TALIDOMIDA / 100 mg / COMPRIMIDOS RECUBIERTOS

Aspecto

Examinar los comprimidos recubiertos muestreados, teniendo en cuenta la forma, la superficie, el color y que no posean imperfecciones visibles.
Tomar 20 comprimidos recubiertos y pesar exactamente cada uno de ellos.
Anotar el peso en forma individual.
Calcular el peso promedio mediante el siguiente cálculo:

$$Pp = \frac{\sum Pc}{20}$$

Dónde:
Pc = Peso de un comprimido recubierto individual (mg)
Pp = Peso promedio de los comprimidos recubiertos (mg)

Identificación de Talidomida

TLC
Materiales y equipos:
Balanza analítica.
Centrifuga.
Placa cromatografía silicagel F_{254}.
Cuba cromatografica.
Probeta de 25 mL y 50 mL.
Matraz de 10,0 mL.
Pipeta graduada de 5,0 mL.
Jeringa para siembra de 5 µL.
Espátula.

Reactivos:
Acetonitrilo calidad HPLC.
Ácido acético glacial ACS.
Butanol ACS.
Acetato de butilo ACS.
Talidomida estándar.

Condiciones cromatográficas en capa delgada:

Fase estacionaria:	Placa cromatografía silicagel F_{254}.
Fase Móvil:	*Preparación*: (50: 25: 5) Acetato de butilo ACS: Ácido acético glacial ACS: Butanol ACS. Mida por separado con probeta, 50 mL de acetato de butilo ACS, 25 mL de ácido acético glacial ACS y 5,0 mL de butanol ACS. Mezcle.
Volumen de Siembra:	5 µL
Revelado:	λ = 254 nm

Solución estándar:

Pese exactamente alrededor de 30,0 mg de estándar vigente de Talidomida y transfiera cuantitativamente a un matraz aforado de 10,0 mL.
Disuelva y lleve a volumen con acetonitrilo calidad HPLC. Homogenice.
Concentración aproximada de Talidomida: 3,0 mg / mL.

Solución muestra:
Reduzca a polvo fino y homogéneo al menos 10 comprimidos recubiertos en un mortero de tamaño adecuado.
Pese exactamente alrededor de 139,0 mg de polvo y transfiera cuantitativamente a un matraz aforado de 10,0 mL de capacidad.
Disuelva y lleve a volumen con acetonitrilo calidad HPLC. Homogenice. Centrifugue.
Concentración aproximada de Talidomida: 3,0 mg / mL.

Procedimiento:
Aplique separadamente, 5 µL de cada una de las soluciones y un blanco de acetonitrilo calidad HPLC a 2 cm de la base de la placa.
Deje secar e introduzca la placa en una cámara.
Deje desarrollar el cromatograma hasta que el frente de solvente alcance ¾ partes de la placa.
Revele la placa a 254 nm.

HPLC
Compare los tiempos de retención, correspondientes a Talidomida muestra y estándar, en los cromatogramas obtenidos en el ensayo de valoración.

Valoración de Talidomida

HPLC
Materiales y equipos:
Cromatógrafo líquido de alta resolución equipado con detector de longitud de onda variable.
Columna Phenomenex Synergi Hydro - RP 80 Å de 150 mm x 4,6 mm, 4 µm de diámetro de partícula. Catálogo 00F-4375-EO o equivalente.
Balanza analítica.
Sonicador.
Agitador magnético.
Vaso de precipitado de 1000 mL.
Probeta de 100 mL, 500 mL y 1000 mL.
Matraz de 50,0 mL y 100,0 mL.
Pipeta doble aforo de 5,0 mL, 10,0 mL y 20,0 mL.
Pipeta graduada de 1,0 mL y 2,0 mL.
Buza magnético.
Espátula.
Filtros Econofilter® de Nylon de 0,45 µm de tamaño de poro. Código: 5185-5833.
Filtros Titán 2® de Nylon de 0,45 µm de tamaño de poro. Catálogo 44525-NN.
Filtros Titán 3® de Polipropileno de 0,45 µm de tamaño de poro. Catálogo 44525-PP.

Reactivos:
Acetonitrilo calidad HPLC.
Agua purificada.
Ácido orto-fosfórico 85 % P/P ACS.
Fenacetina ACS.
Talidomida estándar.

