

Manual

Para usuarios del GPHF-Minilab®

Suplemento 2011

Volumen II

ENSAYOS CON CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA



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



USAID
FROM THE AMERICAN PEOPLE



PROMOTING THE QUALITY OF MEDICINES

SUPLEMENTO 2011 AL VOLUMEN II DE ENSAYOS CON CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Autores

Richard W. O. Jähne, Kornelia Dwornik y Souly Phanouvong

* * *

Revisado por

Adrian Barojas, Daniel Bempong, Sanford Bradby, Kennedy Chibwe, Yanga Dijiba, Latifa El Hadri, Mustapha Hajjou y Patrick Lukulay

* * *

Publicado por

El Global Pharma Health Fund (GPHF), una iniciativa sin ánimo de lucro fundada y patrocinada por Merck Darmstadt · Alemania, y el programa de Promoción de la Calidad de Medicamentos de Farmacopea de los Estados Unidos de Norteamérica (U.S. Pharmacopeia's Promoting the Quality of Medicines program - USP PQM)

* * *

Copyright © de GPHF & USP PQM

* * *

Agradecimientos

La publicación de éste suplemento ha sido posible gracias al generoso apoyo del pueblo de los Estados Unidos de Norteamérica a través de la Agencia para el Desarrollo Internacional de los Estados Unidos de Norteamérica (USAID). Las organizaciones de asistencia internacional GPHF y USP PQM son las responsables del contenido, el cual no necesariamente refleja las opiniones de la Agencia USAID o del Gobierno de los Estados Unidos de Norteamérica.

* * *

Acerca del proyecto GPHF-Minilab®

La proliferación de medicamentos falsificados constituye una seria amenaza para la salud. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que una inquietante proporción de 10 a 30 por ciento de todos los medicamentos ofrecidos en los países subdesarrollados y en vía de desarrollo son falsificaciones o presentan deficiencias de calidad. Combatir dichas falsificaciones, asegura que las décadas de trabajo y medios invertidos en el sector de la salud no se pierdan a causa de control y vigilancia insuficientes.

Para evitar que las organizaciones responsables del aprovisionamiento de los medicamentos y los programas prioritarios para el combate de enfermedades como la malaria, la tuberculosis y el VIH/SIDA en países endémicos sean infiltrados con fármacos falsificados o de baja calidad, el Global Pharma Health Fund (GPHF), una organización caritativa fundada y patrocinada exclusivamente por Merck Darmstadt · Alemania, con sede en la ciudad alemana de Francfort, ha dedicado sus esfuerzos a desarrollar y suministrar a bajo costo el GPHF-Minilab®, un mini-laboratorio para la rápida verificación de la calidad y detección de medicamentos falsificados.

Desde hace 12 años, los minilaboratorios GPHF-Minilab® han venido actuando como primera línea de defensa contra los medicamentos falsificados y de baja norma, que amenazan la salud de millones de habitantes de los países subdesarrollados y en vía de desarrollo. Hasta la fecha un total de más de 440 minilaboratorios han sido suministrados en 70 países de África, la región del Pacífico, Asia y Latinoamérica.

Los socios más importantes para la implementación del minilaboratorio son los servicios nacionales de salud y las agencias nacionales de medicamentos junto con la Organización Mundial de la Salud y el programa de ayuda técnica de Farmacopea de los Estados Unidos de Norteamérica (U.S. Pharmacopeia's Promoting the Quality of Medicines program - USP PQM). Recientemente, los programas conjuntos de control de calidad de medicamentos llevados a cabo en el sureste de Asia y el éste de África dispararon la confiscación por parte de Interpol de millones de pastillas falsificadas sin contenido alguno de medicamentos efectivos para el tratamiento de la malaria.

La necesidad de los países de bajos ingresos de disponer de un sistema de control de calidad para medicamentos económico y sin sofisticaciones innecesarias persiste y es el motor que impulsa en la actualidad el desarrollo de nuevos protocolos de ensayo para el GPHF-Minilab®. La necesidad de aumentar el volumen de ensayos es también el punto de partida para la intensificación de la colaboración con nuestros socios de los Estados Unidos. Cualquier entidad interesada en mejorar la salud de los países en vía de desarrollo está invitada a formar parte de la iniciativa.

