

Una Guía Concisa de Control de Calidad de Fármacos Esenciales
y otros Medicamentos

Manual

Para usuarios del GPHF-Minilab®

Volumen II

ENSAYOS CON CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA



Una iniciativa sin ánimo de lucro
fundada y patrocinada por
Merck, Darmstadt · Alemania

VOLUMEN II • ENSAYOS CON CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Autor

Richard W. O. Jähnke

con la colaboración de

Peter Pachaly, Peter N. Gobina, Andreas Schuster, Oliver J. Nigge, Kornelia Dwornik, Volker Rubeau, Natalia Davydova, Sanford Bradby, Mustapha Hajjou, Abdelkrim Smine y Souly Phanouvong

Agradecimientos a

The United States Agency for International Development (USAID) por su apoyo financiero y asistencia técnica suministrados por el personal del The United States Pharmacopeia Drug Quality and Information Program

* * *

Publicado por

Global Pharma Health Fund (GPHF)

Una iniciativa sin ánimo de lucro fundada y patrocinada por Merck, Darmstadt · Alemania

* * *

Versión actualizada 2008

* * *

Copyright © de GPHF

* * *

Merck, Darmstadt · Alemania

Merck es una empresa farmacéutica y química global cuyos orígenes se remontan al año 1668. La empresa Merck opera bajo el techo de Merck KGaA, adscrita a la Bolsa de Valores de Francfort. En la actualidad, alrededor de un 30% del capital de acciones de la compañía se negocia libremente en el mercado, mientras que la familia Merck continúa disponiéndose aproximadamente un 70%. La empresa Merck persigue intereses de operación estratégica en dos importantes áreas de mercado, como lo son los sectores farmacéutico y químico.

La oferta de productos comprende tanto fármacos de marca de prescripción médica para el tratamiento del cáncer, neurológicos y crecimiento, enfermedades cardiovasculares e infertilidad como una amplia gama de productos para la automedicación.

En el sector químico, la empresa ofrece químicos para sofisticadas aplicaciones: Cristales líquidos para monitores, pigmentos para uso cosmético e industrial, reactivos analíticos y kits de test, así como los productos y servicios que requieren las industrias farmacéutica y de biotecnología para llevar a cabo sus cadenas de procesos.

En el año 2007 Merck y la Organización Mundial de la Salud (OMS) suscribieron un acuerdo de cooperación para el control de la cistosomiásis en la población escolar africana. Conforme al acuerdo, Merck donará 200 millones de tabletas de praziquantel de 600 mg (Cesol® 600), cantidad suficiente para tratar unos 27 millones de niños durante los próximos 10 años. Esta iniciativa se llevó a cabo junto con la creación del Global Pharma Health Fund (GPHF) en Francfort, una iniciativa sin ánimo de lucro exclusivamente patrocinada por Merck cuyo objetivo es el de mejorar el suministro de medicamentos y la salud de la población de los países en vía de desarrollo. El minilaboratorio (GPHF-Minilab®) es, en primera línea, un arma de defensa contra el suministro de medicamentos falsificados o de baja calidad que atentan contra la salud de millones de personas en los países en vía de desarrollo.

* * *

Diseñado por Grimm Grafik Design

Capítulo	Página
1	Introducción 5
2	Salud y Seguridad 9
3	Inspección Visual..... 10
4	Ensayo de Disgregación 13
5	Ensayos con Cromatografía en Capa Fina (CCF)..... 14
5.1	Principio fundamental..... 14
5.2	Fase estacionaria 15
5.3	Fase móvil..... 16
5.4	Preparación de la muestra 17
5.5	Aplicación de la muestra 21
5.6	Revelado de la placa cromatográfica 23
5.7	Detección de los agentes activos..... 24
5.8	Lectura de la placa cromatográfica..... 27
5.9	Factor de retención relativa (valor Rf) 28
5.10	Falla de manejo y errores de muestras..... 29
5.11	Limpieza y disposición de residuos..... 30
6	Procedimientos Individuales de Ensayo 31
6.1	Ácido acetilsalicílico (Aspirina)..... 32
6.2	Aminofilina 36
6.3	Amodiaquina (como base libre y clorhidrato)..... 40
6.4	Amoxicilina 44
6.5	Ampicilina..... 48
6.6	Artemetero* NUEVO 52
6.7	Artesunato 56
6.8	Cefalexina 60
6.9	Ciprofloxacino 64
6.10	Cloranfenicol 68
6.11	Cloroquina (como fosfato y sulfato) 72
6.12	Cloxacilina 76
6.13	Didanosina..... 80
6.14	Eritromicina (como base libre y estearato)..... 84
6.15	Estavudina* 88
6.16	Etambutol* 92
6.17	Fenoximetilpenicilina (Penicilina V) 96
6.18	Furosemida 100
6.19	Glibenclamida..... 104
6.20	Griseofulvina 108
6.21	Indinavir 112
6.22	Isoniazida* 116
6.23	Lamivudina* 120
6.24	Lumefantrina* 124
6.25	Mebendazol..... 128
6.26	Mefloquina 132
6.27	Metronidazol 136
	Índice continúa en la siguiente página

