

Una Guía Concisa de Control de Calidad sobre Drogas Esenciales

# Manual

del GPHF-Minilab®

## Volúmen II Cromatografía de Capa Fina



Fundación Farmacéutica Alemana para la Salud

Una iniciativa de las compañías farmacéuticas alemanas basadas en la investigación

en cooperación con el



INSTITUTO DE MISIÓN MÉDICA

## 6 Procedimientos para el uso del Minilab

El cofre protector contiene una serie de artículos que quizás no sean familiares para usted. Está confundido? No se preocupe. Pronto tendrá una mejor idea de lo que deberá hacer o no hacer. Desempaque los materiales y realice sus primeros pasos en el mundo del control farmacéutico de calidad. Las generaciones anteriores de técnicos farmacéuticos han logrado dominarlo, por eso estamos seguros de que usted también lo va a lograr. Buena suerte!

### I. Inspección Visual



Un calibrador ha sido incluido para poder realizar una descripción exacta del tamaño de la tableta o cápsula durante la inspección visual.

El tamaño del blister y de la caja de empaque se medirán usando una regla graduada.

## II. Prueba de disgregación



La prueba de disgregación de las tabletas y de las cápsulas se realiza usando una botella de 100 ml con boca ancha, la cual está llena con agua a una temperatura de 37° C. La disgregación deberá ser completa en el momento que el reloj toque la alarma luego de treinta minutos.

## III. CCF: 1. Preparación de la muestra



La preparación de las soluciones madre de la prueba y del estándar requiere de una unidad entera de la forma farmacéutica sólida oral.

El Minilab provee de una colección apropiada de estándares secundarios auténticos con los que se puede realizar por lo menos 300 pruebas cromatográficas con los productos sospechosos. Están empacados en un juego de quince tubos plásticos provistos de cierres herméticos contra violaciones. Cada tubo contiene 20-100 tabletas o cápsulas de referencia respectivamente. Se los puede pedir, como un juego completo o individualmente, a Technologie Transfer Marburg (TTM) en Alemania.

**Nota:** Luego de tomar una tableta o cápsula de referencia, cierre con cuidado el envase, asegurándose de que las otras muestras de referencia no se dañen antes de su tiempo de expiración.



El sachet o sobre se vacía directamente en un frasco de vidrio con la ayuda de un embudo, asegurándose de que el sólido residual sea enjuagado con una cantidad conocida de solvente.



Al igual que con los sobres, las cápsulas de gelatina dura se abren y se vacían directamente en el frasco de vidrio, la tapa y el cuerpo de la cápsula se incluyen también en el frasco.



