

Manual

Para usuarios de GPHF-Minilab™

Edición especial de COVID-19
- Dexametasona en comprimidos
- Dexametasona inyectable

Control Visual y Cromatografía en Capa Fina



Richard W. O. Jähnke y Kornelia Dwornik



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



USAID
FROM THE AMERICAN PEOPLE



EDICIÓN ESPECIAL DE COVID-19

Escrito por

Richard W. O. Jähnke y Kornelia Dwornik

* * *

Revisado por

Sanford Bradby, Tabassum Munira, Shaiful Khan, Stephen Kimatu, Farouk A. Umaru y Souly Phanouvong

* * *

Publicado por

el Global Pharma Health Fund (GPHF), una organización benéfica iniciada y mantenida por Merck KGaA (Alemania), y el programa Promoting the Quality of Medicines Plus (PQM+), financiado por la Agencia de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional (USAID) y aplicado por la Convención Farmacopea de los Estados Unidos (USP)

* * *

Copyright © por GPHF

* * *

Sobre el proyecto GPHF-Minilab™

La proliferación de medicamentos de baja calidad y falsificados supone una grave amenaza para la salud. La Organización Mundial de la Salud (OMS) calcula que una proporción preocupante del diez por ciento de todos los medicamentos disponibles en los países en desarrollo son ya falsificados o de mala calidad. La lucha contra los medicamentos falsificados garantizará que décadas de inversiones en sanidad no se pierdan por falta de vigilancia.

Dada la prevalencia de los medicamentos falsificados y de mala calidad en todo el mundo, con la mayor carga en los países en desarrollo, el Global Pharma Health Fund (GPHF), una organización sin ánimo de lucro que cuenta con el único apoyo de Merck KGaA, ha desarrollado y proporciona de forma rentable el GPHF-Minilab™, un minilaboratorio para la realización de pruebas rápidas de calidad y la detección de medicamentos subestándar y falsificados.

Durante muchos años, los GPHF-Minilabs han servido como primera línea de defensa contra los medicamentos falsos y de baja calidad que amenazan la salud de millones de personas en los países en desarrollo. En total, se han entregado más de 900 Minilabs en casi 100 países de las regiones de África, Asia-Pacífico y América Latina.

Los GPHF-Minilabs se utilizan normalmente para el cribado de la calidad de fármacos para la vigilancia basada en el riesgo después de la comercialización, en los controles fronterizos para la inspección, dentro de la cadena de suministro y en el punto de atención/ dispensación para la diligencia debida, etc. Los Minilabs son portátiles, fáciles de usar, rentables, requieren una formación mínima y proporcionan resultados rápidos de identificación, cuantificación y desintegración. Los GPHF-Minilabs no sustituyen a los ensayos de laboratorio del compendio completo. Más bien, utilizan su tecnología para identificar los medicamentos defectuosos para los ensayos de laboratorio completas, lo que se ha convertido en la mejor práctica establecida para las tecnologías de cribado.

El inventario de métodos de Minilabs incluye actualmente 100 ingredientes farmacéuticos activos en sus respectivos productos acabados para el tratamiento de enfermedades transmisibles y no transmisibles, por ejemplo, antibióticos, antituberculostáticos, antimaláricos, antivirales, antidiabéticos, antiasmáticos, analgésicos y medicamentos cardiovasculares y gastrointestinales. A ellos se suma ahora la dexametasona, utilizada para aliviar algunos síntomas observados en los casos graves de COVID-19.

Los principales socios en la implementación de Minilab son las autoridades nacionales de salud y de regulación de medicamentos junto con la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el programa Promoting the Quality of Medicines Plus de USAID. Los datos generados con el GPHF-Minilab™ señalaron eficazmente medicamentos antipalúdicos y antibacterianos falsos sin principios activos y activaron varias veces las alertas mundiales de productos médicos de la OMS. Los Minilabs salvan vidas.

COVID-19 aumenta la necesidad insatisfecha de un control de calidad de los medicamentos no sofisticado y asequible en los países de bajos ingresos. Esta es la fuerza que impulsa el desarrollo de nuevos protocolos de ensayo GPHF-Minilab™ para comprimidos e inyecciones de dexametasona en la actualidad. La necesidad de realizar más pruebas también subraya la importancia de la colaboración, por ejemplo, con nuestros socios ejecutores con sede en Estados Unidos.

* * *

Obra de arte de

Grimm Graphic Design, Ochsenfurt, Alemania

Índice

Capítulo	Página
Índice.....	3
Salud y seguridad	3
Nuevos protocolos de ensayo del Minilab.....	4
7.101 Dexametasona en comprimidos	4
7.102 Dexametasona-21-fosfato como sal disódica en soluciones inyectables.....	8

Salud y seguridad

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 de este manual y las de la manual principal 2020 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.

