

Manual

Para usuarios de GPHF-Minilab™

Edición especial 2024
Detección de anticongelantes
peligrosos en líquidos de uso
oral incl. video tutorial

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

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.

Introducción y ámbito

I. CRIBADO DE INCUMPLIMIENTOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA *

El dietilenglicol (DEG) y el etilenglicol (EG) son sustancias tóxicas utilizadas como disolventes industriales y agentes anticongelantes, potencialmente mortales incluso en pequeñas cantidades, especialmente para los niños. Aunque se desconocen los niveles exactos de ingestión segura de DEG y EG, se considera que un nivel de detección del 0,1% para cada sustancia es adecuado para analizar las materias primas y los productos acabados. La cromatografía de gases (GC) es una técnica precisa y exacta ampliamente utilizada para analizar DEG y EG en productos farmacéuticos. Los Laboratorios Nacionales de Control de Calidad (LNCC) que no tienen acceso a la GC pueden utilizar la cromatografía en capa fina (CCF) para detectar DEG y EG en concentraciones de hasta un 0,2%

(m/m). Sin embargo, los límites de detección pueden variar entre laboratorios, y los analistas deben verificar estos límites. La CCF no puede distinguir entre DEG y EG, por lo que la concentración combinada de ambos contaminantes se determina utilizando una mezcla 50:50 (m/m) para la calibración. Dada la naturaleza semicuantitativa de la CCF y su posible límite de detección por encima del umbral de seguridad del 0,1%, existe el riesgo de pasar por alto productos con concentraciones individuales de DEG o EG superiores al 0,1% pero inferiores al límite de detección. Por ejemplo, con un límite de detección del 0,5%, una muestra con un 0,3% de DEG y sin EG daría un resultado falso negativo. Para mitigar este riesgo, los LNCC que utilicen CCF deberían considerar la confirmación de los resultados en laboratorios colaboradores o centros regionales que utilicen GC. A la espera de su inclusión en la *Farmacopea Internacional*, los grupos

de trabajo implicados en los ensayos de impurezas DEG/EG han expresado su deseo de transferir el método de cribado CCF DEG/EG existente al kit móvil Minilab CCF.

II. RESULTADOS Y MEDIDAS A TOMAR

Los Laboratorios Nacionales de Control de Calidad de Medicamentos con acceso a la cromatografía de gases (GC) deberían utilizarla directamente para los ensayos de confirmación en lugar del método de detección CCF. La GC es al menos dos veces más sensible que la CCF, detectando concentraciones de DEG o EG tan bajas como 0,1% (m/m). La GC también puede analizar excipientes utilizados en la fabricación de productos farmacéuticos. Los laboratorios que confirmen la contaminación por DEG o EG en excipientes o productos acabados deben informar inmediatamente a las autoridades reguladoras.

Ensayos de límites y niveles seguros mediante cromatografía en capa fina

I. PRINCIPIO

Un nivel de detección del 0,1% para DEG y EG se considera adecuado para el cribado de productos farmacéuticos acabados. Se mide una concentración combinada de DEG y EG, utilizando una mezcla 50:50 (m/m) para la calibración. Para el ensayo límite, los niveles de DEG y EG en los líquidos orales deben estar por debajo de la solución de calibración combinada más baja del 0,2% de DEG/EG. Dado que esta solución de calibración inferior es difícilmente detectable, no deben aparecer manchas correspondientes en las soluciones de muestra investigadas. O bien, si se detecta una mancha correspondiente, las soluciones de muestra contienen DEG/EG por encima del nivel de seguridad.

