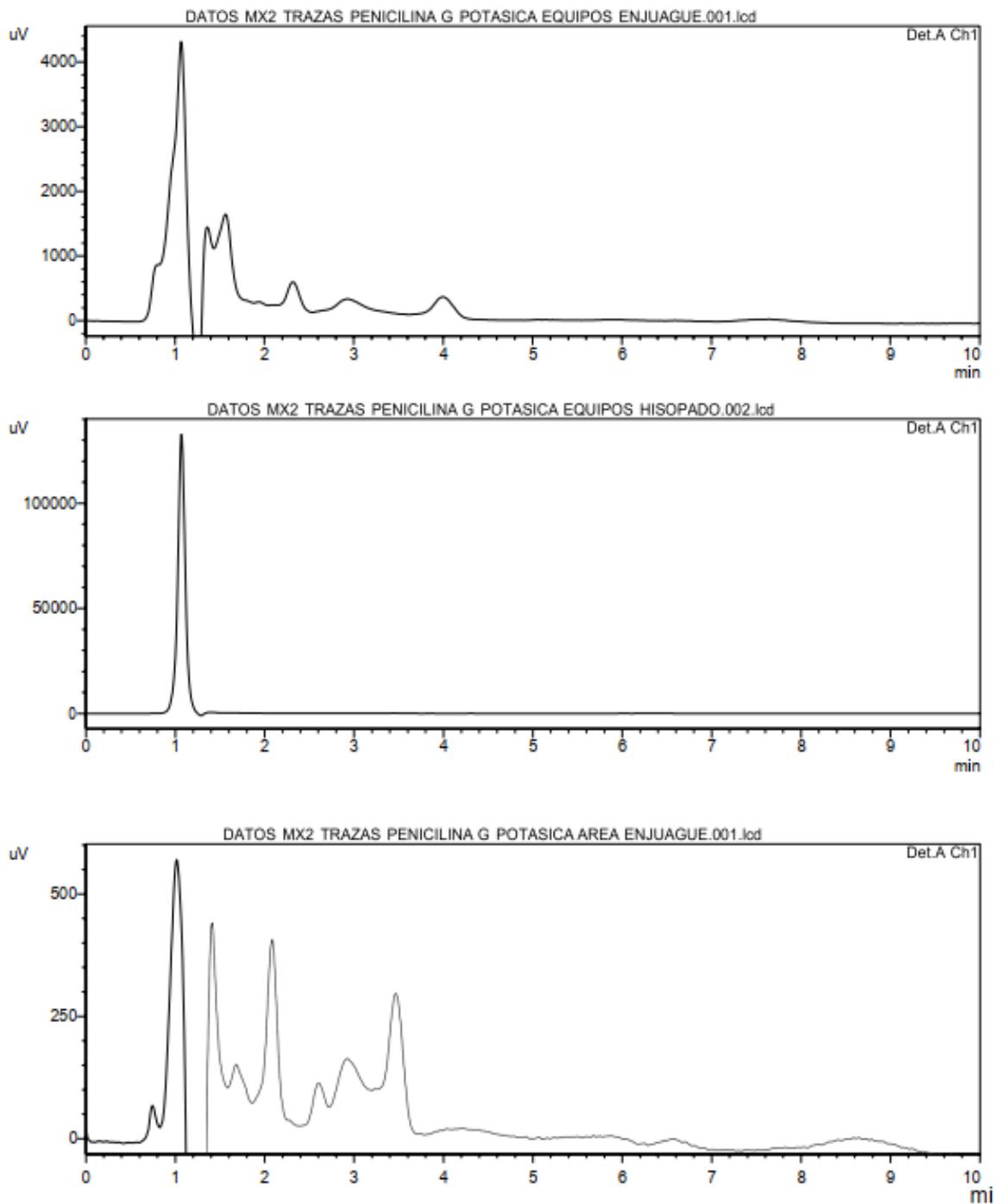
ID#1 Compound Name: Penicilina G Potasica

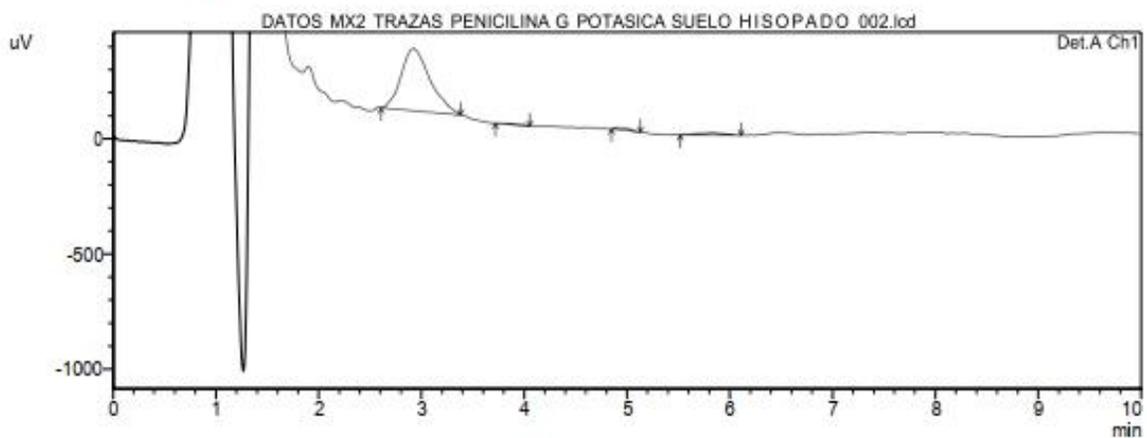
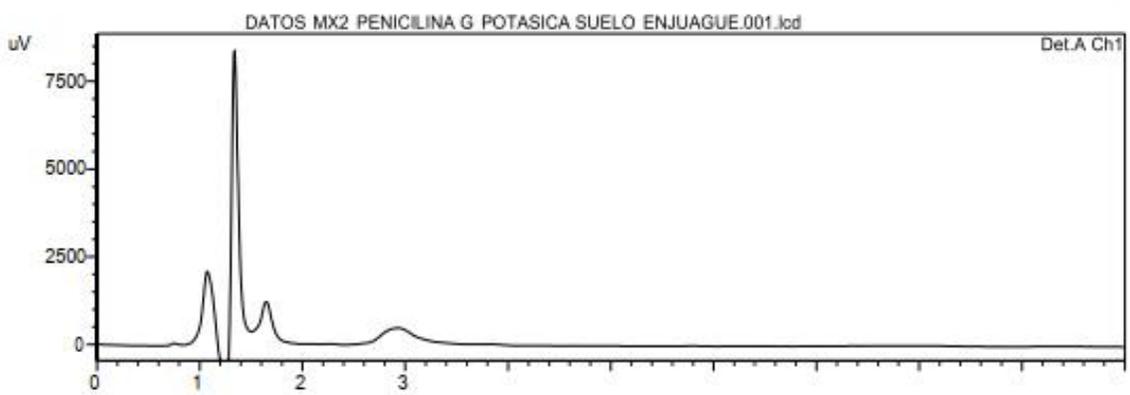
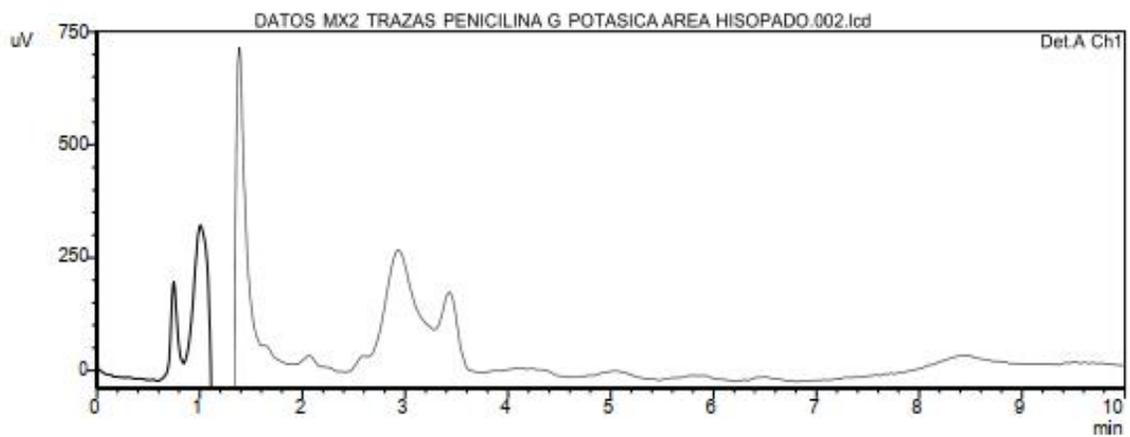
Title	Ret. Time	Area	Conc.	Units	Vial#	Tailing Facto
DATOS PENICILINA G POTASICA PRECISION 1	3.810	87954	0.004	mg/mL	10	0.809
Average	3.810	87954	0.004			0.809
%RSD	0.000	0.000	0.000			0.000
Maximum	3.810	87954	0.004			0.809
Minimum	3.810	87954	0.004			0.809
Standard Deviation	0.000	0	0.00			0.000



Figura 16. Cromatogramas de Muestras 2 de Enjuague e Hisopado, para la precisión del método.

<Chromatogram>





## <Summary Report>

<< Detector A >>

ID#1 Compound Name: Penicilina G Potasica

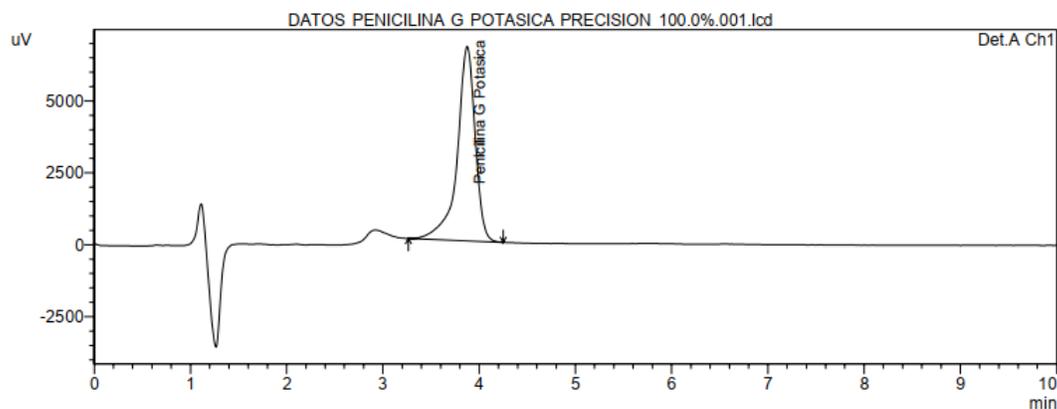
Title	Ret. Time	Area	Conc.	Units	Vial#	Tailing Facto
DATOS MX2 TRAZAS PENICILINA G POTASICA	0.000	0.000	0.00	mg/mL	11	0.000
DATOS MX2 TRAZAS PENICILINA G POTASICA	0.000	0.000	0.00	mg/mL	12	0.000
DATOS MX2 TRAZAS PENICILINA G POTASICA	0.000	0.000	0.00	mg/mL	13	0.000
DATOS MX2 TRAZAS PENICILINA G POTASICA	0.000	0.000	0.00	mg/mL	14	0.000
DATOS MX2 TRAZAS PENICILINA G POTASICA	0.000	0.000	0.00	mg/mL	15	0.000
DATOS MX2 TRAZAS PENICILINA G POTASICA	0.000	0.000	0.00	mg/mL	16	0.000
Average	0.000	0.000	0.00			0.000

Title	Ret. Time	Area	Conc.	Units	Vial#	Tailing Facto
%RSD	0.000	0.000	0.00			0.000
Maximum	0.000	0.000	0.00			0.000
Minimum	0.000	0.000	0.00			0.000
Standard Deviation	0.000	0.000	0.00			0.000

Theoretical Plate#
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000

Figura 17. Cromatograma de estándar 3 Penicilina G Potásica (Precisión del método)