6.28	Nevirapina*	140
6.29	Oseltamivir NUEVO	144
6.30	Paracetamol	148
6.31	Pirazinamida*	152
6.32	Prazicuantel NUEVO	156
6.33	Prednisolona	160
6.34	Primaquina (como difosfato)	164
6.35	Quinina (inclusive todas las sales comunes)	168
6.36	Rifampicina*	172
6.37	Salbutamol	176
6.38	Sulfadoxina (inclusive formulaciones con pirimetamina)	180
6.39	Sulfametoxazol (inclusive formulaciones cotrimoxazol)	184
6.40	Tetraciclina	188
6.41	Zidovudina*	192
7	Cuadro de Resumen de Procedimientos de Ensayo CCF	196
8	Procedimientos de Muestreo	199
9	Formularios para Reportes	201
10	Listados de Inventario para el Equipo Minilab de Cromatografía en Capa Fina	205
11	Guía Ilustrada del Equipo Minilab de Cromatografía en Capa Fina	208

* inclusive combinaciones fijas con otros medicamentos



1 Introducción

La falsificación de productos farmacéuticos y la proliferación de medicamentos de baja calidad son situaciones reconocidas internacionalmente y constituyen un peligro serio para la salud. Son un negocio floreciente especialmente en los países en desarrollo, en los que la capacidad de regulación, y el control legal son insuficientes y no se dispone de los fondos necesarios para un constante monitoreo de calidad. Existen múltiples formas de falsificación de productos farmacéuticos pero el efecto que tienen sobre la salud de los pacientes a quienes son aplicados son desastrosos: tratamientos fallidos, aumentos de toxicidad, incrementos en la resistencia de la malaria contra el fármaco para tratarla, tuberculosis, SIDA e inclusive la muerte a causa de alguna de los anteriores.

Se estima que el volumen de medicamentos falsificados que circulan en los países desarrollados no alcanza el 1%, mientras que en los países en desarrollo llega a sobrepasar el 10%, dependiendo del área geográfica. En África y en algunas regiones de Asia y Latinoamérica el volumen de ventas de medicamentos falsificados alcanza un 30%, en otras no alcanza el 10% por lo cual se considera válido un volumen aproximado de entre 10% y 30%. Cuando se trata de medicamentos para tratar la malaria, antibióticos y otros fármacos utilizados para combatir infecciones, un único caso puede poner en riesgo la vida de varios miles de personas. Falsificaciones de medicamentos contra la malaria, sin agente efectivo alguno, están inundando el mercado del sureste asiático en éste mismo momento. Los pacientes están perdiendo la confianza en los servicios de salud y los medicamentos.

Necesidad del GPHF-Minilab®

Debido al riesgo generalizado que representa la falsificación de medicamentos en la actualidad, el control de calidad del sistema de distribución en los países en desarrollo ha adquirido nuevas dimensiones. En los países en los que no existen buenas prácticas respecto a la manufactura farmacéutica, comercialización y distribución de los medicamentos, se debe someter un número mayor de muestras a las pruebas de identificación con el fin de ofrecer el adecuado control

Necesidad de las pruebas de control de calidad de medicamentos en los países en vía de desarrollo con un sistema de distribución farmacéutica poco clara y proliferación de medicamentos falsificados

Nivel	Lugar de la prueba	Escala de ensayo	Objeto de la prueba
1	Puestos de salud, farmacias rurales, consumidores, etc.	Prueba visual: inspección de las formas farmacéuticas, etiquetado y envases	detección de falsificaciones previa a la administración
2	Hospitales, almacenes, programas de salud pública, mayoristas, importadores, etc.	Pruebas básicas: reacciones colorimétricas, cromatografía en capa fina, disgregación	Controles post-mercadeo, controles en donde no hay disponibilidad de laboratorios profesionales o están fuera de servicio.
3	Laboratorios públicos regionales/nacionales laboratorios privados independientes, laboratorios industriales, etc.	Pruebas completas: métodos de farmacopeas y otros legalmente aceptados	Controles previos y posteriores al envío, pruebas forenses con valor probatorio jurídico, etc.

de calidad. Al mismo tiempo, sin embargo, los análisis según las farmacopeas se han ido tornando más y más costosos y únicamente un puñado de centros de excelencia en algunos países se encuentran en condiciones de realizarlos. El desarrollo e implementación de ensayos simples debería no sólo facilitar el balance entre la necesidad de incrementar el volumen de ensayos, sino también mantener razonable el factor de costos.

Global Pharma Health Fund (GPHF), una iniciativa sin ánimo de lucro fundada y patrocinada por Merck, Darmstadt · Alemania, se puso por tarea desarrollar y suministrar un minilaboratorio portátil, compatible con las condiciones climáticas del trópico, fácil de utilizar, con el cual pudiera verificarse la autenticidad de los medicamentos y su contenido y así detectar falsificaciones, empleando técnicas de análisis de bajo costo. El GPHF-Minilab® podría cerrar la brecha de capacidad de control de calidad de medicamentos en los países que no cuentan con los medios necesarios para crear un sistema efectivo de control de calidad de medicamentos, en los que una serie completa de ensayos resultaría inaccesible a causa de los altos costos o requeriría de demasiado tiempo.