Primer cribado de las deficiencias del producto mediante ensayos físicos

I. ENSAYOS FÍSICOS

Durante el control visual, busque deficiencias en el etiquetado, el envasado y las formas farmacéuticas, tal como se describe en los capítulos introductorios sobre métodos y operaciones generales del manual principal publicado en 2020, e informe de las anomalías. Considere la posibilidad de tomar fotografías, por ejemplo, con la cámara de un smartphone. Cada comprimido suele contener 2, 4 u 8 mg de dexametasona por base libre. Se sabe que existen otras dosis. Verifique el peso total de los comprimidos con la balanza electrónica de

bolsillo suministrada. Todas las formulaciones de comprimidos de dexametasona de liberación rápida deben pasar también el ensayo de desintegración descrita en el manual principal 2020. Deben desintegrarse en agua a 37 °C en menos de 30 minutos. Es un defecto importante si una formulación de liberación instantánea no pasa este ensayo.

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 cromatográfica en capa fina.

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

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

I. PRINCIPIO

La dexametasona se extrae de los comprimidos con un volumen conocido de metanol y luego se comprueba su identidad y contenido mediante cromatografía en capa fina (CCF) frente a una sustancia de referencia adecuada.

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) Cámara de sumersión (frasco de 250 ml) |
| 7) Lápiz y regla | 21) Agua destilada o potable |
| 8) Viales de 10 ml | 22) Metanol |
| 9) Juego de pipetas graduadas (1 a 25 ml) | 23) Acetona |
| 10) Juego de frascos de vidrio de laboratorio (25 a 100 ml) | 24) Acetato de etilo |
| 11) Placas Merck CCF de aluminio con recubrimiento de gel de sílice 60 F ₂₅₄ , tamaño 5x10 cm | 25) Solución de ácido sulfúrico al 96% |
| 12) Microcapilares de vidrio (2-µl de capacidad) | 26) Sustancia de referencia, por ejemplo, dexametasona 8 mg comprimidos |
| 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 sustancia de referencia, por ejemplo, comprimidos con contenido de 8 mg de dexametasona. 1) Se envuelve el comprimido usado como referencia en papel aluminio y se reduce a polvo fino usando una mano de mortero. 2) 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 8 ml de metanol con una pipeta graduada adecuada. 3) Se cierra el frasco y se agita por unos tres minutos, hasta que se haya disuelto la mayor parte de los sólidos. 4) 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 1 mg de dexametasona total por ml y se rotula 'Solución madre del estándar de dexametasona'. La solución se prepara fresca para cada ensayo. 5) Se continúa el trabajo con el líquido claro o turbio sobrenadante.

<p>IV. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN ESTÁNDAR DE TRABAJO AL 100% (LÍMITE SUPERIOR)</p>	<p>La solución madre del estándar no requiere de dilución posterior, habiendo alcanzado ya la concentración final de trabajo de 1 mg de dexametasona total por ml. Para un manejo más conveniente, se puede transferir un poco del líquido sobrenadante a un vial de 10 ml.</p> <p>Esta solución estándar de trabajo representa un fármaco de buena calidad con un contenido de 100% de dexametasona.</p>
<p>V. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN ESTÁNDAR DE TRABAJO AL 80% (LÍMITE INFERIOR)</p>	<p>Se pipetea 4 ml de la solución madre del estándar a un vial de 10 ml y se añade 1 ml de metanol con pipetas graduadas adecuadas. Se tapa y agita el vial. La solución obtenida debe contener 0,8 mg de dexametasona total por ml y se rotula 'Solución estándar de trabajo de dexametasona al 80%'.</p> <p>Esta solución estándar de trabajo representa un producto farmacológico de baja calidad, con contenido de dexametasona de solo 80% de lo indicado en la etiqueta. En la investigación actual, este nivel de contenido de fármaco es el mínimo aceptable para un producto dado. Los límites de la farmacopea no se aplican en nuestro contexto.</p>
<p>VI. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE DE LA MUESTRA A PARTIR DE UN PRODUCTO QUE DICE CONTENER 2 MG DE DEXAMETASONA POR COMPRIMIDO</p> <p>4 MG DE DEXAMETASONA POR COMPRIMIDO</p> <p>8 MG DE DEXAMETASONA POR COMPRIMIDO</p>	<p>Se toma dos comprimidos completos de las muestras seleccionadas durante el trabajo de campo. De acuerdo con el procedimiento usual, los comprimidos 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 la extracción, se añaden 4 ml de metanol utilizando una pipeta graduada apropiada. 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.</p> <p>Transfiere el polvo obtenido de un comprimido de muestra entero a un frasco de vidrio de laboratorio de 25 ml, añada 4 ml de metanol utilizando una pipeta graduada y extraiga la dexametasona. Continúe trabajando como en el caso anterior.</p> <p>Transfiere el polvo obtenido de un comprimido de muestra entero a un frasco de vidrio de laboratorio de 25 ml, añada 8 ml de metanol utilizando una pipeta graduada y extraiga la dexametasona. Continúe trabajando como en el caso anterior.</p> <p>Todas las soluciones madre producidas deberán contener finalmente 1 mg de dexametasona total por ml y rotularse 'Solución madre de la muestra de dexametasona'. Las soluciones se preparan frescas para cada ensayo. Se continúa el trabajo con los líquidos claros o turbios sobrenadantes.</p>
<p>VII. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE TRABAJO DE LA MUESTRA</p>	<p>Las soluciones madre de la muestra de dexametasona no requieren de dilución posterior, ya que representan la concentración final de 1 mg de dexametasona por ml. Si se prepara a partir de un producto de alta calidad, esta solución de muestra debe coincidir con la concentración de dexametasona de la solución estándar de trabajo superior producida arriba. Para un manejo más conveniente, se puede transferir un poco del líquido sobrenadante a un vial de 10 ml.</p>
<p>VIII. APLICACIÓN DE LAS MUESTRAS</p>	<p>Marque una línea de origen paralela y 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.</p> <p>En una placa se pueden aplicar hasta cinco muestras. Comprobar la uniformidad de las manchas utilizando luz UV de 254 nm. Todas las manchas deberán tener forma circular y estar situadas equidistantes entre sí en la línea de origen. Aunque las intensidades puedan diferir, los diáme-</p>

