



**Inês Andreia**

**Domingues Pina da**

**Silva Grilo**

**Manuais de Teste de Fármacos: Tradução e**

**Discurso da Especialidade**





**Inês Andreia  
Domingues Pina da  
Silva Grilo**

**Manuais de Teste de Fármacos: Tradução e  
Discurso da Especialidade**

Projecto apresentado à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Tradução Especializada, realizada sob a orientação científica da Prof. Doutora Maria Teresa Costa Gomes Roberto, Professora Auxiliar do Departamento de Línguas e Culturas da Universidade de Aveiro.



## **o júri**

Presidente

**Prof. Doutora Maria Teresa Murcho Alegre**

Professora Auxiliar da Universidade de Aveiro

**Prof. Doutora Maria Teresa Costa Gomes Roberto**

Professora Auxiliar da Universidade de Aveiro (orientadora)

**Prof. Doutor Samuel Martins Silvestre**

Professor Auxiliar da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior



## **agradecimentos**

Um sincero agradecimento a todos os que contribuíram para a realização deste projecto:

À Professora Doutora Maria Teresa Roberto, pela confiança que depositou neste grupo de trabalho, pela amizade, incentivo e orientação constantes. Pela prontidão e disponibilidade que demonstrou, pelas reuniões nas quais sempre me soube encaminhar, dando conselhos e ideias inspiradoras. Por ter sido e continuar a ser um modelo de referência a nível académico e social.

Aos Professores Doutores Luís Almeida, Bruno Gago e Samuel Silvestre, pela validação, como especialistas da área, do termos específicos deste trabalho, que mostrou ser crucial para solucionar algumas questões tradutológicas e criar uma tradução adequada e familiar da área de conhecimento.

À Rosa, colega e amiga, pelo incessante incentivo e motivação quando a vontade escasseava. Pelas horas de trabalho que parecia infindável. Pelo companheirismo e amizade que contribuíram para o meu crescimento académico e pessoal.

Ao Bruno, pela paciência, amizade, apoio e amor. Pela confiança que sempre me transmitiu durante todo o processo deste projecto.

Por fim, mas não menos importante, aos meus pais, por todo o apoio e incentivo. Por me terem proporcionado a melhor educação possível e fazerem de mim quem hoje sou.

A todos vós, Muito Obrigada!





**palavras-chave**

Fármacos, Cromatografia em Camada Fina, falsificação de medicamentos, linguagem de especialidade, Skopos

**resumo**

O texto de partida deste projecto foi repartido entre dois textos: o “Manual Accompanying The GPHF - Minilab®, Volume II, Thin Layer Chromatographic Tests” e o “Manual Accompanying The GPHF - Minilab®, Supplement 2010, Volume II, Thin Layer Chromatographic Tests”, editados pela Global Pharma Health Fund (GPHF), uma instituição de beneficência iniciada e patrocinada pela Merck Darmstadt – Alemanha. Estes textos inserem-se no Mestrado em Tradução Especializada, no âmbito específico da saúde e ciências da vida.

O tema do texto de partida prende-se com a situação da falsificação de medicamentos, nomeadamente em países africanos, onde a incidência de produtos farmacêuticos falsificados é muito mais elevada. Consiste, em termos práticos, no ensinamento de procedimentos de teste de fármacos através da Cromatografia em Camada Fina, na elaboração de manuais de instruções. Estes textos destinam-se a um público-alvo cuja especialização na área de conhecimento é desconhecida. Portanto, tornou-se imperativo tomar uma postura mediadora perante o texto de partida de modo a criar uma tradução com discurso simples e claro no texto de chegada.

Este relatório visa apresentar uma proposta de metodologia tradutológica para a abordagem de textos deste tipo, assim como uma análise e reflexão, sustentada com exemplos práticos, e resolução dos problemas tradutológicos expostos. Este projecto centrou-se nos traços específicos de um manual de instruções, caracterizando os dois textos (texto de partida e tradução) tendo em conta o discurso usado.



**keywords**

Drugs, Thin Layer Chromatography, counterfeit drugs, specialist language, Skopos

**abstract**

This project's source text was distributed in two texts: the "Manual Accompanying The GPHF - Minilab®, Volume II, Thin Layer Chromatographic Tests" and the "Manual Accompanying The GPHF - Minilab®, Supplement 2010, Volume II, Thin Layer Chromatographic Tests", both edited by The Global Pharma Health Fund (GPHF), a charity initiated and maintained by Merck Darmstadt – Germany. These texts are relevant to the Masters in Specialized Translation in the the specific field of health and life sciences.

The theme of the source texts' relates to the detection of counterfeit drugs, particularly in African countries where the incidence of counterfeit pharmaceutical products is very high. It consists, in practical terms, of the teaching of drug testing procedures by Thin Layer Chromatography, through the elaboration of instruction manuals. These texts are for an audience whose expertise in the knowledge area is unknown. Therefore, it became imperative to take on a mediating position of the source texts' in order to create a translation with a simple and clear discourse in the target text.

This report aims to present a proposed translatorial methodology for dealing with texts of this type, as well as an analysis and reflection, supported by practical examples, and the solving of the translating problems encountered. This project focused on the specific characteristics of an instruction manual, featuring the two texts (source text and translation) and taking the discourse into account.



# Conteúdo

Capítulo 1 Introdução .....	1
Capítulo 2 Enquadramento do texto no mestrado de tradução especializada na área da saúde .....	3
Capítulo 3 Enquadramento teórico do projecto: Introdução à comunicação técnica.....	7
3.1. A tradução técnica.....	7
3.2. Abordagem ao Texto Informativo .....	13
3.3. Linguagens de Especialidade .....	14
3.3.1. Comunicação especializada .....	14
3.4. Representação do Conhecimento.....	17
Capítulo 4 A Metodologia tradutológica baseada nas fases do processo de tradução de Gouadec.....	19
Capítulo 5 Fase de pré-tradução.....	23
5.1 Definição do Tipo de Texto .....	23
5.2 Metodologia de Trabalho.....	26
Capítulo 6 Fase de Tradução .....	29
6.1 Pré-transferência.....	29
6.2 Transferência .....	31
6.3 Pós-transferência .....	41
Capítulo 7 Fase de pós-tradução .....	45
Capítulo 8 Notas conclusivas .....	47
Bibliografia.....	49
Webgrafia .....	51
Anexos .....	55
Anexos 1 Glossário .....	57
Anexo 2.....	65
A - Texto original e Tradução do Volume II (Páginas 141 a 210).....	65
B - Texto original e Tradução do Suplemento (Páginas 1 a 43).....	227



# Lista de Figuras

Figura 1. Os tipos e variedades de texto de Reiss.....	24
Figura 2. As características funcionais dos tipos de texto e ligações aos métodos de tradução.....	24





# Capítulo 1

## Introdução

O texto sob estudo para o presente projecto consiste em dois (de três) manuais de instruções para o controlo da qualidade de fármacos através de testes colorimétricos. Os manuais foram disponibilizados pela empresa farmacêutica Merck, que, através deste projecto, pretende prevenir e atenuar a situação da falsificação de fármacos, nomeadamente em países africanos.

Patrocinada exclusivamente pela Merck Darmstadt – Alemanha, a fundação subsiste, igualmente, através de donativos e voluntariado. Em conjunto com outras iniciativas de assistência ao desenvolvimento internacional, este projecto tem por objectivo melhorar os cuidados de saúde e fomentar o fornecimento de medicamentos, através do kit de testes (Minilab) que será entregue a par da tradução destes manuais. Na posse das traduções em português, conjuntamente com o kit completo de testes disponibilizado pela Merck, os seus receptores serão capazes de se proteger e de proteger doentes contra o perigo inerente ao consumo de medicamentos contrafeitos. Até hoje, mais do que 400 “Minilabs” foram distribuídos em 70 países. Os “Minilabs” consistem em malas próprias para o armazenamento e deslocação de material de laboratório, equipadas com os diversos materiais necessários à execução dos testes propostos, assim como fármacos autênticos para efeitos de referência.

Os textos apresentam-se na forma “comum” de manuais de instruções – texto complementado com ilustrações e notas para o utilizador – e têm como objectivo ensinar métodos de teste aos fármacos a pessoas com conhecimento prévio na área. Embora o texto apresente uma terminologia bastante específica, o seu discurso e tipo de linguagem são, no entanto, característicos de manuais de instruções e, por isso, simples e concisos.

Se por um lado o texto apresenta terminologia da linguagem de especialidade, por outro ostenta um tipo de discurso bastante claro e visivelmente “user friendly”. Deste modo, esta dicotomia de características será analisada ao longo deste relatório.

O relatório será, então, dividido pelas seguintes componentes:

- Enquadramento do texto sob estudo no âmbito do Mestrado em Tradução Especializada na área da saúde;
- Enquadramento teórico do projecto, onde será analisada a tradução técnica e as suas características, bem como as linguagens de especialidade e a representação do conhecimento aliadas à tradução médica/técnica (esta secção servirá como base teórica do projecto);
- Estruturação do processo tradutológico com base nas diferentes fases da tradução defendidas por Daniel Gouadec;
- Apresentação dos problemas tradutivos ao longo de cada uma das fases do processo de tradução, acompanhados por fundamentos teóricos previamente explorados;
- Apresentação de notas conclusivas consistindo num resumo de todo o processo envolvente na elaboração deste relatório, assim como uma análise crítica do mesmo.

São disponibilizados em anexo o glossário bilingue da terminologia médica/farmacológica (Anexo 1), resultante do levantamento de terminologia técnica com o objectivo principal de servir de apoio à tradução e que poderá representar, igualmente, uma referência para futuros trabalhos, bem como o texto de partida acompanhado pela respectiva tradução (Anexo 2).

## **Capítulo 2**

# **Enquadramento do texto no mestrado de tradução especializada na área da saúde**

Este projecto teve início no final do 1º ano do Mestrado de Tradução Especializada (ano lectivo de 2009-2010), tendo começado como um projecto em grupo, independente do âmbito escolar. O mesmo teve início devido ao contacto da Merck, por parte da responsável pelo projecto, a Sr.<sup>a</sup> Sylvia Pöhlmann (responsável pelo desenvolvimento do projecto na Guiné-Bissau que irá manter contacto pessoal com o público-alvo), e da Sr.<sup>a</sup> Kerstin Wallrapp (correspondente do projecto), à Doutora Maria Teresa Roberto, orientadora do projecto, que, por sua vez, depositou a sua confiança neste grupo de trabalho (composto inicialmente por mim e pela colega Rosa Dias).

O tema deste projecto é actual e pertinente para a saúde global. Trata-se de tentar combater e estabelecer um entrave à falsificação de fármacos, que tem vindo a crescer em complexidade, número e extensão geográfica, segundo comunicação da directora da FDA (Food and Drug Administration), Margaret Hamburg, à OMS (Organização Mundial de Saúde).

A contrafacção de medicamentos é um problema a nível mundial. Howard Zucker, antigo director-geral assistente da OMS, considera existir uma “praga” de medicamentos de fraca qualidade e denomina-os como um “assassino silencioso à solta pelas ruas das grandes cidades desde Pequim a Nova Iorque” (2007). As fracas economias que se têm feito sentir, até mesmo em países desenvolvidos, levaram à procura de medicamentos em fontes mais económicas, nomeadamente a Internet, por parte das populações que cada vez

mais lutam por condições de saúde favoráveis. Consequentemente, estima-se que 50% dos medicamentos à venda através da Internet, por sítios que ocultam a sua verdadeira localização geográfica, sejam contrafeitos. Uma segunda estimativa pela OMS a nível global (de todos os meios de venda por todo o mundo) indica a possibilidade de 10% dos medicamentos vendidos no mundo serem falsificados.

Contudo, devido ao especial crescimento da falsificação de fármacos, nomeadamente em países africanos, a tradução destes textos, que será realizada do inglês para o português, terá como objectivo alertar e informar especialistas e técnicos de laboratório, sendo que o consumo de fármacos ineficazes não só não previne a propagação de doenças como a malária e a tuberculose e apresentam uma ameaça à vida e bem-estar de quem os consome, como ainda torna os respectivos consumidores resistentes às substâncias presentes em fármacos legais, tornando, por isso, cada vez mais difícil a cura deste tipo de doenças.

Tal como foi referido anteriormente, estes projectos recorrem a donativos ou ajuda por parte de voluntários, pelo que será incerto o nível de especialização do público-alvo e, daí, a abordagem mais simples e prática da tradução, que será posteriormente analisada. Foi, então, necessário ter em conta que os possíveis leitores não só poderão ser indivíduos não especializados na área da farmacologia como poderão não dominar totalmente a língua portuguesa ou linguagem de especialidade consequente da área de conhecimento.

A divulgação da tradução destes textos em países africanos com língua portuguesa – como língua materna ou segunda língua - pretende alertar e educar, de modo a atenuar os efeitos cada vez mais nefastos resultantes da utilização de fármacos contrafeitos, nomeadamente em países bastante carenciados. O facto de a tradução ser feita num discurso corrente e simples não só facilita todo o processo de aprendizagem dos métodos de teste a serem aplicados como favorece a fácil e rápida divulgação dos mesmos pelas populações circundantes.

Sendo este o objectivo base de todo o projecto, os objectivos específicos deste projecto/relatório são os seguintes:

- Traduzir os manuais de forma a apresentar um discurso simples e claro tendo sempre como referência o objectivo final da tradução (posterior concomitância com a teoria *Skopos*);
- Descrever os campos de conhecimento implicados neste trabalho bem como o tipo de texto, de forma a solucionar e compreender a escolha de termos médicos/técnicos e escolhas de tradução, tendo em conta o público-alvo e o seu nível de conhecimento na área de estudo;
- Recolher, analisar e organizar os termos médicos/técnicos, com vista a criar um glossário bilingue de apoio ao trabalho em curso e a projectos futuros, no âmbito desta temática;
- Analisar, de forma crítica, as escolhas efectuadas durante a tradução como processo e produto, especialmente no que se refere à dimensão discursiva desta área de especialidade.



## **Capítulo 3**

### **Enquadramento teórico do projecto:**

### **Introdução à comunicação técnica**

#### **3.1. A tradução técnica**

O texto é um meio de comunicação que pode ser caracterizado de acordo com os seus traços mais predominantes, com a sua função e objectivo de comunicação, tópico de estudo e tipo de linguagem. Assim sendo, o que é um texto técnico e como identificá-lo? Em que matérias/campos de conhecimento podemos encontrar textos técnicos?

A classificação de texto técnico, ou de comunicação técnica, não pode nem deve ser atribuída apenas a textos dos campos da economia, dos negócios, das leis, etc., somente baseada na existência de terminologia específica nos respectivos textos. O que torna um texto “técnico” é a combinação dessa terminologia com o conhecimento aplicado no mesmo, que é configurado no discurso do texto. É o uso que é dado à respectiva terminologia especializada e do conhecimento, conseqüente do uso específico da terminologia, que é transmitido.

Como distinguir o texto técnico do texto científico? Esta foi uma das dúvidas existentes no início deste projecto, pois seria necessário proceder a uma classificação do tipo de texto, de forma a atribuir os métodos de avaliação correctos para proceder a uma caracterização e análise mais precisas e eficientes.

A distinção entre estes dois tipos de texto não é fácil pois prevalece em ambos uma função referencial ou informativa. Para além do seu conteúdo, estes dois tipos de texto assemelham-se no seu público-alvo pois, maioritariamente, ambos se destinam a especialistas ou indivíduos com

conhecimento prévio na matéria de estudo, sendo que assumem estilos e linguagens distintas consoante o nível de especialização do público a que se destinam. Que elementos nos permitem então proceder à distinção entre ambos?

Jody Byrne distingue estes dois tipos de texto tendo em conta a sua função. O mesmo defende que o uso dos termos “tradução técnica” e “tradução científica” nunca poderá ser feito em conjunto nem podem os termos ser usados intercaladamente para designar o mesmo tipo de tradução. Assim, o autor afirma que os dois tipos de tradução não podem ser comparados. A distinção que este faz destes dois tipos de texto provém da diferente função de cada texto: o texto científico tem por objectivo dar a conhecer a teoria do conteúdo científico que apresenta; por outro lado, o texto técnico, apesar de apresentar igualmente um conteúdo de origem científica, tem por objectivo ensinar a pôr em prática o conhecimento que é transmitido no texto científico. Portanto, podemos fazer corresponder, em termos latos, o texto científico à teoria e o texto técnico à prática, à aplicabilidade da teoria.

Tendo a definição de Byrne como referência, podemos concluir que o texto de estudo deste projecto é técnico, pois tem por base o estudo científico embora com a finalidade de serem efectuados testes com base nesse conhecimento. “Technical texts can rely on world or background knowledge to a greater extent.” (Pinchuck, 1977:218s. apud Byrne, 2006:10)

No caso dos manuais de instruções deste projecto, o objectivo é ajudar o leitor a realizar uma acção, independentemente do conteúdo científico que serve de background. Portanto, apesar de se sustentar em informação científica, o texto técnico deve apresentar uma linguagem simples, concisa, que não ostente ambiguidade e que possibilite a execução bem sucedida das tarefas que são explicadas ao leitor. Da boa compreensão do texto advém uma tarefa bem executada.

Byrne equaciona a qualidade de um manual de instruções em termos da sua usabilidade (usability) – “how well users can use it”.

Portanto, apesar do principal objectivo do texto técnico ser transmitir conhecimento de forma eficiente e de fácil percepção para o leitor, existem



alguns outros aspectos a que o tradutor deve prestar atenção aquando da tradução de um texto desta especificidade.

“... there is more to technical translation than simply transmitting information. Instead, the challenge for technical communicators is to ensure that all of the relevant information is indeed conveyed but also that it is conveyed in such a way that the readers can use the information easily, properly and effectively.” (Byrne, 2006:10)

O leitor torna-se, assim, num factor decisivo no processo de tradução. Embora os textos de partida e de chegada possam apresentar características diferentes a sua função é, contudo, a mesma: ensinar o leitor a usar o produto sob estudo de forma eficiente. Então, para que o texto seja “usável” é indispensável e extremamente necessário que o tradutor conheça os utilizadores reais a quem o texto se destina e as suas expectativas. Estas irão, posteriormente, determinar a usabilidade do texto que, por sua vez, depende igualmente da legibilidade do mesmo.

A tradução é, na maioria dos casos, uma acção que ultrapassa barreiras culturais. Assim, o tradutor tem que interiorizar o papel de intermediário e saber adaptar o texto para a cultura de chegada. Sendo que cada cultura apresenta os seus sinais e códigos, sejam eles culturais, linguísticos, sociológicos, religiosos, etc., seria impossível elaborar uma tradução literal a ser recebida por uma comunidade que claramente apresenta diferentes sinais, conceitos ou códigos.

Logo, apesar dos textos em diferentes línguas poderem apresentar traços diversos que requerem estratégias diferentes, o seu objectivo não deixa de ser o mesmo. O autor, quer o criador do texto de partida quer o tradutor técnico, deve, portanto, ter em especial atenção o “macro-objectivo” do texto que está a produzir que é compreender o leitor e saber o que este pretende do texto, para conseguir corresponder a essas expectativas e traduzir eficientemente, adoptando uma perspectiva funcional em relação ao processo tradutológico.

Reiss aborda a perspectiva funcional no processo de tradução em termos de equivalência, nos dois textos, a nível do conteúdo conceptual, da forma linguística e da função comunicativa, tendo como regra principal o facto de que o texto de chegada deve ter o mesmo “valor” que o texto de partida. Tal torna-

se possível para este projecto pois ambos os textos têm a mesma função comunicativa.

A mesma teoria funcional é defendida por House, que refere que “It is, of course, undeniably true that a translation should produce equivalent responses.” (1997:4) e é com base nesta regra que defende que o derradeiro objectivo de uma tradução é que esta apresente a mesma função que o respectivo texto de partida.

Entendemos, então, que a abordagem funcional de um processo de tradução não só permite a existência de um elo de ligação entre o texto de partida e o texto de chegada, em relação à sua função, como lhe concede prioridade.

Se, por um lado, a concepção da tradução deste projecto se prende com a abordagem funcional de manter a função do texto original na tradução, por outro, é também vinculada pela adopção da teoria Skopos delineada por Katharina Reiss e Hans Vermeer.

“Each text is produced for a given purpose and should serve this purpose. The Skopos rule thus reads as follows: translate / interpret / speak / write in a way that enables your text / translation to function in the situation in which it is used and with the people who want to use it and precisely in the way they want it to function.”  
(Vermeer:1989a:20, tradução de Nord, 2007:29 apud Pym 2010:45)

*Skopos* é a palavra grega que denomina “propósito”, “objectivo”. A teoria Skopos tem como princípio primário que para determinar o processo tradutológico é necessário saber o seu propósito. Esta noção prende-se com a ideia da intencionalidade de cada acção de um indivíduo. Todas as acções têm uma intenção e é essa intenção que vai determinar a acção a ser executada e o modo como será efectuada.

Tudo é feito com um propósito e na tradução quem o decide é o cliente em conjunto com o tradutor. O contacto entre ambos os intervenientes no processo de tradução trará melhores resultados para o projecto, pois o tradutor poderá atingir mais facilmente as expectativas, necessidades, conhecimento prévio e condições situacionais do público-alvo, que foram previamente estudadas e expostas pelo cliente. O cliente deve fornecer tantos detalhes quanto possível sobre o propósito (público-alvo, tempo, espaço, ocasião, meio

de comunicação e função do texto) de modo a conseguir uma tradução fiel e manter-se a si próprio fiel quanto à intenção primordial do trabalho, que será a de obter uma transmissão eficaz da mensagem do texto de partida. Para tal, o tradutor deve, primordialmente, captar e dominar a mensagem do texto de partida.

A análise desta teoria não tem como objectivo definir as estratégias de tradução, mas sim preservar a função / o propósito do texto, mantendo a função educativa e informativa existente no texto de partida, tendo, igualmente, em conta que o público-alvo partilha de um contexto cultural diferente.

Com base nesta ideia, o tradutor tem o papel de mediador, com a função de adequar o texto ao receptor. O tradutor é um mediador que perante os referentes culturais assume, ou deve assumir, uma posição que permita a transferência da mensagem com o mínimo ruído possível, entre o emissor e o receptor. Esta função mediadora pode traduzir-se numa acção transparente, não sendo necessário recorrer a mudanças drásticas que façam com que o leitor se aperceba de que o texto é uma tradução. No caso deste projecto, e na análise decorrente, não foi necessário tomar medidas radicais, pois trata-se do discurso de especialidade que é comum nos manuais de instruções (características que, no caso específico da língua para que se traduz, se mantêm).

Usualmente, o “propósito” de que trata a teoria Skopos refere-se ao propósito do texto de chegada. Mas nesse caso, ao contrário da abordagem funcional, na teoria Skopos o texto de chegada não tem qualquer elo de ligação com o texto de partida? Não existe qualquer tipo de fidelidade? Poderá este processo ser chamado de “tradução” ou simplesmente denominado por “adaptação”?

“What the *Skopos* states is that one must translate, consciously and consistently, in accordance with some principle respecting the target text. The theory does not state what the principle is: this must be decided separately in each specific case.”  
(Vermeer: 1989b/2004:234 apud Pym, 2010:45)

Não existem problemas de fidelidade e de livre tradução, de equivalência formal e dinâmica na teoria, pois o Skopos de uma tarefa de tradução em particular poderá requerer uma tradução fiel ou livre, depende de para que é

necessária a tradução. Nem todas as traduções têm que ser adaptadas para os signos e conceitos culturais do público-alvo. Tal só acontecerá se assim for necessário e se for esse o propósito da tradução. Logo, o tradutor deve traduzir de forma consciente e consistente, de acordo com princípios que respeitam o texto de partida. Contudo, a teoria não define quais os princípios. Esses são definidos separadamente em cada caso específico, sendo o receptor o factor determinante no Skopos do texto.

Nord defende que o tradutor tem obrigações éticas, não só para com os textos (objecto a que se dá mais ênfase aquando da referência à fidelidade da tradução) mas, principalmente, para com as pessoas (emissores, clientes, receptores e todos os que merecem a “fidelidade” do tradutor). O tradutor necessita de mostrar sensibilidade e maturidade.

Podemos, portanto, concluir que existe equivalência na função dos textos de partida e de chegada, o que torna aceitável neste projecto o estudo e aplicabilidade da teoria funcional e da teoria Skopos em conjunto.

Enquanto que a teoria funcional permite a ligação da função do texto de chegada ao texto de partida, a teoria Skopos elimina-a, defendendo que cada texto tem a sua função, cada texto é visto como um original. Como este projecto se baseia num texto do qual a tradução mantém o objectivo final, é possível focarmo-nos nessa função idêntica, não pondo de parte a função crítica do tradutor, introduzindo ambas as teorias no estudo e análise do texto sob avaliação.

## 3.2. Abordagem ao Texto Informativo

Como referido anteriormente, a teoria Skopos foca-se, acima de tudo, no propósito da tradução, que determina as estratégias e métodos de tradução a serem empregues, de modo a produzir um resultado funcional. Logo, as soluções para situações de ambiguidade são diferentes consoante o tipo de tradução e o tipo de texto. Posteriormente, serão analisados os tipos de texto propostos por Reiss, de modo a obter uma análise mais adequada ao tipo de texto sob estudo.

Consequentemente, como referido na secção anterior, este projecto foi elaborado atentando, também, à teoria *Skopos* delineada por Reiss e Vermeer. A adopção desta teoria não torna o tradutor num “mercenário” (Byrne, 2006:43), porque a capacidade de decisão do mesmo como profissional linguístico não deixa de ser aplicada. Nord introduz nesta questão a noção de “function plus loyalty” (1997:122). O facto da teoria Skopos defender que a tradução de um texto deve ser feita de acordo com um princípio que respeite o texto de chegada, que deve ser decidido em particular para cada projecto, pode ser visto como uma parte da teoria. Certamente esta teoria introduz o elemento de subjectividade no processo que nem sempre é repetido (conceito adjacente a outras teorias de tradução). “The translation purpose justifies the translation procedures”. (Nord,1997:124)

Existem diversas estratégias de tradução de que o tradutor dispõe para transmitir a mensagem da forma mais conveniente. O uso destas estratégias em várias fases, no mesmo projecto, texto ou parágrafo, é ainda um tema em discussão - no caso de o tradutor ter um objectivo geral para uma tradução e, contudo, usar diversas estratégias sem comprometer o propósito comunicativo da mensagem resultante do processo de tradução é aceitável e, até, recomendável.

## **3.3. Linguagens de Especialidade**

### **3.3.1. Comunicação especializada**

A comunicação específica de um tópico, não muito diferente da comunicação geral, é sustentada através de cinco elementos:

- o codificador/emissor (o que produz a mensagem);
- a realidade em que está inserida;
- o meio de comunicação através do qual a mensagem é transmitida;
- o decodificador (o receptor da mensagem);
- e a língua/linguagem que é usada para servir como base para a representação da informação que se pretende transmitir.

Existe, ainda, um sexto elemento no acto da comunicação que serve como elo de ligação entre os restantes elementos e torna este mesmo acto possível: a mensagem (escrita ou oral).

Quer o codificador (emissor), quer o decodificador (receptor) da mensagem, partem para o acto da comunicação com conhecimento prévio, seja a nível do mundo real sobre o qual querem comunicar, seja a nível das normas sociais quanto ao uso da linguagem em questão.

Na comunicação específica, pressupõe-se que estes dois participantes tenham um nível mais elevado de especialização do tópico sobre o qual se pretende transmitir a mensagem. Logo, ambos comunicam entre si pressupondo que partilham do mesmo conhecimento e informação acerca do tópico em questão. Podemos, assim, referir que ambos fazem parte duma comunidade discursiva mais específica.

Assim sendo, as suas referências comunicativas estão limitadas ao campo ou área específica do tema da mensagem, sendo mais formalmente conceptualizado do que as referências da linguagem geral/comum. Contudo, esta comunicação abarca, igualmente, a linguagem comum que suporta o texto a nível sintáctico, morfológico e lexical. A linguagem comum serve, portanto, como veículo base para a “construção” do texto técnico. Independentemente do

nível de conhecimento do público-alvo ou da especificidade do assunto que se aborda, é da linguagem comum que partimos para qualquer acto comunicativo.

A comunicação especializada difere da comunicação geral em dois aspectos: no tipo de texto produzido, proveniente de um determinado tipo de comunicação; e no uso de terminologia específica. O uso da terminologia específica facilita a comunicação entre especialistas, tornando-a mais eficiente e rápida. Contudo, a presença dessa terminologia faz com que os critérios de avaliação entre os textos específicos e os textos gerais sejam diferentes: se por um lado os textos gerais são avaliados de acordo com o seu nível expressivo, variedade e originalidade, por outro, nos textos especializados prevalece a sua precisão, concisão e adequação/conveniência, critérios pelos quais serão avaliados.

“A specific text must be concise because concision reduces the possibility of distortions in the information. It must also be precise because of the nature of scientific and technical topics and the functional relations among specialists. Finally, it must be appropriate or suitable to the communicative situation in which it is produced so that, depending on the circumstances of each situation, every text is adapted to the characteristics of the interlocutors and their level of knowledge about the topic, introducing more or less redundancy according to need.” (Cabré, 1998:47)

A terminologia apresenta um papel muito importante na conquista destes objectivos. Através do uso da terminologia específica conseguimos tornar o texto mais conciso — serve como exemplo a precisão de um termo em relação à de uma paráfrase — e os intervenientes dispõem do melhor recurso para referir a área de especialização que partilham: uma linguagem de especialidade. Existem, também, conceitos que só podem ser referidos usando a terminologia adequada; dificilmente a língua geral poderá veicular elementos, processos, características e metodologias específicas de uma dada área de conhecimento sem causar distorção e ambiguidade.

A linguagem de especialidade é uma sub-língua da “língua comum” enriquecida com termos e conceitos específicos do tópico que trata. Apresenta códigos linguísticos e diversas variantes da língua comum, sendo, por isso, semi-autónoma e o seu uso pressupõe conhecimento prévio, pelo que é apenas usada com objectivos específicos que têm como função transmitir

conhecimento de um tópico especializado. A variedade das linguagens de especialidade inseridas na linguagem comum corresponde às finalidades específicas de diferentes situações de comunicação, ou seja, quanto mais tópicos de matérias de conhecimento específicas existirem, maior será o número de linguagens de especialidade, pois maior será a necessidade do ser humano criar “meios” para comunicar sobre um ou mais temas específicos.

Ao contrário da linguagem comum, que utiliza palavras/léxico de uso frequente combinados, de forma lógica, com o discurso e que abarca palavras familiares na comunidade linguística, a linguagem de especialidade baseia-se nos termos que denominam conceitos de um domínio específico. É um subsistema lexical utilizado para prevenir situações de ambiguidade em comunicações de temas específicos. As linguagens de especialidade estão, por isso, mais direccionadas para os objectivos de uma comunidade, pois provêm da necessidade de padronização de novos conceitos para otimizar o acto comunicativo.



### 3.4. Representação do Conhecimento

“The ordering of thought and the conceptualization represent the cognitive side of terminology, the transfer of knowledge constitutes its communicative side. Terminology is the most important characteristic of specialist communication because it differentiates special languages from the general language and also the various special languages from one another.” (Cabré, 1998:45)

Todo o acto comunicativo entre seres vivos depende do uso de sinais que servem como veículo para a transmissão da mensagem desejada. Estes sinais podem ser combinados em sistemas mais ou menos complexos, dependendo do estado de desenvolvimento dos intervenientes.

Na comunicação especializada, escrita ou falada, os conceitos constituem as unidades base para comunicar o conhecimento e informação especializados. A comunicação especializada envolve transferência de conhecimento e, conseqüentemente, representação de conhecimento.

A terminologia é a representação desses conceitos. Tem como função otimizar a comunicação entre especialistas e profissionais e entre estes e o público em geral, apoiar a tradução, auxiliar a elaboração de um discurso na documentação técnica e nos instrumentos de organização da informação e no planeamento linguístico.

Cabré (1998:33) defende que “for specialists, terminology is a formal reflection of the conceptual organisation of a speciality field and an unavoidable means by which professionals express and communicate with each other”.

De facto, existe na terminologia uma organização dos conceitos, representados por termos. Essa organização baseia-se em ontologias, palavras organizadas. As ontologias são as estruturas de representação, isto é, representam a estrutura pela qual o conhecimento de uma determinada área está organizado e estabelece a forma de como será representado ou transmitido.

No texto técnico, dirigido a profissionais ou indivíduos com certo nível de especialização no tema, observamos um discurso produzido por uma área de saber, ou seja, bastante característico, onde predomina a função referencial, pois o seu objectivo principal é a transmissão da informação.

Assim, a terminologia tem por objectivo representar o conhecimento de áreas científicas, utilizando termos que compreendem uma função cognitiva, pois transmitem conhecimentos especializados, e uma função linguística, pois harmonizam as comunicações especializadas. Em resumo, a terminologia descreve e ordena o conhecimento a nível cognitivo e transfere-o a nível comunicacional.

Portanto, a representação do conhecimento é possível através da organização dos termos em sistemas estruturados que reflectem uma organização conceptual. Não é apenas a terminologia específica que determina a representação do conhecimento, mas a forma como esta está organizada. A relação e a disposição dos termos entre si condicionam a percepção da mensagem a ser transmitida.

Christiane Nord aborda a teoria Skopos relacionando-a com a necessidade de um texto coerente a nível intertextual e intratextual, defendendo que “o sentido ou a função de um texto não é algo inerente aos sinais linguísticos; não pode simplesmente ser extraído por alguém que conheça os códigos”. Diferentes receptores da mesma mensagem podem decodificar diferentes significados no mesmo material linguístico, mas esta possibilidade deve ser menor quanto mais especializado for o texto. Assim, o tradutor tem que atender à coerência de códigos com função cognitiva (termos), mantendo igualmente coerência nos outros elementos comunicativos.

## **Capítulo 4**

# **A Metodologia tradutológica baseada nas fases do processo de tradução de Gouadec**

A actividade da tradução, no seu sentido mais lato, não se restringe a uma matéria de conhecimento ou à mera tradução literal de uma comunicação, escrita ou falada. A tradução acarreta, antes, todo um processo de transferência que requer do tradutor mais competências do que o simples conhecimento das línguas envolvidas no projecto de tradução ou a boa utilização de um dicionário.

Para Gouadec, se todos os elementos do processo de tradução forem devidamente localizados e definidos na fase da pré-tradução através de discussão e negociação com o cliente, a fase concreta de tradução apresentará menos problemas e será mais fácil de realizar.

Consequentemente, Gouadec (2007) propõe a divisão do complexo processo da tradução em fases. São elas: a pré-tradução; a tradução; e a pós-tradução.

A pré-tradução é considerada a fase desde que o tradutor recebe o material para tradução até ao início da tradução propriamente dita. Durante esta fase o tradutor deve proceder à realização de todas as tarefas subjacentes à aquisição do trabalho, ao cálculo do orçamento, à negociação, definição das especificações do projecto (em caso de aceitação por parte do cliente das condições propostas pelo tradutor) através do contacto directo com o cliente e à contratação.

Neste projecto, as especificações inerentes ao mesmo foram, desde cedo, tornadas bem claras, não só pela função pretendida através da tradução dos textos mas pela pormenorização de dados fornecidos pela Sr.<sup>a</sup> Kerstin Wallrapp à Doutora Teresa Roberto, que nos informou sobre os objectivos do projecto e deste trabalho de tradução em concreto. Nesta fase, procedeu-se à análise do texto de partida para identificação do tipo de texto e antecipação de possíveis problemas referentes à execução do trabalho, como por exemplo a incapacidade de manuseamento dos textos fornecidos devido ao seu formato de documento (.jpeg e formato em papel). Desta análise resultaram as escolhas efectuadas quanto às ferramentas de apoio à tradução e das fontes terminológicas necessárias para a execução do trabalho, bem como a ordem de procedimentos para a adopção de um método de trabalho eficiente. A fase de pré-tradução tenta ao máximo remover todas as fontes de possíveis dúvidas e determinará muitas das decisões tradutológicas a tomar.

A segunda fase do processo de tradução delineada por Gouadec, a fase de tradução, divide-se, por sua vez, em 3 sub-fases: a pré-transferência; a transferência; e a pós-transferência.

A sub-fase de pré-transferência inclui todas as tarefas que irão proporcionar o próprio exercício da tradução, tais como: a preparação do material, pesquisa documental (quer a nível de procura de bases terminológicas quer na procura de textos de referência ou paralelos para servir de auxílio à tradução), processo de alinhamento de textos e consequente elaboração de uma memória de tradução, etc.

A sub-fase de transferência centra-se no processo fundamental da tradução, na transferência e adaptação dos conteúdos, formato e forma da comunicação contida no texto de partida para um âmbito linguístico e cultural diferente. Nesta fase, o tradutor beneficia não só do material recolhido através da pesquisa da fase anterior mas também da utilização dos meios auxiliares à tradução previamente seleccionados.

A sub-fase de pós-transferência consiste em todas as medidas que o tradutor deve tomar de modo a atingir e corresponder aos critérios de qualidade pré-definidos – controlo da qualidade da tradução a nível linguístico e a nível de

formatação. Esta fase antecede a entrega da tradução ao cliente, logo, o tradutor deve ter em atenção a correspondência aos requisitos de entrega exigidos pelo cliente, como por exemplo o formato do texto (edição) ou, até mesmo, o tipo de documento.

Por último, a fase de pós-tradução envolve as actividades que precedem à entrega da tradução. Estas podem incluir o armazenamento da terminologia numa base de dados pessoal, toda a parte administrativa envolvente no processo, como o pagamento, a emissão de recibos ou a catalogação do projecto para futura referência no caso de um novo projecto da mesma matéria ou com o mesmo cliente.

Nos próximos segmentos, será fundamentada a pesquisa (bibliográfica) sobre o tipo de texto e conseqüente abordagem, assim como serão explicadas as fases do modelo tradutológico de Gouadec desenvolvidas e aplicadas neste projecto.



# Capítulo 5

## Fase de pré-tradução

### 5.1 Definição do Tipo de Texto

A caracterização do texto de partida foi um ponto inicial bastante importante não só para a fase de pré-tradução como para todo o processo em si. Para tal, recorreu-se à tipologia traçada por Reiss.

A autora categoriza os textos de acordo com a sistematização da função dos mesmos e das funções das linguagens em três tipos: “informativo”, “expressivo” e “operativo”. Reiss relaciona os três tipos de textos às suas dimensões linguísticas correspondentes e ao tipo de texto ou situação comunicativa em que estes são usados.

As principais características de cada tipo de texto são sumarizadas por Reiss da seguinte forma:

- “Comunicação plena dos factos” → informação, conhecimento, opiniões, etc. A dimensão linguística usada neste tipo de texto é lógica, o conteúdo ou tópico é o centro da comunicação e o texto é de tipo “informativo”.
- “Composição criativa” → dimensão estética da linguagem. O autor é quem fornece a informação inserida na mensagem e quem decide a forma da mesma. O tipo de texto é “expressivo”.
- “Indução de comportamentos” → o texto apresenta uma função apelativa, de forma a persuadir o leitor/receptor do texto a agir de certa forma. A forma linguística é discursiva e o tipo de texto “operativo”.

A autora refere, ainda, textos provenientes de audiovisuais que não são estudados neste relatório, pelo que teria que ser adoptada outra abordagem da tradução e respectivas técnicas.

As imagens que se seguem ilustram os diferentes tipos de texto expostos pela autora e as relações destes com as suas funções linguísticas, as suas características funcionais e relações aos métodos de tradução.

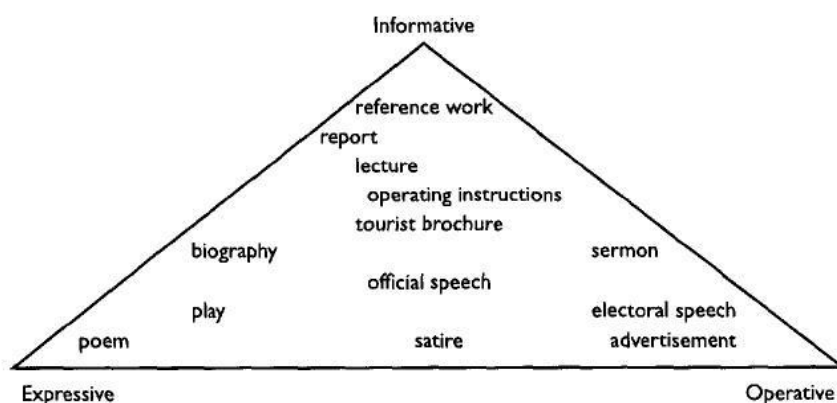


Figura 1. Os tipos e variedades de texto de Reiss. (Munday, 2006:73)

<i>Text type</i>	<i>Informative</i>	<i>Expressive</i>	<i>Operative</i>
Language function	Informative (representing objects and facts)	Expressive (expressing sender's attitude)	Appellative (making an appeal to text receiver)
Language dimension	Logical	Aesthetic	Dialogic
Text focus	Content-focused	Form-focused	Appellative- focused
TT should	Transmit referential content	Transmit aesthetic form	Elicit desired response
Translation method	'Plain prose', explicitation as required	'Identifying' method, adopt perspective of ST author	'Adaptive', equivalent effect

Figura 2. As características funcionais dos tipos de texto e ligações aos métodos de tradução. (Munday, 2006:73)

Através da análise da Figura 1 depreendemos que, mesmo atribuindo uma classificação quanto ao tipo de texto, um texto pode conter características que se aproximem ou afastem dessa classificação. O texto é avaliado no geral, pelo que quando aplicamos regras de tradução teremos que ser mais



objectivos e ter em atenção essas características distintas e traduzir respeitando-as. No caso do manual de instruções, que se encontra no centro do triângulo, entendemos que este pode apresentar características informativas, expressivas ou operativas, não sendo obrigatória a presença de todas as características. Embora esta imagem sirva como referência, cada texto deve ser analisado e classificado individualmente.

Na Figura 2, a referência são os tipos de texto. Analisando o texto deste projecto, e de acordo com a classificação de Reiss, podemos classificá-lo como texto informativo, pois tem como principal função a representação de objectos e factos, embora possa apresentar igualmente características do texto operativo.

Apesar da classificação que atribuí aos diversos tipos de texto, Reiss refere que “the transmission of the predominant function of the ST (Source Text) is the determining factor by which the TT (Target Text) is judged” (1977/89:109 apud Munday, 2006:73). Por isso, sugere métodos de tradução específicos de acordo com o tipo de texto (Figura 2). No caso do texto informativo, a autora defende que o texto de chegada deve transmitir por completo o conteúdo conceptual ou referencial do texto de partida, a tradução deve ser feita em prosa evitando redundâncias e utilizando explicitações quando necessário.

A teoria de Reiss mostrou ser importante para este projecto pois aborda a tradução para além dos parâmetros linguísticos e estuda o texto como um todo, não apenas as palavras ou o efeito que possuem, mas considera a tradução como um propósito comunicativo.

## 5.2 Metodologia de Trabalho

Após a caracterização do texto de partida, e tendo em conta o objectivo da tradução deste projecto, todo o processo adjacente à tradução foi executado atentando à função informativa e instrutiva do texto a traduzir, assim como à função do tradutor como mediador, consciente de que o público-alvo do texto de chegada está inserido num contexto cultural diferente do público-alvo do texto de partida. Embora a função e tipo de texto sejam iguais em ambos os textos, existem referências culturais, nomeadamente em termos linguísticos, que devem ser alteradas e adaptadas consoante a cultura receptora do texto.

Consequentemente, a pesquisa de textos paralelos e de referência foi uma das tarefas que se seguiram à classificação do texto. Para esta fase, o projecto contou com a ajuda do Professor Doutor Luís Almeida que, através dos seus conhecimentos na área da biomedicina farmacêutica, disponibilizou uma lista bibliográfica de apoio à tradução e da área de especialidade, bem como fontes de referência em tecnologia farmacêutica e farmacologia, que facultaram apoio, a nível de enquadramento teórico, indispensável ao processo de tradução.

Uma parte fulcral do processo tradutológico é a fase em que o tradutor adquire conhecimentos, prévios ao acto da tradução, na matéria sobre a qual está a trabalhar. Esta fase representou uma tarefa essencial neste projecto - e para este relatório em particular – pois foi através da análise dos textos previamente estudados que se obteve acesso a informações como a tipologia textual do texto de partida. A análise dos textos paralelos e de referência permitiu estudar a construção do tipo de discurso, na língua de partida e na língua de chegada, com o objectivo de auxiliar a contextualização dos termos específicos e do registo a nível linguístico, resultando no objectivo deste relatório – a explicitação de características do tipo de texto sob estudo.

Para tal, foram analisados vários textos, como por exemplo diferentes manuais de instruções (pois apresentam estrutura e função igual à do texto de partida) e textos de referência para apoio a nível conceptual, ou seja, textos cujo estudo resultou na contextualização dos termos de conhecimento específico na matéria em vários domínios, de forma a tomar decisões mais

adequadas sobre questões tradutológicas, não só a nível da utilização de termos como a nível do tipo de linguagem. A publicação “Vademecum”, disponibilizada online pelo *Infarmed*, consistiu na referência base para a contextualização de termos referentes a substâncias activas de medicamentos, as suas vias de administração e respectivas classificações farmacoterapêuticas. Nesta fase, o projecto contou, posteriormente, com a ajuda do Professor Bruno Gago e do Professor Doutor Samuel Silvestre, que disponibilizaram algumas fontes de textos de referência e procederam à revisão das traduções (fase analisada a seguir).

Como referido anteriormente, este projecto dividiu-se em duas partes, sendo que a primeira parte consistiu na tradução de cerca de 50 páginas distribuídas pelos três manuais fornecidos pela Merck (em formato digital - .jpeg), ainda no ano lectivo de 2009/2010.

Posteriormente, e mais atempadamente, procedeu-se à divisão das restantes páginas por traduzir. Devido ao volume de trabalho, optou-se por incluir mais um membro no grupo – a colega Diana Proença.

Em ambas as partes do projecto, os manuais não foram disponibilizados em formato digital que permitisse o seu manuseamento. Na primeira parte do projecto foram disponibilizados em imagens “.jpeg” que não permitiam copiar ou alterar texto e na segunda parte do projecto foram apenas fornecidos em formato impresso. Tendo em conta que, em qualquer das fases, os manuais fornecidos não permitiam qualquer manuseamento da informação, foi necessário proceder à digitalização dos mesmos (aproximadamente 120 páginas a cada membro do grupo), de modo a facilitar a sua legibilidade e manipulação electrónica durante o processo de tradução. Tal foi possível através da utilização do software “OmniPage Professional 17”. A utilização deste software teve elevada relevância para este projecto, pois devido à extensão do mesmo, tornou substancialmente mais rápido e fácil todo o processo de digitalização e conversão dos ficheiros de imagem (.jpeg), formato no qual foram inicialmente disponibilizados e que resultaram da digitalização das restantes páginas, para ficheiros de texto (.docx). Optou-se por utilizar este programa, entre outros programas de conversão analisados, pois foi o software que mais vantagens apresentou, não só a nível da exactidão e precisão no

reconhecimento de palavras (quer na linguagem comum quer na linguagem científica), como na possibilidade de conversão de grandes quantidades de ficheiros em simultâneo, de guardar as conversões em projectos (pelo que, caso se perdesse informação não seria necessário repetir o mesmo procedimento), na capacidade de guardar os ficheiros de *output* num maior tipo de ficheiros (logo seria mais provável poder corresponder ao tipo de ficheiro exigido pelo cliente), e na acessibilidade do texto inserido em tabelas ou imagens (uma das maiores dificuldades deste projecto a nível de digitalização e formatação consoante o original) através do reconhecimento automático de zonas de texto.

Os textos fornecidos apresentam uma grande quantidade de tabelas e imagens com texto que, na maioria dos casos, não foram reconhecidas pelo programa de conversão, pelo que se teve de proceder à digitalização manual das mesmas, processo esse que se revelou bastante moroso. Através do contacto com a Sr.<sup>a</sup> Sylvia Pöhlmann estabeleceu-se que a tradução não teria que ser fiel ao original em termos de formato, pois a impressão dos mesmos seria diferente: produto original acompanhado apenas pelo texto da tradução da página correspondente.

Após a fase de digitalização seguiu-se o alinhamento dos dois textos, de partida e de chegada, de modo a criar uma memória de tradução com base nas traduções previamente efectuadas na primeira fase do projecto. Tal processo foi executado com o auxílio do software de tradução MemoQ, através do qual foi possível, para além do alinhamento dos textos, a extracção terminológica e a elaboração da memória de tradução, ferramenta indispensável para todo o processo de tradução. Ao mesmo tempo, foram igualmente elaborados glossários bilingues de forma a minimizar o problema da terminologia específica e maximizar a homogeneização da mesma nos trabalhos dos vários elementos do grupo. A utilidade das ferramentas informáticas, como memórias de tradução e glossários, mostrou-se inestimável para a tradução deste tipo de texto, quer por questões de economia de esforço e de tempo, quer pela perspectiva do controlo da qualidade da tradução.

# Capítulo 6

## Fase de Tradução

### 6.1 Pré-transferência

Após a análise dos textos a serem traduzidos concluiu-se que estes ostentavam diversos termos específicos e que, por vezes, eram bastante próximos em significado, o que poderia constituir um possível problema na tradução (erro na tradução ou fraca explicitação, que resultaria na má percepção por parte do leitor).

Consequentemente, foi realizado um levantamento da terminologia específica sujeita a validação por parte do Professor Doutor Luís Almeida, tendo resultado, posteriormente, na elaboração de um glossário bilingue.

A par do glossário, foi igualmente elaborada uma memória de tradução (através do alinhamento dos textos traduzidos na primeira fase do projecto) no software MemoQ, com o objectivo de manter a coesão da tradução, quer individual quer em todo o projecto, visto este ter sido elaborado por três elementos.

A utilização do software MemoQ foi bastante satisfatória, pois tornou o processo de tradução mais fácil e rápido. O programa apresenta: um ambiente de trabalho bastante simples, o que permite que o tradutor consiga usufruir das funções disponibilizadas pelo software em plenitude e sem processos morosos de estudo sobre o software em uso; funções que facilitam a realização da tradução, como por exemplo a divisão das frases do texto de partida em segmentos, o que possibilita o alinhamento directo com o texto de chegada, segmentos esses que são acompanhados por uma janela que apresenta os termos existentes na frase e que constam da memória de tradução, bem como

as frases em que se inserem. Através destas funcionalidades, torna-se ainda mais prático o processo de transmissão da mensagem, pois o tradutor não tem que recorrer a outros programas ou ter um número elevado de janelas abertas no computador para verificar a posição dos termos na memória de tradução ou no texto. Através da divisão das frases do texto de partida em segmentos individuais, o tradutor consegue, ainda, controlar o tamanho do texto de chegada em relação ao tamanho do texto de partida, visto que ao traduzirmos de inglês para português, na maioria dos casos, o número de palavras aumenta, devido ao facto de a língua inglesa ser mais concisa e ao facto do processo de tradução, por via da explicitação ou paráfrase que inevitavelmente sofre, aumentam o texto de chegada em, pelo menos, 10%. Tornou-se possível controlar a extensão de ambos os textos, pois foi necessário extrair apenas o texto dos ficheiros resultantes da digitalização e conversão anteriores, de forma a conseguir inseri-los e manuseá-los no programa de tradução MemoQ.

## 6.2 Transferência

Tendo estabelecido anteriormente um objectivo para a tradução, foi igualmente necessário estabelecer um objectivo para a subsequente análise do texto produzido. Este relatório serve para analisar as características do tipo de texto comparando as estratégias utilizadas em ambas as línguas estudadas. Embora ambos os textos tenham o mesmo objectivo, tal não se traduz no uso das mesmas estratégias linguísticas para atingir determinado objectivo. Consequentemente, apresenta-se nesta fase do processo tradutológico, alguns exemplos do uso da linguagem de especialidade que podem estar representados de forma igual, ou não, nos dois textos. Como referido anteriormente, cada cultura ostenta os seus signos e conceitos, as suas percepções, os seus conhecimentos, que são representados da forma que se tornam perceptíveis para a cultura receptora. Consequentemente, línguas diferentes podem requerer códigos de comunicação diferentes para a transmissão da mesma mensagem.

Tendo em conta que este relatório visa ilustrar aspectos diversos da linguagem de especialidade inserida em ambas as línguas (inglês e português), seguidamente são apresentados alguns exemplos práticos, tendo em conta a sua relevância e uso repetido no texto sob estudo, que caracterizam este tipo de texto:

- Exemplos a nível linguístico/estilístico:

### ➤ **Uso do imperativo afirmativo e negativo**

O modo imperativo é frequentemente usado em textos instrutivos, tais como manuais de instruções, receitas, etc, sendo que o encontramos maioritariamente na forma afirmativa. O uso do modo imperativo constitui uma estratégia importante para a tradução deste tipo de textos, já que não gera qualquer confusão relativamente ao agente da frase.

Neste projecto, o uso do imperativo afirmativo está mais presente nos métodos de teste e nos procedimentos a serem executados, de forma a obter resultados favoráveis.

Exemplos:

- “Feche o frasco e agite-o”;
- “Deixe a solução repousar por mais cinco minutos...”
- “Pipete 1 ml da solução stock do padrão...”

O uso do imperativo negativo nos textos que contêm instruções tem a finalidade de prender a atenção do leitor para a prática de certas técnicas de segurança de modo a evitar determinados procedimentos perigosos. Para tal, o imperativo negativo impõe um tom mais assertivo. Mais comumente, encontramos alguns exemplos desta técnica de persuasão inserida em caixas de texto mais apelativas, onde, frequentemente, o tradutor insere instruções mais importantes que podem evitar acidentes, nomeadamente de laboratório, que se apresentem prejudiciais ao utilizador.

Neste projecto, optou-se por criar uma página que alerta o utilizador para os perigos inerentes ao uso deste tipo de materiais, evitando, portanto, o uso do imperativo negativo. Deste modo consegue-se evitar e prevenir situações de incorrecta leitura (da palavra “não”) e a possível confusão do leitor do uso intermitente entre a positiva e a negativa.

#### ➤ **Uso de “strong verbs” e “weak verbs”**

O estilo estabelece a forma como o autor se relaciona com o leitor e, segundo Byrne (2006), este deve situar-se o mais próximo de um “conversational style”. Quanto à utilização de verbos, o autor distingue-os entre “strong verbs” (ex: ser, estar, fazer, ...) e “weak verbs”, sendo que privilegia o uso de “strong verbs”, pois criam imagens e transmitem a noção de acção, elemento indispensável para a comunicação de instruções. A sua utilização permite, ainda, o fácil e mais rápido acesso à informação por parte do leitor complementado pela formação de frases mais concisas.



### ➤ **Uso de advérbios**

Aquando do manuseamento dos instrumentos e das substâncias, os autores optaram por introduzir advérbios, de modo a alertar o utilizador para o correcto manuseamento dos mesmos e assegurar a boa execução de qualquer procedimento.

Exemplos:

- “ Transfira, cuidadosamente, o conteúdo da folha de alumínio para...”
- “ Deve transferir directamente para o frasco o pó obtido de uma cápsula, adicionando, de seguida, o invólucro”.
- “ Coloque, com cuidado, a placa de CCF contendo os compostos no frasco.”
- “ Agite durante cerca de três minutos, até que a maior parte dos sólidos se tenha dissolvido.”

Neste texto a maioria dos verbos são acompanhados por advérbios ou locuções adverbiais (de modo, de ordem e de inclusão) de forma a expressar o modo como certas acções devem ser executadas explicitando a sua ordem cronológica. O uso destes advérbios é, neste texto, bastante frequente, o que torna mais fácil a percepção dos procedimentos para o tradutor (que não é especializado na área) que resultará numa interpretação mais fácil e correcta do mesmo, que consegue, assim, transmitir a mensagem da forma mais simples e clara para o leitor sobre o modo de como deverá proceder.

### ➤ **Uso de verbos modais**

O uso de verbos modais como “must” e “should” (traduzidos por “deve” e “tem que”), tem o intuito de realçar as recomendações ao leitor.

Existe maior diferenciação dos graus modais no inglês, que vão desde a sugestão branda ao imperativo reforçado. O tradutor tem que tomar decisões que implicam tornar o texto em português mais assertivo, ou até mesmo, mais agressivo, recorrendo à estratégia de compensação, através do uso de verbos mais fortes e outros elementos de reforço.

Neste projecto, optou-se pelo uso maioritário da palavra “deve” como tradução. A expressão “tem que” foi usada em casos restritos, onde se pretende ser mais assertivo.

Exemplos:

- “The paracetamol spot in the chromatogram obtained with the test solution must correspond...” - “A mancha de paracetamol no cromatograma obtido a partir da solução de teste deve corresponder...”.
- “The solution obtained should contain 20 mg of total drug per ml...” -- “A solução obtida deve conter o fármaco numa concentração total de 20 mg por ml...”.
- “Drug must be present each time.” -- “Substância activa tem que estar presente todas as vezes.”

#### ➤ **Uso da passiva/activa**

Diferentes línguas usam a passiva de forma diferente e tal é bastante perceptível na comparação do inglês como português. O português usa frases preferencialmente activas, estando o sujeito presente no verbo, enquanto que o inglês, em certos tipos de texto, prefere a passiva, que oculta o sujeito explícito. Num texto cuja função é instruir, disponibilizando informação que permita ao leitor agir, é preferencial o uso de construções activas, pois nelas existe um sujeito que age, constituem expressões com conotações positivas que incentivam o leitor a agir.

Neste projecto encontramos alguns exemplos frequentes do uso da passiva em que o sujeito da frase (ex: a solução preparada) sofre a acção em vez de ser o agente da mesma. Tais exemplos não se encontram, no entanto, na parte das instruções dos procedimentos dos testes mas nos resultados esperados, pelo que não está uma acção directamente ligada ao uso de construções passivas.

Exemplo:

- “A solução obtida deve conter o fármaco ... e ser rotulada como...”.

### ➤ **Omissão do sujeito na frase**

Neste texto notamos, claramente, uma das características do texto técnico – discurso objectivo e directo com omissão do sujeito. Apesar de ser uma característica invulgar nos textos de língua inglesa, neste projecto está bastante óbvio o uso dessa estratégia. Dada a possibilidade do leitor ser ou não especializado na área, o texto de partida apresenta este tipo de características que o tornam mais acessível. Deste modo, tornou-se bastante mais simples a tradução deste tipo de frases pois adapta-se bem à língua portuguesa, na qual o sujeito está subentendido no verbo.

### ➤ **Uso de linguagem simples**

Como referido anteriormente, o texto instrutivo deve apresentar uma estrutura frásica e linguagem simples. Na tradução dos manuais sob estudo optou-se por manter a estrutura do texto de partida e evitar o uso de jargão, metáforas, eufemismos e neologismos. Foram apenas usadas as abreviaturas para mililitros (ml) e miligramas (mg) sem recorrer à sua forma por extenso, pois são extremamente comuns e frequentemente usadas no dia-a-dia. Assim, o discurso mantém-se mais objectivo.

### ➤ **Uso de estrutura frásica direccionada para o objectivo**

Muito frequentemente lemos manuais de instruções em que a sua estrutura frásica baseia-se na relação de causa e efeito. Alguns autores defendem que, em termos de fluxo de informação, a parte mais importante da frase deve estar no fim, sendo que será essa a parte de que o leitor mais facilmente se recordará.

Contudo, neste projecto optámos por seguir uma regra diferente. Tal como numa notícia, optou-se pela estrutura de sequência de resposta de elementos ao longo da frase como “o quê”/“quem”, “onde”, “quando” e “como” de forma a cativar a atenção do leitor e tornar mais óbvia a sequência de acções e elementos na acção, o que correspondeu a uma tradução mais fiel ao texto de

partida. Através desta estratégia, o leitor tem acesso a informação com acções estruturadas que visam um objectivo ou que têm valor temporal.

Exemplo:

- “Envolva (acção) um comprimido de referência (“o quê”) em folha de alumínio (“onde”) e esmaque-o (acção + “o quê”), até ficar em pó (valor temporal + objectivo), usando o pilão (“como”).

Como referido, na maioria dos casos é usada a estrutura causa-efeito. Contudo, optou-se pelo uso da estratégia explicada anteriormente, igualmente devido à extensão deste projecto.

Esta opção mostrou ser a mais acertada, pois, para além das razões anteriores, permitiu uma tradução que é concomitante com a acção a que corresponde. Tal como descrito anteriormente, o tradutor deve traduzir de modo a prevenir possíveis erros. Se o leitor conseguir estabelecer uma sequência lógica das tarefas a executar através de uma lógica assimétrica no texto, será muito mais fácil executar qualquer tarefa com a menor margem para erro possível.

Em alguns casos, após a fase de revisão, optou-se por uma tradução diferente da primeira tradução, de modo a que o texto estabelecesse maior concordância com o aspecto visual do resultado esperado.

Exemplo:

- “...até que os resíduos que não se dissolveram assentem por baixo do líquido flutuante”. (1ª tradução)
- “...até que os resíduos que não se dissolveram assentem no fundo do frasco”. (2ª tradução – imagem mais aproximada e familiar ao resultado visual esperado)

### ➤ **Uso de frases condicionais**

Frequentemente encontramos frases condicionais em textos através dos quais se deve realizar uma acção e, posteriormente, se espera um resultado. Este tipo de frase pressupõe, de início, uma advertência, logo através do uso desta estratégia de escrita, o leitor fica previamente alertado para o resultado

que deverá obter, sendo que qualquer resultado diferente não está correcto. O uso deste tipo de frases e também comumente usado neste tipo de texto de forma a explicar ao leitor como deve proceder caso se verifique que o resultado obtido não é o esperado.

Exemplo:

- “If this is not achieved, repeat the run from scratch with a second sample.” --- “Se não conseguir obter este resultado, repita o teste do início com uma segunda amostra.”

Neste exemplo, podemos verificar, excepcionalmente, a estrutura frásica de efeito-causa.

### ➤ **Uso de siglas**

Em muitos textos técnicos encontramos o uso de siglas que facilita a leitura e compreensão dos mesmos. Contudo, é necessário ter conhecimento das siglas para compreender o texto de especialidade, pelo que é necessário, e extremamente importante, que o tradutor faça acompanhar a sigla da sua designação por extenso. Visto que este texto e o seu público-alvo não são generalizados e que o leitor pode não estar familiarizado com o tema, é extremamente importante que, numa primeira utilização, a sigla seja acompanhada pela sua forma em extenso.

Apesar da utilidade das siglas, o tradutor deve usá-las com precaução, pois podem ocorrer casos em que o uso de uma sigla induza o leitor em erro: sigla que pode corresponder a mais do que uma designação, quer na língua de estudo, quer de uma língua para outra.

Neste texto deparamo-nos com algumas siglas referentes a projectos ou organizações, tais como:

- GPHF → Global Pharma Health Fundation
- USP DQI → United States Pharmacopeia Drug Quality and Information Program

Nestes exemplos, optou-se por fazer acompanhar as siglas, numa primeira utilização, da sua denominação por extenso conforme o texto de partida,

seguida da tradução para português por questões de contextualização do público-alvo.

➤ **Personificação (dos materiais)**

Em casos mais raros, encontramos no texto de partida o uso de personificação, por forma a desencadear uma acção, inculcando no leitor uma ideia errada.

Exemplo:

- "...some of the supernatant liquid may want to be transferred into a 10-ml vial."

Perante este tipo de discurso, optou-se por uma tradução menos literal que causasse menor confusão possível ao leitor, mantendo o registo e tipo de discurso iguais aos, até então, apresentados e aos quais o leitor começa a estar familiarizado. Deste modo, preserva-se a legibilidade do texto e evita-se a descontinuidade da leitura do texto e, conseqüentemente, da execução das tarefas adjacentes ao mesmo.

Tradução:

- "...transfira uma porção do líquido sobrenadante para um frasco de 10 ml."

- Exemplos a nível de estrutura/organização/ formatação:

➤ **Palavras a negrito / evidenciadas / em maiúsculas**

Em qualquer tipo de texto encontramos títulos ou sub-títulos a negrito ou sublinhados. Tal serve para prender a atenção do leitor para o assunto de que se trata o texto/parágrafo que está prestes a ler. No caso dos manuais de instruções, é bastante pertinente que haja uma distinção em termos de fases dos procedimentos e dos diversos procedimentos entre si.

Para tal, neste projecto optou-se por tornar alguns segmentos de texto mais óbvios através de técnicas gráficas como sombreado, uso de negrito, letra com tamanho maior/maiúsculas para títulos, etc.

Recorreu-se, ainda, à técnica de numeração entre equipamentos e reagentes a usar num determinado teste, de forma a alertar o leitor e ajudar o leitor na organização de todo o processo.

### ➤ **Organização lógica**

Qualquer autor que pretenda elaborar um texto perceptível deve ter em conta que o mesmo deve estar dividido por partes, numa sequência que apresenta todos os elementos de forma coerente e perceptível. Tal torna-se ainda mais importante quando se trata de um texto instrutivo, onde nos podemos deparar com diversos critérios - sequência cronológica, agrupamento de actividades, nível de dificuldade, etc.

Desde cedo este texto não apresentou qualquer dificuldade na percepção das fases dos procedimentos, pois está bastante bem estruturado e a divisão dos diversos elementos é bastante explícita. Neste projecto deparamo-nos com um texto bastante bem elaborado quer a nível do seguimento/sequência dos testes (organização da informação no decorrer do texto) quer a nível da estrutura das frases.

### ➤ **Uso de estrutura repetitiva**

Tal como foi referido, a estrutura de um texto é crucial para a sua compreensão. Para além do aspecto da legibilidade do texto, devemos ter ainda em conta o aspecto visual. De facto, textos que apresentam uma estrutura repetitiva requerem menor esforço por parte do leitor e tornam-se mais apelativos. Estando o leitor cada vez mais familiarizado com a estrutura e formatação do texto (títulos, subtítulos, diferenciação entre diferentes instruções, recurso a ilustrações), será mais fácil a sua interpretação. Deste modo, os manuais que serviram como texto de partida apresentam uma

estrutura semelhante para cada tipo de teste e procedimentos de teste para os diversos fármacos.

➤ **Inclusão de imagens/ilustrações**

É bastante usual o recurso a imagens num texto instrutivo, pois facilitam o esclarecimento das instruções. Ao ter acesso a um elemento visual, o leitor poderá executar com mais confiança qualquer procedimento que se lhe proponha, pois terá um meio de avaliação que servirá como ponto de referência do resultado que é esperado.

➤ **Frases curtas**

Como referido anteriormente e evidenciado ao longo deste relatório, o objectivo maior desta tradução era criar um texto simples e conciso. Para tal, recorreu-se a frases curtas, que foram igualmente respeitadas no texto de chegada, embora por vezes possam apresentar uma extensão ligeiramente maior às do texto de partida. Em alguns casos foi igualmente necessário o uso de um maior número de palavras, comparativamente ao texto de partida, pois era necessária uma explicação mais específica. Nesses casos, o objectivo principal foi evitar a redundância, tanto em relação às frases como aos termos.



## 6.3 Pós-transferência

Após a conclusão do processo de tradução, o tradutor deve rever o texto de chegada, o produto da tradução, tendo em conta diversos aspectos (revisão linguística e científica).

Relativamente ao *layout*, o tradutor deve certificar-se de que o texto de chegada apresenta os mesmos parágrafos, espaçamentos, negritos, posicionamento de imagens, etc, iguais aos do texto de partida. Basicamente toda a organização do texto de partida deve ser respeitada (prática aplicada na maioria dos casos excepto quando houver pedido em contrário por parte do cliente).

Segundo Christiane Nord, o tradutor deve procurar transmitir fielmente a mensagem do texto de partida através de uma tradução coerente e correcta, que apresente rigor e a mesma integridade do texto de partida. O tradutor não deve omitir nem adicionar informação na tradução, tentando ser o mais fiel possível ao texto de partida. A tradução deve representar um texto fluído do qual o leitor não se aperceba que é uma tradução.

No que diz respeito ao registo, tal como referido anteriormente, deve ser mantido no texto de chegada, pelo que a utilização de um registo diferente poderá deturpar a compreensão do texto. Deste modo, manteve-se o registo cuidado, dada a especificidade do texto, contudo simples e preciso atendendo ao objectivo final do mesmo.

Durante todo o processo de revisão, o tradutor tem que ter em conta aspectos como a função do texto (se a função do texto de chegada é a mesma que a do texto de partida), o público-alvo e o uso de terminologia específica. Será igualmente bastante importante, o tradutor verificar a existência de erros de tradução e/ou de língua, gramática, pontuação e consistência terminológica.

Deste modo, o tradutor pode detectar erros além dos linguísticos, tais como a inadequação ao público-alvo e/ou a deturpação do sentido do texto original.

Sendo que o autor de um texto encontra-se sempre condicionado pelo mesmo, é extremamente importante que se recorra a um revisor linguístico e a um revisor/validador científico.

Enquanto que a avaliação linguística é feita através de uma pessoa com uma visão lata sobre o assunto mas com conhecimento linguístico e do que refere a ontologia, a validação é feita através de um especialista, com conhecimento científico do tema abordado.

Nesta fase, o projecto contou, mais uma vez, com a ajuda da Doutora Maria Teresa Roberto, que se encarregou da revisão linguística e dos Professores Doutores Bruno Gago e Samuel Silvestre, que procederam à revisão científica do mesmo.

A revisão de um especialista na área de conhecimento tornou-se imprescindível para este projecto, sendo que nem o tradutor nem o revisor linguístico são especialistas na área, tendo o revisor científico, por algumas vezes, solucionado algumas opções de tradução menos precisas e adequadas. A revisão científica não só permitiu utilizar termos específicos mais adequados e fiéis ao texto de partida, como permitiu corrigir algumas expressões que seriam mais comuns na linguagem de especialidade e, portanto, torná-las mais familiares ao leitor dentro do contexto deste tema. Seguem-se alguns exemplos:

Exemplos de termos específicos:

- “Stock Standard Solution” e “Sample Standard Solution”

Numa primeira tradução, optou-se por traduzir os dois termos por “solução de teste”. Contudo, dado que a certa altura são referidas as duas soluções no mesmo procedimento, e seguindo as instruções do Doutor Bruno Gago, manteve-se o termo “stock” em ambos.

- “Supernatant Liquid”

Através da leitura do texto original, a tradução mais adequada seria “líquido flutuante”. Contudo, segundo o revisor científico, o termo técnico mais correcto seria “líquido sobrenadante”, pelo que constituiu a escolha do tradutor.

- “X mg of total drug per ml”

Numa primeira tradução optou-se por “X mg de fármaco na forma pura”. Após a revisão, constatou-se que o termo e expressão mais correctos seriam “uma concentração total de X mg por ml”.

Exemplos de expressões da língua de especialidade:

- “Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid.”

Primeiramente optou-se pela seguinte tradução:

“Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos que não se dissolveram assentem por baixo do líquido flutuante.”

Após revisão alterou-se para a seguinte tradução:

“Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos que não se dissolveram se depositem no fundo do frasco”.

Desta forma, utiliza-se a forma mais correcta na língua de especialidade sem comprometer a percepção do texto mas tornando-o, ainda, mais simples e preciso.

“All stock sample solutions produced”

Optou-se por traduzir a palavra “produced” por “produzidas”, o que, em termos linguísticos, não seria incorrecto. Contudo, neste contexto, a palavra que mostrou ser mais adequada e a opção final de tradução foi “preparadas”, palavra proposta pelo revisor científico, conhecedor da especificidade da utilização terminológica na área de conhecimento.

Existem diversos exemplos neste projecto de termos e expressões científicas que se encontram fora do conhecimento geral e que foram sujeitos a alteração após a revisão científica.

Após a recepção dos textos revistos seguiu-se a fase de pós-tradução, na qual se realizou a correcção dos mesmos e análise de escolhas mais favoráveis à tradução.



# Capítulo 7

## Fase de pós-tradução

Dadas a extensão e a especificidade deste trabalho, a fase de revisão mostrou ser um trabalho um tanto demorado. De modo a evitar confusões entre os termos mais ou menos correctos, foi elaborada uma tabela com os termos do texto de partida, primeira proposta de tradução e termos propostos na revisão. Assim, foi possível analisar os termos mais adequados (na visão do tradutor), e proceder mais rapidamente à sua correcção.

Tal processo deve ser feito cautelosamente, atendendo a cada situação, pois para duas situações diferentes o mesmo termo pode ser traduzido de forma diferente.

Nesta fase, procedeu-se igualmente a uma última leitura dos textos de partida (convertidos para formato digital) e dos textos traduzidos. Mais uma vez, o tradutor tem que estar atento para situações de correcção automática por parte de softwares de texto que por vezes requerem a intervenção do mesmo. Por vezes estes programas de software são falíveis até mesmo na simples correcção ortográfica, pelo que consiste num ponto bastante importante na correcção do texto (poderá condicionar credibilidade do texto perante o público-alvo).

Procedeu-se, portanto, à impressão dos textos, de forma a poder avaliar a sua formatação e legibilidade em formato de papel. Como referido anteriormente, manteve-se o formato original do texto de partida em termos de tamanhos de letra e negritos ou sombreados, à excepção da inserção de imagens, com especial cuidado para as tabelas apresentadas no fim de cada manual. Assim, são apresentados os textos originais na forma digital mais fiel possível ao formato de papel fornecido, página por página, acompanhados na

página adjacente da sua correspondente tradução. Deste modo facilita-se a compreensão do texto mantendo a correlação entre texto de partida e texto de chegada.

## Capítulo 8

### Notas conclusivas

Após a reflexão e apresentação do texto, trabalho de tradução e análise de elementos característicos do mesmo, tornou-se claro que, partindo de uma perspectiva funcionalista, a função do texto de chegada se encontra no centro de toda a tradução, bem como as expectativas do público-alvo.

Através deste projecto mostramos que a função e o género textual podem direccionar a abordagem do tradutor face ao texto de partida, condicionando as estratégias a utilizar e as suas tomadas de decisão. Para além da uniformidade inerente aos textos considerados técnicos, realçamos a sua diversidade, confirmada em diferentes funções, tipos e géneros textuais.

Este projecto mostrou, igualmente, que são as expectativas do leitor que vão determinar a abordagem do tradutor ao texto e culminar num texto “usável”, critério principal de definição da qualidade do mesmo.

Principalmente, este projecto serviu como exercício e aprofundamento do conhecimento a nível do trabalho do tradutor (de todas as tarefas e etapas de um trabalho de tradução), dos desafios com que este se pode deparar e de algumas soluções ou posições a tomar perante esses desafios. Percebemos que o trabalho do tradutor não depende unicamente da preparação do mesmo a nível linguístico, mas também da sua capacidade de organização e prática de diversas tarefas em simultâneo. O tradutor deve ser capaz de procurar fontes fiáveis de informação (leitura de bibliografia especializada) e assimilar informações sobre temas diversos e sobre os quais, por vezes, existe muito pouca informação disponível. Para além disso, este deve manter espírito crítico, mantendo-se capaz de avaliar diversas situações e adaptar-se às

diversas condicionantes de um projecto. A capacidade de prever situações problemáticas será, igualmente, uma mais-valia.

Tendo em conta que nos deparamos com um texto técnico, concluiu-se que a parceria entre tradutor e revisores/validadores torna-se imprescindível para obter um texto com qualidade e precisão. Em virtude de um trabalho mais fidedigno, o tradutor tem que saber aceitar as propostas elaboradas por outros membros participantes no projecto, e saber avaliá-las de forma a obter o resultado esperado pelo público-alvo que, no fim, será o derradeiro “juiz”.

A maior preocupação neste projecto foi garantir a adequação discursiva ao público-alvo e assegurar a inexistência de erros de tradução que pudessem comprometer a transmissão da mensagem, nomeadamente do conteúdo científico.

Concluindo, apesar da actualização constante das práticas de tradução, quer através de desenvolvimentos a nível do auxílio informático à tradução, quer através de novas teorias, o tradutor exerce uma profissão de constante aprendizagem e adaptação.



# Bibliografia

BAKER, Mona (1997) *In other words: a coursebook on translation*. London: Routledge

BASSNETT, Susan (2003) *Estudos de tradução: fundamentos de uma disciplina.*; trad. Viviana de Campos Figueiredo. Lisboa: FCG. Serviço de Educação e Bolsas

BYRNE, Jody (2006) *Technical Translation: Usability Strategies for Translating Technical Documentation*. Dordrecht: Springer

CABRÉ, Maria Teresa (1998) *Terminology: theory, methods and applications*, edited by Juan C. Sager. Amsterdam: John Benjamins Publishing Company

ELLIS, Donald G. (1992) *From language to communication*. Hillsdale (NJ): Lawrence Erlbaum Associates

FISHBACH, Henry (1998) *Translation and medicine*. Amsterdam: John Benjamins Publishing Company

FREMGAN, Bonnie F. (2009) *Medical terminology: a living language*. 4th ed. Upper Saddle River (NJ): Pearson Prentice Hall

GOUADEC, Daniel (2007) *Translation as a profession*. Amsterdam: John Benjamins Publishing Company

HANN, Michael (1992) *The key to technical translation*. Amsterdam: John Benjamins

HOUSE, Juliane (1997) *Translation quality assessment: a model revisited*. Tübingen: Gunter Narr Verlag

MONTALT, Vincent e GONZÁLEZ DAVIES, Maria (2007) - *Medical translation step by step: learning by drafting*. Manchester: St. Jerome

MUNDAY, Jeremy (2006) *Introducing translation studies: theories and applications*. Abingdon: Routledge

NORD, Christiane (2005) *Text analysis in translation: theory, methodology, and didactic application of a model for translation-oriented text analysis*; trad. de Penelope Sparrow. 2nd ed. Amsterdam: Rodopi

NORD, Christiane (2007) *Translating as a purposeful activity: functionalist approaches explained*. Manchester: St. Jerome

OLIVEIRA, Ana Rita da Silva Remígio (2010) *Processo terminográfico: vertentes conceptual, comunicativa e textual*. Aveiro: A. Oliveira

PYM, Anthony (1998) *Method in translation history*. Manchester: St. Jerome

PYM, Anthony (2010) *Exploring translation theories*. London: Routledge

REISS, Katharina (2000) *Translation criticism: the potentials and limitations: categories and criteria for translation quality assessment*; Trad. Erroll F. Rhodes. Manchester: St. Jerome Publishing

SANTOS, Cláudia da Silva Amaral (2010) *Terminologia e Ontologias: metodologias para representação do conhecimento*. Aveiro: C. Santos

SOMERS, Harold (1996) *Terminology, LSP and translation: studies in language engineering in honour of Juan C. Sager*. Amsterdam: John Benjamins

STEDE, Manfred (1999) *Lexical semantics and knowledge representation in multilingual text generation*. Boston (MA): Kluwer Academic Publishers

WILLIAMS, Jenny e CHESTERMAN, Andrew (2007) *The map: a beginner's guide to doing research in translation studies*. Manchester: St. Jerome Publishing

WRIGHT, Sue Ellen e BUDIN, Gerhard (1997-2001) *Handbook of terminology management*. Amsterdam: John Benjamins Publishing Company

# Webgrafia

BELL, Roger T. (1995) *Translation and translating: theory and practice*. London and New York: Longman, 1995 (1ª ed, 1991).