Condiciones cromatográficas:

Fase estacionaria:	Columna Phenomenex Synergi Hydro - RP 80 Å de 150 mm x 4,6 mm, 4 µm de diámetro de partícula. Catálogo 00F-4375-EO o equivalente.
Fase móvil:	Componente acuoso: Agua purificada. *Componente orgánico:* Acetonitrilo calidad HPLC. *Preparación*: (70: 30: 0,1) Agua purificada: Acetonitrilo calidad HPLC: Ácido orto-fosfórico 85 % P/P ACS. Mida por separado con probeta, 700 mL de agua purificada, 300 mL del acetonitrilo calidad HPLC y 1,0 mL de ácido orto-fosfórico 85 % P/P ACS. Mezcle, desgasifique y filtre por vacío.
Modo:	Isocrático
Temperatura de la columna:	25 ºC
Flujo:	1,0 mL / minuto
Volumen de inyección:	20 µL
Tiempo de corrida:	11 minutos
Detección:	λ = 237 nm
Tiempo de retención de:	Talidomida: Aproximadamente 5,3 minutos Fenacetina: Aproximadamente 7,3 minutos

NOTA: Utilice las soluciones dentro de las 48 horas de preparadas, conservadas a temperatura ambiente.

NOTA: En caso de observar contaminación (carry over) en inyector, coloque un vial con tapa sin septa conteniendo 70 % de agua purificada y 30 % acetonitrilo calidad HPLC e inyecte.
Detenga la corrida luego de la aparición de los picos contaminados.
El vial sólo sirve para realizar una inyección.
Repita esta operación tantas veces como sea necesario.

NOTA: En caso de observar contaminación (carry over) en columna, lave con 95 % de agua purificada y 5 % de acetonitrilo calidad HPLC a 40 °C durante 30 minutos.

Luego invierta la columna y lave en sentido contrario, aumentando gradualmente la proporción de acetonitrilo calidad HPLC hasta llegar a 95 % y 5 % de agua purificada durante 30 minutos.
Vuelva gradualmente a la condición inicial (95 % de agua purificada y 5 % de acetonitrilo calidad HPLC).
Coloque la columna en sentido correcto y estabilice con fase móvil en las condiciones cromatográficas de trabajo.

Filtros opcionales:

Filtros Titán 2® de Nylon de 0,45 µm de tamaño de poro. Catálogo 44525-NN y descarte los primeros 6,0 mL.

Filtros Titán 3® de Polipropileno de 0,45 µm de tamaño de poro. Catálogo 44525-PP y descarte los primeros 4,0 mL.

Ácido fosfórico 1 % V/V: Tome con pipeta graduada, 1,0 mL de ácido orto-fosfórico 85 % P/P ACS.

Transfiera cuantitativamente a un matraz aforado de 100,0 mL.
Lleve a volumen con agua purificada. Homogenice.

Solución estándar interno:
Pese exactamente alrededor de 150,0 mg de Fenacetina ACS y transfiera cuantitativamente a un matraz aforado de 100,0 mL.
Disuelva y lleve a volumen con acetonitrilo calidad HPLC. Homogenice.
Concentración aproximada de Fenacetina: 1,5 mg / mL.

Solución estándar: (Prepare por duplicado rotulando como 1 y 2).
Pese exactamente alrededor de 50,0 mg de estándar vigente de Talidomida y transfiera cuantitativamente a un matraz aforado de 50,0 mL.
Disuelva con 25 mL de diluyente y sonique durante 5 minutos.
Deje enfriar a temperatura ambiente.
Lleve a volumen con diluyente. Homogenice.
Tome con pipeta doble aforo, 10,0 mL de la solución anterior y 5,0 mL de solución estándar interno y transfiera cuantitativamente a un matraz aforado de 100,0 mL.
Agregue con pipeta graduada, 10,0 mL de solución de ácido fosfórico.
Complete a volumen con agua purificada.
Homogenice y filtre por membrana de nylon de 0,45 µm y descarte los primeros 6,0 mL.
Concentración aproximada de Talidomida: 0,1 mg / mL.
Concentración aproximada de Fenacetina: 0,075 mg / mL.