II. EQUIPOS Y REACTIVOS

- 1) Papel aluminio
- 2) Embudo
- 3) Espátula
- 4) Cinta adhesiva
- 5) Rotulador
- 6) Lápiz y regla
- 7) Viales de 10 ml
- 8) Juego de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
- 9) Juego de frascos de vidrio de laboratorio (25 a 100 ml)
- 10) Placas Merck CCF de aluminio con recubrimiento de gel de sílice 60 F₂₅₄ tamaño 5x10 cm
- 11) Microcapilares de vidrio (2-µl de capacidad)
- 12) Cuba cromatográfica (frasco de 500 ml)
- 13) Plancha de calefacción
- 14) Papel de filtro
- 15) Tijeras
- 16) Pinza
- 17) Beaker de plástico de 250 ml para colorear por inmersión
- 18) Permanganato potásico
- 19) Carbonato sódico (anhidro)
- 20) Hidróxido de sodio (granulado)
- 21) Tolueno
- 22) Acetona
- 23) Metanol
- 24) Amoníaco en solución al 25%
- 25) Agua destilada/del grifo/embotellada
- 26) Balanza electrónica de bolsillo
- 27) Agentes de referencia, por ejemplo dietilenglicol (DEG) y etilenglicol (EG) como sustancias puras de fuentes comerciales

III. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE DE CALIBRACIÓN

Para la preparación de la solución madre de calibración se requiere una mezcla de DEG/EG 50:50 (m/m), para lo cual el DEG y el EG se obtienen como sustancia pura con una pureza de casi el 100 % de fuentes comerciales. Utilizando la balanza electrónica de bolsillo y un frasco de vidrio de laboratorio de 50 ml suministrado, pesar correctamente unos 0,3 g de dietilenglicol puro y 0,3 g de etilenglicol puro. Para vencer la inercia dinámica de la balanza y garantizar lecturas correctas, levante el frasco de laboratorio o golpee el platillo de pesada con un bolígrafo o una espátula cada vez que se hayan añadido algunos miligramos más. Diluir con 29,4 ml de metanol utilizando una pipeta graduada adecuada. Ajustar la cantidad de metanol cuando el resultado de la pesada difiera del peso objetivo. Cerrar el frasco de laboratorio y agitar hasta que se disuelva toda la mezcla de DEG/EG. La solución obtenida debe contener 10 mg de dietilenglicol total y 10 mg de etilenglicol total por ml y etiquetarse como '*Solución madre de calibración de DEG/EG*'. Lo ideal es que esta solución se prepare fresca para cada ensayo, aunque parece ser estable durante varios días si se utiliza repetidamente. La solución final obtenida debe ser clara e incolora.

IV. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE CALIBRACIÓN DE TRABAJO 1%

Pipetear 0,5 ml de la solución madre en un vial de 10 ml y añadir 9,5 ml de metanol. Cerrar y agitar el vial. La solución obtenida debe contener 1,0 mg de DEG/EG total por ml y etiquetarse como '*Solución de calibración de trabajo DEG/EG 1%*'.

V. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE CALIBRACIÓN DE TRABAJO 0,5%

Pipetear 0,2 ml de la solución madre en un vial de 10 ml y añadir 7,8 ml de metanol. Cerrar y agitar el vial. La solución obtenida debe contener 0,5 mg de DEG/EG total por ml y etiquetarse como '*Solución de calibración de trabajo DEG/EG 0,5%*'.

VI. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE CALIBRACIÓN DE TRABAJO 0,2%

Pipetear 0,2 ml de la solución madre en un vial de 25 ml y añadir 19,8 ml de metanol. Cerrar y agitar el vial. La solución obtenida debe contener 0,2 mg de DEG/EG total por ml y etiquetarse como '*Solución de calibración de trabajo DEG/EG 0,2%*'.

VII. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE TRABAJO DE LA MUESTRA

Utilizando la balanza electrónica de bolsillo y un frasco de vidrio de laboratorio de 10 ml suministrado, pese correctamente aproximadamente 1 g de solución de muestra. Para superar la inercia dinámica de la balanza y garantizar lecturas correctas, levante el frasco de laboratorio o golpee el platillo de pesada con un bolígrafo o una espátula cada vez que se hayan añadido unos miligramos más. Diluir con 9 ml de metanol utilizando una pipeta graduada adecuada. Ajustar la cantidad de metanol cuando el resultado de la pesada difiera del peso objetivo. Cerrar el frasco de laboratorio y agitar hasta que se haya disuelto toda la muestra. La solución obtenida debe contener 100 mg de muestra total por ml y etiquetarse como '*Solución de trabajo de la muestra*'. Esta solución debe ser recién preparada para cada ensayo. Puede producirse precipitación o separación de fases. Seguir trabajando con el líquido metanólico sobrenadante claro o turbio.