(<http://pt.scribd.com/doc/8027249/Translation-and-Translating-Theory-and-Practice> (consultado a 29/03/2011))

DAVIS, R., SHROBE, H. e SZOLOVITS, P, (1993) *What is a Knowledge Representation?* AI Magazine, 14(1):17-33

(<http://groups.csail.mit.edu/medg/ftp/psz/k-rep.html> (consultado a 25/03/2011))

GUIMARÃES, Maria Joana (2005) *Revista da Faculdade de Letras — Línguas e Literaturas*, II Série, vol. XXII, Porto, 2005, pp. 207-220

([http://clp.dlc.ua.pt/Publicacoes/Terminologias\\_lingua\\_portuguesa.pdf](http://clp.dlc.ua.pt/Publicacoes/Terminologias_lingua_portuguesa.pdf) (29/03/2011))

HALLIDAY, M. A. K. (1996) *Writing science: literacy and discursive power*. London: The Falmer Press, 1996 repr. XIII, 283 p.

([http://books.google.com/books?id=cFOCi\\_H5utwC&printsec=frontcover&hl=pt-PT&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com/books?id=cFOCi_H5utwC&printsec=frontcover&hl=pt-PT&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false) (consultado a 02/05/2011))

LEONARDI, Vanessa (2000), *Equivalence in Translation: Between Myth and Reality*. Translation Journal. Volume 4

(<http://translationjournal.net/journal/14equiv.htm> (consultado a 15/04/2011))

NORD, Christiane (2006), *Loyalty and Fidelity in Specialized Translation*. Confluências-Revista de Tradução Científica e Técnica, n.º 4. 29-40

(<http://www.confluências.net/n4/nord.pdf> (consultado a 18/04/2011))

NUOPPONEN, Anita (1996) *Concept systems and analysis of special language texts*. Gerhard Budin (Ed.), *Multilingualism in Specialist Communication*, 1069-1078. Proceedings of the 10th European LSP-Symposium, Vienna 29.8-2.9.1995. IITF/TermNet, Vienna.

([http://lipas.uwasa.fi/~atn/papers/artikkelit/LinkedDocuments/Nuopponen\\_Text\\_LSP96.pdf](http://lipas.uwasa.fi/~atn/papers/artikkelit/LinkedDocuments/Nuopponen_Text_LSP96.pdf) (29/03/2011))

OWEN, Audrey (2011) *Writing Instruction Manuals: The How-to for How-tos*.  
Writer's helper

(<http://www.writershelper.com/instruction-manuals.html> (consultado a 14/05/2011))

PYM, Anthony (2010), *Text and risk in translation*. Intercultural Studies Group.  
Universitat Rovira i Virgili. Tarragona, Spain

([http://www.tinet.cat/~apym/on-line/translation/risk\\_analysis.pdf](http://www.tinet.cat/~apym/on-line/translation/risk_analysis.pdf) (consultado a 05/04/2011))

PYM, Anthony (2010), *Translation Theory as Historical Problem-Solving*

(<http://usuaris.tinet.cat/apym/on-line/translation/translation.html> (consultado a 05/04/2011))

VIRELLA, Daniel (2008) *Falsificação de medicamentos*. Acta Pediatr Port  
2008:39(1):46-50

([http://www.spp.pt/Userfiles/File/App/Artigos/8/20080528121713\\_Etica\\_Virella\\_D\\_39\(1\).pdf](http://www.spp.pt/Userfiles/File/App/Artigos/8/20080528121713_Etica_Virella_D_39(1).pdf) (consultado 14/03/2011))

The Global Pharma Health Fund (GPHF)

(<http://www.gphf.org/web/en/start/index.htm>)

The Merck Group

(<http://www.merckgroup.com/en/index.html>)

## **Glossários, enciclopédias e gramáticas**

Dicionário e enciclopédia de língua portuguesa

(<http://www.infopedia.pt/>)

Enciclopédia médica online

(<http://medipedia.pt/home/home.php?module=inicio>)

Ginstrom IT Solutions (GITS)

([http://ginstrom.com/translation/tech\\_writing.php](http://ginstrom.com/translation/tech_writing.php) (25/03/2011))

IATE – Base terminológica multilingue da EU

(<http://iate.europa.eu/iatediff/>)

Portal da saúde

(<http://medicosdeportugal.saude.sapo.pt/glossario>)

Prontuário terapêutico

(<http://www.infarmed.pt/prontuario/index>)

The Global Pharma Health Foundation

(<http://www.gphf.org/web/en/start/index.htm>)

The Merck Group

(<http://www.merckgroup.com/en/index.html>)

Vademecum (Infarmed)

(<http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/PUBLICACOES/TEMATICOS/VADEMECUM/vademecum.pdf>)

World Health Organization

(<http://www.who.int/topics/en/>)

# **Anexos**





**Anexo 1**  
**Glossário**

<b>Língua de Partida - Inglês</b>	<b>Língua de Chegada - Português</b>
<b>A</b> Acetaminophen	Acetaminofeno
Acetone	Acetona
Acetylsalicylic acid (Aspirin)	Ácido acetilsalicílico (Aspirina)
Active ingredient	Ingrediente activo
Albendazole	Albendazol
Aminophylline	Aminofilina
Ammonia solution	Solução de amoníaco
Amodiaquine	Amodiaquina
Amoxicillin	Amoxicilina
Ampicillin	Ampicilina
Analgesics	Analgésicos
Anhydrous cefixime	Cefixima anidra
Anthelmintic	Anti-helmíntico
Antiallergic Medicines	Medicamentos antialérgicos
Antiasthmatic Medicines	Medicamentos antiasmáticos
Antibacterial Medicines	Medicamentos antibacterianos
Antibiotics	Antibióticos
Antimalarial Medicines	Medicamentos antimaláricos
Antiretroviral Medicines	Medicamentos anti-retrovirais
Antituberculosis Medicines	Medicamentos antituberculosos
Antiviral Medicines	Medicamentos antivíricos
apply (verb)	aplique (verbo)
Aqueous magnesium chloride solution	Solução aquosa de cloreto de magnésio
Aqueous methanol solution	Solução aquosa de metanol
Artemether	Arteméter
Artesunate	Artesunato
Aspirin	Aspirina
Atovaquone	Atovaquona
Auxiliary agents	Agentes auxiliares
<b>B</b> Batch	Lote
Blisters	Blister
Body shells	Invólucro
<b>C</b> Caffeine	Cafeína

Calliper rule	Régua de medição
Cap (capsules)	Invólucro (cápsulas)
Capsule	Cápsula
Capsule excipients	Excipientes de cápsulas
Cefixime	Cefixima
Cefuroxime acetoxymethyl ester	Pró-farmaco cefuroxima axetil
Cefuroxime axetil	Cefuroxima axetil
Cellulose plates	Placas de celulose
Cephalexin	Cefalexina
Chloramphenicol	Cloranfenicol
Chloroquine	Cloroquina
Chromatogram	Cromatograma
Chromatographic test	Teste cromatográfico
Chromatoplate	Placa cromatográfica
Chromatoplate development	Eluição da placa cromatográfica
Ciprofloxacin	Ciprofloxacina
Cloxacillin	Cloxacilina
Co-formulations	Associação com
Colour Reaction Test	Teste colorimétrico
Combined (drugs)	Associado (medicamentos)
Common salt forms	Sais comuns
Concentrated ammonia solution	Solução concentrada de amoníaco
Cotrimoxazole	Cotrimoxazol
Counterfeit Medicines	Medicamentos contrafeitos
crush it down (verb)	esmague-o/a (verbo)
<b>D</b> Detection (chromatoplate)	Revelação (placa cromatográfica)
Developing time	Tempo de eluição
Development	Eluição
Didanosine	Didanosina
Disintegration Test	Teste de desagregação
Dosage strenghts	Formas de dosagem
Doxycycline	Doxiciclina
Drug	Medicamento/Fármaco
Drug concentration	Concentração de fármaco
Drug degradation	Degradação de fármaco

<b>E</b>	Endemic countries	Países endémicos
	Erythromycin	Eritromicina
	Ethambutol HCL	Etambutol HCL
	Ethyl acetate	Acetato de etilo
	Expected concentration	Concentração estimada
	Extraction	Extracção
	Extraction Medium	Meio de extracção
<b>F</b>	Filter paper	Papel de filtro
	Final Working Concentration	Concentração final eficaz
	Fixed-dose combinations	Combinações de doses fixas
	Formulations	Formulações
	Free base drug	Fármaco em base livre
	Furosemide	Furosemida
<b>G</b>	Glacial acetic acid	Ácido acético glacial
	Glass microcapillaries	Microcapilares de vidro
	Glibenclamide	Glibenclamida
	Graduated ruler	Régua graduada
	Griseofulvin	Griseofulvina
<b>H</b>	Halofantrine	Halofantrina
	Halofantrine hydrochloride	Cloridrato de halofantrina
	Handling	Manuseamento
	Hazy (liquid)	Turvo (líquido)
	Higher standard solution	Solução padrão com limite superior de eficácia
	Homogeneous spotting	Aplicação homogénea
	Hot plate	Placa de aquecimento
	Hydrochloric acid solution	Solução de ácido hidrolórico
	Hydrochloride salt	Forma sal de cloridrato
<b>I</b>	Indinavir	Indinavir
	Injectable powders	Pós para injectáveis
	Injection fluids	Formas farmacêuticas líquidas para injeção
	Iodine	Iodo
	Iodine chamber	Câmara de iodo
	Iodine staining	Coloração com iodo

	Iodine vapour	Vapor de iodo
	Isoniazid	Isoniazida
<b>L</b>	Lamiduvine	Lamiduvina
	Levofloxacin	Levofloxacina
	Levofloxacin semihydrate	Levofloxacina hemi-hidratada
	Low-dose extensions	Formulações de baixa dosagem
	Lower working limit	(Concentração) Limite de trabalho inferior
	Lumefantrine	Lumefantrina
<b>M</b>	Magnesium chloride hexahydrate	Cloreto de magnésio hexahidratado
	Malaria	Malária
	Mebendazole	Mebendazol
	Medicines	Medicamentos
	Mefloquine	Mefloquina
	Methanol	Metanol
	Methanolic ethyl acetate solution	Solução metanólica de acetato de etilo
	Method of detection	Método de detecção
	Metronidazole	Metronidazol
	Microcapillary pipettes	Microcapilares de vidro
	Mobile phase	Fase móvel
	Moxifloxacin	Moxifloxacina
	Moxifloxacin hydrochloride	Cloridrato de moxifloxacina
<b>N</b>	Nevirapine	Nevirapina
	Ninhydrin	Ninidrina
<b>O</b>	Oral administration	Administração oral
	Origin line	Linha de base
	Oseltamivir	Oseltamivir
<b>P</b>	PAC formulations	Formulações PAC
	Paediatric preparations	Formulações pediátricas
	Paracetamol	Paracetamol
	Parenteral	Parentérico (tipo de uso de formas farmacêuticas)
	Pestle	Pilão

Phenoxyethylpenicillin (Penicillin V)	Fenoximetilpenicilina (Penicilina V)
Powder	Pó
Praziquantel	Praziquantel
Prednisolone	Prednisolona
Prednisolone acetate	Acetato de prednisolona
Primaquine	Primaquina
Primaquine phosphate	Fosfato de primaquina
Primary Screening	Triagem primária
Principal spot	Mancha principal
produced (solution)	preparada (solução)
Proguanil	Proguanilo
Proguanil hydrochloride	Cloridrato de proguanilo
Prothionamide	Protionamida
Pyrazinamide	Pirazinamida
Pyrimethamine	Pirimetamina
<b>Q</b> Quinine	Quinina
Quinine bisulphate	Bissulfato de quinina
Quinine dihydrochloride	Dicloridrato de quinina
Quinine hydrochloride dihydrate	Cloridrato de quinina dihidratada
Quinine salts	Sais de quinina
Quinine sulphate	Sulfato de quinina
<b>R</b> Reference spots	Manchas de referência
Reference tablet	Comprimidos de referência
Relative retention factor	Fator de retenção relativa
Release (batch)	Libertação (lote)
Residual solids	Resíduos sólidos
Rifampicin	Rifampicina
Run	Corrida
<b>S</b> Salbutamol	Salbutamol
Sample container	Recipiente de amostras
Satellite spot	Mancha satélite/secundária
Saturation	Saturação
Secondary reference standard	Padrão secundário de referência
Silica gel	Gel de sílica

Single-dose preparations	Preparações de doses únicas
Sodium or potassium ethylene-diaminetetraacetate (EDTA)	Etilenodiaminotetraacetato (EDTA) de potássio ou sódio
Solvent	Solvente
Solvent front	Frente de solvente
Solvent vapour	Vapor do solvente
Spatula	Espátula
Spot tailing	Manchas arrastadas
Spots	Manchas
Spotting	Aplicação
Staining process	Processo de coloração
Standard solution	Solução padrão
Stationary phase	Fase estacionária
Stavudine	Estavudina
Stock sample solution	Solução stock de amostra
Stock standard solution	Solução stock de trabalho
Straight pipette	Pipeta graduada
Strengths	Dosagens
Sulfadoxine	Sulfadoxina
Sulfamethoxazole	Sulfametoxazol
Sulphuric acid	Ácido sulfúrico
Supernatant liquid	Líquido sobrenadante
Syrups	Xaropes
<b>T</b> Tablet	Comprimido
TB	TB (Tuberculose)
Test solution	Solução de teste
Tetracycline	Tetraciclina
Tetracycline hydrochloride	Cloridrato de tetraciclina
Thin Layer Chromatography	Cromatografia em camada fina
TLC developing chamber	Câmara de eluição de CCF
Toluene	Tolueno
transfer (verb)	transfira (verbo)
Travel distance	Distância relativa percorrida
Trimethoprim	Trimetoprim
<b>U</b> Uniformity	Uniformidade

	Upper working limit	Concentração limite superior de trabalho
	UV light	Luz UV (ultravioleta)
<b>V</b>	Vial	Frasco
	Visual Inspection	Inspecção visual
<b>W</b>	wash down (verb)	enxague (verbo)
	Wavelength (UV light)	Comprimento de onda (Luz UV)
	Working sample solution	Solução amostra de trabalho
	Working stock solution	Solução stock de trabalho
	wrap up (verb)	embrulhe (verbo)
<b>Z</b>	Zidovudine	Zidovudina



## **Anexo 2**

**A - Texto original e Tradução do Volume II  
(Páginas 141 a 210)**

### III. PREPARATION OF THE STOCK STANDARD SOLUTION

The preparation of the stock standard solution requires an authentic drug product for reference purposes, for example, tablets containing 500 mg of paracetamol. Wrap up one reference tablet into aluminium foil and crush it down to a fine powder using a pestle. Carefully empty the aluminium foil over a 40-ml laboratory glass bottle and wash down all residual solids with 25 ml of methanol using a straight pipette. Close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 20 mg of total drug per ml and be labelled as '*Paracetamol Stock Standard Solution*'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquid.

### IV. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 100% (UPPER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 25-ml vial and add 15 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 1.25 mg of total drug per ml and be labelled as '*Paracetamol Working Standard Solution 100%*'.

This higher working standard solution represents a drug product of good quality containing 100 % of paracetamol.

### V. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 80% (LOWER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 25-ml vial and add 19 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 1 mg of total drug per ml and be labelled as '*Paracetamol Working Standard Solution 80%*'.

This lower working standard solution represents a drug product of poor quality containing just 80% of the amount of paracetamol as stated on the product's label. In the current investigation, this drug level represents the lower acceptable limit for a given product.

### VI. PREPARATION OF THE STOCK SAMPLE SOLUTION FROM A PRODUCT CLAIMING TO CONTAIN 100 MG OF PARACETAMOL PER UNIT

Take two (!) whole tablets or capsules from an appropriate drug product sampled in the field. As usual, tablets are wrapped up into aluminium foil and crushed down to a fine powder. Transfer all the powder obtained into an appropriate laboratory glass bottle. Powder obtained from sample capsules should be transferred directly into the bottle adding the cap and body shells last. For extraction, add 10 ml of methanol using a straight pipette, close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid.

#### 250 MG OF PARACETAMOL PER UNIT

Take one sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 12.5 ml of methanol following the procedure shown above.

#### 400 MG OF PARACETAMOL PER UNIT

Take one sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 20 ml of methanol following the procedure shown above.

#### 500 MG OF PARACETAMOL PER UNIT

Take one sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 25 ml of methanol following the procedure shown above.

All stock sample solutions produced should finally contain 20 mg of total drug per ml and be labelled as '*Paracetamol Stock Sample Solution*'. Freshly prepare these solutions for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquids.

### III. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DO PADRÃO

A preparação da solução stock do padrão requer um medicamento autêntico para servir de referência, por exemplo comprimidos de 500 mg de paracetamol. Envolver um comprimido de referência em folha de alumínio e esmague-o, até ficar em pó, usando o pilão. Transfira, cuidadosamente, o conteúdo da folha de alumínio para um frasco de vidro de laboratório de 40 ml e lave o resto dos resíduos sólidos com 25 ml de metanol com uma pipeta graduada. Feche o frasco e agite durante cerca de três minutos, até que a maior parte dos sólidos se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos que não se dissolveram se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter o fármaco numa concentração total de 20 mg por ml e ser rotulada como "*Solução Stock do Padrão de Paracetamol*". Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante, límpido ou turvo.

### IV. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 100% (CONCENTRAÇÃO LIMITE SUPERIOR DE TRABALHO)

Pipete 1 ml da solução stock do padrão para um frasco de 25 ml e adicione 15 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter o fármaco numa concentração total de 1,25 mg por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Paracetamol a 100%*".

Esta solução padrão com concentração limite superior de trabalho representa um medicamento de alta qualidade que contém 100% de paracetamol.

### V. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 80% (CONCENTRAÇÃO LIMITE INFERIOR DE TRABALHO)

Pipete 1 ml da solução stock do padrão para um frasco de 25 ml e adicione 19 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter o fármaco numa concentração total de 1 mg por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Paracetamol a 80%*".

Esta solução padrão com concentração limite inferior de trabalho representa um medicamento de fraca qualidade e contém apenas 80% do paracetamol referido no rótulo do produto. Nesta investigação, este nível de fármaco representa o limite mínimo aceitável para tal produto.

### VI. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DE AMOSTRA DE UM PRODUTO DITO CONTER 100 MG DE PARACETAMOL POR UNIDADE

Retire dois (!) comprimidos ou cápsulas de uma amostra do produto. Como anteriormente, os comprimidos devem ser embrulhados numa folha de alumínio e esmagados até ficarem em pó fino. Transfira todo o pó obtido para um frasco de vidro de laboratório apropriado. Deve transferir directamente para o frasco o pó obtido de uma cápsula, adicionando, de seguida, o invólucro. Para proceder à extracção, adicione 10 ml de metanol, usando uma pipeta graduada, feche o frasco e agite-o durante cerca de três minutos, até que a maior parte dos sólidos se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos que não se dissolveram se depositem no fundo do frasco.

#### 250 MG DE PARACETAMOL POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula e extraia o pó obtido com 12,5 ml de metanol conforme o procedimento anterior.

#### 400 MG DE PARACETAMOL POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula e extraia o pó obtido com 20 ml de metanol conforme o procedimento anterior.

#### 500 MG DE PARACETAMOL POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula e extraia o pó obtido com 25 ml de metanol conforme o procedimento anterior.

Todas as soluções stock da amostra preparadas devem, no fim do procedimento, ter uma concentração total de fármaco de 20 mg por ml e serem rotuladas como "*Solução Stock da Amostra de Paracetamol*". Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a usar os líquidos sobrenadantes límpidos ou turvos.

#### VII. PREPARATION OF THE WORKING SAMPLE SOLUTION

Pipette 1 ml of the stock sample solution into a 25-ml vial and add 15 ml of methanol. Close and shake the vial and label as 'Paracetamol Working Sample Solution'.

The expected concentration of paracetamol in this working sample solution is 1.25 mg per ml and should match the concentration of paracetamol of the higher working standard solution produced above.

#### VIII. SPOTTING

Mark an origin line parallel to and about 1.5 cm from the bottom edge of the chromatoplate and apply 2  $\mu$ l of each test and standard solution as shown in the picture opposite using the microcapillary pipettes supplied.

Up to five spots can be placed on a plate. Check the uniformity of all spots using UV light of 254 nm. All spots should be circular in shape and equally spaced across the origin line. Although their intensities might differ, their diameters never should. Different intensities are due to residual amounts of tablet and capsule excipients or different drug concentrations in the sample solutions. A difference in spot size, however, relates to poor spotting. Repeat this step if homogeneous spotting is not achieved first time.

#### IX. DEVELOPMENT

Pipette 10 ml of acetone and 10 ml of toluene into the jar being used as TLC developing chamber. Add 10 drops of glacial acetic acid, close the chamber and mix thoroughly. Line the chamber's wall with filter paper and wait for about 15 minutes thus ensuring saturation of the chamber with solvent vapour. Carefully place the loaded TLC plate into the jar. Close the jar and develop the chromatoplate until the solvent front has moved about three-quarters of the length of the plate, the developing time being about 15 minutes. Remove the plate from the chamber, mark the solvent front and allow any excess solvent to evaporate using a hot plate if necessary.

#### X. DETECTION

Dry off all residual solvent and observe the chromatoplate under UV light of 254 nm using the battery-driven lamp supplied. Use this method of detection for both, identification and quantification purposes. Further verification of drug identity and content can be achieved when observing the plate at daylight after iodine staining.

#### VII. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AMOSTRA DE TRABALHO

Pipete 1 ml da solução stock da amostra para um frasco de 25 ml e adicione 15 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. Rotule-o como "Solução Amostra de Trabalho de Paracetamol".

Estima-se que a concentração de paracetamol nesta solução amostra de trabalho seja de 1,25 mg por ml e deve ser igual à concentração de paracetamol na solução padrão de trabalho com concentração limite superior preparada anteriormente.

#### VIII. APLICAÇÃO

Trace uma linha paralela à base da placa cromatográfica, a cerca de 1,5 cm da base, e aplique 2 µl de cada solução, de padrão e de teste, como ilustrado na figura do lado oposto, usando os microcapilares de vidro fornecidos.

Podem ser aplicadas cinco manchas numa placa. Confirme a uniformidade das manchas através da luz ultravioleta (UV) de 254 nm. Todas as manchas devem ser circulares e separadas entre si por uma distância igual ao longo da linha de base. Apesar de as suas intensidades poderem diferir, o seu diâmetro deve ser sempre igual. As diferentes intensidades devem-se a diferentes quantidades residuais de excipientes dos comprimidos e cápsulas ou devido a diferentes concentrações do fármaco na solução da amostra. Porém, se as manchas apresentarem um tamanho diferente deve-se a uma incorrecta técnica de aplicação. Repita este passo, se não conseguir uma aplicação homogénea à primeira tentativa.

#### IX. ELUIÇÃO

Pipete 10 ml de acetona e 10 ml de tolueno para o frasco que está a ser usado como câmara de eluição de CCF. Adicione 10 gotas de ácido acético glacial, feche a câmara e misture bem. Revista a parede da câmara com papel de filtro e aguarde cerca de 15 minutos para assegurar a saturação da câmara com o vapor do solvente. Coloque, com cuidado, a placa de CCF contendo os compostos no frasco. Feche o frasco e elua a placa cromatográfica até que a frente de solvente tenha percorrido três-quartos do comprimento da placa, tendo em conta que a eluição demora cerca de 15 minutos. Remova a placa da câmara, marque a frente solvente e deixe que o excesso de solvente se evapore. Se for necessário, use a placa de aquecimento.

#### X. REVELAÇÃO

Deixe que todos os resíduos do solvente evaporem da placa cromatográfica e observe-a com luz ultravioleta de 254 nm, usando a lanterna a pilhas fornecida. Use este método de detecção para efeitos de identificação e de quantificação. Para verificação adicional da autenticidade e teor do fármaco, observe a placa à luz do dia após a coloração com iodo.

XI. CHROMATOPLATE OBSERVED UNDER UV LIGHT OF 254 NM

Run No.1: Paracetamol's upper working limit representing 100 % of total drug.

Run No.2: A drug product of good quality containing paracetamol, aspirin and caffeine.

Run No.3: A drug product of poor quality containing very little paracetamol.

Run No.4: Paracetamol's lower working limit representing 80 % of total drug.

(Solvent front)

Principal spots for Aspirin, Paracetamol and Caffeine.

(Origin line)

XII. OBSERVATIONS MADE AT 254 NM

A strong blue-violet spot at a travel distance of about 0.40 indicates the presence of paracetamol in the test solution. When combined with aspirin and caffeine (PAC formulations), some weaker spots might become visible just above and below the paracetamol spot, respectively. Additional strong spots generated by the test solution would point at other drugs or paracetamol degradation, the latter case being more likely when associated with a smaller principal spot. Auxiliary agents incorporated in the different tablet or capsule formulations might cause some fainter spots either travelling alongside the solvent front or emerging near or even on the origin line.

XIII. OBSERVATIONS MADE AT DAYLIGHT AFTER IODINE STAINING

When exposing the chromatoplate to iodine vapour, all paracetamol spots already observed at 254 nm are now turning yellowish brown. Still observe the plate when iodine evaporates already. Spots reflecting poor quality products will disappear first gradually followed by the reference spots representing a drug content of an 80 and 100 percent, respectively.

XIV. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

The paracetamol spot in the chromatogram obtained with the test solution must correspond in terms of colour, size, intensity, shape and travel distance to that in the chromatogram obtained with the lower and higher standard solution. This result must be obtained for each method of detection. If this is not achieved, repeat the run from scratch with a second sample. Reject the batch if the drug content cannot be verified in a third run. For a second opinion, refer additional samples to a fully-fledged drug quality control laboratory. Retain samples and put the batch on quarantine until a final decision on rejection or release has been taken.

#### XI. PLACA CROMATOGRÁFICA OBSERVADA SOB LUZ UV DE 254 NM

1ª corrida: Concentração limite superior de trabalho de paracetamol, representando 100% do fármaco.

2ª corrida: Medicamento de boa qualidade contendo paracetamol, aspirina e cafeína.

3ª corrida: Medicamento de fraca qualidade contendo pouca quantidade de paracetamol.

4ª corrida: Concentração limite inferior de trabalho de paracetamol, representando 80% do fármaco.

(Frente solvente)

Manchas principais de Aspirina, Paracetamol e Cafeína.

(linha de base)

#### XII. OBSERVAÇÃO A 254 NM

Uma mancha azul-violeta forte com uma distância relativa percorrida de cerca de 0,40 indica a presença de paracetamol na solução de teste. Aquando da associação de paracetamol com aspirina e cafeína (formulações PAC), algumas manchas mais fracas poderão tornar-se visíveis, respectivamente acima e abaixo da mancha de paracetamol. Manchas nítidas adicionais formadas pela solução de teste podem indicar a presença de outros fármacos ou a degradação de paracetamol, estando este último caso associado a uma mancha principal mais pequena. Os agentes auxiliares incorporados nas diferentes formulações dos comprimidos ou cápsulas podem originar manchas mais fracas quer ao longo da frente solvente quer perto da linha de base ou sobre esta.

#### XIII. OBSERVAÇÃO À LUZ DO DIA APÓS COLORAÇÃO COM IODO

Aquando da exposição da placa cromatográfica ao vapor de iodo, todas as manchas de paracetamol anteriormente observadas a 254 nm tornam-se amarelo-acastanhadas. Observe a placa durante a evaporação do iodo. As manchas que denunciam um produto de fraca qualidade desaparecerão em primeiro lugar, gradualmente, seguidas pelas manchas de referência que representam um teor de fármaco de 80 e 100 por cento, respectivamente.

#### XIV. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

A mancha de paracetamol no cromatograma obtida a partir da solução de teste deve corresponder, em termos de cor, tamanho, intensidade, forma e distância relativa percorrida, às manchas do cromatograma obtidas com as soluções padrão com concentração limite inferior e superior. Deve obter este resultado para cada método de detecção. Se não conseguir obter este resultado, repita o teste do início com uma segunda amostra. Se não conseguir verificar o teor do fármaco num terceiro teste, rejeite o lote. Para obter uma segunda opinião, envie outras amostras para um laboratório profissional de controlo de qualidade de medicamentos. Guarde algumas amostras e coloque o lote em quarentena até que se tome uma decisão final sobre a sua rejeição ou libertação.

## Phenoxymethylpenicillin (Penicillin V)

Primary Screening via Visual Inspection and Disintegration Test

### I. VISUAL INSPECTION

Search for deficiencies on labelling, packaging and dosage forms as described in the opening chapters on general methods and operations. Write down all product particulars using the reporting form as a guide. Each tablet or capsule usually contains 250 mg of phenoxymethylpenicillin approximately equivalent to 400,000 IU of penicillin V. Other strengths are known to exist.

### II. DISINTEGRATION TEST

All quick release phenoxymethylpenicillin tablets and capsules must pass the disintegration test as described in the opening chapters on general methods and operations. They should disintegrate in water at 37 °C in less than 30 minutes. It's a major defect if a drug product doesn't pass this test.

### III. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

Drug products from unusually cheap sources, drug products with missing or incorrect accompanying documents and drug products with defective dosage forms, packaging or with incomplete, damaged or missing labels or with labels written in a foreign language should be subjected to a thin layer chromatographic test.

## Verification of Drug Identity and Content via Thin Layer Chromatography

### I. PRINCIPLE

Phenoxymethylpenicillin is extracted from tablets and capsules with water and determined by TLC with reference to an authentic secondary standard.

### II. EQUIPMENT AND REAGENTS

1. Pestle
2. Aluminium foil
3. Funnel
4. Label tape
5. Marker pen
6. Pencil
7. 10-ml vials
8. Set of straight pipettes (1 to 25 ml)
9. Set of laboratory glass bottles (25 to 100 ml)
10. Merck TLC aluminium plates pre-coated with silica gel 60 F 254, size 5x10 cm
11. Glass microcapillaries (2- $\mu$ l filling capacity)
12. TLC developing chamber (500-ml jar)
13. Hot plate
14. Filter paper
15. Pair of scissors
16. Pair of tweezers



## Fenoximetilpenicilina (Penicilina V)

Triagem Primária com Inspeção Visual e Teste de Desagregação

### I. INSPEÇÃO VISUAL

Procure deficiências na rotulagem, embalagem e formas de dosagem, tal como descrito nos capítulos iniciais sobre os métodos e procedimentos gerais. Registe todos os pormenores do produto, usando os formulários para relatório como orientação. Cada comprimido ou cápsula normalmente contém 250 mg de fenoximetilpenicilina, aproximadamente equivalente a 400.000 UI de penicilina V. Sabe-se que existem outras dosagens.

### II. TESTE DE DESAGREGAÇÃO

Todos os comprimidos de fenoximetilpenicilina de libertação rápida devem passar o teste de desagregação, tal como se descreve nos capítulos iniciais sobre métodos e procedimentos gerais. Devem desagregar-se em água a 37 °C em menos de 30 minutos. Se o fármaco não passar este teste, constitui um defeito importante.

### III. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

Produtos farmacêuticos a preços vulgarmente baratos, medicamentos com documentos de apoio em falta ou incorrectos e medicamentos com formas de dosagem irregulares, embalagens deficientes ou rótulos incompletos, danificados ou ausentes ou com rótulos escritos em língua estrangeira, devem ser submetidos a um teste cromatográfico em camada fina.

Verificação da Identidade e Teor do Fármaco através da Cromatografia de Camada Fina

### I. PRINCÍPIO

A fenoximetilpenicilina é extraída de comprimidos e cápsulas com água e determinada por CCF, tendo em conta os padrões secundários de referência.

### II. EQUIPAMENTO E REAGENTES

1. Pilão
2. Folha de alumínio
3. Funil
4. Fita adesiva
5. Marcador
6. Lápis
7. Frascos de 10 ml
8. Conjunto de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
9. Conjunto de frascos de vidro de laboratório (25 a 100 ml)
10. Placas de alumínio de CCF da Merck previamente revestidas de gel de sílica 60 F 254, tamanho 5x10 cm
11. Microcapilares de vidro (capacidade de 2 µl)
12. Câmara de eluição de CCF (frasco de 500 ml)
13. Placa de aquecimento
14. Papel de filtro
15. Tesoura
16. Pinças

(continuação da página 144 do texto de partida)

17. UV light of 254 nm
18. Iodine chamber
19. Ethyl acetate
20. Glacial acetic acid
21. Water
22. Secondary reference standard, for example, phenoxymethylpenicillin 250 mg tablets

(continuação da tradução da página 144)

17. Luz ultravioleta de 254 nm
18. Câmara de iodo
19. Acetato de etilo
20. Ácido acético glacial
21. Água
22. Padrão secundário de referência, por exemplo comprimidos de fenoximetilpenicilina de 250 mg

### III. PREPARATION OF THE STOCK STANDARD SOLUTION

The preparation of the stock standard solution requires an authentic drug product for reference purposes, for example, tablets containing 250 mg of phenoxymethylpenicillin. Wrap up one reference tablet into aluminium foil and crush it down to a fine powder using a pestle. Carefully empty the aluminium foil over a 40-ml laboratory glass bottle and wash down all residual solids with 25 ml of water using a straight pipette. Close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 10 mg of total drug per ml and be labelled as 'Phenoxymethylpenicillin Stock Standard Solution'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the hazy supernatant liquid.

### IV. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 100% (UPPER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 3 ml of water. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 2.5 mg of total drug per ml and be labelled as 'Phenoxymethylpenicillin Working Standard Solution 100%'.

This higher working standard solution represents a drug product of good quality containing 100 % of phenoxymethylpenicillin.

### V. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 80% (LOWER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 4 ml of water. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 2 mg of total drug per ml and be labelled as 'Phenoxymethylpenicillin Working Standard Solution 80%'.

This lower working standard solution represents a drug product of poor quality containing just 80% of the amount of phenoxymethylpenicillin as stated on the product's label. In the current investigation, this drug level represents the lower acceptable limit for a given product.

### VI. PREPARATION OF THE STOCK SAMPLE SOLUTION FROM A PRODUCT CLAIMING TO CONTAIN 250 MG OF PENICILLIN V PER UNIT

Take one whole tablet or capsule from an appropriate drug product sampled in the field. As usual, tablets are wrapped up into aluminium foil and crushed down to a fine powder. Transfer all the powder obtained into a 40-ml laboratory glass bottle. Powder obtained from a sample capsule should be transferred directly into the bottle adding the cap and body shells last. For extraction, add 25 ml of water using a straight pipette, close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 10 mg of total drug per ml and be labelled as 'Phenoxymethylpenicillin Stock Sample Solution'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the hazy supernatant liquid.

### III. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DO PADRÃO

A preparação da solução stock do padrão requer um medicamento autêntico para servir de referência, por exemplo comprimidos de 250 mg de fenoximetilpenicilina. Embrulhe um comprimido de referência em folha de alumínio e esmague-o, usando o pilão, até ficar em pó fino. Transfira, cuidadosamente, o conteúdo da folha de alumínio para um frasco de vidro de laboratório de 40 ml e lave o resto dos resíduos sólidos com 25 ml de água com uma pipeta graduada. Feche o frasco e agite durante cerca de três minutos, até que a maior parte dos sólidos se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos que não se dissolveram se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter uma concentração total de fármaco de 10 mg por ml e ser rotulada como "*Solução Stock do Padrão de Fenoximetilpenicilina*". Prepare esta solução de fresco para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante turvo.

### IV. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 100% (CONCENTRAÇÃO LIMITE SUPERIOR DE TRABALHO)

Pipete 1 ml da solução padrão para um frasco de 10 ml e adicione 3 ml de água. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 2,5 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Fenoximetilpenicilina a 100%*".

Esta solução padrão com concentração limite superior de trabalho é um medicamento de alta qualidade que contém 100% de fenoximetilpenicilina.

### V. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 80% (CONCENTRAÇÃO LIMITE MÍNIMO DE TRABALHO)

Pipete 1 ml da solução stock do padrão para um frasco de 10 ml e adicione 4 ml de água. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 2 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Fenoximetilpenicilina a 80%*".

Esta solução padrão de trabalho de concentração limite inferior consiste num medicamento de fraca qualidade e contém apenas 80% de fenoximetilpenicilina, como referido no rótulo do produto. Nesta investigação, este nível de medicamento representa o limite mínimo aceitável para tal produto.

### VI. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DE AMOSTRA DE UM PRODUTO DITO CONTER 250 MG DE PENICILINA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula de uma amostra do produto. Como anteriormente, os comprimidos devem ser embrulhados numa folha de alumínio e esmagados até ficarem em pó fino. Transfira todo o pó obtido para um frasco de vidro de laboratório de 40 ml. Deve transferir directamente para o frasco o pó obtido de uma cápsula, adicionando, de seguida, o invólucro. Para proceder à extracção, adicione 25 ml de água, usando uma pipeta graduada, feche o frasco e agite-o durante cerca de três minutos, até que a maior parte dos sólidos se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos que não se dissolveram se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter 10 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Stock de Amostra de Fenoximetilpenicilina*". Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante turvo.

#### VII. PREPARATION OF THE WORKING SAMPLE SOLUTION

Pipette 1 ml of the stock sample solution into a 10-ml vial and add 3 ml of water. Close and shake the vial and label as '*Phenoxymethylpenicillin Working Sample Solution*'.

The expected concentration of phenoxymethylpenicillin in this working sample solution is 2.5 mg per ml and should match the concentration of penicillin of the higher working standard solution produced above.

#### VIII. SPOTTING

Mark an origin line parallel to and about 1.5 cm from the bottom edge of the chromatoplate and apply 2  $\mu$ l of each test and standard solution as shown in the picture opposite using the microcapillary pipettes supplied.

Up to five spots can be placed on a plate. Check the uniformity of all spots using UV light of 254 nm. All spots should be circular in shape and equally spaced across the origin line. Although their intensities might differ, their diameters never should. Different intensities are due to residual amounts of tablet and capsule excipients or different drug concentrations in the sample solutions. A difference in spot size, however, relates to poor spotting. Repeat this step if homogeneous spotting is not achieved first time.

Note that the filling of the microcapillary pipettes might take some time when handling aqueous sample solutions. As traces of water are causing spot tailing, completely dry off all extraction solvent before chromatoplate development using the hot plate supplied.

#### IX. DEVELOPMENT

Pipette 15 ml of ethyl acetate, 5 ml of glacial acetic acid and 5 ml of water into the jar being used as TLC developing chamber. Close the chamber and mix thoroughly. Line the chamber's wall with filter paper and wait for about 15 minutes thus ensuring saturation of the chamber with solvent vapour. Carefully place the loaded TLC plate into the jar. Close the jar and develop the chromatoplate until the solvent front has moved about three-quarters of the length of the plate, the developing time being about 30 minutes. Remove the plate from the chamber, mark the solvent front and allow any excess solvent to evaporate using a hot plate if necessary.

#### X. DETECTION

Dry off all residual solvent and expose the chromatoplate to iodine vapour for about one minute. Remove the plate from the iodine chamber and observe the plate at daylight. Use this method of detection for both, identification and quantification purposes.

#### VII. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AMOSTRA DE TRABALHO

Pipete 1 ml da solução stock da amostra para um frasco de 10 ml e adicione 3 ml de água. Feche o frasco e agite-o. Rotule-o como "*Solução Amostra de Trabalho de Fenoximetilpenicilina*".

Estima-se que a concentração total de fenoximetilpenicilina nesta solução amostra de trabalho seja de 2,5 mg por ml e deve ser igual à concentração de penicilina na solução padrão de trabalho de concentração limite superior produzida anteriormente.

#### VIII. APLICAÇÃO

Trace uma linha paralela à base da placa cromatográfica, a cerca de 1,5 cm da base, e aplique 2 µl de cada solução, de padrão e de teste, como ilustrado na figura do lado oposto, usando os microcapilares de vidro fornecidos.

Podem ser aplicadas cinco manchas numa placa. Confirme a uniformidade das manchas através da luz ultravioleta de 254 nm. Todas as manchas devem ser circulares e separadas entre si por uma distância igual ao longo da linha de base. Apesar de as suas intensidades poderem diferir, o seu diâmetro deve ser sempre igual. As diferentes intensidades devem-se a diferentes quantidades residuais de excipientes dos comprimidos e cápsulas ou devido a diferentes concentrações do fármaco na solução de amostra. Porém, se as manchas apresentarem um tamanho diferente deve-se a uma incorrecta técnica de aplicação. Repita este passo, se não conseguir uma aplicação homogénea à primeira tentativa.

Tenha em conta que encher as pipetas microcapilares pode demorar algum tempo aquando da utilização de soluções aquosas de amostra. Para evitar que resíduos de água originem manchas arrastadas, utilize a placa de aquecimento fornecida para secar o solvente de extracção antes da revelação da placa cromatográfica.

#### IX. ELUIÇÃO

Pipete 15 ml de acetato de etilo, 5 ml de ácido acético glacial e 5 ml de água para o frasco que está a ser usado como câmara de eluição de CCF. Feche a câmara e misture bem. Revista a parede da câmara com papel de filtro e aguarde cerca de 15 minutos para assegurar a saturação da câmara com o vapor do solvente. Coloque, com cuidado, a placa de CCF contendo os compostos no frasco. Feche o frasco e elua a placa cromatográfica até que a frente de solvente tenha percorrido três-quartos do comprimento da placa, tendo em conta que a eluição demora cerca de 30 minutos. Remova a placa da câmara, marque a frente solvente e deixe que o excesso de solvente se evapore. Se for necessário, use a placa de aquecimento.

#### X. REVELAÇÃO

Deixe que todos os resíduos do solvente evaporem e exponha a placa cromatográfica ao vapor de iodo durante cerca de um minuto. Remova a placa da câmara de iodo e observe-a à luz do dia. Use este método de detecção para efeitos de identificação e de quantificação.

XI. CHROMATORATE OBSERVED AT DAYLIGHT AFTER IODINE STAINING

Run No.1: Penicillin's upper working limit representing 100 % of total drug.

Run No.2: A drug product of good quality.

Run No.3: A drug product of poor quality.

Run No.4: Penicillin's lower working limit representing 80 % of total drug

(Solvent front)

Principal spot

Satellite spot

(Origin line)

XII. OBSERVATION MADE AT DAYLIGHT AFTER IODINE STAINING

A strong brown spot at a travel distance of about 0.85 indicates the presence of phenoxymethylpenicillin in the test solution. This principal spot might come together with a smaller satellite spot having a relative retention factor of about 0.39. Additional strong spots generated by the test solution would point at other drugs. Auxiliary agents incorporated in the different tablet or capsule formulations might cause some fainter spots emerging near or on the origin line. Still observe the plate when iodine evaporates already. Spots reflecting poor quality products will disappear first gradually followed by the reference spots representing a drug content of an 80 and 100 percent, respectively.

XIII. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

The phenoxymethylpenicillin spot in the chromatogram obtained with the test solution must correspond in terms of colour, size, intensity, shape and travel distance to that in the chromatogram obtained with the lower and higher standard solution. This result must be obtained for each method of detection. If this is not achieved, repeat the run from scratch with a second sample. Reject the batch if the drug content cannot be verified in a third run. For a second opinion, refer additional samples to a fully-fledged drug quality control laboratory. Retain samples and put the batch on quarantine until a final decision on rejection or release has been taken.



I. PLACA CROMATOGRÁFICA OBSERVADA À LUZ DO DIA APÓS COLORAÇÃO COM IODO

1ª corrida: Concentração limite superior de trabalho de penicilina, representando 100% do fármaco.

2ª corrida: Medicamento de boa qualidade.

3ª corrida: Medicamento de fraca qualidade.

4ª corrida: Concentração limite inferior de trabalho de penicilina, representando 80% do fármaco.

(Frente solvente)

Mancha principal

Mancha secundária/satélite

(Linha de base)

XII. OBSERVAÇÃO À LUZ DO DIA APÓS COLORAÇÃO COM IODO

Uma mancha acastanhada forte com uma distância relativa percorrida de cerca de 0,85 indica a presença de fenoximetilpenicilina na solução de teste. Esta mancha principal pode vir acompanhada de uma mancha secundária/satélite mais pequena com um factor de retenção relativa de cerca de 0,39. Manchas nítidas adicionais formadas pela solução de teste podem indicar a presença de outros fármacos. Os agentes auxiliares incorporados nas diferentes formulações dos comprimidos ou cápsulas podem originar manchas mais fracas, perto da linha ou sobre esta. Observe a placa durante a evaporação do iodo. As manchas que denunciam um produto de fraca qualidade desaparecerão em primeiro lugar, gradualmente, seguidas pelas manchas de referência que representam um teor de fármaco de 80 e 100 por cento, respectivamente.

XIII. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

A mancha de fenoximetilpenicilina no cromatograma obtida através da solução de teste deve corresponder, em termos de cor, tamanho, intensidade, forma e distância relativa percorrida, às manchas do cromatograma obtidas com as soluções padrão com concentração limite inferior e superior. Deve obter este resultado para cada método de detecção. Se não conseguir obter este resultado, repita o teste do início com uma segunda amostra. Se não conseguir verificar o teor do fármaco num terceiro teste, rejeite o lote. Para obter uma segunda opinião, envie outras amostras para um laboratório profissional de controlo de qualidade de medicamentos. Guarde algumas amostras e coloque o lote em quarentena até que se tome uma decisão final sobre a sua rejeição ou libertação.

## Praziquantel

### Primary Screening via Visual Inspection and Disintegration Test

#### I. VISUAL INSPECTION

Search for deficiencies on labelling, packaging and dosage forms as described in the opening chapters on general methods and operations. Write down all product particulars using the reporting form as a guide. Each tablet or capsule usually contains a 150 or 600 mg of praziquantel. Other strengths are known to exist.

#### II. DISINTEGRATION TEST

All quick release praziquantel tablets and capsules must pass the disintegration test as described in the opening chapters on general methods and operations of the main manual. They should disintegrate in water at 37 °C in less than 30 minutes. It is a major defect if a drug product does not pass this test.

#### III. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

Drug products from unusually cheap sources, drug products with missing or incorrect accompanying documents and drug products with defective dosage forms, packaging or with incomplete, damaged or missing labels or with labels written in a foreign language should be subjected to a thin layer chromatographic test.

### Verification of Drug Identity and Content via Thin Layer Chromatography

#### I. PRINCIPLE

Praziquantel is extracted from tablets and capsules with methanol and determined by TLC with reference to an authentic secondary standard.

#### II. EQUIPMENT AND REAGENTS

1. Pestle
2. Aluminium foil
3. Funnel
4. Label tape
5. Marker pen
6. Pencil
7. 10-ml vials
8. Set of straight pipettes (1 to 25 ml)
9. Set of laboratory glass bottles (25 to 100 ml)
10. Merck TLC aluminium plates pre-coated with silica gel 60 F 254, size 5x10 cm
11. Glass microcapillaries (2- $\mu$ l filling capacity)
12. TLC developing chamber (500-ml jar)
13. Hot plate
14. Filter paper
15. Pair of scissors
16. Pair of tweezers

## Praziquantel

Triagem Primária com Inspeção Visual e Teste de Desagregação

### I. INSPEÇÃO VISUAL

Procure deficiências na rotulagem, embalagem e as formas de dosagem, tal como descrito nos capítulos iniciais sobre os métodos e procedimentos gerais. Registe todos os pormenores do produto, usando os formulários para relatório como orientação. Cada comprimido ou cápsula normalmente contém 150 ou 600 mg de praziquantel. Sabe-se que existem outras dosagens.

### II. TESTE DE DESAGREGAÇÃO

Todos os comprimidos de praziquantel de libertação rápida devem passar o teste de desagregação, tal como se descreve nos capítulos iniciais sobre métodos e procedimentos gerais do manual principal. Devem desagregar-se em água a 37 ° C em menos de 30 minutos. Se o fármaco não passar este teste, constitui um defeito importante.

### III. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

Produtos farmacêuticos a preços invulgarmente baratos, medicamentos com documentos de apoio em falta ou incorrectos e medicamentos com formas de dosagem irregulares, embalagens deficientes ou rótulos incompletos, danificados ou ausentes ou com rótulos escritos em língua estrangeira, devem ser submetidos a um teste cromatográfico em camada fina.

Verificação da Identidade e Teor do Fármaco através da Cromatografia em Camada Fina

#### I. PRINCÍPIO

O praziquantel é extraído de comprimidos e cápsulas com metanol e determinado por CCF, tendo em conta os padrões secundários de referência.

#### II. EQUIPAMENTO E REAGENTES

1. Pilão
2. Folha de alumínio
3. Funil
4. Fita adesiva
5. Marcador
6. Lápis
7. Frascos de 10 ml
8. Conjunto de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
9. Conjunto de frascos de vidro de laboratório (25 a 100 ml)
10. Placas de alumínio de CCF da Merck previamente revestidas de gel de sílica 60 F 254, tamanho 5x10 cm
11. Microcapilares de vidro (capacidade de 2 µl)
12. Câmara de eluição de CCF (frasco de 500 ml)
13. Placa de aquecimento
14. Papel de filtro
15. Tesoura
16. Pinças

(continuação da página 148 do texto de partida)

17. UV light of 254 nm
18. Iodine chamber
19. Acetone
20. Methanol
21. Toluene
22. Secondary reference standard, for example, praziquantel 600 mg tablets

(continuação da tradução da página 148)

- 17 Luz ultravioleta de 254 nm
- 18 Câmara de iodo
- 19 Acetona
- 20 Metanol
- 21 Tolueno
- 22 Padrão secundário de referência, por exemplo comprimidos de praziquantel de 600 mg

### III. PREPARATION OF THE STOCK SAMPLE SOLUTION

The preparation of the stock standard solution requires an authentic drug product for reference purposes, for example, tablets containing 600 mg of praziquantel. Wrap up one reference tablet into aluminium foil and crush it down to a fine powder using a pestle. Carefully empty the aluminium foil over a 25-ml laboratory glass bottle and wash down all residual solids with 20 ml of methanol using a straight pipette. Close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 30 mg of total drug per ml and be labelled as '*Praziquantel Stock Standard Solution*'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquid.

### IV. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 100% (UPPER WORKING LIMIT)

Pipette 2 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 2 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 15 mg of total drug per ml and be labelled as '*Praziquantel Working Standard Solution 100%*'.

This higher working standard solution represents a drug product of good quality containing 100 % of praziquantel.

### V. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 80% (LOWER WORKING LIMIT)

Pipette 2 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 3 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 12 mg of total drug per ml and be labelled as '*Praziquantel Working Standard Solution 80%*'.

This lower working standard solution represents a drug product of poor quality containing just 80% of the amount of praziquantel as stated on the product's label. In the current investigation, this drug level represents the lower acceptable limit for a given product.

### VI. PREPARATION OF THE STOCK SAMPLE SOLUTION FROM A PRODUCT CLAIMING TO CONTAIN 150 MG OF PRAZIQUANTEL PER UNIT

Take two (!) whole tablets or capsules from an appropriate drug product sampled in the field. As usual, tablets are wrapped up into aluminium foil and crushed down to a fine powder. Transfer all the powder obtained into a 25-ml laboratory glass bottle. Powder obtained from sample capsules should be transferred directly into the bottle adding the cap and body shells last. For extraction, add 10 ml of methanol using a straight pipette, close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid.

#### 600 MG OF PRAZIQUANTEL PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 20 ml of methanol using a straight pipette and a 25-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

All stock sample solutions produced should finally contain 30 mg of total drug per ml and be labelled as '*Praziquantel Stock Sample Solution*'. Freshly prepare these solutions for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquids.

### III. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DA AMOSTRA

A preparação da solução stock do padrão requer um medicamento autêntico para servir de referência, por exemplo comprimidos de 600 mg de praziquantel. Embrulhe um comprimido de referência em folha de alumínio e esmague-o, até ficar em pó fino, usando o pilão. Transfira, cuidadosamente, o conteúdo da folha de alumínio para um frasco de vidro de laboratório de 25 ml e lave o resto dos resíduos sólidos com 20 ml de metanol com uma pipeta graduada. Feche o frasco e agite durante cerca de três minutos, até que a maior parte dos sólidos se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos que não se dissolveram se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter o fármaco numa concentração total de 30 mg por ml e ser rotulada como "*Solução Stock do Padrão de Praziquantel*". Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante, límpido ou turvo.

### IV. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 100% (CONCENTRAÇÃO LIMITE SUPERIOR DE TRABALHO)

Pipete 2 ml da solução stock do padrão para um frasco de 10 ml e adicione 2 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter o fármaco numa concentração total de 15 mg por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Praziquantel a 100%*".

Esta solução padrão de trabalho com concentração limite superior representa um medicamento de alta qualidade que contém 100% de praziquantel.

### V. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 80% (CONCENTRAÇÃO LIMITE MÍNIMO DE TRABALHO)

Pipete 2 ml da solução stock do padrão para um frasco de 10 ml e adicione 3 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter o fármaco numa concentração total de 12 mg por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Praziquantel a 80%*".

Esta solução padrão de trabalho com concentração limite inferior representa um medicamento de fraca qualidade e contém apenas 80% do praziquantel referido no rótulo do produto. Nesta investigação, este nível de fármaco representa o limite mínimo aceitável para tal produto.

### VI. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DE AMOSTRA DE UM PRODUTO DITO CONTER 150 MG DE PRAZIQUANTEL POR UNIDADE

Retire dois (!) comprimidos ou cápsulas de uma amostra do produto. Como anteriormente, os comprimidos devem ser embrulhados numa folha de alumínio e esmagados até ficarem em pó fino. Transfira todo o pó obtido para um frasco de vidro de laboratório de 25 ml. Deve transferir directamente para o frasco o pó obtido de uma cápsula, adicionando, de seguida, o invólucro. Para proceder à extracção, adicione 10 ml de metanol, usando uma pipeta graduada, feche o frasco e agite-o durante cerca de três minutos, até que a maior parte dos sólidos se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos que não se dissolveram se depositem no fundo do frasco.

#### 600 MG DE PRAZIQUANTEL POR UNIDADE

Extraia o pó obtido da amostra de um comprimido ou de uma cápsula com 20 ml de metanol, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 25 ml, como recipiente para amostras. Continue como indicado anteriormente.

Todas as soluções stock da amostra preparadas devem, no fim do procedimento, ter uma concentração total de 30 mg por ml e serem rotuladas como "*Solução Stock da Amostra de Praziquantel*". Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a usar os líquidos sobrenadantes límpidos ou turvos.

#### VII. PREPARATION OF THE WORKING SAMPLE SOLUTION

Pipette 2 ml of the stock sample solution into a 10-ml vial and add 2 ml of methanol. Close and shake the vial and label as '*Praziquantel Working Sample Solution*'.

The expected concentration of praziquantel in this working sample solution is 15 mg of total drug per ml and should match the concentration of praziquantel of the higher working standard solution produced above.

#### VIII. SPOTTING

Mark an origin line parallel to and about 1.5 cm from the bottom edge of the chromatoplate and apply 2 µl of each test and standard solution as shown in the picture opposite using the microcapillary pipettes supplied.

Up to five spots can be placed on a plate. Check the uniformity of all spots using UV light of 254 nm. All spots should be circular in shape and equally spaced across the origin line. Although their intensities might differ, their diameters never should. Different intensities are due to residual amounts of tablet and capsule excipients or different drug concentrations in the sample solutions. A difference in spot size, however, relates to poor spotting. Repeat this step if homogeneous spotting is not achieved first time.

#### IX. DEVELOPMENT

Pipette 14 ml of acetone and 7 ml of toluene into the jar being used as TLC developing chamber. Close the chamber and mix thoroughly. Line the chamber's wall with filter paper and wait for about 15 minutes thus ensuring saturation of the chamber with solvent vapour. Carefully place the loaded TLC plate into the jar. Close the jar and develop the chromatoplate until the solvent front has moved about three-quarters of the length of the plate, the developing time being about 15 minutes. Remove the plate from the chamber, mark the solvent front and allow any excess solvent to evaporate using a hot plate if necessary.

#### X. DETECTION

Dry off all residual solvent and observe the chromatoplate under UV light of 254 nm using the battery-driven lamp supplied. Use this method of detection for both, identification and quantification purposes. Further verification of drug identity and content can be achieved when observing the plate at daylight after iodine staining.



#### VII. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AMOSTRA DE TRABALHO

Pipete 2 ml da solução stock da amostra para um frasco de 10 ml e adicione 2 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. Rotule-o como "*Solução Amostra de Trabalho de Praziquantel*".

Estima-se que a concentração de praziquantel nesta solução amostra de trabalho seja de 15 mg por ml e deve ser igual à concentração de praziquantel na solução padrão de trabalho com concentração limite superior preparada anteriormente.

#### VIII. APLICAÇÃO

Trace uma linha paralela à base da placa cromatográfica, a cerca de 1,5 cm da base, e aplique 2 µl de cada solução, de padrão e de teste, como ilustrado na figura do lado oposto, usando os microcapilares de vidro fornecidos.

Podem ser aplicadas cinco manchas numa placa. Confirme a uniformidade das manchas através da luz ultravioleta de 254 nm. Todas as manchas devem ser circulares e separadas entre si por uma distância igual ao longo da linha de base. Apesar de as suas intensidades poderem diferir, o seu diâmetro deve ser sempre igual. As diferentes intensidades devem-se a diferentes quantidades residuais de excipientes dos comprimidos e cápsulas ou devido a diferentes concentrações do fármaco na solução da amostra. Porém, se as manchas apresentarem um tamanho diferente deve-se a uma incorrecta técnica de aplicação. Repita este passo, se não conseguir uma aplicação homogénea à primeira tentativa.

#### IX. ELUIÇÃO

Pipete 14 ml de acetona e 7 ml de tolueno para o frasco que está a ser usado como câmara de eluição de CCF. Feche a câmara e misture bem. Revista a parede da câmara com papel de filtro e aguarde cerca de 15 minutos para assegurar a saturação da câmara com o vapor do solvente. Coloque, com cuidado, a placa de CCF contendo os compostos no frasco. Feche o frasco e elua a placa cromatográfica até que a frente de solvente tenha percorrido três-quartos do comprimento da placa, tendo em conta que a eluição demora cerca de 15 minutos. Remova a placa da câmara, marque a frente solvente e deixe que o excesso de solvente se evapore. Se for necessário, use a placa de aquecimento.

#### X. REVELAÇÃO

Deixe que todos os resíduos do solvente evaporem da placa cromatográfica e observe-a com luz ultravioleta de 254 nm, usando a lanterna a pilhas fornecida. Use este método de detecção para efeitos de identificação e de quantificação. Para verificação adicional da autenticidade e teor do fármaco, observe a placa à luz do dia após a coloração com iodo.

XI. CHROMATOPLATE OBSERVED UNDER UV LIGHT OF 254 NM

Run No.1: Praziquantel's upper working limit representing 100 % of total drug.

Run No.2: A drug product of good quality.

Run No. 3: A drug product of poor quality.

Run No.4: Praziquantel's lower working limit representing 80 % of total drug.

(Solvent front)

Principal spot

(Origin line)

XII. OBSERVATIONS MADE AT 254 NM

A strong blue-violet spot at a travel distance of about 0.55 indicates the presence of praziquantel in the test solution. Additional strong spots generated by the test solution would point at other drugs or praziquantel degradation, the latter case being more likely when associated with a smaller principal spot. Auxiliary agents incorporated in the different tablet or capsule formulations might cause some fainter spots emerging near or on the origin line.

XIII. OBSERVATIONS MADE AT DAYLIGHT AFTER IODINE STAINING

When exposing the chromatoplate to iodine vapour, all praziquantel spots already observed at 254 nm are now turning yellowish brown. Still observe the plate when iodine evaporates already. Spots reflecting poor quality products will disappear first gradually followed by the reference spots representing a drug content of an 80 and 100 percent, respectively.

XIV. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

The praziquantel spot in the chromatogram obtained with the test solution must correspond in terms of colour, size, intensity, shape and travel distance to that in the chromatogram obtained with the lower and higher standard solution. This result must be obtained for each method of detection. If this is not achieved, repeat the run from scratch with a second sample. Reject the batch if the drug content cannot be verified in a third run. For a second opinion, refer additional samples to a fully-fledged drug quality control laboratory. Retain samples and put the batch on quarantine until a final decision on rejection or release has been taken.

XI. PLACA CROMATOGRÁFICA OBSERVADA SOB LUZ UV DE 254 NM

1ª corrida: Concentração limite superior de trabalho de praziquantel, representando 100% do fármaco.

2ª corrida: Medicamento de boa qualidade.

3ª corrida: Medicamento de fraca qualidade.

4ª corrida: Concentração limite inferior de trabalho de praziquantel, representando 80% do fármaco.

(Frente solvente)

Mancha principal

(Linha de base)

XII. OBSERVAÇÃO A 254 NM

Uma mancha azul-violeta forte com uma distância relativa percorrida de cerca de 0,55 indica a presença de praziquantel na solução de teste. Manchas fortes adicionais formadas pela solução de teste podem indicar a presença de outros fármacos ou a degradação de praziquantel, estando este último caso associado a uma mancha principal mais pequena. Os agentes auxiliares incorporados nas diferentes formulações dos comprimidos ou cápsulas podem originar manchas mais fracas, perto da linha de base ou sobre esta.

XIII. OBSERVAÇÃO À LUZ DO DIA APÓS COLORAÇÃO COM IODO

Aquando da exposição da placa cromatográfica ao vapor de iodo, todas as manchas de praziquantel anteriormente observadas a 254 nm tornam-se amarelo-acastanhadas. Observe a placa durante a evaporação do iodo. As manchas que denunciam um produto de fraca qualidade desaparecerão em primeiro lugar, gradualmente, seguidas pelas manchas de referência que representam um teor de fármaco de 80 e 100 por cento, respectivamente.

XIV. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

A mancha de praziquantel no cromatograma obtida através da solução de teste deve corresponder, em termos de cor, tamanho, intensidade, forma e distância relativa percorrida, às manchas do cromatograma obtidas com as soluções padrão com concentração limite inferior e superior. Deve obter este resultado para cada método de detecção. Se não conseguir obter este resultado, repita o teste do início com uma segunda amostra. Se não conseguir verificar o teor do fármaco num terceiro teste, rejeite o lote. Para obter uma segunda opinião, envie outras amostras para um laboratório profissional de controlo de qualidade de medicamentos. Guarde algumas amostras e coloque o lote em quarentena até que se tome uma decisão final sobre a sua rejeição ou libertação.

## Prednisolone

### Primary Screening via Visual Inspection and Disintegration Test

#### I. VISUAL INSPECTION

Search for deficiencies on labelling, packaging and dosage forms as described in the opening chapters on general methods and operations. Write down all product particulars using the reporting form as a guide. Each tablet or capsule usually contains 5 to 25 mg of prednisolone. Other strengths are known to exist.

#### II. DISINTEGRATION TEST

All quick release prednisolone tablets and capsules must pass the disintegration test as described in the opening chapters on general methods and operations. They should disintegrate in water at 37°C in less than 30 minutes. It's a major defect if a drug product doesn't pass this test.

#### III. RESULTS AND ACTIONS TO BE TAKEN

Drug products from unusually cheap sources, drug products with missing or incorrect accompanying documents and drug products with defective dosage forms, packaging or with incomplete, damaged or missing labels or with labels written in a foreign language should be subjected to a thin layer chromatographic test.

### Verification of Drug Identity and Content via Thin Layer Chromatography

#### I. PRINCIPLE

Prednisolone is extracted from tablets and capsules with methanol and determined by TLC with reference to an authentic secondary standard.

#### II. EQUIPMENT AND REAGENTS

- 1 Pestle
- 2 Aluminium foil
- 3 Funnel
- 4 Label tape
- 5 Marker pen
- 6 Pencil
- 7 10-ml vials
- 8 Set of straight pipettes (1 to 25 ml)
- 9 Set of laboratory glass bottles (25 to 100 ml)
- 10 Merck TLC aluminium plates pre-coated with silica gel 60 F 254, size 5x10 cm
- 11 Glass microcapillaries (2- $\mu$ l filling capacity)
- 12 TLC developing chamber (500-ml jar)
- 13 Hot plate
- 14 Filter paper
- 15 Pair of scissors
- 16 UV light of 254 nm
- 17 Ethyl acetate
- 18 Methanol
- 19 Toluene
- 20 Secondary reference standard, for example, prednisolone 5 mg tablets

## **Prednisolona**

Triagem Primária com Inspeção Visual e Teste de Desagregação

### **I. INSPECÇÃO VISUAL**

Procure deficiências na rotulagem, embalagem e as formas de dosagem, tal como descrito nos capítulos iniciais sobre os métodos e procedimentos gerais. Registe todos os pormenores do produto, usando os formulários para relatório como orientação. Cada comprimido ou cápsula normalmente contém 5 a 25 mg de prednisolona. Sabe-se que existem outras dosagens.

### **II. TESTE DE DESAGREGAÇÃO**

Todos os comprimidos de prednisolona de libertação rápida devem passar o teste de desagregação, tal como se descreve nos capítulos iniciais sobre métodos e procedimentos gerais. Devem desagregar-se em água a 37 ° C em menos de 30 minutos. Se o fármaco não passar este teste, constitui um defeito importante.

### **III. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR**

Produtos farmacêuticos a preços invulgarmente baratos, medicamentos com documentos de apoio em falta ou incorrectos e medicamentos com formas de dosagem irregulares, embalagens deficientes ou rótulos incompletos, danificados ou ausentes ou com rótulos escritos em língua estrangeira, devem ser submetidos a um teste cromatográfico em camada fina.

Verificação da Identidade e Teor do Fármaco através da Cromatografia em Camada Fina

### **I. PRINCÍPIO**

A prednisolona é extraída de comprimidos e cápsulas com metanol e determinada por CCF, tendo em conta os padrões secundários de referência.

### **II. EQUIPAMENTO E REAGENTES**

- 1 Pilão
- 2 Folha de alumínio
- 3 Funil
- 4 Fita adesiva
- 5 Marcador
- 6 Lápis
- 7 Frascos de 10 ml
- 8 Conjunto de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
- 9 Conjunto de frascos de vidro de laboratório (25 a 100 ml)
- 10 Placas de alumínio de CCF da Merck previamente revestidas de gel de sílica 60 F 254, tamanho 5x10 cm
- 11 Microcapilares de vidro (capacidade de 2 µl)
- 12 Câmara de eluição de CCF (frasco de 500 ml)
- 13 Placa de aquecimento
- 14 Papel de filtro
- 15 Tesoura
- 16 Luz ultravioleta de 254 nm
- 17 Acetato de etilo
- 18 Metanol
- 19 Tolueno
- 20 Padrão secundário de referência, por exemplo comprimidos de prednisolona de 5 mg

### III. PREPARATION OF THE STOCK STANDARD SOLUTION

The preparation of the stock standard solution requires an authentic drug product for reference purposes, for example, tablets containing 5 mg of prednisolone. Wrap up five (!) reference tablets into aluminium foil and crush them down to a fine powder using a pestle. Carefully empty the aluminium foil over a 25-ml laboratory glass bottle and wash down all residual solids with 10 ml of methanol using a straight pipette. Close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 2.5 mg of total drug per ml and be labelled as '*Prednisolone Stock Standard Solution*'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquid.

### IV. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 100% (UPPER WORKING LIMIT)

The prednisolone stock standard solution requires no further dilution. It already represents the final working concentration of 2.5 mg of total drug per ml. Just for more convenient handling, some of the supernatant liquid may want to be transferred into a 10-ml vial.

This higher working standard solution represents a drug product of good quality containing 100 % of prednisolone.

### V. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 80% (LOWER WORKING LIMIT)

Pipette 4 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 1 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 2.0 mg of total drug per ml and be labelled as '*Prednisolone Working Standard Solution 80%*'.

This lower working standard solution represents a drug product of poor quality containing just 80% of the amount of prednisolone as stated on the product's label. In the current investigation, this drug level represents the lower acceptable limit for a given product.

### VI. PREPARATION OF THE STOCK SAMPLE SOLUTION FROM A PRODUCT CLAIMING TO CONTAIN 5 MG OF PREDNISOLONE PER UNIT

Take five (!) whole tablets or capsules from an appropriate drug product sampled in the field. As usual, tablets are wrapped up into aluminium foil and crushed down to a fine powder. Transfer all the powder obtained into a 25-ml laboratory glass bottle. Powder obtained from sample capsules should be transferred directly into the bottle adding the cap and body shells last. For extraction, add 10 ml of methanol using a straight pipette, close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid.

#### 10 MG OF PREDNISOLONE PER UNIT

Take two (!) whole sample tablets or capsules and extract the powder obtained with 8 ml of methanol using a straight pipette and a 25-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

#### 25 MG OF PREDNISOLONE PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 10 ml of methanol using a straight pipette and a 25-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

All stock sample solutions produced should finally contain 2.5 mg of total drug per ml and be labelled as '*Prednisolone Stock Sample Solution*'. Freshly prepare these solutions for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquids.

### III. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DO PADRÃO

A preparação da solução stock do padrão requer um medicamento autêntico para servir de referência, por exemplo comprimidos de 5 mg de prednisolona. Embrulhe cinco (!) comprimidos de referência em folha de alumínio e esmague-os, até ficarem em pó fino, usando o pilão. Transfira, cuidadosamente, o conteúdo da folha de alumínio para um frasco de vidro de laboratório de 25 ml e lave o resto dos resíduos sólidos com 10 ml de metanol com uma pipeta graduada. Feche o frasco e agite durante cerca de três minutos, até que a maior parte dos sólidos se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos que não se dissolveram se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter o fármaco numa concentração total de 2,5 mg por ml e ser rotulada como "*Solução Stock do Padrão de Prednisolona*". Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante, límpido ou turvo.

### IV. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 100% (CONCENTRAÇÃO LIMITE SUPERIOR DE TRABALHO)

A solução stock do padrão de prednisolona não requer diluição adicional. Já contem a concentração final eficaz de 2,5 mg de fármaco por ml. Para facilitar o manuseamento desta solução, transfira uma porção do líquido sobrenadante para um frasco de 10 ml.

Esta solução padrão com concentração limite superior de trabalho representa um medicamento de alta qualidade que contém 100% de prednisolona.

### V. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 80% (CONCENTRAÇÃO LIMITE MÍNIMO DE TRABALHO)

Pipete 4 ml da solução stock do padrão para um frasco de 10 ml e adicione 1 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter o fármaco numa concentração total de 2,0 mg por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Prednisolona a 80%*".

Esta solução padrão de trabalho com concentração limite inferior representa num medicamento de fraca qualidade e contém apenas 80% da prednisolona referida no rótulo do produto. Nesta investigação, este nível de fármaco representa o limite mínimo aceitável para tal produto.

### VI. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DE AMOSTRA DE UM PRODUTO DITO CONTER 5 MG DE PREDNISOLONA POR UNIDADE

Retire cinco (!) comprimidos ou cápsulas de uma amostra do produto. Como anteriormente, os comprimidos devem ser embrulhados numa folha de alumínio e esmagados até ficarem em pó fino. Transfira todo o pó obtido para um frasco de vidro de laboratório de 25 ml. Deve transferir directamente para o frasco o pó obtido de uma cápsula, adicionando, de seguida, o invólucro. Para proceder à extracção, adicione 10 ml de metanol, usando uma pipeta graduada, feche o frasco e agite-o durante cerca de três minutos, até que a maior parte dos sólidos se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos que não se dissolveram se depositem no fundo do frasco.

#### 10 MG DE PREDNISOLONA POR UNIDADE

Retire dois (!) comprimidos ou cápsulas e extraia o pó obtido com 8 ml de metanol, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 25 ml, como recipiente para amostras. Continue como indicado anteriormente.

#### 25 MG DE PREDNISOLONA POR UNIDADE

Extraia o pó obtido da amostra de um comprimido ou de uma cápsula com 10 ml de metanol, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 25 ml, como recipiente para amostras. Continue como indicado anteriormente.

Todas as soluções stock de amostra preparadas devem, no fim do procedimento, ter uma concentração total de fármaco de 2,5 mg por ml e serem rotuladas como "*Solução Stock da Amostra de Prednisolona*". Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a usar os líquidos sobrenadantes límpidos ou turvos.

#### VII. PREPARATION OF THE WORKING SAMPLE SOLUTION

Prednisolone stock sample solutions require no further dilution. They already represent the final working concentration of 2.5 mg of total drug per ml.

If prepared from a high quality product, the sample solution should match the concentration of prednisolone of the higher working standard solution produced above.

#### VIII. SPOTTING

Mark an origin line parallel to and about 1.5 cm from the bottom edge of the chromatoplate and apply 2 µl of each test and standard solution as shown in the picture opposite using the microcapillary pipettes supplied.

Up to five spots can be placed on a plate. Check the uniformity of all spots using UV light of 254 nm. All spots should be circular in shape and equally spaced across the origin line. Although their intensities might differ, their diameters never should. Different intensities are due to residual amounts of tablet and capsule excipients or different drug concentrations in the sample solutions. A difference in spot size, however, relates to poor spotting. Repeat this step if homogeneous spotting is not achieved first time.

#### IX. DEVELOPMENT

Pipette 15 ml of ethyl acetate, 5 ml of toluene and 3 ml of methanol into the jar being used as TLC developing chamber. Close the chamber and mix thoroughly. Line the chamber's wall with filter paper and wait for about 15 minutes thus ensuring saturation of the chamber with solvent vapour. Carefully place the loaded TLC plate into the jar. Close the jar and develop the chromatoplate until the solvent front has moved about three-quarters of the length of the plate, the developing time being about 20 minutes. Remove the plate from the chamber, mark the solvent front and allow any excess solvent to evaporate using a hot plate if necessary.

#### X. DETECTION

Dry off all residual solvent and observe the chromatoplate under UV light of 254 nm using the battery-driven lamp supplied. Use this method of detection for both, identification and quantification purposes.



#### VII. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AMOSTRA DE TRABALHO

As soluções stock de amostra de prednisolona não requerem diluição adicional. Já contêm a concentração final eficaz de 2,5 mg de fármaco por ml.

Se preparada a partir de um produto de alta qualidade, a solução de amostra deve conter o fármaco numa concentração total igual à concentração de prednisolona na solução padrão de trabalho com concentração limite superior produzida anteriormente.

#### VIII. APLICAÇÃO

Trace uma linha paralela à base da placa cromatográfica, a cerca de 1,5 cm da base, e aplique 2 µl de cada solução, de padrão e de teste, como ilustrado na figura do lado oposto, usando os microcapilares de vidro fornecidos.

Podem ser aplicadas cinco manchas numa placa. Confirme a uniformidade das manchas através da luz ultravioleta de 254 nm. Todas as manchas devem ser circulares e separadas entre si por uma distância igual ao longo da linha de base. Apesar de as suas intensidades poderem diferir, o seu diâmetro deve ser sempre igual. As diferentes intensidades devem-se a diferentes quantidades residuais de excipientes dos comprimidos e cápsulas ou devido a diferentes concentrações do fármaco na solução da amostra. Porém, se as manchas apresentarem um tamanho diferente deve-se a uma incorrecta técnica de aplicação. Repita este passo, se não conseguir uma aplicação homogénea à primeira tentativa.

#### IX. ELUIÇÃO

Pipete 15 ml de acetato de etilo, 5 ml de tolueno e 3 ml de metanol para o frasco que está a ser usado como câmara de eluição de CCF. Feche a câmara e misture bem. Revista a parede da câmara com papel de filtro e aguarde cerca de 15 minutos para assegurar a saturação da câmara com o vapor do solvente. Coloque, com cuidado, a placa de CCF contendo os compostos no frasco. Feche o frasco e elua a placa cromatográfica até que a frente de solvente tenha percorrido três-quartos do comprimento da placa, tendo em conta que a eluição demora cerca de 20 minutos. Remova a placa da câmara, marque a frente solvente e deixe que o excesso de solvente se evapore. Se for necessário, use a placa de aquecimento.

#### X. REVELAÇÃO

Deixe que todos os resíduos do solvente evaporem da placa cromatográfica e observe-a com luz ultravioleta de 254 nm, usando a lanterna a pilhas fornecida. Use este método de detecção para efeitos de identificação e de quantificação.

XI. CHROMATOPLATE OBSERVED UNDER UV LIGHT OF 254 NM

Run No.1: Prednisolone's upper working limit representing 100% of total drug.

Run No.2: A drug product of good quality.

Run No.3: A drug product of poor quality.

Run No.4: Prednisolone's lower working limit representing 80% of total drug.

(Solvent front)

Satellite spot

Principal spot

(Origin line)

XII. OBSERVATIONS MADE AT 254 NM

A strong blue-violet spot at a travel distance of about 0.49 indicates the presence of prednisolone in the test solution. Sometimes a very faint second spot might emerge at a travel distance of about 0.59 representing prednisolone acetate. Additional strong spots generated by the test solution would point at other drugs or prednisolone degradation, the latter case being more likely when associated with a smaller principal spot. Auxiliary agents incorporated in the different tablet or capsule formulations might cause some fainter spots emerging near or on the origin line.

