

# Manual

Para usuarios de GPHF-Minilab™

**Ampliación 2023  
sobre más fármacos para  
tratar trastornos  
cardiovasculares**

## Ensayos Físicos y Cromatografía en Capa Fina



Richard W. O. Jähnke y Kornelia Dwornik



Una iniciativa sin ánimo de lucro  
apoyada por Merck KGaA,  
Darmstadt, Alemania



El programa de Promoción de la Calidad de Medicamentos "Promoting the Quality of Medicines (PQM)", financiado por la Agencia de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional "U.S. Agency for International Development (USAID)", está implementado por la Convención Farmacopea Estadounidense "U.S. Pharmacopeial Convention (USP)".

Capítulo	Página
Salud y seguridad.....	3
Nuevos protocolos de ensayo del Minilab.....	4
7.108 Apixabán.....	4
7.109 Candesartán cilexetilo <i>incl. combinaciones con hidroclorotiazida o amlodipino</i> .....	8
7.110 Clopidogrel <i>sulfato/besilato/clorhidrato con y sin AAS, incl. la ticlopidina afín</i> .....	12
7.111 Hidralazina <i>clorhidrato en formulaciones orales y parenterales</i> .....	16
7.112 Rivaroxabán .....	20
7.113 Warfarina <i>sódica incl. fenprocumon afín</i> .....	24

## Nota importante

Tanto los productos químicos contenidos en el GPHF-Minilab™ así como los fármacos que van a ser analizados contienen sustancias peligrosas. Por este motivo, las personas que trabajan directamente con el Minilab y las personas que los asisten deben seguir en detalle las instrucciones dadas en este manual y en el manual principal para evitar riesgos potenciales en la salud como resultado del contacto accidental con estas sustancias o fármacos respectivamente.

Se debe tener cuidado con el manejo de productos químicos y fármacos para evitar la producción excesiva de polvos y vapores en la atmósfera. Un extractor de aire debe ser utilizado en los momentos de mayor producción de gases o vapores. En caso de no tener a disposición un extractor, este puede ser reemplazado por una ventilación simple pero suficiente.

Síntomas tales como somnolencia, problemas respiratorios, náuseas o dermatitis deben ser reportados con prontitud a los supervisores, especialmente, luego de una

pérdida accidental al derramar grandes cantidades de disolventes orgánicos.

Si al haber derramado o salpicado líquidos, se afectan la piel o los ojos, se deben lavar con abundante agua, reportar al supervisor y si es necesario a los médicos locales para recibir la atención apropiada.

Se deben usar trajes y lentes de protección cuando se trabaje con soluciones agresivas, por ejemplo, ácidos fuertes o soluciones alcalinas.



*Utilice ropa de protección, p.ej. un mandil/delantal y gafas de seguridad, antes de comenzar cualquier trabajo de comprobación de la calidad de los medicamentos. Lávese bien las manos y la cara después del trabajo.*

## 7.108 Apixabán

### Primer cribado de las deficiencias del producto mediante ensayos físicos

#### I. ENSAYOS FÍSICOS

Durante la inspección visual, busque las deficiencias en el etiquetado, el envasado y las formas de dosificación, tal como se indica en los capítulos introductorios del manual principal, e informe de los resultados. Considere la posibilidad de hacer fotografías, por ejemplo, con la cámara de un teléfono inteligente. Cada comprimido suele contener 2.5 ó 5 mg de apixabán. Verifique el peso total de los comprimidos o el peso de

llenado de las cápsulas utilizando la balanza electrónica de bolsillo suministrada. Todas las formulaciones de comprimidos y cápsulas de liberación rápida de apixabán también deben pasar el ensayo de desintegración descrita al principio del manual principal. Deberán desintegrarse en agua a 37 °C en menos de 30 minutos. Si un fármaco de liberación rápida no pasa el ensayo, es una deficiencia importante.

#### II. 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 o almacenados en malas condiciones, deberán ser sometidos a un ensayo de cromatografía en capa fina.

### Verificación de la identidad y la cantidad mediante cromatografía en capa fina

#### I. PRINCIPIO

El apixabán se extrae de los comprimidos o cápsulas con un volumen conocido de solución concentrada de ácido acético y luego se comprueba su identidad y contenido mediante cromatografía en capa fina (TLC) frente a un agente de referencia adecuado.

#### II. EQUIPOS Y REACTIVOS

- 1) Mano de mortero
- 2) Papel aluminio
- 3) Embudo
- 4) Espátula
- 5) Cinta adhesiva
- 6) Rotulador
- 7) Lápiz y regla
- 8) Viales de 10 ml
- 9) Juego de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
- 10) Juego de frascos de vidrio de laboratorio (25 a 100 ml)
- 11) Placas Merck CCF de aluminio con recubrimiento de gel de sílice 60 F<sub>254</sub> tamaño 5 x 10 cm
- 12) Microcapilares de vidrio de 2 µl de capacidad
- 13) Cuba cromatográfica (frasco de 500 ml)
- 14) Plancha de calefacción
- 15) Papel de filtro
- 16) Tijeras
- 17) Pinza
- 18) Luz ultravioleta de 254 nm
- 19) Metanol
- 20) Acetato de etilo
- 21) Solución de ácido acético al 96%
- 22) Agente de referencia, p. ej. comprimidos de apixabán de 5 mg

#### III. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE DEL ESTÁNDAR

La preparación de la solución madre del estándar requiere de un producto auténtico usado como agente de referencia, por ejemplo, comprimidos con contenido de 5 mg de apixabán. Se envuelve el comprimido usada como referencia en papel aluminio y se reduce a polvo fino usando la mano de mortero. Vaciar cuidadosamente el contenido del papel aluminio en un frasco de vidrio de laboratorio de 25 ml y enjuagar todas las cantidades de polvo restantes con 10 ml de solución de ácido acético al 96% usando una pipeta graduada. Cerrar el frasco de laboratorio y agitar durante unos tres minutos. Filtrar la suspensión obtenida a

través del papel de filtro suministrado y recoger el filtrado en un vial de 10 ml. Se tardan unos 5 minutos en recoger aproximadamente 6 ml de un filtrado turbio. La solución turbia obtenida debe contener 0.5 mg de apixabán total por ml y etiquetarse como '*Solución madre del estándar de apixabán*'. Preparar una nueva solución para cada ensayo. Seguir trabajando con el líquido turbio obtenido.

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

La solución madre del estándar no requiere de dilución posterior, ya presenta la concentración final de trabajo de 0.5 mg de apixabán total por ml.

Esta solución estándar de trabajo representa un fármaco de buena calidad con un contenido de 100% de apixabán.

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

Pipetear 4 ml de la solución madre del estándar en un vial de 10 ml y añadir 1 ml de solución de ácido acético al 96% utilizando pipetas graduadas adecuadas. Cerrar y agitar el vial. La solución obtenida debe contener 0.4 mg de apixabán total por ml y etiquetarse como '*Solución estándar de trabajo de apixabán al 80%*'.

Esta solución estándar de trabajo representa un producto farmacológico de baja calidad y bajo contenido de apixabán de solo 80% de lo indicado en la etiqueta del producto. En la investigación actual, este nivel de apixabán representa el límite inferior aceptable para un producto dado. Los límites de la farmacopea no se aplican en nuestro contexto.

#### VI. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE DE LA MUESTRA A PARTIR DE UN PRODUCTO QUE DICE CONTENER 2.5 MG DE APIXABÁN POR UNIDAD

Tomar dos comprimidos enteros o cápsulas de un medicamento adecuado muestreado en el campo. Como es habitual, los comprimidos se envuelven en papel de aluminio y se trituran hasta obtener un polvo fino. Transfiera todo el polvo obtenido a un frasco de vidrio de laboratorio de 25 ml. El polvo obtenido de las cápsulas de muestra debe colocarse directamente en el frasco añadiendo en último lugar el tapón vacío y las carcacas del cuerpo. Para la extracción, añadir 10 ml de solución de ácido acético al 96% utilizando una pipeta graduada adecuada. Cerrar el frasco y agitar durante unos tres minutos. Si el polvo forma una especie de suspensión estable, filtrar el líquido a través del papel de filtro suministrado y recoger el filtrado en un vial de 10 ml. Después de unos 5 minutos, se recogen aproximadamente 6 ml de una solución madre turbia. Esta solución dista mucho de ser perfecta, pero puede utilizarse ya para el moteado. Si el polvo sólo forma una solución ligeramente turbia o incluso transparente, no filtre y deje reposar la solución otros cinco minutos hasta que los residuos no disueltos se asienten bajo el líquido sobrenadante.

**Nota:** Si no se requiere filtración, un comprimido o cápsula de muestra sería suficiente para producir la solución madre de muestra utilizando sólo 5 ml de solución de ácido acético al 96% para la extracción.

#### 5 MG DE APIXABÁN POR UNIDAD

Colocar el polvo obtenido de un comprimido o cápsula de muestra entera un frasco de vidrio de laboratorio de 25 ml, añadir 10 ml de solución de ácido acético al 96% con una pipeta graduada adecuada y extraer el apixabán. Continuar trabajando como se ha descrito anteriormente. Puede ser necesaria la filtración.

Todas las soluciones madre de muestra producidas deben contener finalmente 0.5 mg de apixabán total por ml y ser etiquetadas como '*Solución madre de la muestra de apixabán*'. Estas soluciones se preparan frescas para cada ensayo. Siga trabajando con los líquidos sobrenadantes claros o turbios.

## VII. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE TRABAJO DE LA MUESTRA

Las soluciones madre de la muestra no requieren dilución adicional, puesto que ya representan la concentración final de 0.5 mg de apixabán por ml. Si han sido preparadas a partir de fármacos de buena calidad, las concentraciones de apixabán de estas soluciones deberán corresponder a la concentración de apixabán de la solución estándar de trabajo superior elaborada arriba.

## VIII. APLICACIÓN DE LAS MUESTRAS

Marque una línea de origen paralela a unos 1.5 cm del borde inferior de la placa cromatográfica y aplique 2 µl de cada solución de ensayo y del estándar como se muestra en la imagen de al lado, utilizando las pipetas microcapilares suministradas.

Pueden colocarse hasta cinco manchas en una placa. Comprobar la uniformidad de todas las manchas utilizando luz UV de 254 nm. Todas las manchas deben tener forma circular y estar igualmente espaciadas a lo largo de la línea de origen. Aunque sus intensidades pueden diferir, sus diámetros nunca deberían hacerlo. Las diferentes intensidades se deben a cantidades residuales de excipientes o a diferentes activos y concentraciones en las soluciones de la muestra. Una diferencia en el tamaño de la mancha, sin embargo, se relaciona con una mala mancha. Repita este paso si no se consigue una siembra homogénea de las muestras la primera vez.

Seque suavemente las manchas. Para ello, mantenga la cromatoplaque con la pinza suministrada en la corriente de aire caliente directamente encima de la placa calefactora durante aproximadamente un minuto. Agite constantemente la placa de CCF y, cada vez que la cromatoplaque se desplace hacia abajo, deje que su parte inferior toque la superficie de la placa calefactora durante fracciones de segundo.

## IX. DESARROLLO DEL CROMATOGRAMA

Utilizando pipetas graduadas adecuadas, añada 15 ml de acetato de etilo, 5 ml de metanol y 0.5 ml de solución de ácido acético al 96% al frasco que se utilizará como cuba cromatográfica. Cerrar la cuba y mezclar bien. Forrar la pared de la cuba con papel de filtro y esperar unos 15 minutos, asegurando así la saturación de la cuba con vapor de disolvente. Colocar con cuidado la placa de CCF cargada en el frasco. Cerrar el frasco y desarrollar la placa hasta que el frente del disolvente se haya desplazado unas tres cuartas partes de la longitud de la placa, siendo el tiempo de desarrollo de unos 15 minutos. Retire la placa CCF de la cuba, marque el frente de disolvente y deje que el exceso de disolvente se evapore por secado suave. Para ello, mantenga la cromatoplaque con la pinza suministrada en la corriente de aire caliente directamente encima de la placa calefactora durante unos dos minutos. Agitar constantemente la placa de CCF y, cada vez que la cromatoplaque se desplace hacia abajo, dejar que su parte inferior toque la superficie de la placa calefactora durante fracciones de segundo.