<Chromatogram>



<Summary Report>

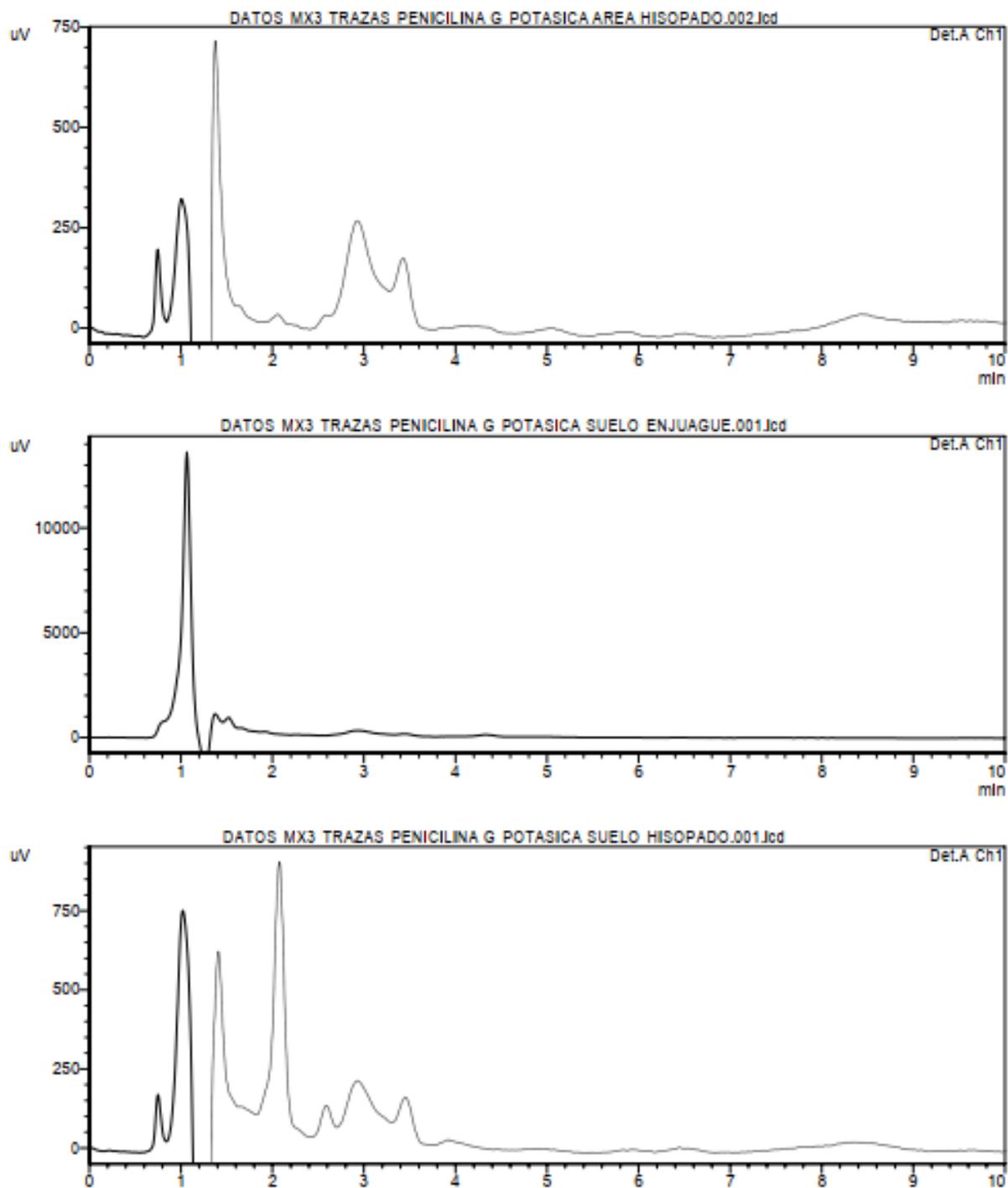
<< Detector A >>

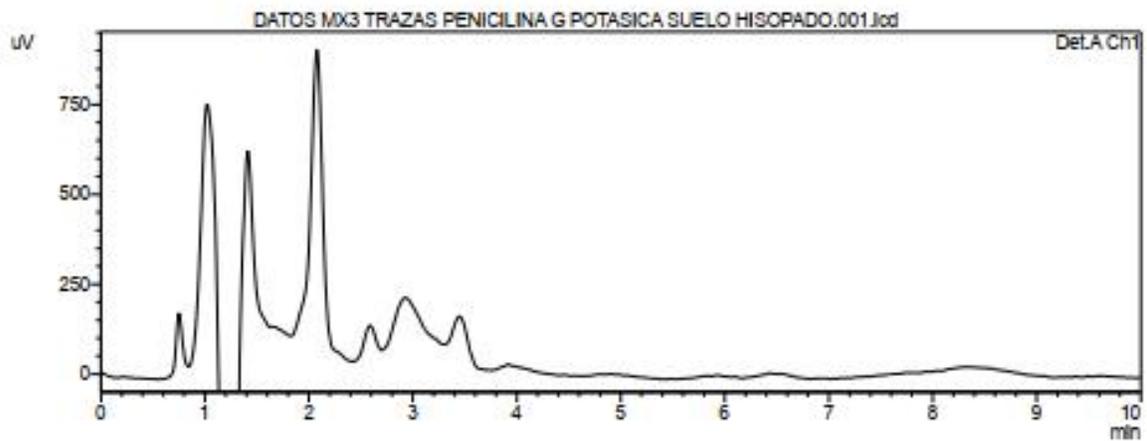
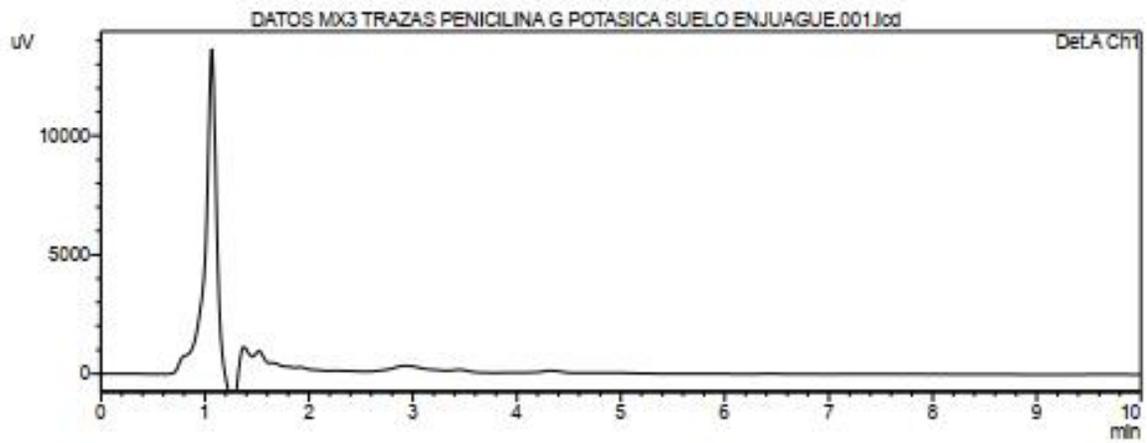
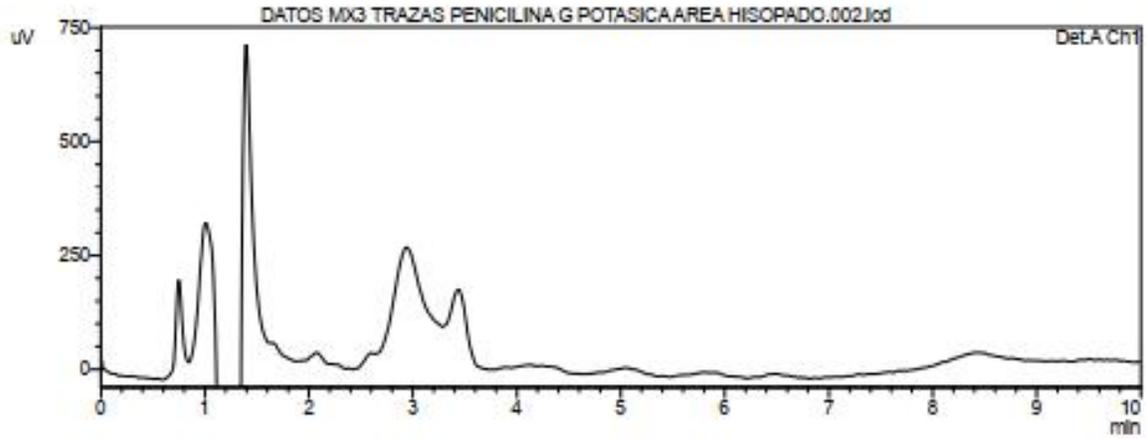
ID#1 Compound Name: Penicilina G Potasica

Title	Ret. Time	Area	Conc.	Units	Vial#	Tailing Facto
DATOS PENICILINA G POTASICA PRECISION 1	3.792	88001	0.004	mg/mL	17	0.856
Average	3.792	88001	0.004			0.856
%RSD	0.000	0.000	0.000			0.000
Maximum	3.792	88001	0.004			0.856
Minimum	3.792	88001	0.004			0.856
Standard Deviation	0.000	0	0.00			0.000

Theoretical Plate#
12551.432
12551.432
0.000
12551.432
12551.432
0.000

Figura 18. Cromatogramas de Muestras 3 de Enjuague e Hisopado, para la precisión del método.





**<Summary Report>**

<< Detector A >>

ID#1 Compound Name: Penicilina G Potasica

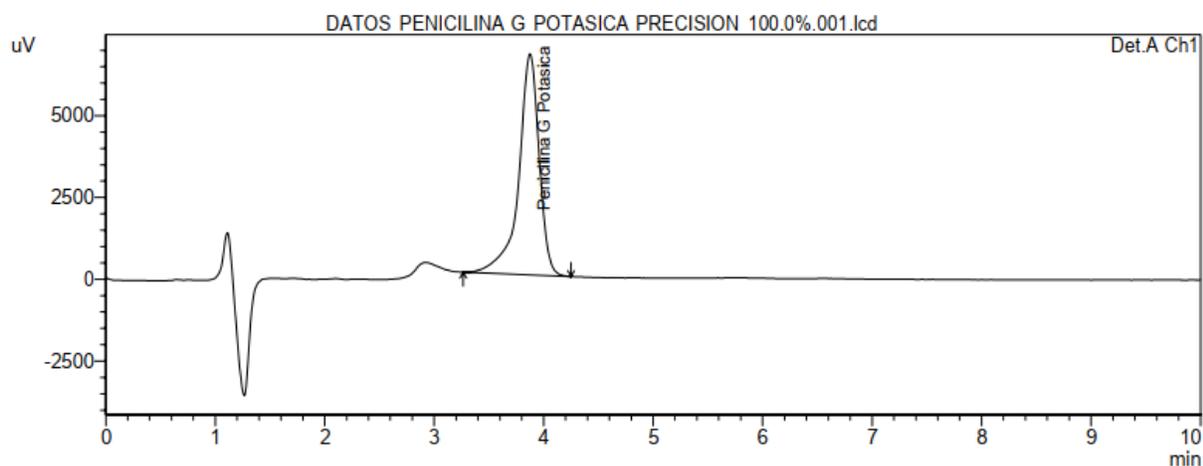
Title	Ret. Time	Area	Conc.	Units	Vial#	Tailing Facto
DATOS MX3 TRAZAS PENICILINA G POTASICA	0.000	0	0.00	mg/mL	18	0.000
DATOS MX3 TRAZAS PENICILINA G POTASICA	0.000	0	0.00	mg/mL	19	0.000
DATOS MX3 TRAZAS PENICILINA G POTASICA	0.000	0	0.00	mg/mL	20	0.000
DATOS MX3 TRAZAS PENICILINA G POTASICA	0.000	0	0.00	mg/mL	21	0.000
DATOS MX3 TRAZAS PENICILINA G POTASICA	0.000	0	0.00	mg/mL	22	0.000
DATOS MX3 TRAZAS PENICILINA G POTASICA	0.000	0	0.00	mg/mL	23	0.000
Average	0.000	0	0.00			0.000

Title	Ret. Time	Area	Conc.	Units	Vial#	Tailing Facto
%RSD	0.000	0.000	0.000			0.000
Maximum	0.000	0	0.00			0.000
Minimum	0.000	0	0.00			0.000
Standard Deviation	0.000	0	0.00			0.000

Theoretical Plate#
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000

Figura 19. Cromatograma de estándar 4 Penicilina G Potásica (Precisión del método)

<Chromatogram>



<Summary Report>

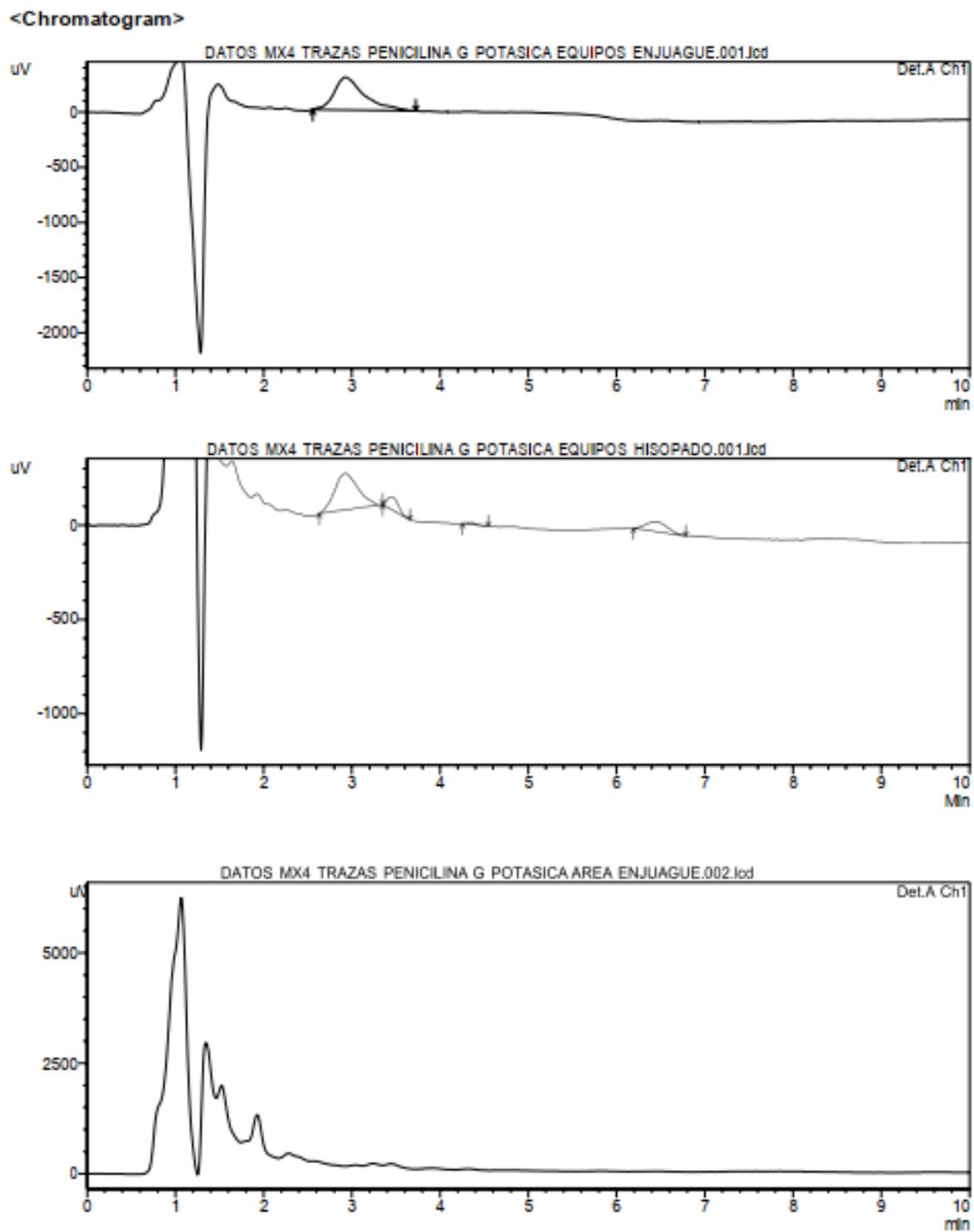
<< Detector A >>

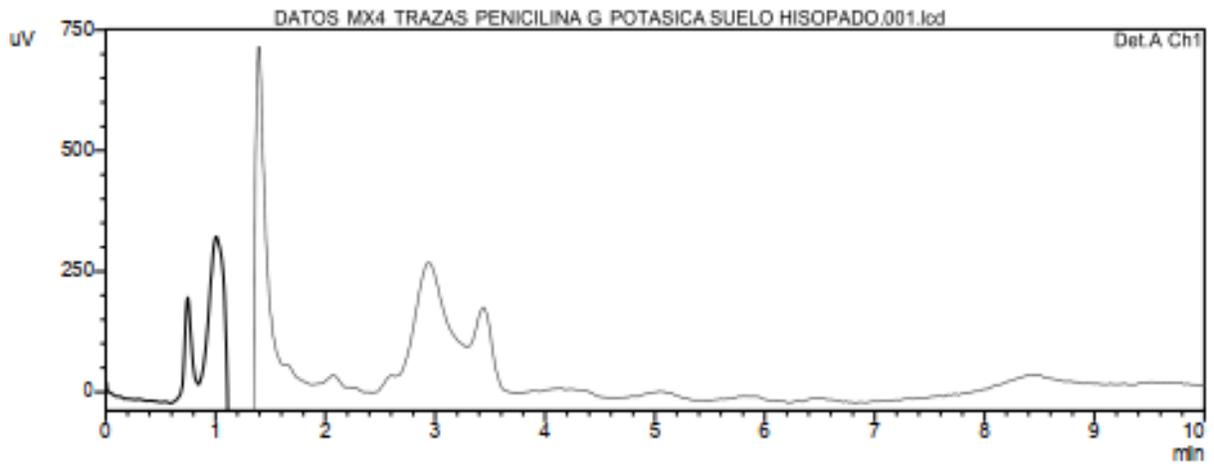
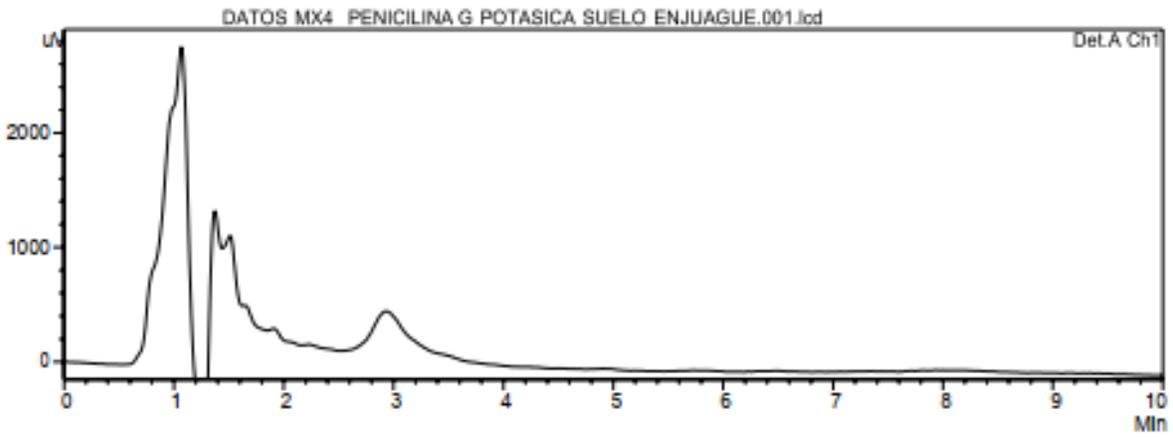
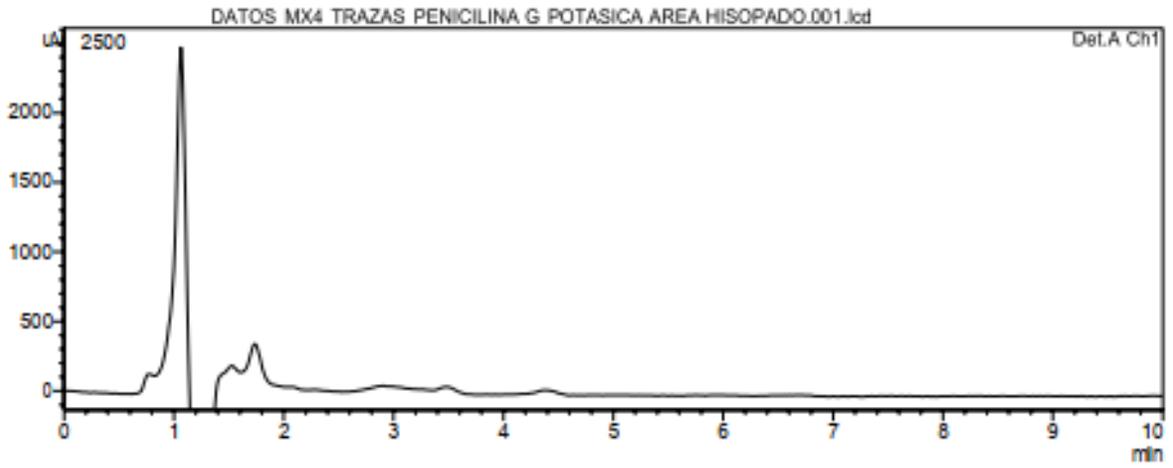
ID#1 Compound Name: Penicilina G Potásica

Title	Ret. Time	Area	Conc.	Units	Vial#	Tailing Facto
DATOS PENICILINA G POTASICA PRECISION 1	3.785	87955	0.004	mg/mL	24	0.811
Average	3.785	87955	0.004			0.811
%RSD	0.000	0.000	0.000			0.000
Maximum	3.785	87955	0.004			0.811
Minimum	3.785	87955	0.004			0.811
Standard Deviation	0.000	0	0.00			0.000

Theoretical Plate#
12792.154
12792.154
0.000
12792.154
12792.154
0.000

Figura 20. Cromatograma de Muestras 4 de Trazas de Penicilina G Potásica en Enjuague e Hisopado, para la precisión del método.