El GPHF-Minilab® hará posible que las

entidades de salud responsables de la compra, almacenaje y distribución de medicamentos se protejan de la amenaza del comercio peligroso de medicamentos falsificados. El manejo que se da a los casos en que se encuentran dichos medicamentos es parte del trabajo y reportarlos es enteramente voluntario. La GPHF distribuye la información acerca de dichas alteraciones, pero no lleva a cabo investigaciones propias. Tan pronto las entidades de salud comprueban la existencia de una alteración de calidad en un medicamento pueden optar por no pagarlo o cambiar discretamente de proveedor. Los Minilab no llevan a nadie a la cárcel, pero pueden dar pie a investigaciones más profundas que inmediatamente protejan a los pacientes de ser tratados con medicamentos adulterados sin efecto terapéutico alguno. Finalmente, la posibilidad de que el delito pueda ser detectado aún en zonas rurales, puede significar por sí misma una señal de alerta para los delincuentes reduciéndose así la proliferación de medicamentos falsificados.

Listado actualizado de aplicaciones colorimétricas y cromatográficas del GPHF-Minilab® para el examen de fármacos utilizados para el control de enfermedades de orden prioritario y para el cuidado infantil en países en desarrollo

Clase terapéutica	Medicamentos individuales
Analgésicos	ácido acetilsalicílico, paracetamol
Antiasmáticos & antialérgicos	aminofilina, predisolona, salbutamol
Antibióticos	amoxicilina, ampicilina, cefalexina, ciprofloxacina, cloranfenicol, cloxacilina, eritromicina, fenoximetilpenicilina, metronidazol, sulfametoxazol, tetraciclina, trimetoprima
Antifúngicos	griseofulvina
Antihelmínticos	mebendazol, praziquantel
Antipalúdicos	amodiaquina, artemetero, artesunato, cloroquina, lumefantrina, mefloquina, pirimetamina, primaquina, quinina, sulfadoxina
Antituberculosos	etambutol, isoniazida, pirazinamida, rifampicina
Antivirales	didanosina, estavudina, indinavir, lamivudina, nevirapina, oseltamivir, zidovudina
Otros	furosemida, glibenclamida

Aplicaciones del GPHF-Minilab®

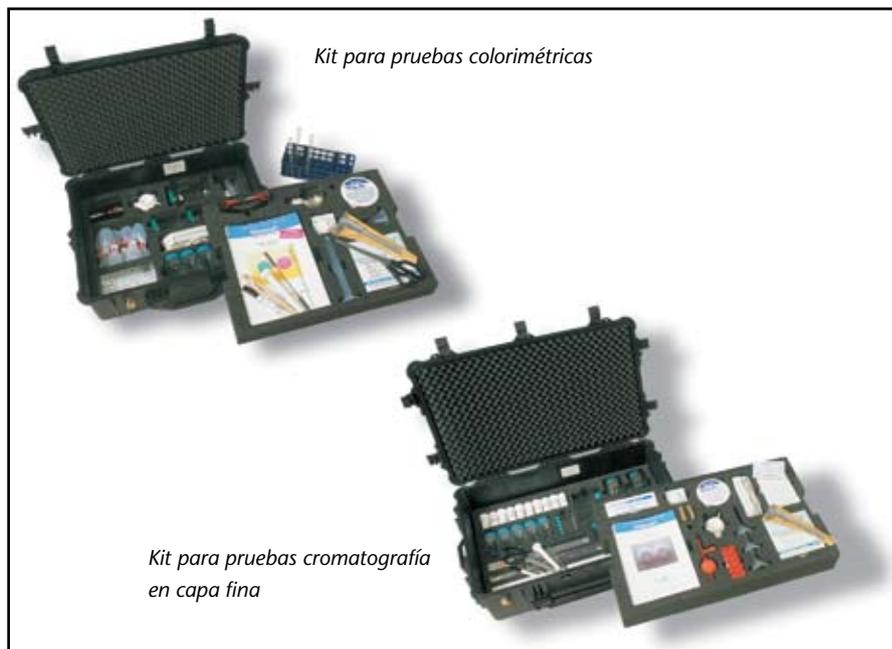
El GPHF-Minilab® concentra su función sobre un rango de más de cuarenta medicamentos que pueden significar la muerte del paciente de estar fuertemente diluidos, hasta llegar a desaparecer. Han sido seleccionados con base en las prácticas generales de prescripción médica, interés de salud pública y los reportes existentes de falsificación de medicamentos, generalmente de antibióticos comunes, antihelmínticos, anti(retro)virales, anti-maláricos, antituberculosos y algunos otros. Existe la posibilidad de extender los métodos de ensayo a otros agentes activos. Una vez detectadas las adulteraciones con ayuda del Minilab, el personal de control de medicamentos, los hospitales, farmacias y otros proveedores de insumos médicos se encuentran en condiciones de tomar las medidas apropiadas para proteger a los pacientes y enviar muestras de confirmación de resultados del análisis a un laboratorio profesional de control de calidad de medicamentos.