## X. DETECCIÓN DE LOS AGENTES ACTIVOS

Después de secar todos los residuos de disolvente, ver la placa de cromatografía bajo luz ultravioleta a 254 nm con la lámpara accionada por batería suministrada. Utilice este método de detección de ambos, identificación y cuantificación de apixabán.



PLACA CROMATOGRÁFICA VISTA BAJO  
LUZ ULTRAVIOLETA DE 254 NM

Recorrido No. 1:

Estándar superior de trabajo representando  
100% de contenido de apixabán

Recorrido No. 2:

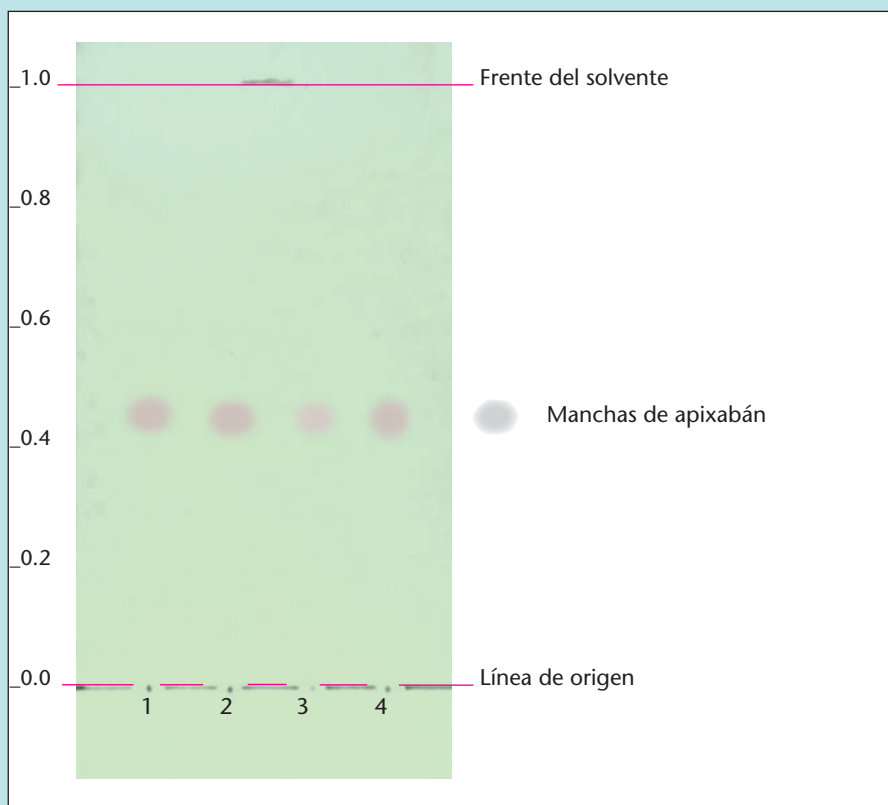
Fármaco de buena calidad con contenido  
aceptable en apixabán

Recorrido No. 3:

Fármaco de calidad deficiente con conteni-  
do inaceptable bajo en apixabán

Recorrido No. 4:

Estándar inferior de trabajo representando  
80% de contenido de apixabán



#### XI. OBSERVACIONES HECHAS A 254 NM

Una mancha oscura a una distancia de recorrido de aproximadamente 0.45 indica la presencia de apixabán en la solución de ensayo. Otras manchas fuertes generadas por la solución de ensayo apuntarían a otros fármacos o a la degradación del apixabán, siendo este último caso más probable cuando se asocia a una mancha principal más pequeña. Una mancha principal más pequeña de la solución de ensayo también puede indicar un contenido pobre de apixabán y una mancha ausente puede indicar una ausencia total de apixabán. Los agentes activos relacionados, por ejemplo el rivaroxabán, mostrarían un factor de retención relativo de aproximadamente 0.53. Los excipientes presentes en varios productos acabados pueden causar manchas más débiles que migran hasta el frente del disolvente o permanecen cerca o en la línea de origen. La lactosa permanece invisible, pero ensayos de tinción adicionales con ácido sulfúrico y calor indican que aparecería en torno a 0.10 si estuviera presente en la formulación.

#### XII. RESULTADOS Y MEDIDAS A TOMAR

La mancha de apixabán 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 el ensayo desde el principio con una segunda muestra. El lote es rechazado, si el contenido del agente activo no puede verificarse en el tercer ensayo. 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. A efectos de documentación, tome fotos de todas las lecturas con una cámara digital o un smartphone.

## Primer cribado de las deficiencias del producto mediante ensayos físicos

### I. ENSAYOS FÍSICOS

Durante la inspección visual, busque las deficiencias en el etiquetado, el envasado y las formas de dosificación, tal como se indica en los capítulos introductorios del manual principal, e informe de los resultados. Considere la posibilidad de hacer fotografías, por ejemplo, con la cámara de un teléfono inteligente. Cada comprimido suele contener 4, 8, 16 ó 32 mg de éster de candesartán cilexetilo. Los comprimidos pueden combinarse con 12.5 o

25 mg de hidroclorotiazida o con 5 o 10 mg de amlodipino. Verifique el peso total de los comprimidos o el peso de llenado de las cápsulas utilizando la balanza electrónica de bolsillo suministrada. Todas las formulaciones de comprimidos y cápsulas de liberación rápida de candesartán también deben pasar el ensayo de desintegración descrita al principio del manual principal. Deberán desintegrarse en agua a 37 °C en menos de 30 minutos. Si un fármaco de liberación rápida no pasa el ensayo, es una deficiencia importante.

### II. 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 o almacenados en malas condiciones, deberán ser sometidos a un ensayo de cromatografía en capa fina.

## Verificación de la identidad y la cantidad mediante cromatografía en capa fina

### I. PRINCIPIO

Combinado o no con otros medicamentos cardíacos, el éster de candesartán cilexetilo se extrae de los comprimidos o cápsulas con un volumen conocido de acetona y luego se comprueba su identidad y contenido mediante cromatografía en capa fina (CCF) frente a un agente de referencia adecuado. Para las combinaciones de dosis fijas, consulte el protocolo de hidroclorotiazida o amlodipino en el manual principal para realizar ensayos adicionales.

### II. EQUIPOS Y REACTIVOS

- |  |  |
|--|--|
| 1) Mano de mortero   | 15) Papel de filtro  |
| 2) Papel aluminio  | 16) Tijeras  |
| 3) Embudo  | 17) Pinza  |
| 4) Espátula  | 18) Luz ultravioleta de 254 nm   |
| 5) Cinta adhesiva  | 19) Luz ultravioleta de 366 nm   |
| 6) Rotulador   | 20) Metanol  |
| 7) Lápiz y regla   | 21) Acetona  |
| 8) Viales de 10 ml   | 22) Acetato de etilo   |
| 9) Juego de pipetas graduadas (1 a 25 ml)  | 23) Solución de ácido acético al 96%   |
| 10) Juego de frascos de vidrio de laboratorio (25 a 100 ml)  | 24) Agente de referencia, p. ej. comprimidos de candesartán cilexetilo de 8 mg |
| 11) Placas Merck CCF de aluminio con recubrimiento de gel de sílice 60 F <sub>254</sub> tamaño 5 x 10 cm |  |
| 12) Microcapilares de vidrio de 2 µl de capacidad  |  |
| 13) Cuba cromatográfica (frasco de 500 ml)   |  |
| 14) Plancha de calefacción   |  |

### III. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE DEL ESTÁNDAR

La preparación de la solución madre del estándar requiere de un producto auténtico usado como agente de referencia, por ejemplo, comprimidos con contenido de 8 mg de éster de candesartán cilexetilo. Se envuelve el comprimido usada como referencia en papel aluminio y se reduce a polvo fino usando la mano de mortero. Vaciar cuidadosamente el contenido del papel aluminio en un frasco de vidrio de laboratorio de 10 ml y enjuagar todas las cantidades de polvo restantes con 4 ml de acetona usando una pipeta graduada. Cerrar el frasco de laboratorio y agitar durante unos tres minutos hasta que se disuelva 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 2 mg de candesartán cilexetilo total por ml y se debe rotular '*Solución madre del estándar de candesartán*'. Para cada ensayo se preparará una nueva solución. Se continúa trabajando con el líquido claro o turbio obtenido.

#### 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 3 ml de acetona utilizando pipetas graduadas adecuadas. Se tapa y agita bien el vial. La solución obtenida debe contener 0.5 mg de agente activo total por ml y se debe rotular '*Solución estándar de trabajo de candesartán al 100%*'.

Esta solución estándar de trabajo representa un fármaco de buena calidad con un contenido de 100% de éster de candesartán cilexetilo.

#### 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 4 ml de acetona utilizando pipetas graduadas adecuadas. Se tapa y agita bien el vial. La solución obtenida debe contener 0.4 mg de agente activo total por ml y se debe rotular '*Solución estándar de trabajo de candesartán al 80%*'.

Esta solución estándar de trabajo representa un producto farmacológico de baja calidad y bajo contenido de éster de candesartán cilexetilo de solo 80% de lo indicado en la etiqueta del producto. En la investigación actual, este nivel de candesartán cilexetilo representa el límite inferior aceptable para un producto dado. Los límites de la farmacopea no se aplican en nuestro contexto.

#### VI. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE DE LA MUESTRA A PARTIR DE UN PRODUCTO QUE DICE CONTENER 4 MG DE CANDESARTÁN CILEXETILO POR UNIDAD

Tomar un comprimido o cápsula entera de un medicamento adecuado muestreado en el campo. Como es habitual, los comprimidos se envuelven en papel de aluminio y se trituran hasta obtener un polvo fino. Transfiera todo el polvo obtenido a un frasco de vidrio de laboratorio de 10 ml. El polvo obtenido de una cápsula de muestra debe colocarse directamente en el frasco añadiendo en último lugar el tapón vacío y las carcacas del cuerpo. Para la extracción, añada 2 ml de acetona utilizando una pipeta graduada adecuada. A continuación, cerrar el frasco y agitar durante unos tres minutos hasta que se disuelva la mayor parte de los sólidos. Dejar reposar la solución durante otros cinco minutos hasta que los residuos no disueltos se asienten bajo el líquido sobrenadante.

8 MG DE CANDESARTÁN CILEXETILO POR UNIDAD

Colocar el polvo obtenido de un comprimido o cápsula de muestra entera un frasco de vidrio de laboratorio de 10 ml, añadir 4 ml de acetona con una pipeta graduada adecuada y extraer el éster de candesartán cilexetilo. Continuar trabajando como se ha descrito anteriormente.

16 MG DE CANDESARTÁN CILEXETILO POR UNIDAD

Colocar el polvo obtenido de un comprimido o cápsula de muestra entera un frasco de vidrio de laboratorio de 10 ml, añadir 8 ml de acetona con una pipeta graduada adecuada y extraer el éster de candesartán cilexetilo. Continuar trabajando como se ha descrito anteriormente.

32 MG DE CANDESARTÁN CILEXETILO POR UNIDAD

Colocar el polvo obtenido de un comprimido o cápsula de muestra entera un frasco de vidrio de laboratorio de 25 ml, añadir 16 ml de acetona con una pipeta graduada adecuada y extraer el éster de candesartán cilexetilo. Continuar trabajando como se ha descrito anteriormente.

Combinadas o no con otros agentes cardiovasculares, todas las soluciones madre de muestra producidas deben contener finalmente 2 mg de éster total de candesartán cilexetilo por ml y ser etiquetadas como '*Solución madre de la muestra de candesartán*'. Estas soluciones se preparan frescas para cada ensayo. Siga trabajando con los líquidos sobrenadantes claros o turbios.

