

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias e Ingenierías**

**Internalización de métodos analíticos para Materias primas por  
Cromatografía de Gases**

**Freddy Joel Guevara Cangahuamín**

**Ingeniería Química**

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito  
para la obtención del título de  
**INGENIERO QUÍMICO**

Quito, 09 de diciembre de 2024

# **UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias e Ingenierías**

## **HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA**

**Internalización de métodos analíticos para Materias primas por  
Cromatografía de Gases**

**Freddy Joel Guevara Cangahuamín**

**Nombre del profesor, Título académico**

**David Egas, PhD**

Quito, 09 de diciembre de 2024

## © DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Freddy Joel Guevara Cangahuamín

Código: 00322626

Cédula de identidad: 1724057219

Lugar y fecha: Quito, 09 de diciembre de 2024

## **ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN**

**Nota:** El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

## **UNPUBLISHED DOCUMENT**

**Note:** The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

## RESUMEN

El presente proyecto tiene como objetivo principal el internalizar, mediante un proceso de verificación y/o validación de procedimientos analíticos, metodologías de cuantificación y cualificación de materias primas por la técnica cromatografía de gases (GC), utilizando como base los procesos descritos en las monografías de las farmacopeas europea (EP) y estadounidense (USP), y la metodología de análisis (MoA) del fabricante Camphor Technologies para las materias primas: zopiclona, acetona y 1, 2, 6 – hexanotriol para la empresa Grünenthal. Dado que el número total de análisis por GC que se ejecutan en laboratorios externos resulta en una preocupación para la empresa por el incremento de tiempos de análisis y liberación de los materiales esenciales para la cadena productiva. Se consiguieron verificar e internalizar los métodos de análisis para zopiclona y acetona a condiciones óptimas de análisis, alcanzando disminuciones superiores al 90% en cuanto a tiempo de análisis y costos. Por otro lado, a pesar de no haber conseguido internalizar la metodología desarrollada para la materia prima 1, 2, 6 – hexanotriol, se ha logrado generar un antecedente y oportunidades de mejora para su posterior validación.

**Palabras clave:** Cromatografía de gases, validación, optimización, materias primas, tiempo de análisis.

## ABSTRACT

The main objective of this project is to internalize, through a process of verification and/or validation of analytical procedures, methodologies for both quantification and qualification of raw materials by gas chromatography (GC), using as a basis the processes described in the monographs of the European Pharmacopoeia (EP), the United States Pharmacopoeia (USP), and the method of analysis (MoA) of the manufacturer Camphor Technologies for the raw materials: zopiclone, acetone and 1, 2, 6 - hexanetriol for the Grünenthal company. Since the total number of GC analyses that are performed by external laboratories represent a concern for the company due to the increase of analysis times and release of essential materials for the production chain. It was possible to verify and internalize the analysis methods for zopiclone and acetone in optimal analytic conditions, achieving reductions of more than 90% in terms of analysis time and costs. On the other hand, despite not having managed to internalize the developed methodology for the raw material 1, 2, 6 - hexanetriol, it was possible to generate a precedent and improvement opportunities for its subsequent validation.

**Key words:** Gas chromatography, validation, optimization, raw materials, analysis time.

**TABLA DE CONTENIDOS**

1.	INTRODUCCIÓN .....	11
1.1	Antecedentes .....	11
1.2	Especificaciones en materias primas .....	12
1.3	Métodos compendiales.....	13
1.4	Cromatografía de gases.....	14
1.5	Justificación del proyecto .....	15
1.6	Objetivos.....	15
2.	METODOLOGÍA.....	17
2.2	Método de análisis .....	17
2.3	Sistema cromatográfico .....	18
2.4	Parámetros y pruebas de verificación/validación .....	18
2.5	Cuantificación y procesamiento.....	20
2.6	Optimización de condiciones analíticas.....	22
2.7	Evaluación de desempeño analítico .....	22
3.	RESULTADOS.....	24
3.1	Análisis efectuados sobre las materias primas.....	24
3.2	Resultados de optimización de condiciones analíticas para 1, 2, 6 - hexanotriol....	27
4.	OBSERVACIONES Y RECOMENDACIONES.....	34
5.	CONCLUSIONES .....	38
6.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
7.	ANEXOS: .....	42

8. ANEXO A: SUMARIO DE CRITERIOS DE ACEPTACIÓN PARA LAS METODOLOGÍAS DESARROLLADAS.....	42
9. ANEXO B: PROTOCOLOS DE VERIFICACIÓN/VALIDACIÓN.....	48
10. ANEXO C: EJEMPLOS DE CÁLCULO PARA EL ANÁLISIS DE LAS MATERIAS PRIMAS PROPUESTAS .....	57
11. ANEXO D: REPORTES ANALÍTICOS PARA LAS METODOLOGÍAS INTERNALIZADAS.....	61
12. ANEXO E: INFORME DE VERIFICACIÓN PARA ZOPICLONA .....	68
13. ANEXO F: INFORME DE VERIFICACIÓN PARA ACETONA .....	75
14. ANEXO G: INFORME DE VALIDACIÓN PARA 1, 2, 6 – HEXANOTRIOL.....	80

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros necesarios para la verificación/validación de métodos analíticos para cada materia prima. ....	19
Tabla 2. Valores de tailing o factor de cola para el pico de hexanotriol a diferentes concentraciones. ....	29
Tabla 3. Parámetros de desempeño analítico para las metodologías desarrolladas para cada materia prima.....	32

**ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1. Cromatograma de la muestra de zopiclona analizada. ....	24
Figura 2. Cromatograma del análisis de valoración e identificación de acetona.....	25
Figura 3. Cromatograma del análisis de valoración de 1, 2, 3 – hexanotriol.....	26
Figura 4. Cromatogramas superpuestos de la muestra de 1, 2, 6 – hexanotriol a condiciones de Split 100:1. ....	27
Figura 5. Efecto de la concentración sobre el pico de 1, 2, 6 – hexanotriol con condiciones de Split 100:1. ....	27
Figura 6. Cromatogramas superpuestos de la muestra de 1, 2, 6 – hexanotriol a condiciones de Split 400:1. ....	28
Figura 7. Efecto de la concentración sobre el pico de 1, 2, 6 – hexanotriol con condiciones de Split 400:1. ....	28
Figura 8. Morfología del pico de 1, 2, 6 – hexanotriol a condiciones de Split Ratio 400:1 y 10 mg/mL de concentración de analito en muestra.....	30
Figura 9. Programa de temperatura propuesto en el MoA del fabricante.....	31
Figura 10. Programa de temperatura modificado. ....	31

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Antecedentes

Grünenthal es una empresa farmacéutica multinacional especializada en la producción de tratamientos contra el dolor, y cuya filosofía se basa en el mejoramiento de la calidad de vida de los pacientes. La empresa fue fundada en 1946 en Alemania, manteniendo su sede en este país. Actualmente cuenta con 27 filiales alrededor del mundo [1], entre las cuales figura Grünenthal Quito Site en Ecuador, misma que opera como centro de desarrollo farmacéutico y logística a nivel de toda América Latina, siendo además la planta dotada de la tecnología más moderna para la manufactura de productos farmacéuticos sólidos, semisólidos y líquidos en el país [2].

Actualmente, la planta cuenta con más de 200 profesionales que se rigen bajo los más altos estándares de calidad y ética del mercado, pues únicamente el cumplimiento de estos puede garantizar la seguridad y eficacia de los medicamentos que son lanzados al mercado [2]. En este contexto, el área de control de calidad cumple un rol fundamental antes, durante y después del proceso de manufactura, pues la liberación (proceso mediante el cual un material es aprobado para entrar o continuar con la cadena productiva de la empresa) de productos terminados, semielaborados y materias primas para la producción, dependen estrictamente del cumplimiento riguroso de especificaciones con respecto a las propiedades fisicoquímicas, cantidad o contenido de excipientes o de ingredientes farmacéuticos activos (API) por sus siglas en Inglés, en formulaciones farmacéuticas y/o materias primas [3].

Dentro del análisis de materias primas, existen dos tipos de análisis que son necesarios para la liberación: el análisis de valoración, el cual consiste en la determinación de la cantidad de excipiente o API dentro de una materia prima y la identificación, cuyo propósito es el determinar la correlación de una sustancia sujeta a análisis de con respecto a un estándar [4].

Además, existen análisis complementarios que son realizados con menor frecuencia, pero que son requeridos cada cierto periodo de tiempo definido por la propia empresa, como parte de un esquema de control y calificación sobre los materiales adquiridos a empresas proveedoras de materias primas, este tipo de pruebas suelen abarcar un amplio espectro de análisis pero usualmente están enfocadas en la cuantificación de impurezas como solventes residuales o residuos del proceso de manufactura de materias primas como pueden ser los solventes residuales [4].

## **1.2 Especificaciones en materias primas**

La cantidad máxima de impurezas como solventes residuales, porcentaje de pureza (valoración) y parámetros de identificación usualmente se encuentran especificados en las monografías de las farmacopeas internacionales y es inherente a cada sustancia o, por otra parte, pueden estar indicados en el certificado de análisis CoA de un fabricante calificado. A partir de esta información, se redacta un documento regulatorio correspondiente a cada artículo estableciéndose las especificaciones correspondientes que tendrán que cumplirse para productos y materias primas a nivel local e internacional. En el caso de solventes residuales en fármacos, excipientes, ingredientes dietéticos y productos terminados, estos se clasifican según su toxicidad y riesgo para la salud humana, ordenándose en clases: I (solventes a evitar por su potencial carcinógeno), II (solventes a limitar al no ser carcinógenos y provocar, o no, efectos tóxicos reversibles) y III (solventes con bajo potencial tóxico) [5].

La zopiclona es un API, clasificado como una no-benzodiazepina cuya característica principal es la de producir un efecto sedante-hipnótico por lo que es utilizada en los tratamientos para insomnio [6]. Durante la etapa final de manufactura de la zopiclona es necesario purificar y aislar el isómero S, para esto es requerido realizar una separación cromatográfica HPLC en fase reversa [7] puesto que esta se encuentra en forma de mezcla

racémica, es en este proceso en el que se emplea una solución de iso-propanol o 2-propanol para realizar lavados periódicos, para posteriormente remover los residuos provocados por su uso mediante un proceso de secado [7]. No obstante, dado que no se puede alcanzar una remoción total de este solvente, pequeñas trazas pueden formar parte de la zopiclona aislada, requiriéndose así establecer una regulación en cuanto a su concentración en la materia prima, ya que el 2-propanol está clasificado como un solvente residual de clase II [5].

Por otro lado, la acetona es un excipiente perteneciente al grupo químico de las cetonas, se encuentra en estado líquido, es incolora e inflamable, y es utilizada en la industria farmacéutica como solvente orgánico debido a su poca toxicidad en concentraciones bajas [8]. Además, dada su alta volatilidad y por ende facilidad de remoción, suele ser utilizada para la extracción de impurezas presentes en materias primas activas [9].

El 1, 2, 6 – hexanotriol, también está clasificado como una materia prima excipiente, se trata de un alcohol trivalente que se caracteriza por ser un líquido claro, inoloro, sumamente viscoso, soluble en agua y en solventes orgánicos [10], y es utilizado en la industria como agente espesante, humectante o adyuvante para el principio activo en preparaciones farmacéuticas [11].

### **1.3 Métodos compendiales**

Existen organizaciones a nivel internacional entre las que figuran la Farmacopea Europea (EP) y la Farmacopea de los Estados Unidos (USP), encargadas de desarrollar metodologías de análisis fisicoquímico para diferentes materiales, como materias primas, utilizados en la industria farmacéutica. Estas entidades además se encargan de establecer los parámetros de especificación para cada materia prima sometida a análisis, bajo los lineamientos y regulaciones propuestas por el Consejo Internacional para la Armonización de Requisitos Técnicos para Productos Farmacéuticos para Uso Humano (ICH).

De este modo, esta entidad se encarga de dar definición a parámetros necesarios en el desarrollo y validación de metodologías de análisis como: especificidad, precisión, exactitud, linealidad, límites de cuantificación (LOQ), límites de detección (LOD) y robustez. Y, a su vez, establecer las evaluaciones estadísticas que deberían cumplirse para cada uno de estos parámetros [12]. No obstante, a pesar de la validez internacional de los métodos farmacopeicos (compendiales), es requerido realizar un proceso de verificación a nivel local para asegurar que el método sea aplicable en las instalaciones de Grünenthal Quito Site [13], conforme a parámetros de validación internos, igualmente basados en las propuestas de las monografías farmacopeicas y el ICH.

#### **1.4 Cromatografía de gases**

La cromatografía de gases es una técnica analítico-instrumental que se fundamenta en la separación ordenada de compuestos que forman parte de una muestra sujeta a análisis, en función a diferencias en la presión de vapor y su afinidad química a la fase estacionaria de una columna de separación [14]. Los compuestos fraccionados serán transportados a través de la columna por un gas de arrastre inerte tanto a la muestra como a la fase estacionaria, siendo común el uso de nitrógeno o helio para este fin [14]. Posteriormente, las fracciones eluyentes arriban al detector de ionización por llama (FID) donde son oxidadas por una llama de hidrógeno-aire para producir moléculas orgánicas cargadas los cuales son recolectados por un electrodo, generando una diferencia de potencial que al ser amplificada se traduce en una señal medible, la cuál es aproximadamente proporcional a la cantidad en masa de determinado compuesto orgánico [15]. De este modo también se establece una limitante en cuanto al tipo de grupos funcionales que son detectables por el FID, presentando poca sensibilidad a moléculas como óxidos de carbono, halógenos y agua [15].

### **1.5 Justificación del proyecto**

Actualmente en Grünenthal – Quito Site, se externalizan análisis por cromatografía de gases de aproximadamente 37 materias primas, entre los que figuran análisis de valoración, identificación, y determinación de impurezas o solventes residuales. Esta situación supone un incremento en la inversión monetaria hacia análisis externos, y aumentos en los tiempos de análisis y liberación, retrasando la cadena productiva de la empresa al depender de los resultados de otros laboratorios. Por otro lado, se ha considerado el revalorizar el instrumento analítico adquirido por el laboratorio químico, ya que debido a la falta de metodologías analíticas validadas o verificadas dentro del laboratorio, el cromatógrafo ha entrado en un estado de desuso a pesar de poseer acceso a metodologías provenientes de farmacopeas con validez internacional.

### **1.6 Objetivos**

Tomando como punto de partida el trasfondo planteado, se ha propuesto como objetivo general del proyecto, el realizar un proceso de internalización (validación o verificación) de cuatro metodologías de análisis químico para tres materias primas piloto: zopiclona, acetona y 1, 2, 6 – hexanotriol mediante la técnica de cromatografía de gases.

El cumplimiento de este meta general se realizará mediante la ejecución de tres objetivos específicos, siendo estos:

- Evaluar la viabilidad de los métodos analíticos requeridos por Grünenthal – Quito Site, mediante la inspección de insumos (disposición de reactivos) y comprobación de compatibilidad en cuanto a componentes instrumentales del cromatógrafo de gases provisto por el laboratorio químico de la empresa con respecto a los componentes especificados por las metodologías a ejecutar (ej. detector empleado, columna y tipo de columna) y posibles consideraciones de seguridad. En caso de cumplirse con todos

estos requerimientos, se podrá emitir un protocolo de verificación o validación, basado en los documentos de soporte locales “PROC-000481: Verificación de métodos compendiales”, “PROC-000470: Validación de métodos Analíticos” y “SUP-002899: PROTOCOLO DE VALIDACIÓN” en el que se especifiquen los materiales a utilizar, así como las condiciones cromatográficas respectivas [13][16][17].

- Comprobar que las metodologías puedan ser replicables en el laboratorio a través de la ejecución del protocolo de verificación/validación correspondiente considerando todos los parámetros de validación respectivos según los procedimientos locales “PROC-000470” y “PROC-000481”.
- Transferir el método analítico para su implementación dentro del laboratorio químico de Grünenthal, mediante la elaboración de un informe final que recopile todos los resultados obtenidos durante la segunda etapa, en conformidad al “SUP-005062: Informe de Validación de Métodos Analíticos”. En caso de obtener resultados positivos y concluir que el método se encuentra verificado/validado al final del informe de validación, se procede a incluir las metodologías al archivo local del área de validaciones, liberando así el método al laboratorio químico de Grünenthal – Quito Site.

## 2. METODOLOGÍA

### 2.2 Método de análisis

Se han planteado tres metodologías de análisis para las tres materias primas para cuantificar el porcentaje de 2-propanol en una muestra de zopiclona mediante cromatografía de gases conforme al ensayo descrito en la Farmacopea Europea 11.4, EP <1060> “Zopiclone” [6]. Para esto es requerido disolver la muestra en un solvente adecuado (dimetilsulfóxido) capaz de extraer el analito, y posteriormente volatilizar la matriz formada y presurizar los compuestos volátiles disueltos en el solvente, mediante el módulo de automuestreo headspace, con el objetivo de que la muestra sea inyectable y analizable mediante la técnica instrumental propuesta. Posteriormente, utilizando una relación de concentraciones y áreas entre estándares y muestras se determina la cantidad de 2-propanol contenida en la API.

En el caso del excipiente acetona, esta metodología toma como referencia el ensayo descrito en la Farmacopea Estadounidense USPNF 2024 Issue 1 <USP43-NF38> “Acetone” [18]. Dado que las propiedades fisicoquímicas de esta materia prima la vuelven aptas para el análisis sin una preparación previa de muestra, esta será analizada mediante inyección directa con el módulo de auto inyección de líquidos y vaporizada en la cámara de mezclado o liner. Para valorar la cantidad de acetona o pureza de ésta, se utilizará el método de normalización de áreas, en el que se cuantifica mediante la obtención de la relación entre el área del pico de interés, entre la sumatoria del resto de áreas en el cromatograma [19].

Este método de cuantificación será igualmente aplicado para el caso del 1, 2, 6 – hexanotriol, exceptuando el hecho de que sí se requiere una preparación previa de la muestra debido principalmente a la viscosidad de esta materia prima, siendo así necesario diluirla en un solvente adecuado (Metanol). Por lo que para utilizar la normalización de áreas como método

para la valoración, es necesario primero sustraer o ignorar las señales provenientes del solvente de preparación.

Las metodologías, así como sus condiciones cromatográficas respectivas se encuentran descritas en detalle en los protocolos de verificación/validación mostrados en el Anexo B, mientras que ejemplos de cálculo se indican en el Anexo C.

### **2.3 Sistema cromatográfico**

Se utilizará un cromatógrafo de gases Agilent 7890B equipado con un sistema de automuestreo de líquidos y de espacio de cabeza o “Headspace”, este módulo en específico será utilizado únicamente para la cuantificación de impurezas volátiles residuales, siendo este el caso del 2-propanol en zopiclona.

Es necesario que los compuestos que ingresen a la columna de separación se encuentren en fase gaseosa para su análisis, dadas las características del inyector a utilizar (Split/Splitless) [20], puesto que este requiere del uso de una cámara de mezclado conocida como “Liner”, donde la muestra se vaporizará y mezclará con la fase móvil para posteriormente fraccionarse en una proporción X:1 (Split Ratio) en caso de utilizar la modalidad de inyección “Split”. Finalmente, se utilizará un detector FID para identificar y cuantificar los analitos correspondientes para cada análisis propuesto.

### **2.4 Parámetros y pruebas de verificación/validación**

Durante el proceso de internalización de las metodologías, los parámetros mínimos requeridos para su aprobación varían según el tipo de análisis que se ejecutará y de la proveniencia del método. En caso de tratarse de un método compendial, el proceso se abordará como una verificación, mientras que, si el mismo es proveniente de un método de análisis (MoA), de un fabricante o laboratorio externo, la aproximación hacia el procedimiento analítico será a través de una validación. Además, es importante considerar que cualquier tipo

de alteración sobre una metodología propuesta, obligatoriamente dirigirá el enfoque hacia una validación.

La diferencia fundamental entre ambos acercamientos es la cantidad de requerimientos mínimos a cumplir para poder probar que el método aporta resultados fiables y reproducibles por cualquier analista en el laboratorio químico. Así mismo, al tratarse de pruebas cualitativas, la cantidad de requerimientos para la verificación o validación será menor comparada a los casos en que se desee internalizar pruebas cuantitativas. Los parámetros por evaluar en función del tipo de análisis se encuentran detallados en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros necesarios para la verificación/validación de métodos analíticos para cada materia prima.

<b>Parámetro/ Análisis</b>	<b>zopiclona/ porcentaje de 2-propanol</b>	<b>acetona/ valoración</b>	<b>acetona/ identificación</b>	<b>1, 2, 6 – hexanotriol/ valoración</b>
<b>Especificidad</b>	X	X	X	X
<b>Exactitud</b>				X
<b>Repetibilidad del sistema analítico</b>		X		X
<b>Precisión del método</b>				X
<b>Precisión intermedia</b>				X
<b>Linealidad</b>		X		X
<b>Límite de detección</b>	X			X
<b>Estabilidad de la solución muestra y estándar</b>	X			X
<b>Robustez</b>	X			X

## 2.5 Cuantificación y procesamiento

Las metodologías desarrolladas requerirán de un método de procesamiento lo suficientemente preciso para identificar varios picos en la muestra, por lo que se utilizará el software de adquisición, administración, y procesamiento de datos especializado en cromatografía, Empower 3 versión 3.8.0.2 y licencia ICL, desarrollado por Waters. Este software está provisto de un algoritmo de integración denominado ApexTrack el cuál basa su detección de picos en la medición de la curvatura de todo el cromatograma en distintos puntos hasta determinar el ápice de un pico para un umbral (“threshold”) de integración establecido de forma automática [21]. De este modo, es posible discriminar la detección a únicamente los picos que puedan ser representativos o de interés en el proceso de valoración e identificación de materias primas o cuantificación de impurezas. En conjunto a esto, se descartan picos que no cumplan con un requerimiento mínimo de relación señal-ruido (s/n) de 1, puesto que, por su propia definición, una relación con un valor menor a la unidad implicaría de forma directa que el ruido es mayor que la señal detectada [12].

Por otro lado, se optimizará la integración de los picos realizando ajustes y aproximaciones mediante la adición de eventos de integración, los eventos de integración corresponden a puntos en los que se controla el tipo de aproximación mediante el cual el software define qué porción del cromatograma corresponde a un pico o no, este tipo de eventos trazan una línea exponencial, tangencial o vertical hacia la línea base, o hacia el punto de separación entre dos picos con baja resolución, con el objetivo de aproximar la morfología del pico hacia una forma (gaussiana o triangular) que favorezca a la integración [22]. Así mismo, el nivel de detección será mayor o menor en función del tipo del análisis; dado es el caso de la valoración de materias primas, pues en este, a pesar de no identificarse de forma cualitativa las impurezas presentes en la muestra, sí es necesario medir el total de estas señales para obtener un porcentaje de pureza de la materia prima y determinar si cumple o no con su respectiva especificación.

Mientras que, para los análisis de identificación de acetona y porcentaje de 2-propanol no es requerido un umbral de integración tan preciso puesto que la cuantificación es realizada mediante una comparación directa entre el área del analito obtenido en la muestra y el área del estándar preparado, o entre tiempos de retención entre estándar-muestra [16]. No obstante, es primordial asegurarse que el umbral de detección se lo suficientemente preciso para detectar el pico de la impureza residual correspondiente. Finalmente, el software Empower 3 también se encargará de determinar criterios de desempeño como relación señal ruido, factor de capacidad y factor de cola para cada uno de los picos detectados en el cromatograma.

Por otro lado, para establecer el área mínima cuantificable del método de procesamiento para las metodologías de valoración, se utilizaron los resultados de la pendiente e intercepto de las curvas de calibración, realizadas por duplicado en las pruebas de linealidad correspondientes, que relacionan el área del pico de analito con su concentración respectiva. Empleándose la ecuación (1) para determinar el límite de cuantificación (LOQ).

$$LOQ = \frac{10\sigma}{S} \quad (1)$$

Donde,

$\sigma$  = La desviación estándar de la respuesta

$S$  = La pendiente de la curva de calibración

Dado que se poseen datos de dos curvas de calibración, es posible utilizar la desviación estándar del intercepto en el eje de las ordenadas de las curvas, como la desviación estándar de la respuesta [12]. Posteriormente, se extrapola el valor del área correspondiente a la concentración del analito en el LOQ para obtener el área mínima cuantificable.

## **2.6 Optimización de condiciones analíticas**

Se realizaron modificaciones sobre la metodología inicial provista por el fabricante de 1, 2, 6 – hexanotriol ya que se observaron anomalías en cuanto a la morfología del pico de interés, por lo que se llevaron a cabo una serie de experimentos en los que se variaron la concentración de analito en muestra (50, 25, 10, 5, 1 mg/mL) y el Split Ratio (100:1, 400:1) con el objetivo de determinar las condiciones de análisis que consigan un pico con un factor de simetría lo más cercano a 1, según las recomendaciones especificadas por USP [19].

Posteriormente al observarse una baja reproducibilidad del tiempo de retención del pico y variaciones en la simetría del mismo en el punto de concentración previamente definido como “óptimo”, se determinó que la causa más probable para esta falla fue la degradación de la columna, por lo que se optó por modificar también la rampa de temperatura para que el horno alcance una temperatura máxima de 200 °C y no 300 °C, como fue previamente especificado por el fabricante. Así mismo, se utilizó una tasa de cambio de temperatura alta, junto a un mayor tiempo de limpieza posterior a la corrida cromatográfica manteniendo la temperatura máxima del método, con el objetivo de remover contaminantes con alto punto de ebullición, conforme a la guía de Agilent [23], permitiendo así también, disminuir 10 minutos de corrida debido al incremento en la tasa de cambio.

## **2.7 Evaluación de desempeño analítico**

Para determinar que las condiciones cromatográficas propuestas en los métodos compendiales o aquellas seleccionadas para el proceso de validación fuesen óptimas, se ha planteado utilizar como medida del desempeño los parámetros de factor de capacidad ( $K'$ ), relación señal-ruido (s/n) y el factor de cola o tailing para el pico del analito de interés correspondiente a cada metodología.

- **Factor de capacidad (K')**

Se define como factor de capacidad a la relación entre el tiempo de elución del analito con respecto al tiempo de elución de un soluto no retenido. De este modo, este parámetro se vuelve una medida de la afinidad del analito con la fase estacionaria o columna, y el tiempo de análisis. Desde esta perspectiva, se define que los valores recomendables para el factor de capacidad se encuentran delimitados en un rango de 1 – 10, puesto que, valores menores pueden implicar que el pico de interés no posea una resolución adecuada con respecto a los analitos de elución más pronta y en caso de tener un valor de K' superior a 10, el analito requerirá de una mayor cantidad de tiempo de análisis, esto repercutiendo directamente en un mayor consumo de recursos energéticos y de fase móvil [14].

- **Relación señal-ruido**

La relación señal-ruido es un parámetro sumamente importante, puesto que expresa en qué medida es posible diferenciar el pico del analito de interés del ruido proveniente de la línea base, por esta razón, es necesario que la relación s/n sea superior a 1, implicando que la señal determinada por el detector es mayor con respecto al ruido o deriva. No obstante, trabajar con valores de s/n de 1 no es recomendable, sugiriéndose un valor mínimo de 3 el cuál suele ser común para concentraciones en valores de LOD según la ICH [12].

- **Factor de cola o tailing**

Este parámetro determina de forma directa la simetría del pico, el tailing es una deformación del pico que implica un alargamiento de la cola del mismo. Valores altos de tailing pueden traer complicaciones al integrar el área bajo la curva del pico y por ende ofrecer resultados poco fiables al momento de valorar la cantidad de determinado analito en una muestra. Por esta razón es necesario mantener valores de tailing bajos, considerando los protocolos internos de la empresa se ha establecido un rango de 0,8 a 2,0 como valores aceptables [16].

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Análisis efectuados sobre las materias primas

Se ejecutaron los análisis de cuantificación del porcentaje de 2-propanol en zopiclona, identificación y valoración de acetona, y valoración de 1, 2, 6 - hexanotriol conforme a las condiciones establecidas en los protocolos correspondientes, obteniéndose los resultados recopilados en los reportes analíticos presentados en el Anexo D , los cromatogramas individuales de las muestras sometidas a análisis se muestran en las Figura 1, Figura 2 y Figura 3.

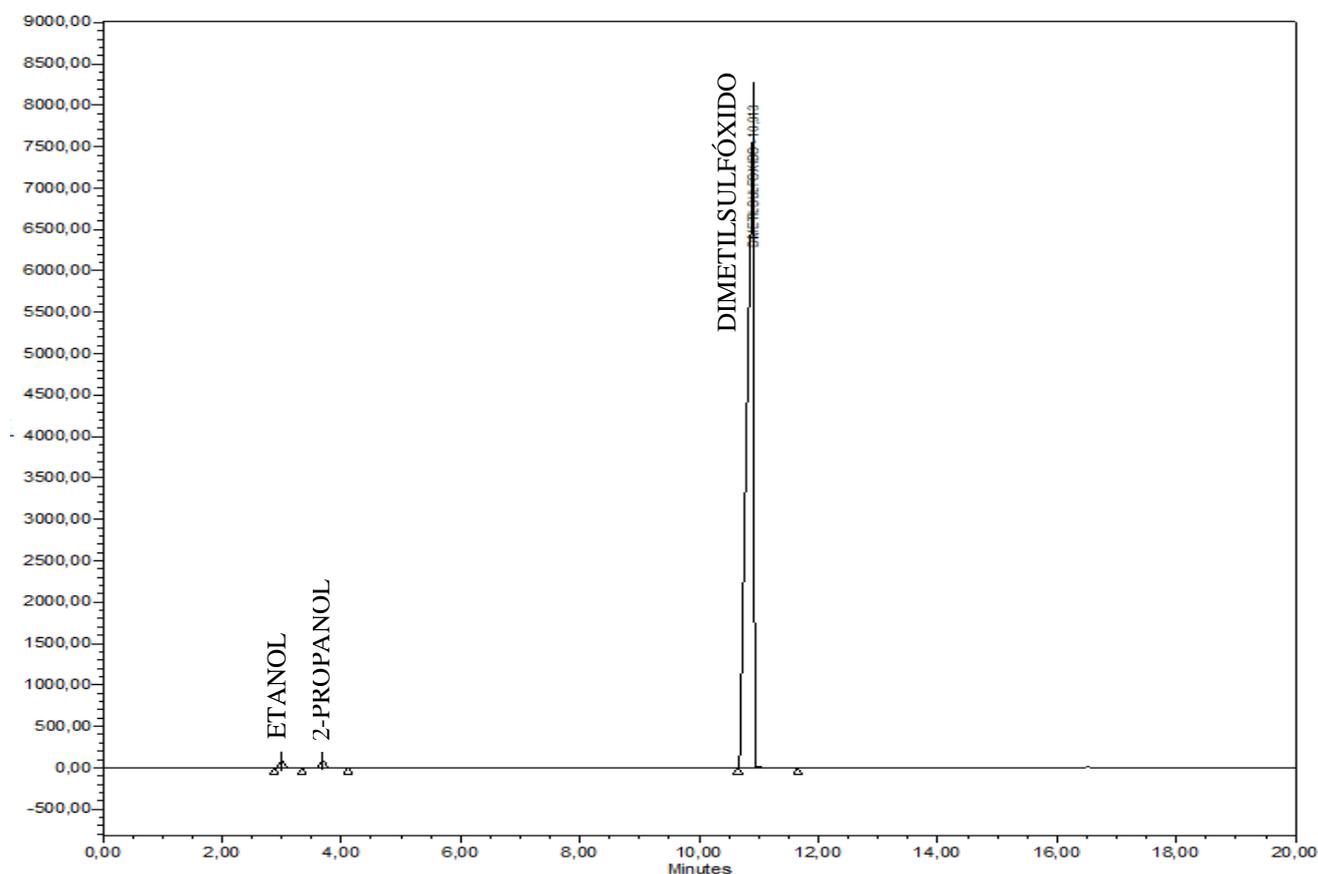


Figura 1. Cromatograma de la muestra de zopiclona analizada.

Como se muestra en la Figura 1 se consigue identificar el pico correspondiente al 2-propanol en la muestra, por lo que posteriormente se compara su área con aquella obtenida por el pico de 2-propanol de una solución estándar a una concentración conocida del analito, ver

el ejemplo de cálculo, basado en los resultados de estabilidad inicial, proporcionado en el Anexo C, determinándose que el porcentaje de 2-propanol en la muestra es de 0,1 %.

