

Manual

Para usuarios del GPHF-Minilab®

Suplemento 2014

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 2014 AL VOLUMEN II DE ENSAYOS CON CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Autores

Richard W. O. Jähnke, Kornelia Dwornik y Kai Fischer

* * *

Revisado por

Adrian Bajoras, Daniel Bempong, Sanford Bradby, Kennedy Chibwe, Yanga Dijiba, Latifa El Hadri, Mustapha Hajjou, Lukas Roth, Patrick Lukulay y Souly Phanouvong

* * *

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 programme - 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 Internacional de Policía Criminal (Interpol) 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 minilaboratorio para la rápida verificación de la calidad y detección de medicamentos falsificados.

Desde hace largo tiempo, 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 600 minilaboratorios han sido suministrados en más de 80 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 agentes activos 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. Todas las entidades y organizaciones de asistencia internacionales interesadas en mejorar la seguridad y la salud de los pacientes en los países en vía de desarrollo están invitadas 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 al Volumen II, Capítulo 6</i>	
<i>Antibióticos inyectables contra la TB y la sepsis en recién nacidos. Complemento al listado de antidiabéticos esenciales.</i>	
6.73 Amikacina sulfato, como solución y polvo inyectables.....	4
6.74 Aminosalicilato (PAS) sódico y base libre, como gránulos de liberación modificada	8
6.75 Capreomicina sulfato inyectable en polvo	12
6.76 Cefazolina sódica inyectable en polvo	16
6.77 Ceftriaxona sódica inyectable en polvo	20
6.78 Estreptomicina sulfato inyectable en polvo.....	24
6.79 Metformina clorhidrato, en forma de tabletas combinadas o no con glibenclamida	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

6.73 Amikacina sulfato, como solución y polvo inyectables

Identificación primaria por medio de la inspección física

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. La amikacina de uso farmacéutico consiste de amikacina disulfato anhidro y se presenta como

solución o polvo inyectables. El polvo es suministrado en viales usualmente con contenido de 100, 250, 500 o 1000 mg de amikacina base libre. Las soluciones inyectables se suministran en viales o ampollas habitualmente con contenido de 50 ó 250 mg de amikacina base libre por ml.

II. 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

Los polvos inyectables de amikacina se disuelven y las soluciones inyectables se diluyen con agua y la presencia y contenido de agente activo se verificará mediante cromatografía en capa fina (CCF) con referencia a un estándar adecuado.

II. EQUIPOS Y REACTIVOS

- | | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1) Balanza de bolsillo | 14) Plancha |
| 2) Papel aluminio | 15) Papel de filtro |
| 3) Espátula | 16) Tijeras |
| 4) Embudo | 17) Pinza |
| 5) Cinta adhesiva | 18) Luz ultravioleta de 254 nm |
| 6) Rotulador | 19) Cámara de manchado con yodo |
| 7) Lápiz y regla | 20) Cámara de sumersión (frasco plástico de 250 ml) |
| 8) Viales de 10 ml | 21) Ninhidrina |
| 9) Juego de pipetas graduadas (1 a 25 ml) | 22) Metanol |
| 10) Juego de frascos de vidrio de laboratorio (25 a 100 ml) | 23) Agua |
| 11) Placas Merck CCF de aluminio con recubrimiento de gel de sílice 60 F ₂₅₄ , tamaño 5 x 10 cm | 24) Ácido acético puro |
| 12) Microcapilares de vidrio (2-µl de capacidad) | 25) Amoníaco (solución al 25%) |
| 13) Cámara de revelado para CCF (frasco de 500 ml) | 26) Ácido sulfúrico (solución al 96%) |
| | 27) Estándar de referencia, por ejemplo amikacina disulfato anhidro como polvo puro de procedencia comercial |

III. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE DEL ESTÁNDAR

La preparación de la solución madre del estándar requiere de amikacina disulfato anhidro como polvo puro de procedencia comercial o de una muestra de buena calidad para ser utilizada como referencia. Se coloca un trozo de papel aluminio en la balanza de bolsillo suministrada, se gradúa la balanza a cero y utilizando una espátula, se colocan sobre el papel aprox. 0.30 g de amikacina sulfato. Se desocupa cuidadosamente el contenido del papel aluminio en un frasco de vidrio de laboratorio de 100 ml y se enjuagan todos los residuos sólidos con 60 ml de agua, utilizando una pipeta graduada adecuada. Se anota cada vez el resultado exacto del pesaje del estándar de referencia y se ajusta la cantidad apropiada de agua para la disolución utilizando, por ejemplo, 58 ml de agua para 0.29 g o 64 ml de agua cuando la cantidad el estándar de referencia extraído de la provisión corresponde a 0.32 g. Se cierra el frasco y se agita hasta que se hayan disuelto todos los sólidos. La solución obtenida debe contener un total de 5 mg de amikacina disulfato o el equivalente de 3.75 mg base libre por ml y se rotula 'Solución madre del estándar de amikacina'. La solución se prepara fresca para cada ensayo.

Importante: La balanza de bolsillo suministrada no registra cantidades inferiores a 0.25 g con

exactitud. El valor estándar de desviación de +/- 2% se considera demasiado alto. Al medir cantidades superiores a 0.25 g, la desviación estándar se reduce a aprox. 1%. Además, la balanza no registra cambios cuando se añaden/retiran tan solo unos pocos miligramos del producto al tratar de alcanzar el peso exacto de 0.30 mg paso a paso, por lo cual cada vez debe levantarse y volverse a colocar la hoja de papel aluminio sobre la balanza evitando la inercia dinámica para obtener lecturas correctas.

IV. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN ESTÁNDAR DE TRABAJO AL 100% (LÍMITE DE CONCENTRACIÓN SUPERIOR)

La solución madre del estándar no requiere de dilución posterior, habiendo alcanzado la concentración superior de trabajo de 3.75 mg de amikacina base libre por ml. Para facilitar el manejo, se transvasa un poco del líquido a un vial de 10 ml y se rotula '*Solución estándar de trabajo de amikacina al 100%*'.

Ésta solución estándar de trabajo representa un fármaco de buena calidad con un contenido de 100% de amikacina.

V. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN ESTÁNDAR DE TRABAJO AL 80% (LÍMITE DE CONCENTRACIÓN INFERIOR)

Se pipetea 4 ml de la solución madre del estándar a un vial de 10 ml y se añade 1 ml de agua. Se tapa y agita el vial. La solución obtenida debe contener un total de 3 mg de amikacina por ml y se rotula '*Solución estándar de trabajo de amikacina al 80%*'.

Ésta solución estándar de trabajo representa un producto farmacológico de baja calidad, con contenido de amikacina 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.

VI. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE DE LA MUESTRA DE UN PRODUCTO QUE DICE CONTENER 100 MG DE AMIKACINA POR VIAL

Se toma un vial sellado de las muestras recogidas durante el trabajo de campo. Se abre el vial y se transfiere la totalidad del polvo a un frasco de laboratorio de 40 ml dotado de un embudo. Para el enjuague y disolución se añaden exactamente 8.9 ml de agua con una pipeta graduada. Se enjuagan el vial y la tapa de caucho tres veces directamente sobre el embudo, asegurándose de dejar la menor cantidad posible del agua de enjuague en el vial. Finalmente se agrega el agua restante al frasco de laboratorio, se tapa y agita la solución hasta haber disuelto la totalidad de los sólidos.

250 MG DE AMIKACINA POR VIAL

Se abre el vial y se transfiere la totalidad del polvo a un frasco de laboratorio de 40 ml dotado de un embudo. Para el enjuague y disolución se añaden exactamente 22.2 ml de agua con una pipeta graduada, siguiendo el procedimiento indicado anteriormente para 100 mg de amikacina.

500 MG DE AMIKACINA POR VIAL

Se abre el vial y se transfiere la totalidad del polvo a un frasco de laboratorio de 100 ml dotado de un embudo. Para el enjuague y disolución se añaden exactamente 44.4 ml de agua con una pipeta graduada, siguiendo el procedimiento indicado anteriormente para 100 mg de amikacina.

1000 MG DE AMIKACINA POR VIAL

Se abre el vial y se transfiere la totalidad del polvo a un frasco de laboratorio de 100 ml dotado de un embudo. Para el enjuague y disolución se añaden exactamente 88.9 ml de agua con una pipeta graduada, siguiendo el procedimiento indicado anteriormente para 100 mg de amikacina.