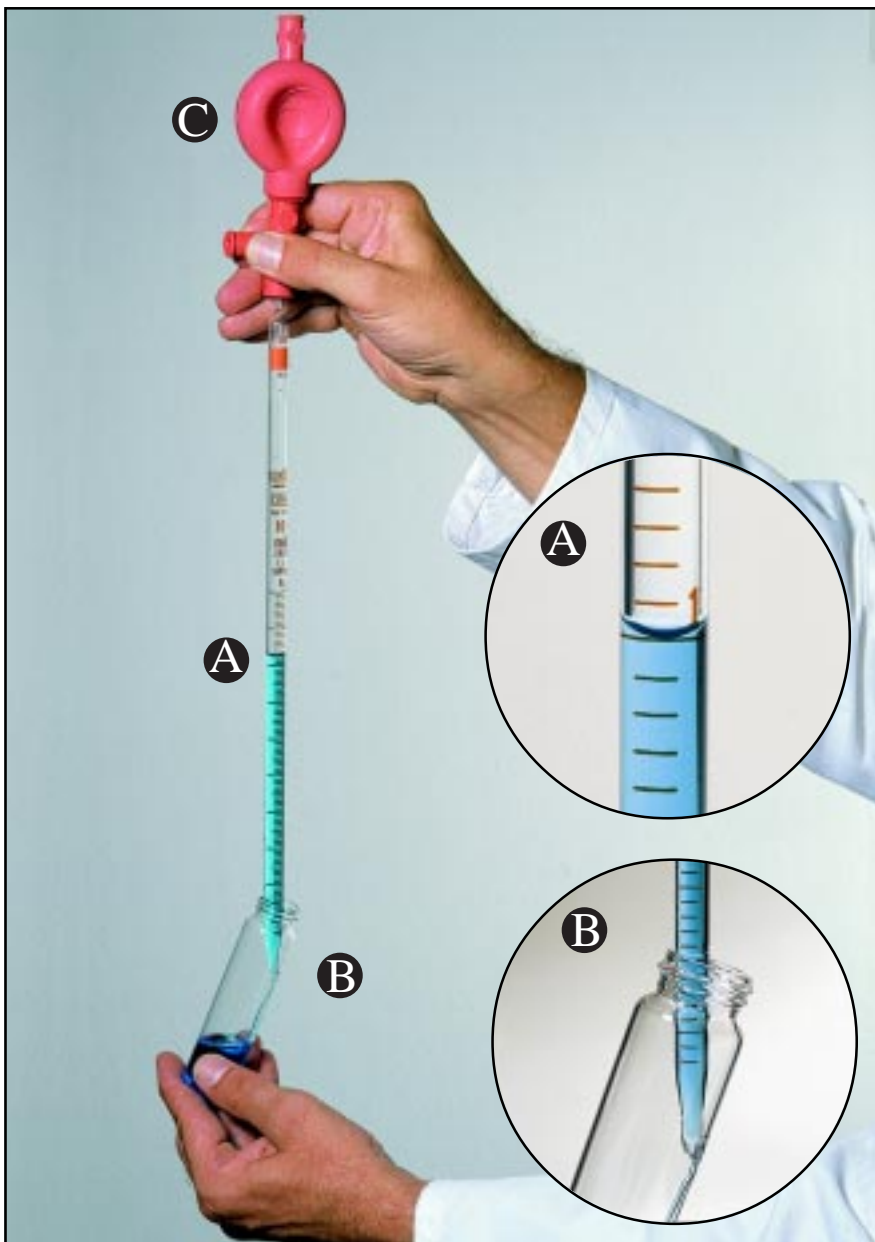
Las cápsulas de gelatina blanda son cortadas en pedazos con un bisturí, cuchilla o tijera. Todas las partes son transferidas completamente a un frasco de laboratorio y las tijeras o el bisturí son enjuagados con un volúmen conocido de solvente como está indicado en la monografía individual.



Las tabletas se trituran con la mano de mortero antes de la extracción. El procedimiento exacto es el siguiente: envuelva una tableta en papel aluminio y tritúrela hasta obtener un polvo fino. Transfiera todos los sólidos en un frasco de laboratorio y enjuague el papel con el solvente de extracción, lo que asegura que no se pierda nada de la tableta.



Todos los sólidos se disuelven en un volúmen conocido de solvente para extracción, usando un juego de varias pipetas graduadas con una capacidad de volúmen de 0.01 a 25.0 ml. La solución obtenida será la solución madre del estándar o la solución madre de la muestra, las cuales necesitan ser diluídas hasta su concentración final o sea la solución de trabajo de la muestra y el estándar.



**Pipeteo:** Sostenga la pipeta en posición vertical para observar que el solvente alcance la mancha de graduación deseada (A). La parte inferior del menisco formado por el solvente deberá estar en la línea de la marca de graduación.

La punta de la pipeta (B) se la coloca en contacto con la pared del frasco.

Una pera de goma se incluye como ayuda para pipetear, así se evita el peligro de pipetear con la boca.

**Advertencia!** Todos los solventes orgánicos se inflaman fácilmente. No trabaje frente a la llama ni fume mientras trabaje con ellos! Todos los solventes son tóxicos. Evite pipetear con la boca. Utilice la pera de goma. No arriesgue su salud!



Use el juego de pipetas graduadas incluidas para diluir las soluciones madre a su concentración final de trabajo.

Un juego de viales de 10 ml (frascos pequeños de vidrio) servirá para envasar las soluciones de trabajo.



Una cinta adhesiva y un marcador permanente se utilizarán para la identificación de las soluciones madre y de trabajo. La cinta adhesiva sirve tanto para materiales de vidrio como de plástico. El marcador es resistente al agua.

### III. CCF: 2 Aplicación de la muestra



Un juego de placas cromatográficas. Son placas de aluminio, recubiertas con un adsorbente de gel de sílice 60 F254. Estas vienen en empaques de cincuenta con el tamaño preciso para que calce en la cámara de desarrollo (5 x 10 cm).