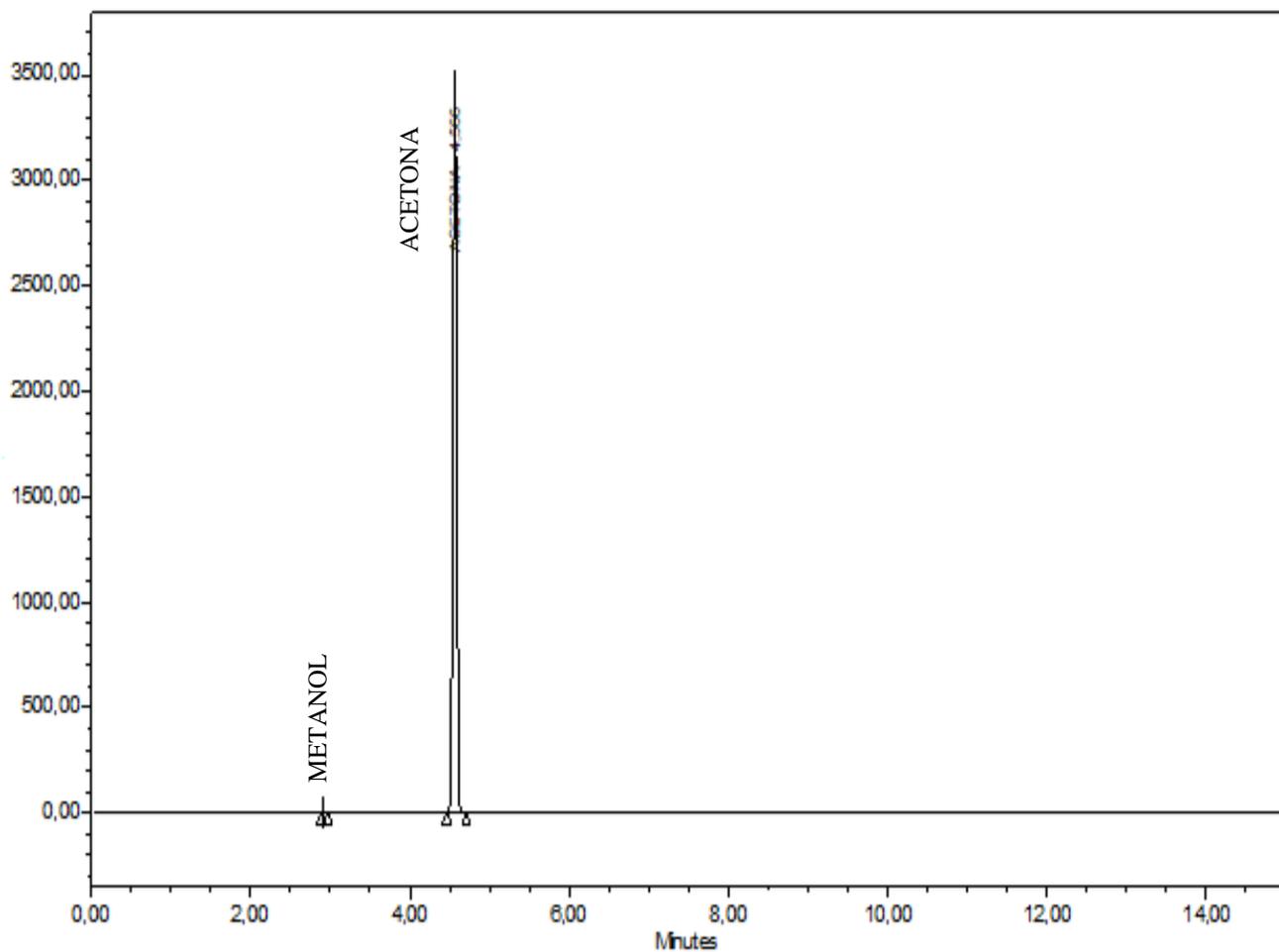


Figura 2. Cromatograma del análisis de valoración e identificación de acetona.

La Figura 2, muestra la identificación del pico correspondiente a la acetona, esta identificación se obtiene al inyectar un estándar de acetona bajo las mismas condiciones analíticas, definiendo un tiempo de retención con el que se puede confirmar la identidad de la materia prima. Posteriormente, se cuantifica que la materia prima está compuesta por acetona en un 99,98%, ver el cálculo basado en el ensayo de repetibilidad para la acetona, mostrado en el Anexo C.

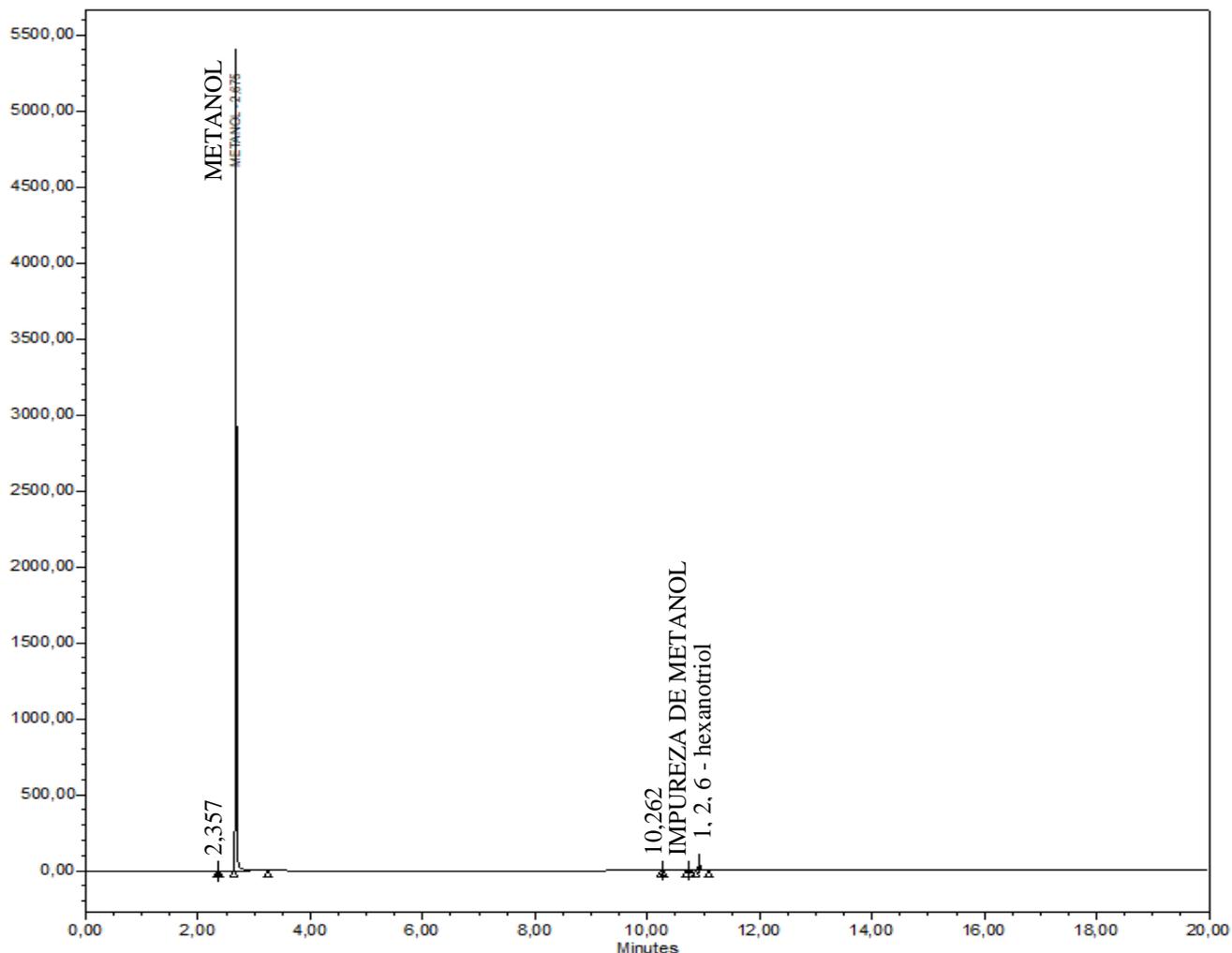


Figura 3. Cromatograma del análisis de valoración de 1, 2, 3 – hexanotriol.

La Figura 3, indica la identificación del pico correspondiente a la materia prima 1, 2, 6 – hexanotriol, además de los picos provenientes del solvente de preparación (Metanol) e impurezas desconocidas cuyo único identificador es su tiempo de retención en el cromatograma. Se cuantifica que la materia prima está compuesta por 1, 2, 6 – hexanotriol en un 100% al descartar las señales que no cumplan con criterios mínimos de señal ruido y la contribución en área de los picos provenientes del solvente de preparación, ver el cálculo correspondiente al ensayo de repetibilidad en el Anexo C.

### 3.2 Resultados de optimización de condiciones analíticas para 1, 2, 6 - hexanotriol

Se obtuvieron los siguientes resultados con el primer par de experimentos descritos en la metodología:

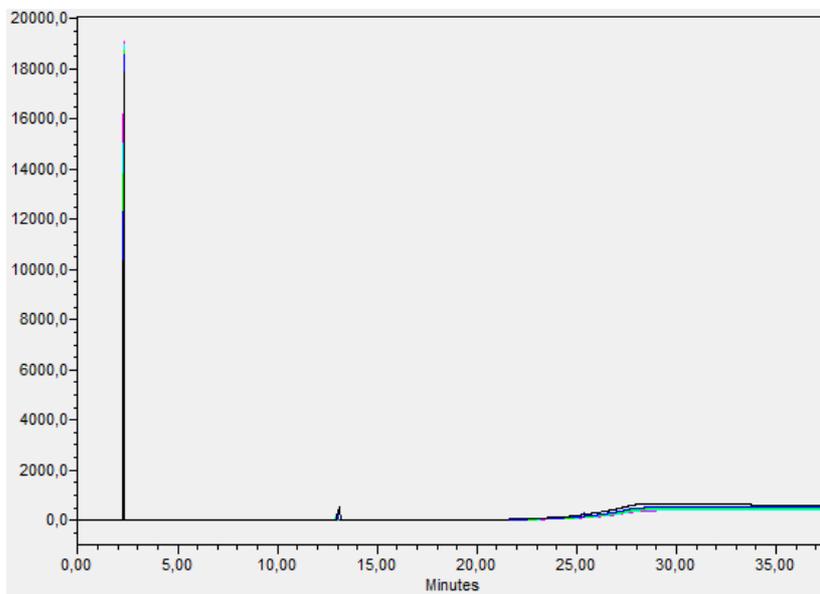


Figura 4. Cromatogramas superpuestos de la muestra de 1, 2, 6 – hexanotriol a condiciones de Split 100:1.

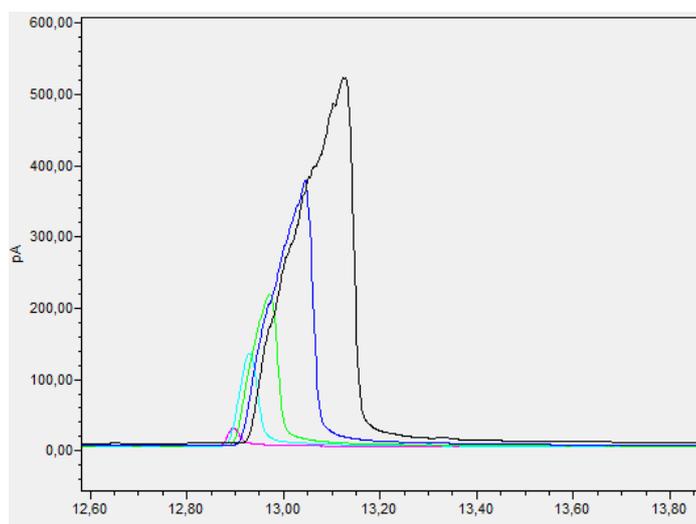


Figura 5. Efecto de la concentración sobre el pico de 1, 2, 6 – hexanotriol con condiciones de Split 100:1.

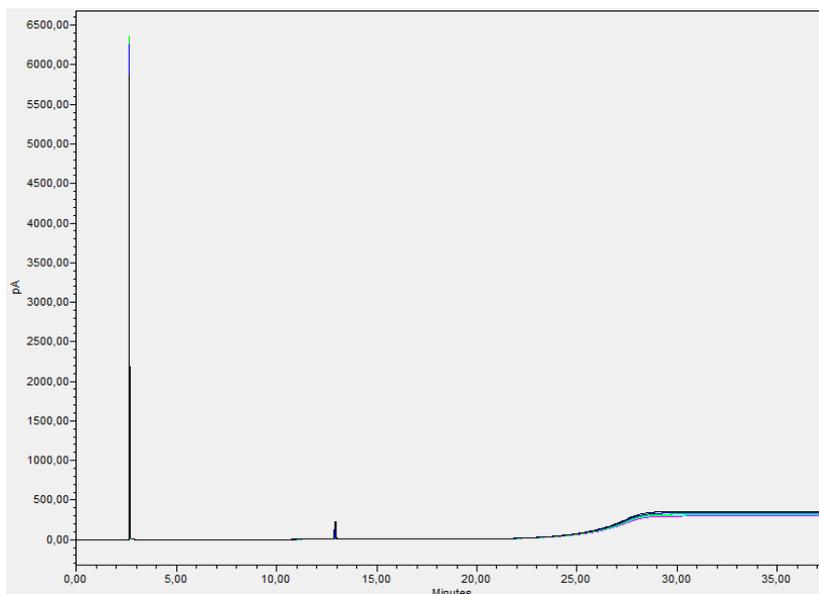


Figura 6. Cromatogramas superpuestos de la muestra de 1, 2, 6 – hexanotriol a condiciones de Split 400:1.

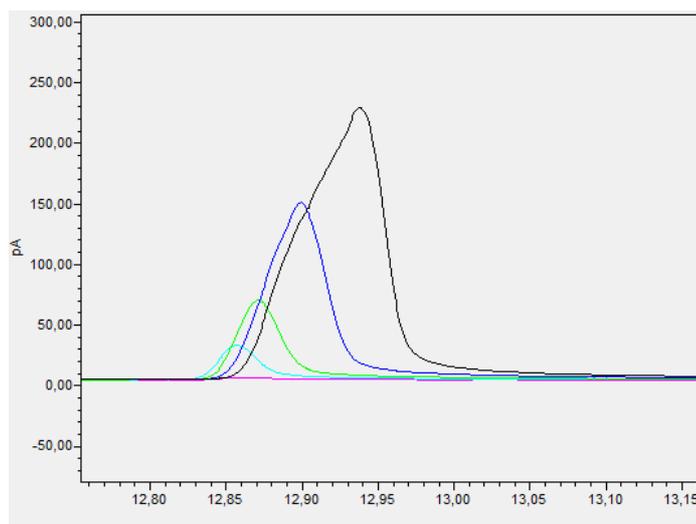


Figura 7. Efecto de la concentración sobre el pico de 1, 2, 6 – hexanotriol con condiciones de Split 400:1.

En las Figura 5 y Figura 7 se puede apreciar el efecto de la concentración y el Split Ratio sobre la morfología del pico, donde las señales en negro corresponden al nivel más alto de concentración (50 mg/mL) y las señales magenta al nivel más bajo. Los factores de cola del pico de 1, 2, 6 – hexanotriol a diferentes concentraciones y Split Ratio se encuentran reportados en la Tabla 2.

Tabla 2. Valores de tailing o factor de cola para el pico de hexanotriol a diferentes concentraciones.

<b>Concentración (mg/mL)</b>	<b>Split Ratio</b>	<b>Tailing</b>
50	100:1	Pico no fiable
25		Pico no fiable
10		0,9
5		1,3
1		3,5
50	400:1	Pico no fiable
25		Pico no fiable
10		1,7
5		2,3
1		No detectado

Una vez determinado un Split Ratio y una concentración de trabajo adecuada se procede a probar la repetibilidad del método analítico, donde se estudia la reproducibilidad del pico en cuanto a área y morfología, ver Figura 8.

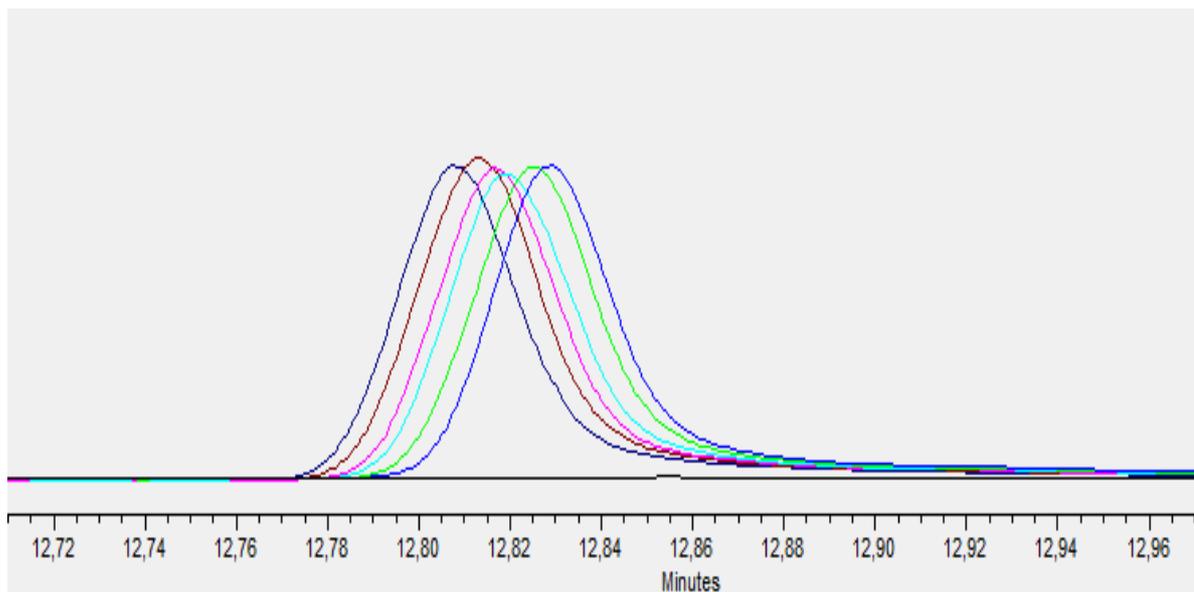


Figura 8. Morfología del pico de 1, 2, 6 – hexanotriol a condiciones de Split Ratio 400:1 y 10 mg/mL de concentración de analito en muestra.

Por otro lado, en los cromatogramas reportados en las Figuras D y E se consigue dilucidar que la línea base tiene una forma de S, fenómeno asociado al sangrado de columna, tomando en consideración que el sangrado puede ser causado por el ingreso de oxígeno a la columna que en conjunto con el incremento de temperatura del programa inicial, ver Figura 9, provocando la escisión de los enlaces que conforman el polímero de polisiloxano, el componente principal de la fase estacionaria de una columna capilar [24], no obstante, esta degradación también puede ocurrir únicamente por un programa de temperatura inapropiado [25].

Al observar estos resultados se consigue apreciar una reproducibilidad de pico muy pobre, por lo que se procedió a repetir el ensayo modificando el programa de temperatura conforme se muestra en la Figura 10. La forma del pico del analito vista en el análisis de repetibilidad,

utilizando las nuevas condiciones del programa de temperatura, se muestra en la

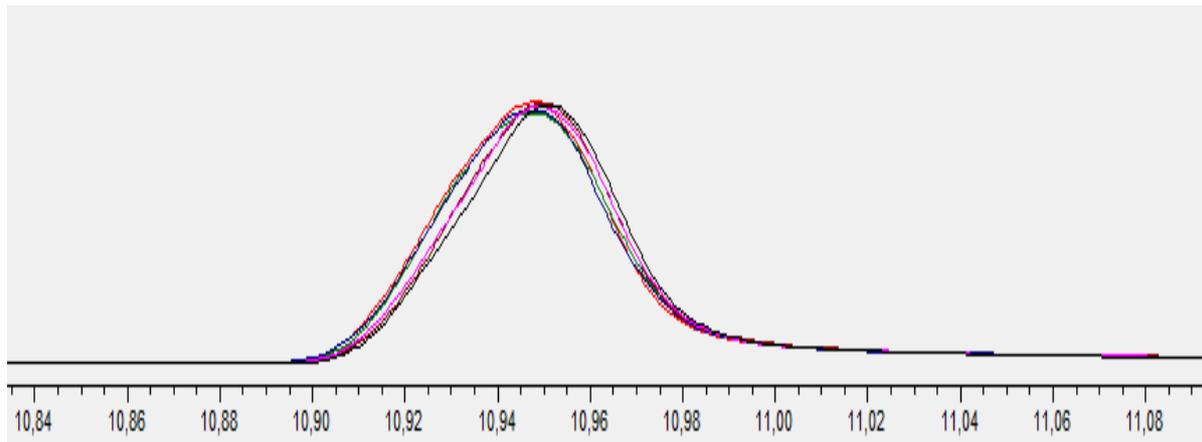


Figura 11.

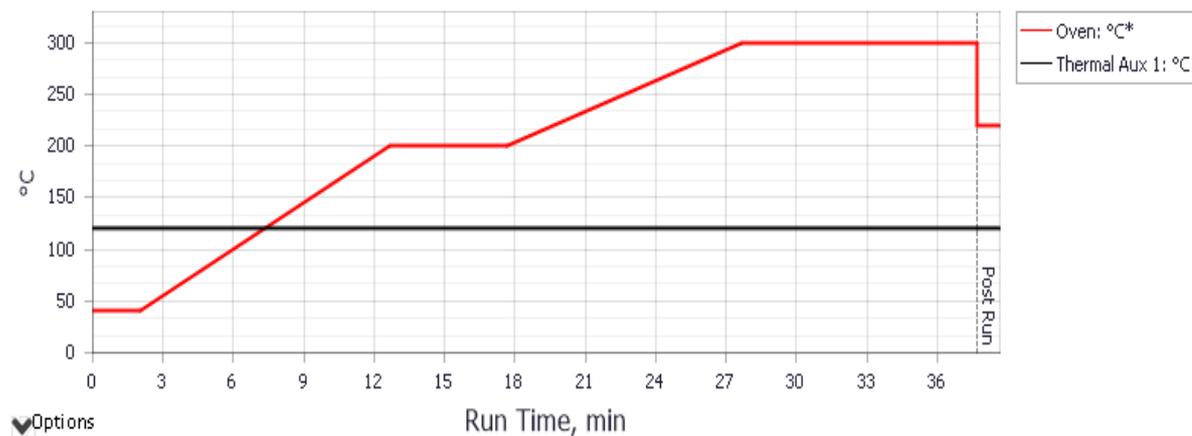


Figura 9. Programa de temperatura propuesto en el MoA del fabricante.

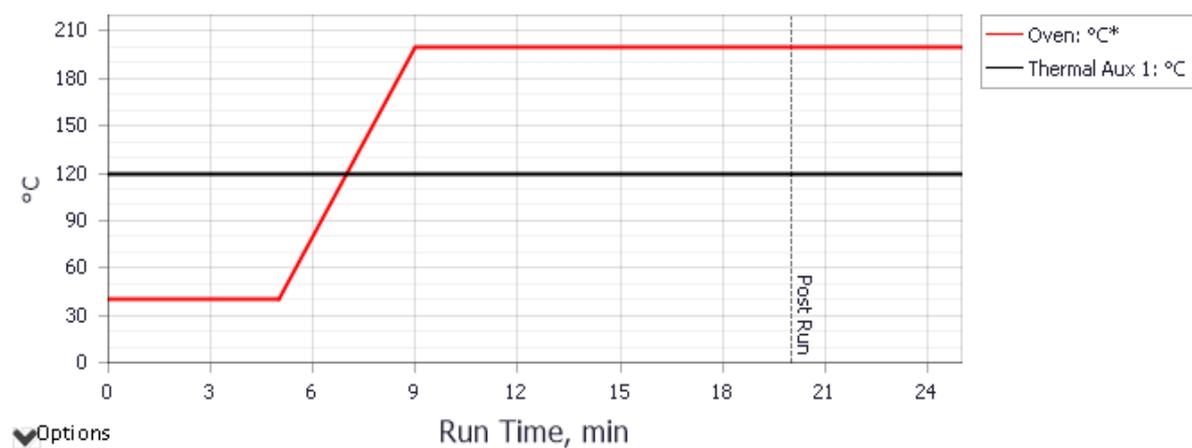


Figura 10. Programa de temperatura modificado.

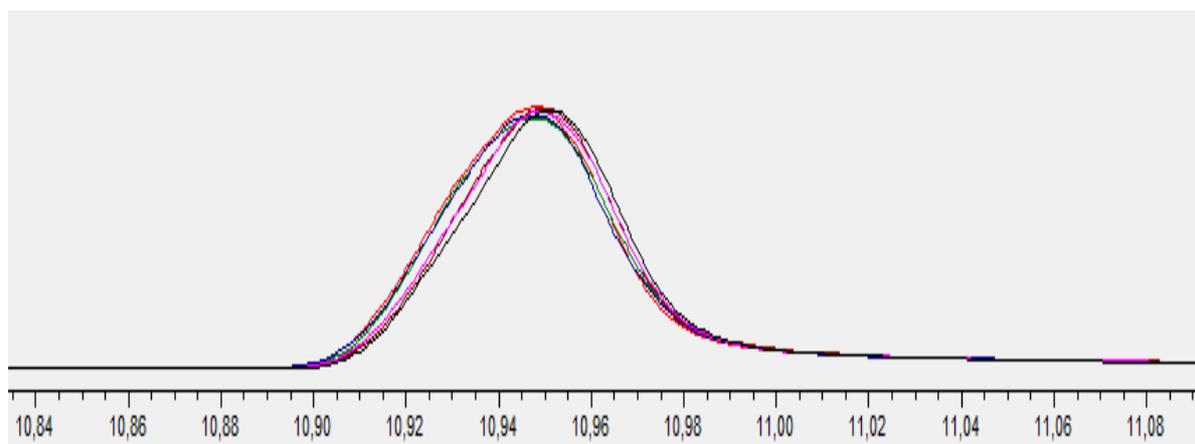


Figura 11. Morfología del pico de 1, 2, 6 – hexanotriol a condiciones de Split Ratio 400:1 y 10 mg/mL de concentración de analito en muestra utilizando el programa de temperatura modificado.

Finalmente, los resultados de las pruebas realizadas para definir si los procedimientos analíticos podrían ser validados o verificados, y por ende, implementados dentro del laboratorio de Grünenthal – Quito Site se encuentran recopiladas en las tablas mostradas en el Anexo A. Estas indican los criterios de aceptación utilizados para evaluar cada uno de estos parámetros conforme al protocolo interno “PROC-000470:” y los resultados obtenidos, de donde se puede concluir que las metodologías de análisis de cuantificación de 2-propanol en zopiclona, e identificación y valoración de acetona, fueron satisfactoriamente internalizados, como se muestra en los informes respectivos que se detallan en los Anexos E y F, mientras que en el Anexo G aparece la metodología no validada, y por ende no internalizada, del 1, 2, 6 – hexanotriol, dado el incumplimiento de los criterios de aceptación de linealidad y exactitud, ver Anexo A. Por otro lado, los parámetros de desempeño analítico conseguidos se encuentran recopilados en la Tabla 3.

Tabla 3. Parámetros de desempeño analítico para las metodologías desarrolladas para cada materia prima.

<b>Materia prima</b>	<b>Parámetro</b>	<b>Analito</b>	<b>Factor de capacidad (k')</b>	<b>Relación s/n</b>	<b>Tailing</b>
<b>zopiclona</b>		2-propanol	3	268	1,2
<b>acetona</b>		acetona	4	35143	1,0
<b>1, 2, 6 - hexanotriol</b>		1, 2, 6 - hexanotriol	10	674	1,1

Finalmente, considerando el consumo de recursos en cuanto a reactivos, gases y costo por hora del analista, para la metodología más costosa en cuanto a reactivos, se obtuvo que para un tiempo regular de análisis, es decir, 7 horas y tomando en cuenta que el analista empleará un total de 2 horas adicionales para preparar muestras y generar la documentación pertinente, el costo promedio por análisis es de aproximadamente \$32,10, representando una disminución del 93,6 % con respecto al precio por análisis para ensayos de valoración y

cuantificación de solventes residuales, que se cotizan con empresas externas. Así mismo, el tiempo de análisis y liberación de las materias primas, se ve reducido en un 91,7 % ya que con las metodologías internalizadas se plantea que el laboratorio químico puede tardar hasta 5 días en corroborar los resultados obtenidos por el analista y aprobar el reporte analítico.

#### 4. OBSERVACIONES Y RECOMENDACIONES

Tanto las metodologías verificadas (internalizadas), como la metodología no validada presentan resultados favorables en cuanto a la especificidad del método, factor que toma especial relevancia dado que, en la mayoría de las metodologías, se emplea la normalización de áreas como procedimiento para la cuantificación. De este modo, el éxito, y obtención de resultados fiables dependen de forma intrínseca de una buena resolución de picos a lo largo del cromatograma y ausencia de interferencias con respecto al pico de interés, por lo que es posible elucubrar que los métodos desarrollados pueden ser empleados con confianza. Es importante comprobar que el método o el factor de respuesta del analito de interés presente una tendencia lineal, no obstante, al no utilizarse una curva de calibración para realizar mediciones, sino un único punto de concentración para el análisis se puede considerar a la prueba de linealidad como un test auxiliar, así como robustez, estabilidad y determinación del límite de detección, salvo el caso de la medición del porcentaje de 2-propanol en zopiclona en el que es necesario conocer tanto el límite cuantificable como detectable del analito, para el análisis rutinario a futuro, puesto que de encontrarse un área fuera de estas concentraciones límites será necesario reportar como analito no detectable o detectable pero no cuantificable.

En cuanto a los picos o señales adicionales que son fueron detectados en los ensayos de zopiclona, acetona y 1, 2, 6 – hexanotriol, en su mayoría al ser señales sumamente bajas (no cumplen requerimientos mínimos de relación señal ruido) y con poca reproducibilidad, es decir, que no se presentan de forma frecuente en cada ensayo correspondiente, se las puede atribuir a ruido ambiental, contaminación leve del liner o de la septa del inyector, o debido a la presencia de contaminantes de alto punto de ebullición [25], por lo que se recomienda siempre llevar a cabo un proceso riguroso de acondicionamiento de columna previo al análisis y reemplazar el liner con una frecuencia cuasi semanal en caso de utilizarse el módulo de

inyección ALS o cada seis meses si únicamente se utiliza el módulo Headspace. En el caso de este estudio, se planteó un programa de acondicionamiento general consistente en los siguientes pasos: purgar la columna de cualquier rastro de oxígeno mediante el ingreso del gas Carrier a una presión aproximada de 7 psi durante 15 a 20 minutos, posteriormente llevar la columna a la temperatura máxima del método con una tasa de cambio de temperatura alta y mantener en ese punto durante 30 minutos, finalmente, disminuir la temperatura hacia su punto inicial, esta serie de pasos están basados en la guía técnica de Agilent para el acondicionamiento de la columna [23].

En el análisis de 2-propanol en zopiclona, se consiguen identificar señales adicionales que se asocian con la muestra, ver cromatogramas de especificidad en Anexo E, no obstante, debido a que el foco principal de la metodología no es el valorar la materia prima, sino únicamente el porcentaje de la impureza, estas señales son ignoradas ya que puede tratarse de otro tipo de residuo no identificado, productos de degradación o trazas de enantiómeros. Para el caso particular de la acetona, a menos que a futuro se tengan que analizar muestras que previamente hayan sido almacenadas como una solución en agua, no puede considerarse la presencia de productos de reacción con el agua, además debido a que los sustituyentes metilos enlazados al grupo ceto no poseen propiedades electroattractoras [26], se puede descartar una posible formación de hidratos. De igual manera, al mantener la muestra en un ambiente controlado, limitando su exposición a la luz directa y libre de contaminación ácida, no se considera posible la formación de hemicetales en presencia de metanol [26] o la generación de productos de degradación [8].

En el caso de la metodología desarrollada para el 1, 2, 6 – hexanotriol, a pesar del fracaso en el proceso de validación debido al incumplimiento parcial de los criterios de aceptación de la prueba de linealidad y exactitud, a excepción de aquellos relacionados al intercepto de la curva de calibración y la distribución de residuos, ver Anexo G. Esto aporta un indicio del

rango óptimo de concentraciones de trabajo al que se puede inyectar la muestra al cromatógrafo sin sobrecargarla y producir efectos secundarios sobre una serie de inyecciones consecutivas. En cuanto a las causas probables del fallo en la curva de calibración, la justificante más acertada es el acontecimiento del fenómeno conocido como “carry-over” [24] en la inyección del punto a 10 mg/mL (100%), causado por la inyección de la solución previa al 110%, explicando el incremento y deformación súbita del pico. Fenómeno que se corrige en las próximas inyecciones (90, 80 y 70 %).

Se descartó una mala preparación de muestra debido a que posteriormente al ensayo se inyectó la misma solución al 100% en otro vial y no se observó una anomalía en la morfología del pico, además de que el área del mismo se redujo a un valor esperado. Esto también explica el por qué existe menos desviación estándar relativa entre los factores de respuesta, obtenidos en la prueba de exactitud mostrada en el Anexo G, al comparar las inyecciones más enriquecidas con analito con respecto a las inyecciones menos concentradas.

De este modo, se sugiere que se estudie únicamente la repetibilidad del factor de respuesta del analito bajo las condiciones cromatográficas, así como el ensayo de valoración respectivo y probar ejecutar esta metodología disminuyendo el volumen de inyección y el Split Ratio con el propósito de evitar una disminución muy pronunciada en cuanto al factor de respuesta o incremento del factor de cola como se pudo apreciar en la Tabla 2, además de la utilización o no, de una columna capilar G43, conforme al ensayo propuesto por la farmacopea europea para el propanotriol (glicerol) [27] debido a la similitud del 1, 2, 6 – hexanotriol en cuanto a propiedades fisicoquímicas [28].

Finalmente, al analizar los resultados de desempeño de la Tabla 3, es posible notar que todas las metodologías cumplen de forma satisfactoria con valores de señal ruido y factor de cola del analito, en este sentido se puede decir que las condiciones cromatográficas son Óptimas. No obstante, al observar los valores de  $K'$ , es posible dilucidar que únicamente para

el caso de las materias primas zopiclona y acetona, las cantidades obtenidas son muy cercanas al rango propuesto como “ideal” para no desperdiciar tiempo analítico, no siendo así para el 1, 2, 6 – hexanotriol, puesto que el mismo es retenido durante mucho tiempo en la fase estacionaria siendo esta la razón por la cual presenta un valor de factor de capacidad de 10, demostrando que probablemente este tipo de materia prima puede presentar un mejor desempeño en otro tipo de columna, como la antes mencionada G43 o bien, requiere de otro tipo de solvente en su preparación cuyo punto de ebullición sea más cercano al punto de ebullición de la materia prima para mejorar el efecto del solvente [25].