100 MG DE AMIKACINA POR 2 ML DE SOLUCIÓN INYECTABLE

Se abren el vial o la ampollita sellados y se transfiere exactamente 1 ml de la solución de la muestra a un vial de 10 ml usando una pipeta graduada. Se diluye la solución con 3.4 ml de agua y se agita.

500 MG DE AMIKACINA POR 2 ML DE SOLUCIÓN INYECTABLE

Se abren el vial o la ampollita sellados y se transfiere exactamente 1 ml de la solución de la muestra a un vial de 25 ml usando una pipeta graduada. Se diluye la solución con 21.2 ml de agua y se agita.

Todas las soluciones madre producidas deberán contener finalmente 11.25 mg de amikacina por ml y rotularse '*Solución madre de la muestra de amikacina*'. Las soluciones se preparan frescas para cada ensayo. Se continúa el trabajo con los líquidos claros.

VII. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE TRABAJO DE LA MUESTRA

Se pipetea 1 ml de la solución madre de la muestra a una vial de 10 ml y se añaden 2 ml de agua. Se cierra, agita y rotula el vial como '*Solución de trabajo de la muestra de amikacina*'.

La concentración de amikacina que se espera obtener de esta solución de trabajo de la muestra es de 3.75 mg por ml y deberá corresponder a la concentración 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 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. Aunque la amikacina por sí misma permanezca invisible, los excipientes del medicamento se harán visibles para facilitar 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 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.

Debe tenerse en cuenta que el llenado de los microcapilares puede requerir de más tiempo al trabajar con soluciones acuosas de muestra. Dado que trazas de agua pueden generar puntos irregulares y "colas" en los puntos, debe secarse por completo el solvente de extracción con la plancha (a temperatura mínima) suministrada antes de revelar la placa cromatográfica.

IX. REVELADO DE LA PLACA CROMATOGRÁFICA

Se pipetea 10 ml de metanol y 10 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 aprox. las tres cuartas partes de la longitud de la placa, siendo el tiempo requerido para el revelado de unos 30 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

Se seca por completo el solvente residual y se expone la placa cromatográfica a los vapores de yodo por aprox. 1 minuto. Se retira la placa de la cámara de yodo y se examina a la luz del día.

Adicionalmente se puede utilizar la placa yodada para el manchado con ninhidrina. Para la solución de manchado de ninhidrina se disuelven en el vaso plástico suministrado 3 g de ninhidrina (aprox. 10 espátulas colmadas) en una mezcla de 150 ml de metanol y 30 ml de ácido acético puro. Utilizando las pinzas se sumerge la placa en la solución, retirándola inmediatamente. Se deja escurrir el excedente de solución de la placa sobre papel absorbente y se limpia el dorso de la misma también con papel. Se seca el resto de la solución de manchado sobre la plancha caliente suministrada. Pasado un minuto gradualmente se irán haciendo visibles a la luz del día los puntos de amikacina. Éste método de detección se utiliza tanto para la identificación como para la cuantificación de la amikacina. El procedimiento ilustrado del manchado con ninhidrina puede consultarse en la página 26 del manual principal 2008. Eventuales manchas violáceas por contaminación accidental de la piel son inocuas para la salud y desaparecerán al cabo de uno o dos días.

Para verificar todavía más la identidad y contenido de amikacina, se puede exponer una segunda placa CCF al manchado con ácido sulfúrico mediante el siguiente procedimiento: Se llena el vaso 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, procediendo a continuación como se ha hecho durante el manchado con ninhidrina. Los puntos deberán aparecer al cabo de unos dos minutos.

XI. PLACA CROMATOGRÁFICA VISTA A LA LUZ DEL DÍA TRAS EL MANCHADO CON YODO

Recorrido No. 1:

Estándar superior de trabajo representando 100% de contenido de amikacina

Recorrido No. 2:

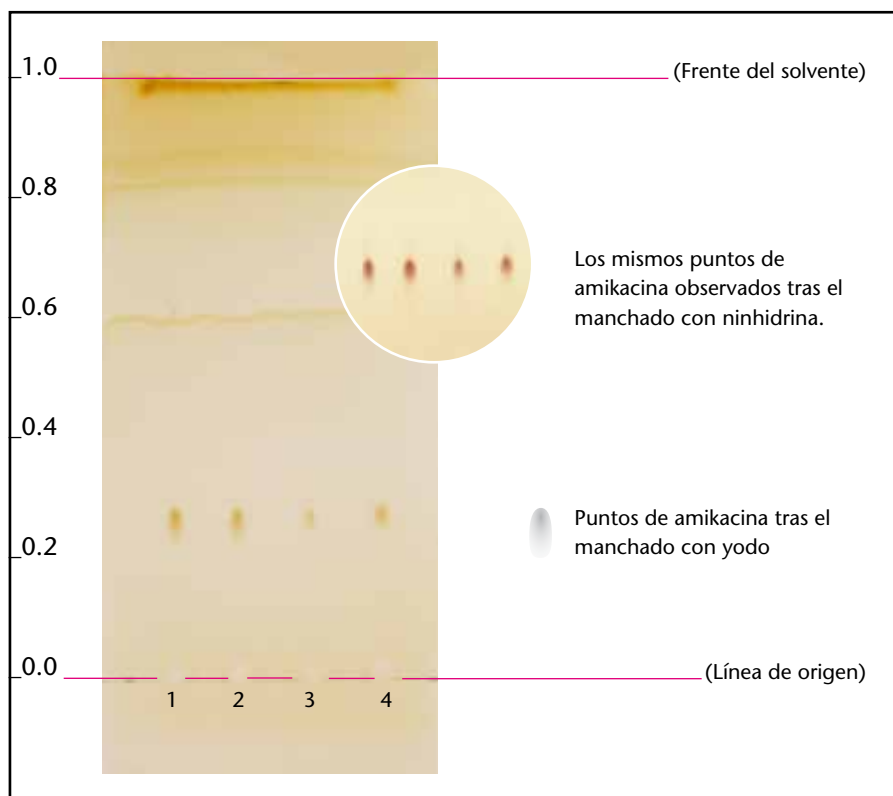
Fármaco de buena calidad con contenido aceptable de amikacina

Recorrido No. 3:

Fármaco de calidad deficiente con contenido inaceptable de amikacina

Recorrido No. 4:

Estándar inferior de trabajo representando 80% de contenido de amikacina



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

Un punto de color naranja-marrón a una distancia de recorrido de aprox. 0.26 indica la presencia de amikacina en la solución de ensayo. Los puntos desaparecerán rápidamente. Se continúa observando la placa conforme se va evaporando el yodo. Los puntos representando los productos de baja calidad irán desapareciendo gradualmente primero, seguidos por los puntos de referencia que representan un contenido de agente activo del 80% y 100%, respectivamente.

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

Al exponer la placa yodada a la ninhidrina y al calor, todos los puntos de amikacina observados durante el manchado con yodo tomarán un color rojizo-marrón, inclusive púrpura intenso, si se utiliza una placa recién desarrollada sin exposición previa al yodo. De acuerdo con el procedimiento de manchado con yodo, los puntos adicionales de color intenso generados por la solución de ensayo podrían indicar la presencia de otros agentes activos o una degradación de la amikacina siendo éste último caso el más probable, si van asociados a un punto principal de menor tamaño. Un punto principal de menor tamaño de la solución de la muestra puede indicar así mismo un bajo contenido de amikacina debido a baja concentración o volumen de llenado insuficiente. De no aparecer punto alguno, la muestra no contiene agente activo.

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

Alternativamente, al exponer la placa yodada al calor y al ácido sulfúrico en vez de a la ninhidrina, todos los puntos de amikacina observados previamente durante el manchado con yodo tomarán un color gris, hasta negro. Para la lectura e interpretación de los resultados se toman como referencia los procedimientos de manchado con yodo y ninhidrina descritos anteriormente.

XV. RESULTADOS & MEDIDAS A TOMAR

El punto de amikacina 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 confirmación de los resultados, 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



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

Global Pharma Health Fund
Frankfurt, Alemania
Tel. +49-69-46939-662
Fax +49-69-46939-852
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. +1-202-712-4789
Fax +1-202-216-3702
aboni@usaid.gov · www.usaid.gov

United States Pharmacopeia
Promoting the Quality
of Medicines program
12601 Twinbrook Parkway
Rockville, MD 20852-1790, USA
Tel. +1-301-816-8162
Fax +1-301-816-8374
pqm@usp.org · www.pqmusp.org