**<Summary Report>**

<< Detector A >>

ID#1 Compound Name: Penicilina G Potasica

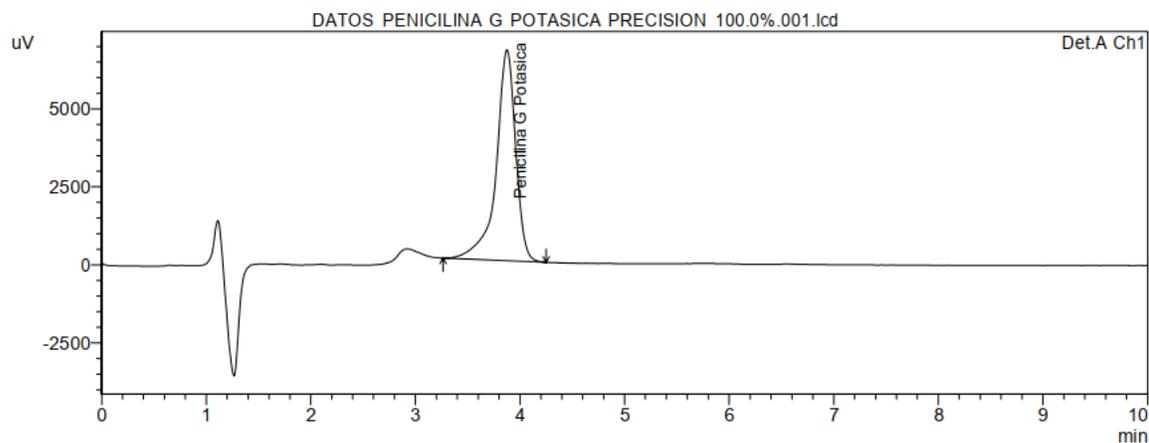
Title	Ret. Time	Area	Conc.	Units	Vial#	Tailing Facto
DATOS MX4 TRAZAS PENICILINA G POTASICA	0.000	0	0.00	mg/mL	25	0.000
DATOS MX4 TRAZAS PENICILINA G POTASICA	0.000	0	0.00	mg/mL	26	0.000
DATOS MX4 TRAZAS PENICILINA G POTASICA	0.000	0	0.00	mg/mL	27	0.000
DATOS MX4 TRAZAS PENICILINA G POTASICA	0.000	0	0.00	mg/mL	28	0.000
DATOS MX4 TRAZAS PENICILINA G POTASICA	0.000	0	0.00	mg/mL	29	0.000
DATOS MX4 TRAZAS PENICILINA G POTASICA	0.000	0	0.00	mg/mL	30	0.000
Average	0.000	0	0.00			0.000

Title	Ret. Time	Area	Conc.	Units	Vial#	Tailing Facto
%RSD	0.000	0	0.000			0.000
Maximum	0.000	0	0.000			0.000
Minimum	0.000	0	0.000			0.000
Standard Deviation	0.000	0	0.000			0.000

Theoretical Plate#
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000

Figura 21. Cromatograma de estándar 5 Penicilina G Potásica (Precisión del método)

<Chromatogram>



<Summary Report>

<< Detector A >>

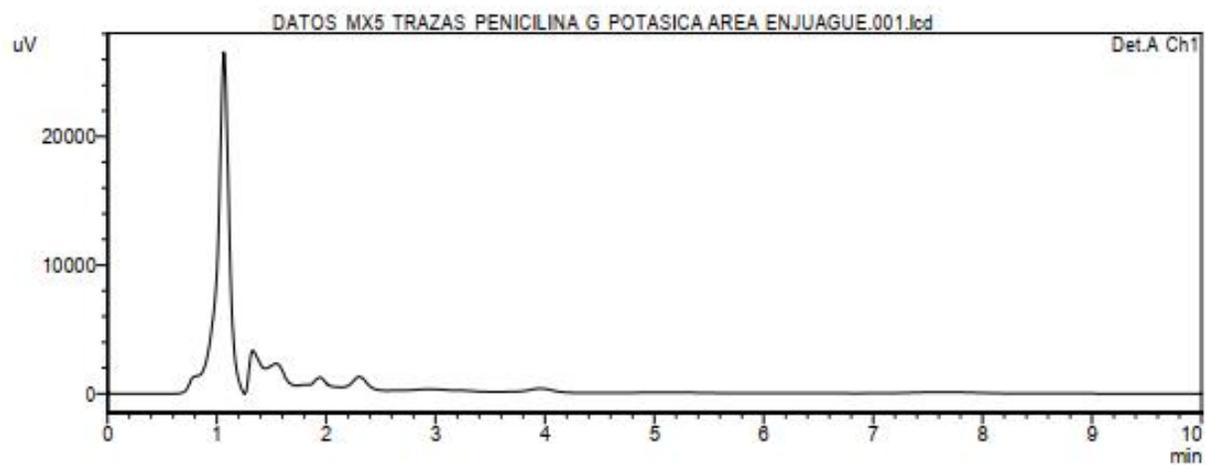
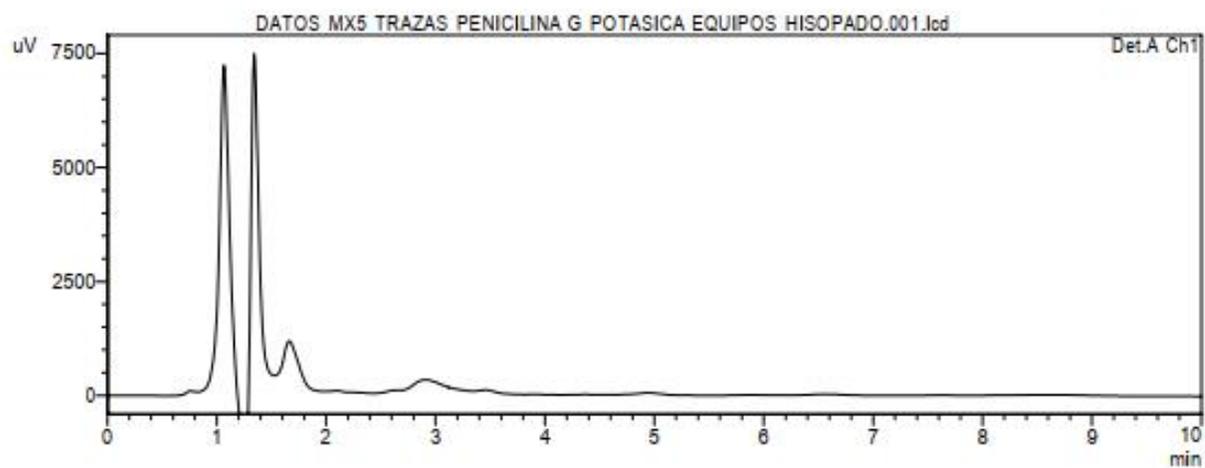
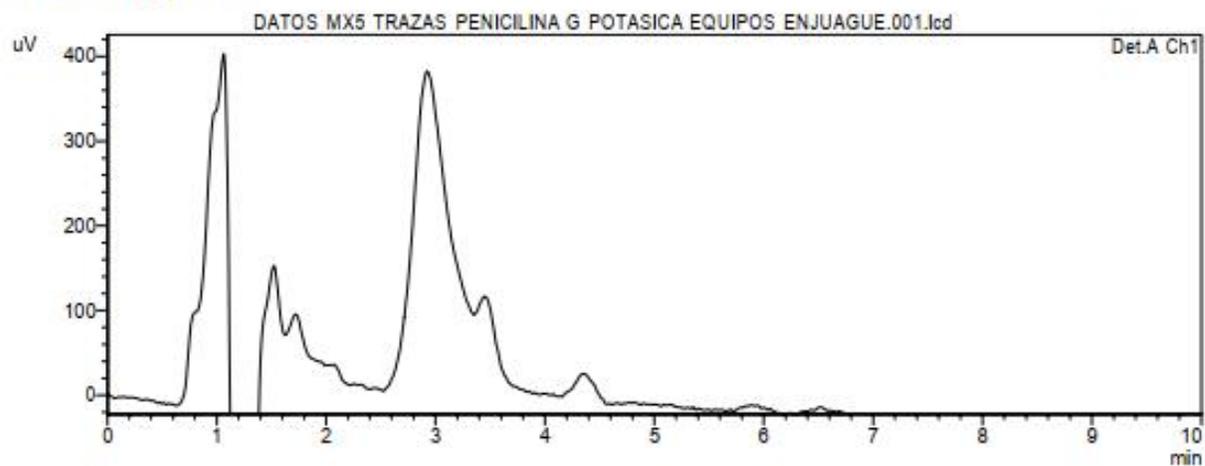
ID#1 Compound Name: Penicilina G Potásica

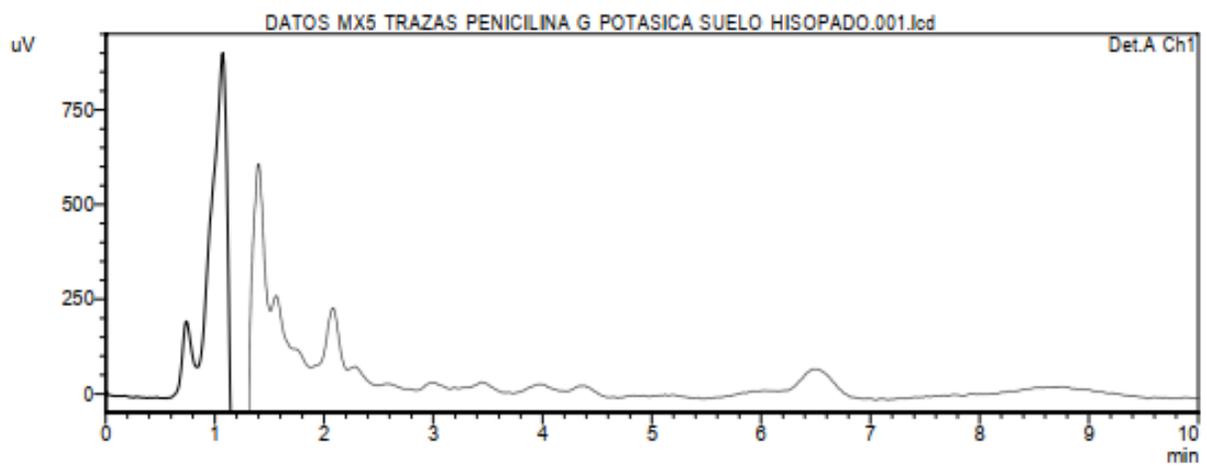
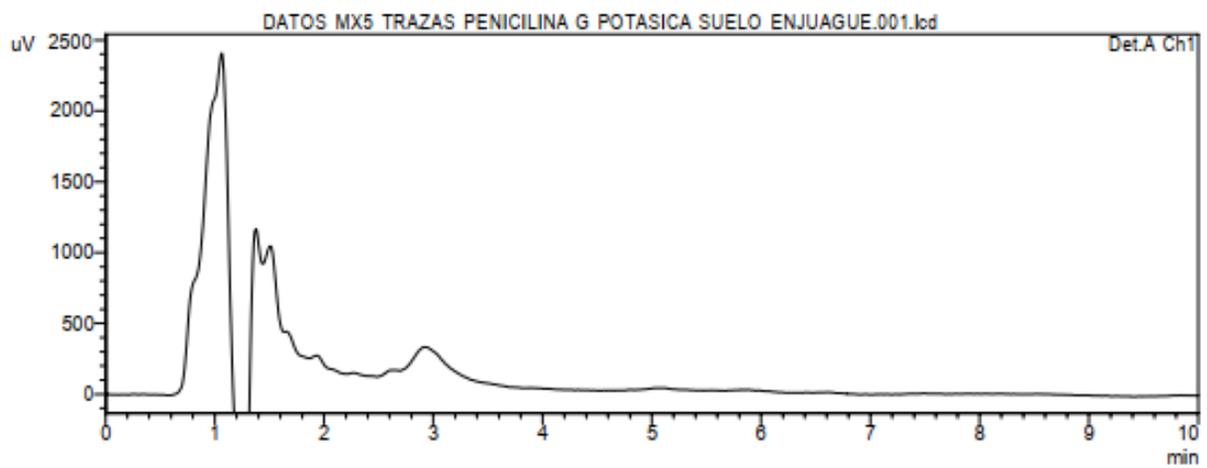
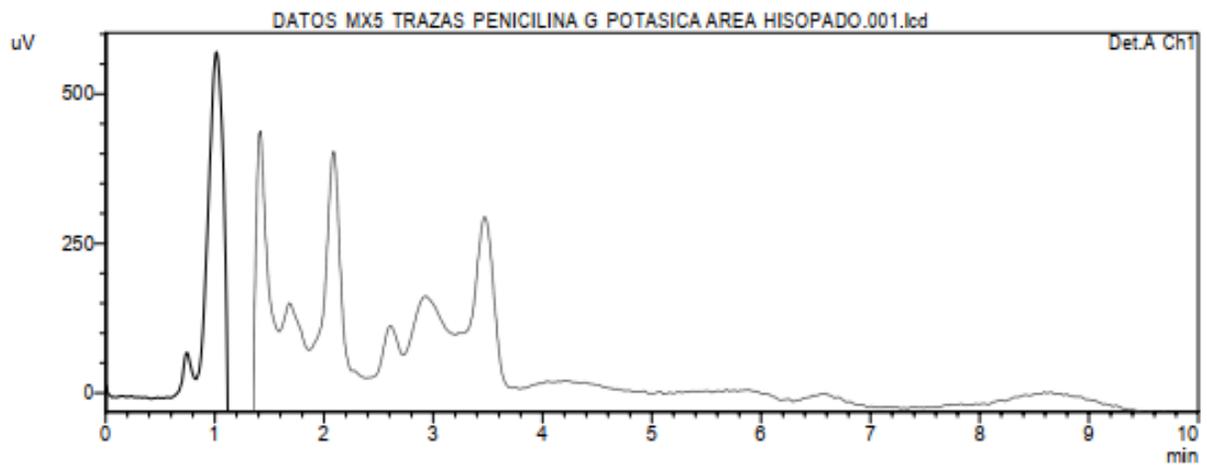
Title	Ret. Time	Area	Conc.	Units	Vial#	Tailing Facto
DATOS PENICILINA G POTASICA PRECISION 1	3.884	87626	0.004	mg/mL	31	0.816
Average	3.884	87626	0.004			0.816
%RSD	0.000	0.000	0.000			0.000
Maximum	3.884	87626	0.004			0.816
Minimum	3.884	87626	0.004			0.816
Standard Deviation	0.000	0	0.00			0.000

Theoretical Plate#
12228.876
12228.876
0.000
12228.876
12228.876
0.000

Figura 22. Cromatograma de Muestras 5 de Trazas de Penicilina G Potásica en Enjuague e Hisopado, para la precisión del método.