## 5. CONCLUSIONES

Se consiguieron internalizar exitosamente un total de 3 metodologías de análisis de 4 propuestas, con resultados óptimos de desempeño analítico lo que garantiza el uso apropiado de recursos de alto valor. De igual manera, se demostró la capacidad que tiene el instrumento para alcanzar resultados fiables debido a los análisis de repetibilidad y precisión ejecutados sobre todas las metodologías, obteniéndose una revalorización del cromatógrafo de gases, en conjunto con las columnas y gases ya adquiridos por la empresa, puesto que al considerar el impacto de la internalización de estas metodologías se logró disminuir de forma muy significativa el tiempo de análisis, tiempo de generación documental y costos por análisis en un 90%.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Grünenthal, “Grünenthal - Donde la ciencia cambia vidas,” <https://www.latam.grunenthal.com/es-mx/sobre-nosotros/informacion-general-de-la-empresa>.
- [2] Grünenthal, “Ecuador,” [https://careers.grunenthal.com/go/Ecuador/4852101/?locale=es\\_ES](https://careers.grunenthal.com/go/Ecuador/4852101/?locale=es_ES).
- [3] G. Tian, A. Koolivand, N. S. Arden, S. Lee, and T. F. O’Connor, “Quality risk assessment and mitigation of pharmaceutical continuous manufacturing using flowsheet modeling approach,” *Comput Chem Eng*, vol. 129, 2019, doi: 10.1016/j.compchemeng.2019.06.033.
- [4] EMA, *Step 5: NOTE FOR GUIDANCE SPECIFICATIONS: TEST PROCEDURES AND ACCEPTANCE CRITERIA FOR NEW DRUG SUBSTANCES AND NEW DRUG PRODUCTS: CHEMICAL SUBSTANCES*. London, 2000, p. 4.
- [5] ICH Harmonized Guidelines, “ICH Q3C (R9) Guideline on impurities: guideline for residual solvents,” 2024.
- [6] EP, “Zopiclone ,” *European Pharmacopoeia 11.5*. 2024.
- [7] M. Santos, B. Jasanaba, and C. Ribas, “Process for synthesis and purification of anhydrous crystalline S-zopiclone,” 2009
- [8] Government of Canada, “Hazardous substance assessment - Acetone,” <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/environmental-workplace-health/occupational-health-safety/workplace-hazardous-materials-information-system/hazardous-substance-assessments/acetone.html>.

- [9] United States Environmental Protection Agency, “TOXICOLOGICAL REVIEW OF ACETONE (CAS No. 67-64-1) In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS),” Washington, DC, May 2003.
- [10] T. Buntara *et al.*, “Catalyst studies on the ring opening of tetrahydrofuran-dimethanol to 1,2,6-hexanetriol,” *Catal. Today*, vol. 210, p. 106, 2013.
- [11] Fisher Scientific, “1,2,6-Hexanetriol, 96 %, Thermo Scientific Chemicals - Description,” <https://www.fishersci.es/shop/products/1-2-6-hexanetriol-96-thermo-scientific/11352336#>.
- [12] ICH Harmonized Guidelines, “VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES Q2(R2),” 2023.
- [13] Grünenthal, “PROC-000470: Validación de métodos Analíticos,” 2023, *Grünenthal*.
- [14] Md. M. Rahman, A. M. A. El-Aty, J.-H. Choi, H.-C. Shin, S. C. Shin, and J.-H. Shim, “Basic Overview on Gas Chromatography Columns,” 2015. [Online]. Available: <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:51683229>
- [15] Agilent Technologies, “GC Detector Design & Troubleshooting- Flame Ionization (FID),” 2020, DE.6789930556.
- [16] Grünenthal, “PROC-000481: Verificación de métodos compendiales,” 2023.
- [17] Grünenthal, “SUP-002899: PROTOCOLO DE VALIDACIÓN,” 2023.
- [18] USP, “Acetone ,” *USP-NF*. 2020.
- [19] USP, “{621} Chromatography,” *USP-NF*, 2024.
- [20] Agilent Technologies, “Agilent 7890B Gas Chromatograph,” 2015.
- [21] Waters, “Guidelines for Setting Auto-Peak Width in ApexTrack Processing Methods and its Effect on USP Resolution and USP Plate Count ,” 2023.
- [22] Waters, “A4, Empower3 Processing Tips and Tricks,” 2013.
- [23] Agilent Technologies, “Maintaining Your GC,” 2014.

- [24] Oxford Academic, "Gas Chromatography Problem Solving and Troubleshooting," *J Chromatogr Sci*, vol. 34, no. 12, pp. 571–572, Dec. 2023, doi: 10.1093/chromsci/34.12.571.
- [25] Agilent Technologies, "GC Method Development," 2017.
- [26] H. R. Chand and A. K. Bhattacharya, "Hemiketal-Keto Tautomerism in 2-Deoxy- $\delta$ -lactones Mediated by 2-Lithiothiazole in Solution State: A Formal Synthesis of DAH, Kamusol and Their C 5 Epimers," *Asian J Org Chem*, 2019, [Online]. Available: <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:204124335>
- [27] EP, "Glycerol," *European Pharmacopoeia 11.5*. 2024.
- [28] S. H. Krishna *et al.*, "Synthesis of Hexane-Tetrols and -Triols with Fixed Hydroxyl Group Positions and Stereochemistry from Methyl Glycosides over Supported Metal Catalysts," *ACS Sustain Chem Eng*, vol. 8, no. 2, pp. 800–805, 2020, doi: 10.1021/acssuschemeng.9b04634.

## 7. ANEXOS:

## 8. ANEXO A: SUMARIO DE CRITERIOS DE ACEPTACIÓN PARA LAS METODOLOGÍAS DESARROLLADAS.

Tabla 1A. Resultados y criterios de aceptación para la verificación del método de cuantificación de 2-propanol en zopiclona.

Parámetro	Resultados	Criterio de Aceptación
Especificidad	No hay interferencias con los diversos componentes presentes en la matriz de la muestra ni atribuibles al proceso de análisis.	No tener interferencias con los diversos componentes presentes tanto en la matriz de la muestra como en el proceso de análisis.
Límite de detección	s/n: 89 RSD: 1,12 %	s/n > 3 RSD para 3 inyecciones ≤ 30%
Estabilidad a 24 horas (ambiente)	0%	Diferencia absoluta con respecto a la muestra en condiciones normales de análisis ≤ 30%
Estabilidad a 24 horas (refrigeración)	0%	Diferencia absoluta con respecto a la muestra en condiciones normales de análisis ≤ 30%
Robustez (variando el solvente de extracción)	K': 3,0 Tailing: 1,6 Variación de analito valorado: 0%	K' ≥ 1,0 Tailing 0,8 – 2,0 Variación de analito valorado ≤ 2,0% con respecto al valor nominal
Robustez (disminuyendo el flujo de fase móvil)	K': 3,0 Tailing: 1,2 Variación de analito valorado: 0%	K' ≥ 1,0 Tailing 0,8 – 2,0 Variación de analito valorado ≤ 2,0% con respecto al valor nominal
Robustez (aumentando el flujo de fase móvil)	K': 3,0 Tailing: 1,2 Variación de analito valorado: 0%	K' ≥ 1,0 Tailing 0,8 – 2,0 Variación de analito valorado ≤ 2,0% con respecto al valor nominal

Robustez (disminuyendo la temperatura del puerto de inyección)	K': 3,0 Tailing: 1,2 Variación de analito valorado: 0%	K' $\geq$ 1,0 Tailing 0,8 – 2,0 Variación de analito valorado $\leq$ 2,0% con respecto al valor nominal
Robustez (aumentando la temperatura del puerto de inyección)	K': 3,0 Tailing: 1,2 Variación de analito valorado: 100%	K' $\geq$ 1,0 Tailing 0,8 – 2,0 Variación de analito valorado $\leq$ 2,0% con respecto al valor nominal

Tabla 2A. Resultados y criterios de aceptación para la verificación del método de valoración de acetona.

Parámetro	Resultados	Criterio de Aceptación
Especificidad	No existen interferencias con los diversos componentes presentes tanto en la matriz de la muestra como en el proceso de análisis	No tener interferencias con los diversos componentes presentes tanto en la matriz de la muestra como en el proceso de análisis
Linealidad	Coeficiente de correlación de la curva de calibración: 1,000 Ordenada al origen: XXX $\pm$  NA  Intervalo de confianza (P=95%) del intercepto: XXX  Los residuos están distribuidos alrededor de la curva de calibración de manera que no exista una tendencia visible.	Coeficiente de correlación de la curva de calibración $\geq$ 0,999  Ordenada al origen: valor máximo $\pm$ 3,0% de la señal medida al 100%  Desviación estándar relativa de los valores de RRF, máximo 2%  Intervalo de confianza (P=95%) del intercepto, incluye las coordenadas de origen.  Los residuos deben estar distribuidos alrededor de la curva de calibración de manera que no exista una tendencia visible.
Precisión del método	Desviación estándar relativa: 0,01 %  Cumplen	Desviación estándar relativa (n=6) $\leq$ 2,0%  Cumplimiento de valores individuales según la especificación

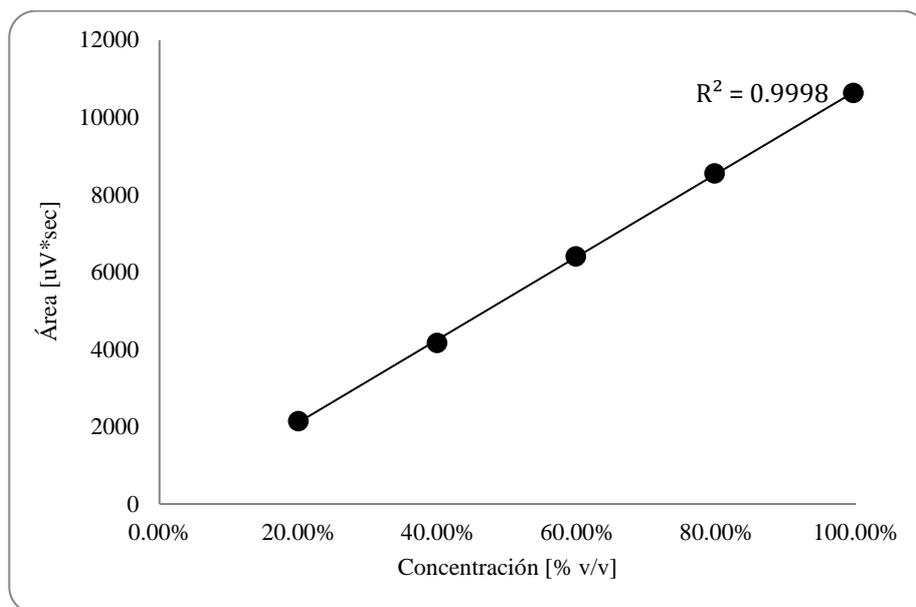


Figura 1A. Curva de calibración promedio para la valoración de acetona.

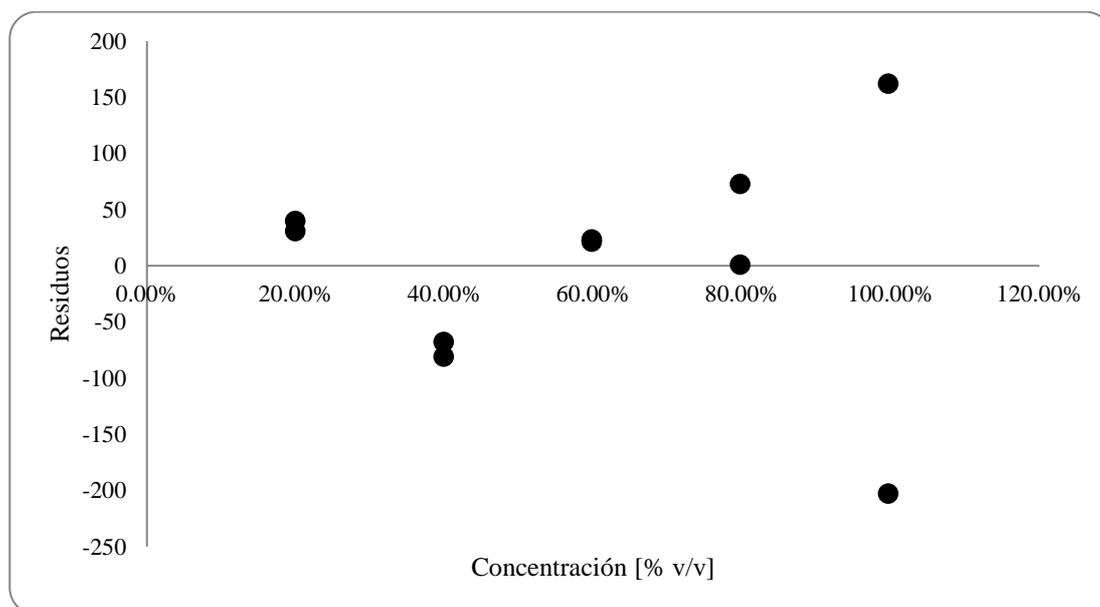


Figura 2A. Distribución de residuos para las curvas de calibración de para la valoración de acetona.

Tabla 3A. Resultados y criterios de aceptación para la validación del método de valoración de 1, 2, 6 - hexanotriol.

Parámetro	Resultados	Criterio de Aceptación
Especificidad	No existen interferencias con los diversos componentes presentes tanto en la matriz de la muestra como en el proceso de análisis	No tener interferencias con los diversos componentes presentes tanto en la matriz de la muestra como en el proceso de análisis.
Exactitud	289,6 No cumplen 4,9 %	Valor de media aritmética entre: 98,0 – 102,0%/ Valores individuales: 97,0 – 103,0% Desviación estándar relativa $\leq 2,0$ %
Repetibilidad del sistema	0,0%	Desviación estándar relativa (n=6) $\leq 2,0\%$
Precisión del método	0,0 %  Cumplen	Desviación estándar relativa (n=6) $\leq 2,0\%$  Cumplimiento de valores individuales según la especificación
Precisión intermedia	0 %	Desviación estándar relativa (n=12) $\leq 2,0\%$
Linealidad	0,668  Cumple 35,9 % Cumple  Cumple  Cumple	Coeficiente de correlación de la curva de calibración $\geq 0,999$ Ordenada al origen: valor máximo $\pm 3,0\%$ de la señal medida al 100%  Desviación estándar relativa de los valores de RRF, máximo 2% Intervalo de confianza (P=95%) del intercepto, incluye las coordenadas de origen  Los residuos deben estar distribuidos alrededor de la curva de calibración de manera que no exista una tendencia visible

Robustez variando el solvente de preparación a etanol	0 %, Robusto	Diferencia absoluta del resultado inicial $\leq 2,0$ %
Robustez variando el solvente de preparación a 2-propanol	3,6 %, No Robusto	Diferencia absoluta del resultado inicial $\leq 2,0$ %
Estabilidad de las soluciones muestra y estándar a 24 horas en temperatura ambiente	0%, Estable	Diferencia absoluta del resultado inicial $\leq 2,0$ %

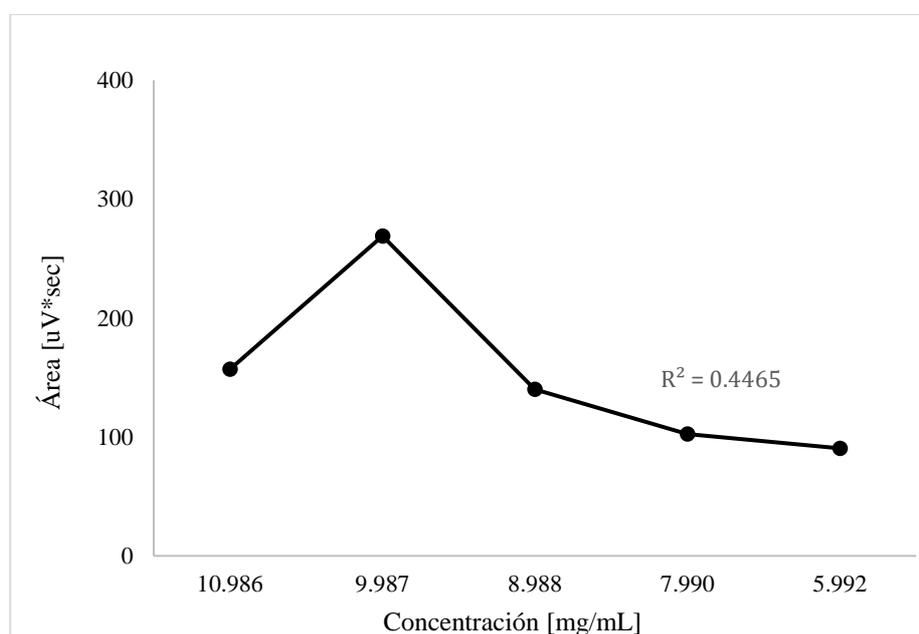


Figura 2A. Curva de calibración promedio para la valoración de 1, 2, 6 -hexanotriol.

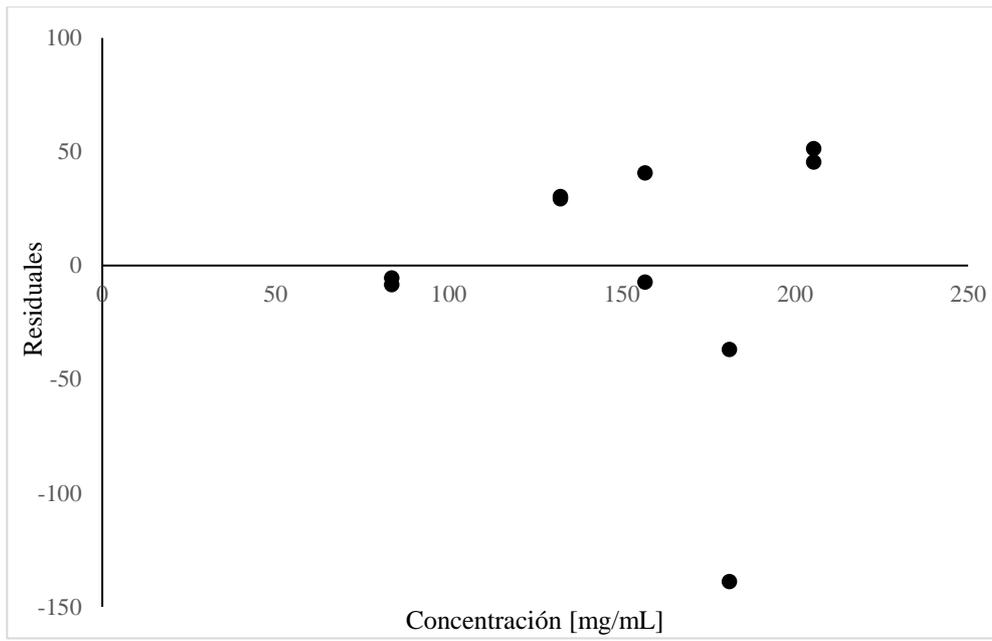


Figura 3A. Distribución de residuos para las curvas de calibración de para la valoración de 1, 2, 6 - hexanotriol.

## 9. ANEXO B: PROTOCOLOS DE VERIFICACIÓN/VALIDACIÓN

	SUP-002899/Rev.04 CONFIDENCIAL Protocolo de Verificación del Método Analítico de identificación y valoración de Zopiclona por GC	Documento N°: PT - (tipo de validación) (Código SAP / SAP Code). (Número de versión / revision number) Pág / Page: X de X / X of X Reemplaza: N/A
---	--	--

### PROTOCOLO DE VERIFICACIÓN

[El presente documento podrá ser adaptado según la necesidad del proceso]

#### GENERALIDADES:

Este documento describe el método analítico, responsabilidades y criterios de aceptación de la verificación del método de analítico de identificación y valoración del solvente residual clase 3, 2-propanol en Zopiclona, conforme a la monografía de la Farmacopea Europea 11.4, EP <1080> "Zopiclona", por GC.

<b>Contenido</b>	
1 Objetivo	1
2 Alcance	2
3 Responsabilidades	2
4 Parámetros de Verificación	2
5 Método de Análisis	3
6 Proceso de Validación	7
7 Criterios de Aceptación	9
8 Acciones para datos de análisis y procesos fuera de especificación	10
9 Resultados / Results	10
10 Historial de Cambios / Change history	10
11 Anexos / Attachments	10

#### 1 Objetivo

Demostrar que el método analítico utilizado para la identificación y valoración del solvente de clase 3, 2-propanol en Zopiclona por GC conforme a la monografía de la Farmacopea Europea 11.4, EP <1080> "Zopiclona", cumple con los requerimientos para las que fue diseñado y por lo tanto es capaz de proveer resultados reproducibles y confiables.

	SUP-002899/Rev.04 CONFIDENCIAL / CONFIDENCIAL Protocolo de Verificación del Método Analítico de identificación y valoración de Zopiclona por GC	Documento / Document N°: PT - (tipo de validación / Type of validation) (Código SAP / SAP Code). (Número de versión / revision number) Pág / Page: X de X / X of X Reemplaza: N/A
---	---	---

### PROTOCOLO DE VERIFICACIÓN

#### 2 Alcance

Método para identificación y valoración de del solvente residual clase 3, 2-propanol en la materia prima Zopiclona, conforme a la monografía de la Farmacopea Europea 11.4, EP <1080> "Zopiclona", por GC.

#### 3 Responsabilidades

Acción/ Responsable	Analista	Coordinador de [Área]	Jefe de [Área]	Global Quality Product Coordinator	Gerente, IMQ-EC / IMQ-EC Head
Protocolo	E	R	R	R	A
Reportes de Trabajo	E	R	A	---	---
Informe	E	R	R	---	A

"E" – Elaboración / **Elaborate**, "R" – Revisión / **Review**, "A" – Aprobación / **Approve**

Gerente IMQ-EC:

Mercedes Herrera

Global Quality Product Coordinator:

Gizella Riquelme

Jefe de Control de Calidad:

Gonzalo Ealizzari

Coordinador de Control de Calidad:

Alexandra Moncayo

Analista:

Guillermo Guayasamin/ Joel Guevara

#### Parámetros de Verificación

Los parámetros a determinar son los siguientes:

- Especificidad
- Límites de detección
- Estabilidad de las soluciones preparadas
  - o 24 horas a temperatura ambiente.
  - o 24 horas en refrigeración.
- Robustez
  - o Variando el flujo de a 2.1 mL/min y a 2.3 mL/min.
  - o Variando el solvente de extracción con N-N Dimetilformamida.
  - o Variando la temperatura del puerto de inyección a 215°C y a 235°C.

Nota: El documento podrá ser usado en español o inglés, según necesidad  
Note: The document can be used in Spanish or English, as needed.

	SUP-002899/Rev.04 CONFIDENCIAL / CONFIDENTIAL Protocolo de Verificación del Método Analítico de identificación y valoración de <b>Zopiclona</b> por GC	Documento / Document N°: PT - (tipo de validación / Type of validation) Código SAP / SAP Code) (Número de versión / revision number) Edi. / Page: X de X / X of X Reemplaza: N/A
	PROTOCOLO DE VERIFICACIÓN	

#### 4 Método de Análisis

Utilizar el método de análisis para la Identificación y valoración del solvente residual clase 3, 2-propanol en la materia prima **Zopiclona** según la monografía de la Farmacopea Europea 11.4, EP <1000> "**Zopiclona**".

##### Fundamento

La muestra se coloca en el interior de un vial **Space**, sometiéndose la solución a posteriores procesos de calentamiento, agitación y presurización, generándose la evaporación del solvente residual. La fase gaseosa del vial es inyectada, cuantificándose los analitos mediante cromatografía gaseosa con detección FID.

##### Aparatos, Reactivos, Estándares y Muestras

##### Equipos:

Cromatógrafo de gases Agilent 7890B con detector FID e inyector **Space**, calibrado en DIC 2023.

Balanzas analíticas, calibradas en DIC 2023.

Micropipetas, calibradas en JUL 2023.

Refrigerador, calibrado en MAR 2023.

Milli-Q, calibrado en ABR 2023.

Campana de extracción, calibrada en JUN 2023.

Columna GC, 30 m x 0.32 mm x 1.0 µm y composición de fase estacionaria: **metilpolisiloxano y cianopropilfenil** (94:3:3).

Estándares: N/A, se prepararán soluciones estándar con reactivos de alta pureza certificada según certificado de análisis del fabricante.

##### Reactivos:

Etanol R1, Lote: 11150283124, **Vigencia** 30 ABR 2026.

Dimetilsulfóxido, Lote: 212382, **Vigencia** JUL 2026.

2-propanol, Lote: 11268234306, **Vigencia** NOV 2024.

##### Materias primas/Muestras:

**Zopiclona**, Lote: T0009, **Vigencia** 31 JUL 2026.

##### Soluciones:

Solución estándar interno: Solución preparada con Etanol R1 y dimetilsulfóxido.

Solución muestra: Solución preparada con la muestra y la solución estándar interno.

Solución de adecuación del sistema: Solución preparada con 2-propanol y estándar interno.

##### Condiciones Analíticas

Note: El documento podrá ser usado en español o inglés, según necesidad.

Note: The document can be used in Spanish or English, as needed.

	SUP-002899/Rev.04 CONFIDENCIAL / CONFIDENTIAL Protocolo de Verificación del Método Analítico de identificación y valoración de <b>Zopiclona</b> por GC	Documento / Document N°: PT - (tipo de validación / Type of validation) Código SAP / SAP Code) (Número de versión / revision number) Edi. / Page: X de X / X of X Reemplaza: N/A
	PROTOCOLO DE VERIFICACIÓN	

Data rate / <b>mínimo</b> peak width: 20 Hz / 0.01 min
Save signal data: save data

##### Condiciones Head Space

Equipo:	Head Space, Agilent 7697A
Temperatura:	Horno: 105 °C Loop: 120 °C Transfer line: 120 °C

##### Método de preparación

Se realizarán preparaciones con cantidades menores de reactivo que aseguren la concentración indicada por la monografía de la Farmacopea Europea 11.4, EP <1000> "**Zopiclona**". De igual forma, se adaptarán las cantidades en gramos descritas por la monografía a volúmenes utilizando la densidad de los reactivos Etanol R1 y 2-propanol, tal y como se muestra a continuación:

$$V (\text{mL solvente}) = \frac{m}{\rho}$$

Donde:

V: Volumen del solvente (mL).

m: Masa del solvente (g).

$\rho$ : Densidad del solvente (g/mL).

##### Preparación de la solución Estándar Interno

Tomar exactamente 443,6 µL de Etanol R1 con una micropipeta y aforar hasta 20,0 mL en un balón volumétrico y con dimetilsulfóxido. Tomar una alícuota de 2,0 mL de la solución recién preparada y aforar en un balón volumétrico de 100,0 mL con dimetilsulfóxido.

##### Preparación de la solución Muestra

Pesar exactamente 50,0 mg de muestra directamente en el vial de Head Space y disolver con 1,0 mL de la solución estándar interno en el mismo vial.

##### Preparación de solución de Adecuación del Sistema (Estándar de referencia)

Tomar exactamente 22,4 µL de 2-propanol con una micropipeta y en un balón volumétrico de 50 mL aforar con la solución estándar interno.

##### Adecuación del Sistema

Note: El documento podrá ser usado en español o inglés, según necesidad.

Note: The document can be used in Spanish or English, as needed.

	SUP-002899/Rev.04 CONFIDENCIAL / CONFIDENTIAL Protocolo de Verificación del Método Analítico de identificación y valoración de <b>Zopiclona</b> por GC	Documento / Document N°: PT - (tipo de validación / Type of validation) Código SAP / SAP Code) (Número de versión / revision number) Edi. / Page: X de X / X of X Reemplaza: N/A
	PROTOCOLO DE VERIFICACIÓN	

##### Condiciones Cromatográficas de Operación

Equipo:	Cromatógrafo de gases Agilent 8890 GC				
Inlet (back injector):	Heater, Temperatura: 225°C Pressure, Valor automático. Total Flow, Valor automático. Mode: Split 1.5 Splitless (44mL/min valor automático)				
Columna:	Columna capilar de dimensiones 30 m x 0.32 mm x 1.0 µm y composición de fase estacionaria: <b>metilpolisiloxano y cianopropilfenil</b> (94:3:3).				
Condiciones de Columna (gas settings: Helio)	Mode: Constant Flow Pressure: 10.183 psi Flow: 2.2 mL/min (Econotario) Average Velocity: 35 cm/sec Post run: 2.2 mL/min				
Rampa de temperatura:	Horno	Rate (°C/min)	Value (°C)	Hold time (min)	Run time (min)
	Inicial	N/A	40	-	5
	Rampa 1	20	240	-	10
	Rampa 2	N/A	240	-	5
Horno de columna:	Temperatura inicial columna (setpoint): 40°C Equilibration time: 10.00 min Temperatura máxima: 300 °C Post run: 40 °C Post run time: 7.00 min				
Detector:	FID <input checked="" type="checkbox"/> Heater: 250 °C Air Flow: 400 mL/min <input checked="" type="checkbox"/> H2 Fuel Flow: 30 mL/min Constant makeup & fuel flow <input checked="" type="checkbox"/> <b>Kabeup</b> flow (He): 1 mL/min Flame				
Señal	Signal source_Det – Front detector				

Note: El documento podrá ser usado en español o inglés, según necesidad.

Note: The document can be used in Spanish or English, as needed.

	SUP-002899/Rev.04 CONFIDENCIAL / CONFIDENTIAL Protocolo de Verificación del Método Analítico de identificación y valoración de <b>Zopiclona</b> por GC	Documento / Document N°: PT - (tipo de validación / Type of validation) Código SAP / SAP Code) (Número de versión / revision number) Edi. / Page: X de X / X of X Reemplaza: N/A
	PROTOCOLO DE VERIFICACIÓN	

##### Procedimiento

Realizar inyecciones de 1 mL de las siguientes soluciones y reactivos:

- Inyectar una vez por separado:
  - Etanol R1
  - Dimetilsulfóxido
  - 2-propanol
- Inyectar una vez la solución estándar interno.
- Inyectar por triplicado la solución de adecuación del sistema (Preparar 3 viales).
- Inyectar una por duplicado la solución muestra (Preparar 2 viales).

##### Requerimientos de adecuación del sistema

Resolución mínima de 3.0 entre las señales de etanol y 2-propanol.

##### Especificación

2-propanol máx. 0,7 por ciento

##### Cálculos

##### Cálculo de solvente residual en materia prima

El cálculo se realiza como se detalla a continuación:

Comparar el área de la solución estándar con el área del analito en la solución muestra. La determinación cumple si para el solvente (2-propanol), el resultado obtenido es menor o igual a lo especificado.

$$\frac{\mu\text{g}}{\text{g}} (\text{ppm solvente}) = \frac{\text{Amta} \times \left( \frac{\%F}{100} \right)}{\text{Astd} \times 50 \times \text{Pmta}} \times 1000 \times 1000 \times \text{D}$$

Donde:

Amta: Área del solvente presente en la solución muestra.

Astd: Área del solvente correspondiente al estándar de referencia.

Vstd: Volumen de estándar (mL).

%F: (considerar la pureza del Reactivo en el Certificado de análisis).

Fmta: Peso de la muestra (g)

D: Densidad del solvente (g/mL) (obtener dato de densidad a partir del certificado de análisis de reactivo o del rotulo del frasco)

Note: El documento podrá ser usado en español o inglés, según necesidad.

Note: The document can be used in Spanish or English, as needed.

SUP-002899/Rev.04  
**CONFIDENCIAL / CONFIDENTIAL**  
 Protocolo de Verificación del Método Analítico de identificación y valoración de Zopiclona por GC

Documento / Document N°:  
 PT - (tipo de validación / Type of validation) / Código SAP / SAP Code (Número de versión / revision number) / Pág. / Page: X de X / X of X  
 Reemplaza: N/A

**PROTOCOLO DE VERIFICACIÓN**

**5 Proceso de Validación**

Se describe el listado de parámetros evaluados durante la validación, de acuerdo con lo establecido por el capítulo USP "Solventes Residuales – Verificación de procedimientos compendiales y validación de procedimientos alternativos".

Referente a:	Parámetros para evaluar:
Validación de solventes residuales clase 3	Especificidad
	Límite de detección
	Estabilidad
	Robustez

**Especificidad:**

La especificidad del método verifica si existen interferencias con algún otro componente presente en las soluciones empleadas para el análisis. Con este propósito, se necesita correr las siguientes pruebas de las soluciones preparadas, inyectar por separado cada una de las preparaciones de las soluciones.

Las soluciones preparadas a inyectar:

- Inyectar una vez por separado:
  - Etanol R1
  - Dimetilsulfóxido
  - Propanol
- Inyectar una vez la solución estándar interno.
- Inyectar una vez la solución de adecuación del sistema.

Bajo los mismos criterios de resolución de picos utilizados para la adecuación del sistema, se determina la especificidad del método.

**Límite de detección:**

El límite de detección es la mínima cantidad de analito puede ser detectado. Con este propósito se necesitan determinar los límites de detección (LOD) del 2-propanol, realizándose diluciones en viales color ámbar para obtener concentraciones del 50.0%, 40.0%, 30.0%, 20.0% y 10.0% con respecto a la concentración de trabajo, en este caso, la concentración de trabajo corresponde a la concentración en µL/mL de 2-propanol en la solución de adecuación del sistema.