Contenido del GPHF-Minilab®

Los minilaboratorios contienen el equipo y productos químicos, así como un muestrario de tabletas y cápsulas auténticas como referencia. El material suministrado es suficiente para llevar a cabo cerca de 1.000 ensayos, garantizando que el costo total de materiales por prueba no sobrepase los dos Euros. Los componentes esenciales están contenidos en dos maletas altamente resistentes y comprenden una gama completa de artículos de vidrio para la extracción, dilución, pipeteado y

goteado de muestras, placas cromatográficas de alto rendimiento, cámaras de revelado y detección, lámparas de luz ultravioleta de diferentes longitudes de onda, una hornilla, un quemador de alcohol, tubos de ensayo, reglillas de calibración y contenedores para almacenamiento – inclusive bolígrafos y lápices. De ser necesario, es posible incluir una balanza digital de bolsillo. Especialmente importante es una colección completa de estándares secundarios de referencia para más de cuarenta principios activos y un juego de manuales que describen procedimientos de operación. Dichos

manuales manejan un lenguaje común y están profusamente ilustrados, leyéndose tan fácilmente como un libro de cocina. Tanto el manual descrito como el manual de reacciones colorimétricas se encuentran disponibles en francés e inglés.



El equipo básico del GPHF-Minilab®, los manuales y un muestrario completo de más de cuarenta estándares secundarios de referencia están contenidos en dos maletas altamente resistentes.

Procedimientos de ensayo con el GPHF-Minilab®

El minilaboratorio se rige por el esquema de ensayos de medicamentos básicos publicado por la organización Mundial de la Salud (OMS) hace unos treinta años a las puertas del siglo XXI. Se han ido integrando nuevos métodos de ensayo y no sólo se suministran manuales de operación impresos en diferentes idiomas, sino también una amplia gama de materiales de laboratorio, juegos de productos químicos básicos y estándares de referencia – todo adecuadamente embalado para el transporte por vía aérea, haciendo

posible la identificación inmediata de medicamentos falsificados con bajo o ningún contenido de principios activos, o con contenido de ingredientes adulterados, en cualquier parte del mundo. Los resultados obtenidos en una serie de ensayos físicos y químicos deben ajustarse a la descripción impresa sobre el envase, como mínimo en lo que se refiere a la denominación y contenido activo del producto. De no ser así o en el caso de presentarse dudas, se pueden tomar las medidas adecuadas para frenar su uso hasta haberse realizado una investigación más profunda. Los minilaboratorios del

Global Pharma Health Fund no sustituyen los análisis exhaustivos que deben realizarse con los medicamentos respecto a su pureza química, liberación del agente activo o contaminación microbiana, ya que éste tipo de ensayos, así como los ensayos de orden forense con propósitos judiciales deben realizarse en laboratorios especializados en dicha labor. El GPHF-Minilab® se desarrolló únicamente para la verificación rápida de calidad de medicamentos y detección de medicamentos falsificados.

Esquema de ensayos físicos y químicos del GPHF-Minilab®

Inspección visual	Disgregación	Reacción colorimétrica	Cromatografía en capa fina
			
1. Esquema de inspección visual de formas farmacéuticas sólidas y sus materiales de envase con el fin de rechazar rápidamente falsificaciones evidentes.	2. Ensayos simplificados de disgregación de tabletas y cápsulas con el fin de verificar información acerca de recubrimiento entérico, efecto retardado y similares, impresas en la etiqueta.	3. Ensayos simplificados con reacciones colorimétricas para verificar rápidamente la identidad del agente activo con respecto a lo impreso en la etiqueta.	4. Ensayos con cromatografía en capa fina para verificar rápidamente el contenido del agente activo con respecto a lo impreso en la etiqueta.

Requerimientos de personal para el GPHF-Minilab®

El personal con formación y/o experiencia de laboratorio puede utilizar el equipo inmediatamente, sin asistencia alguna, siendo aconsejable tomar un curso de vez en cuando para refrescar la información. Los expertos son médicos especializados en el área de química clínica, farmacéuticos con experiencia en análisis de medicamentos y técnicos en las áreas de la medicina y farmacia encargados de realizar estas actividades a niveles adecuados en los hospitales de países en desarrollo. Para el caso de estos países, los farmacéuticos prefieren hacerse instruir como instructores en el uso del Minilab, reduciendo así el número de personas que de otra forma requerirían instrucción directa de Global Pharma Health Fund y sus asociados. Inclusive representantes de la policía y aduanas de algunos países

africanos y del sureste de Asia asisten ocasionalmente a cursos de formación en el uso del Minilab con el fin de informarse, especialmente cuando en sus respectivos países de origen se inician amplios estudios con el fin de mejorar las condiciones de control de calidad de medicamentos. Durante la realización de dichos estudios la posibilidad de recolección de muestras y retención de sustancias sospechosas puede ser de gran ayuda en los casos en que los farmacéuticos no disponen de poder policivo.