<Chromatogram>





<Summary Report>

<< Detector A >>

ID#1 Compound Name: Penicilina G Potasica

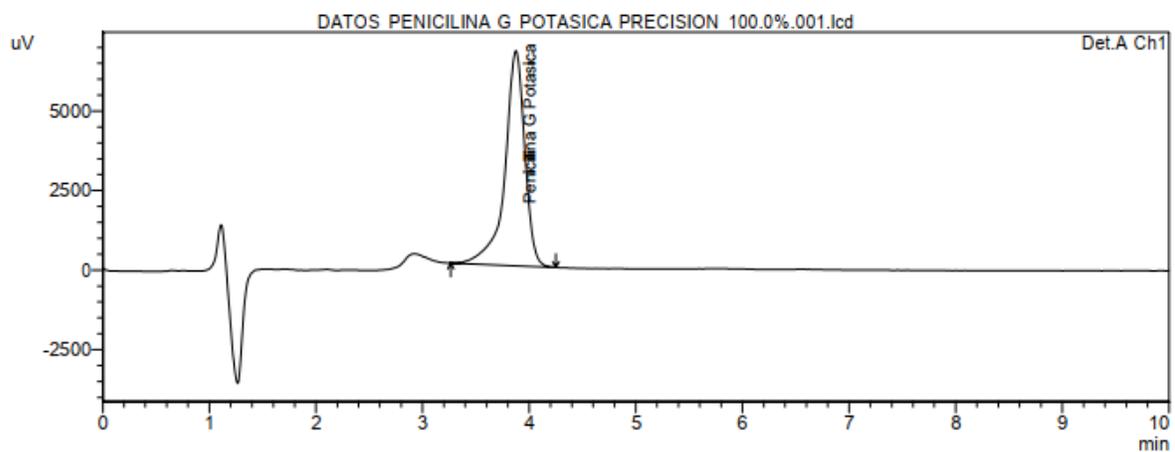
Title	Ret. Time	Area	Conc.	Units	Vial#	Tailing Facto
DATOS MX5 TRAZAS PENICILINA G POTASICA	0.000	0	0.00	mg/mL	32	0.000
DATOS MX5 TRAZAS PENICILINA G POTASICA	0.000	0	0.00	mg/mL	33	0.000
DATOS MX5 TRAZAS PENICILINA G POTASICA	0.000	0	0.00	mg/mL	34	0.000
DATOS MX5 TRAZAS PENICILINA G POTASICA	0.000	0	0.00	mg/mL	35	0.000
DATOS MX5 TRAZAS PENICILINA G POTASICA	0.000	0	0.00	mg/mL	36	0.000
DATOS MX5 TRAZAS PENICILINA G POTASICA	0.000	0	0.00	mg/mL	37	0.000
Average	0.000	0	0.00			0.000

Title	Ret. Time	Area	Conc.	Units	Vial#	Tailing Facto
%RSD	0.000	0.000	0.000			0.000
Maximum	0.000	0	0.00			0.000
Minimum	0.000	0	0.00			0.000
Standard Deviation	0.000	0	0.00			0.000

Theoretical Plate#
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000

Figura 23. Cromatograma de estándar 6 Penicilina G Potásica (Precisión del método)

<Chromatogram>



<Summary Report>

<< Detector A >>

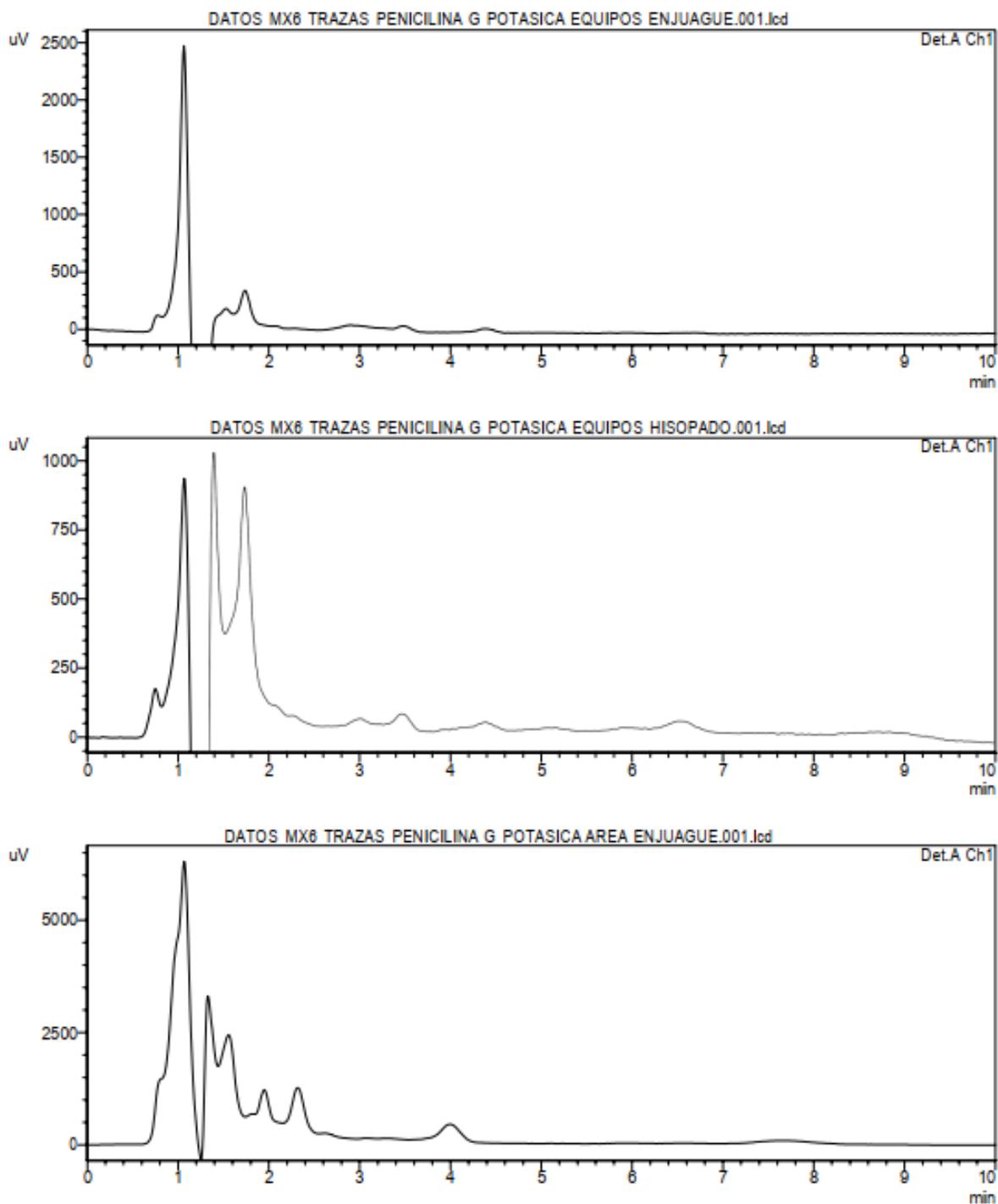
ID#1 Compound Name: Penicilina G Potásica

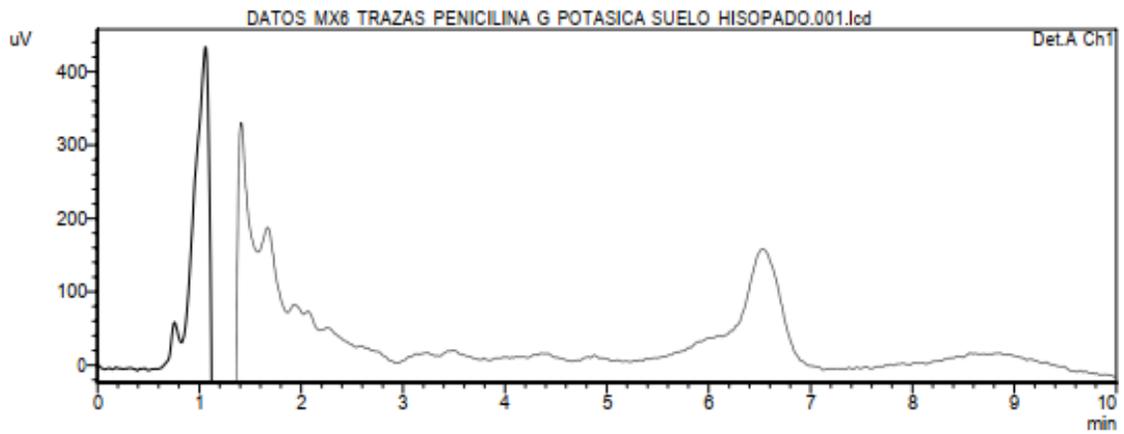
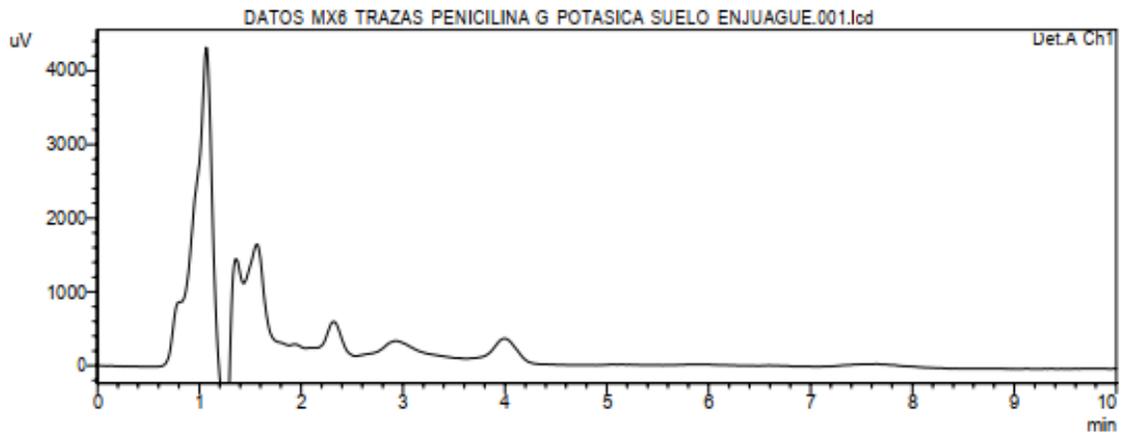
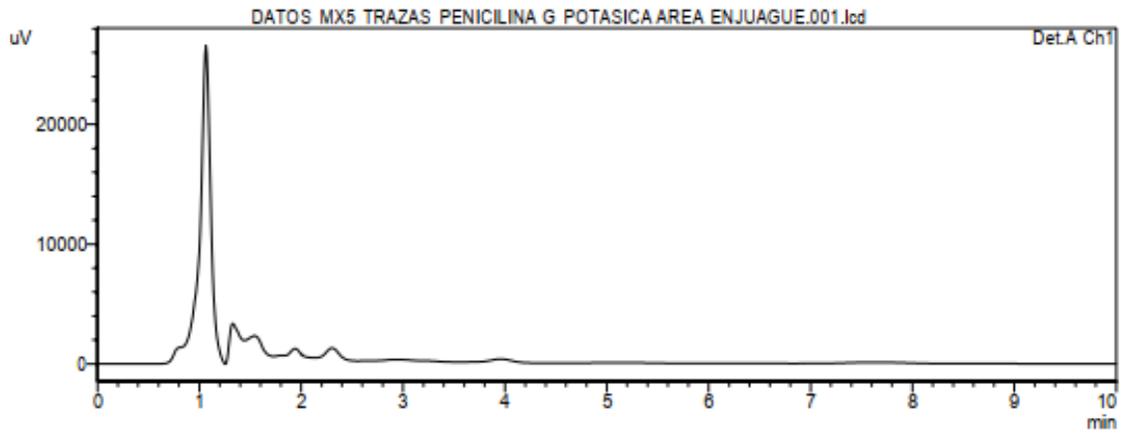
Title	Ret. Time	Area	Conc.	Units	Vial#	Tailing Factor
DATOS PENICILINA G POTASICA PRECISION 1	3.777	88412	0.004	mg/mL	38	0.816
Average	3.777	88412	0.004			0.816
%RSD	0.000	0.000	0.000			0.000
Maximum	3.777	88412	0.004			0.816
Minimum	3.777	88412	0.004			0.816
Standard Deviation	0.000	0	0.00			0.000

Theoretical Plate#
12385.925
12385.925
0.000
12385.925
12385.925
0.000

Figura 24. Cromatograma de Muestras 6 de Trazas de Penicilina G Potásica en Enjuague e Hisopado, para la precisión del método.

<Chromatogram>





## <Summary Report>

<< Detector A >>

ID#1 Compound Name: Penicilina G Potasica

Title	Ret. Time	Area	Conc.	Units	Vial#	Tailing Facto
DATOS MX6 TRAZAS PENICILINA G POTASICA	0.000	0	0.00	mg/mL	39	0.000
DATOS MX6 TRAZAS PENICILINA G POTASICA	0.000	0	0.00	mg/mL	40	0.000
DATOS MX6 TRAZAS PENICILINA G POTASICA	0.000	0	0.00	mg/mL	41	0.000
DATOS MX5 TRAZAS PENICILINA G POTASICA	0.000	0	0.00	mg/mL	42	0.000
DATOS MX6 TRAZAS PENICILINA G POTASICA	0.000	0	0.00	mg/mL	43	0.000
DATOS MX6 TRAZAS PENICILINA G POTASICA	0.000	0	0.00	mg/mL	44	0.000
Average	0.000	0	0.00			0.000

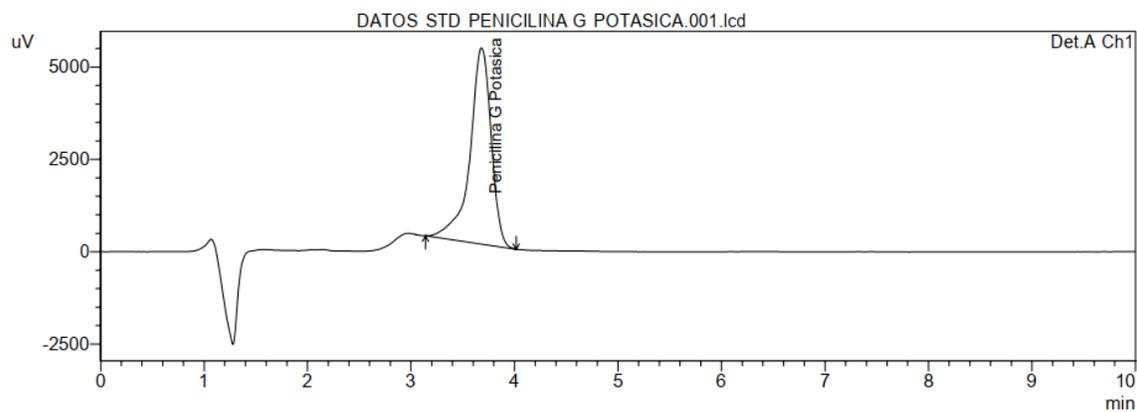
Title	Ret. Time	Area	Conc.	Units	Vial#	Tailing Facto
%RSD	0.000	0.000	0.000			0.000
Maximum	0.000	0	0.00			0.000
Minimum	0.000	0	0.00			0.000
Standard Deviation	0.000	0	0.00			0.000

Theoretical Plate#
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000

## ANEXO 4. EXACTITUD DEL MÉTODO.

Figura 25. Cromatograma de estándar 1 de Penicilina G Potásica, parámetro Exactitud