Solución muestra: (Prepare por duplicado rotulando como 1 y 2).
Reduzca a polvo fino y homogéneo al menos 20 comprimidos recubiertos a los que les haya determinado previamente su peso promedio, en un mortero de tamaño adecuado.
Pese exactamente alrededor de 235,0 mg de polvo y transfiera cuantitativamente a un matraz aforado de 100,0 mL.
Disuelva con 80 mL de diluyente y sonique durante 30 minutos.
Agite magnéticamente durante 30 minutos más. Deje enfriar a temperatura ambiente.
Lleve a volumen con diluyente. Homogenice.
Tome con pipeta doble aforo, 20,0 mL de la solución anterior y 5,0 mL de solución estándar interno y transfiera cuantitativamente a un matraz aforado de 100,0 mL.
Agregue con pipeta graduada, 10,0 mL de solución de ácido fosfórico.
Complete a volumen con agua purificada.
Homogenice y filtre por membrana de nylon de 0,45 µm y descarte los primeros 6,0 mL.
Concentración aproximada de Talidomida: 0,1 mg / mL.
Concentración aproximada de Fenacetina: 0,075 mg / mL

Test de adecuación:
Una vez que el equipo se encuentre en régimen y obtenga una línea de base estable, inyecte blancos (fase móvil y agua purificada) y estándares.
La RSD entre inyecciones debe ser menor o igual al 1,0 %.

Especificaciones (sobre la solución estándar):
Tailing de Talidomida: ≤ 2,0.
Tailing de Fenacetina: ≤ 2,0.
Número de platos teóricos para Talidomida (N): ≥ 7000.
Número de platos teóricos para Fenacetina (N): ≥ 9000.
Resolución entre el pico de Talidomida y de Fenacetina: ≥ 3,0.

NOTA: En todos los cromatogramas calcule la relación entre las áreas de Talidomida y Fenacetina.

$$RA_{e1\,o\,e2} = \frac{A_{T1\,o\,2}}{A_{F1\,o\,2}}$$

Donde:
RAe1 o e2: Relación de áreas promedio del pico principal en los cromatogramas de la solución estándar 1 o 2.
AT 1 o 2: Área del pico de Talidomida en el cromatograma de la solución estándar 1 o 2.
AF 1 o 2: Área del pico de Fenacetina en el cromatograma de la solución estándar 1 o 2.

Cálculo para asegurar la validez de los estándares:

Calcule la RSD entre los factores de estándares, deberá ser menor o igual a 1,0 %.

$$F_{e1} = \frac{P_{e1} \times 10 \times T_e}{RA_{e1} \times 50 \times 100 \times 100}$$

$$F_{e2} = \frac{P_{e2} \times 10 \times T_e}{RA_{e2} \times 50 \times 100 \times 100}$$

$$Factor_{prom} = \frac{F_{e1} + F_{e2}}{2}$$

Dónde:

Fe1 o e2: Factor del estándar 1 o 2.
RAe1 o e2: Relación de áreas promedio del pico principal en los cromatogramas de la solución estándar 1 o 2.
Pe1 o e2: Peso del estándar 1 o 2, en mg.
Te: Título del estándar, expresado como porcentaje (como Talidomida sobre droga tal cual).
Factorprom: Factor promedio de estándar.
A continuación inyecte las muestras, intercalando inyecciones de estándar.

Cálculos:

$$\%\ \text{de Talidomida} = \frac{RA_m \times Factor_{prom} \times P_{pc} \times 100 \times 100 \times 100}{P_m \times 20 \times VD}$$

Dónde:
RAm: Relación de áreas promedio del pico principal en los cromatogramas de la solución muestra.
Factorprom: Factor promedio de estándar.
Pm: Peso de la muestra, en mg.
Ppc: Peso promedio del comprimido recubierto, en mg.
VD: Valor declarado, 100 mg de Talidomida / comprimido recubierto.
La RSD entre resultados de cada muestra debe ser menor o igual al 2,0 %.

Uniformidad de dosis (Uniformidad de contenido)

Materiales y equipos:
Cromatógrafo líquido de alta resolución equipado con detector de longitud de onda variable.
Columna Phenomenex Synergi Hydro - RP 80 Å de 150 mm x 4,6 mm, 4 µm de diámetro de partícula. Catálogo 00F-4375-EO o equivalente.
Balanza analítica.
Sonicador.
Agitador magnético.
Vaso de precipitado de 1000 mL.
Probeta de 100 mL, 500 mL y 1000 mL.
Matraz de 50,0 mL y 100,0 mL.
Pipeta doble aforo de 5,0 mL, 10,0 mL y 20,0 mL.
Pipeta graduada de 1,0 mL y 2,0 mL.
Buzo magnético.
Espátula.
Filtros Econofilter® de Nylon de 0,45 µm de tamaño de poro. Código: 5185-5833.
Filtros Titán 2® de Nylon de 0,45 µm de tamaño de poro. Catálogo 44525-NN.
Filtros Titán 3® de Polipropileno de 0,45 µm de tamaño de poro. Catálogo 44525-PP.