Note: El documento podrá ser usado en español o inglés, según necesidad  
 Note: The document can be used in Spanish or English, as needed

SUP-002899/Rev.04  
**CONFIDENCIAL / CONFIDENTIAL**  
 Protocolo de Verificación del Método Analítico de identificación y valoración de Zopiclona por GC

Documento / Document N°:  
 PT - (tipo de validación / Type of validation) / Código SAP / SAP Code (Número de versión / revision number) / Pág. / Page: X de X / X of X  
 Reemplaza: N/A

**PROTOCOLO DE VERIFICACIÓN**

Se almacenan las soluciones estándar interno, adecuación y muestras preparadas para especificidad, durante 24 horas a temperatura ambiente y refrigeración, sin exponer las muestras a la luz solar. Las muestras son inyectadas junto con soluciones de adecuación recién preparados.

Se preparan tres soluciones de estándar interno, adecuación y muestra (9 soluciones en total) de acuerdo a la preparación especificada en el punto 5. El primer grupo de soluciones (estándar interno, adecuación y muestra) se utilizarán para determinar especificidad, el grupo 2 de soluciones (estándar interno, adecuación y muestra) se almacenarán durante 24 horas a temperatura ambiente y el grupo 3 de soluciones se almacenarán durante 24 horas en refrigeración. Transcurrido este tiempo, se evaluará el desempeño de los grupos 2 y 3 bajo los criterios de especificidad y se comparará con respecto al grupo 1, según el criterio de aceptación correspondiente.

**Robustez:**

Se preparan todas las secuencias de corrida de análisis para la zopiclona de acuerdo al procedimiento descrito en el punto 6 realizando las siguientes modificaciones:

- Variando el flujo en cada secuencia de corrida a 2.1 mL/min y a 2.3 mL/min.
- Variando el solvente de extracción con N-N Dimetilformamida.
- Variando la temperatura del puerto de inyección a 215°C y a 235°C.

Todos los datos de la validación se someten a evaluación de acuerdo a los criterios de aceptación.

**6 Criterios de Aceptación**

Parámetro	Criterio de Aceptación
<b>Especificidad</b>	• No tener interferencias con los diversos componentes presentes tanto en la matriz de la muestra como en el proceso de análisis.
<b>Límites de detección</b>	• LD (S/N > 3): RSD para 3 inyecciones ≤ 30%
<b>Estabilidad de las soluciones</b>	• Diferencia absoluta con respecto a la muestra en condiciones normales de análisis ≤ 30.0%
<b>Robustez</b>	• Factor de capacidad k' ≥ 1.0 <b>Tailing</b> 0.85 – 2.0 Variación de áreas: Diferencia ≤ 2.0%, con respecto al valor nominal.

Note: El documento podrá ser usado en español o inglés, según necesidad  
 Note: The document can be used in Spanish or English, as needed

SUP-002899/Rev.04  
**CONFIDENCIAL / CONFIDENTIAL**  
 Protocolo de Verificación del Método Analítico de identificación y valoración de Zopiclona por GC

Documento / Document N°:  
 PT - (tipo de validación / Type of validation) / Código SAP / SAP Code (Número de versión / revision number) / Pág. / Page: X de X / X of X  
 Reemplaza: N/A

**PROTOCOLO DE VERIFICACIÓN**

La siguiente tabla muestra los volúmenes requeridos tanto de la solución adecuación del sistema como de la solución estándar interno para llegar a las concentraciones deseadas, considerando un volumen de aforo de 1 mL.

		ml.	C. final (µL/mL)
50.0%	Soln. Adecuación	0.5	0,2244
	Soln. Estándar int.	0.5	
	Aforo	1	
40.0%	Soln. Adecuación	0.4	0,1795
	Soln. Estándar int.	0.6	
	Aforo	1	
30.0%	Soln. Adecuación	0.3	0,1346
	Soln. Estándar int.	0.7	
	Aforo	1	
20.0%	Soln. Adecuación	0.2	0,0897
	Soln. Estándar int.	0.8	
	Aforo	1	
10.0%	Soln. Adecuación	0.1	0,0449
	Soln. Estándar int.	0.8	
	Aforo	1	

Se inyectarán volúmenes de 1 mL de acuerdo al siguiente protocolo:

La primera tanda de inyecciones consiste en 5 viales Head Space con las preparaciones al 50.0%, 40.0%, 30.0%, 20.0% y 10.0%, respectivamente. Posteriormente, para confirmar los límites inferiores se realizarán inyecciones por triplicado de las preparaciones al 20.0% (preparar 3 viales) y posteriormente al 10.0% (preparar 3 viales).

- Inyectar una vez la solución al 50.0%
- Inyectar una vez la solución al 40.0%
- Inyectar una vez la solución al 30.0%
- Inyectar una vez la solución al 20.0%
- Inyectar una vez la solución al 10.0%
- Inyectar por triplicado la al 20.0% (Preparar 3 viales).
- Inyectar por triplicado la al 10.0% (Preparar 3 viales).

Se evaluará el valor de la relación señal-ruido (S/N) obtenido de acuerdo los criterios de aceptación.

**Estabilidad de las soluciones:**

Note: El documento podrá ser usado en español o inglés, según necesidad  
 Note: The document can be used in Spanish or English, as needed

SUP-002899/Rev.04  
**CONFIDENCIAL / CONFIDENTIAL**  
 Protocolo de Verificación del Método Analítico de identificación y valoración de Zopiclona por GC

Documento / Document N°:  
 PT - (tipo de validación / Type of validation) / Código SAP / SAP Code (Número de versión / revision number) / Pág. / Page: X de X / X of X  
 Reemplaza: N/A

**PROTOCOLO DE VERIFICACIÓN**

**7 Acciones para datos de análisis y procesos fuera de especificación**

Si los resultados se encuentran fuera de los límites, se informará inmediatamente al área de Validaciones y se evaluará las siguientes acciones cuando aplique:

- Evaluar la criticidad de lo sucedido
- Definir si se aclara en el informe final o se procede a la apertura de un evento.

**8 Resultados / Results**

Evaluar los resultados obtenidos para los parámetros de verificación analizados, elaborar un informe y emitir un registro de validación.

**9 Historial de Cambios / Change history**

No.	Fecha / Date	Cambio Realizado / Change made	Observaciones / Observations

**10 Anexos / Attachments**

N/A

Note: El documento podrá ser usado en español o inglés, según necesidad  
 Note: The document can be used in Spanish or English, as needed

Figura 1B. Protocolo de verificación de 2-propanol en zopiclona.

	SUP-002899/Rev.04 CONFIDENCIAL / CONFIDENTIAL Protocolo de Verificación del Método Analítico Identificación y valoración de Acetona (MP) por Cromatografía de Gases (GC)	Documento N°: PT - (verificación) (20014846). (01) Pág: 1 de 11 Reemplaza: NA
	PROTOCOLO DE VERIFICACIÓN	

**GENERALIDADES:**

Este documento describe el método analítico, responsabilidades y criterios de aceptación de la verificación del método de analítico de identificación y valoración de Acetona (MP) según la monografía de la Farmacopea de Estados Unidos (USP) USP43 Issue 1 <USP43-NF38> "Acetone" por GC.

1	Contenido	1
2	Objetivo	2
3	Alcance	2
4	Responsabilidades	2
5	Parámetros de Verificación	2
6	Método de Análisis	2
7	Método de preparación	6
8	Especificación	7
9	Proceso de Verificación	8
10	Criterios de Aceptación	10
11	Acciones para datos de análisis y procesos fuera de especificación	10
12	Resultados	10
13	Historial de Cambios	11
14	Anexos / Attachments	11

**2 Objetivo**

Demostrar que el método analítico utilizado para la identificación y valoración de Acetona (MP) según la monografía de la Farmacopea de Estados Unidos (USP) USP43 Issue 1 <USP43-NF38> "Acetone" por GC, cumple con los requerimientos para las que fue diseñado y por lo tanto es capaz de proveer resultados reproducibles y confiables.

	SUP-002899/Rev.04 CONFIDENCIAL / CONFIDENTIAL Protocolo de Verificación del Método Analítico Identificación y valoración de Acetona (MP) por Cromatografía de Gases (GC)	Documento N°: PT - (verificación) (20014846). (01) Pág: 2 de 11 Reemplaza: NA
	PROTOCOLO DE VERIFICACIÓN	

**3 Alcance**

Método para identificación y valoración de la materia prima Acetona, según la monografía de la Farmacopea de Estados Unidos (USP) USP43 Issue 1 <USP43-NF38> "Acetone" por GC.

**4 Responsabilidades**

Acción/ Responsable	Analista	Coordinador de [Área]	Jefe de [Área]	Global Quality Product Manager	Gerente IMQ-EC
Protocolo	E	R	R	R	A
Reportes de Trabajo	E	R	A	—	—
Informe	E	R	R	—	A

"E" – Elaboración / Elaborate "R" – Revisión / Review "A" – Aprobación / Approve

Gerente IMQ-EC / IMQ-EC Head: Mercedes Herrera  
 Global Quality Product Manager: Gizella Riquelme  
 Jefe de Control de Calidad: Gonzalo Pellizzari  
 Coordinador de Control de Calidad: Alexandra Moncayo  
 Analista: Paola Cabrera/ Joel Guevara

**5 Parámetros de Verificación**

Los parámetros a determinar son los siguientes:

- Especificidad
- Linealidad
- Precisión del método

**6 Método de Análisis**

Utilizar el método de análisis para la identificación y valoración de acetona, según la monografía de la Farmacopea de Estados Unidos (USP) USP43 Issue 1 <USP43-NF38> "Acetone" por GC.

**Fundamento**

La muestra se coloca en el interior de un vial de inyección ALS sometiendo la solución a posteriores procesos de calentamiento, y vaporización de los componentes de la muestra líquida

Note: El documento podrá ser usado en español o inglés, según necesidad  
 Note: The document can be used in Spanish or English, as needed

	SUP-002899/Rev.04 CONFIDENCIAL / CONFIDENTIAL Protocolo de Verificación del Método Analítico Identificación y valoración de Acetona (MP) por Cromatografía de Gases (GC)	Documento N°: PT - (verificación) (20014846). (01) Pág: 3 de 11 Reemplaza: NA
	PROTOCOLO DE VERIFICACIÓN	

en la cámara de mezcla del inyector. La mezcla de gases es inyectada, cuantificándose los analitos mediante cromatografía gaseosa con detección FID.

**Aparatos, Reactivos, Estándares y Muestras**

- Equipos:**
- Cromatógrafo de gases Agilent 7890B con detector FID e inyector Head Space, calibrado en DIC 2023.
  - Balanzas analíticas, calibradas en ENE 2024.
  - Micropipetas, calibradas en AGO 2024.
  - Refrigerador, calibrado en MAR 2024.
  - Milli-Q, calibrado en ABR 2023.
  - Campana de extracción, calibrada en JUN 2024.
  - Columna GC, 30 m x 0.32 mm x 1.8 µm y composición de fase estacionaria: G43 o equivalente.
  - Estándar/es: N/A, se prepararán soluciones estándar con reactivos de alta pureza certificada según certificado de análisis del fabricante.
- Reactivos:**
- Metanol, Lote: 234000, Vigencia FEB 2027.
  - Acetona, Lote: 232826, Vigencia 27 JUL 2028.
  - Tetrahidrofurano, Lote: 243362, Vigencia JUN 2025.
- Materias primas/Muestras:**
- Acetona, Lote: W0026, Vigencia 31 AGO 2028.

Note: El documento podrá ser usado en español o inglés, según necesidad  
 Note: The document can be used in Spanish or English, as needed

	SUP-002899/Rev.04 CONFIDENCIAL / CONFIDENTIAL Protocolo de Verificación del Método Analítico Identificación y valoración de Acetona (MP) por Cromatografía de Gases (GC)	Documento N°: PT - (verificación) (20014846). (01) Pág: 4 de 11 Reemplaza: NA
	PROTOCOLO DE VERIFICACIÓN	

**Condiciones Analíticas**

**Condiciones Cromatográficas de Operación**

Equipo:	Cromatógrafo de gases Agilent 6890 GC				
Inlet (front injector):	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Heater: Temperatura: 200°C</li> <li>• Pressure: Valor automático.</li> </ul> Total Flow: Valor automático. Mode: Split 400:1 Splitflow: Valor automático				
Columna:	Columna capilar de dimensiones 30 m x 0.32 mm x 1.8 µm y composición de fase estacionaria: metilpolisiloxano y cianopropilfenil (94:3:3).				
Condiciones de Columna (gas settings: Helio)	Mode: Constant Flow Pressure: Valor automático Flow: Valor automático Average Velocity: 35 cm/sec Post run: Mismo valor que Flow				
Rampa de temperatura:	Horno	Rate (°C/min)	Value (°C)	Hold time at final temperature (min)	Run time (min)
	Inicial	0	40	5	5
	Rampa 1	20	240	0	15
Horno de columna:	Temperatura inicial columna (setpoint): 40°C Equilibration time: 10,00 min Temperatura máxima: 280 °C Post run: 150 °C Post run time: 10,00 min				
Detector:	<ul style="list-style-type: none"> <li>• FID <input checked="" type="checkbox"/> Heater: 280 °C</li> <li>• Air Flow: 400 mL/min <input checked="" type="checkbox"/> H2 Fuel Flow: 30 mL/min</li> <li>• Constant makeup &amp; fuel flow <input checked="" type="checkbox"/> Makeup flow (N2): 1 mL/min</li> <li>• Flame</li> </ul>				

Note: El documento podrá ser usado en español o inglés, según necesidad  
 Note: The document can be used in Spanish or English, as needed

	SUP-002899/Rev.04 CONFIDENCIAL / CONFIDENTIAL Protocolo de Verificación del Método Analítico Identificación y valoración de Acetona (MP) por Cromatografía de Gases (GC)	Documento N°: PT - (verificación) (20014846). (01) Pág: 5 de 11 Reemplaza: NA
	PROTOCOLO DE VERIFICACIÓN	

Señal	Signal source : Det – Front detector Data rate / mínimo peak width: 20 Hz / 0.01 min Save signal data: save data
-------	--

**Condiciones ALS**

Equipo:	Head Space Agilent 7667A
Front Injector:	<b>Injection</b> Syringe Size: 10 µL Injection Volume: 1 µL <b>Dwell Time</b> Pre-injection: 0 min Post-injection: 0 min <b>Sample Depth</b> o Enable <b>Washes and Pumps</b> Solvent A Washes: • PreInj: 3 • PostInj: 3 • Volume (µL): Max (8) Solvent B Washes: • PreInj: 3 • PostInj: 3 • Volume (µL): Max (8) Sample Washes: • PreInj: 3 • Volume (µL): Max (8) Sample Pumps: 6 <b>Plunger Speed:</b> o Fast Viscosity Delay: 0 sec

Note: El documento podrá ser usado en español o inglés, según necesidad  
 Note: The document can be used in Spanish or English, as needed

	SUP-002899/Rev.04 CONFIDENCIAL / CONFIDENTIAL Protocolo de Verificación del Método Analítico Identificación y valoración de Acetona (MP) por Cromatografía de Gases (GC)	Documento N°: PT - (verificación) (20014846). (01) Pág: 7 de 11 Reemplaza: NA
	PROTOCOLO DE VERIFICACIÓN	

**Adecuación del Sistema**

**Procedimiento**

**Protocolo de inyección**

Inyectar 1.0 µL de las siguientes soluciones:  
 Inyectar (por triplicado) la solución de adecuación del sistema.  
 Inyectar (por duplicado) la muestra.

**Requerimientos de adecuación del sistema**

Resolución mínima de 15.0 entre las señales de metanol y acetona.

**Nota:** Los tiempos de retención relativos para metanol, acetona y tetrahidrofurano se encuentran próximos a 0.6, 1.0 y 1.9 respectivamente. En caso de realizarse el cálculo de los RRT se debe considerar que el tiempo de retención de referencia corresponde al análisis de interés (acetona) y no a la mayor señal detectada.

**8 Especificación**

**IDENTIFICACIÓN**

B. Tiempo de Retención:	El tiempo de retención de la muestra corresponde al del estándar de Acetona, según se obtiene en la valoración.
<b>VALORACIÓN</b>	
Acetona	Min. 99.0% (Calculado con respecto a la sustancia anhidra).

Note: El documento podrá ser usado en español o inglés, según necesidad  
 Note: The document can be used in Spanish or English, as needed

	SUP-002899/Rev.04 CONFIDENCIAL / CONFIDENTIAL Protocolo de Verificación del Método Analítico Identificación y valoración de Acetona (MP) por Cromatografía de Gases (GC)	Documento N°: PT - (verificación) (20014846). (01) Pág: 6 de 11 Reemplaza: NA
	PROTOCOLO DE VERIFICACIÓN	

	Injection Type: Standard
Tray/Other	Sample Overlap o Enable Sample Overlap ALS Errors: Stop the sequence

Verificar en la sección *Options* del método instrumental creado en Empower, que el método tenga seleccionado el driver GC0:Front (correspondiente al módulo ALS) y no el driver SAMPLER0:GC (correspondiente al módulo Headspace).

**7 Método de preparación**

Se realizarán preparaciones con cantidades menores de reactivo que aseguren la concentración indicada por la monografía de la Farmacopea de Estados Unidos USP43 Issue 2, < USP43-NF38 > "Acetone".

**Preparación de solución matriz**

Tomar exactamente 500.0 µL de Metanol de alta pureza con una micropipeta calibrada y aforar con tetrahidrofurano hasta 25 mL en un balón volumétrico. Esta solución no forma parte del análisis rutinario.

**Preparación de solución de adecuación/aptitud del sistema**

Tomar exactamente 0.2 mL de Metanol de alta pureza y 0.2 mL de Acetona de alta pureza con micropipetas calibradas y aforar con tetrahidrofurano hasta 10 mL en un balón volumétrico.

**Preparación de muestra**

No se requiere preparar o pretreatar la muestra para su inyección. En un vial ALS cargar directamente 1.0 mL de Acetona (MP).

**Preparación de viales**

Tomar aproximadamente 1.0 mL de cada solución y cargar en viales ALS individuales.

Note: El documento podrá ser usado en español o inglés, según necesidad  
 Note: The document can be used in Spanish or English, as needed

	SUP-002899/Rev.04 CONFIDENCIAL / CONFIDENTIAL Protocolo de Verificación del Método Analítico Identificación y valoración de Acetona (MP) por Cromatografía de Gases (GC)	Documento N°: PT - (verificación) (20014846). (01) Pág: 8 de 11 Reemplaza: NA
	PROTOCOLO DE VERIFICACIÓN	

**Cálculos**

s.

**9 Proceso de Verificación**

Se describe el listado de parámetros evaluados durante la verificación, de acuerdo con lo establecido por el capítulo USP <1225> "Validation of Compendial Procedures" y al PROC-000481 "Verificación de métodos compendiales".

Referente a:	Parámetros para evaluar:
Identificación y valoración	Especificidad
	Linealidad
	Precisión del método

**Especificidad:**

La especificidad del método verifica si existen interferencias con algún otro componente presente en las soluciones empleadas para el análisis. Con este propósito, se necesita correr las siguientes pruebas de las soluciones preparadas, inyectar por separado cada una de las preparaciones de las soluciones.

Las soluciones/reactivos a inyectar:

Inyectar 1 vez:

- Tetrahidrofurano.
- Metanol de alta pureza.
- Acetona de alta pureza.
- Solución matriz.
- Solución de adecuación del sistema.
- Muestra.

Preparar los viales de acuerdo al apartado 5.6

**Linealidad:**

Se preparan 4 soluciones de 10 mL en el rango de (80-20%) de concentración de acetona con respecto a su concentración nominal. Además, se tiene en consideración que la muestra a valorar

Note: El documento podrá ser usado en español o inglés, según necesidad  
 Note: The document can be used in Spanish or English, as needed

	SUP-002899/Rev.04 CONFIDENCIAL / CONFIDENTIAL Protocolo de Verificación del Método Analítico Identificación y valoración de Acetona (MP) por Cromatografía de Gases (GC)	Documento N°: PT - (validación de método) (20014846). (01) Pág. 9 de 11 Reemplaza: NA
	PROTOCOLO DE VERIFICACIÓN	

se inyectará de forma directa al instrumento, por lo que no aplica la preparación de una solución madre. De este modo, se preparan las siguientes soluciones a partir de Acetona al 99.0% (concentración nominal). Realizar este procedimiento por duplicado después de comprobar la aptitud del sistema cromatográfico.

% Acetona	Alicuota (mL)
100%	NA
80 %	8
60 %	6
40 %	4
20 %	2

**Precisión del método:**

Se cargan 6 muestras en viales distintos bajo el método de preparación y el protocolo de inyección indicado en el punto 5.6 (No se inyectará en duplicado las muestras, únicamente una inyección por cada vial de muestra). Es necesario comprobar la aptitud del sistema únicamente al inicio de la corrida cromatográfica.

**10 Criterios de Aceptación**

Parámetro	Criterio de Aceptación
<b>Especificidad</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>No tener interferencias con los diversos componentes presentes tanto en la matriz de la muestra como en el proceso de análisis.</li> <li>Coefficiente de correlación de la curva de calibración <math>\geq 0.999</math></li> <li>Ordenada al origen: valor máximo <math>\pm 3.0\%</math> de la señal medida al 100%</li> </ul>
<b>Linealidad</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Desviación estándar relativa de los valores de RRF, máximo 2%</li> <li>Intervalo de confianza (P=95%) del intercepto, incluye las coordenadas de origen.</li> </ul>

Note: El documento podrá ser usado en español o inglés, según necesidad  
 Note: The document can be used in Spanish or English, as needed

	SUP-002899/Rev.04 CONFIDENCIAL / CONFIDENTIAL Protocolo de Verificación del Método Analítico Identificación y valoración de Acetona (MP) por Cromatografía de Gases (GC)	Documento N°: PT - (validación de método) (20014846). (01) Pág. 10 de 11 Reemplaza: NA
	PROTOCOLO DE VERIFICACIÓN	

- Los residuos deben estar distribuidos alrededor de la curva de calibración de manera que no exista una tendencia visible.
- Precisión del método**
  - Desviación estándar relativa (n=8)  $\leq 2.0\%$
  - Cumplimiento de valores individuales según la especificación

En el caso de la linealidad, se omitirán los criterios relacionados con el cálculo de RRF y la distribución de residuos puesto que no se cuantificarán impurezas, únicamente el contenido de acetona en la muestra.

**11 Acciones para datos de análisis y procesos fuera de especificación**

Si los resultados se encuentran fuera de los límites, se informará inmediatamente al área de Validaciones y se evaluará las siguientes acciones cuando aplique:

- Evaluar la criticidad de lo sucedido
- Definir si se aclara en el informe final o se procede a la apertura de un evento.

**12 Resultados**

Evaluar los resultados obtenidos para los parámetros de verificación analizados, elaborar un informe y emitir un registro de validación.

**13 Historial de Cambios**

No.	Fecha / Date	Cambio Realizado / Change made	Observaciones / Observations

**14 Anexos / Attachments**  
N/A

Note: El documento podrá ser usado en español o inglés, según necesidad  
 Note: The document can be used in Spanish or English, as needed

Figura 2B. Protocolo de verificación de identificación y valoración de acetona.

	SUP-002899/Rev.04 CONFIDENCIAL / CONFIDENTIAL Protocolo de Validación del Método Analítico de Valoración de 1, 2, 6 - Hexanotriol (MP) por Cromatografía de Gases (GC)	Documento N°: PT - (validación de método). (01) (90001952). (01) Pág. 1 de 11 Reemplaza: NA
	PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	

**GENERALIDADES:**

Este documento describe el método analítico, responsabilidades y criterios de aceptación de la validación del método de analítico de valoración de 1, 2, 6 - Hexanotriol por GC.

Contenido	
1 Objetivo	1
2 Alcance	1
3 Responsabilidades	2
4 Parámetros de Validación	2
5 Método de Análisis	3
6 Proceso de Validación	9
7 Criterios de Aceptación	
8 Acciones para datos de análisis y procesos fuera de especificación	11
9 Resultados	12
10 Historial de Cambios	12
11 Anexos / Attachments	12

**1 Objetivo**

Demostrar que el método analítico utilizado para la identificación y valoración de 1, 2, 6 - Hexanotriol por Cromatografía de Gases (GC), cumple con los requerimientos para los que fue diseñado y por lo tanto es capaz de proveer resultados reproducibles y confiables.

**2 Alcance**

Método para la valoración de la materia prima 1, 2, 6 - Hexanotriol, por Cromatografía de Gases (GC).

	SUP-002899/Rev.04 CONFIDENCIAL / CONFIDENTIAL Protocolo de Validación del Método Analítico de Valoración de 1, 2, 6 - Hexanotriol (MP) por Cromatografía de Gases (GC)	Documento N°: PT - (validación de método). (01) (90001952). (01) Pág. 2 de 11 Reemplaza: NA
	PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	

**3 Responsabilidades**

Acción/Responsable	Analista	Coordinador de Laboratorio Químico	Jefe de Laboratorio Químico	Coordinador de Validaciones	Jefe de Validaciones	Global Quality Product Manager	Gerente IMQ-EC
Protocolo	E	R	R	R	R	R	A
Reportes de Trabajo	E	R	A	—	—	—	—
Informe	E	R	R	R	R	—	A

E" – Elaboración / Elaborate R" – Revisión / Review "A" – Aprobación / Approval

Gerente IMQ-EC / IMQ-EC Head: Mercedes Herrera  
 Global Quality Product Manager: Verónica Tasiguanu  
 Jefe de Validaciones: Cristina Rios  
 Jefe de Laboratorio Químico: Gonzalo Pellizzari  
 Coordinador de Validaciones: Pamela Cazar  
 Coordinador de Laboratorio Químico: Alexandra Moncayo  
 Analista/s: Paola Cabrera/Joel Guevara

**4 Parámetros de Validación**

Los parámetros a determinar son los siguientes:

- Especificidad
- Exactitud
- Precisión
  - o Repetibilidad del sistema
  - o Precisión del método
  - o Precisión intermedia
- Linealidad
- Robustez
  - o Variando el solvente de preparación a etanol.
  - o Variando el solvente de preparación a 2-propanol.
- Estabilidad de la solución muestra y estándar
  - o 24 horas a temperatura ambiente.

Note: El documento podrá ser usado en español o inglés, según necesidad  
 Note: The document can be used in Spanish or English, as needed

	SUP-002899/Rev.04 CONFIDENCIAL / CONFIDENTIAL Protocolo de Validación del Método Analítico de Valoración de 1, 2, 6-Hexanotriol (MP) por Cromatografía de Gases (GC)	Documento N°: PT - (validación de método). (90001952). (01) Pág: 2 de 11 Reemplaza: NA
--	--	--

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN

**5 Método de Análisis**

Utilizar el método de análisis para la valoración de 1, 2, 6 - Hexanotriol por Cromatografía de Gases (GC).

**5.1 Fundamento**

La muestra se coloca en el interior de un vial de inyección ALS sometiendo la solución a posteriores procesos de calentamiento, y vaporización de los componentes de la muestra líquida en la cámara de mezcla del inyector (líner). La mezcla de gases es inyectada, cuantificándose los analitos mediante cromatografía gaseosa con detección FID.

**5.2 Aparatos, Reactivos, Estándares y Muestras**

Equipo	Última calibración	Próxima calibración	ID	
Cromatógrafo de gases Agilent 7890B con detector FID	DIC 2023	DIC 2024	AI054	-
Balanzas analíticas	JUL 2024	-	-	-
Micropipetas	AGO 2024	NOV 2024	AQ073/AQ072	-
Estándares	Lote	Vigencia	CAS	Fórmula
1, 2, 6 - Hexanotriol	R0007	22 ENE 2025	108-89-4	C8H14O3
Reactivos	Lote	Vigencia		
Metanol HPLC	I1337407	30 ABR 2027	-	-
2-propanol	I1268234	NOV 2024	-	-
Etanol	I1150283	30 ABR 2026	-	-
Materias primas	Lote	Vigencia		
1, 2, 6 - Hexanotriol	W0004	30 SEP 2025	-	-

Note: El documento podrá ser usado en español o inglés, según necesidad  
Note: The document can be used in Spanish or English, as needed

	SUP-002899/Rev.04 CONFIDENCIAL / CONFIDENTIAL Protocolo de Validación del Método Analítico de Valoración de 1, 2, 6-Hexanotriol (MP) por Cromatografía de Gases (GC)	Documento N°: PT - (validación de método). (90001952). (01) Pág: 2 de 11 Reemplaza: NA
--	--	--

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN

**5.3 Condiciones Analíticas**

**Condiciones Cromatográficas de Operación**

Equipo:	Cromatógrafo de gases Agilent 7890B																		
Inlets (Split-Splitless Inlet)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Heater: Temperatura: 200°C</li> <li>Pressure: Valor automático.</li> </ul> Total Flow: Valor automático. <ul style="list-style-type: none"> <li>Septum Purge Flow: 2 mL/min</li> </ul> Inlet Mode: Split Split Ratio: 450:1 Split Flow: Valor automático Gas Saver (On): 15 mL/min After: 2 min																		
Columna:	Columna capilar de dimensiones 30 m x 0,32 mm x 1,0 µm y composición de fase estacionaria: DB-5 o equivalente.																		
Columns	Control Mode: On Flow: 2.0 mL/min Pressure: Valor automático Average Velocity: Valor automático Constant Flow Post run: 2.0 mL/min																		
Rampa de temperatura (Oven):	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Horno</th> <th>Rate (°C/min)</th> <th>Value (°C)</th> <th>Hold (min)</th> <th>Time (min)</th> <th>Run Time (min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Inicial</td> <td>0</td> <td>40</td> <td>5</td> <td></td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>Rampa 1</td> <td>40</td> <td>200</td> <td>11</td> <td></td> <td>20</td> </tr> </tbody> </table>	Horno	Rate (°C/min)	Value (°C)	Hold (min)	Time (min)	Run Time (min)	Inicial	0	40	5		5	Rampa 1	40	200	11		20
Horno	Rate (°C/min)	Value (°C)	Hold (min)	Time (min)	Run Time (min)														
Inicial	0	40	5		5														
Rampa 1	40	200	11		20														
Horno de columna (Oven):	Temperatura inicial horno (setpoint): 40°C Equilibration time: 10.00 min Temperatura máxima: 300 °C Post run: 200 °C																		

Note: El documento podrá ser usado en español o inglés, según necesidad  
Note: The document can be used in Spanish or English, as needed

	SUP-002899/Rev.04 CONFIDENCIAL / CONFIDENTIAL Protocolo de Validación del Método Analítico de Valoración de 1, 2, 6-Hexanotriol (MP) por Cromatografía de Gases (GC)	Documento N°: PT - (validación de método). (90001952). (01) Pág: 2 de 11 Reemplaza: NA
--	--	--

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN

	Post run time: 10.00 min
<b>Detectors:</b>	FID <input checked="" type="checkbox"/> Heater: 200 °C <input checked="" type="checkbox"/> Air Flow: 400 mL/min <input checked="" type="checkbox"/> H2 Fuel Flow: 40 mL/min <input checked="" type="checkbox"/> Makeup flow (N2): 25 mL/min Carrier Gas Flow Correction (None) <ul style="list-style-type: none"> <li>Constant makeup &amp; fuel flow</li> </ul> <input checked="" type="checkbox"/> Flame
<b>Signals:</b>	Signal source : Front Signal (FID) Data rate / Min peak Width: 20 Hz / 0,01 min <input checked="" type="checkbox"/> Zero <input checked="" type="checkbox"/> Save
<b>Configuration:</b>	Modules Front Inlet (SS Inlet): He Front Detector FID (Makeup): N2

**Condiciones del Muestreador automático de líquidos (ALS)**

Equipo	Muestreador automático de líquidos (ALS) Agilent 7693A
Front Injector:	<b>Injection</b> Syringe Size: 10 µL Injection Volume: 1 µL <b>Dwell Time</b> Pre-Injection: 0 min Post-Injection: 0 min <b>Sample Depth</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Enable</li> </ul> <b>Washes and Pumps</b>

Note: El documento podrá ser usado en español o inglés, según necesidad  
Note: The document can be used in Spanish or English, as needed

	SUP-002899/Rev.04 CONFIDENCIAL / CONFIDENTIAL Protocolo de Validación del Método Analítico de Valoración de 1, 2, 6-Hexanotriol (MP) por Cromatografía de Gases (GC)	Documento N°: PT - (validación de método). (90001952). (01) Pág: 2 de 11 Reemplaza: NA
--	--	--

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN

	<b>Solvent A Washes:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Preinj: 3</li> <li>Postinj: 3</li> <li>Volume (µL): Max (8)</li> </ul> <b>Solvent B Washes:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Preinj: 3</li> <li>Postinj: 3</li> <li>Volume (µL): Max (8)</li> </ul> <b>Sample Washes:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Preinj: 3</li> <li>Volume (µL): Max (8)</li> </ul> <b>Sample Pumps: 6</b> <b>Plunger Speed:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Fast</li> </ul> Viscosity Delay: 0 sec Injection Type: Standard
<b>Draw/Other:</b>	<b>Sample Overlap</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Enable Sample Overlap</li> </ul> <b>ALS Errors:</b> Stop the sequence

Note: Verificar en la sección Opciones del método instrumental creado en Empower, que el método tenga seleccionado el driver GC0:Front (correspondiente al módulo ALS) y no el driver SAMPLER0:GC (correspondiente al módulo Headspace), tal y como se muestra en la Figura 1.

Note: El documento podrá ser usado en español o inglés, según necesidad  
Note: The document can be used in Spanish or English, as needed

	SUP-002899/Rev.04 CONFIDENCIAL / CONFIDENTIAL Protocolo de Validación del Método Analítico de Valoración de 1, 2, 6- Hexanotriol (MP) por Cromatografía de Gases (GC)	Documento N°: PT - (validación de método). (90001952). (01) Edic: 2 de 11 Reemplaza: NA
	PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	

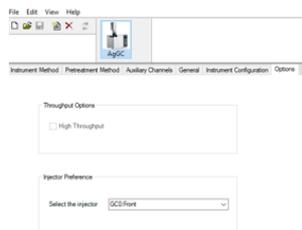


Figura 1. Sección "Options" en el software Empower 3.