* * *

Diseño e impresión: Grimm Grafik Design, Ochsenfurt, Alemania

Capítulo	Página
Nuevos Procedimientos Individuales de Ensayo con Cromatografía	4
<i>Suplemento 2011 al Volumen II, Capítulo 6</i>	
<i>Más Medicamentos Antipalúdicos, Antibacteriales y Antituberculosos</i>	
6.51 Artemetero (combinado con lumefantrina en polvo para suspensiones orales).....	4
6.52 Azitromicina (incl. formas en polvo para suspensiones orales).....	8
6.53 Cicloserina	12
6.54 Dihidroartemisinina (incl. combinaciones con piperquina fosfato).....	16
6.55 Etionamida	20
6.56 Lumefantrina (combinado con artemetero en polvo para suspensiones orales)	24
6.57 Piperquina (como fosfato en combinaciones con dihidroartemisinina).....	28
Cuadro de Resumen de Procedimientos de Ensayo con Cromatografía	32
<i>Suplemento al Volumen II, Capítulo 7</i>	
Listado Actualizado de Estándares de Referencia para el GPHF-Minilab®	33
<i>Suplemento al Volumen II, Capítulo 10</i>	
Salud & Seguridad	35

6.54 Dihidroartemisinina (incl. combinaciones con piperquina fosfato)

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

I. INSPECCIÓN FÍSICA

Buscar las deficiencias en el etiquetado, el envase y en las formas farmacéuticas, tal y como se describe en los capítulos sobre métodos y operaciones generales en el manual principal. Usar el formulario de reporte como guía para anotar cualquier particularidad del producto. Las tabletas o cápsulas contienen por lo regular 20 mg, 60 mg ó 80 mg de dihidroartemisinina. Recientemente se han reemplazado las formulaciones de medicamento único para monoterapia por medicamentos con combinaciones de dosis fija que consisten de 40 mg de dihidroartemisinina y 320 mg de piperquina tetrafosfato.

II. ENSAYO DE DISGREGACIÓN

Todas las tabletas y cápsulas de dihidroartemisinina de liberación rápida de dosis única y las combinaciones de dosis fijas deben pasar el ensayo de disgregación, tal y como está descrito en los capítulos sobre métodos y operaciones generales en el manual principal. Deberán disgregarse en agua a 37 °C en menos de 30 minutos. Si el producto no pasa esta prueba, esto constituye un signo de deficiencia importante.

III. RESULTADOS & 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 las etiquetas escritas en otros idiomas, deberán ser sometidos a un ensayo de cromatografía en capa fina.

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

I. PRINCIPIO

La dihidroartemisinina es extraída de tabletas y cápsulas con metanol y se determina con cromatografía en capa fina (CCF) con referencia a un estándar secundario auténtico. Para la verificación de la piperquina fosfato en medicamentos con combinaciones de dosis fijas se sigue el procedimiento descrito en la página 28 del presente suplemento.

II. EQUIPOS Y REACTIVOS

- | | |
|--|--|
| 1) Pistilo | 13) Plancha caliente |
| 2) Papel aluminio | 14) Papel de filtro |
| 3) Embudo | 15) Tijeras |
| 4) Cinta adhesiva | 16) Pinza |
| 5) Rotulador | 17) Luz ultravioleta de 254 nm |
| 6) Lápiz y regla | 18) Cámara de sumersión (vaso de 250 ml) |
| 7) Viales de 10 ml | 19) Ácido sulfúrico (solución al 96%) |
| 8) Juego de pipetas graduadas (1 a 25 ml) | 20) Acetato de etilo |
| 9) Juego de frascos de vidrio de laboratorio (25 a 100 ml) | 21) Metanol |
| 10) Placas Merck CCF de aluminio con recubrimiento de gel de sílice 60 F ₂₅₄ , tamaño 5x10 cm | 22) Amoníaco (solución al 25%) |
| 11) Microcapilares de vidrio (2-µl de capacidad) | 23) Estándar de referencia, por ejemplo tabletas con una combinación de dosis fija de 40 mg de dihidroartemisinina y 320 mg de piperquina fosfato. |
| 12) Cámara de revelado para CCF (frasco de 500 ml) | |