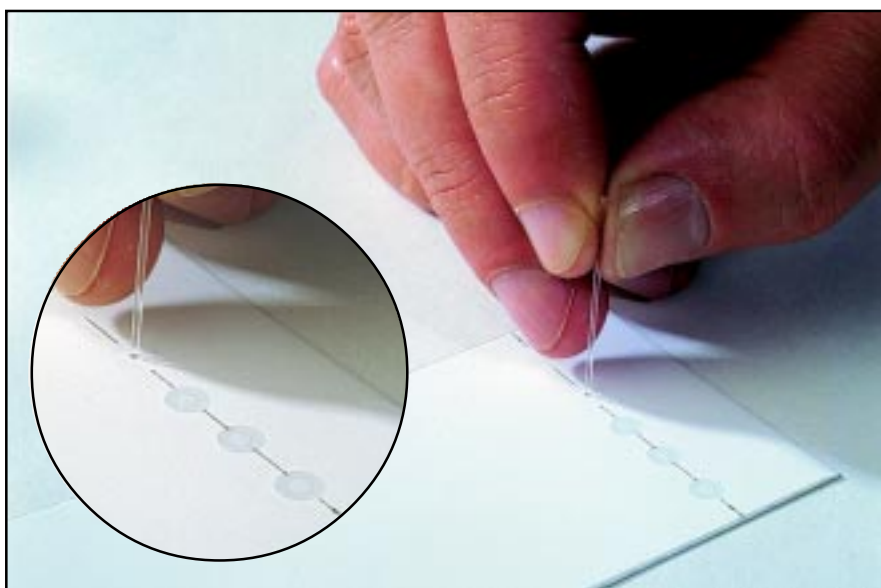
**Nota:** Abra el empaque poco antes de su uso. Saque sólo una placa. Coloque de nuevo el empaque en el cofre de protección. En lo posible evite contacto con la humedad. Almacénelo en un lugar seco. No toque la superficie de la placa.



Se ha incluido un lápiz y una regla para marcar la línea de inicio y del frente así como también el tamaño de la mancha luego de ser visualizada con el detector de luz ultravioleta.

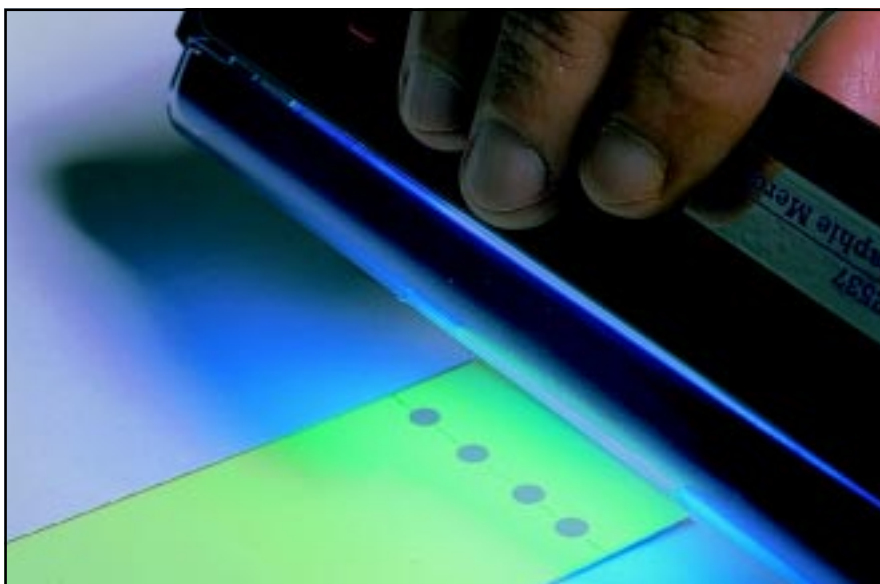


Microcapilares de vidrio desechable son incluidos para la aplicación de la muestra. Ellos administran una cantidad de volúmen de 2 microlitros ( $\mu\text{l}$ ), si se los llena completamente de extremo a extremo.



Coloque la muestra en la línea de inicio de la placa cromatográfica con ayuda del microcapilar, el cual está lleno con la solución de trabajo apropiada. Enjuague tres veces el microcapilar con el solvente de extracción (llene el capilar con el solvente y elimine el solvente sobre un pedazo de papel filtro o papel tissú) antes de aplicar la siguiente muestra sobre la placa. Deseche el microcapilar una vez que la placa esté llena, evitando el peligro de una contaminación entre las muestras de los diferentes productos.





Compruebe la uniformidad de las manchas usando una luz u.v. de 254nm. Las manchas se tornan visibles y muchas de ellas presentarán una forma circular y estarán colocadas a distancias iguales sobre la línea de inicio. Repita este procedimiento si no se obtienen manchas homogéneas.

