

# Manual

del GPHF-Minilab®

**Extensión 2003  
Antiretrovirales**

Tercer Suplemento del Volumen II  
Cromatografía de Capa Fina



Una Iniciativa de las Compañías Farmacéuticas Alemanas basadas en la investigación

## 7.34 Nevirapina - incl. combinaciones fijas con lamivudina y estavudina

### Identificación primaria a través 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 tal como se describe en los capítulos sobre métodos y operaciones generales en el manual principal. Use el *Formulario de Reporte* como una guía para anotar cualquier particularidad del producto. Cada tableta contiene por lo regular 200 mgr de nevirapina.

Existe combinaciones fijas con otros antiretrovirales, por ejemplo lamivudina y estavudina siendo éstos los más comunes. Adicionalmente, existen suspensiones de administración oral que contienen 10 mgr de nevirapina por ml.

#### II. PRUEBA DE DISGREGACIÓN

Todas las tabletas de nevirapina de liberación rápida tienen que pasar la prueba de disgregación tal como se describe en los capítulos sobre métodos y operaciones del manual principal. Se deberán disgregar en agua a 37°C en menos de 30 minutos. Si el producto no pasa la prueba, es un signo de deficiencia.

#### III. RESULTADOS Y MEDIDAS A TOMAR

Los productos medicinales provenientes de fuentes dudosas, o productos en los cuales faltan los documentos acompañantes o no son los correctos, así como los productos medicinales con defectos en su forma farmacéutica, defectos en el empaque, o las etiquetas están incompletas dañadas o hacen falta, o con las etiquetas escritas en otros idiomas, deberán ser sometidos a una prueba de cromatografía de capa fina.

### Verificación de la identidad por medio de la cromatografía de capa fina

#### I. PRINCIPIO

Las suspensiones de nevirapina son diluidas y las tabletas o cápsulas son extraídas con agua acidificada y determinado por medio de la cromatografía de capa fina usando un estándar secundario auténtico como referencia.

#### II. EQUIPOS Y REACTIVOS

- 1) Pistilo o mano de mortero
- 2) Espátula
- 3) Papel aluminio
- 4) Frasco de laboratorio de vidrio con una capacidad de 25 a 100 ml
- 5) Embudo
- 6) Un juego de pipetas (1 a 25 ml)
- 7) Viales de 10 ml
- 8) Cinta adhesiva
- 9) Marcador
- 10) Lápiz
- 11) Placa cromatográfica de Merck recubierta con gel de sílice 60 F254, tamaño 5x10 cm
- 12) Microcapilares de vidrio de 2 µl de capacidad
- 13) Hornilla eléctrica
- 14) Cámara de desarrollo para cromatografía de capa fina
- 15) Papel filtro
- 16) Tijeras
- 17) Pinzas
- 18) Luz ultravioleta de 254nm
- 19) Cámara de Yodo
- 20) Papel universal indicador de pH
- 21) Solución de ácido clorhídrico 36%
- 22) Agua
- 23) Metanol
- 24) Acetato etílico
- 25) Tolueno
- 26) Estándar auténtico de referencia, por ejemplo tableta de 200 mgr de nevirapina

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

Para la preparación de la solución madre del estándar se requiere de un producto auténtico como referencia, por ejemplo una tableta de 200 mgr de nevirapina. El procedimiento para la extracción será el siguiente: envuelva una tableta en papel aluminio y tritúrela con la mano del mortero hasta obtener un polvo fino. Vacíe el papel aluminio en un frasco de laboratorio de 50 ml y enjuague todos los residuos sólidos con 40 ml de agua usando las pipetas graduadas. Después, acidifique debajo de un pH 3 con tres gotas de ácido clorhídrico concentrado usando las pipetas, verifique la acidez con el papel indicador. Cierre el frasco y agítelo por tres minutos hasta que se haya disuelto gran parte del sólido. Deje que repose la solución por 5 minutos hasta que los residuos insolubles se asienten en el fondo de la botella. La solución madre contiene 5 mgr de la droga por ml. Identifíquela como "Solución madre del estándar de nevirapina". Para cada prueba se preparará una nueva solución. Continúe trabajando con el líquido turbio sobrenadante.

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

Pipeteé 1 ml de la solución madre del estándar en un vial de 10 ml y añada 3 ml de metanol. Cierre el vial y agítelo. Esta solución va a contener 1.25 mgr de la droga por ml y se la identificará como "Solución estándar de trabajo de nevirapina al 100%".

La solución de trabajo estándar representa a un producto de buena calidad que contiene nevirapina al 100%.