XIII. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

The prednisolone spot in the chromatogram obtained with the test solution must correspond in terms of colour, size, intensity, shape and travel distance to that in the chromatogram obtained with the lower and higher standard solution. This result must be obtained for each method of detection. If this is not achieved, repeat the run from scratch with a second sample. Reject the batch if the drug content cannot be verified in a third run. For a second opinion, refer additional samples to a fully-fledged drug quality control laboratory. Retain samples and put the batch on quarantine until a final decision on rejection or release has been taken.

XI. PLACA CROMATOGRÁFICA OBSERVADA SOB LUZ UV DE 254 NM

1ª corrida: Concentração limite superior de trabalho de prednisolona, representando 100% do fármaco.

2ª corrida: Medicamento de boa qualidade.

3ª corrida: Medicamento de fraca qualidade.

4ª corrida: Concentração limite inferior de trabalho de prednisolona, representando 80% do fármaco.

(Frente solvente)

Mancha satélite / secundária

Mancha principal

(Linha de base)

XII. OBSERVAÇÃO A 254 NM

Uma mancha azul-violeta forte com uma distância relativa percorrida de cerca de 0,49 indica a presença de prednisolona na solução de teste. Por vezes, uma segunda mancha pouco forte poderá surgir a uma distância relativa percorrida de cerca de 0,59 indicando a presença de acetato de prednisolona. Manchas fortes adicionais formadas pela solução de teste podem indicar a presença de outros fármacos ou a degradação de prednisolona, estando este último caso associado a uma mancha principal mais pequena. Os agentes auxiliares incorporados nas diferentes formulações dos comprimidos ou cápsulas podem originar manchas mais fracas, perto da linha de base ou sobre esta.

XIII. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

A mancha de prednisolona no cromatograma obtida através da solução de teste deve corresponder, em termos de cor, tamanho, intensidade, forma e distância relativa percorrida, às manchas do cromatograma obtidas com as soluções padrão com concentração limite inferior e superior. Deve obter este resultado para cada método de detecção. Se não conseguir obter este resultado, repita o teste do início com uma segunda amostra. Se não conseguir verificar o teor do fármaco num terceiro teste, rejeite o lote. Para obter uma segunda opinião, envie outras amostras para um laboratório profissional de controlo de qualidade de medicamentos. Guarde algumas amostras e coloque o lote em quarentena até que se tome uma decisão final sobre a sua rejeição ou libertação.

### Primaquine (as diphosphate)

Primary Screening via Visual Inspection and Disintegration Test

#### I. VISUAL INSPECTION

Search for deficiencies on labelling, packaging and dosage forms as described in the opening chapters on general methods and operations. Write down all product particulars using the reporting form as a guide. Each tablet or capsule usually contains about 8.75, 13.15 or 26.3 mg of primaquine diphosphate. This translates into the customarily expressed label claims of 5, 7.5 or 15 mg of primaquine free base, respectively. The content of a capsule or the broken section of a tablet must be orange-brown.

#### II. DISINTEGRATION TEST

All quick release primaquine tablets and capsules must pass the disintegration test as described in the opening chapters on general methods and operations. They should disintegrate in water at 37 ° C in less than 30 minutes. It is a major defect if a drug product does not pass this test.

#### III. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

Drug products from unusually cheap sources, drug products with missing or incorrect accompanying documents and drug products with defective dosage forms, packaging or with incomplete, damaged or missing labels or with labels written in a foreign language should be subjected to a thin layer chromatographic test.

### Verification of Drug Identity and Content via Thin Layer Chromatography

#### I. PRINCIPLE

Primaquine phosphate is extracted from tablets and capsules with water and determined by TLC with reference to an authentic secondary standard.

#### II. EQUIPMENT AND REAGENTS

- 1 Pestle
- 2 Aluminium foil
- 3 Funnel
- 4 Label tape
- 5 Marker pen
- 6 Pencil
- 7 10-ml vials
- 8 Set of straight pipettes (1 to 25 ml)
- 9 Set of laboratory glass bottles (25 to 100 ml)
- 10 Merck TLC aluminium plates pre-coated with silica gel 60 F 254, size 5x10 cm
- 11 Glass microcapillaries (2- $\mu$ l filling capacity)
- 12 TLC developing chamber (500-ml jar)
- 13 Hot plate
- 14 Filter paper
- 15 Pair of scissors
- 16 UV light of 254 nm
- 17 Ethyl acetate
- 18 Methanol
- 19 Water
- 20 Ammonia solution 25%
- 21 Secondary reference standard, for example, primaquine 15 mg tablets

### Primaquina (como difosfato)

Triagem Primária com Inspeção Visual e Teste de Desagregação

#### I. INSPEÇÃO VISUAL

Procure deficiências na rotulagem, embalagem e as formas de dosagem, tal como descrito nos capítulos iniciais sobre os métodos e procedimentos gerais. Registe todos os pormenores do produto, usando os formulários para relatório como orientação. Cada comprimido ou cápsula normalmente contém cerca de 8,75, 13,15 ou 26,3 mg de difosfato de primaquina. Tal corresponde às dosagens de 5, 7,5 ou 15 mg, respectivamente, que comumente surgem nas embalagens e que se referem apenas à base primaquina. O conteúdo de uma cápsula ou a parte interna de um comprimido devem ser laranja-acastanhados.

#### II. TESTE DE DESAGREGAÇÃO

Todos os comprimidos de primaquina de libertação rápida devem passar o teste de desagregação, tal como se descreve nos capítulos iniciais sobre métodos e procedimentos gerais. Devem desagregar-se em água a 37 ° C em menos de 30 minutos. Se o fármaco não passar este teste, constitui um defeito importante.

#### III. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

Produtos farmacêuticos a preços invulgarmente baratos, medicamentos com documentos de apoio em falta ou incorrectos e medicamentos com formas de dosagem irregulares, embalagens deficientes ou rótulos incompletos, danificados ou ausentes ou com rótulos escritos em língua estrangeira, devem ser submetidos a um teste cromatográfico em camada fina.

Verificação da Identidade e Teor do Fármaco através da Cromatografia de Camada Fina

#### I. PRINCÍPIO

O fosfato de primaquina é extraído de comprimidos e cápsulas com água e determinado por CCF, tendo em conta os padrões secundários de referência.

#### II. EQUIPAMENTO E REAGENTES

- 1 Pilão
- 2 Folha de alumínio
- 3 Funil
- 4 Fita adesiva
- 5 Marcador
- 6 Lápis
- 7 Frascos de 10 ml
- 8 Conjunto de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
- 9 Conjunto de frascos de vidro de laboratório (25 a 100 ml)
- 10 Placas de alumínio de CCF da Merck previamente revestidas de gel de sílica 60F 254, tamanho 5x10 cm
- 11 Microcapilares de vidro (capacidade de 2 µl)
- 12 Câmara de eluição de CCF (frasco de 500 ml)
- 13 Placa de aquecimento
- 14 Papel de filtro
- 15 Tesoura
- 16 Luz ultravioleta de 254 nm
- 17 Acetato de etilo
- 18 Metanol
- 19 Água
- 20 Solução de amoníaco a 25%
- 21 Padrão secundário de referência, por exemplo comprimidos de primaquina de 15 mg

### III. PREPARATION OF THE STOCK STANDARD SOLUTION

The preparation of the stock standard solution requires an authentic drug product for reference purposes, for example, tablets containing 15 mg of primaquine. Wrap up one reference tablet into aluminium foil and crush it down to a fine powder using a pestle. Carefully empty the aluminium foil over a 25-ml laboratory glass bottle and wash down all residual solids with 15 ml of water using a straight pipette. Close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 1 mg of total drug per ml and be labelled as '*Primaquine Stock Standard Solution*'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the hazy supernatant liquid.

### IV. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 100% (UPPER WORKING LIMIT)

The primaquine stock standard solution requires no further dilution. It already represents the final working concentration of 1 mg of total drug per ml. Just for more convenient handling, some of the supernatant liquid may want to be transferred into a 10-ml vial.

This higher working standard solution represents a drug product of good quality containing 100 % of primaquine.

### V. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 80% (LOWER WORKING LIMIT)

Pipette 4 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 1 ml of water. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 0.8 mg of total drug per ml and be labelled as '*Primaquine Working Standard Solution 80%*'.

This lower working standard solution represents a drug product of poor quality containing just 80% of the amount of primaquine as stated on the product's label. In the current investigation, this drug level represents the lower acceptable limit for a given product.

### VI. PREPARATION OF THE STOCK SAMPLE SOLUTION FROM A PRODUCT CLAIMING TO CONTAIN 5 MG OF PRIMAQUINE PER UNIT

Take three (!) whole tablets or capsules from an appropriate drug product sampled in the field. As usual, tablets are wrapped up into aluminium foil and crushed down to a fine powder. Transfer all the powder obtained into a 25-ml laboratory glass bottle. Powder obtained from sample capsules should be transferred directly into the bottle adding the cap and body shells last. For extraction, add 15 ml of water using a straight pipette, close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid.

#### 7.5 MG OF PRIMAQUINE PER UNIT

Take two (!) whole sample tablets or capsules and extract the powder obtained with 15 ml of water using a straight pipette and a 25-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

#### 15 MG OF PRIMAQUINE PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 15 ml of water using a straight pipette and a 25-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

All stock sample solutions produced should finally contain 1 mg of total drug per ml and be labelled as '*Primaquine Stock Sample Solution*'. Freshly prepare these solutions for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquids.

### III. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DO PADRÃO

A preparação da solução stock do padrão requer um medicamento autêntico para servir de referência, por exemplo comprimidos de 15 mg de primaquina. Embrulhe um comprimido de referência em folha de alumínio e esmague-o, até ficar em pó fino, usando o pilão. Transfira, cuidadosamente, o conteúdo da folha de alumínio para um frasco de vidro de laboratório de 25 ml e lave o resto dos resíduos sólidos com 15 ml de água com uma pipeta graduada. Feche o frasco e agite-o durante cerca de três minutos, até que a maior parte dos sólidos se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos que não se dissolveram se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter o fármaco numa concentração total de 1 mg por ml e ser rotulada como "*Solução Stock do Padrão de Primaquina*". Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante turvo.

### IV. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 100% (CONCENTRAÇÃO LIMITE SUPERIOR DE TRABALHO)

A solução padrão de primaquina não requer diluição adicional. Já contém a concentração final eficaz de 1 mg de fármaco por ml. Para facilitar o manuseamento desta solução, transfira uma porção do líquido sobrenadante para um frasco de 10 ml.

Esta solução padrão de trabalho com concentração limite superior representa um medicamento de alta qualidade que contém 100% de primaquina.

### V. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 80% (CONCENTRAÇÃO LIMITE MÍNIMO DE TRABALHO)

Pipete 4 ml da solução padrão para um frasco de 10 ml e adicione 1 ml de água. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter o fármaco numa concentração total de 0,8 mg por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Primaquina a 80%*".

Esta solução padrão de trabalho com concentração limite inferior representa um medicamento de fraca qualidade e contém apenas 80% da primaquina referida no rótulo do produto. Nesta investigação, este nível de fármaco representa o limite mínimo aceitável para tal produto.

### VI. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DE AMOSTRA DE UM PRODUTO DITO CONTER 5 MG DE PRIMAQUINA POR UNIDADE

Retire três (!) comprimidos ou cápsulas de uma amostra do produto. Como anteriormente, os comprimidos devem ser embrulhados numa folha de alumínio e esmagados até ficarem em pó fino. Transfira todo o pó obtido para um frasco de vidro de laboratório de 25 ml. Deve transferir directamente para o frasco o pó obtido de uma cápsula, adicionando, de seguida, o invólucro. Para proceder à extracção, adicione 15 ml de água, usando uma pipeta graduada, feche o frasco e agite-o durante cerca de três minutos, até que a maior parte dos sólidos se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos que não se dissolveram se depositem no fundo do frasco.

#### 7,5 MG DE PRIMAQUINA POR UNIDADE

Retire dois (!) comprimidos ou cápsulas e extraia o pó obtido com 15 ml de água, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 25 ml, como recipiente para amostras. Continue como indicado anteriormente.

#### 15 MG DE PRIMAQUINA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula e extraia o pó obtido com 15 ml de água, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 25 ml, como recipiente para amostras. Continue como indicado anteriormente.

Todas as soluções stock da amostra preparadas devem, no fim do procedimento, ter uma concentração total de 1 mg de fármaco por ml e serem rotuladas como "*Solução Stock da Amostra de Primaquina*". Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a usar os líquidos sobrenadantes límpidos ou turvos.

#### VII. PREPARATION OF THE WORKING SAMPLE SOLUTION

Primaquine stock sample solutions require no further dilution. They already represent the final working concentration of 1 mg of total drug per ml. If prepared from a high quality product, the sample solution should match the concentration of primaquine of the higher working standard solution produced above.

#### VIII. SPOTTING

Mark an origin line parallel to and about 1.5 cm from the bottom edge of the chromatoplate and apply 2 µl of each test and standard solution as shown in the picture opposite using the microcapillary pipettes supplied.

Up to five spots can be placed on a plate. Check the uniformity of all spots using the UV light of 254 nm. All spots should be circular in shape and equally spaced across the origin line. Although their intensities might differ, their diameters never should. Different intensities are due to residual amounts of tablet and capsule excipients or different drug concentrations in the sample solutions. A difference in spot size, however, relates to poor spotting. Repeat this step if homogeneous spotting is not achieved first time.

Note that filling the microcapillary pipettes might take some time when handling aqueous sample solutions. As traces of water are causing spot tailing, completely dry off all extraction solvent before chromatoplate development using the hot plate supplied.

#### IX. DEVELOPMENT

Pipette 20 ml of methanol, 5 ml of ethyl acetate and 0.5 ml of concentrated ammonia solution into the jar being used as TLC developing chamber. Close the chamber and mix thoroughly. Line the chamber's wall with filter paper and wait for about 15 minutes thus ensuring saturation of the chamber with solvent vapour. Carefully place the loaded TLC plate into the jar. Close the jar and develop the chromatoplate until the solvent front has moved about three-quarters of the length of the plate, the developing time being about 20 minutes. Remove the plate from the chamber, mark the solvent front and allow any excess solvent to evaporate using a hot plate if necessary.

#### X. DETECTION

Dry off all residual solvent and observe the chromatoplate under UV light of 254 nm using the battery-driven lamp supplied. Use this method of detection for both, identification and quantification purposes. Due to a light induced colour change, further verification of drug identity and content can be achieved when observing the plate at daylight after about two hours again.



#### VII. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AMOSTRA DE TRABALHO

As soluções stock da amostra de primaquina não requerem diluição adicional. Já contêm a concentração final eficaz de 1 mg de fármaco por ml. Se preparada a partir de um produto de alta qualidade, a solução de amostra deve ter uma concentração de primaquina igual à da solução padrão de trabalho com concentração limite superior produzida anteriormente.

#### VIII. APLICAÇÃO

Trace uma linha paralela à base da placa cromatográfica, a cerca de 1,5 cm da base, e aplique 2 µl de cada solução, de padrão e de teste, como ilustrado na figura do lado oposto, usando os microcapilares de vidro fornecidos.

Podem ser aplicadas cinco manchas numa placa. Confirme a uniformidade de todas as manchas através da luz ultravioleta de 254 nm. Todas as manchas devem ser circulares e separadas entre si por uma distância igual ao longo da linha de base. Apesar de as suas intensidades poderem diferir, o seu diâmetro deve ser sempre igual. As diferentes intensidades devem-se a diferentes quantidades residuais de excipientes dos comprimidos e cápsulas ou devido a diferentes concentrações do fármaco na solução de amostra. Porém, se as manchas apresentarem um tamanho diferente deve-se a uma incorrecta técnica de aplicação. Repita este passo, se não conseguir uma aplicação homogénea à primeira tentativa.

Tenha em conta que encher as pipetas microcapilares pode demorar algum tempo aquando da utilização de soluções de amostra aquosas. Para evitar que resíduos de água originem manchas arrastadas, utilize a placa de aquecimento fornecida para secar o solvente de extracção antes da revelação da placa cromatográfica.

#### IX. ELUIÇÃO

Pipete 20 ml de metanol, 5 ml de acetato de etilo e 0,5 ml da solução concentrada de amoníaco para o frasco que está a ser usado como câmara de eluição de CCF. Feche a câmara e misture bem. Revista a parede da câmara com papel de filtro e aguarde cerca de 15 minutos para assegurar a saturação da câmara com o vapor do solvente. Coloque, com cuidado, a placa de CCF contendo os compostos no frasco. Feche o frasco e elua a placa cromatográfica até que a frente de solvente tenha percorrido três-quartos do comprimento da placa, tendo em conta que a eluição demora cerca de 20 minutos. Remova a placa da câmara, marque a frente solvente e deixe que o excesso de solvente se evapore. Se for necessário, use a placa de aquecimento.

#### X. REVELAÇÃO

Deixe que todos os resíduos do solvente evaporem da placa cromatográfica e observe-a com luz ultravioleta de 254 nm, usando a lanterna a pilhas fornecida. Use este método de detecção para efeitos de identificação e de quantificação. Devido à alteração de cor induzida pela exposição à luz, poderá proceder a uma verificação adicional da autenticidade e teor do fármaco, após duas horas, através de uma segunda observação da placa à luz do dia.

XI. CHROMATOPLATE OBSERVED UNDER UV LIGHT OF 254 NM

Run No.1: Primaquine's upper working limit representing 100% of total drug.

Run No.2: A drug product of good quality.

Run No.3: A drug product of poor quality.

Run No.4: Primaquine's lower working limit representing 80% of total drug.

(Solvent front)

Primaquine's satellite spot

Primaquine's principal spot

(Origin line)

XII. OBSERVATIONS MADE AT 254 NM

A strong blue-violet spot at a travel distance of about 0.21 combined with a smaller satellite spot just above the principal spot indicates the presence of primaquine in the test solution. Additional strong spots generated by the test solution would point at other drugs or even primaquine degradation, the latter case being more likely when associated with a smaller principal spot. Auxiliary agents incorporated in the different tablet or capsule formulations might cause some fainter spots emerging near or on the origin line.

XIII. OBSERVATIONS MADE AT DAYLIGHT AFTER ABOUT TWO HOURS

Due to a light induced degradation process, all primaquine principal spots already observed at 254 nm are now turning yellowish orange. This change of colour from white and invisible to yellowish and visible within a few hours makes primaquine very distinguishable from similar antimalarial compounds, for example chloroquine and amodiaquine.

XIV. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

The primaquine spot in the chromatogram obtained with the test solution must correspond in terms of colour, size, intensity, shape and travel distance to that in the chromatogram obtained with the lower and higher standard solution. This result must be obtained for each method of detection. If this is not achieved, repeat the run from scratch with a second sample. Reject the batch if the drug content cannot be verified in a third run. For a second opinion, refer additional samples to a fully-fledged drug quality control laboratory. Retain samples and put the batch on quarantine until a final decision on rejection or release has been taken.

#### XI. PLACA CROMATOGRÁFICA OBSERVADA SOB LUZ UV DE 254 NM

1ª corrida: Concentração limite superior de trabalho de primaquina, representando 100% do fármaco.

2ª corrida: Medicamento de boa qualidade.

3ª corrida: Medicamento de fraca qualidade.

4ª corrida: Concentração limite inferior de trabalho de primaquina, representando 80% do fármaco.

(Frente solvente)

Mancha satélite / secundária de primaquina

Mancha principal de primaquina

(Linha de base)

#### XII. OBSERVAÇÃO A 254 NM

Uma mancha azul-violeta forte com uma distância relativa percorrida de cerca de 0,21 combinada com uma mancha secundária/satélite mais pequena, situada imediatamente acima da mancha principal, indica a presença de primaquina na solução de teste. Manchas fortes adicionais formadas pela solução de teste podem indicar a presença de outros fármacos ou a degradação de primaquina, estando este último caso associado a uma mancha principal mais pequena. Os agentes auxiliares incorporados nas diferentes formulações dos comprimidos ou cápsulas podem originar manchas mais fracas, perto da linha de base ou sobre esta.

#### XIII. OBSERVAÇÃO À LUZ DO DIA APÓS CERCA DE DUAS HORAS

Devido a um processo de degradação induzido pela exposição à luz, todas as manchas principais de primaquina, anteriormente observadas a 254 nm, tornam-se agora amarelo-alaranjadas. Esta alteração de cor, de amarelo e invisível para amarelado e visível, sucedida em poucas horas, torna a primaquina bastante diferenciada de outros compostos antimaláricos, como por exemplo a cloroquina e a amodiaquina.

#### XIV. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

A mancha de primaquina no cromatograma obtida através da solução de teste deve corresponder, em termos de cor, tamanho, intensidade, forma e distância relativa percorrida, às manchas do cromatograma obtidas com as soluções padrão com concentração limite inferior e superior. Deve obter este resultado para cada método de detecção. Se não conseguir obter este resultado, repita o teste do início com uma segunda amostra. Se não conseguir verificar o teor do fármaco num terceiro teste, rejeite o lote. Para obter uma segunda opinião, envie outras amostras para um laboratório profissional de controlo de qualidade de medicamentos. Guarde algumas amostras e coloque o lote em quarentena até que se tome uma decisão final sobre a sua rejeição ou libertação.

### Pyrazinamide (including fixed-dose combinations)

Primary Screening via Visual Inspection and Disintegration Test

#### I. VISUAL INSPECTION

Search for deficiencies on labelling, packaging and dosage forms as described in the opening chapters on general methods and operations. Write down all product particulars using the reporting form as a guide. Each tablet or capsule usually contains 400 or 500 mg of pyrazinamide.

Dosage strengths of a 100 to 300 mg of pyrazinamide are known to exist in particular in fixed-dose combinations with other antituberculosis medicines.

#### II. DISINTEGRATION TEST

All quick release pyrazinamide tablets and capsules must pass the disintegration test as described in the opening chapters on general methods and operations. They should disintegrate in water at 37 °C in less than 30 minutes. It's a major defect if a drug product doesn't pass this test.

#### III. RESULTS AND ACTIONS TO BE TAKEN

Drug products from unusually cheap sources, drug products with missing or incorrect accompanying documents and drug products with defective dosage forms, packaging or with incomplete, damaged or missing labels or with labels written in a foreign language should be subjected to a thin layer chromatographic test.

### Verification of Drug Identity and Content via Thin Layer Chromatography

#### I. PRINCIPLE

Pyrazinamide is extracted from tablets and capsules with methanol and determined by TLC with reference to an authentic secondary standard. When combined with other antituberculosis drugs, all compounds can be extracted and analysed simultaneously.

#### II. EQUIPMENT AND REAGENTS

- 1 Pestle
- 2 Aluminium foil
- 3 Funnel
- 4 Label tape
- 5 Marker pen
- 6 Pencil
- 7 10-ml vials
- 8 Set of straight pipettes (1 to 25 ml)
- 9 Set of laboratory glass bottles (25 to 100 ml)
- 10 Merck TLC aluminium plates pre-coated with silica gel 60 F 254, size 5x10 cm
- 11 Glass microcapillaries (2- $\mu$ l filling capacity)
- 12 TLC developing chamber (500-ml jar)
- 13 Hot plate
- 14 Filter paper
- 15 Pair of scissors

### **Pirazinamida (incluindo produtos com combinações de doses fixas)**

Triagem Primária com Inspeção Visual e Teste de Desagregação

#### **I. INSPECÇÃO VISUAL**

Procure deficiências na rotulagem, embalagem e nas formas de dosagem, tal como descrito nos capítulos iniciais sobre os métodos e procedimentos gerais. Registe todos os pormenores do produto, usando os formulários para relatório como orientação. Cada comprimido ou cápsula normalmente contém 400 ou 500 mg de pirazinamida.

Sabe-se existir formas de dosagem de pirazinamida de 100 a 300 mg, particularmente em combinações de doses fixas com outros medicamentos antituberculosos.

#### **II. TESTE DE DESAGREGAÇÃO**

Todos os comprimidos de pirazinamida de libertação rápida devem passar o teste de desagregação, tal como se descreve nos capítulos iniciais sobre métodos e procedimentos gerais. Devem desagregar-se em água a 37 ° C em menos de 30 minutos. Se o fármaco não passar este teste, constitui um defeito importante.

#### **III. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR**

Produtos farmacêuticos a preços invulgarmente baratos, medicamentos com documentos de apoio em falta ou incorrectos e medicamentos com formas de dosagem irregulares, embalagens deficientes ou rótulos incompletos, danificados ou ausentes ou com rótulos escritos em língua estrangeira, devem ser submetidos a um teste cromatográfico em camada fina.

Verificação da Identidade e Teor do Fármaco através da Cromatografia em Camada Fina

#### **I. PRINCÍPIO**

A pirazinamida é extraída de comprimidos e cápsulas com metanol e determinada por CCF, tendo em conta os padrões secundários de referência. Quando a pirazinamida é associada a outros fármacos antituberculosos, todos os compostos podem ser simultaneamente extraídos e analisados.

#### **II. EQUIPAMENTO E REAGENTES**

- 1 Pilão
- 2 Folha de alumínio
- 3 Funil
- 4 Fita adesiva
- 5 Marcador
- 6 Lápis
- 7 Frascos de 10 ml
- 8 Conjunto de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
- 9 Conjunto de frascos de vidro de laboratório (25 a 100 ml)
- 10 Placas de alumínio de CCF da Merck previamente revestidas de gel de sílica 60F 254, tamanho 5x10 cm
- 11 Microcapilares de vidro (capacidade de 2 µl)
- 12 Câmara de eluição de CCF (frasco de 500 ml)
- 13 Placa de aquecimento
- 14 Papel de filtro
- 15 Tesoura

(continuação da página 160 do texto de partida)

- 16 Pair of tweezers
- 17 UV light of 254 nm
- 18 Iodine chamber
- 19 Methanol
- 20 Toluene
- 21 Ammonia solution 25%
- 22 Secondary reference standard, for example, pyrazinamide 500 mg tablets

(continuação da tradução da página 160)

- 16 Pinças
- 17 Luz ultravioleta de 254 nm
- 18 Câmara de iodo
- 19 Metanol
- 20 Tolueno
- 21 Solução de amoníaco a 25%
- 22 Padrão secundário de referência, por exemplo comprimidos de pirazinamida de 500 mg

### III. PREPARATION OF THE STOCK STANDARD SOLUTION

The preparation of the stock standard solution requires an authentic drug product for reference purposes, for example, tablets containing 500 mg of pyrazinamide. Wrap up one reference tablet into aluminium foil and crush it down to a fine powder using a pestle. Carefully empty the aluminium foil over a 100-ml laboratory glass bottle and wash down all residual solids with 50 ml of methanol using a straight pipette. Close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 10 mg of total drug per ml and be labelled as '*Pyrazinamide Stock Standard Solution*'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquid.

### IV. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 100% (UPPER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 7 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 1.25 mg of total drug per ml and be labelled as '*Pyrazinamide Working Standard Solution 100%*'.

This higher working standard solution represents a drug product of good quality containing 100 % of pyrazinamide.

### V. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 80% (LOWER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 9 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 1.0 mg of total drug per ml and be labelled as '*Pyrazinamide Working Standard Solution 80%*'.

This lower working standard solution represents a drug product of poor quality containing just 80% of the amount of pyrazinamide as stated on the product's label. In the current investigation, this drug level represents the lower acceptable limit for a given product.

### VI. PREPARATION OF THE STOCK SAMPLE SOLUTION FROM A PRODUCT CLAIMING TO CONTAIN 100 MG OF PYRAZINAMIDE PER UNIT

Take one whole tablet or capsule from an appropriate drug product sampled in the field. As usual, tablets are wrapped up into aluminium foil and crushed down to a fine powder. Transfer all the powder obtained into a 25-ml laboratory glass bottle. Powder obtained from a sample capsule should be transferred directly into the bottle adding the cap and body shells last. For extraction, add 10 ml of methanol using a straight pipette, close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid.

#### 300 MG OF PYRAZINAMIDE PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 30 ml of methanol using a straight pipette and a 40-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

#### 400 MG OF PYRAZINAMIDE PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 40 ml of methanol using a straight pipette and a 100-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.



### III. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DO PADRÃO

A preparação da solução stock do padrão requer um medicamento autêntico para servir de referência, por exemplo comprimidos de 500 mg de pirazinamida. Embrulhe um comprimido de referência em folha de alumínio e esmague-o, até ficar em pó, usando o pilão. Transfira, cuidadosamente, o conteúdo da folha de alumínio para um frasco de vidro de laboratório de 100 ml e lave o resto dos resíduos sólidos com 50 ml de metanol com uma pipeta graduada. Feche o frasco e agite durante cerca de três minutos, até que a maior parte dos sólidos se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos que não se dissolveram se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve ter uma concentração total de fármaco de 10 mg por ml e ser rotulada como "*Solução Stock do Padrão de Pirazinamida*". Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante, límpido ou turvo.

### IV. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 100% (CONCENTRAÇÃO LIMITE SUPERIOR DE TRABALHO)

Pipete 1 ml da solução stock do padrão para um frasco de 10 ml e adicione 7 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter o fármaco numa concentração total de 1,25 mg por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Pirazinamida a 100%*".

Esta solução padrão de trabalho com concentração limite superior representa um medicamento de alta qualidade que contém 100% de pirazinamida.

### V. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 80% (CONCENTRAÇÃO LIMITE MÍNIMO DE TRABALHO)

Pipete 1 ml da solução stock do padrão para um frasco de 10 ml e adicione 9 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter o fármaco numa concentração total de 1,0 mg por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Pirazinamida a 80%*".

Esta solução padrão de trabalho com concentração limite inferior consiste num medicamento de fraca qualidade e contém apenas 80% da pirazinamida referida no rótulo do produto. Nesta investigação, este nível de fármaco representa o limite mínimo aceitável para tal produto.

### VI. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DE AMOSTRA DE UM PRODUTO DITO CONTER 100 MG DE PIRAZINAMIDA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula de uma amostra do produto. Como anteriormente, os comprimidos devem ser embrulhados numa folha de alumínio e esmagados até ficarem em pó fino. Transfira todo o pó obtido para um frasco de vidro de laboratório de 25 ml. Deve transferir directamente para o frasco o pó obtido de uma cápsula, adicionando, de seguida, o invólucro. Para proceder à extracção, adicione 10 ml de metanol, usando uma pipeta graduada, feche o frasco e agite-o durante cerca de três minutos, até que a maior parte dos sólidos se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos que não se dissolveram se depositem no fundo do frasco.

#### 300 MG DE PIRAZINAMIDA POR UNIDADE

Extraia o pó obtido da amostra de um comprimido ou de uma cápsula com 30 ml de metanol, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 40 ml, como recipiente para amostras. Continue como indicado anteriormente.

#### 400 MG DE PIRAZINAMIDA POR UNIDADE

Extraia o pó obtido da amostra de um comprimido ou de uma cápsula com 40 ml de metanol, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 100 ml, como recipiente para amostras. Continue como indicado anteriormente.

#### 500 MG OF PYRAZINAMIDE PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 50 ml of methanol using a straight pipette and a 100-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

All stock sample solutions produced should finally contain 10 mg of total drug per ml and be labelled as '*Pyrazinamide Stock Sample Solution*'. Freshly prepare these solutions for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquids.

#### VII. PREPARATION OF THE WORKING SAMPLE SOLUTION

Pipette 1 ml of the stock sample solution into a 10-ml vial and add 7 ml of methanol. Close and shake the vial and label as '*Pyrazinamide Working Sample Solution*'.

The expected concentration of pyrazinamide in this working sample solution is 1.25 mg per ml and should match the concentration of pyrazinamide of the higher working standard solution produced above.

#### VIII. SPOTTING

Mark an origin line parallel to and about 1.5 cm from the bottom edge of the chromatoplate and apply 2 µl of each test and standard solution as shown in the picture opposite using the microcapillary pipettes supplied.

Up to five spots can be placed on a plate. Check the uniformity of all spots using UV light of 254 nm. All spots should be circular in shape and equally spaced across the origin line. Although their intensities might differ, their diameters never should. Different intensities are due to residual amounts of tablet and capsule excipients or different drug concentrations in the sample solutions. A difference in spot size, however, relates to poor spotting. Repeat this step if homogeneous spotting is not achieved first time.

#### IX. DEVELOPMENT

Pipette 12 ml of methanol, 10 ml of toluene and 0.5 ml of concentrated ammonia solution into the jar being used as TLC developing chamber. Close the chamber and mix thoroughly. Line the chamber's wall with filter paper and wait for about 15 minutes thus ensuring saturation of the chamber with solvent vapour. Carefully place the loaded TLC plate into the jar. Close the jar and develop the chromatoplate until the solvent front has moved about three-quarters of the length of the plate, the developing time being about 20 minutes. Remove the plate from the chamber, mark the solvent front and allow any excess solvent to evaporate using a hot plate if necessary.

#### X. DETECTION

Dry off all residual solvent and observe the chromatoplate under UV light of 254 nm using the battery-driven lamp supplied. Use this method of detection for both, identification and quantification purposes. Further verification of pyrazinamide identity and content can be achieved when observing the plate at daylight after iodine staining.

In case ethambutol is present, stain the chromatoplate with ninhydrin for its detection. Consult pages 26 and 90 to see how to perform the staining process. Note that this method of detection will make it impossible to further observe pyrazinamide or isoniazid spots under UV light of 254 nm and rifampicin spots at daylight.

#### 500 MG DE PIRAZINAMIDA POR UNIDADE

Extraia o pó obtido da amostra de um comprimido ou de uma cápsula com 50 ml de metanol, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 100 ml, como recipiente para amostras. Continue como indicado anteriormente.

Todas as soluções stock de amostra preparadas devem, no fim do procedimento, ter uma concentração total de fármaco de 10 mg por ml e serem rotuladas como "*Solução Amostra de Trabalho de Pirazinamida*". Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a usar os líquidos sobrenadantes límpidos ou turvos.

#### VII. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AMOSTRA DE TRABALHO

Pipete 1 ml da solução stock da amostra para um frasco de 10 ml e adicione 7 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. Rotule-o como "*Solução Amostra de Trabalho de Pirazinamida*".

Estima-se que a concentração de pirazinamida nesta solução de amostra de trabalho seja de 1,25 mg por ml e deve ser igual à concentração de pirazinamida na solução padrão de trabalho com concentração limite superior produzida anteriormente.

#### VIII. APLICAÇÃO

Trace uma linha paralela à base da placa cromatográfica, a cerca de 1,5 cm da base, e aplique 2 µl de cada solução, de padrão e de teste, como ilustrado na figura do lado oposto, usando os microcapilares de vidro fornecidos.

Podem ser aplicadas cinco manchas numa placa. Confirme a uniformidade das manchas através da luz ultravioleta de 254 nm. Todas as manchas devem ser circulares e separadas entre si por uma distância igual ao longo da linha de base. Apesar de as suas intensidades poderem diferir, o seu diâmetro deve ser sempre igual. As diferentes intensidades devem-se a diferentes quantidades residuais de excipientes dos comprimidos e cápsulas ou devido a diferentes concentrações do fármaco na solução de amostra. Porém, se as manchas apresentarem um tamanho diferente deve-se a uma incorrecta técnica aplicação. Repita este passo, se não conseguir uma aplicação homogénea à primeira tentativa.

#### IX. ELUIÇÃO

Pipete 12 ml de metanol, 10 ml de tolueno e 0,5 ml da solução concentrada de amoníaco para o frasco que está a ser usado como câmara de eluição de CCF. Feche a câmara e misture bem. Revista a parede da câmara com papel de filtro e aguarde cerca de 15 minutos para assegurar a saturação da câmara com o vapor do solvente. Coloque, com cuidado, a placa de CCF contendo os compostos no frasco. Feche o frasco e elua a placa cromatográfica até que a frente de solvente tenha percorrido três-quartos do comprimento da placa, tendo em conta que a eluição demora cerca de 20 minutos. Remova a placa da câmara, marque a frente solvente e deixe que o excesso de solvente se evapore. Se for necessário, use a placa de aquecimento.

#### X. REVELAÇÃO

Deixe que todos os resíduos do solvente evaporem da placa cromatográfica e observe-a com luz ultravioleta de 254 nm, usando a lanterna a pilhas fornecida. Use este método de detecção para efeitos de identificação e de quantificação. Para verificação adicional da autenticidade da pirazinamida, observe a placa à luz do dia após a coloração com iodo.

Para detectar a presença de etambutol, core a placa cromatográfica com ninidrina. Consulte as páginas 26 e 90 para verificar como se executa este procedimento. Tenha em conta que este método de detecção tornará impossível a observação posterior de manchas de pirazinamida e isoniazida sob luz ultravioleta de 254 nm e de manchas de rifampicina à luz do dia.

#### XI. CHROMATOPLATE OBSERVED UNDER UV LIGHT OF 254 NM

Run No.1: A standard solution representing 100% of total pyrazinamide, isoniazid and rifampicin as upper working limit.

Run No. 2: A pyrazinamide fixed-dose combination product of good quality.

Run No.3: A pyrazinamide fixed-dose combination product of poor quality.

Run No.4: A standard solution representing 80% of total pyrazinamide, isoniazid and rifampicin as lower working limit.

(Solvent front)

Rifampicin's principal and satellite spot

Pyrazinamide's principal spot

Isoniazid's principal spot

(Origin line)

#### XII.OBSERVATIONS MADE AT 254 NM

A blue-violet spot at a travel distance of about 0.56 indicates the presence of pyrazinamide in the test solution. When combined with isoniazid and rifampicin, two more principal spots are visible below and above the pyrazinamide spot at a travel distance of about 0.45 and 0.71, respectively. Additional strong spots generated by the test solution would point at other drugs or pyrazinamide degradation, the latter case being more likely when associated with a smaller principal spot. Auxiliary agents incorporated in the different tablet or capsule formulations might cause some fainter spots emerging near or on the origin line. Fixed-dose combination products containing also ethambutol would require staining with ninhydrin solution as this drug cannot be detected with UV light of any wavelenght whatsoever.

#### XIII. OBSERVATIONS MADE AT DAYLIGHT AFTER IODINE STAINING

When exposing the chromatoplate to iodine vapour, all pyrazinamide spots already observed at 254 nm are now turning orange-brown. Still observe the plate when iodine evaporates already. Spots reflecting poor quality products will disappear first gradually followed by the reference spots representing a drug content of an 80 and 100 percent, respectively.

#### XIV. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

The pyrazinamide spot in the chromatogram obtained with the test solution must correspond in terms of colour, size, intensity, shape and travel distance to that in the chromatogram obtained with the lower and higher standard solution. This result must be obtained for each method of detection. If this is not achieved, repeat the run from scratch with a second sample. Reject the batch if the drug content cannot be verified in a third run. For a second opinion, refer additional samples to a fully-fledged drug quality control laboratory. Retain samples and put the batch on quarantine until a final decision on rejection or release has been taken.

#### XI. PLACA CROMATOGRÁFICA OBSERVADA SOB LUZ UV DE 254 NM

1ª corrida: Uma solução padrão de pirazinamida, isoniazida e rifampicina, representando 100% dos fármacos, como limite superior de trabalho.

2ª corrida: Medicamento de pirazinamida com combinação de doses fixas de boa qualidade.

3ª corrida: Medicamento de pirazinamida com combinação de doses fixas de fraca qualidade.

4ª corrida: Uma solução padrão de pirazinamida, isoniazida e rifampicina, apresentando 80% dos medicamentos, como limite inferior de trabalho.

(Frente solvente)

Manchas principal e satélite / secundária de rifampicina

Mancha principal de pirazinamida

Mancha principal de isoniazida

(Linha de base)

#### XII. OBSERVAÇÃO A 254 NM

Uma mancha azul-violeta forte com uma distância relativa percorrida de cerca de 0,56 indica a presença de pirazinamida na solução de teste. Aquando da associação de pirazinamida com isoniazida e rifampicina, duas outras manchas principais tornam-se visíveis abaixo e acima da mancha de pirazinamida com uma distância relativa percorrida de cerca de 0,45 e 0,71, respectivamente. Manchas fortes adicionais formadas pela solução de teste podem indicar a presença de outros medicamentos ou a degradação de pirazinamida, estando este último caso associado a uma mancha principal mais pequena. Os agentes auxiliares incorporados nas diferentes formulações dos comprimidos ou cápsulas podem originar manchas mais fracas, perto da linha de base ou sobre esta. Os produtos de combinações de doses fixas que contêm igualmente etambutol necessitam de coloração com uma solução de ninidrina para serem detectados, pois este medicamento não é detectado por nenhuma luz ultravioleta, independentemente do seu comprimento de onda.

#### XIII. OBSERVAÇÃO À LUZ DO DIA APÓS COLORAÇÃO COM IODO

Aquando da exposição da placa cromatográfica ao vapor de iodo, todas as manchas de pirazinamida anteriormente observadas a 254 nm tornam-se amarelo-acastanhadas. Observe a placa durante a evaporação do iodo. As manchas que denunciam um produto de fraca qualidade desaparecerão em primeiro lugar, gradualmente, seguidas pelas manchas de referência que representam um teor de fármaco de 80 e 100 por cento, respectivamente.

#### XIV. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

A mancha de pirazinamida no cromatograma obtida através da solução de teste deve corresponder, em termos de cor, tamanho, intensidade, forma e distância relativa percorrida, às manchas do cromatograma obtidas com as soluções padrão com concentração limite inferior e superior. Deve obter este resultado para cada método de detecção. Se não conseguir obter este resultado, repita o teste do início com uma segunda amostra. Se não conseguir verificar o teor do fármaco num terceiro teste, rejeite o lote. Para obter uma segunda opinião, envie outras amostras para um laboratório profissional de controlo de qualidade de medicamentos. Guarde algumas amostras e coloque o lote em quarentena até que se tome uma decisão final sobre a sua rejeição ou libertação.

### Quinine (including common salt forms)

Primary Screening via Visual Inspection and Disintegration Test

#### I. VISUAL INSPECTION

Search for deficiencies on labelling, packaging and dosage forms as described in the opening chapters on general methods and operations. Write down all product particulars using the reporting form as a guide. Each tablet or capsule usually contains 300 mg of quinine sulphate. Different dosage strengths of a 100, 200, 250 and 500 mg of quinine sulphate are known to exist. Various preparations may present quinine in different salt forms whereby the amount of a 100 mg of quinine free base equals about 121 mg of quinine sulphate, 122 mg of quinine dihydrochloride, 122 mg of quinine hydrochloride dihydrate and 170 mg of quinine bisulphate. The customarily expressed dosage strength on product labels usually refers to the quinine salt rather than the free base.

#### II. DISINTEGRATION TEST

All quick release quinine tablets and capsules must pass the disintegration test as described in the opening chapters on general methods and operations. They should disintegrate in water at 37 ° C in less than 30 minutes. It's a major defect if a drug product doesn't pass this test.

#### III. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

Drug products from unusually cheap sources, drug products with missing or incorrect accompanying documents and drug products with defective dosage forms, packaging or with incomplete, damaged or missing labels or with labels written in a foreign language should be subjected to a thin layer chromatographic test.

### Verification of Drug Identity and Content via Thin Layer Chromatography

#### I. PRINCIPLE

Quinine injection fluids are diluted and tablets or capsules are extracted with aqueous methanol solution and determined by TLC with reference to an authentic secondary standard. Dilutions are the same for quinine sulphate or any form of hydrochloride salt as their quinine free base content is virtually the same each time. Adjustments must be made for bisulphate and other less common quinine salts. Those products are not part of this protocol.

#### II. EQUIPMENT AND REAGENTS

- 1 Pestle
- 2 Aluminium foil
- 3 Funnel
- 4 Label tape
- 5 Marker pen
- 6 Pencil
- 7 10-ml vials
- 8 Set of straight pipettes (1 to 25 ml)
- 9 Set of laboratory glass bottles (25 to 100 ml)
- 10 Merck TLC aluminium plates pre-coated with silica gel 60 F 254, size 5x10 cm
- 11 Glass microcapillaries (2-µl filling capacity)
- 12 TLC developing chamber (500-ml jar)
- 13 Hot plate

## Quinina (incluindo os sais mais comuns)

Triagem Primária com Inspeção Visual e Teste de Desagregação

### I. INSPECÇÃO VISUAL

Procure deficiências na rotulagem, embalagem e nas formas de dosagem, tal como descrito nos capítulos iniciais sobre os métodos e procedimentos gerais. Registe todos os pormenores do produto, usando os formulários para relatório como orientação. Cada comprimido ou cápsula normalmente contém 300 mg de sulfato de quinina. Sabe-se existir diferentes formas de dosagem de 100, 200, 250 e 500 mg de sulfato de quinina. Diversas preparações poderão apresentar quinina nos sais mais comuns, sendo que a quantidade de 100 mg de quinina em base livre equivale a cerca de 121 mg de sulfato de quinina, 122 mg de dicloridrato de quinina, 122 mg de cloridrato de quinina dihidratada e 170 mg de bissulfato de quinina. As doses habitualmente presentes nos rótulos de produtos referem, normalmente, sais de quinina em vez de quinina em base livre.

### II. TESTE DE DESAGREGAÇÃO

Todos os comprimidos e cápsulas de quinina de libertação rápida devem passar o teste de desagregação, tal como se descreve nos capítulos iniciais sobre métodos e procedimentos gerais. Devem desagregar-se em água a 37 ° C em menos de 30 minutos. Se o fármaco não passar este teste, constitui um defeito importante.

### III. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

Produtos farmacêuticos a preços invulgarmente baratos, medicamentos com documentos de apoio em falta ou incorrectos e medicamentos com formas de dosagem irregulares, embalagens deficientes ou rótulos incompletos, danificados ou ausentes ou com rótulos escritos em língua estrangeira, devem ser submetidos a um teste cromatográfico em camada fina.

Verificação da Identidade e Teor do Fármaco através da Cromatografia em Camada Fina

#### I. PRINCÍPIO

As formas farmacêuticas líquidas para injeção de quinina são diluídas e os comprimidos e cápsulas são extraídos através de uma solução de aquosa de metanol e determinados por CCF, tendo em conta os padrões secundários de referência. O processo de diluição é igual para o sulfato de quinina ou qualquer forma de sal de cloridrato, tendo em conta que a sua quantidade de quinina em base livre é, virtualmente, igual em cada caso. Poderão ser necessários alguns ajustes no uso de bissulfato e outros sais de quinina menos comuns. Esses produtos não fazem parte deste protocolo.

#### II. EQUIPAMENTO E REAGENTES

- 1 Pilão
- 2 Folha de alumínio
- 3 Funil
- 4 Fita adesiva
- 5 Marcador
- 6 Lápis
- 7 Frascos de 10 ml
- 8 Conjunto de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
- 9 Conjunto de frascos de vidro de laboratório (25 a 100 ml)
- 10 Placas de alumínio de CCF da Merck previamente revestidas de gel de sílica 60F 254, tamanho 5x10 cm
- 11 Microcapilares de vidro (capacidade de 2 µl)
- 12 Câmara de eluição de CCF (frasco de 500 ml)
- 13 Placa de aquecimento

(continuação da página 164 do texto de partida)

- 14 Filter paper
- 15 Pair of scissors
- 16 Pair of tweezers
- 17 UV light of 254 and 366 nm
- 18 Iodine chamber
- 19 Methanol
- 20 Water
- 21 Ammonia solution 25%
- 22 Secondary reference standard, for example, quinine sulphate 300 mg tablets

### III. PREPARATION OF THE STOCK STANDARD SOLUTION

The preparation of the stock standard solution requires an authentic drug product for reference purposes, for example, tablets containing 300 mg of quinine sulphate. Wrap up one reference tablet into aluminium foil and crush it down to a fine powder using a pestle. Carefully empty the aluminium foil...



(continuação da tradução da página 164)

- 14 Papel de filtro
- 15 Tesoura
- 16 Pinças
- 17 Luz ultravioleta de 254 e 366 nm
- 18 Câmara de iodo
- 19 Metanol
- 20 Água
- 21 Solução de amoníaco a 25%
- 22 Padrão secundário de referência, por exemplo comprimidos de sulfato de quinina de 300 mg

### III. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DO PADRÃO

A preparação da solução padrão requer um medicamento autêntico para servir de referência, por exemplo comprimidos de 300 mg de sulfato de quinina. Embrulhe um comprimido de referência em folha de alumínio e esmague-o, até ficar em pó fino, usando o pilão. Transfira, cuidadosamente, o conteúdo da folha de alumínio...

...over a 40-ml laboratory glass bottle and wash down all residual solids with 3 ml of water using a straight pipette. For further extraction, add 27 ml of methanol, close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 10 mg of quinine sulphate or about 8.3 mg of quinine free base per ml and be labelled as '*Quinine Stock Standard Solution*'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquid.

#### IV. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 100% (UPPER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 7 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 1.25 mg of quinine sulphate or about 1.0 mg of quinine free base per ml and be labelled as '*Quinine Working Standard Solution 100%*'.

This higher working standard solution represents a drug product of good quality containing 100 % of quinine.

#### V. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 80% (LOWER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 9 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 1.0 mg of quinine sulphate or about 0.8 mg of quinine free base per ml and be labelled as '*Quinine Working Standard Solution 80%*'.

This lower working standard solution represents a drug product of poor quality containing just 80% of the amount of quinine as stated on the product's label. In the current investigation, this drug level represents the lower acceptable limit for a given product.

#### VI. PREPARATION OF THE STOCK SAMPLE SOLUTION FROM SOLID DOSAGE FORMS CLAIMING TO CONTAIN 200 MG OF QUININE SULPHATE OR HYDROCHLORIDE PER UNIT

Take one whole tablet or capsule from an appropriate drug product sampled in the field. As usual, tablets are wrapped up into aluminium foil and crushed down to a fine powder. Transfer all the powder obtained into a 25-ml laboratory glass bottle. Powder obtained from sample capsules should be transferred directly into the bottle adding the cap and body shells last. For extraction, add 2 ml of water followed by 18 ml of methanol using appropriate straight pipettes, close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid.

##### SOLID DOSAGE FORMS CLAIMING TO CONTAIN 250 MG OF QUININE SULPHATE OR HYDROCHLORIDE PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 2 ml of water followed by 23 ml of methanol using appropriate straight pipettes and a 40-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

##### SOLID DOSAGE FORMS CLAIMING TO CONTAIN 300 MG OF QUININE SULPHATE OR HYDROCHLORIDE PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 3 ml of water followed by 27 ml of methanol using appropriate straight pipettes and a 40-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

##### SOLID DOSAGE FORMS CLAIMING TO CONTAIN 500 MG OF QUININE SULPHATE OR HYDROCHLORIDE PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 5 ml of water followed by 45 ml of methanol using appropriate straight pipettes and a 100-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

...para um frasco de vidro de laboratório de 40 ml e lave o resto dos resíduos sólidos com 3 ml de água com uma pipeta graduada. Para proceder à extracção, adicione 27 ml de metanol, feche o frasco e agite-o durante cerca de três minutos, até que a maior parte dos sólidos se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos que não se dissolveram se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter uma concentração total de 10 mg de sulfato de quinina ou cerca de 8,3 mg de quinina por ml e ser rotulada como "*Solução Stock do Padrão de Quinina*". Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante, límpido ou turvo.

#### IV. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 100% (CONCENTRAÇÃO LIMITE SUPERIOR DE TRABALHO)

Pipete 1 ml da solução stock do padrão para um frasco de 10 ml e adicione 7 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter uma concentração total de 1,25 mg de sulfato de quinina ou cerca de 1,0 mg de quinina por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Quinina a 100%*".

Esta solução padrão com concentração limite superior representa um medicamento de alta qualidade que contém 100% de quinina.

#### V. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 80% (CONCENTRAÇÃO LIMITE MÍNIMO DE TRABALHO)

Pipete 1 ml da solução stock do padrão para um frasco de 10 ml e adicione 9 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter uma concentração total de 1,0 mg de sulfato de quinina ou cerca de 0,8 mg de quinina por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Quinina a 80%*".

Esta solução padrão de trabalho com concentração limite inferior representa um medicamento de fraca qualidade e contém apenas 80% da quinina referida no rótulo do produto. Nesta investigação, este nível de fármaco representa o limite mínimo aceitável para tal produto.

#### VI. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DE AMOSTRA DE FORMAS FARMACÉUTICAS SÓLIDAS DITAS CONTER UMA DOSAGEM DE 200 MG DE SULFATO OU CLORIDRATO DE QUININA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula de uma amostra do produto. Como anteriormente, os comprimidos devem ser embrulhados numa folha de alumínio e esmagados até ficarem em pó fino. Transfira todo o pó obtido para um frasco de vidro de laboratório de 25 ml. Deve transferir directamente para o frasco o pó obtido de uma cápsula, adicionando, de seguida, o invólucro. Para proceder à extracção, adicione 2 ml de água seguidos de 18 ml de metanol, usando uma pipeta graduada, feche o frasco e agite-o durante cerca de três minutos, até que a maior parte dos sólidos se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos que não se dissolveram se depositem no fundo do frasco.

#### FORMAS FARMACÉUTICAS SÓLIDAS DITAS CONTER UMA DOSAGEM DE 250 MG DE SULFATO OU CLORIDRATO DE QUININA POR UNIDADE

Extraia o pó obtido da amostra de um comprimido ou de uma cápsula com 2 ml de água seguidos de 23 ml de metanol, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 40 ml, como recipiente para amostras. Continue como indicado anteriormente.

#### FORMAS FARMACÉUTICAS SÓLIDAS DITAS CONTER UMA DOSAGEM DE 300 MG DE SULFATO OU CLORIDRATO DE QUININA POR UNIDADE

Extraia o pó obtido da amostra de um comprimido ou de uma cápsula com 3 ml de água seguidos de 27 ml de metanol, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 40 ml, como recipiente para amostras. Continue como indicado anteriormente.

#### FORMAS FARMACÉUTICAS SÓLIDAS DITAS CONTER UMA DOSAGEM DE 500 MG DE SULFATO OU CLORIDRATO DE QUININA POR UNIDADE

Extraia o pó obtido da amostra de um comprimido ou de uma cápsula com 5 ml de água seguidos de 45 ml de metanol, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 100 ml, como recipiente para amostras. Continue como indicado anteriormente.

#### LIQUID DOSAGE FORMS CLAIMING TO CONTAIN 125 MG OF QUININE HYDROCHLORIDE PER ML

Dilute 1 ml of the injection fluid with 11.5 ml of methanol using appropriate straight pipettes and a 25-ml laboratory glass bottle.

#### LIQUID DOSAGE FORMS CLAIMING TO CONTAIN 150 MG OF QUININE HYDROCHLORIDE PER ML

Dilute 1 ml of the injection fluid with 14 ml of methanol using appropriate straight pipettes and a 25-ml laboratory glass bottle.

All stock sample solutions produced should finally contain 10 mg of quinine sulphate or 10 mg of quinine hydrochloride per ml being each time equivalent to about 8.3 mg of quinine free base. Freshly prepare these solutions for each test and label them as '*Quinine Stock Sample Solution*'. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquids.

#### VII. PREPARATION OF THE WORKING SAMPLE SOLUTION

Pipette 1 ml of the stock sample solution into a 10-ml vial and add 7 ml of methanol. Close and shake the vial and label as '*Quinine Working Sample Solution*'.

The expected concentration of quinine sulphate or hydrochloride in this working sample solution is 1.25 mg per ml and should match the quinine salt and free base concentration of the higher working standard solution produced above.

#### VIII. SPOTTING

Mark an origin line parallel to and about 1.5 cm from the bottom edge of the chromatoplate and apply 2  $\mu$ l of each test and standard solution as shown in the picture opposite using the microcapillary pipettes supplied.

Up to five spots can be placed on a plate. Check the uniformity of all spots using UV light of 254 nm. All spots should be circular in shape and equally spaced across the origin line. Although their intensities might differ, their diameters never should. Different intensities are due to residual amounts of tablet and capsule excipients or different drug concentrations in the sample solutions. A difference in spot size, however, relates to poor spotting. Repeat this step if homogeneous spotting is not achieved first time.

Note that the filling of the microcapillary pipettes might take some time when handling aqueous sample solutions. As traces of water are causing spot tailing, completely dry off all extraction solvent before chromatoplate development using the hot plate supplied.

#### IX. DEVELOPMENT

Pipette 20 ml of methanol and 0.5 ml of concentrated ammonia solution into the jar being used as TLC developing chamber. Close the chamber and mix thoroughly. Line the chamber's wall with filter paper and wait for about 15 minutes thus ensuring saturation of the chamber with solvent vapour. Carefully place the loaded TLC plate into the jar. Close the jar and develop the chromatoplate until the solvent front has moved about three-quarters of the length of the plate, the developing time being about 20 minutes. Remove the plate from the chamber, mark the solvent front and allow any excess solvent to evaporate using a hot plate if necessary.

#### X. DETECTION

Dry off all residual solvent and observe the chromatoplate under UV light of 254 nm using the battery-driven lamp supplied. Use this method of detection for both, identification and quantification purposes. Further verification of drug identity and content can be achieved when observing the plate a) under UV light of 366 nm in a dark room and b) at daylight after iodine staining.

FORMAS FARMACÊUTICAS LÍQUIDAS DITAS CONTER UMA DOSAGEM DE 125 MG DE CLORIDRATO DE QUININA POR UNIDADE

Dilua 1 ml das formas farmacêuticas líquidas para injeção com 11,5 ml de metanol, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 25 ml.

FORMAS FARMACÊUTICAS LÍQUIDAS DITAS CONTER UMA DOSAGEM DE 150 MG DE CLORIDRATO DE QUININA POR UNIDADE

Dilua 1 ml das formas farmacêuticas líquidas para injeção com 14 ml de metanol, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 25 ml.

Todas as soluções stock da amostra preparadas devem, no fim do procedimento, conter uma concentração total de 10 mg de sulfato de quinina ou 10 mg de cloridrato de quinina por ml, sendo cada quantidade equivalente a cerca de 8,3 mg de quinina. Prepare estas soluções de fresco para cada teste e rotule-as como "*Solução Stock da Amostra de Quinina*". Continue a usar os líquidos sobrenadantes límpidos ou turvos.

#### VII. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AMOSTRA DE TRABALHO

Pipete 1 ml da solução stock da amostra para um frasco de 10 ml e adicione 7 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. Rotule-o como "*Solução Amostra de Trabalho de Quinina*".

Estima-se que a concentração de sulfato ou cloridrato de quinina nesta solução amostra de trabalho seja de 1,25 mg por ml e deve ser igual à concentração de quinina na solução padrão de trabalho com concentração limite superior preparada anteriormente.

#### VIII. APLICAÇÃO

Trace uma linha paralela à base da placa cromatográfica, a cerca de 1,5 cm da base, e coloque 2 µl de cada solução, de padrão e de teste, como ilustrado na figura do lado oposto, usando os microcapilares de vidro fornecidos.

Podem ser aplicadas cinco manchas numa placa. Confirme a uniformidade das manchas através da luz ultravioleta de 254 nm. Todas as manchas devem ser circulares e separadas entre si por uma distância igual ao longo da linha de base. Apesar de as suas intensidades poderem diferir, o seu diâmetro deve ser sempre igual. As diferentes intensidades devem-se a diferentes quantidades residuais de excipientes dos comprimidos e cápsulas ou devido a diferentes concentrações do fármaco na solução da amostra. Porém, se as manchas apresentarem um tamanho diferente deve-se a uma incorrecta técnica de aplicação. Repita este passo, se não conseguir uma aplicação homogénea à primeira tentativa.

Tenha em conta que encher os microcapilares pode demorar algum tempo aquando da utilização de soluções de amostra aquosas. Para evitar que resíduos de água originem manchas arrastadas, utilize a placa de aquecimento fornecida para secar o solvente de extracção antes da eluição da placa cromatográfica.

#### IX. ELUIÇÃO

Pipete 20 ml de metanol e 0,5 ml da solução concentrada de amoníaco para o frasco que está a ser usado como câmara de eluição de CCF. Feche a câmara e misture bem. Revista a parede da câmara com papel de filtro e aguarde cerca de 15 minutos para assegurar a saturação da câmara com o vapor do solvente. Coloque, com cuidado, a placa de CCF contendo os compostos no frasco. Feche o frasco e elua a placa cromatográfica antes que a frente de solvente tenha percorrido três-quartos do comprimento da placa, tendo em conta que a eluição da placa demora cerca de 20 minutos. Remova a placa da câmara, marque a frente solvente e deixe que o excesso de solvente se evapore. Se for necessário, use a placa de aquecimento.

#### X. REVELAÇÃO

Deixe que todos os resíduos do solvente evaporem da placa cromatográfica e observe-a com luz ultravioleta de 254 nm, usando a lanterna a pilhas fornecida. Use este método de detecção para efeitos de identificação e de quantificação. Para verificação adicional da autenticidade e teor do fármaco, observe a placa a) num espaço escuro sob luz ultravioleta de 366 nm e b) à luz do dia após a coloração com iodo.

#### XI. CHROMATOPLATE OBSERVED UNDER UV LIGHT OF 254 NM

Run No.1: Quinine's upper working limit representing 100% of total drug.

Run No.2: A drug product of good quality.

Run No.3: A drug product of poor quality.

Run No.4: Quinine's lower working limit representing 80% of total drug.

(Solvent front)

Principal spot

Satellite spot

(Origin line)

#### XII. OBSERVATIONS MADE AT 254 NM

A strong blue spot at a travel distance of about 0.58 indicates the presence of quinine in the test solution. A satellite spot emerging just below the principal spot further emphasises the existence of quinine. Additional strong spots generated by the test solution would point at other drugs or quinine degradation, the latter case being more likely when associated with a smaller principal spot. Auxiliary agents incorporated in the different tablet or capsule formulations might cause some fainter spots emerging near or on the origin line.

#### XIII. OBSERVATIONS MADE AT 366 NM

When exposing the chromatoplate to UV light of 366 nm in a dark room, all quinine spots already observed at 254 nm are now showing a very strong fluorescence. If there is no fluorescence then there is no quinine in the test solution.

#### XIV. OBSERVATIONS MADE AT DAYLIGHT AFTER IODINE STAINING

When exposing the chromatoplate to iodine vapour, all quinine spots already observed at 254 and 366 nm are now turning orange-brown. Still observe the plate when iodine evaporates already. Spots reflecting poor quality products will disappear first gradually followed by the reference spots representing a drug content of an 80 and 100 percent, respectively.

#### XV. RESULTS AND ACTIONS TO BE TAKEN

The quinine spot in the chromatogram obtained with the test solution must correspond in terms of colour, size, intensity, shape and travel distance to that in the chromatogram obtained with the lower and higher standard solution. This result must be obtained for each method of detection. If this is not achieved, repeat the run from scratch with a second sample. Reject the batch if the drug content cannot be verified in a third run. For a second opinion, refer additional samples to a fully-fledged drug quality control laboratory. Retain samples and put the batch on quarantine until a final decision on rejection or release has been taken.

#### XI. PLACA CROMATOGRÁFICA OBSERVADA SOB LUZ UV DE 254 NM

1ª corrida: Concentração limite superior de trabalho de quinina, representando 100% do fármaco.

2ª corrida: Medicamento de boa qualidade.

3ª corrida: Medicamento de fraca qualidade.

4ª corrida: Concentração limite inferior de trabalho de quinina, representando 80% do fármaco.

(Frente solvente)

Mancha principal

Mancha satélite / secundária

(Linha de base)

#### XII. OBSERVAÇÃO A 254 NM

Uma mancha azul forte com uma distância relativa percorrida de cerca de 0,58 indica a presença de quinina na solução de teste. O aparecimento de uma mancha secundária/satélite logo abaixo da mancha principal torna ainda mais evidente a existência de quinina. Manchas fortes adicionais formadas pela solução de teste podem indicar a presença de outros fármacos ou a degradação de quinina, estando este último caso associado a uma mancha principal mais pequena. Os agentes auxiliares incorporados nas diferentes formulações dos comprimidos ou cápsulas podem originar manchas mais fracas, perto da linha de base ou sobre esta.

#### XIII. OBSERVAÇÃO A 366 NM

Aquando da exposição da placa cromatográfica à luz ultravioleta de 366 nm num espaço escuro, todas as manchas de quinina anteriormente observadas a 254 nm tornam-se bastante fluorescentes. Se não aparecer qualquer fluorescência, a solução de teste não contém quinina.

#### XIV. OBSERVAÇÃO À LUZ DO DIA APÓS COLORAÇÃO COM IODO

Aquando da exposição da placa cromatográfica ao vapor de iodo, todas as manchas de quinina anteriormente observadas a 254 e 366 nm tornam-se amarelo-acastanhadas. Observe a placa durante a evaporação do iodo. As manchas que denunciam um produto de fraca qualidade desaparecerão em primeiro lugar, gradualmente, seguidas pelas manchas de referência que representam um teor de fármaco de 80 e 100 por cento, respectivamente.

#### XV. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

A mancha de quinina no cromatograma obtida através da solução de teste deve corresponder, em termos de cor, tamanho, intensidade, forma e distância relativa percorrida, às manchas do cromatograma obtidas com as soluções padrão com concentração limite inferior e superior. Deve obter este resultado para cada método de detecção. Se não conseguir obter este resultado, repita o teste do início com uma segunda amostra. Se não conseguir verificar o teor do fármaco num terceiro teste, rejeite o lote. Para obter uma segunda opinião, envie outras amostras para um laboratório profissional de controlo de qualidade de medicamentos. Guarde algumas amostras e coloque o lote em quarentena até que se tome uma decisão final sobre a sua rejeição ou libertação.

### Rifampicin (including fixed-dose combinations)

Primary Screening via Visual Inspection and Disintegration Test

#### I. VISUAL INSPECTION

Search for deficiencies on labelling, packaging and dosage forms as described in the opening chapters on general methods and operations. Write down all product particulars using the reporting form as a guide. Each tablet or capsule usually contains a 150, 300, 450 or 600 mg of rifampicin. When combined with other antituberculosis medicines, strengths of a 60 and 120 mg of rifampicin have been observed. The content of a capsule or the broken section of a tablet must be red-brown.

#### II. DISINTEGRATION TEST

All quick release rifampicin tablets and capsules must pass the disintegration test as described in the opening chapters on general methods and operations. They should disintegrate in water at 37 °C in less than 30 minutes. It is a major defect if a drug product does not pass this test.

#### III. RESULTS AND ACTIONS TO BE TAKEN

Drug products from unusually cheap sources, drug products with missing or incorrect accompanying documents and drug products with defective dosage forms, packaging or with incomplete, damaged or missing labels or with labels written in a foreign language should be subjected to a thin layer chromatographic test.

### Verification of Drug Identity and Content via Thin Layer Chromatography

#### I. PRINCIPLE

Rifampicin is extracted from tablets and capsules with methanol and determined by TLC with reference to an authentic secondary standard. When combined with other antituberculosis drugs, all compounds can be extracted and analysed simultaneously.

#### II. EQUIPMENT AND REAGENTS

1. Pestle
2. Aluminium foil
3. Funnel
4. Label tape
5. Marker pen
6. Pencil
7. 10-ml vials
8. Set of straight pipettes (1 to 25 ml)
9. Set of laboratory glass bottles (25 to 100 ml)
10. Merck TLC aluminium plates pre-coated with silica gel 60 F 254, size 5x10 cm
11. Glass microcapillaries (2- $\mu$ l filling capacity)
12. TLC developing chamber (500-ml jar)
13. Hot Plate
14. Filter Paper



## Rifampicina (incluindo produtos com combinações de doses fixas)

Triagem Primária com Inspeção Visual e Teste de Desagregação

### I. INSPECÇÃO VISUAL

Procure deficiências na rotulagem, embalagem e as formas de dosagem, tal como descrito nos capítulos iniciais sobre os métodos e procedimentos gerais. Registe todos os pormenores do produto, usando os formulários para relatório como orientação. Cada comprimido ou cápsula normalmente contém 150, 300, 450 ou 600 mg de rifampicina. Aquando da associação de rifampicina com outros medicamentos antituberculosos, existem formas de dosagem de 60 e 120 mg de rifampicina. O conteúdo de uma cápsula ou a parte interna de um comprimido devem ser vermelho-acastanhados.

### II. TESTE DE DESAGREGAÇÃO

Todos os comprimidos e cápsulas de rifampicina de libertação rápida devem passar o teste de desagregação, tal como se descreve nos capítulos iniciais sobre métodos e procedimentos gerais. Devem desagregar-se em água a 37 °C em menos de 30 minutos. Se o fármaco não passar este teste, constitui um defeito importante.

### III. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

Produtos farmacêuticos a preços invulgarmente baratos, medicamentos com documentos de apoio em falta ou incorrectos e medicamentos com formas de dosagem irregulares, embalagens deficientes ou rótulos incompletos, danificados ou ausentes ou com rótulos escritos em língua estrangeira, devem ser submetidos a um teste cromatográfico em camada fina.

## Verificação da Identidade e Teor do Fármaco através da Cromatografia em Camada Fina

### I. PRINCÍPIO

A rifampicina é extraída de comprimidos e cápsulas com metanol e determinada por CCF, tendo em conta os padrões secundários de referência. Aquando da associação da rifampicina com outros medicamentos antituberculosos, todos os compostos podem ser simultaneamente extraídos e analisados.

### II. EQUIPAMENTO E REAGENTES

- 1 Pilão
- 2 Folha de alumínio
- 3 Funil
- 4 Fita adesiva
- 5 Marcador
- 6 Lápis
- 7 Frascos de 10 ml
- 8 Conjunto de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
- 9 Conjunto de frascos de vidro de laboratório (25 a 100 ml)
- 10 Placas de alumínio de CCF da Merck previamente revestidas de gel de sílica 60F 254, tamanho 5x10 cm
- 11 Microcapilares de vidro (capacidade de 2 µl)
- 12 Câmara de eluição de CCF (frasco de 500 ml)
- 13 Placa de aquecimento
- 14 Papel de filtro

(continuação da página 168 do texto de partida)

- 15 Pair of scissors
- 16 UV light of 254 nm
- 17 Methanol
- 18 Toluene
- 19 Ammonia solution 25%
- 20 Secondary reference standard, for example, rifampicin 150 mg capsules

(continuação da tradução da página 168)

- 15 Tesoura
- 16 Luz ultravioleta de 254 nm
- 17 Metanol
- 18 Tolueno
- 19 Solução de amoníaco a 25%
- 20 Padrão secundário de referência, por exemplo comprimidos de rifampicina de 150 mg

### III. PREPARATION OF THE STOCK STANDARD SOLUTION

The preparation of the stock standard solution requires an authentic drug product for reference purposes, for example, capsules containing 150 mg of rifampicin. Open one capsule by carefully separating the cap from the bottom shell and transfer all the powder into a 25-ml laboratory glass bottle adding the empty capsule shells last. For extraction, suspend the powder obtained in 15 ml of methanol using a straight pipette. Close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 10 mg of total drug per ml and be labelled as '*Rifampicin Stock Standard Solution*'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquid.

### IV. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 100% (UPPER WORKING LIMIT)

Pipette 2 ml of the stock standard solution into a 25-ml vial and add 8 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 2.0 mg of total drug per ml and be labelled as '*Rifampicin Working Standard Solution 100%*'.

This higher working standard solution represents a drug product of good quality containing 100 % of rifampicin.

### V. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 80% (LOWER WORKING LIMIT)

Pipette 4 ml of the higher working standard solution (! Not the stock standard solution!) into a 10-ml vial and add 1 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 1.6 mg of total drug per ml and be labelled as '*Rifampicin Working Standard Solution 80%*'.

This lower working standard solution represents a drug product of poor quality containing just 80% of the amount of rifampicin as stated on the product's label. In the current investigation, this drug level represents the lower acceptable limit for a given product.

### VI. PREPARATION OF THE STOCK SAMPLE SOLUTION FROM A PRODUCT CLAIMING TO CONTAIN 60 MG OF RIFAMPICIN PER UNIT

Take two (!) whole tablets or capsules from an appropriate drug product sampled in the field. As usual, tablets are wrapped up into aluminium foil and crushed down to a fine powder. Transfer all the powder obtained into an appropriately sized laboratory glass bottle. Powder obtained from a sample capsule should be transferred directly into the bottle adding the cap and body shells last. For extraction, add 12 ml of methanol using a straight pipette, close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid.

#### 120 MG OF RIFAMPICIN PER UNIT

Take one sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 12 ml of methanol following the procedure shown above.

#### 150 MG OF RIFAMPICIN PER UNIT

Take one sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 15 ml of methanol following the procedure shown above.

#### 300 MG OF RIFAMPICIN PER UNIT

Take one sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 30 ml of methanol following the procedure shown above.

#### 450 MG OF RIFAMPICIN PER UNIT

Take one sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 45 ml of methanol following the procedure shown above.

### III. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DO PADRÃO

A preparação da solução stock do padrão requer um medicamento autêntico para servir de referência, por exemplo cápsulas de 150 mg de rifampicina. Abra uma cápsula separando, cuidadosamente, as partes do invólucro e transfira todo o pó para um frasco de vidro de laboratório de 25 ml adicionando, por último, o invólucro. Para proceder à extracção, misture o pó obtido em 15 ml de metanol, usando uma pipeta graduada. Feche o frasco e agite durante cerca de três minutos, até que a maior parte dos sólidos se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos que não se dissolveram se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter o fármaco numa concentração total de 10 mg por ml e ser rotulada como "*Solução Stock do Padrão de Rifampicina*". Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante, límpido ou turvo.

### IV. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 100% (CONCENTRAÇÃO LIMITE SUPERIOR DE TRABALHO)

Pipete 2 ml da solução stock do padrão para um frasco de 25 ml e adicione 8 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter o fármaco numa concentração total de 2,0 mg por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Rifampicina a 100%*".

Esta solução padrão com concentração limite superior representa um medicamento de alta qualidade que contém 100% de rifampicina.

### V. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 80% (CONCENTRAÇÃO LIMITE MÍNIMO DE TRABALHO)

Pipete 4 ml da solução stock do padrão com concentração limite superior (! Não a solução padrão de trabalho) para um frasco de 10 ml e adicione 1 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter o fármaco numa concentração total de 1,6 mg por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Rifampicina a 80%*".

Esta solução padrão de trabalho com concentração limite inferior consiste num medicamento de fraca qualidade e contém apenas 80% da rifampicina referida no rótulo do produto. Nesta investigação, este nível de fármaco representa o limite mínimo aceitável para tal produto.

### VI. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DE AMOSTRA DE UM PRODUTO DITO CONTER 60 MG DE RIFAMPICINA POR UNIDADE

Retire dois (!) comprimidos ou cápsulas de uma amostra do produto. Como anteriormente, os comprimidos devem ser embrulhados numa folha de alumínio e esmagados até ficarem em pó fino. Transfira todo o pó obtido para um frasco de vidro de laboratório de tamanho apropriado. Deve transferir directamente para o frasco o pó obtido de uma cápsula, adicionando, de seguida, o invólucro. Para proceder à extracção, adicione 12 ml de metanol, usando uma pipeta graduada, feche o frasco e agite-o durante cerca de três minutos, até que a maior parte dos sólidos se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos que não se dissolveram se depositem no fundo do frasco.

#### 120 MG DE RIFAMPICINA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula e extraia o pó obtido com 12 ml de metanol conforme o procedimento anterior.

#### 150 MG DE RIFAMPICINA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula e extraia o pó obtido com 15 ml de metanol conforme o procedimento anterior.

#### 300 MG DE RIFAMPICINA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula e extraia o pó obtido com 30 ml de metanol conforme o procedimento anterior.

#### 450 MG DE RIFAMPICINA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula e extraia o pó obtido com 45 ml de metanol conforme o procedimento anterior.

#### 600 MG OF RIFAMPICIN PER UNIT

Take one sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 60 ml of methanol following the procedure shown above.

All stock sample solutions produced should finally contain 10 mg of total drug per ml and be labelled as '*Rifampicin Stock Sample Solution*'. Freshly prepare these solutions for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquids.

#### PREPARATION OF THE WORKING SAMPLE SOLUTION

Pipette 1 ml of the stock sample solution into a 10-ml vial and add 4 ml of methanol. Close and shake the vial and label as '*Rifampicin Working Sample Solution*'.

The expected concentration of rifampicin in this working sample solution is 2 mg per ml and should match the concentration of rifampicin of the higher working standard solution produced above.

#### VIII. SPOTTING

Mark an origin line parallel to and about 1.5 cm from the bottom edge of the chromatoplate and apply 2 µl of each test and standard solution as shown in the picture opposite using the microcapillary pipettes supplied.

Up to five spots can be placed on a plate. Check the uniformity of all spots using UV light of 254 nm. All spots should be circular in shape and equally spaced across the origin line. Although their intensities might differ, their diameters never should. Different intensities are due to residual amounts of tablet and capsule excipients or different drug concentrations in the sample solutions. A difference in spot size, however, relates to poor spotting. Repeat this step if homogeneous spotting is not achieved first time.

#### IX. DEVELOPMENT

A: 10 ml of methanol and 10 ml of toluene. Use this mobile phase for rifampicin single-dose preparations or when rifampicin is combined with isoniazid alone.

B: 12 ml of methanol, 10 ml of toluene and 0.5 ml of concentrated ammonia solution. Use this mobile phase when rifampicin is combined with isoniazid plus pyrazinamide or with isoniazid, pyrazinamide plus ethambutol.

Select the mobile phase and transfer the appropriate solvents into the TLC developing chamber. Close the chamber and mix thoroughly. Line the chamber's wall with filter paper and wait for about 15 minutes thus ensuring saturation of the chamber with solvent vapour. Carefully place the loaded TLC plate into the jar. Close the jar and develop the chromatoplate until the solvent front has moved about three-quarters of the length of the plate, the developing time being about 20 minutes. Remove the plate from the chamber, mark the solvent front and allow any excess solvent to evaporate using a hot plate if necessary.

#### X. DETECTION

Dry off all residual solvent and observe the chromatoplate at daylight. Rifampicin spots are already visible and require no further detection. Use the readings at daylight for both, identification and quantification purposes. When rifampicin is combined with isoniazid or pyrazinamide, then expose the chromatoplate also to UV light of 254 nm. In case ethambutol is present, stain the plate with ninhydrin for its detection. Consult pages 26 and 90 to see how to perform the staining process. After dyeing, plates cannot be read by UV anymore.