Reactivos:
Acetonitrilo calidad HPLC.
Agua purificada.
Ácido orto-fosfórico 85 % P/P ACS.
Fenacetina ACS.
Talidomida estándar.

Condiciones cromatográficas:

Fase estacionaria:	Columna Phenomenex Synergi Hydro - RP 80 Å de 150 mm x 4,6 mm, 4 µm de diámetro de partícula. Catálogo 00F-4375-EO o equivalente.
Fase móvil:	Componente acuoso: Agua purificada.
	Componente orgánico: Acetonitrilo calidad HPLC.
	Preparación: (70: 30: 0,1) Agua purificada: Acetonitrilo calidad HPLC: Ácido orto-fosfórico 85 % P/P ACS.
	Mida por separado con probeta, 700 mL de agua purificada, 300 mL del acetonitrilo calidad HPLC y 1,0 mL de ácido orto-fosfórico 85 % P/P ACS. Mezcle, desgasifique y filtre por vacío.
Modo:	Isocrático

Temperatura de la columna:	25 ºC
Flujo:	1,0 mL / minuto
Volumen de inyección:	20 µL
Tiempo de corrida:	11 minutos
Detección:	λ = 237 nm
Tiempo de retención de:	Talidomida: Aproximadamente 5,3 minutos
	Fenacetina: Aproximadamente 7,3 minutos

NOTA: Utilice las soluciones dentro de las 48 horas de preparadas, conservadas a temperatura ambiente.

NOTA: En caso de observar contaminación (carry over) en inyector, coloque un vial con tapa sin septa conteniendo 70 % de agua purificada y 30 % acetonitrilo calidad HPLC e inyecte.
Detenga la corrida luego de la aparición de los picos contaminados.
El vial sólo sirve para realizar una inyección.
Repita esta operación tantas veces como sea necesario.

NOTA: En caso de observar contaminación (carry over) en columna, lave con 95 % de agua purificada y 5 % de acetonitrilo calidad HPLC a 40 °C durante 30 minutos.
Luego invierta la columna y lave en sentido contrario, aumentando gradualmente la proporción de acetonitrilo calidad HPLC hasta llegar a 95 % y 5 % de agua purificada durante 30 minutos.
Vuelva gradualmente a la condición inicial (95 % de agua purificada y 5 % de acetonitrilo calidad HPLC).
Coloque la columna en sentido correcto y estabilice con fase móvil en las condiciones cromatográficas de trabajo.

Filtros opcionales:
Filtros Titán 2® de Nylon de 0,45 µm de tamaño de poro. Catálogo 44525-NN y descarte los primeros 6,0 mL.
Filtros Titán 3® de Polipropileno de 0,45 µm de tamaño de poro. Catálogo 44525-PP y descarte los primeros 4,0 mL.

Ácido fosfórico 1 % V/V: Tome con pipeta graduada, 1, mL de ácido orto-fosfórico 85 % P/P ACS.
Transfiera cuantitativamente a un matraz aforado de 100,0 mL.
Lleve a volumen con agua purificada.
Homogenice.

Solución estándar interno:
Pese exactamente alrededor de 150,0 mg de Fenacetina ACS y transfiera cuantitativamente a un matraz aforado de 100,0 mL.
Disuelva y lleve a volumen con acetonitrilo calidad HPLC. Homogenice.
Concentración aproximada de Fenacetina: 1,5 mg / mL.

Solución estándar: (Prepare por duplicado rotulando como 1 y 2).
Pese exactamente alrededor de 50,0 mg de estándar vigente de Talidomida y transfiera cuantitativamente a un matraz aforado de 50,0 mL.
Disuelva con 25 mL de diluyente y sonique durante 5 minutos.
Deje enfriar a temperatura ambiente.

