

# Manual

Para usuarios del GPHF-Minilab®

Suplemento 2012

Volumen II

## ENSAYOS CON CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA



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



**USAID**  
FROM THE AMERICAN PEOPLE



PROMOTING THE QUALITY OF MEDICINES

## SUPLEMENTO 2012 AL VOLUMEN II DE ENSAYOS CON CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

### Autores

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

\* \* \*

### Revisado por

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

\* \* \*

### Publicado por

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

\* \* \*

Copyright © de GPHF & USP PQM

\* \* \*

### Agradecimientos

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

\* \* \*

### Acerca del proyecto GPHF-Minilab®

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

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

Desde hace largo tiempo, los minilaboratorios GPHF-Minilab® han venido actuando como primera línea de defensa contra los medicamentos falsificados y de baja norma, que amenazan la salud de millones de habitantes de los países subdesarrollados y en vía de desarrollo. Hasta la fecha un total de más de 500 minilaboratorios han sido suministrados en más de 80 países de África, la región del Pacífico, Asia y Latinoamérica.

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

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

\* \* \*

Diseño e impresión: Grimm Grafik Design, Ochsenfurt, Alemania

Capítulo	Página
Nuevos Procedimientos Individuales de Ensayo con Cromatografía.....	4
<i>Suplemento al Volumen II, Capítulo 6</i>	
<i>Medicamentos antipalúdicos en combinaciones fijas a base de artesunato:</i>	
6.58 Artesunato (incl. formulaciones combinadas comunes).....	4
6.59 Amodiaquina (incl. formulaciones combinadas con artesunato).....	8
6.60 Mefloquina (incl. formulaciones combinadas con artesunato).....	12
6.61 Pirimetamina (incl. formulaciones combinadas con artesunato y sulfamidas).....	16
6.62 Pironaridina (como tetrafosfato, incl. formulaciones combinadas con artesunato).....	20
6.63 Sulfadoxina (incl. formulaciones combinadas con pirimetamina y artesunato).....	24
6.64 Sulfametoxipirazina (incl. formulaciones combinadas con pirimetamina y artesunato).....	28
Cuadro de Resumen de Procedimientos de Ensayo con Cromatografía.....	32
<i>Suplemento al Volumen II, Capítulo 7</i>	
Listado Actualizado de Estándares de Referencia para el GPHF-Minilab®.....	33
<i>Suplemento al Volumen II, Capítulo 10</i>	
Salud & Seguridad.....	35

## 6.58 Artesunato (incl. formulaciones combinadas comunes)

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

#### I. INSPECCIÓN FÍSICA

Buscar las deficiencias en el etiquetado, el envase y en las formas farmacéuticas, tal y como se describe en los capítulos sobre métodos y operaciones generales en el manual principal. Usar el formulario de reporte como guía para anotar cualquier particularidad del producto. Inicialmente administrado como medicamento de agente activo único, se ha vuelto mucho más común la terapia artesunato combinada con otros medicamentos antipalúdicos. Las tabletas o cápsulas apropiadas usualmente consisten por una parte de artesunato y por otra de amodiaquina, mefloquina, pironaridina, pirimetamina, sulfadoxina o sulfametoxipirazina. La dosis de artesunato en los medicamentos de dosis fijas es usualmente de entre 25 y 200 mg.

#### II. ENSAYO DE DISGREGACIÓN

Combinadas o no con otros agentes antipalúdicos, todas las tabletas y cápsulas de liberación rápida de artesunato deben pasar el ensayo de disgregación, tal y como está descrito en los capítulos sobre métodos y operaciones generales en el manual principal. Deberán disgregarse en agua a 37 °C en menos de 30 minutos. Si el producto no pasa esta prueba, esto constituye un signo de deficiencia importante.

#### III. RESULTADOS & MEDIDAS A TOMAR

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

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

#### I. PRINCIPE

Combinado o no con otros agentes antipalúdicos, el artesunato se extrae de tabletas y cápsulas con metanol y se determina con cromatografía en capa fina (CCF) con referencia a un estándar secundario. Todos los procedimientos descritos en ésta monografía sirven para la detección del artesunato en las presentaciones de dosis única y combinada en las formas sólidas para administración oral. Para la verificación rápida de la calidad de la amodiaquina, la mefloquina, la pironaridina, la pirimetamina, la sulfadoxina o la sulfametoxipirazina en las combinaciones corrientes consulte los protocolos adecuados descritos en éste manual.