### <Chromatogram>



### <Summary Report>

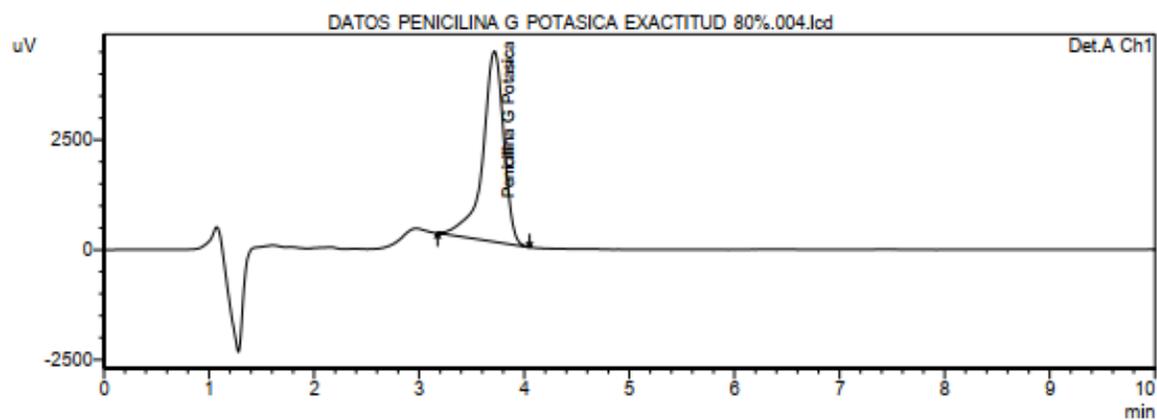
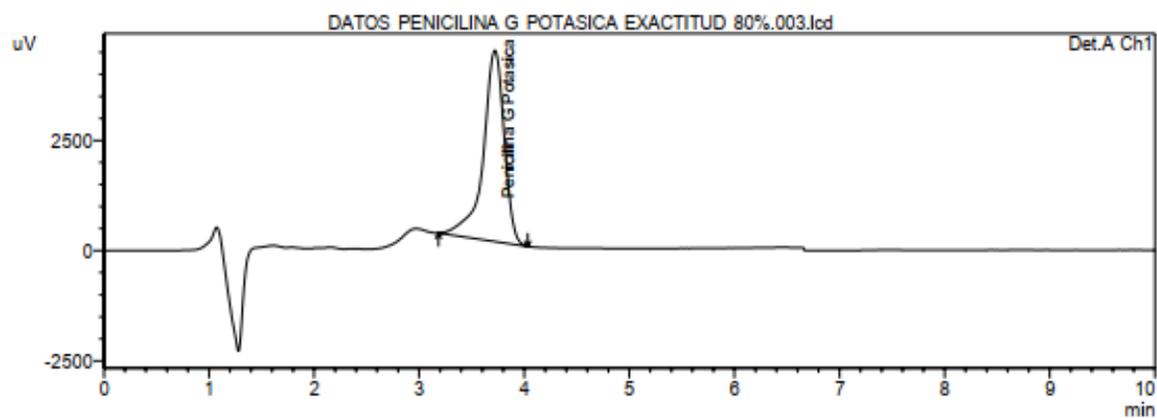
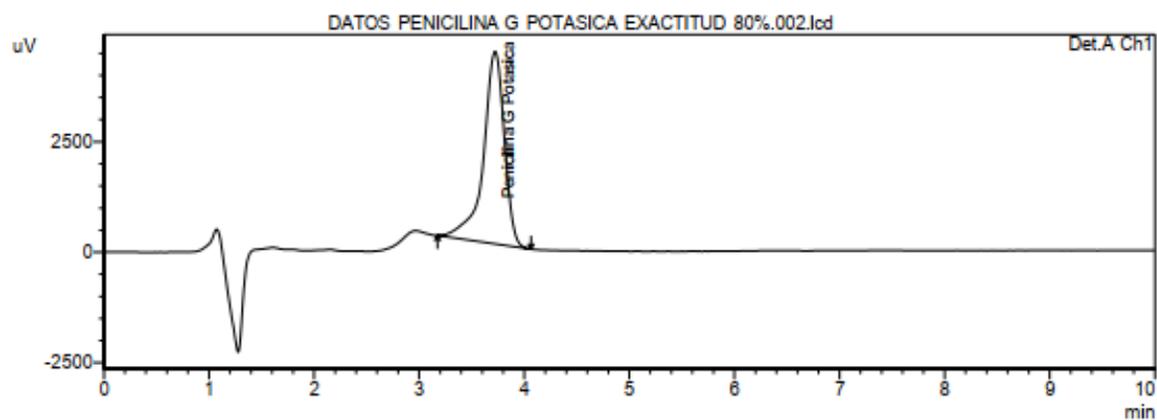
<< Detector A >>

ID#1 Compound Name: Penicilina G Potasica

Title	Ret. Time	Area	Conc.	Via#	Tailing Facto	Theoretical Plate#
DATOS STD PENICILINA G POTASICA.001.	3.678	75798	0.0032	2	0.800	14734.746
Average	3.678	75798	0.0032		0.800	14734.746
%RSD	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000
Maximum	3.678	75798	0.0032		0.800	14734.746
Minimum	3.678	75798	0.0032		0.800	14734.746
Standard Deviation	0.000	0	0.000		0.000	0.000

Figura 26. Cromatograma de Muestra 80.0% (0.0032 mg/mL) de Penicilina G Potásica, parámetro Exactitud

<Chromatogram>



## <Summary Report>

<< Detector A >>

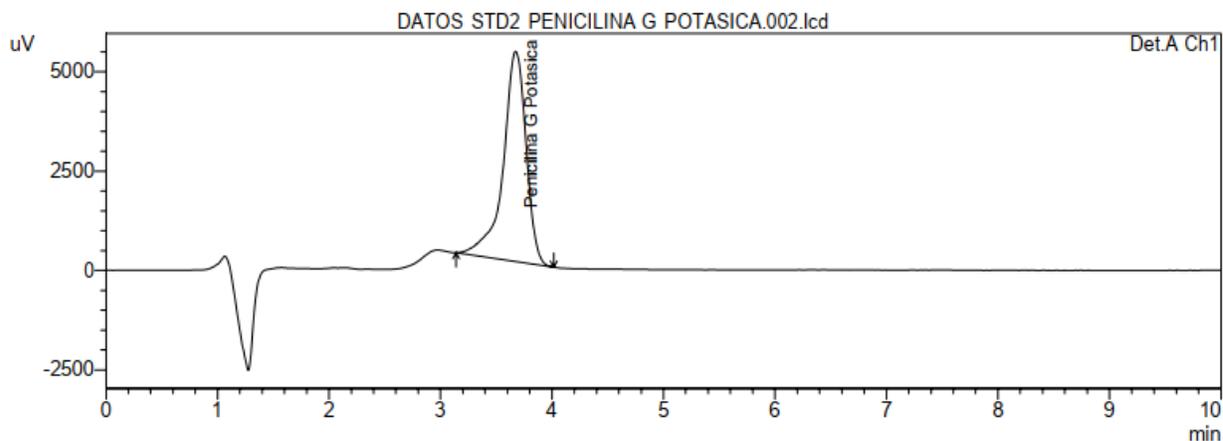
ID#1 Compound Name: Penicilina G Potasica

Title	Ret. Time	Area	Conc.	Vial#	Tailing Facto	Theoretical Plate#
DATOS PENICILINA G POTASICA EXACTITUD 8	3.719	60549	99.853	3	0.788	1883.319
DATOS PENICILINA G POTASICA EXACTITUD 8	3.716	60350	99.524	3	0.789	1863.905
DATOS PENICILINA G POTASICA EXACTITUD 8	3.711	60375	99.566	3	0.790	1858.343
Average	3.715	60425	99.648		0.789	1868.523
%RSD	0.100	0.179	0.179		0.175	0.702

Title	Ret. Time	Area	Conc.	Vial#	Tailing Facto	Theoretical Plate#
Maximum	3.719	60549	99.853		0.790	1883.319
Minimum	3.711	60350	99.524		0.788	1858.343
Standard Deviation	0.004	108	0.179		0.001	13.113

Figura 27. Cromatograma de estándar 2 de Penicilina G Potásica, parámetro de Exactitud

<Chromatogram>



<Summary Report>

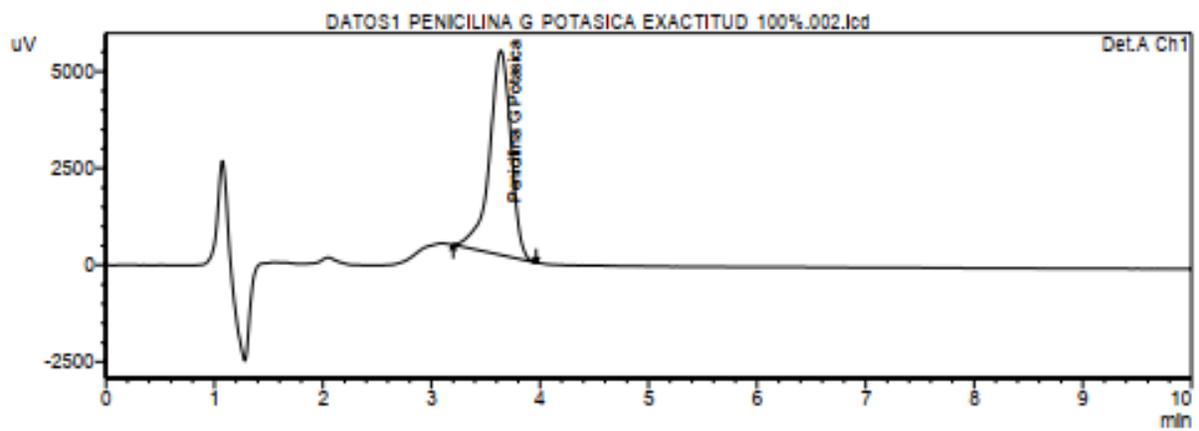
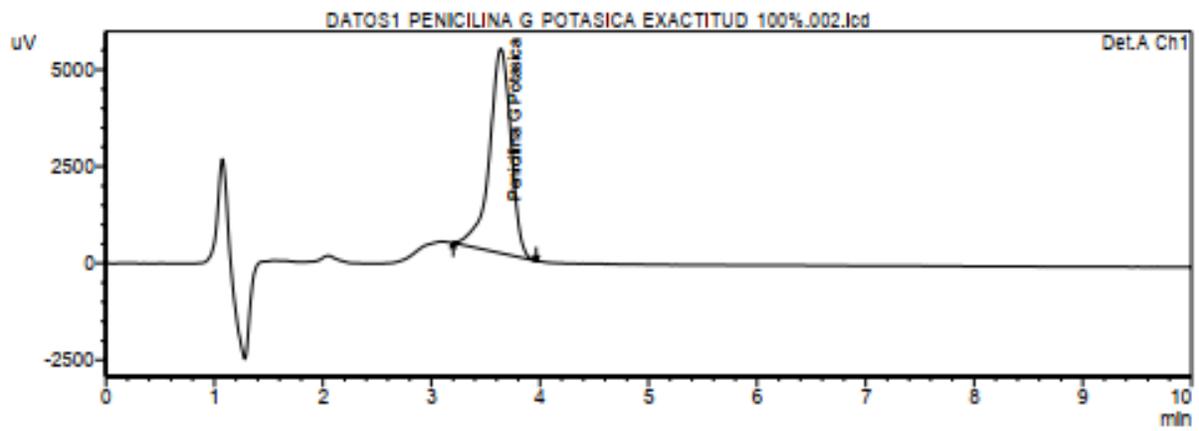
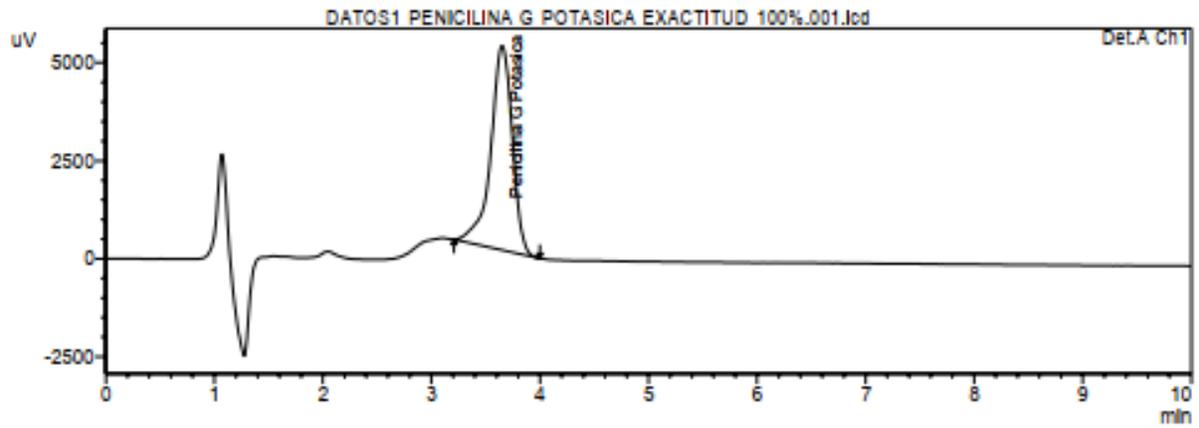
<< Detector A >>

ID#1 Compound Name: Penicilina G Potasica

Title	Ret. Time	Area	Conc.	Vial#	Tailing Facto	Theoretical Plate#
DATOS STD2 PENICILINA G POTASICA.002.lcd	3.671	75705	0.004	4	0.802	14720.233
Average	3.671	75705	0.004		0.802	14720.233
%RSD	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000
Maximum	3.671	75705	0.004		0.802	14720.233
Minimum	3.671	75705	0.004		0.802	14720.233
Standard Deviation	0.000	0	0.000		0.000	0.000

Figura 28. Cromatograma de Muestra 100.0% (0.0040 mg/mL) de Penicilina G Potásica, parámetro Exactitud

<Chromatogram>



## <Summary Report>

<< Detector A >>

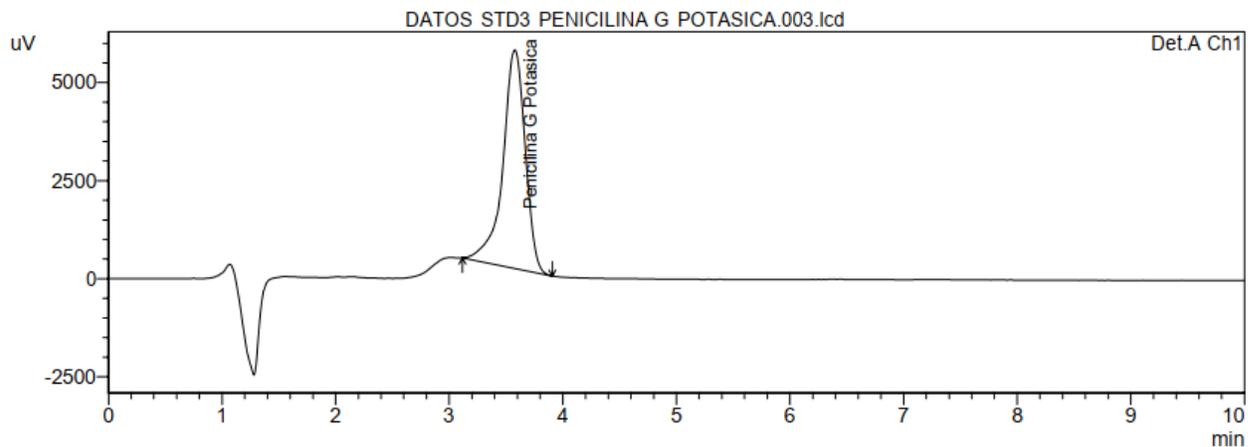
ID#1 Compound Name: Penicilina G Potasica

Title	Ret. Time	Area	Conc.	Vial#	Tailing Facto	Theoretical Plate#
DATOS1 PENICILINA G POTASICA EXACTITUD	3.649	72194	95.362	8	0.843	1722.346
DATOS1 PENICILINA G POTASICA EXACTITUD	3.635	72431	95.676	8	0.848	1736.511
DATOS1 PENICILINA G POTASICA EXACTITUD	3.635	72431	95.676	8	0.848	1736.511
Average	3.640	72352	95.571		0.847	1731.789
%RSD	0.220	0.190	0.190		0.333	0.472

Title	Ret. Time	Area	Conc.	Vial#	Tailing Facto	Theoretical Plate#
Maximum	3.649	72431	95.676		0.848	1736.511
Minimum	3.635	72194	95.362		0.843	1722.346
Standard Deviation	0.008	137	0.181		0.003	8.178

Figura 29. Cromatograma de estándar 3 de Penicilina G Potásica, parámetro de Exactitud