5.4 Método de preparación

Preparación de solución estándar de adecuación del sistema

Pesar 100.0 mg de 1, 2, 6 - Hexanotriol estándar en un balón volumétrico de 10.0 mL y aforar con Metanol HPLC.

Preparación de solución blanco

No requiere preparación, inyectar directamente Metanol HPLC.

Preparación de muestra

Pesar 100.0 mg de la materia prima 1, 2, 6 - Hexanotriol en un balón volumétrico de 10.0 mL y aforar con Metanol HPLC.

Note: El documento podrá ser usado en español o inglés, según necesidad  
 Note: The document can be used in Spanish or English, as needed

	SUP-002899/Rev.04 CONFIDENCIAL / CONFIDENTIAL Protocolo de Validación del Método Analítico de Valoración de 1, 2, 6- Hexanotriol (MP) por Cromatografía de Gases (GC)	Documento N°: PT - (validación de método). (90001952). (01) Edic: 2 de 11 Reemplaza: NA
	PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	

6 Proceso de Validación

Se describe el listado de parámetros evaluados durante la validación, de acuerdo con lo establecido al PROC-000470:

Especificidad:

La especificidad del método verifica si existen interferencias con algún otro componente presente en las soluciones empleadas para el análisis. Con este propósito, se necesita correr las siguientes pruebas de las soluciones o reactivos.

Las soluciones/reactivos a inyectar:

Inyectar 1 vez:

- Metanol HPLC.
- Etanol
- 2-propanol.
- Solución de estándar.
- Muestra.

Preparar los viales de acuerdo al apartado 5.4 del documento.

Linealidad:

Se preparan 5 soluciones en el rango de (110-70%) de concentración de 1, 2, 6 - Hexanotriol con respecto a la concentración nominal de 1, 2, 6 - Hexanotriol. Considerándose que según el método propuesto la concentración al 100% en la solución tanto de adecuación como muestra es de 10.0 mg/mL.

Solución madre:

Se preparan las siguientes soluciones a partir de una solución madre al 500% obtenida al pesar 2500.0 mg de 1, 2, 6 - Hexanotriol en una balanza analítica y llevarla hasta aforo con metanol HPLC en un balón de 50 mL, realizar este proceso por duplicado.

% 1, 2, 6- Hexanotriol	1, 2, 6-Hexanotriol (mg/mL)	Alícuota (mL)	Aforo (mL)
110%	11,0	5,5	25
100%	10,0	5,0	25
90%	9,0	4,5	25
80%	8,0	4,0	25
70%	7,0	3,5	25

Note: El documento podrá ser usado en español o inglés, según necesidad  
 Note: The document can be used in Spanish or English, as needed

	SUP-002899/Rev.04 CONFIDENCIAL / CONFIDENTIAL Protocolo de Validación del Método Analítico de Valoración de 1, 2, 6- Hexanotriol (MP) por Cromatografía de Gases (GC)	Documento N°: PT - (validación de método). (90001952). (01) Edic: 2 de 11 Reemplaza: NA
	PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	

Preparación de viales

Tomar aproximadamente 1.5 mL de cada solución y cargar en viales ALS individuales.

Procedimiento para análisis

Inyectar 1,0 µL de las siguientes soluciones:

- Inyectar metanol HPLC (blanco).
- Inyectar (por triplicado) la solución de estándar de adecuación del sistema.
- Inyectar (por duplicado) la muestra.

Requerimientos de adecuación del sistema

Factor de simetría promedio del pico de 1,2,6 - Hexanotriol entre 0.8 - 2.0.

5.5 Especificación

1, 2, 6 - Hexanotriol No menos que 99,0% ]

5.6 Cálculos

Cálculo del porcentaje de 1,2,6 - Hexanotriol:

$$\% 1, 2, 6 - Hexanotriol = \frac{r_D}{r_T}$$

Donde

r<sub>D</sub>: Área del pico correspondiente al 1, 2, 6 - Hexanotriol en la muestra.

r<sub>T</sub>: Suma del área de todos los picos en la muestra descartando los picos provenientes del blanco.

**Nota:** No se requiere hacer correcciones teniendo en cuenta la humedad puesto que el detector FID no es sensible al agua.

Note: El documento podrá ser usado en español o inglés, según necesidad  
 Note: The document can be used in Spanish or English, as needed

	SUP-002899/Rev.04 CONFIDENCIAL / CONFIDENTIAL Protocolo de Validación del Método Analítico de Valoración de 1, 2, 6- Hexanotriol (MP) por Cromatografía de Gases (GC)	Documento N°: PT - (validación de método). (90001952). (01) Edic: 2 de 11 Reemplaza: NA
	PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	

Repetibilidad:

Se prepara una solución estándar según el apartado 5.4, posteriormente se inyecta 6 veces esta solución.

Precisión del método:

Se preparan 6 muestras en viales distintos bajo el método indicado en el punto 5.4 e inyectar cada muestra desde un vial distinto.

Precisión intermedia:

Otro analista, en un día distinto, ejecuta los análisis de precisión del método y repetibilidad del sistema, se deben utilizar soluciones estándar preparadas recientemente y muestras. Comparar el total de los resultados obtenidos por ambos analistas.

Exactitud:

Realizar, por triplicado, la preparación de solución madre al 500% de concentración nominal y diluir hasta los puntos de 110%, 100% y 70%, tal y como se describe en el procedimiento de linealidad.

Estabilidad

Preparar y almacenar una muestra y una solución estándar durante 24 horas a temperatura ambiente, una vez transcurrido ese tiempo inyectar y comparar los resultados obtenidos con los de la prueba de repetibilidad.]

Robustez

Se preparan todas las secuencias de corrida de análisis para el 1, 2, 6 - Hexanotriol de acuerdo al procedimiento descrito en el punto 5.4 realizando las siguientes modificaciones:

- Variando el solvente de preparación a etanol y 2-propanol.

Todos los datos de la validación se someten a evaluación de acuerdo a los criterios de aceptación.

Note: El documento podrá ser usado en español o inglés, según necesidad  
 Note: The document can be used in Spanish or English, as needed

	SUP-002899/Rev.04 <b>CONFIDENCIAL / CONFIDENTIAL</b> Protocolo de Validación del Método Analítico de Valoración de 1, 2, 6- Hexanotriol (MP) por Cromatografía de Gases (GC)	Documento N°: PT - (validación de método). (90001952); (01) Pág. 2 de 11 Reemplaza: NA
	<b>PROTOCOLO DE VALIDACIÓN</b>	

#### 7 Criterios de Aceptación

Parámetro	Criterio de Aceptación
<b>Especificidad</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>No tener interferencias con los diversos componentes presentes tanto en la matriz de la muestra como en el proceso de análisis.</li> <li>Coefficiente de correlación de la curva de calibración <math>\geq 0,999</math></li> <li>Ordenada al origen: valor máximo <math>\pm 3,0\%</math> de la señal medida al 100%</li> </ul>
<b>Linealidad</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Desviación estándar relativa de los valores de RRF, máximo 2%</li> <li>Intervalo de confianza (P=95%) del intercepto, incluye las coordenadas de origen.</li> <li>Los residuos deben estar distribuidos alrededor de la curva de calibración de manera que no exista una tendencia visible.</li> </ul>
<b>Repetibilidad del sistema</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Desviación estándar relativa (n=8) <math>\leq 2,0\%</math></li> </ul>
<b>Precisión del método</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Desviación estándar relativa (n=6) <math>\leq 2,0\%</math></li> <li>Cumplimiento de valores individuales según la especificación</li> </ul>
<b>Precisión Intermedia</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Desviación estándar relativa (n=12) <math>\leq 2,0\%</math></li> </ul>
<b>Exactitud</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Valor de media aritmética entre: 98,0 – 102,0% / Valores individuales: 97,0 – 103,0%</li> <li>Desviación estándar relativa <math>\leq 2,0\%</math></li> </ul>
<b>Estabilidad</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Diferencia absoluta del resultado inicial <math>\leq 2,0\%</math></li> </ul>
<b>Robustez</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Diferencia absoluta del resultado inicial <math>\leq 2,0\%</math></li> </ul>

#### 8 Acciones para datos de análisis y procesos fuera de especificación

Si los resultados se encuentran fuera de los límites, se informará inmediatamente al área de Validaciones y se evaluará las siguientes acciones cuando aplique:

- Evaluar la criticidad de lo sucedido
- Definir si se aclara en el informe final o se procede a la apertura de un evento.

Note: El documento podrá ser usado en español o inglés, según necesidad  
 Note: The document can be used in Spanish or English, as needed

	SUP-002899/Rev.04 <b>CONFIDENCIAL / CONFIDENTIAL</b> Protocolo de Validación del Método Analítico de Valoración de 1, 2, 6- Hexanotriol (MP) por Cromatografía de Gases (GC)	Documento N°: PT - (validación de método). (90001952); (01) Pág. 2 de 11 Reemplaza: NA
	<b>PROTOCOLO DE VALIDACIÓN</b>	

#### 9 Resultados

Evaluar los resultados obtenidos para los parámetros de validación analizados, elaborar un informe y emitir un registro de validación.

#### 10 Historial de Cambios

No.	Fecha / Date	Cambio Realizado / Change made	Observaciones / Observations
01	12 NOV 2024	Documento nuevo	N/A

#### 11 Anexos / Attachments

N/A

Note: El documento podrá ser usado en español o inglés, según necesidad  
 Note: The document can be used in Spanish or English, as needed

Figura 3B. Protocolo de validación de valoración de 1, 2, 6 - hexanotriol.

10. ANEXO C: EJEMPLOS DE CÁLCULO PARA EL ANÁLISIS DE LAS MATERIAS PRIMAS PROPUESTAS

**GRUNENTHAL** Title: Reporte Analítico para Procesos de Validación 2 of 2

**RESPALDO DE PESOS/REGISTROS DE EQUIPOS/CÁLCULOS:**

- Estabilidad

Pesar	
15. Jul 2024	17:48
TECHANDINA B9	BA-24-1128
ID1	ZOPICLONA
ID2	T8889
ID3	ESTABILIDAD SOLN
50.34 mg	→ Inicial
50.43 mg	→ Inicial
50.26 mg	→ Ambiente
50.44 mg	→ Ambiente
50.17 mg	→ Refrigeración
50.16 mg	→ Refrigeración

SGC/RRP / 15 JUL 2024

Reactivos:

Reactivo	Lote	Caducidad
Aire Sintético	040009499691	27 FEB 2029
Nitrogeno	040009369225	08 SEP 2028

• Porcentaje de 2-propanol en muestra

1. 2-propanol (M1) =  $\frac{A_{m1} \times C_{std}}{A_{s1} \times C_{m1}} \times D \times 100 = \frac{133 \times \left( \frac{0,0224 \text{ mL}}{50 \text{ mL}} \times \frac{99,9}{100} \right)}{729 \times (0,05043 \frac{\text{g}}{\text{mL}})} \times 0,78 \frac{\text{g}}{\text{mL}} \times 100 = 0,1391\% \approx 0,1\%$

2. 2-propanol (M2) =  $\frac{142 \times 0,0224 \times 0,999 \times 1}{729 \times 50 \times 0,05043} \times 0,78 \times 100 = 0,1358\% \approx 0,1\%$

3. 2-propanol = 0,1345% ≈ 0,1% SGC/RRP / 17 JUL 2024

(D) Se corrigió la concentración de 2-propanol en el estándar de referencia (solución de adición) con la pureza del reactivo, obtenida del COA.  
SGC/RRP / 17 JUL 2024

SGC/RRP / 25 JUL 2024

Figura 1C. Cálculo del porcentaje de 2-propanol en una muestra de zopiclona.



## RESPALDO DE PESOS/REGISTROS DE EQUIPOS/CALCULOS:

Reactivos		
Reactivo	Lote	Capacidad
Aire Sintético	040003633664 ✓	28 JUN 2029 ✓
Nitrogeno	040003304225 ✓	08 SEP 2028 ✓

Inyección	Área	% Área
Acetona_1	10681	99,97 ✓
Acetona_2	10769	100 ✓
Acetona_3	10700	100 ✓
Acetona_4	10956	99,98 ✓
Acetona_5	10977	99,97 ✓
Acetona_6	10869	99,97 ✓
Desv. estándar	0,01	✓
Promedio	99,98	✓
Desv. estándar relativa	0,01%	✓

SIGC/PM / 03 OCT 2024

PEM / 03 OCT 2024

Number: SUP-008902 Rev: 02

Printed on: 24 Sep 2023, 10:12:19 AM Printed by: EC35816

Effective Date: 07 Sep 2023

No part of this document may be passed on, reproduced or published without written permission of Grünenthal.

Figura 2C. Cálculo del porcentaje de pureza (valoración) de una muestra de acetona.

RESPALDO DE PESOS/REGISTROS DE EQUIPOS/CALCULOS:

Pesar		18 Nov 2024		14:16	
TECNANDINA B2-24-0830					
1,2,6-HEXANOTRIOL					
ID2	✓ R0007	JGC / PCW / 18 NOV 2024			
ID3	PRECISION				
105.44 mg ✓					
Pesar		18 Nov 2024		14:23	
TECNANDINA B2					
1,2,6-HEXANOTRIOL					
ID1	✓ U0004	JGC / PCW / 18 NOV 2024			
ID2	REPTIBILIDAD				
ID3	103.04 mg → M1				
	103.91 mg → M2				
	100.03 mg → M3				
	101.53 mg → M4				
	105.24 mg → M5				
	104.51 mg → M6				
18 Nov 2024					
• Valoración STD					
$\% \text{ 1,2,6-Hexanotriol} = \frac{\text{Área 1,2,6-Hexanotriol}}{\text{Suma de áreas del cromatograma excluyendo picos atribuidos al Blanco}} \times 100$					
STD-1 = $\frac{119}{119} \times 100 = 100\%$					
STD-2 = $\frac{117}{117} \times 100 = 100\%$					
STD-3 = $\frac{122}{122} \times 100 = 100\%$					
STD-4 = $\frac{120}{120} \times 100 = 100\%$					
STD-5 = $\frac{119}{119} \times 100 = 100\%$					
STD-6 = $\frac{120}{120} \times 100 = 100\%$					
• Valoración Muestras					
M1 = $\frac{139}{139} \times 100 = 100\%$					
M2 = $\frac{145}{145} \times 100 = 100\%$					
M3 = $\frac{91}{91} \times 100 = 100\%$					
M4 = $\frac{84}{84} \times 100 = 100\%$					
M5 = $\frac{137}{137} \times 100 = 100\%$					
M6 = $\frac{141}{141} \times 100 = 100\%$					
JGC / PCW / 18 NOV 2024					
• Cálculo SST (Tailings)					
STD-1 = 1,1 ; STD-2 = 1,1 ; STD-3 = 1,1 ; STD-4 = 1,1 ; STD-5 = 1,1					
STD-6 = 1,1 ; Promedio = 1,1					
• RSD Valoración = $(\sigma / \bar{x}) \times 100$ ; $\sigma$ = desviación estándar ; $\bar{x}$ = promedio					
RSD STD = 0% ✓					
RSD M = 0% ✓					
JGC / PCW / 18 NOV 2024					
(1) Error de escritura JGC / PCW / 18 NOV 2024 ✓					

Figura 3C. Cálculo del porcentaje de pureza (valoración) de una muestra de 1, 2, 6 - hexanotriol.

## 11. ANEXO D: REPORTES ANALÍTICOS PARA LAS METODOLOGÍAS INTERNALIZADAS



Reporte final Valoración

### Reporte Analítico Laboratorio Químico

#### VALORACIÓN

Peak Name: 2-PROPANOL

	SampleName	Peak Name	Vial	Injection	Area	Retention Time (min)	Result Id	USP Tailing	USP Resolution	K Prime	s/n	USP Plate Count
1	SLN ADECUACION 1	2-PROPANOL	2	1	655	3,708	1222	1,2	3,6	3	1162	5949
2	SLN ADECUACION 2	2-PROPANOL	3	1	755	3,709	1221	1,2	3,6	3	1464	5892
3	SLN ADECUACION 3	2-PROPANOL	4	1	762	3,711	1220	1,2	3,6	3	1537	5901
4	M1 ZOPICLONA T0009	2-PROPANOL	5	1	139	3,709	1219	1,2	3,6	3	258	5712
5	M2 ZOPICLONA T0009	2-PROPANOL	6	1	142	3,706	1218	1,2	3,6	3	277	5863
Mean					491			1,2	3,6	3	940	5863
% RSD					65,7							

Peak Name: DIMETILSULFOXIDO

	SampleName	Peak Name	Vial	Injection	Area	Retention Time (min)	Result Id	USP Tailing	USP Resolution	K Prime	s/n	USP Plate Count
1	SLN ADECUACION 1	DIMETILSULFOXIDO	2	1	52747	10,894	1222	0,5	41,8	10	98407	82549
2	SLN ADECUACION 2	DIMETILSULFOXIDO	3	1	77840	10,940	1221	0,5	30,7	10	132615	24792
3	SLN ADECUACION 3	DIMETILSULFOXIDO	4	1	72128	10,927	1220	0,5	29,9	10	132210	26030
4	M1 ZOPICLONA T0009	DIMETILSULFOXIDO	5	1	86407	10,957	1219	0,5	32,2	10	138328	35352
5	M2 ZOPICLONA T0009	DIMETILSULFOXIDO	6	1	75303	10,938	1218	0,5	31,2	10	139247	22389
Mean					72885			0,5	33,2	10	128162	38223
% RSD					17,1							

Peak Name: ETANOL

	SampleName	Peak Name	Vial	Injection	Area	Retention Time (min)	Result Id	USP Tailing	K Prime	s/n	USP Plate Count
1	SLN ADECUACION 1	ETANOL	2	1	566	3,025	1222	1,2	2	1031	4314
2	SLN ADECUACION 2	ETANOL	3	1	636	3,027	1221	1,2	2	1262	4272
3	SLN ADECUACION 3	ETANOL	4	1	641	3,026	1220	1,2	2	1325	4273
4	M1 ZOPICLONA T0009	ETANOL	5	1	625	3,026	1219	1,2	2	1237	4183
5	M2 ZOPICLONA T0009	ETANOL	6	1	626	3,024	1218	1,2	2	1310	4384
Mean					619			1,2	2	1233	4285
% RSD					4,9						

Peak Name: ZOPICLONA

	SampleName	Peak Name	Vial	Injection	Area	Retention Time (min)	Result Id	USP Tailing	USP Resolution	K Prime	s/n	USP Plate Count
1	SLN ADECUACION 1	ZOPICLONA	2	1		4,220	1222					
2	SLN ADECUACION 2	ZOPICLONA	3	1		4,220	1221					
3	SLN ADECUACION 3	ZOPICLONA	4	1		4,220	1220					
4	M1 ZOPICLONA T0009	ZOPICLONA	5	1	77	4,217	1219	1,2	2,7	3	157	8301

Reported by User: Cabrera Vilota, Jessica (Paola Cabrera)

Project Name: 2024 Julio Químico- Estabilidad VGC\_ZOPICLONA

Report Method: Reporte final Valoración

Date Printed:

Report Method ID: 1224 1224

10/10/2024

Page: 1 of 3

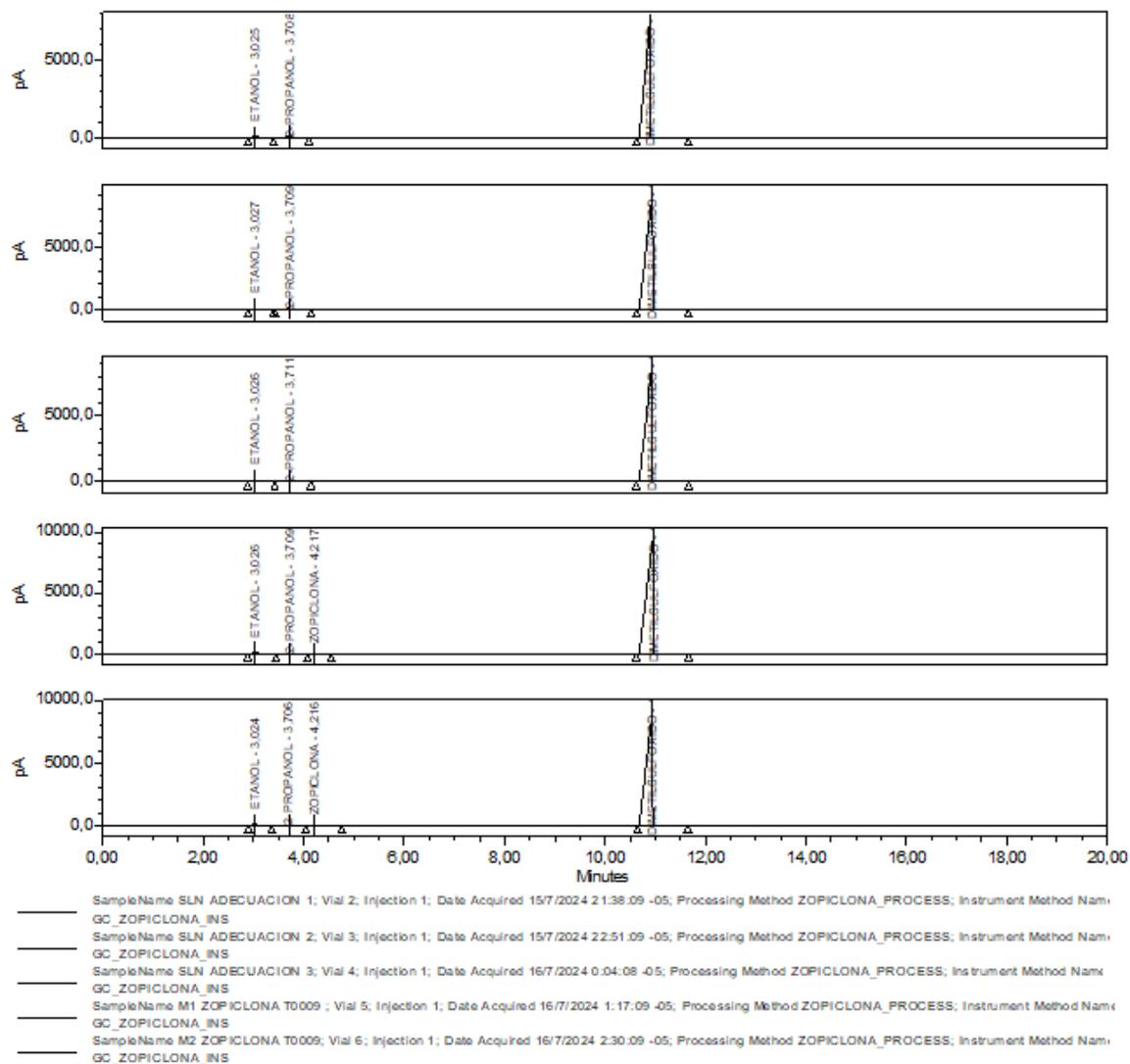
8:19:22 America/Guayaquil

System Name AgGC\_HS

Peak Name: ZOPICLONA

	SampleName	Peak Name	Vial	Injection	Area	Retention Time (min)	Result Id	USP Tailing	USP Resolution	K Prime	s/in	USP Plate Count
5	M2 ZOPICLONA T0009	ZOPICLONA	6	1	80	4,216	1218	1,2	2,7	3	170	8503
Mean					78			1,2	2,7	3	164	8402
% RSD					2,8							

Chromatogram Overlay with Z Axis Offset



Reported by User: Cabrera Villota, Jessica (Paola Cabrera)

Project Name: 2024Julio/Químico-Estabilidades VGC\_ZOPICLONA

Report Method: Reporte final Valbración

Date Printed:

Report Method ID: 1224 1224

10/10/2024

Page: 2 of 3

8:19:22 America/Guayaquil

Figura 1D. Reporte analítico del análisis de cuantificación de 2-propanol en zopiclona.



## Reporte Analítico Laboratorio Químico

### VALORACIÓN

SampleName: STDADECUACION

SampleName	Peak Name	Vial	Injection	Area (µV*sec)	% Area	Retention Time (min)	s/n	USP Tailing	USP Resolution	K Prime	USP Plate Count
1 STD ADECUACION	TETRAHIDROFUROANO	1	1	12795	97,53	7,352	37432	1,1	38,6	6	244557
2 STD ADECUACION	METANOL	1	1	124	0,94	2,916	388	1,1		2	44899
3 STD ADECUACION	ACETONA	1	1	200	1,53	4,557	408	1,0	23,3	4	45580
4 STD ADECUACION	TETRAHIDROFUROANO	1	2	13111	97,50	7,349	64952	1,2	38,5	6	241273
5 STD ADECUACION	METANOL	1	2	130	0,97	2,915	682	1,1		2	44687
6 STD ADECUACION	ACETONA	1	2	207	1,54	4,555	709	1,0	23,4	4	45727
7 STD ADECUACION	TETRAHIDROFUROANO	1	3	12900	97,50	7,351	52248	1,1	38,6	6	245215
8 STD ADECUACION	METANOL	1	3	127	0,98	2,915	552	1,1		2	44971
9 STD ADECUACION	ACETONA	1	3	203	1,54	4,556	575	1,0	23,4	4	45417

SampleName: ACETONA\_1

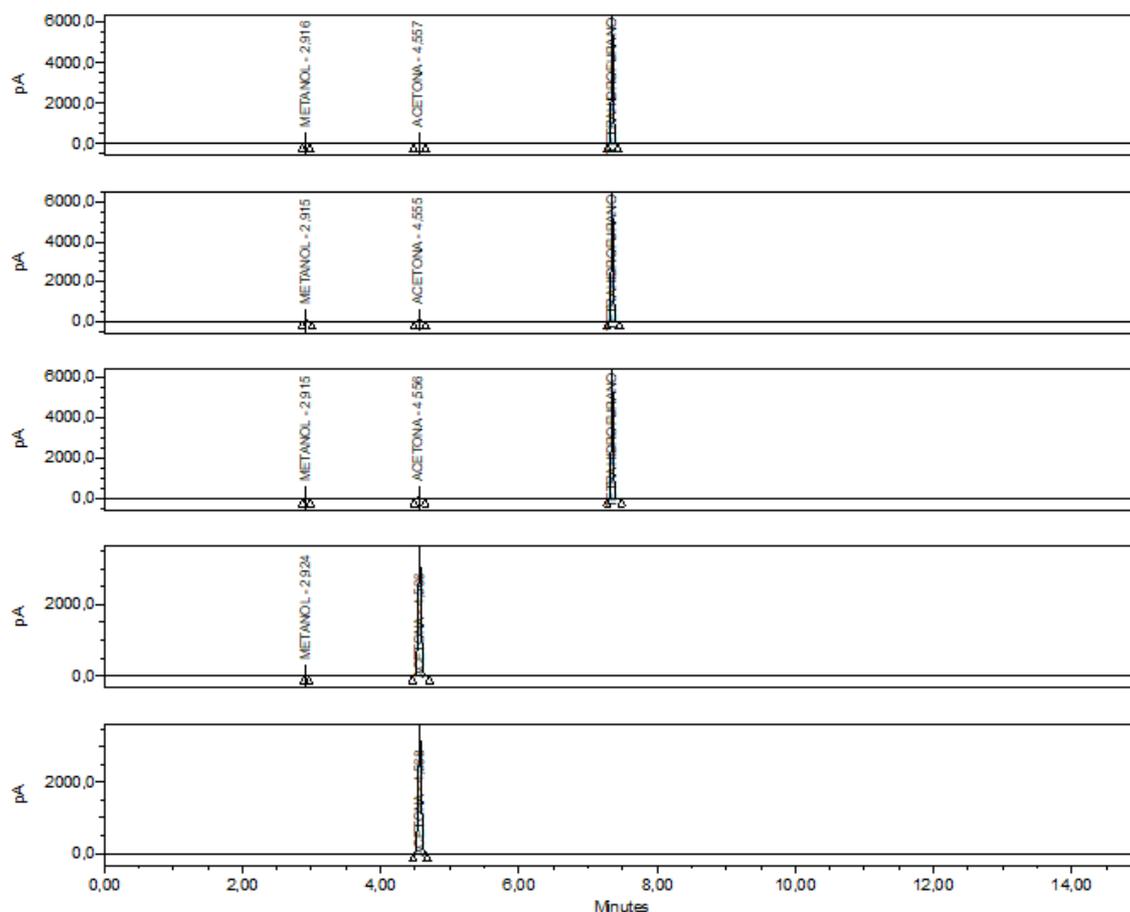
SampleName	Peak Name	Vial	Injection	Area (µV*sec)	% Area	Retention Time (min)	s/n	USP Tailing	USP Resolution	K Prime	USP Plate Count
1 ACETONA_1	METANOL	2	1	3	0,03	2,924	14	1,2		2	45122
2 ACETONA_1	ACETONA	2	1	10681	99,97	4,566	34297	1,0	23,1	4	43771

SampleName: ACETONA\_2

SampleName	Peak Name	Vial	Injection	Area (µV*sec)	% Area	Retention Time (min)	s/n	USP Tailing	K Prime	USP Plate Count
1 ACETONA_2	ACETONA	3	1	10783	100,00	4,568	19195	1,0	4	43881

SystemName AgGC\_HS

## Chromatogram Overlay with Z Axis Offset



\_\_\_\_\_ SampleName STD ADECUACION; Vial 1; Injection 1; Date Acquired 8/10/2024 14:58:00 -05; Processing Method ACETONA\_PROCESS\_VALORACION; Instrumen  
 Method Name GC\_ACETONA\_INS  
 \_\_\_\_\_ SampleName STD ADECUACION; Vial 1; Injection 2; Date Acquired 8/10/2024 15:37:26 -05; Processing Method ACETONA\_PROCESS\_VALORACION; Instrumen  
 Method Name GC\_ACETONA\_INS  
 \_\_\_\_\_ SampleName STD ADECUACION; Vial 1; Injection 3; Date Acquired 8/10/2024 16:19:16 -05; Processing Method ACETONA\_PROCESS\_VALORACION; Instrumen  
 Method Name GC\_ACETONA\_INS  
 \_\_\_\_\_ SampleName ACETONA\_1; Vial 2; Injection 1; Date Acquired 8/10/2024 17:00:17 -05; Processing Method ACETONA\_PROCESS\_VALORACION; Instrument Metho  
 Name GC\_ACETONA\_INS  
 \_\_\_\_\_ SampleName ACETONA\_2; Vial 3; Injection 1; Date Acquired 8/10/2024 17:41:22 -05; Processing Method ACETONA\_PROCESS\_VALORACION; Instrument Metho  
 Name GC\_ACETONA\_INS

Sign Off Full Name Cabrera Villota, JESSICA (paola.cabrera)	Sign Off Date 9/10/2024 15:55:52 -05	Sign Off Reason Sign Off Level 1, Reason: Authors hip
--	---	--

Reported by User: Cabrera Villota, JESSICA (Paola.Cabrera)

Project Name: 2024/Octubre/Químico-Estabilidades VGC\_ACETONA

Report Method: Reporte final Valoración\_AC

Date Printed:

Report Method ID: 1261 1261

10/10/2024

Page: 2 of 2

8:15:12 America/Guayaquil

Figura 2D. Reporte analítico del análisis de identificación y valoración de acetona.