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

Pipeteé 1 ml de la solución madre del estándar en un vial de 10 ml y añada 4 ml de metanol. Cierre el vial y agítelo. Esta solución va a contener 1 mgr de la droga por ml y se la identificará como "Solución estándar de trabajo de nevirapina al 80%".

La solución estándar de trabajo de baja concentración representa a un producto de baja calidad que contiene 80% de nevirapina. En nuestro trabajo esta concentración de la droga representa el límite inferior aceptable para un producto.

### VI. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE DE LA MUESTRA PARA DOSIFICACIONES SÓLIDAS, CUYO PRODUCTO DECLARA UNA CONCENTRACIÓN DE 200 MGR DE NEVIRAPINA POR UNIDAD

Tome una tableta o cápsula del producto apropiado que se encuentre en el mercado. Envuelva la tableta en papel aluminio y tritúrela con la mano del mortero hasta obtener un polvo fino. El polvo se transfiere en un frasco de laboratorio de 50 ml. En el caso de cápsulas, ésta se abrirá y se vaciará en un frasco de laboratorio, luego se colocará las tapas vacías de la cápsula en el frasco. Añada 40 ml de agua usando las pipetas, acidifique debajo de un pH 3 con tres gotas de ácido clorhídrico concentrado y verifique la acidez con el papel indicador. Cierre el frasco y agítelo por tres minutos hasta que una gran parte del sólido se haya disuelto. Deje que repose la solución por cinco minutos hasta que los residuos insolubles se sedimenten debajo del líquido turbio sobrenadante.

### DOSIFICACIÓN LÍQUIDA DE 10 MGR DE NEVIRAPINA POR ML

Abra una muestra y transfiera 4 ml de la suspensión a una botella de laboratorio de 10 ml y diluya con 4 ml de agua usando cada vez las pipetas del tamaño adecuado. Acidifique debajo de un pH 3 con una gota de ácido clorhídrico concentrado usando las pipetas y verifique la acidez con el papel indicador. Cierre el frasco y agítelo por cerca tres minutos hasta que la mayor parte del sólido se haya disuelto. Deje que repose la solución por cinco minutos hasta que los residuos insolubles se sedimenten debajo del líquido turbio sobrenadante.

Todas las soluciones van a contener 5 mgr de la droga por ml y serán identificadas como "Solución madre de la muestra de nevirapina". Para cada prueba se preparará una nueva solución. Continúe trabajando con el líquido turbio sobrenadante o la dilución clara a turbia.

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

Pipeteé 1 ml de la solución madre de la muestra en un vial de 10 ml y añada 3 ml de metanol. Cierre el vial y agítelo. Esta solución se la identificará como "Solución de trabajo de la muestra de nevirapina".

La concentración que se espera será de 1.25 mgr por ml y corresponderá a la concentración de nevirapina de nuestro estándar alto de trabajo.

## VIII. APLICACIÓN DE LA PRUEBA

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

Hasta cinco manchas se podrán aplicar sobre la placa. 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 origen. La intensidad de ellas puede diferir pero sus diámetros no deben ser diferentes. La diferencia en la intensidad se debe a la diferente cantidad de los excipientes de las tabletas o 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. Si no se logra una aplicación homogénea, repita de nuevo el procedimiento.

## IX. DESARROLLO

Pipeteé en la cámara de desarrollo 11 ml de acetato etílico, 5 ml de metanol y 4 ml de tolueno. Cierre el recipiente y mezcle cuidadosamente. Cubra las paredes del recipiente con papel filtro y espere 15 minutos para asegurar la saturación con los vapores del solvente. Coloque con cuidado la placa en la cámara. Cierre la cámara y desarrolle la placa cromatográfica hasta que el solvente haya alcanzado las tres cuartas partes de la longitud de la placa. El tiempo necesario de desarrollo es de aproximadamente 15 minutos. Remueva la placa de la cámara, marque el frente del solvente. Si es necesario utilice la hornilla eléctrica para evaporar el resto del solvente.

## X. DETECCIÓN

Seque todo solvente residual de la placa. Observe la placa a la luz ultravioleta de 254 nm usando las lámparas fluorescentes a baterías. Utilice este método de detección para propósitos de cuantificación. Verificaciones posteriores de la identidad de la droga y de su contenido se los puede realizar cuando se observa la placa a la luz del día luego de la coloración con yodo.

### XI. PLACA CROMATOGRÁFICA OBSERVADA A 254 NM

#### Corrida Nr. 1

Límite superior representa el 100% del total de nevirapina, estavudina y lamivudina.