## VII. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE TRABAJO DE LA MUESTRA

Pipetear 1 ml de la solución madre de la muestra en un vial de 10 ml y añadir 3 ml de acetona. Cierre y agite el vial y etiquételo como 'Solución de muestra de trabajo de candesartán'.

La concentración esperada de éster de candesartán cilexetilo en las soluciones de muestra de trabajo es de 0.5 mg por ml y debe corresponder a la concentración de candesartán cilexetilo en la solución estándar de trabajo superior preparada anteriormente.

## VIII. APLICACIÓN DE LAS MUESTRAS

Marque una línea de origen paralela a unos 1.5 cm del borde inferior de la placa cromatográfica y aplique 2 µl de cada solución de ensayo y del estándar como se muestra en la imagen de al lado, utilizando las pipetas microcapilares suministradas.

Pueden colocarse hasta cinco manchas en una placa. Comprobar la uniformidad de todas las manchas utilizando luz UV de 254 nm. Todas las manchas deben tener forma circular y estar igualmente espaciadas a lo largo de la línea de origen. Aunque sus intensidades pueden diferir, sus diámetros nunca deberían hacerlo. Las diferentes intensidades se deben a cantidades residuales de excipientes o a diferentes activos y concentraciones en las soluciones de la muestra. Una diferencia en el tamaño de la mancha, sin embargo, se relaciona con una mala mancha. Repita este paso si no se consigue una siembra homogénea de las muestras la primera vez.

Deje que las manchas se sequen al aire durante unos tres minutos hasta que el olor a acetona desaparezca casi por completo. Evite el secado con calor.

## IX. DESARROLLO DEL CROMATOGRAMA

Utilizando pipetas graduadas adecuadas, añada 18 ml de acetato de etilo, 2 ml de metanol y 0.1 ml de solución de ácido acético al 96% al frasco que se utilizará como cuba cromatográfica. Cerrar la cuba y mezclar bien. Forrar la pared de la cuba con papel de filtro y esperar unos 15 minutos, asegurando así la saturación de la cuba con vapor de disolvente. Colocar con cuidado la placa de CCF cargada en el frasco. Cerrar el frasco y desarrollar la placa hasta que el frente del disolvente se haya desplazado unas tres cuartas partes de la longitud de la placa, siendo el tiempo de desarrollo de unos 10 minutos. Retire la placa CCF de la cuba, marque el frente de disolvente y deje que el exceso de disolvente se evapore. Para ello, deje que las manchas se sequen al aire durante unos cinco minutos. Evite secarlas con calor.

## X. DETECCIÓN DE LOS AGENTES ACTIVOS

Después de secar todos los residuos de disolvente, ver la placa de cromatografía bajo luz ultravioleta a 254 nm con la lámpara accionada por batería suministrada. Utilice este método de detección para la identificación y cuantificación de candesartán cilexetilo. Si se combina con hidroclorotiazida (HCT), la mancha de este agente aparecerá por encima de la mancha de candesartán cilexetilo. Si se combina con amlodipino, puede detectarse una mancha adicional muy cerca o en la línea de origen. Cuando esta última mancha se irradia con luz UV a 366 nm, aparece una fuerte fluorescencia blanca. Para comprobar el contenido de HCT o amlodipino, consulte los protocolos de ensayo correspondientes en el manual principal.

## XI. OBSERVACIONES HECHAS A 254 NM

Una fuerte mancha azul-violeta a una distancia de recorrido de aproximadamente 0.42 indica la presencia de candesartán cilexetilo en la solución de ensayo. Otras manchas fuertes generadas por la solución de ensayo apuntarían a otros fármacos o a la degradación del candesartán cilexetilo, siendo este último caso más probable cuando se asocia a una man-

PLACA CROMATOGRÁFICA VISTA BAJO  
LUZ ULTRAVIOLETA DE 254 NM

Recorrido No. 1:

Estándar superior de trabajo representando  
100% de contenido de candesartán  
cilexetilo

Recorrido No. 2:

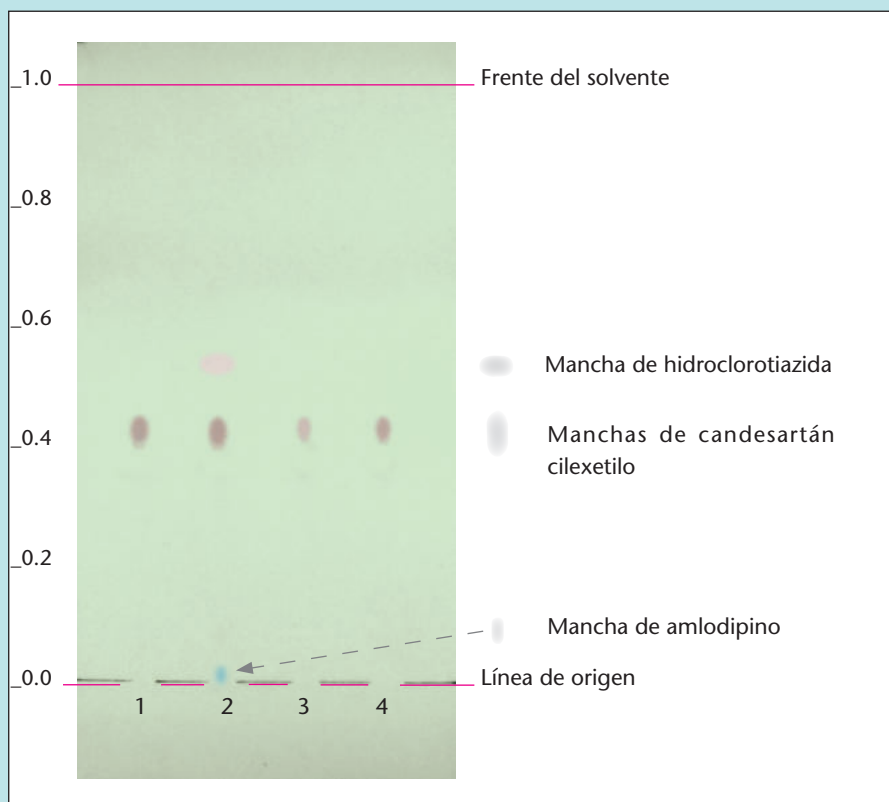
Combinación en dosis fija de buena calidad  
con contenido aceptable de candesartán  
cilexetilo

Recorrido No. 3:

Fármaco de calidad deficiente con con-  
tenido inaceptable bajo en candesartán  
cilexetilo

Recorrido No. 4:

Estándar inferior de trabajo representando  
80% de contenido de candesartán cilexetilo



cha principal más pequeña. Una mancha principal más pequeña de la solución de ensayo también puede indicar un contenido pobre de candesartán cilexetilo y una mancha ausente puede indicar una ausencia total de candesartán. Si el candesartán cilexetilo se combina con hidrocortiazida (HCT), puede observarse una segunda mancha a una distancia de recorrido de aproximadamente 0.54 por encima de la mancha del candesartán. Si candesartán cilexetilo se combina con amlodipino, se observa una mancha adicional a una distancia de recorrido de aproximadamente 0.02 cerca de la línea de origen. Los excipientes presentes en varios productos acabados pueden causar manchas más débiles que migran hasta el frente del disolvente o permanecen cerca o en la línea de origen.

XII. OBSERVACIONES HECHAS A 366 NM

Cuando el candesartán cilexetil se combina con el amlodipino, la presencia de este último compuesto se confirma por una fuerte fluorescencia blanca a una distancia de recorrido de aproximadamente 0.02 muy cerca de la línea de origen.

XIII. RESULTADOS Y MEDIDAS A TOMAR

La mancha de candesartán cilexetilo 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 el ensayo desde el principio con una segunda muestra. El lote es rechazado, si el contenido del agente activo no puede verificarse en el tercer ensayo. 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. A efectos de documentación, tome fotos de todas las lecturas con una cámara digital o un smartphone.

## Primer cribado de las deficiencias del producto mediante ensayos físicos

### I. ENSAYOS FÍSICOS

Durante la inspección visual, busque las deficiencias en el etiquetado, el envasado y las formas de dosificación, tal como se indica en los capítulos introductorios del manual principal, e informe de los resultados. Considere la posibilidad de hacer fotografías, por ejemplo, con la cámara de un teléfono inteligente. Tanto si el clopidogrel se presenta como sal sulfato, besilato o clorhidrato, cada comprimido suele contener 75 mg de clopidogrel por base libre. Se sabe que existen

otras dosis y combinaciones de dosis fijas con ácido acetilsalicílico (AAS). Verifique el peso total de los comprimidos o el peso de llenado de las cápsulas utilizando la balanza electrónica de bolsillo suministrada. Todas las formulaciones de comprimidos y cápsulas de liberación rápida de candesartán también deben pasar el ensayo de desintegración descrita al principio del manual principal. Deberán desintegrarse en agua a 37 °C en menos de 30 minutos. Si un fármaco de liberación rápida no pasa el ensayo, es una deficiencia importante.

### II. 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 o almacenados en malas condiciones, deberán ser sometidos a un ensayo de cromatografía en capa fina.

## Verificación de la identidad y la cantidad mediante cromatografía en capa fina

### I. PRINCIPIO

El clopidogrel sulfato/besilato/clorhidrato se extrae de los comprimidos o cápsulas con un volumen conocido de metanol y luego se comprueba su identidad y contenido mediante cromatografía en capa fina (CCF) frente a un agente de referencia adecuado. Para combinaciones fijas con AAS, consulte el protocolo de ácido acetilsalicílico en el manual principal para ensayos adicionales. Por cierto, se utiliza la misma fase móvil tanto para el protocolo de ensayo de clopidogrel como para el de ácido acetilsalicílico.

### II. EQUIPOS Y REACTIVOS

- |  |  |
|--|--|
| 1) Mano de mortero   | 14) Plancha de calefacción   |
| 2) Papel aluminio  | 15) Papel de filtro  |
| 3) Embudo  | 16) Tijeras  |
| 4) Espátula  | 17) Pinza  |
| 5) Cinta adhesiva  | 18) Luz ultravioleta de 254 nm   |
| 6) Rotulador   | 19) Luz ultravioleta de 366 nm   |
| 7) Lápiz y regla   | 20) Cámara de manchado con yodo  |
| 8) Viales de 10 ml   | 21) Metanol  |
| 9) Juego de pipetas graduadas (1 a 25 ml)  | 22) n-Butanol  |
| 10) Juego de frascos de vidrio de laboratorio (25 a 100 ml)  | 23) Acetato de etilo   |
| 11) Placas Merck CCF de aluminio con recubrimiento de gel de sílice 60 F <sub>254</sub> tamaño 5 x 10 cm | 24) Solución de ácido acético al 96%   |
| 12) Microcapilares de vidrio de 2 µl de capacidad  | 25) Solución de ácido sulfúrico al 96%   |
| 13) Cuba cromatográfica (frasco de 500 ml)   | 26) Agua destilada/grifo/embotellada   |
|  | 27) Agente de referencia, p. ej. comprimidos que contienen 75 mg de clopidogrel en forma de su sal sulfato |

### III. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE DEL ESTÁNDAR

La preparación de la solución madre del estándar requiere de un producto auténtico usado como agente de referencia, por ejemplo, comprimidos que contengan 75 mg de clopidogrel en forma de su sal sulfato. Se envuelve el comprimido usada como referencia en papel aluminio y se reduce a polvo fino usando la mano de mortero. Vaciar cuidadosamente el contenido del papel aluminio en un frasco de vidrio de laboratorio de 25 ml y enjuagar todas las cantidades de polvo restantes con 15 ml de metanol usando una pipeta graduada. Cerrar el frasco de laboratorio y agitar durante unos tres minutos hasta que se disuelva 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 5 mg de clopidogrel total por ml y se debe rotular 'Solución madre del estándar de clopidogrel'. Para cada ensayo se preparará una nueva solución. Se continúa trabajando con el líquido claro o turbio obtenido.

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

La solución madre del estándar no requiere de dilución posterior, ya presenta la concentración final de trabajo de 5 mg de clopidogrel total por ml. Para una manipulación más cómoda, parte del líquido sobrenadante puede transferirse a un nuevo vial de 10 ml.