Adquisición, mantenimiento y transporte del GPHF-Minilab®

El minilaboratorio del Global Pharma Health Fund es un producto único en el mercado, por lo cual las instituciones públicas pueden adquirirlo sin necesidad de licitación, lo cual facilita una rápida respuesta a las necesidades de los progra-

mas de salud pública. Además, habiendo sido ensamblado para uso estrictamente humanitario requiere de un solo código de tarifa arancelaria para ser trasladado entre diferentes países, trámite que se facilita aún más, si hace parte de programas conjuntos con la Organización de las Naciones Unidas. Los minilaboratorios se suministran al costo, por lo cual se encuentran al alcance de instituciones privadas no-gubernamentales y comunidades religiosas comprometidas con el cuidado de la salud. El ensamblaje y transporte de los minilaboratorios corre a cargo de Technologie Transfer Marburg (TTM) una empresa logística con alto reconocimiento dentro de la comunidad.

El Global Pharma Health Fund ha otorgado licencia a Technologie Transfer Marburg para efectuar el ensamblaje, facturación y transporte del GPHF-Minilab®. TTM sumi-

nistra el Minilab, los respectivos equipos de laboratorio, estándares de referencia, reactivos y soluciones de ensayo tanto para pruebas de cromatografía como de colorimetría (www.ttm-germany.de). El presupuesto de costos generalmente incluye los costos de transporte, pero la tarifa arancelaria de importación debe ser investigada localmente por los encargados de cada proyecto. El suministro de instrumental e insumos de reposición para el minilab a todos los lugares del mundo está garantizado por la misma vía. Los minilaboratorios pueden acondicionarse a las necesidades específicas de cada proyecto, por ejemplo equipos CCF y estándares de referencia para el control de calidad de medicamentos contra la malaria únicamente. Los costos finales del Minilab dependen de su destinación específica, pudiendo ser mayores o menores.

Usuarios del GPHF-Minilab®, recursos y organizaciones de apoyo

Los Minilab son frecuentemente utilizados para el control de calidad de medicamentos contra la malaria, la tuberculosis y el SIDA por instituciones que llevan a cabo programas prioritarios de asistencia de salud en los países con índices preocupantes de incidencia de estas enfermedades entre su población. Estos programas son promovidos y apoyados por la organización Mundial de la Salud (OMS), con sede en Ginebra (Suiza), y

tres importantes ONGs de los Estados Unidos de Norteamérica: la Management Sciences for Health (MSH), la Partnership for Supply Chain Management (PFSCM) y la Drug Quality and Information Program of the United States Pharmacopeia (USP DQI), todas con sede en Washington, D.C. Apoyo adicional ofrecen el programa alemán de cooperación técnica (GTZ) y organizaciones religiosas como, por ejemplo el Medical Mission Institute Würzburg, la organización de ayuda con medicamentos *action medeor* y la asociación alemana de médicos para los países en vía de desarrollo. Actualmente son utilizados en Tanzania 25 Minilabs como sistema de defensa de primera línea para proteger a la población de la infiltración de medicamentos falsificados.

Desde hace diez años los Minilabs son asequibles a escala global tanto desde el punto de vista físico como económico y protegen instituciones de salud alrededor del mundo entero contra la infiltración de medicamentos falsificados que atentan contra la salud y la vida de la población. Más de 300 unidades se encuentran en servicio en 70 países. Los métodos de ensayo del GPHF-Minilab® son una tecnología aceptada por la fuerza internacional de combate contra la falsificación de productos médicos (IMPACT) supervisada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la detección de medicación adulterada y protección de

los pacientes en los países en vía de desarrollo. Con este respaldo y un tiempo récord comprobado de suministro del Minilab a casi cualquier lugar del planeta, las instituciones financieras gubernamentales y no-gubernamentales, por ejemplo el Banco Mundial, el Fondo Global, la UNDP y otras, ofrecen garantías y otro tipo de apoyo a los proyectos de control de calidad de medicamentos que utilizan el Minilab.

Con seguridad la visión de importantes agencias financieras, el entusiasmo de la población local, el sistema logístico establecido y el compromiso del Global Pharma Health Fund impulsarán la iniciativa Minilab durante la próxima década, por lo cual debería considerarse seriamente la opción de instruir a los estudiantes en su uso en todas las facultades de farmacia, química y medicina.

Información importante

Los medicamentos falsificados representan un serio peligro para la salud y la vida de los pacientes. Con el fin de evitar resultados errados que pudieran convertirse en una grave amenaza para los pacientes, es esencial que las instrucciones y ensayos presentados en este manual sean estudiados cuidadosamente y reproducidos con exactitud al utilizar el GPHF-Minilab®.



GPHF-Minilab®

Información y contacto

Global Pharma Health Fund e.V.
Otto-Meißner-Straße 1
60314 Frankfurt, Alemania
Tel.: +49-69-962387-600
Fax: +49-69-962387-609
info@gphf.org, www.gphf.org

El GPHF es una iniciativa sin ánimo de lucro fundada y patrocinada por Merck, Darmstadt · Alemania

6 Procedimientos Individuales de Ensayo



6.31 Pirazinamida (inclusive combinaciones de dosis fijas)

Identificación primaria por medio de la inspección visual y del ensayo de disgregación

I. INSPECCIÓN VISUAL

Buscar las deficiencias en el etiquetado, en el envase y en las formas farmacéuticas como se describe en los capítulos anteriores de métodos y operaciones generales. Usar el formulario de reporte como guía para anotar cualquier particularidad del producto. Las tabletas o cápsulas contienen por lo regular 400 o 500 mg de pirazinamida. Se conoce la existencia de dosis con potencias de 100 a 300 mg de pirazinamida, particularmente en combinaciones de dosis fijas con otros medicamentos antituberculosos.