tros nunca deben hacerlo. Las diferencias de intensidad se deben a la cantidad de excipientes residuales contenidos en los comprimidos 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 las manchas sea homogéneo.

Seque suavemente las manchas. Para ello, sujete la placa de cromatografía con las pinzas suministradas durante unos 30 segundos en la corriente de aire caliente justo encima de la placa calefactora. Agite la placa CCF hacia arriba y hacia abajo constantemente y cada vez que baje la placa de cromatografía, puede tocar la superficie de la placa caliente durante una fracción de segundo.

IX. DESARROLLO DEL CROMATOGRAMA

Se pipetea 20 ml de acetato de etilo, 2 ml de acetona y 0,2 ml de agua al frasco a utilizarse como cuba cromatográfica. Se tapa la cuba y se mezcla muy bien. Se recubre la pared de la cuba con papel filtro y se espera por unos 15 minutos para asegurar la saturación de la cuba con el vapor del solvente. Cuidadosamente se coloca la placa CCF cargada en el frasco. Cerrar el frasco y desarrollar la placa hasta que el frente del disolvente haya alcanzado aproximadamente las tres cuartas partes de la longitud de la placa. El tiempo de proceso será de unos 10 minutos. Se retira la placa de la cuba, se marca la línea del frente del solvente y se evapora el exceso de disolvente. Para ello, sujete la placa cromatográfica con las pinzas suministradas durante aprox. dos minutos en la corriente de aire caliente justo por encima de la placa calefactora. Sacudir arriba y abajo la placa de CCF constantemente y cada vez que la placa de cromatografía baje, puede tocar la superficie de la placa calefactora durante fracciones de segundo.

X. DETECCIÓN DE LOS AGENTES ACTIVOS

Secar todo el disolvente residual y observar la placa cromatográfica bajo luz UV de 254 nm utilizando la lámpara a pilas suministrada, preferiblemente en una sala oscura. Utilizar este método de detección tanto para la identificación como para la cuantificación.

Para una mayor identificación y semicuantificación, tinte la placa cromatográfica con ácido sulfúrico y séquela en una placa calefactora. Para ello, llene el vaso de plástico de 250 ml suministrado con 190 ml de metanol, seguido de 10 ml de solución de ácido sulfúrico concentrado al 96 % y mezcle suavemente. Deje que la mezcla se enfríe y sumerja la cromatopla en la solución de tinción utilizando unas pinzas. Sacar inmediatamente la placa CCF de la solución y dejar escurrir todo el exceso de líquido sobre papel absorbente. Limpie el líquido restante de la parte posterior de la placa cromatográfica y continúe secando toda la solución de manchado en la placa de calentamiento suministrada. Durante el calentamiento, las manchas de dexametasona y otras manchas de corticosteroides relacionadas se harán gradualmente visibles a la luz del día. Tenga en cuenta que el procedimiento de tinción con solución de ácido sulfúrico es muy similar al descrito con ninhidrina en la página 36 del manual principal 2020. Después de leer la cromatopla a la luz del día, se puede hacer una verificación adicional de la identidad y el contenido de la dexametasona exponiendo la cromatopla a una luz ultravioleta de 366 nm en una sala oscura.