Esta solución estándar de trabajo representa un fármaco de buena calidad con un contenido de 100% de clopidogrel por base libre.

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

Pipetear 4 ml de la solución madre del estándar en un vial de 10 ml y añadir 1 ml de metanol utilizando pipetas graduadas adecuadas. Cerrar y agitar el vial. La solución obtenida debe contener 4 mg de clopidogrel total por ml y etiquetarse como '*Solución estándar de trabajo de clopidogrel al 80%*'.

Esta solución estándar de trabajo representa un producto farmacológico de baja calidad y bajo contenido de clopidogrel de solo 80% de lo indicado en la etiqueta del producto. En la investigación actual, este nivel de clopidogrel representa el límite inferior aceptable para un producto dado. Los límites de la farmacopea no se aplican en nuestro contexto.

#### VI. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE DE LA MUESTRA A PARTIR DE UN PRODUCTO QUE DICE CONTENER 75 MG DE CLOPIDOGREL POR UNIDAD

Tomar un comprimido o cápsula entera de un medicamento adecuado muestreado en el campo. Como es habitual, los comprimidos se envuelven en papel de aluminio y se Trituran hasta obtener un polvo fino. Transfiera todo el polvo obtenido a un frasco de vidrio de laboratorio de 25 ml. El polvo obtenido de una cápsula de muestra debe colocarse directamente en el frasco añadiendo en último lugar el tapón vacío y las carcasas del cuerpo. Para la extracción, añada 15 ml de metanol utilizando una pipeta graduada adecuada. A continuación, cerrar el frasco y agitar durante unos tres minutos hasta que se disuelva la mayor parte de los sólidos. Dejar reposar la solución durante otros cinco minutos hasta que los residuos no disueltos se asienten bajo el líquido sobrenadante.

#### 300 MG DE CLOPIDOGREL POR UNIDAD

Colocar el polvo obtenido de un comprimido o cápsula de muestra entera un frasco de vidrio de laboratorio de 100 ml, añadir 60 ml de metanol con una pipeta graduada adecuada y extraer el clopidogrel. Continuar trabajando como se ha descrito anteriormente.

Combinadas o no con AAS, todas las soluciones madre de muestra producidas deben contener finalmente 5 mg de clopidogrel total por ml y ser etiquetadas como '*Solución madre de la muestra de clopidogrel*'. Estas soluciones se preparan frescas para cada ensayo. Siga trabajando con los líquidos sobrenadantes claros o turbios.

#### VII. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE TRABAJO DE LA MUESTRA

Las soluciones madre de la muestra no requieren dilución adicional, puesto que ya representan la concentración final de 5 mg de clopidogrel por ml. Si han sido preparadas a partir de fármacos de buena calidad, las concentraciones de clopidogrel de estas soluciones deberán corresponder a la concentración de clopidogrel de la solución estándar de trabajo superior elaborada arriba. Para facilitar la manipulación, parte del líquido sobrenadante puede transferirse a un vial de 10 ml.

#### VIII. APLICACIÓN DE LAS MUESTRAS

Marque una línea de origen paralela a unos 1.5 cm del borde inferior de la placa cromatográfica y aplique 2 µl de cada solución de ensayo y del estándar como se muestra en la imagen en la página 15, utilizando las pipetas microcapilares suministradas.

Pueden colocarse hasta cinco manchas en una placa. Comprobar la uniformidad de todas las manchas utilizando luz UV de 254 nm. Todas las manchas deben tener forma circular y estar igualmente espaciadas a lo largo de la línea de origen. Aunque sus intensidades pueden diferir, sus diámetros nunca deberían hacerlo. Las diferentes intensidades se deben a cantidades residuales de excipientes o a diferentes activos y concentraciones en las soluciones de la muestra. Una diferencia en el tamaño de la mancha, sin embargo, se relaciona con una mala mancha. Repita este paso si no se consigue una siembra homogénea de las muestras la primera vez.

Deje que las manchas se sequen al aire durante unos dos o tres minutos hasta que el metanol haya desaparecido casi por completo.

**IX. DESARROLLO DEL CROMATOGRAMA**

A) Fase móvil para la verificación del contenido de clopidogrel: Utilizando pipetas graduadas adecuadas, añada 18 ml de acetato de etilo, 4 ml de metanol y 0.1 ml de solución de ácido acético al 96% al frasco que se utilizará como cuba cromatográfica. Cerrar la cuba y mezclar bien. Forrar la pared de la cuba con papel de filtro y esperar unos 15 minutos, asegurando así la saturación de la cuba con vapor de disolvente. Colocar con cuidado la placa de CCF cargada en el frasco. Cerrar el frasco y desarrollar la placa hasta que el frente del disolvente se haya desplazado unas tres cuartas partes de la longitud de la placa, siendo el tiempo de desarrollo de unos 10 minutos. Retire la placa CCF de la cuba, marque el frente de disolvente y deje que el exceso de disolvente se evapore por secado suave. Para ello, mantenga la cromatoplaca con la pinza suministrada en la corriente de aire caliente directamente encima de la placa calefactora durante unos dos minutos. Agitar constantemente la placa de CCF y, cada vez que la cromatoplaca se desplace hacia abajo, dejar que su parte inferior toque la superficie de la placa calefactora durante fracciones de segundo.

B) Fase móvil para distinguir el clopidogrel de la ticlopidina, estrechamente relacionada: Pipetear 12 ml de n-butanol, 3 ml de solución de ácido acético al 96% y 6 ml de agua en la cámara de desarrollo CCF en el orden indicado. Colocar con cuidado la placa de CCF cargada en la cámara saturada de vapor de disolvente. Cerrar la cámara y desarrollar la placa cromatográfica hasta que el frente de disolvente se haya desplazado aproximadamente la mitad de la longitud de la placa, siendo el tiempo de desarrollo de unos 30 minutos. Retirar la placa de CCF de la cámara, marcar el frente de disolvente y dejar que el exceso de disolvente se evapore mediante secado suave en la corriente de aire caliente por encima de la placa calefactora durante unos tres minutos, como ya se ha indicado anteriormente para la fase móvil «A».

**X. DETECCIÓN DE LOS AGENTES ACTIVOS**

Después de secar todos los residuos de disolvente, ver la placa de cromatografía bajo luz ultravioleta a 254 nm con la lámpara accionada por batería suministrada. Para una mayor identificación y cuantificación del clopidogrel, manchar la placa cromatográfica con vapores de yodo.

Para distinguir aún más el clopidogrel de la ticlopidina, estrechamente relacionada con él, hay que tratar la placa de yodo con ácido sulfúrico y calor. Para ello, llene el vaso de plástico de 250 ml suministrado con 190 ml de metanol, seguidos de 10 ml de solución de ácido sulfúrico al 96%, y mezcle bien. Dejar enfriar la mezcla y sumergir la placa cromatográfica en la solución colorante con la cara superior hacia abajo si es de la fase móvil «A» y con la cara inferior primero si es de la fase móvil «B». Retire inmediatamente la placa de la solución y deje escurrir el exceso de líquido sobre un pañuelo de papel. Limpie el líquido restante de la parte posterior de la placa y seque toda la solución colorante durante unos 30 a 60 segundos a temperatura máxima en la placa caliente suministrada. Tras retirar la placa cromatográfica de la placa calefactora, observar la placa manchada bajo luz UV a 366 nm en la oscuridad. Las manchas que representan clopidogrel muestran fluorescencia blanca. La ticlopidina, estrechamente relacionada, no muestra esta fluorescencia.

**XI. OBSERVACIONES HECHAS A 254 NM**

Fase móvil A: Una mancha oscura a una distancia de recorrido de aproximadamente 0.73 indica la presencia de clopidogrel en la solución de ensayo. Otras manchas fuertes generadas por la solución de ensayo apuntarían a otros fármacos o a la degradación del clopidogrel, siendo este último caso más probable cuando se asocia a una mancha principal más pequeña. Una mancha principal más pequeña de la solución de ensayo también puede indicar un contenido pobre de clopidogrel y ninguna mancha en absoluto una ausencia completa de clopidogrel. Si se combina con ácido acetilsalicílico (AAS), este compuesto es visible a una distancia de recorrido de aproximadamente 0.47. Además, el ácido bencenosulfónico de la sal de besilato de clopidogrel puede hacerse visible a una distancia de recorrido de aproximadamente 0.20. Los excipientes presentes en varios productos acabados pueden causar manchas más débiles que migran hasta el frente del disolvente o permanecen cerca o en la línea de origen.



PLACA CROMATOGRÁFICA DE LA FASE MÓVIL «A» VISTA BAJO LUZ ULTRAVIOLETA DE 254 NM

Recorrido No. 1:

Estándar superior de trabajo representando 100% de contenido de clopidogrel

Recorrido No. 2:

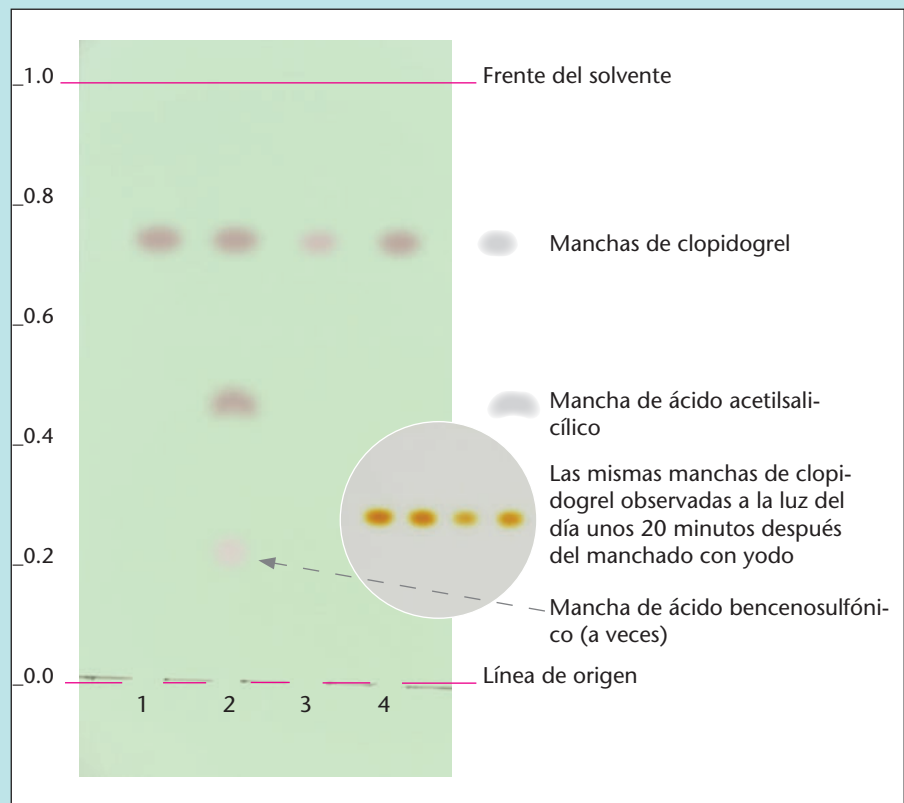
Combinación en dosis fija de buena calidad Con contenido aceptable de clopidogrel

Recorrido No. 4:

Fármaco de calidad deficiente con contenido inaceptable bajo en clopidogrel

Recorrido No. 4:

Estándar inferior de trabajo representando 80% de contenido de clopidogrel



Fase móvil B: Una mancha oscura a una distancia de recorrido de aproximadamente 0.90 indica la presencia de clopidogrel en la solución de ensayo. La ticlopidina, estrechamente relacionada con la misma familia de tienopiridinas, mostraría un factor de retención relativo de aproximadamente 0.63. El factor de retención relativo del AAS es de aproximadamente 0.80 y el del ácido benzenosulfónico, de aproximadamente 0.52.