## Reporte Analítico Laboratorio Químico

## VALORACIÓN

SampleName: METANOL HPLC

	SampleName	Peak Name	Vial	Injection	Area (µV*sec)	% Area	Retention Time (min)	s/n	USP Tailing	USP Resolution	K Prime	USP Plate Count
1	METANOL HPLC		1	1	0,0	0,00	7,402	1	0,7	1,6	6	3506328
2	METANOL HPLC		1	1	0,1	0,00	7,380	1	0,6	6,2	6	5804812
3	METANOL HPLC		1	1	0,0	0,00	7,447	1	1,5	1,3	6	8771777
4	METANOL HPLC		1	1	0,0	0,00	7,460	1	1,2	1,3	6	10744002
5	METANOL HPLC		1	1	0,0	0,00	7,470	1	1,8	1,3	6	23187739
6	METANOL HPLC		1	1	0,0	0,00	7,497	1	0,7	1,0	6	4513024
7	METANOL HPLC		1	1	0,1	0,00	7,524	1	0,7	0,8	7	3603821
8	METANOL HPLC		1	1	0,0	0,00	7,554	1	0,9	2,5	7	11044345
9	METANOL HPLC		1	1	0,0	0,00	7,587	1	0,8	4,1	7	20036243
10	METANOL HPLC		1	1	0,0	0,00	7,598	1	1,2	1,6	7	19465320
11	METANOL HPLC		1	1	0,0	0,00	7,699	1	1,1	15,9	7	27682492
12	METANOL HPLC	METANOL_unknown	1	1	0,6	0,01	10,734	4	0,9	105,5	10	691018
13	METANOL HPLC		1	1	0,0	0,00	7,437	1	0,8	3,3	6	32782177
14	METANOL HPLC		1	1	0,0	0,00	7,307	1	1,7	2,0	6	6117475
15	METANOL HPLC		1	1	0,0	0,00	7,283	1	1,2	1,0	6	5695718
16	METANOL HPLC		1	1	0,0	0,00	7,273	1	0,9	15,0	6	10685871
17	METANOL HPLC		1	1	0,0	0,00	7,170	1	1,6	1,7	6	18862374
18	METANOL HPLC		1	1	0,0	0,00	7,152	1	0,9	8,5	6	448387
19	METANOL HPLC		1	1	0,0	0,00	7,053	1	1,5	8,7	6	9029032
20	METANOL HPLC		1	1	0,0	0,00	6,956	1	1,1	1,6	6	3951487
21	METANOL HPLC		1	1	0,0	0,00	6,940	1	1,2	206,3	6	19501258
22	METANOL HPLC	METANOL	1	1	7127,4	99,98	2,675	69608	1,1		2	93143

SampleName: STD\_ADECUACION

	SampleName	Peak Name	Vial	Injection	Area (µV*sec)	% Area	Retention Time (min)	s/n	USP Tailing	USP Resolution	K Prime	USP Plate Count
1	STD_ADECUACION	METANOL_unknown	2	1	1,2	0,02	10,730	10	1,3	186,3	10	697659
2	STD_ADECUACION	1,2,6 - HEXANOTRIOL	2	1	138,1	1,87	10,927	843	1,0	3,2	10	386184
3	STD_ADECUACION	METANOL	2	1	7245,6	98,11	2,675	92095	1,1		2	92875
4	STD_ADECUACION	METANOL	2	2	7339,1	98,18	2,675	86584	1,1		2	92290
5	STD_ADECUACION	1,2,6 - HEXANOTRIOL	2	2	134,8	1,80	10,926	762	1,0	3,2	10	380037
6	STD_ADECUACION	METANOL_unknown	2	2	1,2	0,02	10,730	9	1,7	186,3	10	701673
7	STD_ADECUACION	1,2,6 - HEXANOTRIOL	2	3	138,1	1,83	10,924	679	1,1	3,1	10	398241
8	STD_ADECUACION	METANOL_unknown	2	3	1,1	0,01	10,730	7	1,5	179,6	10	620284
9	STD_ADECUACION	METANOL	2	3	7423,7	98,16	2,675	75537	1,1		2	92429

Reported by User: Huertas, Catalina (Patricia.Huertas)

Project Name: 2024NoviembreQuímico-Estabilidades\GC\_1,2,6-HEXANOTRIOL

Report Method: Reporte Valoración

Date Printed:

Report Method ID: 1408 1408

3/12/2024

Page: 1 of 3

13:11:13 America/Guatemala

## System Name AgGC\_HS

SampleName: 1,2,6 - HEXANOTRIOL MP

	SampleName	Peak Name	Vial	Injection	Area ( $\mu\text{V} \cdot \text{sec}$ )	% Area	Retention Time (min)	s/n	USP Tailing	USP Resolution	K Prime	USP Plate Count
1	1,2,6 - HEXANOTRIOL MP		3	1	0,1	0,00	2,357	2	1,2		1	285010
2	1,2,6 - HEXANOTRIOL MP	1,2,6 - HEXANOTRIOL	3	1	139,5	1,87	10,926	993	1,0	3,2	10	379110
3	1,2,6 - HEXANOTRIOL MP	METANOL_unknown	3	1	1,2	0,02	10,728	11	1,4	10,9	10	714520
4	1,2,6 - HEXANOTRIOL MP	METANOL	3	1	7310,9	98,11	2,675	103176	1,1	12,1	2	92762
5	1,2,6 - HEXANOTRIOL MP		3	1	0,2	0,00	10,262	3	1,1	216,2	9	1369961
6	1,2,6 - HEXANOTRIOL MP	METANOL_unknown	3	2	1,0	0,01	10,728	9	1,3	12,5	10	826446
7	1,2,6 - HEXANOTRIOL MP		3	2	0,3	0,00	10,263	3	1,2	41,2	9	2264130
8	1,2,6 - HEXANOTRIOL MP		3	2	0,1	0,00	9,286	2	1,2	238,8	8	3094932
9	1,2,6 - HEXANOTRIOL MP	METANOL	3	2	7453,2	98,11	2,675	87909	1,1		2	92402
10	1,2,6 - HEXANOTRIOL MP	1,2,6 - HEXANOTRIOL	3	2	142,4	1,87	10,926	815	1,0	3,3	10	374596

Reported by User: Huertas, Catalina (Patricia.Huertas)

Report Method: Reporte Valoración

Report Method ID: 1408 1408

Page: 2 of 3

Project Name: 2024\Noviembre\Químico-Estabilidades\GC\_1,2,6-HEXANOTRIOL

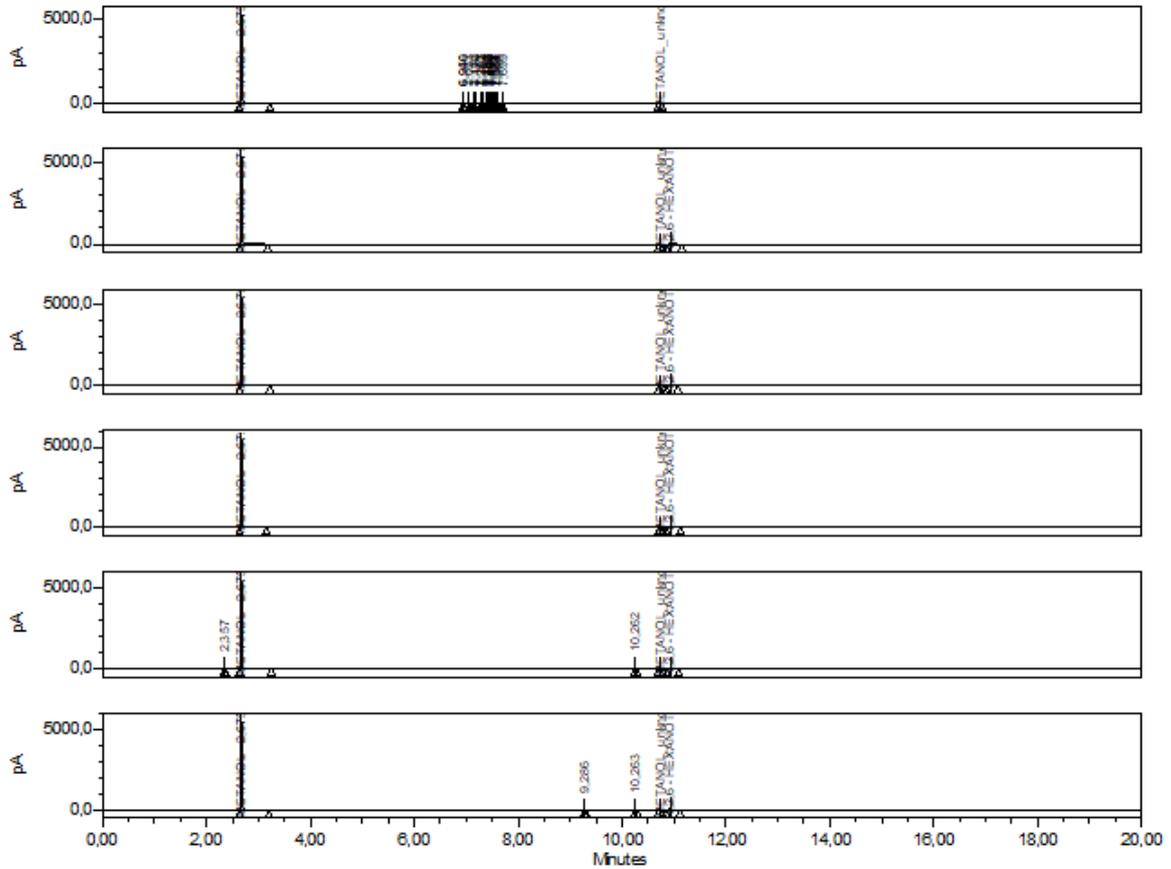
Date Printed:

3/12/2024

13:11:13 America/Guayaqui

System Name AgGC\_HS

Chromatogram Overlay with Z Axis Offset



SampleName METANOL HPLC; Vial 1; Injection 1; Date Acquired 19/11/2024 17:08:04 -05; Processing Method HTRIOL\_PROCESS; Instrument Method Nam  
 1\_2\_6\_HEXANOTRIOL\_INS\_T5  
 SampleName STD\_ADECUACION; Vial 2; Injection 1; Date Acquired 19/11/2024 17:55:38 -05; Processing Method HTRIOL\_PROCESS; Instrument Method Nam  
 1\_2\_6\_HEXANOTRIOL\_INS\_T5  
 SampleName STD\_ADECUACION; Vial 2; Injection 2; Date Acquired 19/11/2024 18:43:29 -05; Processing Method HTRIOL\_PROCESS; Instrument Method Nam  
 1\_2\_6\_HEXANOTRIOL\_INS\_T5  
 SampleName STD\_ADECUACION; Vial 2; Injection 3; Date Acquired 19/11/2024 19:31:09 -05; Processing Method HTRIOL\_PROCESS; Instrument Method Nam  
 1\_2\_6\_HEXANOTRIOL\_INS\_T5  
 SampleName 1,2,6 - HEXANOTRIOL MP; Vial 3; Injection 1; Date Acquired 19/11/2024 20:18:35 -05; Processing Method HTRIOL\_PROCESS; Instrument Method Nam  
 1\_2\_6\_HEXANOTRIOL\_INS\_T5  
 SampleName 1,2,6 - HEXANOTRIOL MP; Vial 3; Injection 2; Date Acquired 19/11/2024 21:06:12 -05; Processing Method HTRIOL\_PROCESS; Instrument Method Nam  
 1\_2\_6\_HEXANOTRIOL\_INS\_T5

Sign Off Full Name Huertas, Catalina (patricia.huertas), Mbcayo M Alexandra (Alexandra.Mbcayo)	Sign Off Date 20/11/2024 14:47:41 -05, 23/11/2024 11:18:14 -05	Sign Off Reason Sign Off Level 1, Reason: Review , Sign Off Level 1, Reason: Authorship
--	---	---

Reported by User: Huertas, Catalina (Patricia.Huertas)  
 Report Method: Reporte Valoración  
 Report Method ID: 1408 1408  
 Page: 3 of 3

Project Name: 2024/Noviembre/Químico-Estabilidades/IGC\_1,2,6-HEXANOTRIOL  
 Date Printed: 3/12/2024  
 13:11:13 America/Guayaqui

Figura 3D. Reporte analítico del análisis de valoración de 1, 2, 6 – hexanotriol.

## 12. ANEXO E: INFORME DE VERIFICACIÓN PARA ZOPICLONA

	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL Informe de Verificación del Método Analítico de identificación y valoración del solvente residual de clase 3, 2-propanol en la materia prima <u>Zopiclona</u> por GC.	Documento <u>MC</u> DNF-01 - (Verificación <sub>4</sub> 90001137),(01) Pág.: 1 de 26 Reemplaza: Documento Nuevo
---	---	---

1. Introducción	2
2. Sumario	3
3. Método	5
4. Parámetros de la validación	9
5. Conclusiones	25
6. Historial de cambios	26
7. Anexos	26

	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL Informe de Verificación del Método Analítico de identificación y valoración del solvente residual de clase 3, 2-propanol en la materia prima <u>Zopiclona</u> por GC.	Documento <u>MC</u> DNF-01 - (Verificación <sub>4</sub> 90001137),(01) Pág.: 3 de 26 Reemplaza: Documento Nuevo
---	---	---

### 1. Introducción

Este reporte presenta el diseño experimental y los resultados, relacionados a la verificación del método analítico de identificación y valoración del solvente residual clase 3, 2-propanol en la materia prima Zopiclona según la monografía de la Farmacopea Europea 11.4, EP <1066> "Zopiclona" por Cromatografía Gaseosa con Head Space.

Los siguientes parámetros fueron determinados:

- Especificidad
- Límites de detección
- Estabilidad de las soluciones preparadas de las soluciones muestras:
  - o 24 horas a temperatura ambiente
  - o 24 horas en refrigeración
- Robustez, cambiando el solvente de extracción.
  - o Cambiar el dimetilsulfóxido por N,N-dimetilformamida
- Variando del flujo de la fase móvil en cada secuencia de corrida
  - o 2,1 mL/min
  - o 2,3 mL/min
- Variando la temperatura del puerto de inyección.
  - o 215°C
  - o 235°C

	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL Informe de Verificación del Método Analítico de identificación y valoración del solvente residual de clase 3, 2-propanol en la materia prima <u>Zopiclona</u> por GC.	Documento <u>MC</u> DNF-01 - (Verificación <sub>4</sub> 90001137),(01) Pág.: 3 de 26 Reemplaza: Documento Nuevo
---	---	---

### 2. Sumario

Los resultados obtenidos en el proceso de validación/verificación se exponen en la tabla de datos a continuación:

Tabla Nº 1: Sumario de resultados obtenidos

Parámetro	Resultados	Criterio de Aceptación
Especificidad	No hay interferencias con los diversos componentes presentes tanto en la matriz de la muestra como en el proceso de análisis	No tener interferencias con los diversos componentes presentes tanto en la matriz de la muestra como en el proceso de análisis
Límites de detección	S/N: 156	S/N >3
2-propanol (10%)	RSD: 12 %	RSD para 3 inyecciones ≤ 30%
Estabilidad a 24 horas en temperatura ambiente	0%, Estable	Diferencia absoluta con respecto a la muestra en condiciones normales de análisis ≤ 30%
Estabilidad a 24 horas en refrigeración	0%, Estable	Diferencia absoluta con respecto a la muestra en condiciones normales de análisis ≤ 30%
Robustez variando el solvente de extracción	K: 3,0 Robusto Tailing: 1,6 Robusto Variación de áreas: 0% Robusto	Factor de capacidad K' ≥ 1,0 Tailing 0,8 – 2,0 Variación de áreas: ≤ 2,0%, con respecto al valor nominal

	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL Informe de Verificación del Método Analítico de identificación y valoración del solvente residual de clase 3, 2-propanol en la materia prima <u>Zopiclona</u> por GC.	Documento <u>MC</u> DNF-01 - (Verificación <sub>4</sub> 90001137),(01) Pág.: 4 de 26 Reemplaza: Documento Nuevo
---	---	---

Robustez variando el flujo a 2,1 mL/min.	K: 3,0 Robusto Tailing: 1,2 Robusto Variación de áreas: 0% Robusto	Factor de capacidad K' ≥ 1,0 Tailing 0,8 – 2,0 Variación de áreas: ≤ 2,0%, con respecto al valor nominal
Robustez variando el flujo a 2,3 mL/min.	K: 3,0 Robusto Tailing: 1,2 Robusto Variación de áreas: 0% Robusto	Factor de capacidad K' ≥ 1,0 Tailing 0,8 – 2,0 Variación de áreas: ≤ 2,0%, con respecto al valor nominal
Robustez variando la temperatura del puerto de inyección a 215 °C.	K: 3,0 Robusto Tailing: 1,2 Robusto Variación de áreas: 0% Robusto	Factor de capacidad K' ≥ 1,0 Tailing 0,8 – 2,0 Variación de áreas: ≤ 2,0%, con respecto al valor nominal.
Robustez variando la temperatura del puerto de inyección a 235 °C.	K: 3,0 Robusto Tailing: 1,2 Robusto Variación de áreas: 100% No Robusto	Factor de capacidad K' ≥ 1,0 Tailing 0,8 – 2,0 Variación de áreas: ≤ 2,0%, con respecto al valor nominal.

	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL	Documento  INF-01 - (Verificación  90001137)(01) Pág. 5 de 26 Reemplaza: Documento Nuevo
	Informe de Verificación del Método Analítico de identificación y valoración del solvente residual de clase 3, 2-propanol en la materia prima <u>Zopiclona</u> por GC.	

### 3. Método

El procedimiento para la identificación y valoración del solvente residual de clase 3, 2-propanol en Zopiclona por Cromatografía Gaseosa con Head Space, es llevado a cabo por el procedimiento analítico descrito a continuación:

#### 3.1 Aparatos, Reactivos, Estándares y Muestras

Cromatógrafo de gases Agilent 7890B con detector FID e inyector Head Space, calibrado en DIC 2023.

Balanzas analíticas calibradas en: ENE 2024.

Micropipetas calibradas en: JUN 2024.

Refrigerador calibrado en: MAR 2024.

Milli q calibrado en: ABR 2023.

Campana de extracción calibrado en: JUN 2024.

Columna GC, 30 m x 0,32 mm x 1,8  $\mu$ m y composición de fase estacionaria:

metilpolisiloxano y cianopropil fenil (94:3:3).

Estándar/es: N/A, se prepararán soluciones estándar con reactivos de alta pureza certificada según certificado de análisis del fabricante.

Etanol R1, Lote: I1150283124, Vigencia 30 ABR 2026.

Dimetilsulfóxido, Lote: 212362, Vigencia JUL 2026.

2-propanol, Lote: I1268234306, Vigencia NOV 2024.

N,N-Dimetilformamida, Lote: I1268234306, Vigencia NOV 2024.

Zopiclona, Lote: T0009, Vigencia 31 JUL 2028.

Helio: lote: 040009444473, Vigencia: 08 ENE 2029.

Nitrogeno: lote: 040009304225, Vigencia: 08 SEP 2028.

Aire sintético: lote: 040009499691, Vigencia: 27 FEB 2029.

	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL	Documento  INF-01 - (Verificación  90001137)(01) Pág. 6 de 26 Reemplaza: Documento Nuevo
	Informe de Verificación del Método Analítico de identificación y valoración del solvente residual de clase 3, 2-propanol en la materia prima <u>Zopiclona</u> por GC.	

### 3.2 Condiciones Analíticas

Tabla N°2: Condiciones analíticas del cromatógrafo de gases

Equipo:	Cromatógrafo de gases Agilent 6890 GC				
Inlet (back injector):	Heater: Temperatura: 225°C Pressure: Valor automático. Total Flow: Valor automático. Mode: Split 1:5 Split Flow: Valor automático				
Columna:	Columna capilar de dimensiones 30 m x 0,32 mm x 1,8 $\mu$ m y composición de fase estacionaria: <u>metilpolisiloxano</u> y <u>cianopropil fenil</u> (94:3:3).				
Condiciones de Columna (gas settings; Helio)	Mode: Constant Flow Pressure: Valor automático Flow: 2,2 mL/min (Prioritario) Average Velocity: Valor automático Post run: 2,2 mL/min (mismo que Flow)				
Rampa de temperatura:	Horno	Rate (°C/min)	Value (°C)	Hold time (min)	Run time (min)
	Initial	N/A	40	5	5
	Rampa 1	20	240	5	20
Horno de columna:	Temperatura inicial columna (setpoint): 40°C Equilibration time: 10,00 min Temperatura máxima: 260 °C Post run: 40 °C Post run time: 7,00 min				
Detector:	FID <input checked="" type="checkbox"/> Heater: 250 °C Air Flow: 400 mL/min <input checked="" type="checkbox"/> H <sub>2</sub> Fuel Flow: 30 mL/min Constant makeup & fuel flow <input checked="" type="checkbox"/> Makeup flow (He): 1 mL/min Flame				
Señal	Signal source: Det - Front detector Data rate / minimum peak width: 20 Hz / 0,01 min Save signal data: save data				

	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL	Documento  INF-01 - (Verificación  90001137)(01) Pág. 7 de 26 Reemplaza: Documento Nuevo
	Informe de Verificación del Método Analítico de identificación y valoración del solvente residual de clase 3, 2-propanol en la materia prima <u>Zopiclona</u> por GC.	

### 3.3 Condiciones Head Space

Tabla N°3: Condiciones analíticas del Head Space

Equipo:	Head Space Agilent 7697A
Temperatura:	Horno: 105 °C Loop: 120 °C Transfer line: 120 °C
Tiempo:	Vial equilibration: 45 min Injection duration: 1 min GC Cycle: 73 min
Vial and loop (20 mL vial) Vial Fill mode: Custom (Pressure)	Shake vial while in oven: Frequency: 18 shakes / min, acceleration: 60 cm/s <sup>2</sup> . Fill pressure: (valor automático) Pressure equilibration time: 0,3 min
Advanced functions:	Extraction mode (multiple extractions)
Venting and purging:	<input checked="" type="checkbox"/> Vent vial pressure after the last extraction Vent vial pressure between extractions
Post-injection purge: Custom	Purge flow: 180 mL/min Purge time: 3 min
Dynamic leak checking	Acceptable leak rate: Custom Leak Flow: 0,5 mL/min
Sequence actions:	Vial missing: Abort Wrong vial size: Abort Leak detected: Abort System not ready: Abort

La redacción hace referencia a lo descrito en el programa empower, los valores automáticos pueden variar debido al equipo, columna y sistema.

	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL	Documento  INF-01 - (Verificación  90001137)(01) Pág. 8 de 26 Reemplaza: Documento Nuevo
	Informe de Verificación del Método Analítico de identificación y valoración del solvente residual de clase 3, 2-propanol en la materia prima <u>Zopiclona</u> por GC.	

### 3.4 Método de preparación

#### Preparación de la solución Estándar Interno

Tomar exactamente 444  $\mu$ L de Etanol R1 con una micropipeta y aforar hasta 20,0 mL en un balón volumétrico y con dimetilsulfóxido. Tomar una alícuota de 2,0 mL de la solución recién preparada y aforar en un balón volumétrico de 100,0 mL con dimetilsulfóxido.

#### Preparación de solución de Adecuación del Sistema o Estándar de referencia (preparar por triplicado)

Tomar exactamente 22,4  $\mu$ L de 2-propanol con una micropipeta y en un balón volumétrico de 50 mL, aforar con la solución estándar interno.

#### Preparación de la solución Muestra (preparar por duplicado)

Pesar exactamente 50,0 mg de muestra directamente en el vial de Head Space y disolver con 1,0 mL de la solución estándar interno en el mismo vial.

#### Adecuación del sistema

Injectar 1 mL de la fase gaseosa de cada vial.  
Injectar una vez la solución Estándar Interno.  
Injectar por triplicado la solución de Adecuación del Sistema (Preparar 3 viales).  
Injectar por duplicado la solución Muestra (Preparar 2 viales).

#### Requerimientos de adecuación del sistema:

Resolución mínima de 3,0 entre las señales de etanol y 2-propanol.

### 3.5 Especificación

2-propanol máx. 0,7 por ciento

### 3.6 Cálculos

Cálculo de solvente residual en materia prima

El cálculo se realiza como se detalla a continuación:

Comparar el área para cada solvente de la solución estándar con el área del analito en la solución muestra. El test cumple si para cada solvente, el resultado obtenido es menor o igual a lo especificado.

	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL Informe de Verificación del Método Analítico de identificación y valoración del solvente residual de clase 3, 2-propanol en la materia prima <u>Zopiclona</u> por GC.	Documento <u>DC</u> INF-01 - (Verificación) 90001137(01) Pág.: 9 de 26 Reemplaza: Documento Nuevo
		

$$\%2 - \text{propanol} = \frac{\text{Amta} \times \text{Cmtd} \times \left(\frac{\%P}{100}\right)}{\text{Astd} \times \text{Cmta}} \times D \times 100$$

Donde:

**Amta:** Área del 2-propanol presente en la solución muestra.

**Astd:** Área promedio del solvente 2-propanol presente en el estándar de referencia.

**Cmta:** Concentración de la solución muestra (g/mL).

**Cmtd:** Concentración de 2-propanol en la solución estándar de referencia (mL/mL).

**%P:** (considerar la pureza del Reactivo en el Certificado de análisis).

**Pmta:** Peso de la muestra (g)

**D:** Densidad del solvente 2-propanol (g/mL) (obtener dato de densidad a partir del certificado de análisis de reactivo o del rotulo del frasco)

**4. Parámetros de la Validación.**

**4.1 Especificidad**

La especificidad del método ha sido verificada por comparación y análisis de los cromatogramas de las siguientes soluciones:

Tabla N° 4: Detalle de la prueba de especificidad:

- Etanol R1	Figura 1
- Dimetilsulfóxido	Figura 2
- 2-propanol	Figura 3
- Estándar interno	Figura 4
- Estándar de referencia	Figura 5
- Muestra de <u>Zopiclona</u>	Figura 6

	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL Informe de Verificación del Método Analítico de identificación y valoración del solvente residual de clase 3, 2-propanol en la materia prima <u>Zopiclona</u> por GC.	Documento <u>DC</u> INF-01 - (Verificación) 90001137(01) Pág.: 11 de 26 Reemplaza: Documento Nuevo
		

System Name: AgGC\_H6

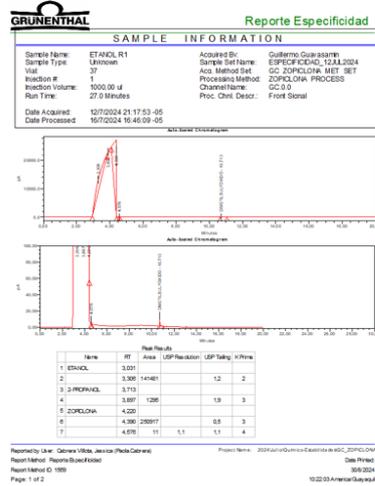
Name	RT	Area	USP Praction	USP Tally	K/Fine
8 DIMETILSULFOXIDO	10.710	32	123.9	0.0	10

Sign-Off Full Name: Guillermo Guzmán  
 Signature: [Signature]  
 Date: 12/12/2024 10:50:02 -05  
 Sign-Off Reason: Reason: Review, Sign-Off Level: 1, Reason: Subsequent

Reported by: User: Guillermo Guzmán (Photo: Guillermo Guzmán)  
 Report Method: Report: Report: Report  
 Report Method ID: 1389  
 Page: 2 of 2  
 10/22/24 America/Santiago

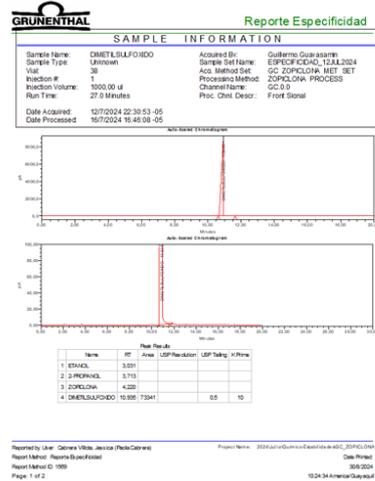
	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL Informe de Verificación del Método Analítico de identificación y valoración del solvente residual de clase 3, 2-propanol en la materia prima <u>Zopiclona</u> por GC.	Documento <u>DC</u> INF-01 - (Verificación) 90001137(01) Pág.: 10 de 26 Reemplaza: Documento Nuevo
		

Figura 1. Cromatograma correspondiente a la inyección de Etanol R1.



	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL Informe de Verificación del Método Analítico de identificación y valoración del solvente residual de clase 3, 2-propanol en la materia prima <u>Zopiclona</u> por GC.	Documento <u>DC</u> INF-01 - (Verificación) 90001137(01) Pág.: 12 de 26 Reemplaza: Documento Nuevo
		

Figura 2. Cromatograma correspondiente a la inyección de Dimetilsulfóxido.



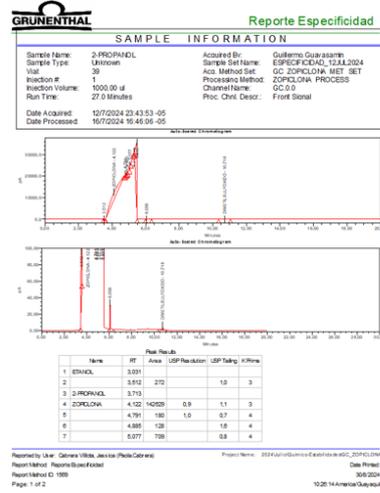
	SUP-005062/Rev. 02 <b>CONFIDENCIAL</b> Informe de Verificación del Método Analítico de identificación y valoración del solvente residual de clase 3, 2-propanol en la materia prima <b>Zopiclona</b> por GC.	Documento <b>MC</b> INF-01 - (Verificación) 90001137.(01) Pág.: 13 de 26 Reemplaza: Documento Nuevo
	System Name AgGC_H5	

Sign Off Full Name Guillermo Guzmán (guillermo.guzman@grunenthal.com)	Sign Off Date 15/07/2024 15:50:02 -05:28:02:04 15:57:39:05	Sign Off Reason Sign Off Level 1, Reason on Review, Sign Off Level 1, Reason Authorized
---	---	--

Reported by User: Gabriela Villos, Jessica (Pérez Cabrera)      Project Name: 2024Laboratorio de Estudios de AGC\_ZOPICLONA  
 Report Method: Reporte Especializado      Date Printed: 30/06/2024  
 Report Method ID: 1009      Page: 2 of 2      10:24:54 America/Guayaquil

	SUP-005062/Rev. 02 <b>CONFIDENCIAL</b> Informe de Verificación del Método Analítico de identificación y valoración del solvente residual de clase 3, 2-propanol en la materia prima <b>Zopiclona</b> por GC.	Documento <b>MC</b> INF-01 - (Verificación) 90001137.(01) Pág.: 14 de 26 Reemplaza: Documento Nuevo
	System Name AgGC_H5	

Figura 3. Cromatograma correspondiente a la inyección de 2-propanol.



	SUP-005062/Rev. 02 <b>CONFIDENCIAL</b> Informe de Verificación del Método Analítico de identificación y valoración del solvente residual de clase 3, 2-propanol en la materia prima <b>Zopiclona</b> por GC.	Documento <b>MC</b> INF-01 - (Verificación) 90001137.(01) Pág.: 15 de 26 Reemplaza: Documento Nuevo
	System Name AgGC_H5	

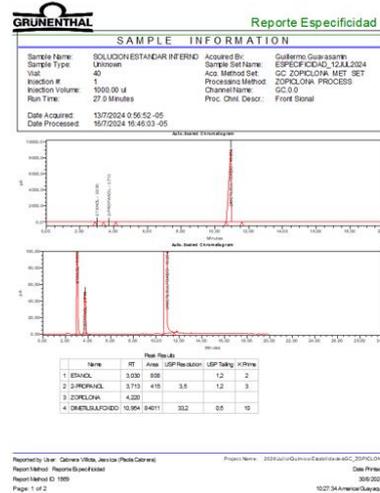
Peak	Name	RT	Area	USP Purity	USP Titer	%Area
8		5.310	182		0.7	4
9		5.485	180	2.3	0.5	4
10		5.595	86	4.5	1.1	5
11	DIENILSUFOXIDO	10.718	20	68.8	6.7	10

Sign Off Full Name Guillermo Guzmán (guillermo.guzman@grunenthal.com)	Sign Off Date 15/07/2024 15:50:02 -05:28:02:04 15:57:39:05	Sign Off Reason Sign Off Level 1, Reason on Review, Sign Off Level 1, Reason Authorized
---	---	--

Reported by User: Gabriela Villos, Jessica (Pérez Cabrera)      Project Name: 2024Laboratorio de Estudios de AGC\_ZOPICLONA  
 Report Method: Reporte Especializado      Date Printed: 30/06/2024  
 Report Method ID: 1009      Page: 2 of 2      10:26:14 America/Guayaquil

	SUP-005062/Rev. 02 <b>CONFIDENCIAL</b> Informe de Verificación del Método Analítico de identificación y valoración del solvente residual de clase 3, 2-propanol en la materia prima <b>Zopiclona</b> por GC.	Documento <b>MC</b> INF-01 - (Verificación) 90001137.(01) Pág.: 16 de 26 Reemplaza: Documento Nuevo
	System Name AgGC_H5	

Figura 4. Cromatograma correspondiente a la inyección de Estándar interno.



	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL Informe de Verificación del Método Analítico de identificación y valoración del solvente residual de clase 3, 2-propanol en la materia prima <b>Zopiclona</b> por GC.	Documento <b>DC</b> INF-01 - (Verificación) 90001137(01) Pág.: 17 de 26 Reemplaza: Documento Nuevo
	System Name AgGC_H6	

Sign Off Full Name Gustavo Guzmán (guzman.gustavo@grunenthal.com)	Sign Off Date 19/12/2024 16:56:52 -05 236 2024 19:57:39 -05	Sign Off Reason Sign Off Level 1, Reason New Rev., Sign Off Level 1, Reason Authoring
---	--	--

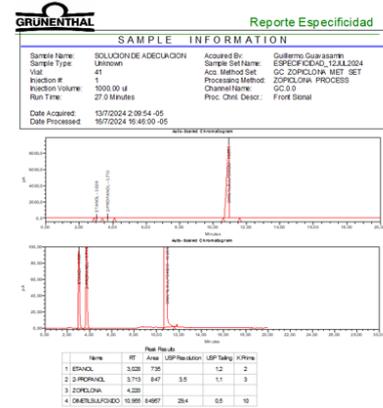
Reported by User: Gabriela Vilas, Jessica (Pérez Cabrera)      Project Name: 2024 Actualización Exámenes de GC\_ZOPICLONA  
 Report Method: Reporte Especificidad      Date Printed: 30/12/2024  
 Report Method ID: 1009      Page: 2 of 2      10:27:34 America/Guayaquil

	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL Informe de Verificación del Método Analítico de identificación y valoración del solvente residual de clase 3, 2-propanol en la materia prima <b>Zopiclona</b> por GC.	Documento <b>DC</b> INF-01 - (Verificación) 90001137(01) Pág.: 18 de 26 Reemplaza: Documento Nuevo
	System Name AgGC_H6	

Sign Off Full Name Gustavo Guzmán (guzman.gustavo@grunenthal.com)	Sign Off Date 19/12/2024 16:56:52 -05 236 2024 19:57:39 -05	Sign Off Reason Sign Off Level 1, Reason New Rev., Sign Off Level 1, Reason Authoring
---	--	--

Reported by User: Gabriela Vilas, Jessica (Pérez Cabrera)      Project Name: 2024 Actualización Exámenes de GC\_ZOPICLONA  
 Report Method: Reporte Especificidad      Date Printed: 30/12/2024  
 Report Method ID: 1009      Page: 1 of 2      10:30:54 America/Guayaquil

Figura 5. Cromatograma correspondiente a la inyección de Estándar de referencia.