**Nota:** La aplicación de la muestra es un trabajo de precisión y se necesitará de mucho entrenamiento para obtener perfección. Es muy importante no rayar la superficie de la capa absorbente para evitar que la fase móvil corra de forma desigual y las manchas salgan distorsionadas.

### III. CCF: 3. Desarrollo de la placa cromatográfica



Un recipiente con tapa servirá como cámara de desarrollo. Todos los lados del recipiente se cubren con papel filtro, lo que asegura la saturación de la atmósfera con los vapores del solvente antes de introducir la placa para el desarrollo. Corte el papel filtro de manera que sea fácil introducirlo en el recipiente. Use las tijeras incluidas.

Use el juego de pipetas graduadas para la preparación de la fase móvil, que es el vehículo que transporta la muestra a través de la placa cromatográfica. Pipetee todos los solventes en el recipiente tal como se indica en la monografía individual y mézclelos. Cierre el recipiente y espere aprox. 15 minutos para asegurar una saturación de la cámara con los vapores del solvente. Finalmente, coloque la placa que contiene las muestras en el recipiente y espere hasta que el solvente haya subido las tres cuartas partes de la placa.

**Nota:** Prepare diariamente la fase móvil. No regrese el solvente ya usado a los recipientes de almacenamiento.

**Advertencia!** Todos los solventes son tóxicos. Evite pipetear con la boca. Utilice la pera de goma. No arriesgue su salud!



Una vez que la placa cromatográfica ha sido desarrollada, sáquela del recipiente y deje evaporar el exceso de solvente. Para acortar el tiempo de secado se podría usar la hornilla eléctrica. Este último procedimiento se realiza si la fase móvil consiste en solventes de baja volatilidad, como por ejemplo acetato de etilo, tolueno o agua.



En nuestro trabajo se utilizará una plancha marca Philips colocada al revés como hornilla. La plancha puede ser usada con cualquier circuito eléctrico y está provista de un selector de voltaje (110-240V). En caso necesario, un adaptador para el enchufe eléctrico, está incluido en el Minilab.

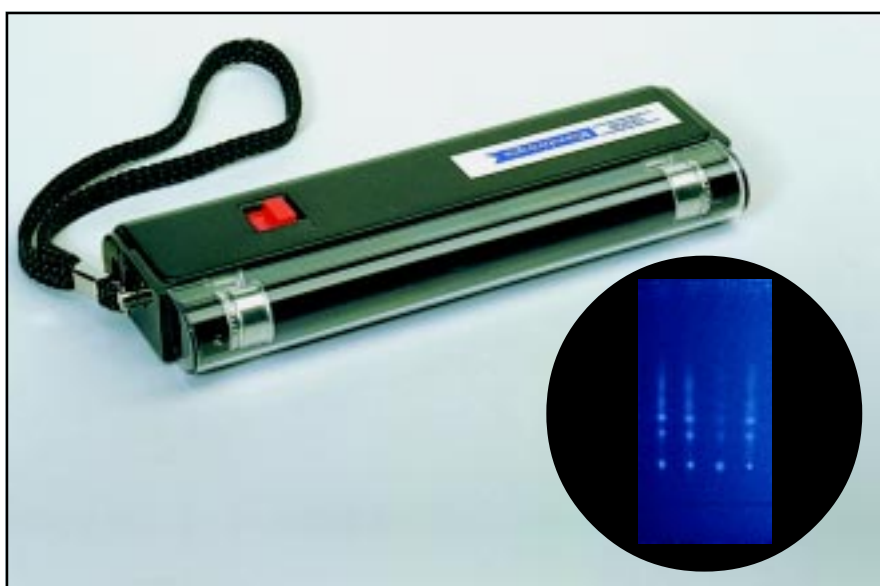
**Advertencia!** Evite el contacto directo con la plancha caliente. Desconecte la plancha después de usarla.