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

Cuando la placa de CCF se expone de nuevo al vapor de yodo, todas las manchas de clopidogrel observadas anteriormente a 254 nm pasan a ser de color marrón amarillento. Las manchas son muy fuertes, lo que dificulta las lecturas semicuantitativas. Tras un período de espera de unos 20 minutos, cuando el yodo se evapora y el manchado madura, las diferentes tonalidades y tamaños indican aproximadamente diferentes concentraciones de clopidogrel. La ticlopidina se comporta de forma muy similar en este caso.

XIII. OBSERVACIONES HECHAS A 366 NM DESPUÉS DE MANCHAR LA PLACA DE YODO CON ÁCIDO SULFÚRICO

Cuando la placa de CCF yodada se expone adicionalmente a ácido sulfúrico y calor, todas las manchas de clopidogrel muestran una fluorescencia blanca en la oscuridad. La ticlopidina, estrechamente relacionada con el clopidogrel, no muestra esta fluorescencia. La fluorescencia es más intensa en presencia de yodo después del manchado con yodo y sólo aparece a temperatura ambiente después de retirar la placa de CCF de la placa caliente.

XIV. RESULTADOS Y MEDIDAS A TOMAR

La mancha de clopidogrel 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 el ensayo desde el principio con una segunda muestra. El lote es rechazado, si el contenido del agente activo no puede verificarse en el tercer ensayo. 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. A efectos de documentación, tome fotos de todas las lecturas con una cámara digital o un smartphone.

## Primer cribado de las deficiencias del producto mediante ensayos físicos

### I. ENSAYOS FÍSICOS

Durante la inspección visual, busque las deficiencias en el etiquetado, el envasado y las formas de dosificación, tal como se indica en los capítulos introductorios del manual principal, e informe de los resultados. Considere la posibilidad de hacer fotografías, por ejemplo, con la cámara de un teléfono inteligente. Las formas farmacéuticas líquidas para uso parenteral contienen 20 mg de sal clorhidrato de hidralazina por unidad. Las soluciones parenterales deben ser transparentes y estar libres de materias extrañas. Por

el contrario, los comprimidos suelen contener 25, 50 ó 100 mg de sal clorhidrato de hidralazina. Se conocen otras dosis. Verifique el peso total de los comprimidos o el peso de llenado de las cápsulas utilizando la balanza electrónica de bolsillo suministrada. Todas las formulaciones de comprimidos y cápsulas de hidralazina de liberación rápida también deben pasar el ensayo de desintegración descrita al principio del manual principal. Deberán desintegrarse en agua a 37 °C en menos de 30 minutos. Si un fármaco de liberación rápida no pasa el ensayo, es una deficiencia importante.

### II. 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 o almacenados en malas condiciones, deberán ser sometidos a un ensayo de cromatografía en capa fina.

## Verificación de la identidad y la cantidad mediante cromatografía en capa fina

### I. PRINCIPIO

Las soluciones de clorhidrato de hidralazina se diluyen y las formas farmacéuticas sólidas se extraen con un volumen conocido de agua y, luego se comprueba la identidad y el contenido de las soluciones de ensayo obtenidas mediante cromatografía en capa fina (TLC) frente a un agente de referencia adecuado.

### II. EQUIPOS Y REACTIVOS

- |  |  |
|--|--|
| 1) Mano de mortero   | 14) Plancha de calefacción   |
| 2) Papel aluminio  | 15) Papel de filtro  |
| 3) Embudo  | 16) Tijeras  |
| 4) Espátula  | 17) Pinza  |
| 5) Cinta adhesiva  | 18) Luz ultravioleta de 254 nm   |
| 6) Rotulador   | 19) Metanol  |
| 7) Lápiz y regla   | 20) Acetona  |
| 8) Viales de 10 ml   | 21) Solución de amoníaco al 25%  |
| 9) Juego de pipetas graduadas (1 a 25 ml)  | 22) Solución de ácido acético al 96%   |
| 10) Juego de frascos de vidrio de laboratorio (25 a 100 ml)  | 23) Agua destilada/grifo/embotellada   |
| 11) Placas Merck CCF de aluminio con recubrimiento de gel de sílice 60 F <sub>254</sub> tamaño 5 x 10 cm | 24) Balanza electrónica de bolsillo  |
| 12) Microcapilares de vidrio de 2 µl de capacidad  | 25) Agente de referencia, por ejemplo, clorhidrato de hidralazina en forma de comprimido de 25 mg o, alternativamente, clorhidrato de hidralazina como sustancia pura de procedencia comercial |
| 13) Cuba cromatográfica (frasco de 500 ml)   |  |

### III. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE DEL ESTÁNDAR

Si se suministran comprimidos de referencia que contienen 25 mg de hidrocloreto de hidralazina, entonces envuelva un comprimido en papel de aluminio y tritúrelo con una mano de mortero hasta obtener un polvo fino. Vaciar cuidadosamente el papel de aluminio sobre un frasco de vidrio de laboratorio de 25 ml y lavar todos los sólidos residuales con 5 ml de agua utilizando una pipeta graduada. Cerrar el frasco y agitar durante unos tres minutos hasta que se disuelva la mayor parte de los sólidos. Dejar reposar la solución otros cinco minutos hasta que los residuos no disueltos se depositen bajo el líquido sobrenadante. La solución obtenida debe contener 5 mg de clorhidrato de hidralazina total por ml y etiquetarse como 'Solución madre del estándar de hidralazina'. Preparar esta solución fresca para cada ensayo. Seguir trabajando con el líquido sobrenadante claro o turbio.

Si los comprimidos de referencia se sustituyen por polvo de clorhidrato de hidralazina de gran pureza cercana al 100%, pesar correctamente unos 0.3 g utilizando la balanza electrónica de bolsillo suministrada. A continuación, disolver el polvo en 60 ml de agua, obteniendo de nuevo una solución que contenga 5 mg de clorhidrato de hidralazina total por ml de agua. Ajustar la cantidad de agua para la disolución cuando el resultado del pesaje difiera del peso objetivo. Para vencer la inercia dinámica de la balanza, levantar el bote de pesada o golpear el platillo de pesada con un bolígrafo o una espátula cada vez que se hayan añadido o retirado algunos miligramos más. Para garantizar una disolución completa, respetar los tiempos de agitación y de reposo mencionados anteriormente. Etiquetar como se ha indicado anteriormente. La solución final obtenida debe ser clara, sin sólidos residuales observables. Preparar esta solución fresca para cada ensayo.

#### 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 3 ml de metanol utilizando pipetas graduadas adecuadas. Se tapa y agita bien el vial. La solución obtenida debe contener 1.25 mg de clorhidrato de hidralazina total por ml y se debe rotular '*Solución estándar de trabajo de hidralazina al 100%*'.

Esta solución estándar de trabajo representa un fármaco de buena calidad con un contenido de 100% de clorhidrato de hidralazina.

#### 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 4 ml de metanol utilizando pipetas graduadas adecuadas. Se tapa y agita bien el vial. La solución obtenida debe contener 1 mg de clorhidrato de hidralazina total por ml y se debe rotular '*Solución estándar de trabajo de hidralazina al 80%*'.

Esta solución estándar de trabajo representa un producto farmacológico de baja calidad y bajo contenido de clorhidrato de hidralazina de solo 80% de lo indicado en la etiqueta del producto. En la investigación actual, este nivel de clorhidrato de hidralazina representa el límite inferior aceptable para un producto dado. Los límites de la farmacopea no se aplican en nuestro contexto.

#### VI. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE DE LA MUESTRA A PARTIR DE UN PRODUCTO LÍQUIDO QUE DICE CONTENER 20 MG DE HIDRALAZINA HCL POR AMPOLLA O VIAL

Tome una ampolla o vial sellado de 1 ml de un fármaco apropiado muestreado en el campo. Abra la ampolla o vial y transfiera el contenido a un frasco de vidrio de laboratorio de 10 ml. Lavar la ampolla o vial vacío con 3 ml de agua y combinar cada solución de lavado con la solución de muestra.

#### PRODUCTO LIOFILIZADO QUE DICE CONTENER 20 MG DE HIDRALAZINA HCL POR AMPOLLA O VIAL

Tome una ampolla o vial de un fármaco apropiado muestreado en el campo. Ábrala y transfiera el contenido a un frasco de vidrio de laboratorio de 25 ml utilizado como contenedor de muestras. Quite la parte superior de las ampollas de vidrio, envuelva el cuerpo de la ampolla en papel de aluminio y rómpalo con una mano de mortero antes de transferir todos los fragmentos de vidrio y el liofilizado completamente al frasco de laboratorio de 25 ml. A continuación, se extrae todo con 4 ml de agua. Durante la extracción, la etiqueta con su adhesivo también puede desprenderse gradualmente, de modo que toda la solución puede volverse turbia. Sin embargo, esto no influye en la extracción de la hidralazina.

#### COMPRIMIDO QUE DICE CONTENER 25 MG DE HIDRALAZINA HCL POR UNIDAD

Colocar el polvo obtenido de un comprimido o cápsula de muestra entera un frasco de vidrio de laboratorio de 10 ml, añadir 5 ml de agua con una pipeta graduada adecuada y extraer el clorhidrato de hidralazina. Continuar trabajando como se ha descrito anteriormente.

#### COMPRIMIDO QUE DICE CONTENER 50 MG DE HIDRALAZINA HCL POR UNIDAD

Tomar un comprimido o cápsula de muestra entera y extraer el polvo obtenido con 10 ml de agua utilizando una pipeta graduada y un frasco de vidrio de laboratorio de 25 ml como recipiente de muestra.

#### COMPRIMIDO QUE DICE CONTENER 100 MG DE HIDRALAZINA HCL POR UNIDAD

Tomar un comprimido o cápsula de muestra entera y extraer el polvo obtenido con 20 ml de agua utilizando una pipeta graduada y un frasco de vidrio de laboratorio de 25 ml como recipiente de muestra.

Todas las soluciones madre de muestra producidas deben contener finalmente 5 mg de hidrocloreto de hidralazina total por ml y ser etiquetadas como '*Solución madre de la muestra de hidralazina*'. Estas soluciones se preparan frescas para cada ensayo. Siga trabajando con los líquidos sobrenadantes claros o turbios.

#### VII. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE TRABAJO DE LA MUESTRA

Pipetear 1 ml de la solución madre de la muestra en un vial de 10 ml y añadir 3 ml de metanol. Cierre y agite el vial y etiquételo como '*Solución de muestra de trabajo de hidralazina*'.

La concentración esperada de hidrocloreto de hidralazina en las soluciones de muestra de trabajo es de 1.25 mg por ml y debe corresponder a la concentración de hidrocloreto de hidralazina en la solución estándar de trabajo superior preparada anteriormente.

#### VIII. APLICACIÓN DE LAS MUESTRAS

Marque una línea de origen paralela a unos 1.5 cm del borde inferior de la placa cromatográfica y aplique 2 µl de cada solución de ensayo y del estándar como se muestra en la imagen de al lado, utilizando las pipetas microcapilares suministradas.

Pueden colocarse hasta cinco manchas en una placa. Comprobar la uniformidad de todas las manchas utilizando luz UV de 254 nm. Todas las manchas deben tener forma circular y estar igualmente espaciadas a lo largo de la línea de origen. Aunque sus intensidades pueden diferir, sus diámetros nunca deberían hacerlo. Las diferentes intensidades se deben a cantidades residuales de excipientes o a diferentes activos y concentraciones en las soluciones de la muestra. Una diferencia en el tamaño de la mancha, sin embargo, se relaciona con una mala mancha. Repita este paso si no se consigue una siembra homogénea de las muestras la primera vez.

Secar suavemente las manchas. Para ello, mantenga la cromatoplaque con la pinza suministrada en la corriente de aire caliente directamente encima de la placa calefactora durante unos treinta segundos. Agitar constantemente la placa de CCF y, cada vez que la cromatoplaque se desplace hacia abajo, dejar que su parte inferior toque la superficie de la placa calefactora durante fracciones de segundo.