XI. OBSERVACIONES HECHAS A 254 NM

Una mancha azul-violeta a una distancia de recorrido de aproximadamente 0,44 indica la presencia de dexametasona en la solución de ensayo. Otras manchas fuertes generadas por la solución de ensayo apuntarían a otros fármacos o a la degradación de la dexametasona, 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 dexametasona y ninguna mancha en absoluto una ausencia total de dexametasona. Los agentes auxiliares incorporados en diferentes productos acabados pueden causar algunas manchas más débiles que se desplazan junto al frente del disolvente o que emergen cerca o en la línea de origen. Otros corticosteroides relacionados se separan claramente de la mancha de dexametasona y sus factores de retención relativos son los siguientes: aproximadamente 0,36 para la prednisona, aproximadamente 0,32 para la prednisolona, aproximadamente 0,34 para la metilprednisolona y aproximadamente 0,37 para la hidrocortisona. Tenga en cuenta que los rellenos de grado no farmacéutico pueden contener metil o propil parabeno como conservantes, que pueden aparecer con un factor de retención relativo de aproximadamente 0,64.

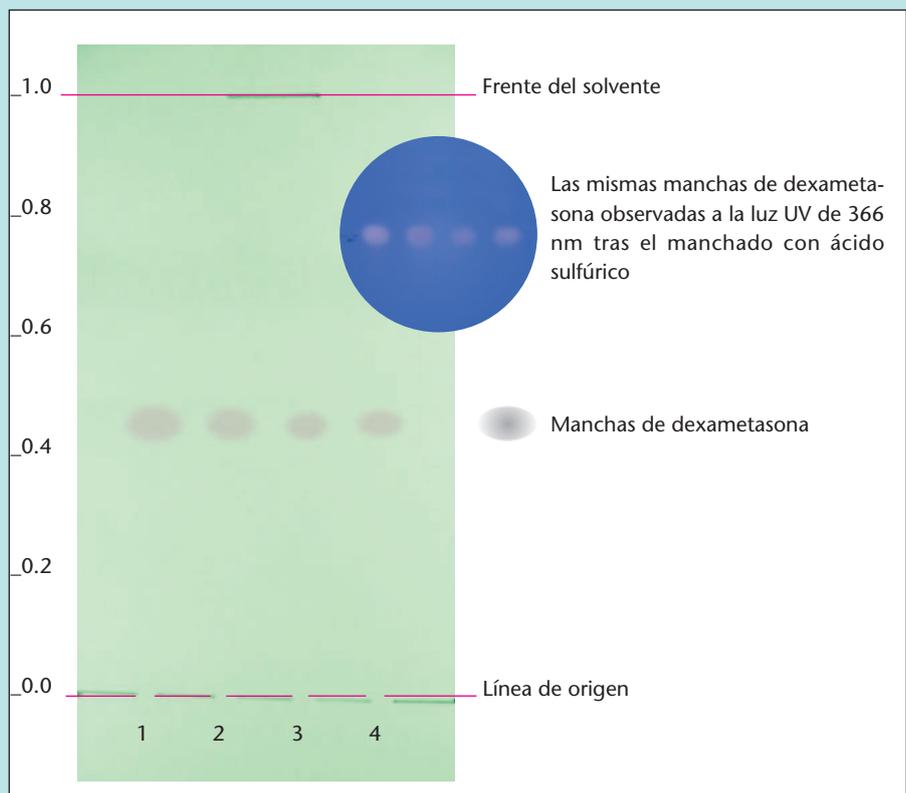
PLACA CROMATOGRÁFICA VISTA BAJO LUZ ULTRAVIOLETA DE 254 NM

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

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

Recorrido No. 3:
Fármaco de calidad deficiente con contenido inaceptable bajo en dexametasona

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



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

Con una nueva exposición de la placa cromatográfica al ácido sulfúrico y al calor, las manchas de dexametasona observadas anteriormente a 254 nm se vuelven ahora grises, con diferentes intensidades que indican diferentes concentraciones del fármaco. Otros corticosteroides relacionados se comportan de forma muy similar, con la excepción de la hidrocortisona, que se vuelve de color amarillo sucio.