Si se dispone de información sobre los excipientes y sustancias activas del preparado líquido oral que se va a analizar, preparar soluciones adicionales disolviendo una cantidad adecuada de cada uno de los compuestos en un volumen apropiado de metanol y filtrando si es necesario.

VIII. SEMBRAR LAS MUESTRAS

Trazar una línea de origen paralela al borde inferior de la placa cromatográfica y a unos 1,5 cm del mismo. Utilizando pipetas microcapilares, aplique 2 µl de cada solución de ensayo y de calibración como se muestra en la imagen de la página siguiente. Coloque hasta cinco puntos en la placa, asegurándose de que sean circulares, uniformes y estén espaciados uniformemente. Se aceptan variaciones en la intensidad de las manchas, pero los diámetros deben ser uniformes. Si los tamaños de las manchas difieren, repita el paso.

Seque suavemente las manchas sujetando la placa cromatográfica con unas pinzas en una corriente de aire caliente por encima de la placa calefactora durante unos 10 segundos. Agite constantemente la placa de CCF y deje que su parte inferior toque la superficie de la placa calefactora durante fracciones de segundo al moverla hacia abajo.

IX. DESARROLLO DEL CROMATOGRAMA

Utilizando pipetas graduadas adecuadas y una pipeta de transferencia, añadir 17 ml de acetona, 1 ml de tolueno, 1,9 ml de agua y 2 gotas de solución de amoníaco 25% al frasco que sirve de cuba cromatográfica. Cerrar la cámara y mezclar bien. Cubra la pared de la cuba con papel de filtro y espere unos 15 minutos para asegurar la saturación de la cuba con vapor de disolvente. Colocar con cuidado la placa de CCF cargada en el frasco. Cerrar el frasco y revelar la placa hasta que el frente de disolvente se haya desplazado unas tres cuartas partes de la longitud de la placa, siendo el tiempo de revelado de unos 12 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, sujete la placa cromatográfica con las pinzas suministradas en la corriente de aire caliente directamente encima de la placa calefactora durante aproximadamente un minuto. Agitar constantemente la placa de CCF y, cada vez que la cromatopla se desplace hacia abajo, dejar que su parte inferior toque la superficie de la placa calefactora durante fracciones de segundo.

X. DETECCIÓN DE IMPUREZAS

Manchar la placa cromatográfica desarrollada con una solución de permanganato potásico. Preparar la solución disolviendo 125 mg de hidróxido sódico, 3,7 g de carbonato sódico anhidro y 1,5 g de permanganato potásico en 200 ml de agua. Es aceptable una ligera turbidez tras la disolución del carbonato sódico. Utilizar el vaso de precipitados de plástico de 250 ml suministrado para trabajar con la solución, que podrá conservarse en un recipiente de laboratorio cerrado a temperatura ambiente durante al menos un mes. Sumerja la placa de CCF en la solución utilizando unas pinzas, retírela inmediatamente, deje que el exceso de solución se escurra por el lado largo izquierdo de la placa sobre una toalla de papel y seque el reverso con un pañuelo de papel. Utilizando el lado largo izquierdo, las posibles rayas se desplazan en la dirección menos perturbadora. Al máximo nivel de calentamiento, secar toda la placa cromatográfica sobre una placa caliente durante unos dos o tres minutos, colocando tres placas de CCF como separadores para evitar el calor directo. Obsérvense las manchas de dietilenglicol y etilenglicol de las soluciones de calibración y otras manchas de las soluciones de ensayo que se hacen visibles a medida que la solución de permanganato se decolora debido a la presencia de compuestos oxidables para revelar manchas entre amarillentas y blancas. Leer la placa de CCF por segunda vez tras un período de reposo de unos 10 minutos. El proceso también puede realizarse pulverizando la solución y secándola con un secador de pelo, pero ambos procedimientos requieren una práctica repetida para perfeccionarlos. El ensayo de CCF es válido si las manchas de DEG/EG de la solución de calibración al 0,5% son visibles. La coloración por inmersión se ilustra en la página 36 del manual principal, y se puede ver el vídeo correspondiente utilizando el código QR proporcionado aquí.