Lleve a volumen con diluyente. Homogenice.
Tome con pipeta doble aforo, 10,0 mL de la solución anterior y 5,0 mL de solución estándar interno y transfiera cuantitativamente a un matraz aforado de 100,0 mL.
Agregue con pipeta graduada, 10,0 mL de solución de ácido fosfórico.
Complete a volumen con agua purificada.
Homogenice y filtre por membrana de nylon de 0,45 µm y descarte los primeros 6,0 mL.
Concentración aproximada de Talidomida: 0,1 mg / mL.
Concentración aproximada de Fenacetina: 0,075 mg / mL.

Solución muestra: (Prepare por duplicado rotulando como 1 y 2).
Coloque un comprimido recubierto en un matraz aforado de 100,0 mL.
Agregue con pipeta graduada 10,0 mL de solución de ácido fosfórico y sonique durante 10 minutos agitando periódicamente en forma energética.
Disuelva con 80 mL de diluyente y sonique durante 20 minutos.
Deje enfriar a temperatura ambiente.
Lleve a volumen con diluyente. Homogenice.
Tome con pipeta doble aforo, 10,0 mL de la solución anterior y 5,0 mL de solución estándar interno y transfiera cuantitativamente a un matraz aforado de 100,0 mL.
Agregue con pipeta graduada 10,0 mL de solución de ácido fosfórico.
Complete a volumen con agua purificada.
Homogenice y filtre por membrana de nylon de 0,45 µm y descarte los primeros 6,0 mL.
Concentración aproximada de Talidomida: 0,1 mg / mL.
Concentración aproximada de Fenacetina: 0,075 mg / mL

Test de adecuación:
Una vez que el equipo se encuentre en régimen y obtenga una línea de base estable, inyecte blancos (fase móvil, diluyente y agua purificada) y estándares de acuerdo al
La RSD entre inyecciones debe ser menor o igual al 1,0 %.

Especificaciones (sobre la solución estándar):
Tailing de Talidomida: ≤ 2,0.
Tailing de Fenacetina: ≤ 2,0.
Número de platos teóricos para Talidomida (N): ≥ 7000.
Número de platos teóricos para Fenacetina (N): ≥ 9000.
Resolución entre el pico de Talidomida y de Fenacetina: ≥ 3,0.

NOTA: En todos los cromatogramas calcule la relación entre las áreas de Talidomida y Fenacetina.

$$RA_{e1o\,e2} = \frac{A_{T1o2}}{A_{F1o2}}$$

Donde:
RAe1 o e2: Relación de áreas promedio del pico principal en los cromatogramas de la solución estándar 1 o 2.
AT 1 o 2: Área del pico de Talidomida en el cromatograma de la solución estándar 1 o 2.
AF 1 o 2: Área del pico de Fenacetina en el cromatograma de la solución estándar 1 o 2.
Cálculo para asegurar la validez de los estándares:
Calcule la RSD entre los factores de estándares, deberá ser menor o igual a 1,0 %.

$$F_{e1} = \frac{P_{e1} \times 10 \times T_e}{RA_{e1} \times 50 \times 100 \times 100}$$

$$F_{e2} = \frac{P_{e2} \times 10 \times T_e}{RA_{e2} \times 50 \times 100 \times 100}$$

$$Factor_{prom} = \frac{F_{e1} + F_{e2}}{2}$$

Donde:
Fe1 o e2: Factor del estándar 1 o 2.
RAe1 o e2: Relación de áreas promedio del pico principal en los cromatogramas de la solución estándar 1 o 2.
Pe1 o e2: Peso del estándar 1 o 2, en mg.
Te: Título del estándar, expresado como porcentaje (como Talidomida sobre droga tal cual).
Factorprom: Factor promedio de estándar.

A continuación inyecte las muestras, intercalando inyecciones de estándar.

Cálculos:

$$\% \text{ de Talidomida} = \frac{RA_m \times Factor_{prom} \times 100 \times 100 \times 100}{10 \times VD}$$

Donde:
RAm: Relación de áreas promedio del pico principal en los cromatogramas de la solución muestra.
Factorprom: Factor promedio de estándar.
VD: Valor declarado, 100 mg de Talidomida / comprimido recubierto.