### III.CCF: 4. Detección de la Muestra

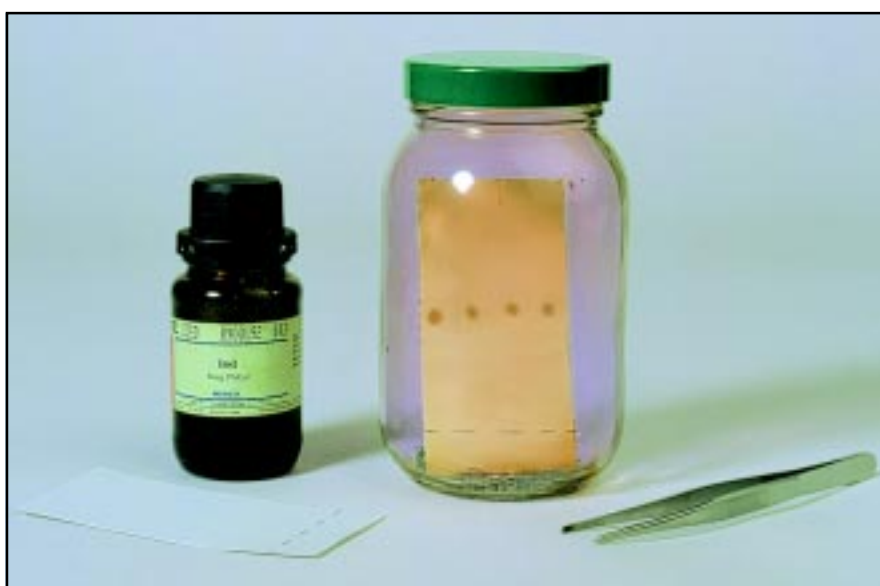


Se ha incluido una lámpara ultravioleta a baterías con una radiación de onda corta de 254 nm para la detección de manchas invisibles en la placa cromatográfica. Lleve la placa a una habitación oscura (debajo de la mesa, en un compartimento, caja o cabina) y expóngala a la luz ultravioleta. Las manchas sensibles a la luz se volverán visibles. Marque con un lápiz las manchas para posteriores evaluaciones.

Advertencia! No mire directamente a la fuente de luz ultravioleta para evitar daños en los ojos.



Se ha incluido una segunda lámpara ultravioleta a baterías, capaz de emitir una radiación de onda larga de 366 nm, para la detección de manchas invisibles. Lleve la placa a una habitación oscura (debajo de la mesa, en un compartimento, caja o cabina) y expóngala a la luz ultravioleta. Las manchas sensibles a la luz se volverán visibles. Marque con un lápiz las manchas para posteriores evaluaciones.



Se ha incluido un segundo recipiente para la coloración con yodo de manchas invisibles, que no han podido ser detectadas con la luz ultravioleta. Añada algunos cristales de yodo en el recipiente, ciérralo y caliéntelo por 30 segundos. Otra alternativa es exponer el recipiente directamente a la luz solar por cinco minutos. El yodo empieza a sublimarse y la atmósfera del recipiente empieza a saturarse con los vapores de yodo indicado por una niebla violeta.

Coloque la placa cromatográfica en el recipiente y la mayoría de las manchas invisibles van cambiando gradualmente a un color café-amarillo. El tiempo de desarrollo termina luego de un minuto.

#### IV. Limpieza



Lave minuciosamente todas las pipetas graduadas, los materiales de vidrio y demás equipos de laboratorio luego de ser usados. Las sustancias usadas en la prueba serán descartadas y los frascos vacíos serán enjuagados usando suficiente detergente. Si es necesario se usará un cepillo para tubos. Finalmente si es posible se enjuagarán los materiales de vidrio con agua desionizada para evitar formación de espuma o de manchas. Luego de esto se colocarán las pipetas graduadas y los demás materiales de vidrio boca abajo en el estante para facilitar el secado.

Las pipetas graduadas que se encuentran muy sucias o tapadas se las lavará con un solvente apropiado, como una solución de detergente caliente, ácido acético al 50 % o peróxido de hidrógeno al 10 %, antes del lavado final.

Nota: Para descartar los reactivos y las soluciones de prueba usadas utilice un recipiente preferiblemente hecho de polipropileno. Las sustancias se descartarán de acuerdo a las leyes y los requisitos locales.

#### V. Restitución del Minilab a su estado original



Luego de limpiar y secar todos los materiales, retorne éstos al cofre de protección. Colóquelos como está indicado en la fotografía. El cofre tiene una protección hermética apropiada contra agua y aire para asegurar la protección contra la humedad.



El montaje final del Minilab.