XIII. OBSERVACIONES HECHAS A 366 NM TRAS EL MANCHADO CON ÁCIDO SULFÚRICO

Cuando la placa teñida se expone a la luz ultravioleta de 366 nm en una sala oscura, la dexametasona y cada mancha de otros corticosteroides relacionados muestran ahora variaciones de una fluorescencia muy débil de color rosa oscuro a azul oscuro, con la excepción de la hidrocortisona, que muestra aquí una fluorescencia blanca brillante. En cualquier caso, la dexametasona, con su prominente factor de retención relativo de aproximadamente 0,44, está por delante de todos los demás corticosteroides.

XIV. RESULTADOS Y MEDIDAS A TOMAR

La mancha de dexametasona 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. Para documentar el proceso, haga fotos de todos los resultados con una cámara digital desactivando primero el flash.

Primer cribado de las deficiencias del producto mediante ensayos físicos

I. ENSAYOS FÍSICOS

Durante el control visual, busque deficiencias en el etiquetado, el envasado y las formas farmacéuticas, tal como se describe en los capítulos introductorios sobre métodos y operaciones generales del manual principal publicado en 2020, e informe de las anomalías. Considere la posibilidad de tomar fotografías, por ejemplo, con la cámara de un smartphone. Cada ml de solución estéril suele contener unos 3,3 mg de dexametasona (como fosfato disódico), lo que equivale a unos 4 mg de dexametasona-

21-fosfato o a unos 4,37 mg de sal disódica de dexametasona-21-fosfato. Se sabe que existen otras concentraciones de dosificación, por ejemplo, la que figura en la actual lista de medicamentos esenciales para adultos o niños de la OMS es de 4 mg de dexametasona por base libre (presentada como fosfato disódico) por ml. El contenido acuoso de las ampollas y viales de fosfato de dexametasona tiene un aspecto claro e incoloro y no presenta materias/partículas extrañas. Si no es así, se trata de 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 inyectables que contienen sal disódica de fosfato de dexametasona se diluyen con un volumen conocido de agua y la existencia y el contenido del fosfato de dexametasona se comprueban mediante cromatografía en capa fina (CCF) con referencia a una solución de control apropiada.

Nota importante: La sal sódica de fosfato de dexametasona es higroscópica y muy inestable a temperatura ambiente y, por lo tanto, ya es difícil de manejar en el laboratorio completo y casi imposible de manejar en el campo como agente de referencia. Para evitar los problemas de estabilidad asociados a los estándares sólidos de referencia, se pueden comparar productos acabados de soluciones inyectables de dexametasona entre sí. Debe tenerse cuidado de que tanto las soluciones de referencia como las de muestra tengan exactamente el mismo contenido de fosfato de dexametasona, por ejemplo, las muestras de producto que contienen 4 mg de fosfato de dexametasona (equivalente a aproximadamente 4,37 mg de fosfato sódico de dexametasona) por ml de solución inyectable sólo pueden compararse con soluciones de referencia que también contengan 4 mg de fosfato de dexametasona por ml de solución inyectable. Las soluciones inyectables de dexametasona listas para su uso son generalmente estables durante dos o tres años en el envase original protegido de la luz a 25 °C. Sólo se aplican las instrucciones de almacenamiento y la fecha de caducidad que figuran en la etiqueta.

II. EQUIPOS Y REACTIVOS

- | | |
|---|--|
| <ol style="list-style-type: none"> 1) Rotulador 2) Cinta adhesiva 3) Lápiz y regla 4) Viales de 10 ml 5) Juego de pipetas graduadas (1 a 25 ml) 6) Juego de frascos de vidrio de laboratorio (25 a 100 ml) 7) Placas Merck CCF de aluminio con recubrimiento de gel de sílice 60 F₂₅₄ tamaño 5x10 cm 8) Microcapilares de vidrio (2-µl de capacidad) 9) Cuba cromatográfica (frasco de 500 ml) 10) Plancha de calefacción 11) Papel de filtro 12) Tijeras 13) Pinza 14) Luz ultravioleta de 254 nm 15) Luz ultravioleta de 366 nm 16) Cámara de sumersión (frasco de 250 ml) | <ol style="list-style-type: none"> 17) Agua destilada o potable 18) Metanol 19) n-Butanol 20) Solución de ácido acético al 96% 21) Solución de ácido sulfúrico al 96% 22) Solución de referencia, por ejemplo, 8 mg de fosfato de dexametasona en ampollas de 2 ml, cada milímetro contiene 4 mg de fosfato de dexametasona o 4,37 mg de sal disódica de fosfato de dexametasona |
|---|--|

III. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE DEL ESTÁNDAR

La preparación de la solución madre del estándar requiere de un producto auténtico usado para fines de referencia, por ejemplo, ampollas de dexametasona fosfato de 8 mg de fuentes acreditadas que contengan 2 ml de solución inyectable, cada ml con 4 mg de fosfato de dexametasona: 1) Antes de abrirla, agitar y golpear enérgicamente la ampolla varias veces sobre una superficie blanda, por ejemplo un libro, para que el líquido de la cabeza de la ampolla corra hacia abajo y se combine con el líquido del cuerpo de la ampolla. 2) A continuación, rompa la cabeza de la ampolla vacía y transfiera toda la solución del cuerpo de la ampolla a un frasco de vidrio de laboratorio de 10 ml. 3) Para forzar la solución a través del cuello estrecho de la ampolla, puede ser útil conectar sin apretar el cuello abierto de la ampolla a la boca abierta del frasco de vidrio de laboratorio y agitar esta construcción, con la ampolla sentada boca abajo en el frasco de laboratorio, enérgicamente de arriba a abajo. 4) Cerrar el frasco de laboratorio una vez que se haya completado el trasvase de la solución. Lamentablemente, la simple decantación no funciona. 5) Etiquetar como 'Solución madre del estándar de fosfato de dexametasona/FD'. No es necesario realizar ninguna otra dilución.

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

Pipetear 1 ml de la solución madre del estándar en un vial de 10 ml y añadir 7 ml de agua utilizando pipetas graduadas adecuadas. Cerrar y agitar el vial. La solución obtenida debe contener 0,5 mg de fosfato de dexametasona total por ml y ser etiquetada como 'Solución estándar de trabajo de FD al 100%'. Prepare de nuevo esta solución para cada ensayo. Continúe trabajando con la solución clara diluida.

Esta solución estándar de trabajo superior representa un fármaco de buena calidad que contiene el 100% de fosfato de dexametasona.

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

Pipetear 0,5 ml de la solución madre del estándar en un vial de 10 ml y añadir 4,5 ml de agua utilizando pipetas graduadas adecuadas. Cerrar y agitar el vial. La solución obtenida debe contener 0,4 mg de fosfato de dexametasona total por ml y ser etiquetada como 'Solución estándar de trabajo de FD al 80%'. Prepare de nuevo esta solución para cada ensayo. Continúe trabajando con la solución clara diluida.

Esta solución estándar de trabajo inferior representa un medicamento de baja calidad que contiene sólo el 80% de la cantidad de fosfato de dexametasona indicada en la etiqueta del producto. En la investigación actual, este nivel de contenido de fosfato de dexametasona es el mínimo 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 FOSFATO DE DEXAMETASONA POR VIAL/AMPOLLA DE 1 ML

Tome una ampolla de 4 mg y compruebe primero que el contenido de fosfato de dexametasona indicado en la etiqueta es el mismo entre la muestra y la solución de control. A continuación, transferir todo el contenido líquido a un frasco de vidrio de laboratorio de 10 ml de la misma manera como se ha descrito anteriormente para la ampolla de referencia. Obtenga 0,5 ml de solución de inyección del frasco de laboratorio con una pipeta graduada adecuada y combinarla con 3,5 ml de agua en un segundo frasco de laboratorio de 10 ml. Cerrar, agitar y etiquetar. Tenga en cuenta que la manipulación de los frascos es mucho más fácil que la manipulación de las ampollas, ya que el pipeteo puede hacerse directamente a través de la apertura de las mismas sin tener que utilizar un frasco de laboratorio.

8 MG DE FOSFATO DE DEXAMETASONA POR AMPOLLA/VIAL DE 2 ML

Tome una ampolla de 8 mg y compruebe primero que el contenido de fosfato de dexametasona indicado en la etiqueta coincida perfectamente con la muestra y la solución de control. A continuación, transfiera todo el contenido líquido a un frasco de vidrio de laboratorio de 10 ml de la misma manera que se ha descrito anteriormente para la ampolla de referencia. Obtenga 1 ml de solución de inyección del frasco de laboratorio utilizando una pipeta graduada adecuada y combínala con 7 ml de agua en un segundo frasco de laboratorio de 10 ml. Cerrar, agitar y etiquetar. Tenga en cuenta que la manipulación de los frascos es mucho más fácil que la manipulación de las ampollas, ya que el pipeteo puede hacerse directamente a través de la apertura de las mismas sin tener que utilizar un frasco de laboratorio.

Todas las soluciones madre de muestra producidas deben contener finalmente 0,5 mg de fosfato de dexametasona total por ml y ser etiquetadas como 'Solución madre de la muestra de FD'. Prepare de nuevo estas soluciones para cada ensayo. Continúe trabajando con las soluciones claras diluidas.