Test de Disolución

Materiales y equipos:
Disolutor.
Cromatógrafo líquido de alta resolución equipado con detector de longitud de onda variable.
Columna Phenomenex Synergi Hydro - RP 80 Å de 150 mm x 4,6 mm, 4 µm de diámetro de partícula. Catálogo 00F-4375-EO o equivalente.
Balanza analítica.
Sonicador.
Agitador magnético.
Vaso de precipitado de 1000 mL.
Probeta de 50 mL, 500 mL, 1000,0 mL y 2000 mL.
Matraz de 50,0 mL y 100,0 mL.
Pipeta doble aforo de 5,0 mL, 10,0 mL y 20,0 mL.
Pipeta graduada de 1,0 mL y 2,0 mL.
Buzo magnético.
Espátula.
Filtros Econofilter® de Nylon de 0,45 µm de tamaño de poro. Código: 5185-5833.
Filtros Titán 2® de Nylon de 0,45 µm de tamaño de poro. Catálogo 44525-NN.
Filtros Titán 3® de Polipropileno de 0,45 µm de tamaño de poro. Catálogo 44525-PP.

Reactivos:
Acetonitrilo calidad HPLC.
Agua purificada.
Ácido orto-fosfórico 85 % P/P ACS.
Ácido clorhídrico concentrado ACS.
Brij 35 [polioxietileno (23) lauril éter] ACS.
Fenacetina ACS.
Talidomida estándar.

Condiciones de disolución:

Q:	70 %
Aparato:	II USP, Paletas.
Volumen:	2000 mL
Medio de disolución:	Coloque 2000 mL de ácido clorhídrico 0,225 N con 0,5 mL de solución de Brij 35 al 50 % P/V en agua purificada.
Temperatura:	37,0 ºC ± 0,5 ºC
Velocidad:	75 rpm
Tiempo de muestreo:	60 minutos

Condiciones cromatográficas:

Fase estacionaria:	Columna Phenomenex Synergi Hydro - RP 80 Å de 150 mm x 4,6 mm, 4 µm de diámetro de partícula. Catálogo 00F-4375-EO o equivalente.
Fase móvil:	Componente acuoso: Agua purificada. *Componente orgánico:* Acetonitrilo calidad HPLC. *Preparación*: (70: 30: 0,1) Agua purificada: Acetonitrilo calidad HPLC: Ácido orto-fosfórico 85 % P/P ACS. Mida por separado con probeta, 700 mL de agua purificada, 300 mL del acetonitrilo calidad HPLC y 1,0 mL de ácido orto-fosfórico 85 % P/P ACS. Mezcle, desgasifique y filtre por vacío.
Modo:	Isocrático
Temperatura de la columna:	25 ºC
Flujo:	1,0 mL / minuto
Volumen de inyección:	20 µL
Tiempo de corrida:	11 minutos
Detección:	λ = 237 nm
Tiempo de retención de:	Talidomida: Aproximadamente 5,3 minutos Fenacetina: Aproximadamente 7,3 minutos

NOTA: Utilice las soluciones dentro de las 48 horas de preparadas, conservadas a temperatura ambiente.

NOTA: En caso de observar contaminación (carry over) en inyector, coloque un vial con tapa sin septa conteniendo 70 % de agua purificada y 30 % acetonitrilo calidad HPLC e inyecte.

Detenga la corrida luego de la aparición de los picos contaminados.
El vial sólo sirve para realizar una inyección.
Repita esta operación tantas veces como sea necesario.

NOTA: En caso de observar contaminación (carry over) en columna, lave con 95 % de agua purificada y 5 % de acetonitrilo calidad HPLC a 40 °C durante 30 minutos.
Luego invierta la columna y lave en sentido contrario, aumentando gradualmente la proporción de acetonitrilo calidad HPLC hasta llegar a 95 % y 5 % de agua purificada durante 30 minutos.
Vuelva gradualmente a la condición inicial (95 % de agua purificada y 5 % de acetonitrilo calidad HPLC).

Filtros opcionales:

Filtros Titán 2® de Nylon de 0,45 µm de tamaño de poro. Catálogo 44525-NN y descarte los primeros 6,0 mL.
Filtros Titán 3® de Polipropileno de 0,45 µm de tamaño de poro. Catálogo 44525-PP y descarte los primeros 4,0 mL.

Coloque la columna en sentido correcto y estabilice con fase móvil en las condiciones cromatográficas de trabajo.

Ácido fosfórico 1 % V/V: Tome con pipeta graduada, 1,0 mL de ácido orto-fosfórico 85 % P/P ACS.
Transfiera cuantitativamente a un matraz aforado de 100,0 mL.
Lleve a volumen con agua purificada.
Homogenice.