#### Corrida Nr. 2

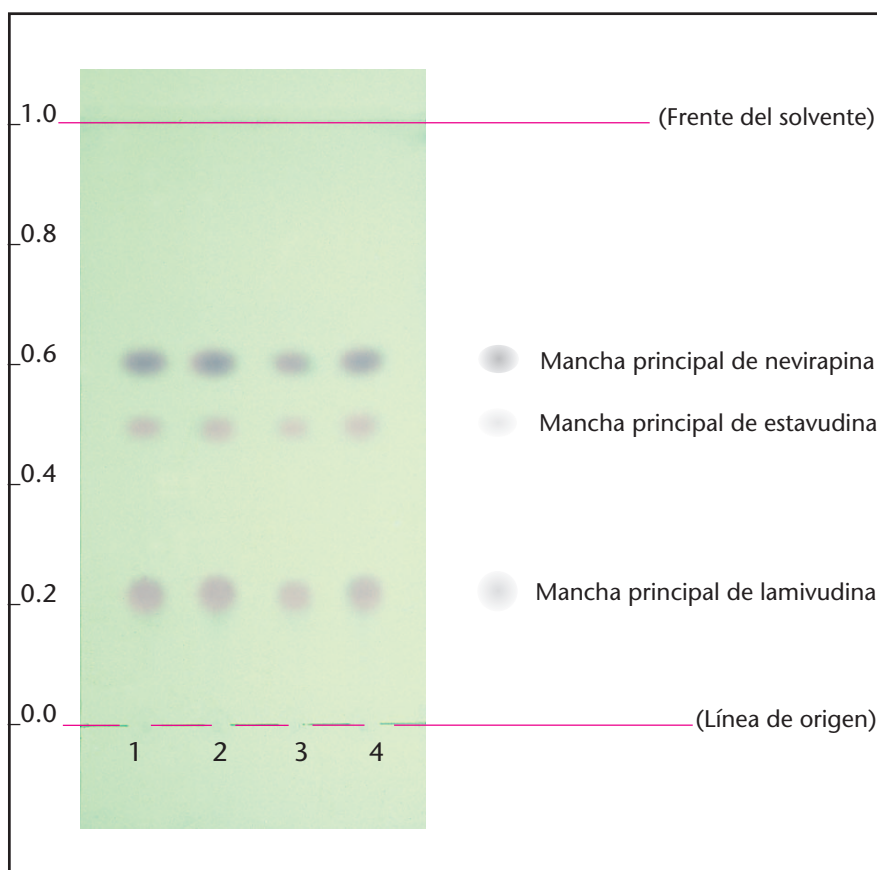
Triple combinación fija de alta calidad.

#### Corrida Nr. 3

Triple combinación fija de baja calidad.

#### Corrida Nr. 4

Límite inferior representa el 80% del total de nevirapina, estavudina y lamivudina.



### XII. OBSERVACIONES HECHAS A 254 NM

Cuando se expone la placa a una luz ultravioleta de 254 nm se reconocerá la presencia de nevirapina por una mancha fuerte de color azul-violeta a una distancia recorrida de 0.60. En antiretrovirales donde la nevirapina es presentada en combinaciones fijas con estavudina y lamivudina, una segunda y tercera mancha principal pueden ser observadas a una distancia recorrida de 0.48 y 0.21 respectivamente. Otras manchas fuertes adicionales producidas por la solución de prueba indican una degradación de la droga especialmente si la mancha principal es pequeña. Muchas manchas débiles podrían aparecer en la línea de origen o cerca a ella y normalmente se debe a la presencia de los agentes auxiliares incorporados en la formulación del producto.

### XIII. OBSERVACIONES HECHAS A LA LUZ DEL DÍA LUEGO DE LA COLORACIÓN CON YODO

Cuando se expone la placa a los vapores de yodo aparecerán una serie de manchas débiles café-naranja junto con las manchas anteriormente observadas en las placas expuestas a la luz UV de 254nm.

### XIV. RESULTADOS Y MEDIDAS A TOMAR

La mancha o manchas principales obtenidas en el cromatograma con la solución prueba deberán corresponder tanto en color, tamaño, forma, intensidad y distancia corrida con el del cromatograma obtenido con las soluciones estándares alta y baja. Este resultado deberá ser obtenido con todos los métodos de detección. Si no se obtienen resultados satisfactorios, se deberá repetir la corrida con una segunda muestra. Si luego de la tercera corrida no se ha podido verificar el contenido de la droga se rechazará el lote. Envíe las muestras a un laboratorio de control de calidad de drogas para una segunda opinión. Retenga el lote y manténgalo en cuarentena hasta que se haya tomado una decisión sobre el rechazo o la aceptación del producto.