<Chromatogram>



<Summary Report>

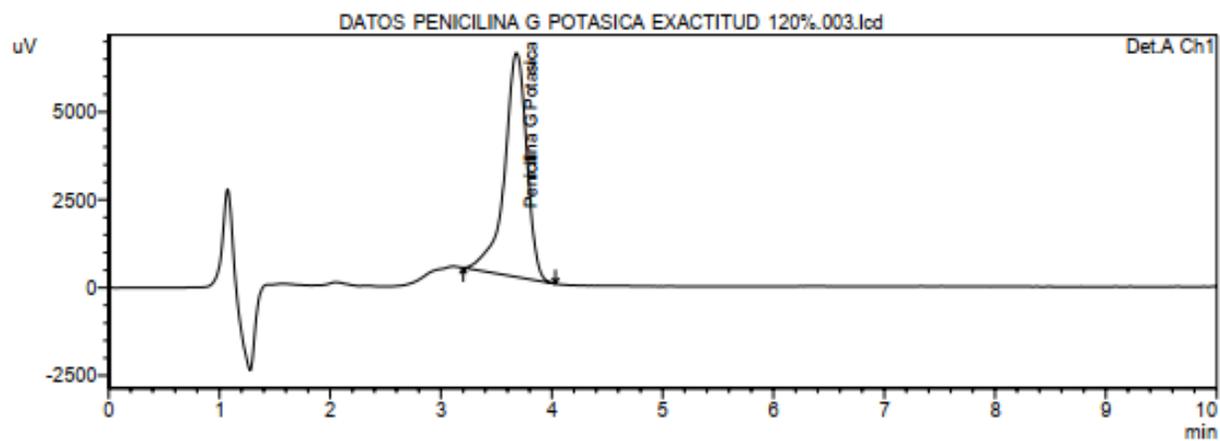
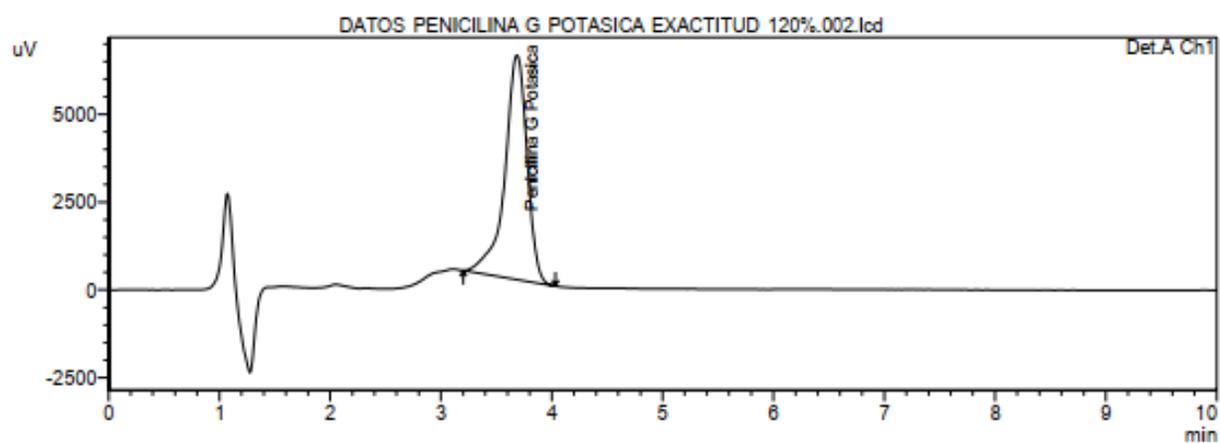
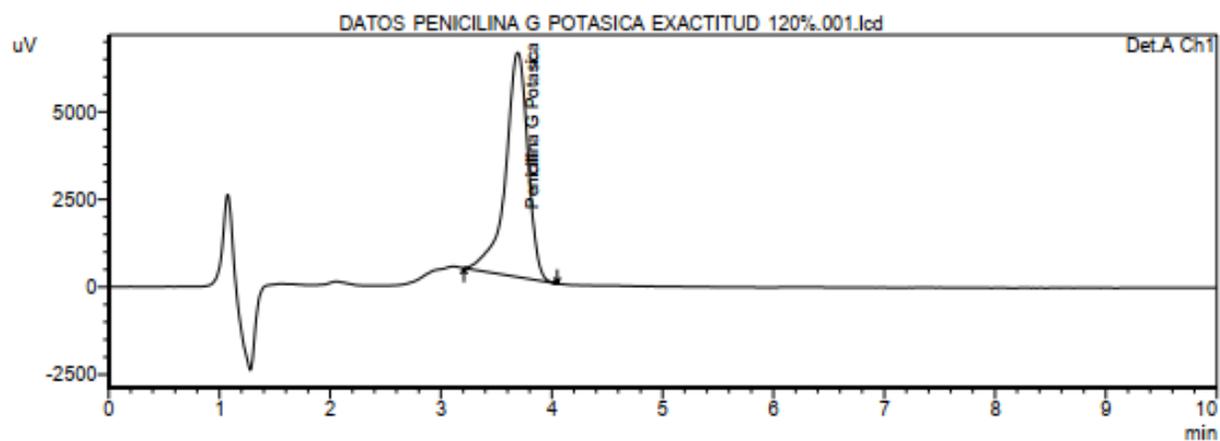
<< Detector A >>

ID#1 Compound Name: Penicilina G Potasica

Title	Ret. Time	Area	Conc.	Via#	Tailing Factor	Theoretical Plate#
DATOS STD3 PENICILINA G POTASICA.003.lcd	3.574	76372	0.0048	6	0.840	14688.311
Average	3.574	76372	0.0048		0.840	14688.311
%RSD	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000
Maximum	3.574	76372	0.0048		0.840	14688.311
Minimum	3.574	76372	0.0048		0.840	14688.311
Standard Deviation	0.000	0	0.000		0.000	0.000

Figura 30. Cromatograma de Muestra 120.0% (0.0042 mg/mL) de Penicilina G Potásica, parámetro Exactitud

<Chromatogram>



## <Summary Report>

<< Detector A >>

ID#1 Compound Name: Penicilina G Potasica

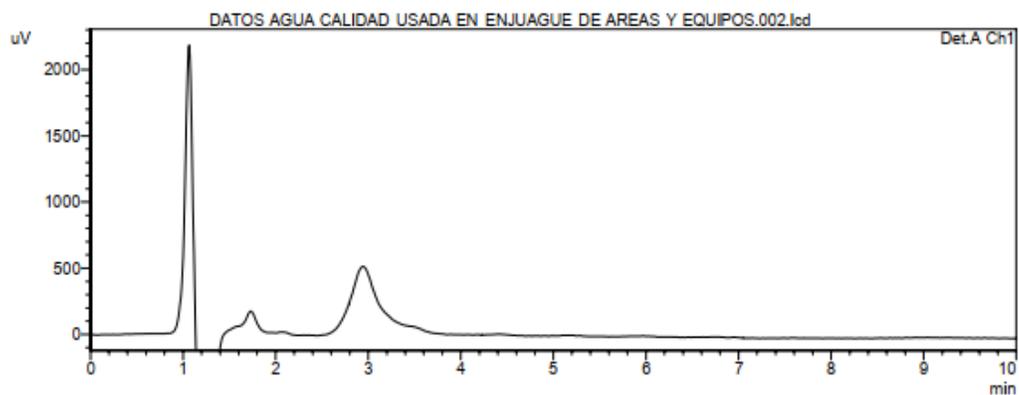
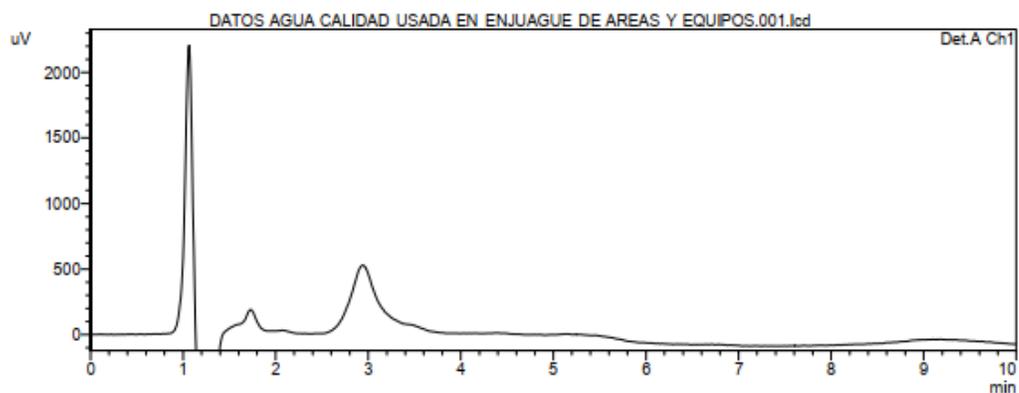
Title	Ret. Time	Area	Conc.	Vial#	Tailing Facto	Theoretical Plate#
DATOS PENICILINA G POTASICA EXACTITUD 1	3.690	89897	98.091	5	0.812	1773.384
DATOS PENICILINA G POTASICA EXACTITUD 1	3.681	89460	97.615	5	0.815	1764.391
DATOS PENICILINA G POTASICA EXACTITUD 1	3.678	89269	97.406	5	0.818	1755.509
Average	3.683	89542	97.704		0.815	1764.428
%RSD	0.170	0.359	0.359		0.397	0.507

Title	Ret. Time	Area	Conc.	Vial#	Tailing Facto	Theoretical Plate#
Maximum	3.690	89897	98.091		0.818	1773.384
Minimum	3.678	89269	97.406		0.812	1755.509
Standard Deviation	0.006	322	0.351		0.003	8.937

## ANEXO 5. ESPECIFICIDAD

Figura 31. Cromatograma del diluyente (agua destilada)

### <Chromatogram>



### <Summary Report>

<< Detector A >>

ID#1 Compound Name: Blanco

Title	Ret. Time	Area	Conc.	Units	Vial#	Tailing Facto
DATOS AGUA CALIDAD USADA EN ENJUAGUE	0.000	0	0.00	mg/L	80	0.000
DATOS AGUA CALIDAD USADA EN ENJUAGUE	0.000	0	0.00	mg/L	80	0.000
Average	0.000	0	0.00			0.000
%RSD	0.000	0.000	0.000			0.000
Maximum	0.000	0	0.00			0.000
Minimum	0.000	0	0.00			0.000
Standard Deviation	0.000	0	0.00			0.000