#### II. EQUIPOS Y REACTIVOS

- |  |   |
|--|---|
| 1) Pistilo   | 12) Cámara de revelado para CCF (frasco de 500 ml)                      |
| 2) Papel aluminio  | 13) Plancha   |
| 3) Embudo  | 14) Papel de filtro   |
| 4) Cinta adhesiva  | 15) Tijeras   |
| 5) Rotulador   | 16) Pinza   |
| 6) Lápiz y regla   | 17) Luz ultravioleta de 254 nm  |
| 7) Viales de 10 ml   | 18) Cámara de sumersión (frasco plástico de 250 ml)                     |
| 8) Juego de pipetas graduadas (1 a 25 ml)  | 19) Ácido sulfúrico (solución al 96%)                                   |
| 9) Juego de frascos de vidrio de laboratorio (25 a 100 ml)   | 20) Acetona   |
| 10) Placas Merck CCF de aluminio con recubrimiento de gel de sílice 60 F <sub>254</sub> tamaño 5x10 cm | 21) Acetato de etilo  |
| 11) Microcapilares de vidrio (2-µl de capacidad)   | 22) Ácido acético puro  |
|  | 23) Metanol   |
|  | 24) Estándar de referencia, por ejemplo tabletas de artesunato de 50 mg |

III. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE DEL ESTÁNDAR

La preparación de la solución madre del estándar requiere de un producto auténtico usado como referencia, por ejemplo, tabletas con contenido de 50 mg de artesunato. Se envuelve la tableta usada como referencia en papel aluminio y se reduce a polvo fino usando el pistilo. Se desocupa cuidadosamente el contenido del papel aluminio en un frasco de vidrio de laboratorio de 25 ml y se enjuagan todos los residuos sólidos con 10 ml de metanol utilizando una pipeta graduada adecuada. Se cierra el frasco y se agita por unos tres minutos, hasta que se haya disuelto la mayor parte de los sólidos. Se deja reposar la solución por unos cinco minutos más, para que los residuos no disueltos se asienten en el fondo del frasco. La solución obtenida debe contener un total de 5 mg de artesunato por ml y se rotula 'Solución madre del estándar de artesunato'. La solución se prepara fresca para cada ensayo. Se continúa el trabajo con el líquido claro o turbio sobrenadante.

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

La solución madre del estándar no requiere de dilución posterior, habiendo alcanzado la concentración superior de trabajo de 5 mg de artesunato por ml. Para un manejo más conveniente, se puede transferir un poco del líquido sobrenadante a un vial de 10 ml y se rotula 'Solución estándar de trabajo de artesunato al 100%'.

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

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

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

Ésta solución estándar de trabajo representa un producto farmacológico de baja calidad, con contenido de artesunato de solo 80% de lo indicado en la etiqueta. En la investigación actual, éste nivel de contenido de fármaco representa el límite de concentración inferior aceptable de un determinado producto.

VI. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE DE LA MUESTRA DE UN PRODUCTO QUE DICE CONTENER 25 MG DE ARTESUNATO POR UNIDAD

Se toman dos (!) tabletas o cápsulas completas de las muestras recogidas durante el trabajo de campo. De acuerdo con el procedimiento usual, las tabletas se envuelven en papel aluminio y se trituran hasta obtener un polvo fino. Se transfiere todo el polvo obtenido a un frasco de laboratorio de 25 ml. Para el caso de las cápsulas, se desocupa primero el polvo contenido en la cápsula de la muestra, seguido de la tapa y el cuerpo, directamente en el frasco. Para la extracción se añaden 10 ml de metanol utilizando una pipeta graduada. Se tapa el frasco y se agita por unos tres minutos, hasta que la mayor parte de los sólidos se haya disuelto. Se deja reposar la solución por unos cinco minutos más, hasta que los residuos que no se hayan disuelto queden asentados en el fondo del frasco.

50 MG DE ARTESUNATO POR UNIDAD

Se toma una tableta o cápsula completa de la muestra y se extrae el polvo obtenido con 10 ml de metanol. Se continúa trabajando de la forma descrita anteriormente.

60 MG DE ARTESUNATO POR UNIDAD

Se toma una tableta o cápsula completa de la muestra y se extrae el polvo obtenido con 12 ml de metanol. Se continúa trabajando de la forma descrita anteriormente.

100 MG DE ARTESUNATO POR UNIDAD

Se toma una tableta o cápsula completa de la muestra y se extrae el polvo obtenido con 20 ml de metanol. Se continúa trabajando de la forma descrita anteriormente.

200 MG DE ARTESUNATO POR UNIDAD

Se toma una tableta o cápsula completa de la muestra y se extrae el polvo obtenido con 40 ml de metanol. Se continúa trabajando de la forma descrita anteriormente.

Combinadas o no con otros agentes antipalúdicos, todas las soluciones madre producidas deberán contener finalmente 5 mg de artesunato por ml y rotularse 'Solución madre de la muestra de artesunato'. Las soluciones se preparan frescas para cada ensayo. Se continúa el trabajo con los líquidos claros o turbios sobrenadantes.