#### 600 MG DE RIFAMPICINA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula e extraia o pó obtido com 60 ml de metanol conforme o procedimento anterior.

Todas as soluções stock de amostra preparadas devem, no fim do procedimento, conter o fármaco numa concentração total de 10 mg por ml e serem rotuladas como “*Solução Stock da Amostra de Rifampicina*”. Prepare novas soluções para cada teste. Continue a usar os líquidos sobrenadantes lípidos ou turvos.

#### VII. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AMOSTRA DE TRABALHO

Pipete 1 ml da solução stock de amostra para um frasco de 10 ml e adicione 4 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. Rotule-o como “*Solução Amostra de Trabalho de Rifampicina*”.

Estima-se que a concentração de rifampicina nesta solução de amostra de trabalho seja de 2 mg por ml e deve ser igual à concentração de rifampicina na solução padrão de trabalho com concentração limite superior preparada anteriormente.

#### VIII. APLICAÇÃO

Trace uma linha paralela à base da placa cromatográfica, a cerca de 1,5 cm da base, e aplique 2 µl de cada solução, de padrão e de teste, como ilustrado na figura do lado oposto, usando os microcapilares de vidro fornecidos.

Podem ser aplicadas cinco manchas numa placa. Confirme a uniformidade das manchas através da luz ultravioleta de 254 nm. Todas as manchas devem ser circulares e separadas entre si por uma distância igual ao longo da linha de base. Apesar de as suas intensidades poderem diferir, o seu diâmetro deve ser sempre igual. As diferentes intensidades devem-se a diferentes quantidades residuais de excipientes dos comprimidos e cápsulas ou devido a diferentes concentrações do fármaco na solução de amostra. Porém, se as manchas apresentarem um tamanho diferente deve-se a uma incorrecta técnica de aplicação. Repita este passo, se não conseguir uma aplicação homogénea à primeira tentativa.

#### IX. ELUIÇÃO

A: 10 ml de metanol e 10 ml de tolueno. Use esta fase móvel para as preparações das doses únicas de rifampicina ou associações de rifampicina apenas com isoniazida.

B: 12 ml de metanol, 10 ml de tolueno e 0,5 ml da solução concentrada de amoníaco. Use esta fase móvel aquando da associação de rifampicina com isoniazida e pirazinamida ou com isoniazida, pirazinamida e etambutol.

Escolha a fase móvel (A ou B) e transfira os solventes apropriados para a câmara de eluição de CCF. Feche a câmara e misture bem. Revista a parede da câmara com papel de filtro e aguarde cerca de 15 minutos para assegurar a saturação da câmara com o vapor do solvente. Coloque, com cuidado, a placa de CCF contendo os compostos no frasco. Feche o frasco e elua a placa cromatográfica antes que a frente de solvente tenha percorrido até três-quartos do comprimento da placa, tendo em conta que a eluição da placa demora cerca de 20 minutos. Remova a placa da câmara, marque a frente solvente e deixe que o excesso de solvente se evapore. Se for necessário, use a placa de aquecimento.

#### X. REVELAÇÃO

Deixe que todos os resíduos do solvente evaporem da placa cromatográfica e observe-a à luz do dia. As manchas de rifampicina já estão visíveis e não requerem qualquer procedimento de detecção adicional. Use os resultados da leitura à luz do dia para efeitos de identificação e de quantificação. Quando a rifampicina se encontra associada à isoniazida ou à pirazinamida, exponha, igualmente, a placa cromatográfica à luz ultravioleta de 254 nm. Para detectar a presença de etambutol, core a placa com ninidrina. Consulte as páginas 26 e 90 para verificar como se executa este procedimento. Após serem coradas, as placas já não podem ser analisadas através de luz ultravioleta.

XI. CHROMATOPLATE OBSERVED AT DAYLIGHT WHEN USING MOBILE PHASE A

Run No.1: Rifampicin's upper working limit representing 100% of total drug.

Run No.2: A drug product of good quality.

Run No.3: A drug product of poor quality.

Run No.4: Rifampicin's lower working limit representing 80 % of total drug.

(Solvent front)

Rifampicin's satellite spot

Rifampicin's principal spot

(Origin line)

XII. OBSERVATIONS MADE AT DAYLIGHT

Mobile phase A: An orange-brown spot at a travel distance of about 0.43 indicates the presence of rifampicin in the test solution. Some satellite spots may or may not emerge at a travel distance of about 0.66. No further spots should be visible, even when rifampicin is combined with other TB drugs.

Mobile phase B: Rifampicin travels much further the relative retention factor being about 0.71 now.

XIII. OBSERVATIONS MADE AT 254 NM

Mobile phase A: All rifampicin spots already observed at daylight are now turning greyish brown. When combined with isoniazid, a second principal spot will become visible at a travel distance of about 0.33. Go to page 111 to see the appropriate chromatoplate. Additional strong spots would point at other drugs. Some weaker spots emerging near or on the origin line are normally caused by auxiliary agents incorporated in the different tablet or capsule formulations.

Mobile phase B: Consult page 163 to see the appropriate chromatoplate including comments.

XIV. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

The rifampicin spot in the chromatogram obtained with the test solution must correspond in terms of colour, size, intensity, shape and travel distance to that in the chromatogram obtained with the lower and higher standard solution. This result must be obtained for each mobile phase and method of detection. If this is not achieved, repeat the run from scratch with a second sample. Reject the batch if the drug content cannot be verified in a third run. For a second opinion, refer additional samples to a fully-fledged drug quality control laboratory. Retain samples and put the batch on quarantine until a final decision on rejection or release has been taken.



XI. PLACA CROMATOGRÁFICA OBSERVADA À LUZ DO DIA AQUANDO DO USO DA FASE MÓVEL A

1ª corrida: Concentração limite superior de trabalho de rifampicina, representando 100% do fármaco.

2ª corrida: Medicamento de boa qualidade.

3ª corrida: Medicamento de fraca qualidade.

4ª corrida: Concentração limite inferior de trabalho de rifampicina, representando 80% do fármaco.

(Frente solvente)

Mancha satélite / secundária de rifampicina

Mancha principal de rifampicina

(Linha de base)

XII. OBSERVAÇÃO À LUZ DO DIA

Fase móvel A: Uma mancha laranja-acastanhada forte com uma distância relativa percorrida de cerca de 0,43 indica a presença de rifampicina na solução de teste. Algumas manchas secundárias/satélite poderão ou não surgir a uma distância relativa percorrida de cerca de 0,66. Mesmo quando a rifampicina é associada a outros medicamentos para a Tuberculose, não se devem tornar visíveis mais manchas.

Fase móvel B: As manchas de rifampicina apresentam uma distância relativa percorrida bastante maior, sendo, neste caso, o factor de retenção relativa de cerca de 0,71.

XIII. OBSERVAÇÃO A 254 NM

Fase móvel A: Todas as manchas de rifampicina observadas anteriormente à luz do dia tornam-se, agora, castanho-acinzentadas. Aquando da associação de rifampicina com isoniazida, uma segunda mancha principal tornar-se-á visível a uma distância relativa percorrida de cerca de 0,33. Consulte a página 111 para verificar a placa cromatográfica apropriada. Manchas fortes adicionais podem indicar a presença de outros medicamentos. Os agentes auxiliares incorporados nas diferentes formulações dos comprimidos ou cápsulas podem causar manchas mais fracas, perto da linha de base ou sobre esta.

Fase móvel B: Consulte a página 163 para ver os comentários referentes à placa cromatográfica apropriada.

XIV. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

A mancha de rifampicina no cromatograma obtida através da solução de teste deve corresponder, em termos de cor, tamanho, intensidade, forma e distância relativa percorrida, às manchas do cromatograma obtidas com as soluções padrão com concentração limite inferior e superior. Deve obter este resultado para cada fase móvel e método de detecção. Se não conseguir obter este resultado, repita o teste do início com uma segunda amostra. Se não conseguir verificar o teor do fármaco num terceiro teste, rejeite o lote. Para obter uma segunda opinião, envie outras amostras para um laboratório profissional de controlo de qualidade de medicamentos. Guarde algumas amostras e coloque o lote em quarentena até que se tome uma decisão final sobre a sua rejeição ou libertação.

## Salbutamol

Primary Screening via Visual Inspection and Disintegration Test

### I. VISUAL INSPECTION

Search for deficiencies on labelling, packaging and dosage forms as described in the opening chapters on general methods and operations. Write down all product particulars using the reporting form as a guide. Each tablet or capsule usually contains 2, 4 or 8 mg of salbutamol.

### II. DISINTEGRATION TEST

All quick release salbutamol tablets and capsules must pass the disintegration test as described in the opening chapters on general methods and operations. They should disintegrate in water at 37 °C in less than 30 minutes. It's a major defect if a drug product doesn't pass this test.

### III. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

Drug products from unusually cheap sources, drug products with missing or incorrect accompanying documents and drug products with defective dosage forms, packaging or with incomplete, damaged or missing labels or with labels written in a foreign language should be subjected to a thin layer chromatographic test.

## Verification of Drug Identity and Content via Thin Layer Chromatography

### I. PRINCIPLE

Salbutamol is extracted from tablets and capsules with aqueous methanol solution and determined by TLC with reference to an authentic secondary standard.

### II. EQUIPMENT AND REAGENTS

1. Pestle
2. Aluminium foil
3. Funnel
4. Label tape
5. Marker pen
6. Pencil
7. 10-ml vials
8. Set of straight pipettes (1 to 25 ml)
9. Set of laboratory glass bottles (25 to 100 ml)
10. Merck TLC aluminium plates pre-coated with silica gel 60 F 254, size 5x10 cm
11. Glass microcapillaries (2- $\mu$ l filling capacity)
12. TLC developing chamber (500-ml jar)
13. Hot Plate
14. Filter Paper
15. Pair of scissors
16. Pair of tweezers
17. UV light of 254 nm
18. Iodine chamber
19. Methanol
20. Water
21. Ammonia solution 25%
22. Secondary reference standard, for example, salbutamol 4 mg tablets

## Salbutamol

Triagem Primária com Inspeção Visual e Teste de Desagregação

### I. INSPECÇÃO VISUAL

Procure deficiências na rotulagem, embalagem e as formas de dosagem, tal como descrito nos capítulos iniciais sobre os métodos e procedimentos gerais. Registe todos os pormenores do produto, usando os formulários para relatório como orientação. Cada comprimido ou cápsula normalmente contém 2, 4 ou 8 mg de salbutamol.

### II. TESTE DE DESAGREGAÇÃO

Todos os comprimidos e cápsulas de salbutamol de libertação rápida devem passar o teste de desagregação, tal como se descreve nos capítulos iniciais sobre métodos e procedimentos gerais. Devem desagregar-se em água a 37 °C em menos de 30 minutos. Se o fármaco não passar este teste, constitui um defeito importante.

### III. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

Produtos farmacêuticos a preços vulgarmente baratos, medicamentos com documentos de apoio em falta ou incorrectos e medicamentos com formas de dosagem irregulares, embalagens deficientes ou rótulos incompletos, danificados ou ausentes ou com rótulos escritos em língua estrangeira, devem ser submetidos a um teste cromatográfico em camada fina.

Verificação da Identidade e Teor do Fármaco através da Cromatografia em Camada Fina

### I. PRINCÍPIO

O salbutamol é extraído de comprimidos e cápsulas com uma solução aquosa de metanol e determinado por CCF, tendo em conta os padrões secundários de referência.

### II. EQUIPAMENTO E REAGENTES

1. Pilão
2. Folha de alumínio
3. Funil
4. Fita adesiva
5. Marcador
6. Lápis
7. Frascos de 10 ml
8. Conjunto de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
9. Conjunto de frascos de vidro de laboratório (25 a 100 ml)
10. Placas de alumínio de CCF da Merck previamente revestidas de gel de sílica 60F 254, tamanho 5x10 cm
11. Microcapilares de vidro (capacidade de 2 µl)
12. Câmara de eluição de CCF (frasco de 500 ml)
13. Placa de aquecimento
14. Papel de filtro
15. Tesoura
16. Pinças
17. Luz ultravioleta de 254 nm
18. Câmara de iodo
19. Metanol
20. Água
21. Solução de amoníaco a 25%
22. Padrão secundário de referência, por exemplo comprimidos de salbutamol de 4 mg

### III. PREPARATION OF THE STOCK STANDARD SOLUTION

The preparation of the stock standard solution requires an authentic drug product for reference purposes, for example, tablets containing 4 mg of salbutamol. Wrap up two (!) reference tablets into aluminium foil and crush them down to a fine powder using a pestle. Carefully empty the aluminium foil over a 25-ml laboratory glass bottle and wash down all residual solids with 1 ml of water followed, after about one minute, by 7 ml of methanol using each time appropriate straight pipettes. Close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 1 mg of total drug per ml and be labelled as '*Salbutamol Stock Standard Solution*'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the hazy supernatant liquid.

### IV. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 100% (UPPER WORKING LIMIT)

The salbutamol stock standard solution requires no further dilution. It already represents the final working concentration of 1 mg of total drug per ml. Just for more convenient handling, some of the supernatant liquid may want to be transferred into a 10-ml vial.

This higher working standard solution represents a drug product of good quality containing 100 % of salbutamol.

### V. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 80% (LOWER WORKING LIMIT)

Pipette 4 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 1 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 0.8 mg of total drug per ml and be labelled as '*Salbutamol Working Standard Solution 80%*'.

This lower working standard solution represents a drug product of poor quality containing just 80% of the amount of salbutamol as stated on the product's label. In the current investigation, this drug level represents the lower acceptable limit for a given product.

### VI. PREPARATION OF THE STOCK SAMPLE SOLUTION FROM A PRODUCT CLAIMING TO CONTAIN 2 MG OF SALBUTAMOL PER UNIT

Take four (!) whole tablets or capsules from an appropriate drug product sampled in the field. As usual, tablets are wrapped up into aluminium foil and crushed down to a fine powder. Transfer all the powder obtained into a 25-ml laboratory glass bottle. Powder obtained from sample capsules should be transferred directly into the bottle adding the cap and body shells last.

For extraction, add 1 ml of water followed, after about one minute, by 7 ml methanol using appropriate straight pipettes. Close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid.

#### 4 MG OF SALBUTAMOL PER UNIT

Take two (!) whole sample tablets or capsules and extract the powder obtained with 1 ml of water followed, after about one minute, by 7 ml of methanol using appropriate straight pipettes and a 25-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

#### 8 MG OF SALBUTAMOL PER UNIT

Take one (!) whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 1 ml of water followed, after about one minute, by 7 ml of methanol using appropriate straight pipettes and a 25-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

All stock sample solutions produced should finally contain 1 mg of total drug per ml and be labelled as '*Salbutamol Stock Sample Solution*'. Freshly prepare these solutions for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquids.

### III. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO

A preparação da solução stock do padrão requer um medicamento autêntico para servir de referência, por exemplo comprimidos de 4 mg de salbutamol. Embrulhe dois (!) comprimidos de referência em folha de alumínio e esmague-os, até ficarem em pó fino, usando o pilão. Transfira, cuidadosamente, o conteúdo da folha de alumínio para um frasco de vidro de laboratório de 25 ml e lave o resto dos resíduos sólidos com 1 ml de água. Após cerca de um minuto, insira 7 ml de metanol. Utilize pipetas graduadas nos dois procedimentos. Feche o frasco e agite durante cerca de três minutos, até que a maior parte dos sólidos se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos que não se dissolveram se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter o fármaco numa concentração total de 1 mg por ml e ser rotulada como "*Solução Stock do Padrão de Salbutamol*". Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante turvo.

### IV. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 100% (CONCENTRAÇÃO LIMITE SUPERIOR DE TRABALHO)

A solução stock do padrão de salbutamol não requer diluição adicional. Já contém a concentração final eficaz de 1 mg de fármaco por ml. Para facilitar o manuseamento desta solução, transfira uma porção do líquido sobrenadante para um frasco de 10 ml.

Esta solução padrão com concentração limite superior representa um medicamento de alta qualidade que contém 100% de salbutamol.

### V. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 80% (CONCENTRAÇÃO LIMITE MÍNIMO DE TRABALHO)

Pipete 4 ml da solução stock do padrão para um frasco de 10 ml e adicione 1 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter o fármaco numa concentração total de 0,8 mg por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Salbutamol a 80%*".

Esta solução padrão de trabalho com concentração limite inferior representa um medicamento de fraca qualidade e contém apenas 80% do salbutamol referido no rótulo do produto. Nesta investigação, este nível de fármaco representa o limite mínimo aceitável para tal produto.

### VI. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DE AMOSTRA DE UM PRODUTO DITO CONTER 2 MG DE SALBUTAMOL POR UNIDADE

Retire quatro (!) comprimidos ou cápsulas de uma amostra do produto. Como anteriormente, os comprimidos devem ser embrulhados numa folha de alumínio e esmagados até ficarem em pó fino. Transfira todo o pó obtido para um frasco de vidro de laboratório de 25 ml. Deve transferir directamente para o frasco o pó obtido de uma cápsula, adicionando, de seguida, o invólucro.

Para proceder à extracção, adicione 1 ml de água. Após cerca de um minuto, adicione 7 ml de metanol. Use pipetas graduadas em ambos os procedimentos. Feche o frasco e agite durante cerca de três minutos, até que a maior parte dos sólidos se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos que não se dissolveram se depositem no fundo do frasco.

#### 4 MG DE SALBUTAMOL POR UNIDADE

Retire dois (!) comprimidos ou cápsulas e extraia o pó obtido com 1 ml de água. Cerca de um minuto depois, adicione 7 ml de metanol. Utilize, em ambos os procedimentos, pipetas graduadas e um frasco de vidro de laboratório de 25 ml, como recipiente para amostras. Continue como indicado anteriormente.

#### 8 MG DE SALBUTAMOL POR UNIDADE

Retire um (!) comprimido ou cápsula e extraia o pó obtido com 1 ml de água. Cerca de um minuto depois, adicione 7 ml de metanol. Utilize, em ambos os procedimentos, pipetas graduadas e um frasco de vidro de laboratório de 25 ml, como recipiente para amostras. Continue como indicado anteriormente.

Todas as soluções stock de amostra preparadas devem, no fim do procedimento, conter o fármaco numa concentração total de 1 mg por ml e serem rotuladas como "*Solução Stock da Amostra de Salbutamol*". Prepare novas soluções para cada teste. Continue a usar os líquidos sobrenadantes límpidos ou turvos.

#### VII. PREPARATION OF THE WORKING SAMPLE SOLUTION

Salbutamol stock sample solutions require no further dilution. They already represent the final working concentration of 1 mg of total drug per ml. If prepared from a high quality product, the sample solution should match the concentration of salbutamol of the higher working standard solution produced above.

#### VIII.SPOTTING

Mark an origin line parallel to and about 1.5 cm from the bottom edge of the chromatoplate and apply 2 µl of each test and standard solution as shown in the picture opposite using the microcapillary pipettes supplied.

Up to five spots can be placed on a plate. Check the uniformity of all spots using UV light of 254 nm. All spots should be circular in shape and equally spaced across the origin line. Although their intensities might differ, their diameters never should. Different intensities are due to residual amounts of tablet and capsule excipients or different drug concentrations in the sample solutions. A difference in spot size, however, relates to poor spotting. Repeat this step if homogeneous spotting is not achieved first time.

Note that the filling of the microcapillary pipettes might take some time when handling aqueous sample solutions. As traces of water are causing spot tailing, completely dry off all extraction solvent before chromatoplate development using the hot plate supplied.

#### IX.DEVELOPMENT

Pipette 20 ml of methanol and 0.3 ml of concentrated ammonia solution into the jar being used as TLC developing chamber. Close the chamber and mix thoroughly. Line the chamber's wall with filter paper and wait for about 15 minutes thus ensuring saturation of the chamber with solvent vapour. Carefully place the loaded TLC plate into the jar. Close the jar and develop the chromatoplate until the solvent front has moved about three-quarters of the length of the plate, the developing time being about 20 minutes. Remove the plate from the chamber, mark the solvent front and allow any excess solvent to evaporate using a hot plate if necessary.

#### X.DETECTION

Dry off all residual solvent and observe the chromatoplate under UV light of 254 nm using the battery-driven lamp supplied. Use this method of detection for both, identification and quantification purposes. Further verification of drug identity and content can be achieved when observing the plate at daylight after iodine staining.

#### VII. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AMOSTRA DE TRABALHO

As soluções stock da amostra de salbutamol não requerem diluição adicional. Já contêm a concentração final eficaz de 1 mg de fármaco por ml. Se preparada a partir de um produto de alta qualidade, a concentração da solução de amostra deve ser igual à concentração de salbutamol na solução padrão com concentração limite superior preparada anteriormente.

#### VIII. APLICAÇÃO

Trace uma linha paralela à base da placa cromatográfica, a cerca de 1,5 cm da base, e aplique 2 µl de cada solução, de padrão e de teste, como ilustrado na figura do lado oposto, usando os microcapilares de vidro fornecidos.

Podem ser aplicadas cinco manchas numa placa. Confirme a uniformidade das manchas através da luz ultravioleta de 254 nm. Todas as manchas devem ser circulares e separadas entre si por uma distância igual ao longo da linha de base. Apesar de as suas intensidades poderem diferir, o seu diâmetro deve ser sempre igual. As diferentes intensidades devem-se a diferentes quantidades residuais de excipientes dos comprimidos e cápsulas ou devido a diferentes concentrações do fármaco na solução da amostra. Porém, se as manchas apresentarem um tamanho diferente deve-se a uma incorrecta técnica de aplicação. Repita este passo, se não conseguir uma aplicação homogénea à primeira tentativa.

Tenha em conta que encher os microcapilares de vidro pode demorar algum tempo aquando da utilização de soluções de amostra aquosas. Para evitar que resíduos de água originem manchas arrastadas, utilize a placa de aquecimento fornecida para secar o solvente de extracção antes da eluição da placa cromatográfica.

#### IX. ELUIÇÃO

Pipete 20 ml de metanol e 0,3 ml da solução concentrada de amoníaco para o frasco que está a ser usado como câmara de eluição de CCF. Feche a câmara e misture bem. Revista a parede da câmara com papel de filtro e aguarde cerca de 15 minutos para assegurar a saturação da câmara com o vapor do solvente. Coloque, com cuidado, a placa de CCF contendo os compostos no frasco. Feche o frasco e elua a placa cromatográfica antes que a frente de solvente tenha percorrido três-quartos do comprimento da placa, tendo em conta que a eluição da placa demora cerca de 20 minutos. Remova a placa da câmara, marque a frente solvente e deixe que o excesso de solvente se evapore. Se for necessário, use a placa de aquecimento.

#### X. REVELAÇÃO

Deixe que todos os resíduos do solvente evaporem da placa cromatográfica e observe-a com luz ultravioleta de 254 nm, usando a lanterna a pilhas fornecida. Use este método de detecção para efeitos de identificação e de quantificação. Para verificação adicional da autenticidade e do teor do fármaco, observe a placa à luz do dia após a coloração com iodo.

XI. CHROMATOPLATE OBSERVED UNDER UV LIGHT OF 254 NM

Run No.1: Salbutamol's upper working limit representing 100% of total drug.

Run No.2: A drug product of good quality.

Run No.3: A drug product of poor quality.

Run No.4: Salbutamol's lower working limit representing 80% of total drug.

(Solvent front)

Principal spot

(Origin line)

XII. OBSERVATIONS MADE AT 254 NM

A blue-violet spot at a travel distance of about 0.46 indicates the presence of salbutamol in the test solution. Additional strong spots generated by the test solution would point at other drugs or salbutamol degradation, the latter case being more likely when associated with a smaller principal spot. Auxiliary agents incorporated in the different tablet or capsule formulations might cause some fainter spots emerging near or on the origin line.

XIII. OBSERVATION MADE AT DAYLIGHT AFTER IODINE STAINING

When exposing the chromatoplate to iodine vapour, all salbutamol spots already observed at 254 nm are now turning yellowish brown. Still observe the plate when iodine evaporates already. Spots reflecting poor quality products will disappear first gradually followed by the reference spots representing a drug content of an 80 and 100 percent, respectively.

XIV. RESULTS AND ACTIONS TO BE TAKEN

The salbutamol spot in the chromatogram obtained with the test solution must correspond in terms of colour, size, intensity, shape and travel distance to that in the chromatogram obtained with the lower and higher standard solution. This result must be obtained for each method of detection. If this is not achieved, repeat the run from scratch with a second sample. Reject the batch if the drug content cannot be verified in a third run. For a second opinion, refer additional samples to a fully-fledged drug quality control laboratory. Retain samples and put the batch on quarantine until a final decision on rejection or release has been taken.



XI. PLACA CROMATOGRÁFICA OBSERVADA SOB LUZ UV DE 254 NM

1ª corrida: Concentração limite superior de trabalho de salbutamol, representando 100% do fármaco.

2ª corrida: Medicamento de boa qualidade.

3ª corrida: Medicamento de fraca qualidade.

4ª corrida: Concentração limite inferior de trabalho de salbutamol, representando 80% do fármaco.

(Frente solvente)

Mancha principal

(Linha de base)

XII. OBSERVAÇÃO A 254 NM

Uma mancha azul-violeta forte com uma distância relativa percorrida de cerca de 0,46 indica a presença de salbutamol na solução de teste. Manchas fortes adicionais formadas pela solução de teste podem indicar a presença de outros medicamentos ou a degradação de salbutamol, estando este último caso associado a uma mancha principal mais pequena. Os agentes auxiliares incorporados nas diferentes formulações dos comprimidos e cápsulas podem originar manchas mais fracas, perto da linha de base ou sobre esta.

XIII. OBSERVAÇÃO À LUZ DO DIA APÓS COLORAÇÃO COM IODO

Aquando da exposição da placa cromatográfica ao vapor de iodo, todas as manchas de salbutamol anteriormente observadas a 254 nm tornam-se amarelo-acastanhadas. Observe a placa durante a evaporação do iodo. As manchas que denunciam um produto de fraca qualidade desaparecerão em primeiro lugar, gradualmente, seguidas pelas manchas de referência que representam um teor de fármaco de 80 e 100 por cento, respectivamente.

XIV. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

A mancha de salbutamol no cromatograma obtida através da solução de teste deve corresponder, em termos de cor, tamanho, intensidade, forma e distância relativa percorrida, às manchas do cromatograma obtidas com as soluções padrão com concentração limite inferior e superior. Deve obter este resultado para cada método de detecção. Se não conseguir obter este resultado, repita o teste do início com uma segunda amostra. Se não conseguir verificar o teor do fármaco num terceiro teste, rejeite o lote. Para obter uma segunda opinião, envie outras amostras para um laboratório profissional de controlo de qualidade de medicamentos. Guarde algumas amostras e coloque o lote em quarentena até que se tome uma decisão final sobre a sua rejeição ou libertação.

### Stavudine (including fixed-dose combinations)

#### Primary Screening via Visual Inspection and Disintegration Test

##### I. VISUAL INSPECTION

Search for deficiencies on labelling, packaging and dosage forms as described in the opening chapters on general methods and operations. Write down all product particulars using the reporting form as a guide. Each tablet or capsule usually contains a 15 to 40 mg of stavudine. Low-dose extensions of 6 and 12 mg of stavudine exist for children in particular when combined with other antiretrovirals. Solutions for oral administration are usually presented as dry powder for reconstitution. Frequently, stavudine is combined with lamivudine and nevirapine in a single tablet or capsule formulation.

##### II. DISINTEGRATION TEST

All quick release stavudine tablets and capsules must pass the disintegration test as described in the opening chapters on general methods and operations. They should disintegrate in water at 37 °C in less than 30 minutes. It's a major defect if a drug product doesn't pass this test.

##### III. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

Drug products from unusually cheap sources, drug products with missing or incorrect accompanying documents and drug products with defective dosage forms, packaging or with incomplete, damaged or missing labels or with labels written in a foreign language should be subjected to a thin layer chromatographic test.

#### Verification of Drug Identity and Content via Thin Layer Chromatography

##### I. PRINCIPLE

Stavudine solutions are diluted and tablets or capsules are extracted with water and determined by TLC with reference to an authentic secondary standard. When combined with lamivudine and nevirapine, all three compounds can be extracted and analysed simultaneously.

##### II. EQUIPMENT AND REAGENTS

1. Pestle
2. Aluminium foil
3. Funnel
4. Label tape
5. Marker pen
6. Pencil
7. 10-ml vials
8. Set of straight pipettes (1 to 25 ml)
9. Set of laboratory glass bottles (25 to 100 ml)
10. Merck TLC aluminium plates pre-coated with silica gel 60 F 254, size 5x10 cm
11. Glass microcapillaries (2- $\mu$ l filling capacity)
12. TLC developing chamber (500-ml jar)
13. Hot plate
14. Filter paper
15. Pair of scissors
16. Pair of tweezers

## Estavudina (incluindo produtos com combinações de doses fixas)

Triagem Primária com Inspeção Visual e Teste de Desagregação

### I. INSPECÇÃO VISUAL

Procure deficiências na rotulagem, embalagem e as formas de dosagem, tal como descrito nos capítulos iniciais sobre os métodos e procedimentos gerais. Registe todos os pormenores do produto, usando os formulários para relatório como orientação. Cada comprimido ou cápsula normalmente contém 15 a 40 mg de estavudina. Existem formulações de baixa dosagem de 6 e 12 mg de estavudina para crianças, principalmente quando combinadas com outros anti-retrovirais. As soluções para administração oral são, usualmente, apresentadas em forma de pó para reconstituição. A estavudina é, frequentemente, associada a lamivudina e nevirapina numa formulação única de comprimido ou cápsula.

### II. TESTE DE DESAGREGAÇÃO

Todos os comprimidos e cápsulas de estavudina de libertação rápida devem passar o teste de desagregação, tal como se descreve nos capítulos iniciais sobre métodos e procedimentos gerais. Devem desagregar-se em água a 37 °C em menos de 30 minutos. Se o fármaco não passar este teste, constitui um defeito importante.

### III. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

Produtos farmacêuticos a preços involuntariamente baratos, medicamentos com documentos de apoio em falta ou incorrectos e medicamentos com formas de dosagem irregulares, embalagens deficientes ou rótulos incompletos, danificados ou ausentes ou com rótulos escritos em língua estrangeira, devem ser submetidos a um teste cromatográfico em camada fina.

## Verificação da Identidade e Teor do Fármaco através da Cromatografia em Camada Fina

### I. PRINCÍPIO

As soluções de estavudina são diluídas e os comprimidos e cápsulas são extraídos com água e determinadas por CCF, tendo em conta os padrões secundários de referência. Aquando da associação da estavudina com lamivudina e nevirapina, todos os três compostos podem ser simultaneamente extraídos e analisados.

### II. EQUIPAMENTO E REAGENTES

1. Pilão
2. Folha de alumínio
3. Funil
4. Fita adesiva
5. Marcador
6. Lápis
7. Frascos de 10 ml
8. Conjunto de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
9. Conjunto de frascos de vidro de laboratório (25 a 100 ml)
10. Placas de alumínio de CCF da Merck previamente revestidas de gel de sílica 60F 254, tamanho 5x10 cm
11. Microcapilares de vidro (capacidade de 2 µl)
12. Câmara de eluição de CCF (frasco de 500 ml)
13. Placa de aquecimento
14. Papel de filtro
15. Tesoura
16. Pinças

(continuação da página 176 do texto de partida)

17. UV light of 254 nm
18. Iodine chamber
19. Ethyl acetate
20. Methanol
21. Toluene
22. Water
23. Secondary reference standard, for example, stavudine 40 mg capsules

(continuação da tradução da página 176)

17. Luz ultravioleta de 254 nm
18. Câmara de iodo
19. Acetato de etilo
20. Metanol
21. Tolueno
22. Água
23. Padrão secundário de referência, por exemplo cápsulas de estavudina de 40 mg

### III. PREPARATION OF THE STOCK STANDARD SOLUTION

The preparation of the stock standard solution requires an authentic drug product for reference purposes, for example, capsules containing 40 mg of stavudine. Open one capsule by carefully separating the cap from the bottom shell and transfer all the powder into a 25-ml laboratory glass bottle adding the empty capsule shells last. For extraction, suspend the powder obtained in 16 ml of water using a straight pipette. Close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 2.5 mg of total drug per ml and be labelled as '*Stavudine Stock Standard Solution*'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquid.

### IV. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 100% (UPPER WORKING LIMIT)

Pipette 2 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 2 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 1.25 mg of total drug per ml and be labelled as '*Stavudine Working Standard Solution 100%*'.

This higher working standard solution represents a drug product of good quality containing 100 % of stavudine.

### V. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 80% (LOWER WORKING LIMIT)

Pipette 2 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 3 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 1.0 mg of total drug per ml and be labelled as '*Stavudine Working Standard Solution 80%*'.

This lower working standard solution represents a drug product of poor quality containing just 80% of the amount of stavudine as stated on the product's label. In the current investigation, this drug level represents the lower acceptable limit for a given product.

### VI. PREPARATION OF THE STOCK SAMPLE SOLUTION FROM SOLID DOSAGE FORMS CLAIMING TO CONTAIN 6 MG OF STAVUDINE PER UNIT

Take four (!) whole tablets or capsules from an appropriate drug product sampled in the field. As usual, tablets are wrapped up into aluminium foil and crushed down to a fine powder. Transfer all the powder obtained into a 25-ml laboratory glass bottle. Powder obtained from sample capsules should be transferred directly into the bottle adding the cap and body shells last. For extraction, add 9.6 ml of water using a straight pipette, close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid.

#### 12 MG OF STAVUDINE PER UNIT

Take two (!) whole sample tablets or capsules and extract the powder obtained with 9.6 ml of water following the procedure shown above.

#### 15 MG OF STAVUDINE PER UNIT

Take two (!) whole sample tablets or capsules and extract the powder obtained with 12 ml of water following the procedure shown above.

#### 20 MG OF STAVUDINE PER UNIT

Take two (!) whole sample tablets or capsules and extract the powder obtained with 16 ml of water following the procedure shown above.

#### 30 MG OF STAVUDINE PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 12 ml of water following the procedure shown above.

### III. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DO PADRÃO

A preparação da solução stock do padrão requer um medicamento autêntico para servir de referência, por exemplo cápsulas de 40 mg de estavudina. Abra uma cápsula separando, cuidadosamente, as partes do invólucro e transfira todo o pó para um frasco de vidro de laboratório de 25 ml adicionando, por último, o invólucro. Para proceder à extracção, misture o pó obtido em 16 ml de água, usando uma pipeta graduada. Feche o frasco e agite durante cerca de três minutos, até que a maior parte dos sólidos se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos que não se dissolveram se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter o fármaco numa concentração total de 2,5 mg por ml e ser rotulada como "*Solução Stock do Padrão de Estavudina*". Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante, límpido ou turvo.

### IV. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 100% (CONCENTRAÇÃO LIMITE SUPERIOR DE TRABALHO)

Pipete 2 ml da solução stock do padrão para um frasco de 10 ml e adicione 2 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter o fármaco numa concentração total de 1,25 mg por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Estavudina a 100%*".

Esta solução padrão com concentração limite superior representa um medicamento de alta qualidade que contém 100% de estavudina.

### V. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 80% (CONCENTRAÇÃO LIMITE MÍNIMO DE TRABALHO)

Pipete 2 ml da solução stock do padrão para um frasco de 10 ml e adicione 3 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter o fármaco numa concentração total de 1,0 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Estavudina a 80%*".

Esta solução padrão de trabalho com concentração limite inferior consiste num medicamento de fraca qualidade e contém apenas 80% da estavudina referida no rótulo do produto. Nesta investigação, este nível de fármaco representa o limite mínimo aceitável para tal produto.

### VI. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DE AMOSTRA DE FORMAS DE DOSAGEM SÓLIDAS DITAS CONTER 6 MG DE ESTAVUDINA POR UNIDADE

Retire quatro (!) comprimidos ou cápsulas de uma amostra do produto. Como anteriormente, os comprimidos devem ser embrulhados numa folha de alumínio e esmagados até ficarem em pó fino. Transfira todo o pó obtido para um frasco de vidro de laboratório de 25 ml. Deve transferir directamente para o frasco o pó obtido de uma cápsula, adicionando, de seguida, o invólucro. Para proceder à extracção, adicione 9,6 ml de água, usando uma pipeta graduada, feche o frasco e agite-o durante cerca de três minutos, até que a maior parte dos sólidos se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos que não se dissolveram se depositem no fundo do frasco.

#### 12 MG DE ESTAVUDINA POR UNIDADE

Retire dois (!) comprimidos ou cápsulas e extraia o pó obtido com 9,6 ml de água conforme o procedimento anterior.

#### 15 MG DE ESTAVUDINA POR UNIDADE

Retire dois (!) comprimidos ou cápsulas e extraia o pó obtido com 12 ml de água conforme o procedimento anterior.

#### 20 MG DE ESTAVUDINA POR UNIDADE

Retire dois (!) comprimidos ou cápsulas e extraia o pó obtido com 16 ml de água conforme o procedimento anterior.

#### 30 MG DE ESTAVUDINA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula e extraia o pó obtido com 12 ml de água conforme o procedimento anterior.

#### 40 MG OF STAVUDINE PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 16 ml of water following the procedure shown above.

#### 200 MG OF STAVUDINE PER UNIT

Open one sample bottle and reconstitute all the powder with 80 ml of water using a straight pipette. Close the bottle and shake till a clear solution or homogeneous suspension is obtained.

All stock sample solutions produced should finally contain 2.5 mg of total drug per ml and be labelled as '*Stavudine Stock Sample Solution*'. Freshly prepare these solutions for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquids.

#### VII. PREPARATION OF THE WORKING SAMPLE SOLUTION

Pipette 2 ml of the stock sample solution into a 10-ml vial and add 2 ml of methanol. Close and shake the vial and label as '*Stavudine Working Sample Solution*'.

The expected concentration of stavudine in this working sample solution is 1.25 mg per ml and should match the concentration of stavudine of the higher working standard solution produced above.

#### VIII. SPOTTING

Mark an origin line parallel to and about 1.5 cm from the bottom edge of the chromatoplate and apply 2  $\mu$ l of each test and standard solution as shown in the picture opposite using the microcapillary pipettes supplied.

Up to five spots can be placed on a plate. Check the uniformity of all spots using UV light of 254 nm. All spots should be circular in shape and equally spaced across the origin line. Although their intensities might differ, their diameters never should. Different intensities are due to residual amounts of tablet and capsule excipients or different drug concentrations in the sample solutions. A difference in spot size, however, relates to poor spotting. Repeat this step if homogeneous spotting is not achieved first time.

Note that the filling of the microcapillary pipettes might take some time when handling aqueous sample solutions. As traces of water are causing spot tailing, completely dry off all extraction solvent before chromatoplate development using the hot plate supplied.

#### IX. DEVELOPMENT

Pipette 11 ml of ethyl acetate, 5 ml of methanol and 4 ml of toluene into the jar being used as TLC developing chamber. Close the chamber and mix thoroughly. Line the chamber's wall with filter paper and wait for about 15 minutes thus ensuring saturation of the chamber with solvent vapour. Carefully place the loaded TLC plate into the jar. Close the jar and develop the chromatoplate until the solvent front has moved about three-quarters of the length of the plate, the developing time being about 15 minutes. Remove the plate from the chamber, mark the solvent front and allow any excess solvent to evaporate using a hot plate if necessary.

#### X. DETECTION

Dry off all residual solvent and observe the chromatoplate under UV light of 254 nm using the battery-driven lamp supplied. Use this method of detection for both, identification and quantification purposes. Further verification of drug identity and content can be achieved when observing the plate at daylight after iodine staining.



#### 40 MG DE ESTAVUDINA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula e extraia o pó obtido com 16 ml de água conforme o procedimento anterior.

#### 200 MG DE ESTAVUDINA POR UNIDADE

Abra uma garrafa de amostra e reconstitua todo o pó com 80 ml de água, usando uma pipeta graduada. Feche a garrafa e agite-a até obter uma solução sem resíduos ou uma suspensão homogênea.

Todas as soluções stock de amostra preparadas devem, no fim do procedimento, conter o fármaco numa concentração total de 2,5 mg por ml e serem rotuladas como "*Solução Stock da Amostra de Estavudina*". Prepare novas soluções para cada teste. Continue a usar os líquidos sobrenadantes lípidos ou turvos.

#### VII. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AMOSTRA DE TRABALHO

Pipete 2 ml da solução stock de amostra para um frasco de 10 ml e adicione 2 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. Rotule-o como "*Solução Stock da Amostra de Estavudina*".

Estima-se que a concentração de estavudina nesta solução de amostra de trabalho seja de 1,25 mg por ml e deve ser igual à concentração de estavudina na solução padrão com concentração limite superior preparada anteriormente.

#### VIII. APLICAÇÃO

Trace uma linha paralela à base da placa cromatográfica, a cerca de 1,5 cm da base, e aplique 2 µl de cada solução, de padrão e de teste, como ilustrado na figura do lado oposto, usando os microcapilares de vidro fornecidos.

Podem ser aplicadas cinco manchas numa placa. Confirme a uniformidade das manchas através da luz ultravioleta de 254 nm. Todas as manchas devem ser circulares e separadas entre si por uma distância igual ao longo da linha de base. Apesar de as suas intensidades poderem diferir, o seu diâmetro deve ser sempre igual. As diferentes intensidades devem-se a diferentes quantidades residuais de excipientes dos comprimidos e cápsulas ou devido a diferentes concentrações do fármaco na solução de amostra. Porém, se as manchas apresentarem um tamanho diferente deve-se a uma incorrecta técnica de aplicação. Repita este passo, se não conseguir uma aplicação homogênea à primeira tentativa.

Tenha em conta que encher os microcapilares de vidro pode demorar algum tempo aquando da utilização de soluções de amostra aquosas. Para evitar que resíduos de água originem manchas arrastadas, utilize a placa de aquecimento fornecida para secar o solvente de extracção antes da eluição da placa cromatográfica.

#### IX. ELUIÇÃO

Pipete 11 ml de acetato de etilo, 5 ml de metanol e 4 ml de tolueno para o frasco que está a ser usado como câmara de eluição de CCF. Feche a câmara e misture bem. Revista a parede da câmara com papel de filtro e aguarde cerca de 15 minutos para assegurar a saturação da câmara com o vapor do solvente. Coloque, com cuidado, a placa de CCF contendo os compostos no frasco. Feche o frasco e elua a placa cromatográfica antes que a frente de solvente tenha percorrido três-quartos do comprimento da placa, tendo em conta que a eluição da placa demora cerca de 15 minutos. Remova a placa da câmara, marque a frente solvente e deixe que o excesso de solvente se evapore. Se for necessário, use a placa de aquecimento.

#### X. REVELAÇÃO

Deixe que todos os resíduos do solvente evaporem da placa cromatográfica e observe-a com luz ultravioleta de 254 nm, usando a lanterna a pilhas fornecida. Use este método de detecção para efeitos de identificação e de quantificação. Para verificação adicional da autenticidade e teor do fármaco, observe a placa à luz do dia após a coloração com iodo.

XI. CHROMATOPLATE OBSERVED UNDER UV LIGHT

Run No.1: Stavudine's upper working limit representing 100% of total drug.

Run No.2: A drug product of good quality.

Run No.3: A drug product of poor quality.

Run No.4: Stavudine's lower working limit representing 80% of total drug.

(Solvent front)

Stavudine's principal spot

(Origin line)

XII.OBSERVATIONS MADE AT 254 NM

A strong blue-violet spot at a travel distance of about 0.48 indicates the presence of stavudine in the test solution. When combined with lamivudine alone, a second spot will become visible at a travel distance of about 0.21 and when combined with lamivudine plus nevirapine, a third spot with a relative retention factor of about 0.60 will become visible, the pattern of all spots being shown on page 135. Additional strong spots generated by the test solution would point at other drugs or stavudine degradation, the latter case being more likely when associated with a smaller principal spot. Auxiliary agents incorporated in the different tablet or capsule formulations might cause some fainter spots emerging near or on the origin line.

XIII.OBSERVATIONS MADE AT DAYLIGHT AFTER IODINE STAINING

When exposing the chromatoplate to iodine vapour, all stavudine spots already observed at 254 nm are now turning orange-brown. Still observe the plate when iodine evaporates already. Spots reflecting poor quality products will disappear first gradually followed by the reference spots representing a drug content of an 80 and 100 percent, respectively.

XIV. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

The stavudine spot in the chromatogram obtained with the test solution must correspond in terms of colour, size, intensity, shape and travel distance to that in the chromatogram obtained with the lower and higher standard solution. This result must be obtained for each method of detection. If this is not achieved, repeat the run from scratch with a second sample. Reject the batch if the drug content cannot be verified in a third run. For a second opinion, refer additional samples to a fully-fledged drug quality control laboratory. Retain samples and put the batch on quarantine until a final decision on rejection or release has been taken.

#### XI. PLACA CROMATOGRÁFICA OBSERVADA SOB LUZ UV

1ª corrida: Concentração limite superior de trabalho de estavudina, representando 100% do fármaco.

2ª corrida: Medicamento de boa qualidade.

3ª corrida: Medicamento de fraca qualidade.

4ª corrida: Concentração limite inferior de trabalho de estavudina, representando 80% do fármaco.

(Frente solvente)

Mancha principal de estavudina

(Linha de base)

#### XII. OBSERVAÇÃO A 254 NM

Uma mancha azul-violeta forte com uma distância relativa percorrida de cerca de 0,48 indica a presença de estavudina na solução de teste. Aquando da associação da estavudina apenas com lamivudina, uma segunda mancha tornar-se-á visível a uma distância relativa percorrida de cerca de 0,21, enquanto que quando combinada com lamivudina e nevirapina, aparecerá uma terceira mancha com factor de retenção relativa de cerca de 0,60. Tenha em conta o padrão de todas as manchas referido na página 135. Manchas fortes adicionais formadas pela solução de teste podem indicar a presença de outros medicamentos ou a degradação da estavudina, estando este último caso associado a uma mancha principal mais pequena. Os agentes auxiliares incorporados nas diferentes formulações dos comprimidos e cápsulas podem originar manchas mais fracas, perto da linha de base ou sobre esta.

#### XIII. OBSERVAÇÃO À LUZ DO DIA APÓS COLORAÇÃO COM IODO

Aquando da exposição da placa cromatográfica ao vapor de iodo, todas as manchas de estavudina, anteriormente observadas a 254 nm, tornam-se amarelo-acastanhadas. Observe a placa durante a evaporação do iodo. As manchas que denunciam um produto de fraca qualidade desaparecerão em primeiro lugar, gradualmente, seguidas pelas manchas de referência que representam um teor de fármaco de 80 e 100 por cento, respectivamente.

#### XIV. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

A mancha de estavudina no cromatograma obtida através da solução de teste deve corresponder, em termos de cor, tamanho, intensidade, forma e distância relativa percorrida, às manchas do cromatograma obtidas com as soluções padrão com concentração limite inferior e superior. Deve obter este resultado para cada método de detecção. Se não conseguir obter este resultado, repita o teste do início com uma segunda amostra. Se não conseguir verificar o teor do fármaco num terceiro teste, rejeite o lote. Para obter uma segunda opinião, envie outras amostras para um laboratório profissional de controlo de qualidade de medicamentos. Guarde algumas amostras e coloque o lote em quarentena até que se tome uma decisão final sobre a sua rejeição ou libertação.

### Sulfadoxine (including SP formulations)

Primary Screening via Visual Inspection and Disintegration Test

#### I. VISUAL INSPECTION

Search for deficiencies on labelling, packaging and dosage forms as described in the opening chapters on general methods and operations. Write down all product particulars using the reporting form as a guide. Each tablet or capsule usually contains 500 mg of sulfadoxine combined with 25 mg of pyrimethamine.

#### II. DISINTEGRATION TEST

All quick release tablets and capsules containing a fixed combination of sulfadoxine with pyrimethamine must pass the disintegration test as described in the opening chapters on general methods and operations. They should disintegrate in water at 37 °C in less than 30 minutes. It is a major defect if a drug product does not pass this test.

#### III. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

Drug products from unusually cheap sources, drug products with missing or incorrect accompanying documents and drug products with defective dosage forms, packaging or with incomplete, damaged or missing labels or with labels written in a foreign language should be subjected to a thin layer chromatographic test.

### Verification of Drug Identity and Content via Thin Layer Chromatography

#### I. PRINCIPLE

Sulfadoxine and pyrimethamine are extracted from tablets and capsules with methanol and determined by TLC with reference to an authentic secondary standard.

#### II. EQUIPMENT AND REAGENTS

1. Pestle
2. Aluminium foil
3. Funnel
4. Label tape
5. Marker pen
6. Pencil
7. 10-ml vials
8. Set of straight pipettes (1 to 25 ml)
9. Set of laboratory glass bottles (25 to 100 ml)
10. Merck TLC aluminium plates pre-coated with silica gel 60 F 254, size 5x10 cm
11. Glass microcapillaries (2- $\mu$ l filling capacity)
12. TLC developing chamber (500-ml jar)
13. Hot plate
14. Filter paper
15. Pair of scissors
16. Pair of tweezers
17. UV light of 254 nm

### **Sulfadoxina (incluindo formulações com pirimetamina)**

Triagem Primária com Inspeção Visual e Teste de Desagregação

#### **I. INSPEÇÃO VISUAL**

Procure deficiências na rotulagem, embalagem e nas formas de dosagem, tal como descrito nos capítulos iniciais sobre os métodos e procedimentos gerais. Registe todos os pormenores do produto, usando os formulários para relatório como orientação. Cada comprimido ou cápsula normalmente contém 500 mg de sulfadoxina associada a 25 mg de pirimetamina.

#### **II. TESTE DE DESAGREGAÇÃO**

Todos os comprimidos e cápsulas de libertação rápida que contêm uma combinação fixa de sulfadoxina e pirimetamina devem passar o teste de desagregação, tal como se descreve nos capítulos iniciais sobre métodos e procedimentos gerais. Devem desagregar-se em água a 37 ° C em menos de 30 minutos. Se o fármaco não passar este teste, constitui um defeito importante.

#### **III. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR**

Produtos farmacêuticos a preços invulgarmente baratos, medicamentos com documentos de apoio em falta ou incorrectos e medicamentos com formas de dosagem irregulares, embalagens deficientes ou rótulos incompletos, danificados ou ausentes ou com rótulos escritos em língua estrangeira, devem ser submetidos a um teste cromatográfico em camada fina.

### **Verificação da Identidade e Teor do Fármaco através da Cromatografia em Camada Fina**

#### **I. PRINCÍPIO**

A sulfadoxina e a pirimetamina são extraídas de comprimidos e cápsulas com metanol e determinadas por CCF, tendo em conta os padrões secundários de referência.

#### **II. EQUIPAMENTO E REAGENTES**

1. Pilão
2. Folha de alumínio
3. Funil
4. Fita adesiva
5. Marcador
6. Lápis
7. Frascos de 10 ml
8. Conjunto de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
9. Conjunto de frascos de vidro de laboratório (25 a 100 ml)
10. Placas de alumínio de CCF da Merck previamente revestidas de gel de sílica 60F 254, tamanho 5x10 cm
11. Microcapilares de vidro (capacidade de 2 µl)
12. Câmara de eluição de CCF (frasco de 500 ml)
13. Placa de aquecimento
14. Papel de filtro
15. Tesoura
16. Pinças
17. Luz ultravioleta de 254 nm

(continuação da página 180 do texto de partida)

18. Iodine chamber
19. Ethyl acetate
20. Methanol
21. Secondary reference standard, for example, sulfadoxine/pyrimethamine 500/25 mg tablets

(continuação da tradução da página 180)

18. Câmara de iodo
19. Acetato de etilo
20. Metanol
21. Padrão secundário de referência, por exemplo comprimidos de sulfadoxina/pirimetamina de 500/25 mg

### III. PREPARATION OF THE STOCK STANDARD SOLUTION

The preparation of the stock standard solution requires an authentic drug product for reference purposes, for example, tablets containing 500 mg of sulfadoxine combined with 25 mg of pyrimethamine. Wrap up one reference tablet into aluminium foil and crush it down to a fine powder using a pestle. Carefully empty the aluminium foil over a 25-ml laboratory glass bottle and wash down all residual solids with 20 ml of methanol using a straight pipette. Close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 25 mg of sulfadoxine and 1.25 mg of pyrimethamine per ml and be labelled as '*SP Stock Standard Solution*'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquid.

### IV. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 100% (UPPER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 3 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 6.25 mg of sulfadoxine and about 0.31 mg of pyrimethamine per ml and be labelled as '*SP Working Standard Solution 100%*'.

This higher working standard solution represents a drug product of good quality containing 100 % of sulfadoxine and pyrimethamine.

### V. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 80% (LOWER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 4 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 5 mg of sulfadoxine and 0.25 mg of pyrimethamine per ml and be labelled as '*SP Working Standard Solution 80%*'.

This lower working standard solution represents a drug product of poor quality containing just 80% of the amount of sulfadoxine and pyrimethamine as stated on the product's label. In the current investigation, this drug level represents the lower acceptable limit for a given product.

### VI. PREPARATION OF THE STOCK SAMPLE SOLUTION FROM A PRODUCT CLAIMING TO CONTAIN 500 MG OF SULFADOXINE AND 25 MG OF PYRIMETHAMINE PER UNIT

Take one whole tablet or capsule from an appropriate drug product sampled in the field. As usual, tablets are wrapped up into aluminium foil and crushed down to a fine powder. Transfer all the powder obtained into a 25-ml laboratory glass bottle. Powder obtained from a sample capsule should be transferred directly into the bottle adding the cap and body shells last. For extraction, add 20 ml of methanol using a straight pipette, close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 25 mg of sulfadoxine and 1.25 mg of pyrimethamine per ml and be labelled as '*SP Stock Sample Solution*'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquid.



### III. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO SROCK DO PADRÃO

A preparação da solução stock do padrão requer um medicamento autêntico para servir de referência, por exemplo comprimidos de 500 mg de sulfadoxina associada a 25 mg de pirimetamina. Embrulhe um comprimido de referência em folha de alumínio e esmague-o, até ficar em pó fino, usando o pilão. Transfira, cuidadosamente, o conteúdo da folha de alumínio para um frasco de vidro de laboratório de 25 ml e lave o resto dos resíduos sólidos com 20 ml de metanol com uma pipeta graduada. Feche o frasco e agite durante cerca de três minutos, até que a maior parte dos sólidos se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos que não se dissolveram se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter 25 mg de sulfadoxina e 1,25 mg de pirimetamina por ml e ser rotulada como "*Solução Stock do Padrão de SP*". Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante, límpido ou turvo.

### IV. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 100% (CONCENTRAÇÃO LIMITE SUPERIOR DE TRABALHO)

Pipete 1 ml da solução stock do padrão para um frasco de 10 ml e adicione 3 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 6,25 mg de sulfadoxina e cerca de 0,31 mg de pirimetamina por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de SP a 100%*".

Esta solução padrão de trabalho com concentração limite superior representa um medicamento de alta qualidade que contém 100% de sulfadoxina e pirimetamina.

### V. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 80% (CONCENTRAÇÃO LIMITE MÍNIMO DE TRABALHO)

Pipete 1 ml da solução stock do padrão para um frasco de 10 ml e adicione 4 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 5 mg de sulfadoxina e 0,25 mg de pirimetamina por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de SP a 80%*".

Esta solução padrão de trabalho com concentração limite inferior consiste num medicamento de fraca qualidade e contém apenas 80% da sulfadoxina e pirimetamina referidas no rótulo do produto. Nesta investigação, este nível de fármaco representa o limite mínimo aceitável para tal produto.

### VI. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DE AMOSTRA DE UM PRODUTO DITO CONTER 500 MG DE SULFADOXINA E 25 MG DE PIRIMETAMINA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula de uma amostra do produto. Como anteriormente, os comprimidos devem ser embrulhados numa folha de alumínio e esmagados até ficarem em pó fino. Transfira todo o pó obtido para um frasco de vidro de laboratório de 25 ml. Deve transferir directamente para o frasco o pó obtido de uma cápsula, adicionando, de seguida, o invólucro. Para proceder à extracção, adicione 20 ml de metanol, usando uma pipeta graduada, feche o frasco e agite-o durante cerca de três minutos, até que a maior parte dos sólidos se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos que não se dissolveram se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter 25 mg de sulfadoxina e 1,25 mg de pirimetamina por ml e ser rotulada como "*Solução Srock da Amostra de SP*". Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante, límpido ou turvo.

#### VII. PREPARATION OF THE WORKING SAMPLE SOLUTION

Pipette 1 ml of the stock sample solution into a 10-ml vial and add 3 ml of methanol. Close and shake the vial and label as '*SP Working Sample Solution*'.

The expected concentration of sulfadoxine in the working sample solution is 6.25 mg and that of pyrimethamine about 0.31 mg per ml and each of them should match the concentration of its appropriate counterpart in the higher working standard solution produced above.

#### VIII. SPOTTING

Mark an origin line parallel to and about 1.5 cm from the bottom edge of the chromatoplate and apply 2  $\mu$ l of each test and standard solution as shown in the picture opposite using the microcapillary pipettes supplied.

Up to five spots can be placed on a plate. Check the uniformity of all spots using UV light of 254 nm. All spots should be circular in shape and equally spaced across the origin line. Although their intensities might differ, their diameters never should. Different intensities are due to residual amounts of tablet and capsule excipients or different drug concentrations in the sample solutions. A difference in spot size, however, relates to poor spotting. Repeat this step if homogeneous spotting is not achieved first time.

#### IX. DEVELOPMENT

Pipette 15 ml of ethyl acetate and 5 ml of methanol into the jar being used as TLC developing chamber. Close the chamber and mix thoroughly. Line the chamber's wall with filter paper and wait for about 15 minutes thus ensuring saturation of the chamber with solvent vapour. Carefully place the loaded TLC plate into the jar. Close the jar and develop the chromatoplate until the solvent front has moved about three-quarters of the length of the plate, the developing time being about 15 minutes. Remove the plate from the chamber, mark the solvent front and allow any excess solvent to evaporate using a hot plate if necessary.

#### X. DETECTION

Dry off all residual solvent and observe the chromatoplate under UV light of 254 nm using the battery-driven lamp supplied. Use this method of detection for both, identification and quantification purposes. Further verification of drug identity and content can be achieved when observing the plate at daylight after iodine staining.

#### VII. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AMOSTRA DE TRABALHO

Pipete 1 ml da solução stock de amostra para um frasco de 10 ml e adicione 3 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. Rotule-o como "*Solução Amostra de Trabalho de SP*".

Estima-se que a concentração de sulfadoxina nesta solução de amostra de trabalho seja de 6,25 mg por ml e a de pirimetamina de cerca de 0,31 mg por ml e cada uma deve ser igual à concentração da sua contraparte apropriada na solução padrão de trabalho com concentração limite superior preparada anteriormente.

#### VIII. APLICAÇÃO

Trace uma linha paralela à base da placa cromatográfica, a cerca de 1,5 cm da base, e aplique 2 µl de cada solução, de padrão e de teste, como ilustrado na figura do lado oposto, usando os microcapilares de vidro fornecidos.

Podem ser aplicadas cinco manchas numa placa. Confirme a uniformidade das manchas através da luz ultravioleta de 254 nm. Todas as manchas devem ser circulares e separadas entre si por uma distância igual ao longo da linha de base. Apesar de as suas intensidades poderem diferir, o seu diâmetro deve ser sempre igual. As diferentes intensidades devem-se a diferentes quantidades residuais de excipientes dos comprimidos e cápsulas ou devido a diferentes concentrações dos fármacos na solução de amostra. Porém, se as manchas apresentarem um tamanho diferente deve-se a uma incorrecta técnica de aplicação. Repita este passo, se não conseguir uma aplicação homogénea à primeira tentativa.

#### IX. ELUIÇÃO

Pipete 15 ml de acetato de etilo e 5 ml de metanol para o frasco que está a ser usado como câmara de eluição de CCF. Feche a câmara e misture bem. Revista a parede da câmara com papel de filtro e aguarde cerca de 15 minutos para assegurar a saturação da câmara com o vapor do solvente. Coloque, com cuidado, a placa de CCF contendo os compostos no frasco. Feche o frasco e elua a placa cromatográfica antes que a frente de solvente tenha percorrido três-quartos do comprimento da placa, tendo em conta que a eluição da placa demora cerca de 15 minutos. Remova a placa da câmara, marque a frente solvente e deixe que o excesso de solvente se evapore. Se for necessário, use a placa de aquecimento.

#### X. REVELAÇÃO

Deixe que todos os resíduos do solvente evaporem da placa cromatográfica e observe-a com luz ultravioleta de 254 nm, usando a lanterna a pilhas fornecida. Use este método de detecção para efeitos de identificação e de quantificação. Para verificação adicional da autenticidade e teor do fármaco, observe a placa à luz do dia após a coloração com iodo.

XI. CHROMATOPLATE OBSERVED UNDER UV LIGHT OF 254 NM

Run No.1: Sulfadoxine/Pyrimethamine's upper working limit representing 100% of total drug.

Run No.2: A drug product of good quality.

Run No.3: A drug product of poor quality.

Run No.4: Sulfadoxine/Pyrimethamine's lower working limit representing 80 % of total drug.

(Solvent front)

Principal spot for sulfadoxine

Principal spot for pyrimethamine

(Origin line)

XII. OBSERVATIONS MADE AT 254 NM

A strong blue-violet spot at a travel distance of about 0.68 indicates the presence of sulfadoxine and a second smaller spot at 0.44 that of pyrimethamine in the test solution. Both spots must be there when presented as fixed-dose combination product. Additional strong spots generated by the test solution would point at other drugs or degradation of SP actives, the latter case being more likely when associated with smaller principal spots. Auxiliary agents incorporated in the different tablet or capsule formulations might cause some fainter spots emerging near or on the origin line.

XIII. OBSERVATIONS MADE AT DAYLIGHT AFTER IODINE STAINING

When exposing the chromatoplate to iodine vapour, all sulfadoxine spots already observed at 254 nm are now turning yellowish brown. Pyrimethamine performs poor or not at all. Still observe the plate when iodine evaporates already. Spots reflecting poor quality products will disappear first gradually followed by the reference spots representing a drug content of an 80 and 100 percent, respectively.

XIV. RESULTS AND ACTIONS TO BE TAKEN

Both, the sulfadoxine and pyrimethamine spot in the chromatogram obtained with the test solution, must correspond in terms of colour, size, intensity, shape and travel distance to that in the chromatogram obtained with the lower and higher standard solution. This result must be obtained for each method of detection. If this is not achieved, repeat the run from scratch with a second sample. Reject the batch if the drug content cannot be verified in a third run. For a second opinion, refer additional samples to a fully-fledged drug quality control laboratory. Retain samples and put the batch on quarantine until a final decision on rejection or release has been taken.

#### XI. PLACA CROMATOGRÁFICA OBSERVADA SOB LUZ UV DE 254 NM

1ª corrida: Concentração limite superior de trabalho de sulfadoxina/pirimetamina, representando 100% do fármaco.

2ª corrida: Medicamento de boa qualidade.

3ª corrida: Medicamento de fraca qualidade.

4ª corrida: Concentração limite inferior de trabalho de sulfadoxina/pirimetamina, representando 80% do fármaco.

(Frente solvente)

Mancha principal de sulfadoxina

Mancha principal de pirimetamina

(Linha de base)

#### XII. OBSERVAÇÃO A 254 NM

Uma mancha azul-violeta forte com uma distância relativa percorrida de cerca de 0,68 indica a presença de sulfadoxina e uma segunda mancha mais pequena a 0,44 indica a presença de pirimetamina na solução de teste. Ambas as manchas devem ser visíveis aquando da utilização do produto com combinação de dose fixa. Manchas fortes adicionais formadas pela solução de teste podem indicar a presença de outros fármacos ou a degradação dos agentes activos de SP, estando este último caso associado a manchas principais mais pequenas. Os agentes auxiliares incorporados nas diferentes formulações dos comprimidos e cápsulas podem originar manchas mais fracas, perto da linha de base ou sobre esta.

#### XIII. OBSERVAÇÃO À LUZ DO DIA APÓS COLORAÇÃO COM IODO

Aquando da exposição da placa cromatográfica ao vapor de iodo, todas as manchas de sulfadoxina anteriormente observadas a 254 nm tornam-se amarelo-acastanhadas. A nitidez das manchas de pirimetamina é fraca ou não é, de todo, possível de observar. Observe a placa durante a evaporação do iodo. As manchas que denunciam um produto de fraca qualidade desaparecerão em primeiro lugar, gradualmente, seguidas pelas manchas de referência que representam um teor de fármaco de 80 e 100 por cento, respectivamente.

#### XIV. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

Quer as manchas de sulfadoxina quer as de pirimetamina presentes no cromatograma obtidas através da solução de teste devem corresponder, em termos de cor, tamanho, intensidade, forma e distância relativa percorrida, às manchas do cromatograma obtidas com as soluções padrão com concentração limite inferior e superior. Deve obter este resultado para cada método de detecção. Se não conseguir obter este resultado, repita o teste do início com uma segunda amostra. Se não conseguir verificar o teor do fármaco num terceiro teste, rejeite o lote. Para obter uma segunda opinião, envie outras amostras para um laboratório profissional de controlo de qualidade de medicamentos. Guarde algumas amostras e coloque o lote em quarentena até que se tome uma decisão final sobre a sua rejeição ou libertação.

### Sulfamethoxazole (including cotrimoxazole formulations)

Primary Screening via Visual Inspection and Disintegration Test

#### I. VISUAL INSPECTION

Search for deficiencies on labelling, packaging and dosage forms as described in the opening chapters on general methods and operations. Write down all product particulars using the reporting form as a guide. Each tablet or capsule usually contains a 100 or 400 mg of sulfamethoxazole combined with a 20 or 80 mg of trimethoprim, respectively. Other strengths are known to exist. The term cotrimoxazole commonly refers to appropriate fixed-dose combination products.

#### II. DISINTEGRATION TEST

All quick release cotrimoxazole tablets and capsules must pass the disintegration test as described in the opening chapters on general methods and operations. They should disintegrate in water at 37 °C in less than 30 minutes. It is a major defect if a drug product does not pass this test.

#### III. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

Drug products from unusually cheap sources, drug products with missing or incorrect accompanying documents and drug products with defective dosage forms, packaging or with incomplete, damaged or missing labels or with labels written in a foreign language should be subjected to a thin layer chromatographic test.

Verification of Drug Identity and Content via Thin Layer Chromatography

#### I. PRINCIPLE

Sulfamethoxazole and trimethoprim are extracted from tablets and capsules with methanol and determined by TLC with reference to an authentic secondary standard.

#### II. EQUIPMENT AND REAGENTS

1. Pestle
2. Aluminium foil
3. Funnel
4. Label tape
5. Marker pen
6. Pencil
7. 10-ml vials
8. Set of straight pipettes (1 to 25 ml)
9. Set of laboratory glass bottles (25 to 100 ml)
10. Merck TLC aluminium plates pre-coated with silica gel 60 F 254, size 5x10 cm
11. Glass microcapillaries (2- $\mu$ l filling capacity)
12. TLC developing chamber (500-ml jar)
13. Hot plate
14. Filter paper
15. Pair of scissors
16. Pair of tweezers
17. UV light of 254 nm
18. Iodine chamber
19. Ethyl acetate
20. Methanol
21. Secondary reference standard, for example, sulfamethoxazole/trimethoprim 100/20 mg tablets

### **Sulfametoxazol (incluindo formulações de cotrimoxazol)**

Triagem Primária com Inspeção Visual e Teste de Desagregação

#### **I. INSPEÇÃO VISUAL**

Procure deficiências na rotulagem, embalagem e nas formas de dosagem, tal como descrito nos capítulos iniciais sobre os métodos e procedimentos gerais. Registe todos os pormenores do produto, usando os formulários para relatório como orientação. Cada comprimido ou cápsula contém, normalmente, 100 ou 400 mg de sulfametoxazol associados a 20 ou 80 mg de trimetoprim, respectivamente. Sabe-se que existem outras dosagens. O termo cotrimoxazol designa, geralmente, produtos associados, adequados de dosagem fixa.

#### **II. TESTE DE DESAGREGAÇÃO**

Todos os comprimidos e cápsulas de cotrimoxazol de libertação rápida devem passar o teste de desagregação tal como se descreve nos capítulos iniciais sobre métodos e procedimentos gerais. Devem desagregar-se em água a 37 °C em menos de 30 minutos. Se o fármaco não passar este teste, constitui um defeito importante.

#### **III. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR**

Produtos farmacêuticos a preços invulgarmente baratos, medicamentos com documentos de apoio em falta ou incorrectos e medicamentos com formas de dosagem irregulares, embalagens deficientes ou rótulos incompletos, danificados ou ausentes ou com rótulos escritos em língua estrangeira, devem ser submetidos a um teste cromatográfico em camada fina.

Verificação da Identidade e do Teor do Fármaco através da Cromatografia em Camada Fina

#### **I. PRINCÍPIO**

O sulfametoxazol e o trimetoprim são extraídos de comprimidos e cápsulas com metanol e determinados por CCF, tendo em conta os padrões secundários de referência.

#### **II. EQUIPAMENTO E REAGENTES**

1. Pilão
2. Folha de alumínio
3. Funil
4. Fita adesiva
5. Marcador
6. Lápis
7. Frascos de 10 ml
8. Conjunto de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
9. Conjunto de frascos de vidro de laboratório (25 a 100 ml)
10. Placas de alumínio de CCF da Merck previamente revestidas de gel de sílica 60F 254, tamanho 5x10 cm
11. Microcapilares de vidro (capacidade de 2 µl)
12. Câmara de eluição de CCF (frasco de 500 ml)
13. Placa de aquecimento
14. Papel de filtro
15. Tesoura
16. Pinças
17. Luz ultravioleta de 254 nm
18. Câmara de iodo
19. Acetato de etilo
20. Metanol
21. Padrão secundário de referência, por exemplo comprimidos de sulfametoxazol/trimetoprim de 100/20 mg

### III. PREPARATION OF THE STOCK STANDARD SOLUTION

The preparation of the stock standard solution requires an authentic drug product for reference purposes, for example, tablets containing 100 mg of sulfamethoxazole combined with 20 mg of trimethoprim. Wrap up one reference tablet into aluminium foil and crush it down to a fine powder using a pestle. Carefully empty the aluminium foil over a 25-m1 laboratory glass bottle and wash down all residual solids with 10 ml of methanol using a straight pipette. Close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 10 mg of sulfamethoxazole and 2 mg of trimethoprim per ml and be labelled as '*Cotrimoxazole Stock Standard Solution*'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquid.

### IV. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 100% (UPPER WORKING LIMIT)

Pipette 2 ml of the stock standard solution into a 10-m1 vial and add 2 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 5 mg of sulfamethoxazole and 1 mg of trimethoprim per ml and be labelled as '*Cotrimoxazole Working Standard Solution 100%*'.

This higher working standard solution represents a drug product of good quality containing 100 % of sulfamethoxazole and trimethoprim.

### V. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 80% (LOWER WORKING LIMIT)

Pipette 2 ml of the stock standard solution into a 10-m1 vial and add 3 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 4 mg of sulfamethoxazole and 0.8 mg of trimethoprim per ml and be labelled as '*Cotrimoxazole Working Standard Solution 80%*'.

This lower working standard solution represents a drug product of poor quality containing just 80% of the amount of sulfamethoxazole and trimethoprim as stated on the product's label. In the current investigation, this drug level represents the lower acceptable limit for a given product.

### VI. PREPARATION OF THE STOCK SAMPLE SOLUTION FROM A PRODUCT CLAIMING TO CONTAIN 100 MG OF SULFAMETHOXAZOLE AND 20 MG OF TRIMETHOPRIM PER UNIT

Take one whole tablet or capsule from an appropriate drug product sampled in the field. As usual, tablets are wrapped up into aluminium foil and crushed down to a fine powder. Transfer all the powder obtained into a 25-m1 laboratory glass bottle. Powder obtained from a sample capsule should be transferred directly into the bottle adding the cap and body shells last. For extraction, add 10 ml of methanol using a straight pipette, close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid.

#### 400 MG OF SULFAMETHOXAZOLE AND 80 MG OF TRIMETHOPRIM PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 40 ml of methanol using a straight pipette and a 100-m1 laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as shown above.

All stock sample solutions produced should finally contain 10 mg of sulfamethoxazole and 2 mg of trimethoprim per ml and be labelled as '*Cotrimoxazole Stock Sample Solution*'. Freshly prepare these solutions for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquids.



### III. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DO PADRÃO

A preparação da solução stock do padrão requer um medicamento autêntico para servir de referência, por exemplo comprimidos de 100 mg de sulfametoxazol combinados com 20 mg de trimetoprim. Embrulhe um comprimido de referência em folha de alumínio e esmague-o, até ficar em pó fino, usando o pilão. Transfira, cuidadosamente, o conteúdo da folha de alumínio para um frasco de vidro de laboratório de 25 ml e lave o resto dos resíduos sólidos com 10 ml de metanol com uma pipeta graduada. Feche o frasco e agite durante cerca de três minutos, até que a maior parte dos sólidos se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos que não se dissolveram se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter 10 mg de sulfametoxazol e 2 mg de trimetoprim por ml e ser rotulada como "*Solução Stock do Padrão de Cotrimoxazol*". Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante, límpido ou turvo.

### IV. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 100% (CONCENTRAÇÃO LIMITE SUPERIOR DE TRABALHO)

Pipete 2 ml da solução stock do padrão para um frasco de 10 ml e adicione 2 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 5 mg de sulfametoxazol e 1 mg de trimetoprim por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Cotrimoxazol a 100%*".

Esta solução padrão de trabalho com concentração limite superior representa um medicamento de alta qualidade que contém 100% de sulfametoxazol e trimetoprim.

### V. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 80% (CONCENTRAÇÃO LIMITE MÍNIMO DE TRABALHO)

Pipete 2 ml da solução stock do padrão para um frasco de 10 ml e adicione 3 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 4 mg de sulfametoxazol e 0,8 mg de trimetoprim por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Cotrimoxazol a 80%*".

Esta solução padrão de trabalho com concentração limite inferior representa um medicamento de fraca qualidade e contém apenas 80% do sulfametoxazol e do trimetoprim referidos no rótulo do produto. Nesta investigação, este nível de medicamento representa o limite mínimo aceitável para tal produto.

### VI. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DE AMOSTRA DE UM PRODUTO DITO CONTER 100 MG DE SULFAMETOXAZOL E 20 MG DE TRIMETOPRIM POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula de uma amostra do produto. Como anteriormente, os comprimidos devem ser embrulhados numa folha de alumínio e esmagados até ficarem em pó fino. Transfira todo o pó obtido para um frasco de vidro de laboratório de 25 ml. Deve transferir directamente para o frasco o pó obtido de uma cápsula, adicionando, de seguida, o invólucro. Para proceder à extracção, adicione 10 ml de metanol, usando uma pipeta graduada, feche o frasco e agite-o durante cerca de três minutos, até que a maior parte dos sólidos se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos que não se dissolveram se depositem no fundo do frasco.

#### 400 MG DE SULFAMETOXAZOL E 80 MG DE TRIMETOPRIM POR UNIDADE

Extraia o pó obtido da amostra de um comprimido ou de uma cápsula com 40 ml de metanol, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 100 ml, como recipiente para amostras. Continue como indicado anteriormente.

Todas as soluções stock de amostra preparadas devem, no fim do procedimento, conter 10 mg de sulfametoxazol e 2 mg de trimetoprim por ml e serem rotuladas como "*Solução Stock da Amostra de Cotrimoxazol*". Prepare novas soluções para cada teste. Continue a usar os líquidos sobrenadantes, límpidos ou turvos.

#### VII. PREPARATION OF THE WORKING SAMPLE SOLUTION

Pipette 2 ml of the stock sample solution into a 10-ml vial and add 2 ml of methanol. Close and shake the vial and label as '*Cotrimoxazole Working Sample Solution*'.

The expected concentration of sulfamethoxazole in the working sample solution is 5 mg and that of trimethoprim 1 mg per ml and each of them should match the concentration of its appropriate counterpart in the higher working standard solution produced above.

#### VIII.SPOTTING

Mark an origin line parallel to and about 1.5 cm from the bottom edge of the chromatoplate and apply 2  $\mu$ l of each test and standard solution as shown in the picture opposite using the microcapillary pipettes supplied.

Up to five spots can be placed on a plate. Check the uniformity of all spots using UV light of 254 nm. All spots should be circular in shape and equally spaced across the origin line. Although their intensities might differ, their diameters never should. Different intensities are due to residual amounts of tablet and capsule excipients or different drug concentrations in the sample solutions. A difference in spot size, however, relates to poor spotting. Repeat this step if homogeneous spotting is not achieved first time.

#### IX. DEVELOPMENT

Pipette 15 ml of ethyl acetate and 5 ml of methanol into the jar being used as TLC developing chamber. Close the chamber and mix thoroughly. Line the chamber's wall with filter paper and wait for about 15 minutes thus ensuring saturation of the chamber with solvent vapour. Carefully place the loaded TLC plate into the jar. Close the jar and develop the chromatoplate until the solvent front has moved about three-quarters of the length of the plate, the developing time being about 15 minutes. Remove the plate from the chamber, mark the solvent front and allow any excess solvent to evaporate using a hot plate if necessary.

#### X.DETECTION

Dry off all residual solvent and observe the chromatoplate under UV light of 254 nm using the battery-driven lamp supplied. Use this method of detection for both, identification and quantification purposes. Further verification of drug identity and content can be achieved when observing the plate at daylight after iodine staining.

#### VII. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AMOSTRA DE TRABALHO

Pipete 2 ml da solução stock de amostra para um frasco de 10 ml e adicione 2 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. Rotule-o como "*Solução Amostra de Trabalho de Cotrimoxazol*".

Estima-se que a concentração de sulfametoxazol nesta solução de amostra de trabalho seja de 5 mg por ml e que a de trimetoprim seja de cerca de 1 mg por ml. Cada uma destas concentrações deve ser igual à concentração da sua contraparte apropriada na solução padrão de trabalho com concentração limite superior preparada anteriormente.