Theoretical Plate#
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000

Figura 32. Cromatograma de Estándar de Penicilina G Potásica Especificidad

<Chromatogram>

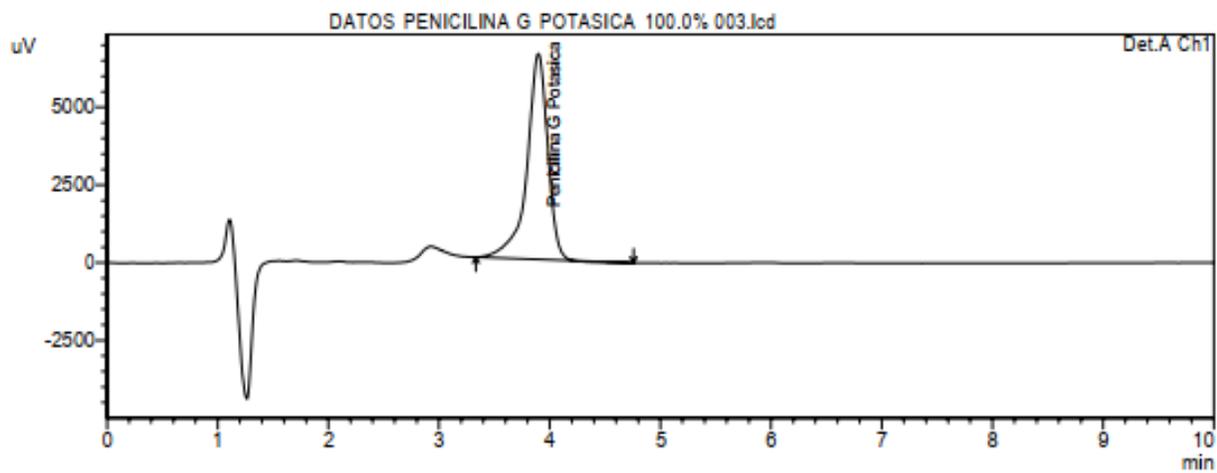
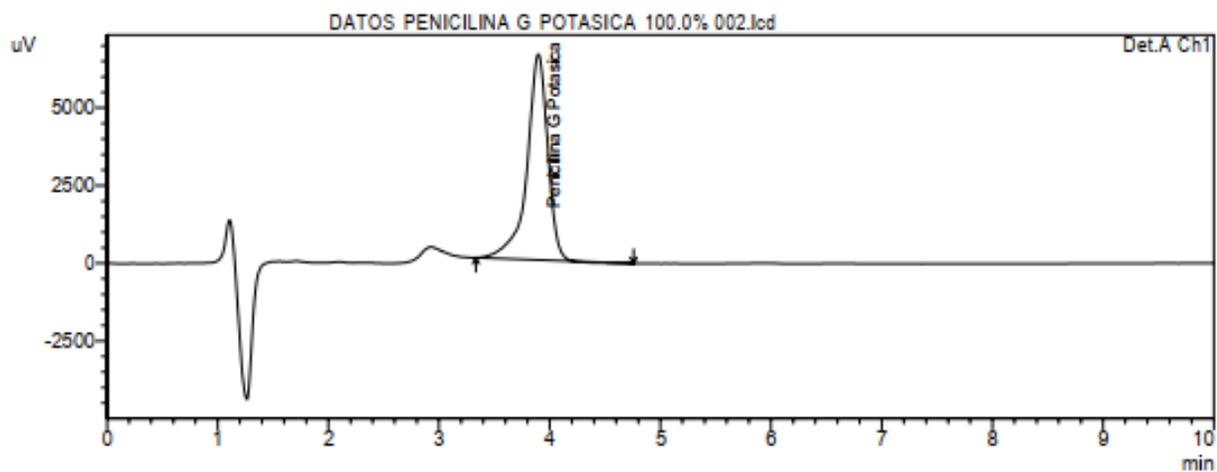
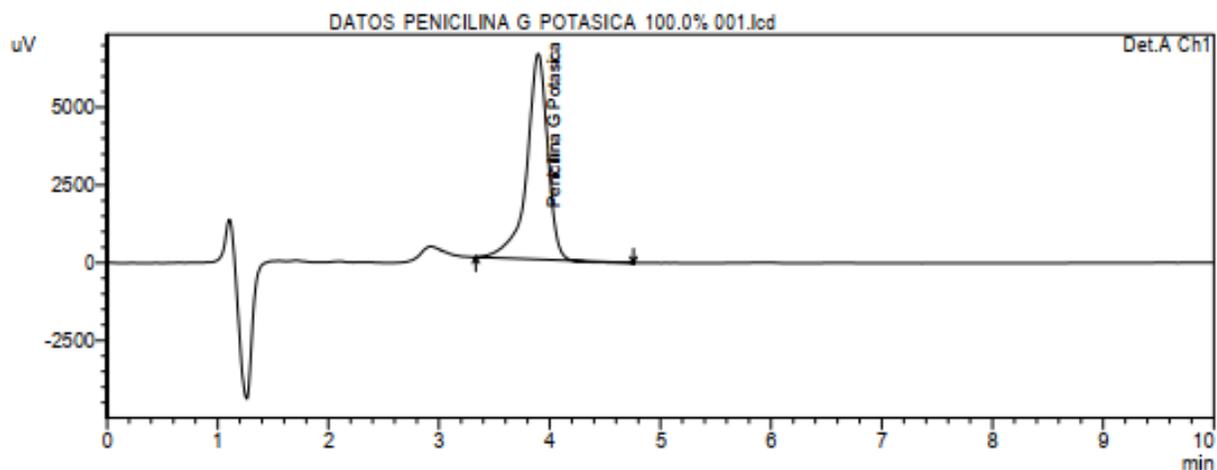
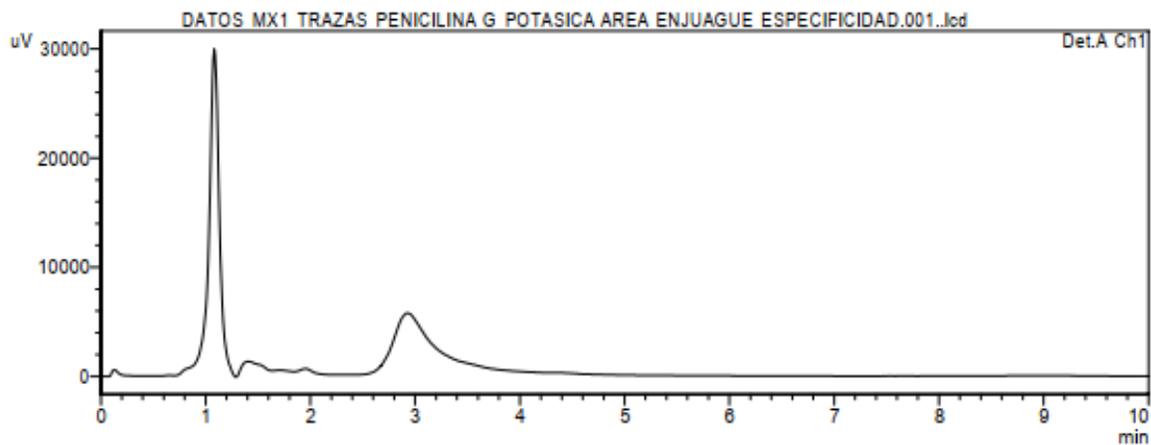
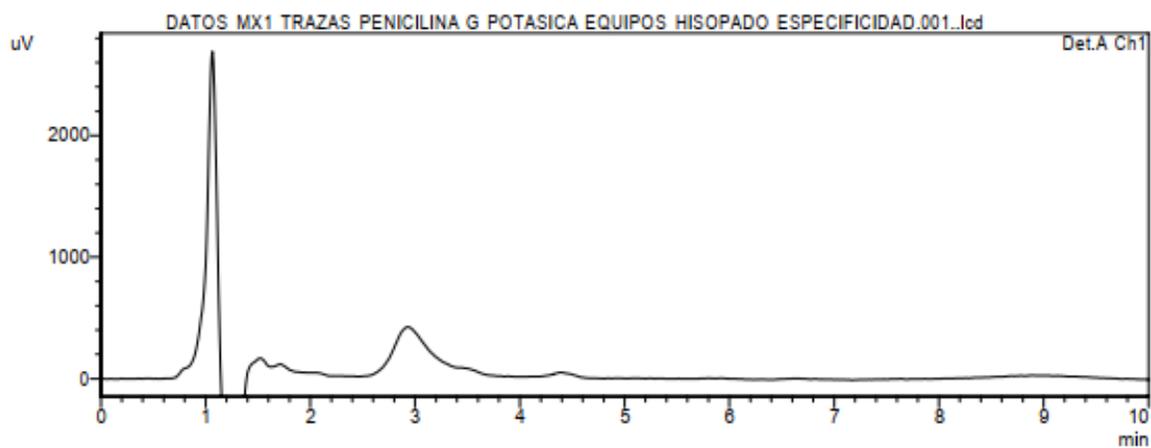
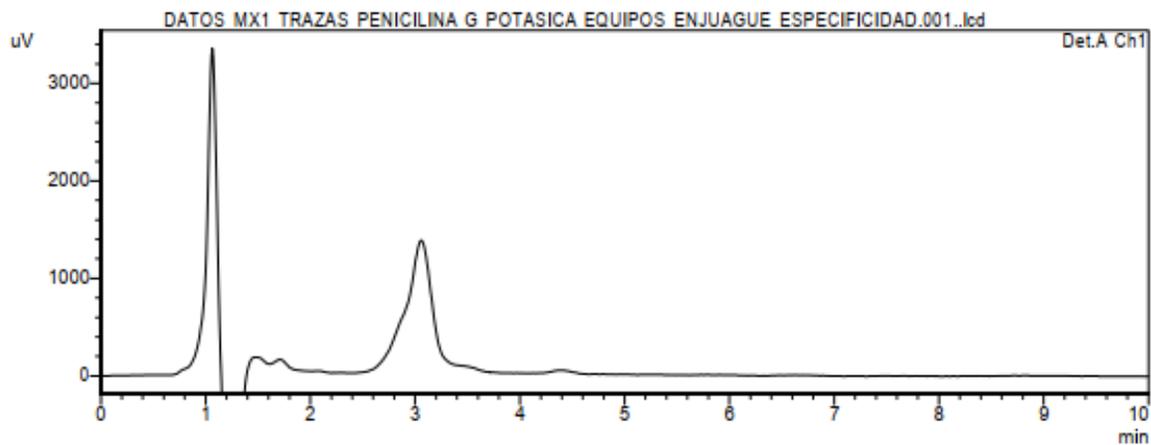
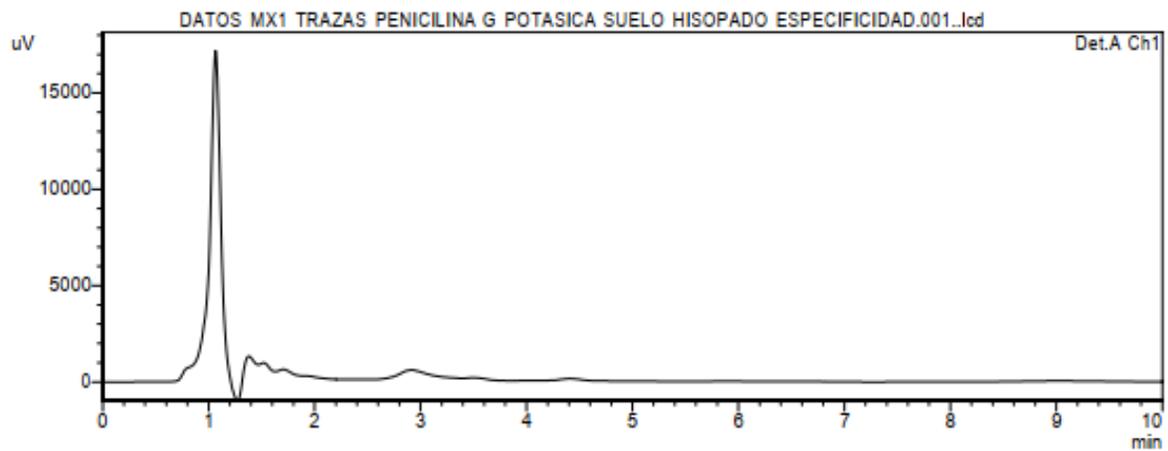
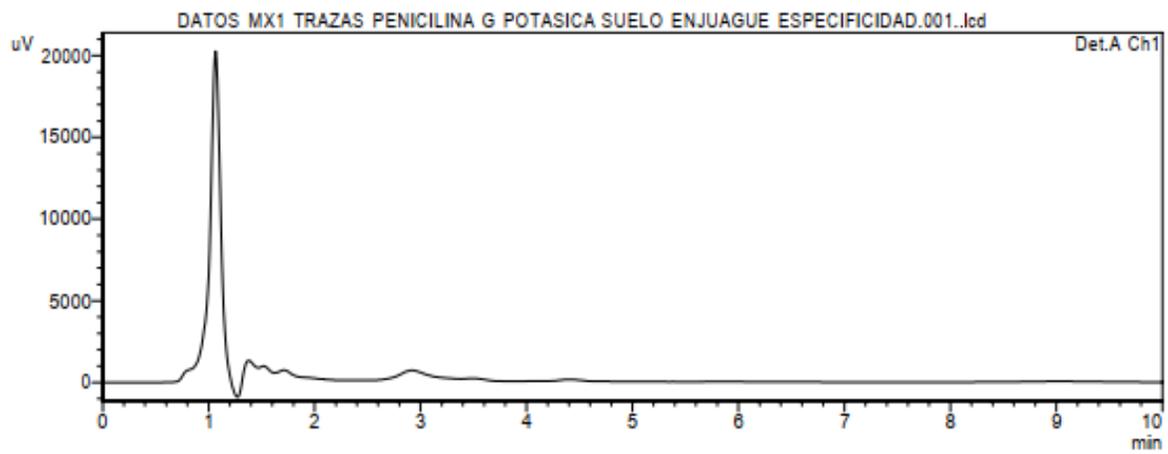
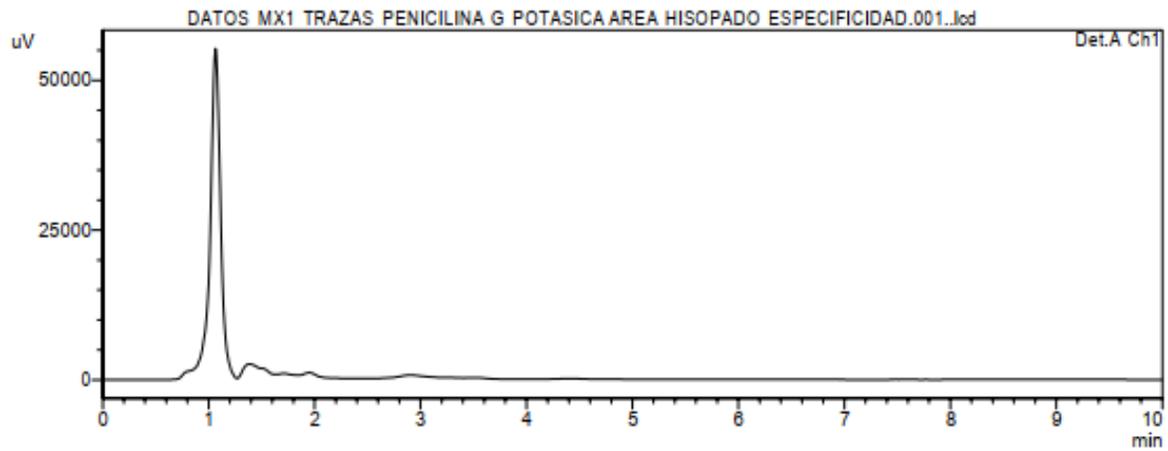


Figura 33. Cromatogramas de Muestras 1 de Penicilina G Potásica, para el parámetro de Especificidad

<Chromatogram>





**<Summary Report>**

<< Detector A >>

ID#1 Compound Name: Penicilina G Potasica

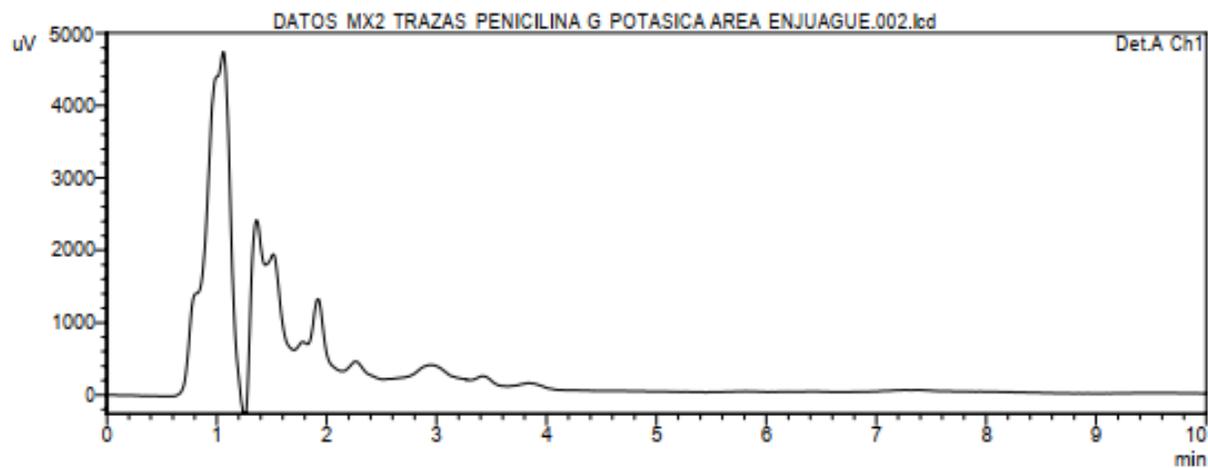
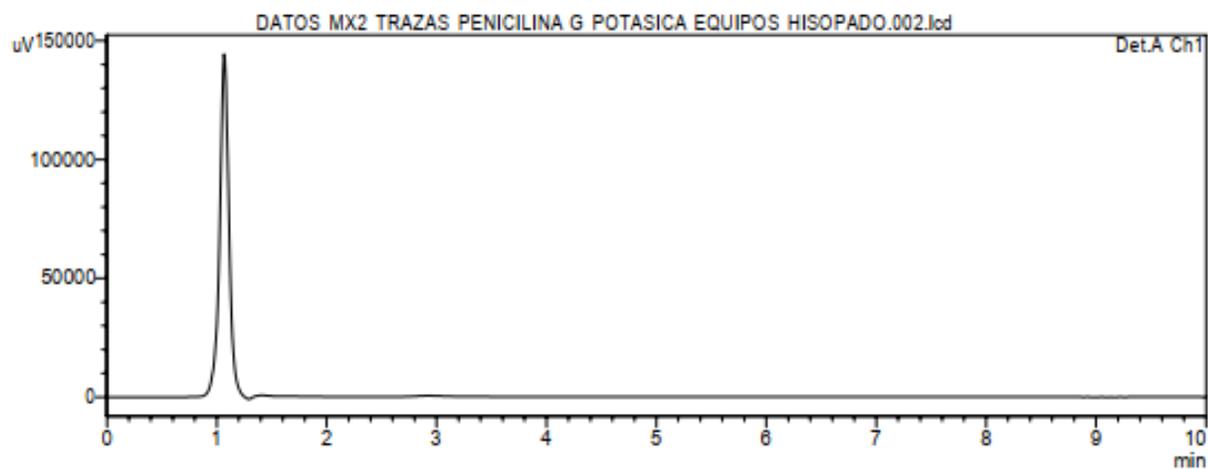
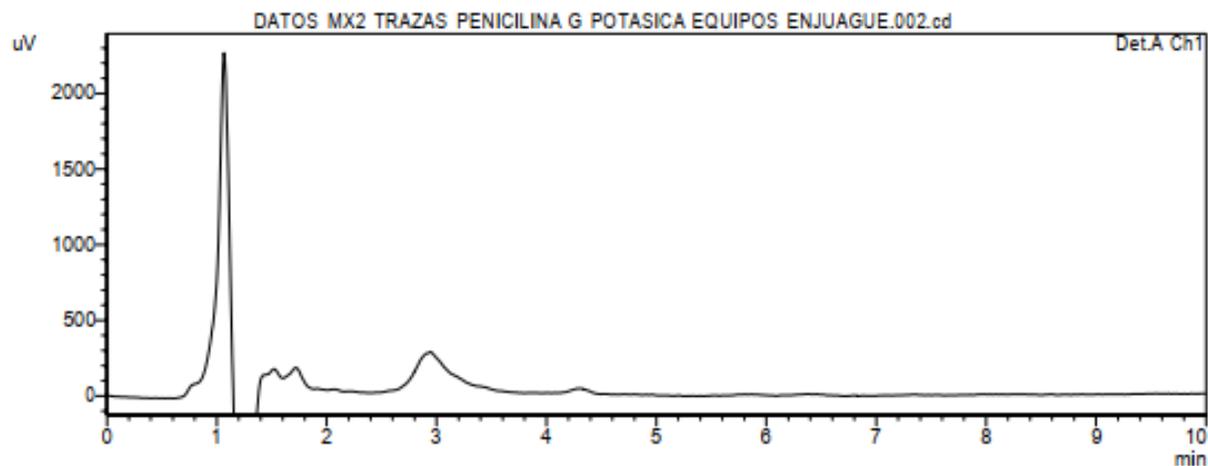
Title	Ret. Time	Area	Conc.	Units	Vial#	Tailing Facto
DATOS MX1 TRAZAS PENICILINA G POTASICA	0.000	0	0.00	mg/mL	48	0.000
DATOS MX1 TRAZAS PENICILINA G POTASICA	0.000	0	0.00	mg/mL	49	0.000
DATOS MX1 TRAZAS PENICILINA G POTASICA	0.000	0	0.00	mg/mL	50	0.000
DATOS MX1 TRAZAS PENICILINA G POTASICA	0.000	0	0.00	mg/mL	51	0.000
DATOS MX1 TRAZAS PENICILINA G POTASICA	0.000	0	0.00	mg/mL	52	0.000
DATOS MX1 TRAZAS PENICILINA G POTASICA	0.000	0	0.00	mg/mL	53	0.000
Average	0.000	0	0.00			0.000