## 7.7 Cotrimoxazol

### Identificación primaria por medio de la inspección visual y la prueba de disgregación

#### I. INSPECCIÓN VISUAL

Busque las deficiencias en el etiquetado, en el empaque y en las formas farmacéuticas como se describe en los capítulos anteriores de métodos y operaciones generales. Use el formulario de reporte como una guía para anotar cualquier particularidad del producto. Cada tableta contiene usualmente 480 mgr. de cotrimoxazol (400 mgr. sulfametoxazol + 80 mgr. trimetoprima). Las tabletas que contienen sólo 120 mgr. de cotrimoxazol (100 mgr. sulfametoxazol + 20 mgr. trimetoprima) son para uso pediátrico.

#### II. PRUEBA DE DISGREGACIÓN

Todas las tabletas y cápsulas de cotrimoxazol de liberación rápida deben pasar la prueba de disgregación tal como está descrita en los capítulos anteriores sobre métodos y operaciones. Ellas 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.

#### III. RESULTADOS Y MEDIDAS A TOMAR

Los productos medicinales provenientes de una fuente dudosa o en los cuales los documentos acompañantes faltan o no son los correctos, así como los productos medicinales con defectos en su forma farmacéutica, defectos en el empaque o con etiquetas incompletas, dañadas o que faltan; o con las etiquetas escritas en otros idiomas deberán ser sometidos a una prueba de identidad.

### Verificación de la identidad a través de la cromatografía de capa fina

#### I. PRINCIPIO

El sulfametoxazol y la trimetoprima son extraídos de las tabletas con metanol y son determinados con la CCF usando como referencia un estándar secundario auténtico.

#### II. EQUIPOS Y REACTIVOS

- 1) Mano de mortero
- 2) Papel aluminio
- 3) Frasco de laboratorio de vidrio con una capacidad de 25 a 100 ml
- 4) Un juego de pipetas graduadas (de 1 a 25 ml)
- 5) Viales de 10 ml
- 6) Cinta adhesiva
- 7) Marcador
- 8) Lápiz
- 9) Placa cromatográfica recubierta con gel de sílice 60 F 254 de Merck, tamaño 5 x 10 cm
- 10) Microcapilares de vidrio de 2 µl de capacidad
- 11) Hornilla eléctrica ( Plancha marca Philips)
- 12) Cámara de desarrollo para cromatografía de capa fina (frasco)
- 13) Papel filtro
- 14) Tijeras
- 15) Luz ultravioleta de 254 nm
- 16) Cámara para el yodo
- 17) Pinzas
- 18) Metanol
- 19) Acetato de etilo
- 20) Tabletas de referencia de cotrimoxazol de 120 mg

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

Para la preparación de la solución madre del estándar se requiere una tableta de referencia de 120 mgr. de cotrimoxazol. El procedimiento de extracción es el siguiente: envuelva una tableta en papel aluminio y tritúrela con la mano del mortero hasta obtener un polvo fino. Transfiera todos los sólidos en un frasco de laboratorio de 25 ml y enjuague los residuos de sólido con 10 ml metanol. Cierre el frasco y agítelo por tres minutos hasta que se haya disuelto el sólido. Deje que repose la solución por 5 minutos hasta que los residuos insolubles se sedimenten debajo del líquido sobrenadante. La solución debe contener 12 mgr. del total de la droga/ml y se lo identifica como *solución madre del estándar de cotrimoxazol*. Prepare una nueva solución para cada prueba.

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

Pipetee 2 ml de la solución madre clara del estándar en un vial de 10 ml y añada 2 ml de metanol. Cierre el vial y agítelo. Esta solución debe contener 6 mgr. de la droga total/ml y se la identificará como *solución estándar de trabajo de cotrimoxazol al 100 %*.

La solución estándar de trabajo representa un producto de buena calidad conteniendo 100% de cotrimoxazol.

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

Pipetee 2 ml de la solución madre clara del estándar en un vial de 10 ml y añada 3 ml de metanol. Cierre el vial y agítelo. Esta solución debe contener 4.8 mgr. de la droga total/ml y se la identificará como *solución estándar de trabajo de cotrimoxazol al 80%*.

La solución estándar de trabajo de baja concentración representa un producto de poca calidad conteniendo 80% de cotrimoxazol. Para nuestro trabajo este nivel de la droga representa el límite inferior aceptable para un determinado producto.