#### VIII. APLICAÇÃO

Trace uma linha paralela à base da placa cromatográfica, a cerca de 1,5 cm da base, e aplique 2 µl de cada solução, de padrão e de teste, como ilustrado na figura do lado oposto, usando os microcapilares de vidro fornecidos.

Podem ser aplicadas cinco manchas numa placa. Confirme a uniformidade das manchas através da luz ultravioleta de 254 nm. Todas as manchas devem ser circulares e separadas entre si por uma distância igual ao longo da linha de base. Apesar de as suas intensidades poderem diferir, o seu diâmetro deve ser sempre igual. As diferentes intensidades devem-se a diferentes quantidades residuais de excipientes de comprimidos e cápsulas ou devido a diferentes concentrações dos fármacos na solução de amostra. Porém, se as manchas apresentarem um tamanho diferente deve-se a uma incorrecta técnica de aplicação. Repita este passo, se não conseguir uma aplicação homogénea à primeira tentativa.

#### IX. ELUIÇÃO

Pipete 15 ml de acetato de etilo e 5 ml de metanol para o frasco que está a ser usado como câmara de eluição de CCF. Feche a câmara e misture bem. Revista a parede da câmara com papel de filtro e aguarde cerca de 15 minutos para assegurar a saturação da câmara com o vapor do solvente. Coloque, com cuidado, a placa de CCF contendo os compostos no frasco. Feche o frasco e elua a placa cromatográfica antes que a frente de solvente tenha percorrido três-quartos do comprimento da placa, tendo em conta que a eluição da placa demora cerca de 15 minutos. Remova a placa da câmara, marque a frente solvente e deixe que o excesso de solvente se evapore. Se for necessário, use a placa de aquecimento.

#### X. DETECÇÃO

Deixe que todos os resíduos do solvente evaporem da placa cromatográfica e observe-a com luz ultravioleta de 254 nm, usando a lanterna a pilhas fornecida. Use este método de detecção para efeitos de identificação e de quantificação. Para verificação adicional da autenticidade e teor do fármaco, observe a placa à luz do dia após a coloração com iodo.

XI. CHROMATOPLATE OBSERVED UNDER UV LIGHT OF 254 NM

Run No.1: Cotrimoxazole's upper working limit representing 100 % of total drug.

Run No.2: A drug product of good quality.

Run No.3: A drug product of poor quality.

Run No.4: Cotrimoxazole's lower working limit representing 80 % of total drug.

(Solvent front)

Principal spot for sulfamethoxazole

Principal spot for trimethoprim

(Origin line)

XII. OBSERVATIONS MADE AT 254 NM

A strong blue-violet spot at a travel distance of about 0.65 indicates the presence of sulfamethoxazole and a second smaller spot at about 0.24 that of trimethoprim in the test solution. Both spots must be there when presented as fixed-dose combination product. Additional strong spots generated by the test solution would point at other drugs or degradation of cotrimoxazole actives, the latter case being more likely when associated with smaller principal spots. Auxiliary agents incorporated in the different tablet or capsule formulations might cause some fainter spots emerging near or on the origin line.

XIII. OBSERVATIONS MADE AT DAYLIGHT AFTER IODINE STAINING

When exposing the chromatoplate to iodine vapour, all sulfamethoxazole and trimethoprim spots already observed at 254 nm are now turning yellowish brown. Still observe the plate when iodine evaporates already. Spots reflecting poor quality products will disappear first gradually followed by the reference spots representing a drug content of an 80 and 100 percent, respectively.

XIV. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

Both, the sulfamethoxazole and trimethoprim spot in the chromatogram obtained with the test solution, must correspond in terms of colour, size, intensity, shape and travel distance to that in the chromatogram obtained with the lower and higher standard solution. This result must be obtained for each method of detection. If this is not achieved, repeat the run from scratch with a second sample. Reject the batch if the drug content cannot be verified in a third run. For a second opinion, refer additional samples to a fully-fledged drug quality control laboratory. Retain samples and put the batch on quarantine until a final decision on rejection or release has been taken.

#### XI. PLACA CROMATOGRÁFICA OBSERVADA SOB LUZ UV DE 254 NM

1ª corrida: Concentração limite superior de trabalho de cotrimoxazol, representando 100% do fármaco.

2ª corrida: Medicamento de boa qualidade.

3ª corrida: Medicamento de fraca qualidade.

4ª corrida: Concentração limite inferior de trabalho de cotrimoxazol, representando 80% do fármaco.

(Frente solvente)

Mancha principal de sulfametoxazol

Mancha principal de trimetoprim

(Linha de base)

#### XII. OBSERVAÇÃO A 254 NM

Uma mancha azul-violeta forte com uma distância relativa percorrida de cerca de 0,65 indica a presença de sulfametoxazol e uma segunda mancha mais pequena a cerca de 0,24 indica a presença de trimetoprim na solução de teste. Ambas as manchas devem ser visíveis aquando da utilização do produto com combinação de dose fixa. Manchas fortes adicionais formadas pela solução de teste podem indicar a presença de outros fármacos ou a degradação de cotrimoxazol, estando este último caso associado a manchas principais mais pequenas. Os agentes auxiliares incorporados nas diferentes formulações dos comprimidos e cápsulas podem originar manchas mais fracas, perto da linha de base ou sobre esta.

#### XIII. OBSERVAÇÃO À LUZ DO DIA APÓS COLORAÇÃO COM IODO

Aquando da exposição da placa cromatográfica ao vapor de iodo, todas as manchas de sulfametoxazol e trimetoprim, anteriormente observadas a 254 nm, tornam-se amarelo-acastanhadas. Observe a placa durante a evaporação do iodo. As manchas que denunciam um produto de fraca qualidade desaparecerão em primeiro lugar, gradualmente, seguidas pelas manchas de referência que representam um teor de fármaco de 80 e 100 por cento, respectivamente.

#### XIV. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

Quer a mancha de sulfametoxazol quer a de trimetoprim no cromatograma, obtidas através da solução de teste, devem corresponder, em termos de cor, tamanho, intensidade, forma e distância relativa percorrida, às manchas do cromatograma obtidas com as soluções padrão de trabalho com concentração limite inferior e superior. Deve obter este resultado para cada método de detecção. Se não conseguir obter este resultado, repita o teste do início com uma segunda amostra. Se não conseguir verificar o teor do fármaco num terceiro teste, rejeite o lote. Para obter uma segunda opinião, envie outras amostras para um laboratório profissional de controlo de qualidade de medicamentos. Guarde algumas amostras e coloque o lote em quarentena até que se tome uma decisão final sobre a sua rejeição ou libertação.

## Tetracycline

### Primary Screening via Visual Inspection and Disintegration Test

#### I. VISUAL INSPECTION

Search for deficiencies on labelling, packaging and dosage forms as described in the opening chapters on general methods and operations. Write down all product particulars using the reporting form as a guide. Each tablet or capsule usually contains 250 or 500 mg of tetracycline hydrochloride. The content of a capsule or the broken section of a tablet must be yellow.

#### II. DISINTEGRATION TEST

All quick release tetracycline tablets and capsules must pass the disintegration test as described in the opening chapters on general methods and operations. They should disintegrate in water at 37 °C in less than 30 minutes. It's a major defect if a drug product doesn't pass this test.

#### III. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

Drug products from unusually cheap sources, drug products with missing or incorrect accompanying documents and drug products with defective dosage forms, packaging or with incomplete, damaged or missing labels or with labels written in a foreign language should be subjected to a thin layer chromatographic test.

### Verification of Drug Identity and Content via Thin Layer Chromatography

#### I. PRINCIPLE

Tetracycline hydrochloride is extracted from tablets and capsules with methanol and determined by TLC with reference to an authentic secondary standard. This principle is also fit for other tetracycline type of drugs, for example doxycycline.

#### II. EQUIPMENT AND REAGENTS

1. Pestle
2. Aluminium foil
3. Funnel
4. Label tape
5. Marker pen
6. Pencil
7. 10-ml vials
8. Set of straight pipettes (1 to 25 ml)
9. Set of laboratory glass bottles (25 to 100 ml)
10. \*Merck TLC aluminium plates pre-coated with silica gel 60 F 254, size 5x10 cm
11. Glass microcapillaries (2- $\mu$ l filling capacity)
12. TLC developing chamber (500-ml jar)
13. Hot plate
14. Filter paper
15. Pair of scissors
16. UV light of 366 nm
17. Acetone
18. Glacial acetic acid

Tetraciclina

Triagem Primária com Inspeção Visual e Teste de Desagregação

#### I. INSPECÇÃO VISUAL

Procure deficiências na rotulagem, embalagem e nas formas de dosagem, tal como descrito nos capítulos iniciais sobre os métodos e procedimentos gerais. Registe todos os pormenores do produto, usando os formulários para relatório como orientação. Cada comprimido ou cápsula normalmente contém 250 ou 500 mg de cloridrato de tetraciclina. O conteúdo de uma cápsula ou a parte interna de um comprimido devem ser amarelos.

#### II. TESTE DE DESAGREGAÇÃO

Todos os comprimidos e cápsulas de tetraciclina de libertação rápida devem passar o teste de desagregação, tal como se descreve nos capítulos iniciais sobre métodos e procedimentos gerais. Devem desagregar-se em água a 37 °C em menos de 30 minutos. Se o fármaco não passar este teste, constitui um defeito importante.

#### III. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

Produtos farmacêuticos a preços invulgarmente baratos, medicamentos com documentos de apoio em falta ou incorrectos e medicamentos com formas de dosagem irregulares, embalagens deficientes ou rótulos incompletos, danificados ou ausentes ou com rótulos escritos em língua estrangeira, devem ser submetidos a um teste cromatográfico em camada fina.

Verificação da Identidade e Teor do Fármaco através da Cromatografia em Camada Fina

#### I. PRINCÍPIO

O cloridrato de tetraciclina é extraído de comprimidos e cápsulas com metanol e determinado por CCF, tendo em conta os padrões secundários de referência. Este princípio é igualmente adequado para outros tipos de fármacos de tetraciclina, como por exemplo a doxiciclina.

#### II. EQUIPAMENTO E REAGENTES

1. Pilão
2. Folha de alumínio
3. Funil
4. Fita adesiva
5. Marcador
6. Lápis
7. Frascos de 10 ml
8. Conjunto de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
9. Conjunto de frascos de vidro de laboratório (25 a 100 ml)
10. \*Placas de alumínio de CCF da Merck previamente revestidas de gel de sílica 60F 254, tamanho 5x10 cm
11. Microcapilares de vidro (capacidade de 2 µl)
12. Câmara de eluição de CCF (frasco de 500 ml)
13. Placa de aquecimento
14. Papel de filtro
15. Tesoura
16. Luz ultravioleta de 366 nm
17. Acetona
18. Ácido acético glacial

(continuação da página 188 do texto de partida)

19. Methanol
20. Water
21. Magnesium chloride hexahydrate
22. Sodium or potassium ethylenediaminetetraacetate (EDTA)
23. Secondary reference standard, for example, tetracycline hydrochloride 250 mg capsules

\* In case a switch to paper chromatography is preferred, use aluminium plates pre-coated with cellulose. However, these plates are difficult to handle in practice and their use has therefore been avoided. They must be protected against humidity at all times and cut down to size before use.



(continuação da tradução da página 188)

19. Metanol
20. Água
21. Cloreto de magnésio hexahidratado
22. Etilenodiaminotetraacetato (EDTA) de potássio ou sódio
23. Padrão secundário de referência, por exemplo cápsulas de hidrocloreto de tetraciclina de 250 mg

\* No caso de ser preferível fazer a cromatografia em papel, use placas de alumínio previamente revestidas com celulose. Contudo, o manuseamento destas placas é difícil, daí o seu uso ter sido evitado. Devem ser constantemente protegidas contra a humidade e cortadas à medida antes de serem usadas.

### III. PREPARATION OF THE STOCK STANDARD SOLUTION

The preparation of the stock standard solution requires an authentic drug product for reference purposes, for example, capsules containing 250 mg of tetracycline hydrochloride. Open one capsule by carefully separating the cap from the bottom shell and transfer all the powder into a 40-ml laboratory glass bottle adding the empty capsule shells last. For extraction, suspend the powder obtained in 25 ml of methanol using a straight pipette. Close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 10 mg of total drug per ml and be labelled as '*Tetracycline Stock Standard Solution*'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquid.

### IV. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 100% (UPPER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 3 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 2.5 mg of total drug per ml and be labelled as '*Tetracycline Working Standard Solution 100%*'.

This higher working standard solution represents a drug product of good quality containing 100 % of tetracycline hydrochloride.

### V. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 80% (LOWER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 4 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 2.0 mg of total drug per ml and be labelled as '*Tetracycline Working Standard Solution 80%*'.

This lower working standard solution represents a drug product of poor quality containing just 80% of the amount of tetracycline hydrochloride as stated on the product's label. In the current investigation, this drug level represents the lower acceptable limit for a given product.

### VI. PREPARATION OF THE STOCK SAMPLE SOLUTION FROM A PRODUCT CLAIMING TO CONTAIN 250 MG OF TETRACYCLINE HYDROCHLORIDE PER UNIT

Take one whole tablet or capsule from an appropriate drug product sampled in the field. As usual, tablets are wrapped up into aluminium foil and crushed down to a fine powder. Transfer all the powder obtained into a 40-ml laboratory glass bottle. Powder obtained from a sample capsule should be transferred directly into the bottle adding the cap and body shells last. For extraction, add 25 ml of methanol using a straight pipette, close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid.

### 500 MG OF TETRACYCLINE HYDROCHLORIDE PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 50 ml of methanol using a straight pipette and a 100-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

All stock sample solutions produced should finally contain 10 mg of total drug per ml and be labelled as '*Tetracycline Stock Sample Solution*'. Freshly prepare these solutions for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquids.

### III. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DO PADRÃO

A preparação da solução stock do padrão requer um medicamento autêntico para servir de referência, por exemplo cápsulas de 250 mg de cloridrato de tetraciclina. Abra uma cápsula separando, cuidadosamente, as partes do invólucro e transfira todo o pó para um frasco de vidro de laboratório de 40 ml adicionando, por último, o invólucro. Para proceder à extração, misture o pó obtido em 25 ml de metanol, usando uma pipeta graduada. Feche o frasco e agite durante cerca de três minutos, até que a maior parte dos sólidos se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos que não se dissolveram se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter o fármaco numa concentração total de 10 mg por ml e ser rotulada como "*Solução Stock do Padrão de Tetraciclina*". Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante, límpido ou turvo.

### IV. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 100% (CONCENTRAÇÃO LIMITE SUPERIOR DE TRABALHO)

Pipete 1 ml da solução stock do padrão para um frasco de 10 ml e adicione 3 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter o fármaco numa concentração total de 2,5 mg por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Tetraciclina a 100%*".

Esta solução padrão de trabalho com concentração limite superior representa um medicamento de alta qualidade que contém 100% de cloridrato de tetraciclina.

### V. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 80% (CONCENTRAÇÃO LIMITE MÍNIMO DE TRABALHO)

Pipete 1 ml da solução stock do padrão para um frasco de 10 ml e adicione 4 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter o fármaco numa concentração total de 2,0 mg por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Tetraciclina a 80%*".

Esta solução padrão de trabalho com concentração limite inferior representa num medicamento de fraca qualidade e contém apenas 80% do cloridrato de tetraciclina referido no rótulo do produto. Nesta investigação, este nível de fármaco representa o limite mínimo aceitável para tal produto.

### VI. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE AMOSTRA DE UM PRODUTO DITO CONTER 250 MG DE CLORIDRATO DE TETRACICLINA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula de uma amostra do produto. Como anteriormente, os comprimidos devem ser embrulhados numa folha de alumínio e esmagados até ficarem em pó fino. Transfira todo o pó obtido para um frasco de vidro de laboratório de 40 ml. Deve transferir directamente para o frasco o pó obtido de uma cápsula, adicionando, de seguida, o invólucro. Para proceder à extração, adicione 25 ml de metanol, usando uma pipeta graduada, feche o frasco e agite-o durante cerca de três minutos, até que a maior parte dos sólidos se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos que não se dissolveram se depositem no fundo do frasco.

### 500 MG DE CLORIDRATO DE TETRACICLINA POR UNIDADE

Extraia o pó obtido da amostra de um comprimido ou de uma cápsula com 50 ml de metanol, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 100 ml, como recipiente para amostras. Continue como indicado anteriormente.

Todas as soluções stock de amostra preparadas devem, no fim do procedimento, conter o fármaco numa concentração total de 10 mg por ml e serem rotuladas como "*Solução Stock da Amostra de Tetraciclina*". Prepare novas soluções para cada teste. Continue a usar os líquidos sobrenadantes, límpidos ou turvos.

#### VII. PREPARATION OF THE WORKING SAMPLE SOLUTION

Pipette 1 ml of the stock sample solution into a 10-ml vial and add 3 ml of methanol. Close and shake the vial and label as '*Tetracycline Working Sample Solution*'.

The expected concentration of tetracycline hydrochloride in this working sample solution is 2.5 mg per ml and should match the concentration of tetracycline of the higher working standard solution produced above.

#### VIII. SPOTTING

Mark an origin line parallel to and about 1.5 cm from the bottom edge of the chromatoplate and apply 2 µl of each test and standard solution as shown in the picture opposite using the microcapillary pipettes supplied.

Up to five spots can be placed on a plate. Check the uniformity of all spots using UV light of 254 nm. All spots should be circular in shape and equally spaced across the origin line. Although their intensities might differ, their diameters never should. Different intensities are due to residual amounts of tablet and capsule excipients or different drug concentrations in the sample solutions. A difference in spot size, however, relates to poor spotting. Repeat this step if homogeneous spotting is not achieved first time.

#### IX. DEVELOPMENT

A: When working with silica plates use as mobile phase a solvent mix consisting of 10 ml of methanol, 5 ml of acetone and 5 ml of an aqueous magnesium chloride solution\*.

B: When working with cellulose plates use as mobile phase a solvent mix consisting of 2 ml of glacial acetic acid and 20 ml of an aqueous magnesium chloride solution\*\*.

Select the mobile phase and transfer the appropriate solvents into the TLC developing chamber. Close the chamber and shake thoroughly. Any precipitate observed during the mixing of solvents will now disappear. Line the chamber's wall with filter paper and wait for about 15 minutes thus ensuring saturation of the chamber with solvent vapour. Carefully place the loaded TLC plate into the jar. Close the jar and develop the chromatoplate until the solvent front has moved about three-quarters of the length of the plate, the developing time being about 30 minutes. Remove the plate from the chamber, mark the solvent front and allow any excess solvent to evaporate using a hot plate if necessary.

\*Take three full spatulas of magnesium chloride hexahydrate and one full spatula of EDTA and dissolve in 10 ml of water. Shake and wait till all the solids are completely dissolved.

\*\* Prepare 20 ml of the same solution when working with cellulose plates.

#### X. DETECTION

Dry off all residual solvent and observe the chromatoplate in the dark under of detection for both, identification and quantification purposes. Further UV light of 366 nm using the battery-driven lamp supplied. Use this method verification of drug identity and content can be achieved when observing the plate at daylight after heating on a hot plate.

## VII. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AMOSTRA DE TRABALHO

Pipete 1 ml da solução stock de amostra para um frasco de 10 ml e adicione 3 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. Rotule-o como “*Solução Amostra de Trabalho de Tetraciclina*”.

Estima-se que a concentração de cloridrato de tetraciclina nesta solução amostra de trabalho seja de 2,5 mg por ml e deve ser igual à concentração de tetraciclina na solução padrão de trabalho com concentração limite superior preparada anteriormente.

## VIII. APLICAÇÃO

Trace uma linha paralela à base da placa cromatográfica, a cerca de 1,5 cm da base, e aplique 2 µl de cada solução, de padrão e de teste, como ilustrado na figura do lado oposto, usando os microcapilares de vidro fornecidos.

Podem ser aplicadas cinco manchas numa placa. Confirme a uniformidade das manchas através da luz ultravioleta de 254 nm. Todas as manchas devem ser circulares e separadas entre si por uma distância igual ao longo da linha de base. Apesar de as suas intensidades poderem diferir, o seu diâmetro deve ser sempre igual. As diferentes intensidades devem-se a diferentes quantidades residuais de excipientes dos comprimidos e cápsulas ou devido a diferentes concentrações do fármaco na solução de amostra. Porém, se as manchas apresentarem um tamanho diferente deve-se a uma incorrecta técnica de aplicação. Repita este passo, se não conseguir uma aplicação homogénea à primeira tentativa.

## IX. ELUIÇÃO

A: Aquando do uso de placas de sílica utilize, como fase móvel, uma mistura de solventes contendo 10 ml de metanol, 5 ml de acetona e 5 ml de solução aquosa de cloreto de magnésio \*.

B: Aquando do uso de placas de celulose utilize, como fase móvel, uma mistura de solventes contendo 2 ml de ácido acético glacial e 20 ml de solução aquosa de cloreto de magnésio \*\*.

Escolha a fase móvel e transfira os solventes apropriados para a câmara de eluição de CCF. Feche a câmara e misture bem. Quaisquer precipitados observados durante a mistura de solventes irão, agora, desaparecer. Revista a parede da câmara com papel de filtro e aguarde cerca de 15 minutos para assegurar a saturação da câmara com o vapor do solvente. Coloque, com cuidado, a placa de CCF contendo os compostos no frasco. Feche o frasco e elua a placa cromatográfica antes que a frente de solvente tenha percorrido três-quartos do comprimento da placa, tendo em conta que a eluição da placa demora cerca de 30 minutos. Remova a placa da câmara, marque a frente solvente e deixe que o excesso de solvente se evapore. Se for necessário, use a placa de aquecimento.

\* Retire três espátulas cheias de cloreto de magnésio hexahidratado e uma espátula cheia de EDTA e dissolva em 10 ml de água. Agite e aguarde até que todos os sólidos se tenham dissolvido completamente.

\*\* Prepare 20 ml da mesma solução aquando do uso de placas de celulose.

## X. REVELAÇÃO

Deixe que todos os resíduos do solvente evaporem da placa cromatográfica e observe-a no escuro, com luz ultravioleta, como método de detecção, para efeitos de identificação e quantificação. Observe a placa, posteriormente, com luz ultravioleta de 366 nm, usando a lanterna a pilhas fornecida. Use este método de detecção, para efeitos de identificação e quantificação. Posterior verificação da autenticidade e do teor do fármaco, será feita através da observação da placa à luz do dia após aquecimento.

XI. CHROMATOPLATE MADE OF SILICA GEL OBSERVED AT DAYLIGHT AFTER HEATING

Run No.1: Tetracycline's upper working limit representing 100 % of total drug.

Run No.2: A drug product of good quality.

Run No.3: A drug product of poor quality.

Run No.4: Tetracycline's lower working limit representing 80 % of total drug.

(Solvent front)

Principal spot

(Origin line)

XII. OBSERVATIONS MADE AT 366 NM IN THE DARK BEFORE HEATING

On silica plates, a spot with a strong yellow fluorescence at a travel distance of about 0.62 indicates the presence of tetracycline in the test solution. On cellulose plates, the tailing disappears and tetracycline travels much further the relative retention factor being about 0.76 now (see page 31). If there is no fluorescence observed then there is no tetracycline in the test solution. Additional strong spots generated by the test solution would point at other drugs or tetracycline degradation, the latter case being more likely when associated with a smaller principal spot. Auxiliary agents incorporated in the different tablet or capsule formulations might cause some fainter spots emerging near or on the origin line.

XIII. OBSERVATIONS MADE AT DAYLIGHT ON SILICA PLATES DURING AND AFTER HEATING

When exposing developed silica gel plates to heat, all tetracycline spots already observed at 366 nm are now changing their colour from soft yellow to orange and even red. When removing the plate from the hot point, the colour returns to soft yellow at ambient temperature. The colour change can be initiated back and forward several times. Still observe the plate when cooling off. Spots reflecting poor quality products will disappear first gradually followed by the reference spots representing a drug content of an 80 and 100 percent, respectively.

XIV. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

The tetracycline spot in the chromatogram obtained with the test solution must correspond in terms of colour, size, intensity, shape and travel distance to that in the chromatogram obtained with the lower and higher standard solution. This result must be obtained for each TLC system and method of detection. If this is not achieved, repeat the run from scratch with a second sample. Reject the batch if the drug content cannot be verified in a third run. For a second opinion, refer additional samples to a fully-fledged drug quality control laboratory. Retain samples and put the batch on quarantine until a final decision on rejection or release has been taken.

#### XI. PLACA CROMATOGRÁFICA DE GEL DE SÍLICA OBSERVADA À LUZ DO DIA APÓS AQUECIMENTO DA PLACA

1ª corrida: Concentração limite superior de trabalho de tetraciclina, representando 100% do fármaco.

2ª corrida: Medicamento de boa qualidade.

3ª corrida: Medicamento de fraca qualidade.

4ª corrida: Concentração limite inferior de trabalho de tetraciclina, representando 80% do fármaco.

(Frente solvente)

Mancha principal

(Linha de base)

#### XII. OBSERVAÇÃO A 366 NM NO ESCURO ANTES DO AQUECIMENTO DA PLACA

Nas placas de sílica, uma mancha com uma fluorescência amarela forte e uma distância relativa percorrida de cerca de 0,62 indica a presença de tetraciclina na solução de teste. Nas placas de celulose, o rasto das manchas desaparece e a tetraciclina apresenta uma distância relativa percorrida bastante maior, sendo, neste caso, o factor de retenção relativa de cerca de 0,76 (ver página 31). Se não observar qualquer fluorescência, a solução de teste não contém tetraciclina. Manchas fortes adicionais formadas pela solução de teste podem indicar a presença de outros fármacos ou a degradação de tetraciclina, estando este último caso associado a uma mancha principal mais pequena. Os agentes auxiliares incorporados nas diferentes formulações dos comprimidos e cápsulas podem originar manchas mais fracas, perto da linha de base ou sobre esta.

#### XIII. OBSERVAÇÃO À LUZ DO DIA COM PLACAS DE SILICA DURANTE E APÓS O AQUECIMENTO DAS MESMAS

Aquando da exposição das placas de gel de sílica ao calor, todas as manchas de tetraciclina anteriormente observadas a 366 nm mudam de amarelo claro para laranja e, eventualmente, vermelho. Ao remover a placa da fonte de calor, a cor das manchas retorna a amarelo claro à temperatura ambiente. A mudança de cor pode ser provocada diversas vezes. Observe a placa durante o arrefecimento. As manchas que denunciam um produto de fraca qualidade desaparecerão em primeiro lugar, gradualmente, seguidas pelas manchas de referência que representam um teor de fármaco de 80 e 100 por cento, respectivamente.

#### XIV. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

A mancha de tetraciclina no cromatograma obtida através da solução de teste deve corresponder, em termos de cor, tamanho, intensidade, forma e distância relativa percorrida, às manchas do cromatograma obtidas com as soluções padrão de trabalho com concentração limite inferior e superior. Deve obter este resultado para cada sistema de CCF e método de detecção. Se não conseguir obter este resultado, repita o teste do início com uma segunda amostra. Se não conseguir verificar o teor do fármaco num terceiro teste, rejeite o lote. Para obter uma segunda opinião, envie outras amostras para um laboratório profissional de controlo de qualidade de medicamentos. Guarde algumas amostras e coloque o lote em quarentena até que se tome uma decisão final sobre a sua rejeição ou libertação.

## Zidovudine (including fixed-dose combinations)

Primary Screening via Visual Inspection and Disintegration Test

### I. VISUAL INSPECTION

Search for deficiencies on labelling, packaging and dosage forms as described in the opening chapters on general methods and operations. Write down all product particulars using the reporting form as a guide. Each tablet or capsule usually contains a 100, 250 or 300 mg of zidovudine. Frequently, zidovudine is combined with lamivudine in a single tablet or capsule formulation. Fixed-dose combinations with other antiretrovirals are known to exist. Solutions for oral and parenteral administration are usually presented in strengths of 10 mg of zidovudine per ml.

### II. DISINTEGRATION TEST

All quick release zidovudine tablets and capsules must pass the disintegration test as described in the opening chapters on general methods and operations. They should disintegrate in water at 37 °C in less than 30 minutes. It's a major defect if a drug product doesn't pass this test.

### III. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

Drug products from unusually cheap sources, drug products with missing or incorrect accompanying documents and drug products with defective dosage forms, packaging or with incomplete, damaged or missing labels or with labels written in a foreign language should be subjected to a thin layer chromatographic test.

Verification of Drug Identity and Content via Thin Layer Chromatography

### I. PRINCIPLE

Zidovudine solutions are diluted and tablets or capsules are extracted with water and determined by TLC with reference to an authentic secondary standard. When combined with lamivudine, both compounds can be extracted and analysed simultaneously.

### II. EQUIPMENT AND REAGENTS

1. Pestle
2. Aluminium foil
3. Funnel
4. Label tape
5. Marker pen
6. Pencil
7. 10-ml vials
8. Set of straight pipettes (1 to 25 ml)
9. Set of laboratory glass bottles (25 to 100 ml)
10. Merck TLC aluminium plates pre-coated with silica gel 60 F 254, size 5x10 cm
11. Glass microcapillaries (2- $\mu$ l filling capacity)
12. TLC developing chamber (500-ml jar)
13. Hot plate
14. Filter paper
15. Pair of scissors
16. Pair of tweezers



## Zidovudina (incluindo produtos com combinações de doses fixas)

Triagem Primária com Inspeção Visual e Teste de Desagregação

### I. INSPECÇÃO VISUAL

Procure deficiências na rotulagem, embalagem e nas formas de dosagem, tal como descrito nos capítulos iniciais sobre os métodos e procedimentos gerais. Registe todos os pormenores do produto, usando os formulários para relatório como orientação. Cada comprimido ou cápsula normalmente contém 100, 250 ou 300 mg de zidovudina. A zidovudina é, frequentemente, associada à lamivudina numa formulação única de comprimido ou cápsula. Sabe-se que existem combinações de doses fixas com outros fármacos anti-retrovirais. As soluções para administração oral e parentérica são, normalmente, apresentadas em dosagens de 10 mg de zidovudina por ml.

### II. TESTE DE DESAGREGAÇÃO

Todos os comprimidos e cápsulas de zidovudina de libertação rápida devem passar o teste de desagregação, tal como se descreve nos capítulos iniciais sobre métodos e procedimentos gerais. Devem desagregar-se em água a 37 °C em menos de 30 minutos. Se o fármaco não passar este teste, constitui um defeito importante.

### III. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

Produtos farmacêuticos a preços invulgarmente baratos, medicamentos com documentos de apoio em falta ou incorrectos e medicamentos com formas de dosagem irregulares, embalagens deficientes ou rótulos incompletos, danificados ou ausentes ou com rótulos escritos em língua estrangeira, devem ser submetidos a um teste cromatográfico em camada fina.

Verificação da Identidade e Teor do Fármaco através da Cromatografia em Camada Fina

### I. PRINCÍPIO

As soluções de zidovudina são diluídas e os comprimidos ou cápsulas são extraídos com água e determinadas por CCF, tendo em conta os padrões secundários de referência. Aquando da associação à lamivudina, ambos os compostos podem ser simultaneamente extraídos e analisados.

### II. EQUIPAMENTO E REAGENTES

1. Pilão
2. Folha de alumínio
3. Funil
4. Fita adesiva
5. Marcador
6. Lápis
7. Frascos de 10 ml
8. Conjunto de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
9. Conjunto de frascos de vidro de laboratório (25 a 100 ml)
10. Placas de alumínio de CCF da Merck previamente revestidas de gel de sílica 60F 254, tamanho 5x10 cm
11. Microcapilares de vidro (capacidade de 2 µl)
12. Câmara de eluição de CCF (frasco de 500 ml)
13. Placa de aquecimento
14. Papel de filtro
15. Tesoura
16. Pinças

(Continuação da página 192 do texto de partida)

17. UV light of 254 nm
18. Iodine chamber
19. Ethyl acetate
20. Methanol
21. Toluene
22. Water
23. Secondary reference standard, for example, zidovudine 300 mg tablets

(Continuação da tradução da página 192)

17. Luz ultravioleta de 254 nm
18. Câmara de iodo
19. Acetato de etilo
20. Metanol
21. Tolueno
22. Água
23. Padrão secundário de referência, por exemplo comprimidos de zidovudina de 300 mg

### III. PREPARATION OF THE STOCK STANDARD SOLUTION

The preparation of the stock standard solution requires an authentic drug product for reference purposes, for example, tablets containing 300 mg of zidovudine. Wrap up one reference tablet into aluminium foil and crush it down to a fine powder using a pestle. Carefully empty the aluminium foil over a 100-ml laboratory glass bottle and wash down all residual solids with 60 ml of water using a straight pipette. Close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 5 mg of total drug per ml and be labelled as '*Zidovudine Stock Standard Solution*'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquid.

### IV. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 100% (UPPER WORKING LIMIT)

This higher working standard solution represents a drug product of good quality containing 100 % of zidovudine.

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 3 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 1.25 mg of total drug per ml and be labelled as '*Zidovudine Working Standard Solution 100%*'.

### V. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 80% (LOWER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 4 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 1.0 mg of total drug per ml and be labelled as '*Zidovudine Working Standard Solution 80%*'.

This lower working standard solution represents a drug product of poor quality containing just 80% of the amount of zidovudine as stated on the product's label. In the current investigation, this drug level represents the lower acceptable limit for a given product.

### VI. PREPARATION OF THE STOCK SAMPLE SOLUTION FROM SOLID DOSAGE FORMS CLAIMING TO CONTAIN 100 MG OF ZIDOVUDINE PER UNIT

Take one whole tablet or capsule from an appropriate drug product sampled in the field. As usual, tablets are wrapped up into aluminium foil and crushed down to a fine powder. Transfer all the powder obtained into a 25-ml laboratory glass bottle. Powder obtained from a sample capsule should be transferred directly into the bottle adding the cap and body shells last. For extraction, add 20 ml of water using a straight pipette, close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid.

#### SOLID DOSAGE FORMS CLAIMING TO CONTAIN 250 MG OF ZIDOVUDINE PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 50 ml of water using a straight pipette and a 100-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

#### SOLID DOSAGE FORMS CLAIMING TO CONTAIN 300 MG OF ZIDOVUDINE PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 60 ml of water using a straight pipette and a 100-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

### III. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DO PADRÃO

A preparação da solução stock do padrão requer um medicamento autêntico para servir de referência, por exemplo comprimidos de 300 mg de zidovudina. Embrulhe um comprimido de referência em folha de alumínio e esmague-o, até ficar em pó fino, usando o pilão. Transfira, cuidadosamente, o conteúdo da folha de alumínio para um frasco de vidro de laboratório de 100 ml e lave o resto dos resíduos sólidos com 60 ml de água com uma pipeta graduada. Feche o frasco e agite durante cerca de três minutos, até que a maior parte dos sólidos se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos que não se dissolveram se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter o fármaco numa concentração total de 5 mg por ml e ser rotulada como "*Solução Stock do Padrão de Zidovudina*". Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante, límpido ou turvo.

### IV. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 100% (CONCENTRAÇÃO LIMITE SUPERIOR DE TRABALHO)

Esta solução padrão de trabalho com concentração limite superior representa um medicamento de alta qualidade que contém 100% de zidovudina.

Pipete 1 ml da solução stock do padrão para um frasco de 10 ml e adicione 3 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter o fármaco numa concentração total de 1,25 mg por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Zidovudina a 100%*".

### V. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 80% (CONCENTRAÇÃO LIMITE MÍNIMO DE TRABALHO)

Pipete 1 ml da solução stock do padrão para um frasco de 10 ml e adicione 4 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter o fármaco numa concentração total de 1 mg por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Zidovudina a 80%*".

Esta solução padrão de trabalho com concentração limite inferior representa um medicamento de fraca qualidade e contém apenas 80% da zidovudina referida no rótulo do produto. Nesta investigação, este nível de fármaco representa o limite mínimo aceitável para tal produto.

### VI. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DE AMOSTRA DE FORMAS DE DOSAGEM SÓLIDAS DITAS CONTER 100 MG DE ZIDOVUDINA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula de uma amostra do produto. Como anteriormente, os comprimidos devem ser embrulhados numa folha de alumínio e esmagados até ficarem em pó fino. Transfira todo o pó obtido para um frasco de vidro de laboratório de 25 ml. Deve transferir directamente para o frasco o pó obtido de uma cápsula, adicionando, de seguida, o invólucro. Para proceder à extracção, adicione 20 ml de água, usando uma pipeta graduada, feche o frasco e agite-o durante cerca de três minutos, até que a maior parte dos sólidos se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos que não se dissolveram se depositem no fundo do frasco.

#### FORMAS DE DOSAGEM SÓLIDAS DITAS CONTER 250 MG DE ZIDOVUDINA POR UNIDADE

Extraia o pó obtido da amostra de um comprimido ou de uma cápsula com 50 ml de água, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 100 ml, como recipiente para amostras. Continue como indicado anteriormente.

#### FORMAS DE DOSAGEM SÓLIDAS DITAS CONTER 300 MG DE ZIDOVUDINA POR UNIDADE

Extraia o pó obtido da amostra de um comprimido ou de uma cápsula com 60 ml de água, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 100 ml, como recipiente para amostras. Continue como indicado anteriormente.

#### LIQUID DOSAGE FORMS CLAIMING TO CONTAIN 10 MG OF ZIDOVUDINE PER ML

Transfer 2 ml of the oral or parenteral solution presented into a 10-ml laboratory glass bottle and dilute with 2 ml of water using each time appropriate straight pipettes. Close the bottle and shake for mixing.

All stock sample solutions produced should finally contain 5 mg of total drug per ml and be labelled as "Zidovudine Stock Sample Solution". Freshly prepare these solutions for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquids.

#### VII. PREPARATION OF THE WORKING SAMPLE SOLUTION

Pipette 1 ml of the stock sample solution into a 10-ml vial and add 3 ml of methanol. Close and shake the vial and label as "Zidovudine Working Sample Solution".

The expected concentration of zidovudine in this working sample solution is 1.25 mg per ml and should match the concentration of zidovudine of the higher working standard solution produced above.

#### VIII. SPOTTING

Mark an origin line parallel to and about 1.5 cm from the bottom edge of the chromatoplate and apply 2 µl of each test and standard solution as shown in the picture opposite using the microcapillary pipettes supplied.

Up to five spots can be placed on a plate. Check the uniformity of all spots using UV light of 254 nm. All spots should be circular in shape and equally spaced across the origin line. Although their intensities might differ, their diameters never should. Different intensities are due to residual amounts of tablet and capsule excipients or different drug concentrations in the sample solutions. A difference in spot size, however, relates to poor spotting. Repeat this step if homogeneous spotting is not achieved first time.

Note that the filling of the microcapillary pipettes might take some time when handling aqueous sample solutions. As traces of water are causing spot tailing, completely dry off all extraction solvent before chromatoplate development using the hot plate supplied.

#### IX. DEVELOPMENT

Pipette 11 ml of ethyl acetate, 5 ml of methanol and 4 ml of toluene into the jar being used as TLC developing chamber. Close the chamber and mix thoroughly. Line the chamber's wall with filter paper and wait for about 15 minutes thus ensuring saturation of the chamber with solvent vapour. Carefully place the loaded TLC plate into the jar. Close the jar and develop the chromatoplate until the solvent front has moved about three-quarters of the length of the plate, the developing time being about 15 minutes. Remove the plate from the chamber, mark the solvent front and allow any excess solvent to evaporate using a hot plate if necessary.

#### X. DETECTION

Dry off all residual solvent and observe the chromatoplate under UV light of 254 nm using the battery-driven lamp supplied. Use this method of detection for both, identification and quantification purposes. Further verification of drug identity and content can be achieved when observing the plate at daylight after iodine staining.

#### FORMAS DE DOSAGEM LÍQUIDAS DITAS CONTER 10 MG DE ZIDOVUDINA POR ML

Transfira 2 ml da solução oral ou parentérica apresentada para um frasco de vidro de laboratório de 10 ml e dilua com 2 ml de água. Utilize pipetas graduadas nos dois procedimentos. Feche o frasco e agite para proceder à mistura.

Todas as soluções stock de amostra preparadas devem, no fim do procedimento, conter o fármaco numa concentração total de 5 mg por ml e serem rotuladas como "*Solução Stock da Amostra de Zidovudina*". Prepare novas soluções para cada teste. Continue a usar os líquidos sobrenadantes, límpidos ou turvos.

#### VII. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AMOSTRA DE TRABALHO

Pipete 1 ml da solução stock de amostra para um frasco de 10 ml e adicione 3 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. Rotule-o como "*Solução Amostra de Trabalho de Zidovudina*".

Estima-se que a concentração de zidovudina nesta solução de amostra seja de 1,25 mg por ml e deve ser igual à concentração de zidovudina na solução padrão de trabalho com concentração limite superior preparada anteriormente.

#### VIII. APLICAÇÃO

Trace uma linha paralela à base da placa cromatográfica, a cerca de 1,5 cm da base, e aplique 2 µl de cada solução, de padrão e de teste, como ilustrado na figura do lado oposto, usando os microcapilares de vidro fornecidos.

Podem ser aplicadas cinco manchas numa placa. Confirme a uniformidade das manchas através da luz ultravioleta de 254 nm. Todas as manchas devem ser circulares e separadas entre si por uma distância igual ao longo da linha de base. Apesar de as suas intensidades poderem diferir, o seu diâmetro deve ser sempre igual. As diferentes intensidades devem-se devido a diferentes quantidades residuais de excipientes dos comprimidos e cápsulas ou devido a diferentes concentrações de fármacos na solução de amostra. Porém, se as manchas apresentarem um tamanho diferente deve-se a uma incorrecta técnica de aplicação. Repita este passo, se não conseguir uma aplicação homogénea à primeira tentativa.

Tenha em conta que encher os microcapilares de vidro pode demorar algum tempo aquando da utilização de soluções de amostra aquosas. Para evitar que resíduos de água originem manchas arrastadas, utilize a placa de aquecimento fornecida para secar o solvente de extracção antes da eluição da placa cromatográfica.

#### IX. ELUIÇÃO

Pipete 11 ml de acetato de etilo, 5 ml de metanol e 4 ml de tolueno para o frasco que está a ser usado como câmara de eluição de CCF. Feche a câmara e misture bem. Revista a parede da câmara com papel de filtro e aguarde cerca de 15 minutos para assegurar a saturação da câmara com o vapor do solvente. Coloque, com cuidado, a placa de CCF contendo os compostos no frasco. Feche o frasco e elua a placa cromatográfica antes que a frente de solvente tenha percorrido três-quartos do comprimento da placa, tendo em conta que a eluição da placa demora cerca de 15 minutos. Remova a placa da câmara, marque a frente solvente e deixe que o excesso de solvente se evapore. Se for necessário, use a placa de aquecimento.

#### X. REVELAÇÃO

Deixe que todos os resíduos do solvente evaporem da placa cromatográfica e observe-a com luz ultravioleta de 254 nm, usando a lanterna a pilhas fornecida. Use este método de detecção para efeitos de identificação e de quantificação. Para verificação adicional da autenticidade e teor do fármaco, observe a placa à luz do dia após a coloração com iodo.

XI. CHROMATOPLATE OBSERVED UNDER UV LIGHT OF 254 NM

Run No.1: Zidovudine's upper working limit representing 100% of total drug.

Run No.2: A drug product of good quality.

Run No.3: A drug product of poor quality.

Run No.4: Zidovudine's lower working limit representing 80% of total drug.

(Solvent front)

Zidovudine's principal spot

(Origin line)

XII. OBSERVATIONS MADE AT 254 NM

A strong blue-violet spot at a travel distance of about 0.61 indicates the presence of zidovudine in the test solution. When combined with lamivudine, a second spot will become visible at a travel distance of about 0.21. Additional strong spots generated by the test solution would point at other drugs or zidovudine degradation, the latter case being more likely when associated with a smaller principal spot. Auxiliary agents incorporated in the different tablet or capsule formulations might cause some fainter spots emerging near or on the origin line.

XIII. OBSERVATIONS MADE AT DAYLIGHT AFTER IODINE STAINING

When exposing the chromatoplate to iodine vapour, all zidovudine spots already observed at 254 nm are now turning orange-brown. Still observe the plate when iodine evaporates already. Spots reflecting poor quality products will disappear first gradually followed by the reference spots representing a drug content of an 80 and 100 percent, respectively.

XIV. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

The zidovudine spot in the chromatogram obtained with the test solution must correspond in terms of colour, size, intensity, shape and travel distance to that in the chromatogram obtained with the lower and higher standard solution. This result must be obtained for each method of detection. If this is not achieved, repeat the run from scratch with a second sample. Reject the batch if the drug content cannot be verified in a third run. For a second opinion, refer additional samples to a fully-fledged drug quality control laboratory. Retain samples and put the batch on quarantine until a final decision on rejection or release has been taken.



#### XI. PLACA CROMATOGRÁFICA OBSERVADA SOB LUZ UV DE 254 NM

1ª corrida: Concentração limite superior de trabalho de zidovudina, representando 100% do fármaco.

2ª corrida: Medicamento de boa qualidade.

3ª corrida: Medicamento de fraca qualidade.

4ª corrida: Concentração limite inferior de trabalho de zidovudina, representando 80% do fármaco.

(Frente solvente)

Mancha principal de zidovudina

(Linha de base)

#### XII. OBSERVAÇÃO A 254 NM

Uma mancha azul-violeta forte com uma distância relativa percorrida de cerca de 0,61 indica a presença de zidovudina na solução de teste. Quando a zidovudina é associada a lamivudina, uma segunda mancha tornar-se-á visível a uma distância relativa percorrida de cerca de 0,21. Manchas fortes adicionais formadas pela solução de teste podem indicar a presença de outros fármacos ou a degradação de zidovudina, estando este último caso associado a uma mancha principal mais pequena. Os agentes auxiliares incorporados nas diferentes formulações dos comprimidos ou cápsulas podem originar manchas mais fracas, perto da linha de base ou sobre esta.

#### XIII. OBSERVAÇÃO À LUZ DO DIA APÓS COLORAÇÃO COM IODO

Aquando da exposição da placa cromatográfica ao vapor de iodo, todas as manchas de zidovudina, anteriormente observadas a 254 nm, tornam-se laranja-acastanhadas. Observe a placa durante a evaporação do iodo. As manchas que denunciam um produto de fraca qualidade desaparecerão em primeiro lugar, gradualmente, seguidas pelas manchas de referência que representam um teor de fármaco de 80 e 100 por cento, respectivamente.

#### XIV. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

A mancha de zidovudina no cromatograma obtida através da solução de teste deve corresponder, em termos de cor, tamanho, intensidade, forma e distância relativa percorrida, às manchas do cromatograma obtidas com as soluções padrão de trabalho com concentração limite inferior e superior. Deve obter este resultado para cada método de detecção. Se não conseguir obter este resultado, repita o teste do início com uma segunda amostra. Se não conseguir verificar o teor do fármaco num terceiro teste, rejeite o lote. Para obter uma segunda opinião, envie outras amostras para um laboratório profissional de controlo de qualidade de medicamentos. Guarde algumas amostras e coloque o lote em quarentena até que se tome uma decisão final sobre a sua rejeição ou libertação.

## Summary Table of TLC Test Procedures

The table below summarizes all TLC test procedures presented in full length in the previous chapter. This table is a valuable tool for people on an advanced working level not needing a detailed guide on operation procedures day-by-day anymore. The summary table might help also in organizing the work when performing TLC analysis on a routine basis.

Merck TLC plates pre-coated with silica gel 60 F254 will be used as stationary phase in all cases. Spotting volume is always 2 µl for which appropriate microcapillaries are supplied. Where indicated, mobile phases cater for fixed-dose combination products (combos), too.

Active Ingredient	Final Working Concentration	Extraction Medium	Mobile Phase	Method of Detection
Acetylsalicylic acid (Aspirin)	2.5 mg/ml	Methanol	20 ml of ethyl acetate 5 ml of methanol 10 drops of glacial acetic acid	UV of 254 nm, iodine staining
Aminophylline	2.5 mg/ml	Water	14 ml of acetone 7 ml of toluene	UV of 254 nm
Amodiaquine - free base	0.48 mg/ml	Methanol (or HCL 3.6%)	20.0 ml of methanol 5.0 ml of ethyl acetate 0.5 ml of conc. ammonia sol.	UV of 254 nm
- HCL	0.625 mg/ml	Water		
Amoxicillin	2.5 mg/ml	Acidified aqueous acetone solution	15 ml of ethyl acetate 5 ml of glacial acetic acid 5 ml of water	UV of 366 nm, iodine staining
Ampicillin	2.5 mg/ml	See amoxicillin	See amoxicillin	UV of 366 nm, iodine staining
Artemether (incl. combos)	2 mg/ml	Acetone	18 ml of toluene 4 ml of ethyl acetate 2 ml of glacial acetic acid	Staining with sulphuric acid plus heat
Artesunate	5 mg/ml	Methanol	18.0 ml of ethyl acetate 4.0 ml of acetone 0.1 ml of glacial acetic acid	Staining with sulphuric acid plus heat
Cephalexin	1.25 mg/ml	Methanol	12.5 ml of ethyl acetate 5.0 ml of acetone 5.0 ml of glacial acetic acid 2.5 ml of water	UV of 254 nm, iodine staining
Chloramphenicol	2.5mg/ml	Methanol	15 ml of ethyl acetate 5 ml of toluene 3 ml of methanol	UV of 254 nm
Chloroquine - phosphate - sulphate	2.5 mg/ml 2.0 mg/ml (each equivalent to about 1.5 mg of chloroquine free base/ml)	Water	See amodiaquine	UV of 254 nm, iodine staining
Ciprofloxacin	0.625 mg/ml	Water	10.0 ml of methanol 5.0 ml of acetone 2.5 ml of toluene 5.0 ml of conc. ammonia sol	UV of 254 nm

Resumo dos Procedimentos do Teste por CCF

A tabela a seguir sumariza os procedimentos do teste por CCF apresentados na totalidade dos capítulos anteriores. Esta tabela é uma ferramenta útil para técnicos com um nível avançado de conhecimento que já não necessitam de um manual detalhado sobre os procedimentos operacionais para o trabalho do dia-a-dia. A utilização desta tabela pode ajudar, igualmente, na organização do trabalho rotineiro da análise por CCF.

As placas de CCF previamente revestidas de gel de sílica 60 F 254 da Merck serão usadas, em todos os casos, como fase estacionária. O volume da aplicação da amostra é sempre de 2 µl, para o qual são fornecidas pipetas apropriadas com microcapilares. As fases móveis fornecem ainda indicações para os produtos presentes em associação (assoc.).

Ingrediente activo	Concentração final	Meio de extracção	Fase Móvel	Método de Detecção
Ácido Acetilsalicílico (Aspirina)	2,5 mg/ml	Metanol	20 ml de acetato de etilo 5 ml de metanol 10 gotas de ácido acético glacial	Luz UV de 254 nm, coloração com iodo
Aminofilina	2,5 mg/ml	Água	14 ml de acetona 7 ml de tolueno	Luz UV de 254 nm
Amodiaquina - base livre	0,48 mg/ml	Metanol (ou HCL a 3,6%)	20 ml de metanol 5 ml de acetato de etilo 0,5 ml de sol. conc. amoníaco*	Luz UV de 254 nm
- HCL	0,625 mg/ml	Água		
Amoxicilina	2,5 mg/ml	Solução aquosa acidificada de acetona	15 ml de acetato de etilo 5 ml de ácido acético glacial 5 ml de água	Luz UV de 366 nm, coloração com iodo
Ampicilina	2,5 mg/ml	Ver amoxicilina	Ver amoxicilina	Luz UV de 366 nm, coloração com iodo
Arteméter (incl. Assoc.)	2 mg/ml	Acetona	18 ml de tolueno 4 ml de acetato de etilo 2 ml de ácido acético glacial	Coloração com ácido sulfúrico e aplicação de calor
Artesunato	5 mg/ml	Metanol	18 ml de acetato de etilo 4 ml de acetona 0,1 ml de ácido acético glacial	Coloração com ácido sulfúrico e aplicação de calor
Cefalexina	1,25 mg/ml	Metanol	12,5 ml de acetato de etilo 5 ml de acetona 5 ml de ácido acético glacial 2,5 ml de água	Luz UV de 254 nm, coloração com iodo
Cloranfenicol	2,5mg/ml	Metanol	15 ml de acetato de etilo 5 ml de tolueno 3 ml de metanol	Luz UV de 254 nm
Cloroquina - fosfato - sulfato	2,5 mg/ml 2 mg/ml (cada um equivalente a cerca de 1,5 mg de cloroquina por ml)	Água	Ver amodiaquina	Luz UV de 254 nm, coloração com iodo
Ciprofloxacina	0,625 mg/ml	Água	10 ml de metanol 5 ml de acetona 2,5 ml de tolueno 5 ml de sol. conc. de amoníaco	Luz UV de 254 nm

\*Solução concentrada de amoníaco

Active Ingredient	Final Working Concentration	Extraction Medium	Mobile Phase	Method of Detection
Cloxacillin	6.25 mg/ml	Water	See amoxicillin	Iodine staining
Didanosine	1.25 mg/ml	Water	13.0 ml of methanol 4.0 ml of toluene 3.0 ml of ethyl acetate 0.2 ml of conc. ammonia sol.	UV of 254 nm, iodine staining
Erythromycin	12.5 mg/ml	Methanol	See amodiaquine	Iodine staining
Ethambutol HCL (incl. combos)	1.25 mg/ml	Methanol	12.0 ml of methanol 10.0 ml of toluene 0.5 ml of conc. ammonia sol.	Ninhydrin staining
Furosemide	2 mg/ml	Acetone	21 ml of methanol 2 ml of acetone 2 ml of toluene	UV of 254 nm, iodine staining
Glibenclamide	1 mg/ml	Methanolic ethyl acetate solution	11 ml of ethyl acetate 7 ml of methanol 1 ml of toluene 1 ml of conc. ammonia sol.	UV of 254 nm
Griseofulvin	1.25 mg/ml	Acetone	18 ml of ethyl acetate 4 ml of methanol	UV of 254 nm
Indinavir	5 mg/ml	Water	11.0 ml of ethyl acetate 5.0 ml of methanol 4.0 ml of toluene 0.2 ml of conc. ammonia sol.	UV of 254 nm, iodine staining
Isoniazid	2.5mg/ml	Methanol	a) 10 ml of methanol 10 ml of toluene b) see ethambutol HCL	UV of 254 nm, iodine staining
Lamiduvine (incl. combos)	1.25 mg/ml	Water	11 ml of ethyl acetate 5 ml of methanol 4 ml of toluene	UV of 254 nm, iodine staining
Lumefantrine (incl. combos)	0.8 mg/ml	Acetone	See artemether	UV of 254 nm, iodine staining
Mebendazole	2.5 mg/ml	Glacial acetic acid	14 ml of toluene 4 ml of ethyl acetate 4 ml of glacial acetic acid	UV of 254 nm
Mefloquine	2.5 mg/ml	Methanol	16 ml of ethyl acetate 4 ml of methanol 3 ml of conc. ammonia sol.	UV of 254 nm
Metronidazole	5 mg/ml	Methanol	15 ml of ethyl acetate 5 ml of methanol 10 drops of conc. ammonia sol.	UV of 254 nm
Nevirapine (incl. combos)	1.25 mg/ml	Acidified water of pH 3 and below	See lamivudine	UV of 254 nm

Ingrediente Activo	Concentração final	Meio de extração	Fase Móvel	Método de Detecção
Cloxacilina	6,25 mg/ml	Água	Ver amoxicilina	Coloração com iodo
Didanosina	1,25 mg/ml	Água	13 ml de metanol 4 ml de tolueno 3 ml de acetato de etilo 0,2 ml de sol. conc. de amoníaco	Luz UV de 254 nm, coloração com iodo
Eritromicina	12,5 mg/ml	Metanol	Ver amodiaquina	Coloração com iodo
Etambutol HCL (incl. Assoc.)	1,25 mg/ml	Metanol	12 ml de metanol 10 ml de tolueno 0,5 ml de sol. conc. de amoníaco	Coloração com ninidrina
Furosemida	2 mg/ml	Acetona	21 ml de metanol 2 ml de acetona 2 ml de tolueno	Luz UV de 254 nm, coloração com iodo
Glibenclamida	1 mg/ml	Solução metanólica de acetato de etilo	11 ml de acetato de etilo 7 ml de metanol 1 ml de tolueno 1 ml de sol. conc. de amoníaco	Luz UV de 254 nm
Griseofulvina	1,25 mg/ml	Acetona	18 ml de acetato de etilo 4 ml de metanol	Luz UV de 254 nm
Indinavir	5 mg/ml	Água	11 ml de acetato de etilo 5 ml de metanol 4 ml de tolueno 0,2 ml de sol. conc. de amoníaco	Luz UV de 254 nm, coloração com iodo
Isoniazida (incl. Assoc.)	2,5 mg/ml	Metanol	a) 10 ml de metanol 10 ml de tolueno b) ver etambutol HCL	Luz UV de 254 nm, coloração com iodo
Lamivudina (incl. Assoc.)	1,25 mg/ml	Água	11 ml de acetato de etilo 5 ml de metanol 4 ml de tolueno	Luz UV de 254 nm, coloração com iodo
Lumefantrina (incl. Assoc.)	0,8 mg/ml	Acetona	Ver arteméter	Luz UV de 254 nm, coloração com iodo
Mebendazol	2,5 mg/ml	Ácido acético glacial	14 ml de tolueno 4 ml de acetato de etilo 4 ml de ácido acético glacial	Luz UV de 254 nm
Mefloquina	2,5 mg/ml	Metanol	16 ml de acetato de etilo 4 ml de metanol 3 ml de sol. conc. de amoníaco	Luz UV de 254 nm
Metronidazol	5 mg/ml	Metanol	15 ml de acetato de etilo 5 ml de metanol 10 gotas de sol. conc. de amoníaco	Luz UV de 254 nm
Nevirapina (incl. Assoc.)	1,25 mg/ml	Água acidificada com pH igual ou inferior a 3	ver lamivudina	Luz UV de 254 nm

Active Ingredient	Final Working Concentration	Extraction Medium	Mobile Phase	Method of Detection
Oseltamivir	7.5 mg/ml	Methanol	8 ml of methanol 6 ml of ethyl acetate 4 ml of toluene 2 ml of conc. ammonia sol.	UV of 254 nm
Paracetamol (Acetaminophen)	1.25 mg/ml	Methanol	10 ml of toluene 10 ml of acetone 10 drops of glacial acetic acid	UV of 254 nm, iodine staining
Phenoxymethylpenicillin	2.5 mg/ml	Water	See amoxicillin	Iodine staining
Praziquantel	15 mg/ml	Methanol	See aminophylline	UV of 254 nm, iodine staining
Prednisolone	2.5 mg/ml	Methanol	See chloramphenicol	UV of 254 nm
Primaquine	1 mg/ml	Water	See amodiaquine	UV of 254 nm and visible at daylight after about 2 hrs
Pyrazinamide (incl. combos)	1.25 mg/ml	Methanol	See ethambutol HCL	UV of 254 nm, iodine staining
Quinine - sulphate - 2 HCL - HCL x 2H <sub>2</sub> O	1.25 mg/ml 1.25 mg/ml 1.25 mg/ml (each about equivalent to 1 mg of quinine free base/ml)	Aqueous methanol solution	20.0 ml of methanol 0.5 ml of conc. ammonia sol.	UV of 254 nm, UV of 366 nm, iodine staining
Rifampicin (incl. combos)	2 mg/ml	Methanol	a) see isoniazid b) see ethambutol HCL	UV of 254 nm, also visible at daylight
Salbutamol	1 mg/ml	Aqueous methanol solution	20.0 ml of methanol 0.3 ml of conc. ammonia sol.	UV of 254 nm, iodine staining
Stavudine (incl. combos)	1.25 mg/ml	Water	See lamivudine	UV of 254 nm, iodine staining
Sulfadoxine + Pyrimethamine	6.25 mg/ml + 0.31 mg/ml	Methanol	15 ml of ethyl acetate 5 ml of methanol	UV of 254 nm, iodine staining
Sulfamethoxazole + Trimethoprim	5 + 1 mg/ml	Methanol	See sulfadoxine/ pyrimethamine	UV of 254 nm, iodine staining
Tetracycline HCL (procedure also fit for doxycycline)	2.5 mg/ml	Methanol	10 ml of methanol 5 ml of acetone 5 ml of an aqueous MgCl <sub>2</sub> /EDTA sol. (5%/0.1%)	UV of 366 nm, staining by heating on a hot plate
Zidovudine (incl. combos)	1.25 mg/ml	Water	See lamivudine	UV of 254 nm, iodine staining

Ingrediente Activo	Concentração final	Meio de extração	Fase Móvel	Método de Detecção
Osetamivir	7,5 mg/ml	Metanol	8 ml de metanol 6 ml de acetato de etilo 4 ml de tolueno 2 ml de sol. conc. de amoníaco	Luz UV de 254 nm
Paracetamol (Acetaminofeno)	1,25 mg/ml	Metanol	10 ml de tolueno 10 ml de acetona 10 gotas de ácido acético glacial	Luz UV de 254 nm, coloração com iodo
Fenoximetilpenicilina	2,5 mg/ml	Água	Ver amoxicilina	Coloração com iodo
Praziquantel	15 mg/ml	Metanol	Ver aminofilina	Coloração com ninidrina
Prednisolona	2,5 mg/ml	Metanol	Ver cloranfenicol	Luz UV de 254 nm
Primaquina	1 mg/ml	Água	Ver amodiaquina	Luz UV de 254 nm e visível à luz do dia após 2 horas
Pirazinamida (incl. Assoc.)	1,25 mg/ml	Metanol	Ver etambutol HCL	Luz UV de 254 nm, coloração com iodo
Quinina - sulfato - 2 HCL - HCL x 2H2O	1,25 mg/ml 1,25 mg/ml 1,25 mg/ml (cada um equivalente a 1 mg de quinina por ml)	Solução aquosa de metanol	20 ml de metanol 0,5 ml de sol. conc. de amoníaco	Luz UV de 254 e 366 nm, coloração com iodo
Rifampicina (incl. Assoc.)	2 mg/ml	Metanol	a) ver isoniazida b) ver etambutol HCL	Luz UV de 254 nm, igualmente visível à luz do dia
Salbutamol	1 mg/ml	Solução aquosa de metanol	20 ml de metanol 0,3 ml de sol. conc. de amoníaco	Luz UV de 254 nm, coloração com iodo
Estavudina (incl. Assoc.)	1,25 mg/ml	Água	Ver lamivudina	Luz UV de 254 nm, coloração com iodo
Sulfadoxina + Pirimetamina	6,25 + 0,31 mg/ml	Metanol	15 de acetato de etilo 4 ml de metanol	Luz UV de 254 nm, coloração com iodo
Sulfametoxazol + Trimetoprim	5 + 1 mg/ml	Metanol	Ver sulfadoxina/ pirimetamina	Luz UV de 254 nm, coloração com iodo
Tetraciclina HCL (Procedimento igual para doxiciclina)	2,5 mg/ml	Metanol	10 ml de metanol 5 ml de acetona 5 ml de solução aquosa de MgCl <sub>2</sub> /EDTA (5%/0,1%)	Luz UV de 366 nm, coloração através de calor na placa de aquecimento
Zidovudina (incl. Assoc.)	1,25 mg/ml	Água	Ver lamivudina	Luz UV de 254 nm, coloração com iodo

## Sampling Procedures

Going in search of counterfeit and substandard quality medicines in a warehouse with a known size of stock material is much more easy than monitoring the medicines market of an entire country. In a warehouse or hospital situation, samples are taken in such a way that the procedure comes close to real life, that is, that samples are taken and tested regularly from all purchased or donated supplies according to their sequence of arrival following the rule 'first comes, first checked'. Other local rules or protocols might be applicable instead. When monitoring the drug quality of any one product in a post-marketing situation in an entire country sampling might get more complex. The best tentative approach is to take samples on random, that is, that each sample is chosen entirely by chance and that all members of the entire sample population have an equal chance of being included for testing. Statistical data analysis of test results is possible if the total size of the sample...

### **Practical Guide for the Collection of Samples in Market Assessment Studies\***

1- Pharmaceutical products which are required to be sampled for testing should be selected based on one or more of the following criteria. They should:

- be in the country's list of registered medicines
- be among the most widely used e.g. antimalarials and antibiotics
- be products treating diseases of public health importance
- suspected to be a counterfeit
- include paediatric preparations

2- Both the pharmaceutical outlets and products should be selected and sampled in a random fashion and should be representative of the market. In this regard, attempts should be made to ensure that selected products sampled in a manner that there is geographical coverage of the country and of the different types of medicines distribution outlets.

3- Samples should be collected from the various distribution channels — designated ports of entry, central medicines store departments, community and hospital pharmacies and pharmacies run by missions and other non-governmental organisations as well as those in the private sector.

4- Samples should be collected from different lots/batches.

5- The actual number of tablets or capsules per sample should be decided on the basis of the type of laboratory testing to be performed. In the case of tablets or capsules packaged in strips or blisters, the total number collected should be divided into three equal portions and each portion be sealed. One portion should be sent to the laboratory for testing, one should be sent to the manufacturer for investigation and one should be retained as a control. In case of tablets or capsules packed in a bottle or similar container, at least two original containers should be sampled. For syrups and injectable powders three portions should be collected. It should be noted that a portion of samples to be sent to the manufacturer through the National Medicines Regulatory Authorities should be intact and in their original packaging.

6- Arrangements should be made for an appropriate sampling schedule that takes into account the logistics and availability of resources for testing. The schedule should be communicated well in advance so that the lab will be prepared to receive samples for testing.

7- Each sample collected must have a Sampling Form properly filled out and safely attached to or inserted into the sample container.



## Procedimentos para Recolha de Amostras

Procurar por medicamentos contrafeitos ou de fraca qualidade num armazém, tendo conhecimento da quantidade de stock, é bastante mais fácil do que monitorizar o mercado dos medicamentos no país inteiro. Num armazém ou num hospital, são recolhidas amostras de tal maneira que o procedimento se assemelha à vida real, isto é, as amostras são retiradas de todos os produtos comprados, ou fornecidos, e testadas, com regularidade, de acordo com a sua ordem de chegada, seguindo a regra “o primeiro a chegar é o primeiro a ser testado”. Poderão, pelo contrário, ser aplicadas outras regras ou protocolos locais. A recolha de amostras pelo país inteiro pode tornar-se mais complexa aquando da monitorização da qualidade dos fármacos de cada produto numa situação pós-comercialização. A melhor hipótese será a de recolher amostras ao acaso, isto é, cada amostra é inteiramente escolhida ao acaso e todos os produtos sujeitos a recolha de amostras têm a mesma probabilidade de serem testados. É possível efectuar uma análise estatística dos dados dos resultados dos testes se a quantidade total das amostras, por exemplo a quantidade de comprimidos de mefloquina no país, for conhecida ou possa ser obtida através de estudos de mercado.

### **Guia Prático para a Recolha de Amostras para Estudos de Avaliação do Mercado \***

1- Os produtos farmacêuticos que são necessários amostrar para teste devem ser seleccionados com base em um ou mais dos seguintes critérios. Devem, portanto:

- constar da lista oficial de fármacos registados no país;
- ser dos fármacos mais usados, como por exemplo antimaláricos e antibióticos;
- ser produtos que tratam de doenças importantes para a saúde pública;
- ser suspeitos de contrafacção;
- incluir preparação de formulações pediátricas;

2- Quer os pontos de venda quer os produtos farmacêuticos devem ser seleccionados e sujeitos a recolha de amostras ao acaso e devem representar o mercado. Em relação a este critério, devem ser feitas tentativas para garantir que os produtos são seleccionados para recolha de amostras tendo em conta a área geográfica do país abrangida e os diferentes tipos de pontos de distribuição de fármacos.

3- As amostras devem ser recolhidas dos diversos canais de distribuição – meios de entrada no mercado, departamentos médicos centrais de armazenamento, farmácias de hospitais e comunitárias e farmácias atribuídas a missões ou organizações não-governamentais, assim como as do sector privado.

4- As amostras devem ser recolhidas de diferentes lotes.

5- O número exacto de comprimidos e cápsulas por amostra deve ser decidido com base no tipo de teste de laboratório a ser efectuado. Caso os comprimidos ou cápsulas estejam embalados em strips ou blisters, o número total recolhido deve ser dividido em três partes iguais e cada parte deve ser selada. Uma destas partes deve ser enviada para o laboratório para ser testada, outra deve ser enviada para o fabricante para investigação e outra ser retida para controlo. Caso os comprimidos ou cápsulas sejam embalados em frascos ou contentores semelhantes, devem ser sujeitos a recolha de amostras, pelo menos, dois contentores originais. Em caso de xaropes ou pós para injectáveis devem ser recolhidas 3 porções. Deve-se ter em conta que a porção a ser enviada para o fabricante, através das Autoridades Nacionais Reguladoras dos Medicamentos (NMRA), deve estar intacta e na sua embalagem original.

6- Deve ser feito um plano de trabalho apropriado para agendar a recolha de amostras que tenha em conta a parte logística e a disponibilidade dos recursos para efectuar os testes. A agenda deve ser divulgada com antecedência de modo a que o laboratório esteja preparado para receber as amostras a serem testadas.

7- Cada amostra recolhida deve ter um Formulário de Recolha de Amostras devidamente anexado ou inserido no recipiente de amostras.

(continuação da página 199 do texto de partida)

8- The container used to store samples should not interact with the product nor should it allow contamination. The samples should be in their original „unit“ packaging and labeling. The container should also protect the sample from light, air, moisture, as required must be properly labeled.

9- If a particular medicine has been transferred from the original container to a smaller container (for sale or dispensing purposes) which does not have proper labeling, additional samples should be taken from the original container as well.

10- Appropriate care should be taken to provide adequate packaging to protect samples during transportation, either by filling the container with cotton batting or foam, or by filling any residual space with a suitable material. All containers should be appropriately labeled, sealed and tamper-evident i.e. of such a type that unauthorized opening can be detected.

11- Collected samples should be packed, transported, and stored in a manner that prevents any deterioration, contamination, or adulteration. Samples should be stored in accordance with the manufacturer's recommended storage instructions for the respective product.

\*Issued by the Tanzanian Food and Drug Administration (TFDA) for national drug quality monitoring studies

(continuação da tradução da página 199)

8- O recipiente usado para armazenamento das amostras não deve estar em contacto com o produto nem estar sujeito a contaminação. As amostras devem estar na sua “unidade” de embalagem e rótulo originais. O recipiente deve, igualmente, proteger a amostra da luz, ar e humidade e ser devidamente rotulado.

9- Se um determinado fármaco tiver sido transferido do seu recipiente original para outro recipiente mais pequeno (para efeitos de venda ou dispensa) que não está devidamente rotulado, devem ser retiradas amostras adicionais do recipiente original.

10- Devem ser tomados cuidados adicionais de forma a garantir uma protecção adequada da embalagem das amostras durante o transporte, quer através do preenchimento do recipiente com pasta de algodão ou esferovite, ou através do preenchimento dos espaços com material adequado. Todos os recipientes devem ser devidamente rotulados, selados e vedados, isto é, de maneira a que qualquer tentativa de abertura não autorizada seja detectada.

11- As amostras recolhidas devem ser embaladas, transportadas e armazenadas de modo a prevenir a sua deterioração, contaminação ou adulteração. As amostras devem ser armazenadas de acordo com as instruções de armazenamento do respectivo produto recomendadas pelo fabricante.

\* Publicado pela Administração de Alimentação e Medicamentos da Tanzânia (TFDA) para estudos nacionais de monitorização da qualidade de fármacos...

...population, for example the amount of mefloquine tablets in a country, is known or can be obtained by market studies. Based on this knowledge, representative sample sizes for each product under consideration can then be calculated.

When performing a bigger drug quality monitoring project some other important questions have to be settled among all stakeholders before project start. These questions are as follows: Can the samples be collected privately by local project staff or must they be collected officially by law enforcement people? Can the sampling be done in a covert operation with pseudo customers or must it be performed in an open fashion so that everybody knows with whom he is dealing? Are the samples to be purchased or are they obtainable free of charge? How big is the sample size and what is the sampling frequency?

The amount of samples to be drawn and the costs of sampling and workload of testing can be rationalised and minimised following statistical quality control methods to be found, for example, in ISO Standard handbooks or considering batch analysis in pharmacopoeias for sterility testing. Taking these rules into account, the drawing of samples should take place in concordance with the schedule as outlined in the table below; in our case the sample size being 50 tablets or capsules per batch, thus covering the maximum requirement of 24 units per examination with the GPHF-Minilab and a minimum of 26 units for further confirmatory testing. For fixed-dose combination products, the required sample size may rise up to one hundred tablets or capsules, respectively. Priorities in testing must be set if the total number of units cannot be obtained. In a rapid screening exercise for counterfeit medicines detection, drug identity and content verification have certainly priority over disintegration testing in particular if not more than 10 tablets or capsules can be obtained per batch.

#### **Sample Size Calculation for Batch Assessment Studies Requiring 50 Units for Testing**

A: If the number of items in the batch consists of less than 100 containers, for example patient packs or boxes, then the minimum number of items to be tested are 10% or 4 containers whichever number is the greater. Draw from the total number of containers sampled at least 50 tablets or capsules, respectively.

B: If the number of items in the batch consists of more than 100 but not more than 500 containers, for example patient packs or boxes, then the minimum of items to be tested are 10 containers. Draw from the total number of containers sampled at least 50 tablets or capsules, respectively.

C: If the number of items in the batch consists of more than 500 containers, for example patient packs or boxes, the minimum number of items to be tested are 2% or 20 containers whichever is the less. Draw from the total number of containers sampled at least 50 tablets or capsules, respectively.

1 container per batch is delivered. Draw 50 tablets as sample.

2 containers per batch are delivered. Draw 25 tablets from each container.

10 containers per batch are delivered. Sample 4 containers and draw from each container 13 tablets.

40 containers per batch are delivered. Still, sample 4 containers only and draw from each item 13 tablets.

50 containers per batch are delivered. Sample 5 containers equivalent to 10% and draw from each container 10 tablets.

97 containers per batch are delivered. Sample 10 containers (about equivalent to 10%) and draw from each container 5 tablets only.

150 containers per batch are delivered. Sample 10 containers and draw from each container 5 tablets.

...por exemplo a quantidade de comprimidos de mefloquina num país que pode ser conhecida através de estudos de mercado. Com base no conhecimento destes critérios, podem ser calculadas as quantidades representativas de amostras de cada produto sob consideração.

No caso de projectos de maior dimensão para monitorização da qualidade de fármacos, é necessário acordar entre os intervenientes outras questões importantes, antes do início dos mesmos. Essas questões são as seguintes: Podem as amostras ser colhidas por pessoas responsáveis por projectos locais ou têm que ser oficialmente colhidas por pessoas legalmente autorizadas? Pode a recolha de amostras ser feita numa operação não oficial com clientes fictícios ou tem que ser realizada de forma directa de modo a que todos saibam com quem estão a trabalhar? As amostras estão à venda ou podem ser obtidas sem custos? Qual o tamanho da amostra e qual a frequência da recolha de amostras?

A quantidade de amostras a serem recolhidas, os custos da recolha de amostras e carga de trabalho dos testes podem ser racionalizados e minimizados seguindo métodos estatísticos de controlo de qualidade que podem ser encontrados, por exemplo, na norma "ISO Standard Handbooks" para manuais ou considerar metodologias de testes de esterilidade para análise de lotes escritas em farmacopeias. Seguindo estas regras, a recolha de amostras deve ser efectuada de acordo com a agenda traçada na tabela seguinte; no nosso caso a amostra contém 50 comprimidos ou cápsulas por lote, respeitando o limite máximo de 24 unidades por exame com o GPHF - Minilab e o mínimo de 26 unidades para testes de confirmação posterior. Para os produtos de combinações de dosagem fixa, a quantidade de amostras necessária pode aumentar para 100 comprimidos ou cápsulas, respectivamente. Se o número total de unidades não for obtido, devem ser estabelecidas prioridades na realização dos testes. Na detecção de medicamentos contrafeitos através de uma triagem visual rápida, a verificação da identidade e teor do fármaco tem, certamente, prioridade sobre o teste de desagregação, em particular se não forem obtidos 10 comprimidos ou cápsulas por lote.

#### **Cálculo da Quantidade de Amostras em Estudos de Avaliação de Lotes que necessitam de 50 Unidades para Teste**

A: Se o número de unidades por lote for menor que 100 recipientes, por exemplo pacotes ou caixas destinadas a pacientes, (então) o número mínimo de unidades a serem testadas é de 10% ou de 4 recipientes, conforme o número que for maior. Retire do número total de recipientes sujeitos a recolha de amostras pelo menos 50 comprimidos ou cápsulas.

B: Se o número de unidades por lote for maior que 100 mas inferior a 500 recipientes, por exemplo pacotes ou caixas destinadas a pacientes, (então) o número mínimo de unidades a serem testadas é de 10 recipientes. Retire do número total de recipientes sujeitos a recolha de amostras pelo menos 50 comprimidos ou cápsulas.

C: Se o número de unidades por lote for maior que 500 recipientes, por exemplo pacotes ou caixas destinadas a pacientes, o número mínimo de unidades a serem testadas é de 2% ou de 20 recipientes, conforme o número que for menor. Retire do número total de recipientes sujeitos a recolha de amostras pelo menos 50 comprimidos ou cápsulas.

É entregue 1 recipiente por lote. Retire 50 comprimidos para amostra.

São entregues 2 recipientes por lote. Retire 25 comprimidos de cada recipiente.

São entregues 10 recipientes por lote. Recolha amostras de 4 recipientes e retire 13 comprimidos de cada recipiente.

São entregues 40 recipientes por lote. Recolha, na mesma, amostras de apenas 4 recipientes e retire 13 comprimidos de cada unidade.

São entregues 50 recipientes por lote. Recolha amostras de 5 recipientes, equivalente a 10%, e retire 10 comprimidos de cada recipiente.