	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL Informe de Verificación del Método Analítico de identificación y valoración del solvente residual de clase 3, 2-propanol en la materia prima <b>Zopiclona</b> por GC.	Documento <b>DC</b> INF-01 - (Verificación) 90001137(01) Pág.: 19 de 26 Reemplaza: Documento Nuevo
	System Name AgGC_H6	

Sign Off Full Name Gustavo Guzmán (guzman.gustavo@grunenthal.com)	Sign Off Date 19/12/2024 16:56:52 -05 236 2024 19:57:39 -05	Sign Off Reason Sign Off Level 1, Reason New Rev., Sign Off Level 1, Reason Authoring
---	--	--

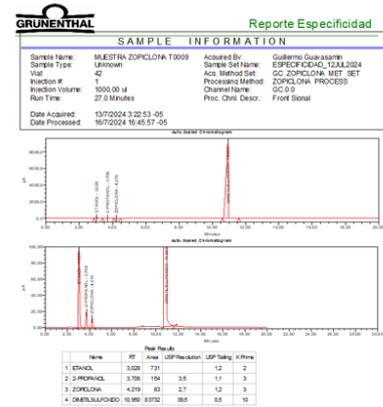
Reported by User: Gabriela Vilas, Jessica (Pérez Cabrera)      Project Name: 2024 Actualización Exámenes de GC\_ZOPICLONA  
 Report Method: Reporte Especificidad      Date Printed: 30/12/2024  
 Report Method ID: 1009      Page: 2 of 2      10:30:54 America/Guayaquil

	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL Informe de Verificación del Método Analítico de identificación y valoración del solvente residual de clase 3, 2-propanol en la materia prima <b>Zopiclona</b> por GC.	Documento <b>DC</b> INF-01 - (Verificación) 90001137(01) Pág.: 20 de 26 Reemplaza: Documento Nuevo
	System Name AgGC_H6	

Sign Off Full Name Gustavo Guzmán (guzman.gustavo@grunenthal.com)	Sign Off Date 19/12/2024 16:56:52 -05 236 2024 19:57:39 -05	Sign Off Reason Sign Off Level 1, Reason New Rev., Sign Off Level 1, Reason Authoring
---	--	--

Reported by User: Gabriela Vilas, Jessica (Pérez Cabrera)      Project Name: 2024 Actualización Exámenes de GC\_ZOPICLONA  
 Report Method: Reporte Especificidad      Date Printed: 30/12/2024  
 Report Method ID: 1009      Page: 1 of 2      10:32:47 America/Guayaquil

Figura 6. Cromatograma correspondiente a la inyección de Muestra de Zopiclona.



	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL	Documento  DNF-01 - (Verificación  90001137)(01)
	Informe de Verificación del Método Analítico de identificación y valoración del solvente residual de clase 3. 2-propanol en la materia prima <u>Zopiclona</u> por GC.	Pág.: 21 de 26 Reemplaza: Documento Nuevo

System Name: AgGC\_146

Sign-Off Full Name Cristóbal Rivas, Guillermo Guillermo Rivas, Cristóbal	Sign-Off Date 07/2024 10:55:02 -05 2382204 1937 39 -05	Sign-Off Reason Sign-Off User: 1, Reason: Nuevo, Sign-Off Level: 1, Reason: Autorización
--	---	---

Reported by: Liber, Gabriela Villa, Jessica Pardo Cabrera	Project Name: 2024 Laboratorios y Estudios de GC_Zopiclona
Report Method: Reporte De Verificación	Date Printed: 08/2024
Report Method ID: 1000	Page 2 of 2

	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL	Documento  DNF-01 - (Verificación  90001137)(01)
	Informe de Verificación del Método Analítico de identificación y valoración del solvente residual de clase 3. 2-propanol en la materia prima <u>Zopiclona</u> por GC.	Pág.: 23 de 26 Reemplaza: Documento Nuevo

Tabla N°5: Estabilidad de las soluciones muestra.

Materia prima	Solvente	Inicial	Ambiente ( $(I-A)/I$ )*100	Refrigeración ( $(I-R)/I$ )*100
<u>Zopiclona</u>	2-propanol	0,1	0 %	0 %

I: Inicial, A: Ambiente, R: Refrigeración

El analito de interés se mantiene estable en la matriz de solventes correspondientes a la preparación de muestra, al exhibirse una diferencia absoluta con respecto a la muestra en condiciones normales de análisis menor al 30,0 %. A pesar de no haberse determinado la estabilidad individual de los solventes (etanol y dimetilsulfóxido), los resultados obtenidos demuestran que las muestras preparadas pueden ser almacenadas durante 24 horas, tanto a temperatura ambiente como en refrigeración, e incluso extender el tiempo de almacenamiento a 32 horas en refrigeración, siempre y cuando se considere que las muestras preparadas Zopiclona disueltas con la solución estándar interno se conserven bien selladas dentro de un vial Headspace ámbar.

#### 4.4 Robustez

A continuación se detallan los resultados obtenidos para el parámetro de robustez con cada variable.

Tabla N°6: Resultados de robustez modificando el solvente de extracción a NN-dimetilformamida.

Materia prima	Solvente	Inicial	Robustez ( $(I-R)/I$ )*100
<u>Zopiclona</u>	2-propanol	0,1	0 %

Tabla N°7: Resultados de robustez con la modificación del flujo a 2.1 mL/min

Materia prima	Solvente	Inicial	Robustez ( $(I-R)/I$ )*100
<u>Zopiclona</u>	2-propanol	0,1	0 %

	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL	Documento  DNF-01 - (Verificación  90001137)(01)
	Informe de Verificación del Método Analítico de identificación y valoración del solvente residual de clase 3. 2-propanol en la materia prima <u>Zopiclona</u> por GC.	Pág.: 22 de 26 Reemplaza: Documento Nuevo

Al observar los resultados obtenidos, se puede identificar que los tiempos de retención para los en picos atribuibles a la matriz de trabajo (dimetil sulfóxido y etanol) no interfieren con la señal correspondiente al analito de interés (2-propanol), evidenciándose este hecho en la Figura 5, donde además se obtuvo una resolución mayor 3 entre el pico más próximo al analito, siendo esta suficiente para determinar que su presencia en la matriz no interfiere con el análisis. Por otro lado, al observar el cromatograma presentado en la Figura 6 aparecen pequeñas señales que al no poder ser identificadas en el cromatograma correspondiente a la matriz, ver Figura 4, o a la solución de referencia, por lo tanto han sido asociados a la materia prima Zopiclona, su presencia tampoco afecta al pico de interés.

#### 4.2 Límites de detección

A continuación se detallan los resultados obtenidos para los límites de detección del 2-propanol.

Límite al 10%

Tabla N°4: Límite de detección mínimo de 2-propanol

N° Inyecciones	Area	S/N
1	89	142
2	88	149
3	90	178
<b>Promedio</b>	<b>89</b>	<b>156</b>
<b>RSD %</b>	<b>1</b>	<b>12</b>

Los resultados obtenidos de  $RSD \leq 30\%$  y señal ruido (S/N) mayor a 3, para esta prueba, permiten establecer que el método es capaz de identificar señales a la mínima concentración sin perder precisión en los resultados entregados.

#### 4.3 Estabilidad

A continuación se detallan los resultados obtenidos para el parámetro de estabilidad a 24 horas. Se utiliza el porcentaje de analito (2-propanol) promedio obtenido de las muestras almacenadas en condiciones ambiente y refrigeración, y se evalúa con respecto al porcentaje de 2-propanol promedio determinado en las muestras cuyo análisis fue llevado a cabo en fresco.

	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL	Documento  DNF-01 - (Verificación  90001137)(01)
	Informe de Verificación del Método Analítico de identificación y valoración del solvente residual de clase 3. 2-propanol en la materia prima <u>Zopiclona</u> por GC.	Pág.: 24 de 26 Reemplaza: Documento Nuevo

Tabla N°8: Resultados de robustez con la modificación del flujo a 2.3 mL/min

Materia prima	Solvente	Inicial	Robustez ( $(I-R)/I$ )*100
<u>Zopiclona</u>	2-propanol	0,1	0 %

Tabla N°9: Resultados de robustez con la modificación de la temperatura en el puerto de inyección a 215 °C

Materia prima	Solvente	Inicial	Robustez ( $(I-R)/I$ )*100
<u>Zopiclona</u>	2-propanol	0,1	0 %

Tabla N°10: Resultados de robustez con la modificación de la temperatura en el puerto de inyección a 235 °C

Materia prima	Solvente	Inicial	Robustez ( $(I-R)/I$ )*100
<u>Zopiclona</u>	2-propanol	0,1	100 %

NA: No aplica I: Inicial R: Robustez

Al variar el solvente en la preparación del vial Head Space de dimetilsulfóxido a NN-dimetilformamida, se obtiene una menor resolución para el pico de 2-propanol y un mayor tailing, que no afectan a los resultados obtenidos puesto que estos parámetros cumplen con los valores especificados de resolución. Esto puede ser ocasionado debido a que el dimetilsulfóxido actúa mejor como solvente de extracción para el 2-propanol que la NN-dimetilformamida.

En el cambio de flujo de la fase móvil, se pueden observar dos comportamientos con respecto a los tiempos de retención de cada analito retrasándose o adelantándose al disminuir o aumentar el flujo respectivamente, este efecto es esperado al realizar modificaciones de flujo. El uso de estándar o solución de referencia para estos casos asegura la correcta detección de la señal.

Al variar la temperatura del inyector, no se aprecian cambios en cuanto al tailing, resolución o el factor de capacidad, no obstante, existe una disminución de las áreas para el 2-propanol cuando la temperatura del puerto es de 215 °C y un leve aumento al fijar la temperatura operacional a 235 °C.

	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL	Documento <del>MC</del> DNF-01 - (Verificación) 90001137(01) Pág. 25 de 26
	Informe de Verificación del Método Analítico de identificación y valoración del solvente residual de clase 3, 2-propanol en la materia prima <del>Zopiclona</del> por GC.	Reemplaza: Documento Nuevo

Por ende, no se puede concluir que el método es robusto aplicando estos cambios, a pesar de obtenerse resultados dentro de especificación y en el caso del ensayo a 215°C, una variación del 0% con respecto al valor nominal de 2-propanol.

De manera general, se debe plantear que el método es susceptible a los cambios ensayados y se recomienda en rutina seguir a cabalidad las instrucciones de este método sin realizar ninguno de los cambios documentados.

#### 5. Conclusiones

La señal obtenida por el dimetilsulfóxido en todos los cromatogramas de esta verificación no es considerada como un pico de interés, solo se la identifica ya que corresponde al solvente principal en las preparaciones de muestras y estándares, siendo así la mayor señal observada en cada prueba.

Se han detectado errores de digitación en el protocolo inicial que se han solventado en los reportes correspondientes de cada prueba de esta verificación, con ello no impide la aprobación de este informe y no afecta a los resultados obtenidos en el mismo, además se han realizado aclaraciones con respecto a los valores automáticos y el programa de horno descritos en las tablas de configuración del equipo GC y el módulo Headspace. De este modo, se consigue armonizar las especificaciones instrumentales escritas en el protocolo con el panel de control del cromatógrafo de gases y el software Empower 3.

#### Especificidad:

Todos los resultados respecto al parámetro de la especificidad estuvieron conforme a los criterios de aceptación establecidos en el protocolo sin desvíos asociados.

#### Limites:

Todos los resultados respecto al parámetro del límite de detección estuvieron conforme a los criterios de aceptación establecidos en el protocolo sin desvíos asociados.

#### Estabilidad:

Pese a que los preparados de muestra, han demostrado ser estables a 24 horas en temperatura ambiente y en refrigeración, bajo las condiciones adecuadas, se recomienda que las preparaciones de muestras y soluciones estándar sean analizadas inmediatamente después de su preparación.

	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL	Documento <del>MC</del> DNF-01 - (Verificación) 90001137(01) Pág. 36 de 26
	Informe de Verificación del Método Analítico de identificación y valoración del solvente residual de clase 3, 2-propanol en la materia prima <del>Zopiclona</del> por GC.	Reemplaza: Documento Nuevo

#### Robustez:

Los resultados respecto al parámetro de Robustez estuvieron conforme, en su mayoría a los criterios de aceptación establecidos en el protocolo sin desvíos asociados, por lo que se concluye que el método es robusto bajo cambios leves de flujo y el solvente de extracción utilizado, a los cambios propuestos y debe ser ejecutado considerando las condiciones farmacopeicas descritas.

Tras realizar la revisión de los resultados se concluye que el método analítico del solvente residual de clase 3, 2-propanol en la materia prima ~~Zopiclona~~ por Cromatografía Gaseosa con Head Space, cumple con los criterios de aceptación y se encuentra **Verificado**.

#### 6. Historial de cambios

No.	Fecha	Cambio Realizado	Observaciones
01	JUL 2024	No Requiere	Documento nuevo

#### 7. Anexos

1. Reporte de especificidad, 5 páginas.
2. Reportes de estabildades, 17 páginas.
3. Reporte de límites, 5 páginas.
4. Reporte de robustez con NN dimetilformamida, 4 páginas.
5. Reporte de robustez a flujo de 2,1 mL/min, 5 páginas.
6. Reporte de robustez a flujo de 2,3 mL/min, 5 páginas.
7. Reporte de robustez a temperatura de 215°C, 5 páginas.
8. Reporte de robustez a temperatura de 235°C, 5 páginas.
9. Códos de ~~resolución~~ utilizados, 5 páginas.
10. Códos de gases ~~empleados~~, 4 páginas.

## 13. ANEXO F: INFORME DE VERIFICACIÓN PARA ACETONA

	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL	Documento N°: DNF-01-20014846-01
	Verificación del Método Analítico de Identificación y valoración de Acetona (MP) por Cromatografía de Gases (GC)	Pág: 1 de 19 Reemplaza: Documento nuevo

1. Introducción	2
2. Sumario	2
3. Método	3
4. Parámetros de la validación	7
5. Conclusiones	17
6. Historial de cambios	18
7. Anexos	18

	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL	Documento N°: DNF-01-20014846-01
	Verificación del Método Analítico de Identificación y valoración de Acetona (MP) por Cromatografía de Gases (GC)	Pág: 3 de 19 Reemplaza: Documento nuevo

<b>Precisión del método</b>	Desviación estándar relativa: 0,0 %	Desviación estándar relativa ( $s=6$ ) ≤ 2,0%
	Cumplen	Cumplimiento de valores individuales según la especificación

### 3. Método

El procedimiento para la identificación y valoración de Acetona por Cromatografía de Gases (GC), es llevado a cabo por el procedimiento analítico descrito a continuación:

#### 3.1 Aparatos, Reactivos, Estándares y Muestras

##### Equipos:

Cromatógrafo de gases Agilent 7890B con detector FID e inyector Head Space, calibrado en DIC 2023.  
Balanzas analíticas, calibradas en ENE 2024.  
Micropipetas, calibradas en AGO 2024.  
Refrigerador, calibrado en MAR 2024.  
Milli-Q, calibrado en ABR 2023.  
Campana de extracción, calibrada en JUN 2024.

Estándares: N/A, se prepararán soluciones estándar con reactivos de alta pureza certificada según certificado de análisis del fabricante.

##### Reactivos:

Metanol, Lote: 234000, Vigencia FEB 2027.  
Acetona, Lote: 232829, Vigencia 27 JUL 2028.  
Tetrahidrofurano, Lote: 243362, Vigencia JUN 2025.

##### Materias primas/Muestras:

Acetona, Lote: W0062, Vigencia 31 AGO 2028.

	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL	Documento N°: DNF-01-20014846-01
	Verificación del Método Analítico de Identificación y valoración de Acetona (MP) por Cromatografía de Gases (GC)	Pág: 7 de 19 Reemplaza: Documento nuevo

### 1. Introducción

Este reporte presenta el diseño experimental y los resultados, relacionados a la verificación del método analítico de identificación y valoración de Acetona (MP), según la monografía de la Farmacopea de Estados Unidos (USP) USP/NF 2024 Issue 1 <USP43-NF38> "Acetona" por Cromatografía de gases (GC).

Los siguientes parámetros fueron determinados:

- Especificidad
- Linealidad
- Precisión del método

### 2. Sumario

Los resultados obtenidos en el proceso de validación/verificación se exponen en la tabla de datos a continuación:

Parámetro	Resultados	Criterio de Aceptación
<b>Especificidad</b>	No hay interferencias con los diversos componentes presentes tanto en la matriz de la muestra como en el proceso de análisis	No tener interferencias con los diversos componentes presentes tanto en la matriz de la muestra como en el proceso de análisis
	Coefficiente de correlación de la curva de calibración: 1,000	Coefficiente de correlación de la curva de calibración ≥ 0,999
	Ordenada al origen: Cumple	Ordenada al origen: valor máximo ± 3,0% de la señal medida al 100%
<b>Linealidad</b>	NA	Desviación estándar relativa de los valores de RRF, máximo 2%
	Intervalo de confianza (P=95%) del intercepto, incluye las coordenadas de origen.	Intervalo de confianza (P=95%) del intercepto, incluye las coordenadas de origen.
	NA	Los residuos deben estar distribuidos alrededor de la curva de calibración de manera que no exista una tendencia visible.

	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL	Documento N°: DNF-01-20014846-01
	Verificación del Método Analítico de Identificación y valoración de Acetona (MP) por Cromatografía de Gases (GC)	Pág: 4 de 19 Reemplaza: Documento nuevo

### 3.2 Condiciones Analíticas

#### Condiciones Cromatográficas de Operación

Equipo:	Cromatógrafo de gases Agilent 6890 GC				
Inlet (front injector)	Heater: Temperatura: 200°C Pressure: Valor automático. Total Flow: Valor automático. Mode: Split 400:1 Split Flow: Valor automático				
Columna:	Columna capilar de dimensiones 30 m x 0,32 mm x 1,8 µm y composición de fase estacionaria: metilpolisiloxano y cianopropil fenil (94:3:3).				
Condiciones de Columna (gas settings: Helio)	Mode: Constant Flow Pressure: Valor automático Flow: Valor automático Average Velocity: 35 cm/sec Post run: Mismo valor que Flow				
Rampa de temperatura:	Horno	Rate (°C/min)	Value (°C)	Hold time at final temperature (min)	Run time (min)
	Inicial	0	40	5	5
	Rampa 1	20	240	0	15
Horno de columna:	Temperatura inicial columna (setpoint): 40°C Equilibration time: 10,00 min Temperatura máxima: 260 °C Post run: 150 °C Post run time: 10,00 min				
Detector:	<ul style="list-style-type: none"> <li>• FID <input checked="" type="checkbox"/> Heater: 280 °C</li> <li>• Air Flow: 400 mL/min <input checked="" type="checkbox"/> H<sub>2</sub> Fuel Flow: 30 mL/min</li> <li>• Constant makeup &amp; fuel flow <input checked="" type="checkbox"/> Makeup flow (N<sub>2</sub>): 1 mL/min</li> </ul>				

	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL	Documento N°: DNF-01-20014846-01
	Verificación del Método Analítico de Identificación y valoración de Acetona (MP) por Cromatografía de Gases (GC)	Pág: 5 de 19 Reemplaza: Documento nuevo

	• Flame
Señal	Signal source : Det – Front detector Data rate / mínimo peak width: 20 Hz / 0,01 min Save signal data: save data

**Condiciones ALS**

Equipo:	Head Space Agilent 7697A
Front Injector:	Injection Syringe Size: 10 µL Injection Volume: 1 µL Dwell Time Pre-Injection: 0 min Post-Injection: 0 min Sample Depth o Enable Washes and Pumps Solvent A Washes: • PreInj: 3 • PostInj: 3 • Volume (µL): Max (8) Solvent B Washes: • PreInj: 3 • PostInj: 3 • Volume (µL): Max (8) Sample Washes: • PreInj: 3 • Volume (µL): Max (8) Sample Pumps: 6 Plunger Speed: o Fast Viscosity Delay: 0 sec

	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL	Documento N°: DNF-01-20014846-01
	Verificación del Método Analítico de Identificación y valoración de Acetona (MP) por Cromatografía de Gases (GC)	Pág: 6 de 19 Reemplaza: Documento nuevo

	Injection Type: Standard
Tray/Other	Sample Overlap o Enable Sample Overlap ALS Errors: Stop the sequence

Verificar en la sección Options del método instrumental creado en Empower, que el método tenga seleccionado el driver GCU:Front (correspondiente al módulo ALS) y no el driver SAMPLER0:GC (correspondiente al módulo Headspace).

**3.3 Método de preparación****Preparación Muestra**

No se requiere preparar o pretreatar la muestra para su inyección.

**Solución de Adecuación del Sistema**

Tomar exactamente 0,2 mL de Metanol de alta pureza (estándar) y 0,2 mL de Acetona de alta pureza (estándar) con micropipetas calibradas y aforar con tetrahidrofurano hasta 10 mL en un balón volumétrico.

**Preparación de viales**

Tomar aproximadamente 1,0 mL de cada solución y cargar en viales ALS individuales.

**Procedimiento**

Injectar 1,0 µL de las siguientes soluciones:

Injectar (por triplicado) la solución de adecuación del sistema.

Injectar (por duplicado) la muestra.

**Requerimientos de adecuación/aptitud del sistema**

Resolución mínima de 15,0 entre las señales de metanol y acetona.

	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL	Documento N°: DNF-01-20014846-01
	Verificación del Método Analítico de Identificación y valoración de Acetona (MP) por Cromatografía de Gases (GC)	Pág: 7 de 19 Reemplaza: Documento nuevo

Nota: Los tiempos de retención relativos para metanol, acetona y tetrahidrofurano se encuentran próximos a 0,6, 1,0 y 1,9 respectivamente. En caso de realizarse el cálculo de los RRT se debe considerar que el tiempo de retención de referencia corresponde al analito de interés (acetona) y no a la mayor señal detectada.

**3.4 Especificación****IDENTIFICACION**

B. Tiempo de Retención: El tiempo de retención de la muestra corresponde al del estándar de Acetona, según se obtiene en la valoración.

**VALORACIÓN**

Acetona Min. 99,0% (Calculado con respecto a la sustancia anhidra).

**3.5 Cálculos**

Cálculo del porcentaje de acetona en la muestra de acetona MP:

$$\% \text{acetona} = \frac{r_1}{r_T}$$

Donde

$r_1$ : Área del pico correspondiente a acetona en la muestra.

$r_T$ : Suma del área de todos los picos en la muestra.

No se requiere hacer correcciones teniendo en cuenta la humedad puesto que el detector FID no detecta agua

	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL	Documento N°: DNF-01-20014846-01
	Verificación del Método Analítico de Identificación y valoración de Acetona (MP) por Cromatografía de Gases (GC)	Pág: 8 de 19 Reemplaza: Documento nuevo

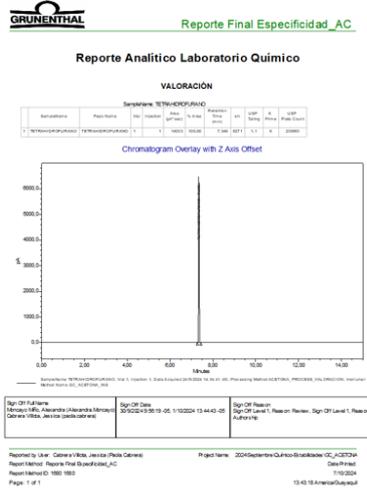
**4. Parámetros de la Validación****4.1 Especificidad**

La especificidad del método ha sido verificada por comparación y análisis de los cromatogramas de las siguientes soluciones:

- Tetrahidrofurano Figura 1
- Metanol de alta pureza (estándar) Figura 2
- Acetona de alta pureza (estándar) Figura 3
- Solución matriz Figura 4
- Solución de adecuación del sistema Figura 5
- Muestra Figura 6

	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL	Documento N°: INF-01-20014846-01 Pág: 9 de 19 Reemplaz: Documento nuevo
	Verificación del Método Analítico de Identificación y valoración de Acetona (MP) por Cromatografía de Gases (GC)	

Figura 1. Cromatograma de la inyección de tetrahidrofurano.



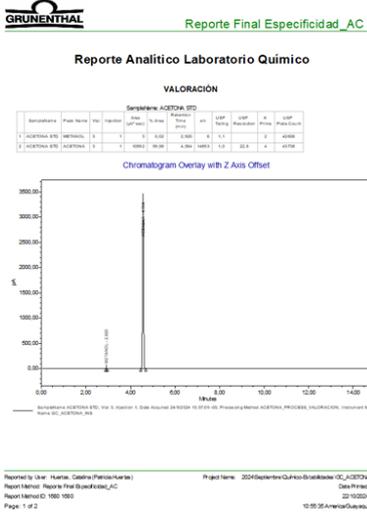
	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL	Documento N°: INF-01-20014846-01 Pág: 10 de 19 Reemplaz: Documento nuevo
	Verificación del Método Analítico de Identificación y valoración de Acetona (MP) por Cromatografía de Gases (GC)	

Figura 2. Cromatograma de la inyección de metanol de alta pureza.



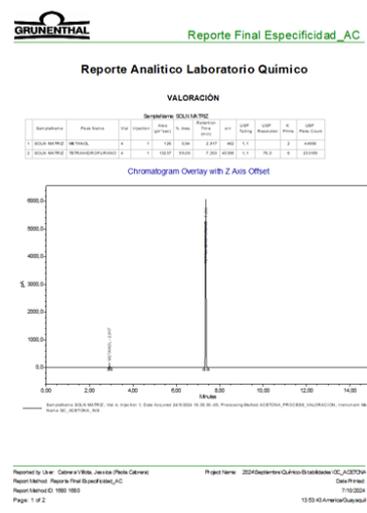
	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL	Documento N°: INF-01-20014846-01 Pág: 11 de 19 Reemplaz: Documento nuevo
	Verificación del Método Analítico de Identificación y valoración de Acetona (MP) por Cromatografía de Gases (GC)	

Figura 3. Cromatograma de la inyección de acetona de alta pureza.



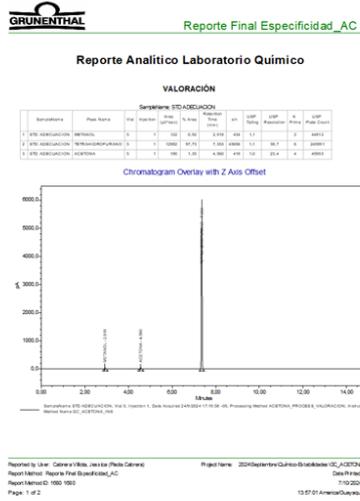
	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL	Documento N°: INF-01-20014846-01 Pág: 12 de 19 Reemplaz: Documento nuevo
	Verificación del Método Analítico de Identificación y valoración de Acetona (MP) por Cromatografía de Gases (GC)	

Figura 4. Cromatograma de la inyección de la solución matriz.



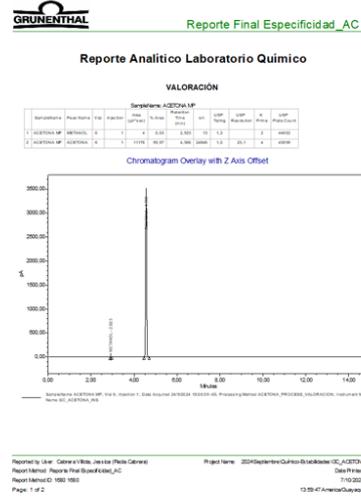
	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL	Documento N°: DNF-01-20014846-01
	Verificación del Método Analítico de Identificación y valoración de Acetona (MP) por Cromatografía de Gases (GC)	Página: 13 de 18 Reemplaza: Documento nuevo

Figura 5. Cromatograma de la inyección de la solución de adecuación.

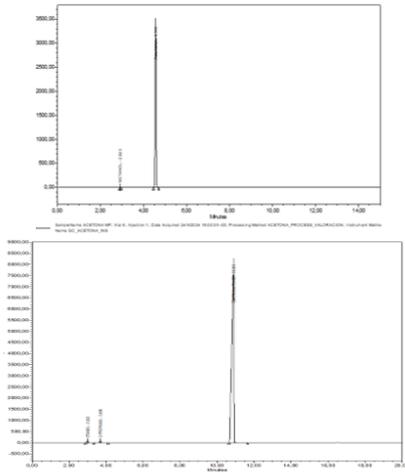


	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL	Documento N°: DNF-01-20014846-01
	Verificación del Método Analítico de Identificación y valoración de Acetona (MP) por Cromatografía de Gases (GC)	Página: 14 de 18 Reemplaza: Documento nuevo

Figura 6. Cromatograma de la inyección de la muestra.



	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL	Documento N°: DNF-01-20014846-01
	Verificación del Método Analítico de Identificación y valoración de Acetona (MP) por Cromatografía de Gases (GC)	Página: 15 de 18 Reemplaza: Documento nuevo



4.2 Linealidad

Se obtiene la regresión lineal de la curva de calibración descrita en la Tabla 1 y se evalúan el coeficiente de correlación, el valor de ordenada al origen y el intervalo de confianza al 95% del intercepto conforme a los criterios de aceptación planteados en el protocolo de verificación:

	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL	Documento N°: DNF-01-20014846-01
	Verificación del Método Analítico de Identificación y valoración de Acetona (MP) por Cromatografía de Gases (GC)	Página: 16 de 18 Reemplaza: Documento nuevo

Tabla 1: Curva de calibración promedio de Acetona

%	Concentración [% w/v]	Área 1	Área 2	Área promedio
100	59.64	10448	10813	10631
80	59.71	8588	8516	8552
60	59.78	6401	6403	6402
40	59.86	4176	4163	4170
20	59.93	2148	2139	2144

Gráfico 1: Curva de calibración promedio de Acetona obtenida.

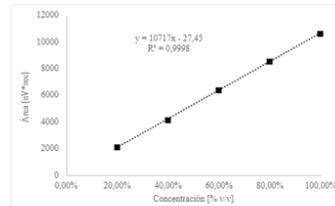


Tabla 2: Resumen de criterios

Coefficiente de correlación	Ordenada al origen	Intervalo de confianza del intercepto	Señal al 100%
1,000	-27,45	± 188,92	± 319,00

	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL	Documento N°: INF-01-20014846-01
	Verificación del Método Analítico de Identificación y valoración de Acetona (MP) por Cromatografía de Gases (GC)	Pág: 17 de 18 Reemplaza: Documento nuevo

#### 4.3 Repetibilidad (Precisión del Método)

Se realizan seis inyecciones de muestra a concentración nominal, se valora el contenido de acetona en cada una de ellas, y se evalúa el cumplimiento individual y la desviación estándar relativa de la cantidad valorada:

Tabla 3: Porcentaje de acetona obtenido en las muestras para el análisis de repetibilidad (precisión del método).

Muestra (#)	Concentración obtenida %
1	99,97
2	100,00
3	100,00
4	99,98
5	99,97
6	99,97
Promedio	99,98
Desv. St.	0,01
RSD	0,01 %

#### 5. Conclusiones

Se detectan y descartan picos cuya relación señal-ruido (s/n) es menor a 3 puesto que este es el valor mínimo aceptable considerando una concentración de contaminante ubicada en el límite de detección (LOD), y no se han identificado picos que interfieran con la señal de análisis. Se recomienda discriminar picos con un área menor a 1044, puesto que esta área se corresponde al límite de cuantificación (LOQ) que ha sido obtenido mediante los valores de intercepto y pendiente de la curva de calibración promedio, ver Anexo 2. De igual manera, es altamente recomendado el uso del modo Gas Saver Mode al momento de crear el método instrumental, ya que esta opción no modifica ningún parámetro del análisis o su

	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL	Documento N°: INF-01-20014846-01
	Verificación del Método Analítico de Identificación y valoración de Acetona (MP) por Cromatografía de Gases (GC)	Pág: 18 de 18 Reemplaza: Documento nuevo

desempeño, pero si consigue ahorrar el gas utilizado como Carrier, de forma significativa. Para configurar este parámetro únicamente se tiene que seleccionar la opción Gas Saver, en la sección **Injects**, y elegir un flujo entre 15 a 20  $\text{ml}/\text{min}$  después de 2 minutos.

Finalmente, se corrige un error de escritura presente en el protocolo el cual hace referencia al lote de acetona utilizado en el estudio, puesto que se empleó el lote W0062.

Tras realizar la revisión de los resultados se concluye que el Método Analítico de identificación y valoración de acetona por Cromatografía de Gases (GC), cumple con los criterios de aceptación y se encuentra **Verificado**

#### 6. Historial de cambios.

No.	Fecha	Cambio Realizado	Observaciones

#### 7. Anexos

1. Reporte de especificidad, 6 páginas.
2. Reporte de linealidad, 6 páginas.
3. Reporte de repetibilidad, 6 páginas.
4. CoAs de reactivos utilizados, 3 páginas.
5. CoAs de gases empleados, 4 páginas.