VII. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE TRABAJO DE LA MUESTRA

Las soluciones madre de muestras de fosfato de dexametasona no requieren ninguna dilución adicional. Ya representan la concentración final de trabajo de 0,5 mg de fosfato de dexametasona por ml. Si se prepara a partir de un producto de alta calidad, la solución de muestra debe coincidir con la concentración de fosfato de dexametasona de la solución estándar de trabajo superior producida anteriormente.

VIII. APLICACIÓN DE LAS MUESTRAS

Marque una línea de origen paralela y 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.

En una placa se pueden aplicar hasta cinco muestras. Comprobar la uniformidad de las manchas utilizando luz UV de 254 nm. Todas las manchas deberán tener forma circular y estar situadas equidistantes entre sí en 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 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 las manchas sea homogéneo.

Seque suavemente las manchas. Para ello, sujete la placa de cromatografía con las pinzas suministradas durante unos dos minutos en la corriente de aire caliente justo encima de la placa calefactora. Agite la placa CCF hacia arriba y hacia abajo constantemente y cada vez que baje la placa de cromatografía, puede tocar la superficie de la placa caliente durante una fracción de segundo.

IX. DESARROLLO DEL CROMATOGRAMA

Pipetear 12 ml de n-butanol, 4 ml de agua y 4 ml de solución de ácido acético al 96% en el frasco utilizado como cuba cromatográfica. La fase móvil tomada es la misma que en la edición 10.0 de la Farmacopea Europea. Cerrar la cuba y mezclar bien. Forrar la pared de la cuba con papel de filtro y esperar 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. Cierre el frasco y **desarrolle la placa cromatográfica hasta que el frente del disolvente se haya desplazado aproximadamente un cincuenta por ciento (!) de la longitud total de la placa cromatográfica, con un tiempo de desarrollo de unos 30 minutos**. Al extender el tiempo de desarrollo a 60 minutos, la difusión molecular comenzará a afectar la forma de las manchas de fosfato de dexametasona. Retire la cromatoplaque de la cuba, marque el frente del disolvente y deje que el exceso de disolventes se evapore de la placa cromatográfica. El ácido acético y el n-butanol son disolventes de baja volatilidad en los que normalmente se utiliza la placa caliente para la evaporación de la placa de CCF durante un período de tiempo más largo. Por otro lado, las manchas de fosfato de dexametasona son muy sensibles al calor y la cromatoplaque no debe sobrecalentarse. Por lo tanto, deje que la fase móvil residual se evapore durante unos 30 segundos colocando la placa de CCF directamente sobre la placa calefactora suministrada y, a continuación, continúe secando la placa cromatográfica durante unos cuatro minutos en la corriente de aire caliente situada directamente sobre la placa calefactora utilizando las pinzas suministradas. Para ello, sacudir arriba y abajo la placa cromatográfica constantemente y cada vez que la cromatoplaque baje, también deberá tocar la superficie de la placa calefactora durante fracciones de segundo. Recuerde que cualquier sobrecalentamiento hará desaparecer las manchas de fosfato de dexametasona. Como alternativa, la placa CCF puede secarse con un secador de pelo.

X. DETECCIÓN DE LOS AGENTES ACTIVOS

Secar todo el disolvente residual y observar la placa cromatográfica bajo luz UV de 254 nm utilizando la lámpara a pilas suministrada, preferiblemente en una sala oscura. Utilizar este método de detección tanto para la identificación como para la cuantificación.

Para una mayor identificación y semicuantificación, tiña la placa cromatográfica con ácido sulfúrico y séquela en una placa calefactora. Para ello, llene el vaso de plástico de 250 ml suministrado con 190 ml de metanol, seguido de 10 ml de solución de ácido sulfúrico concentrado al 96 % y mezcle suavemente. Deje que la mezcla se enfríe y sumerja la cromatoplaque en la solución de tinción utilizando unas pinzas. Sacar inmediatamente la placa CCF de la solución y dejar escurrir todo el exceso de líquido sobre papel absorbente. Limpie el líquido restante de la parte posterior de la placa cromatográfica y continúe secando toda la solución de manchado en la placa de calentamiento suministrada. Durante el calentamiento, todas las manchas de fosfato de dexametasona se harán gradualmente visibles a la luz del día después de aproximadamente un minuto. Tenga en cuenta que el procedimiento de tinción con solución de ácido sulfúrico es muy similar al descrito con ninhidrina en la página 36 del manual principal. Tras la lectura de