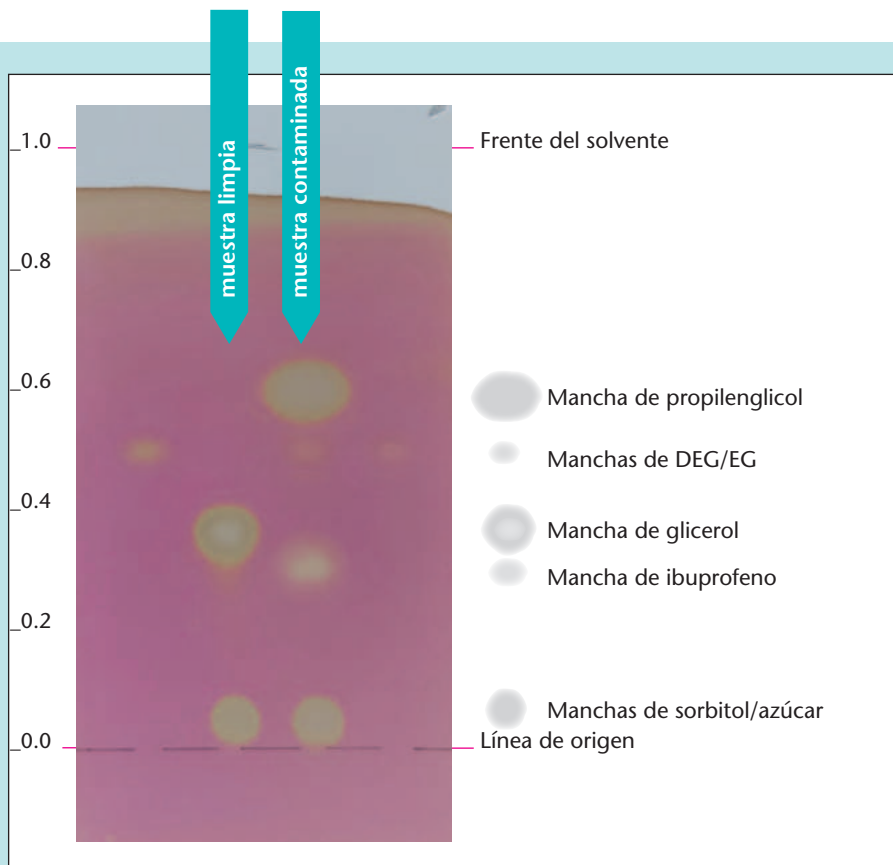
PLACA CROMATOGRÁFICA VISTA A LA LUZ DEL DÍA TRAS MANCHADO CON PERMANGANATO

Recorrido No. 1:
Solución de calibración de trabajo 0,5%
(Límite de validez del método/la mancha debe ser visible)

Recorrido No. 2:
Jarabe limpio no medicinal a base de glicerol y azúcar

Recorrido No. 3:
Jarabe de ibuprofeno contaminado a base de propilen-glicol y azúcar

Recorrido No. 4:
Solución de calibración de trabajo 0,2%
(Valor límite DEG/EG)



XI. OBSERVACIONES HECHAS A LA LUZ DEL DÍA TRAS MANCHADO CON PERMANGANATO

Tras la coloración con solución de permanganato, se forma un fondo púrpura oscuro. Los compuestos sensibles a la solución de visualización se vuelven de amarillo claro a blanco, haciendo que la placa de CCF aparezca como negativa. Pequeñas manchas amarillentas a una distancia de recorrido de aproximadamente 0,51 indican la presencia de dietilenglicol o etilenglicol, o ambos, que superan el límite. Las manchas fuertes a varias distancias de recorrido sugieren otros ingredientes: una mancha blanca a aprox. 0,62 indica propilenglicol, a aprox. 0,37 indica glicerol, a aprox. 0,30 indica ibuprofeno y a aprox. 0,06 cerca de la línea de origen indica sorbitol o sacarosa. Dependiendo de los ingredientes que contenga el líquido oral, pueden aparecer otras manchas más marcadas. Las manchas pueden solaparse debido a su proximidad o tamaño. Otros excipientes contenidos en diversos productos acabados, como los edulcorantes artificiales, los conservantes y los colorantes, pueden no causar manchas o causar manchas débiles, migrando hacia el frente del disolvente o permaneciendo cerca del origen.