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

Las soluciones madre de las muestras no requieren de dilución posterior, ya que representan la concentración final de 5 mg de artesunato por ml. Si han sido preparadas a partir de fármacos de buena calidad, la concentración de artesunato de estas soluciones deberán corresponder a la solución estándar de trabajo superior elaborada arriba.

## VIII. APLICACIÓN DE LOS PUNTOS

Se traza una línea de origen paralela a una distancia de 1.5 cm del extremo inferior de la placa cromatográfica y se aplican con los microcapilares suministrados 2 microlitros ( $\mu$ l) de la solución de ensayo y del estándar como se indica en la fotografía.

Hasta cinco puntos se pueden aplicar sobre una placa. Compruébese la uniformidad de los puntos utilizando luz ultravioleta de 254 nm. Aunque el artesunato por sí mismo permanezca invisible, los excipientes y demás componentes del medicamento se harán visibles para facilitar la identificación. Todos los puntos deberán tener forma circular y ser aplicados equidistantes sobre la línea de origen. Aunque las intensidades puedan diferir, los diámetros nunca deben hacerlo. Las diferencias de intensidad se deben a la cantidad de excipientes residuales contenidos en las tabletas o cápsulas o a la diferente concentración de agentes activos en las soluciones de muestra. Una diferencia en el tamaño de los diámetros es resultado de un deficiente procedimiento de aplicación. Por lo tanto, se deberá repetir el procedimiento hasta que el diámetro de los puntos sea homogéneo.

## IX. REVELADO DE LA PLACA CROMATOGRÁFICA

Se pipetea 18 ml de acetato de etilo, 4 ml de acetona y exactamente 0.1 ml de ácido acético puro al frasco a utilizarse como cámara de revelado. Se tapa la cámara y se mezcla muy bien. Se recubre la pared de la cámara con papel filtro y se espera por unos 15 minutos para asegurar la saturación de la cámara con el vapor del solvente. Cuidadosamente se coloca la placa CCF cargada en el frasco. Se cierra el frasco y se revela la placa cromatográfica hasta que el frente del solvente haya cubierto aproximadamente las tres cuartas partes de la longitud de la placa, siendo el tiempo requerido para el revelado de unos 10 minutos. Se retira la placa de la cámara, se marca la línea del frente del solvente y se permite la evaporación del excedente de solvente, utilizando una plancha caliente de ser necesario.

## X. DETECCIÓN DE LOS AGENTES ACTIVOS

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

Una vez verificada la presencia o ausencia de otros agentes activos, se expone la placa CCF al manchado con ácido sulfúrico para la detección del artesunato mediante el siguiente procedimiento: se llena el frasco plástico de 250 ml de capacidad con 190 ml de metanol, seguidos de 10 ml de solución concentrada de ácido sulfúrico y se mezcla suavemente. Se deja reposar la mezcla para que enfríe. Utilizando una pinza se sumerge la placa CCF de cabeza en la solución de manchado, retirándola inmediatamente. Se deja escurrir el exceso de líquido sobre papel absorbente; luego se seca muy bien el reverso de la placa y se permite que la placa seque por completo colocándola sobre la plancha caliente suministrada con el equipo. Conforme se va calentando, los puntos de artesunato se van haciendo gradualmente visibles a la luz del día. Éste método de detección se utiliza tanto para la identificación del artesunato como para su cuantificación. El procedimiento de manchado se describe detalladamente en la página 26 del manual principal (edición 2008).

Habiendo realizado el manchado con ácido sulfúrico y tras haber calentado la placa, es posible detectar los demás agentes activos, mefloquina por ejemplo, sometiendo la placa a luz ultravioleta de 366 nm en un cuarto oscuro.

XI. PLACA CROMATOGRÁFICA VISTA A LA LUZ DEL DÍA TRAS LA EXPOSICIÓN AL ÁCIDO SULFÚRICO Y AL CALOR

Recorrido No.1:

Estándar superior de trabajo representando 100% de contenido de artesunato

Recorrido No. 2:

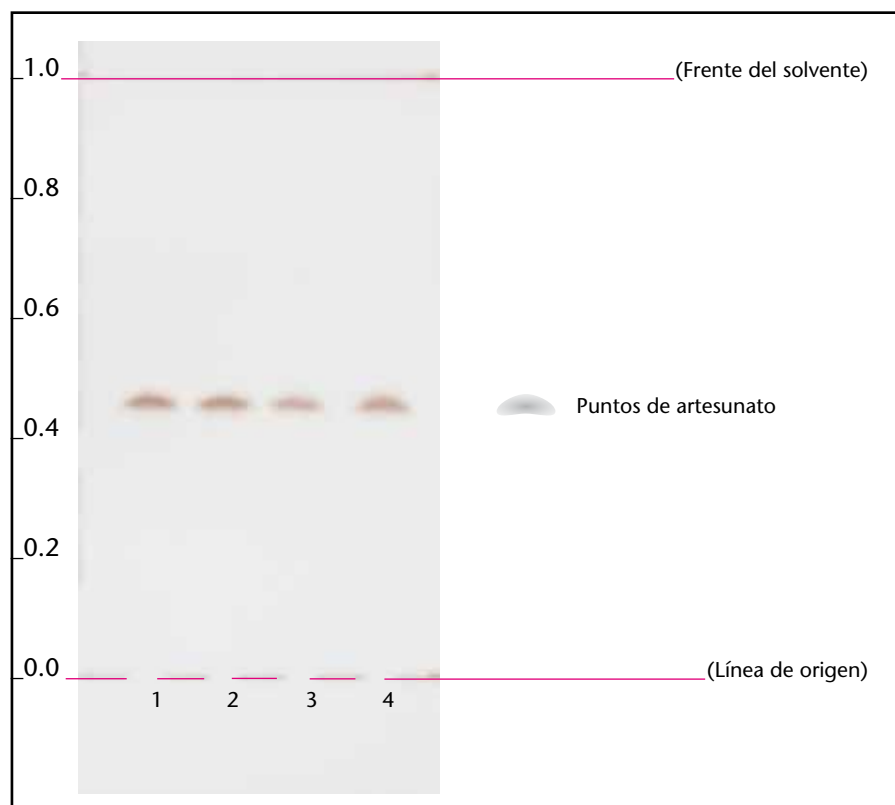
Fármaco de buena calidad con contenido aceptable de artesunato

Recorrido No. 3:

Fármaco de calidad deficiente con contenido inaceptable de artesunato

Recorrido No. 4:

Estándar inferior de trabajo representando 80% de contenido de artesunato



XII. OBSERVACIONES HECHAS A 254 NM ANTES DEL MANCHADO CON ÁCIDO SULFÚRICO

El artesunato mismo se mantiene invisible y no deben detectarse otros puntos, a no ser que el medicamento analizado venga en forma de producto compuesto conteniendo agentes activos visibles a la luz UV de 254 nm, por ejemplo sulfadoxina y sulfametoxipirazina, ambas con distancias de recorrido similares de aprox. 0.57. Otros agentes activos (amodiaquina, mefloquina, pironaridina, pirimetamina) y los excipientes incorporados a las diferentes formulaciones de las tabletas o cápsulas pueden generar puntos adicionales a cerca a o sobre la línea de origen.

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

Un punto de color marrón a una distancia de recorrido de aprox. 0.46 indica la presencia de artesunato en la solución de ensayo. Los demás agentes activos en formulaciones combinadas no se harán visibles en ésta fase. Puntos intensos adicionales generados por la solución de ensayo indican la presencia de otros agentes activos o una degradación del artesunato, siendo éste último caso más probable al ir asociados a un punto principal de menor tamaño. Otros agentes activos presentes en las tabletas y cápsulas de formulaciones combinadas, mefloquina por ejemplo, y algunos excipientes incorporados pueden causar la aparición de manchas cerca a o sobre la línea de origen.

XIV. RESULTADOS & MEDIDAS A TOMAR

El punto de artesunato en el cromatograma obtenido con la solución de ensayo debe corresponder en términos de color, tamaño, intensidad, forma y distancia de recorrido al obtenido con el cromatograma de las soluciones estándar alta y baja. Éste resultado debe obtenerse con cada método de detección. Si ese no es el caso, se debe repetir el ensayo desde el principio con una segunda muestra. El lote se rechaza, si el contenido de fármaco no puede verificarse al tercer ensayo. Para la determinación del contenido exacto de agente activo, se refieren muestras adicionales a un laboratorio profesional de control de calidad de fármacos. Las muestras se retienen y el lote se pone en cuarentena hasta que se haya tomado una decisión final respecto a liberar o rechazar el producto. Con el fin de documentar los ensayos, fotografíe todos los resultados con una cámara digital con la luz de flash desactivada.

Auténtico o falsificado?



Luchando contra los medicamentos falsificados · Protegiendo la vida



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

**Global Pharma Health Fund**  
Frankfurt, Alemania  
Tél. +49-69-46939-662  
Fax +49-69-46939-852  
info@gphf.org · www.gphf.org



**USAID**  
FROM THE AMERICAN PEOPLE



**PROMOTING THE QUALITY OF MEDICINES**

**U.S. Agency for  
International Development**  
Office of Health, Infectious Diseases  
and Nutrition, Ronald Reagan Bldg.,  
1300 Pennsylvania Avenue NW  
Washington, DC 20523-3700, USA  
Phone +1-202-712-4789  
Fax +1-202-216-3702  
aboni@usaid.gov · www.usaid.gov

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