Ácido clorhídrico 0,225 N: Mida con pipeta probeta, 38,0 mL de ácido clorhídrico concentrado ACS.
Transfiera cuantitativamente a un matraz aforado de 2000,0 mL conteniendo 500 mL de agua purificada. Homogenice. Deje enfriar a temperatura ambiente.
Complete a volumen con agua purificada. Homogenice.

Brij 35 al 50 % P/V: Pese alrededor de 50,0 g de Brij 35 [polioxietileno (23) lauril éter] ACS.
Transfiera cuantitativamente a un matraz aforado de 100,0 mL.
Disuelva y lleve a volumen con agua purificada.
Homogenice.

Solución estándar interno: (Prepare por simplificado).
Pese exactamente alrededor de 75,0 mg de Fenacetina ACS y transfiera cuantitativamente a un matraz aforado de 100,0 mL.
Disuelva con 80 mL de diluyente y sonique durante 3 minutos.
Complete a volumen con diluyente.
Homogenice.
Tome con pipeta doble aforo, 20,0 mL de la solución anterior y transfiera cuantitativamente a un matraz aforado de 100,0 mL.
Agregue con pipeta graduada 10,0 mL de solución de ácido fosfórico.
Complete a volumen con agua purificada.
Homogenice.
Concentración aproximada de Fenacetina: 0,15 mg / mL.

Solución estándar: (Prepare por duplicado rotulando como 1 y 2).
Pese exactamente alrededor de 50,0 mg de estándar vigente de Talidomida y transfiera cuantitativamente a un matraz aforado de 50,0 mL.
Disuelva con 25 mL de diluyente y sonique durante 5 minutos.
Deje enfriar a temperatura ambiente. Lleve a volumen con diluyente. Homogenice.
Tome con pipeta doble aforo, 5,0 mL de la solución anterior y transfiera cuantitativamente a un matraz aforado de 100,0 mL.
Agregue con pipeta graduada 10,0 mL de solución de ácido fosfórico.
Complete a volumen con agua purificada.
Homogenice.
Tome con pipeta doble aforo, 20,0 mL de la solución anterior y 5,0 mL de solución estándar interno y transfiera cuantitativamente a un matraz aforado de 50,0 mL.
Complete a volumen con agua purificada.
Homogenice y filtre por membrana de nylon de 0,45 µm y descarte los primeros 6,0 mL.
Concentración aproximada de Talidomida: 20,0 µg / mL.
Concentración aproximada de Fenacetina: 15,0 mg / mL.

Solución muestra:
Desgasifique el medio de disolución inmediatamente antes de utilizarlo.
Coloque el volumen indicado en cada uno de los vasos del equipo de disolución y permita que la solución llegue a la temperatura especificada.
Luego coloque un comprimido recubierto en cada vaso del aparato que contiene el medio de disolución y verifique que el mismo se encuentre en el fondo del vaso (de no ser así, repita la operación) y dé inicio al ciclo.
Una vez concluido el tiempo de disolución, tome una alícuota de 50,0 mL de la zona media entre la superficie del medio de disolución y la parte superior de la paleta y a una distancia no menor a 1 cm de la pared del vaso.
Filtre por membrana de nylon de 0,45 µm y descarte los primeros 6,0 mL.
Tome con pipeta doble aforo, 20,0 mL de la solución filtrada y 5,0 mL de solución estándar interno y transfiera cuantitativamente a un matraz aforado de 50,0 mL.
Complete a volumen con agua purificada. Homogenice.
Concentración aproximada de Talidomida: 20,0 µg / mL.
Concentración aproximada de Fenacetina: 15,0 mg / mL.

Test de adecuación:
Una vez que el equipo se encuentre en régimen y obtenga una línea de base estable, inyecte blancos (fase móvil, diluyente, medio de disolución, agua purificada) y estándares.
La RSD entre inyecciones debe ser menor o igual al 1,0 %.

Especificaciones (sobre la solución estándar):
Tailing de Talidomida: ≤ 2,0.
Tailing de Fenacetina: ≤ 2,0.
Número de platos teóricos para Talidomida (N): ≥ 7000.
Número de platos teóricos para Fenacetina (N): ≥ 9000.
Resolución entre el pico de Talidomida y de Fenacetina: ≥ 3,0.