II. ENSAYO DE DISGREGACIÓN

Todas las tabletas o cápsulas de pirazinamida de liberación rápida tienen que pasar el ensayo de disgregación tal como esta descrita en los capítulos anteriores sobre métodos y operaciones generales. Deberán disgregarse en agua a 37 °C en menos de 30 minutos. Si el producto no pasa ésta prueba, esto constituye un signo de deficiencia importante.

III. RESULTADOS Y MEDIDAS A TOMAR

Los productos farmacéuticos adquiridos a precios extremadamente bajos o para los cuales los documentos acompañantes faltan o no son los correctos, así como aquellos con defectos en su forma farmacéutica, defectos en el envase o con etiquetas incompletas, dañadas o que faltan; o con etiquetado en otros idiomas deberán ser sometidos a un ensayo con cromatografía en capa fina.

Verificación de la identidad y la cantidad a través del ensayo con cromatografía en capa fina

I. PRINCIPIO

Pirazinamida se extrae de tabletas y cápsulas con metanol y se determina con cromatografía en capa fina (CCF) con referencia a un estándar secundario. En combinaciones con otros medicamentos antituberculosos, todos los componentes pueden ser extraídos y analizados simultáneamente.

II. EQUIPOS Y REACTIVOS

- 1) Pistilo
- 2) Papel aluminio
- 3) Embudo
- 4) Cinta adhesiva
- 5) Rotulador
- 6) Lápiz
- 7) Viales de 10 ml
- 8) Juego de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
- 9) Juego de frascos de vidrio de laboratorio (25 a 100 ml)
- 10) Placas Merck CCF de aluminio con recubrimiento de gel de sílice 60 F 254, de 5 x 10 cm
- 11) Microcapilares de vidrio de 2 µl de capacidad
- 12) Cámara de revelado para CCF (frasco de 500 ml)
- 13) Plancha caliente
- 14) Papel de filtro
- 15) Tijeras
- 16) Pinza
- 17) Luz ultravioleta de 254 nm
- 18) Cámara de manchado con yodo
- 19) Metanol
- 20) Tolueno
- 21) Hidróxido de amonio (solución al 25%)
- 22) Estándar secundario de referencia, p. ej. tabletas de pirazinamida de 500 mg

- III. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE DEL ESTÁNDAR**
- La preparación de la solución madre del estándar requiere de un producto auténtico usado como referencia, por ejemplo, tabletas con contenido de 500 mg de pirazinamida. Se envuelve la tableta usada como referencia en papel aluminio y se reduce a polvo fino usando el pistilo. Se desocupa cuidadosamente el contenido del papel aluminio en un frasco de vidrio de laboratorio de 100 ml y se enjuagan todos los residuos con 50 ml de metanol usando una pipeta graduada. Se cierra la botella y se agita por unos tres minutos, hasta que se haya disuelto la mayor parte de los sólidos. Se deja reposar la solución por unos cinco minutos más, hasta que los residuos no disueltos se asienten en el fondo del frasco. La solución obtenida debe contener 10 mg del agente activo por ml y se debe rotular "Solución madre del estándar de pirazinamida". Para cada prueba se preparará una nueva solución. Se continúa trabajando con el líquido turbio sobrenadante o la dilución clara obtenida.
-
- IV. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN ESTÁNDAR DE TRABAJO AL 100% (LÍMITE SUPERIOR)**
- Se pipetea 1 ml de la solución madre del estándar a un vial de 10 ml y se añaden 7 ml de metanol. Se tapa y agita el vial. La solución obtenida debe contener 1.25 mg del agente activo por ml y se debe rotular "Solución estándar de trabajo de pirazinamida al 100%".
- Esta solución estándar representa un fármaco de buena calidad con un contenido de 100% de pirazinamida.
-
- V. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN ESTÁNDAR DE TRABAJO AL 80% (LÍMITE INFERIOR)**
- Se pipetea 1 ml de la solución madre del estándar a un vial de 10 ml y se añaden 9 ml de metanol. Se tapa y agita bien el vial. La solución obtenida debe contener 1.0 mg del agente activo por ml y se debe rotular "Solución estándar de trabajo de pirazinamida al 80%".
- Esta solución estándar representa un producto farmacológico de baja calidad y bajo contenido de pirazinamida de solo 80% de lo indicado en la etiqueta del producto. En la investigación actual, este nivel de contenido de fármaco representa el límite de concentración inferior aceptable de un determinado producto.
-
- VI. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE DE LA MUESTRA DE UN PRODUCTO QUE DICE CONTENER 100 MG DE PIRAZINAMIDA POR UNIDAD**
- Se toma una tableta o cápsula completa del producto farmacológico de las muestras recogidas durante el trabajo de campo. Como se indicó anteriormente, las tabletas se envuelven en papel aluminio y se trituran hasta obtener un polvo fino. Se transfiere todo el polvo obtenido a un frasco de laboratorio de 25 ml. Para el caso de las cápsulas, se desocupa primero el polvo contenido en la cápsula de muestra, seguido de la tapa y el cuerpo, directamente en el frasco. Para la extracción se añaden 10 ml de metanol usando una pipeta graduada. Se tapa el frasco y se agita por unos tres minutos, hasta que la mayor parte de los sólidos se haya disuelto. Se deja reposar la solución por unos cinco minutos más, hasta que los residuos que no se hayan disuelto queden asentados en el fondo del frasco.
- 300 MG DE PIRAZINAMIDA POR UNIDAD**
- Se toma una tableta o cápsula completa y se extrae el polvo obtenido con 30 ml de metanol usando una pipeta graduada y un frasco de laboratorio de 40 ml para contener la muestra. Se continúa el procedimiento como se ha descrito arriba.
- 400 MG DE PIRAZINAMIDA POR UNIDAD**
- Se toma una tableta o cápsula completa y se extrae el polvo obtenido con 40 ml de metanol usando una pipeta graduada y un frasco de laboratorio de 100 ml para contener la muestra. Se continúa el procedimiento como se ha descrito arriba.