#### IX. DESARROLLO DEL CROMATOGRAMA

Utilizando pipetas graduadas adecuadas, añada 10 ml de metanol, 5 ml de acetona y 5 ml de solución de amoníaco al 25% al frasco que se utilizará como cuba cromatográfica. Cerrar la cuba y mezclar bien. Forrar la pared de la cuba con papel de filtro y esperar unos 15 minutos, asegurando así la saturación de la cuba con vapor de disolvente. Colocar con cuidado la placa de CCF cargada en el frasco. Cerrar el frasco y desarrollar la placa hasta que el frente del disolvente se haya desplazado unas tres cuartas partes de la longitud de la placa, siendo el tiempo de desarrollo de unos 20 minutos. Retire la placa CCF de la cámara, marque el frente del disolvente y deje que el exceso de disolvente se seque al aire durante unos cinco minutos.

#### X. DETECCIÓN DE LOS AGENTES ACTIVOS

Después de secar todos los residuos de disolvente, ver la placa de cromatografía bajo luz ultravioleta a 254 nm con la lámpara accionada por batería suministrada. Utilice este método de detección de ambos, identificación y cuantificación de hidralazina.

Para una mayor detección de hidralazina, realizar una coloración con ninhidrina. Para ello, disolver unos 3 g de ninhidrina (unas 10 veces una espátula bien llena) en una mezcla de 150 ml de metanol y 30 ml de solución de ácido acético al 96%. Utilice el vaso de plástico suministrado para alojar la solución de coloración. Esto permitirá sumergir la placa cromatográfica en la solución utilizando un par de pinzas. Retire inmediatamente la placa del vaso de plástico, deje que la solución sobrante caiga sobre un tisú de papel y, por último, seque la parte posterior de la placa utilizando de nuevo un tisú de papel. Continúe secando toda la solución de coloración sobre una placa caliente y observe cómo las manchas de hidralazina se hacen gradualmente visibles.

El proceso de manchado con ninhidrina se ilustra en su totalidad en la página 36 del manual principal. Tenga en cuenta que la piel contaminada con la solución de ninhidrina también se

PLACA CROMATOGRÁFICA VISTA BAJO  
LUZ ULTRAVIOLETA DE 254 NM

Recorrido No. 1:

Estándar superior de trabajo representando  
100% de contenido de hidralazina

Recorrido No. 2:

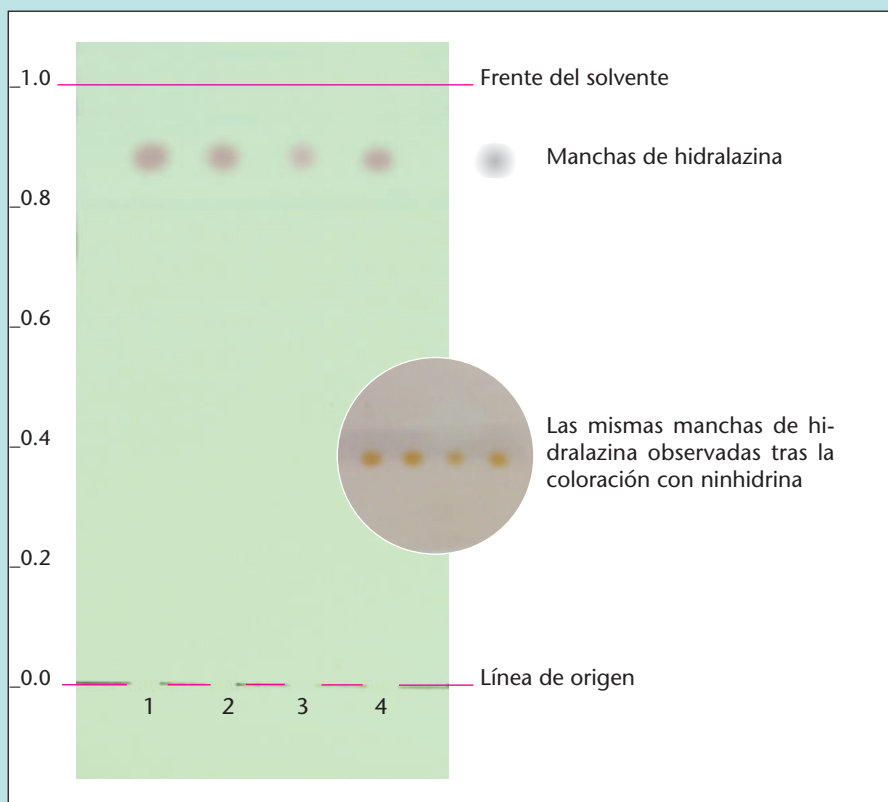
Fármaco de buena calidad con contenido  
aceptable en hidralazina

Recorrido No. 3:

Fármaco de calidad deficiente con conte-  
nido inaceptable bajo en hidralazina

Recorrido No. 4:

Estándar inferior de trabajo representando  
80% de contenido de hidralazina



manchará. Sin embargo, esto no es peligroso para la salud y las manchas violetas desaparecerán al cabo de uno o dos días.

XI. OBSERVACIONES HECHAS A 254 NM

Una mancha oscura a una distancia de recorrido de aproximadamente 0.88 indica la presencia de hidralazina en la solución de ensayo. Otras manchas fuertes generadas por la solución de ensayo apuntarían a otros fármacos o a la degradación de la hidralazina, siendo este último caso más probable cuando se asocia a una mancha principal más pequeña. Una mancha principal más pequeña de la solución de ensayo también puede indicar un contenido pobre de hidralazina y ninguna mancha en absoluto una ausencia completa de hidralazina. Los excipientes presentes en varios productos acabados pueden causar manchas más débiles que migran hasta el frente del disolvente o permanecen cerca o en la línea de origen.

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

Todas las manchas de hidralazina que antes se hacían visibles con luz UV a 254 nm se vuelven ahora de color marrón rojizo y más tarde se decoloran a marrón anaranjado. Si la placa cromatográfica todavía contiene residuos de solución amoniacal de la fase móvil, toda la placa podría colorearse al final del día. Por lo tanto, las semicuantificaciones no siempre son concluyentes, pero la coloración con ninhidrina es buena para seguir identificando la hidralazina.

XIII. RESULTADOS Y MEDIDAS A TOMAR

La mancha de hidralazina 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 el ensayo desde el principio con una segunda muestra. El lote es rechazado, si el contenido del agente activo no puede verificarse en el tercer ensayo. 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. A efectos de documentación, tome fotos de todas las lecturas con una cámara digital o un smartphone.

# 7.112 Rivaroxabán

## Primer cribado de las deficiencias del producto mediante ensayos físicos

### I. ENSAYOS FÍSICOS

Durante la inspección visual, busque las deficiencias en el etiquetado, el envasado y las formas de dosificación, tal como se indica en los capítulos introductorios del manual principal, e informe de los resultados. Considere la posibilidad de hacer fotografías, por ejemplo, con la cámara de un teléfono inteligente. Cada comprimido suele contener 2.5, 10, 15 ó 20 mg de rivaroxabán. Verifique el peso total de los comprimidos o el peso de

llenado de las cápsulas utilizando la balanza electrónica de bolsillo suministrada. Todas las formulaciones de comprimidos y cápsulas de liberación rápida de rivaroxabán también deben pasar el ensayo de desintegración descrita al principio del manual principal. Deberán desintegrarse en agua a 37 °C en menos de 30 minutos. Si un fármaco de liberación rápida no pasa el ensayo, es una deficiencia importante.

### II. 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 o almacenados en malas condiciones, deberán ser sometidos a un ensayo de cromatografía en capa fina.

## Verificación de la identidad y la cantidad mediante cromatografía en capa fina

### I. PRINCIPIO

El rivaroxabán se extrae de los comprimidos o cápsulas con un volumen conocido de solución concentrada de ácido acético y luego se comprueba su identidad y contenido mediante cromatografía en capa fina (TLC) frente a un agente de referencia adecuado.

### II. EQUIPOS Y REACTIVOS

- 1) Mano de mortero
- 2) Papel aluminio
- 3) Embudo
- 4) Espátula
- 5) Cinta adhesiva
- 6) Rotulador
- 7) Lápiz y regla
- 8) Viales de 10 ml
- 9) Juego de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
- 10) Juego de frascos de vidrio de laboratorio (25 a 100 ml)
- 11) Placas Merck CCF de aluminio con recubrimiento de gel de sílice 60 F<sub>254</sub> tamaño 5 x 10 cm
- 12) Microcapilares de vidrio de 2 µl de capacidad
- 13) Cuba cromatográfica (frasco de 500 ml)
- 14) Plancha de calefacción
- 15) Papel de filtro
- 16) Tijeras
- 17) Pinza
- 18) Luz ultravioleta de 254 nm
- 19) Metanol
- 20) Acetato de etilo
- 21) Solución de ácido acético al 96%
- 22) Agente de referencia, p. ej. comprimidos de rivaroxabán de 10 mg

### III. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE DEL ESTÁNDAR

La preparación de la solución madre del estándar requiere de un producto auténtico usado como agente de referencia, por ejemplo, comprimidos con contenido de 10 mg de rivaroxabán. Se envuelve el comprimido usada como referencia en papel aluminio y se reduce a polvo fino usando la mano de mortero. Vaciar cuidadosamente el contenido del papel aluminio en un frasco de vidrio de laboratorio de 25 ml y enjuagar todas las cantidades de polvo restantes con 10 ml de solución de ácido acético al 96% usando una pipeta graduada. Cerrar el frasco de laboratorio y agitar durante unos tres minutos. 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 turbia obtenida debe contener 1 mg de rivaroxabán total por ml y se debe rotular '*Solución madre del estándar de rivaroxabán*'. Para cada ensayo se preparará una nueva solución. Se continúa trabajando con el líquido turbio obtenido.

#### 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 1 ml de solución de ácido acético al 96% utilizando pipetas graduadas adecuadas. Se tapa y agita bien el vial. La solución obtenida debe contener 0.5 mg del agente activo total por ml y se debe rotular '*Solución estándar de trabajo de rivaroxabán al 100%*'.

Esta solución estándar de trabajo representa un fármaco de buena calidad con un contenido de 100% de rivaroxabán.

#### 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 1.5 ml de solución de ácido acético al 96% utilizando pipetas graduadas adecuadas. Se tapa y agita bien el vial. La solución obtenida debe contener 0.4 mg de rivaroxabán total por ml y se debe rotular '*Solución estándar de trabajo de rivaroxabán al 80%*'.

Esta solución estándar de trabajo representa un producto farmacológico de baja calidad y bajo contenido de rivaroxabán de solo 80% de lo indicado en la etiqueta del producto. En la investigación actual, este nivel de rivaroxabán representa el límite inferior aceptable para un producto dado. Los límites de la farmacopea no se aplican en nuestro contexto.

#### VI. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE DE LA MUESTRA A PARTIR DE UN PRODUCTO QUE DICE CONTENER 2.5 MG DE RIVAROXABÁN POR UNIDAD

Tomar un comprimido o cápsula entera de un medicamento adecuado muestreado en el campo. Como es habitual, los comprimidos se envuelven en papel de aluminio y se trituran hasta obtener un polvo fino. Transfiera todo el polvo obtenido a un frasco de vidrio de laboratorio de 10 ml. El polvo obtenido de una cápsula de muestra debe colocarse directamente en el frasco añadiendo en último lugar el tapón vacío y las carcacas del cuerpo. Para la extracción, añada 2.5 ml de solución de ácido acético al 96% utilizando una pipeta graduada adecuada. A continuación, cerrar el frasco y agitar durante unos tres minutos. Dejar reposar la solución durante otros cinco minutos hasta que los residuos no disueltos se asienten bajo el líquido sobrenadante.

##### 10 MG DE RIVAROXABÁN POR UNIDAD

Colocar el polvo obtenido de un comprimido o cápsula de muestra entera en un frasco de vidrio de laboratorio de 25 ml, añadir 10 ml de solución de ácido acético al 96% con una pipeta graduada adecuada y extraer el rivaroxabán. Continuar trabajando como se ha descrito anteriormente.