NOTA: En todos los cromatogramas calcule la relación entre las áreas de Talidomida y Fenacetina.

$$RA_{e1oe2} = \frac{A_{T1o2}}{A_{F1o2}}$$

Donde:
RAe1 o e2: Relación de áreas promedio del pico principal en los cromatogramas de la

solución estándar 1 o 2.
AT 1 o 2: Área del pico de Talidomida en el cromatograma de la solución estándar 1 o 2.
AF 1 o 2: Área del pico de Fenacetina en el cromatograma de la solución estándar 1 o 2.

Cálculo para asegurar la validez de los estándares:
Calcule la RSD entre los factores de estándares, deberá ser menor o igual a 1,0 %.

$$F_{e1} = \frac{P_{e1} \times 5 \times 20 \times T_e}{RA_{e1} \times 50 \times 100 \times 50 \times 100}$$

$$F_{e2} = \frac{P_{e2} \times 5 \times 20 \times T_e}{RA_{e2} \times 50 \times 100 \times 50 \times 100}$$

$$Factor_{prom} = \frac{F_{e1} + F_{e2}}{2}$$

Donde:
Fe1 o e2: Factor del estándar 1 o 2.
RAe1 o e2: Relación de áreas promedio del pico principal en los cromatogramas de la solución estándar 1 o 2.
Pe1 o e2: Peso del estándar 1 o 2, en mg.
Te: Título del estándar, expresado como porcentaje (como Talidomida sobre droga tal cual).
Factorprom: Factor promedio de estándar.

A continuación inyecte las muestras, intercalando inyecciones de estándar.

Cálculos:

$$\%\ \text{de Talidomida} = \frac{RA_m \times Factor_{prom} \times 2000 \times 50 \times 100}{20 \times VD}$$

Donde:
RAm: Relación de áreas promedio del pico principal en los cromatogramas de la solución muestra.
Factorprom: Factor promedio de estándar.
VD: Valor declarado, 100 mg de Talidomida / comprimido recubierto.

Solventes Residuales

Condiciones cromatográficas (GC):
Equipos: Cromatógrafo gaseoso equipado con detector de ionización a la llama (FID),
Fase estacionaria: Columna Capilar de silica fundida 5% difenil 95% polisiloxano de 30m x 0.32 mm x 0.25 micrones (Perkin Elmer Elite-5)
Gas Carrier: Nitrógeno.
Split: 8ml/min
Presión: 10 psi.
Temperatura: Columna: 35°C.
Inyector: 100°C

Detector 260°C
Detector: FID
Configuración Detector: Rango: 1
Constante de tiempo: 200
Atenuación: -6
Offset: 0 mv.
Tiempo de Corrida: 4.5 minutos

Head Space:
Modo de Trabajo: constante
Venteo: Activado
Temperatura: Aguja: 85°C
Transferencia: 90°C
Horno: 80°C
Tiempo de inyección: 0.02 minutos.
Tiempo: Presurización: 3 minutos
Termostatización: 60 minutos
Retirado: 0.2 minutos
Presión Columna: 20 psi.
Inyección: 20 psi.

Solución estándar
Preparar una solución de manera tal que en el vial de HeadSpace, al que se le agrega previamente 5 ml de sulfato de sodio al 20%, quede una solución con una concentración aproximada de 100 mg/ml de Etanol.
Cerrar herméticamente el vial.

Solución muestra:
Moler 10 comprimidos con molinillo a los cuales se les tomo su peso promedio anteriormente. Colocar el peso equivalente a un comprimido en un vial que contenga 5 ml de solución al 20% de Sulfato de Sodio Anhidro, homogeneizar y cerrar herméticamente.
Procedimiento: Inyectar la solución muestra y estándar.

Cálculos

$$\text{ppm solvente / Cpr} = \frac{Am \times Cs \times 5000}{Ast \times Pm}$$

Dónde:
Am: Área de la muestra.
Ast: Área del estándar.
Cs: Concentración del solvente en mg/ml.
Pm: peso de la muestra en mg.

Control Microbiológico

Se seguirán los lineamientos de USP 40 capítulos generales <61> y <62>
Dilución de la muestra: 1:100
Método: Siembra en placa

BIBLIOGRAFÍA:
Según PVAN-MAR-0257/01.
Propia**,** USP (37, 2014).