São entregues 97 recipientes por lote. Recolha amostras de 10 recipientes (equivalente a cerca de 10%) e retire apenas 5 comprimidos de cada recipiente.

São entregues 150 recipientes por lote. Recolha amostras de 10 recipientes e retire 5 comprimidos de cada recipiente.

(continuação da página 200 do texto de partida)

375 containers per batch are delivered. Sample again 10 containers and draw from each container 5 tablets.

490 containers per batch are delivered. Sample again 10 containers and draw from each container 5 tablets.

540 containers per batch are delivered. Sample 11 containers (about 2%) and draw from each container 5 tablets.

800 containers per batch are delivered. Sample 16 containers (precisely 2%) and draw from each container 3 tablets.

1000 containers per batch are delivered. Sample 20 containers and draw from each container 3 tablets.

2000 containers per batch are delivered. Sample again 20 containers and draw from each container 3 tablets.

9000 containers per batch are delivered. Sample again 20 containers and draw from each container 3 tablets.

(continuação da tradução da página 200)

São entregues 375 recipientes por lote. Recolha, novamente, amostras de 10 recipientes e retire 5 comprimidos de cada recipiente.

São entregues 490 recipientes por lote. Recolha, novamente, amostras de 10 recipientes e retire 5 comprimidos de cada recipiente.

São entregues 540 recipientes por lote. Recolha amostras de 11 recipientes (cerca de 2%) e retire 5 comprimidos de cada recipiente.

São entregues 800 recipientes por lote. Recolha amostras de 16 recipientes (exactamente 2%) e retire 3 comprimidos de cada recipiente.

São entregues 1000 recipientes por lote. Recolha amostras de 20 recipientes e retire 3 comprimidos de cada recipiente.

São entregues 2000 recipientes por lote. Recolha, novamente, amostras de 20 recipientes e retire 3 comprimidos de cada recipiente.

São entregues 9000 recipientes por lote. Recolha, novamente, amostras de 20 recipientes e retire 3 comprimidos de cada recipiente.

## Report

Shown below is a suggestion for a reporting form for the sampling and testing of finished solid dosage forms. Adaptations to local rules and situations might be required. The example is followed by a blank reporting form which can be reproduced for instant use without asking for further permission.

### Reporting Form for Medicines Sampling and Testing

Sample reference no.: 15

Sample given by\*: Ms. Tevtao

Point of sampling: St. Joseph's Hospital

Sample taken by\*: Mr. Wangri,

\* Name and signature, sample collector(s) may-be authority and/or project representative(s)

Name of drug product: PENBLOC

Active ingredient, strength and dosage form: Penicillin 250 mg tablets

Manufacturer's name and address: RIVA Pharmaceuticals Ltd., Mumbai, India

Batch No. and Expiry Date: UKK 9902, Aug-10

Supplier's name and address: Royal importers & drug suppliers (K) Ltd. – Mombasa, P.O. Box 5712

Air Way Bill No/ Packing List No/ Bill No etc.: AFX 32501

Date and time when the drug product was sampled: 05- JAN-2007 /10:20 am

How many containers were delivered per batch?: 80

How many containers were sampled per batch?: 8

How many tablets/capsules were taken from each container?: 5

How many tablets /capsules were pooled in a sample container?: 40

At which conditions has the sample been stored before testing (approximately): 27° C/65% RH

Note: Properly label the sample container stating the drug product's & manufacturer's name, active ingredient(s), strength, batch no. and expiry date as well as the date of sampling and the sample reference number. You might want to put an additional label into the sample container for safety reasons. When working up the sample, this sampling and test protocol will guide you through all the Minilab's operation procedures be asked to perform. Label also this protocol with the unique sample reference number for easy identification and reconciliation purposes.



## Relatório

Indica-se, seguidamente, uma sugestão de formulário para relatório, para recolher amostras e realizar os testes de do produto acabado de formas farmacêuticas sólidas. Poderão necessitar de adaptação a regulamentos e situações locais. Este modelo é seguido de um formulário em branco que poderá ser reproduzido para uso imediato sem autorização adicional.

### Formulário de Relatório para Recolha de Amostras e Realização de Testes a Medicamentos

Nº de referência da amostra: 15

Amostra dada por\*: Ms. Tevtao

Local de recolha da amostra: Hospital de St. Joseph

Amostra recolhida por\*: Mr. wa In, g ri,

\* Nome e assinatura, a(s) pessoa(s) que recolhe(m) a amostra pode(m) ser uma autoridade e ou o(s) representante(s) do projecto.

Nome do fármaco: PENBLOC

Substância activa, forma farmacêutica e dosagem: comprimidos de 250 mg de penicilina

Nome e morada do Fabricante: RIVA Pharmaceuticals Ltd., Mumbai, Índia

Nº. do Lote e Prazo de Validade: UKK 9902, Agosto -10

Nome e Morada do Fornecedor: Royal Importers e Drug Suppliers (K) LTD., Mombasa, P.O. Box 5712

Nº de Guia de Transporte/No. De Guia de Remessa/Nº de factura etc.: AFX32501

Data e hora em que o fármaco foi testado: 05 – Jan -2007/ 10:20

Quantas embalagens foram entregues por lote? 80

Quantas embalagens foram testadas por lote? 8

Quantos comprimidos/cápsulas foram retirados de cada embalagem? 5

Quantos comprimidos/cápsulas estão juntos no recipiente de amostras? 40

Em que condições estavam as amostras armazenadas antes do teste (aproximadamente)? 27°C/ 65% HR

Nota: Coloque uma etiqueta no recipiente de amostras, indicando o nome do produto e do fabricante, a(s) substância(s) activa(s), dosagem, número de lote e prazo de validade, assim como a data da recolha da amostra e o número de referência da amostra. Deverá colocar mais uma etiqueta dentro do recipiente de amostras, por razões de segurança. Quando estiver a realizar o teste, este protocolo de recolha e análise de amostras dará orientação durante toda a realização dos procedimentos indicados pelo Minilab. Marque este formulário, igualmente, com o número de referência da amostra, para fácil identificação e verificação.

Reporting Form for Medicines Sampling and Testing

**Visual Inspection**

Specify: off-white, mottled tablets

Passed

Not passed

**Disintegration Test**

Only 2 of 18 units are allowed to fail

1.run; specify: 2 of 6 failed

2. run; specify: 6 of 6 failed

3. run; specify: 1 of 6 failed

Overall:

passed

not passed; specify: 3 of 18 failed

**Colour Reaction Test**

Drug must be present each time

1.run; specify:

Passed

Not passed; specify:

2.run; specify:

Passed

Not passed; specify:

3.run; specify:

Passed

Not passed; specify:

**TLC Test**

Drug must be present and content within limits each time

1.run; specify:

Passed

Not passed; specify: less than 80%

2.run; specify:

Passed

Not passed; specify: ditto

3.run; specify:

Passed

Formulário de Relatório para Recolha de Amostras e Realização de Testes a Medicamentos

**Inspecção Visual**

especifique: branco-sujo, comprimidos mesclados

aprovado

não aprovado

**Teste de Desagregação**

Apenas 2 de 18 unidades podem falhar

1. ensaio; especifique: falharam 2 de 6

2. ensaio; especifique: passaram 6 de 6

3. ensaio; especifique: falharam 1 de 6

Avaliação Geral:

aprovado

não aprovado; especifique: 3 de 18 falharam

**Teste Colorimétrico**

Substância activa tem que estar presente todas as vezes

1. ensaio; especifique

aprovado

não aprovado; especifique

2. ensaio; especifique

aprovado

não aprovado; especifique

3. ensaio; especifique

aprovado

não aprovado; especifique

**Teste por CCF**

Substância activa tem que estar presente e o seu teor dentro dos limites todas as vezes

1. ensaio; especifique

aprovado

não aprovado; especifique: menos de 80%

2. ensaio; especifique

aprovado

não aprovado; especifique: idem

3. ensaio; especifique

aprovado

(continuação da página 202 do texto de partida)

Not passed; specify: ditto

Signature of the responsible person(s) performing medicines testing finally confirming that the sample was properly labelled and that the testing for this batch has been completed and that the protocol properly reflects the results observed during bench work.

Date & Signature: 25-FEB -2007          R. Patel

Signature of person responsible for batch release/rejection

Date & Signature: 25-FEB -2007          Peter N. Wanga

(continuação da tradução da página 202)

não aprovado; especifique - idem

A assinatura da pessoa responsável pela análise dos medicamentos, em como confirma que a amostra foi rotulada correctamente e que a análise deste lote foi completada, e que o protocolo reflecte, correctamente, os resultados observados durante o trabalho de ensaio.

Data e Assinatura: 25 de Fevereiro -2007 R. Patel

Assinatura da pessoa responsável pela rejeição/libertação do lote

Data e Assinatura: 25 – Fevereiro 2007 Peter W. Wanga

**Reporting Form for Medicines Sampling and Testing**

Sample reference no.:

Sample given by\*:

Point of sampling:

Sample taken by\*:

\* Name and signature, sample collector(s) may-be authority and/or project representative(s)

Name of drug product:

Active ingredient, strength and dosage form:

Manufacturer's name and address:

Batch No. and Expiry Date:

Supplier's name and address:

Air Way Bill No/ Packing List No/ Bill No etc.:

Date and time when the drug product was sampled:

How many containers were delivered per batch?:

How many containers were sampled per batch?:

How many tablets/capsules were taken from each container?:

How many tablets /capsules were pooled in a sample container?:

At which conditions has the sample been stored before testing (approximately):

Note: Properly label the sample container stating the drug product's & manufacturer's name, active ingredient(s), strength, batch no. and expiry date as well as the date of sampling and the sample reference number. You might want to put an additional label into the sample container for safety reasons. When working up the sample, this sampling and test protocol will guide you through all the Minilab's operation procedures be asked to perform. Label also this protocol with the unique sample reference number for easy identification and reconciliation purposes.

### Formulário de Relatório para Recolha de Amostras e Realização de Testes a Medicamentos

Nº de referência da amostra:

Amostra dada por\*:

Local de recolha da amostra:

Amostra recolhida por\*:

\* Nome e assinatura, a(s) pessoa(s) que recolhe(m) a amostra pode(m) ser uma autoridade e ou o(s) representante(s) do projecto.

Nome do fármaco:

Substância activa, forma farmacêutica e dosagem:

Nome e morada do Fabricante:

Nº. do Lote e Prazo de Validade:

Nome e Morada do Fornecedor:

Nº de Guia de Transporte/No. De Guia de Remessa/Nº de factura etc.:

Data e hora em que o fármaco foi testado:

Quantas embalagens foram entregues por lote?

Quantas embalagens foram testadas por lote?

Quantos comprimidos/cápsulas foram retirados de cada embalagem?

Quantos comprimidos/cápsulas estão juntos no recipiente de amostras?

Em que condições estavam as amostras armazenadas antes do teste (aproximadamente)?

Nota: Coloque uma etiqueta no recipiente de amostras, indicando o nome do produto e do fabricante, a(s) substância(s) activa(s), dosagem, número de lote e prazo de validade, assim como a data da recolha da amostra e o número de referência da amostra. Deverá colocar mais uma etiqueta dentro do recipiente de amostras, por razões de segurança. Quando estiver a realizar o teste, este protocolo de recolha e análise de amostras dará orientação durante toda a realização dos procedimentos indicados pelo Minilab. Marque este formulário, igualmente, com o número de referência da amostra, para fácil identificação e verificação.

Reporting Form for Medicines Sampling and Testing

**Visual Inspection**

Specify:

Passed

Not passed

**Disintegration Test**

Only 2 of 18 units are allowed to fail

1.run; specify:

2. run; specify:

3. run; specify:

Overall:

passed

not passed; specify:

**Colour Reaction Test**

Drug must be present each time

1.run; specify:

Passed

Not passed; specify:

2.run; specify:

Passed

Not passed; specify:

3.run; specify:

Passed

Not passed; specify:

**TLC Test**

Drug must be present and content within limits each time

1.run; specify:

Passed

Not passed; specify:

2.run; specify:

Passed

Not passed; specify:

3.run; specify:

Passed



Formulário de Relatório para Recolha de Amostras e Realização de Testes a Medicamentos

**Inspecção Visual**

especifique:

aprovado

não aprovado

**Teste de Desagregação**

Apenas 2 de 18 unidades podem falhar

1. ensaio; especifique:

2. ensaio; especifique:

3. ensaio; especifique:

Avaliação Geral:

aprovado

não aprovado; especifique:

**Teste Colorimétrico**

Substância activa tem que estar presente todas as vezes

1. ensaio; especifique

aprovado

não aprovado; especifique

2. ensaio; especifique

aprovado

não aprovado; especifique

3. ensaio; especifique

aprovado

não aprovado; especifique

**Teste CCF**

Substância activa tem que estar presente e o seu teor dentro dos limites todas as vezes

1. ensaio; especifique

aprovado

não aprovado; especifique:

2. ensaio; especifique

aprovado

não aprovado; especifique:

3. ensaio; especifique

aprovado

(continuação da página 204 do texto de partida)

Not passed; specify:

Signature of the responsible person(s) performing medicines testing finally confirming that the sample was properly labelled and that the testing for this batch has been completed and that the protocol properly reflects the results observed during bench work.

Date & Signature:

Signature of person responsible for batch release/rejection

Date & Signature:

( continuação da tradução da página 204)

não aprovado; especifique:

A assinatura da pessoa responsável pela análise dos medicamentos, em como confirma que a amostra foi rotulada correctamente e que a análise deste lote foi completada, e que o protocolo reflecte, correctamente, os resultados observados durante o trabalho de ensaio.

Data e Assinatura:

Assinatura da pessoa responsável pela rejeição/libertação do lote

Data e Assinatura:

## List of Inventory Items for Minilab TLC Test Kit

The first list of inventory items reflects the kind and quantities of equipment, chemicals and reference standards supplied when a standard GPHF-Minilab® for thin layer chromatographic testing is ordered. TLC Minilabs can also be tailored to cater for specific needs in malaria and TB endemic countries. Antiviral and antiretroviral reference standards are optional features only. They go to specific avian influenza and HIV/AIDS programmes and are shown in the second table. The Global Pharma Health Fund's logistic partner Technologie Transfer Marburg maintains an appropriate stock of inventory items ready for global shipment. There, the management of orders will be facilitated and errors be avoided when using the catalogue numbers shown in the table below. There is no minimum order value. The contact details for the procurement of replacement items or full Minilab sets are as follows:

Technologie Transfer Marburg (TTM)

Auf der Kupferschmiede 1, 35091 Cabe, Germany

[ttm@ttm-germany.de](mailto:ttm@ttm-germany.de)

Phone: +49-6421-8737-30

Fax: +49-6421-8737-37

1. Standard list of inventory items in the TLC test kit		
Order No.	Item	Qty.
	<b>Teaching, training, guidance</b>	
G5040029	Manual Update 2008 with 41 TLC tests on 43 active ingredients	1
	<b>Visual Inspection</b>	
G5020045	Calliper rule	1
G5020025	Graduated ruler, 20 cm in length	1
	<b>Disintegration Testing</b>	
G5020021	Laboratory glass bottle with closure, 100-ml filling capacity	5
G5020049	Thermometer, alcohol centigrade	1
G5020018	Pre-set timer	1
	<b>Preparation of stock and working solutions</b>	
G5020008	Spatula, double ended, stainless steel	1
G5020038	Pestle	1
G5020044	Pair of scissors	1
G5020047	Blade/Scalpel	1
G5020001	Aluminium foil with a thickness of 30 µm, 45 x 1000 cm	1
G5020050	Funnel made of polypropylene, 65/9 mm	3
G5020050	Laboratory glass bottle with closure, 10-ml filling capacity (vial)	20
G5020022	Laboratory glass bottle with closure, 25-ml filling capacity	6
G5020024	Laboratory glass bottle with closure, 40-ml filling capacity	15
**	Laboratory glass bottle with closure, 100-ml filling capacity (see disintegration testing)	
G5020026	Straight pipette, 1-ml filling capacity, graduated 0.01 ml	10
G5020028	Straight pipette, 2-ml filling capacity, graduated 0.01 ml	5
G5020030	Straight pipette, 5-ml filling capacity, graduated 0.1 ml	10
G5020027	Straight pipette, 10-ml filling capacity, graduated 0.1 ml	10
G5020029	Straight pipette, 25-ml filling capacity, graduated 0.1 ml	5
G5020037	Pipette filler (Pumpette/Peleus Ball)	1
G5020041	Rack accommodating straight pipettes and other laboratory equipment	1
	<b>Labelling of stock and working solutions</b>	
G5020009	Label tape	1
G5020019	Marker pen, black, water-resistant	2
	<b>Spotting of working standard and sample solution</b>	
G5020005	Pencil, soft grade	1
G5020006	Pencil sharpener	1

Lista de Itens de Inventário do Minilab TLC Test kit

A primeira lista dos itens de inventário reflecte o tipo e as quantidades de equipamento, reagentes e padrões de referência fornecidos aquando do pedido de um GPHF – Minilab® padrão para testes cromatográficos de camada fina. Os TLC Minilabs podem, igualmente, ser feitos à medida e de maneira a satisfazer necessidades específicas em países endémicos de malária e TB. Os padrões de referência dos antiviricos e anti-retrovirais são componentes apenas opcionais. Servem para programas específicos contra a gripe aviária e VIH/SIDA e são listados na segunda tabela. A Technologie Transfer Marburg, parceira logística da The Global Pharma Health Fund, mantém um stock apropriado de itens de inventário pronto para envio a nível mundial. Consequentemente, o uso dos números dos catálogos listados na tabela seguinte irá facilitar a gestão dos pedidos e evitar erros. Não existe valor mínimo por pedido. Os contactos para a aquisição ou troca de itens ou do Minilib inteiro são os seguintes:

Technologie Transfer Marburg (TTM)

Auf der Kupferschmiede 1, 35091 Cabe, Germany

[ttm@ttm-germany.de](mailto:ttm@ttm-germany.de)

Telefone: +49-6421-8737-30

Fax: +49-6421-8737-37

1.Lista Padrão de Itens de Inventário do TLC Test Kit		
Nº de Pedido	Item	Qtd.
	<b>Ensino, treino, orientação</b>	
G5040029	Actualização do manual de 2008 com 41 testes de CCF em 43 ingredientes activos	1
	<b>Inspeção Visual</b>	
G5020045	Régua de medição	1
G5020025	Régua graduada, 20 cm de comprimento	1
	<b>Teste de Desagregação</b>	
G5020021	Frasco de vidro de laboratório com tampa, 100 ml de capacidade	5
G5020049	Termómetro de álcool com escala em graus centígrados	1
G5020018	Temporizador	1
	<b>Preparação das soluções para stock e para trabalho</b>	
G5020008	Espátula de laboratório em aço inoxidável	1
G5020038	Pilão	1
G5020044	Tesoura	1
G5020047	Lâmina/Bisturi	1
G5020001	Folha de alumínio com espessura de 30 µm, 45 x 1000 cm	1
G5020050	Funil de polipropileno, 65/9 mm	3
G5020050	Frasco de vidro de laboratório com tampa, 10 ml de capacidade	20
G5020022	Frasco de vidro de laboratório com tampa, 25 ml de capacidade	6
G5020024	Frasco de vidro de laboratório com tampa, 40 ml de capacidade	15
**	Frasco de vidro de laboratório com tampa, 100 ml de capacidade (ver teste de desagregação)	
G5020026	Pipeta graduada, 1 ml de capacidade, graduação 0,01 ml	10
G5020028	Pipeta graduada, 2 ml de capacidade, graduação 0,01 ml	5
G5020030	Pipeta graduada, 5 ml de capacidade, graduação 0,1 ml	10
G5020027	Pipeta graduada, 10 ml de capacidade, graduação 0,1 ml	10
G5020029	Pipeta graduada, 25 ml de capacidade, graduação 0,1 ml	5
G5020037	Pêra para pipeta (Pompete/pêra de sucção)	1
G5020041	Suporte para pipetas graduadas e outros equipamentos de laboratório	1
	<b>Rotulagem das soluções para stock e para trabalho</b>	
G5020009	Fita adesiva	1
G5020019	Marcador, preto, à prova de água	2
	<b>Aplicação da amostra das soluções padrão e de amostra</b>	
G5020005	Lápis, mina mole	1
G5020006	Afiadeira	1

Order No.	Item	Qty.
**	Graduated ruler, 20 cm in length (see visual inspection above)	
G5020013	Glass microcapillaries capable of delivering a known volume of 2 µl, pack of 100	10
G5020011	Hot plate (e.g. Philips World Travel Iron)	1
G5020054	Adaptor plug for the world-wide use of electrical appliances	1
	<b>Preparation of the mobile phase (Mixing of solvents)</b>	
G5020033	Transfer pipette made of polypropylene, 3-ml filling capacity, graduated 0.5 ml	10
**	Set of straight pipettes (see preparation of stock and sample solutions above)	
	<b>TLC plates</b>	
G5020007	Merck TLC aluminium plates pre-coated with Silica gel 60 F254, 5 x 10 cm, pack of 50	8
	<b>TLC plate development</b>	
G5020023	TLC developing chamber/laboratory glass bottle with closure, 500-ml filling capacity	1
G5020043	Circular filter paper, 150 mm in diameter, pack of 100	3
**	Pre-set timer (see disintegration testing above)	
	<b>Detection of spots</b>	
G50020055	UV-lamp supplying light of 254 nm	1
G5020056	UV-lamp supplying light of 366 nm	1
G5020004	Replacement batteries for UV-lamps	8
G5020059	TLC dipping chamber/250-ml beaker made of polypropylene, 65 mm open diameter	1
G5020023	Iodine staining chamber/laboratory glass bottle with closure, 500-ml filling capacity	1
G5020035	Pair of tweezers, stainless steel, length 130 mm	1
**	Hot plate (see spotting of working standard and sample solution above)	
	<b>Secondary reference standards</b>	
G5030001	Acetylsalicylic acid 300 mg - tube of 20	1
G5030002	Aminophylline 100 mg - tube of 20	1
G5030003	Amodiaquine hydrochloride 200 mg - tube of 20	1
G5030004	Amoxicillin 500 mg - tube of 20	1
G5030005	Ampicillin 500 mg - tube of 20	1
G5030043	Artemether 50 mg - tube of 20	1
G5030062	Artesunate 50 mg - tube of 20	1
G5030007	Cephalexin 250 mg - tube of 20	1
G5030008	Chloramphenicol 250 mg - tube of 20	1
G5030009	Chloroquine phosphate 250 mg - tube of 20	1
G5030044	Ciprofloxacin 250 mg - tube of 20	1
G5030011	Cloxacillin 250 mg - tube of 20	1
G5030014	Erythromycin 250 mg - tube of 20	1
G5030015	Ethambutol hydrochloride 400 mg - tube of 20	1
G5030016	Furosemide 40 mg - tube of 20	1
G5030017	Glibenclamide 5 mg - tube of 40	1
G5030018	Griseofulvin 125 mg - tube of 20	1
G5030020	Isoniazid 100 mg - tube of 20	1
G5030022	Lumefantrine/artemether 120/20 mg - tube of 10	1
G5030023	Mebendazole 100 mg - tube of 20	1
G5030024	Mefloquine 250 mg - tube of 10	1
G5030026	Metronidazole 250 mg - tube of 20	1
G5030029	Paracetamol 500 mg - tube of 20	1
	<i>Table continued on the next page</i>	

Order No.	Item	Qtd.
**	Régua graduada, 20 cm de comprimento (ver inspeção visual acima)	
G5020013	Microcapilares de vidro capazes de fornecer um volume conhecido de 2 µl, caixa de 100	10
G5020011	Placa de aquecimento (exemplo Philips World Travel Iron)	1
G5020054	Adaptador de tomada para uso universal de aparelhos eléctricos	1
	Preparação da fase móvel (Mistura de solventes)	
G5020033	Pipeta de transferência/Pasteur de polipropileno, 3 ml de capacidade, graduação 0,5 ml	10
**	Conjunto de pipetas graduadas (ver preparação das soluções de stock e de amostra acima)	
	Placas de CCF	
G5020007	Placas de alumínio de CCF da Merck previamente revestidas de gel de sílica 60F 254, tamanho 5x10 cm, caixa de 50	8
	Desenvolvimento de Placas de CCF	
G5020023	Câmara de eluição de CCF / frasco de vidro de laboratório com tampa, 500 ml de capacidade	1
G5020043	Papel de filtro circular, 150 mm de diâmetro, caixa de 100	3
**	Temporizador (ver teste de desagregação acima)	
	Detecção de manchas	
G50020055	Lanterna com luz ultravioleta de 254 nm	1
G5020056	Lanterna com luz ultravioleta de 366 nm	1
G5020004	Pilhas de substituição para as lanternas de luz ultravioleta	8
G5020059	Câmara de imersão de CCF/copo de precipitação de 250 ml de polipropileno, 65 mm de diâmetro	1
G5020023	Câmara de coloração com iodo / frasco de vidro de laboratório com tampa, 500 ml de capacidade	1
G5020035	Pinças, aço inoxidável, 130 mm de comprimento	1
**	Placa de aquecimento (ver colocação das amostras na soluções padrão e amostra acima)	
	Padrões secundários de referência	
G5030001	Ácido acetilsalicílico 300 mg - tubo de 20	1
G5030002	Aminofilina 100 mg - tubo de 20	1
G5030003	Hidrocloreto de amodiaquina 200 mg - tubo de 20	1
G5030004	Amoxicilina 500 mg - tubo de 20	1
G5030005	Ampicilina 500 mg - tubo de 20	1
G5030043	Arteméter 50 mg - tubo de 20	1
G5030062	Artesunato 50 mg - tubo de 20	1
G5030007	Cefalexina 250 mg - tubo de 20	1
G5030008	Cloranfenicol 250 mg - tubo de 20	1
G5030009	Fosfato de cloroquina 250 mg - tubo de 20	1
G5030044	Ciprofloxacina 250 mg - tubo de 20	1
G5030011	Cloxacilina 250 mg - tubo de 20	1
G5030014	Eritromicina 250 mg - tubo de 20	1
G5030015	Cloridrato de etambutol 400 mg - tubo de 20	1
G5030016	Furosemida 40 mg - tubo de 20	1
G5030017	Glibenclamida 5 mg - tubo de 40	1
G5030018	Griseofulvina 125 mg - tubo de 20	1
G5030020	Isoniazida 100 mg - tubo de 20	1
G5030022	Lumefantrina/ arteméter 120/20 mg - tubo de 10	1
G5030023	Mebendazol 100 mg - tubo de 20	1
G5030024	Mefloquina 250 mg - tubo de 10	1
G5030026	Metronidazol 250 mg - tubo de 20	1
G5030029	Paracetamol 500 mg - tubo de 20	1
	<i>A tabela continua na página seguinte</i>	

Order No.	Item - table continued from previous page	Qty.
G5030030	Phenoxymethylpenicillin 250 mg - tube of 20	1
G5030045	Praziquantel 600 mg - tube of 20	1
G5030031	Prednisolone 5 mg - tube of 100	1
G5030032	Primaquine 15 mg - tube of 20	1
G5030033	Pyrazinamide 500 mg - tube of 20	1
G5030034	Quinine sulphate 300 mg - tube of 20	1
G5030035	Rifampicin 150 mg - tube of 20	1
G5030036	Salbutamol 4 mg - tube of 40	1
G5030038	Sulfadoxine/pyrimethamine 500/25 mg - tube of 20	1
G5030012	Sulfamethoxazole/trimethoprim (cotrimoxazole) 100/20 mg - tube of 20	1
G5030039	Tetracycline hydrochloride 250 mg - tube of 20	1
	<b>Chemicals (analytical reagent grade of commerce)</b>	
G5010001	Acetone, 1000 ml	4
G5010002	Ammonia solution 25 to 26%, 50 ml	1
G5010007	Ethyl acetate, 1000 ml	3
G5010003	Ethylenediaminetetraacetate sodium/potassium salt (EDTA), 50 g	1
G5010006	Glacial acetic acid, 1000 ml	2
G5010017	Hydrochloric acid solution 36%, 1000 ml	1
G5010010	Iodine, 100 g	1
G5010013	Magnesium chloride hexahydrate, 100 g	1
G5010014	Methanol (Methyl alcohol), 1000 ml	15
G5010028	Ninhydrin, 10 g	1
G5010018	Sulphuric acid solution 96%, 1000 ml	1
G5010020	Toluene, 1000 ml	1
G5020012	Universal pH indicator test paper	1
	<b>Packaging</b>	
G5020014	Case	1
G5020058	Padlock	2
<b>2. List of optional features</b>		
	<b>Secondary reference standards for antiviral and antiretroviral medicines</b>	
G5030059	Didanosine 125 mg - tube of 10	
G5030060	Didanosine 125 mg - tube of 20	
G5030048	Didanosine 200 mg - tube of 10	
G5030013	Didanosine 200 mg - tube of 20	
G5030049	Indinavir 200 mg - tube of 10	
G5030019	Indinavir 200 mg - tube of 20	
G5030050	Lamivudine 150 mg - tube of 10	
G5030021	Lamivudine 150 mg - tube of 20	
G5030051	Nevirapine 200 mg - tube of 10	
G5030027	Nevirapine 200 mg - tube of 20	
G5030041	Oseltamivir 75 mg - tube of 10	
G5030058	Oseltamivir 75 mg - tube of 20	
G5030053	Stavudine 40 mg - tube of 10	
G5030037	Stavudine 40 mg - tube of 20	
G5030055	Zidovudine 300 mg - tube of 10	
G5030042	Zidovudine 300 mg - tube of 20	



Nº de Pedido	Item - continuação da tabela da página anterior	Qtd.
G5030030	Fenoximetilpenicilina 250 mg - tubo de 20	1
G5030045	Praziquantel 600 mg - tubo de 20	1
G5030031	Prednisolona 5 mg - tubo de 100	1
G5030032	Primaquina 15 mg - tubo de 20	1
G5030033	Pirazinamida 500 mg - tubo de 20	1
G5030034	Sulfato de quinina 300 mg - tubo de 20	1
G5030035	Rifampicina 150 mg - tubo de 20	1
G5030036	Salbutamol 4 mg - tubo de 40	1
G5030038	Sulfadoxina/ pirimetamina 500/25 mg - tubo de 20	1
G5030012	Sulfametoxazol/ trimetoprim (cotrimoxazol) 100/20 mg - tubo de 20	1
G5030039	Cloridrato de tetraciclina 250 mg - tubo de 20	1
	<b>Reagentes (de grau analítico para comércio)</b>	
G5010001	Acetona, 1000 ml	4
G5010002	Solução de amoníaco de 25 a 26%, 50 ml	1
G5010007	Acetato de etilo, 1000 ml	3
G5010003	Sal de potássio/sódio de etilenodiaminotetraacetato (EDTA), 50 g	1
G5010006	Ácido acético glacial, 1000 ml	2
G5010017	Solução de ácido hidroclórico a 36%, 1000 ml	1
G5010010	Iodo, 100 g	1
G5010013	Cloreto de magnésio hexahidratado, 100 g	1
G5010014	Metanol (álcool metilo), 1000 ml	15
G5010028	Ninidrina, 10 g	1
G5010018	Solução de ácido sulfúrico a 96%, 1000 ml	1
G5010020	Tolueno, 1000 ml	1
G5020012	Indicador universal de pH em papel para teste	1
	<b>Empacotamento</b>	
G5020014	Mala	1
G5020058	Cadeado	2
<b>2. Lista de itens opcionais</b>		
	Padrões secundários de referência para medicamentos antivíricos e anti-retrovirais	
G5030059	Didanosina 125 mg - tubo de 10	
G5030060	Didanosina 125 mg - tubo de 20	
G5030048	Didanosina 200 mg - tubo de 10	
G5030013	Didanosina 200 mg - tubo de 20	
G5030049	Indinavir 200 mg - tubo de 10	
G5030019	Indinavir 200 mg - tubo de 20	
G5030050	Lamiduvina 150 mg - tubo de 10	
G5030021	Lamiduvina 150 mg - tubo de 20	
G5030051	Nevirapina 200 mg - tubo de 10	
G5030027	Nevirapina 200 mg - tubo de 20	
G5030041	Oseltamivir 75 mg - tubo de 10	
G5030058	Oseltamivir 75 mg - tubo de 20	
G5030053	Estavudina 40 mg - tubo de 10	
G5030037	Estavudina 40 mg - tubo de 20	
G5030055	Zidovudina 300 mg - tubo de 10	
G5030042	Zidovudina 300 mg - tubo de 20	

**Page 208**

Assembly Illustration for Minilab TLC Test Kit

(Imagem)

**Página 208**

Manual da Montagem do Minilab TLC Test Kit

(Imagem)

**Page 209**

(Imagem)

**Página 209**

(Imagem)

**Page 210**

**A Charity Initiated and Sponsored by Merck Darmstadt • Germany**

**Global Pharma Health Fund e.V. (GPHF)**

Walther-von-Cronberg-Platz 6 • 60594 Frankfurt Germany

Phone +49-69-962387-600 • Fax +49-69-962387-609

**[info@gphf.org](mailto:info@gphf.org) • [www.gphf.org](http://www.gphf.org)**

**Página 210**

**Uma Instituição de Beneficência Iniciada e Patrocinada pela Merck Darmstadt – Alemanha**

**Global Pharma Health Fund e.V. (GPHF)**

Walther-von-Cronberg-Platz 6 • 60594 Frankfurt Germany

Telefone: +49-69-962387-600 • Fax: +49-69-962387-609

**[info@gphf.org](mailto:info@gphf.org) • [www.gphf.org](http://www.gphf.org)**

## **Anexo 2**

**B - Texto original e Tradução do Suplemento 2010**

**(Páginas 1 a 43)**

A Concise Quality Control Guide on Essential Drugs and other Medicines

# Manual

Accompanying the GPHF-Minilab®

Supplement 2010

Volume II

## **Thin Layer Chromatographic Tests**

**GPHF**

GLOBAL PHARMA  
HEALTH FUND E.V.

A Charity Initiated and Sponsored by Merck Darmstadt – Germany

Um Guia Conciso de Controlo de Qualidade de Fármacos Essenciais e outros Medicamentos

# Manual

Acompanha o GPHF-Minilab®

Suplemento 2010

Volume II

## **Testes Cromatográficos em Camada Fina**

**GPHF**

GLOBAL PHARMA  
HEALTH FUND E.V.

Uma Instituição de Beneficência Iniciada e Patrocinada pela Merck Darmstadt – Alemanha

## A Concise Quality Control Guide on Essential Drugs and other Medicines

### SUPPLEMENT 2010 TO VOLUME II ON THIN LAYER CHROMATOGRAPHIC TESTS

#### Written by

Richard W. O. Jahnke, Kornelia Dwornik, Volker Rubeau and Souly Phanouvong

\*\*\*

#### Reviewed by

Adrian Barojas, Daniel Bempong, Sanford Bradby, Yanga Dijiba, Mustapha Hajjou and Patrick Lukulay

\*\*\*

#### Published by

the Global Pharma Health Fund (GPHF), a charity initiated and maintained by Merck Darmstadt • Germany, and the United States Pharmacopeia Drug Quality and Information Program (USP DQI)

Copyright © by GPHF & USP DQI

\*\*\*

#### Acknowledgements

This supplement was made possible by the generous financial support of the American people through the United States Agency for International Development (USAID). The contents are the responsibility of GPHF and USP DQI and do not necessarily reflect the views of USAID or the United States Government.

#### About the GPHF-Minilab® Project

Counterfeit medicines proliferation constitutes serious health hazards. The World Health Organization (WHO) estimates that a disturbing proportion of ten to thirty percent of all drugs offered in developing countries are either counterfeit or of deficient quality already.

To prevent counterfeit and substandard anti-infective medicines infiltrating drug supply organisations and priority disease programmes in malaria, TB and HIV/AIDS endemic countries, the Global Pharma Health Fund (GPHF) in Frankfurt, a charity maintained exclusively by Merck, Darmstadt Germany, set out to develop and supply at low cost the GPHF-Minilab®, a mini-laboratory for rapid drug quality verification and counterfeit medicines detection.

Since ten years, GPHF-Minilabs are acting as a first-line defence against counterfeit and substandard medicines threatening the health of millions of people living in developing nations. Overall, more than 330 Minilabs have been supplied across 70 countries in Africa, Asia and Latin America already.

Main implementation partners are national health and medicines regulatory authorities together with the World Health Organization and the U.S. Pharmacopeia Drug Quality and Information Program. Joint drug quality monitoring projects run in South East Asia and East Africa triggered off the seizure of millions of counterfeit antimalarial pills without any active principles by Interpol in the recent years.

The unchanged need for non-sophisticated and affordable drug quality monitoring in low-income countries forms the driving force behind the development of new GPHF-Minilab® test protocols today. The need for more testing is also the starting point for an intensified collaboration with our US based implementing partners. For better health in developing countries, other parties are invited to join in.

\*\*\*

Made by Grimm Grafik Design

GPHF-Minilab® assembled and supplied by Technologie Transfer Marburg, Cabe, Germany

Um Guia Conciso de Controlo de Qualidade de Fármacos Essenciais e outros  
Medicamentos  
**SUPLEMENTO 2010 DO VOLUME II SOBRE TESTES CROMATOGRÁFICOS EM  
CAMADA FINA**

**Escrito por**

Richard W. O. Jähnke, Kornelia Dwornik, Volker Rubeau e Souly Phanouvong

\* \* \*

**Revisto por**

Adrian Barojas, Daniel Bempong, Sanford Bradby, Yanga Dijiba, Mustapha Hajjou e Patrick Lukulay

\* \* \*

**Publicado por**

Global Pharma Health Fund (GPHF), uma instituição de beneficência iniciada e patrocinada pela Merck Darmstadt – Alemanha, e pela United States Pharmacopeia Drug Quality and Information Program (USP DQI) (Programa de Informação e Qualidade de Medicamentos da Farmacopeia dos Estados Unidos)

**Copyright © de GPHF & USP DQI**

\*\*\*

**Agradecimentos**

A elaboração deste suplemento tornou-se possível graças ao generoso apoio financeiro do povo americano através da United States Agency for International Development (USAID) (Agência dos Estados Unidos para o Desenvolvimento Internacional). O conteúdo é da responsabilidade da GPHF e USP DQI e não reflecte, necessariamente, as perspectivas da USAID ou do governo dos Estados Unidos.

**Acerca do Projecto GPHF - Minilab®**

A proliferação dos medicamentos contrafeitos constitui graves perigos para a saúde. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que cerca de 10 a 30 por cento de todos os medicamentos distribuídos nos países em desenvolvimento são quer contrafeitos quer de qualidade deficiente.

Para prevenir a infiltração de medicamentos contrafeitos e anti-infecciosos de baixa qualidade nas redes de distribuição de medicamentos a cargo de organizações e programas de doenças prioritárias como a malária, TB e VIH/SIDA, em países endémicos, a Global Pharma Health Fund (GPHF) em Frankfurt, uma instituição de caridade patrocinada pela Merck, em Darmstadt na Alemanha, procurou desenvolver e fornecer o GPHF - Minilab®, um mini-laboratório para a rápida verificação da qualidade de fármacos e detecção de medicamentos contrafeitos, a baixos custos.

Desde há 10 anos, estes mini-laboratórios têm vindo a estabelecer uma primeira linha de defesa contra medicamentos contrafeitos ou sub-padronizados que ameaçam a saúde de milhões de pessoas que vivem em nações em desenvolvimento. Ao todo, mais do que 330 Minilabs já foram distribuídos por 70 países de África, Ásia e América Latina.

Os principais parceiros desta implementação são as autoridades reguladoras dos medicamentos e saúde nacionais conjuntamente com a Organização Mundial da Saúde e o Programa da Informação e Qualidade de Medicamentos da Farmacopeia dos Estados Unidos. Os projectos de controlo da qualidade de fármacos que estão a decorrer no sudeste da Ásia e na África Oriental despoletaram, em anos recentes, a apreensão pela Interpol de milhões de comprimidos antimaláricos contrafeitos sem qualquer substância activa.

A necessidade incessante do controlo da qualidade de medicamentos não sofisticados a preços acessíveis em países com rendimentos reduzidos constitui a principal causa do desenvolvimento actual dos protocolos dos testes do novo GPHF - Minilab®. A necessidade de testes posteriores é igualmente um ponto de partida para a intensificação da colaboração com os nossos parceiros sediados nos Estados Unidos. São convidadas outras entidades a participar nesta acção, de modo a melhorar a saúde dos países em desenvolvimento.

\*\*\*

Composição e impressão por Grimm Grafik Design

O GPHF - Minilab® é produzido e fornecido pela Technologie Transfer Marburg, Cölbe, Alemanha

## Table of Contents

	Page
New TLC Test Protocols .....	4
<i>Supplement to Volume II, Chapter 6</i>	
<i>More Antimalarial, Antibacterial, Antituberculosis and Anthelmintic Medicines</i>	
6.42 Albendazole .....	4
6.43 Atovaquone (incl. proguanil co-formulations) .....	8
6.44 Cefixime .....	12
6.45 Cefuroxime axetil.....	16
6.46 Halofantrine .....	20
6.47 Levofloxacin .....	24
6.48 Moxifloxacin .....	28
6.49 Proguanil .....	32
6.50 Prothionamide .....	36
Summary Table of Chromatographic Working Conditions .....	40
<i>Supplement to Volume II, Chapter 7</i>	
Updated List of GPHF-Minilab® Reference Standards.....	41
<i>Supplement to Volume II, Chapter 10</i>	
Health St Safety Instructions .....	43



## Índice

	Página
Protocolos para Novos Testes por CCF4	
<i>Suplemento para o Volume II, Capítulo</i> .....	4
<i>Mais Medicamentos Antimaláricos, Antibacterianos, Antituberculosos e Anti-helmínticos</i>	
6.42 Albendazol .....	4
6.43 Atovaquona (incl. associação com proguanilo) .....	8
6.44 Cefixima .....	12
6.45 Cefuroxima axetil .....	16
6.46 Halofantrina .....	20
6.47 Levofloxacina .....	24
6.48 Moxifloxacina .....	28
6.49 Proguanilo .....	32
6.50 Protionamida .....	36
Resumo dos Procedimentos de Teste por CCF .....	40
<i>Suplemento para o Volume II, Capítulo 7</i>	
Lista actualizada dos Padrões de Referência do GPHF - Minilab® .....	41
<i>Suplemento para o Volume II, Capítulo 10</i>	
Instruções de Saúde & Segurança.....	43

## Page 4

### Albendazole

#### Primary Screening via Visual Inspection and Disintegration Test

##### I. VISUAL & PHYSICAL INSPECTION

Search for deficiencies on labelling, packaging and dosage forms as described in the opening chapters on general methods and operations of the main manual. Write down all product particulars using the reporting form as a guide. Each tablet or capsule usually contains 200 or 400 mg of albendazole.

##### II. DISINTEGRATION TEST

All quick release albendazole tablets and capsules must pass the disintegration test as described in the opening chapters on general methods and operations of the main manual. They should disintegrate in water at 37 °C in less than 30 minutes. It's a major defect if a drug product doesn't pass this test.

##### III. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

Drug products from unusually cheap sources, drug products with missing or incorrect accompanying documents and drug products with defective dosage forms, packaging or with incomplete, damaged or missing labels or with labels written in a foreign language should be subjected to a thin layer chromatographic test.

#### Verification of Drug Identity and Content via Thin Layer Chromatography

##### I. PRINCIPLE

Albendazole is extracted from tablets and capsules with glacial acetic acid and determined by TLC with reference to an authentic secondary standard.

##### II. EQUIPMENT AND REAGENTS

- 1) Pestle
- 2) Aluminium foil
- 3) Funnel
- 4) Label tape
- 5) Marker pen
- 6) Pencil
- 7) 10-ml vials
- 8) Set of straight pipettes (1 to 25 ml)
- 9) Set of laboratory glass bottles (25 to 100 ml)
- 10) Merck TLC aluminium plates pre-coated with silica gel 60 F 254, size 5x10 cm
- 11) Glass microcapillaries (2- $\mu$ l filling capacity)
- 12) TLC developing chamber (500-ml jar)
- 13) Hot plate
- 14) Filter paper
- 15) Pair of scissors
- 16) Pair of tweezers
- 17) UV light of 254 nm
- 18) Iodine chamber
- 19) Ethyl acetate
- 20) Glacial acetic acid
- 21) Toluene
- 22) Authentic reference standard, for example, albendazole 400 mg tablets

## **Página 4**

### **Albendazol**

Triagem Primária com Inspeção Visual e Teste de Desagregação

#### **I. INSPEÇÃO VISUAL & FÍSICA**

Procure deficiências na rotulagem, embalagem e nas formas de dosagem, tal como descrito nos capítulos iniciais sobre os métodos e procedimentos gerais do manual principal. Registe todos os pormenores do produto, usando os formulários para relatório como orientação. Cada comprimido ou cápsula normalmente contém 200 ou 400 mg de albendazol.

#### **II. TESTE DE DESAGREGAÇÃO**

Todos os comprimidos e cápsulas de albendazol de libertação rápida devem passar o teste de desagregação, tal como se descreve nos capítulos iniciais sobre métodos e procedimentos gerais do manual principal. Devem desagregar-se em água a 37 ° C em menos de 30 minutos. Se o fármaco não passar este teste, constitui um defeito importante.

#### **III. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR**

Produtos farmacêuticos a preços vulgarmente baratos, medicamentos com documentos de apoio em falta ou incorrectos e medicamentos com formas de dosagem irregulares, embalagens deficientes ou rótulos incompletos, danificados ou ausentes ou com rótulos escritos em língua estrangeira, devem ser submetidos a um teste cromatográfico em camada fina.

### **Verificação da Identidade e Teor do Fármaco através da Cromatografia em Camada Fina**

#### **I. PRINCÍPIO**

O albendazol é extraído de comprimidos e cápsulas com ácido acético glacial e determinado por CCF, tendo em conta os padrões secundários de referência.

#### **II. EQUIPAMENTO E REAGENTES**

- 1) Pilão
- 2) Folha de alumínio
- 3) Funil
- 4) Fita adesiva
- 5) Marcador
- 6) Lápis
- 7) Frascos de 10 ml
- 8) Conjunto de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
- 9) Conjunto de frascos de vidro de laboratório (25 a 100 ml)
- 10) Placas de alumínio de CCF da Merck previamente revestidas de gel de sílica 60F 254, tamanho 5x10 cm
- 11) Microcapilares de vidro (capacidade de 2 µl)
- 12) Câmara de eluição de CCF (frasco de 500 ml)
- 13) Placa de aquecimento
- 14) Papel de filtro
- 15) Tesoura
- 16) Pinças
- 17) Luz ultravioleta de 254 nm
- 18) Câmara de iodo
- 19) Acetato de etilo
- 20) Ácido acético glacial
- 21) Tolueno
- 22) Padrão de referência autêntico, por exemplo comprimidos de albendazol de 400 mg

### III. PREPARATION OF THE STOCK STANDARD SOLUTION

The preparation of the stock standard solution requires an authentic drug product for reference purposes, for example, tablets containing 400 mg of albendazole. Wrap up one reference tablet into aluminium foil and crush it down to a fine powder using a pestle. Carefully empty the aluminium foil over a 100-ml laboratory glass bottle and wash down all residual solids with 40 ml of glacial acetic acid using a straight pipette. Close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 10 mg of total drug per ml and be labelled as '*Albendazole Stock Standard Solution*'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the hazy supernatant liquid.

### IV. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 100% (UPPER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 7 ml of glacial acetic acid. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 1.25 mg of total drug per ml and be labelled as '*Albendazole Working Standard Solution 100%*'.

This higher working standard solution represents a drug product of good quality containing 100 % of albendazole.

### V. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 80% (LOWER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 9 ml of glacial acetic acid. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 1 mg of total drug per ml and be labelled as '*Albendazole Working Standard Solution 80%*'.

This lower working standard solution represents a drug product of poor quality containing just 80% of the amount of albendazole as stated on the product's label. In the current investigation, this drug level represents the lower acceptable limit for a given product.

### VI. PREPARATION OF THE STOCK SAMPLE SOLUTION FROM A PRODUCT CLAIMING TO CONTAIN 200 MG OF ALBENDAZOLE PER UNIT

Take one whole tablet or capsule from an appropriate drug product sampled in the field. As usual, tablets are wrapped up into aluminium foil and crushed down to a fine powder. Transfer all the powder obtained into a 25-ml laboratory glass bottle. Powder obtained from a sample capsule should be transferred directly into the bottle adding the cap and body shells last. For extraction, add 20 ml of glacial acetic acid using a straight pipette, close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid.

#### 400 MG OF ALBENDAZOLE PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 40 ml of glacial acetic acid using a straight pipette and a 40-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

All stock sample solutions produced should finally contain 10 mg of total drug per ml and be labelled as '*Albendazole Stock Sample Solution*'. Freshly prepare these solutions for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquids.

### III. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DO PADRÃO

A preparação da solução stock do padrão requer um medicamento autêntico para servir de referência, por exemplo comprimidos de 400 mg de albendazol. Embrulhe um comprimido de referência numa folha de alumínio e esmague-o, até ficar em pó fino, usando o pilão. Transfira, cuidadosamente, o conteúdo da folha de alumínio para um frasco de vidro de laboratório de 100 ml e lave o resto dos resíduos sólidos com 40 ml de ácido acético glacial com uma pipeta graduada. Feche o frasco e agite durante cerca de três minutos, até que a maior parte dos sólidos se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos que não se dissolveram se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter o fármaco numa concentração total de 10 mg por ml e ser rotulada como "*Solução Stock do Padrão de Albendazol*". Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante turvo.

### IV. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 100% (CONCENTRAÇÃO LIMITE SUPERIOR DE TRABALHO)

Pipete 1 ml da solução stock do padrão para um frasco de 10 ml e adicione 7 ml de ácido acético glacial. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter o fármaco numa concentração total de 1,25 mg por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Albendazol a 100%*".

Esta solução padrão de trabalho com concentração limite superior representa um medicamento de alta qualidade que contém 100% de albendazol.

### V. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 80% (CONCENTRAÇÃO LIMITE MÍNIMO DE TRABALHO)

Pipete 1 ml da solução stock do padrão para um frasco de 10 ml e adicione 9 ml de ácido acético glacial. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter o fármaco numa concentração total de 1 mg por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Albendazol a 80%*".

Esta solução padrão de trabalho com concentração limite inferior representa um medicamento de fraca qualidade e contém apenas 80% do albendazol referido no rótulo do produto. Nesta investigação, este nível de fármaco representa o limite mínimo aceitável para tal produto.

### VI. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DE AMOSTRA DE UM PRODUTO DITO CONTER 200 MG DE ALBENDAZOL POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula de uma amostra do produto. Como anteriormente, os comprimidos devem ser embrulhados numa folha de alumínio e esmagados até ficarem em pó fino. Transfira todo o pó obtido para um frasco de vidro de laboratório de 25 ml. Deve transferir directamente para o frasco o pó obtido de uma cápsula, adicionando, de seguida, o invólucro. Para proceder à extracção, adicione 20 ml de ácido acético glacial, usando uma pipeta graduada, feche o frasco e agite-o durante cerca de três minutos, até que a maior parte dos sólidos se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos que não se dissolveram se depositem no fundo do frasco.

#### 400 MG DE ALBENDAZOL POR UNIDADE

Extraia o pó obtido da amostra de um comprimido ou de uma cápsula com 40 ml de ácido acético glacial, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 40 ml, como recipiente para amostras. Continue como indicado anteriormente.

Todas as soluções stock de amostra preparadas devem, no fim do procedimento, conter o fármaco numa concentração total de 10 mg por ml e serem rotuladas como "*Solução Stock da Amostra de Albendazol*". Prepare novas soluções para cada teste. Continue a usar os líquidos sobrenadantes límpidos ou turvos.

#### VII. PREPARATION OF THE WORKING SAMPLE SOLUTION

Pipette 1 ml of the stock sample solution into a 10-ml vial and add 7 ml of glacial acetic acid. Close and shake the vial and label as '*Albendazole Working Sample Solution*'.

The expected concentration of albendazole in this working sample solution is 1.25 mg per ml and should match the concentration of albendazole of the higher working standard solution produced above.

#### VIII. SPOTTING

Mark an origin line parallel to and about 1.5 cm from the bottom edge of the chromatoplate and apply 2 µl of each test and standard solution as shown in the picture opposite using the microcapillary pipettes supplied.

Up to five spots can be placed on a plate. Check the uniformity of all spots using UV light of 254 nm. All spots should be circular in shape and equally spaced across the origin line. Although their intensities might differ, their diameters never should. Different intensities are due to residual amounts of tablet and capsule excipients or different drug concentrations in the sample solutions. A difference in spot size, however, relates to poor spotting. Repeat this step if homogeneous spotting is not achieved first time.

#### IV. DEVELOPMENT

Pipette 10 ml of toluene, 4 ml of ethyl acetate and 8 ml of glacial acetic acid into the jar being used as TLC developing chamber. Close the chamber and mix thoroughly. Line the chamber's wall with filter paper and wait for about 15 minutes thus ensuring saturation of the chamber with solvent vapour. Carefully place the loaded TLC plate into the jar. Close the jar and develop the chromatoplate until the solvent front has moved about three-quarters of the length of the plate, the developing time being about 20 minutes. Remove the plate from the chamber, mark the solvent front and allow any excess solvent to evaporate using a hot plate if necessary.

#### X. DETECTION

Dry off all residual solvent and observe the chromatoplate under UV light of 254 nm using the battery-driven lamp supplied. Use this method of detection for both, identification and quantification purposes. Further verification of drug identity and content can be achieved when observing the plate at daylight after iodine staining.

#### VII. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AMOSTRA DE TRABALHO

Pipete 1 ml da solução stock de amostra para um frasco de 10 ml e adicione 7 ml de ácido acético glacial. Feche o frasco e agite-o. Rotule-o como "*Solução Amostra de Trabalho de Albendazol*".

Estima-se que a concentração de albendazol nesta solução de amostra seja de 1,25 mg por ml e deve ser igual à concentração de albendazol na solução padrão de trabalho com concentração limite superior preparada anteriormente.

#### VIII. APLICAÇÃO

Trace uma linha paralela à base da placa cromatográfica, a cerca de 1,5 cm da base, e aplique 2 µl de cada solução, de padrão e de teste, como ilustrado na figura do lado oposto, usando os microcapilares de vidro fornecidos.

Podem ser aplicadas cinco manchas numa placa. Confirme a uniformidade das manchas através da luz ultravioleta de 254 nm. Todas as manchas devem ser circulares e separadas entre si por uma distância igual ao longo da linha de base. Apesar de as suas intensidades poderem diferir, o seu diâmetro deve ser sempre igual. As diferentes intensidades devem-se a diferentes quantidades residuais de excipientes dos comprimidos e cápsulas ou devido a diferentes concentrações de fármaco na solução de amostra. Porém, se as manchas apresentarem um tamanho diferente deve-se a uma incorrecta técnica de aplicação. Repita este passo, se não conseguir uma marcação homogénea à primeira tentativa.

#### IX. ELUIÇÃO

Pipete 10 ml de tolueno, 4 ml de acetato de etilo e 8 ml de ácido acético glacial para o frasco que está a ser usado como câmara de eluição de CCF. Feche a câmara e misture bem. Revista a parede da câmara com papel de filtro e aguarde cerca de 15 minutos para assegurar a saturação da câmara com o vapor do solvente. Coloque, com cuidado, a placa de CCF contendo os compostos no frasco. Feche o frasco e elua a placa cromatográfica antes que a frente de solvente tenha percorrido três-quartos do comprimento da placa, tendo em conta que a eluição da placa demora cerca de 20 minutos. Remova a placa da câmara, marque a frente solvente e deixe que o excesso de solvente se evapore. Se for necessário, use a placa de aquecimento.

#### X. REVELAÇÃO

Deixe que todos os resíduos do solvente evaporem da placa cromatográfica e observe-a com luz ultravioleta de 254 nm, usando a lanterna a pilhas fornecida. Use este método de detecção para efeitos de identificação e de quantificação. Para verificação adicional da autenticidade e teor do fármaco, observe a placa à luz do dia após a coloração com iodo.

**XI. CHROMATOPLATE OBSERVED UNDER UV LIGHT OF 254 NM**

Run No.1: Upper working standard representing 100% of total albendazole

Run No.2: A drug product of good quality with acceptable drug content

Run No.3: A drug product of poor quality with unacceptable low drug content

Run No.4: Lower working standard representing 80% of total albendazole

(Solvent front)

Principal spot

(Origin line)

**XII. OBSERVATIONS MADE AT 254 NM**

A strong blue-violet spot at a travel distance of about 0.56 indicates the presence of albendazole in the test solution. Additional strong spots generated by the test solution would point at other drugs or albendazole degradation, the latter case being more likely when associated with a smaller principal spot. Auxiliary agents incorporated in the different tablet or capsule formulations might cause some fainter spots emerging near or on the origin line.

**XIII. OBSERVATIONS MADE AT DAYLIGHT AFTER IODINE STAINING**

When exposing the chromatoplate to iodine vapour, all albendazole spots already observed at 254 nm are now turning yellowish brown. Still observe the plate when iodine evaporates already. Spots reflecting poor quality products will disappear first gradually followed by the reference spots representing a drug content of 80 and 100 percent, respectively.

**XIV. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN**

The albendazole spot in the chromatogram obtained with the test solution must correspond in terms of colour, size, intensity, shape and travel distance to that in the chromatogram obtained with the lower and higher standard solution. This result must be obtained for each method of detection. If this is not achieved, repeat the run from scratch with a second sample. Reject the batch if the drug content cannot be verified in a third run. For precise drug content determination, refer additional samples to a fully-fledged drug quality control laboratory. Retain samples and put the batch on quarantine until a final decision on rejection or release has been taken.



**XI. PLACA CROMATOGRÁFICA OBSERVADA SOB LUZ UV DE 254 NM**

1ª corrida: Padrão com concentração limite superior de trabalho, representando 100% de albendazol

2ª corrida: Medicamento de boa qualidade com conteúdo aceitável de fármaco

3ª corrida: Medicamento de fraca qualidade com conteúdo baixo e inaceitável de fármaco

4ª corrida: Padrão com concentração limite inferior de trabalho, representando 80% de albendazol

(Frente solvente)

Mancha principal

(linha de base)

**XII. OBSERVAÇÃO A 254 NM**

Uma mancha azul-violeta forte com uma distância relativa percorrida de cerca de 0,56 indica a presença de albendazol na solução de teste. Manchas fortes adicionais formadas pela solução de teste podem indicar a presença de outros fármacos ou a degradação de albendazol, estando este último caso associado a uma mancha principal mais pequena. Os agentes auxiliares incorporados nas diferentes formulações dos comprimidos ou cápsulas podem originar manchas mais fracas, perto da linha de base ou sobre esta.

**XIII. OBSERVAÇÃO À LUZ DO DIA APÓS COLORAÇÃO COM IODO**

Aquando da exposição da placa cromatográfica ao vapor de iodo, todas as manchas de albendazol anteriormente observadas a 254 nm tornam-se amarelo-acastanhadas. Observe a placa durante a evaporação do iodo. As manchas que denunciam um produto de fraca qualidade desaparecerão em primeiro lugar, gradualmente, seguidas pelas manchas de referência que representam um teor de fármaco de 80 e 100 por cento, respectivamente.

**XIV. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR**

A mancha de albendazol no cromatograma obtida através da solução de teste deve corresponder, em termos de cor, tamanho, intensidade, forma e distância relativa percorrida, às manchas do cromatograma obtidas com as soluções padrão de trabalho com concentração limite inferior e superior. Deve obter este resultado para cada método de detecção. Se não conseguir obter este resultado, repita o teste do início com uma segunda amostra. Se não conseguir verificar o teor do fármaco num terceiro teste, rejeite o lote. Para determinar, de forma precisa, o teor do fármaco, envie outras amostras para um laboratório profissional de controlo de qualidade de medicamentos. Guarde algumas amostras e coloque o lote em quarentena até que se tome uma decisão final sobre a sua rejeição ou libertação.

### **Atovaquone (including proguanil co-formulations)**

Primary Screening via Visual Inspection and Disintegration Test

#### **I. VISUAL & PHYSICAL INSPECTION**

Search for deficiencies on labelling, packaging and dosage forms as described in the opening chapters on general methods and operations of the main manual. Write down all product particulars using the reporting form as a guide. Atovaquone is available for the treatment of malaria usually in a co-formulation with proguanil. For use in adults, tablets or capsules are containing 250 mg of atovaquone and 100 mg of proguanil hydrochloride and for paediatric use, 62.5 mg of atovaquone and 25 mg of proguanil hydrochloride, respectively. Atovaquone single dosage forms are known to exist.

#### **II. DISINTEGRATION TEST**

All quick release atovaquone tablets and capsules must pass the disintegration test as described in the opening chapters on general methods and operations of the main manual. They should disintegrate in water at 37 °C in less than 30 minutes. It's a major defect if a drug product doesn't pass this test.

#### **III. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN**

Drug products from unusually cheap sources, drug products with missing or incorrect accompanying documents and drug products with defective dosage forms, packaging or with incomplete, damaged or missing labels or with labels written in a foreign language should be subjected to a thin layer chromatographic test.

### **Verification of Drug Identity and Content via Thin Layer Chromatography**

#### **I. PRINCIPLE**

Both compounds, atovaquone and proguanil, are extracted from co-formulated tablets and capsules with methanolic acetone solution and determined simultaneously by TLC with reference to an authentic secondary standard. Atovaquone single dosage forms can be extracted with acetone alone.

#### **II. EQUIPMENT AND REAGENTS**

- 1) Pestle
- 2) Aluminium foil
- 3) Funnel
- 4) Label tape
- 5) Marker pen
- 6) Pencil
- 7) 10-ml vials
- 8) Set of straight pipettes (1 to 25 ml)
- 9) Set of laboratory glass bottles (25 to 100 ml)
- 10) Merck TLC aluminium plates pre-coated with silica gel 60 F 254, size 5x10 cm
- 11) Glass microcapillaries (2- $\mu$ l filling capacity)
- 12) TLC developing chamber (500-ml jar)
- 13) Hot plate
- 14) Filter paper
- 15) Pair of scissors

## **Página 8**

### **Atovaquona (incluindo associações com proguanilo)**

Triagem Primária com Inspeção Visual e Teste de Desagregação

#### **I. INSPEÇÃO VISUAL & FÍSICA**

Procure deficiências na rotulagem, embalagem e nas formas de dosagem, tal como descrito nos capítulos iniciais sobre os métodos e procedimentos gerais do manual principal. Registe todos os pormenores do produto, usando os formulários para relatório como orientação. A atovaquona está disponível para o tratamento da malária, normalmente em associações com proguanilo. Existem, para adultos, comprimidos ou cápsulas que contêm 250 mg de atovaquona e 100 mg de cloridrato de proguanilo e, para uso pediátrico, existem comprimidos ou cápsulas com 62,5 mg de atovaquona e 25 mg de cloridrato de proguanilo. Sabe-se que existem formas de dosagem únicas de atovaquona.

#### **II. TESTE DE DESAGREGAÇÃO**

Todos os comprimidos e cápsulas de atovaquona de libertação rápida devem passar o teste de desagregação, tal como se descreve nos capítulos iniciais sobre métodos e procedimentos gerais do manual principal. Devem desagregar-se em água a 37 ° C em menos de 30 minutos. Se o fármaco não passar este teste, constitui um defeito importante.

#### **III. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR**

Produtos farmacêuticos a preços vulgarmente baratos, medicamentos com documentos de apoio em falta ou incorrectos e medicamentos com formas de dosagem irregulares, embalagens deficientes ou rótulos incompletos, danificados ou ausentes ou com rótulos escritos em língua estrangeira, devem ser submetidos a um teste cromatográfico em camada fina.

Verificação da Identidade e Teor do Fármaco através da Cromatografia em Camada Fina

#### **I. PRINCÍPIO**

Ambos os compostos, atovaquona e proguanilo, são extraídos de comprimidos e cápsulas com co-formulações com uma solução metanólica de acetona e simultaneamente determinados por CCF, tendo em conta os padrões secundários de referência. As formas farmacêuticas contendo simplesmente atovaquona podem ser extraídas usando apenas acetona.

#### **II. EQUIPAMENTO E REAGENTES**

- 1) Pilão
- 2) Folha de alumínio
- 3) Funil
- 4) Fita adesiva
- 5) Marcador
- 6) Lápis
- 7) Frascos de 10 ml
- 8) Conjunto de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
- 9) Conjunto de frascos de vidro de laboratório (25 a 100 ml)
- 10) Placas de alumínio de CCF da Merck previamente revestidas de gel de sílica 60F 254, tamanho 5x10 cm
- 11) Microcapilares de vidro (capacidade de 2 µl)
- 12) Câmara de eluição de CCF (frasco de 500 ml)
- 13) Placa de aquecimento
- 14) Papel de filtro
- 15) Tesoura

(continuação da página 8 do texto de partida)

- 16) Pair of tweezers
- 17) UV light of 254 nm
- 18) Iodine chamber
- 19) Acetone
- 20) Methanol
- 21) Glacial acetic acid
- 22) Secondary reference standard, for example, co-formulated tablets containing 62.5 mg of atovaquone and 25 mg of proguanil hydrochloride

(continuação da tradução da página 8)

- 16) Pinças
- 17) Luz ultravioleta de 254 nm
- 18) Câmara de iodo
- 19) Acetona
- 20) Metanol
- 21) Ácido acético glacial
- 22) Padrão secundário de referência, por exemplo comprimidos de co-formulações contendo 62,5 mg de atovaquona e 25 mg de cloridrato de proguanilo

### III. PREPARATION OF THE EXTRACTION MEDIUM

For the extraction from tablets and capsules, atovaquone/ proguanil co-formulations require the use of methanolic acetone solution consisting of 25% of methanol and 75% of acetone.

### IV. PREPARATION OF THE STOCK STANDARD SOLUTION

The preparation of the stock standard solution requires an authentic drug product for reference purposes, for example, tablets containing 62.5 mg of atovaquone combined with 25 mg of proguanil hydrochloride. Wrap up one reference tablet into aluminium foil and crush it down to a fine powder using a pestle. Carefully empty the aluminium foil over a 25-ml laboratory glass bottle and wash down all residual solids with 12.5 ml of methanolic acetone solution using a straight pipette. Close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 5 mg of atovaquone and 2 mg of proguanil hydrochloride per ml and be labelled as '*Atovaquone Stock Standard Solution*'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquid.

### V. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 100% (UPPER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 3 ml of methanolic acetone solution. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 1.25 mg of atovaquone and 0.5 mg of proguanil hydrochloride per ml and be labelled as '*Atovaquone Working Standard Solution 100%*'.

This higher working standard solution represents a drug product of good quality containing 100 % of atovaquone and proguanil.

### V. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 80% (LOWER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 4 ml of methanolic acetone solution. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 1 mg of atovaquone and 0.4 mg of proguanil hydrochloride per ml and be labelled as '*Atovaquone Working Standard Solution 80%*'.

This lower working standard solution represents a drug product of poor quality containing just 80% of the amount of atovaquone and proguanil as stated on the product's label. In the current investigation, this drug level represents the lower acceptable limit for a given product.

### VII. PREPARATION OF THE STOCK SAMPLE SOLUTION FROM A PRODUCT CLAIMING TO CONTAIN 62.5 MG OF ATOVAQUONE AND 25 MG OF PROGUANIL HCL PER UNIT

Take one whole tablet or capsule from an appropriate drug product sampled in the field. As usual, tablets are wrapped up into aluminium foil and crushed down to a fine powder. Transfer all the powder obtained into a 25-ml laboratory glass bottle. Powder obtained from sample capsules should be transferred directly into the bottle adding the cap and body shells last. For extraction, add 12.5 ml of methanolic acetone solution using a straight pipette, close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid.

### 250 MG OF ATOVAQUONE AND 100 MG OF PROGUANIL HCL PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 50 ml of methanolic acetone solution using a straight pipette and a 100-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

### III. PREPARAÇÃO DO MEIO DE EXTRACÇÃO

Para proceder à extracção a partir de comprimidos e cápsulas, as co-formulações de atovaquona/proguanilo necessitam do uso de uma solução metanólica de acetona que deve conter 25% de metanol e 75% de acetona.

### IV. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DO PADRÃO

A preparação da solução stock do padrão requer um medicamento autêntico para servir de referência, por exemplo comprimidos de 62,5 mg de atovaquona combinados com 25 mg de cloridrato de proguanilo. Embrulhe um comprimido de referência numa folha de alumínio e esmague-o, até ficar em pó fino, usando o pilão. Transfira, cuidadosamente, o conteúdo da folha de alumínio para um frasco de vidro de laboratório de 25 ml e lave o resto dos resíduos sólidos com 12,5 ml de solução metanólica de acetona com uma pipeta graduada. Feche o frasco e agite durante cerca de três minutos, até que a maior parte dos sólidos se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos que não se dissolveram se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter 5 mg de atovaquona e 2 mg de cloridrato de proguanilo por ml e ser rotulada como "*Solução Stock do Padrão de Atovaquona*". Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante, límpido ou turvo.

### V. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 100% (CONCENTRAÇÃO LIMITE SUPERIOR DE TRABALHO)

Pipete 1 ml da solução stock do padrão para um frasco de 10 ml e adicione 3 ml de solução metanólica de acetona. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 1,25 mg de atovaquona e 0,5 mg de cloridrato de proguanilo por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Atovaquona a 100%*".

Esta solução padrão de trabalho com concentração limite superior representa um medicamento de alta qualidade que contém 100% de atovaquona e proguanilo.

### V. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 80% (CONCENTRAÇÃO LIMITE MÍNIMO DE TRABALHO)

Pipete 1 ml da solução stock do padrão para um frasco de 10 ml e adicione 4 ml de uma solução metanólica de acetona. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 1 mg de atovaquona e 0,4 mg de cloridrato de proguanilo por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Atovaquona a 80%*".

Esta solução padrão de trabalho com concentração limite inferior representa um medicamento de fraca qualidade e contém apenas 80% da atovaquona e do proguanilo referidos no rótulo do produto. Nesta investigação, este nível de fármaco representa o limite mínimo aceitável para tal produto.

### VI. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AMOSTRA DE TRABALHO DE UM PRODUTO DITO CONTER 62,5 MG DE ATOVAQUONA E 25 MG DE CLORIDRATO DE PROGUAANO POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula de uma amostra do produto. Como anteriormente, os comprimidos devem ser embrulhados numa folha de alumínio e esmagados até ficarem em pó fino. Transfira todo o pó obtido para um frasco de vidro de laboratório de 25 ml. Deve transferir directamente para o frasco o pó obtido das cápsulas de amostra, adicionando, por último, o invólucro. Para proceder à extracção, adicione 12,5 ml da solução metanólica de acetona, usando uma pipeta graduada, feche o frasco e agite-o durante cerca de três minutos, até que a maior parte dos sólidos se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos que não se dissolveram se depositem no fundo do frasco.

### 250 MG DE ATOVAQUONA E 100 MG DE CLORIDRATO DE PROGUAANO POR UNIDADE

Extraia o pó obtido da amostra de um comprimido ou de uma cápsula com 50 ml da solução metanólica de acetona, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 100 ml, como recipiente para amostras. Continue como indicado anteriormente.

#### 250 MG OF ATOVAQUONE SINGLE-DOSE PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 50 ml of acetone using a straight pipette and a 100-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

All stock sample solutions produced should finally contain 5 mg of atovaquone and in case of co-formulations also 2 mg of proguanil hydrochloride per ml and be labelled as '*Atovaquone Stock Sample Solution*'. Freshly prepare these solutions for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquids.

#### VIII. PREPARATION OF THE WORKING SAMPLE SOLUTION

Pipette 1 ml of the stock sample solution into a 10-ml vial and add 3 ml of methanolic acetone solution. Close and shake the vial and label as '*Atovaquone Working Sample Solution*'.

The expected concentration of atovaquone in the working sample solution is 1.25 mg and that of proguanil hydrochloride 0.5 mg per ml and each of both compounds should match the concentration of their appropriate counterpart in the higher working standard solution produced above.

#### IX. SPOTTING

Mark an origin line parallel to and about 1.5 cm from the bottom edge of the chromatoplate and apply 2  $\mu$ l of each test and standard solution as shown in the picture opposite using the microcapillary pipettes supplied.

Up to five spots can be placed on a plate. Check the uniformity of all spots using UV light of 254 nm. All spots should be circular in shape and equally spaced across the origin line. Although their intensities might differ, their diameters never should. Different intensities are due to residual amounts of tablet and capsule excipients or different drug concentrations in the sample solutions. A difference in spot size, however, relates to poor spotting. Repeat this step if homogeneous spotting is not achieved first time.

#### X. DEVELOPMENT

Pipette 15 ml of acetone, 5 ml of methanol and 0.5 ml of glacial acetic acid into the jar being used as TLC developing chamber. Close the chamber and mix thoroughly. Line the chamber's wall with filter paper and wait for about 15 minutes thus ensuring saturation of the chamber with solvent vapour. Carefully place the loaded TLC plate into the jar. Close the jar and develop the chromatoplate until the solvent front has moved about three-quarters of the length of the plate, the developing time being about 15 minutes. Remove the plate from the chamber, mark the solvent front and allow any excess solvent to evaporate using a hot plate if necessary.

#### XI. DETECTION

Dry off all residual solvent and observe the chromatoplate first at daylight and later under ultraviolet light of 254 nm using the battery-driven UV lamp supplied. Use the UV detection for both, identification and quantification purposes. Further verification of drug identity and content can be achieved when observing the plate at daylight after iodine staining.



#### 250 MG DE ATOVAQUONA POR UNIDADE

Extraia o pó obtido da amostra de um comprimido ou de uma cápsula com 50 ml de acetona, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 100 ml, como recipiente para amostras. Continue como indicado anteriormente.

Todas as soluções stock de amostra preparadas devem, no fim do procedimento, conter 5 mg de atovaquona e, no caso das co-formulações, devem conter igualmente 2 mg de cloridrato de proguanilo por ml e serem rotuladas como “*Solução Stock da Amostra de Atovaquona*”. Prepare novas soluções para cada teste. Continue a usar os líquidos sobrenadantes límpidos ou turvos.

#### VII. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AMOSTRA DE TRABALHO

Pipete 1 ml da solução stock de amostra para um frasco de 10 ml e adicione 3 ml da solução metanólica de acetona. Feche o frasco e agite-o. Rotule-o como “*Solução Amostra de Trabalho de Atovaquona*”.

Estima-se que a concentração de atovaquona nesta solução de amostra de trabalho seja de 1,25 mg por ml e a de cloridrato de proguanilo de cerca de 0,5 mg por ml e a concentração de cada um dos compostos deve ser igual à concentração da sua contraparte apropriada na solução padrão de trabalho com concentração limite superior preparada anteriormente.

#### VIII. APLICAÇÃO

Trace uma linha paralela à base da placa cromatográfica, a cerca de 1,5 cm da base, e aplique 2 µl de cada solução, de padrão e de teste, como ilustrado na figura do lado oposto, usando os microcapilares de vidro fornecidos.

Podem ser aplicadas cinco manchas numa placa. Confirme a uniformidade das manchas através da luz ultravioleta de 254 nm. Todas as manchas devem ser circulares e separadas entre si por uma distância relativa percorrida igual ao longo da linha de base. Apesar de as suas intensidades poderem diferir, o seu diâmetro deve ser sempre igual. As diferentes intensidades devem-se a diferentes quantidades residuais de excipientes dos comprimidos e cápsulas ou devido a diferentes concentrações de fármaco na solução de amostra. Porém, se as manchas apresentarem um tamanho diferente deve-se a uma incorrecta técnica de aplicação. Repita este passo, se não conseguir uma aplicação homogénea à primeira tentativa.

#### IX. ELUIÇÃO

Pipete 15 ml de acetona, 5 ml de metanol e 0,5 ml de ácido acético glacial para o frasco que está a ser usado como câmara de eluição de CCF. Feche a câmara e misture bem. Revista a parede da câmara com papel de filtro e aguarde cerca de 15 minutos para assegurar a saturação da câmara com o vapor do solvente. Coloque, com cuidado, a placa de CCF contendo os compostos no frasco. Feche o frasco e elua a placa cromatográfica antes que a frente de solvente tenha percorrido três-terços do comprimento da placa, tendo em conta que a eluição da placa demora cerca de 15 minutos. Remova a placa da câmara, marque a frente solvente e deixe que o excesso de solvente se evapore. Se for necessário, use a placa de aquecimento.

#### X. REVELAÇÃO

Deixe que todos os resíduos do solvente evaporem da placa cromatográfica observe-a primeiro à luz do dia e posteriormente sob luz ultravioleta de 254 nm, usando a lanterna a pilhas fornecida. Use o método de detecção de luz ultravioleta para efeitos de identificação e de quantificação. Para verificação adicional da autenticidade e teor do fármaco, observe a placa à luz do dia após a coloração com iodo.

XII. CHROMATOPLATE OBSERVED UNDER UV LIGHT OF 254 NM

Run No. 1: Upper working standard representing 100% of total atovaquone and proguanil

Run No.2: A fixed-dose combination product of good quality with acceptable drug content

Run No.3: A fixed-dose combination product of poor quality with acceptable low drug content

Run No.4: Lower working standard representing 80% of total atovaquone and proguanil

(Solvent front)

Principal spot for atovaquone

Principal spot for proguanil

(Origin line)

XIII. OBSERVATIONS MADE AT DAYLIGHT

A faint brownish orange spot at a travel distance of about 0.83 may already now indicate the presence of atovaquone in the test solution. No other spots should be visible even when atovaquone is combined with proguanil.

XIV. OBSERVATIONS MADE AT 254 NM

All atovaquone spots already observed at daylight near the solvent front are now turning bluish to brownish-grey and are much more intense. When combined with proguanil, a second spot in blue-violet colour will have to become visible much further down the plate at a travel distance of about 0.22. Additional strong spots generated by the test solution would point at other active ingredients or drug degradation, the latter case being more likely when associated with some smaller principal spots. Auxiliary agents incorporated in the different tablet or capsule formulations might cause some fainter spots emerging near or on the origin line.