##### 15 MG DE RIVAROXABÁN POR UNIDAD

Colocar el polvo obtenido de un comprimido o cápsula de muestra entera en un frasco de vidrio de laboratorio de 25 ml, añadir 15 ml de solución de ácido acético al 96% con una pipeta graduada adecuada y extraer el rivaroxabán. Continuar trabajando como se ha descrito anteriormente.

##### 20 MG DE RIVAROXABÁN POR UNIDAD

Colocar el polvo obtenido de un comprimido o cápsula de muestra entera en un frasco de vidrio de laboratorio de 25 ml, añadir 20 ml de solución de ácido acético al 96% con una pipeta graduada adecuada y extraer el rivaroxabán. Continuar trabajando como se ha descrito anteriormente.

Todas las soluciones madre de muestra producidas deben contener finalmente 1 mg de rivaroxabán total por ml y ser etiquetadas como '*Solución madre de la muestra de rivaroxabán*'. Estas soluciones se preparan frescas para cada ensayo. Siga trabajando con los líquidos sobrenadantes claros o turbios.

## VII. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE TRABAJO DE LA MUESTRA

A l'aide des pipettes graduées, introduire 1 ml de la solution essai du stock dans une fiole de 10 ml et ajouter 1 ml de solution d'acide acétique à 96%. Fermer, agiter la fiole et l'étiqueter en tant que 'Solution Essai du Travail de Rivaroxaban'.

La concentración esperada de rivaroxabán en las soluciones de muestra de trabajo es de 0.5 mg por ml y debe corresponder a la concentración de rivaroxabán en la solución estándar de trabajo superior preparada anteriormente.

## VIII. APLICACIÓN DE LAS MUESTRAS

Marque una línea de origen paralela a unos 1.5 cm del borde inferior de la placa cromatográfica y aplique 2 µl de cada solución de ensayo y del estándar como se muestra en la imagen de al lado, utilizando las pipetas microcapilares suministradas.

Pueden colocarse hasta cinco manchas en una placa. Comprobar la uniformidad de todas las manchas utilizando luz UV de 254 nm. Todas las manchas deben tener forma circular y estar igualmente espaciadas a lo largo de la línea de origen. Aunque sus intensidades pueden diferir, sus diámetros nunca deberían hacerlo. Las diferentes intensidades se deben a cantidades residuales de excipientes o a diferentes activos y concentraciones en las soluciones de la muestra. Una diferencia en el tamaño de la mancha, sin embargo, se relaciona con una mala mancha. Repita este paso si no se consigue una siembra homogénea de las muestras la primera vez.

Seque suavemente las manchas. Para ello, mantenga la cromatoplaque con la pinza suministrada en la corriente de aire caliente directamente encima de la placa calefactora durante aproximadamente un minuto. Agite constantemente la placa de CCF y, cada vez que la cromatoplaque se desplace hacia abajo, deje que su parte inferior toque la superficie de la placa calefactora durante fracciones de segundo.

## IX. DESARROLLO DEL CROMATOGRAMA

Utilizando pipetas graduadas adecuadas, añada 15 ml de acetato de etilo, 5 ml de metanol y 0.5 ml de solución de ácido acético al 96% al frasco que se utilizará como cuba cromatográfica. Cerrar la cuba y mezclar bien. Forrar la pared de la cuba con papel de filtro y esperar unos 15 minutos, asegurando así la saturación de la cuba con vapor de disolvente. Colocar con cuidado la placa de CCF cargada en el frasco. Cerrar el frasco y desarrollar la placa hasta que el frente del disolvente se haya desplazado unas tres cuartas partes de la longitud de la placa, siendo el tiempo de desarrollo de unos 15 minutos. Retire la placa CCF de la cuba, marque el frente de disolvente y deje que el exceso de disolvente se evapore por secado suave. Para ello, mantenga la cromatoplaque con la pinza suministrada en la corriente de aire caliente directamente encima de la placa calefactora durante unos dos minutos. Agitar constantemente la placa de CCF y, cada vez que la cromatoplaque se desplace hacia abajo, dejar que su parte inferior toque la superficie de la placa calefactora durante fracciones de segundo.

## X. DETECCIÓN DE LOS AGENTES ACTIVOS

Después de secar todos los residuos de disolvente, ver la placa de cromatografía bajo luz ultravioleta a 254 nm con la lámpara accionada por batería suministrada. Utilice este método de detección de ambos, identificación y cuantificación de rivaroxabán.

PLACA CROMATOGRÁFICA VISTA BAJO  
LUZ ULTRAVIOLETA DE 254 NM

Recorrido No. 1:

Estándar superior de trabajo representando  
100% de contenido de rivaroxabán

Recorrido No. 2:

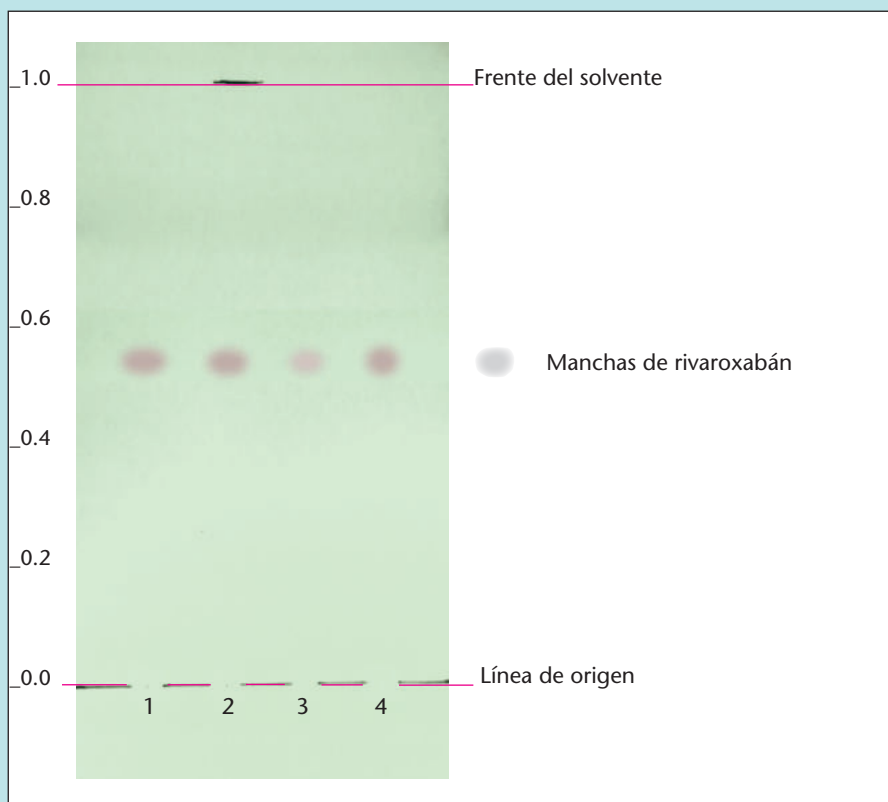
Fármaco de buena calidad con contenido  
aceptable en rivaroxabán

Recorrido No. 3:

Fármaco de calidad deficiente con conteni-  
do inaceptable bajo en rivaroxabán

Recorrido No. 4:

Estándar inferior de trabajo representando  
80% de contenido de rivaroxabán



XI. OBSERVACIONES HECHAS A 254 NM

Una mancha oscura a una distancia de recorrido de aproximadamente 0.53 indica la presencia de rivaroxabán en la solución de ensayo. Otras manchas fuertes generadas por la solución de ensayo apuntarían a otros fármacos o a la degradación del rivaroxabán, siendo este último caso más probable cuando se asocia a una mancha principal más pequeña. Una mancha principal más pequeña de la solución de ensayo también puede indicar un contenido pobre de rivaroxabán y una mancha ausente puede indicar una ausencia total de rivaroxabán. Los agentes activos relacionados, por ejemplo el apixabán, mostrarían un factor de retención relativo de aproximadamente 0.45 e incluso producen fluorescencia blanca cuando se observan bajo luz UV a 366 nm emitida por una potente lámpara de laboratorio. Los excipientes presentes en varios productos acabados pueden causar manchas más débiles que migran hasta el frente del disolvente o permanecen cerca o en la línea de origen. La lactosa permanece invisible, pero ensayos de coloración adicionales con ácido sulfúrico y calor indican que aparecería en torno a 0.10 si estuviera presente en la formulación.

XII. RESULTADOS Y MEDIDAS A TOMAR

La mancha de rivaroxabán 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 el ensayo desde el principio con una segunda muestra. El lote es rechazado, si el contenido del agente activo no puede verificarse en el tercer ensayo. 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. A efectos de documentación, tome fotos de todas las lecturas con una cámara digital o un smartphone.

## 7.113 Warfarina sódica incl. fenprocumon afin

### Primer cribado de las deficiencias del producto mediante ensayos físicos

#### I. ENSAYOS FÍSICOS

Durante la inspección visual, busque las deficiencias en el etiquetado, el envasado y las formas de dosificación, tal como se indica en los capítulos introductorios del manual principal, e informe de los resultados. Considere la posibilidad de hacer fotografías, por ejemplo, con la cámara de un teléfono inteligente. Cada comprimido suele contener 1, 2, 3 ó 5 mg de sal sódica de warfarina. Se sabe que existen otras dosis. Verifique el

peso total de los comprimidos o el peso de llenado de las cápsulas utilizando la balanza electrónica de bolsillo suministrada. Todas las formulaciones de comprimidos y cápsulas de warfarina de liberación rápida también deben pasar el ensayo de desintegración descrita al principio del manual principal. Deberán desintegrarse en agua a 37 °C en menos de 30 minutos. Si un fármaco de liberación rápida no pasa el ensayo, es una deficiencia importante.

#### II. 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 o almacenados en malas condiciones, deberán ser sometidos a un ensayo de cromatografía en capa fina.

### Verificación de la identidad y la cantidad mediante cromatografía en capa fina

#### I. PRINCIPIO

La warfarina sódica, con o sin contenido de isopropanol, se extrae de los comprimidos o cápsulas con un volumen conocido de metanol y luego se comprueba su identidad y contenido mediante cromatografía en capa fina (CCF) frente a un agente de referencia adecuado.

#### II. EQUIPOS Y REACTIVOS

- 1) Mano de mortero
- 2) Papel aluminio
- 3) Embudo
- 4) Espátula
- 5) Cinta adhesiva
- 6) Rotulador
- 7) Lápiz y regla
- 8) Viales de 10 ml
- 9) Juego de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
- 10) Juego de frascos de vidrio de laboratorio (25 a 100 ml)
- 11) Placas Merck CCF de aluminio con recubrimiento de gel de sílice 60 F<sub>254</sub> tamaño 5 x 10 cm
- 12) Microcapilares de vidrio de 2 µl de capacidad
- 13) Cuba cromatográfica (frasco de 500 ml)
- 14) Plancha de calefacción
- 15) Papel de filtro
- 16) Tijeras
- 17) Pinza
- 18) Luz ultravioleta de 254 nm
- 19) Cámara de manchado con yodo
- 20) Tolueno
- 21) Metanol
- 22) Acetato de etilo
- 23) Solución de ácido acético al 96%
- 24) Agente de referencia, p. ej. comprimidos de warfarina sódica de 5 mg

### III. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE DEL ESTÁNDAR

La preparación de la solución madre del estándar requiere de un producto auténtico usado como agente de referencia, por ejemplo, comprimidos que contengan 5 mg de sal sódica de warfarina. Se envuelve el comprimido usada como referencia en papel aluminio y se reduce a polvo fino usando la mano de mortero. Vaciar cuidadosamente el contenido del papel aluminio en un frasco de vidrio de laboratorio de 10 ml y enjuagar todas las cantidades de polvo restantes con 5 ml de metanol usando una pipeta graduada. Cerrar el frasco de laboratorio y agitar durante unos tres minutos hasta que se disuelva 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 1 mg de warfarina sódica total por ml y se debe rotular '*Solución madre del estándar de warfarina*'. Para cada ensayo se preparará una nueva solución. Se continúa trabajando con el líquido claro o turbio obtenido.