500 MG DE PIRAZINAMIDA POR UNIDAD

Se toma una tableta o cápsula completa y se extrae el polvo obtenido con 50 ml de metanol usando una pipeta graduada y un frasco de laboratorio de 100 ml para contener la muestra. Se continúa el procedimiento como se ha descrito arriba.

Todas las soluciones resultantes deberán contener 10 mg del agente activo por ml y rotularse "*Solución madre de la muestra de pirazinamida*". Para cada prueba se preparará una nueva solución. Se continúa trabajando con el líquido turbio sobrenadante o la dilución clara obtenida.

VII. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE TRABAJO DE LA MUESTRA

Se pipetea 1 ml de la solución madre de la muestra a un vial de 10 ml y se añaden 7 ml de metanol. Se tapa y agita bien el vial, rotulándolo "*Solución de trabajo de la muestra de pirazinamida*".

La concentración esperada de pirazinamida en esta solución de trabajo deberá ser de 1.25 mg por ml y corresponder a la concentración de pirazinamida de la solución estándar de trabajo superior elaborada arriba.

VIII. APLICACIÓN DE LOS PUNTOS

Se traza una línea de origen paralela a una distancia de 1.5 cm del extremo inferior de la placa cromatográfica y se aplican con las pipetas microcapilares suministradas 2 microlitros (μ l) de la solución de ensayo y del estándar como se indica en la fotografía.

Hasta cinco puntos se pueden aplicar en la placa cromatográfica. Se comprueba la uniformidad de los puntos usando luz UV de 254 nm. Todos los puntos deben tener forma circular y ser aplicados equidistantes sobre la línea de origen. Aunque su intensidad puede diferir, su diámetro no. Mientras que la diferencia en la intensidad se debe a la diferente cantidad de los residuos de excipientes o la cantidad de agente activo contenidos en las tabletas o de las cápsulas, una diferencia de diámetro resulta de la aplicación incorrecta. Se debe repetir el paso, si no se logra una aplicación homogénea la primera vez.

IX. REVELADO DE LA PLACA CROMATOGRÁFICA

Se pipetea 12 ml de metanol, 10 ml de tolueno y 0.5 ml de solución concentrada de amoníaco al frasco usado como cámara de revelado. Se cubren las paredes del frasco con papel de filtro y se espera por unos 15 minutos para asegurar que el interior del frasco se sature con los vapores de solvente. Cuidadosamente se coloca la placa cromatográfica cargada en el frasco. Se cierra el frasco y se revela la placa hasta que el frente del solvente haya impregnado unas tres cuartas partes de la longitud de la placa, siendo el tiempo de revelado de unos 20 minutos. Se retira la placa del frasco, se marca la línea del frente del solvente y se permite la evaporación del excedente de solvente, usando la plancha caliente de ser necesario.

X. DETECCIÓN DE LOS AGENTES ACTIVOS

Se seca el resto de la fase móvil y se observa la placa cromatográfica bajo luz ultravioleta de 254 nm usando la lámpara a pilas suministrada. Se utiliza este método tanto para el proceso de identificación como para la verificación cuantitativa. Para la verificación adicional de la identidad y la cantidad de pirazinamida se observa la placa a la luz del día tras el manchado con yodo.

En caso de que haya etambutol presente, se mancha la placa cromatográfica con ninhidrina para su detección. En las páginas 26 y 94 puede verse la forma de realizar procedimiento de manchado. Debe tenerse en cuenta que este método de detección hará imposible los puntos de pirazinamida o isoniazida bajo luz ultravioleta de 254 nm y los puntos de rifampicina a la luz del día.