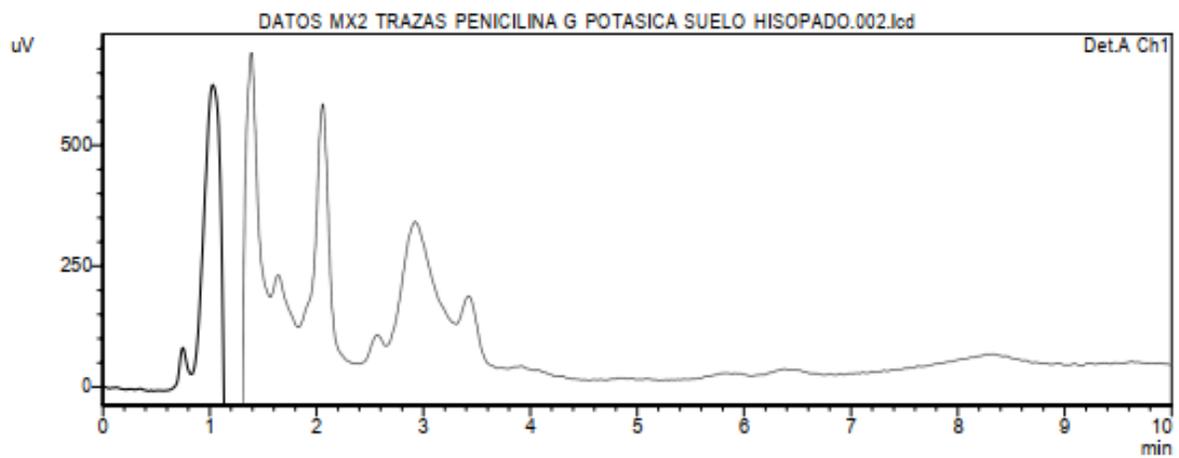
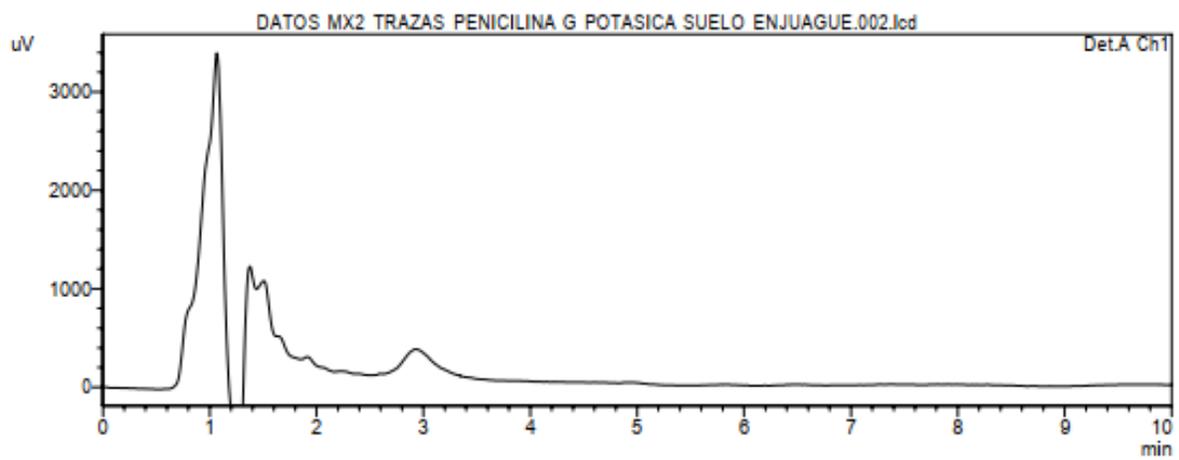
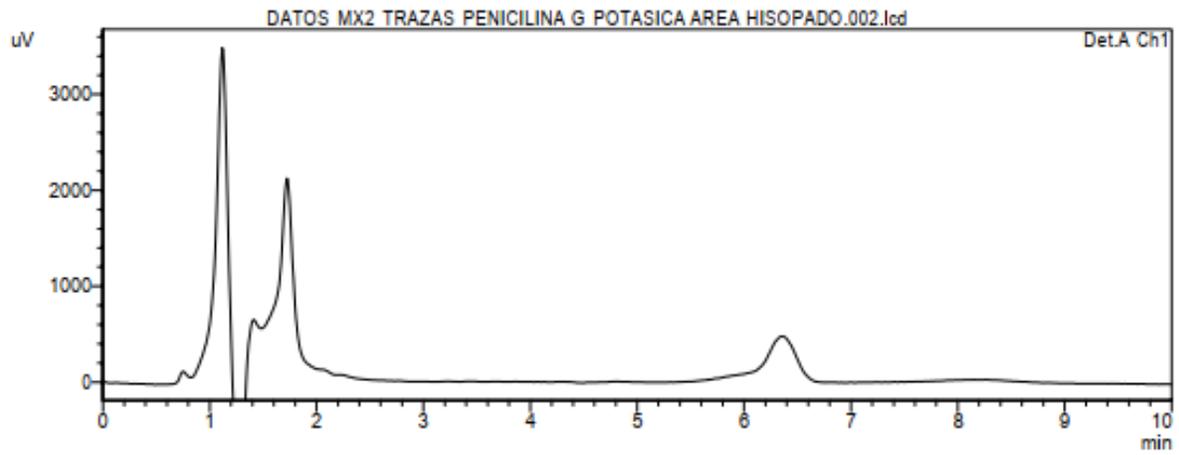
Title	Ret. Time	Area	Conc.	Units	Vial#	Tailing Facto
%RSD	0.000	0.000	0.000			0.000
Maximum	0.000	0	0.00			0.000
Minimum	0.000	0	0.00			0.000
Standard Deviation	0.000	0	0.00			0.000

Theoretical Plate#
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000

Figura 34. Cromatogramas de Muestras 2 de Penicilina G Potásica, para el parámetro de Especificidad

<Chromatogram>





## <Summary Report>

<< Detector A >>

ID#1 Compound Name: Penicilina G Potasica

Title	Ret. Time	Area	Conc.	Units	Vial#	Tailing Facto
DATOS MX2 TRAZAS PENICILINA G POTASICA	0.000	0	0.00	mg/mL	54	0.000
DATOS MX2 TRAZAS PENICILINA G POTASICA	0.000	0	0.00	mg/mL	55	0.000
DATOS MX2 TRAZAS PENICILINA G POTASICA	0.000	0	0.00	mg/mL	56	0.000
DATOS MX2 TRAZAS PENICILINA G POTASICA	0.000	0	0.00	mg/mL	57	0.000
DATOS MX2 TRAZAS PENICILINA G POTASICA	0.000	0	0.00	mg/mL	58	0.000
DATOS MX2 TRAZAS PENICILINA G POTASICA	0.000	0	0.00	mg/mL	59	0.000
Average	0.000	0	0.00			0.000

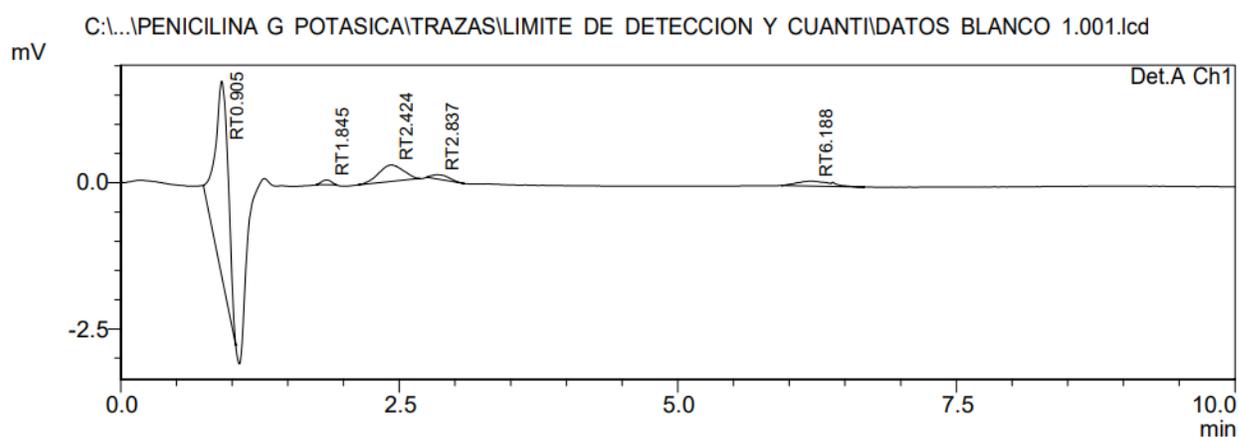
Title	Ret. Time	Area	Conc.	Units	Vial#	Tailing Facto
%RSD	0.000	0.000	0.000			0.000
Maximum	0.000	0	0.00			0.000
Minimum	0.000	0	0.00			0.000
Standard Deviation	0.000	0	0.00			0.000

Theoretical Plate#
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000
0.000

## ANEXO 6. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN Y DETECCIÓN

Figura 35. Cromatogramas de Blanco 1 de Penicilina G Potásica, para el límite de cuantificación y detección

### <Chromatogram>



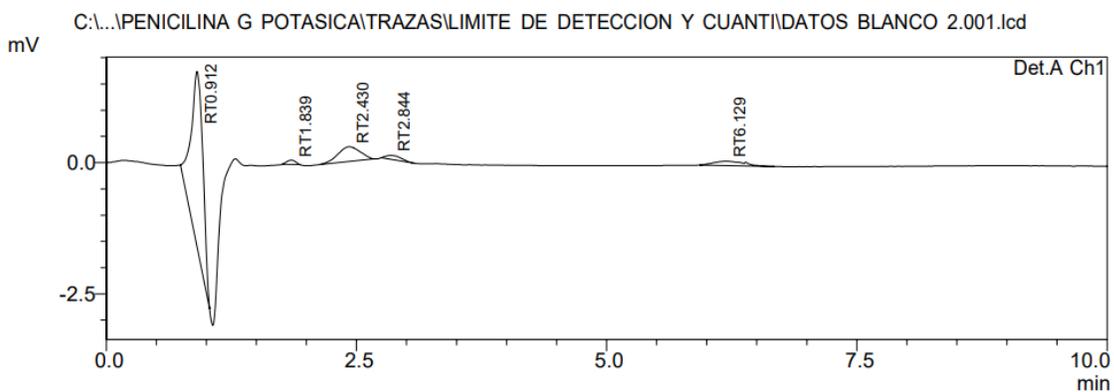
### <Results>

Detector A

ID#	Name	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Units
1	RT0.905	0.905	26781	3312	0.000	mg/μL
2	RT1.845	1.845	491	83	0.000	mg/μL
3	RT2.424	2.424	4348	282	0.000	mg/μL
4	RT2.837	2.837	832	73	0.000	mg/μL
5	RT6.188	6.188	1787	81	0.000	mg/μL

Figura 36. Cromatogramas de Blanco 2 de Penicilina G Potásica, para el límite de cuantificación y detección

<Chromatogram>



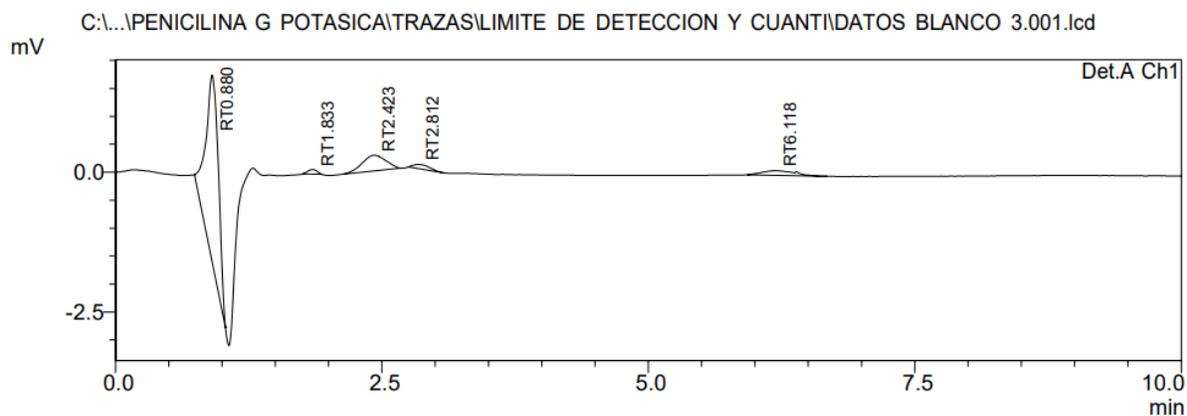
<Results>

Detector A

ID#	Name	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Units
1	RT0.912	0.912	26865	3979	0.000	mg/μL
2	RT1.839	1.839	474	102	0.000	mg/μL
3	RT2.430	2.430	4762	288	0.000	mg/μL
4	RT2.844	2.844	882	77	0.000	mg/μL
5	RT6.129	6.129	1519	71	0.000	mg/μL

Figura 37. Cromatogramas de Blanco 3 de Penicilina G Potásica, para el límite de cuantificación y detección

<Chromatogram>



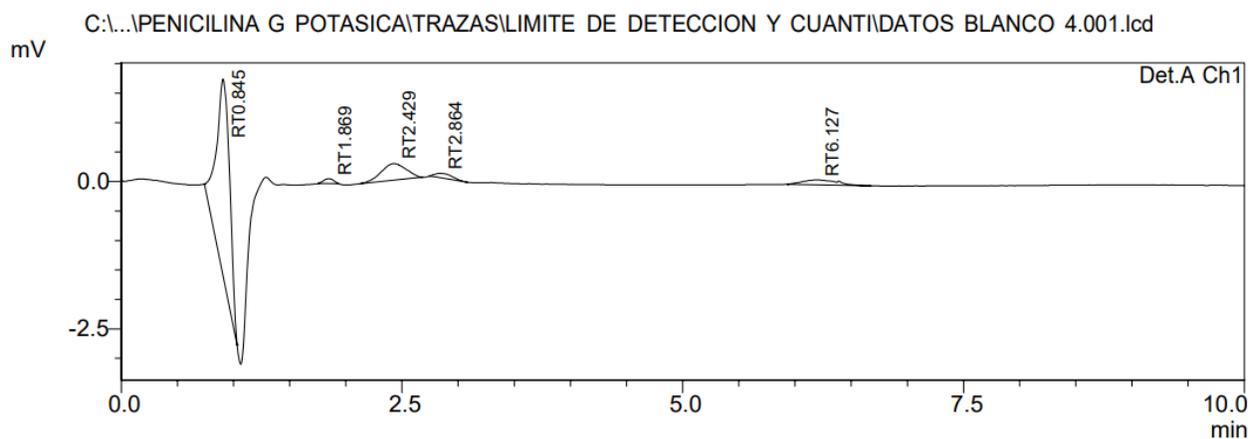
<Results>

Detector A

ID#	Name	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Units
1	RT0.880	0.880	25421	3854	0.000	mg/μL
2	RT1.833	1.833	498	100	0.000	mg/μL
3	RT2.423	2.423	4176	252	0.000	mg/μL
4	RT2.812	2.812	862	89	0.000	mg/μL
5	RT6.118	6.118	1359	66	0.000	mg/μL

Figura 38. Cromatogramas de Blanco 4 de Penicilina G Potásica, para el límite de cuantificación y detección

<Chromatogram>



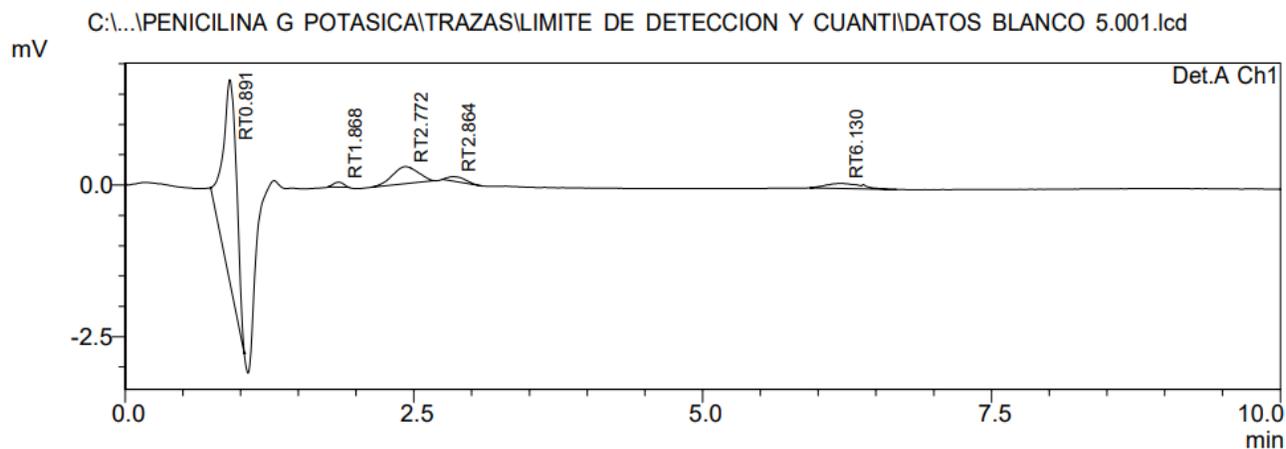
<Results>

Detector A

ID#	Name	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Units
1	RT0.845	0.845	26252	3734	0.000	mg/μL
2	RT1.869	1.869	517	106	0.000	mg/μL
3	RT2.429	2.429	4151	261	0.000	mg/μL
4	RT2.864	2.864	831	92	0.000	mg/μL
5	RT6.127	6.127	1286	72	0.000	mg/μL

Figura 39. Cromatogramas de Blanco 5 de Penicilina G Potásica, para el límite de cuantificación y detección

<Chromatogram>



<Results>

Detector A

ID#	Name	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Units
1	RT0.891	0.891	27899	3685	0.000	mg/μL
2	RT1.868	1.868	482	98	0.000	mg/μL
3	RT2.772	2.772	4204	246	0.000	mg/μL
4	RT2.864	2.864	865	98	0.000	mg/μL
5	RT6.130	6.130	1297	76	0.000	mg/μL