### VI. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE DE LA MUESTRA, CUYO PRODUCTO DECLARA UNA CONCENTRACIÓN DE 120 MGR. DE COTRIMOXAZOL POR UNIDAD

Para la preparación de la solución madre de la muestra se requiere una tableta entera o de una cápsula del producto apropiado que se encuentre en el mercado. El procedimiento de extracción es el mismo que para la tableta de referencia de cotrimoxazol: envuelva una tableta en papel aluminio y tritúrela con la mano del mortero hasta obtener un polvo fino. Transfiera cuantitativamente el polvo a un frasco de laboratorio de 25 ml. Añada 10 ml de metanol, cierre el frasco y se agítelo por tres minutos hasta que se haya disuelto el sólido. Deje que repose la solución por 5 minutos hasta que los residuos insolubles se sedimenten debajo del líquido sobrenadante claro. El frasco se lo identifica como *solución madre de la muestra de cotrimoxazol*. Esta solución debe contener 12 mgr. del total de la droga/ml. Prepare una solución nueva para cada prueba.

### VII. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE DE LA MUESTRA, CUYO PRODUCTO DECLARA UNA CONCENTRACIÓN DE 480 MGR. DE COTRIMOXAZOL POR UNIDAD

A. Para la preparación de la solución madre de la muestra se requiere de una tableta del producto apropiado, el procedimiento de extracción se realiza de la siguiente manera: se tritura la tableta hasta obtener un polvo fino y se transfiere todo el sólido obtenido en un frasco de laboratorio de 25 ml. Añada 20.0 ml de metanol, cierre el frasco y agítelo por tres minutos hasta que se haya disuelto el sólido. Deje que repose la solución por 5 minutos hasta que los residuos insolubles se sedimenten debajo del líquido sobrenadante.

B. Para diluciones posteriores, mezcle en un vial de vidrio de diez mililitros 2 ml del líquido claro con 2 ml de metanol. Cierre el vial y agítelo. Identifíquelo como *solución madre de la muestra de cotrimoxazol*. La solución debe contener 12 mgr. del total de la droga/ml. Prepare una solución nueva para cada prueba.

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

Pipetee 2 ml de la solución madre clara de la muestra en un vial de 10 ml y añada 2 ml de metanol. Cierre el vial, agítelo e identifíquelo como *solución de trabajo de la muestra de cotrimoxazol*.

La concentración esperada de trimetoprima en la solución de trabajo es de 1.0 mg/ml y la de sulfametoxazol es 5.0 mg/ml. Ambas concentraciones equivalen a la concentración del estándar de concentración alta de trimetoprima y sulfametoxazol.

### IX. APLICACIÓN DE LA PRUEBA

Marque una línea paralela (línea de inicio) a una distancia de 1.5cm del extremo inferior de la placa cromatográfica y aplique con las pipetas microcapilares 2 microlitros ( $\mu$ l) de la solución de la prueba y del estándar como se demuestra en la fotografía de la página siguiente.

Hasta cinco aplicaciones se pueden hacer en la placa cromatográfica. Compruebe la uniformidad de las manchas usando una luz UV de 254 nm. Todas las manchas deben ser circulares y estar localizadas a distancias iguales sobre la línea de inicio. La intensidad de ellas puede diferir pero sus diámetros no deben ser diferente. La diferencia en la intensidad se debe a la diferente cantidad de los residuos de las tabletas o de las cápsulas, o a la diferente concentración de la droga en la solución de muestra. Una diferencia en el tamaño de la mancha es evidencia de una mala aplicación. Repita de nuevo el procedimiento si no se logra una aplicación homogénea.

### X. DESARROLLO

Pipetee 15 ml de acetato de etilo y 5 ml de metanol en el frasco utilizado como cámara de desarrollo para la CCF. Cierre el recipiente y mezcle cuidadosamente. Recubra las paredes del recipiente con papel filtro y espere 15 minutos para asegurar la saturación de la cámara con los vapores del solvente. Coloque con cuidado la placa cargada en el frasco. Cierre el frasco y desarrolle la placa cromatográfica hasta que el solvente haya alcanzado las tres cuartas partes de la longitud de la placa, siendo el tiempo de desarrollo de aproximadamente 20 minutos. Remueva la placa cromatográfica de la cámara, marque el frente del solvente y deje que el resto del solvente se evapore usando la hornilla eléctrica si fuese necesario.