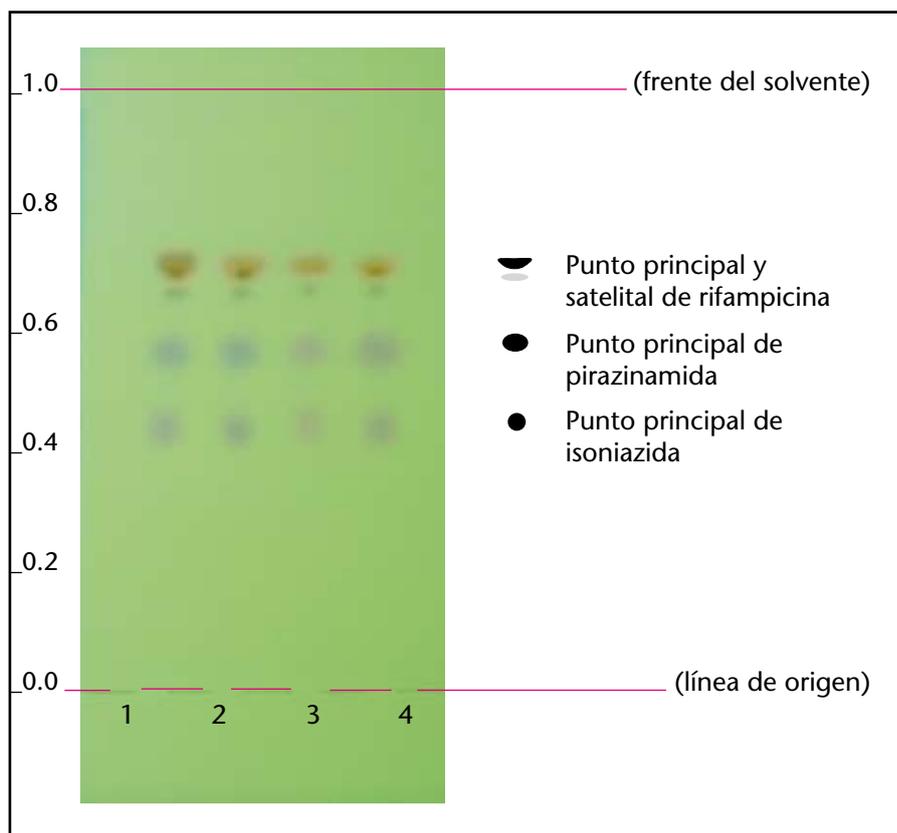
XI. PLACA CROMATOGRÁFICA VISTA BAJO LUZ ULTRAVIOLETA DE 254 NM

Recorrido No. 1:
Estándar superior representando 100% de pirazinamida, isoniazida y rifampicina

Recorrido No. 2:
Fármaco combinado de buena calidad

Recorrido No. 3:
Fármaco combinado de baja calidad

Recorrido No. 4:
Estándar inferior representando 80% de pirazinamida, isoniazida y rifampicina



XII. OBSERVACIONES HECHAS A 254 NM

Un punto azul-violeta intenso a una distancia de recorrido de aprox. 0.56 indica la presencia de pirazinamida en la solución de ensayo. En formulaciones con isoniazida y rifampicina se hacen visibles dos puntos principales más, por debajo y encima del punto de pirazinamida a una distancia de recorrido de 0.45 y 0.71, respectivamente. Puntos fuertes adicionales generados por la solución de ensayo indican la presencia de otros agentes activos o una degradación de la pirazinamida, siendo este último caso más probable al verse asociados a un punto principal más pequeño. Los agentes auxiliares incorporados a las diferentes formulaciones de las tabletas y cápsulas pueden generar algunos puntos más pálidos cerca a o sobre la línea de origen. Los productos combinados que contengan etambutol, requerirán del manchado con solución de ninhidrina, ya que este fármaco no puede ser detectado con luz ultravioleta de longitud de onda alguna.

XIII. OBSERVACIONES HECHAS A LA LUZ DEL DÍA TRAS EL MANCHADO CON YODO

Al exponer la placa cromatográfica a los vapores de yodo, todos los puntos de pirazinamida detectados bajo la luz ultravioleta se irán tornando naranja-marrón. Se continúa observando la placa conforme se vaya evaporando el yodo. Los puntos generados por productos de baja calidad desaparecerán primero gradualmente, seguidos por los puntos del fármaco de referencia con un contenido de agente activo de 80% y 100%, respectivamente.

XIV. RESULTADOS Y MEDIDAS A TOMAR

El punto de pirazinamida en el cromatograma obtenido con la solución de ensayo debe corresponder en términos de color, tamaño, intensidad, forma y distancia de recorrido al cromatograma obtenido con las soluciones estándar alta y baja. Este resultado debe obtenerse con cada método de detección. Si ese no es el caso, se debe repetir la prueba desde el principio con una segunda muestra. El lote es rechazado, si el contenido del agente activo no puede verificarse a la tercera prueba. Para obtener una segunda opinión, se refieren muestras adicionales a un laboratorio profesional de control de calidad de fármacos. Las muestras se retienen y el lote se pone en cuarentena hasta que se haya tomado una decisión final respecto a liberar o rechazar el producto.

Una iniciativa sin ánimo de lucro fundada y patrocinada por
Merck, Darmstadt · Alemania



Global Pharma Health Fund e.V. (GPHF)

Otto-Meißner-Straße 1 · 60314 Frankfurt · Alemania

Tel. +49-69-962387-600 · Fax +49-69-962387-609

info@gphf.org · www.gphf.org