XV. OBSERVATIONS MADE AT DAYLIGHT AFTER IODINE STAINING

When exposing the chromatoplate to iodine vapour, all atovaquone spots already observed at 254 nm are now turning yellowish brown. No other spots should be visible even when atovaquone is combined with proguanil. Still observe the plate when iodine evaporates already. Atovaquone spots reflecting poor quality products will disappear first gradually followed by the reference spots representing a drug content of 80 and 100 percent, respectively.

XVI. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

All spots in the chromatogram obtained with the test solution must correspond in terms of colour, size, intensity, shape and travel distance to that in the chromatogram obtained with the lower and higher standard solution. This result must be obtained for each method of detection. If this is not achieved, repeat the run from scratch with a second sample. Reject the batch if the drug content cannot be verified in a third run. For precise drug content determination, refer additional samples to a fully-fledged drug quality control laboratory. Retain samples and put the batch on quarantine until a final decision on rejection or release has been taken.

## XII. PLACA CROMATOGRÁFICA OBSERVADA SOB LUZ UV DE 254 NM

- 1ª corrida: Padrão com concentração limite superior de trabalho, representando 100% de atovaquona e proguanilo
- 2ª corrida: Medicamento de combinação de dose fixa de boa qualidade com conteúdo aceitável de fármaco
- 3ª corrida: Medicamento de combinação de dose fixa de fraca qualidade com conteúdo baixo de fármaco e inaceitável
- 4ª corrida: Padrão com concentração limite inferior de trabalho, representando 80% de atovaquona e proguanilo

(Frente solvente)

Mancha principal de atovaquona

Mancha principal de proguanilo

(linha de base)

## XIII. OBSERVAÇÃO À LUZ DO DIA

Uma mancha laranja-acastanhada esmorecida com uma distância relativa percorrida de cerca de 0,83 pode já indicar a presença de atovaquona na solução de teste. Mesmo quando a atovaquona é associada a proguanilo, não se devem tornar visíveis outras manchas.

## XIV. OBSERVAÇÃO A 254 NM

Todas as manchas de atovaquona que se encontram perto da frente de solvente e foram observadas anteriormente à luz do dia, tornam-se agora de azulado a cinzento-acastanhado e muito mais intensas. Aquando da associação da atovaquona a proguanilo, uma segunda mancha, de cor azul-violeta, terá que tornar-se visível bem mais abaixo na placa, a uma distância relativa percorrida de cerca de 0,22. Manchas fortes adicionais formadas pela solução de teste podem indicar a presença de outros ingredientes activos ou a degradação do fármaco, estando este último caso associado a algumas manchas principais mais pequenas. Os agentes auxiliares incorporados nas diferentes formulações dos comprimidos ou cápsulas podem originar manchas mais fracas, perto da linha de base ou sobre esta.

## XV. OBSERVAÇÃO À LUZ DO DIA APÓS COLORAÇÃO COM IODO

Aquando da exposição da placa cromatográfica ao vapor de iodo, todas as manchas de atovaquona anteriormente observadas a 254 nm tornam-se amarelo-acastanhadas. Mesmo quando a atovaquona é misturada com proguanilo, não se devem tornar visíveis outras manchas. Observe a placa durante a evaporação do iodo. As manchas de atovaquona que denunciam produtos de fraca qualidade desaparecerão em primeiro lugar, gradualmente, seguidas pelas manchas de referência, que representam um teor de fármaco de 80 e 100 por cento, respectivamente.

## XVI. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

Todas as manchas no cromatograma obtidas através da solução de teste devem corresponder, em termos de cor, tamanho, intensidade, forma e distância relativa percorrida, às manchas do cromatograma obtidas com as soluções padrão de trabalho com concentração limite inferior e superior. Deve obter este resultado para cada método de detecção. Se não conseguir obter este resultado, repita o teste do início com uma segunda amostra. Se não conseguir verificar o teor do fármaco num terceiro teste, rejeite o lote. Para determinar, de forma precisa, o teor do fármaco, envie outras amostras para um laboratório profissional de controlo de qualidade de medicamentos. Guarde algumas amostras e coloque o lote em quarentena até que se tome uma decisão final sobre a sua rejeição ou libertação.

## Cefixime

### Primary Screening via Visual Inspection and Disintegration Test

#### I. VISUAL & PHYSICAL INSPECTION

Search for deficiencies on labelling, packaging and dosage forms as described in the opening chapters on general methods and operations of the main manual. Write down all product particulars using the reporting form as a guide. Each tablet or capsule usually contains 100, 200 or 400 mg of anhydrous cefixime. Other dosage strengths are known to exist.

#### II. DISINTEGRATION TEST

All quick release cefixime tablets and capsules must pass the disintegration test as described in the opening chapters on general methods and operations of the main manual. They should disintegrate in water at 37 °C in less than 30 minutes. It's a major defect if a drug product doesn't pass this test.

#### III. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

Drug products from unusually cheap sources, drug products with missing or incorrect accompanying documents and drug products with defective dosage forms, packaging or with incomplete, damaged or missing labels or with labels written in a foreign language should be subjected to a thin layer chromatographic test.

### Verification of Drug Identity and Content via Thin Layer Chromatography

#### I. PRINCIPLE

Cefixime is extracted from tablets and capsules with methanol and determined by TLC with reference to an authentic secondary standard.

#### II. EQUIPMENT AND REAGENTS

- 1) Pestle
- 2) Aluminium foil
- 3) Funnel
- 4) Label tape
- 5) Marker pen
- 6) Pencil
- 7) 10-ml vials
- 8) Set of straight pipettes (1 to 25 ml)
- 9) Set of laboratory glass bottles (25 to 100 ml)
- 10) Merck TLC aluminium plates pre-coated with silica gel 60 F 254, size 5x10 cm
- 11) Glass microcapillaries (2 µl filling capacity)
- 12) TLC developing chamber (500-ml jar)
- 13) Hot plate
- 14) Filter paper
- 15) Pair of scissors
- 16) Pair of tweezers

## Cefixima

Triagem Primária com Inspeção Visual e Teste de Desagregação

### I. INSPECÇÃO VISUAL & FÍSICA

Procure deficiências na rotulagem, embalagem e nas formas de dosagem, tal como descrito nos capítulos iniciais sobre os métodos e procedimentos gerais do manual principal. Registe todos os pormenores do produto, usando os formulários para relatório como orientação. Cada comprimido ou cápsula normalmente contém 100, 200 ou 400 mg de cefixima anidra. Sabe-se que existem outras dosagens.

### II. TESTE DE DESAGREGAÇÃO

Todos os comprimidos e cápsulas de cefixima de libertação rápida devem passar o teste de desagregação, tal como se descreve nos capítulos iniciais sobre métodos e procedimentos gerais do manual principal. Devem desagregar-se em água a 37 ° C em menos de 30 minutos. Se o fármaco não passar este teste, constitui um defeito importante.

### III. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

Produtos farmacêuticos a preços vulgarmente baratos, medicamentos com documentos de apoio em falta ou incorrectos e medicamentos com formas de dosagem irregulares, embalagens deficientes ou rótulos incompletos, danificados ou ausentes ou com rótulos escritos em língua estrangeira, devem ser submetidos a um teste cromatográfico em camada fina.

Verificação da Identidade e Teor do Fármaco através da Cromatografia em Camada Fina

### I. PRINCÍPIO

A cefixima é extraída de comprimidos e cápsulas com metanol e determinada por CCF, tendo em conta os padrões secundários de referência.

### II. EQUIPAMENTO E REAGENTES

- 1) Pilão
- 2) Folha de alumínio
- 3) Funil
- 4) Fita adesiva
- 5) Marcador
- 6) Lápis
- 7) Frascos de 10 ml
- 8) Conjunto de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
- 9) Conjunto de frascos de vidro de laboratório (25 a 100 ml)
- 10) Placas de alumínio de CCF da Merck previamente revestidas de gel de sílica 60F 254, tamanho 5x10 cm
- 11) Microcapilares de vidro (capacidade de 2 µl)
- 12) Câmara de eluição de CCF (frasco de 500 ml)
- 13) Placa de aquecimento
- 14) Papel de filtro
- 15) Tesoura
- 16) Pinças

(Continuação da página 12 do texto de partida)

- 17) UV light of 254 nm
- 18) Iodine chamber
- 19) Acetone
- 20) Ethyl acetate
- 21) Glacial acetic acid
- 22) Methanol
- 23) Water
- 24) Secondary reference standard, for example, tablets containing 200 mg of anhydrous cefixime

(Continuação da tradução da página 12)

- 17) Luz ultravioleta de 254 nm
- 18) Câmara de iodo
- 19) Acetona
- 20) Acetato de etilo
- 21) Ácido acético glacial
- 22) Metanol
- 23) Água
- 24) Padrão secundário de referência, por exemplo comprimidos de cefixima anidra de 200 mg

### III. PREPARATION OF THE STOCK STANDARD SOLUTION

The preparation of the stock standard solution requires an authentic drug product for reference purposes, for example, tablets containing 200 mg of anhydrous cefixime. Wrap up one reference tablet into aluminium foil and crush it down to a fine powder using a pestle. Carefully empty the aluminium foil over a 40-ml laboratory glass bottle and wash down all residual solids with 25 ml of methanol using a straight pipette. Close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 8 mg of total drug per ml and be labelled as '*Cefixime Stock Standard Solution*'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquid.

### IV. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 100% (UPPER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 7 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 1 mg of total drug per ml and be labelled as '*Cefixime Working Standard Solution 100%*'.

This higher working standard solution represents a drug product of good quality containing 100 % of cefixime.

### V. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 80% (LOWER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 9 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 0.8 mg of total drug per ml and be labelled as '*Cefixime Working Standard Solution 80%*'.

This lower working standard solution represents a drug product of poor quality containing just 80% of the amount of cefixime as stated on the product's label. In the current investigation, this drug level represents the lower acceptable limit for a given product.

### VI. PREPARATION OF THE STOCK SAMPLE SOLUTION FROM A PRODUCT CLAIMING TO CONTAIN 100 MG OF CEFIXIME PER UNIT

Take one whole tablet or capsule from a drug product sampled in the field. As usual, tablets are wrapped up into aluminium foil and crushed down to a fine powder. Transfer all the powder obtained into a 25-ml laboratory glass bottle. Powder obtained from sample capsules should be transferred directly into the bottle adding the cap and body shells last. For extraction, add 12.5 ml of methanol using a straight pipette, close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid.

#### 200 MG OF CEFIXIME PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 25 ml of methanol using a straight pipette and a 40-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.



### III. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DO PADRÃO

A preparação da solução stock do padrão requer um medicamento autêntico para servir de referência, por exemplo comprimidos de 200 mg de cefixima anidra. Embrulhe um comprimido de referência numa folha de alumínio e esmague-o, até ficar em pó fino, usando o pilão. Transfira, cuidadosamente, o conteúdo da folha de alumínio para um frasco de vidro de laboratório de 40 ml e lave o resto dos resíduos sólidos com 25 ml de metanol usando uma pipeta graduada. Feche o frasco e agite durante cerca de três minutos, até que a maior parte dos sólidos se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos que não se dissolveram se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter o fármaco numa concentração total de 8 mg por ml e ser rotulada como "*Solução Stock do Padrão de Cefixima*". Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante, límpido ou turvo.

### IV. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 100% (CONCENTRAÇÃO LIMITE SUPERIOR DE TRABALHO)

Pipete 1 ml da solução stock do padrão para um frasco de 10 ml e adicione 7 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter o fármaco numa concentração total de 1 mg por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Cefixima a 100%*".

Esta solução padrão de trabalho com concentração limite superior representa um medicamento de alta qualidade que contém 100% de cefixima.

### V. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 80% (CONCENTRAÇÃO LIMITE MÍNIMO DE TRABALHO)

Pipete 1 ml da solução stock do padrão para um frasco de 10 ml e adicione 9 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter o fármaco numa concentração total de 0,8 mg por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Cefixima a 80%*".

Esta solução padrão de trabalho com concentração limite inferior representa um medicamento de fraca qualidade e contém apenas 80% da cefixima referida no rótulo do produto. Nesta investigação, este nível de fármaco representa o limite mínimo aceitável para tal produto.

### VI. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DE AMOSTRA DE UM PRODUTO DITO CONTER 100 MG DE CEFIXIMA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula de uma amostra do produto. Como anteriormente, os comprimidos devem ser embrulhados numa folha de alumínio e esmagados até ficarem em pó fino. Transfira todo o pó obtido para um frasco de vidro de laboratório de 25 ml. Deve transferir directamente para o frasco o pó obtido das cápsulas de amostra, adicionando, por último, o invólucro. Para proceder à extracção, adicione 12,5 ml de metanol, usando uma pipeta graduada, feche o frasco e agite-o durante cerca de três minutos, até que a maior parte dos sólidos se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos que não se dissolveram se depositem no fundo do frasco.

#### 200 MG DE CEFIXIMA POR UNIDADE

Extraia o pó obtido da amostra de um comprimido ou de uma cápsula com 25 ml de metanol, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 40 ml, como recipiente para amostras. Continue como indicado anteriormente.

#### 490 MG OF CEFIXIME PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 50 ml of methanol using a straight pipette and a 100-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

All stock sample solutions produced should finally contain 8 mg of total drug per ml and be labelled as '*Cefixime Stock Sample Solution*'. Freshly prepare these solutions for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquids.

#### VII. PREPARATION OF THE WORKING SAMPLE SOLUTION

Pipette 1 ml of the stock sample solution into a 10-ml vial and add 7 ml of methanol. Close and shake the vial and label as '*Cefixime Working Sample Solution*'.

The expected concentration of cefixime in the working sample solution is 1 mg per ml and should match the concentration of cefixime of the higher working standard solution produced above.

#### VIII. SPOTTING

Mark an origin line parallel to and about 1.5 cm from the bottom edge of the chromatoplate and apply 2 µl of each test and standard solution as shown in the picture opposite using the microcapillary pipettes supplied.

Up to five spots can be placed on a plate. Check the uniformity of all spots using UV light of 254 nm. All spots should be circular in shape and equally spaced across the origin line. Although their intensities might differ, their diameters never should. Different intensities are due to residual amounts of tablet and capsule excipients or different drug concentrations in the sample solutions. A difference in spot size, however, relates to poor spotting. Repeat this step if homogeneous spotting is not achieved first time.

#### IX. DEVELOPMENT

Pipette 12.5 ml of ethyl acetate, 5 ml of acetone, 5 ml of glacial acetic acid and 2.5 ml of water into the jar being used as TLC developing chamber. Close the chamber and mix thoroughly. Line the chamber's wall with filter paper and wait for about 15 minutes thus ensuring saturation of the chamber with solvent vapour. Carefully place the loaded TLC plate into the jar. Close the jar and develop the chromatoplate until the solvent front has moved about three-quarters of the length of the plate, the developing time being about 25 minutes. Remove the plate from the chamber, mark the solvent front and allow any excess solvent to evaporate using a hot plate if necessary.

#### X. DETECTION

Dry off all residual solvent and observe the chromatoplate under UV light of 254 nm using the battery-driven lamp supplied. Use this method of detection for both, identification and quantification purposes. Further verification of drug identity and content can be achieved when observing the plate at daylight after iodine staining.

#### 490 MG DE CEFIXIMA POR UNIDADE

Extraia o pó obtido da amostra de um comprimido ou de uma cápsula com 50 ml de metanol, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 100 ml, como recipiente para amostras. Continue como indicado anteriormente.

Todas as soluções amostra preparadas devem, no fim do procedimento, conter o fármaco numa concentração total de 8 mg por ml e serem rotuladas como "*Solução Stock da Amostra de Cefixima*". Prepare novas soluções para cada teste. Continue a usar os líquidos sobrenadantes límpidos ou turvos.

#### VII. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AMOSTRA DE TRABALHO

Pipete 1 ml da solução stock de amostra para um frasco de 10 ml e adicione 7 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. Rotule-o como "*Solução Amostra de Trabalho de Cefixima*".

Estima-se que a concentração de cefixima nesta solução de amostra de trabalho seja de 1 mg por ml e deve ser igual à concentração de cefixima na solução padrão de trabalho com concentração limite superior preparada anteriormente.

#### VIII. APLICAÇÃO

Trace uma linha paralela à base da placa cromatográfica, a cerca de 1,5 cm da base, e aplique 2 µl de cada solução, de padrão e de teste, como ilustrado na figura do lado oposto, usando os microcapilares de vidro fornecidos.

Podem ser aplicadas cinco manchas numa placa. Confirme a uniformidade das manchas através da luz ultravioleta de 254 nm. Todas as manchas devem ser circulares e separadas entre si por uma distância igual ao longo da linha traçada. Apesar de as suas intensidades poderem diferir, o seu diâmetro deve ser sempre igual. As diferentes intensidades devem-se a diferentes quantidades residuais de excipientes dos comprimidos e cápsulas ou devido a diferentes concentrações de fármaco na solução de amostra. Porém, se as manchas apresentarem um tamanho diferente deve-se a uma incorrecta técnica de aplicação. Repita este passo, se não conseguir uma aplicação homogénea à primeira tentativa.

#### IX. ELUIÇÃO

Pipete 12,5 ml de acetato de etilo, 5 ml de acetona, 5 ml de ácido acético glacial e 2,5 ml de água para o frasco que está a ser usado como câmara de eluição de CCF. Feche a câmara e misture bem. Cubra a parede da câmara com papel de filtro e aguarde cerca de 15 minutos para assegurar a saturação da câmara com o vapor do solvente. Coloque, com cuidado, a placa de CCF contendo os compostos no frasco. Feche o frasco e elua a placa cromatográfica antes que a frente de solvente tenha percorrido três-quartos do comprimento da placa, tendo em conta que a eluição da placa demora cerca de 25 minutos. Remova a placa da câmara, marque a frente solvente e deixe que o excesso de solvente se evapore. Se for necessário, use a placa de aquecimento.

#### X. REVELAÇÃO

Deixe que todos os resíduos do solvente evaporem da placa cromatográfica e observe-a com luz ultravioleta de 254 nm, usando a lanterna a pilhas fornecida. Use este método de detecção para efeitos de identificação e de quantificação. Para verificação adicional da autenticidade e teor do fármaco, observe a placa à luz do dia após a coloração com iodo.

XL CHROMATOPLATE OBSERVED UNDER UV LIGHT OF 254 NM

Run No.1: Upper working standard representing 100% of total anhydrous cefixime

Run No.2: A drug product of good quality with acceptable drug content

Run No.3: A drug product of poor quality with unacceptable low drug content

Run No. 4: Lower working standard representing 80% of total anhydrous cefixime

(Solvent front)

Principal spot

(Origin line)

XII. OBSERVATIONS MADE AT 254 NM

A greyish-violet spot at a travel distance of about 0.22 indicates the presence of cefixime in the test solution. Additional strong spots generated by the test solution would point at other drugs or cefixime degradation, the latter case being more likely when associated with a smaller principal spot. Auxiliary agents incorporated in the different tablet or capsule formulations might cause some fainter spots emerging near or on the origin line.

XIII. OBSERVATIONS MADE AT DAYLIGHT AFTER IODINE STAINING

When exposing the chromatoplate to iodine vapour, all cefixime spots already observed at 254 nm are now turning yellowish brown. Still observe the plate when iodine evaporates already. Spots reflecting poor quality products will disappear first gradually followed by the reference spots representing a drug content of 80 and 100 percent, respectively.

XIV. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

The cefixime spot in the chromatogram obtained with the test solution must correspond in terms of colour, size, intensity, shape and travel distance to that in the chromatogram obtained with the lower and higher standard solution. This result must be obtained for each method of detection. If this is not achieved, repeat the run from scratch with a second sample. Reject the batch if the drug content cannot be verified in a third run. For precise drug content determination, refer additional samples to a fully-fledged drug quality control laboratory. Retain samples and put the batch on quarantine until a final decision on rejection or release has been taken.

#### XI. PLACA CROMATOGRÁFICA OBSERVADA SOB LUZ UV DE 254 NM

1ª corrida: Padrão com concentração limite superior de trabalho, representando 100% de cefixima anidra

2ª corrida: Medicamento de boa qualidade com conteúdo aceitável de fármaco

3ª corrida: Medicamento de fraca qualidade com conteúdo de fármaco baixo e inaceitável

4ª corrida: Padrão com concentração limite inferior de trabalho, representando 80% de cefixima anidra

(Frente solvente)

Mancha principal

(linha de base)

#### XII. OBSERVAÇÃO A 254 NM

Uma mancha violeta-acinzentada com uma distância relativa percorrida de cerca de 0,22 indica a presença de cefixima na solução de teste. Manchas fortes adicionais formadas pela solução de teste podem indicar a presença de outros fármacos ou a degradação de cefixima, estando este último caso associado a uma mancha principal mais pequena. Os agentes auxiliares incorporados nas diferentes formulações dos comprimidos ou cápsulas podem originar manchas mais fracas, perto da linha de base ou sobre esta.

#### XIII. OBSERVAÇÃO À LUZ DO DIA APÓS COLORAÇÃO COM IODO

Aquando da exposição da placa cromatográfica ao vapor de iodo, todas as manchas de cefixima, anteriormente observadas a 254 nm, tornam-se amarelo-acastanhadas. Observe a placa durante a evaporação do iodo. As manchas que denunciam produtos de fraca qualidade desaparecerão em primeiro lugar, gradualmente, seguidas pelas manchas de referência que representam um teor fármaco de 80 e 100 por cento, respectivamente.

#### XIV. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

A mancha de cefixima no cromatograma obtida através da solução de teste deve corresponder, em termos de cor, tamanho, intensidade, forma e distância relativa percorrida, às manchas do cromatograma obtidas com as soluções padrão de trabalho com concentração limite inferior e superior. Deve obter este resultado para cada método de detecção. Se não conseguir obter este resultado, repita o teste do início com uma segunda amostra. Se não conseguir verificar o teor do fármaco num terceiro teste, rejeite o lote. Para determinar, de forma precisa, o teor do fármaco, envie outras amostras para um laboratório profissional de controlo de qualidade de medicamentos. Guarde algumas amostras e coloque o lote em quarentena até que se tome uma decisão final sobre a sua rejeição ou libertação.

### Cefuroxime axetil

#### Primary Screening via Visual Inspection and Disintegration Test

##### I. VISUAL & PHYSICAL INSPECTION

Search for deficiencies on labelling, packaging and dosage forms as described in the opening chapters on general methods and operations of the main manual. Write down all product particulars using the reporting form as a guide. Each tablet or capsule usually contains about a 150, 300 or 600 mg of the prodrug cefuroxime acetoxyethyl ester equivalent to 125, 250 or 500 mg of cefuroxime free base. The customarily expressed dosage strengths are those of the cefuroxime free base content. However, presentations of a 125, 250 or 500 mg cefuroxime axetil are known to exist, which are then equivalent to about 104, 208 and 416 mg of cefuroxime free base only.

##### II. DISINTEGRATION TEST

All quick release cefuroxime tablets and capsules must pass the disintegration test as described in the opening chapters on general methods and operations of the main manual. They should disintegrate in water at 37 °C in less than 30 minutes. It's a major defect if a drug product doesn't pass this test.

##### III. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

Drug products from unusually cheap sources, drug products with missing or incorrect accompanying documents and drug products with defective dosage forms, packaging or with incomplete, damaged or missing labels or with labels written in a foreign language should be subjected to a thin layer chromatographic test.

#### Verification of Drug Identity and Content via Thin Layer Chromatography

##### I. PRINCIPLE

Cefuroxime axetil is extracted from tablets and capsules with methanol and determined by TLC with reference to an authentic secondary standard.

##### II. EQUIPMENT AND REAGENTS

- 1) Pestle
- 2) Aluminium foil
- 3) Funnel
- 4) Label tape
- 5) Marker pen
- 6) Pencil
- 7) 10-ml vials
- 8) Set of straight pipettes (1 to 25 ml)
- 9) Set of laboratory glass bottles (25 to 100 ml)
- 10) Merck TLC aluminium plates pre-coated with silica gel 60 F 254, size 5x10 cm
- 11) Glass microcapillaries (2- $\mu$ l filling capacity)
- 12) TLC developing chamber (500-ml jar)
- 13) Hot plate
- 14) Filter paper
- 15) Pair of scissors

## Cefuroxima axetil

Triagem Primária com Inspeção Visual e Teste de Desagregação

### I. INSPECÇÃO VISUAL & FÍSICA

Procure deficiências na rotulagem, embalagem e nas formas de dosagem, tal como descrito nos capítulos iniciais sobre os métodos e procedimentos gerais do manual principal. Registe todos os pormenores do produto, usando os formulários para relatório como orientação. Cada comprimido ou cápsula normalmente contém cerca de 150, 300 ou 600 mg do pró-farmaco cefuroxima axetil equivalente a 125, 250 ou 500 mg de concentração total de cefuroxima. As formas de dosagem comumente expressas são as que contêm apenas cefuroxima. Contudo, sabe-se que existem formas de dosagem de 125, 250 ou 500 mg de cefuroxima axetil, que são equivalentes a apenas cerca de 104, 208 e 416 mg de concentração total de cefuroxima.

### II. TESTE DE DESAGREGAÇÃO

Todos os comprimidos e cápsulas de cefuroxima de libertação rápida devem passar o teste de desagregação, tal como se descreve nos capítulos iniciais sobre métodos e procedimentos gerais do manual principal. Devem desagregar-se em água a 37 ° C em menos de 30 minutos. Se o fármaco não passar este teste, constitui um defeito importante.

### III. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

Produtos farmacêuticos a preços vulgarmente baratos, medicamentos com documentos de apoio em falta ou incorrectos e medicamentos com formas de dosagem irregulares, embalagens deficientes ou rótulos incompletos, danificados ou ausentes ou com rótulos escritos em língua estrangeira, devem ser submetidos a um teste cromatográfico em camada fina.

## Verificação da Identidade e Teor do Fármaco através da Cromatografia em Camada Fina

### I. PRINCÍPIO

A cefuroxima axetil é extraída de comprimidos e cápsulas com metanol e determinada por CCF, tendo em conta os padrões secundários de referência.

### II. EQUIPAMENTO E REAGENTES

- 1) Pilão
- 2) Folha de alumínio
- 3) Funil
- 4) Fita adesiva
- 5) Marcador
- 6) Lápis
- 7) Frascos de 10 ml
- 8) Conjunto de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
- 9) Conjunto de frascos de vidro de laboratório (25 a 100 ml)
- 10) Placas de alumínio de CCF da Merck previamente revestidas de gel de sílica 60F 254, tamanho 5x10 cm
- 11) Microcapilares de vidro (capacidade de 2 µl)
- 12) Câmara de eluição de CCF (frasco de 500 ml)
- 13) Placa de aquecimento
- 14) Papel de filtro
- 15) Tesoura

(Continuação da página 16 do texto de partida)

- 16) Pair of tweezers
- 17) UV light of 254 nm
- 18) Iodine chamber
- 19) Acetone
- 20) Glacial acetic acid
- 21) Methanol
- 22) Toluene
- 23) Secondary reference standard, for example, cefuroxime axetil 300.7 mg tablets equivalent to 250 mg of cefuroxime free base



(Continuação da tradução da página 16)

- 16) Pinças
- 17) Luz ultravioleta de 254 nm
- 18) Câmara de iodo
- 19) Acetona
- 20) Ácido acético glacial
- 21) Metanol
- 22) Tolueno
- 23) Padrão secundário de referência, por exemplo comprimidos de cefuroxima axetil de 300,7 mg, equivalentes a 250 mg de concentração total de cefuroxima

### III. PREPARATION OF THE STOCK STANDARD SOLUTION

The preparation of the stock standard solution requires an authentic drug product for reference purposes, for example, tablets containing 300.7 mg of cefuroxime axetil equivalent to 250 mg of cefuroxime free base. Wrap up one reference tablet into aluminium foil and crush it down to a fine powder using a pestle. Carefully empty the aluminium foil over a 40-ml laboratory glass bottle and wash down all residual solids with 25 ml of methanol using a straight pipette. Close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 12 mg of cefuroxime axetil equivalent to 10 mg of cefuroxime free base per ml and be labelled as '*Cefuroxime Stock Standard Solution*'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquid.

### IV. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 100% (UPPER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 7 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 1.5 mg of cefuroxime axetil equivalent to 1.25 mg of cefuroxime free base per ml and be labelled as '*Cefuroxime Working Standard Solution 100%*'.

This higher working standard solution represents a drug product of good quality containing 100 % of cefuroxime axetil.

### V. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 80% (LOWER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 9 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 1.2 mg of cefuroxime axetil equivalent to 1 mg of cefuroxime free base per ml and be labelled as '*Cefuroxime Working Standard Solution 80%*'.

This lower working standard solution represents a drug product of poor quality containing just 80% of the amount of cefuroxime axetil as stated on the product's label. In the current investigation, this drug level represents the lower acceptable limit for a given product.

### VI. PREPARATION OF THE STOCK SAMPLE SOLUTION FROM A PRODUCT CLAIMING TO CONTAIN 104 MG OF CEFUROXIME FREE BASE PER UNIT

Take one whole tablet or capsule from a drug product sampled in the field. As usual, tablets are wrapped up into aluminium foil and crushed down to a fine powder. Transfer all the powder obtained into an appropriately sized laboratory glass bottle. Powder obtained from sample capsules should be transferred directly into the bottle adding the cap and body shells last. For extraction, add 10.4 ml of methanol using a straight pipette, close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid.

#### 125 MG OF CEFUROXIME FREE BASE PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 12.5 ml of methanol following the procedure shown above.

#### 208 MG OF CEFUROXIME FREE BASE PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 20.8 ml of methanol following the procedure shown above.

#### 250 MG OF CEFUROXIME FREE BASE PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 25 ml of methanol following the procedure shown above.

### III. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DO PADRÃO

A preparação da solução stock do padrão requer um medicamento autêntico para servir de referência, por exemplo comprimidos de 300,7 mg de cefuroxima axetil, equivalentes a 250 mg de concentração total de cefuroxima. Embrulhe um comprimido de referência em folha de alumínio e esmague-o, até ficar em pó fino, usando o pilão. Transfira, cuidadosamente, o conteúdo da folha de alumínio para um frasco de vidro de laboratório de 40 ml e lave o resto dos resíduos sólidos com 25 ml de metanol usando uma pipeta graduada. Feche o frasco e agite durante cerca de três minutos, até que a maior parte dos sólidos se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos que não se dissolveram se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter 12 mg de cefuroxima axetil, equivalente a 10 mg de concentração total de cefuroxima por ml e ser rotulada como "*Solução Stock do Padrão de Cefuroxima*". Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante, límpido ou turvo.

### IV. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 100% (CONCENTRAÇÃO LIMITE SUPERIOR DE TRABALHO)

Pipete 1 ml da solução stock do padrão para um frasco de 10 ml e adicione 7 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 1,5 mg de cefuroxima axetil, equivalente a 1,25 mg de concentração total de cefuroxima por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Cefuroxima a 100%*".

Esta solução padrão de trabalho com concentração limite superior representa um medicamento de alta qualidade que contém 100% de cefuroxima axetil.

### V. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 80% (CONCENTRAÇÃO LIMITE MÍNIMO DE TRABALHO)

Pipete 1 ml da solução stock do padrão para um frasco de 10 ml e adicione 9 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 1,2 mg de cefuroxima axetil, equivalente a 1 mg de concentração total de cefuroxima, por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Cefuroxima a 80%*".

Esta solução padrão de trabalho com concentração limite inferior representa um medicamento de fraca qualidade e contém apenas 80% da cefuroxima axetil referida no rótulo do produto. Nesta investigação, este nível de fármaco representa o limite mínimo aceitável para tal produto.

### VI. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DE AMOSTRA DE UM PRODUTO DITO CONTER 104 MG DE CEFUROXIMA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula de uma amostra do produto. Como anteriormente, os comprimidos devem ser embrulhados numa folha de alumínio e esmagados até ficarem em pó fino. Transfira todo o pó obtido para um frasco de vidro de laboratório de tamanho apropriado. Deve transferir directamente para o frasco o pó obtido das cápsulas de amostra, adicionando, por último, o invólucro. Para proceder à extracção, adicione 10,4 ml de metanol, usando uma pipeta graduada, feche o frasco e agite-o durante cerca de três minutos, até que a maior parte dos sólidos se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos que não se dissolveram se depositem no fundo do frasco.

#### 125 MG DE CEFUROXIMA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula e extraia o pó obtido com 12,5 ml de metanol conforme o procedimento anterior.

#### 208 MG DE CEFUROXIMA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula e extraia o pó obtido com 20,8 ml de metanol conforme o procedimento anterior.

#### 250 MG DE CEFUROXIMA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula e extraia o pó obtido com 25 ml de metanol conforme o procedimento anterior.

#### 416 MG OF CEFUROXIME FREE BASE PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 41.6 ml of methanol following the procedure shown above.

#### 500 MG OF CEFUROXIME FREE BASE PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 50 ml of methanol following the procedure shown above.

All stock sample solutions produced should finally contain 10 mg of cefuroxime free base equivalent to about 12 mg of cefuroxime axetil per ml and be labelled as '*Cefuroxime Stock Sample Solution*'. Freshly prepare these solutions for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquids.

### VII. PREPARATION OF THE WORKING SAMPLE SOLUTION

Pipette 1 ml of the stock sample solution into a 10-ml vial and add 7 ml of methanol. Close and shake the vial and label as '*Cefuroxime Working Sample Solution*'.

The expected concentration of cefuroxime axetil in the working sample solution is 1.5 mg and that of cefuroxime free base 1.25 mg per ml and both moieties should match the concentration of their equivalent counterparts in the higher working standard solution produced above.

### VIII. SPOTTING

Mark an origin line parallel to and about 1.5 cm from the bottom edge of the chromatoplate and apply 2 µl of each test and standard solution as shown in the picture opposite using the microcapillary pipettes supplied.

Up to five spots can be placed on a plate. Check the uniformity of all spots using UV light of 254 nm. All spots should be circular in shape and equally spaced across the origin line. Although their intensities might differ, their diameters never should. Different intensities are due to residual amounts of tablet and capsule excipients or different drug concentrations in the sample solutions. A difference in spot size, however, relates to poor spotting. Repeat this step if homogeneous spotting is not achieved first time.

### IX. DEVELOPMENT

Pipette 10 ml of acetone, 10 ml of toluene and 1 ml of glacial acetic acid into the jar being used as TLC developing chamber. Close the chamber and mix thoroughly. Line the chamber's wall with filter paper and wait for about 15 minutes thus ensuring saturation of the chamber with solvent vapour. Carefully place the loaded TLC plate into the jar. Close the jar and develop the chromatoplate until the solvent front has moved about three-quarters of the length of the plate, the developing time being about 15 minutes. Remove the plate from the chamber, mark the solvent front and allow any excess solvent to evaporate using a hot plate if necessary.

### X. DETECTION

Dry off all residual solvent and observe the chromatoplate under UV light of 254 nm using the battery-driven lamp supplied. Use this method of detection for both, identification and quantification purposes. Further verification of drug identity and content can be achieved when observing the plate at daylight after iodine staining.

#### 416 MG DE CEFUROXIMA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula e extraia o pó obtido com 41,6 ml de metanol conforme o procedimento anterior.

#### 500 MG DE CEFUROXIMA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula e extraia o pó obtido com 50 ml de metanol conforme o procedimento anterior.

Todas as soluções stock de amostra preparadas devem, no fim do procedimento, conter 10 mg de cefuroxima, equivalente a cerca de 12 mg de cefuroxima axetil, por ml e serem rotuladas como "*Solução Stock da Amostra de Cefuroxima*". Prepare novas soluções para cada teste. Continue a usar os líquidos sobrenadantes, límpidos ou turvos.

### VII. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AMOSTRA DE TRABALHO

Pipete 1 ml da solução stock da amostra para um frasco de 10 ml e adicione 7 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. Rotule-o como "*Solução Amostra de Trabalho de Cefuroxima*".

Estima-se que a concentração de cefuroxima axetil nesta solução de amostra seja de 1,5 mg e de cefuroxima de 1,25 mg por ml e a concentração de ambas deve ser igual à concentração da sua contraparte equivalente na solução padrão de trabalho com concentração limite superior preparada anteriormente.

### VIII. APLICAÇÃO

Trace uma linha paralela à base da placa cromatográfica, a cerca de 1,5 cm da base, e aplique 2 µl de cada solução, de padrão e de teste, como ilustrado na figura do lado oposto, usando os microcapilares de vidro fornecidos.

Podem ser aplicadas cinco manchas numa placa. Confirme a uniformidade das manchas através da luz ultravioleta de 254 nm. Todas as manchas devem ser circulares e separadas entre si por uma distância relativa igual ao longo da linha de base. Apesar de as suas intensidades poderem diferir, o seu diâmetro deve ser sempre igual. As diferentes intensidades devem-se a diferentes quantidades residuais de excipientes dos comprimidos e cápsulas e devido a diferentes concentrações de fármaco na solução de amostra. Porém, se as manchas apresentarem um tamanho diferente deve-se a uma incorrecta técnica de aplicação. Repita este passo, se não conseguir uma aplicação homogénea à primeira tentativa.

### IX. ELUIÇÃO

Pipete 10 ml de acetona, 10 ml de tolueno e 1 ml de ácido acético glacial para o frasco que está a ser usado como câmara de eluição de CCF. Feche a câmara e misture bem. Revista a parede da câmara com papel de filtro e aguarde cerca de 15 minutos para assegurar a saturação da câmara com o vapor do solvente. Coloque, com cuidado, a placa de CCF contendo os compostos no frasco. Feche o frasco e elua a placa cromatográfica antes que a frente solvente tenha percorrido três-quartos do comprimento da placa, tendo em conta que a eluição da placa demora cerca de 15 minutos. Remova a placa da câmara, marque a frente de solvente e deixe que o excesso de solvente se evapore. Se for necessário, use a placa de aquecimento.

### X. REVELAÇÃO

Deixe que todos os resíduos do solvente evaporem da placa cromatográfica e observe-a com luz ultravioleta de 254 nm, usando a lanterna a pilhas fornecida. Use este método de detecção para efeitos de identificação e de quantificação. Para verificação adicional da autenticidade e teor do fármaco, observe a placa à luz do dia após a coloração com iodo.

XL CHROMATOPLATE OBSERVED UNDER UV LIGHT OF 254 NM

Run No.1: Upper working standard representing 100% of total cefuroxime axetil

Run No.2: A drug product of good quality with acceptable drug content

Run No.3: A drug product of poor quality with unacceptable low drug content

Run No.4: Lower working standard representing 80% of total cefuroxime axetil

(Solvent front)

Principal spot

(Origin line)

XII. OBSERVATIONS MADE AT 254 NM

A strong blue-violet spot at a travel distance of about 0.58 indicates the presence of cefuroxime axetil in the test solution. Additional strong spots generated by the test solution would point at other drugs or cefuroxime axetil degradation, the latter case being more likely when associated with a smaller principal spot. Auxiliary agents incorporated in the different tablet or capsule formulations might cause some fainter spots emerging near or on the origin line.

XIII. OBSERVATIONS MADE AT DAYLIGHT AFTER IODINE STAINING

When exposing the chromatoplate to iodine vapour, all cefuroxime spots already observed at 254 nm are now turning yellowish brown. Still observe the plate when iodine evaporates already. Spots reflecting poor quality products will disappear first gradually followed by the reference spots representing a drug content of 80 and 100 percent, respectively.

XIV. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

The cefuroxime axetil spot in the chromatogram obtained with the test solution must correspond in terms of colour, size, intensity, shape and travel distance to that in the chromatogram obtained with the lower and higher standard solution. This result must be obtained for each method of detection. If this is not achieved, repeat the run from scratch with a second sample. Reject the batch if the drug content cannot be verified in a third run. For precise drug content determination, refer additional samples to a fully-fledged drug quality control laboratory. Retain samples and put the batch on quarantine until a final decision on rejection or release has been taken.

#### XI. PLACA CROMATOGRÁFICA OBSERVADA SOB LUZ UV DE 254 NM

1ª corrida: Padrão com concentração limite superior de trabalho, representando 100% de cefuroxima axetil

2ª corrida: Medicamento de boa qualidade com conteúdo aceitável de fármaco

3ª corrida: Medicamento de fraca qualidade com conteúdo de fármaco baixo e inaceitável

4ª corrida: Padrão com concentração limite inferior de trabalho, representando 80% de cefuroxima axetil

(Frente solvente)

Mancha principal

(linha de base)

#### XII. OBSERVAÇÃO A 254 NM

Uma mancha azul-violeta forte com uma distância relativa percorrida de cerca de 0,58 indica a presença de cefuroxima axetil na solução de teste. Manchas fortes adicionais formadas pela solução de teste podem indicar a presença de outros fármacos ou a degradação da cefuroxima axetil, estando este último caso associado a uma mancha principal mais pequena. Os agentes auxiliares incorporados nas diferentes formulações dos comprimidos ou cápsulas podem originar manchas mais fracas, perto da linha de base ou sobre esta.

#### XIII. OBSERVAÇÃO À LUZ DO DIA APÓS COLORAÇÃO COM IODO

Aquando da exposição da placa cromatográfica ao vapor de iodo, todas as manchas de cefuroxima anteriormente observadas a 254 nm tornam-se amarelo-acastanhadas. Observe a placa durante a evaporação do iodo. As manchas que denunciam um produto de fraca qualidade desaparecerão em primeiro lugar, gradualmente, seguidas pelas manchas de referência que representam um teor de fármaco de 80 e 100 por cento, respectivamente.

#### XIV. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

A mancha de cefuroxima axetil no cromatograma obtida através da solução de teste deve corresponder, em termos de cor, tamanho, intensidade, forma e distância relativa percorrida, às manchas do cromatograma obtidas com as soluções padrão de trabalho com concentração limite inferior e superior. Deve obter este resultado para cada método de detecção. Se não conseguir obter este resultado, repita o teste do início com uma segunda amostra. Se não conseguir verificar o teor do fármaco num terceiro teste, rejeite o lote. Para determinar, de forma precisa, o teor do fármaco, envie outras amostras para um laboratório profissional de controlo de qualidade de medicamentos. Guarde algumas amostras e coloque o lote em quarentena até que se tome uma decisão final sobre a sua rejeição ou libertação.

## Halofantrine

### Primary Screening via Visual Inspection and Disintegration Test

#### I. VISUAL & PHYSICAL INSPECTION

Search for deficiencies on labelling, packaging and dosage forms as described in the opening chapters on general methods and operations of the main manual. Write down all product particulars using the reporting form as a guide. Each tablet or capsule usually contains 250 mg of halofantrine hydrochloride.

#### II. DISINTEGRATION TEST

All quick release halofantrine tablets and capsules must pass the disintegration test as described in the opening chapters on general methods and operations of the main manual. They should disintegrate in water at 37 °C in less than 30 minutes. It's a major defect if a drug product doesn't pass this test.

#### III. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

Drug products from unusually cheap sources, drug products with missing or incorrect accompanying documents and drug products with defective dosage forms, packaging or with incomplete, damaged or missing labels or with labels written in a foreign language should be subjected to a thin layer chromatographic test.

### Verification of Drug Identity and Content via Thin Layer Chromatography

#### I. PRINCIPLE

Halofantrine hydrochloride is extracted from tablets and capsules with methanol and determined by TLC with reference to an authentic secondary standard.

#### II. EQUIPMENT AND REAGENTS

- 1) Pestle
- 2) Aluminium foil
- 3) Funnel
- 4) Label tape
- 5) Marker pen
- 6) Pencil
- 7) 10-ml vials
- 8) Set of straight pipettes (1 to 25 ml)
- 9) Set of laboratory glass bottles (25 to 100 ml)
- 10) Merck TLC aluminium plates pre-coated with silica gel 60 F 254, size 5x10 cm
- 11) Glass microcapillaries (2- $\mu$ l filling capacity)
- 12) TLC developing chamber (500-ml jar)
- 13) Hot plate
- 14) Filter paper
- 15) Pair of scissors
- 16) Pair of tweezers
- 17) UV light of 254 nm



## Halofantrina

Triagem Primária com Inspeção Visual e Teste de Desagregação

### I. INSPECÇÃO VISUAL & FÍSICA

Procure deficiências na rotulagem, embalagem e nas formas de dosagem, tal como descrito nos capítulos iniciais sobre os métodos e procedimentos gerais do manual principal. Registe todos os pormenores do produto, usando os formulários para relatório como orientação. Cada comprimido ou cápsula normalmente contém 250 mg de cloridrato de halofantrina.

### II. TESTE DE DESAGREGAÇÃO

Todos os comprimidos e cápsulas de halofantrina de libertação rápida devem passar o teste de desagregação, tal como se descreve nos capítulos iniciais sobre métodos e procedimentos gerais do manual principal. Devem desagregar-se em água a 37 ° C em menos de 30 minutos. Se o fármaco não passar este teste, constitui um defeito importante.

### III. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

Produtos farmacêuticos a preços invulgarmente baratos, medicamentos com documentos de apoio em falta ou incorrectos e medicamentos com formas de dosagem irregulares, embalagens deficientes ou rótulos incompletos, danificados ou ausentes ou com rótulos escritos em língua estrangeira, devem ser submetidos a um teste cromatográfico em camada fina.

Verificação da Identidade e Teor do Fármaco através da Cromatografia em Camada Fina

### I. PRINCÍPIO

O cloridrato de halofantrina é extraído de comprimidos e cápsulas com metanol e determinado por CCF, tendo em conta os padrões secundários de referência.

### II. EQUIPAMENTO E REAGENTES

- 1) Pilão
- 2) Folha de alumínio
- 3) Funil
- 4) Fita adesiva
- 5) Marcador
- 6) Lápis
- 7) Frascos de 10 ml
- 8) Conjunto de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
- 9) Conjunto de frascos de vidro de laboratório (25 a 100 ml)
- 10) Placas de alumínio de CCF da Merck previamente revestidas de gel de sílica 60F 254, tamanho 5x10 cm
- 11) Microcapilares de vidro (capacidade de 2 µl)
- 12) Câmara de eluição de CCF (frasco de 500 ml)
- 13) Placa de aquecimento
- 14) Papel de filtro
- 15) Tesoura
- 16) Pinças
- 17) Luz ultravioleta de 254 nm

(Continuação da página 20 do texto de partida)

- 18) Iodine chamber
- 19) Acetone
- 20) Methanol
- 21) Glacial acetic acid
- 22) Secondary reference standard, for example, halofantrine hydrochloride 250 mg tablets

( Continuação da tradução da página 20)

18) Câmara de iodo

19) Acetona

20) Metanol

21) Ácido acético glacial

22) Padrão secundário de referência, por exemplo comprimidos de cloridrato de halofantrina de 250 mg

### III. PREPARATION OF THE STOCK STANDARD SOLUTION

The preparation of the stock standard solution requires an authentic drug product for reference purposes, for example, tablets containing 250 mg of halofantrine hydrochloride. Wrap up one reference tablet into aluminium foil and crush it down to a fine powder using a pestle. Carefully empty the aluminium foil over a 40-ml laboratory glass bottle and wash down all residual solids with 25 ml of methanol using a straight pipette. Close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 10 mg of total drug per ml and be labelled as 'Halofantrine Stock Standard Solution'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquid.

### IV. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 100% (UPPER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 25-ml vial and add 15 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 0.625 mg of total drug per ml and be labelled as '*Halofantrine Working Standard Solution 100%*'.

This higher working standard solution represents a drug product of good quality containing 100 % of halofantrine.

### V. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 80% (LOWER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 25-ml vial and add 19 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 0.5 mg of total drug per ml and be labelled as '*Halofantrine Working Standard Solution 80%*'.

This lower working standard solution represents a drug product of poor quality containing just 80% of the amount of halofantrine as stated on the product's label. In the current investigation, this drug level represents the lower acceptable limit for a given product.

### VI. PREPARATION OF THE STOCK SAMPLE SOLUTION FROM A PRODUCT CLAIMING TO CONTAIN 250 MG OF HALOFANTRINE HYDROCHLORIDE PER UNIT

Take one whole tablet or capsule from an appropriate drug product sampled in the field. As usual, tablets are wrapped up into aluminium foil and crushed down to a fine powder. Transfer all the powder obtained into a 40-ml laboratory glass bottle. Powder obtained from sample capsules should be transferred directly into the bottle adding the cap and body shells last. For extraction, add 25 ml of methanol using a straight pipette, close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid.

The solution obtained should contain 10 mg of total drug per ml and be labelled as '*Halofantrine Stock Sample Solution*'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquid.

### III. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DO PADRÃO

A preparação da solução stock do padrão requer um medicamento autêntico para servir de referência, por exemplo comprimidos de 250 mg de cloridrato de halofantrina. Embrulhe um comprimido de referência numa folha de alumínio e esmague-o, até ficar em pó fino, usando o pilão. Transfira, cuidadosamente, o conteúdo da folha de alumínio para um frasco de vidro de laboratório de 40 ml e lave o resto dos resíduos sólidos com 25 ml de metanol com uma pipeta graduada. Feche o frasco e agite durante cerca de três minutos, até que a maior parte dos sólidos se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos que não se dissolveram se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter o fármaco numa concentração total de 10 mg por ml e ser rotulada como "*Solução Stock do Padrão de Halofantrina*". Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante, límpido ou turvo.

### IV. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 100% (CONCENTRAÇÃO LIMITE SUPERIOR DE TRABALHO)

Pipete 1 ml da solução stock do padrão para um frasco de 25 ml e adicione 15 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter o fármaco numa concentração total de 0,625 mg por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Halofantrina a 100%*".

Esta solução padrão de trabalho com concentração limite superior representa um medicamento de alta qualidade que contém 100% de halofantrina.

### V. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 80% (CONCENTRAÇÃO LIMITE MÍNIMO DE TRABALHO)

Pipete 1 ml da solução stock do padrão para um frasco de 25 ml e adicione 19 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter o fármaco numa concentração total de 0,5 mg por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Halofantrina a 80%*".

Esta solução padrão de trabalho com concentração limite inferior consiste num medicamento de fraca qualidade e contém apenas 80% da halofantrina referida no rótulo do produto. Nesta investigação, este nível de fármaco representa o limite mínimo aceitável para tal produto.

### VI. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DE AMOSTRA DE UM PRODUTO DITO CONTER 250 MG DE CLORIDRATO DE HALOFANTRINAPOR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula de uma amostra do produto. Como anteriormente, os comprimidos devem ser embrulhados numa folha de alumínio e esmagados até ficarem em pó fino. Transfira todo o pó obtido para um frasco de vidro de laboratório de 40 ml. Deve transferir directamente para o frasco o pó obtido das cápsulas de amostra, adicionando, por último, o invólucro. Para proceder à extracção, adicione 25 ml de metanol, usando uma pipeta graduada, feche o frasco e agite-o durante cerca de três minutos, até que a maior parte dos sólidos se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos que não se dissolveram se depositem no fundo do frasco.

A solução obtida deve conter o fármaco numa concentração total de 10 mg por ml e ser rotulada como "*Solução Stock da Amostra de Halofantrina*". Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante, límpido ou turvo.

#### VII. PREPARATION OF THE WORKING SAMPLE SOLUTION

Pipette 1 ml of the stock sample solution into a 25-ml vial and add 15 ml of methanol. Close and shake the vial and label as '*Halofantrine Working Sample Solution*'.

The expected concentration of halofantrine hydrochloride in the working sample solution is 0.625 mg per ml and should match the concentration of halofantrine of the higher working standard solution produced above.

#### VIII. SPOTTING

Mark an origin line parallel to and about 1.5 cm from the bottom edge of the chromatoplate and apply 2  $\mu$ l of each test and standard solution as shown in the picture opposite using the microcapillary pipettes supplied.

Up to five spots can be placed on a plate. Check the uniformity of all spots using UV light of 254 nm. All spots should be circular in shape and equally spaced across the origin line. Although their intensities might differ, their diameters never should. Different intensities are due to residual amounts of tablet and capsule excipients or different drug concentrations in the sample solutions. A difference in spot size, however, relates to poor spotting. Repeat this step if homogeneous spotting is not achieved first time.

#### IX. DEVELOPMENT

Pipette 15 ml of acetone, 5 ml of methanol and 2 ml of glacial acetic acid into the jar being used as TLC developing chamber. Close the chamber and mix thoroughly. Line the chamber's wall with filter paper and wait for about 15 minutes thus ensuring saturation of the chamber with solvent vapour. Carefully place the loaded TLC plate into the jar. Close the jar and develop the chromatoplate until the solvent front has moved about three-quarters of the length of the plate, the developing time being about 15 minutes. Remove the plate from the chamber, mark the solvent front and allow any excess solvent to evaporate using a hot plate if necessary.

#### X. DETECTION

Dry off all residual solvent and observe the chromatoplate under UV light of 254 nm using the battery-driven lamp supplied. Use this method of detection for both, identification and quantification purposes. Further verification of drug identity and content can be achieved when observing the plate at daylight after iodine staining.

#### VII. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AMOSTRA DE TRABALHO

Pipete 1 ml da solução stock da amostra para um frasco de 25 ml e adicione 15 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. Rotule-o como "*Solução Amostra de Trabalho de Halofantrina*".

Estima-se que a concentração de cloridrato de halofantrina nesta solução de amostra seja de 0,625 mg por ml e deve ser igual à concentração de halofantrina na solução padrão de trabalho com concentração limite superior preparada anteriormente.

#### VIII. APLICAÇÃO

Trace uma linha paralela à base da placa cromatográfica, a cerca de 1,5 cm da base, e aplique 2 µl de cada solução, de padrão e de teste, como ilustrado na figura do lado oposto, usando os microcapilares de vidro fornecidos.

Podem ser aplicadas cinco manchas numa placa. Confirme a uniformidade das manchas através da luz ultravioleta de 254 nm. Todas as manchas devem ser circulares e separadas entre si por uma distância igual ao longo da linha de base. Apesar de as suas intensidades poderem diferir, o seu diâmetro deve ser sempre igual. As diferentes intensidades devem-se a diferentes quantidades residuais de excipientes dos comprimidos e cápsulas e devido a diferentes concentrações de fármaco na solução de amostra. Porém, se as manchas apresentarem um tamanho diferente deve-se a uma incorrecta aplicação. Repita este passo, se não conseguir uma aplicação homogénea à primeira tentativa.

#### IX. ELUIÇÃO

Pipete 15 ml de acetona, 5 ml de metanol e 2 ml de ácido acético glacial para o frasco que está a ser usado como câmara de eluição de CCF. Feche a câmara e misture bem. Revista a parede da câmara com papel de filtro e aguarde cerca de 15 minutos para assegurar a saturação da câmara com o vapor do solvente. Coloque, com cuidado, a placa de CCF contendo os compostos no frasco. Feche o frasco e elua a placa cromatográfica antes que a frente solvente tenha percorrido três-quartos do comprimento da placa, tendo em conta que a eluição da placa demora cerca de 15 minutos. Remova a placa da câmara, marque a frente solvente e deixe que o excesso de solvente se evapore. Se for necessário, use a placa de aquecimento.

#### X. REVELAÇÃO

Deixe que todos os resíduos do solvente evaporem da placa cromatográfica e observe-a com luz ultravioleta de 254 nm, usando a lanterna a pilhas fornecida. Use este método de detecção para efeitos de identificação e de quantificação. Para verificação adicional da autenticidade e teor do fármaco, observe a placa à luz do dia após a coloração com iodo.

XI. CHROMATOPLATE OBSERVED UNDER UV LIGHT OF 254 NM

Run No.1: Upper working standard representing 100% of total halofantrine

Run No.2: A drug product of good quality with acceptable drug content

Run No.3: A drug product of poor quality with unacceptable low drug content

Run No.4: Lower working standard representing 80% of total halofantrine

(Solvent front)

Principal spot

(Origin line)

XII. OBSERVATIONS MADE AT 254 NM

A strong blue-violet spot at a travel distance of about 0.71 indicates the presence of halofantrine in the test solution. Additional strong spots generated by the test solution would point at other drugs or halofantrine degradation, the latter case being more likely when associated with a smaller principal spot. Auxiliary agents incorporated in the different tablet or capsule formulations might cause some fainter spots emerging near or on the origin line.

XIII. OBSERVATIONS MADE AT DAYLIGHT AFTER IODINE STAINING

When exposing the chromatoplate to iodine vapour, all halofantrine spots already observed at 254 nm are now turning yellowish brown. Still observe the plate when iodine evaporates already. Spots reflecting poor quality products will disappear first gradually followed by the reference spots representing a drug content of 80 and 100 percent, respectively.

XIV. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

The halofantrine spot in the chromatogram obtained with the test solution must correspond in terms of colour, size, intensity, shape and travel distance to that in the chromatogram obtained with the lower and higher standard solution. This result must be obtained for each method of detection. If this is not achieved, repeat the run from scratch with a second sample. Reject the batch if the drug content cannot be verified in a third run. For precise drug content determination, refer additional samples to a fully-fledged drug quality control laboratory. Retain samples and put the batch on quarantine until a final decision on rejection or release has been taken.



#### XI. PLACA CROMATOGRÁFICA OBSERVADA SOB LUZ UV DE 254 NM

1ª corrida: Padrão com concentração limite superior de trabalho, representando 100% de halofantrina

2ª corrida: Medicamento de boa qualidade com conteúdo aceitável de fármaco

3ª corrida: Medicamento de fraca qualidade com conteúdo de fármaco baixo e inaceitável

4ª corrida: Padrão com concentração limite inferior de trabalho, representando 80% de halofantrina

(Frente solvente)

Mancha principal

(linha de base)

#### XII. OBSERVAÇÃO A 254 NM

Uma mancha azul-violeta forte com uma distância relativa percorrida de cerca de 0,71 indica a presença de halofantrina na solução de teste. Manchas fortes adicionais formadas pela solução de teste podem indicar a presença de outros fármacos ou a degradação de halofantrina, estando este último caso associado a uma mancha principal mais pequena. Os agentes auxiliares incorporados nas diferentes formulações dos comprimidos ou cápsulas podem originar manchas mais fracas, perto da linha de base ou sobre esta.

#### XIII. OBSERVAÇÃO À LUZ DO DIA APÓS COLORAÇÃO COM IODO

Aquando da exposição da placa cromatográfica ao vapor de iodo, todas as manchas de halofantrina anteriormente observadas a 254 nm tornam-se amarelo-acastanhadas. Observe a placa durante a evaporação do iodo. As manchas que denunciam um produto de fraca qualidade desaparecerão em primeiro lugar, gradualmente, seguidas pelas manchas de referência que representam um teor de fármaco de 80 e 100 por cento, respectivamente.

#### XIV. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

A mancha de halofantrina no cromatograma obtida através da solução de teste deve corresponder, em termos de cor, tamanho, intensidade, forma e distância relativa percorrida, às manchas do cromatograma obtidas com as soluções padrão de trabalho com concentração limite inferior e superior. Deve obter este resultado para cada método de detecção. Se não conseguir obter este resultado, repita o teste do início com uma segunda amostra. Se não conseguir verificar o teor do fármaco num terceiro teste, rejeite o lote. Para determinar, de forma precisa, o conteúdo do fármaco, envie outras amostras para um laboratório profissional de controlo de qualidade de medicamentos. Guarde algumas amostras e coloque o lote em quarentena até que se tome uma decisão final sobre a sua rejeição ou libertação.

## Levofloxacin

### Primary Screening via Visual Inspection and Disintegration Test

#### I. VISUAL & PHYSICAL INSPECTION

Search for deficiencies on labeling, packaging and dosage forms as described in the opening chapters on general methods and operations of the main manual. Write down all product particulars using the reporting form as a guide. Each tablet or capsule usually contains 250, 500 or 750 mg of levofloxacin free base or appropriate equivalents of about 256, 512 or 769 mg of levofloxacin semihydrate. Other dosage strengths are known to exist.

#### II. DISINTEGRATION TEST

All quick release levofloxacin tablets and capsules must pass the disintegration test as described in the opening chapters on general methods and operations of the main manual. They should disintegrate in water at 37° C in less than 30 minutes. It's a major defect if a drug product doesn't pass this test.

#### III. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

Drug products from unusually cheap sources, drug products with missing or incorrect accompanying documents and drug products with defective dosage forms, packaging or with incomplete, damaged or missing labels or with labels written in a foreign language should be subjected to a thin layer chromatographic test.

### Verification of Drug Identity and Content via Thin Layer Chromatography

#### I. PRINCIPLE

Levofloxacin tablets and capsules are extracted with aqueous acetic acid solution and determined by TLC with reference to an authentic secondary standard.

#### II. EQUIPMENT AND REAGENTS

- 1) Pestle
- 2) Aluminium foil
- 3) Funnel
- 4) Label tape
- 5) Marker pen
- 6) Pencil
- 7) 10-ml vials
- 8) Set of straight pipettes (1 to 25 ml)
- 9) Set of laboratory glass bottles (25 to 100 ml)
- 10) Merck TLC aluminium plates pre-coated with silica gel 60 F 254, size 5x10 cm
- 11) Glass microcapillaries (2- $\mu$ l filling capacity)
- 12) TLC developing chamber (500-ml jar)
- 13) Hot plate
- 14) Filter paper
- 15) Pair of scissors
- 16) Pair of tweezers
- 17) UV light of 254 nm

## Levofloxacin

Triagem Primária com Inspeção Visual e Teste de Desagregação

### I. INSPECÇÃO VISUAL & FÍSICA

Procure deficiências na rotulagem, embalagem e nas formas de dosagem, tal como descrito nos capítulos iniciais sobre os métodos e procedimentos gerais do manual principal. Registe todos os pormenores do produto, usando os formulários para relatório como orientação. Cada comprimido ou cápsula normalmente contém 250, 500 ou 750 mg de levofloxacin ou os equivalentes apropriados de cerca de 256, 512 ou 769 mg de levofloxacin hemi-hidratada. Sabe-se que existem outras dosagens.

### II. TESTE DE DESAGREGAÇÃO

Todos os comprimidos e cápsulas de levofloxacin de libertação rápida devem passar o teste de desagregação, tal como se descreve nos capítulos iniciais sobre métodos e procedimentos gerais do manual principal. Devem desagregar-se em água a 37 ° C em menos de 30 minutos. Se o fármaco não passar este teste, constitui um defeito importante.

### III. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

Produtos farmacêuticos a preços vulgarmente baratos, medicamentos com documentos de apoio em falta ou incorrectos e medicamentos com formas de dosagem irregulares, embalagens deficientes ou rótulos incompletos, danificados ou ausentes ou com rótulos escritos em língua estrangeira, devem ser submetidos a um teste cromatográfico em camada fina.

Verificação da Identidade e Teor do Fármaco através da Cromatografia em Camada Fina

#### I. PRINCÍPIO

A levofloxacin é extraída de comprimidos e cápsulas com uma solução aquosa de ácido acético e determinada por CCF, tendo em conta os padrões secundários de referência.

#### II. EQUIPAMENTO E REAGENTES

- 1) Pilão
- 2) Folha de alumínio
- 3) Funil
- 4) Fita adesiva
- 5) Marcador
- 6) Lápis
- 7) Frascos de 10 ml
- 8) Conjunto de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
- 9) Conjunto de frascos de vidro de laboratório (25 a 100 ml)
- 10) Placas de alumínio de CCF da Merck previamente revestidas de gel de sílica 60F 254, tamanho 5x10 cm
- 11) Microcapilares de vidro (capacidade de 2 µl)
- 12) Câmara de eluição de CCF (frasco de 500 ml)
- 13) Placa de aquecimento
- 14) Papel de filtro
- 15) Tesoura
- 16) Pinças
- 17) Luz ultravioleta de 254 nm

(Continuação da página 24 do texto de partida)

- 18) UV light of 366 nm
- 19) Iodine chamber
- 20) Glacial acetic acid
- 21) Methanol
- 22) Water
- 23) Ammonia solution 25%
- 24) Authentic reference standard, for example, tablets containing an equivalent of 250 mg of levofloxacin free base

(Continuação da tradução da página 24)

- 18) Luz ultravioleta de 366 nm
- 19) Câmara de iodo
- 20) Ácido acético glacial
- 21) Metanol
- 22) Água
- 23) Solução de amoníaco a 25%
- 24) Padrão autêntico de referência, por exemplo comprimidos de conteúdo equivalente a 250 mg de levofloxacina

### III. PREPARATION OF THE STOCK STANDARD SOLUTION

The preparation of the stock standard solution requires an authentic drugproduct for reference purposes, for example, tablets containing an equivalent of 250 mg of levofloxacin free base. Wrap up one reference tablet into aluminium foil and crush it down to a fine powder using a pestle. Carefully empty the aluminium foil over a 40-ml laboratory glass bottle and wash down all residual solids with 5 ml of glacial acetic acid followed by 20 ml of water using appropriate straight pipettes. Close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 10 mg of total drug per ml and be labelled as '*Levofloxacin Stock Standard Solution*'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquid.

### IV. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 100% (UPPER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 7 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 1.25 mg of total drug per ml and be labelled as '*Levofloxacin Working Standard Solution 100%*'.

This higher working standard solution represents a drug product of good quality containing 100 % of levofloxacin free base.

### V. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 80% (LOWER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 9 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 1 mg of total drug per ml and be labelled as '*Levofloxacin Working Standard Solution 80%*'.

This lower working standard solution represents a drug product of poor quality containing just 80% of the amount of levofloxacin free base as stated on the product's label. In the current investigation, this drug level represents the lower acceptable limit for a given product.

### VI. PREPARATION OF THE STOCK SAMPLE SOLUTION FROM A PRODUCT CLAIMING TO CONTAIN 250 MG OF LEVOFLOXACIN PER UNIT

Take one whole tablet or capsule from an appropriate drug product sampled in the field. As usual, tablets are wrapped up into aluminium foil and crushed down to a fine powder. Transfer all the powder obtained into a 40-ml laboratory glass bottle. Powder obtained from a sample capsule should be transferred directly into the bottle adding the cap and body shells last. For extraction, add 5 ml of glacial acetic acid followed by 20 ml of water using appropriate straight pipettes, close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid.

#### 500 MG OF LEVOFLOXACIN PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 10 ml of glacial acetic acid followed by 40 ml of water using appropriate straight pipettes and a 100-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

#### 750 MG OF LEVOFLOXACIN PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 15 ml of glacial acetic acid followed by 60 ml of water using appropriate straight pipettes and a 100-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

All stock sample solutions produced should finally contain 10 mg of total drug per ml and be labelled as '*Levofloxacin Stock Sample Solution*'. Freshly prepare these solutions for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquids.

### III. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DO PADRÃO

A preparação da solução stock do padrão requer um medicamento autêntico para servir de referência, por exemplo comprimidos de conteúdo equivalente a 250 mg de levofloxacina. Embrulhe um comprimido de referência em folha de alumínio e esmague-o, até ficar em pó fino, usando o pilão. Transfira, cuidadosamente, o conteúdo da folha de alumínio para um frasco de vidro de laboratório de 40 ml e lave o resto dos resíduos sólidos com 5 ml de ácido acético glacial seguidos de 20 ml de água usando pipetas graduadas apropriadas. Feche o frasco e agite durante cerca de três minutos, até que a maior parte dos sólidos se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos que não se dissolveram se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter o fármaco numa concentração total de 10 mg por ml e ser rotulada como "*Solução Stock do Padrão de Levofloxacina*". Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante, límpido ou turvo.

### IV. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 100% (CONCENTRAÇÃO LIMITE SUPERIOR DE TRABALHO)

Pipete 1 ml da solução stock do padrão para um frasco de 10 ml e adicione 7 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter o fármaco numa concentração total de 1,25 mg por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Levofloxacina a 100%*".

Esta solução padrão de trabalho com concentração limite superior representa um medicamento de alta qualidade que contém 100% de levofloxacina.

### V. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 80% (CONCENTRAÇÃO LIMITE MÍNIMO DE TRABALHO)

Pipete 1 ml da solução stock do padrão para um frasco de 10 ml e adicione 9 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter o fármaco numa concentração total de 1 mg por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Levofloxacina a 80%*".

Esta solução padrão de trabalho com concentração limite inferior consiste num medicamento de fraca qualidade e contém apenas 80% da levofloxacina referida no rótulo do produto. Nesta investigação, este nível de fármaco representa o limite mínimo aceitável para tal produto.

### VI. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DE AMOSTRA DE UM PRODUTO DITO CONTER 250 MG DE LEVOFLOXACINA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula de uma amostra do produto. Como anteriormente, os comprimidos devem ser embrulhados numa folha de alumínio e esmagados até ficarem em pó fino. Transfira todo o pó obtido para um frasco de vidro de laboratório de 40 ml. Deve transferir directamente para o frasco o pó obtido de uma cápsula, adicionando, de seguida, o invólucro. Para proceder à extracção, adicione 5 ml de ácido acético glacial seguidos de 20 ml de água, usando pipetas graduadas apropriadas, feche o frasco e agite-o durante cerca de três minutos, até que a maior parte dos sólidos se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos que não se dissolveram se depositem no fundo do frasco.

#### 500 MG DE LEVOFLOXACINA POR UNIDADE

Extraia o pó obtido da amostra de um comprimido ou de uma cápsula com 10 ml de ácido acético glacial seguidos de 40 ml de água, usando pipetas graduadas apropriadas e um frasco de vidro de laboratório de 100 ml, como recipiente para amostras. Continue como indicado anteriormente.

#### 750 MG DE LEVOFLOXACINA POR UNIDADE

Extraia o pó obtido da amostra de um comprimido ou de uma cápsula com 15 ml de ácido acético glacial seguidos de 60 ml de água, usando pipetas graduadas apropriadas e um frasco de vidro de laboratório de 100 ml, como recipiente para amostras. Continue como indicado anteriormente.

Todas as soluções stock de amostra preparadas devem, no fim do procedimento, conter o fármaco numa concentração total de 10 mg por ml e serem rotuladas como "*Solução Stock da Amostra de Levofloxacina*". Prepare novas soluções para cada teste. Continue a usar os líquidos sobrenadantes, límpidos ou turvos.

#### VII. PREPARATION OF THE WORKING SAMPLE SOLUTION

Pipette 1 ml of the stock sample solution into a 10-ml vial and add 7 ml of methanol. Close and shake the vial and label as '*Levofloxacin Working Sample Solution*'.

The expected concentration of levofloxacin free base in this working sample solution is 1.25 mg per ml and should match the concentration of levofloxacin of the higher working standard solution produced above.

#### VIII. SPOTTING

Mark an origin line parallel to and about 1.5 cm from the bottom edge of the chromatoplate and apply 2  $\mu$ l of each test and standard solution as shown in the picture opposite using the microcapillary pipettes supplied.

Up to five spots can be placed on a plate. Check the uniformity of all spots using UV light of 254 nm. All spots should be circular in shape and equally spaced across the origin line. Although their intensities might differ, their diameters never should. Different intensities are due to residual amounts of tablet and capsule excipients or different drug concentrations in the sample solutions. A difference in spot size, however, relates to poor spotting. Repeat this step if homogeneous spotting is not achieved first time.

Note that the filling of the microcapillary pipettes might take some time when handling aqueous sample solutions. As traces of water are causing spot tailing, completely dry off all extraction solvent before chromatoplate development using the hot plate supplied.

#### IX. DEVELOPMENT

Pipette 14 ml of methanol, 4 ml of concentrated ammonia solution and 2 ml of water into the jar being used as TLC developing chamber. Close the chamber and mix thoroughly. Line the chamber's wall with filter paper and wait for about 15 minutes thus ensuring saturation of the chamber with solvent vapour. Carefully place the loaded TLC plate into the jar. Close the jar and develop the chromatoplate until the solvent front has moved about three-quarters of the length of the plate, the developing time being about 30 minutes. Remove the plate from the chamber, mark the solvent front and allow any excess solvent to evaporate using a hot plate if necessary.

#### X. DETECTION

Dry off all residual solvent and observe the chromatoplate under UV light of 254 and 366 nm using the battery-driven lamps supplied. Use these methods of detection for both, identification and quantification purposes. Make sure that the work place is really dark with little or no ambient light when operating the UV lamp of 366 nm. Further verification of drug identity and content can be achieved when observing the plate at daylight after iodine staining.



#### VII. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AMOSTRA DE TRABALHO

Pipete 1 ml da solução stock de amostra para um frasco de 10 ml e adicione 7 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. Rotule-o como "*Solução Amostra de Trabalho de Levofloxacin*".

Estima-se que a concentração de levofloxacin nesta solução amostra de trabalho seja de 1,25 mg por ml e deve ser igual à concentração de levofloxacin na solução padrão de trabalho com concentração limite superior preparada anteriormente.

#### VIII. APLICAÇÃO

Trace uma linha paralela à base da placa cromatográfica, a cerca de 1,5 cm da base, e aplique 2 µl de cada solução, de padrão e de teste, como ilustrado na figura do lado oposto, usando os microcapilares de vidro fornecidos.

Podem ser aplicadas cinco manchas numa placa. Confirme a uniformidade das manchas através da luz ultravioleta de 254 nm. Todas as manchas devem ser circulares e separadas entre si por uma distância igual ao longo da linha de base. Apesar de as suas intensidades poderem diferir, o seu diâmetro deve ser sempre igual. As diferentes intensidades devem-se a diferentes quantidades residuais de excipientes dos comprimidos e cápsulas ou devido a diferentes concentrações de fármaco na solução de amostra. Porém, se as manchas apresentarem um tamanho diferente deve-se a uma incorrecta técnica de aplicação. Repita este passo, se não conseguir uma marcação homogénea à primeira tentativa.

Tenha em conta que encher os microcapilares de vidro pode demorar algum tempo aquando da utilização de soluções de amostra aquosas. Para evitar que resíduos de água originem manchas arrastadas, utilize a placa de aquecimento fornecida para secar o solvente de extracção antes da eluição da placa cromatográfica.

#### IX. ELUIÇÃO

Pipete 14 ml de metanol, 4 ml de solução concentrada de amoníaco e 2 ml de água para o frasco que está a ser usado como câmara de eluição de CCF. Feche a câmara e misture bem. Revista a parede da câmara com papel de filtro e aguarde cerca de 15 minutos para assegurar a saturação da câmara com o vapor do solvente. Coloque, com cuidado, a placa de CCF contendo os compostos no frasco. Feche o frasco e elua a placa cromatográfica antes que a frente de solvente tenha percorrido três-quartos do comprimento da placa, tendo em conta que a eluição da placa demora cerca de 30 minutos. Remova a placa da câmara, marque a frente solvente e deixe que o excesso de solvente se evapore. Se for necessário, use a placa de aquecimento.

#### X. REVELAÇÃO

Deixe que todos os resíduos do solvente evaporem da placa cromatográfica e observe-a com luz ultravioleta de 254 e 366 nm, usando as lanternas a pilhas fornecidas. Use estes métodos de detecção para efeitos de identificação e de quantificação. Assegure-se de que o local de trabalho é escuro, com pouca ou nenhuma luz ambiente, aquando do manuseamento da luz ultravioleta de 366 nm. Para verificar a autenticidade do teor do fármaco, observe a placa à luz do dia após a coloração com iodo.

XI. CHROMATOPLATES OBSERVED UNDER UV LIGHT OF 254 AND 366 NM

Run No.1: Upper working standard representing 100% of total levofloxacin

Run No.2: A drug product of good quality with acceptable drug content

Run No.3: A drug product of poor quality with unacceptable low drug content

Run No.4: Lower working standard representing 80% of total levofloxacin

(Solvent front)

Principal spot observed at 254 nm

Same principal spot observed at 366 nm

(Origin line)

XII. OBSERVATIONS MADE AT 254 NM

A blue-violet spot at a travel distance of about 0.71 indicates the presence of levofloxacin in the test solution. Additional strong spots generated by the test solution would point at other drugs or levofloxacin degradation, the latter case being more likely when associated with a smaller principal spot. Auxiliary agents incorporated in the different tablet or capsule formulations might cause some fainter spots emerging near or on the origin line.

XIII. OBSERVATIONS MADE AT 366 NM

When exposing the chromatoplate to UV light of 366 nm in a dark room, all levofloxacin spots already observed at 254 nm must now show an intense yellowish-blue fluorescence. Bear in mind that the colour shown here can be indicative only. The actual shade of the reference spot on the plate will be valid for decision making.

XIV. OBSERVATIONS MADE AT DAYLIGHT AFTER IODINE STAINING

When exposing the chromatoplate to iodine vapour, all levofloxacin spots already observed at 254 and 366 nm are now turning yellowish brown. Still observe the plate when iodine evaporates already. Spots reflecting poor quality products will disappear first gradually followed by the reference spots representing a drug content of 80 and 100 percent, respectively.

XV. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

The levofloxacin spot in the chromatogram obtained with the test solution must correspond in terms of colour, size, intensity, shape and travel distance to that in the chromatogram obtained with the lower and higher standard solution. This result must be obtained for each method of detection. If this is not achieved, repeat the run from scratch with a second sample. Reject the batch if the drug content cannot be verified in a third run. For precise drug content determination, refer additional samples to a fully-fledged drug quality control laboratory. Retain samples and put the batch on quarantine until a final decision on rejection or release has been taken.

#### XI. PLACAS CROMATOGRÁFICAS OBSERVADAS SOB LUZ UV DE 254 E 366 NM

1ª corrida: Padrão com concentração limite superior de trabalho, representando 100% de levofloxacina

2ª corrida: Medicamento de boa qualidade com conteúdo aceitável de fármaco

3ª corrida: Medicamento de fraca qualidade com conteúdo de fármaco baixo e inaceitável

4ª corrida: Padrão com concentração limite inferior de trabalho, representando 80% de levofloxacina

(Frente solvente)

Mancha principal observada a 254 nm

Mesma mancha principal observada a 366 nm

(linha de base)

#### XII. OBSERVAÇÃO A 254 NM

Uma mancha azul-violeta com uma distância relativa percorrida de cerca de 0,71 indica a presença de levofloxacina na solução de teste. Manchas fortes adicionais formadas pela solução de teste podem indicar a presença de outros fármacos ou a degradação da levofloxacina, estando este último caso associado a uma mancha principal mais pequena. Os agentes auxiliares incorporados nas diferentes formulações dos comprimidos ou cápsulas podem originar manchas mais fracas, perto da linha de base ou sobre esta.