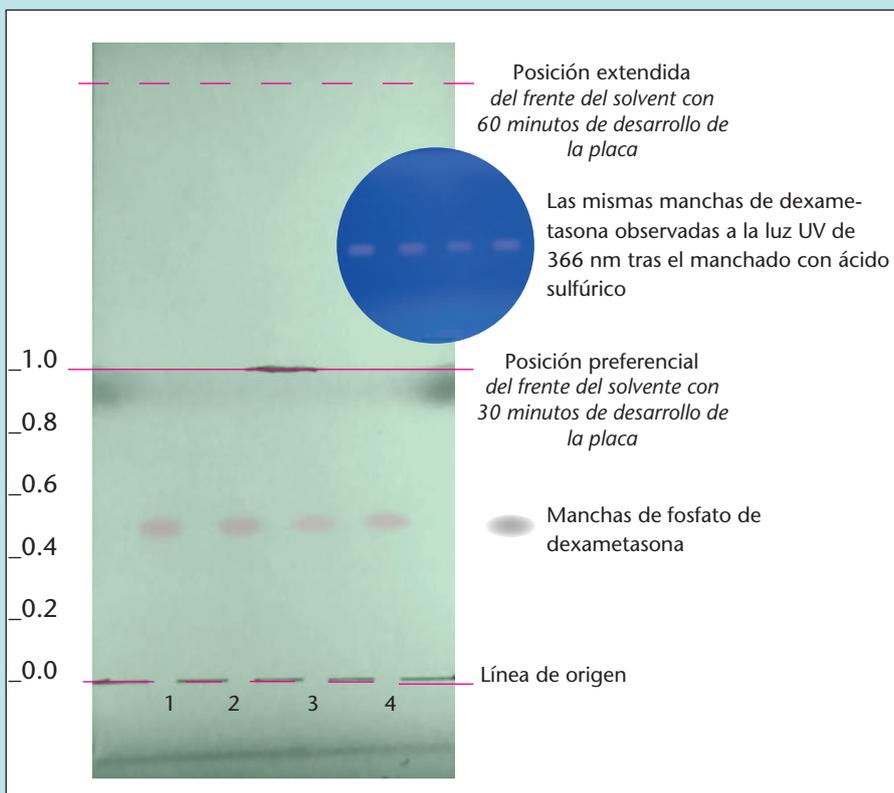
PLACA CROMATOGRÁFICA VISTA BAJO LUZ ULTRAVIOLETA DE 254 NM

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

Recorrido No. 2:
Fármaco de buena calidad con contenido aceptable de fosfato de dexametasona

Recorrido No. 3:
Fármaco de calidad deficiente con contenido inaceptable bajo en fosfato de dexametasona

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



la cromatoplaque a la luz del día, se puede realizar una verificación adicional de la identidad y el contenido del fosfato de dexametasona exponiendo la cromatoplaque a una luz ultravioleta de 366 nm en una sala oscura.

XI. OBSERVACIONES HECHAS A 254 NM

Una mancha azul-violeta a una distancia de recorrido de aproximadamente 0,49 indica la presencia de fosfato de dexametasona en la solución de ensayo. Otras manchas fuertes generadas por la solución de ensayo apuntarían a otros fármacos o a la degradación del fosfato de dexametasona, 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 dexametasona y ninguna mancha en absoluto una ausencia completa de fosfato de dexametasona. Los agentes auxiliares incorporados en los diferentes productos acabados pueden causar algunas manchas más débiles que se desplazan junto al frente del disolvente o que emergen cerca o en la línea de origen. Sólo a título informativo: Si la dexametasona estuviera presente en forma de su base libre, recorrería una distancia de aproximadamente 0,87.

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

Tras una nueva exposición de la placa cromatográfica al ácido sulfúrico y al calor, las manchas de fosfato de dexametasona observadas anteriormente a 254 nm se vuelven ahora grises, con diferentes intensidades que indican diferentes concentraciones de fármaco.

XIII. OBSERVACIONES HECHAS A 366 NM TRAS EL MANCHADO CON ÁCIDO SULFÚRICO

Tras exponer la placa cromatográfica teñida a la luz UV de 366 nm en una sala oscura, las manchas de fosfato de dexametasona muestran una débil fluorescencia gris rojiza.

XIV. RESULTADOS Y MEDIDAS A TOMAR

La mancha de fosfato de dexametasona 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. Para documentar el proceso, haga fotos de todos los resultados con una cámara digital desactivando primero el flash.

- 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 casi 100 países.

Este suplemento es un número especial sobre la medicación prioritaria con dexametasona para el alivio de los síntomas en los casos graves de COVID-19 en el hospital.

El inventario de métodos del manual principal de GPHF-Minilab, publicado en 2020, consiste en una colección de procedimientos de ensayo para 100 ingredientes farmacéuticos activos para la verificación rápida de la calidad de una amplia gama de productos farmacéuticos acabados.



Global Pharma Health Fund
www.gphf.org