## 14. ANEXO G: INFORME DE VALIDACIÓN PARA 1, 2, 6 – HEXANOTRIOL.

		SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL Validación del Método Analítico de Valoración de 1, 2, 6 – Hexanotriol (MP) por Cromatografía de gases (GC)		Documento N°: INF-VM- 90001952- 01 Pág: 3 de 24 Reemplaza: Documento nuevo	
Precisión del método	0,0 %	Desviación estándar relativa (n=6) $\leq$ 2,0%			
	Cumple	Cumplimiento de valores individuales según la especificación			
Precisión intermedia	0 %	Desviación estándar relativa (n=12) $\leq$ 2,0%			
	0,668	Coeficiente de correlación de la curva de calibración $\geq$ 0,999			
	Cumple	Ordenada al origen: valor máximo $\pm$ 3,0% de la señal medida al 100%			
Linealidad	35,9 %	Desviación estándar relativa de los valores de RRF, máximo 2%			
	Cumple	Intervalo de confianza (P=95%) del intercepto, incluye las coordenadas de origen			
	$d_{\text{cumple}}$	Los residuos deben estar distribuidos alrededor de la curva de calibración de manera que no exista una tendencia visible			
Robustez variando el solvente de preparación a etanol	0 %, Robusto	Diferencia absoluta del resultado inicial $\leq$ 2,0 %			
Robustez variando el solvente de preparación a 2-propanol	3,6 %, No Robusto	Diferencia absoluta del resultado inicial $\leq$ 2,0 %			
Estabilidad de las soluciones: muestra y estándar a 24 horas en temperatura ambiente	0%, Estable	Diferencia absoluta del resultado inicial $\leq$ 2,0 %			

		SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL Validación del Método Analítico de Valoración de 1, 2, 6 – Hexanotriol (MP) por Cromatografía de gases (GC)		Documento N°: INF-VM- 90001952- 01 Pág: 4 de 24 Reemplaza: Documento nuevo	
---	--	--	--	---	--

### 3. Método

El procedimiento para la Valoración de 1, 2, 6 - Hexanotriol (MP) por Cromatografía de gases (GC), es llevado a cabo por el procedimiento analítico descrito a continuación:

#### 3.1 Aparatos, Reactivos, Estándares y Muestras

Equipo	Última calibración	Próxima calibración	ID	
Cromatógrafo de gases Agilent 7890B con detector FID	DIC 2023	DIC 2024	AI054	-
Balanzas analíticas	JUL 2024	DIC 2024	NA	-
Micropipetas	AGO 2024	NOV 2024	AQ073/AQ072	-
Estándar/es	Lote	Vigencia	CAS	Fórmula
1, 2, 6 - Hexanotriol	R0007	22 ENE 2025	106-69-4	C6H14O3
Reactivos	Lote	Vigencia		
Metanol HPLC	I1337407	30 ABR 2027	-	-
2-propanol	I1268234	NOV 2024	-	-
Etanol	I1150283	30 ABR 2026	-	-
Materias primas	Lote	Vigencia		
1, 2, 6 - Hexanotriol	W0004	30 SEP 2025	-	-

#### 3.2 Condiciones Analíticas

##### Condiciones del Muestreador automático de líquidos (ALS)

Equipo	Muestreador automático de líquidos (ALS) Agilent 7695A
Front Inyector:	Inyección Syringe Size: 10 $\mu$ L Injection Volume: 1 $\mu$ L Dwell Time Pre-Injection: 0 min

		SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL Validación del Método Analítico de Valoración de 1, 2, 6 – Hexanotriol (MP) por Cromatografía de gases (GC)		Documento N°: INF-VM- 90001952- 01 Pág: 1 de 24 Reemplaza: Documento nuevo	
---	--	--	--	---	--

1.	Introducción	2
2.	Sumario	2
3.	Método	4
4.	Parámetros de la validación	10
5.	Conclusiones	23
6.	Historial de cambios	24
7.	Anexos	24

		SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL Validación del Método Analítico de Valoración de 1, 2, 6 – Hexanotriol (MP) por Cromatografía de gases (GC)		Documento N°: INF-VM- 90001952- 01 Pág: 2 de 24 Reemplaza: Documento nuevo	
---	--	--	--	---	--

### 1. Introducción

Este reporte presenta el diseño experimental y los resultados, relacionados a la validación del método analítico de Valoración de 1, 2, 6 – Hexanotriol (MP) por Cromatografía de gases (GC).

Los siguientes parámetros fueron determinados:

- Especificidad
- Exactitud
- Precisión
  - o Repetibilidad del sistema
  - o Precisión del método
  - o Precisión intermedia
- Linealidad
- Robustez
  - o Variando el solvente de preparación a etanol.
  - o Variando el solvente de preparación a 2-propanol.
- Estabilidad de la solución muestra y estándar
- 24 horas a temperatura ambiente.

### 2. Sumario

Los resultados obtenidos en el proceso de validación/verificación se exponen en la tabla de datos a continuación:

Parámetro	Resultados	Criterio de Aceptación
Especificidad	No existen interferencias con los diversos componentes presentes tanto en la matriz de la muestra como en el proceso de análisis	No tener interferencias con los diversos componentes presentes tanto en la matriz de la muestra como en el proceso de análisis.
	289,6 No cumplen	Valor de media aritmética entre: 98,0 – 102,0% / Valores individuales: 97,0 – 103,0%
Exactitud	4,9 %	Desviación estándar relativa $\leq$ 2,0 %
Repetibilidad del sistema	0,0%	Desviación estándar relativa (n=6) $\leq$ 2,0%

	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL Validación del Método Analítico de Valoración de 1, 2, 6 - <del>Hexano</del> <b>trio</b> (MP) por Cromatografía de gases (GC)	Documento N°: DNF-VM- 90001952-01 Pág: 5 de 24 Reemplaza: Documento nuevo
	Post-Injection: 0 min <b>Sample Depth</b> o Enable <b>Washes and Pumps</b> Solvent A Washes: • <b>Purge:</b> 3 • <b>Post:</b> 3 • <b>Volume (µL):</b> Max (8) Solvent B Washes: • <b>Purge:</b> 3 • <b>Post:</b> 3 • <b>Volume (µL):</b> Max (8) Sample Washes: • <b>Purge:</b> 3 • <b>Volume (µL):</b> Max (8) Sample Pumps: 6 <b>Plunger Speed:</b> o Fast Viscosity Delay: 0 sec Injection Type: Standard	

<b>Tray/Other:</b>	<b>Sample Overlap</b> o Enable Sample Overlap <b>ALS Errors:</b> Stop the sequence
--------------------	---

**Condiciones Cromatográficas de Operación**

<b>Equipo:</b> Cromatógrafo de gases Agilent 7890B <b>Inlets (Split-Splitless Inlet)</b>	• <b>Heater:</b> Temperatura: 200°C • <b>Pressure:</b> Valor automático. Total Flow: Valor automático. • <b>Septum Purge Flow:</b> 2 mL/min
--	--

	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL Validación del Método Analítico de Valoración de 1, 2, 6 - <del>Hexano</del> <b>trio</b> (MP) por Cromatografía de gases (GC)	Documento N°: DNF-VM- 90001952-01 Pág: 6 de 24 Reemplaza: Documento nuevo
	Inlet Mode: Split Split Ratio: 450:1 Split Flow: Valor automático Gas Saver (On): 15 mL/min After: 2 min	

Columna:	Columna capilar de dimensiones 30 m x 0,32 mm x 1,0 µm y composición de fase estacionaria: DB-5 o equivalente.				
Columna:	Control Mode: On Flow: 2,0 mL/min Pressure: Valor automático Average Velocity: Valor automático Constant Flow Post run: 2,0 mL/min				
Rampa de temperatura (Oven):	Horno	Rate (°C/min)	Value (°C)	Hold Time (min)	Run Time (min)
	Inicial	0	40	5	5
	Rampa 1	40	200	11	20
Horno de columna (Oven):	Temperatura inicial horno (setpoint): 40°C Equilibration time: 10,00 min Temperatura máxima: 300 °C Post run: 200 °C Post run time: 10,00 min				
Detectores:	FID <input checked="" type="checkbox"/> Heater: 200 °C <input checked="" type="checkbox"/> Air Flow: 400 mL/min <input checked="" type="checkbox"/> H2 Fuel Flow: 40 mL/min <input checked="" type="checkbox"/> Makeup flow (N2): 25 mL/min Carrier Gas Flow Correction (None)				

	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL Validación del Método Analítico de Valoración de 1, 2, 6 - <del>Hexano</del> <b>trio</b> (MP) por Cromatografía de gases (GC)	Documento N°: DNF-VM- 90001952-01 Pág: 7 de 24 Reemplaza: Documento nuevo
	Constant makeup & fuel flow <input checked="" type="checkbox"/> Flame	

Signals	Signal source: Front Signal (FID) Data rate / Min peak Width: 20 Hz / 0,01 min <input checked="" type="checkbox"/> Zero <input checked="" type="checkbox"/> Save
Configuration	Modules Front Inlet (SS Inlet): He Front Detector FID (Makeup): N2

Nota: Verificar en la sección **Options** del método instrumental creado en **Empower**, que el método tenga seleccionado el driver **GC:Front** (correspondiente al módulo ALS) y no el driver **SAMPLER:GC** (correspondiente al módulo Headspace), tal y como se muestra en la Figura 1.

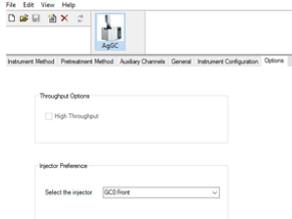


Figura 1. Sección "Options" en el software Empower 3.

	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL Validación del Método Analítico de Valoración de 1, 2, 6 - <del>Hexano</del> <b>trio</b> (MP) por Cromatografía de gases (GC)	Documento N°: DNF-VM- 90001952-01 Pág: 8 de 24 Reemplaza: Documento nuevo
	<h3>3.3 Método de preparación</h3> <p><b>Preparación de solución estándar de adecuación del sistema</b></p> Pesar 100,0 mg de 1, 2, 6 - <del>Hexano</del> <b>trio</b> estándar en un balón volumétrico de 10,0 mL y aforar con Metanol HPLC.	

**Preparación de solución blanco**  
 No requiere preparación, inyectar directamente Metanol HPLC.

**Preparación de muestra**  
 Pesar 100,0 mg de la materia prima 1, 2, 6 - ~~Hexano~~**trio** en un balón volumétrico de 10,0 mL y aforar con Metanol HPLC.

**Preparación de viales**  
 Tomar aproximadamente 1,5 mL de cada solución y cargar en viales ALS individuales.

**Procedimiento para análisis**  
 Inyectar 1,0 µL de las siguientes soluciones:  
 Inyectar metanol HPLC (blanco).  
 Inyectar (por triplicado) la solución de estándar de adecuación del sistema.  
 Inyectar (por duplicado) la muestra.

**Requerimientos de adecuación del sistema**  
 El factor de simetría (**Tailing**) promedio del pico de 1,2,6 - ~~Hexano~~**trio** está entre 0,8 - 2,0.

Nota: Asegurarse de disolver bien la muestra antes de aforar y homogenizar bien la mezcla antes de cargar en viales ALS.

	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL Validación del Método Analítico de Valoración de 1, 2, 6 - <del>Hexanotriol</del> (MP) por Cromatografía de gases (GC)	Documento N°: DNF-VLM-90001952-01 Fecha: 9 de 24 Reemplaza: Documento nuevo
		

3.4 Especificación

1, 2, 6 - ~~Hexanotriol~~ No menos que 99.0%

3.5 Cálculos

Cálculo del porcentaje de 1,2,6 - ~~Hexanotriol~~:

$$\% \text{ 1, 2, 6 - Hexanotriol} = \frac{r_y}{r_T}$$

Donde,

r<sub>y</sub> : Área del pico correspondiente al 1, 2, 6 - ~~Hexanotriol~~ en la muestra.

r<sub>T</sub> : Suma del área de todos los picos en la muestra descartando los picos provenientes del blanco.

Nota: No se requiere hacer correcciones teniendo en cuenta la humedad puesto que el detector FID no es sensible al agua.

	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL Validación del Método Analítico de Valoración de 1, 2, 6 - <del>Hexanotriol</del> (MP) por Cromatografía de gases (GC)	Documento N°: DNF-VLM-90001952-01 Fecha: 10 de 24 Reemplaza: Documento nuevo
		

4. Parámetros de la Validación

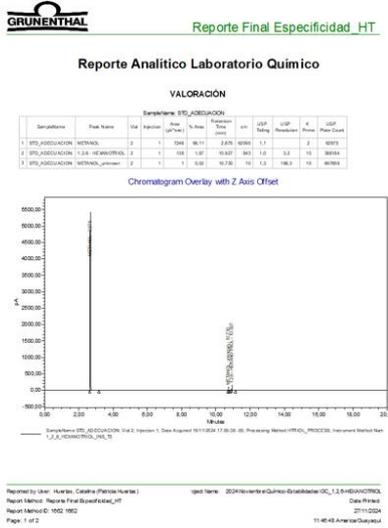
4.1 Especificidad

La especificidad del método ha sido verificada por comparación y análisis de los cromatogramas de las siguientes soluciones:

- Solución estándar de adecuación del sistema Figura 1
- Solución muestra de 1, 2, 6 - ~~Hexanotriol~~ Figura 2
- Metanol HPLC Figura 3
- Etanol Figura 4
- 2 - Propanol Figura 5

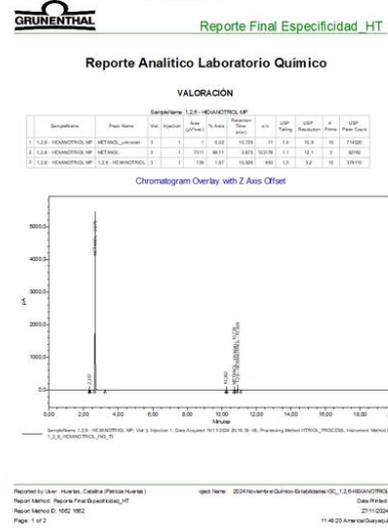
	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL Validación del Método Analítico de Valoración de 1, 2, 6 - <del>Hexanotriol</del> (MP) por Cromatografía de gases (GC)	Documento N°: DNF-VLM-90001952-01 Fecha: 11 de 24 Reemplaza: Documento nuevo
		

Figura 1. Cromatograma de la solución estándar de adecuación del sistema



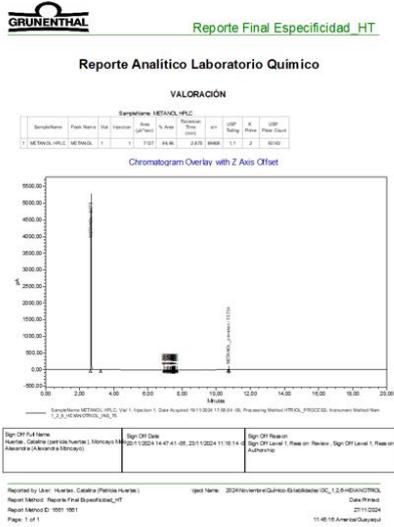
	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL Validación del Método Analítico de Valoración de 1, 2, 6 - <del>Hexanotriol</del> (MP) por Cromatografía de gases (GC)	Documento N°: DNF-VLM-90001952-01 Fecha: 12 de 24 Reemplaza: Documento nuevo
		

Figura 2. Solución muestra de 1,2,6 - ~~Hexanotriol~~



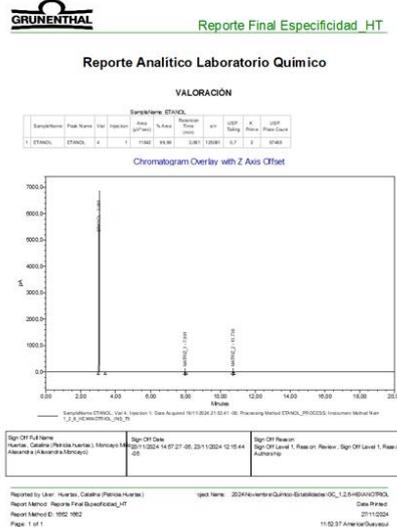
	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL	Documento N°: INF-VM- 90001952-01
	Validación del Método Analítico de Valoración de 1, 2, 6 - <del>Hexano</del> <b>Hexanotriol</b> (MP) por Cromatografía de gases (GC)	Fecha: 13 de 24 Reemplaza: Documento nuevo

Figura 3. Cromatograma de metanol HPLC



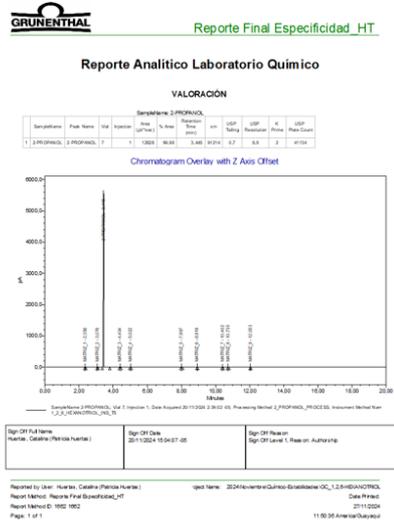
	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL	Documento N°: INF-VM- 90001952-01
	Validación del Método Analítico de Valoración de 1, 2, 6 - <del>Hexano</del> <b>Hexanotriol</b> (MP) por Cromatografía de gases (GC)	Fecha: 14 de 24 Reemplaza: Documento nuevo

Figura 4. Cromatograma de etanol



	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL	Documento N°: INF-VM- 90001952-01
	Validación del Método Analítico de Valoración de 1, 2, 6 - <del>Hexano</del> <b>Hexanotriol</b> (MP) por Cromatografía de gases (GC)	Fecha: 15 de 24 Reemplaza: Documento nuevo

Figura 5. Cromatograma de 2-propanol



	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL	Documento N°: INF-VM- 90001952-01
	Validación del Método Analítico de Valoración de 1, 2, 6 - <del>Hexano</del> <b>Hexanotriol</b> (MP) por Cromatografía de gases (GC)	Fecha: 16 de 24 Reemplaza: Documento nuevo

4.2 Linealidad

Se obtiene la regresión lineal de la curva de calibración descrita en la Tabla # y se evalúan el coeficiente de correlación, el valor de ordenada al origen y el intervalo de confianza al 95% del intercepto conforme a los criterios de aceptación planteados en el protocolo de verificación:

Tabla 1: Curva de calibración promedio de 1,2,6 - ~~Hexano~~ **Hexanotriol**

%	Concentración [mg/mL]	Áreas
110	11,0	157
100	10,0	269
90	9,0	140
80	8,0	103
70	7,0	91

Gráfico 1: Curva de calibración promedio de 1, 2, 6 - ~~Hexano~~ **Hexanotriol**

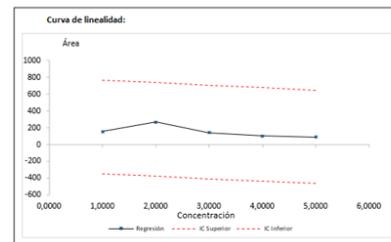


Gráfico 2: Distribución de residuos

	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL Validación del Método Analítico de Valoración de 1, 2, 6 - Hexanotriol (MP) por Cromatografía de gases (GC)	Documento N°: DNF-VM- 90001952-01 Fecha: 16 de 24 Reemplaza: Documento nuevo

**4.2 Linealidad**

Se obtiene la regresión lineal de la curva de calibración descrita en la Tabla # y se evalúan el coeficiente de correlación, el valor de ordenada al origen y el intervalo de confianza al 95% del intercepto conforme a los criterios de aceptación plantados en el protocolo de verificación.

Tabla 1: Curva de calibración promedio de 1, 2, 6 - Hexanotriol

%	Concentración [mg/mL]	Áreas
110	11,0	157
100	10,0	269
90	9,0	140
80	8,0	103
70	7,0	91

Gráfico 1: Curva de calibración promedio de 1, 2, 6 - Hexanotriol

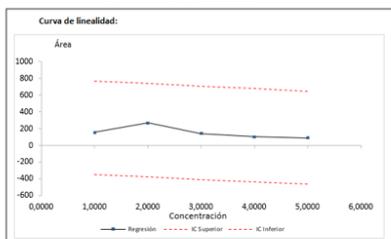


Gráfico 2: Distribución de residuos

	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL Validación del Método Analítico de Valoración de 1, 2, 6 - Hexanotriol (MP) por Cromatografía de gases (GC)	Documento N°: DNF-VM- 90001952-01 Fecha: 17 de 24 Reemplaza: Documento nuevo

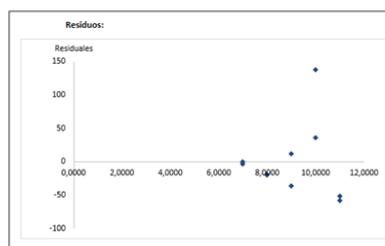


Tabla 2: Resumen de criterios de linealidad

Coefficiente de correlación	Ordenada al origen	Intervalo de confianza del intercepto
0,668	-130,1	± 558,1

La metodología desarrollada no cumple con todos los criterios de aceptación descritos a excepción de aquellos relacionados al intercepto de la curva de calibración y la distribución de residuos. Esto aporta un indicio del rango óptimo de concentraciones de trabajo al que se puede inyectar la muestra al cromatógrafo sin sobrecargarla y producir efectos secundarios sobre una serie de inyecciones consecutivas. En cuanto a las causas probables del fallo en la curva de calibración, la justificante más acertada es que se haya producido el fenómeno de **carry-over** causado por la inyección de la solución previa al 110%, explicando el incremento y deformación súbita del pico en la solución al 100%, fenómeno que se corrige en las próximas inyecciones (90, 80 y 70 %). Se descarta una mala preparación de muestra debido a que posteriormente al ensayo se inyectó la misma solución al 100% en otro vial y no se observó una anomalía en la morfología del pico, además de que el área del mismo se redujo a un valor esperado.

	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL Validación del Método Analítico de Valoración de 1, 2, 6 - Hexanotriol (MP) por Cromatografía de gases (GC)	Documento N°: DNF-VM- 90001952-01 Fecha: 18 de 24 Reemplaza: Documento nuevo

**4.3 Exactitud**

Para el análisis de exactitud se inyectan por duplicado, cada uno de los puntos de concentración para cada una de las tres soluciones madre preparadas, posteriormente se calcula el porcentaje de recuperación obtenido en función al factor de respuesta obtenido en el **system suitability test (SST)**

Tabla 3: Porcentaje de recuperación obtenidos para cada nivel de concentración en función de factor de respuesta.

Nivel	Area promedio	RF	RF SST promedio	Concentración Teórica [mg/mL]	Concentración Obtenida [mg/mL]	% Recuperación	Promedio
110%	146	13,29		10,99	52,10	292,10	
	155	14,06		10,99	33,97	309,10	302,60
	153	13,95		10,97	33,64	306,60	
100%	138	13,81		9,99	30,34	303,70	
	136	13,61	46,5	9,99	29,90	299,30	303,87
	140	14,04		9,97	30,78	308,60	
70%	86	12,30		6,99	18,91	270,40	
	88	12,51		6,99	19,24	275,10	278,40
	92	13,18		6,98	20,23	289,70	
							Promedio 294,96
							Desv. Est. 14,36
							% RSD 4,87

El método propuesto, no cumple con los parámetros de desviación estándar relativa del porcentaje de recuperación, además se observa una varianza significativa en cuanto a los factores de respuesta. Los altos porcentajes de recuperación fueron causados debido a esta gran diferencia entre el factor de respuesta provisto por el estándar de trabajo y el conseguido por las muestras, esto pudo ser causado debido a algunos factores: a) Variabilidad de respuesta debido a que el estándar de trabajo (materia prima estandarizada) utilizado no es del mismo proveedor que la materia prima, b) Pérdida de la sensibilidad de respuesta del detector debido a contaminación causada por el medio no aislado al que está expuesto el cromatógrafo, contaminación del inyector o c) Pérdida de eficiencia de separación de la columna, al haber sido expuesta a una serie de inyecciones consecutivas previas a concentraciones no apropiadas de 1, 2, 6 - Hexanotriol, provocando **carryover** de productos de degradación de columna que puedan interferir con la elución correcta y en bandas bien definidas del analito de interés, explicándose así también la aparición de picos fantasma no repetibles entre cada inyección de una misma preparación.

	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL Validación del Método Analítico de Valoración de 1, 2, 6 - Hexanotriol (MP) por Cromatografía de gases (GC)	Documento N°: DNF-VM- 90001952-01 Fecha: 19 de 24 Reemplaza: Documento nuevo

**4.4 Repetibilidad**

Se prepara una solución estándar, se inyecta 6 veces y se realiza el cálculo de valoración por normalización de áreas respectivo, ver punto 3.5 del documento. También se evalúa el criterio de **System Suitability** planteado.

Tabla 4: Porcentaje valorado de 1, 2, 6 - Hexanotriol en estándar de adecuación del sistema.

Muestra (#)	% Valoración	Factor de simetría (Tailing)
1	100	1,1
2	100	1,1
3	100	1,1
4	100	1,1
5	100	1,1
6	100	1,1
Promedio	100	1,1
Desv. St	0	0
RSD	0 %	0 %

**4.5 Precisión del método**

Se preparan 6 muestras de materia prima y se realiza el cálculo de valoración por normalización de áreas respectivo, ver punto 3.5 del documento. Se evalúa el cumplimiento individual del valor especificado y la desviación estándar relativa de la cantidad valorada, para el conjunto de muestras.

Tabla 5: Porcentaje valorado de 1, 2, 6 - Hexanotriol en las 6 muestras de repetibilidad

Muestra (#)	% Valoración
1	100
2	100
3	100
4	100
5	100
6	100
Promedio	100
Desv. St	0
RSD	0 %

	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL	Documento N°: DNF-VM- 90001952-01
	Validación del Método Analítico de Valoración de 1, 2, 6 - Hexanoctriol (MP) por Cromatografía de gases (GC)	Edic: 20 de 24 Reemplaza: Documento nuevo

#### 4.6 Precisión Intermedia

Otro analista, en un día distinto, ejecuta los análisis de precisión del método y repetibilidad del sistema, se deben utilizar soluciones estándar preparadas recientemente y muestras. Se compara el total de los resultados de valoración obtenidos por ambos analistas.

Tabla 7: Porcentaje valorado de 1, 2, 6 - Hexanoctriol en muestras en la prueba de Precisión Intermedia.

Muestra (#)	% Valoración
1	100
2	100
3	100
4	100
5	100
6	100
Promedio	100
D <sub>av</sub> . St	0
RSD	0

Tabla 8: Porcentaje valorado de 1, 2, 6 - Hexanoctriol en estándar de adecuación del sistema en la prueba de Precisión Intermedia.

Muestra (#)	% Valoración	Factor de simetría (Tailine)
1	100	1,0
2	100	0,9
3	100	1,0
4	100	1,0
5	100	1,0
6	100	1,0
Promedio	100	1,0
D <sub>av</sub> . St	0	0,04
RSD	0%	4,15%

Tabla 9: Porcentaje valorado de 1, 2, 6 - Hexanoctriol en muestras para prueba de Precisión Intermedia

	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL	Documento N°: DNF-VM- 90001952-01
	Validación del Método Analítico de Valoración de 1, 2, 6 - Hexanoctriol (MP) por Cromatografía de gases (GC)	Edic: 21 de 24 Reemplaza: Documento nuevo

Muestra (#)	% Valoración
1	100
2	100
3	100
4	100
5	100
6	100
7	100
8	100
9	100
10	100
11	100
12	100
Promedio	100
D <sub>av</sub> . St	0
RSD	0

Tabla 10: Porcentaje valorado de 1, 2, 6 - Hexanoctriol en muestras para prueba de Precisión Intermedia

Muestra (#)	% Valoración	Factor de simetría (Tailine)
1	100	1,1
2	100	1,1
3	100	1,1
4	100	1,1
5	100	1,1
6	100	1,1
7	100	1,0
8	100	0,9
9	100	1,0
10	100	1,0
11	100	1,0
12	100	1,0
Promedio	100	1,0
D <sub>av</sub> . St	0	0,07

	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL	Documento N°: DNF-VM- 90001952-01
	Validación del Método Analítico de Valoración de 1, 2, 6 - Hexanoctriol (MP) por Cromatografía de gases (GC)	Edic: 22 de 24 Reemplaza: Documento nuevo

RSD	0	6,4
-----	---	-----

#### 4.7 Estabilidad

Se prepara una muestra y se la almacena por 24 horas a temperatura ambiente, se comparan los resultados de valoración obtenidos con respecto a una muestra preparada e inyectada en fresco:

Tabla 11: Porcentaje valorado en la muestra de estabilidad

Inyección (#)	% Valoración
1	100,0
2	100,0
Promedio	100,0
D <sub>av</sub> . St	0,0
RSD	0,0

No se aprecian cambios ni en los criterios de System Suitability de los estándares, ni en el porcentaje valorado en las muestras.

Estabilidad inicial %	Estabilidad 24 h a temperatura ambiente %	Diferencia %
100,0	100,0	0,0

#### 4.8 Robustez

Se prepara una muestra, modificando el solvente de preparación (etanol y 2-propanol) y se comparan los resultados de valoración obtenidos con respecto a una muestra preparada e inyectada en fresco:

Tabla 12: Porcentaje valorado obtenido en la muestra preparada con etanol.

Inyección (#)	% Valoración
1	100,0
2	100,0
Promedio	100,0
D <sub>av</sub> . St	0,0
RSD	0,0

	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL	Documento N°: DNF-VM- 90001952-01
	Validación del Método Analítico de Valoración de 1, 2, 6 - Hexanoctriol (MP) por Cromatografía de gases (GC)	Edic: 23 de 24 Reemplaza: Documento nuevo

Tabla 13: Porcentaje valorado obtenido en la muestra preparada con 2-propanol.

Inyección (#)	% Valoración
1	96,4
2	96,3
Promedio	96,4
D <sub>av</sub> . St	0,05
RSD	0,05

No se aprecian cambios ni en los criterios de System Suitability de los estándares, pero si en el porcentaje valorado entre el par de muestras inicial y 2-propanol.

Estabilidad inicial %	Robustez variando el solvente de preparación a etanol %	Diferencia %
100,0	100,0	0,0

Estabilidad inicial %	Robustez variando el solvente de preparación a 2-propanol %	Diferencia %
100,0	96,4	3,6

## 5. Conclusiones

Tras realizar la revisión de los resultados se concluye que el Método Analítico de verificación de 1, 2, 6 - Hexanoctriol (MP) por Cromatografía de gases (GC), no cumple con los criterios de aceptación y se encuentra **No Validado**. No obstante, es importante tomar en consideración que se ha conseguido determinar que el rango óptimo de concentraciones para realizar el ensayo de 1, 2, 6 - hexanoctriol es de (90% - 70%) ó 9-7 mg/mL, de materia prima, dado que la metodología no requiere de una curva de calibración para valorar la cantidad de analito sino únicamente se integra de forma lineal a través de cero (normalización de áreas) con un único punto de concentración. De este modo, se sugiere que se estudie únicamente la repetibilidad del factor de respuesta del analito bajo las condiciones cromatográficas, así como el ensayo de valoración respectivo. Además, es recomendable realizar una limpieza periódica de la cámara de mezclado de muestra-gas Carrier o Lines, ya que esto puede favorecer a obtener una línea base

	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL Validación del Método Analítico de Valoración de 1, 2, 6 - <del>Hexanotriol</del> (MP) por Cromatografía de gases (GC)	Documento N°: DNF-VM- 90901952- 01 <del>01</del> 23 de 24 Reemplaza: Documento nuevo

Tabla 13: Porcentaje valorado obtenido en la muestra preparada con 2-propanol.

Inyección (#)	% Valoración
1	96,4
2	96,3
Promedio	96,4
Dasv. St	0,05
RSD	0,05

No se aprecian cambios ni en los criterios de **System Suitability**, de los estándares, pero sí en el porcentaje valorado entre el par de muestras inicial y 2-propanol.

Estabilidad inicial %	Robustez variando el solvente de preparación a etanol %	Diferencia %
100,0	100,0	0,0

Estabilidad inicial %	Robustez variando el solvente de preparación a 2-propanol %	Diferencia %
100,0	96,4	3,6

### 5. Conclusiones

Tras realizar la revisión de los resultados se concluye que el Método Analítico de verificación de 1, 2, 6 - Hexanotriol (MP) por Cromatografía de gases (GC), no cumple con los criterios de aceptación y se encuentra **No Validado**. No obstante, es importante tomar en consideración que se ha conseguido determinar que el rango óptimo de concentraciones para realizar el ensayo de 1, 2, 6 - ~~hexanotriol~~ es de (90% - 70%) ó 9-7 mg/mL, de materia prima, dado que la metodología no requiere de una curva de calibración para valorar la cantidad de analito sino únicamente se integra de forma lineal a través de cero (normalización de áreas) con un único punto de concentración. De este modo, se sugiere que se estudie únicamente la repetibilidad del factor de respuesta del analito bajo las condiciones cromatográficas, así como el ensayo de valoración respectivo. Además, es recomendable realizar una limpieza periódica de la cámara de mezclado de muestra-gas Carrier o **Linea**, ya que esto puede favorecer a obtener una línea base

	SUP-005062/Rev. 02 CONFIDENCIAL Validación del Método Analítico de Valoración de 1, 2, 6 - <del>Hexanotriol</del> (MP) por Cromatografía de gases (GC)	Documento N°: DNF-VM- 90901952- 01 <del>01</del> 24 de 24 Reemplaza: Documento nuevo

con menor ruido facilitando el análisis de impurezas en la materia prima. De igual manera, se tiene que considerar el reemplazo de la ~~seta~~ del puerto de inyección

Finalmente, también se puede probar ejecutar esta metodología disminuyendo el volumen de inyección y/o utilizando una columna capilar G43 cuidando de no sobrecargar la columna, conforme al ensayo propuesto por la farmacopea europea para el propanotriol (glicerina) debido a la similitud del 1,2,6 - ~~hexanotriol~~ en cuanto a propiedades fisicoquímicas.

### 6. Historial de cambios

No.	Fecha	Cambio Realizado	Observaciones
01	04 DIC 2024	NA	DOCUMENTO NUEVO

### 7. Anexos

1. Reporte de especificidad, 4 páginas.
2. Reporte de exactitud, 11 páginas.
3. Reporte de repetibilidad, 5 páginas.
4. Reporte de precisión intermedia, 5 páginas.
5. Reporte de linealidad, 13 páginas.
6. Reportes de robustez, 9 páginas.
7. Reporte de estabilidad, 10 páginas.
8. ~~Lista~~ de reactivos utilizados, 5 páginas.
9. ~~Lista~~ de gases empleados, 3 páginas.