<p>III. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE DEL ESTÁNDAR</p>	<p>La preparación de la solución madre del estándar requiere de un producto auténtico usado como referencia, por ejemplo, tabletas con contenido de 40 mg de dihidroartemisinina combinada con 320 mg de piperquina fosfato. 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 40 ml y se enjuagan todos los residuos sólidos con 20 ml de metanol utilizando una pipeta graduada. Se cierra el frasco 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, para que los residuos no disueltos se asienten en el fondo del frasco. La solución obtenida debe contener 2 mg de dihidroartemisinina por ml y se rotula '<i>Solución madre del estándar de dihidroartemisinina</i>'. La solución se prepara fresca para cada ensayo. Se continúa el trabajo con el líquido claro o turbio sobrenadante.</p>
<p>IV. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN ESTÁNDAR DE TRABAJO AL 100% (LÍMITE SUPERIOR)</p>	<p>La solución madre del estándar no requiere de dilución posterior, habiendo alcanzado la concentración superior de trabajo de 2 mg de dihidroartemisinina por ml. Para un manejo más conveniente, se puede transferir un poco del líquido sobrenadante a un vial de 10 ml y se rotula '<i>Solución estándar de trabajo de dihidroartemisinina al 100%</i>'. Ésta solución estándar representa un fármaco de buena calidad con un contenido de 100% de dihidroartemisinina.</p>
<p>V. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN ESTÁNDAR DE TRABAJO AL 80% (LÍMITE INFERIOR)</p>	<p>Se pipetea 4 ml de la solución madre del estándar a un vial de 10 ml y se añade 1 ml de metanol. Se tapa y agita el vial. La solución obtenida debe contener 1.6 mg de dihidroartemisinina por ml y se rotula '<i>Solución estándar de trabajo de dihidroartemisinina al 80%</i>'. Ésta solución estándar representa un producto farmacológico de baja calidad, con contenido de dihidroartemisinina de solo 80% de lo indicado en la etiqueta. En la investigación actual, éste nivel de contenido de fármaco representa el límite de concentración inferior aceptable de un determinado producto.</p>
<p>VI. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE DE LA MUESTRA DE UN PRODUCTO QUE DICE CONTENER 20 MG DE DIHIDROARTEMISININA POR UNIDAD</p>	<p>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 apropiado. 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 utilizando 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 bajo el líquido sobrenadante.</p>
<p>40 MG DE DIHIDROARTEMISININA POR UNIDAD</p>	<p>Se toma una tableta o cápsula completa de muestra y se extrae el polvo obtenido con 20 ml de metanol. Se procede como se ha indicado arriba.</p>
<p>60 MG DE DIHIDROARTEMISININA POR UNIDAD</p>	<p>Se toma una tableta o cápsula completa de muestra y se extrae el polvo obtenido con 30 ml de metanol. Se procede como se ha indicado arriba.</p>
<p>80 MG DE DIHIDROARTEMISININA POR UNIDAD</p>	<p>Se toma una tableta o cápsula completa de muestra y se extrae el polvo obtenido con 40 ml de metanol. Se procede como se ha indicado arriba. Todas las soluciones madre producidas deberán contener finalmente 2 mg de dihidroartemisinina por ml y rotularse '<i>Solución madre de la muestra de dihidroartemisinina</i>'. Las soluciones se preparan frescas para cada ensayo. Se continúa el trabajo con los líquidos claros o turbios sobrenadantes.</p>

VII. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE TRABAJO DE LA MUESTRA

Las soluciones madre de las muestras no requieren de dilución posterior, ya que representan la concentración final de 2 mg de dihidroartemisinina por ml. Si han sido preparadas a partir de fármacos de buena calidad, la concentración de dihidroartemisinina de estas soluciones deberán corresponder a 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 los microcapilares suministrados 2 microlitros (μ l) de la solución de ensayo y del estándar, como se indica en la fotografía.

Hasta cinco puntos se pueden aplicar sobre una placa. Compruébese la uniformidad de los puntos utilizando luz ultravioleta de 254 nm. Aún si la dihidroartemisinina por sí misma es invisible se observarán los rastros de algunos excipientes u otros agentes activos que facilitarán la verificación. Todos los puntos deberán tener forma circular y ser aplicados equidistantes sobre la línea de origen. Aunque las intensidades puedan diferir, los diámetros nunca deben hacerlo. Las diferencias de intensidad se deben a la cantidad de excipientes residuales contenidos en las tabletas o cápsulas o a la diferente concentración de agentes activos en las soluciones de muestra. Una diferencia en el tamaño de los diámetros es resultado de un deficiente procedimiento de aplicación. Por lo tanto, se deberá repetir el procedimiento hasta que el diámetro de los puntos sea homogéneo.