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

La solución madre del estándar no requiere de dilución posterior, ya presenta la concentración final de trabajo de 1 mg de warfarina sódica total por ml. Para una manipulación más cómoda, parte del líquido sobrenadante puede transferirse a un vial de 10 ml.

Esta solución estándar de trabajo representa un fármaco de buena calidad con un contenido de 100% de warfarina sódica.

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

Pipetear 2 ml de la solución madre del estándar en un vial de 10 ml y añadir 0.5 ml de metanol utilizando pipetas graduadas adecuadas. Cerrar y agitar el vial. La solución obtenida debe contener 0.8 mg de warfarina sódica total por ml y etiquetarse como '*Solución estándar de trabajo de warfarina al 80%*'.

Esta solución estándar de trabajo representa un producto farmacológico de baja calidad y bajo contenido de warfarina sódica de solo 80% de lo indicado en la etiqueta del producto. En la investigación actual, este nivel de warfarina sódica representa el límite inferior aceptable para un producto dado. Los límites de la farmacopea no se aplican en nuestro contexto.

### VI. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE DE LA MUESTRA A PARTIR DE UN PRODUCTO QUE DICE CONTENER 2 MG WARFARINA SÓDICA POR UNIDAD

Tomar tres comprimidos enteros o cápsulas de un medicamento adecuado muestreado en el campo. Como es habitual, los comprimidos se envuelven en papel de aluminio y se trituran hasta obtener un polvo fino. Transfiere todo el polvo obtenido a un frasco de vidrio de laboratorio de 25 ml. El polvo obtenido de las cápsulas de muestra debe colocarse directamente en el frasco añadiendo en último lugar los tapones vacíos y las carcasas del cuerpo. Para la extracción, añada 6 ml de metanol utilizando una pipeta graduada adecuada. A continuación, cerrar el frasco y agitar durante unos tres minutos hasta que se disuelva la mayor parte de los sólidos. Dejar reposar la solución durante otros cinco minutos hasta que los residuos no disueltos se asienten bajo el líquido sobrenadante.

#### 3 MG WARFARINA SÓDICA POR UNIDAD

Colocar el polvo obtenido de dos comprimidos o cápsulas de muestra entera un frasco de vidrio de laboratorio de 25 ml, añadir 6 ml de metanol con una pipeta graduada adecuada y extraer la warfarina sódica. Continuar trabajando como se ha descrito anteriormente.

#### 5 MG WARFARINA SÓDICA POR UNIDAD

Colocar el polvo obtenido de un comprimido o cápsula de muestra entera un frasco de vidrio de laboratorio de 10 ml, añadir 5 ml de metanol con una pipeta graduada adecuada y extraer la warfarina sódica. Continuar trabajando como se ha descrito anteriormente.

Todas las soluciones madre de muestra producidas deben contener finalmente 1 mg de warfarina sódica total por ml y ser etiquetadas como '*Solución madre de la muestra de warfarina*'. Estas soluciones se preparan frescas para cada ensayo. Siga trabajando con los líquidos sobrenadantes claros o turbios.

## VII. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE TRABAJO DE LA MUESTRA

Las soluciones madre de la muestra no requieren dilución adicional, puesto que ya representan la concentración final de 1 mg de warfarina sódica por ml. Si han sido preparadas a partir de fármacos de buena calidad, las concentraciones de warfarina sódica de estas soluciones deberán corresponder a la concentración de warfarina sódica de la solución estándar de trabajo superior elaborada arriba.

## VIII. APLICACIÓN DE LAS MUESTRAS

Marque una línea de origen paralela a unos 1.5 cm del borde inferior de la placa cromatográfica y aplique 2 µl de cada solución de ensayo y del estándar como se muestra en la imagen de al lado, utilizando las pipetas microcapilares suministradas.

Pueden colocarse hasta cinco manchas en una placa. Comprobar la uniformidad de todas las manchas utilizando luz UV de 254 nm. Todas las manchas deben tener forma circular y estar igualmente espaciadas a lo largo de la línea de origen. Aunque sus intensidades pueden diferir, sus diámetros nunca deberían hacerlo. Las diferentes intensidades se deben a cantidades residuales de excipientes o a diferentes activos y concentraciones en las soluciones de la muestra. Una diferencia en el tamaño de la mancha, sin embargo, se relaciona con una mala mancha. Repita este paso si no se consigue una siembra homogénea de las muestras la primera vez.

Deje que las manchas se sequen al aire durante uno o dos minutos hasta que el metanol haya desaparecido casi por completo. Evite cualquier secado con calor.

## IX. DESARROLLO DEL CROMATOGRAMA

Utilizando pipetas graduadas adecuadas, añada 15 ml de tolueno, 5 ml de acetato de etilo y 1 ml de solución de ácido acético al 96% al frasco que se utilizará como cuba cromatográfica. Cerrar la cuba y mezclar bien. Forrar la pared de la cuba con papel de filtro y esperar unos 15 minutos, asegurando así la saturación de la cuba con vapor de disolvente. Colocar con cuidado la placa de CCF cargada en el frasco. Cerrar el frasco y desarrollar la placa hasta que el frente del disolvente se haya desplazado unas tres cuartas partes de la longitud de la placa, siendo el tiempo de desarrollo de unos 15 minutos. Retire la placa CCF de la cuba, marque el frente de disolvente y deje que el exceso de disolvente se evapore por secado suave. Para ello, mantenga la cromatoplaca con la pinza suministrada en la corriente de aire caliente directamente encima de la placa calefactora durante unos dos minutos. Agitar constantemente la placa de CCF y, cada vez que la cromatoplaca se desplace hacia abajo, dejar que su parte inferior toque la superficie de la placa calefactora durante fracciones de segundo.

## X. DETECCIÓN DE LOS AGENTES ACTIVOS

Después de secar todos los residuos de disolvente, ver la placa de cromatografía bajo luz ultravioleta a 254 nm con la lámpara accionada por batería suministrada. Para una mayor identificación y cuantificación de la warfarina, manchar la placa cromatográfica con vapores de yodo. Observar de nuevo la placa cromatográfica manchada bajo luz UV a 254 nm. Algunas manchas observadas previamente pueden aparecer más intensas, lo que permite una mejor lectura. Todos los métodos de detección anteriores se aplican también al fenprocumon, un principio activo farmacéutico estrechamente relacionado con la warfarina.

## XI. OBSERVACIONES HECHAS A 254 NM

Una mancha oscura a una distancia de recorrido de aproximadamente 0.38 indica la presencia de warfarina en la solución de ensayo. Otras manchas fuertes generadas por la solución de ensayo apuntarían a otros fármacos o a la degradación de warfarina, siendo este último caso más probable cuando se asocia a una mancha principal más pequeña.



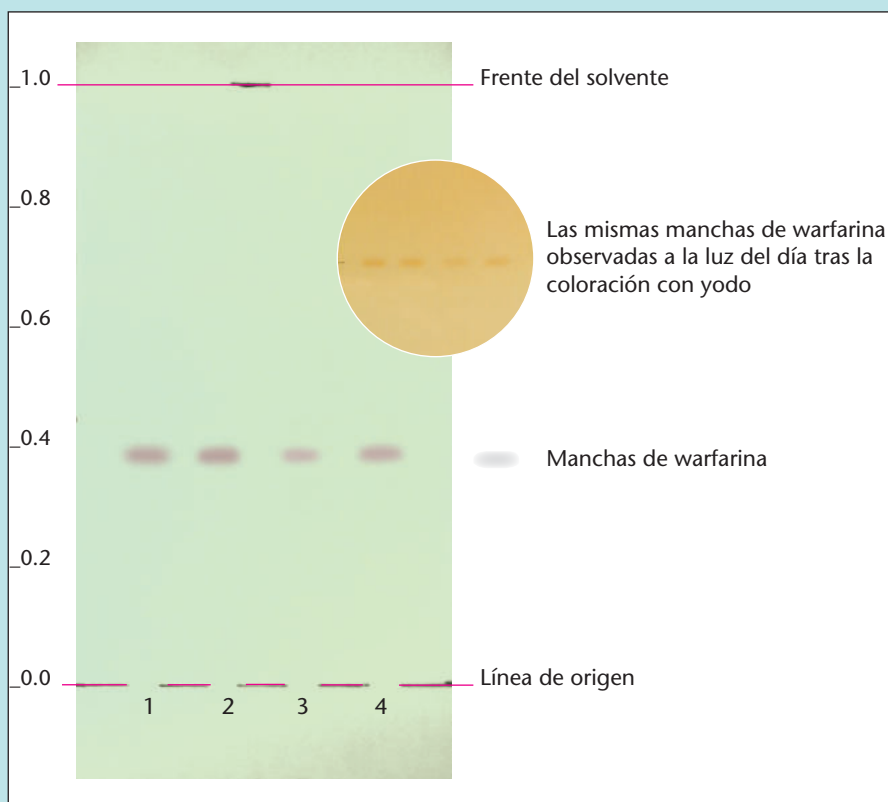
PLACA CROMATOGRÁFICA VISTA BAJO  
LUZ ULTRAVIOLETA DE 254 NM

Recorrido No. 1:  
Estándar superior de trabajo representando  
100% de contenido de warfarina

Recorrido No. 2:  
Fármaco de buena calidad con contenido  
aceptable en warfarina

Recorrido No. 3:  
Fármaco de calidad deficiente con conteni-  
do inaceptable bajo en warfarina

Recorrido No. 4:  
Estándar inferior de trabajo representando  
80% de contenido de warfarina



Una mancha principal más pequeña de la solución de ensayo también puede indicar un contenido pobre de warfarina y una mancha ausente puede indicar una ausencia total de warfarina. El fenprocumon, estrechamente relacionado, mostraría un factor de retención relativo de aproximadamente 0.52. Los excipientes presentes en varios productos acabados pueden causar manchas más débiles que migran hasta el frente del disolvente o permanecen cerca o en la línea de origen.

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

Cuando la placa de TLC se expone de nuevo al vapor de yodo, todas las manchas de warfarina observadas anteriormente a 254 nm pasan a ser de color marrón claro, con diferentes tonos y tamaños que indican diferentes concentraciones de warfarina. El fenprocumon se comporta de forma muy similar en este caso. Sin embargo, la coloración es relativamente débil para ambos compuestos.

XIII. RESULTADOS Y MEDIDAS A TOMAR

La mancha de warfarina 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 el ensayo desde el principio con una segunda muestra. El lote es rechazado, si el contenido del agente activo no puede verificarse en el tercer ensayo. 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. A efectos de documentación, tome fotos de todas las lecturas con una cámara digital o un smartphone.

- Detección de medicamentos falsificados y de calidad inferior en los países de ingresos bajos y medios
- Protección de los consumidores y de las cadenas de suministro de medicamentos
- Impulsar la capacidad de ensayo de medicamentos prioritarios
- Asistencia en el seguimiento de la calidad de los medicamentos después de su comercialización
- Complementar el trabajo de los laboratorios de control de medicamentos existentes

El GPHF-Minilab™  
es un laboratorio en miniatura  
único que viene con métodos de ensayo asequibles  
para una detección rápida y fácil de medicamentos falsificados y de  
calidad inferior como tecnología de nivel inicial para los entornos de salud con  
recursos limitados en países de ingresos bajos y medios.

En más de veinte años de trabajo en proyectos, el GPHF-Minilab™ ha demostrado  
su idoneidad en más de 100 países.

Este suplemento del Manual Minilab amplía la lista de medicamentos cardiovasculares a un total  
de veinte principios activos farmacéuticos, incluidas sus combinaciones a dosis fijas para tratar  
trastornos cardiovasculares.

El inventario de métodos del Manual Minilab incluye ahora una colección de métodos  
de ensayo para 113 principios activos farmacéuticos para la verificación  
rápida de la calidad de una amplia gama de productos  
farmacéuticos acabados.



Global Pharma Health Fund  
[www.gphf.org](http://www.gphf.org)