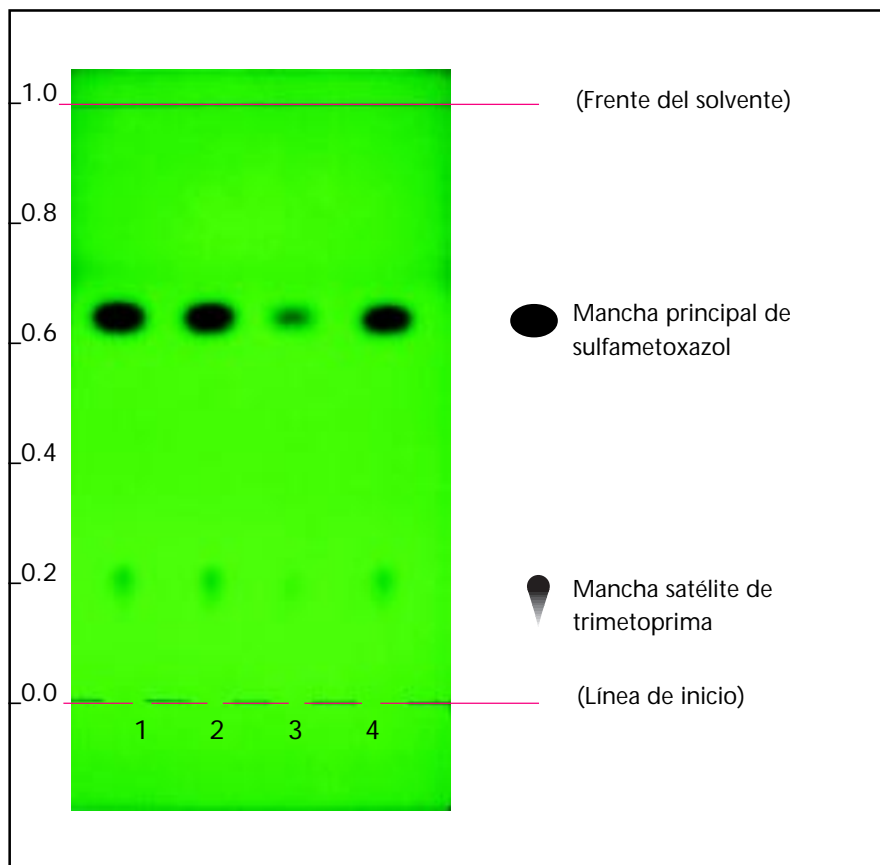
### XI. DETECCIÓN

Seque los residuos de solvente y observe la placa cromatográfica con una luz ultravioleta de 254 nm. Inspeccione la placa después de realizar la coloración con yodo.



**XII. PLACA CROMATOGRÁFICA  
OBSERVADA A 254 NM**

- Corrida Nr. 1  
Limite superior para el cotrimoxazol representando el 100 % del total de la droga
- Corrida Nr. 2  
Un producto de buena calidad
- Corrida Nr. 3  
Un producto de baja calidad
- Corrida Nr. 4  
Limite inferior para cotrimoxazol representando el 80 % del total de la droga



**XIII. OBSERVACIONES HECHAS  
A 254 NM**

La presencia de cotrimoxazol está indicada por dos manchas principales, una representa al sulfametoxazol con una distancia recorrida de 0.65 seguido de una segunda mancha que representa la trimetoprima con una distancia recorrida de cerca 0.24. Otras manchas fuertes producidas por la solución de prueba indican un avance en la degradación de la droga especialmente cuando es asociado con una mancha principal pequeña. Muchas manchas débiles podrían aparecer en la región inferior del cromatograma causado normalmente por agentes auxiliares incorporados en la formulación de las tabletas o de las cápsulas.

**XIV. OBSERVACIONES HECHAS  
DURANTE LA COLORACIÓN  
CON YODO**

Dos manchas de color café se producirá en el mismo lugar indicado con la luz UV de 254 nm. La mancha que representa al sulfametoxazol atrapa con facilidad el yodo y se torna de un color anaranjado-café mientras que la otra mancha representa la trimetoprima y es relativamente débil con la coloración con yodo.

**XV. RESULTADOS Y MEDIDAS  
A TOMAR**

La mancha principal obtenida en el cromatograma con la solución prueba debe corresponder tanto en color, forma, intensidad y distancia corrida con el del cromatograma obtenido con las soluciones estándares alta y baja. Este resultado debe ser obtenido con todos los métodos de detección. Si no se logra esto, se deberá repetir la corrida con una segunda muestra. Rechace el lote si el contenido de la droga no puede ser verificado luego de una tercera corrida. Para una segunda opinión envíe las muestras a un laboratorio completo de control de calidad de drogas. Retenga el lote y manténgalo en cuarentena hasta que se haya tomado una decisión de rechazar o aceptar el producto.