IX. REVELADO DE LA PLACA CROMATOGRÁFICA

Se pipetea 16 ml de acetato de etilo, 4 ml de metanol y 3 ml de solución concentrada de amoníaco al frasco a utilizarse como cámara de revelado. Se tapa la cámara y se mezcla muy bien. Se recubre la pared de la cámara con papel filtro y se espera por unos 15 minutos para asegurar la saturación de la cámara con el vapor del solvente. Cuidadosamente se coloca la placa CCF cargada en el frasco. Se cierra el frasco y se revela la placa cromatográfica hasta que el frente del solvente haya cubierto aproximadamente las tres cuartas partes de la longitud de la placa, siendo el tiempo requerido para el revelado de unos 15 minutos. Se retira la placa de la cámara, se marca la línea del frente del solvente y se permite la evaporación del excedente de solvente, utilizando una plancha caliente de ser necesario.

X. DETECCIÓN DE LOS AGENTES ACTIVOS

Al trabajar con éste tipo de medicamentos de combinaciones de dosis fijas, es mejor verificar la presencia de piperacuina fosfato antes que la de dihidroartemisinina, para lo cual se expone la placa CCF seca primero a la luz ultravioleta de 254 nm utilizando la lámpara a pilas suministrada para tal efecto.

Una vez se haya establecido la presencia o ausencia de la piperacuina puede exponerse la placa CCF al manchado con ácido sulfúrico para detectar la presencia de dihidroartemisinina mediante el siguiente procedimiento: se llena el vaso de precipitados plástico de 250 ml de capacidad con 190 ml de metanol, seguidos de 10 ml de solución concentrada de ácido sulfúrico y se mezcla suavemente. Se deja reposar la mezcla para que enfríe. Utilizando una pinza se sumerge la placa CCF de cabeza en la solución de manchado, retirándola inmediatamente. Se deja escurrir el exceso de líquido sobre papel absorbente; luego se seca muy bien el reverso de la placa y se permite que la placa seque por completo colocándola sobre la plancha caliente suministrada con el equipo. Conforme se va calentando, los puntos de dihidroartemisinina se van haciendo gradualmente visibles a la luz del día. Éste método de detección se utiliza tanto para la identificación de la dihidroartemisinina como para su cuantificación.

Habiendo realizado el manchado con ácido sulfúrico, es posible detectar la dihidroartemisinina a la vez que la piperacuina, sometiendo la placa a luz ultravioleta de 366 nm en un cuarto oscuro.

XI. PLACA CROMATOGRÁFICA VISTA A LA LUZ DEL DÍA Y BAJO LUZ ULTRAVIOLETA DE 366 NM TRAS EL MANCHADO CON ÁCIDO SULFÚRICO

Recorrido No.1:

Estándar superior de trabajo representando 100% de contenido de dihidroartemisinina

Recorrido No. 2:

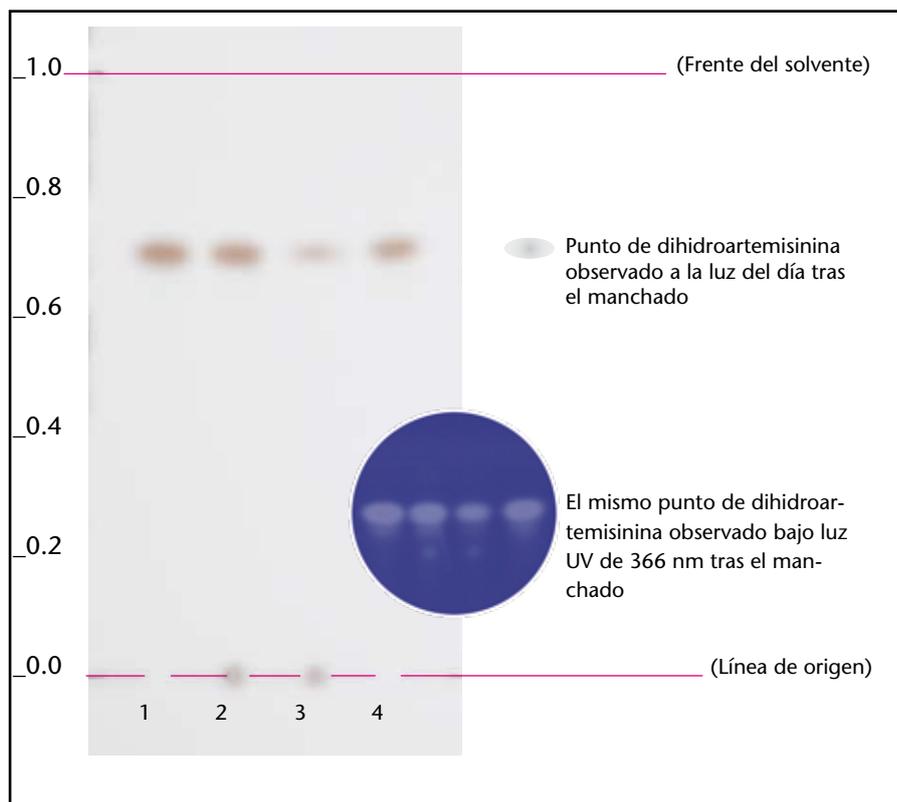
Fármaco de buena calidad con contenido aceptable de agente activo