#### XIII. OBSERVAÇÃO A 366 NM

Aquando da exposição da placa cromatográfica à luz ultravioleta de 366 nm num espaço escuro, todas as manchas de levofloxacina anteriormente observadas a 254 nm devem mostrar uma fluorescência amarelo-azulada intensa. Tenha em conta que a cor revelada neste passo é apenas indicativa. A forma da mancha de referência na placa cromatográfica será, esta sim, um factor válido para uma tomada de decisão.

#### XIV. OBSERVAÇÃO À LUZ DO DIA APÓS COLORAÇÃO COM IODO

Aquando da exposição da placa cromatográfica ao vapor de iodo, todas as manchas de levofloxacina anteriormente observadas a 254 e 366 nm tornam-se amarelo-acastanhadas. Observe a placa durante a evaporação do iodo. As manchas que denunciam um produto de fraca qualidade desaparecerão em primeiro lugar, gradualmente, seguidas pelas manchas de referência que representam um teor de fármaco de 80 e 100 por cento, respectivamente.

#### XV. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

A mancha de levofloxacina no cromatograma obtida através da solução de teste deve corresponder, em termos de cor, tamanho, intensidade, forma e distância relativa percorrida, às manchas do cromatograma obtidas com as soluções padrão de trabalho com concentração limite inferior e superior. Deve obter este resultado para cada método de detecção. Se não conseguir obter este resultado, repita o teste do início com uma segunda amostra. Se não conseguir verificar o teor do fármaco num terceiro teste, rejeite o lote. Para determinar, de forma precisa, o teor do fármaco, envie outras amostras para um laboratório profissional de controlo de qualidade de medicamentos. Guarde algumas amostras e coloque o lote em quarentena até que se tome uma decisão final sobre a sua rejeição ou libertação.

## Moxifloxacin

### Primary Screening via Visual Inspection and Disintegration Test

#### I. VISUAL & PHYSICAL INSPECTION

Search for deficiencies on labelling, packaging and dosage forms as described in the opening chapters on general methods and operations of the main manual. Write down all product particulars using the reporting form as a guide. Each tablet or capsule usually contains 436.8 mg of moxifloxacin hydrochloride. This translates into the customarily expressed label claim of 400 mg of moxifloxacin free base. Confusing label claims of 400 mg of moxifloxacin hydrochloride are known to exist, the product then presenting about 367 mg of moxifloxacin free base only.

#### II. DISINTEGRATION TEST

All quick release moxifloxacin tablets and capsules must pass the disintegration test as described in the opening chapters on general methods and operations of the main manual. They should disintegrate in water at 37 °C in less than 30 minutes. It's a major defect if a drug product doesn't pass this test

#### III. RESULTS ACTIONS TO BE TAKEN

Drug products from unusually cheap sources, drug products with missing or incorrect accompanying documents and drug products with defective dosage forms, packaging or with incomplete, damaged or missing labels or with labels written in a foreign language should be subjected to a thin layer chromatographic test.

### Verification of Drug Identity and Content via Thin Layer Chromatography

#### I. PRINCIPLE

Moxifloxacin hydrochloride tablets and capsules are extracted with methanol and determined by TLC with reference to an authentic secondary standard.

#### II. EQUIPMENT AND REAGENTS

- 1) Pestle
- 2) Aluminium foil
- 3) Funnel
- 4) Label tape
- 5) Marker pen
- 6) Pencil
- 7) 10-ml vials
- 8) Set of straight pipettes (1 to 25 ml)
- 9) Set of laboratory glass bottles (25 to 100 ml)
- 10) Merck TLC aluminium plates pre-coated with silica gel 60 F 254, size 5x10 cm
- 11) Glass microcapillaries (2- $\mu$ l filling capacity)
- 12) TLC developing chamber (500-ml jar)
- 13) Hot plate
- 14) Filter paper
- 15) Pair of scissors
- 16) Pair of tweezers

## Moxifloxacina

Triagem Primária com Inspeção Visual e Teste de Desagregação

### I. INSPEÇÃO VISUAL & FÍSICA

Procure deficiências na rotulagem, embalagem e nas formas de dosagem, tal como descrito nos capítulos iniciais sobre os métodos e procedimentos gerais do manual principal. Registe todos os pormenores do produto, usando os formulários para relatório como orientação. Cada comprimido ou cápsula normalmente contém 436,8 mg de cloridrato de moxifloxacina. Tal traduz-se nos rótulos das embalagens numa dosagem de 400 mg de moxifloxacina. Sabe-se que existem rótulos de 400 mg de cloridrato de moxifloxacina que podem ser confundidos com os anteriores, sendo que este produto contém apenas cerca de 367 mg de moxifloxacina.

### II. TESTE DE DESAGREGAÇÃO

Todos os comprimidos e cápsulas de moxifloxacina de libertação rápida devem passar o teste de desagregação, tal como se descreve nos capítulos iniciais sobre métodos e procedimentos gerais do manual principal. Devem desagregar-se em água a 37 ° C em menos de 30 minutos. Se o fármaco não passar este teste, constitui um defeito importante.

### III. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

Produtos farmacêuticos a preços vulgarmente baratos, medicamentos com documentos de apoio em falta ou incorrectos e medicamentos com formas de dosagem irregulares, embalagens deficientes ou rótulos incompletos, danificados ou ausentes ou com rótulos escritos em língua estrangeira, devem ser submetidos a um teste cromatográfico em camada fina.

## Verificação da Identidade e Teor do Fármaco através da Cromatografia em Camada Fina

### I. PRINCÍPIO

O cloridrato de moxifloxacina é extraído de comprimidos e cápsulas com metanol e determinado por CCF, tendo em conta os padrões secundários de referência.

### II. EQUIPAMENTO E REAGENTES

- 1) Pilão
- 2) Folha de alumínio
- 3) Funil
- 4) Fita adesiva
- 5) Marcador
- 6) Lápis
- 7) Frascos de 10 ml
- 8) Conjunto de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
- 9) Conjunto de frascos de vidro de laboratório (25 a 100 ml)
- 10) Placas de alumínio de CCF da Merck previamente revestidas de gel de sílica 60F 254, tamanho 5x10 cm
- 11) Microcapilares de vidro (capacidade de 2 µl)
- 12) Câmara de eluição de CCF (frasco de 500 ml)
- 13) Placa de aquecimento
- 14) Papel de filtro
- 15) Tesoura
- 16) Pinças

(Continuação da página 28 do texto de partida)

- 17) UV light of 254 nm
- 18) UV light of 366 nm
- 19) Iodine chamber
- 20) Methanol
- 21) Water
- 22) Ammonia solution 25%
- 23) Authentic reference standard, for example, tablets containing an equivalent of 400 mg of moxifloxacin free base

(Continuação da tradução da página 28)

- 17) Luz ultravioleta de 254 nm
- 18) Luz ultravioleta de 366 nm
- 19) Câmara de iodo
- 20) Metanol
- 21) Água
- 22) Solução de amoníaco a 25%
- 23) Padrão autêntico de referência, por exemplo comprimidos de conteúdo equivalente a 400 mg de moxifloxacina

### III. PREPARATION OF THE STOCK STANDARD SOLUTION

The preparation of the stock standard solution requires an authentic drug product for reference purposes, for example, tablets containing an equivalent of 400 mg of moxifloxacin free base. Wrap up one reference tablet into aluminium foil and crush it down to a fine powder using a pestle. Carefully empty the aluminium foil over a 40-ml laboratory glass bottle and wash down all residual solids with 40 ml of methanol using a straight pipette. Close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 10 mg of total drug per ml and be labelled as '*Moxifloxacin Stock Standard Solution*'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquid.

### IV. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 100% (UPPER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 7 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 1.25 mg of total drug per ml and be labelled as '*Moxifloxacin Working Standard Solution 100%*'.

This higher working standard solution represents a drug product of good quality containing 100 % of moxifloxacin free base.

### V. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 80% (LOWER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 9 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 1 mg of total drug per ml and be labelled as '*Moxifloxacin Working Standard Solution 80%*'.

This lower working standard solution represents a drug product of poor quality containing just 80% of the amount of moxifloxacin free base as stated on the product's label. In the current investigation, this drug level represents the lower acceptable limit for a given product.

### VI. PREPARATION OF THE STOCK SAMPLE SOLUTION FROM A PRODUCT CLAIMING TO CONTAIN 367 MG OF MOXIFLOXACIN FREE BASE PER UNIT

Take one whole tablet or capsule from an appropriate drug product sampled in the field. As usual, tablets are wrapped up into aluminium foil and crushed down to a fine powder. Transfer all the powder obtained into a 40-ml laboratory glass bottle. Powder obtained from a sample capsule should be transferred directly into the bottle adding the cap and body shells last. For extraction, add 36.7 ml of methanol using a straight pipette, close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid.

#### 400 MG OF MOXIFLOXACIN FREE BASE PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 40 ml of methanol using a straight pipette and a 40-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

All stock sample solutions produced should finally contain 10 mg of total drug per ml and be labelled as '*Moxifloxacin Stock Sample Solution*'. Freshly prepare these solutions for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquids.



### III. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DO PADRÃO

A preparação da solução stock do padrão requer um medicamento autêntico para servir de referência, por exemplo comprimidos de conteúdo equivalente a 400 mg de moxifloxacina. Embrulhe um comprimido de referência em folha de alumínio e esmague-o, até ficar em pó fino, usando o pilão. Transfira, cuidadosamente, o conteúdo da folha de alumínio para um frasco de vidro de laboratório de 40 ml e lave o resto dos resíduos sólidos com 40 ml de metanol com uma pipeta graduada. Feche o frasco e agite durante cerca de três minutos, até que a maior parte dos sólidos se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos que não se dissolveram se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter o fármaco numa concentração total de 10 mg por ml e ser rotulada como "*Solução Stock do Padrão de Moxifloxacina*". Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante, límpido ou turvo.

### IV. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 100% (CONCENTRAÇÃO LIMITE SUPERIOR DE TRABALHO)

Pipete 1 ml da solução stock do padrão para um frasco de 10 ml e adicione 7 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter o fármaco numa concentração total de 1,25 mg por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Moxifloxacina a 100%*".

Esta solução padrão de trabalho com concentração limite superior representa um medicamento de alta qualidade que contém 100% de moxifloxacina.

### V. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 80% (CONCENTRAÇÃO LIMITE MÍNIMO DE TRABALHO)

Pipete 1 ml da solução stock do padrão para um frasco de 10 ml e adicione 9 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter o fármaco numa concentração total de 1 mg por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Moxifloxacina a 80%*".

Esta solução padrão de trabalho com concentração limite inferior consiste num medicamento de fraca qualidade e contém apenas 80% da moxifloxacina referida no rótulo do produto. Nesta investigação, este nível de fármaco representa o limite mínimo aceitável para tal produto.

### VI. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DE AMOSTRA DE UM PRODUTO DITO CONTER 367 MG DE MOXIFLOXACINA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula de uma amostra do produto. Como anteriormente, os comprimidos devem ser embrulhados numa folha de alumínio e esmagados até ficarem em pó fino. Transfira todo o pó obtido para um frasco de vidro de laboratório de 40 ml. Deve transferir directamente para o frasco o pó obtido de uma cápsula, adicionando, de seguida, o invólucro. Para proceder à extracção, adicione 36,7 ml de metanol, usando uma pipeta graduada, feche o frasco e agite-o durante cerca de três minutos, até que a maior parte dos sólidos se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos que não se dissolveram se depositem no fundo do frasco.

#### 400 MG DE MOXIFLOXACINA POR UNIDADE

Extraia o pó obtido da amostra de um comprimido ou de uma cápsula com 40 ml de metanol, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 40 ml, como recipiente para amostras. Continue como indicado anteriormente.

Todas as soluções stock de amostra preparadas devem, no fim do procedimento, conter o fármaco numa concentração total de 10 mg por ml e serem rotuladas como "*Solução Stock da Amostra de Moxifloxacina*". Prepare novas soluções para cada teste. Continue a usar os líquidos sobrenadantes, límpidos ou turvos.

#### VII. PREPARATION OF THE WORKING SAMPLE SOLUTION

Pipette 1 ml of the stock sample solution into a 10-ml vial and add 7 ml of methanol. Close and shake the vial and label as '*Moxifloxacin Working Sample Solution*'.

The expected concentration of moxifloxacin free base in this working sample solution is 1.25 mg per ml and should match the concentration of moxifloxacin of the higher working standard solution produced above.

#### VIII. SPOTTING

Mark an origin line parallel to and about 1.5 cm from the bottom edge of the chromatoplate and apply 2  $\mu$ l of each test and standard solution as shown in the picture opposite using the microcapillary pipettes supplied.

Up to five spots can be placed on a plate. Check the uniformity of all spots using UV light of 254 nm. All spots should be circular in shape and equally spaced across the origin line. Although their intensities might differ, their diameters never should. Different intensities are due to residual amounts of tablet and capsule excipients or different drug concentrations in the sample solutions. A difference in spot size, however, relates to poor spotting. Repeat this step if homogeneous spotting is not achieved first time.

#### IX. DEVELOPMENT

Pipette 12 ml of methanol, 4 ml of concentrated ammonia solution and 4 ml of water into the jar being used as TLC developing chamber. Close the chamber and mix thoroughly. Line the chamber's wall with filter paper and wait for about 15 minutes thus ensuring saturation of the chamber with solvent vapour. Carefully place the loaded TLC plate into the jar. Close the jar and develop the chromatoplate until the solvent front has moved about three-quarters of the length of the plate, the developing time being about 40 minutes. Remove the plate from the chamber, mark the solvent front and allow any excess solvent to evaporate using a hot plate if necessary.

#### X. DETECTION

Dry off all residual solvent and observe the chromatoplate under UV light of 254 and 366 nm using the battery-driven lamps supplied. Use these methods of detection for both, identification and quantification purposes. Make sure that the work place is really dark with little or no ambient light when operating the UV lamp of 366 nm. Further verification of drug identity and content can be achieved when observing the plate at daylight after iodine staining.

#### VII. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AMOSTRA DE TRABALHO

Pipete 1 ml da solução stock de amostra para um frasco de 10 ml e adicione 7 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. Rotule-o como "*Solução Amostra de Trabalho de Moxifloxacina*".

Estima-se que a concentração de moxifloxacina nesta solução de amostra de trabalho seja de 1,25 mg por ml e deve ser igual à concentração de moxifloxacina na solução padrão de trabalho com concentração limite superior preparada anteriormente.

#### VIII. APLICAÇÃO

Trace uma linha paralela à base da placa cromatográfica, a cerca de 1,5 cm da base, e aplique 2 µl de cada solução, de padrão e de teste, como ilustrado na figura do lado oposto, usando os microcapilares de vidro fornecidos.

Podem ser aplicadas cinco manchas numa placa. Confirme a uniformidade das manchas através da luz ultravioleta de 254 nm. Todas as manchas devem ser circulares e separadas entre si por uma distância igual ao longo da linha de base. Apesar de as suas intensidades poderem diferir, o seu diâmetro deve ser sempre igual. As diferentes intensidades devem-se a diferentes quantidades residuais de excipientes dos comprimidos e cápsulas ou devido a diferentes concentrações de fármaco na solução de amostra. Porém, se as manchas apresentarem um tamanho diferente deve-se a uma incorrecta técnica de aplicação. Repita este passo, se não conseguir uma aplicação homogénea à primeira tentativa.

#### IX. ELUIÇÃO

Pipete 12 ml de metanol, 4 ml de solução concentrada de amoníaco e 4 ml de água para o frasco que está a ser usado como câmara de eluição de CCF. Feche a câmara e misture bem. Revista a parede da câmara com papel de filtro e aguarde cerca de 15 minutos para assegurar a saturação da câmara com o vapor do solvente. Coloque, com cuidado, a placa de CCF contendo os compostos no frasco. Feche o frasco e elua a placa cromatográfica antes que a frente de solvente tenha percorrido três-quartos do comprimento da placa, tendo em conta que a eluição da placa demora cerca de 40 minutos. Remova a placa da câmara, marque a frente solvente e deixe que o excesso de solvente se evapore. Se for necessário, use a placa de aquecimento.

#### X. REVELAÇÃO

Deixe que todos os resíduos do solvente evaporem da placa cromatográfica e observe-a com luz ultravioleta de 254 e 366 nm, usando as lanternas a pilhas fornecidas. Use estes métodos de detecção para efeitos de identificação e de quantificação. Assegure-se de que o local de trabalho é escuro, com pouca ou nenhuma luz ambiente, aquando do manuseamento da luz ultravioleta de 366 nm. Para verificar a autenticidade do teor do fármaco, observe a placa à luz do dia após a coloração com iodo.

XI. CHROMATOPLATES OBSERVED UNDER UV LIGHT OF 254 AND 366 NM

Run No.1: Upper working standard representing 100% of total moxifloxacin

Run No.2: A drug product of good quality with acceptable drug content

Run No.3: A drug product of poor quality with unacceptable low drug content

Run No.4: Lower working standard representing 80% of total moxifloxacin

(Solvent front)

Principal spot observed at 254 nm

Same principal spot observed at 366 nm

(Origin line)

XII. OBSERVATION MADE AT 254 NM

A blue-violet spot at a travel distance of about 0.77 indicates the presence of moxifloxacin in the test solution. Additional strong spots generated by the test solution would point at other drugs or moxifloxacin degradation, the latter case being more likely when associated with a smaller principal spot. Auxiliary agents incorporated in the different tablet or capsule formulations might cause some fainter spots emerging near or on the origin line.

XIII. OBSERVATIONS MADE AT 366 NM

When exposing the chromatoplate to UV light of 366 nm in a dark room, all moxifloxacin spots already observed at 254 nm must now show an intense yellowish-blue fluorescence. Bear in mind that the colour shown here can be indicative only. The actual shade of the reference spot on the plate will be valid for decision making.

XIV. OBSERVATIONS MADE AT DAYLIGHT AFTER IODINE STAINING

When exposing the chromatoplate to iodine vapour, all moxifloxacin spots already observed at 254 and 366 nm are now turning yellowish brown. Still observe the plate when iodine evaporates already. Spots reflecting poor quality products will disappear first gradually followed by the reference spots representing a drug content of 80 and 100 percent, respectively.

XV. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

The moxifloxacin spot in the chromatogram obtained with the test solution must correspond in terms of colour, size, intensity, shape and travel distance to that in the chromatogram obtained with the lower and higher standard solution. This result must be obtained for each method of detection. If this is not achieved, repeat the run from scratch with a second sample. Reject the batch if the drug content cannot be verified in a third run. For precise drug content determination, refer additional samples to a fully-fledged drug quality control laboratory. Retain samples and put the batch on quarantine until a final decision on rejection or release has been taken.

#### XI. PLACAS CROMATOGRÁFICAS OBSERVADAS SOB LUZ UV DE 254 E 366 NM

1ª corrida: Padrão com concentração limite superior de trabalho, representando 100% de moxifloxacina

2ª corrida: Medicamento de boa qualidade com conteúdo aceitável de fármaco

3ª corrida: Medicamento de fraca qualidade com conteúdo de fármaco baixo e inaceitável

4ª corrida: Padrão com concentração limite inferior de trabalho, representando 80% de moxifloxacina

(Frente solvente)

Mancha principal observada a 254 nm

Mesma mancha principal observada a 366 nm

(linha de base)

#### XII. OBSERVAÇÃO A 254 NM

Uma mancha azul-violeta com uma distância relativa percorrida de cerca de 0,77 indica a presença de moxifloxacina na solução de teste. Manchas fortes adicionais formadas pela solução de teste podem indicar a presença de outros fármacos ou a degradação de moxifloxacina, estando este último caso associado a uma mancha principal mais pequena. Os agentes auxiliares incorporados nas diferentes formulações dos comprimidos ou cápsulas podem originar manchas mais fracas, perto da linha de base ou sobre esta.

#### XIII. OBSERVAÇÃO A 366 NM

Aquando da exposição da placa cromatográfica à luz ultravioleta de 366 nm num espaço escuro, todas as manchas de moxifloxacina anteriormente observadas a 254 nm devem mostrar uma fluorescência amarelo-azulada intensa. Tenha em conta que a cor revelada neste passo é apenas indicativa. A forma da mancha de referência na placa cromatográfica será, esta sim, um factor válido para uma tomada de decisão.

#### XIV. OBSERVAÇÃO À LUZ DO DIA APÓS COLORAÇÃO COM IODO

Aquando da exposição da placa cromatográfica ao vapor de iodo, todas as manchas de moxifloxacina anteriormente observadas a 254 e 366 nm tornam-se amarelo-acastanhadas. Observe a placa durante a evaporação do iodo. As manchas que denunciam um produto de fraca qualidade desaparecerão em primeiro lugar, gradualmente, seguidas pelas manchas de referência que representam um teor de fármaco de 80 e 100 por cento, respectivamente.

#### XV. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

A mancha de moxifloxacina no cromatograma obtida através da solução de teste deve corresponder, em termos de cor, tamanho, intensidade, forma e distância relativa percorrida, às manchas do cromatograma obtidas com as soluções padrão de trabalho com concentração limite inferior e superior. Deve obter este resultado para cada método de detecção. Se não conseguir obter este resultado, repita o teste do início com uma segunda amostra. Se não conseguir verificar o teor do fármaco num terceiro teste, rejeite o lote. Para determinar, de forma precisa, o teor do fármaco, envie outras amostras para um laboratório profissional de controlo de qualidade de medicamentos. Guarde algumas amostras e coloque o lote em quarentena até que se tome uma decisão final sobre a sua rejeição ou libertação.

## Proguanil

### Primary Screening via Visual Inspection and Disintegration Test

#### I. VISUAL & PHYSICAL INSPECTION

Search for deficiencies on labelling, packaging and dosage forms as described in the opening chapters on general methods and operations of the main manual. Write down all product particulars using the reporting form as a guide. Proguanil is available for the treatment of malaria usually in a co-formulation with atovaquone. For use in adults, tablets or capsules are containing a 100 mg of proguanil hydrochloride combined with 250 mg of atovaquone and for paediatric use 25 mg of proguanil hydrochloride are combined with 62.5 mg of atovaquone. Proguanil single dosage forms are more and more uncommon.

#### II. DISINTEGRATION TEST

All quick release proguanil tablets and capsules must pass the disintegration test as described in the opening chapters on general methods and operations of the main manual. They should disintegrate in water at 37 °C in less than 30 minutes. It's a major defect if a drug product doesn't pass this test.

#### III. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

Drug products from unusually cheap sources, drug products with missing or incorrect accompanying documents and drug products with defective dosage forms, packaging or with incomplete, damaged or missing labels or with labels written in a foreign language should be subjected to a thin layer chromatographic test.

### Verification of Drug Identity and Content via Thin Layer Chromatography

#### I. PRINCIPLE

Proguanil hydrochloride is extracted from tablets and capsules with methanol and determined by TLC with reference to an authentic secondary standard. When combined with atovaquone, both compounds can be analysed simultaneously following the test protocol on page 8 of this extension.

#### II. EQUIPMENT AND REAGENTS

- 1) Pestle
- 2) Aluminium foil
- 3) Funnel
- 4) Label tape
- 5) Marker pen
- 6) Pencil
- 7) 10-ml vials
- 8) Set of straight pipettes (1 to 25 ml)
- 9) Set of laboratory glass bottles (25 to 100 ml)
- 10) Merck TLC aluminium plates pre-coated with silica gel 60 F 254, size 5x10 cm
- 11) Glass microcapillaries (2- $\mu$ l filling capacity)
- 12) TLC developing chamber (500-ml jar)
- 13) Hot plate
- 14) Filter paper
- 15) Pair of scissors

## Proguanilo

Triagem Primária com Inspeção Visual e Teste de Desagregação

### I. INSPECÇÃO VISUAL & FÍSICA

Procure deficiências na rotulagem, embalagem e nas formas de dosagem, tal como descrito nos capítulos iniciais sobre os métodos e procedimentos gerais do manual principal. Registe todos os pormenores do produto, usando os formulários para relatório como orientação. O proguanilo está disponível para o tratamento da malária, normalmente em associação com atovaquona. Existem, para adultos, comprimidos ou cápsulas que contêm 100 mg de cloridrato de proguanilo combinados com 250 mg de atovaquona e, para uso pediátrico, existem comprimidos ou cápsulas com 25 mg de cloridrato de proguanilo e 62,5 mg de atovaquona. As formas farmacêuticas apenas com proguanilo são cada vez mais incomuns.

### II. TESTE DE DESAGREGAÇÃO

Todos os comprimidos e cápsulas de proguanilo de libertação rápida devem passar o teste de desagregação, tal como se descreve nos capítulos iniciais sobre métodos e procedimentos gerais do manual principal. Devem desagregar-se em água a 37 ° C em menos de 30 minutos. Se o fármaco não passar este teste, constitui um defeito importante.

### III. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

Produtos farmacêuticos a preços invulgarmente baratos, medicamentos com documentos de apoio em falta ou incorrectos e medicamentos com formas de dosagem irregulares, embalagens deficientes ou rótulos incompletos, danificados ou ausentes ou com rótulos escritos em língua estrangeira, devem ser submetidos a um teste cromatográfico em camada fina.

## Verificação da Identidade e Teor do Fármaco através da Cromatografia em Camada Fina

### I. PRINCÍPIO

O cloridrato de proguanilo é extraído de comprimidos e cápsulas com metanol e determinado por CCF, tendo em conta os padrões secundários de referência. Quando associado a atovaquona, ambos os compostos podem ser simultaneamente analisados tendo em conta o protocolo de teste na página 8 deste suplemento.

### II. EQUIPAMENTO E REAGENTES

- 1) Pilão
- 2) Folha de alumínio
- 3) Funil
- 4) Fita adesiva
- 5) Marcador
- 6) Lápis
- 7) Frascos de 10 ml
- 8) Conjunto de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
- 9) Conjunto de frascos de vidro de laboratório (25 a 100 ml)
- 10) Placas de alumínio de CCF da Merck previamente revestidas de gel de sílica 60F 254, tamanho 5x10 cm
- 11) Microcapilares de vidro (capacidade de 2 µl)
- 12) Câmara de eluição de CCF (frasco de 500 ml)
- 13) Placa de aquecimento
- 14) Papel de filtro
- 15) Tesoura

(Continuação da página 32 do texto de partida)

- 16) UV light of 254 nm
- 17) Acetone
- 18) Methanol
- 19) Glacial acetic acid
- 20) Secondary reference standard, for example, proguanil hydrochloride 100 mg tablets



(Continuação da tradução da página 32)

- 16) Luz ultravioleta de 254 nm
- 17) Acetona
- 18) Metanol
- 19) Ácido acético glacial
- 20) Padrão secundário de referência, por exemplo comprimidos de cloridrato de proguanilo de 100 mg

### III. PREPARATION OF THE STOCK STANDARD SOLUTION

The preparation of the stock standard solution requires an authentic drug product for reference purposes, for example, tablets containing 100 mg of proguanil hydrochloride. Wrap up one reference tablet into aluminium foil and crush it down to a fine powder using a pestle. Carefully empty the aluminium foil over a 25-ml laboratory glass bottle and wash down all residual solids with 20 ml of methanol using a straight pipette. Close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 5 mg of total drug per ml and be labelled as '*Proguanil Stock Standard Solution*'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquid.

### IV. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 100% (UPPER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 7 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 0.625 mg of total drug per ml and be labelled as '*Proguanil Working Standard Solution 100%*'.

This higher working standard solution represents a drug product of good quality containing 100 % of proguanil.

### V. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 80% (LOWER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 9 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 0.5 mg of total drug per ml and be labelled as '*Proguanil Working Standard Solution 80%*'.

This lower working standard solution represents a drug product of poor quality containing just 80% of the amount of proguanil as stated on the product's label. In the current investigation, this drug level represents the lower acceptable limit for a given product.

### VI. PREPARATION OF THE STOCK SAMPLE SOLUTION FROM A PRODUCT CLAIMING TO CONTAIN 25 MG OF PROGUANIL HCL PER UNIT

Take two (!) whole tablets or capsules from an appropriate drug product sampled in the field. As usual, tablets are wrapped up into aluminium foil and crushed down to a fine powder. Transfer all the powder obtained into a 25-ml laboratory glass bottle. Powder obtained from sample capsules should be transferred directly into the bottle adding the cap and body shells last. For extraction, add 10 ml of methanol using a straight pipette, close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid.

#### 100 MG OF PROGUANIL PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 20 ml of methanol using a straight pipette and a 25-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

All stock sample solutions produced should finally contain 5 mg of total drug per ml and be labelled as '*Proguanil Stock Sample Solution*'. Freshly prepare these solutions for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquids.

### III. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DO PADRÃO

A preparação da solução stock do padrão requer um medicamento autêntico para servir de referência, por exemplo comprimidos de 100 mg de cloridrato de proguanilo. Embrulhe um comprimido de referência em folha de alumínio e esmague-o, até ficar em pó fino, usando o pilão. Transfira, cuidadosamente, o conteúdo da folha de alumínio para um frasco de vidro de laboratório de 25 ml e lave o resto dos resíduos sólidos com 20 ml de metanol com uma pipeta graduada. Feche o frasco e agite durante cerca de três minutos, até que a maior parte dos sólidos se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos que não se dissolveram se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter o fármaco numa concentração total de 5 mg por ml e ser rotulada como "*Solução Stock do Padrão de Proguanilo*". Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante, límpido ou turvo.

### IV. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 100% (CONCENTRAÇÃO LIMITE SUPERIOR DE TRABALHO)

Pipete 1 ml da solução stock do padrão para um frasco de 10 ml e adicione 7 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter o fármaco numa concentração total de 0,625 mg por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Proguanilo a 100%*".

Esta solução padrão de trabalho com concentração limite superior representa um medicamento de alta qualidade que contém 100% de proguanilo.

### V. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 80% (CONCENTRAÇÃO LIMITE MÍNIMO DE TRABALHO)

Pipete 1 ml da solução stock do padrão para um frasco de 10 ml e adicione 9 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter o fármaco numa concentração total de 0,5 mg por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Proguanilo a 80%*".

Esta solução padrão de trabalho com concentração limite inferior consiste num medicamento de fraca qualidade e contém apenas 80% do proguanilo referido no rótulo do produto. Nesta investigação, este nível de fármaco representa o limite mínimo aceitável para tal produto.

### VI. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DE AMOSTRA DE UM PRODUTO DITO CONTER 25 MG DE CLORIDRATO DE PROGUAANO POR UNIDADE

Retire dois (!) comprimidos ou duas cápsulas de uma amostra do produto. Como anteriormente, os comprimidos devem ser embrulhados numa folha de alumínio e esmagados até ficarem em pó fino. Transfira todo o pó obtido para um frasco de vidro de laboratório de 25 ml. Deve transferir directamente para o frasco o pó obtido das cápsulas de amostra, adicionando, por último, o invólucro. Para proceder à extracção, adicione 10 ml de metanol, usando uma pipeta graduada, feche o frasco e agite-o durante cerca de três minutos, até que a maior parte dos sólidos se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos que não se dissolveram se depositem no fundo do frasco.

#### 100 MG DE PROGUAANO POR UNIDADE

Extraia o pó obtido da amostra de um comprimido ou de uma cápsula com 20 ml de metanol, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 25 ml, como recipiente para amostras. Continue como indicado anteriormente.

Todas as soluções stock de amostra preparadas devem, no fim do procedimento, conter o fármaco numa concentração total de 5 mg por ml e serem rotuladas como "*Solução Stock da Amostra de Proguanilo*". Prepare novas soluções para cada teste. Continue a usar os líquidos sobrenadantes, límpidos ou turvos.

#### VII. PREPARATION OF THE WORKING SAMPLE SOLUTION

Pipette 1 ml of the stock sample solution into a 10-ml vial and add 7 ml of methanol. Close and shake the vial and label as '*Proguanil Working Sample Solution*'.

The expected concentration of proguanil hydrochloride in the working sample solution is 0.625 mg per ml and should match the concentration of proguanil of the higher working standard solution produced above.

#### VIII. SPOTTING

Mark an origin line parallel to and about 1.5 cm from the bottom edge of the chromatoplate and apply 2 µl of each test and standard solution as shown in the picture opposite using the microcapillary pipettes supplied.

Up to five spots can be placed on a plate. Check the uniformity of all spots using UV light of 254 nm. All spots should be circular in shape and equally spaced across the origin line. Although their intensities might differ, their diameters never should. Different intensities are due to residual amounts of tablet and capsule excipients or different drug concentrations in the sample solutions. A difference in spot size, however, relates to poor spotting. Repeat this step if homogeneous spotting is not achieved first time.

#### IX. DEVELOPMENT

Pipette 15 ml of acetone, 5 ml of methanol and 0.5 ml of glacial acetic acid into the jar being used as TLC developing chamber. Close the chamber and mix thoroughly. Line the chamber's wall with filter paper and wait for about 15 minutes thus ensuring saturation of the chamber with solvent vapour. Carefully place the loaded TLC plate into the jar. Close the jar and develop the chromatoplate until the solvent front has moved about three-quarters of the length of the plate, the developing time being about 15 minutes. Remove the plate from the chamber, mark the solvent front and allow any excess solvent to evaporate using a hot plate if necessary.

#### X. DETECTION

Dry off all residual solvent and observe the chromatoplate under UV light of 254 nm using the battery-driven lamp supplied. Use this method of detection for both, identification and quantification purposes.

#### VII. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AMOSTRA DE TRABALHO

Pipete 1 ml da solução stock de amostra para um frasco de 10 ml e adicione 7 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. Rotule-o como "*Solução Amostra de Trabalho de Proguanilo*".

Estima-se que a concentração de cloridrato de proguanilo nesta solução de amostra seja de 0,625 mg por ml e deve ser igual à concentração de proguanilo na solução padrão de trabalho com concentração limite superior preparada anteriormente.

#### VIII. APLICAÇÃO

Trace uma linha paralela à base da placa cromatográfica, a cerca de 1,5 cm da base, e aplique 2 µl de cada solução, de padrão e de teste, como ilustrado na figura do lado oposto, usando os microcapilares de vidro fornecidos.

Podem ser aplicadas cinco manchas numa placa. Confirme a uniformidade das manchas através da luz ultravioleta de 254 nm. Todas as manchas devem ser circulares e separadas entre si por uma distância igual ao longo da linha de base. Apesar de as suas intensidades poderem diferir, o seu diâmetro deve ser sempre igual. As diferentes intensidades devem-se a diferentes quantidades residuais de excipientes dos comprimidos e cápsulas ou devido a diferentes concentrações de fármaco na solução de amostra. Porém, se as manchas apresentarem um tamanho diferente deve-se a uma incorrecta técnica de aplicação. Repita este passo, se não conseguir uma aplicação homogénea à primeira tentativa.

#### IX. ELUIÇÃO

Pipete 15 ml de acetona, 5 ml de metanol e 0,5 ml de ácido acético glacial para o frasco que está a ser usado como câmara de eluição de CCF. Feche a câmara e misture bem. Revista a parede da câmara com papel de filtro e aguarde cerca de 15 minutos para assegurar a saturação da câmara com o vapor do solvente. Coloque, com cuidado, a placa de CCF contendo os compostos no frasco. Feche o frasco e elua a placa cromatográfica antes que a frente de solvente tenha percorrido três-quartos do comprimento da placa, tendo em conta que a eluição da placa demora cerca de 15 minutos. Remova a placa da câmara, marque a frente solvente e deixe que o excesso de solvente se evapore. Se for necessário, use a placa de aquecimento.

#### X. REVELAÇÃO

Deixe que todos os resíduos do solvente evaporem da placa cromatográfica e observe-a com luz ultravioleta de 254 nm, usando a lanterna a pilhas fornecida. Use este método de detecção para efeitos de identificação e de quantificação.

XI. CHROMATOPLATE OBSERVED UNDER UV LIGHT OF 254 NM

Run No.1: Upper working standard representing 100% of total proguanil

Run No.2: A drug product of good quality with acceptable drug content

Run No.3: A drug product of poor quality with unacceptable low drug content

Run No.4: Lower working standard representing 80% of total proguanil

(Solvent front)

Principal spot for proguanil

(Origin line)

XII. OBSERVATIONS MADE AT 254 NM

A strong blue-violet spot at a travel distance of about 0.22 indicates the presence of proguanil in the test solution. When combined with atovaquone, a second spot may become visible at a travel distance of about 0.83. Additional strong spots generated by the test solution would point at other drugs or proguanil degradation, the latter case being more likely when associated with a smaller principal spot. Auxiliary agents incorporated in the different tablet or capsule formulations might cause some fainter spots emerging near or on the origin line.

XIII. RESULTS AND ACTIONS TO BE TAKEN

The proguanil spot in the chromatogram obtained with the test solution must correspond in terms of colour, size, intensity, shape and travel distance to that in the chromatogram obtained with the lower and higher standard solution. This result must be obtained for each method of detection. If this is not achieved, repeat the run from scratch with a second sample. Reject the batch if the drug content cannot be verified in a third run. For precise drug content determination, refer additional samples to a fully-fledged drug quality control laboratory. Retain samples and put the batch on quarantine until a final decision on rejection or release has been taken.

#### XI. PLACA CROMATOGRÁFICA OBSERVADA SOB LUZ UV DE 254 NM

1ª corrida: Padrão com concentração limite superior de trabalho, representando 100% de proguanilo

2ª corrida: Medicamento de boa qualidade com conteúdo aceitável de fármaco

3ª corrida: Medicamento de fraca qualidade com conteúdo de fármaco baixo e inaceitável

4ª corrida: Padrão com concentração limite inferior de trabalho, representando 80% de proguanilo

(Frente solvente)

Mancha principal de proguanilo

(linha de base)

#### XII. OBSERVAÇÃO A 254 NM

Uma mancha azul-violeta forte com uma distância relativa percorrida de cerca de 0,22 indica a presença de proguanilo na solução de teste. Quando associado a atovaquona, uma segunda mancha poderá tornar-se visível a uma distância relativa percorrida de cerca de 0,83. Manchas fortes adicionais formadas pela solução de teste podem indicar a presença de outros fármacos ou a degradação do proguanilo, estando este último caso associado a uma mancha principal mais pequena. Os agentes auxiliares incorporados nas diferentes formulações dos comprimidos e cápsulas podem originar manchas mais fracas, perto da linha de base ou sobre esta.

#### XIII. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

A mancha de proguanilo no cromatograma obtida através da solução de teste deve corresponder, em termos de cor, tamanho, intensidade, forma e distância relativa percorrida, às manchas do cromatograma obtidas com as soluções padrão de trabalho com concentração limite inferior e superior. Deve obter este resultado para cada método de detecção. Se não conseguir obter este resultado, repita o teste do início com uma segunda amostra. Se não conseguir verificar o teor do fármaco num terceiro teste, rejeite o lote. Para determinar, de forma precisa, o teor do fármaco, envie outras amostras para um laboratório profissional de controlo de qualidade de medicamentos. Guarde algumas amostras e coloque o lote em quarentena até que se tome uma decisão final sobre a sua rejeição ou libertação.

## Prothionamide

Primary Screening via Visual Inspection and Disintegration Test

### I. VISUAL & PHYSICAL INSPECTION

Search for deficiencies on labelling, packaging and dosage forms as described in the opening chapters on general methods and operations of the main manual. Write down all product particulars using the reporting form as a guide. Each tablet or capsule usually contains 250 mg of prothionamide.

### II. DISINTEGRATION TEST

All quick release prothionamide tablets and capsules must pass the disintegration test as described in the opening chapters on general methods and operations of the main manual. They should disintegrate in water at 37 °C in less than 30 minutes. It's a major defect if a drug product doesn't pass this test.

### III. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

Drug products from unusually cheap sources, drug products with missing or incorrect accompanying documents and drug products with defective dosage forms, packaging or with incomplete, damaged or missing labels or with labels written in a foreign language should be subjected to a thin layer chromatographic test.

Verification of Drug Identity and Content via Thin Layer Chromatography

### I. PRINCIPLE

Prothionamide is extracted from tablets and capsules with methanol and determined by TLC with reference to an authentic secondary standard.

### II. EQUIPMENT AND REAGENTS

- 1) Pestle
- 2) Aluminium foil
- 3) Funnel
- 4) Label tape
- 5) Marker pen
- 6) Pencil
- 7) 10-ml vials
- 8) Set of straight pipettes (1 to 25 ml)
- 9) Set of laboratory glass bottles (25 to 100 ml)
- 10) Merck TLC aluminium plates pre-coated with silica gel 60 F 254, size 5x10 cm
- 11) Glass microcapillaries (2- $\mu$ l filling capacity)
- 12) TLC developing chamber (500-ml jar)
- 13) Hot plate
- 14) Filter paper
- 15) Pair of scissors
- 16) Pair of tweezers
- 17) UV light of 254 nm



## Protionamida

Triagem Primária com Inspeção Visual e Teste de Desagregação

### I. INSPECÇÃO VISUAL & FÍSICA

Procure deficiências na rotulagem, embalagem e nas formas de dosagem, tal como descrito nos capítulos iniciais sobre os métodos e procedimentos gerais do manual principal. Registe todos os pormenores do produto, usando os formulários para relatório como orientação. Cada comprimido ou cápsula normalmente contém 250 mg de protionamida.

### II. TESTE DE DESAGREGAÇÃO

Todos os comprimidos e cápsulas de protionamida de libertação rápida devem passar o teste de desagregação, tal como se descreve nos capítulos iniciais sobre métodos e procedimentos gerais do manual principal. Devem desagregar-se em água a 37 ° C em menos de 30 minutos. Se o fármaco não passar este teste, constitui um defeito importante.

### III. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

Produtos farmacêuticos a preços vulgarmente baratos, medicamentos com documentos de apoio em falta ou incorrectos e medicamentos com formas de dosagem irregulares, embalagens deficientes ou rótulos incompletos, danificados ou ausentes ou com rótulos escritos em língua estrangeira, devem ser submetidos a um teste cromatográfico em camada fina.

Verificação da Identidade e Teor do Fármaco através da Cromatografia em Camada Fina

#### I. PRINCÍPIO

A protionamida é extraída de comprimidos e cápsulas com metanol e determinada por CCF, tendo em conta os padrões secundários de referência.

#### II. EQUIPAMENTO E REAGENTES

- 1) Pilão
- 2) Folha de alumínio
- 3) Funil
- 4) Fita adesiva
- 5) Marcador
- 6) Lápis
- 7) Frascos de 10 ml
- 8) Conjunto de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
- 9) Conjunto de frascos de vidro de laboratório (25 a 100 ml)
- 10) Placas de alumínio de CCF da Merck previamente revestidas de gel de sílica 60F 254, tamanho 5x10 cm
- 11) Microcapilares de vidro (capacidade de 2 µl)
- 12) Câmara de eluição de CCF (frasco de 500 ml)
- 13) Placa de aquecimento
- 14) Papel de filtro
- 15) Tesoura
- 16) Pinças
- 17) Luz ultravioleta de 254 nm

(Continuação da página 36 do texto de partida)

- 18) Iodine chamber
- 19) Ethyl acetate
- 20) Methanol
- 21) Secondary reference standard, for example, prothionamide 250 mg tablets

(Continuação da tradução da página 36)

18) Câmara de iodo

19) Acetato de etilo

20) Metanol

21) Padrão secundário de referência, por exemplo comprimidos de protionamida de 250 mg

### III. PREPARATION OF THE STOCK STANDARD SOLUTION

The preparation of the stock standard solution requires an authentic drug product for reference purposes, for example, tablets containing 250 mg of prothionamide. Wrap up one reference tablet into aluminium foil and crush it down to a fine powder using a pestle. Carefully empty the aluminium foil over a 40-ml laboratory glass bottle and wash down all residual solids with 25 ml of methanol using a straight pipette. Close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 10 mg of total drug per ml and be labelled as '*Prothionamide Stock Standard Solution*'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquid.

### IV. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 100% (UPPER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 3 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 2.5 mg of total drug per ml and be labelled as '*Prothionamide Working Standard Solution 100%*'.

This higher working standard solution represents a drug product of good quality containing 100 % of prothionamide.

### V. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 80% (LOWER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 4 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 2 mg of total drug per ml and be labelled as '*Prothionamide Working Standard Solution 80%*'.

This lower working standard solution represents a drug product of poor quality containing just 80% of the amount of prothionamide as stated on the product's label. In the current investigation, this drug level represents the lower acceptable limit for a given product.

### VI. PREPARATION OF THE STOCK SAMPLE SOLUTION FROM A PRODUCT CLAIMING TO CONTAIN 250 MG OF PROTHIONAMIDE PER UNIT

Take one whole tablet or capsule from an appropriate drug product sampled in the field. As usual, tablets are wrapped up into aluminium foil and crushed down to a fine powder. Transfer all the powder obtained into a 40-ml laboratory glass bottle. Powder obtained from sample capsules should be transferred directly into the bottle adding the cap and body shells last. For extraction, add 25 ml of methanol using a straight pipette, close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid.

All stock sample solutions obtained should finally contain 10 mg of total drug per ml and be labelled as '*Prothionamide Stock Sample Solution*'. Freshly prepare these solutions for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquids.

### III. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DO PADRÃO

A preparação da solução stock do padrão requer um medicamento autêntico para servir de referência, por exemplo comprimidos de 250 mg de protionamida. Embrulhe um comprimido de referência numa folha de alumínio e esmague-o, até ficar em pó fino, usando o pilão. Transfira, cuidadosamente, o conteúdo da folha de alumínio para um frasco de vidro de laboratório de 40 ml e lave o resto dos resíduos sólidos com 25 ml de metanol com uma pipeta graduada. Feche o frasco e agite durante cerca de três minutos, até que a maior parte dos sólidos se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos que não se dissolveram se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter o fármaco numa concentração total de 10 mg por ml e ser rotulada como "*Solução Stock do Padrão de Protionamida*". Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante, límpido ou turvo.

### IV. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 100% (CONCENTRAÇÃO LIMITE SUPERIOR DE TRABALHO)

Pipete 1 ml da solução stock do padrão para um frasco de 10 ml e adicione 3 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter o fármaco numa concentração total de 2,5 mg por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Protionamida a 100%*".

Esta solução padrão de trabalho com concentração limite superior representa um medicamento de alta qualidade que contém 100% de protionamida.

### V. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 80% (CONCENTRAÇÃO LIMITE MÍNIMO DE TRABALHO)

Pipete 1 ml da solução stock do padrão para um frasco de 10 ml e adicione 4 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter o fármaco numa concentração total de 2 mg por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Protionamida a 80%*".

Esta solução padrão de trabalho com concentração limite inferior consiste num medicamento de fraca qualidade e contém apenas 80% da protionamida referida no rótulo do produto. Nesta investigação, este nível de fármaco representa o limite mínimo aceitável para tal produto.

### VI. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DE AMOSTRA DE UM PRODUTO DITO CONTER 250 MG DE PROTIONAMIDA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula de uma amostra do produto. Como anteriormente, os comprimidos devem ser embrulhados numa folha de alumínio e esmagados até ficarem em pó fino. Transfira todo o pó obtido para um frasco de vidro de laboratório de 40 ml. Deve transferir directamente para o frasco o pó obtido das cápsulas de amostra, adicionando, por último, o invólucro. Para proceder à extracção, adicione 25 ml de metanol, usando uma pipeta graduada, feche o frasco e agite-o durante cerca de três minutos, até que a maior parte dos sólidos se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos que não se dissolveram se depositem no fundo do frasco.

Todas as soluções stock de amostra obtidas devem, no fim do procedimento, conter o fármaco numa concentração total de 10 mg por ml e serem rotuladas como "*Solução Stock da Amostra de Protionamida*". Prepare novas soluções para cada teste. Continue a usar os líquidos sobrenadantes, límpidos ou turvos.

#### VII. PREPARATION OF THE WORKING SAMPLE SOLUTION

Pipette 1 ml of the stock sample solution into a 10-ml vial and add 3 ml of methanol. Close and shake the vial and label as '*Prothionamide Working Sample Solution*'.

The expected concentration of prothionamide in the working sample solution is 2.5 mg per ml and should match the concentration of prothionamide of the higher working standard solution produced above.

#### VIII. SPOTTING

Mark an origin line parallel to and about 1.5 cm from the bottom edge of the chromatoplate and apply 2  $\mu$ l of each test and standard solution as shown in the picture opposite using the microcapillary pipettes supplied.

Up to five spots can be placed on a plate. Check the uniformity of all spots using UV light of 254 nm. All spots should be circular in shape and equally spaced across the origin line. Although their intensities might differ, their diameters never should. Different intensities are due to residual amounts of tablet and capsule excipients or different drug concentrations in the sample solutions. A difference in spot size, however, relates to poor spotting. Repeat this step if homogeneous spotting is not achieved first time.

#### IX. DEVELOPMENT

Pipette 18 ml of ethyl acetate and 2 ml of methanol into the jar being used as TLC developing chamber. Close the chamber and mix thoroughly. Line the chamber's wall with filter paper and wait for about 15 minutes thus ensuring saturation of the chamber with solvent vapour. Carefully place the loaded TLC plate into the jar. Close the jar and develop the chromatoplate until the solvent front has moved about three-quarters of the length of the plate, the developing time being about 10 minutes. Remove the plate from the chamber, mark the solvent front and allow any excess solvent to evaporate using a hot plate if necessary.

#### X. DETECTION

Dry off all residual solvent and observe the chromatoplate under UV light of 254 nm using the battery-driven lamp supplied. Use this method of detection for both, identification and quantification purposes. Further verification of drug identity and content can be achieved when observing the plate at daylight after iodine staining.

#### VII. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AMOSTRA DE TRABALHO

Pipete 1 ml da solução stock de amostra para um frasco de 10 ml e adicione 3 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. Rotule-o como "*Solução Amostra de Trabalho de Protionamida*".

Estima-se que a concentração de protionamida nesta solução amostra de trabalho seja de 2,5 mg por ml e deve ser igual à concentração de protionamida na solução padrão de trabalho com concentração limite superior preparada anteriormente.

#### VIII. APLICAÇÃO

Trace uma linha paralela à base da placa cromatográfica, a cerca de 1,5 cm da base, e aplique 2 µl de cada solução, de padrão e de teste, como ilustrado na figura do lado oposto, usando os microcapilares de vidro fornecidos.

Podem ser aplicadas cinco manchas numa placa. Confirme a uniformidade das manchas através da luz ultravioleta de 254 nm. Todas as manchas devem ser circulares e separadas entre si por uma distância igual ao longo da linha de base. Apesar de as suas intensidades poderem diferir, o seu diâmetro deve ser sempre igual. As diferentes intensidades devem-se devido a diferentes quantidades residuais de excipientes dos comprimidos e cápsulas ou devido a diferentes concentrações de fármacos nas soluções de amostra. Porém, se as manchas apresentarem um tamanho diferente deve-se a uma incorrecta técnica de aplicação. Repita este passo, se não conseguir uma aplicação homogénea à primeira tentativa.

#### IX. ELUIÇÃO

Pipete 18 ml de acetato de etilo e 2 ml de metanol para o frasco que está a ser usado como câmara de eluição de CCF. Feche a câmara e misture bem. Revista a parede da câmara com papel de filtro e aguarde cerca de 15 minutos para assegurar a saturação da câmara com o vapor do solvente. Coloque, com cuidado, a placa de CCF contendo os compostos no frasco. Feche o frasco e elua a placa cromatográfica antes que a frente de solvente tenha percorrido três-quartos do comprimento da placa, tendo em conta que a eluição da placa demora cerca de 10 minutos. Remova a placa da câmara, marque a frente solvente e deixe que o excesso de solvente se evapore. Se for necessário, use a placa de aquecimento.

#### X. REVELAÇÃO

Deixe que todos os resíduos do solvente evaporem da placa cromatográfica e observe-a com luz ultravioleta de 254 nm, usando a lanterna a pilhas fornecida. Use este método de detecção para efeitos de identificação e de quantificação. Para verificação adicional da autenticidade e teor do fármaco, observe a placa à luz do dia após a coloração com iodo.

XI. CHROMATOPLATE OBSERVED UNDER UV LIGHT OF 254 NM

Run No.1: Upper working standard representing 100% of total prothionamide

Run No.2: A drug product of good quality with acceptable drug content

Run No.3: A drug product of poor quality with unacceptable low drug content

Run No.4: Lower working standard representing 80% of total prothionamide

(Solvent front)

Principal spot

(Origin line)

XII. OBSERVATIONS MADE AT 254 NM

A grey-violet spot at a travel distance of about 0.52 indicates the presence of prothionamide in the test solution. Additional strong spots generated by the test solution would point at other drugs or prothionamide degradation, the latter case being more likely when associated with a smaller principal spot. Auxiliary agents incorporated in the different tablet or capsule formulations might cause some fainter spots emerging near or on the origin line.

XIII. OBSERVATIONS MADE AT DAYLIGHT AFTER IODINE STAINING

When exposing the chromatoplate to iodine vapour, all prothionamide spots already observed at 254 nm are now turning yellowish brown. Still observe the plate when iodine evaporates already. Spots reflecting poor quality products will disappear first gradually followed by the reference spots representing a drug content of 80 and 100 percent, respectively.

XIV. RESULTS & ACTION TO BE TAKEN

The prothionamide spot in the chromatogram obtained with the test solution must correspond in terms of colour, size, intensity, shape and travel distance to that in the chromatogram obtained with the lower and higher standard solution. This result must be obtained for each method of detection. If this is not achieved, repeat the run from scratch with a second sample. Reject the batch if the drug content cannot be verified in a third run. For precise drug content determination, refer additional samples to a fully-fledged drug quality control laboratory. Retain samples and put the batch on quarantine until a final decision on rejection or release has been taken.



#### XI. PLACA CROMATOGRÁFICA OBSERVADA SOB LUZ UV DE 254 NM

1ª corrida: Padrão com concentração limite superior de trabalho, representando 100% de protionamida

2ª corrida: Medicamento de boa qualidade com conteúdo aceitável de fármaco

3ª corrida: Medicamento de fraca qualidade com conteúdo de fármaco baixo e inaceitável

4ª corrida: Padrão com concentração limite inferior de trabalho, representando 80% de protionamida

(Frente solvente)

Mancha principal

(linha de base)

#### XII. OBSERVAÇÃO A 254 NM

Uma mancha cinzenta-violeta com uma distância relativa percorrida de cerca de 0,52 indica a presença de protionamida na solução de teste. Manchas fortes adicionais formadas pela solução de teste podem indicar a presença de outros fármacos ou a degradação de protionamida, estando este último caso associado a uma mancha principal mais pequena. Os agentes auxiliares incorporados nas diferentes formulações dos comprimidos ou cápsulas podem originar manchas mais fracas, perto da linha de base ou sobre esta.

#### XIII. OBSERVAÇÃO À LUZ DO DIA APÓS COLORAÇÃO COM IODO

Aquando da exposição da placa cromatográfica ao vapor de iodo, todas as manchas de protionamida anteriormente observadas a 254 nm tornam-se amarelo-acastanhadas. Observe a placa durante a evaporação do iodo. As manchas que denunciam um produto de fraca qualidade desaparecerão em primeiro lugar, gradualmente, seguidas pelas manchas de referência que representam um teor de fármaco de 80 e 100 por cento, respectivamente.

#### XIV. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

A mancha de protionamida no cromatograma obtida através da solução de teste deve corresponder, em termos de cor, tamanho, intensidade, forma e distância relativa percorrida, às manchas do cromatograma obtidas com as soluções padrão de trabalho com concentração limite inferior e superior. Deve obter este resultado para cada método de detecção. Se não conseguir obter este resultado, repita o teste do início com uma segunda amostra. Se não conseguir verificar o teor do fármaco num terceiro teste, rejeite o lote. Para determinar, de forma precisa, o teor do fármaco, envie outras amostras para um laboratório profissional de controlo de qualidade de medicamentos. Guarde algumas amostras e coloque o lote em quarentena até que se tome uma decisão final sobre a sua rejeição ou libertação.

## Summary Table of Chromatographic Working Conditions

The table below summarizes all TLC test procedures presented in full length in the previous chapter. This table is a valuable tool for people on an advanced working level not needing a detailed guide on operation procedures day-by-day anymore. The summary table might help also in organising the work when performing TLC analysis on a routine basis.

Thin layer chromatographic plates pre-coated with silica gel 60 F254 will be used as stationary phase in all cases. Spotting volume is always 2 µl for which appropriate microcapillaries are supplied. Where indicated, mobile phases cater for fixed-dose combination products (combos), too.

Active Ingredient	Final Working Concentration	Extraction Medium	Mobile Phase	Method of Detection
Albendazole	1.25 mg/ml	Glacial acetic acid	10.0 ml of toluene 4.0 ml of ethyl acetate 8.0 ml of glacial acetic acid	UV of 254 nm, iodine staining
Atovaquone (incl. proguanil combos)	1.25 mg/ml	Methanolic acetone solution	15.0 ml of acetone 5.0 ml of methanol 0.5 ml of glacial acetic acid	UV of 254 nm, iodine staining visible to the naked eye
Cefixime	1.0 mg/ml	Methanol	12.5 ml of ethyl acetate 5.0 ml of acetone 5.0 ml of glacial acetic acid 2.5 ml of water	UV of 254 nm, iodine staining
Cefuroxime axetil	1.5 mg/ml	Methanol	10.0 ml of acetone 10.0 ml of toluene 1.0 ml of glacial acetic acid	UV 254 nm, iodine staining
Halofantrine	0.625 mg/ml	Methanol	15.0 ml of acetone 5.0 ml of methanol 2.0 ml of glacial acetic acid	UV of 254 nm, iodine staining
Levofloxacin	1.25 mg/ml	Acetic acid solution 20%	14.0 ml of methanol 4.0 ml of conc. Ammonia sol. 2.0 ml of water	UV of 254 nm, UV of 366 nm, iodine staining
Moxifloxacin	1.25 mg/ml	Methanol	12.0 ml of methanol 4.0 ml of conc. ammonia sol. 2.0 ml of water	UV of 254 nm, UV of 366 nm, iodine staining
Proguanil	0.625 mg/ml	Methanol	see atovaquone	UV of 254 nm
Prothionamide	2.5 mg/ml	Methanol	18.0 ml ethyl acetate 2.0 ml of methanol	UV of 254 nm, iodine staining

Resumo dos Procedimentos do Teste por CCF

A tabela a seguir sumariza os procedimentos do teste por CCF apresentados na totalidade dos capítulos anteriores. Esta tabela é uma ferramenta útil para técnicos com um nível avançado de conhecimento que já não necessitam de um manual detalhado sobre os procedimentos operacionais para o trabalho do dia-a-dia. A utilização desta tabela pode ajudar, igualmente, na organização do trabalho rotineiro da análise por CCF.

As placas de CCF previamente revestidas de gel de sílica 60 F 254 serão usadas, em todos os casos, como fase estacionária. O volume da aplicação da amostra é sempre de 2 µl, para o qual são fornecidas pipetas apropriadas com microcapilares. As fases móveis fornecem, ainda, indicações para os produtos presentes em associação (assoc.).

Ingrediente activo	Concentração final	Meio de extracção	Fase Móvel	Método de Detecção
Albendazol	1,25 mg/ml	Ácido acético glacial	10 ml de tolueno 4 ml de acetato de etilo 8 ml de ácido acético glacial	Luz UV de 254 nm, coloração com iodo
Atovaquona (incl. assoc. com proguanil)	1,25 mg/ml	Solução metanólica de acetona	15 ml de acetona 5 ml de metanol 0,5 ml de ácido acético glacial	Luz UV de 254 nm, coloração com iodo visível a olho nu
Cefixima	1,0 mg/ml	Metanol	12,5 ml de acetato de etilo 5 ml de acetona 5 ml de ácido acético glacial 2,5 ml de água	Luz UV de 254 nm, coloração com iodo
Cefuroxima axetil	1,5 mg/ml	Metanol	10 ml de acetona 10 ml de tolueno 1 ml de ácido acético glacial	Luz UV de 254 nm, coloração com iodo
Halofantrina	0,625 mg/dl	Metanol	15 ml de acetona 5 ml de metanol 2 ml de ácido acético glacial	Luz UV de 254 nm, coloração com iodo
Levofloxacina	1,25 mg/ml	Solução de ácido acético a 20%	14 ml de metanol 4 ml de solução concentrada de amoníaco 2 ml de água	Luz UV de 254 e 366 nm, coloração com iodo
Moxifloxacina	1,25 mg/ml	Metanol	12 ml de metanol 4 ml de solução concentrada de amoníaco 2 ml de água	Luz UV de 254 e 366 nm, coloração com iodo
Proguanilo	0,625 mg/dl	Metanol	Ver atovaquona	Luz UV de 254 nm
Protionamida	2,5 mg/ml	Metanol	18 ml de acetato de etilo 2 ml de metanol	Luz UV de 254 nm, coloração com iodo

## Updated List of GPHF-Minilab® Reference Standards

The first list of reference standards reflects the kind and quantities supplied when a standard GPHF-Minilab® for thin layer chromatographic testing is ordered. The second list shows optional reference standards to be used only for expert projects or where specific regional preferences in drug therapy become applicable, for example, antiviral and antiretroviral reference standards for avian influenza and HIV/AIDS programmes and the antimalarial halofantrine for the West African region. TLC Minilabs can also be tailored to cater for specific needs in malaria and TB endemic countries. **The background list of Minilab equipment and chemicals remains unchanged.** For these items, just consult the main manual issued 2008. The Global Pharma Health Fund's logistic partner Technologie Transfer Marburg maintains an appropriate stock of inventory items ready for global shipment. There, the management of orders will be facilitated and errors be avoided when using the catalogue numbers shown in the table below. There is no minimum order value. The contact details for the procurement of replacement items or full Minilab sets are as follows:

Technologie Transfer Marburg

Auf der Kupferschmiede 1

35091 Cabe, Germany

[ttm@ttm-germany.de](mailto:ttm@ttm-germany.de)

Phone +49-6421-8737-30

Fax +49-6421-8737-37

<b>1. Standard list of GPHF- Minilab® reference standards</b>		
<i>Order No.</i>	<i>Secondary reference standards</i>	<i>Qty.</i>
	<b>Antibacterial Medicines</b>	
G5030004	Amoxicillin 500 mg – tube of 20	1
G5030005	Ampicillin 500 mg – tube of 20	1
G5030065	Cefixime 200 mg – tube of 10 NEW	1
G5030066	Cefuroxime axetil 300.7 mg (equivalent to 250 mg of cefuroxime) – tube of 10* NEW	1
G5030007	Cephalexin 250 mg – tube of 20	1
G5030008	Chloramphenicol 250 mg – tube of 20	1
G5030044	Ciprofloxacin 250 mg – tube of 20	1
G5030011	Cloxacillin 250 mg – tube of 20	1
G5030014	Erythromycin 250 mg – tube of 20	1
G5030067	Levofloxacin 250 mg – tube of 10* NEW	1
G5030026	Metronidazole 250 mg – tube of 20	1
G5030068	Moxifloxacin 400 mg – tube of 10* NEW	1
G5030030	Phenoxymethylpenicillin 250 mg – tube of 20	1
G5030012	Sulfamethoxazole /trimethoprim (cotrimoxazole) 100/20 mg – tube of 20	1
G5030039	Tetracycline hydrochloride 250 mg – tube of 20	1
	<b>Antimalarial Medicines</b>	
G5030003	Amodiaquine hydrochloride 200 mg – tube of 20	1
G5030043	Artemether 50 mg – tube of 20	1
G5030062	Artesunate 50 mg – tube of 20 (may come as 100 mg dose according to availability)	1
G5030064	Atovaquone/ proguanil hydrochloride 62.5/25 mg – tube of 10* NEW	1
G5030009	Chloroquine phosphate 250 mg – tube of 20	1
G5030022	Lumefantrine/ artemether 120/20 mg – tube of 10*	1
G5030024	Mefloquine 250 mg – tube of 10*	1
G5030032	Primaquine 15 mg – tube of 20	1
G5030069	Proguanil hydrochloride 100 mg – tube of 20 NEW	1
G5030034	Quinine sulphate 300 mg – tube of 20	1
G5030038	Sulfadoxine/pyrimethamine 500/25 mg – tube of 20	1
	<i>Table continued on the next page</i>	

Lista Atualizada Dos Padrões De Referência Do GPHF - Minilab®

A primeira lista dos padrões de referência reflecte o tipo e as quantidades do equipamento fornecido aquando do pedido de um GPHF - Minilab® padrão para testes cromatográficos de camada fina. A segunda lista mostra padrões de referência opcionais que devem ser usados apenas para projectos periciais ou casos em que se verifiquem preferências regionais específicas na farmacoterapêutica, por exemplo, programas de padrões de referência antivíricos e anti-retrovirais para a gripe aviária e VIH/SIDA e o antimalárico halofantrina para a região oeste de África. Os Minilabs de CCF podem, igualmente, ser feitos à medida e de maneira a satisfazer necessidades específicas em países endémicos de malária e TB. **A lista base do equipamento e reagentes do Minilab permanece inalterada.** Para estes itens, consulte apenas o manual principal publicado em 2008. A Technologie Transfer Marburg, parceira logística da Global Pharma Health Fund, mantém um stock apropriado de itens de inventário pronto para envio a nível mundial. Consequentemente, o uso dos números dos catálogos listados na tabela seguinte irá facilitar a gestão dos pedidos e evitar erros. Não existe valor mínimo por pedido. Os contactos para a aquisição ou troca de itens ou do Minilab inteiro são os seguintes:

Technologie Transfer Marburg

Auf der Kupferschmiede 1

35091 Cölbe, Germany

[ttm@ttm-germany.de](mailto:ttm@ttm-germany.de)

Telefone: +49-6421-8737-30

Fax: +49-6421-8737-37

<b>1. Lista padronizada dos padrões de referência do GPHF - Minilab®</b>		
<i>Nº de pedido</i>	<i>Padrões de referência secundários</i>	<i>Qtd.</i>
	<b>Medicamentos Antibacterianos</b>	
G5030004	Amoxicilina 500 mg - tubo de 20	1
G5030005	Ampicilina 500 mg - tubo de 20	1
G5030065	Cefixima 200 mg - tubo de 10 <i>NOVO</i>	1
G5030066	Cefuroxima axetil de 300,7 mg (equivalente a 250 mg de cefuroxima) - tubo de 10* <i>NOVO</i>	1
G5030007	Cefalexina 250 mg - tubo de 20	1
G5030008	Cloranfenicol 250 mg - tubo de 20	1
G5030044	Ciprofloxacina 250 mg - tubo de 20	1
G5030011	Cloxacilina 250 mg - tubo de 20	1
G5030014	Eritromicina 250 mg - tubo de 20	1
G5030067	Levofloxacina 250 mg - tubo de 10* <i>NOVO</i>	1
G5030026	Metronidazol 250 mg - tubo de 20	1
G5030068	Moxifloxacina 400 mg - tubo de 10* <i>NOVO</i>	1
G5030030	Fenoximetilpenicilina 250 mg - tubo de 20	1
G5030012	Sulfametoxazol/ trimetoprim (cotrimoxazol) 100/20 mg - tubo de 20	1
G5030039	Cloridrato de tetraciclina 250 mg - tubo de 20	1
	<b>Medicamentos Antimaláricos</b>	
G5030003	Cloridrato de amodiaquina 200 mg - tubo de 20	1
G5030043	Arteméter 50 mg - tubo de 20	1
G5030062	Artesunato 50 mg - tubo de 20 (consoante a sua disponibilidade, poderá ser fornecido numa dose de 100 mg)	1
G5030064	Atovaquona / Cloridrato de proguanilo 62,5/25 mg - tubo de 10* <i>NOVO</i>	1
G5030009	Fosfato de cloroquina 250 mg - tubo de 20	1
G5030022	Lumefantrina/ arteméter 120/20 mg - tubo de 10*	1
G5030024	Mefloquina 250 mg - tubo de 10*	1
G5030032	Primaquina 15 mg - tubo de 20	1
G5030069	Cloridrato de proguanilo 100 mg - tubo de 20 <i>NOVO</i>	1
G5030034	Sulfato de quinina 300 mg - tubo de 20	1
G5030038	Sulfadoxina/ pirimetamina 500/25 mg - tubo de 20	1
	<i>A tabela continua na página seguinte</i>	

<i>Order No.</i>	<i>Secondary reference standards, cont'd</i>	<i>Qty.</i>
	<b>Antituberculosis Medicines</b>	
G5030044	Ciprofloxacin 250 mg – tube of 20	(1)**
G5030015	Ethambutol hydrochloride 400 mg – tube of 20	1
G5030020	Isoniazid 100 mg – tube of 20	1
G5030067	Levofloxacin 250 mg – tube of 10* NEW	(1)**
G5030068	Moxifloxacin 400 mg – tube of 10* NEW	(1)**
G5030070	Prothionamide 250 mg – tube of 10* NEW	1
G5030033	Pyrazinamide 500 mg – tube of 20	1
G5030035	Rifampicin 150 mg – tube of 20	1
	<b>Anthelmintic Medicines</b>	
G5030063	Albendazole 400 mg- tube of 20 NEW	1
G5030023	Mebendazole 100 mg – tube of 20	1
G5030045	Praziquantel 600 mg – tube of 20	1
	<b>Antiasthmatic, Antiallergic and Analgesic Medicines</b>	1
G5030001	Acetylsalicylic acid 300 mg – tube of 20	1
G5030002	Aminophylline hydrate 100 mg – tube of 20	1
G5030029	Paracetamol 500 mg – tube of 20	1
G5030031	Prednisolone 5 mg – tube of 100	1
G5030036	Salbutamol 4 mg – tube of 40	1

\* also available as 20 unis/tube, \*\* already included in the list of antibacterial medicines on top of the table

<b>2. List of optional GPHF - Minilab® reference standards</b>		
<i>Order No.</i>	<i>Secondary reference standards</i>	
	<b>Antimalarial Medicines</b>	
G5030071	Halofantrine hydrochloride 250 mg – tube of 10* NEW	
	<b>Antiretroviral Medicines</b>	
G5030059	Didanosine 125 mg – tube of 10*	
G5030048	Didanosine 200 mg – tube of 10*	
G5030049	Indinavir 200 mg – tube of 10*	
G5030050	Lamiduvine 150 mg – tube of 10*	
G5030051	Nevirapine 200 mg – tube of 10*	
G5030053	Stavudine 40 mg – tube of 10*	
G5030055	Zidovudine 300 mg – tube of 10*	
	<b>Antiviral Medicines</b>	
G5030041	Oseltamivir 75 mg – tube of 10*	
	<b>Other Medicines</b>	
G5030016	Furosemide 40 mg - tube of 20	
G5030017	Glibenclamide 5 mg – tube of 40	
G5030018	Griseofulvin 125 mg – tube of 20	

\*also available as 20 units/tube

<i>Nº de pedido</i>	<i>Padrões secundários de referência, continuação</i>	<i>Qtd.</i>
	<b>Medicamentos Antituberculosos</b>	
G5030044	Ciprofloxacina 250 mg - tubo de 20	(1)**
G5030015	Cloridrato de etambutol 400 mg - tubo de 20	1
G5030020	Isoniazida 100 mg - tubo de 20	1
G5030067	Levofloxacina 250 mg - tubo de 10* NOVO	(1)**
G5030068	Moxifloxacina 400 mg - tubo de 10* NOVO	(1)**
G5030070	Protionamida 250 mg - tubo de 10* NOVO	1
G5030033	Pirazinamida 500 mg - tubo de 20	1
G5030035	Rifampicina 150 mg - tubo de 20	1
	<b>Medicamentos Anti-helmínticos</b>	
G5030063	Albendazol 400 mg - tubo de 20 NOVO	1
G5030023	Mebendazol 100 mg - tubo de 20	1
G5030045	Praziquantel 600 mg - tubo de 20	1
	<b>Medicamentos Antiasmáticos, antialérgicos e analgésicos</b>	1
G5030001	Ácido acetilsalicílico 300 mg - tubo de 20	1
G5030002	Hidrato de aminofilina 100 mg - tubo de 20	1
G5030029	Paracetamol 500 mg - tubo de 20	1
G5030031	Prednisolona 5 mg - tubo de 100	1
G5030036	Salbutamol 4 mg - tubo de 40	1

\* igualmente disponível em unidades/tubos de 20, \*\* incluídos anteriormente na lista de medicamentos antibacterianos no início da tabela

<b>2. Lista dos padrões de referência opcionais do GPHF - Minilab®</b>		
<i>Nº de pedido</i>	<i>Padrões de referência secundários</i>	
	<b>Medicamentos Antimaláricos</b>	
G5030071	Cloridrato de halofantrina 250 mg - tubo de 10* NOVO	
	<b>Medicamentos Anti-retrovirais</b>	
G5030059	Didanosina 125 mg - tubo de 10*	
G5030048	Didanosina 200 mg - tubo de 10*	
G5030049	Indinavir 200 mg - tubo de 10*	
G5030050	Lamivudina 150 mg - tubo de 10*	
G5030051	Nevirapina 200 mg - tubo de 10*	
G5030053	Estavudina 40 mg - tubo de 10*	
G5030055	Zidovudina 300 mg - tubo de 10*	
	<b>Medicamentos Antivíricos</b>	
G5030041	Osetamivir 75 mg - tubo de 10*	
	<b>Outros Medicamentos</b>	
G5030016	Furosemida 40 mg - tubo de 20	
G5030017	Glibenclamida 5 mg - tubo de 40	
G5030018	Griseofulvina 125 mg - tubo de 20	

\* igualmente disponível em unidades/tubos de 20

## Health & Safety

### Important Notice

The chemicals travelling alongside the GPHF-Minilab® as well as pharmaceuticals to be tested may contain hazardous substances. Hence, users of the Minilab and bystanders should closely follow all instructions given in this manual in order to avoid potential health risks resulting from accidental contact with these chemical and pharmaceutical substances.

Care must be exercised in the handling of chemicals and pharmaceuticals in order to avoid generating excessive dust or vapours in the atmosphere. Extraction should be used at points of activity that, in more austere circumstances, might be replaced by simple but sufficient air ventilation.

Symptoms such as drowsiness, respiratory problems, nausea or skin rash must be reported to the supervisor especially after accidental spillage of large amounts of organic solvents.

In the event of accidental spillage or splashing of liquids affecting skin or eyes, wash with copious amounts of water, report to the supervisor and if necessary, to the local surgery for further attention.

Use protective clothes and safety spectacles when handling aggressive test solutions, for example strong acids and caustic solutions.

*Use protective clothing, for example an apron and safety spectacles, prior to starting any work on drug quality testing.*



## Saúde e Segurança

### Nota importante

Os reagentes que acompanham o GPHF - Minilab®, assim como os fármacos a serem testados, podem conter substâncias perigosas. Deste modo, os utilizadores do Minilab e observadores devem seguir rigorosamente todas as instruções fornecidas neste manual, de maneira a evitar potenciais riscos de saúde resultantes do contacto accidental com estes reagentes e substâncias farmacêuticas.

Deve ter cuidado no manuseamento dos reagentes e fármacos de modo a evitar a propagação de poeiras ou vapores excessivos para a atmosfera. A extração deve ser executada em locais de trabalho em que, em circunstâncias mais austeras, possa substituído de forma simples, mas suficiente, o ar da ventilação.

Sintomas como sonolência, problemas respiratórios, náuseas ou erupções cutâneas devem ser relatadas ao supervisor, principalmente após derrame accidental de grandes quantidades de solventes orgânicos.

No caso de derrame accidental ou projecção de líquidos que possam afectar a pele ou os olhos, enxague abundantemente com água, relate ao supervisor e, se necessário, aos serviços de cirurgia locais, para posterior avaliação.

Use luvas protectoras e óculos de segurança aquando do manuseamento de soluções agressivas, por exemplo soluções de ácidos fortes ou soluções corrosivas.

*Vista roupa protectora, por exemplo um avental e óculos de segurança, antes de iniciar qualquer teste da qualidade de fármacos.*

**Page 44**

Genuine or Counterfeit?

Fighting Counterfeit Medicines – Protecting People’s Life

**Global Pharma Health Fund**

Otto-Meißner-Straße 1

60314 Frankfurt, Germany

Phone 0049-69-962387-600

Fax 0049-69-962387-609

[info@gphf.org](mailto:info@gphf.org) • [www.gphf.org](http://www.gphf.org)

A Charity Initiated and Maintained by Merck, Darmstadt Germany

**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 001-202-712-4789

Fax 001-202-216-3702

[aboni@usaid.gov](mailto:aboni@usaid.gov) • [www.usaid.gov](http://www.usaid.gov)

**United States Pharmacopeia**

Drug Quality and Information Program

12601 Twinbrook Parkway

Rockville, MD 20852-1790, USA

Phone 001-301-816-8162

Fax 001-301-816-8374

[uspdqi@usp.org](mailto:uspdqi@usp.org) • [www.uspdqi.org](http://www.uspdqi.org)

**Página 44**

Genuíno ou Contrafeito?

A Combater Medicamentos Contrafeitos - A Proteger a Vida Humana

**Global Pharma Health Fund**

Otto-Meißner-Straße 1

60314 Frankfurt, Germany

Telephone: 0049-69-962387-600

Fax: 0049-69-962387-609

[info@gphf.org](mailto:info@gphf.org) • [www.gphf.org](http://www.gphf.org)

Uma Instituição de Beneficência Iniciada e Patrocinada pela Merck Darmstadt – Alemanha

**U.S. Agency for International Development**

Office of Health, Infectious Diseases and Nutrition (Departamento da Saúde, Doenças Infecciosas e Nutrição), Ronald Reagan Bldg.,  
1300 Pennsylvania Avenue NW Washington, DC 20523-3700, EUA

Telephone: 001-202-712-4789

Fax: 001-202-216-3702

[aboni@usaid.gov](mailto:aboni@usaid.gov) • [www.usaid.gov](http://www.usaid.gov)

**United States Pharmacopeia**

Drug Quality and Information Program (Programa de Informação e Qualidade de Fármacos)

12601 Twinbrook Parkway

Rockville, MD 20852-1790, EUA

Telephone: 001-301-816-8162

Fax: 001-301-816-8374

[uspdqi@usp.org](mailto:uspdqi@usp.org) • [www.uspdqi.org](http://www.uspdqi.org)