XII. RESULTADOS Y MEDIDAS A TOMAR

El ensayo sólo es válido si el cromatograma de la solución de calibración al 0,5% muestra una mancha de dietilenglicol/etilenglicol (DEG/EG). Determine el límite de detección evaluando las manchas de DEG/EG en los cromatogramas de las soluciones de calibración al 1%, 0,5% y 0,2% realizando una segunda corrida. La muestra pasa claramente el ensayo si no hay ninguna mancha o si hay una mancha de DEG/EG por debajo del tamaño de mancha de la solución de calibración al 0,2%. Aunque este método de CCF ayuda a los Laboratorios Nacionales de Control de Calidad de Medicamentos con menos recursos a detectar productos adulterados, deben considerar formas de reducir los falsos negativos, como confirmar los resultados en laboratorios colaboradores o centros regionales mediante cromatografía de gases (GC). Los laboratorios que dispongan de equipos de GC deberán confirmar los resultados directamente con GC, obviando el cribado por CCF para detectar la no conformidad. Si se confirma la contaminación por DEG o EG en excipientes o productos acabados, notifíquelo inmediatamente a las autoridades reguladoras, ponga en cuarentena los lotes afectados y conserve las muestras como referencia. Documente todas las lecturas de CCF con fotos digitales.

Artículos adicionales necesarios en el inventario del Minilab

Además del kit GPHF-Minilab™ existente, deben añadirse los siguientes artículos al inventario Minilab para poder realizar el nuevo protocolo de ensayo de impurezas de dietilenglicol (DG) y etilenglicol (EG).

Los datos de contacto para la adquisición de kits GPHF-Minilab™ y artículos adicionales para el ensayo de impurezas DEG/EG son los siguientes:

Technologie Transfer Marburg (TTM)
Industriestrasse 10
35091 Cölbe, Alemania
Correo electrónico: ttm@ttm-germany.de
Tel: +49-6421-8737-30
Fax: +49-6421-8737-37

Sustancias de referencia del GPHF-Minilab

Sustancias de referencia en el control de impurezas

Nº ref.	Artículo	Cant.
AG030206	Dietilenglicol, 100 g	1
AG030207	Etilenglicol, 25 g	1

Solventes y Químicos del GPHF-Minilab

Químicos con grado 'reactivo analítico comercial'

Nº ref.	Artículo	Cant.
AG010042	Permanganato potásico, 25 g	1
AG010043	Carbonato sódico (anhidro), 300 g	1
AG010044	Hidróxido de sodio (granulado), 100 g	1

* Este nuevo protocolo de ensayo GPHF-Minilab™ se basa en el procedimiento 'Los ensayos para el dietilenglicol y el etilenglicol en preparaciones líquidas para uso oral', que se propuso como nuevo capítulo para su inclusión en 'La Farmacopea Internacional' el 31 de octubre de 2023. Se puede acceder a la versión completa del procedimiento propuesto a través del siguiente enlace: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/medicines/pharmacopoeia/2023-11-16-deg-eg-inliquidoral-dosage-forms-qas22-922rev3.pdf?sfvrsn=284f645d_1 Este enlace al documento de trabajo QAS/23.922/rev3 fue consultado por última vez en julio de 2024.

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

Esta edición especial para el manual Minilab amplía los ensayos de principios activos farmacéuticos
a los ensayos de excipientes farmacéuticos. Más concretamente, los ensayos de preparados líqui-
dos para uso oral se amplían para incluir la presencia de agentes anticongelantes, por ejemplo,
impurezas de dietilenglicol y etilenglicol..

El inventario de métodos del Manual Minilab incluye ahora una colección de métodos
de ensayo para 119 principios activos farmacéuticos, así como un ensayo
de impurezas para la verificación rápida de la calidad de una
amplia gama de productos farmacéuticos acabados.



Global Pharma Health Fund
www.gphf.org