Recorrido No. 3:

Fármaco de calidad deficiente con contenido inaceptable de agente activo

Recorrido No. 4:

Estándar inferior de trabajo representando 80% de contenido de dihidroartemisinina



XII. OBSERVACIONES HECHAS A 254 NM ANTES DEL MANCHADO

La dihidroartemisinina misma se mantiene invisible y no deben detectarse otros puntos, a no ser que el medicamento analizado venga en forma de combinación de dosis fijas con contenido de piperacuina fosfato. En tal caso, se hará visible un punto representando la piperacuina a una distancia de recorrido de aprox. 0.54. La presencia de tenues puntos se debe a la baja solubilidad de la piperacuina fosfato en el metanol utilizado para extraer la muestra. La presencia de otro tipo de puntos generados por la solución de ensayo indica la existencia de otros agentes activos.

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

Un punto de color marrón a una distancia de recorrido de aprox. 0.69 indica la presencia de dihidroartemisinina en la solución de ensayo. No deben aparecer más puntos, ni siquiera si la dihidroartemisinina viene combinada con piperacuina fosfato. La aparición de puntos de color intenso generados por la solución de ensayo indica la presencia de otros agentes activos o una degradación de la dihidroartemisinina, siendo este el caso más probable si van asociados a un punto principal más pequeño. Los agentes auxiliares incorporados a las diferentes formulaciones de las tabletas o cápsulas pueden generar tenues puntos adicionales a lo largo del recorrido o cerca/sobre la línea de origen.

XIV. OBSERVACIONES HECHAS A 366 NM TRAS EL MANCHADO CON ÁCIDO SULFÚRICO

Ambos puntos, el de la dihidroartemisinina y el de la piperacuina observados previamente paso a paso mediante diferentes métodos de detección se van tornando visibles simultáneamente. El punto correspondiente a la dihidroartemisinina presenta una fluorescencia color crema pálida, el punto correspondiente a la piperacuina una fluorescencia ligeramente azulada.

XV. RESULTADOS & MEDIDAS A TOMAR

El punto de dihidroartemisinina en el cromatograma obtenido con la solución de ensayo debe corresponder en términos de color, tamaño, intensidad, forma y distancia de recorrido al obtenido con el cromatograma de las soluciones estándar alta y baja. Éste resultado debe obtenerse con cada método de detección. Si ese no es el caso, se debe repetir el ensayo desde el principio con una segunda muestra. El lote se rechaza, si el contenido de fármaco no puede verificarse al tercer ensayo. Para la determinación del contenido exacto de agente activo, 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. Con el fin de documentar los ensayos, fotografíe todos los resultados con una cámara digital con la luz de flash desactivada.

Auténtico o falsificado?



Luchando contra los medicamentos falsificados · Protegiendo la vida humana



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

Global Pharma Health Fund
Otto-Meißner-Straße 1
60314 Frankfurt, Alemania
Tel.: 0049-69-962387-600
info@gphf.org · www.gphf.org



USAID
FROM THE AMERICAN PEOPLE



PROMOTING THE QUALITY OF MEDICINES

U.S. Agency for

International Development

Office of Health, Infectious Diseases
and Nutrition, Ronald Reagan Bldg.,
1300 Pennsylvania Avenue NW
Washington, DC 20523-3700, USA
Tel.: 001-202-712-4789
Fax: 001-202-216-3702
aboni@usaid.gov · www.usaid.gov

United States Pharmacopeia

Promoting the Quality
of Medicines program
12601 Twinbrook Parkway
Rockville, MD 20852-1790, USA
Tel.: 001-301-816-8162
Fax: 001-301-816-8374
pqm@usp.org · www.pqmusp.org